Biologia Molecular da
CÉLULA

5ª Edição



ALBERTS JOHNSON LEWIS RAFF ROBERTS WALTER



Inclui CD-ROM



Bruce Alberts doutorou-se na Universidade de Harvard e é professor de Bioquímica e Biofísica na Universidade da Califórnia, São Francisco. Por 12 anos, atuou como presidente da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos (1993-2005). **Alexander Johnson** doutorou-se na Universidade de Harvard e é professor de Microbiologia e Imunologia e diretor do Programa de Bioquímica, Biologia Celular, Genética e Biologia do Desenvolvimento na Universidade da Califórnia, São Francisco. **Julian Lewis** doutorou-se em Filosofia na Universidade de Oxford e é cientista sênior no London Research Institute of Cancer Research UK. **Martin Raff** é mestre pela Universidade McGill e atua no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Conselho de Pesquisas Médicas e no Departamento de Biologia no University College, Londres. **Keith Roberts** doutorou-se na Universidade de Cambridge e é *Fellow* emérito do John Innes Center, Norwich. **Peter Walter** doutorou-se na Universidade Rockefeller em Nova Iorque, é professor e chefe do Departamento de Bioquímica e Biofísica na Universidade da Califórnia, São Francisco, e investigador do Instituto Médico Howard Hughes.



B615 Biologia molecular da célula [recurso eletrônico] / Bruce Alberts ... [et al.] ; tradução Ana Letícia Vanz ... [et al.]. – 5. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2010.

Editado também como livro impresso em 2010
ISBN 978-85-363-2170-7

1. Biologia molecular – Célula. I. Alberts, Bruce.

CDU 577.2:576.3

Catalogação na publicação: Renata de Souza Borges CRB-10/1922

ALBERTS JOHNSON LEWIS RAFF ROBERTS WALTER

Biologia Molecular da CÉLULA

5ª Edição

Consultoria, supervisão e revisão técnica desta edição:

Gaby Renard
Mestre e doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pesquisadora da QuatroG Pesquisa & Desenvolvimento/TECNOPUC.

Jocelei Maria Chies
Mestre em Genética pela UFRGS. Doutora em Biologia Molecular pela UnB. Pesquisadora da QuatroG Pesquisa & Desenvolvimento/TECNOPUC.

Versão impressa
desta obra: 2010



2010

Obra originalmente publicada sob o título
Molecular biology of the cell, 5th Edition
ISBN 978-0-8153-4105-5

© 2008, 2002 by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter.
©1983, 1989, 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson.
All rights reserved. Authorized translation from English language edition published by Garland Science, part of Taylor & Francis Group, LLC.

Este livro contém informações obtidas de fontes autênticas e altamente respeitadas. O material citado possui permissão, bem como as fontes são indicadas. Amplos esforços foram empregados para publicar dados e informações confiáveis, porém os autores e a Editora não podem ser responsabilizados por erros ou omissões ou quaisquer consequências advindas da aplicação incorreta de informação contida nesta obra.

Capa: *Mário Röhnelt*

Preparação de originais: *Luana Janini Peixoto*

Leitura final: *Lara Gobhardt Martins*

Editora Sênior – Biociências: *Letícia Bispo de Lima*

Editora Júnior – Biociências: *Carla Casaril Paludo*

Editoração eletrônica: *Techbooks*

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
ARTMED® EDITORA S.A.
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 - Santana
90040-340 Porto Alegre RS
Fone (51) 3027-7000 Fax (51) 3027-7070

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte,
sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação,
fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

SÃO PAULO
Av. Embaixador Macedo Soares, 10.735 - Pavilhão 5 - Cond. Espace Center
Vila Anastácio 05095-035 São Paulo SP
Fone (11) 3665-1100 Fax (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444

IMPRESSO NO BRASIL
PRINTED IN BRAZIL

Equipe de tradução

Ana Letícia de Souza Vanz (Índice remissivo)
Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Doutoranda em Bioquímica pela Leibniz Universität Hannover, Alemanha.

Anne D. Villela (Iniciais)
Mestre e doutoranda em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS.

Ardala Elisa Breda Andrade (Cap. 3, 14, 22 e Glossário)
Mestre e doutoranda em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS.

Carlos Alexandre Sanches Ferreira (Cap. 7)
Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS. Professor adjunto e diretor da Faculdade de Biociências da PUCRS.

Carlos Termignoni (Cap. 2)
Doutor em Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Professor adjunto do Departamento de Bioquímica e pesquisador do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Cláudia Paiva Nunes (Cap. 12 e 18)
Mestre e doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS. Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento/TECNOPUC.

Cristopher Zandoná Schneider (Cap. 17 e 22)
Mestre e doutor em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS. Pesquisador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Tuberculose e do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional do Instituto de Pesquisas Biomédicas (CPBMF/IPB) da PUCRS.

Denise C. Machado (Cap. 10, 19 e 25)
Doutora em Imunologia pela University of Sheffield, Inglaterra. Professora e pesquisadora do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Diógenes Santiago Santos (Cap. 20 e 24)
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela UNIFESP. Professor adjunto da PUCRS. Coordenador do INCT em Tuberculose e do CPBMF/IPB da PUCRS.

GabyRenard (Cap. 8, 9, 14 e Glossário)
Mestre e doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS. Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento/TECNOPUC.

Giancarlo Pasquali (Cap. 14)
Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Universidade de Leiden, Holanda. Professor adjunto do Departamento de Biologia Molecular e pesquisador do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Heique Marlis Bogdawa (Cap. 1)
Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.

Jacqueline Moraes Cardone (Cap. 13)
Mestre e doutora em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Pós-doutoranda no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

José Arthur B. Chies (Cap. 6, 11 e 16)
Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Doutor em Sciences de La Vie, Specialité en Immunologie, pela Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie). Professor associado do Departamento de Genética da UFRGS.

José Eduardo Nunes Saconni (Glossário)
Mestrando em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS.

Rosane Machado Scheibe (Cap. 4 e 5)
Doutora em Biologia Molecular pela University of Sheffield, Inglaterra.

Rui Fernando Felix Lopes (Cap. 21 e 23)
Mestre em Ciências Veterinárias pela UFRGS. Doutor em Zootecnia pela UFRGS. Professor associado do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Sandra Estrazulas Farias (Cap. 15)
Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela UNIFESP. Professora adjunta do Departamento de Fisiologia e pesquisadora do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Prefácio

Em diversos aspectos, compreendemos melhor a estrutura do universo do que o funcionamento das células vivas. Cientistas podem calcular a idade do Sol e prever quando ele vai parar de irradiar luz, mas não podem explicar por que um ser humano pode viver 80 anos e um camundongo apenas dois. Sabemos as sequências completas do genoma destas e de muitas outras espécies, porém ainda não podemos antever como a célula se comportará se mutarmos um gene anteriormente não estudado. As estrelas talvez sejam 10^{43} vezes maiores do que as células, mas estas são mais complexas, possuem estruturas mais complicadas e são os produtos mais surpreendentes das leis da física e química. Por meio da hereditariedade e da seleção natural, operando desde o início da vida na Terra até os dias atuais – isto é, aproximadamente 20% da idade do Universo –, células vivas têm sido progressivamente refinadas e têm estendido sua maquinaria molecular, além de registrarem os resultados dos seus experimentos nas instruções genéticas que passam para a sua progênie.

A cada edição deste livro, surpreendemo-nos com a informação nova reunida em poucos anos por biólogos, mas ficamos ainda mais impressionados com a sofisticação dos mecanismos que encontramos. Quanto mais a fundo investigamos o interior da célula, mais percebemos o quanto ainda deve ser entendido. Ingenuamente, trabalhando na 1ª edição, comemoramos a identificação de uma única proteína – um receptor de sinal – como um excelente passo adiante. Agora sabemos que cada proteína é comumente parte de um complexo com muitas outras, trabalhando juntas como um sistema, regulando as atividades umas das outras de forma sutil e sendo mantidas em posições específicas pela ligação a proteínas de sustentação que dão à fábrica química uma estrutura espacial definida. O sequenciamento do genoma nos forneceu partes de listas moleculares completas para muitos organismos diferentes; a genética e a bioquímica nos mostraram uma boa proposta a respeito do que aquelas partes são capazes individualmente e quais partes interagem com as outras; mas temos somente a mais ínfima compreensão sobre a dinâmica desses sistemas bioquímicos, com todos seus controles integrados. Então, embora haja excelentes realizações para relatar, os biólogos encaram desafios ainda mais importantes para o futuro.

Nesta edição, a fim de incluir os mais recentes avanços, foram acrescentados novos tópicos, abrangendo desde epigenética, modificações nas histonas, pequenos RNAs nucleares e genômica comparativa, até dinâmica do citoesqueleto, controle do ciclo celular, apoptose, células-tronco e câncer. Como nas edições anteriores, filtramos e organizamos a grande quantidade de informações existente sobre as células, a fim de facilitar o entendimento do assunto por parte dos leitores. Isso significa ir além da exposição de fatos e aprender como colocá-los em uso para justificar, predizer e controlar o comportamento dos sistemas vivos.

A fim de elaborar um livro-texto mais portátil, alteramos o projeto gráfico da obra, permanecendo nela os Capítulos 1 a 20 (que abrangem o essencial da biologia celular) e em CD-ROM anexo ao livro (formato PDF®) os Capítulos 21 a 25 (que abrangem os sistemas multicelulares). Queremos enfatizar que os capítulos eletrônicos foram revisados e atualizados tanto quanto os impressos e sinceramente esperamos que sejam lidos!

Os capítulos estão organizados numa sequência lógica de cinco Partes:

- A **Parte I** aborda a bioquímica básica. Os capítulos podem servir ou como uma introdução àqueles que não estudaram bioquímica ou como reciclagem àqueles que já a estudaram.
- A **Parte II** trata do armazenamento, da expressão e da transmissão de informações genéticas.
- A **Parte III** apresenta os princípios dos métodos experimentais de investigação celular mais importantes.
- A **Parte IV** discute a organização interna da célula.

- A **Parte V** traz o comportamento celular nos organismos multicelulares, junções celulares, adesão celular, matriz extracelular e câncer. Os Capítulos 21 a 25 complementam a Parte V abordando reprodução sexuada, células-tronco, organismos multicelulares e sistema imune adaptativo.

Para que os leitores possam testar seu conhecimento a respeito do assunto abordado, incluímos pela primeira vez questões ao final de cada capítulo, elaboradas por John Wilson e Tim Hunt, enfatizando uma abordagem quantitativa e o raciocínio a partir de experimentos. Também foram incluídos ao longo do livro tabelas e painéis, como destaques especiais.

Uma lista concisa de referências selecionadas foi incluída no final de cada capítulo, sendo apresentadas em ordem alfabética. Essas referências frequentemente incluem os artigos originais em que descobertas importantes foram noticiadas pela primeira vez. O Capítulo 8 inclui várias tabelas, as quais destacam os grandes acontecimentos e descobertas, bem como nomes de cientistas envolvidos e ano. De maneira geral, a política do livro foi evitar nomear cientistas individualmente.

Detalhes completos das convenções adotadas no livro são fornecidos na Nota ao leitor. Como pode ser verificado, escolhemos uma abordagem eficiente em confrontar as diferentes regras para a escrita dos nomes de genes e proteínas.

Professores têm à disposição (formato PowerPoint®) lâminas com figuras, quadros e tabelas, bem como painéis (formato PDF®) do livro (www.artmed.com.br – Áreado Professor), para elaboração de suas aulas.

Como sempre, somos gratos a muitas pessoas. Os agradecimentos pela ajuda científica são dados separadamente, mas escolhemos, para citar aqui, algumas contribuições excepcionalmente importantes: Julie Theriot tem participação de destaque nos Capítulos 16 (Citoesqueleto) e 24 (Patógenos, Infecção e Imunidade Inata), assim como David Morgan pelo Capítulo 17 (Ciclo Celular). Wallace Marshall e Laura Attardi contribuíram de forma essencial com os Capítulos 8 (Manipulação de Proteínas, DNA e RNA) e 20 (Câncer), respectivamente, como fez Maynard Olson para a parte de genomas do Capítulo 4 (DNA, Cromossomos e Genomas), Xiaodong Wang para o Capítulo 18 (Apoptose) e Nicholas Harberd para a parte de plantas do Capítulo 15 (Mecanismos da Comunicação Celular).

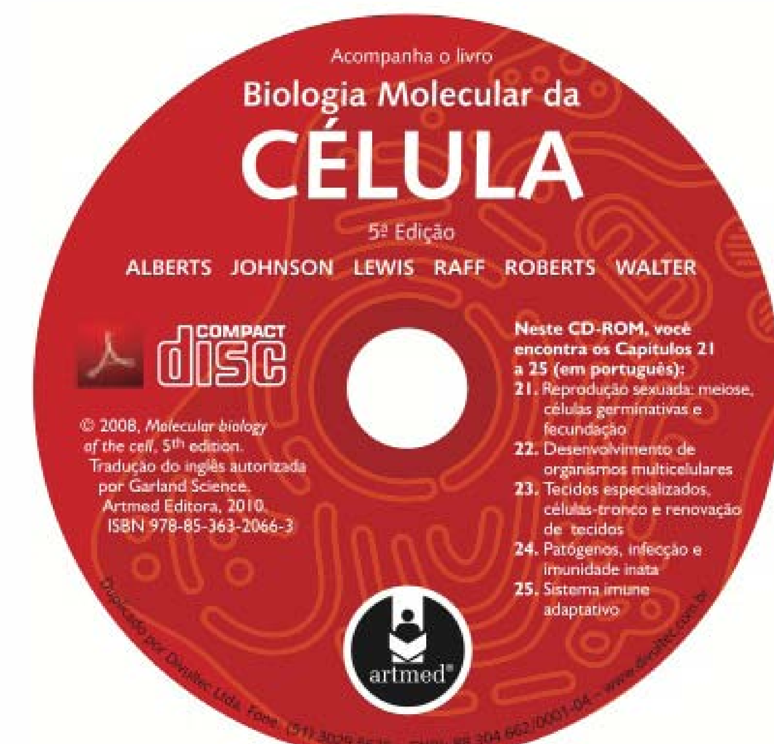
Também temos um enorme débito com a equipe de profissionais da Garland Science e outros que ajudaram a converter os esforços dos escritores em um produto final de qualidade. Denise Schanck gerenciou todo o trabalho e orientou, com sabedoria, competência e generosidade, os autores durante a produção da obra. Nigel Orme definiu o projeto gráfico final e supervisionou os aspectos visuais do livro, incluindo a quarta capa. Matthew McClements organizou o projeto da obra e também sua capa. Emma Jeffcock editorou a obra com velocidade e eficiência extraordinárias. Eleanor Lawrence e Sherry Granum atualizaram e estenderam o glossário. Jackie Harbor e Sigrid Masson nos mantiveram organizados. Adam Sendroff nos manteve informados sobre os nossos leitores, suas necessidades e reações. Marjorie Anderson, Bruce Goatly e Sherry Granum examinaram minuciosamente o conteúdo em busca de erros. Agradecemos a todos eles, não somente por sua competência profissional, dedicação e eficiência, que supera nossa própria, mas também pela ajuda e amizade inesgotáveis. Eles fizeram com que fosse um prazer trabalhar neste livro.

Por último, mas não com menos importância, agradecemos nossos cônjuges, familiares, amigos e colegas. Sem sua paciência e grande apoio, não poderíamos ter produzido quaisquer edições desta obra.

Os autores

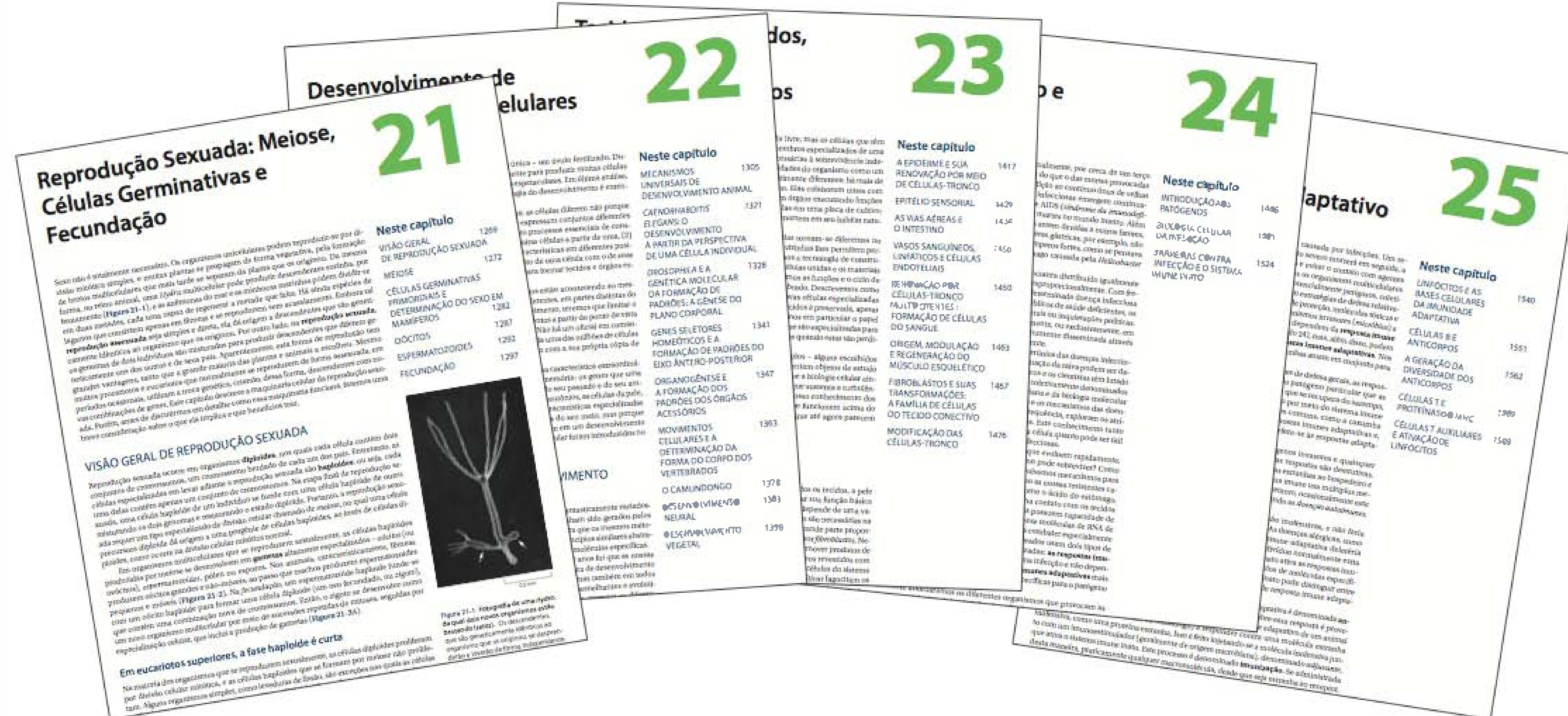
Nota ao leitor

O leitor encontrará nesta edição diversos diferenciais que tornam a obra ainda mais didática.



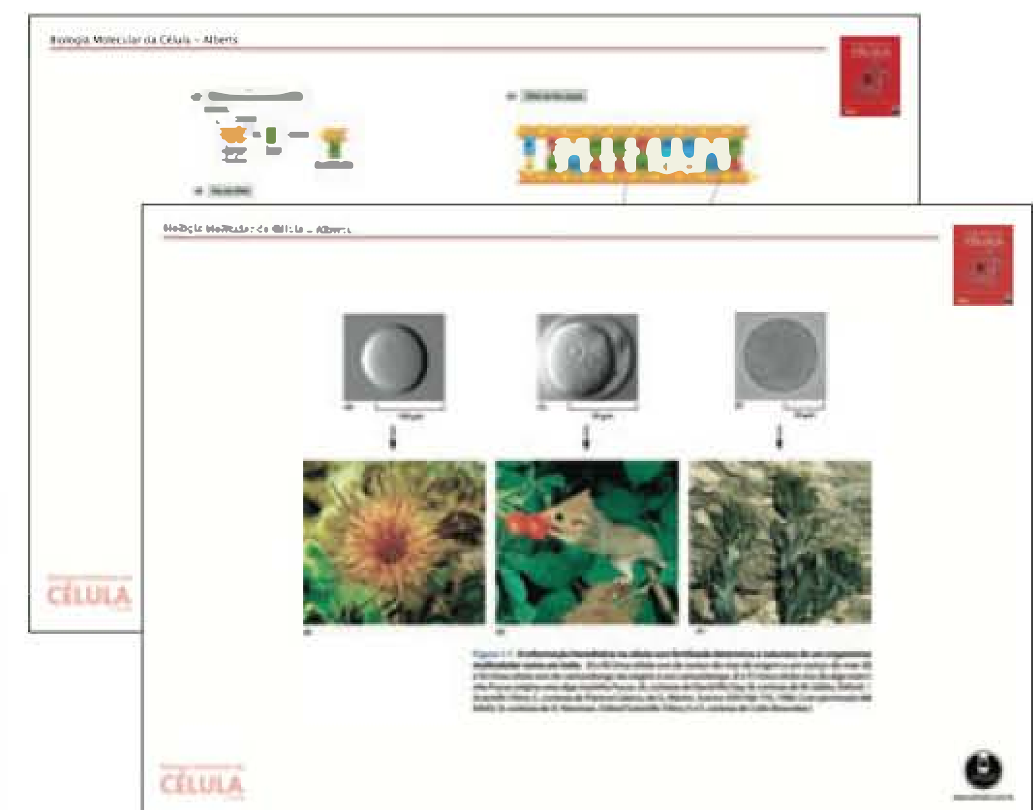
Anexo ao livro

Com o objetivo de elaborar uma obra mais portátil, os Capítulos 21 a 25 (em português) são disponibilizados (em formato PDF®) em CD-ROM anexo ao livro, complementando a Parte V.



Na Área do Professor, em www.artmed.com.br

Figuras, quadros e tabelas (em português), em formato PowerPoint®, poderão ser utilizados como recurso didático na sala de aula.



Os painéis (em português), disponíveis em formato PDF®, auxiliarão o professor ao preparar suas aulas.

> **TESTE SEU CONHECIMENTO**
>
> **Quais afirmações estão corretas? Justifique.**
>
> 1-1 Os genes da hemoglobina humana, que estão arranjados em grupos em dois cromossomos, fornecem um bom exemplo de um conjunto de genes ortólogos.
>
> 1-2 A transferência genética horizontal é mais predominante em organismos unicelulares do que em organismos multicelulares.
>
> 1-3 A maioria das sequências de DNA em um genoma bacteriano codifica proteínas, enquanto que a maioria das sequências no genoma humano não.
>
> **Discuta as seguintes questões.**
>
> 1-4 Uma vez que o código genético foi decifrado há quatro décadas, alguns alegam que ele é um ancestral "congelado", enquanto outros têm afirmado que ele foi moldado por seleção natural. Uma

Teste seu conhecimento
Novidade nesta edição, a obra conta, ao final de cada capítulo, com o item "Teste seu conhecimento". São diversas questões, escritas por John Wilson e Tim Hunt, que auxiliarão os leitores a fixar os assuntos abordados ao longo dos capítulos.

Glossário
No decorrer do livro, quando o termo merece destaque, ele aparece em **negrito**, indicando que ali é abordado em mais detalhes. *Itálico* também é utilizado para chamar a atenção de termos importantes com um menor grau de ênfase. No final do livro, há o glossário, que abrange termos técnicos que são parte da terminologia usual de biologia celular; é indicado como o primeiro recurso para o leitor ao encontrar termos com os quais não está familiarizado.

Nomenclatura
As convenções para nomear genes ou proteínas são bastante variadas. Por motivos didáticos, não utilizaremos na obra essas convenções, seguindo então uma única regra: **escrevemos todos os nomes de genes, como os nomes de pessoas e lugares, com a primeira letra maiúscula e as letras seguintes minúsculas, mas todas em itálico**, deste modo: *Apc, Bazooka, Cdc2, Dishevelled, Egl1*. A **proteína correspondente, se possuir seu nome originado do gene, será então escrita da mesma forma, mas não com as letras em itálico**: Apc, Bazooka, Cdc2, Dishevelled, Egl1. Quando é necessário especificar o organismo, isto pode ser feito com um prefixo para o nome do gene.

Para completar, listamos outros detalhes das convenções que seguimos. Em alguns exemplos, uma letra adicionada ao nome do gene é tradicionalmente usada para distinguir entre genes relacionados quanto à função ou à evolução; para esses genes, colocamos a letra em maiúsculo se for comum fazê-lo (*LacZ, RecA, HoxA4*). Não usamos hífen para separar as letras ou os números adicionados ao nome. As proteínas são mais um problema: muitas delas têm nomes particulares, designados antes de o gene ser nomeado. Tais nomes de proteínas têm muitas variantes, embora a maioria deles tradicionalmente inicie com letra minúscula (actina, hemoglobina, catalase), como nomes de objetos comuns (queijo, náilon), a menos que sejam abreviados (como GFP, para proteína fluorescente verde [*Green Fluorescent Protein*], ou BMP4, para proteína morfogenética óssea #4 [*Bone Morphogenetic Protein #4*]). Determinar todos os nomes de proteínas utilizando um estilo uniforme alteraria muito as convenções já estabelecidas, e devemos simplesmente escrevê-los na forma tradicional (actina, GFP, etc.). Para os nomes dos genes correspondentes em todos estes casos, no entanto, seguimos a nossa regra-padrão: *Actina, Hemoglobina, Catalase, Bmp4, Gfp*. Ocasionalmente, no livro, precisamos dar destaque ao nome de uma proteína e, para isso, utilizamos *itálico*, cuja finalidade geralmente ficará evidente no contexto.

	Convenção utilizada neste livro	
Organismo	**Gene**	**Proteína**
Camundongo	*HoxA4*	HoxA4
	Bmp4	BMP4
	Integrina α1, Itgα1	integrina α1
Humano	*HoxA4*	HoxA4
Peixe-zebra	*Cyclops, Cyc*	Cyclops, Cyc
Caenorhabditis	*Unc6*	Unc6
Drosophila	*Sevenless, Sev*	Sevenless, Sev
	Deformed, Dfd	Deformed, Dfd
Levedura		
Saccharomyces cerevisae (brotamento)	*Cdc28*	Cdc28
Schizosaccharomyces pombe (divisão)	*Cdc2*	Cdc2
Arabidopsis	*Gai*	GAI
E. coli	*UvrA*	UvrA

Agradecimentos

Ao escrever este livro, fomos beneficiados pelas sugestões de muitos biólogos e bioquímicos. Gostaríamos de agradecer aos seguintes cientistas por suas sugestões na preparação desta edição, assim como àqueles que nos ajudaram a preparar a 1ª, a 2ª, a 3ª e a 4ª edições. (Os que ajudaram nesta edição são citados primeiro.)

Capítulo 1: W. Ford Doolittle (Dalhousie University, Canada), Jennifer Frazier (Exploratorium®, San Francisco), Douglas Kellogg (University of California, Santa Cruz), Eugene Koonin (National Institutes of Health), Mitchell Sogin (Woods Hole Institute)

Capítulo 2: Michael Cox (University of Wisconsin, Madison), Christopher Mathews (Oregon State University), Donald Voet (University of Pennsylvania), John Wilson (Baylor College of Medicine)

Capítulo 3: David Eisenberg (University of California, Los Angeles), Louise Johnson (University of Oxford), Steve Harrison (Harvard University), Greg Petsko (Brandeis University), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Janet Thornton (European Bioinformatics Institute, UK)

Capítulo 4: David Allis (The Rockefeller University), Adrian Bird (Wellcome Trust Center, UK), Gary Felsenfeld (National Institutes of Health), Susan Gasser (University of Geneva, Switzerland), Eric Green (National Institutes of Health), Douglas Koshland (Carnegie Institution of Washington, Baltimore), Ulrich Laemmli (University of Geneva, Switzerland), Michael Lynch (Indiana University), Hiten Madhani (University of California, San Francisco), Elliott Margulies (National Institutes of Health), Geeta Narlikar (University of California, San Francisco), Maynard Olson (University of Washington)

Capítulo 5: Elizabeth Blackburn (University of California, San Francisco), James Haber (Brandeis University), Nancy Kleckner (Harvard University), Joachim Li (University of California, San Francisco), Thomas Lindahl (Cancer Research, UK), Rodney Rothstein (Columbia University), Aziz Sancar (University of North Carolina, Chapel Hill), Bruce Stillman (Cold Spring Harbor Laboratory), Steven West (Cancer Research, UK), Rick Wood (University of Pittsburgh)

Capítulo 6: Raul Andino (University of California, San Francisco), David Bartel (Massachusetts Institute of Technology), Richard Ebright (Rutgers University), Daniel Finley (Harvard University), Joseph Gall (Carnegie Institute of Washington), Michael Green (University of Massachusetts Medical School), Carol Gross (University of California, San Francisco), Christine Guthrie (University of California, San Francisco), Art Horwich (Yale University School of Medicine), Roger Kornberg (Stanford University), Reinhard Lührman (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen), Quinn Mitrovich (University of California, San Francisco), Harry Noller (University of California, Santa Cruz), Roy Parker (University of Arizona), Robert Sauer (Massachusetts Institute of Technology), Joan Steitz (Yale University), Jack Szostak (Harvard Medical School, Howard Hughes Medical Institute), David Tollervey (University of Edinburgh, UK), Alexander Varshavsky (California Institute of Technology), Jonathan Weissman (University of California, San Francisco)

Capítulo 7: Raul Andino (University of California, San Francisco), David Bartel (Massachusetts Institute of Technology), Michael Bulger (University of Rochester Medical Center), Michael Green (University of Massachusetts Medical School), Carol Gross (University of California, San Francisco), Frank Holstege (University Medical Center, The Netherlands), Roger Kornberg (Stanford University), Hiten Madhani (University of California, San Francisco), Barbara Panning (University of California, San Francisco), Mark Ptashne (Memorial Sloan-Kettering Center), Ueli Schibler (University of Genebra, Switzerland), Azim Surani (University of Cambridge)

Capítulo 8: Wallace Marshall [contribuição principal] (University of California, San Francisco)

Capítulo 9: Wolfgang Baumeister (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried), Ken Sawin (The Wellcome Trust Centre for Cell Biology, UK), Peter Shaw (John Innes Centre, UK), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute for Biophysics, Frankfurt am Main), Ronald Vale (University of California, San Francisco), Jennifer Lippincott-Schwartz (National Institutes of Health)

Capítulo 10: Ari Helenius (Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Switzerland), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main), Dieter Osterhelt (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried), Kai Simons (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden)

Capítulo 11: Wolfhard Almers (Oregon Health and Science University), Robert Edwards (University of California, San Francisco), Bertil Hille (University of Washington), Lily Jan (University of California, San Francisco), Roger Nicoll (University of California, San Francisco), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Patrick Williamson (University of Massachusetts, Amherst)

Capítulo 12: Larry Gerace (The Scripps Research Institute), Ramanujan Hegde (National Institutes of Health), Nikolaus Pfanner (University of Freiburg, Germany), Daniel Schnell (University of Massachusetts, Amherst), Karsten Weis (University of California, Berkeley), Susan Wente (Vanderbilt University Medical Center), Pat Williamson (University of Massachusetts, Amherst)

Capítulo 13: Scott Emr (University of California, San Diego), Ben Glick (University of Chicago), Ari Helenius (Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Switzerland), Ira Melhnan (Yale University), Hugh Pelham (The Medical Research Council, Cambridge), Giampietro Schiavo (London Research Institute), Graham Warren (Yale University), Marino Zerial (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Frankfurt am Main)

Capítulo 14: Michael Gray (Dalhousie University), Andrew Halestrap (University of Bristol, UK), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt am Main), Craig Thompson (Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania), Michael Yaffe (University of California, San Diego)

Capítulo 15: Nicholas Harberd [contribuição importante] (John Innes Centre, UK), Henry Bourne (University of California, San Francisco), Dennis Bray (University of Cambridge), James Briscoe (National Institute for Medical Research, UK), James Ferrell (Stanford University), Matthew Freeman (Laboratory of Molecular Biology, UK), Alfred Gilman (The University of Texas Southwestern Medical Center), Sankar Ghosh (Yale University School of Medicine), Alan Hall (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), Carl-Henrik Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Sweden), Robin Irvine (University of Cambridge), Michael Karin (University of California, San Diego), Elliott Meyerowitz (California Institute of Technology), Roel Nusse (Stanford University), Tony Pawson (Mount Sinai Hospital, Toronto), Julie Pitcher (University College London), Len Stephens (The Babraham Institute, UK)

Capítulo 16: Julie Theriot [contribuição principal] (Stanford University), Henry Bourne (University of California, San Francisco), Larry Goldstein (University of California, San Diego), Alan Hall (MRC Laboratory of Molecular Biology and Cell Biology, UK), Joe Howard (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden), Laura Machesky (The University of Birmingham, UK), Timothy Mitchison (Harvard Medical School), Ronald Vale (University of California, San Francisco)

Capítulo 17: David Morgan [contribuição principal] (University of California, San Francisco), Arshad Desai (University of California, San Diego), Bruce Edgar (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), Michael Glotzer (University of Chicago), Rebecca Heald (University of California, Berkeley), Eric Karsenti (European Molecular Biology Laboratory, Germany), Kim Nasmyth (University of Oxford), Jonathan Pines (Gurdon Institute, Cambridge), Charles Sherr (St. Jude Children's Hospital)

Capítulo 18: Xiaodong Wang [contribuição importante] (The University of Texas Southwestern Medical School), Jerry Adams (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia), Douglas Green (St. Jude Children's Hospital), Shigekazu Nagata (Kyoto University, Japan)

Capítulo 19: Jeffrey Axelrod (Stanford University Medical Center), Walter Birchmeier (Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Germany), Keith Burridge (University of North Carolina, Chapel Hill), John Couchman (Imperial College, UK), Caroline Damsky (University of California, San Francisco), Mathias Falk (Lehigh University), David Garrod (University of Manchester, UK), Daniel Goodenough (Harvard Medical School), Martin Humphries (University of Manchester, UK), Richard Hynes (Massachusetts Institute of Technology), Ken Keegstra (Michigan State University), Morgan Sheng (Massachusetts Institute of Technology), Charles Streuli (University of Manchester, UK), Masatoshi Takeichi (RIKEN Kobe Institute, Japan), Kenneth Yamada (National Institutes of Health).

Capítulo 20: Laura Attardi [contribuição importante] (Stanford University), Anton Berns (Netherlands Cancer Institute, The Netherlands), Michael Bishop (University of California, San Francisco), Fred Bunz (Johns Hopkins), Johann De-Bono (The Institute of Cancer Research, UK), John Dick (University of Toronto, Canada), Paul Edwards (University of Cambridge), Douglas Hanahan (University of California, San Francisco), Joseph Lipsick (Stanford University School of Medicine), Scott Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory), Bruce Ponder (University of Cambridge), Craig Thompson (University of Pennsylvania), Ian Tomlinson (Cancer Research, UK), Robert Weinberg (Massachusetts Institute of Technology)

Capítulo 21: Patricia Calarco (University of California, San Francisco), John Carroll (University College London), Abby Dernburg (University of Califonia, Berkeley), Scott Hawley (Stowers Institute for Medical Research, Kansas City), Neil Hunter (University of California, Davis), Nancy Kleckner (Harvard University), Anne McLaren (Wellcome/ CancerResearch Campaign Institute, Cambridge), Diana Myles (University of California, Davis), Terry Orr-Weaver (Massachusetts Institute of Technology), Renee Reijo (University of California, San Francisco), Gerald Schatten (Pittsburgh Development Center), Azim Surani (The Gurdon Institute, UK), Paul Wassarman (Mount Sinai School of Medicine)

Capítulo 22: Julie Ahringer (The Gurdon Institute, UK), Konrad Basler (University of Zürich, Switzerland), Richard Harland (University of California, Berkeley), Brigid Hogan (Duke University), Kenneth Irvine (Rutgers University), Daniel St. Johnson (The Gurdon Institute, UK), Elliott Meyerowitz (California Institute of Technology), William McGinnis (University of California, San Diego), Elizabeth Robertson (The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, UK), Francois Schweisguth (French National Centre for Scientific Research, France), Jim Smith (The Gurdon Institute, UK), Nicolas Tapon (London Research Institute)

Capítulo 23: Ralf Adams (London Research Institute), Hans Clevers (Hubrecht Institute, The Netherlands), Jeffrey Gordon (Washington University, St. Louis), Holger Gerhardt (London Research Institute), Simon Hughes (Kings College, UK), Daniel Louvard (Institut Curie, France), Bjorn Olsen (Harvard Medical School), Stuart Orkin (Harvard Medical School), Thomas Reh (University of Washington, Seattle), Austin Smith (University of Edinburgh, UK), Charles Streuli (The University of Manchester, UK), Fiona Watt (Cancer Research Institute, UK)

Capítulo 24: Julie Theriot [contribuição principal] (Stanford University), Michael Bishop (University of California, San Francisco), Harald von Boehmer (Harvard Medical School), Lynn Enquist (Princeton University), Stan Falkow (Stanford University), Douglas Fearon (University of Cambridge), Lewis Lanier (University of California, San Francisco), Richard Locksley (University of California, San Francisco), Daniel Portnoy (University of California, Berkeley), Caetano Reis e Sousa (Cancer Research, UK), Ralph Steinman (The Rockefeller University), Gary Ward (University of Vermont)

Capítulo 25: Harald von Boehmer (Harvard Medical School), Douglas Fearon (University of Cambridge), Lewis Lanier (University of California, San Francisco), Philippa Marrack (National Jewish Medical and Research Center, Denver), Michael Neuberger (University of Cambridge), Michael Nussenzweig (Rockefeller University), William Paul (National Institutes of Health), Klaus Rajewsky (Harvard Medical School), Caetano Reis e Sousa (Cancer Research, UK), Ralph Steinman (The Rockefeller University).

Glossário: Eleanor Lawrence, Sherry Granum

Estudantes revisores: David Kashatus (Duke University), Emmanuel Kreidl (University of Vienna, Austria), Nick Rudzik (University of Toronto, Canada), Dea Shahinas (University of Toronto, Canada)

Edições anteriores: David Agard (University of California, San Francisco), Michael Akam (University of Cambridge), Fred Alt (CBR Institute for Biomedical Research, Boston), Linda Amos (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Raul Andino (University of California, San Francisco), Clay Armstrong (University of Pennsylvania), Martha Arnaud (University of California, San Francisco), Spyros Artavanis-Tsakonas (Harvard Medical School), Michael Ashburner (University of Cambridge), Jonathan Ashmore (University College London), Tayna Awabdy (University of California, San Francisco), Peter Baker (falecido), David Baldwin (Stanford University), Michael Banda (University of California, San Francisco), Cornelia Bargmann (University of California, San Francisco), Ben Barres (Stanford University), David Bartel (Massachusetts Institute of Technology), Michael Bennett (Albert Einstein College of Medicine), Darwin Berg (University of California, San Diego), Merton Bernfield (Harvard Medical School), Michael Berridge (The Babraham Institute, Cambridge), David Birk (UMNDJ—Robert Wood Johnson Medical School), Michael Bishop (University of California, San Francisco), Tim Bliss (National Institute for Medical Research, London), Hans Bode (University of California, Irvine), Piet Borst (Jan Swammerdam Institute, University of Amsterdam), Henry Bourne (University of California, San Francisco), Alan Boyde (University College London), Martin Brand (University of Cambridge), Carl Branden (falecido), Andre Brandli (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich), Mark Bretscher (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Marianne Bronner-Fraser (California Institute of Technology), Robert Brooks (King's College London), Barry Brown (King's College London), Michael Brown (University of Oxford), Steve Burden (New York University of Medicine), Max Burger (University of Basel), Stephen Burley (SGX Pharmaceuticals), Keith Burridge (University of North Carolina, Chapel Hill), John Cairns (Radcliffe Infirmary, Oxford), Zacheus Cande (University of California, Berkeley), Lewis Cantley (Harvard Medical School), Charles Cantor (Columbia University), Roderick Capaldi (University of Oregon), Mario Capecchi (University of Utah), Michael Carey (University of California, Los Angeles), Adelaide Carpenter (University of California, San Diego), Tom Cavalier-Smith (King's College London), Pierre Chambon (University of Strasbourg), Enrico Coen (John Innes Institute, Norwich, UK), Philip Cohen (University of

Dundee, Scotland), Robert Cohen (University of California, San Francisco), Stephen Cohen (EMBL Heidelberg, Germany), Roger Cooke (University of California, San Francisco), John Cooper (Washington University School of Medicine, St. Louis), Nancy Craig (Johns Hopkins University), James Crow (University of Wisconsin, Madison), Stuart Cull-Candy (University College London), Leslie Dale (University College London), Michael Dexter (The Wellcome Trust, UK), Anthony DeFranco (University of California, San Francisco), Christopher Dobson (University of Cambridge), Russell Doolittle (University of California, San Diego), Julian Downward (Cancer Research, UK), Keith Dudley (King's College London), Graham Dunn (MRC Cell Biophysics Unit, London), Jim Dunwell (John Innes Institute, Norwich, UK), Paul Edwards (University of Cambridge), Robert Edwards (University of California, San Francisco), David Eisenberg (University of California, Los Angeles), Sarah Elgin (Washington University, St. Louis), Ruth Ellman (Institute of Cancer Research, Sutton, UK), Beverly Emerson (The Salk Institute), Charles Emerson (University of Virginia), Scott Emr (University of California, San Diego), Sharyn Endow (Duke University), Tariq Enver (Institute of Cancer Research, London), David Epel (Stanford University), Gerard Evan (University of California, Comprehensive Cancer Center), Ray Evert (University of Wisconsin, Madison), Stanley Falkow (Stanford University), Gary Felsenfeld (National Institutes of Health), Stuart Ferguson (University of Oxford), Christine Field (Harvard Medical School), Gary Firestone (University of California, Berkeley), Gerald Fischbach (Columbia University), Robert Fletterick (University of California, San Francisco), Harvey Florman (Tufts University), Judah Folkman (Harvard Medical School), Larry Fowke (University of Saskatchewan, Canada), Daniel Friend (University of California, San Francisco), Elaine Fuchs (University of Chicago), Joseph Gall (Yale University), Richard Gardner (University of Oxford), Anthony Gardner-Medwin (University College London), Peter Garland (Institute of Cancer Research, London), Walter Gehring (Biozentrum, University of Basel), Benny Geiger (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), Larry Gerace (The Scripps Research Institute), John Gerhart (University of California, Berkeley), Günther Gerisch (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried), Frank Gertler (Massachusetts Institute of Technology), Sankar Ghosh (Yale University School of Medicine), Reid Gilmore (University of Massachusetts, Amherst), Bernie Gilula (falecido), Charles Gilvarg (Princeton University), Michael Glotzer (University of Vienna, Austria), Larry Goldstein (University of California, San Diego), Bastien Gomperts (University College Hospital Medical School, London), Daniel Goodenough (Harvard Medical School), Jim Goodrich (University of Colorado, Boulder), Peter Gould (Middlesex Hospital Medical School, London), Alan Grafen (University of Oxford), Walter Gratzer (King's College London), Howard Green (Harvard University), Michael Green (University of Massachusetts, Amherst), Leslie Grivell (University of Amsterdam, The Netherlands), Carol Gross (University of California, San Francisco), Frank Grosveld (Erasmus Universiteit, The Netherlands), Michael Grunstein (University of California, Los Angeles), Barry Gumbiner (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), Brian Gunning (Australian National University, Canberra), Christine Guthrie (University of California, San Francisco), Ernst Hafen (Universitat Zurich), David Haig (Harvard University), Alan Hall (MRC Laboratory for Molecular Biology and Cell Biology, London), Jeffrey Hall (Brandeis University), John Hall (Universityof Southampton, UK), Zach Hall (University of California, San Francisco), David Hanke (University of Cambridge), Nicholas Harberd (John Innes Centre, Norwich, UK), Graham Hardie (University of Dundee, Scotland), Richard Harland (University of California, Berkeley), Adrian Harris (Cancer Research, UK), John Harris (University of Otago, New Zealand), Stephen Harrison (Harvard University), Leland Hartwell (University of Washington, Seattle), Adrian Harwood (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology and Cell Biology Unit, London), John Heath (University of Birmingham, UK), Ari Helenius (Yale University), Richard Henderson (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Glenn Herrick (University of Utah), Ira Herskowitz (falecida), Bertil Hille (University of Washington, Seattle), Alan Hinnebusch (National Institutes of Health, Bethesda), Nancy Hollingsworth (State University of New York, Stony Brook), Leroy Hood (Institute for Systems Biology, Seattle), John Hopfield (Princeton University), Robert Horvitz (Massachusetts Institute of Technology), David Housman (Massachusetts Institute of Technology), Jonathan Howard (University of Washington, Seattle), James Hudspeth (The Rockefeller University), Simon Hughes (King's College London), Martin Humphries (University of Manchester, UK), Tim Hunt (Cancer Research, UK), Laurence Hurst (University of Bath, UK), Jeremy Hyams (University College London), Tony Hyman (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology & Genetics, Dresden), Richard Hynes (Massachusetts Institute of Technology), Philip Ingham (University of Sheffield, UK), Norman Iscove (Ontario Cancer Institute, Toronto), David Ish-Horowicz (Cancer Research, UK), Lily Jan (University of California, San Francisco), Charles Janeway (falecido), Tom Jessell (Columbia University), Arthur Johnson (Texas A & M University), Andy Johnston (John Innes Institute, Norwich, UK), E.G. Jordan (Queen Elizabeth College, London), Ron Kaback (University of California, Los Angeles), Ray Keller (University of California, Berkeley), Douglas Kellogg (University of California, Santa Cruz), Regis Kelly (University of California, San Francisco), John Kendrick-Jones (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Cynthia Kenyon (University of California, San Francisco), Roger Keynes (University of Cambridge), Judith Kimble (University of Wisconsin, Madison), Robert Kingston (Massachusetts General Hospital), Marc Kirschner (Harvard University), Richard Klausner (National Institutes of Health), Nancy Kleckner (Harvard University), Mike Klymkowsky (University of Colorado, Boulder), Kelly Komachi (University of Ca-

lifornia, San Francisco), Eugene Koonin (National Institutes of Health), Juan Korenbrot (University of California, San Francisco), Tom Kornberg (University of California, San Francisco), Stuart Kornfeld (Washington University, St. Louis), Daniel Koshland (University of California, Berkeley), Marilyn Kozak (University of Pittsburgh), Mark Krasnow (Stanford University), Werner Kühlbrandt (Max Planck Institute for Biophysics, Frankfurt am Main), John Kuriyan (University of California, Berkeley), Robert Kypta (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, London), Peter Lachmann (MRC Center, Cambridge), Ulrich Laemmli (University of Geneva, Switzerland), Trevor Lamb (University of Cambridge), Hartmut Land (Cancer Research, UK), David Lane (University of Dundee, Scotland), Jane Langdale (University of Oxford), Jay Lash (University of Pennsylvania), Peter Lawrence (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Paul Lazarow (Mount Sinai School of Medicine), Robert J. Lefkowitz (Duke University), Michael Levine (University of California, Berkeley), Warren Levinson (University of California, San Francisco), Alex Levitzki (Hebrew University, Israel), Ottoline Leyser (University of York, UK), Joachim Li (University of California, San Francisco), Tomas Lindahl (Cancer Research, UK), Vishu Lingappa (University of California, San Francisco), Jennifer Lippincott-Schwartz (National Institutes of Health, Bethesda), Dan Littman (New York University School of Medicine), Clive Lloyd (John Innes Institute, Norwich, UK), Richard Losick (Harvard University), Robin Lovell-Badge (National Institute for Medical Research, London), Shirley Lowe (University of California, San Francisco), Laura Machesky (University of Birmingham, UK), James Maller (University of Colorado Medical School), Tom Maniatis (Harvard University), Colin Manoil (Harvard Medical School), Philippa Marrack (National Jewish Medical and Research Center, Denver), Mark Marsh (Institute of Cancer Research, London), Gail Martin (University of California, San Francisco), Paul Martin (University College London), Joan Massagué (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), Brian McCarthy (University of California, Irvine), Richard McCarty (Cornell University), William McGinnis (University of California, Davis), Anne McLaren (Wellcome/ Cancer Research Campaign Institute, Cambridge), Frank McNally (University of California, Davis), Freiderick Meins (Freiderich Miescher Institut, Basel), Stephanie Mel (University of California, San Diego), Ira Mellman (Yale University), Barbara Meyer (University of California, Berkeley), Elliot Meyerowitz (California Institute of Technology), Chris Miller (Brandeis University), Robert Mishell (University of Birmingham, UK), Avrion Mitchison (University College London), N.A. Mitchison (University College London), Tim Mitchison (Harvard Medical School), Peter Mombaerts (The Rockefeller University), Mark Mooseker (Yale University), David Morgan (University of California, San Francisco), Michelle Moritz (University of California, San Francisco), Montrose Moses (Duke University), Keith Mostov (University of California, San Francisco), Anne Mudge (University College London), Hans Müller-Eberhard (Scripps Clinic and Research Institute), Alan Munro (University of Cambridge), J. Murdoch Mitchison (Harvard University), Richard Myers (Stanford University), Diana Myles (University of California, Davis), Andrew Murray (Harvard University), Mark E. Nelson (University of Illinois, Urbana-Champaign), Michael Neuberger (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Walter Neupert (University of Munich, Germany), David Nicholls (University of Dundee, Scotland), Suzanne Noble (University of California, San Francisco), Harry Noller (University of California, Santa Cruz), Jodi Nunnari (University of California, Davis), Paul Nurse (Cancer Research, UK), Duncan O'Dell (falecido), Patrick O'Farrell (University of California, San Francisco), Maynard Olson (University of Washington, Seattle), Stuart Orkin (Children's Hospital, Boston), Terri Orr- Weaver (Massachusetts Institute of Technology), Erin O'Shea (Harvard University), William Otto (Cancer Research, UK), John Owen (University of Birmingham, UK), Dale Oxender (University of Michigan), George Palade (falecido), Barbara Panning (University of California, San Francisco), Roy Parker (University of Arizona, Tucson), William W. Parson (University of Washington, Seattle), Terence Partridge (MRC Clinical Sciences Centre, London), William E. Paul (National Institutes of Health), Tony Pawson (Mount Sinai Hospital, Toronto), Hugh Pelham (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Robert Perry (Institute of Cancer Research, Philadelphia), Greg Petsko (Brandeis University), Gordon Peters (Cancer Research, UK), David Phillips (The Rockefeller University), Jeremy Pickett-Heaps (The University of Melbourne, Australia), Julie Pitcher (University College London), Jeffrey Pollard (Albert Einstein College of Medicine), Tom Pollard (Yale University), Bruce Ponder (University of Cambridge), Dan Portnoy (University of California, Berkeley), James Priess (University of Washington, Seattle), Darwin Prockop (Tulane University), Dale Purves (Duke University), Efraim Racker (Cornell University), Jordan Raff (Wellcome/CRC Institute, Cambridge), Klaus Rajewsky (University of Cologne, Germany), George Ratcliffe (University of Oxford), Elio Raviola (Harvard Medical School), Martin Rechsteiner (University of Utah, Salt Lake City), David Rees (National Institute for Medical Research, London), Louis Reichardt (University of California, San Francisco), Fred Richards (Yale University), Conly Rieder (Wadsworth Center, Albany), Phillips Robbins (Massachusetts Institute of Technology), Elaine Robson (University of Reading, UK), Robert Roeder (The Rockefeller University), Joel Rosenbaum (Yale University), Janet Rossant (Mount Sinai Hospital, Toronto), Jesse Roth (National Institutes of Health), Jim Rothman (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), Erkki Ruoslahti (La Jolla Cancer Research Foundation), Gary Ruvkun (Massachusetts General Hospital), David Sabatini (New York University), Alan Sachs (University of California, Berkeley), Alan Sachs (University of California, Berkeley), Edward Salmon (University of North Carolina, Chapel Hill), Joshua Sanes (Harvard University), Peter Sarnow (Stanford Univer-

sity), Lisa Satterwhite (Duke University Medical School), Howard Schachman (University of California, Berkeley), Gottfried Schatz (Biozentrum, University of Basel), Randy Schekman (University of California, Berkeley), Richard Scheller (Stanford University), Giampietro Schiavo (Cancer Research, UK), Joseph Schlessinger (New York University Medical Center), Michael Schramm (Hebrew University), Robert Schreiber (Scripps Clinic and Research Institute), James Schwartz (Columbia University), Ronald Schwartz (National Institutes of Health), François Schweisguth (ENS, Paris), John Scott (University of Manchester, UK), John Sedat (University of California, San Francisco), Peter Selby (Cancer Research, UK), Zvi Sellinger (Hebrew University, Israel), Gregg Semenza (Johns Hopkins University), Philippe Sengel (University of Grenoble, France), Peter Shaw (John Innes Institute, Norwich, UK), Michael Sheetz (Columbia University), David Shima (Cancer Research, UK), Samuel Silverstein (Columbia University), Kai Simons (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden), Melvin I. Simon (California Institute of Technology), Jonathan Slack (Cancer Research, UK), Alison Smith (John Innes Institute, Norfolk, UK), John Maynard Smith (University of Sussex, UK), Frank Solomon (Massachusetts Institute of Technology), Michael Solursh (University of Iowa), Bruce Spiegelman (Harvard Medical School), Timothy Springer (Harvard Medical School), Mathias Sprinzl (University of Bayreuth, Germany), Scott Stachel (University of California, Berkeley), Andrew Staehelin (University of Colorado, Boulder), David Standring (University of California, San Francisco), Margaret Stanley (University of Cambridge), Martha Stark (University of California, San Francisco), Wilfred Stein (Hebrew University, Israel), Malcolm Steinberg (Princeton University), Paul Sternberg (California Institute of Technology), Chuck Stevens (The Salk Institute), Murray Stewart (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Monroe Strickberger (University of Missouri, St. Louis), Robert Stroud (University of California, San Francisco), Michael Stryker (University of California, San Francisco), William Sullivan (University of California, Santa Cruz), Daniel Szollosi (Institut National de la Recherche Agronomique, France), Jack Szostak (Massachusetts General Hospital), Masatoshi Takeichi (Kyoto University), Clifford Tabin (Harvard Medical School), Diethard Tautz (University of Cologne, Germany), Julie Theriot (Stanford University), Roger Thomas (University of Bristol, UK), Vernon Thornton (King's College London), Cheryll Tickle (University of Dundee, Scotland), Jim Till (Ontario Cancer Institute, Toronto), Lewis Tilney (University of Pennsylvania), Nick Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory), Alain Townsend (Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford), Paul Travers (Anthony Nolan Research Institute, London), Robert Trelstad (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School), Anthony Trewavas (Edinburgh University, Scotland), Nigel Unwin (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge), Victor Vacquier (University of California, San Diego), Harry van der Westen (Wageningen, The Netherlands), Tom Vanaman (University of Kentucky), Harold Varmus (Sloan-Kettering Institute), Alexander Varshavsky (California Institute of Technology), Madhu Wahi (University of California, San Francisco), Virginia Walbot (Stanford University), Frank Walsh (Glaxo-Smithkline-Beecham, UK), Trevor Wang (John Innes Institute, Norwich, UK), Yu-Lie Wang (Worcester Foundation for Biomedical Research), Anne Warner (University College London), Graham Warren (Yale University School of Medicine), Paul Wassarman (Mount Sinai School of Medicine), Fiona Watt (Cancer Research, UK), Clare Waterman-Storer (The Scripps Research Institute), Fiona Watt (Cancer Research, UK), John Watts (John Innes Institute, Norwich, UK), Klaus Weber (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen), Martin Weigert (Institute of Cancer Research, Philadelphia), Harold Weintraub (falecido), Karsten Weis (University of California, Berkeley), Irving Weissman (Stanford University), Jonathan Weissman (University of California, San Francisco), Norman Wessells (Stanford University), Judy White (University of Virginia), Steven West (Cancer Research, UK), William Wickner (Dartmouth College), Michael Wilcox (falecido), Lewis T. Williams (Chiron Corporation), Keith Willison (Chester Beatty Laboratories, London), John Wilson (Baylor University), Alan Wolffe (falecido), Richard Wolfenden (University of North Carolina, Chapel Hill), Sandra Wolin (Yale University School of Medicine), Lewis Wolpert (University College London), Rick Wood (Cancer Research, UK), Abraham Worcel (University of Rochester), Nick Wright (Cancer Research, UK), John Wyke (Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow), Keith Yamamoto (University of California, San Francisco), Charles Yocum (University of Michigan, Ann Arbor), Peter Yurchenco (UMDNJ, Robert Wood Johnson Medical School), Rosalind Zalin (University College London), Patricia Zambryski (University of California, Berkeley).

Sumário

PARTE I	**INTRODUÇÃO À CÉLULA**	
Capítulo 1	Células e Genomas	1
Capítulo 2	Química Celular e Biossíntese	45
Capítulo 3	Proteínas	125
PARTE II	**MECANISMOS GENÉTICOS BÁSICOS**	
Capítulo 4	DNA, Cromossomos e Genomas	195
Capítulo 5	Replicação, Reparo e Recombinação do DNA	263
Capítulo 6	Como as Células Leem o Genoma: Do DNA à Proteína	329
Capítulo 7	Controle da Expressão Gênica	411
PARTE III	**MÉTODOS**	
Capítulo 8	Manipulação de Proteínas, DNA e RNA	501
Capítulo 9	Visualização de Células	579
PARTE IV	**ORGANIZAÇÃO INTERNA DAS CÉLULAS**	
Capítulo 10	Estrutura da Membrana	617
Capítulo 11	Transporte de Membrana de Pequenas Moléculas e as Propriedades Elétricas das Membranas	651
Capítulo 12	Compartimentos Intracelulares e Endereçamento de Proteínas	695
Capítulo 13	Tráfego Intracelular de Vesículas	749
Capítulo 14	Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloropastos	813
Capítulo 15	Mecanismos da Comunicação Celular	879
Capítulo 16	Citoesqueleto	965
Capítulo 17	Ciclo Celular	1053
Capítulo 18	Apoptose	1115
PARTE V	**AS CÉLULAS EM SEU CONTEXTO SOCIAL**	
Capítulo 19	Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular	1131
Capítulo 20	Câncer	1205
Capítulo 21	Reprodução Sexuada: Meiose, Células Germinativas e Fecundação	1269
Capítulo 22	Desenvolvimento de Organismos Multicelulares	1305
Capítulo 23	Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos	1417
Capítulo 24	Patógenos, Infecção e Imunidade Inata	1485
Capítulo 25	Sistema Imune Adaptativo	1539
Glossário		G-1
Índice		I-1
Tabela		T-1

Sumário detalhado

Parte I Introdução à Celula

Capítulo 1 Células e Genomas 1

CARACTERÍSTICAS UNIVERSAIS DAS CÉLULAS NA TERRA 1

Todas as células guardam sua informação hereditária no mesmo código químico linear (DNA) 2
Todas as células replicam sua informação hereditária por polimerização a partir de um molde 3
Todas as células transcrevem partes da informação hereditária em uma mesma forma intermediária (RNA) 4
Todas as células usam proteínas como catalisadores 5
Todas as células traduzem o RNA em proteínas da mesma maneira 6
O fragmento da informação genética que corresponde a uma proteína é um gene 7
A vida demanda energia livre 8
Todas as células funcionam como fábricas bioquímicas que utilizam os mesmos blocos moleculares básicos de construção 8
Todas as células são envoltas por uma membrana plasmática através da qual devem passar nutrientes e materiais descartáveis 9
Uma célula viva pode existir com menos de 500 genes 10
Resumo 11

A DIVERSIDADE DOS GENOMAS E A ÁRVORE DA VIDA 11

As células podem ser alimentadas por várias fontes de energia livre 12
Algumas células fixam nitrogênio e dióxido de carbono para outras 12
A maior diversidade bioquímica é vista entre as células procarióticas 14
A árvore da vida possui três ramos principais: bactérias, arquebactérias e eucariotos 15
Alguns genes evoluem rapidamente; outros são altamente conservados 16
A maioria das bactérias e das arquebactérias tem entre 1.000 e 6.000 Genes 17
Novos genes são gerados a partir de genes preexistentes 18
Duplicações gênicas dão origem às famílias de genes relacionados dentro de uma única célula 19
Os genes podem ser transferidos entre os organismos tanto no laboratório quanto na natureza 21
O sexo resulta em trocas horizontais da informação genética dentro de uma espécie 22
A função de um gene com frequência pode ser deduzida a partir de sua sequência 22
Mais de 200 famílias de genes são comuns a todos os três primeiros ramos da árvore da vida 23
As mutações revelam as funções dos genes 23
Os biólogos moleculares têm se concentrado em *E. Coli* 24
Resumo 26

INFORMAÇÃO GENÉTICA EM EUCARIOTOS 26

As células eucarióticas podem ter surgido como predadoras 26
As células eucarióticas contemporâneas evoluíram de uma simbiose 27
Os eucariotos possuem genomas híbridos 30
Os genomas eucarióticos são grandes 30
Os genomas eucarióticos são ricos em DNA regulatório 31
O genoma define o programa de desenvolvimento multicelular 31
Muitos eucariotos vivem como células solitárias: os protistas 32
Uma levedura serve como um modelo mínimo de eucarioto 33
Os níveis de expressão de todos os genes de um organismo podem ser monitorados simultaneamente 34
Para compreendermos as células, necessitamos da matemática, da computação e da informação quantitativa 35
A *Arabidopsis* foi escolhida dentre 300 mil espécies como uma planta-modelo 36
O mundo das células animais é representado por um verme, uma mosca, um rato e um humano 36
Os estudos em *Drosophila* explicam o desenvolvimento de vertebrados 37
O genoma dos vertebrados é um produto de duplicações repetidas 38
A redundância genética é um problema para os geneticistas, mas cria oportunidades para os organismos evoluírem 39
O camundongo serve como modelo para os mamíferos 39
Os humanos relatam suas próprias peculiaridades 40
Somos todos minuciosamente diferentes 41
Resumo 42
Teste seu conhecimento 42
Referências 44

Capítulo 2 Química Celular e Biossíntese 45

OS COMPONENTES QUÍMICOS DA CÉLULA 45

As células são formadas por poucos tipos de átomos 45
Os elétrons localizados nas posições mais externas determinam como os átomos interagem 46
As ligações covalentes são formadas por compartilhamento de elétrons 48
Existem diferentes tipos de ligações covalentes 50
Frequentemente um átomo comporta-se como se o seu raio fosse fixo 51
A água é a mais abundante das substâncias presentes nas células 51
Algumas moléculas polares formam ácidos e bases em água 52
Quatro tipos de interações não-covalentes contribuem para manter a associação entre as moléculas de uma célula 53
As células são formadas por compostos de carbono 54
As células contêm quatro famílias principais de moléculas orgânicas pequenas 55
Os açúcares funcionam como uma fonte de energia para as células e são as subunidades dos polissacarídeos 55
Os ácidos graxos são componentes das membranas celulares e também fonte de energia 58
Os aminoácidos são as subunidades das proteínas 59
Os nucleotídeos são as subunidades do DNA e do RNA 61
A química das células é dominada por macromoléculas com propriedades extraordinárias 62
As ligações monovalentes determinam tanto a forma precisa das macromoléculas como as ligações com outras moléculas 63
Resumo 65

CATÁLISE E O USO DE ENERGIA PELAS CÉLULAS 65

O metabolismo celular é organizado por enzimas 66
A ordem biológica é possibilitada pela liberação de energia térmica pelas células 66
Os organismos fotossintéticos utilizam a luz solar para sintetizar moléculas orgânicas 68
As células obtêm energia pela oxidação de moléculas orgânicas 70
Oxidação e redução envolvem transferência de elétrons 71
As enzimas diminuem as barreiras que impedem as reações químicas 72
Como as enzimas encontram seus substratos: a grande rapidez do movimento molecular 74
A mudança de energia livre de uma reação determina se ela pode ocorrer 75
A concentração dos reagentes influi na variação de energia livre e na direção da reação 76
Em uma sequência de reações, os valores de $\Delta G°$ são aditivos 77
Carreadores de moléculas ativados são essenciais bara a biossíntese 78
A formação de um carreador ativado é acoplada a uma reação energeticamente favorável 79
O ATP é a molécula carreadora ativada mais usada 80

A energia armazenada no ATP geralmente está atrelada para unir duas moléculas 81
NADH e NADPH são importantes carreadores de elétrons 82
Existem muitas outras moléculas de carreadores ativados nas células 83
A síntese dos polímeros biológicos é impulsionada pela hidrólise de ATP 84
Resumo 87

COMO AS CÉLULAS OBTÊM ENERGIA DOS ALIMENTOS 88
A glicólise é uma via central na produção de ATP 88
A fermentação produz ATP em ausência de oxigênio 89
A glicólise ilustra como as enzimas acoplam a oxidação ao armazenamento de energia 91
Os organismos armazenam as moléculas de alimento em compartimentos especiais 91
A maioria das células animais obtém dos ácidos graxos a energia para os períodos entre as refeições 95
Tanto os açúcares quanto as gorduras são degradados a acetil-CoA nas mitocôndrias 96
O ciclo do ácido cítrico gera NADH pela oxidação de grupos acetila a CO_2 97
Na maioria das células, o transporte de elétrons leva à síntese da maior parte do ATP 100
Os aminoácidos e os nucleotídeos fazem parte do ciclo do nitrogênio 100
O metabolismo é organizado e regulado 101
Resumo 103
Teste seu conhecimento 103
Referências 124

Capítulo 3 Proteínas **125**

A FORMA E A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS 125
A forma de uma proteína é especificada pela sua sequência de aminoácidos 125
As proteínas se enovelam na conformação de menor energia 130
As hélices α e as folhas β são motivos comuns de enovelamento 131
Os domínios proteicos são as unidades modulares a partir das quais as proteínas maiores são construídas 135
Apenas poucas de muitas cadeias polipeptídicas possíveis serão úteis para as células 136
As proteínas podem ser classificadas em muitas famílias 137
As buscas de sequências podem identificar parentes próximos 139
Alguns domínios proteicos formam partes de várias proteínas diferentes 140
Certos pares de domínios são encontrados juntos em muitas proteínas 141
O genoma humano codifica um conjunto complexo de proteínas, revelando muito do que permanece desconhecido 142
As grandes moléculas proteicas geralmente contêm mais de uma cadeia polipeptídica 142
Algumas proteínas formam longos filamentos helicoidais 143
Muitas moléculas proteicas apresentam formas alongadas e fibrosas 145
Muitas proteínas contêm uma surpreendente quantidade da cadeia polipeptídica não-estruturada 146
Ligações cruzadas covalentes frequentemente estabilizam proteínas extracelulares 147
Moléculas proteicas frequentemente servem como subunidades na formação de grandes estruturas 148
Muitas estruturas nas células são capazes de autoassociação 149
Fatores de associação frequentemente auxiliam na formação de estruturas biológicas complexas 151
Resumo 152

FUNÇÃO PROTEICA 152
Todas as proteínas ligam-se a outras moléculas 153
A conformação da superfície de uma proteína determina a sua química 154
Comparações entre as sequências de proteínas pertencentes a uma mesma família destacam sítios de ligação a ligantes 155
Proteínas ligam-se umas às outras por meio de diversos tipos de interfaces 156
Os sítios de ligação dos anticorpos são especialmente versáteis 156
A constante de equilíbrio mede a força de ligação 157
Enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos 159
A ligação do substrato é a primeira etapa na catálise enzimática 159
As enzimas aceleram reações estabilizando seletivamente os estados de transição 160
As enzimas podem utilizar simultaneamente a catálise ácida e básica 160
A lisozima ilustra como uma enzima funciona 161
Pequenas moléculas que se ligam fortemente às proteínas lhes conferem novas funções 166
Túneis moleculares direcionam substratos em enzimas com múltiplos sítios catalíticos 167
Complexos multienzimáticos ajudam a aumentar a taxa de metabolismo celular 168
A célula regula a atividade catalítica de suas enzimas 169
Enzimas alostéricas possuem dois ou mais sítios de ligação interativos 171
Dois ligantes cujos sítios de ligação estão acoplados devem afetar reciprocamente a ligação um do outro 171
Agregados proteicos simétricos geram transições alostéricas cooperativas 172
A transição alostérica na aspartato-transcarbamoilase é compreendida em nível atômico 173
Muitas alterações nas proteínas são induzidas por fosforilação 175
Uma célula eucariótica contém uma ampla coleção de proteína-cinases e proteína-fosfatases 176
A regulação das proteína-cinases Cdk e Src mostram como uma proteína pode funcionar como um *Microchip* *177*
Proteínas que ligam e hidrolisam GTP são reguladores celulares onipresentes 178
As proteínas reguladoras controlam a atividade de proteínas que ligam GTP por determinar se uma molécula de GTP ou de GDP está ligada 179
Os movimentos de grandes proteínas podem ser gerados por pequenas proteínas 179
As proteínas motoras geram grandes movimentos nas células 181
Os transportadores ligados à membrana aproveitam energia para bombear moléculas através das membranas 182
As proteínas frequentemente formam complexos grandes, que funcionam como máquinas proteicas 184
Máquinas proteicas com partes intercambiáveis maximizam o uso da informação genética 184
A ativação de máquinas proteicas frequentemente envolve o seu posicionamento em locais específicos 185
Muitas proteínas são controladas por modificações covalentes em diversos sítios 186
Uma complexa rede de interação de proteínas é a base da função da célula 187
Resumo 190
Teste seu conhecimento 191
Referências 193

Parte II Mecanismos Genéticos Básicos

Capítulo 4 DNA, Cromossomos e Genomas **195**

ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA 197
A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos complementares 197
A estrutura do DNA fornece um mecanismo para a hereditariedade 199
Em eucariotos, o DNA é localizado no núcleo celular 200
Resumo 201

DNA CROMOSSÔMICO E SEU EMPACOTAMENTO NA FIBRA DE CROMATINA 202
O DNA eucariótico é compactado em uma série de cromossomos 202
Os cromossomos contêm longas sequências de genes 204
A sequência de nucleotídeos do genoma humano mostra como os genes estão organizados 205
Comparações entre genomas revelam sequências conservadas de DNA na evolução 207
Os cromossomos existem em estados diferentes durante a vida da célula 208
Cada molécula de DNA que forma um cromossomo linear deve conter um centrômero, dois telômeros e origens de replicação 209
As moléculas de DNA estão extremamente compactadas nos cromossomos 210
Os nucleossomos são as unidades básicas da estrutura dos cromossomos eucarióticos 211
A estrutura da partícula do cerne do nucleossomo revela como o DNA é compactado 212
Os nucleossomos possuem uma estrutura dinâmica e frequentemente são sujeitos a alterações catalisadas pelos complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP 215

Normalmente os nucleossomos são condensados para formar uma fibra de cromatina compacta 216
Resumo 218

REGULAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA 219
Alguns mistérios iniciais sobre a estrutura da cromatina 220
A heterocromatina é altamente organizada e atipicamente resistente à expressão gênica 220
As histonas do cerne são modificadas covalentemente em vários sítios diferentes 222
A cromatina adquire uma variedade adicional pela inserção sítio-específica de um conjunto de variantes de histonas 224
As modificações covalentes e as variantes de histonas atuam em conjunto para produzir um "código de histonas" que auxilia a determinar a função biológica 224
Um complexo de proteínas de leitura e escrita de código pode propagar modificações específicas na cromatina a longas distâncias em um cromossomo 226
Sequências de DNA de "barreira" bloqueiam a propagação dos complexos de escrita e leitura e, portanto, separam domínios de cromatina vizinhos 227
A cromatina nos centrômeros revela como as variantes de histonas podem criar estruturas especiais 228
Estruturas de cromatina podem ser diretamente herdadas 230
Estruturas da cromatina fornecem características únicas à função dos cromossomos eucarióticos 231
Resumo 233

ESTRUTURA GERAL DOS CROMOSSOMOS 233
Os cromossomos são dobrados em grandes alças de cromatina 234
Os cromossomos politênicos são únicos na capacidade de permitir a visualização de estruturas de cromatina 236
Existem múltiplas formas de heterocromatina 238
As alças de cromatina são descondensadas quando os genes nelas contidos são expressos 239
A cromatina pode mover-se a sítios específicos dentro do núcleo para alterar a expressão gênica 239
Redes de macromoléculas formam um conjunto de ambientes bioquímicos distintos dentro do núcleo 241
Cromossomos mitóticos são formados pela cromatina no seu estado mais condensado 243
Resumo 245

COMO OS GENOMAS EVOLUEM 245
Alterações no genoma são causadas por falhas dos mecanismos normais de cópia e manutenção do DNA 246
As sequências genômicas de duas espécies diferem na mesma proporção do período que ocorreu sua separação evolutiva 247
Árvores filogenéticas construídas a partir de comparações de sequências de DNA indicam as relações entre todos os organismos 248
Uma comparação entre cromossomos humanos e de camundongos mostra como a estrutura dos genomas diverge 249
O tamanho do genoma de um vertebrado reflete a taxa relativa de adição de DNA e perda de DNA em uma linhagem 251
É possível reconstruir a sequência de alguns genomas antigos 251
Comparações múltiplas de sequência identificam sequências de DNA importantes com função desconhecida 252
Alterações aceleradas em sequências previamente conservadas podem auxiliar a decifrar etapas críticas na evolução humana 253
A duplicação gênica fornece uma fonte importante de novidades genéticas durante a evolução 253
Genes duplicados sofrem divergência 254
A evolução da família de genes da globina mostra como as duplicações de DNA contribuem para a evolução dos organismos 256
Genes que codificam novas proteínas podem ser criados pela recombinação de éxons 257
Mutações neutras geralmente se distribuem e tornam-se fixas em uma população, com probabilidade dependente do tamanho da população 257
Muito pode ser aprendido pelas análises de variação em humanos 258
Resumo 260
Teste seu conhecimento 260
Referências 262

Capítulo 5 Replicação, Reparo e Recombinação do DNA 263

MANUTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA 263
As taxas de mutação são extremamente baixas 263
Baixas taxas de mutação são necessárias à vida que conhecemos 265
Resumo 265

MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO DNA 266
A base para a replicação e o reparo do DNA é o pareamento das bases 266
A forquilha de replicação de DNA é assimétrica 266
A alta fidelidade da replicação do DNA requer vários mecanismos de correção 268
Apenas a replicação do DNA na direção 5′-3′ permite correção eficiente de erros 271
Uma enzima especial de polimerização de nucleotídeos sintetiza pequenas moléculas de iniciadores de RNA na fita descontínua 272
Proteínas especiais auxiliam na abertura da dupla-hélice de DNA à frente da forquilha de replicação 273
Uma cinta deslizante mantém a DNA-polimerase deslocando-se sobre o DNA 273
Na forquilha de replicação, as proteínas cooperam para formar uma maquinaria de replicação 275
Um sistema de reparo de pareamento incorreto remove erros de replicação que escapam da maquinaria de replicação 276
As DNA-topoisomerases evitam o emaranhamento do DNA durante a replicação 278
A replicação do DNA é essencialmente semelhante em eucariotos e bactérias 280
Resumo 281

INÍCIO E TÉRMINO DA REPLICAÇÃO DO DNA NOS CROMOSSOMOS 281
A síntese de DNA inicia na origem de replicação 281
Os cromossomos bacterianos têm uma única origem de replicação do DNA 282
Os cromossomos eucarióticos contêm múltiplas origens de replicação 282
A replicação de DNA em eucariotos só ocorre durante uma etapa do ciclo celular 284
Regiões diferentes no mesmo cromossomo replicam em tempos distintos na fase S 285
A cromatina altamente condensada é replicada mais tarde, enquanto os genes na cromatina menos condensada tendem a replicar mais precocemente 285
Sequências de DNA bem-definidas atuam como origens de replicação em um eucarioto simples, a levedura *S. cerevisiae* 286
Um grande complexo de múltiplas subunidades liga-se às origens de replicação de eucariotos 287
As sequências de DNA de mamíferos que determinam o início da replicação são difíceis de identificar 288
Novos nucleossomos são formados atrás da forquilha de replicação 289
Os mecanismos da duplicação cromossômica de eucariotos asseguram que o padrão da modificação das histonas possa ser herdado 290
A telomerase replica as extremidades dos cromossomos 292
O comprimento dos telômeros é regulado pelas células e pelos organismos 293
Resumo 294

REPARO DO DNA 295
Sem o reparo do DNA, as lesões espontâneas alterariam rapidamente as sequências de DNA 296
A dupla-hélice de DNA é corrigida imediatamente 296
Uma lesão no DNA pode ser removida por mais de uma via 297
O acoplamento do reparo do DNA à transcrição assegura que o DNA celular mais importante seja reparado de modo eficiente 299
A química das bases do DNA facilita a detecção de lesões 300
DNA-polimerases especiais são usadas em emergências para reparar o DNA 302
Quebras na fita dupla são eficientemente corrigidas 302
Lesões no DNA retardam a progressão do ciclo celular 303
Resumo 304

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA 304
A recombinação homóloga tem muitas aplicações na célula 304
A recombinação homóloga possui características comuns a todas as células 305

A recombinação homóloga é dirigida pelas interações de pareamento de bases do DNA 305
A proteína RecA e suas homólogas permitem que uma fita simples de DNA faça par com uma região homóloga de uma dupla-hélice de DNA 307
A migração da ramificação pode aumentar as regiões de heterodúplex ou liberar o DNA recém-sintetizado na forma de fita simples 308
A recombinação homóloga pode reparar corretamente quebras na fita dupla de DNA 308
As células controlam cuidadosamente o uso da recombinação homóloga no reparo do DNA 310
Junções de Holliday normalmente são formadas durante os eventos de recombinação homóloga 311
A recombinação meiótica é iniciada por quebras programadas na fita dupla 312
A recombinação homóloga normalmente resulta em conversão gênica 314
A correção de pareamento incorreto evita a recombinação promíscua entre duas sequências de DNA com pareamento imperfeito 315
Resumo 316

TRANSPOSIÇÃO E RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA CONSERVATIVA 316
Pela transposição, os elementos genéticos móveis podem se inserir em qualquer sequência de DNA 317
Os transposons de DNA-only movem-se por corte-e-colagem e por mecanismos replicativos 317
Alguns vírus utilizam o mecanismo de transposição para moverem-se para dentro dos cromossomos das células hospedeiras 319
Os retrotransposons semelhantes a retrovírus assemelham-se aos retrovírus, porém não possuem a capa proteica 320
Uma grande parte do genoma humano é composta de retrotransposons não-retrovirais 321
Diferentes elementos transponíveis predominam em diferentes organismos 322
As sequências genômicas revelam o número aproximado de vezes que os elementos transponíveis foram movidos 323
A recombinação sítio-específica conservativa pode rearranjar o DNA de modo reversível 323
A recombinação sítio-específica conservativa foi descoberta no bacteriófago λ 324
A recombinação sítio-específica conservativa pode ser utilizada para ativar ou desativar genes 324
Resumo 326
Teste seu conhecimento 327
Referências 328

Capítulo 6 Como as Células Leem o Genoma: Do DNA à Proteína 329

DO DNA AO RNA 331
O RNA é transcrito a partir de porções de sequências de DNA 331
A transcrição produz um RNA complementar a uma das fitas do DNA 333
As células produzem diversos tipos de RNA 335
Os sinais codificados no DNA indicam à RNA-polimerase onde iniciar e onde terminar 336
A sequência de nucleotídeos dos sinais de início e de término da transcrição apresenta heterogenidade 338
A iniciação da transcrição nos eucariotos necessita de várias proteínas 339
A RNA-polimerase II necessita de fatores gerais de transcrição 340
A polimerase II também necessita de proteínas modificadoras de cromatina, ativadoras e mediadoras 342
A extensão da transcrição produz tensões de super-hélice no DNA 343
A extensão da transcrição em eucariotos está fortemente associada ao processamento de RNA 345
O capeamento do RNA é a primeira modificação dos pré-mRNAs eucarióticos 346
O *splicing* (processamento) do RNA remove as sequências de íntrons de pré-mRNAs recentemente transcritos 347
As sequências nucleotídicas sinalizam onde ocorre o *splicing* *349*
O *splicing* do RNA é realizado pelo spliceossomo 349
O spliceossomo usa hidrólise de ATP para produzir uma série complexa de rearranjos RNA-RNA 351
Outras propriedades do pré-mRNA e a sua síntese auxiliam a explicar a escolha dos sítios adequados de *splicing* *352*
Um segundo grupo de snRNPs realiza o *splicing* de uma pequena parcela de íntrons nos animais e nas plantas 353
O *splicing* de RNA apresenta uma extraordinária plasticidade 355
O *splicing* do RNA catalisado pelo spliceossomo provavelmente evoluiu a partir de mecanismos de auto-*splicing* *355*
As enzimas de processamento do RNA geram a extremidade 3′ dos mRNAs de eucariotos 357
Os mRNAs eucarióticos maduros são seletivamente exportados do núcleo 358
Muitos RNAs não-codificadores também são sintetizados e processados no núcleo 360
O nucléolo é uma fábrica produtora de ribossomos 362
O núcleo contém uma variedade de estruturas subnucleares 363
Resumo 366

DO RNA À PROTEÍNA 366
Uma sequência de mRNA é decodificada em conjuntos de três nucleotídeos 367
As moléculas de tRNA transportam aminoácidos para os códons no mRNA 368
Os tRNAs são covalentemente modificados antes de saírem do núcleo 369
As enzimas específicas acoplam cada aminoácido à sua molécula de tRNA apropriada 370
A edição por tRNA-sintetases assegura a exatidão 371
Os aminoácidos são adicionados à extremidade C-terminal de uma cadeia polipeptídica em crescimento 373
A mensagem de RNA é decodificada nos ribossomos 373
Os fatores de extensão direcionam a tradução e aumentam a exatidão do processo 377
O ribossomo é uma ribozima 378
As sequências nucleotídicas no mRNA sinalizam onde inicia a síntese proteica 379
Os códons de terminação marcam o final da tradução 381
As proteínas são produzidas nos polirribossomos 381
Existem pequenas variações no código genético padrão 382
Inibidores da síntese de proteína procariótica são úteis como antibióticos 383
A exatidão na tradução requer gasto de energia livre 385
Mecanismos de controle de qualidade impedem a tradução de mRNAs com danos 385
Algumas proteínas iniciam o seu dobramento ainda durante a síntese 387
As chaperonas moleculares auxiliam no dobramento da maioria das proteínas 388
As regiões hidrofóbicas expostas fornecem sinais essenciais para o controle de qualidade da proteína 390
O proteossomo é uma protease compartimentalizada com sítios ativos sequestrados 391
Um elaborado sistema de conjugação de ubiquitina marca as proteínas para destruição 393
Muitas proteínas são controladas por destruição regulada 395
As proteínas dobradas anormalmente podem se agregar e causar doenças humanas destrutivas 396
Existem muitas etapas do DNA à proteína 399
Resumo 399

O MUNDO DE RNA E A ORIGEM DA VIDA 400
A vida necessita de informação estocada 401
Os polinucleotídeos podem tanto estocar a informação quanto catalisar reações químicas 401
Um mundo de pré-RNA provavelmente precedeu o mundo de RNA 402
As moléculas de RNA de fita simples podem dobrar-se em estruturas altamente elaboradas 403
As moléculas autorreplicadoras sofrem seleção natural 404
Como ocorreu a evolução da síntese de proteínas? 407
Todas as células atuais usam DNA como material hereditário 408
Resumo 408
Teste seu conhecimento 409
Referências 410

Capítulo 7 Controle da Expressão Gênica 411

UMA VISÃO GERAL DO CONTROLE GÊNICO 411
Os diferentes tipos celulares de um organismo multicelular contêm o mesmo DNA 411
Diferentes tipos celulares sintetizam diferentes conjuntos de proteínas 412

Sinais externos podem induzir uma célula a alterar a expressão de seus genes 413
A expressão gênica pode ser regulada em muitas etapas no caminho que vai do DNA ao RNA até a proteína 415
Resumo 415

MOTIVOS DE LIGAÇÃO AO DNA NAS PROTEÍNAS DE REGULAÇÃO GÊNICA 416
Proteínas de regulação gênica foram descobertas por genética bacteriana 416
A porção externa da hélice de DNA pode ser lida por proteínas 416
Sequências curtas de DNA são componentes fundamentais dos comutadores genéticos 418
As proteínas de regulação gênica contêm motivos estruturais que podem ler sequências de DNA 418
O motivo hélice-volta-hélice é um dos motivos de ligação ao DNA mais simples e mais comuns 419
As proteínas homeodomínio constituem-se em uma classe especial de proteínas hélice-volta-hélice 420
Existem vários tipos de motivos de ligação ao DNA dedos de zinco 421
Folhas β pregueadas também podem reconhecer DNA 422
Algumas proteínas utilizam alças que entram nos sulcos maior e menor para o reconhecimento do DNA 423
O motivo zíper de leucina faz a mediação tanto da ligação ao DNA como da dimerização proteica 423
A heterodimerização expande o repertório de sequências de DNA que as proteínas de regulação gênica podem reconhecer 424
O motivo hélice-alça-hélice também faz a mediação da dimerização e da ligação ao DNA 425
Ainda não é possível prever as sequências de DNA reconhecidas por todas as proteínas de regulação gênica 426
Um ensaio de alteração da mobilidade em gel permite que as proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA sejam facilmente detectadas 427
A cromatografia de afinidade ao DNA facilita a purificação de proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA 428
A sequência de DNA reconhecida por uma proteína de regulação gênica pode ser determinada experimentalmente 429
O *footprinting* filogenético identifica sequências de DNA regulatórias por meio da genômica comparativa 431
A técnica de imunoprecipitação da cromatina identifica sítios de DNA ocupados por proteínas de regulação gênica em células vivas 431
Resumo 432

COMO FUNCIONAM OS COMUTADORES GENÉTICOS 432
O repressor do triptofano é um comutador simples que liga e desliga os genes nas bactérias 433
Os ativadores transcricionais ativam os genes 435
Um ativador transcricional e um repressor transcricional controlam o operon *Lac* ***435***
A formação de alças no DNA ocorre durante a regulação gênica bacteriana 437
As bactérias utilizam subunidades de RNA-polimerase intercambiáveis para auxiliar na regulação da transcrição gênica 438
Comutadores complexos evoluíram para o controle da transcrição gênica em eucariotos 439
Uma região eucariótica de controle gênico consiste em um promotor e em sequências regulatórias de DNA 440
As proteínas eucarióticas ativadoras de genes promovem a associação da RNA-polimerase e dos fatores gerais de transcrição no sítio de início da transcrição 441
As proteínas eucarióticas ativadoras de genes modificam a estrutura local da cromatina 442
As proteínas de ativação gênica atuam sinergicamente 444
As proteínas eucarióticas de repressão gênica podem inibir a transcrição de várias maneiras 445
As proteínas eucarióticas de regulação gênica frequentemente ligam-se ao DNA de forma cooperativa 445
Os comutadores genéticos complexos que regulam o desenvolvimentoem *Drosophila* são formados por módulos menores 447
O gene *Eve* de *Drosophila* é regulado por controles combinatórios 448
As regiões complexas de controle gênico dos mamíferos também são construídas a partir de módulos regulatórios simples 450
Os isoladores são sequências de DNA que impedem as proteínas eucarióticas de regulação gênica de influenciar genes distantes 452
Os comutadores genéticos evoluíram rapidamente 453
Resumo 453

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE CRIAM TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS 454
Rearranjos de DNA fazem a mediação da variação de fase em bactérias 454
Um conjunto de proteínas de regulação gênica determina o tipo celular em leveduras que se reproduzem por brotamento 455
Duas proteínas que reprimem a síntese uma da outra determinam o estado herdável do bacteriófago lambda 457
Circuitos de regulação gênica podem ser usados para produzir mecanismos de memória 458
Circuitos de transcrição permitem à celula realizar operações lógicas 459
A biologia sintética cria novos mecanismos a partir de porções biológicas existentes 460
Os relógios circadianos têm como base circuitos de retroalimentação em regulação gênica 460
A expressão de um conjunto de genes pode ser coordenada por uma única proteína 462
A expressão de uma proteína de regulação gênica crítica pode desencadear a expressão de uma bateria inteira de genes situados *downstream* no cromossomo 463
O controle gênico combinatório cria muitos tipos celulares diferentes nos eucariotos 464
A formação de um órgão inteiro pode ser desencadeada por uma única proteína de regulação gênica 465
O padrão de metilação do DNA pode ser herdado quando as células de vertebrados se dividem 467
A impressão genômica necessita da metilação do DNA 468
As ilhas ricas em CG estão associadas a muitos genes em mamíferos 470
Mecanismos epigenéticos garantem que padrões estáveis de expressão gênica possam ser transmitidos para as células-filhas 471
As grandes alterações cromossômicas na estrutura da cromatina podem ser herdadas 473
O controle da expressão gênica é intrinsecamente variável 476
Resumo 477

CONTROLES PÓS-TRANSCRICIONAIS 477
A atenuação da transcrição produz a terminação prematura de algumas moléculas de RNA 477
Ribocontroles poderiam representar formas ancestrais de controle gênico 478
O *splicing* alternativo do RNA pode produzir diferentes formas de uma proteína a partir do mesmo gene 479
A definição de gene modificou-se desde a descoberta do *splicing* alternativo do RNA 480
A determinação sexual na *Drosophila* depende de uma série regulada de eventos de *splicing* de RNA 481
Uma mudança no sítio de clivagem no transcrito de RNA e de adição de poli-A pode alterar a extremidade c-terminal de uma proteína 482
A edição do RNA pode alterar o significado da mensagem do RNA 483
O transporte do RNA a partir do núcleo pode ser regulado 485
Alguns mRNAs estão localizados em regiões específicas do citoplasma 486
As regiões 5′ e 3′ não-traduzidas dos mRNAs controlam a sua tradução 488
A fosforilação de um fator de iniciação regula de maneira global a síntese proteica 488
A Iniciação em códons AUG *upstream* do início da tradução pode regular o início da tradução eucariótica 489
Os sítios internos de entrada no ribossomo fornecem oportunidades para o controle traducional 491
A expressão gênica pode ser controlada por uma mudança na estabilidade do mRNA 492
A adição citoplasmática de poli-A pode regular a tradução 493
Pequenos transcritos de RNA não-codificante regulam muitos genes de animais e plantas 493
O RNA de interferência é um mecanismo de defesa celular 495
O RNA de interferência pode direcionar a formação de heterocromatina 496
O RNA de interferência tornou-se uma ferramenta experimental poderosa 497
Resumo 497
Teste seu conhecimento 497
Referências 499

Parte III Métodos

Capítulo 8 Manipulação de Proteínas, DNA e RNA 501

ISOLAMENTO DE CÉLULAS E SEU CRESCIMENTO EM CULTURA 501
Células podem ser isoladas a partir de tecidos intactos 502
Células podem ser crescidas em cultura 502
Linhagens de células eucarióticas são uma fonte amplamente utilizada de células homogêneas 505
Células-tronco embrionárias poderiam revolucionar a medicina 505
O transplante nuclear de células somáticas pode prover uma maneira de gerar células-tronco personalizadas 507
Linhagens celulares de hibridomas são fábricas que produzem anticorpos monoclonais 508
Resumo 510

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 510
Células podem ser separadas em suas frações componentes 510
Extratos celulares provêm sistemas acessíveis para o estudo da função das células 511
Proteínas podem ser separadas por cromatografia 512
A cromatografia de afinidade explora sítios de ligação específicos nas proteínas 513
Alvos geneticamente modificados fornecem uma maneira fácil de purificar proteínas 514
Sistemas livres de células purificados são necessários à dissecação precisa das funções moleculares 516
Resumo 516

ANÁLISE DE PROTEÍNAS 517
As proteínas podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 517
Proteínas específicas podem ser detectadas por *blotting* com anticorpos 518
A espectrometria de massas fornece um método altamente sensível para identificar proteínas desconhecidas 519
Métodos de separação bidimensional são especialmente potentes 521
Medidas hidrodinâmicas revelam o tamanho e a forma de um complexo proteico 522
Grupos de proteínas que interagem podem ser identificados por métodos bioquímicos 523
As interações entre proteínas também podem ser identificadas por uma técnica de dois híbridos em leveduras 523
Dados combinados derivados de diferentes técnicas produzem mapas confiáveis de interações entre proteínas 524
Métodos ópticos podem monitorar as interações entre proteínas em tempo real 524
Algumas técnicas podem monitorar moléculas únicas 526
A função da proteína pode ser interrompida seletivamente com pequenas moléculas 527
A estrutura proteica pode ser determinada pelo uso de difração de raios X 527
A NMR pode ser utilizada para determinar a estrutura de proteínas em solução 529
A sequência da proteína e sua estrutura fornecem pistas sobre a função proteica 530
Resumo 531

ANÁLISE E MANIPULAÇÃO DE DNA 532
Nucleases de restrição cortam grandes moléculas de DNA em fragmentos 532
A eletroforese em gel separa moléculas de DNA de diferentes tamanhos 534
As moléculas de DNA purificadas podem ser marcadas especificamente *in vitro* com radioisótopos ou com marcadores químicos 535
As reações de hibridização de ácidos nucleicos fornecem uma maneira sensível para detectar as sequências específicas de nucleotídeos 535
O *Northern* e o *Southern blotting* facilitam a hibridização com moléculas de ácidos nucleicos separadas por eletroforese 538
Os genes podem ser clonados usando-se bibliotecas de DNA 540
Dois tipos de bibliotecas de DNA servem para diferentes propósitos 541
Os clones de cDNA contêm sequências codificantes não-interrompidas 544
Genes podem ser amplificados seletivamente por PCR 544
As células podem ser usadas como fábricas para produzir proteínas específicas 546
Proteínas e ácidos nucleicos podem ser sintetizados diretamente por reações químicas 548
O DNA pode ser rapidamente sequenciado 548
As sequências de nucleotídeos são utilizadas para predizer a sequência de aminoácidos de proteínas 550
Os genomas de vários organismos foram totalmente sequenciados 551
Resumo 552

ESTUDO DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DOS GENES 553
A genética clássica inicia com a interrupção de um processo celular por mutagênese ao acaso 553
As sondagens genéticas identificam mutantes com anormalidades específicas 556
Mutações podem causar a perda ou o ganho da função proteica 557
Testes de complementação revelam se dois mutantes estão no mesmo gene ou em genes diferentes 558
Os genes podem ser ordenados em vias por análise de epistasia 558
Genes identificados por mutações podem ser clonados 559
A genética humana apresenta problemas especiais e oportunidades 560
Genes humanos são herdados em blocos haploides, que podem ajudar na busca por mutações que causam doença 561
Características complexas são influenciadas por múltiplos genes 563
A genética reversa começa com um gene conhecido e determina quais processos celulares requerem sua função 563
Os genes podem ser modificados de várias maneiras 564
Genes modificados podem ser inseridos na linhagem germinativa de vários organismos 565
Os animais podem ser modificados geneticamente 566
As plantas transgênicas são importantes tanto para a biologia celular como para a agricultura 568
Grandes coleções de nocautes dirigidos fornecem uma ferramenta para examinar a função de cada gene em um organismo 569
O RNA de interferência é uma maneira simples e rápida de testar a função do gene 571
Genes repórter e hibridização *in situ* revelam quando e onde um gene é expresso 572
A expressão de genes individuais pode ser medida usando-se RT-PCR quantitativo 573
Os microarranjos monitoram a expressão de milhares de genes de uma só vez 574
A análise da expressão gênica em células únicas revela o “ruído” biológico 575
Resumo 576
Teste seu conhecimento 576
Referências 578

Capítulo 9 Visualização de Células 579

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS AO MICROSCÓPIO ÓPTICO 579
O microscópio óptico pode resolver detalhes com distâncias de 0,2 μm 580
As células vivas são vistas claramente em um microscópio de contraste de fase ou em um microscópio de contraste de interferência diferencial 583
As imagens podem ser intensificadas e analisadas por técnicas digitais 583
Tecidos intactos normalmente são fixados e cortados antes da microscopia 585
As moléculas específicas podem ser localizadas nas células por microscopia de fluorescência 586
Os anticorpos podem ser utilizados para detectar moléculas específicas 588
É possível obter imagens de objetos tridimensionais complexos com o microscópio óptico 589
O microscópio confocal produz secções ópticas excluindo a luz fora de foco 590
Proteínas fluorescentes podem ser utilizadas para marcar proteínas individuais em células e organismos vivos 592
A dinâmica das proteínas pode ser acompanhada em células vivas 593
Indicadores emissores de luz podem medir as alterações rápidas nas concentrações intracelulares de íons 596
Várias estratégias estão disponíveis para que substâncias às quais a membrana é impermeável possam ser introduzidas nas células 597

A luz pode ser utilizada para manipular objetos microscópicos assim como obter sua imagem 598
Moléculas únicas podem ser visualizadas utilizando-se a microscopia de fluorescência de reflexão interna total 599
Moléculas individuais podem ser tocadas e movidas pelo uso da microscopia de força atômica 600
As moléculas podem ser marcadas com radioisótopos 600
Os radioisótopos são utilizados para acompanhar moléculas em células e em organismos 602
Resumo 603

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS E MOLÉCULAS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO 604
O microscópio eletrônico resolve a estrutura fina da célula 604
As amostras biológicas necessitam de preparação especial para o microscópio eletrônico 605
As macromoléculas específicas podem ser localizadas por microscopia eletrônica de imunolocalização com ouro 606
As imagens de superfícies podem ser obtidas por microscopia eletrônica de varredura 607
O sombreamento com metais permite que características da superfície sejam examinadas com alta resolução por meio de microscopia eletrônica de transmissão 608
A coloração negativa e a microscopia crioeletrônica permitem que as macromoléculas sejam visualizadas com alta resolução 610
Imagens múltiplas podem ser combinadas para aumentar a resolução 610
As vistas diferentes de um único objeto podem ser combinadas para produzir reconstruções tridimensionais 612
Resumo 612
Teste seu conhecimento 614
Referências 615

Parte IV Organização Interna das Células

Capítulo 10 Estrutura da Membrana 617

A BICAMADA LIPÍDICA 617
Fosfoglicerídeos, esfingolipídeos e esteroides são os principais lipídeos das membranas celulares 618
Os fosfolipídeos formam bicamadas espontaneamente 620
A bicamada lipídica é um fluido bidimensional 621
A fluidez da uma bicamada lipídica depende de sua composição 622
Apesar de sua fluidez, as bicamadas lipídicas podem formar domínios de composições distintas 624
As gotas lipídicas são circundadas por uma monocamada fosfolipídica 625
A assimetria da bicamada lipídica é funcionalmente importante 626
Os glicolipídeos são encontrados na superfície de todas as membranas plasmáticas 628
Resumo 629

PROTEÍNAS DE MEMBRANA 629
As proteínas de membrana podem se associar à bicamada lipídica de várias maneiras 629
Os ancoramentos de lipídeos controlam a localização de algumas proteínas de sinalização na membrana 630
A cadeia polipeptídica cruza a bicamada lipídica em uma conformação de hélice α na maioria das proteínas transmembrana 631
As hélices α transmembrana frequentemente interagem umas com as outras 632
Alguns barris β formam grandes canais transmembrana 634
Muitas proteínas de membrana são glicosiladas 635
As proteínas de membrana podem ser solubilizadas e purificadas em detergentes 636
A bacteriorrodopsina é uma bomba de prótons que atravessa a bicamada lipídica como sete hélices α 640
As proteínas de membrana frequentemente atuam como grandes complexos 642
Muitas proteínas de membrana difundem-se no plano da membrana 642
As células podem confinar proteínas e lipídeos em domínios específicos em uma membrana 645
O citoesqueleto cortical proporciona força mecânica e restringe a difusão das proteínas de membrana 646
Resumo 648
Teste seu conhecimento 648
Referências 650

Capítulo 11 Transporte de Membrana de Pequenas Moléculas e as Propriedades Elétricas das Membranas 651

PRINCÍPIOS DO TRANSPORTE DE MEMBRANA 651
As bicamadas lipídicas livres de proteínas são fortemente impermeáveis a íons 652
Existem duas principais classes de proteínas de transporte de membrana: carreadoras e de canal 652
O transporte ativo é mediado por proteínas carreadoras acopladas a uma fonte de energia 653
Resumo 654

PROTEÍNAS CARREADORAS E O TRANSPORTE ATIVO DE MEMBRANA 654
O transporte ativo pode ser dirigido por gradientes de íons 656
As proteínas carreadoras na membrana plasmática regulam o pH citosólico 657
Uma distribuição assimétrica de proteínas carreadoras nas células epiteliais está por trás do transporte transcelular de solutos 658
Existem três classes de bombas acionadas por ATP 659
A bomba de Ca^{2+} é a ATPase do tipo P mais compreendida 660
A bomba Na^+-K^+ da membrana plasmática estabelece o gradiente de Na^+ através da membrana plasmática 661
Os carreadores ABC constituem a maior família de proteínas de transporte de membrana 663
Resumo 667

CANAIS IÔNICOS E AS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DAS MEMBRANAS 667
Os canais iônicos são íon-seletivos e flutuam entre os estados aberto e fechado 667
O potencial de membrana em células animais depende principalmente dos canais de escape de K^+ e do gradiente de K^+ através da membrana plasmática 669
O potencial de repouso decai lentamente quando a bomba de Na^+-K^+ para 669
A estrutura tridimensional de um canal de K^+ bacteriano mostra como um canal iônico pode funcionar 671
As aquaporinas são permeáveis à água, mas impermeáveis a íons 673
A função de uma célula nervosa depende da sua estrutura alongada 675
Os canais de cátions controlados por voltagem geram potenciais de ação em células eletricamente excitáveis 676
A mielinização aumenta a velocidade e a eficácia da propagação do potencial de ação em células nervosas 678
A análise eletrofisiológica de regiões grampeadas indica que os canais individuais controlados abrem de maneira tudo-ou-nada 680
Os canais de cátions controlados por voltagem são evolutiva e estruturalmente relacionados 682
Os canais iônicos controlados por transmissor convertem sinais químicos em sinais elétricos nas sinapses químicas 682
As sinapses químicas podem ser excitatórias ou inibitórias 684
Os receptores de acetilcolina nas junções neuromusculares são canais catiônicos controlados por transmissor 684
Os canais iônicos controlados por transmissor são os principais alvos para fármacos psicoativos 686
A transmissão neuromuscular envolve a ativação sequencial de cinco conjuntos diferentes de canais iônicos 687
Os neurônios individuais são aparelhos de computação complexos 688
A computação neuronal requer uma combinação de pelo menos três tipos de canais de K^+ 689
A potencialização de longo termo no hipocampo de mamíferos depende da entrada de Ca^{2+} pelos canais receptores NMDA 690
Resumo 692
Teste seu conhecimento 693
Referências 694

Capítulo 12 Compartimentos Intracelulares e Endereçamento de Proteínas 695

COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS CÉLULAS 695
Todas as células eucarióticas têm o mesmo conjunto básico de organelas envoltas por membranas 695
A origem evolutiva explica a relação topológica das organelas 697
As proteínas podem mover-se entre os compartimentos de diferentes maneiras 699

As sequências-sinal direcionam proteínas aos destinos celulares corretos 701
A maioria das organelas não pode ser construída *de novo*: elas necessitam de informação na própria organela 702
Resumo 704

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE O NÚCLEO E O CITOSOL 704
Os complexos de poro nuclear perfuram o envelope nuclear 705
Sinais de localização nuclear direcionam as proteínas nucleares ao núcleo 705
Os receptores de importação nuclear ligam-se tanto a sinais de localização nuclear como a proteínas NPC 707
A exportação nuclear funciona como a importação nuclear, mas de modo inverso 708
A GTPase Ran impõe a direcionalidade no transporte através dos NPCs 708
O transporte através de NPCs pode ser regulado pelo controle do acesso à maquinaria de transporte 709
Durante a mitose, o envelope nuclear é desmontado 710
Resumo 712

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS PARA MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS 713
A translocação para dentro da mitocôndria depende de sequências-sinal e de transportadores de proteína 713
As proteínas precursoras mitocondriais são importadas como cadeias polipeptídicas desenoveladas 715
A hidrólise de ATP e um potencial de membrana dirigem a importação de proteína para o espaço da matriz 716
Bactérias e mitocôndrias usam mecanismos similares para inserir porinas em suas membranas externas 717
O transporte para a membrana mitocondrial interna e o espaço intermembrana ocorre por meio de algumas vias 717
Duas sequências-sinal direcionam proteínas para a membrana tilacoidal em cloroplastos 719
Resumo 720

PEROXISSOMOS 721
Os peroxissomos utilizam oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio para realizar reações oxidativas 721
Uma sequência-sinal curta direciona a importação de proteínas aos peroxissomos 722
Resumo 723

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO 723
O retículo endoplasmático é estrutural e funcionalmente diverso 724
As sequências-sinal foram descobertas primeiro em proteínas importadas para o retículo endoplasmático rugoso 726
Uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP) direciona sequências-sinal do RE para um receptor específico na membrana do RE rugoso 727
A cadeia polipeptídica atravessa um poro aquoso no transportador 730
A translocação através da membrana do retículo endoplasmático nem sempre necessita do alongamentoda cadeia polipeptídica em andamento 731
Em proteínas transmembrana de passagem única, somente uma sequência-sinal interna do retículo endoplasmático permanece na bicamada lipídica como uma hélice μ que atravessa a membrana 732
As combinações de sinais de início e de parada da transferência determinam a topologia das proteínas transmembrana de múltiplas passagem 734
As cadeias polipeptídicas transportadas enovelam-se e são montadas no lúmen do retículo endoplasmático rugoso 736
A maioria das proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso é glicosilada pela adição de um oligossacarídeo comum ligado ao *N* 736
Os oligossacarídeos são utilizados como "rótulos" para marcar o estado de enovelamento da proteína 738
As proteínas enoveladas inadequadamente são exportadas do RE e degradadas no citosol 739
As proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático ativam uma resposta de proteína desenovelada 740
Algumas proteínas de membrana adquirem uma âncora de glicosilfosfatidilinositol ligada covalentemente 742
A maioria das bicamadas lipídicas é montada noretículo endoplasmático 743
Resumo 745
Teste seu conhecimento 746
Referências 748

Capítulo 13 Tráfego Intracelular de Vesículas 749

OS MECANISMOS MOLECULARES DO TRANSPORTE DE MEMBRANAS E A MANUTENÇÃO DA DIVERSIDADE DE COMPARTIMENTOS 750
Existem vários tipos de vesículas revestidas 751
A montagem do revestimento de clatrina direciona a formação de vesículas 754
Nem todos os revestimentos formam estruturas semelhantes a cestas 755
Os fosfoinositídeos marcam organelas e domínios de membrana 757
Proteínas citoplasmáticas regulam a liberação e a remoção do revestimento das vesículas 757
GTPases monoméricas controlam a montagem do revestimento 758
Nem todas as vesículas de revestimento são esféricas 760
As proteínas Rab guiam o transporte para a vesícula 760
As SNAREs fazem a mediação da fusão de membranas 762
As SNAREs em interação necessitam ser afastadas antes que possam funcionar novamente 764
As proteínas de fusão virais e as SNAREs podem utilizar mecanismos de fusão semelhantes 764
Resumo 766

TRANSPORTE A PARTIR DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, ATRAVÉS DO APARELHO DE GOLGI 766
As proteínas deixam o retículo endoplasmático em vesículas de transporte revestidas de COPII 767
Somente proteínas que são apropriadamente dobradas e montadas podem deixar o retículo endoplasmático 767
O transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi é mediado por agrupamentos tubulares de vesículas 768
A via de recuperação para o retículo endoplasmático utiliza sinais de direcionamento 769
Muitas proteínas são seletivamente retidas nos compartimentos em que atuam 771
O aparelho de Golgi consiste em uma série ordenada de compartimentos 771
As cadeias de oligossacarídeos são processadas no aparelho de Golgi 773
Os proteoglicanos são montados no aparelho de Golgi 775
Qual é o propósito da glicosilação? 776
O transporte através do aparelho de Golgi deve ocorrer pelo transporte vesicular ou pela maturação das cisternas 777
As proteínas da matriz do Golgi auxiliam a organizar a pilha do Golgi 778
Resumo 779

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA OS LISOSSOMOS 779
Os lisossomos são os principais sítios de digestão intracelular 779
Os lisossomos são heterogêneos 780
Os vacúolos de vegetais e de fungos são nitidamente lisossomos versáteis 781
Múltiplas vias levam materiais aos lisossomos 782
Um receptor de manose-6-fosfato reconhece proteínas lisossômicas na rede *trans* de Golgi 783
O receptor de M6P navega entre membranas específicas 784
Uma região-sinal da cadeia polipeptídica das hidrolases fornece a chave para a adição de M6P 785
Os defeitos na GlcNAc-fosfotransferase causam uma doença de armazenamento nos lisossomos em humanos 785
Alguns lisossomos devem sofrer exocitose 786
Resumo 787

TRANSPORTE PARA O INTERIOR DA CÉLULA A PARTIR DA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSE 787
As células fagocíticas especializadas podem ingerir grandes partículas 787
As vesículas pinocíticas formam-se a partir de fossas revestidas da membrana plasmática 789
Nem todas as vesículas pinocíticas são revestidas de clatrina 790
As células utilizam endocitose mediada por receptores para importar macromoléculas extracelulares selecionadas 791
Os materiais endocitados que não são retirados dos endossomos terminam nos lisossomos 792

As proteínas específicas são removidas dos endossomos iniciais e devolvidas para a membrana plasmática 793
Os corpos multivesiculares formam-se na via para os endossomos tardios 795
A transcitose transfere macromoléculas através de camadas de células epiteliais 797
As células epiteliais possuem dois compartimentos endossômicos iniciais distintos, mas possuem um compartimento endossômico tardio comum 798
Resumo 799

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA O EXTERIOR DA CÉLULA: EXOCITOSE 799
Muitas proteínas e lipídeos parecem ser automaticamente levados do aparelho de Golgi para a superfície celular 800
As vesículas secretoras brotam da rede *trans* de Golgi 801
As proteínas frequentemente são processadas proteoliticamente durante a formação das vesículas secretoras 803
As vesículas secretoras esperam próximas à membrana plasmática até que sejam sinalizadas para liberar os seus conteúdos 803
A exocitose regulada pode ser uma resposta localizada da membrana plasmática e do seu citoplasma subjacente 804
Os componentes de membrana das vesículas secretoras são rapidamente removidos da membrana plasmática 805
Alguns eventos de exocitose regulada servem para aumentar a membrana plasmática 805
As células polarizadas direcionam as proteínas da rede *trans* de Golgi para o domínio apropriado da membrana plasmática 805
Diferentes estratégias guiam lipídeos e proteínas de membrana seletivamente aos domínios corretos da membrana plasmática 806
As vesículas sinápticas podem formar-se diretamente a partir de vesículas endocíticas 807
Resumo 809
Teste seu conhecimento 810
Referências 812

Capítulo 14 Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloropastos **813**

A MITOCÔNDRIA 815
A mitocôndria contém uma membrana externa, uma membrana interna e dois compartimentos internos 816
O ciclo do ácido cítrico gera elétrons de alta energia 817
Um processo quimiosmótico converte a energia de oxidação em ATP 817
O NADH transfere seus elétrons para o oxigênio por meio de três grandes complexos enzimáticos respiratórios 819
À medida que os elétrons movem-se ao longo da cadeia respiratória, a energia é armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna 820
O gradiente de prótons direciona a síntese de ATP 821
O gradiente de prótons direciona o transporte acoplado através da membrana interna 822
Os gradientes de prótons produzem a maior parte do ATP celular 822
As mitocôndrias mantêm uma alta razão ATP: ADP nas células 823
Um alto valor negativo de ΔG é necessário para que a hidrólise do ATP seja útil para a célula 824
A ATP-sintase pode funcionar reversamente para hidrolisar ATP e bombear H^+ 826
Resumo 827

AS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS E SUAS BOMBAS DE PRÓTONS 827
Os prótons, de forma incomum, movimentam-se facilmente 827
O potencial redox é uma medida das afinidades eletrônicas 828
As transferências de elétrons liberam grandes quantidades de energia 829
Os métodos espectroscópicos são usados para identificar muitos dos carreadores de elétrons da cadeia respiratória 829
A cadeia respiratória inclui três grandes complexos enzimáticos embebidos na membrana interna 831
Um centro de ferro-cobre da citocromo-oxidase catalisa a eficiente redução de O_2 832
As transferências de elétrons na membrana mitocondrial interna são mediadas pelo tunelamento de elétrons durante colisões aleatórias 834
Uma grande queda do potencial redox através de cada um dos três complexos enzimáticos respiratórios fornece a energia para o bombeamento de H^+ 835
O bombeamento de H^+ ocorre por mecanismos distintos nos três principais complexos enzimáticos 835
Os ionóforos H^+ desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP 836
O controle respiratório normalmente reprime o fluxo de elétrons através da cadeia 837
Os desacopladores naturais convertem as mitocôndrias da gordura marrom em máquinas geradoras de calor 838
A mitocôndria possui muitas funções críticas no metabolismo celular 838
As bactérias também exploram mecanismos quimiosmóticos para aproveitar a energia 839
Resumo 840

OS CLOROPLASTOS E A FOTOSSÍNTESE 840
O cloroplasto é um membro da família dos plastídeos de organelas 841
Os cloroplastos lembram as mitocôndrias, mas possuem um compartimento adicional 842
Os cloroplastos capturam energia da luz solar e a utilizam para fixar carbono 843
A fixação do carbono é catalisada pela ribulose-bifosfato-carboxilase 844
Três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO_2 que é fixada 845
A fixação do carbono em alguns vegetais é compartimentalizada para facilitar o crescimento sob baixas concentrações de CO_2 846
A fotossíntese é dependente da fotoquímica das moléculas de clorofila 847
Um fotossistema consiste em um centro de reação fotoquímica somado a um complexo da antena 848
Em um centro de reação, a energia luminosa capturada pela clorofila cria um doador forte de elétrons a partir de um doador fraco 849
A fotofosforilação acíclica produz tanto NADPH quanto ATP 850
Os cloroplastos podem produzir ATP pela fotofosforilação cíclica, sem produzir NADPH 853
As estruturas dos fotossistemas I e II estão relacionadas e também lembram fotossistemas bacterianos 853
A força próton-motriz é a mesma nas mitocôndrias e nos cloroplastos 853
As proteínas carreadoras na membrana interna dos cloroplastos controlam as trocas de metabólitos com o citosol 854
Os cloroplastos também realizam outras biossínteses cruciais 855
Resumo 855

OS SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCÔNDRIAS E DE PLASTÍDEOS 855
As mitocôndrias e os cloroplastos contêm sistemas genéticos completos 856
O crescimento e a divisão das organelas determinam o número de mitocôndrias e de plastídeos em uma célula 857
Os genomas das mitocôndrias e dos cloroplastos possuem diferenças 859
As mitocôndrias e os cloroplastos provavelmente evoluíram de bactérias endossimbióticas 859
As mitocôndrias utilizam o código degenerado e podem ter uma variante do código genético 861
As mitocôndrias animais possuem o mais simples sistema genético conhecido 862
Alguns genes de organelas contêm íntrons 863
Os genomas dos cloroplastos dos vegetais superiores contêm cerca de 120 genes 863
Os genes mitocondriais são herdados por um mecanismo não-mendeliano 864
Os genes das organelas são herdados por herança materna em muitos organismos 866
Os mutantes *petite* de leveduras demonstram a extrema importância do núcleo celular para a biogênese mitocondrial 866
As mitocôndrias e os cloroplastos possuem proteínas tecido-específicas codificadas no núcleo celular 867
As mitocôndrias importam e os cloroplastos produzem a maioria dos seus lipídeos 867
As mitocôndrias podem contribuir para o envelhecimento das células e dos organismos 868
Por que as mitocôndrias e os cloroplastos têm os seus próprios sistemas genéticos? 868
Resumo 870

A EVOLUÇÃO DAS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS 870
As células mais primitivas provavelmente produziam ATP por fermentação 870
As cadeias transportadoras de elétrons permitiram que as bactérias anaeróbias utilizassem moléculas não-fermentáveis como suas principais fontes de energia 871
Ao proporcionar uma fonte inesgotável de força redutora, as bactérias fotossintetizantes superaram um grande obstáculo na evolução das células 872
As cadeias transportadoras de elétrons fotossintetizantes mais complexas das cianobactérias produziram o oxigênio atmosférico e permitiram novas formas de vida 873
Resumo 875
Teste seu conhecimento 877
Referências 878

Capítulo 15 Mecanismos da Comunicação Celular 879
PRINCÍPIOS GERAIS DA COMUNICAÇÃO CELULAR 879
As moléculas-sinal extracelulares se ligam a receptores específicos 880
As moléculas-sinal extracelulares podem agir a pequenas ou a grandes distâncias 881
As junções ocludentes permitem que a informação sinalizadora seja compartilhada pelas células vizinhas 884
Cada célula está programada para responder a combinações específicas de moléculas-sinal extracelulares 884
Diferentes tipos celulares respondem diferentemente à mesma molécula-sinal extracelular 885
O destino de algumas células em desenvolvimento depende da sua posição no gradiente morfogênico 886
Uma célula pode alterar rapidamente a concentração de uma molécula somente se o tempo de vida da molécula for curto 886
O óxido nítrico sinaliza pela regulação direta da atividade de proteínas específicas dentro da célula-alvo 887
Os receptores nucleares são proteínas reguladoras gênicas moduladas por ligantes 889
Os receptores associados a canais iônicos, a proteínas G e a enzimas são as três maiores classes de receptores de superfície celular 891
A maioria dos receptores de superfície celular ativados transmite sinais por meio de pequenas moléculas e de uma rede de proteínas de sinalização intracelular 893
Muitas proteínas de sinalização intracelular atuam como comutadores moleculares que são ativados por fosforilação ou por ligação ao GTP 895
Os complexos de sinalização intracelular aumentam a velocidade, a eficiência e a especificidade da resposta 897
As interações entre as proteínas de sinalização intracelular são mediadas por domínios de ligação modulares 897
As células podem usar múltiplos mecanismos para responder abruptamente a um aumento gradual na concentração de um sinal extracelular 899
As redes de sinalização intracelular utilizam circuitos de retroalimentação 901
As células podem ajustar sua sensibilidade ao sinal 902
Resumo 903

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS À PROTEÍNA G (GPCRS) E MEDIADORES INTRACELULARES PEQUENOS 904
As proteínas G triméricas transmitem os sinais a partir dos receptores associados à proteína G 905
Algumas proteínas G regulam a produção de AMP cíclico 905
A proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA) faz a mediação da maioria dos efeitos do AMP cíclico 908
Algumas proteínas G ativam a via de sinalização do fosfolipídeo de inositol pela ativação da fosfolipase C-β 909
O Ca^{2+} funciona como um mediador intracelular ubíquo 912
A frequência das oscilações do Ca^{2+} influencia a resposta celular 912
As proteína-cinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases) fazem a mediação de muitas das respostas aos sinais de Ca^{2+} nas células animais 914
Algumas proteínas G regulam canais iônicos diretamente 916
O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos 917
Os mediadores intracelulares e as cascatas enzimáticas amplificam os sinais extracelulares 919
A dessensibilização dos receptores associados à proteína G depende da fosforilação do receptor 920
Resumo 921

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS A ENZIMAS 921
Os receptores tirosina-cinases ativados se autofosforilam 922
As tirosinas fosforiladas nos receptores tirosina-cinases servem como sítios de ancoragem para proteínas de sinalização intracelular 923
Proteínas com domínios SH2 se ligam às tirosinas fosforiladas 924
A Ras pertence à grande superfamília das GTPases monoméricas 926
Os receptores tirosina-cinases ativam Ras via adaptadores e GEFs: evidências oriundas do olho de *Drosophila* em desenvolvimento 927
Ras ativa um módulo de sinalização de MAP-cinase 928
Proteínas de suporte ajudam a prevenir a intercomunicação entre módulos paralelos de MAP-cinases 930
A família das Rho-GTPases acoplam funcionalmente os receptores de superfície celular ao citoesqueleto 931
A PI 3-cinase produz sítios lipídicos de ancoragem na membrana plasmática 932
A via de sinalização PI 3-cinase-Akt estimula a sobrevivência e o crescimento celular 934
As vias de sinalização ativadas pelos receptores tirosina-cinases e pelos receptores associados à proteína G se sobrepõem 935
Os receptores associados a tirosina-cinases dependem de tirosina-cinases citoplasmáticas 935
Os receptores de citocinas ativam a via de sinalização JAK-STAT, promovendo um caminho rápido para o núcleo 937
As tirosina-fosfatases revertem as fosforilações das tirosinas 938
As proteínas sinalizadoras da superfamília TGFβ atuam por meio de receptores serinatreonina-cinases e Smads 939
As proteína-cinases serinatreonina e tirosina são estruturalmente relacionadas 941
A quimiotaxia bacteriana depende de uma via de sinalização, com dois componentes, ativada por receptores associados a histidina-cinases 941
A metilação do receptor é responsável pela adaptação na quimiotaxia bacteriana 943
Resumo 944

VIAS DE SINALIZAÇÃO DEPENDENTES DE PROTEÓLISE REGULADA DE PROTEÍNAS REGULADORAS GÊNICAS LATENTES 946
O receptor Notch é uma proteína reguladora gênica latente 946
As proteínas Wnt interagem com os receptores Frizzled e inibem a degradação de β-catenina 948
As proteínas Hedgehog se ligam a Patched, liberando a inibição por Smoothened 950
Os múltiplos estímulos estressantes e inflamatórios atuam por meio de uma via de sinalização dependente de NFκB 952
Resumo 954

SINALIZAÇÃO EM PLANTAS 955
A multicelularidade e a comunicação celular evoluíram independentemente em plantas e animais 955
A classe dos receptores serinatreonina-cinases é a maior entre os receptores de superfície celular nas plantas 956
O etileno bloqueia a degradação de proteínas reguladoras gênicas específicas no núcleo 957
O posicionamento regulado dos transportadores de auxina modela o crescimento das plantas 959
Os fitocromos detectam a luz vermelha e os criptocromos detectam a luz azul 960
Resumo 961
Teste seu conhecimento 962
Referências 964

Capítulo 16 Citoesqueleto 965
AUTOASSOCIAÇÃO E ESTRUTURA DINÂMICA DOS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO 965
Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação 966
O citoesqueleto também pode formar estruturas estáveis 969

Cada tipo de filamento do citoesqueleto é construído a partir de subunidades proteicas menores 970
Filamentos formados a partir de múltiplos protofilamentos apresentam vantagens 971
A taxa de nucleação é o fator limitante na formação de um polímero do citoesqueleto 972
As subunidades de actina e tubulina associam-se à cabeça e à cauda em oposição, gerando filamentos polarizados 973
Filamentos de actina e microtúbulos possuem duas extremidades distintas com diferentes taxas de crescimento 975
Os processos de *Treadmilling* (transferência contínua de subunidades de tubulina do final de um microtúbulo para o outro) e de instabilidade dinâmica dos filamentos são consequência da hidrólise de nucleotídeos pela tubulina e pela actina 976
O *Treadmilling* e a instabilidade dinâmica auxiliam a rápida reorganização do citoesqueleto 980
A tubulina e a actina são extremamente conservadas na evolução de eucariotos 982
A estrutura dos filamentos intermediários depende do empacotamento lateral e do enrolamento da supertorção 983
Filamentos intermediários conferem estabilidade mecânica para as células animais 985
A polimerização de filamentos pode ser alterada por substâncias 987
A organização e a divisão celular em bactérias dependem de homólogos do citoesqueleto de eucariotos 989
Resumo 991

COMO AS CÉLULAS REGULAM SEUS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO 992
Um complexo proteico que contém γ-tubulina faz a nucleação dos microtúbulos 992
Os microtúbulos irradiam a partir do centrossomo de células animais 992
Os filamentos de actina frequentemente são nucleados na membrana plasmática 996
O mecanismo de nucleação afeta a organização em larga escala de filamentos 998
Proteínas que se ligam às subunidades livres alteram o crescimento de um filamento 999
Proteínas de quebra regulam o comprimento e a cinética do comportamento de filamentos de actina e de microtúbulos 1000
Proteínas que se ligam lateralmente aos filamentos podem tanto estabilizá-los quanto desestabilizá-los 1001
Proteínas que interagem com as extremidades dos filamentos podem modificar drasticamente sua dinâmica 1002
Diferentes tipos de proteínas alteram as propriedades das extremidades de microtúbulos em rápido crescimento 1003
Os filamentos estão organizados em estruturas complexas nas células 1005
Filamentos intermediários são interligados sob a forma de fortes arranjos em feixes 1005
Proteínas de ligação cruzada (interligação) com diferentes propriedades organizam os diversos arranjos de filamentos de actina 1006
A filamina e a espectrina formam redes de filamentos de actina 1008
Elementos do citoesqueleto estabelecem diversas conexões a membranas 1009
Resumo 1010

MOTORES MOLECULARES 1010
Proteínas motoras com base em actina são membros da superfamília da miosina 1011
Existem dois tipos de proteínas motoras de microtúbulos: cinesinas e dineínas 1014
A semelhança estrutural entre as miosinas e as cinesinas indica uma origem evolutiva comum 1015
As proteínas motoras geram força pelo acoplamento de hidrólise de ATP às mudanças conformacionais 1016
A cinética das proteínas motoras é adaptada às funções da célula 1020
As proteínas motoras medeiam o transporte intracelular de organelas delimitadas por membrana 1021
O citoesqueleto posiciona moléculas específicas de RNA 1022
As células regulam o funcionamento das proteínas motoras 1023
Resumo 1025

O CITOESQUELETO E O COMPORTAMENTO CELULAR 1025
O deslizamento da miosina II e de filamentos de actina provoca a contração muscular 1026
A contração muscular é iniciada por uma súbita elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} 1028
O músculo cardíaco é uma delicada peça de engenharia 1031
Cílios e flagelos são estruturas motrizes construídas a partir de microtúbulos e dineína 1031
A construção do fuso mitótico requer microtúbulos dinâmicos e a interação de diversas proteínas motoras 1034
Diversas células podem deslizar sobre um substrato sólido 1036
A polimerização de actina direciona a protrusão da membrana plasmática 1037
A adesão e a tração permitem que a célula seja impulsionada 1040
Membros da família da proteína Rho provocam grandes rearranjos no citoesqueleto de actina 1041
Sinais extracelulares podem ativar os três membros da família da proteína Rho 1043
Sinais externos podem definir a direção da migração celular 1045
A comunicação entre o citoesqueleto de actina e o de microtúbulos coordena a polarização e a locomoção geral das células 1046
A complexa especialização morfológica dos neurônios depende do citoesqueleto 1047
Resumo 1050
Teste seu conhecimento 1050
Referências 1052

Capítulo 17 Ciclo Celular 1053

PANORAMA GERAL DO CICLO CELULAR 1054
O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases 1054
O controle do ciclo celular é similar em todos os eucariotos 1056
O controle do ciclo celular pode ser geneticamente dissecado pela análise de mutantes de leveduras 1056
O controle do ciclo celular pode ser bioquimicamente analisado em embriões animais 1057
O controle do ciclo celular pode ser estudado em células cultivadas de mamíferos 1059
A progressão do ciclo celular pode ser estudada de várias maneiras 1059
Resumo 1060

O SISTEMA DE CONTROLE DO CICLO CELULAR 1060
O sistema de controle do ciclo celular desencadeia os principais eventos do ciclo celular 1060
O sistema de controle do ciclo celular depende de proteína-cinases dependentes de ciclinas (Cdks) ciclicamente ativadas 1062
A fosforilação inibidora e as proteínas inibidoras de Cdk (CKIs) podem suprimir a atividade das Cdks 1063
O sistema de controle do ciclo celular depende de proteólise cíclica 1064
O controle do ciclo celular também depende de regulação transcricional 1064
O sistema de controle do ciclo celular funciona como uma rede de interruptores bioquímicos 1065
Resumo 1067

FASE S 1067
A S-Cdk inicia a replicação do DNA uma vez por ciclo 1067
A duplicação dos cromossomos requer a duplicação da estrutura da cromatina 1069
As coesinas ajudam a manter as cromátides-irmãs unidas 1070
Resumo 1071

MITOSE 1071
A M-Cdk leva à entrada na mitose 1071
A desfosforilação ativa a M-Cdk no início da mitose 1074
A condensina ajuda a configurar os cromossomos duplicados para a separação 1075
O fuso mitótico é uma máquina com base em microtúbulos 1075
As proteínas motoras dependentes de microtúbulos controlam a montagem e a função do fuso 1077
Dois mecanismos colaboram na montagem de um fuso mitótico bipolar 1077
A duplicação do centrossomo ocorre no início do ciclo celular 1078
A M-Cdk inicia a montagem do fuso na prófase 1078
A conclusão da montagem do fuso em células animais requer a desintegração do envelope nuclear 1079
A instabilidade dos microtúbulos aumenta muito na mitose 1080
Os cromossomos mitóticos promovem a montagem do fuso bipolar 1081

Os cinetocoros ligam as cromátides-irmãs ao fuso 1082
A biorientação é obtida por tentativa e erro 1083
Múltiplas forças movem os cromossomos no fuso 1085
O APC/C provoca a separação da cromátide-irmã e a conclusão da mitose 1087
Cromossomos não-ligados bloqueiam a separação da cromátide-irmã: o ponto de verificação da montagem do fuso 1088
Os cromossomos se segregam na anáfase A e B 1089
Os cromossomos segregados são empacotados em núcleos-filhos na telófase 1090
A meiose é uma forma especial de divisão nuclear envolvida na reprodução sexuada 1090
Resumo 1092

CITOCINESE 1092

A actina e a miosina II do anel contrátil geram força para a citocinese 1093
A ativação local da Rhoa desencadeia a montagem e a contração do anel contrátil 1094
Os microtúbulos do fuso mitótico determinam o plano de divisão da célula animal 1095
O fragmoplasto orienta a citocinese nas plantas superiores 1097
Organelas envoltas por membrana devem ser distribuídas às células-filhas durante a citocinese 1098
Algumas células reposicionam seu fuso para se dividirem assimetricamente 1099
A mitose pode ocorrer sem citocinese 1099
A fase G_1 é um estado estável de inatividade das Cdks 1100
Resumo 1101

CONTROLE DA DIVISÃO E DO CRESCIMENTO CELULAR 1101

Os mitógenos estimulam a divisão celular 1102
As células podem retardar a divisão entrando em um estado especializado de não-divisão 1103
Os mitógenos estimulam as atividades de G_1-Cdk e G_1/S-Cdk 1103
Danos no DNA bloqueiam a divisão celular: a resposta a danos no DNA 1105
Muitas células humanas têm um limite embutido do número de vezes que podem se dividir 1107
Sinais de proliferação anormal ocasionam a interrupção do ciclo celular ou apoptose, exceto em células cancerosas 1107
O crescimento do organismo e de órgãos depende do crescimento celular 1108
Células em proliferação geralmente coordenam o crescimento com a divisão 1108
Células vizinhas competem por proteínas-sinal extracelulares 1110
Os animais controlam a massa celular total por mecanismos desconhecidos 1111
Resumo 1112
Teste seu conhecimento 1112
Referências 1113

Capítulo 18 Apoptose 1115

A morte celular programada elimina células desnecessárias 1115
Células apoptóticas são bioquimicamente reconhecíveis 1117
A apoptose depende de uma cascata proteolítica intracelular mediada por caspases 1118
Receptores da superfície celular ativam a via extrínseca da apoptose 1120
A via intrínseca da apoptose depende da mitocôndria 1121
Proteínas Bcl2 regulam a via intrínseca da apoptose 1121
Caspases inibem IAPs 1124
Fatores de sobrevivência extracelulares inibem a apoptose em várias vias 1126
Apoptose excessiva ou insuficiente pode contribuir para doenças 1127
Resumo 1128
Teste seu conhecimento 1128
Referências 1129

Parte V As Células em seu Contexto Social

Capítulo 19 Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular 1131

CADERINAS E ADESÃO CÉLULA-CÉLULA 1133

As caderinas fazem a mediação da adesão célula-célula dependente de Ca^{2+} em todos os animais 1135
A superfamília das caderinas nos vertebrados abrange centenas de diferentes proteínas, incluindo muitas com funções de sinalização 1136
As caderinas fazem a mediação da adesão homofílica 1137
Adesões seletivas célula-célula permitem que as células dissociadas dos vertebrados reunam-se em tecidos organizados 1139
As caderinas controlam a organização seletiva das células 1140
Twist regula as transições epitélio-mesenquimais 1141
As cateninas ligam as caderinas clássicas ao citoesqueleto de actina 1142
As junções aderentes coordenam a mobilidade entre células adjacentes com base na actina 1142
Os desmossomos proporcionam a força mecânica ao epitélio 1143
As junções célula-célula enviam sinais para o interior da célula 1145
As selectinas fazem a mediação das adesões transientes célula-célula na corrente sanguínea 1145
Proteínas que pertencem à superfamília das imunoglobulinas fazem a mediação da adesão célula-célula independente de Ca^{2+} 1146
Muitos tipos de moléculas de adesão celular atuam em paralelo para criar uma sinapse 1147
As proteínas de sustentação organizam os complexos juncionais 1148
Resumo 1149

JUNÇÕES COMPACTAS E A ORGANIZAÇÃO DO EPITÉLIO 1150

As junções compactas formam uma barreira entre as células e um obstáculo entre os domínios de membrana 1150
As proteínas de sustentação dos complexos juncionais desempenham uma função fundamental no controle da proliferação celular 1153
As junções célula-célula e a lâmina basal governam a polaridade ápico-basal do epitélio 1155
Um sistema de sinalização independente controla a polaridade celular planar 1157
Resumo 1158

PASSAGEM DE CÉLULA PARA CÉLULA: JUNÇÕES TIPO FENDA E PLASMODESMATA 1158

As junções tipo fenda ligam as células de forma elétrica e metabólica 1158
A conexão da junção tipo fenda é constituída por até seis subunidades de conexinas transmembrana 1159
As junções tipo fenda possuem diversas funções 1161
As células podem regular a permeabilidade da junções tipo fenda 1161
Nas plantas, os plasmodesmata realizam muitas das funções das junções tipo fenda 1162
Resumo 1163

A LÂMINA BASAL 1164

A lâmina basal forma a base de todo o epitélio e circunda alguns tipos de células não-epiteliais 1164
A laminina é o principal componente da lâmina basal 1165
O colágeno tipo IV confere força tensora à lâmina basal 1166
As lâminas basais realizam diversas funções 1167
Resumo 1169

INTEGRINAS E ADESÃO CÉLULA-MATRIZ 1169

As integrinas são heterodímeros transmembrana que se ligam ao citoesqueleto 1170
As integrinas podem mudar de uma conformação ativa para uma conformação inativa 1170
Defeitos na integrina são responsáveis por muitas doenças genéticas 1172
As integrinas se agregam para formar adesões fortes 1174
A ligação à matriz extracelular através das integrinas controla a proliferação e a sobrevivência celular 1175
As integrinas recrutam as proteínas sinalizadoras intracelulares para os locais de adesão célula-substrato 1176
As integrinas podem produzir efeitos intracelulares localizados 1177
Resumo 1178

A MATRIZ EXTRACELULAR DOS TECIDOS CONECTIVOS ANIMAIS 1178

A matriz extracelular é produzida e orientada pelas células 1179
As cadeias de glicosaminoglicanos ocupam grande parte do espaço e formam géis hidratados 1179
A hialuronana atua como um preenchedor de espaços e facilita a migração celular durante a morfogênese e o reparo 1180
Os proteoglicanos são compostos de cadeias de GAGs covalentemente ligadas a um núcleo proteico 1181

Os proteoglicanos podem regular a atividade das proteínas secretadas 1182
Os proteoglicanos de superfície celular atuam como receptores 1183
Os colágenos são as principais proteínas da matriz extracelular 1184
As cadeias de colágeno sofrem uma série de modificações pós-tradução 1186
Os pró-peptídeos são clivados em pró-colágeno após sua secreção, para permitir a montagem de fibrilas 1187
Os colágenos associados às fibrilas secretadas auxiliam na organização das fibrilas 1187
As células auxiliam na organização das fibrilas de colágeno que secretam, exercendo tensão na matriz 1189
A elastina confere elasticidade aos tecidos 1189
A fibronectina é uma proteína extracelular que auxilia a ligação das células à matriz 1191
A tensão exercida pelas células regula a reunião das fibrilas de fibronectina 1191
A fibronectina se liga às integrinas pelo motivo RGD 1193
As células devem ser capazes de degradar e produzir matriz 1193
A degradação da matriz é localizada nas vizinhanças das células 1194
Resumo 1195

A PAREDE CELULAR DAS PLANTAS 1195
A composição da parede celular depende do tipo celular 1195
A força tensora da parede celular permite que as células vegetais desenvolvam pressão de turgor 1197
A parede celular primária é constituída por microfibrilas de celulose estrelaçadas com uma rede de polissacarídeos pectínicos 1197
A deposição orientada da parece celular controla o crescimento da planta 1199
Os microtúbulos orientam a deposição da parede celular 1200
Resumo 1202
Teste seu conhecimento 1202
Referências 1204

Capítulo 20 Câncer **1205**
CÂNCER COMO UM PROCESSO MICROEVOLUTIVO 1205
As células cancerosas reproduzem-se desenfreadamente e colonizam outros tecidos 1206
Muitos cânceres originam-se de uma única célula anormal 1207
As células cancerosas possuem mutações somáticas 1208
Uma única mutação não é suficiente para causar um câncer 1209
Cânceres se desenvolvem gradualmente pelo aumento de células aberrantes 1210
A detecção precoce previne o câncer de cérvice 1211
A progressão dos tumores envolve sucessivos ciclos de mutação e de seleção natural 1212
As mudanças epigenéticas que se acumulam nas células cancerosas envolvem a estrutura da cromatina herdada e a metilação do DNA 1213
Células cancerosas humanas são geneticamente instáveis 1214
O crescimento do câncer depende de um controle deficiente da morte celular, da diferenciação celular, ou de ambos 1215
As células cancerosas em geral são alteradas em resposta a danos no DNA e a outras formas de estresse 1216
Células cancerosas humanas escapam do limite interno de proliferação celular 1217
Uma pequena população de células-tronco mantém muitos tumores 1217
Como surgem as células-tronco cancerosas? 1218
Para estabelecer metástases, as células cancerosas malignas devem sobreviver e proliferar em um ambiente inóspito 1220
Tumores induzem angiogênese 1220
O microambiente do tumor influencia o desenvolvimento do câncer 1221
Diversas propriedades contribuem para o crescimento canceroso 1223
Resumo 1223

CAUSAS EVITÁVEIS DO CÂNCER 1224
Muito dos agentes causadores de câncer, mas nem todos, lesionam o DNA 1225
Os iniciadores de tumor lesionam o DNA; os promotores de tumor não 1226
Vírus e outras infecções contribuem para uma proporção significativa de cânceres humanos 1227
A identificação dos carcinógenos revela maneiras de evitar o câncer 1229
Resumo 1230

DESCOBRINDO OS GENES CRÍTICOS PARA O CÂNCER 1230
A identificação de mutações determinantes de ganho ou de perda de função requer métodos distintos 1231
Retrovírus podem agir como vetores de oncogenes que alteram o comportamento celular 1232
Diferentes buscas por oncogenes sempre convergem para o mesmo gene – Ras 1233
Estudos de síndromes cancerosas hereditárias raras identificaram os genes supressores de tumor 1234
Os genes supressores podem ser identificados no estudo de tumores 1235
Os genes supressores de tumor podem ser inativados por mecanismos genéticos e epigenéticos 1235
Genes mutados no câncer podem se tornar hiperativos de várias maneiras 1237
A busca por genes críticos para o câncer continua 1239
Resumo 1240

AS BASES MOLECULARES DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS CANCEROSAS 1241
Estudos tanto de embriões em desenvolvimento como de camundongos geneticamente modificados ajudaram a descobrir a função dos genes críticos para o câncer 1241
Muitos genes críticos para o câncer regulam a proliferação celular 1242
Vias distintas podem mediar a desregulação da progressão do ciclo celular e a desregulação do crescimento celular em células cancerosas 1244
Mutações nos genes que regulam a apoptose permitem às células cancerosas sobreviverem quando não deveriam 1245
Mutações no gene *p53* permitem que muitas células cancerosas sobrevivam e proliferem apesar das lesões no DNA 1246
Vírus de DNA tumorais bloqueiam a ação de proteínas-chave supressoras de tumor 1247
As alterações nas células tumorais que levam à metástase ainda são um grande mistério 1249
Cânceres colorretais se desenvolvem lentamente, via uma sucessão de alterações visíveis 1250
Poucas lesões genéticas chave são comuns a uma ampla fração de cânceres colorretais 1251
Alguns cânceres colorretais possuem defeitos na maquinaria de reparo de pareamento incorreto de bases 1254
As etapas da progressão do tumor frequentemente podem ser correlacionadas a mutações específicas 1254
Cada caso de câncer é caracterizado por seu próprio arranjo de lesões genéticas 1256
Resumo 1256

TRATAMENTO DO CÂNCER: PRESENTE E FUTURO 1256
A busca para a cura dos cânceres é difícil, mas não impossível 1257
As terapias tradicionais exploram a instabilidade genética e a perda da resposta dos pontos de verificação do ciclo celular em células cancerosas 1257
Novos fármacos poderão explorar a causa específica da instabilidade genética de um tumor 1257
A instabilidade genética ajuda a tornar os cânceres progressivamente mais resistentes a terapias 1259
Novas terapias estão emergindo do nosso conhecimento em biologia do câncer 1260
Pequenas moléculas podem ser desenvolvidas para inibir proteínas oncogênicas específicas 1260
Vasos sanguíneos tumorais são um alvo lógico para terapia anticâncer 1262
Muitos cânceres podem ser tratados pelo aumento da resposta imune contra um tumor específico 1262
O tratamento do paciente com vários fármacos simultaneamente tem vantagem potencial para a terapia anticâncer 1263
O perfil da expressão gênica pode ajudar a classificar os cânceres em subgrupos clinicamente significativos 1264
Ainda há muito o que fazer 1264
Resumo 1265
Teste seu conhecimento 1265
Referências 1267

Os Capítulos 21 a 25 estão disponíveis no CD-ROM

Capítulo 21 Reprodução Sexuada: Meiose, Células Germinativas e Fecundação 1269

VISÃO GERAL DE REPRODUÇÃO SEXUADA 1269
Em eucariotos superiores, a fase haploide é curta 1269
Meiose cria diversidade genética 1271
A reprodução sexuada proporciona uma vantagem competitiva aos organismos 1271
Resumo 1272

MEIOSE 1272
Os gametas são produzidos por duas divisões celulares meióticas 1272
Os cromossomos homólogos duplicados (e os cromossomos sexuais) formam pares durante o início da prófase I 1274
O pareamento dos homólogos culmina na formação de um complexo sinaptotênico 1275
A segregação dos homólogos depende de proteínas específicas da meiose associadas ao cinetocoro 1276
A meiose frequentemente funciona mal 1278
O *crossing-over* reforça o rearranjo genético 1279
O *crossing-over* é altamente regulado 1280
Nos mamíferos, a meiose é regulada de forma diferente em machos e fêmeas 1280
Resumo 1281

CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS E DETERMINAÇÃO DO SEXO EM MAMÍFEROS 1282
Sinais de células vizinhas especificam PGCs em embriões mamíferos 1282
As PGCs migram para a gônada em desenvolvimento 1283
O gene *Sry* direciona a gônada mamífera em desenvolvimento a tornar-se um testículo 1283
Muitos aspectos da reprodução sexuada variam bastante entre espécies animais 1285
Resumo 1286

OÓCITOS 1287
Um oócito é altamente especializado para desenvolvimento independente 1287
Os oócitos desenvolvem-se em etapas 1288
Os oócitos utilizam mecanismos especiais para atingir seu tamanho grande 1290
A maioria dos oócitos humanos morre sem maturar 1291
Resumo 1292

ESPERMATOZOIDES 1292
Os espermatozoides estão altamente adaptados para transferir seu DNA para um oócito 1292
Os espermatozoides são produzidos continuamente no testículo mamífero 1293
Os espermatozoides se desenvolvem como um sincício 1294
Resumo 1296

FECUNDAÇÃO 1297
Espermatozoides ejaculados se tornam capacitados no trato genital feminino 1297
Espermatozoides capacitados ligam-se à zona pelúcida e sofrem uma reação acrossômica 1298
O mecanismo de fusão espermatozoide-oócito ainda é desconhecido 1298
A fusão do espermatozoide ativa o oócito por aumentaro Ca^{2+} no citosol 1299
A reação cortical ajuda a garantir que apenas um espermatozoide fecunde o oócito 1300
O espermatozoide fornece centríolos assim como seu genoma para o zigoto 1301
A fecundação *in vitro* e a injeção intracitoplasmática do espermatozoide estão revolucionando o tratamento da infertilidade humana 1301
Resumo 1303
Referências 1304

Capítulo 22 Desenvolvimento de Organismos Multicelulares 1305

MECANISMOS UNIVERSAIS DE DESENVOLVIMENTO ANIMAL 1305
Os animais compartilham algumas características anatômicas básicas 1307
Os animais multicelulares são ricos em proteínas que fazem a mediação das interações celulares e da regulação gênica 1308
O DNA regulador define o programa de desenvolvimento 1309
A manipulação do embrião revela as interações entre as suas células 1310
Os estudos de animais mutantes identificam os genes que controlam os processos do desenvolvimento 1311
Uma célula toma as decisões sobre o seu desenvolvimento muito antes de mostrar uma mudança visível 1311
As células relembram valores posicionais que refletem a sua localização no corpo 1312
Sinais indutivos podem criar diferenças ordenadas entre células inicialmente idênticas 1313
Células-irmãs podem nascer diferentes por uma divisão celular assimétrica 1313
A retroalimentação positiva pode originar assimetria onde não havia antes 1314
A retroalimentação positiva gera padrões, cria resultados tudo-ou-nada e provê memória 1315
Um pequeno conjunto de vias de sinalização, utilizado repetidamente, controla o padrão de desenvolvimento 1316
Morfógenos são indutores de longo alcance que exercem efeitos graduados 1316
Os inibidores extracelulares de moléculas-sinal moldam a resposta ao indutor 1317
Os sinais de desenvolvimento podem se espalhar através de um tecido de diferentes maneiras 1318
Os programas que são intrínsecos a uma célula frequentemente definem o curso de tempo do seu desenvolvimento 1319
Enquanto o embrião cresce, os padrões iniciais são estabelecidos em pequenos grupos de células e refinados por indução sequencial 1319
Resumo 1320

CAENORHABDITIS ELEGANS: O DESENVOLVIMENTO A PARTIR DA PERSPECTIVA DE UMA CÉLULA INDIVIDUAL 1321
O *Caenorhabditis elegans* é anatomicamente simples 1321
Os destinos celulares no nematoide em desenvolvimento são quase perfeitamente previsíveis 1322
Os produtos de genes de efeito materno organizam a divisão assimétrica do ovo 1323
Os padrões progressivamente mais complexos são criados por interações célula-célula 1324
A microcirurgia e a genética revelam a lógica do controle do desenvolvimento; a clonagem de genes e o seu sequenciamento revelam seus mecanismos moleculares 1325
As células alteram suas capacidades de resposta aos sinais do desenvolvimento ao longo do tempo 1325
Os genes heterocrônicos controlam o tempo no desenvolvimento 1326
As células não contam as divisões celulares para cronometrar seus programas internos 1327
Células selecionadas morrem por apoptose como parte do programa de desenvolvimento 1327
Resumo 1328

DROSOPHILA E A GENÉTICA MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE PADRÕES: A GÊNESE DO PLANO CORPORAL 1328
O corpo do inseto é construído como uma série de unidades segmentares 1329
A *Drosophila* inicia o seu desenvolvimento como um sincício 1330
As sondagens genéticas definem os grupos de genes necessários aos aspectos específicos da formação dos padrões iniciais 1332
As interações do oócito com seu ambiente definem os eixos do embrião: a função dos genes de polaridade do ovo 1333
Os genes de sinalização dorso-ventrais criam um gradiente de uma proteína nuclear de regulação gênica 1334

Dpp e Sog produzem um gradiente de morfógenos secundário para refinar o padrão da parte dorsal do embrião 1336
O eixo dorso-ventral dos insetos corresponde ao eixo ventro-dorsal dos vertebrados 1336
Três classes de genes de segmentação refinam o padrão materno ântero-posterior e subdividem o embrião 1336
A expressão localizada dos genes de segmentação é regulada por uma hierarquia de sinais posicionais 1337
A natureza modular do DNA regulador permite que os genes possuam múltiplas funções controladas independentemente 1339
Os genes de polaridade do ovo, os genes *gap* e os genes *pair-rule* criam um padrão transiente que é relembrado por outros genes 1340
Resumo 1341

GENES SELETORES HOMEÓTICOS E A FORMAÇÃO DE PADRÕES DO EIXO ÂNTERO-POSTERIOR 1341
O código Hox especifica diferenças ântero-posteriores 1342
Os genes seletores homeóticos codificam proteínas de ligação ao DNA que interagem com outras proteínas de regulação gênica 1342
Os genes seletores homeóticos são expressos sequencialmente de acordo com a sua ordem no complexo Hox 1343
O complexo Hox carrega um registro permanente das informações posicionais 1344
O eixo ântero-posterior é controlado pelos genes seletores *Hox* também nos vertebrados 1344
Resumo 1347

ORGANOGÊNESE E A FORMAÇÃO DOS PADRÕES DOS ÓRGÃOS ACESSÓRIOS 1347
As mutações somáticas condicionais e induzidas tornam possível analisar funções gênicas tardias no desenvolvimento 1348
As partes do corpo da mosca adulta desenvolvem-se a partir dos discos imaginais 1349
Os genes seletores homeóticos são essenciais para a memória da informação posicional nas células dos discos imaginais 1351
Genes reguladores específicos definem as células que formarão um órgão acessório 1351
O disco da asa de insetos é dividido em compartimentos 1352
Quatro vias de sinalização da mesma família combinam-se para formar o padrão dos discos da asa: Wingless, Hedgehog, Dpp e Notch 1353
O tamanho de cada compartimento é regulado por interações entre as suas células 1353
Os padrões dos membros dos vertebrados são formados por mecanismos similares 1355
A expressão localizada de classes específicas de proteínas de regulação gênica prenuncia a diferenciação celular 1356
A inibição lateral produz a distinção das células-mãe sensoriais nos agrupamentos pró-neurais 1357
A inibição lateral direciona a progênie da célula-mãe sensorial a diferentes destinações finais 1357
A polaridade planar das divisões assimétricas é controlada pela sinalização via receptor Frizzled 1358
As divisões assimétricas de células-tronco geram neurônios adicionais no sistema nervoso central 1359
As divisões assimétricas do neuroblasto segregam um inibidor da divisão celular em apenas uma das células-filhas 1361
A sinalização por Notch regula o padrão mais refinado dos tipos celulares diferenciados em diversos tipos de tecidos 1362
Alguns genes reguladores chave definem um tipo celular; outros podem ativar o programa para a criação de um órgão inteiro 1362
Resumo 1363

MOVIMENTOS CELULARES E A DETERMINAÇÃO DA FORMA DO CORPO DOS VERTEBRADOS 1363
A polaridade do embrião de anfíbios depende da polaridade do óvulo 1364
A clivagem produz muitas células a partir de uma 1365
A gastrulação transforma uma bola côncava de células em uma estrutura de três camadas com um intestino primitivo 1365
Os movimentos da gastrulação são precisamente previsíveis 1366
Sinais químicos desencadeiam os processos mecânicos 1367
Mudanças ativas no empacotamento celular propiciam uma força motriz à gastrulação 1368
Padrões variáveis de moléculas de adesão celular forçam a formação de novos arranjos de células 1369
A notocorda se alonga, enquanto a placa neural se enrola para formar o tubo neural 1370
Um oscilador da expressão gênica controla a segmentação da mesoderme para somitos 1371
A retroalimentação negativa retardada pode gerar as oscilações do relógio de segmentação 1373
Os tecidos embrionários são invadidos de modo estritamente controlado por células migratórias 1373
A distribuição das células migrantes depende de fatores de sobrevivência, assim como de sinais de direcionamento 1375
A assimetria esquerda-direita do corpo dos vertebrados deriva da assimetria molecular no embrião jovem 1376
Resumo 1377

O CAMUNDONGO 1378
O desenvolvimento de mamíferos começa com um preâmbulo especializado 1378
O embrião jovem de mamíferos é altamente regulador 1380
As células-tronco embrionárias totipotentes podem ser obtidas a partir de um embrião de mamífero 1380
Interações entre o epitélio e o mesênquima geram estruturas tubulares ramificadas 1381
Resumo 1382

DESENVOLVIMENTO NEURAL 1383
São designadas diferentes características aos neurônios de acordo com o momento e o local onde nasceram 1383
A característica atribuída a um neurônio em seu nascimento estabelece as conexões que ele irá formar 1385
Cada axônio ou dendrito se estende por meio de um cone de crescimento em sua ponta 1386
O cone de crescimento guia o neurito em desenvolvimento ao longo de um caminho precisamente definido *in vivo* 1387
Os cones de crescimento podem alterar sua sensibilidade à medida que se deslocam 1389
Os tecidos-alvo liberam fatores neurotróficos que controlam o crescimento e a sobrevivência das células nervosas 1389
A especificidade neuronal orienta a formação de mapas neurais organizados 1391
Os axônios de diferentes regiões da retina respondem diferentemente a um gradiente de moléculas repulsivas no tectum 1392
Os padrões difusos das conexões sinápticas se tornam nítidos pelo remodelamento dependente de atividade 1393
A experiência molda o padrão de conexões sinápticas no cérebro 1395
A memória adulta e a remodelação das sinapses durante o desenvolvimento podem depender de mecanismos similares 1396
Resumo 1397

DESENVOLVIMENTO VEGETAL 1398
A *Arabidopsis* serve de organismo-modelo para a genética molecular de plantas 1398
O genoma de *Arabidopsis* é rico em genes controladores do desenvolvimento 1399
O desenvolvimento embrionário inicia com o estabelecimento de um eixo raiz-caule e é, então, interrompido dentro da semente 1400
As partes de uma planta são sequencialmente geradas por meristemas 1403
O desenvolvimento da plântula depende de sinais ambientais 1403
Sinais hormonais de longo alcance coordenam eventos do desenvolvimento em partes separadas da planta 1403
A forma de cada nova estrutura depende da divisão e da expansão celular orientada 1406
Cada módulo vegetal cresce a partir de um conjunto microscópico de primórdios em um meristema 1407
O transporte polarizado de auxina controla o padrão de primórdios no meristema 1408
A sinalização celular mantém o meristema 1409
Mutações reguladoras podem transformar a topologia vegetal pela alteração do comportamento celular no meristema 1410
A ativação para a floração depende de sinais ambientais passados e presentes 1412
Os genes seletores homeóticos especificam as partes de uma flor 1413
Resumo 1415
Referências 1415

Capítulo 23 Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos 1417

A EPIDERME E SUA RENOVAÇÃO POR MEIO DE CÉLULAS-TRONCO 1417
As células da epiderme formam uma barreira impermeável estratificada 1419
As células epidérmicas em diferenciação expressam uma sequência de genes diferentes à medida que amadurecem 1420
Células-tronco na camada basal asseguram a renovação da epiderme 1420
As duas células-filhas de uma célula-tronco não têm sempre que se tornar diferentes 1421
A camada basal contém tanto células-tronco como células amplificadoras transitórias 1422
Divisões amplificadoras transitórias são parte da estratégia de controle do crescimento 1423
As células-tronco de alguns tecidos conservam seletivamente as fitas originais do DNA 1424
A taxa de divisão de células-tronco pode aumentar dramaticamente quando células novas são necessárias com urgência 1425
A interação de muitos sinais dirige a renovação da epiderme 1426
A glândula mamária sofre ciclos de desenvolvimento e de regressão 1426
Resumo 1428

EPITÉLIO SENSORIAL 1429
Os neurônios sensoriais olfatórios são continuamente substituídos 1429
As células pilosas auditivas têm de durar a vida toda 1430
A maioria das células permanentes renova suas partes: as células fotorreceptoras da retina 1432
Resumo 1433

AS VIAS AÉREAS E O INTESTINO 1434
Os tipos celulares adjacentes colaboram nos alvéolos dos pulmões 1434
Células caliciformes, células ciliadas e macrófagos colaboram para manter as vias aéreas limpas 1434
O revestimento do intestino delgado renova a si mesmo mais rápido que qualquer outro tecido 1436
A sinalização Wnt mantém o compartimento de células-tronco do intestino 1438
A sinalização Notch controla a diversificação celular do intestino 1439
A sinalização efrina-Eph controla a migração de células epiteliais do intestino 1440
As vias de sinalização Wnt, Hedgehog, PDGF e BMP combinam-se para delimitar o nicho de células-tronco 1441
As funções do fígado como uma interface entre o tubo digestivo e o sangue 1442
A perda celular do fígado estimula a sua proliferação celular 1443
A renovação de tecido não depende obrigatoriamente de células-tronco: as células secretoras de insulina no pâncreas 1444
Resumo 1445

VASOS SANGUÍNEOS, LINFÁTICOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS 1445
As células endoteliais revestem todos os vasos sanguíneos e linfáticos 1445
Extremidades de células endoteliais abrem caminho para a angiogênese 1446
Tipos diferentes de células endoteliais formam tipos diferentes de vasos 1447
Tecidos que necessitam de um suprimento de sangue liberam VEGF; a sinalização Notch entre células endoteliais regula a resposta 1448
Sinais das células endoteliais controlam o recrutamento de pericitos e células musculares lisas para formar a parede do vaso 1450
Resumo 1450

RENOVAÇÃO POR CÉLULAS-TRONCO MULTIPOTENTES: FORMAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE 1450
As três principais categorias de células brancas do sangue são granulócitos, monócitos e linfócitos 1451
A produção de cada tipo de célula do sangue na medula óssea é controlada individualmente 1453
A medula óssea contém células-tronco hemopoiéticas 1454
Uma célula-tronco multipotente origina todas as categorias de células sanguíneas 1456
O comprometimento é um processo de etapas sucessivas 1456
A divisão de células progenitoras comprometidas amplifica o número de células sanguíneas especializadas 1457
As células-tronco dependem dos sinais de contato de células do estroma 1458
Os fatores que regulam a hemopoiese podem ser analisados em cultivo 1459
A eritropoiese depende do hormônio eritropoietina 1459
Múltiplos CSFs influenciam a produção de neutrófilos e macrófagos 1460
O comportamento de uma célula hemopoiética depende em parte do acaso 1461
A regulação da sobrevivência celular é tão importante quanto a regulação da proliferação celular 1462
Resumo 1462

ORIGEM, MODULAÇÃO E REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO 1463
Os mioblastos fundem-se para formar novas fibras musculares esqueléticas 1464
As células musculares podem variar suas propriedades mudando as isoformas das proteínas que contêm 1465
As fibras musculares esqueléticas secretam miostatina para limitar o seu próprio crescimento 1465
Alguns mioblastos continuam como células-tronco quiescentes (inativas) no adulto 1466
Resumo 1467

FIBROBLASTOS E SUAS TRANSFORMAÇÕES: A FAMÍLIA DE CÉLULAS DO TECIDO CONECTIVO 1467
Os fibroblastos mudam suas características em resposta aos sinais químicos 1467
A matriz extracelular pode influenciar a diferenciação das células do tecido conectivo por influenciar na forma e na ligação celular 1468
Os osteoblastos produzem matriz óssea 1469
A maioria dos ossos é construída em torno de modelos cartilaginosos 1470
O osso é remodelado constantemente pelas células em seu interior 1472
Os osteoclastos são controlados por sinais de osteoblastos 1473
As células adiposas podem desenvolver-se a partir de fibroblastos 1474
A leptina secretada por células adiposas promove o *feedback* para regular o consumo de alimento 1475
Resumo 1476

MODIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO 1476
Células-tronco hemopoiéticas podem ser usadas para substituir células sanguíneas doentes por outras saudáveis 1477
Populações de células-tronco epidérmicas podem ser expandidas em cultivo para o reparo de tecido 1477
As células-tronco neurais podem ser manipuladas em cultivo 1478
As células-tronco neurais podem repovoar o sistema nervoso central 1478
No organismo adulto, as células-tronco são específicas para o tecido 1479
As células-tronco embrionárias podem produzir qualquer parte do corpo 1480
Células-tronco embrionárias específicas para o paciente poderiam resolver o problema da rejeição imunológica 1481
Células-tronco embrionárias são úteis para a descoberta de fármacos e a análise de doenças 1482
Resumo 1482
Referências 1483

Capítulo 24 Patógenos, Infecção e Imunidade Inata 1485

INTRODUÇÃO AOS PATÓGENOS 1486
Os patógenos desenvolvem mecanismos específicos de interação com seus hospedeiros 1486
Os sinais e os sintomas de uma infecção podem ser causados pelo patógeno ou pela resposta do hospedeiro 1487
Os patógenos são filogeneticamente diversos 1488
As bactérias patogênicas possuem genes especializados em virulência 1489
Os fungos e os protozoários parasitas têm um ciclo de vida complexo com formas diversas 1494
Os vírus utilizam a maquinaria da célula hospedeira em todos os aspectos de sua multiplicação 1496
Os príons são proteínas infecciosas 1498
Agentes causais das moléstias infecciosas estão ligados ao câncer, a doenças cardíacas e a outras doenças crônicas 1499
Resumo 1501

BIOLOGIA CELULAR DA INFECÇÃO 1501
Os patógenos atravessam barreiras protetoras para colonizar o hospedeiro 1501

Os patógenos que colonizam o epitélio evitam ser eliminados pelo hospedeiro 1502
Os patógenos intracelulares possuem mecanismos tanto para a penetração quanto para a saída das células hospedeiras 1504
Partículas virais ligam-se a moléculas apresentadas na superfície da célula hospedeira 1505
Os vírions penetram as células hospedeiras por fusão de membrana, por formação de poros ou por rompimento da membrana 1506
As bactérias penetram as células hospedeiras por fagocitose 1507
Os parasitas eucarióticos intracelulares invadem de forma ativa a célula hospedeira 1508
Muitos patógenos alteram o tráfego da membrana de células hospedeiras 1511
Os vírus e as bactérias utilizam o citoesqueleto da célula hospedeira para seus movimentos intracelulares 1514
As infecções virais apropriam-se do metabolismo das células hospedeiras 1517
Os patógenos podem alterar o comportamento do organismo hospedeiro para facilitar a sua disseminação 1518
Os patógenos evoluem rapidamente 1518
A variação antigênica nos patógenos ocorre por mecanismos múltiplos 1519
Replicação propensa a erros dominou a evolução viral 1520
Os patógenos resistentes a fármacos são um problema crescente 1521
Resumo 1524

BARREIRAS CONTRA INFECÇÃO E O SISTEMA IMUNE INATO 1524
A superfície epitelial e as defensinas ajudam a prevenir a infecção 1525
Células humanas reconhecem características conservadas dos patógenos 1526
A ativação do complemento marca os patógenos para fagocitose ou para lise 1528
As proteínas semelhantes a Toll e NOD pertencem a uma antiga família de receptores de reconhecimento de padrões característicos 1530
As células fagocíticas caçam, englobam e destroem os patógenos 1531
Os macrófagos ativados contribuem para a resposta inflamatória nos sítios da infecção 1533
As células infectadas por vírus desenvolvem medidas drásticas para evitar a replicação viral 1534
As células matadoras naturais induzem as células infectadas por vírus a cometer suicídio 1535
As células dendríticas suprem a ligação entre as respostas inata e adaptativa do sistema imune 1536
Resumo 1537
Referências 1537

Capítulo 25 Sistema Imune Adaptativo 1539

LINFÓCITOS E AS BASES CELULARES DA IMUNIDADEADAPTATIVA 1540
Os linfócitos são necessários à imunidade adaptativa 1540
Os sistemas imunes inato e adaptativo atuam conjuntamente 1541
Os linfócitos B desenvolvem-se na medula óssea; os linfócitos T desenvolvem-se no timo 1543
O sistema imune adaptativo atua por meio da seleção clonal 1544
A maioria dos antígenos ativa vários clones de linfócitos diferentes 1545
A memória imunológica é decorrente tanto da expansão clonal quanto da diferenciação de linfócitos 1545
A tolerância imunológica garante que os antígenos próprios não sejam atacados 1547
Os linfócitos circulam continuamente através dos órgãos linfoides periféricos 1549
Resumo 1551

CÉLULAS B E ANTICORPOS 1551
As células B produzem anticorpos que atuam tanto como receptores de superfície celular quanto como proteínas secretadas 1552
Um anticorpo típico possui dois sítios idênticos de ligação a antígenos 1552
Uma molécula de anticorpo é composta por cadeias pesadas e cadeias leves 1552
Existem cinco classes de cadeias pesadas de anticorpos, cada uma com atividades biológicas diferentes 1553
A intensidade de interação antígeno-anticorpo depende do número e da afinidade dos sítios de ligação ao antígeno 1557
As cadeias leves e pesadas dos anticorpos são compostas por regiões constantes e variáveis 1558
As cadeias leves e pesadas são compostas por domínios de Ig repetitivos 1559
Um sítio de ligação a antígenos é construído por alças hipervariáveis 1560
Resumo 1561

A GERAÇÃO DA DIVERSIDADE DOS ANTICORPOS 1562
Os genes que codificam os anticorpos são combinados a partir de segmentos de genes separados durante o desenvolvimento da célula B 1562
As junções imprecisas dos segmentos gênicos aumentam a diversidade das regiões V 1564
O controle da recombinação V(D)J assegura que as células B sejam monoespecíficas 1565
As hipermutações somáticas dirigidas por antígenos determinam respostas precisas de anticorpos 1566
As células B podem trocar a classe dos anticorpos que produzem 1567
Resumo 1568

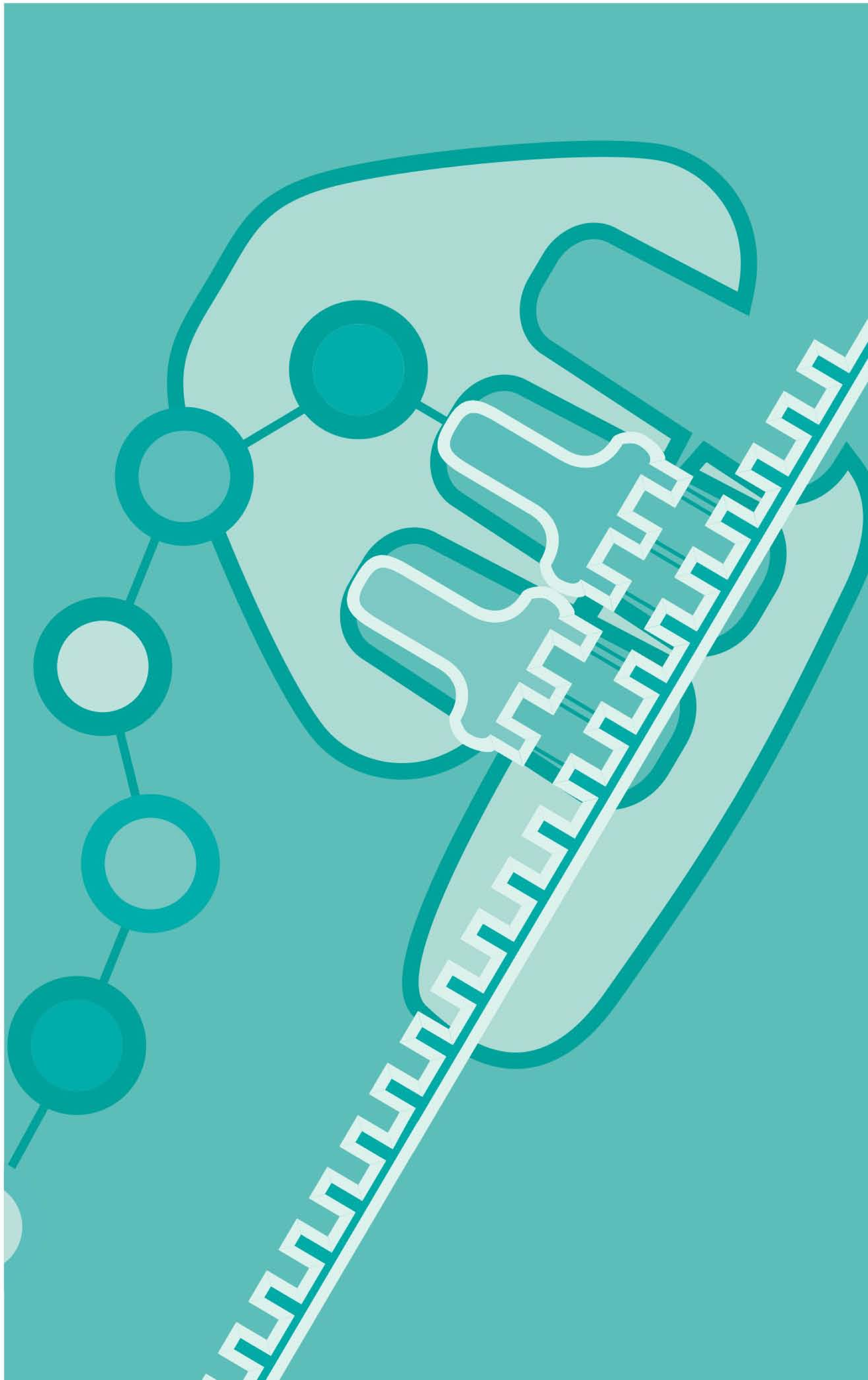
CÉLULAS T E PROTEÍNAS DO MHC 1569
Os receptores de células T são heterodímeros semelhantes a anticorpos 1570
A apresentação de antígenos pelas células dendríticas pode ativar ou tornar as células T tolerantes 1571
As células T citotóxicas efetoras induzem a morte das células-alvo 1572
As células T auxiliares efetoras ajudam na ativação de outras células dos sistemas imunes inato e adaptativo 1573
As células T reguladoras suprimem a atividade de outras células T 1574
As células T reconhecem peptídeos estranhos ligados às proteínas do MHC 1575
As proteínas do MHC foram descritas nas reações a transplantes antes que suas funções fossem conhecidas 1575
As proteínas do MHC de classe I e de classe II são heterodímeros estruturalmente similares 1576
Uma proteína do MHC liga-se a um peptídeo e interage com o receptor de célula T 1577
As proteínas do MHC auxiliam a direcionar as células T a seus alvos apropriados 1579
Os correceptores CD4 e CD8ligam-se a porções invariáveis das proteínas do MHC 1580
As células T citotóxicas respondem a fragmentos de proteínas citosólicas estranhas associadas às proteínas do MHC de classe I 1581
As células T auxiliares reconhecem fragmentos de uma proteína estranha endocitada em associação com as proteínas do MHC de classe II 1583
As células T potencialmente eficientes são selecionadas positivamente no timo 1585
Várias células T auxiliares e citotóxicas em desenvolvimento que podem ser ativadas por complexos peptídeo-MHC próprios são eliminadas no timo 1586
Algumas proteínas órgão-específicas são expressas ectopicamente na medula tímica 1587
As funções das proteínas do MHC explicam seu polimorfismo 1588
Resumo 1588

CÉLULAS T AUXILIARES E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS 1589
As células dendríticas ativadas usam múltiplos mecanismos para ativar as células T 1590
A ativação das células T é controlada por retroalimentação negativa 1591
A subclasse de célula T auxiliar efetora determina a natureza da resposta imune adaptativa 1592
As células T_H1 ativam macrófagos infectados e estimulam uma resposta inflamatória 1594
A ligação do antígeno aos receptores de células B é somente um dos passos da ativação das células B 1595
Células T auxiliares antígeno-específicas são essenciais para a ativação da maioria das células B 1597
Uma classe especial de células B reconhece antígenos independentes de células T 1598
Moléculas de reconhecimento imune pertencem a uma antiga superfamília de imunoglobulinas 1599
Resumo 1600
Referências 1600

I INTRODUÇÃO À CÉLULA

Parte I
Capítulos

1 Células e Genomas
2 Química Celular e Biossíntese
3 Proteínas



Células e Genomas

1

A superfície do nosso planeta é habitada por coisas vivas – fábricas químicas interessantes organizadas de forma complexa que recebem substâncias de sua vizinhança e as utilizam como matérias-primas para gerar cópias de si próprias. Os organismos vivos parecem extraordinariamente diversos. O que poderia ser mais diferente do que um tigre e uma alga marinha, ou uma bactéria e uma árvore? Já nossos ancestrais, não tendo nenhum conhecimento a respeito de células ou de DNA, notaram que todas as coisas vivas tinham algo em comum. A isso eles chamaram de "vida", maravilharam-se, empenharam-se para defini-la, e ficaram intrigados para explicar o que ela era e como funcionava a partir da matéria não-viva.

As descobertas do século passado não diminuíram o encantamento; pelo contrário, desvendaram o mistério envolvendo a natureza da vida. Hoje sabemos que todas as coisas vivas são formadas por células, e que todas essas unidades da matéria viva compartilham de uma mesma maquinaria para a maioria de suas funções básicas. As matérias vivas aparentam ser infinitamente variadas quanto ao seu exterior, mas são fundamentalmente semelhantes em seu interior. Toda a biologia é um contraponto entre os dois temas: a admirável variedade em particularidades individuais e a admirável constância nos mecanismos fundamentais. Neste primeiro capítulo, começaremos por destacar as características universais de toda a vida em nosso planeta. Iremos, assim, examinar brevemente a diversidade das células. Veremos como um código universal comum, em que estão contidas todas as especificações dos organismos vivos, torna possível ler, medir e decifrar essas especificações para alcançar um entendimento coerente sobre todas as formas de vida, desde as menores até as maiores.

Neste capítulo

CARACTERÍSTICAS UNIVERSAIS DAS CÉLULAS NA TERRA 1

A DIVERSIDADE DOS GENOMAS E A ÁRVORE DA VIDA 11

INFORMAÇÃO GENÉTICA EM EUCARIOTOS 26

CARACTERÍSTICAS UNIVERSAIS DAS CÉLULAS NA TERRA

Estima-se que atualmente existam mais de dez milhões – talvez cem milhões – de espécies que habitam a Terra. Cada uma dessas espécies é diferente, e cada uma é capaz de se reproduzir fielmente. Isso gera uma progênie da mesma espécie: o organismo parental transfere as informações específicas, minuciosamente detalhadas, das características que seus descendentes devem ter. Este fenômeno da *hereditariedade* é a parte central da definição da vida: ele diferencia a vida de outros processos, como o desenvolvimento de um cristal, a queima de uma vela, ou a formação de ondas na água, nos quais são geradas estruturas ordenadas, mas sem o mesmo tipo de ligação peculiar que se observa entre os pais e os seus descendentes. Assim como a chama da vela, os organismos vivos consomem energia livre para criar e manter sua organização; mas a energia livre dirige um sistema imensamente complexo de processos químicos que são especificados pela informação hereditária.

A maioria dos organismos vivos é unicelular; outros organismos, como nós mesmos, são vastas cidades multicelulares, nas quais grupos de células realizam funções especializadas e estão conectados por intrincados sistemas de comunicação. Contudo, tanto em se tratando de uma simples bactéria quanto de um agregado de mais de 10^{13} células, como o corpo humano, o organismo foi gerado a partir da divisão celular de uma única célula. Consequentemente, uma simples célula é o veículo de informação hereditária que define a espécie (**Figura 1-1**). Especificada por essa informação, a célula contém a maquinaria para obter a matéria-prima do ambiente e para elaborar a partir dela novas células à sua própria imagem, completa com a nova cópia da informação hereditária. Apenas uma célula tem essa capacidade.

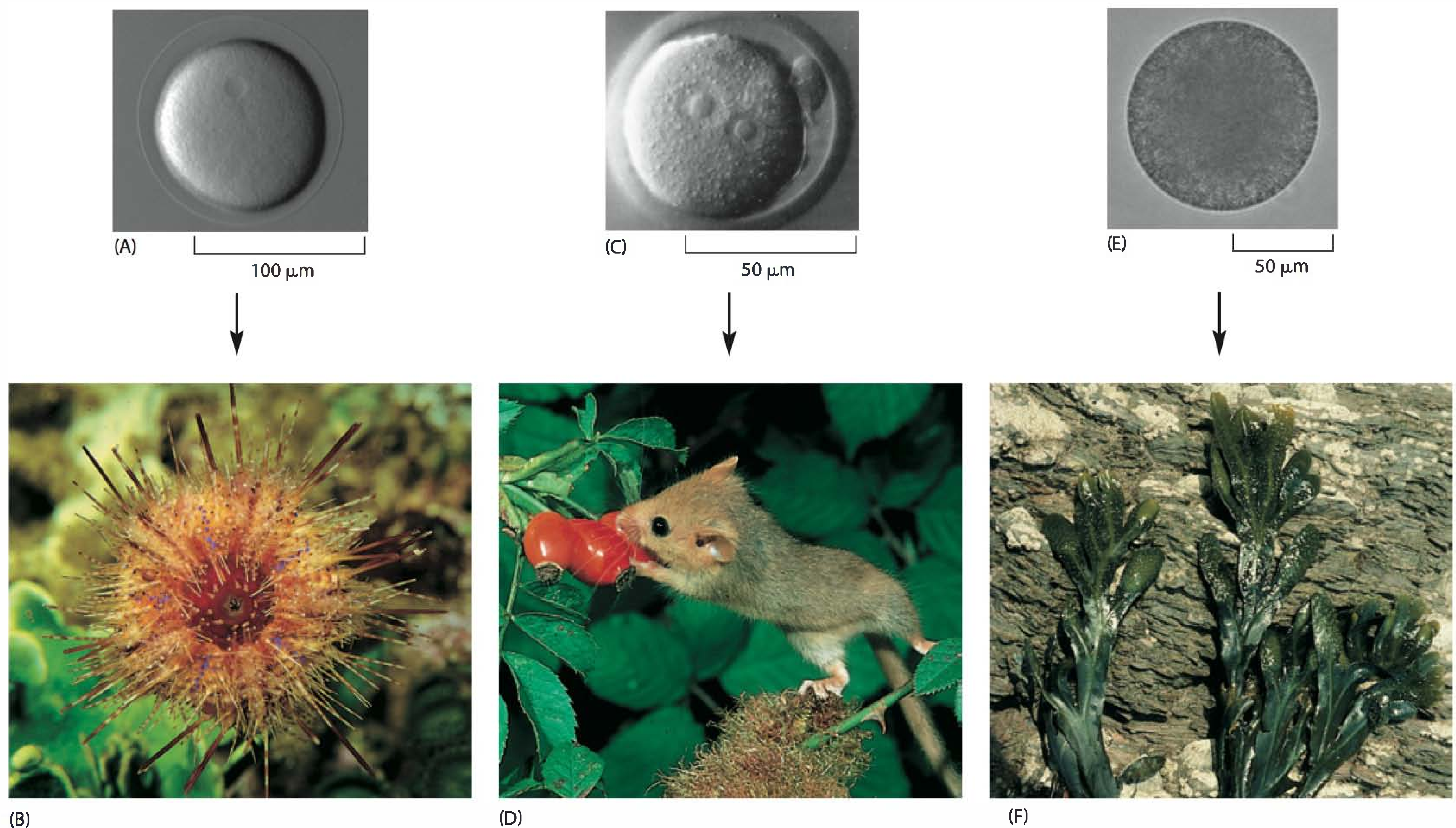


Figura 1-1 A informação hereditária na célula-ovo fertilizada determina a natureza de um organismo multicelular como um todo. (A e B) Uma célula-ovo de ouriço-do-mar dá origem a um ouriço-do-mar. (C e D) Uma célula-ovo de camundongo dá origem a um camundongo. (E e F) Uma célula-ovo da alga marinha *Fucus* origina uma alga marinha *Fucus*. (A, cortesia de David McClay; B, cortesia de M. Gibbs, Oxford Scientific Films; C, cortesia de Patricia Calarco, de G. Martin, *Science* 209:768-776, 1980. Com permissão de AAAS; D, cortesia de O. Newman, Oxford Scientific Films; E e F, cortesia de Colin Brownlee.)

Todas as células guardam sua informação hereditária no mesmo código químico linear (DNA)

Os computadores nos familiarizaram com o conceito de informação como uma quantidade mensurável – um milhão de bytes (para registrar algumas centenas de páginas ou a imagem de uma câmera digital), 600 milhões para uma música em um CD, e assim por diante. Eles também nos tornaram claramente cientes de que uma mesma informação pode ser armazenada sob diferentes formas físicas. Com a evolução do mundo dos computadores, os discos e as fitas de arquivos eletrônicos que usávamos há dez anos para os nossos arquivos eletrônicos tornaram-se ilegíveis com as máquinas atuais. As células vivas, assim como os computadores, fornecem informações e estima-se que venham evoluindo e diversificando-se por mais de 3,5 bilhões de anos. Dificilmente imaginaríamos que todas as células armazenassem suas informações da mesma forma, ou que os arquivos de um tipo de célula pudessem ser lidos pelo sistema de processamento de outra célula. Contudo, é assim que acontece. Todas as células vivas da Terra, sem nenhuma exceção conhecida, armazenam suas informações hereditárias na forma de moléculas de DNA de fita dupla – longas cadeias poliméricas pareadas não-ramificadas, formadas sempre pelos mesmos quatro tipos de monômeros. Esses monômeros possuem apelidos extraídos de um alfabeto de quatro letras – A, T, C e G – e ordenados em uma longa sequência linear, que codifica a informação genética, assim como as sequências numéricas 0 e 1 codificam as informações em um arquivo de computador. Nós podemos pegar um pedaço de DNA de uma célula humana e o inserir em uma bactéria, ou introduzir um pedaço de DNA bacteriano em uma célula humana, e as informações serão lidas, interpretadas e copiadas com sucesso. Usando métodos químicos, os cientistas podem obter a sequência completa dos monômeros em qualquer molécula de DNA – estendendo-se por milhões de nucleotídeos – e, desse modo, decifrar a informação hereditária que cada organismo contém.

Todas as células replicam sua informação hereditária por polimerização a partir de um molde

Os mecanismos que tornam a vida possível dependem da estrutura de fita dupla da molécula de DNA. Cada monômero em uma cadeia simples de DNA – ou seja, cada **nucleotídeo** – consiste de duas partes: um açúcar (desoxirribose), com um grupo fosfato ligado a ele, e uma *base*, que pode ser tanto adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T) (**Figura 1-2**). Cada açúcar está ligado ao próximo por meio do grupo fosfato, criando uma cadeia de polímero composta de um esqueleto repetitivo de açúcar e fosfato, com séries de bases projetando-se dela. O polímero de DNA se estende pela adição de monômeros em uma das extremidades. Para uma fita simples isolada, essas bases podem ser, em princípio, adicionadas em qualquer ordem, pois se ligam à próxima da mesma maneira, por meio de uma parte comum da molécula, que é a mesma para todas elas. Na célula viva, entretanto, o DNA não é sintetizado isoladamente como uma fita livre, mas a partir de um molde formado por uma fita de DNA preexistente. As bases que se projetam da fita existente ligam-se com as bases da fita que está sendo sintetizada de acordo com uma regra rigorosa, definida pela estrutura complementar das bases: A liga-se com T, e C liga-se com G. Esse pareamento de bases mantém os novos monômeros no lugar e, desse modo, controla a seleção de qual dos quatro monômeros deverá ser o próximo adicionado à fita crescente. Dessa forma, uma estrutura de fita dupla é criada, composta de duas sequências exatamente complementares de As, Cs, Ts e Gs. Essas duas fitas torcidas entre si formam uma dupla-hélice (**Figura 1-2E**).

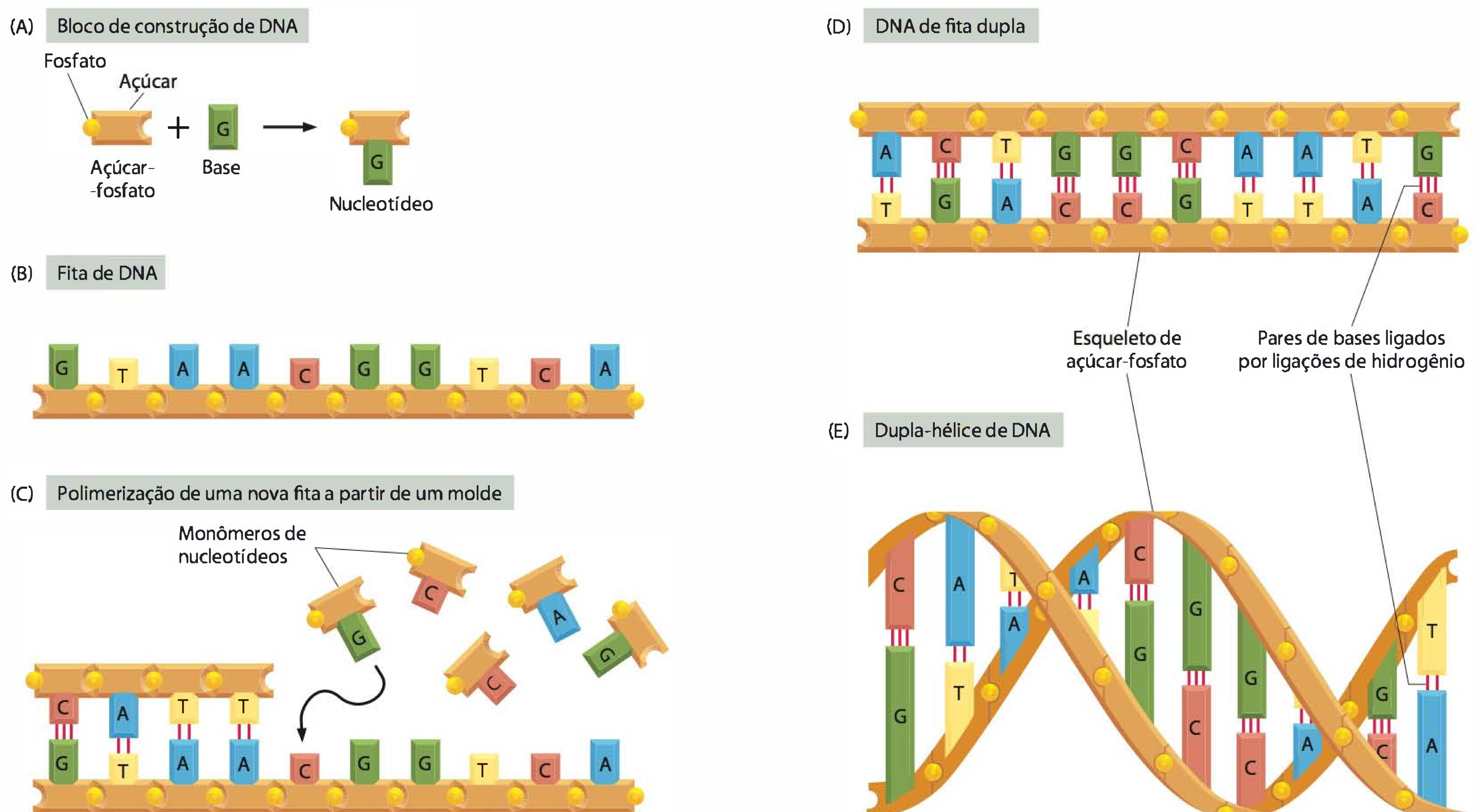


Figura 1-2 O DNA e os seus blocos de construção. (A) O DNA é formado a partir de subunidades simples, chamadas de nucleotídeos, cada uma constituída por uma molécula de açúcar-fosfato, com uma cadeia lateral nitrogenada, ou uma base ligada a ela. As bases são de quatro tipos (adenina, guanina, citosina e timina), correspondendo a quatro nucleotídeos distintos nomeados A, G, C e T. (B) Uma cadeia simples de DNA consiste de nucleotídeos conectados por ligações de açúcar-fosfato. Note que as unidades de açúcar-fosfato são assimétricas, dando ao esqueleto da cadeia uma clara orientação ou polaridade. Esta orientação guia os processos moleculares pelos quais a informação no DNA é interpretada e copiada nas células: a informação é sempre "lida" em uma ordem consistente, exatamente como um texto em português é lido da esquerda para a direita. (C) Pelo padrão de polimerização a partir de um molde, a sequência de nucleotídeos existente em uma fita de DNA controla a sequência na qual os nucleotídeos são adicionados em uma nova fita de DNA; a base T de uma fita emparelha-se com a base A da outra fita, e a base G emparelha-se com a base C. A nova fita tem uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência velha e um esqueleto com direcionalidade oposta: o correspondente a GTAA... da fita original é ...TTAC. (D) Uma molécula típica de DNA consiste em duas destas fitas complementares. Os nucleotídeos dentro de cada fita são unidos por ligações químicas fortes (covalentes); os nucleotídeos complementares de fitas opostas são mantidos juntos mais fracamente, por meio de ligações de hidrogênio. (E) As duas fitas sofrem torção, em torno uma da outra, formando uma dupla-hélice – uma estrutura robusta que pode acomodar qualquer sequência de nucleotídeos sem alterar sua estrutura básica.

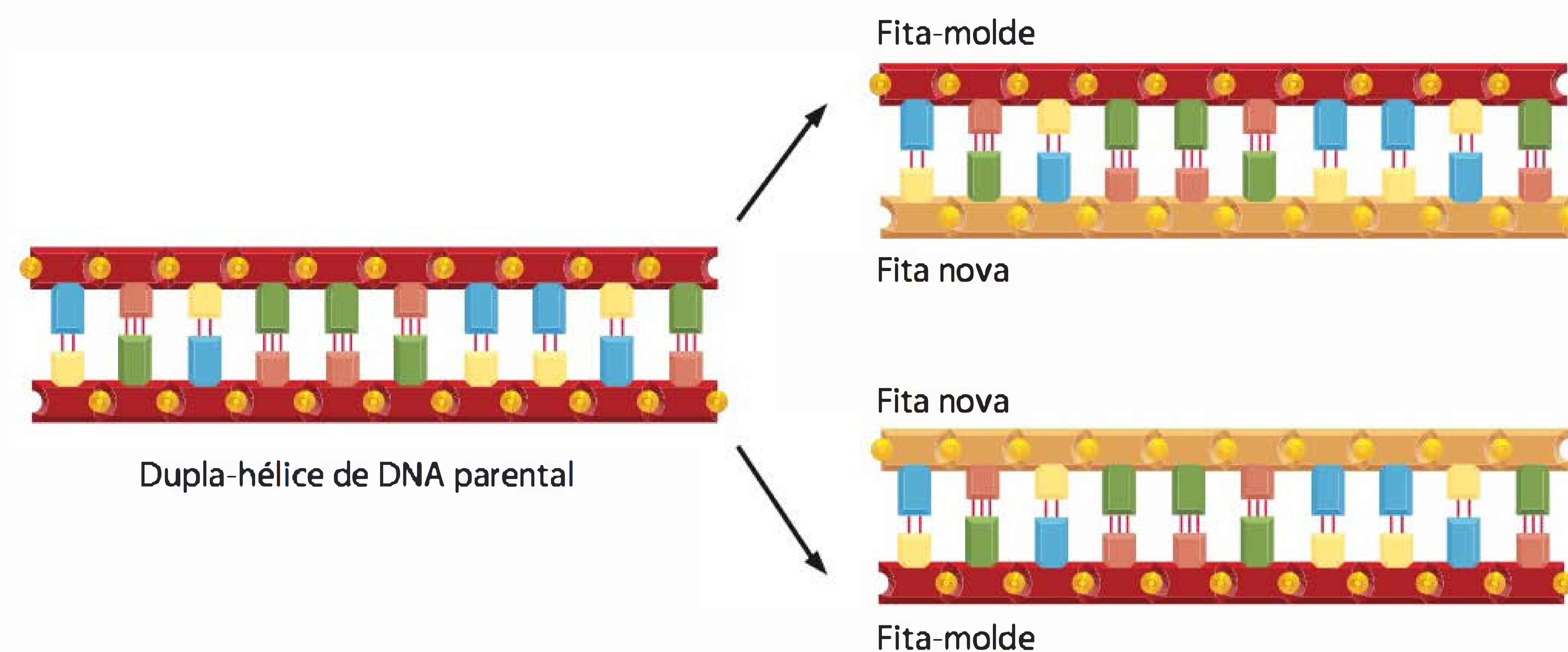


Figura 1-3 O processo de cópia da informação genética pela replicação do DNA. Neste processo, as duas fitas de uma dupla-hélice de DNA são separadas, e cada uma serve como um molde para a síntese de uma nova fita complementar.

As ligações entre os pares de bases são fracas quando comparadas às ligações açúcar-fosfato, permitindo que as duas fitas de DNA sejam separadas sem que ocorram danos aos seus esqueletos. Sendo assim, cada fita pode servir de molde, da maneira descrita a pouco, para a síntese de uma nova fita de DNA complementar a si própria – isto é, uma nova cópia da informação hereditária (**Figura 1-3**). Em diferentes tipos de células, este processo de **replicação de DNA** ocorre em diferentes velocidades, com diferentes controles para iniciá-lo ou interrompê-lo, e diferentes moléculas auxiliares que ajudam durante o processo. Contudo, os princípios básicos são universais: o DNA é o depósito das informações, e a *polimerização a partir de um molde* é a maneira pela qual estas informações são copiadas.

Todas as células transcrevem partes da informação hereditária em uma mesma forma intermediária (RNA)

Para cumprir a função de armazenamento de informação, o DNA deve ser capaz de fazer mais do que cópias de si mesmo. Ele também deve *expressar* sua informação, permitindo que esta guie a síntese de outras moléculas na célula. O mesmo mecanismo ocorre em todos os organismos vivos, levando primeiro, e acima de tudo, à produção de duas outras classes-chave de polímeros: RNAs e proteínas. O processo (discutido em detalhe nos Capítulos 6 e 7) começa com uma polimerização a partir de um molde chamada de **transcrição**, na qual segmentos da sequência de DNA são usados como moldes para guiar a síntese de moléculas menores intimamente relacionadas – polímeros de **ácido ribonucleico**, ou **RNA**. Em seguida, em um processo mais complexo de **tradução**, muitas dessas moléculas de RNA direcionam a síntese de polímeros pertencentes a uma classe química radicalmente diferente – as *proteínas* (**Figura 1-4**).

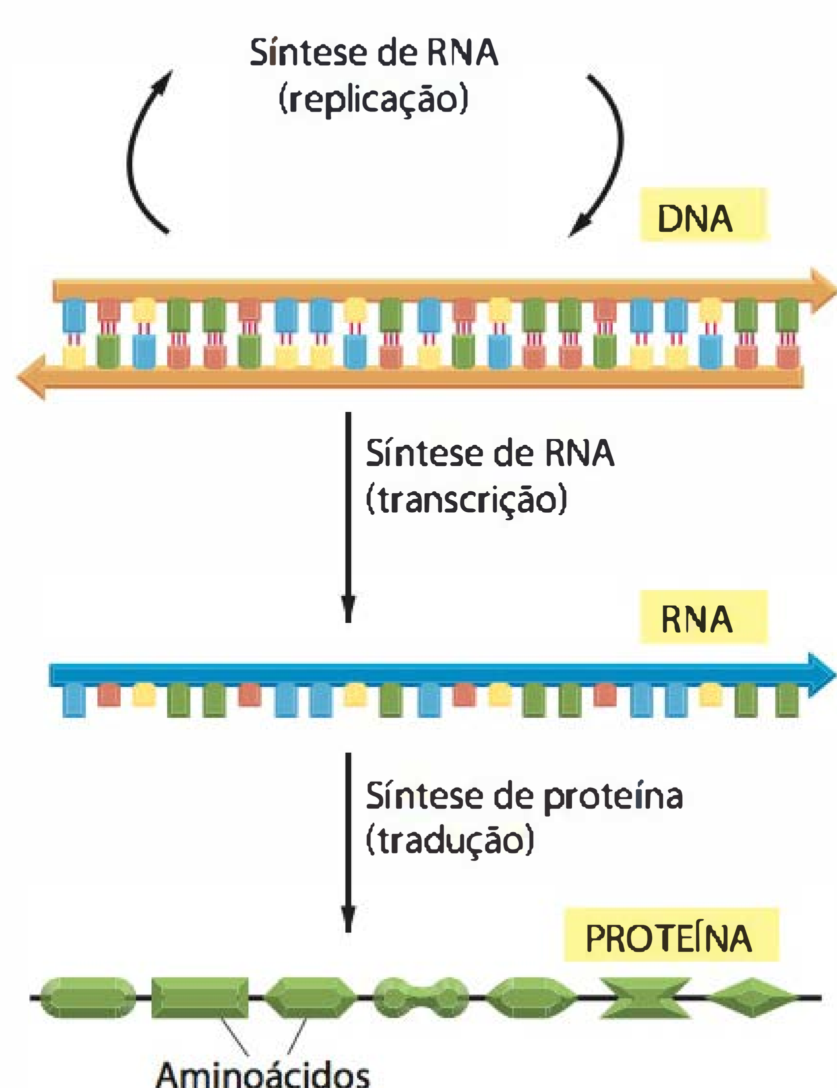


Figura 1-4 Do DNA à proteína. A informação genética é lida e processada em duas etapas. Primeiro, na *transcrição*, os segmentos de uma sequência de DNA são usados para guiar a síntese de moléculas de RNA. Depois, na *tradução*, as moléculas de RNA são usadas para guiar a síntese de moléculas de proteínas.

No RNA, o esqueleto é formado por um açúcar ligeiramente diferente daquele do DNA – ribose em vez de desoxirribose –, e uma das quatro bases também é um pouco diferente – uracila (U) no lugar de timina (T); mas as três outras bases – A, C e G – são as mesmas, e todos os quatro pares de bases se pareiam com suas contrapartes complementares no DNA – A, U, C e G do RNA com T, A, G e C do DNA, respectivamente. Durante a transcrição, os monômeros de RNA são alinhados e selecionados para a polimerização a partir de uma fita-molde de DNA da mesma forma que os monômeros de DNA são selecionados durante a replicação. Como consequência, tem-se uma molécula de polímero cuja sequência de nucleotídeos representa fielmente uma parte da informação genética da célula, embora escrita em um alfabeto ligeiramente diferente, consistindo de monômeros de RNA ao invés de monômeros de DNA.

O mesmo segmento de DNA pode ser usado repetidamente para guiar a síntese de muitos transcritos de RNA idênticos. Assim, enquanto o arquivo de informação genética da célula na forma de DNA é fixo e inviolável, os transcritos de RNA são produzidos em massa e descartáveis (**Figura 1-5**). Como poderemos ver, estes transcritos funcionam como intermediários na transferência da informação genética: eles atuam principalmente como **RNA mensageiro** (**mRNA**) para guiar a síntese de proteínas, de acordo com as instruções genéticas armazenadas no DNA.

As moléculas de RNA possuem estruturas distintas que também podem conferir-lhes outras características químicas especializadas. Sendo de fita simples, os seus esqueletos são flexíveis, podendo dobrar sobre si mesmos para permitir que uma parte da molécula forme ligações fracas com outra parte dessa mesma molécula. Isso acontece quando os seguimentos da sequência são localmente complementares: um segmento ...GGGG..., por exemplo,

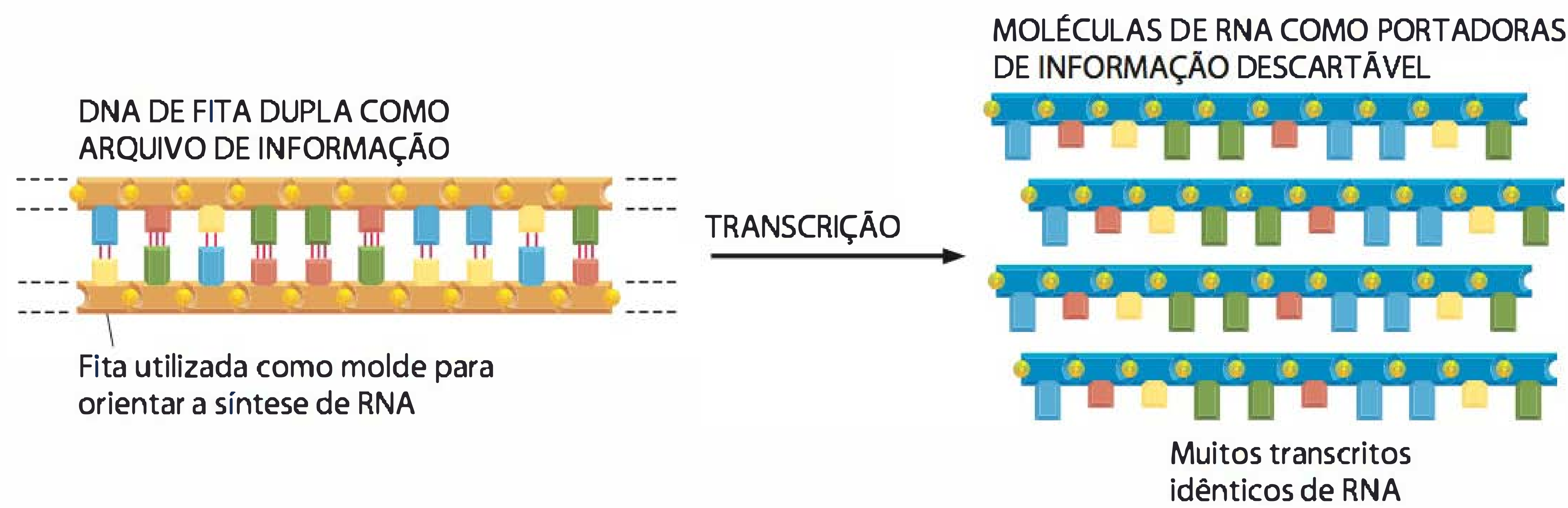


Figura 1-5 Como a informação genética é transmitida para uso no interior da célula. Cada célula contém um conjunto fixo de moléculas de DNA – seu arquivo de informação genética. Um determinado segmento desse DNA guia a síntese de vários transcritos de RNA idênticos, que servem como cópias de trabalho da informação armazenada no arquivo. Diferentes grupos de moléculas de RNA podem ser produzidos transcrevendo-se partes selecionadas de uma longa sequência de DNA, permitindo que cada célula possa usar seu estoque de informação de maneira diferente.

tenderá a se associar com um segmento ...CCCC... Esses tipos de associações internas podem fazer com que uma cadeia de RNA se dobre em uma forma específica imposta por sua sequência (**Figura 1-6**). A forma da molécula de RNA, por sua vez, pode habilitá-la a reconhecer outras moléculas, ligando-se a elas seletivamente – e ainda, em alguns casos, catalisar mudanças químicas nas moléculas às quais estão ligadas. Como veremos no Capítulo 6, algumas reações químicas catalisadas por moléculas de RNA são cruciais para muitos dos mais antigos e fundamentais processos nas células vivas, e tem-se sugerido que as catálises mais extensivas realizadas pelo RNA desempenharam um papel central no início da evolução da vida.

Todas as células usam proteínas como catalisadores

As moléculas de **proteína**, como as moléculas de DNA e de RNA, são cadeias poliméricas longas não-ramificadas, formadas por sequências de blocos construtores monoméricos retirados de um repertório-padrão semelhante em todas as células vivas. Assim como o DNA e o RNA, elas carregam informações em uma forma de sequência linear de símbolos, da mesma maneira que uma mensagem humana é escrita em um código alfabético. Existem diferentes moléculas de proteína em cada célula, e – descontando a água – elas constituem a maior parte da massa de uma célula.

Os monômeros de uma proteína, os **aminoácidos**, são completamente distintos dos de RNA e DNA, e são de 20 tipos diferentes, em vez de quatro. Cada aminoácido é constituído da mesma estrutura básica, por meio da qual pode se ligar de modo-padrão a qualquer outro do grupo de aminoácidos; ligada a essa estrutura básica, existe uma cadeia lateral que atribui a cada aminoácido uma característica química distinta. Cada uma das moléculas de proteína, ou **polipeptídeos**, formada pela união de aminoácidos em uma sequência particular, dobra-se para adquirir uma forma tridimensional precisa, com sítios reativos em sua su-

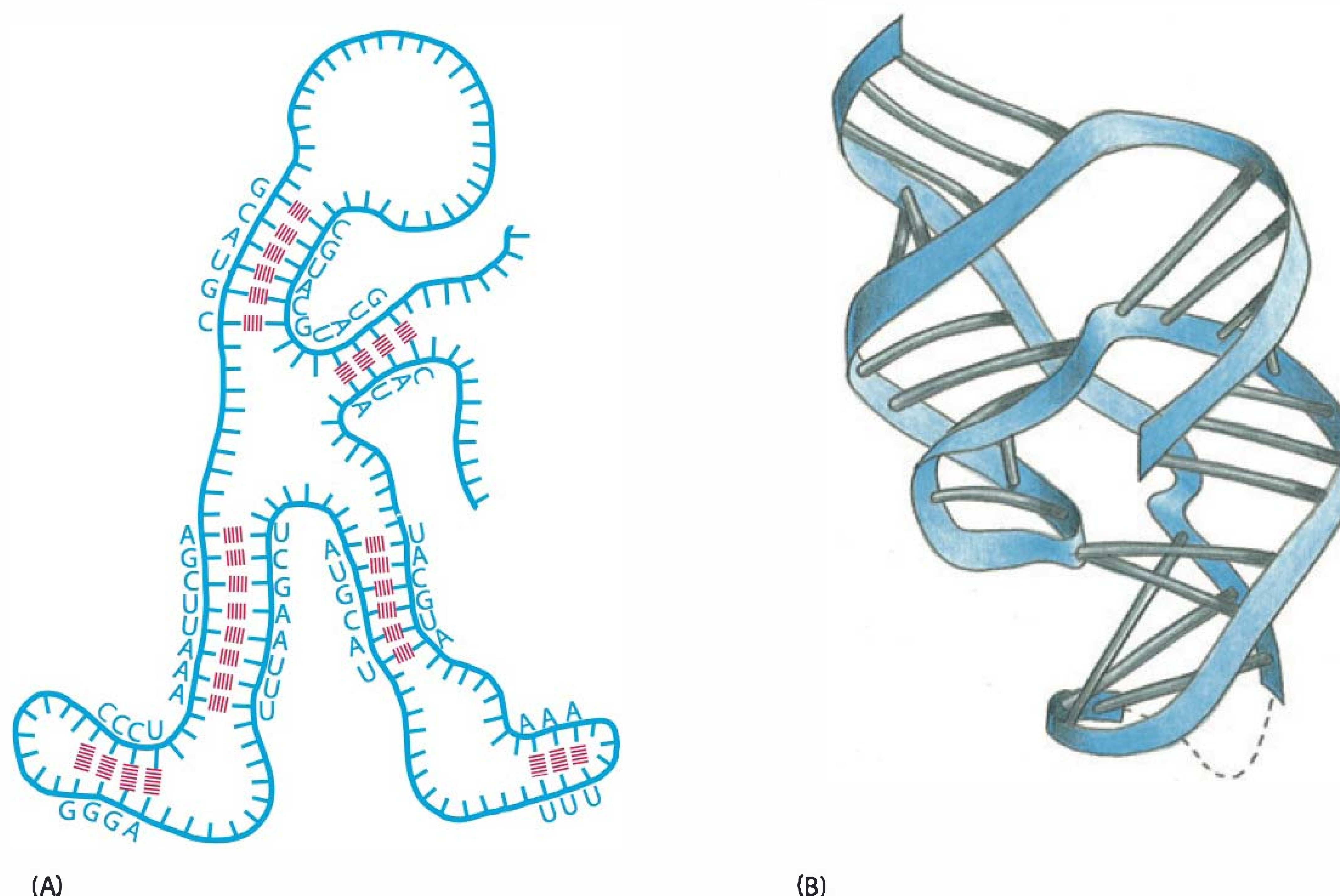
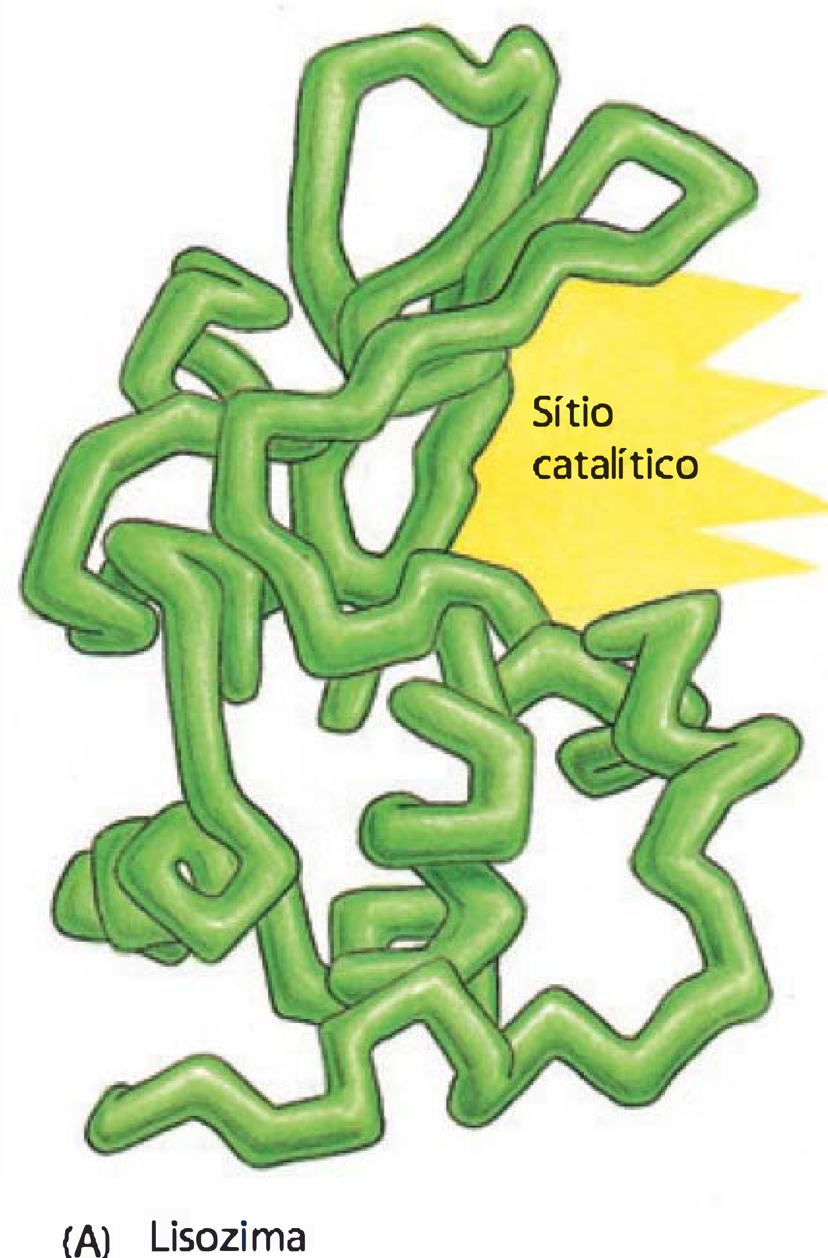


Figura 1-6 A conformação de uma molécula de RNA. (A) O pareamento de nucleotídeos entre diferentes regiões da mesma cadeia polimérica de RNA faz com que a molécula adquira uma configuração distinta. (B) A estrutura tridimensional de uma molécula de RNA, do vírus da hepatite Delta, que catalisa a clivagem da fita de RNA. A faixa em azul representa o esqueleto de açúcar-fosfato; as barras representam os pares de bases. (B, com base em A.R. Ferré D'Amaré, K. Zhou e J.A. Doudna, *Nature* 395:567-574, 1998. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



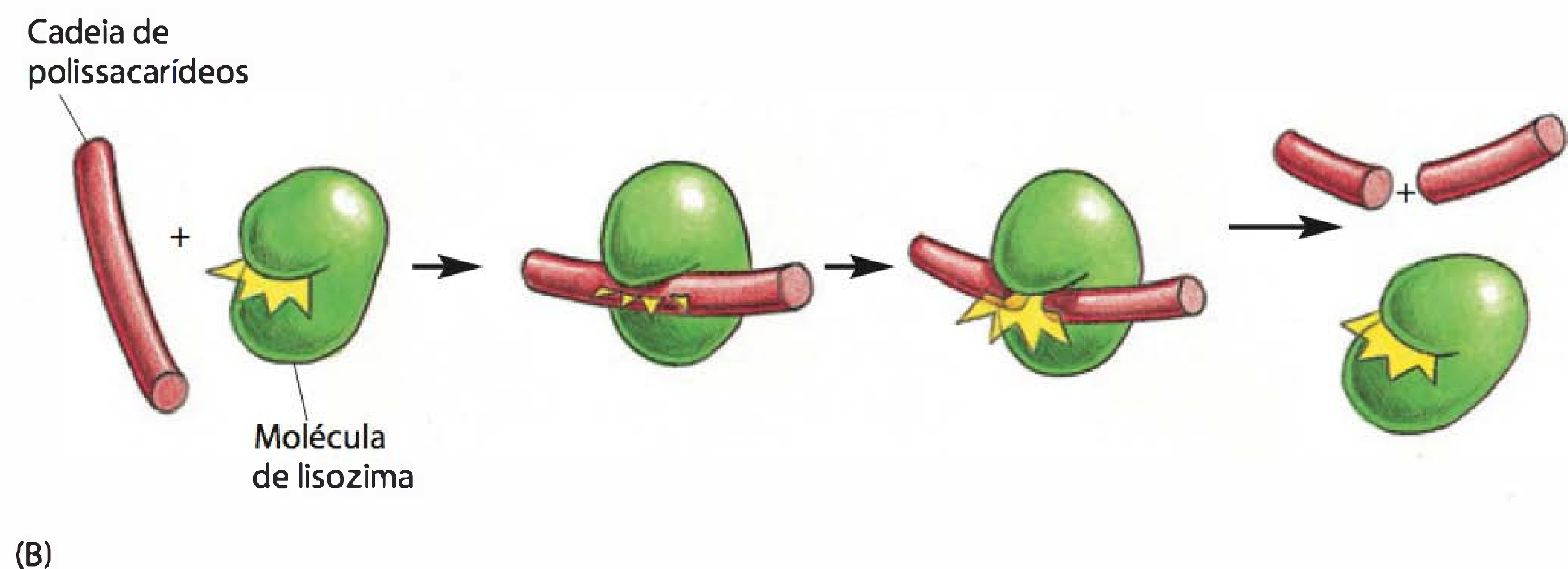


Figura 1-7 Como uma molécula de proteína atua como um catalisador de uma reação química. (A) A cadeia polimérica de uma proteína dobra-se em uma forma específica definida por sua sequência de aminoácidos. Um sulco na superfície da enzima lisozima, uma molécula especificamente dobrada, forma um sítio catalítico. (B) Uma molécula de polissacarídeo (*vermelho*) – uma cadeia polimérica de monômeros de açúcar – se liga ao sítio catalítico da lisozima e é fragmentada, como resultado do rompimento da ligação covalente catalisada pelos aminoácidos alinhados na concavidade.

perfície (**Figura 1-7**A). Esses polímeros de aminoácidos ligam-se com alta especificidade a outras moléculas e atuam como **enzimas**, catalisando reações nas quais ligações covalentes são formadas ou quebradas. Dessa maneira, dirigem a maioria dos processos químicos nas células (Figura 1-7B). As proteínas possuem muitas outras funções – manutenção de estruturas, geração de movimentos, percepção de sinais, e assim por diante –, cada molécula de proteína desempenhando uma função específica de acordo com sua própria sequência de aminoácidos especificada geneticamente. As proteínas, acima de tudo, são as responsáveis por colocar em ação a informação genética da célula.

Assim, os polinucleotídeos especificam a sequência de aminoácidos das proteínas. Estas, por sua vez, catalisam muitas reações químicas, incluindo aquelas pelas quais novas moléculas de DNA são sintetizadas, e a informação genética contida no DNA é utilizada para produzir tanto RNA quanto proteínas. Esse ciclo de retroalimentação é a base do comportamento autocatalítico da própria reprodução dos organismos vivos (**Figura 1-8**).

Todas as células traduzem o RNA em proteínas da mesma maneira

A tradução da informação genética, a partir do alfabeto de quatro letras dos polinucleotídeos nas 20 letras do alfabeto das proteínas, é um processo complexo. As regras dessa tradução, em alguns aspectos, parecem ser claras e racionais, mas em outros, parecem estranhamente arbitrárias, sendo idênticas (com poucas exceções) em todos os organismos vivos. Acredita-se que essas características arbitrárias são o reflexo de acidentes que ocorreram no início da história da vida – propriedades aleatórias dos primeiros organismos que passaram por hereditabilidade, tornando-se tão profundamente enraizadas na constituição de todas as células vivas que não podem ser mudadas sem acarretar efeitos desastrosos.

A informação contida em uma sequência de um mRNA é lida em grupos de três nucleotídeos por vez: cada trinca de nucleotídeo, ou *códon*, especifica (codifica para) um único aminoácido na proteína correspondente. Uma vez que existem 64 (= 4 × 4 × 4) códons possíveis, todos ocorrendo na natureza – mas apenas 20 aminoácidos –, existem necessariamente muitos casos onde vários códons correspondem a um mesmo aminoácido. O código é lido por uma classe especial de moléculas pequenas de RNA, os **RNAs transportadores (tRNAs)**. Cada tipo de tRNA liga-se a uma extremidade de um aminoácido específico, apresentando em sua outra extremidade uma sequência específica de três nucleotídeos – um *anticódon* – que o habilita a reconhecer, pelo pareamento de bases, um códon ou um grupo de códons no mRNA (**Figura 1-9**).

Para a síntese proteica, uma sucessão de moléculas de tRNA carregadas com os seus aminoácidos apropriados deve unir-se a uma molécula de mRNA e, através do pareamento, os anticódons dos tRNAs emparelham-se com cada um de seus códons sucessivos. Os aminoácidos devem, então, ser ligados uns aos outros para alongar a cadeia de proteína crescente, e os tRNAs, atenuados de suas cargas, devem ser liberados. Todo este conjunto de processos é realizado por uma gigantesca máquina multimolecular, o **ribossomo**, formado por duas cadeias principais de RNA, chamadas de **RNAs ribossomais (rRNAs)**, junto a mais

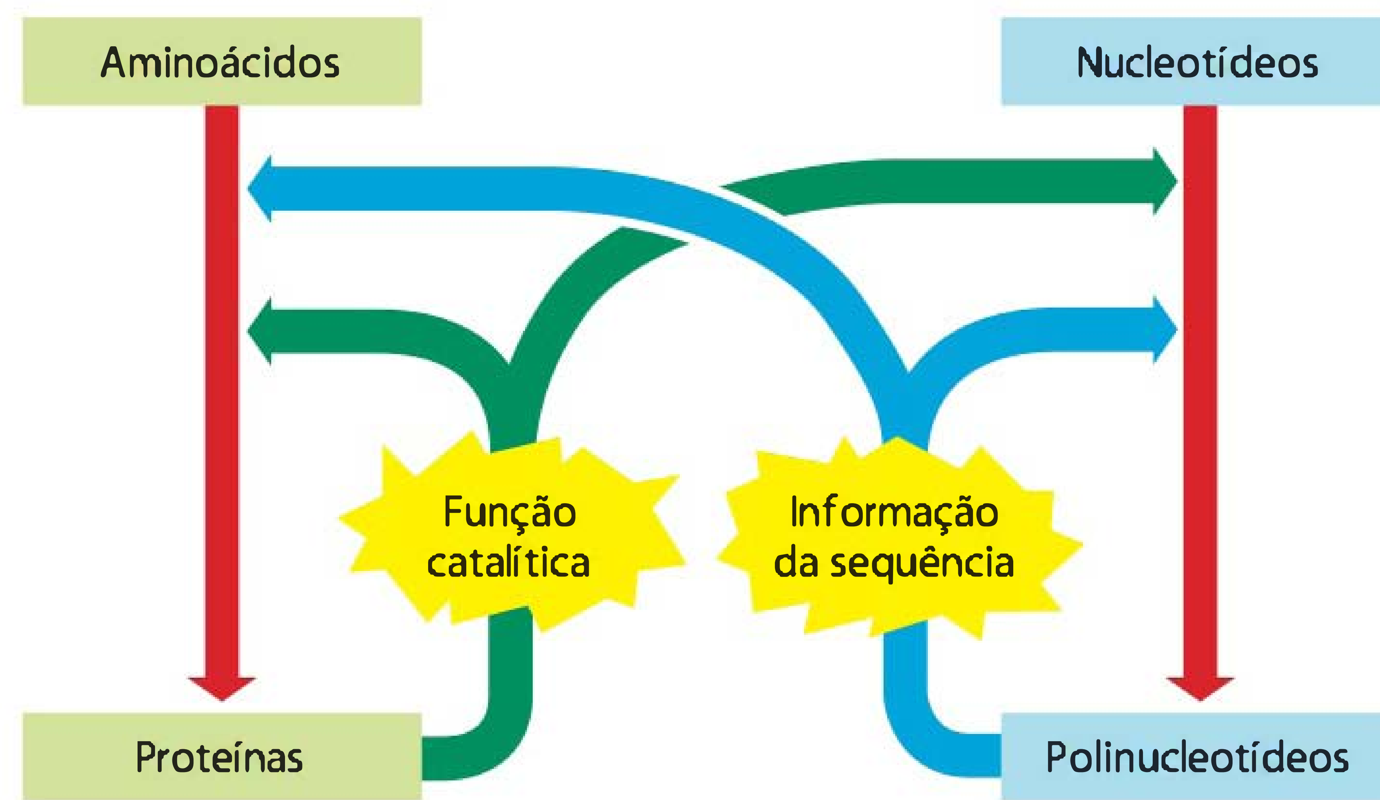


Figura 1-8 A vida como um processo autocatalítico. Os polinucleotídeos (polímeros de nucleotídeos) e as proteínas (polímeros de aminoácidos) fornecem a informação da sequência e as funções catalíticas que servem – por meio de um conjunto complexo de reações químicas – para efetuar a síntese de mais polinucleotídeos e proteínas do mesmo tipo.

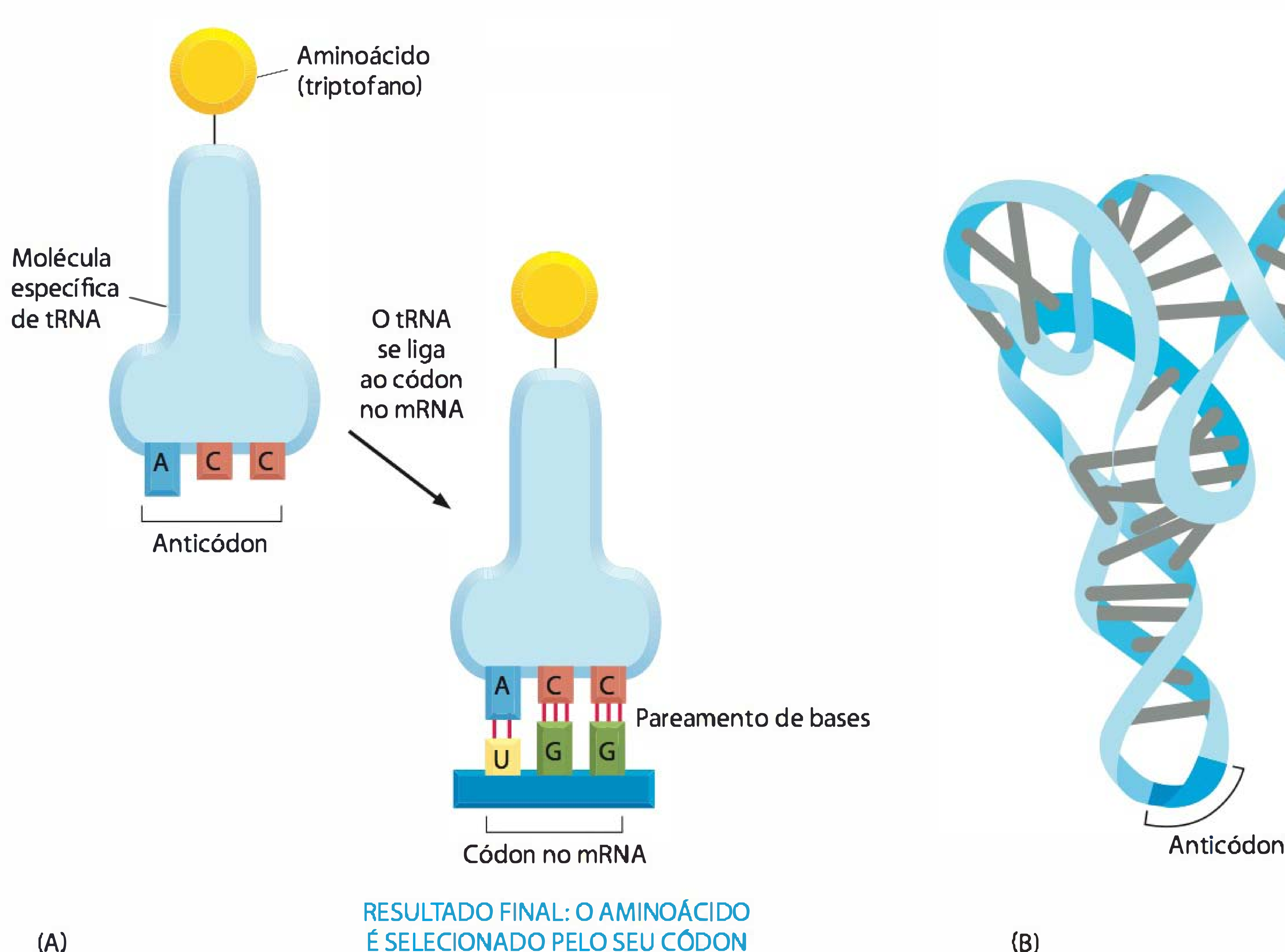
de 50 proteínas diferentes. Essa molécula evolutivamente antiga agarra-se à porção terminal de uma molécula de mRNA e se desloca ao longo dela, capturando moléculas de tRNA carregadas para formar uma nova cadeia de proteína pela ligação dos aminoácidos que elas transportam (**Figura 1-10**).

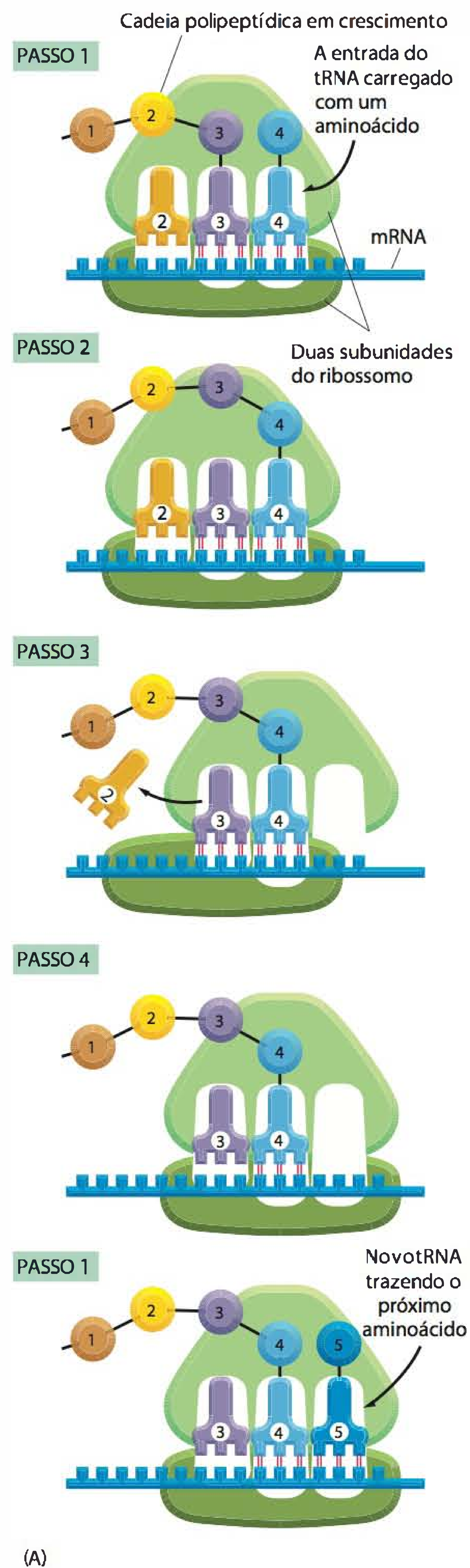
O fragmento da informação genética que corresponde a uma proteína é um gene

Como regra, as moléculas de DNA são muito grandes, contendo as especificações para milhares de proteínas. Os segmentos individuais da sequência inteira de DNA são transcritos em moléculas de mRNA separadas, com cada segmento codificando uma proteína diferente. Cada um desses segmentos de DNA representa um **gene**. Existe uma complexidade na qual moléculas de RNA transcritas a partir de um mesmo segmento de DNA podem ser processadas em mais de uma forma, originando assim um grupo de versões alternativas de uma proteína, especialmente em células mais complexas como as de plantas e animais. Portanto, um gene é, na maioria das vezes, definido como um segmento de DNA correspondente a uma única proteína, ou como um grupo de variantes proteicas (ou como uma única molécula de RNA catalítica ou estrutural para aqueles genes que produzem RNA, mas não proteínas).

Em todas as células, a *expressão* de genes individuais é regulada: em vez de manufaturar todo seu repertório de possíveis proteínas com toda intensidade, o tempo todo, a célula ajusta a velocidade de transcrição e de tradução de diferentes genes independentemente, de acordo com a necessidade. Os segmentos de *DNA regulador* são interespaçados entre os seg-

Figura 1-9 O RNA transportador. (A) Uma molécula de tRNA específica para o aminoácido triptofano. Uma extremidade da molécula de tRNA possui triptofano ligado a ela, enquanto a outra extremidade apresenta a sequência nucleotídica da trinca CCA (o seu anticódon), que reconhece o códon do triptofano em moléculas de mRNAs. (B) A estrutura tridimensional da molécula do tRNA triptofano. Note que o códon e o anticódon em (A) estão na orientação antiparalela, como as duas fitas em um DNA de dupla-hélice (ver Figura 1-2), de tal maneira que a sequência do anticódon no tRNA é lida da direita para a esquerda, enquanto a do códon no mRNA é lida da esquerda para a direita.





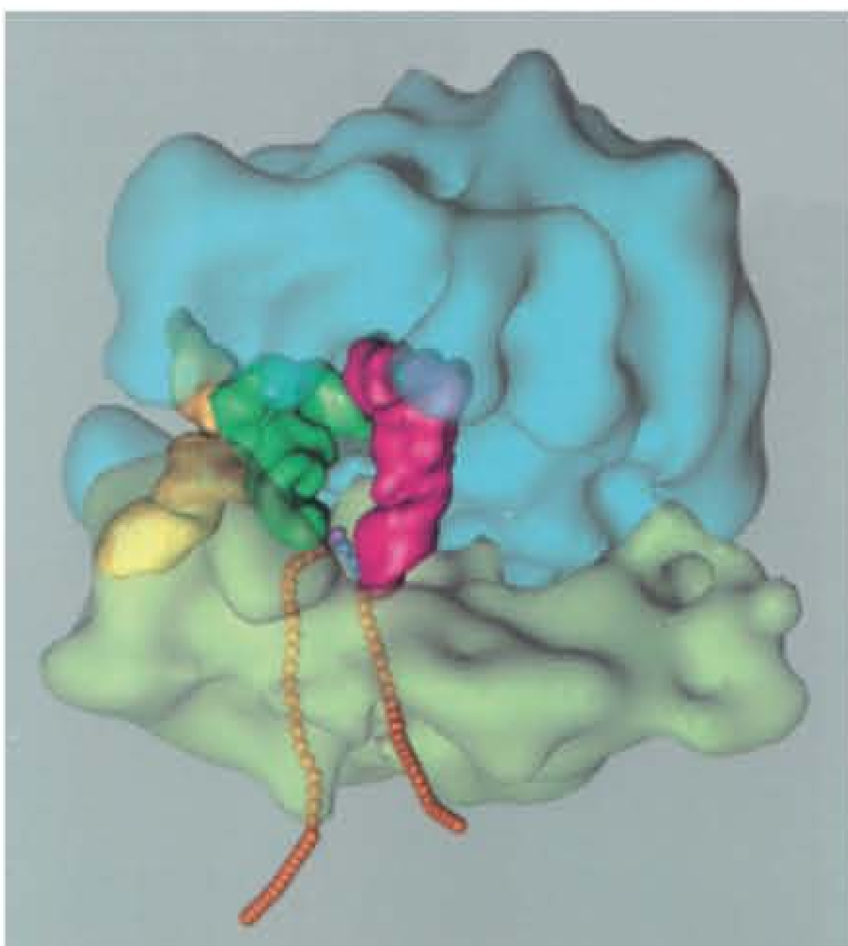


Figura 1-10 Um **ribossomo em funcionamento.** (A) O diagrama mostra como um ribossomo se move ao longo de uma molécula de mRNA, capturando moléculas de tRNA, que combinam com os códons de mRNA e utilizando-as para unir aminoácidos à cadeia proteica. O mRNA especifica a sequência de aminoácidos. (B) A estrutura tridimensional de um ribossomo bacteriano (*verde-claro* e *azul*), movendo-se ao longo da molécula de mRNA (esferas *laranja*), com três moléculas de tRNA (*amarelo*, *verde* e *rosa*) em diferentes estágios em seus processos de captura e de liberação. O ribossomo é um conjunto gigantesco de mais de 50 proteínas individuais e moléculas de RNA. (B, cortesia de Joachim Frank, Yanhong Li e Rajendra Agarwal.)

mentos que codificam as proteínas, e essas regiões não-codificadoras ligam-se a moléculas especiais de proteínas que controlam a velocidade local de transcrição (**Figura 1-11**). Outros DNAs não-codificadores também estão presentes, alguns deles servindo, por exemplo, como uma pontuação, definindo onde começa e termina a informação para uma determinada proteína. A quantidade e a organização dos DNAs reguladores e outros não-codificadores variam muito de uma classe de organismos para a outra, mas a estratégia básica é universal. Dessa maneira, o **genoma** de uma célula – isto é, todas as informações genéticas contidas em sua sequência completa de DNA – comanda não somente a natureza das proteínas da célula, mas também quando e onde elas serão sintetizadas.

A vida demanda energia livre

Uma célula viva é um sistema químico dinâmico operando distante do seu equilíbrio químico. Para uma célula crescer ou fazer uma nova célula a sua própria imagem, ela deve adquirir energia livre do seu ambiente, assim como da matéria-prima, para realizar as reações sintéticas necessárias. Esse consumo de energia livre é fundamental para a vida. Quando isso para, a célula sofre um declínio no equilíbrio químico e em seguida morre.

A informação genética também é fundamental à vida. Existiria alguma conexão? A resposta é sim: a energia livre é necessária para a propagação da informação. Por exemplo, para especificar um *bit* de informação – isto é, uma escolha de sim ou não entre duas alternativas igualmente prováveis – gasta-se uma quantidade definida de energia livre que pode ser calculada. A relação quantitativa envolve um entendimento árduo e depende de uma definição precisa do termo "energia livre", discutido no Capítulo 2. Entretanto, a ideia básica não é difícil de se entender intuitivamente.

Imagine as moléculas de uma célula como um aglomerado de objetos dotados de energia termal, movendo-se ao redor violentamente ao acaso, colidindo umas com as outras. Para especificar a informação genética – na forma de sequência de DNA, por exemplo – as moléculas desse aglomerado em desordem devem ser capturadas, dispostas em uma ordem definida por um molde preexistente, e unir-se de maneira estável. As ligações que mantêm as moléculas em seu devido lugar no molde e as unem, devem ser fortes o suficiente para resistir ao efeito de desordem da termodinâmica. O processo é conduzido pelo consumo de energia livre, que é necessário para assegurar que as ligações sejam feitas de maneira correta e eficiente. No caso mais simples, as moléculas podem ser comparadas a uma armadilha de molas carregada, pronta para adotar uma conformação mais estável de menor energia quando encontra os seus parceiros apropriados; quando as moléculas adotam esta conformação ligada, a sua energia disponível – energia livre –, assim como a energia armazenada nas molas da armadilha, é liberada e dissipada como calor. Em uma célula, os processos químicos que correspondem à transferência de informação são mais complexos, mas o mesmo princípio básico é aplicado: a energia livre deve ser utilizada na criação de ordem.

Para que a célula replique a sua informação genética de maneira fiel, e realmente faça todas as suas moléculas complexas de acordo com as especificações corretas, ela necessita de energia livre, a qual deve ser importada de seus arredores de alguma maneira.

Todas as células funcionam como fábricas bioquímicas que utilizam os mesmos blocos moleculares básicos de construção

Devido ao fato de todas as células fabricarem DNA, RNA e proteínas, e por essas macromoléculas serem compostas por um mesmo grupo de subunidades básicas em todos os casos,

todas as células devem conter e manipular uma coleção semelhante de pequenas moléculas, incluindo açúcares simples, nucleotídeos e aminoácidos, assim como outras substâncias que são universalmente necessárias para as suas sínteses. Todas as células, por exemplo, necessitam do nucleotídeo fosforilado *ATP* (*adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina) como bloco de construção para a síntese de DNA e de RNA; todas as células produzem e consomem essa molécula como carreadora de energia livre e de grupos fosfato para mediar muitas outras reações químicas.

Embora todas as células funcionem como fábricas bioquímicas amplamente semelhantes, muitos dos detalhes de suas transações de pequenas moléculas são diferentes, e não é tão fácil para as moléculas informacionais apontarem as características que são estritamente universais. Alguns organismos, como as plantas, necessitam somente de nutrientes mais simples e aproveitam a energia do sol para fazerem quase todas as suas pequenas moléculas orgânicas; outros organismos, como os animais, alimentam-se de coisas vivas e obtêm muitas das suas moléculas orgânicas já prontas. Retomaremos esse ponto mais adiante.

Todas as células são envoltas por uma membrana plasmática através da qual devem passar nutrientes e materiais descartáveis

Existe, entretanto, pelo menos mais uma característica da célula que é universal: cada uma é delimitada por uma membrana – a **membrana plasmática**. Esse compartimento atua como uma barreira seletiva que possibilita que a célula concentre nutrientes adquiridos do seu meio e retenha os produtos de síntese para uso próprio, enquanto excreta os resíduos. Sem a membrana plasmática, a célula não poderia manter sua integridade como um sistema químico coordenado.

As moléculas que formam essa membrana possuem a propriedade físico-química simples de serem *anfifílicas* – isto é, consistem de uma parte hidrofóbica (insolúvel em água) e outra hidrofílica (solúvel em água). Quando colocadas na água, essas moléculas se agregam espontaneamente, arranjando as suas porções hidrofóbicas de tal maneira que fiquem em contato umas com as outras para escondê-las da água, enquanto mantêm a porção hidrofílica exposta ao meio aquoso. As moléculas anfifílicas que possuem uma forma apropriada, como as moléculas de fosfolipídeos que compõem a maior parte da membrana plasmática, agregam-se espontaneamente em presença de água, para formar uma *bicamada* que cria pequenas vesículas fechadas (**Figura 1-12**). O fenômeno pode ser demonstrado simplesmente misturando-se fosfolipídeos e água; sob condições apropriadas, ocorre a formação de pequenas vesículas, cujos componentes aquosos são isolados do meio externo.

Embora os detalhes químicos variem, as caudas hidrofóbicas predominantes nas moléculas de membrana são formadas por polímeros de hidrocarbonetos ($-CH_2-CH_2-CH_2-$), e sua montagem espontânea em vesículas formadas por bicamadas é mais um exemplo de um importante princípio geral: as células produzem moléculas cujas propriedades químicas as tornam capazes de se *automontar* nas estruturas que são necessárias à célula.

As bordas da célula não podem ser totalmente impermeáveis. Se uma célula tem de crescer e se reproduzir, ela deve ser capaz de importar matéria-prima e exportar resíduo através de sua membrana plasmática. Por essa razão, todas as células possuem proteínas especializadas inseridas em sua membrana, que servem para transportar moléculas específicas de um lado a outro (**Figura 1-13**). Algumas dessas *proteínas transportadoras de membrana*, assim como algumas das proteínas que catalisam as reações fundamentais de pequenas moléculas no interior da célula, foram muito bem

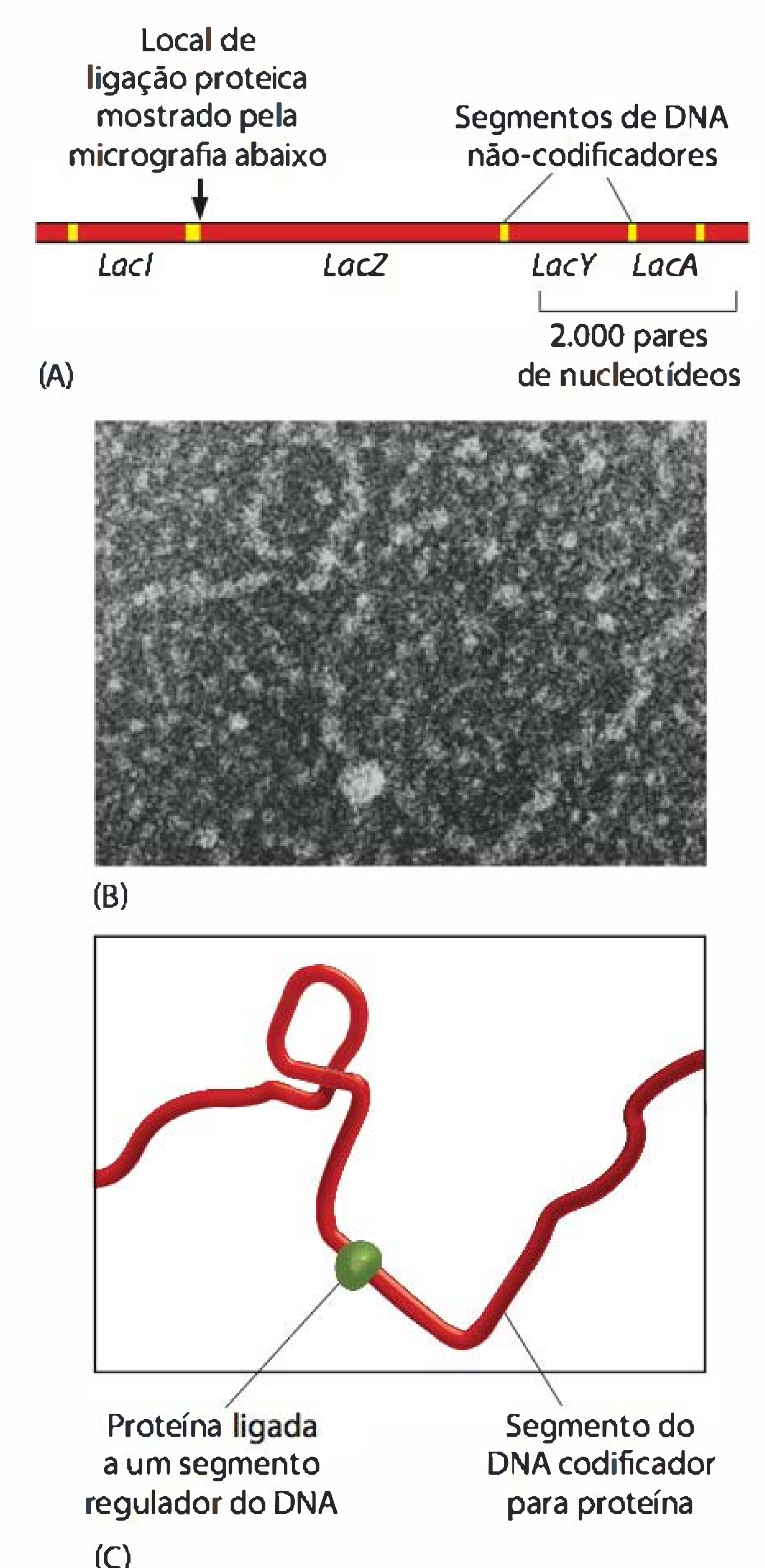


Figura 1-11 Regulação gênica pela ligação proteica ao DNA regulador. (A) Um diagrama de uma pequena porção do genoma da bactéria *Escherichia coli* contendo os genes codificadores (chamados de *LacI*, *LacZ*, *LacY* e *LacA*) para quatro proteínas diferentes. Os segmentos de DNA codificadores de proteína (*vermelho*) têm segmentos regulador e outros segmentos de DNA não-codificadores (*amarelo*) entre eles. (B) Uma micrografia eletrônica dessa região do DNA, com uma molécula de proteína (codificada pelo gene *LacI*) ligada ao segmento regulador; esta proteína controla a velocidade de transcrição dos genes *LacZ, LacY* e *LacA*. (C) Um esquema das estruturas mostradas em (B). (B, cortesia de Jack Griffith.)

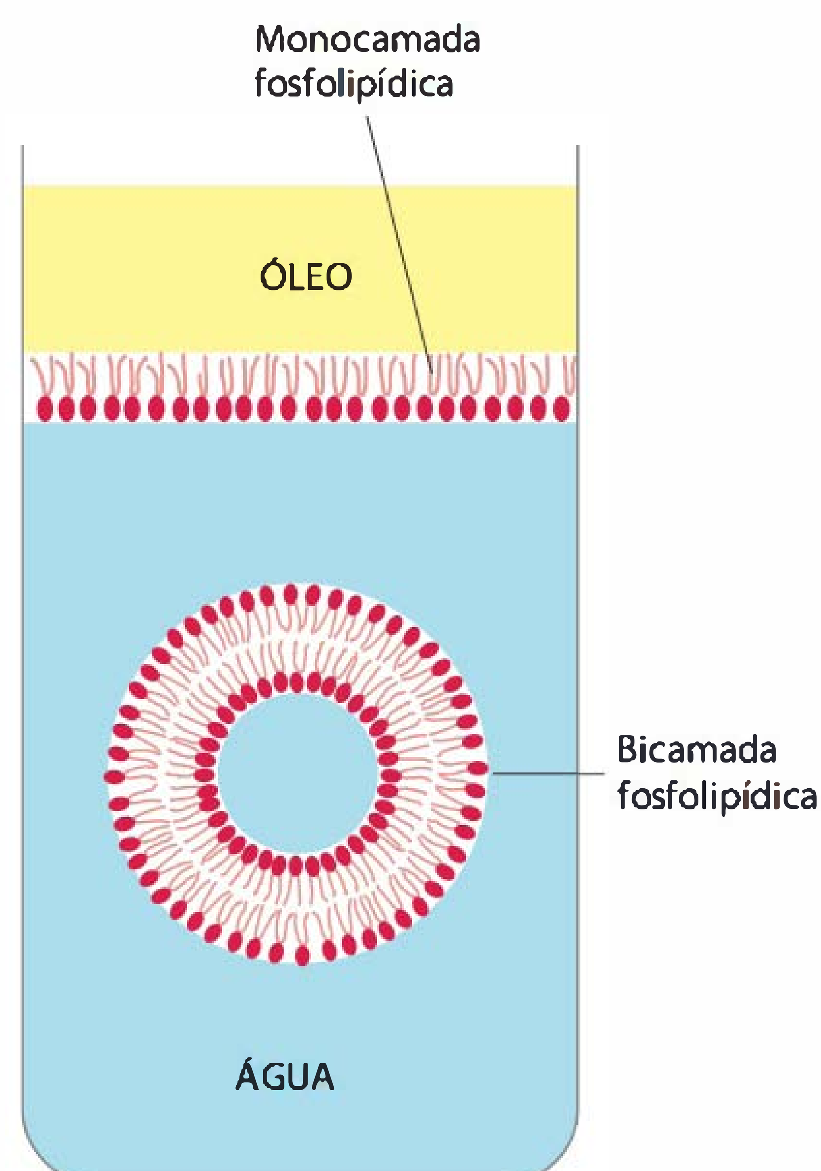


Figura 1-12 Formação de uma membrana por moléculas fosfolipídicas anfifílicas. Essas moléculas possuem uma cabeça hidrofílica (afinidade por água, fosfato) e uma cauda hidrofóbica (evitam água, hidrocarboneto). Na interface entre o óleo e a água, as moléculas se arranjam como uma camada simples com seus grupos hidrofílicos voltados para a água e os hidrofóbicos para o óleo. Quando imersas em água, elas se agregam em forma de bicamadas, contendo compartimentos aquosos.

conservadas durante o curso da evolução, de modo que é possível observar uma semelhança familiar entre elas, mesmo quando grupos de organismos com uma relação mais distante são comparados.

As proteínas transportadoras na membrana determinam amplamente quais moléculas entram ou saem da célula, e as proteínas catalíticas dentro da célula determinam as reações que essas moléculas sofrerão. Dessa maneira, especificando as proteínas que a célula irá produzir, a informação genética gravada na sequência do DNA conduzirá todo o conjunto químico da célula; e não apenas a sua química, mas também sua forma e comportamento, pois estes dois também são sintetizados e controlados pelas proteínas celulares.

Uma célula viva pode existir com menos de 500 genes

Os princípios básicos da transmissão da informação genética são bastante simples, mas quão complexas realmente são as células vivas? Em particular, quais são os requisitos mínimos? Podemos ter uma pequena ideia se considerarmos a espécie que tem um dos menores genomas conhecidos – a bactéria *Mycoplasma genitalium* (**Figura 1-14**). Este organismo vive como um parasita em mamíferos, dos quais adquire muitas de suas pequenas moléculas prontas para o uso. Todavia, ele ainda necessita sintetizar todas as moléculas grandes – DNA, RNA e proteínas – necessárias para os processos básicos da hereditariedade. Esse organismo possui apenas 480 genes em seu genoma composto de 580.070 pares de nucleotídeos, que representam 145.018 *bytes* de informação – praticamente o necessário para gravar o texto de um capítulo deste livro. A biologia celular pode ser complicada, mas não impossível.

É provável que o número mínimo de genes necessários para a viabilidade de uma célula no ambiente atual não seja menor que 200 a 300, embora existam cerca de 60 genes no conjunto essencial compartilhado por todas as espécies vivas sem qualquer exceção conhecida.

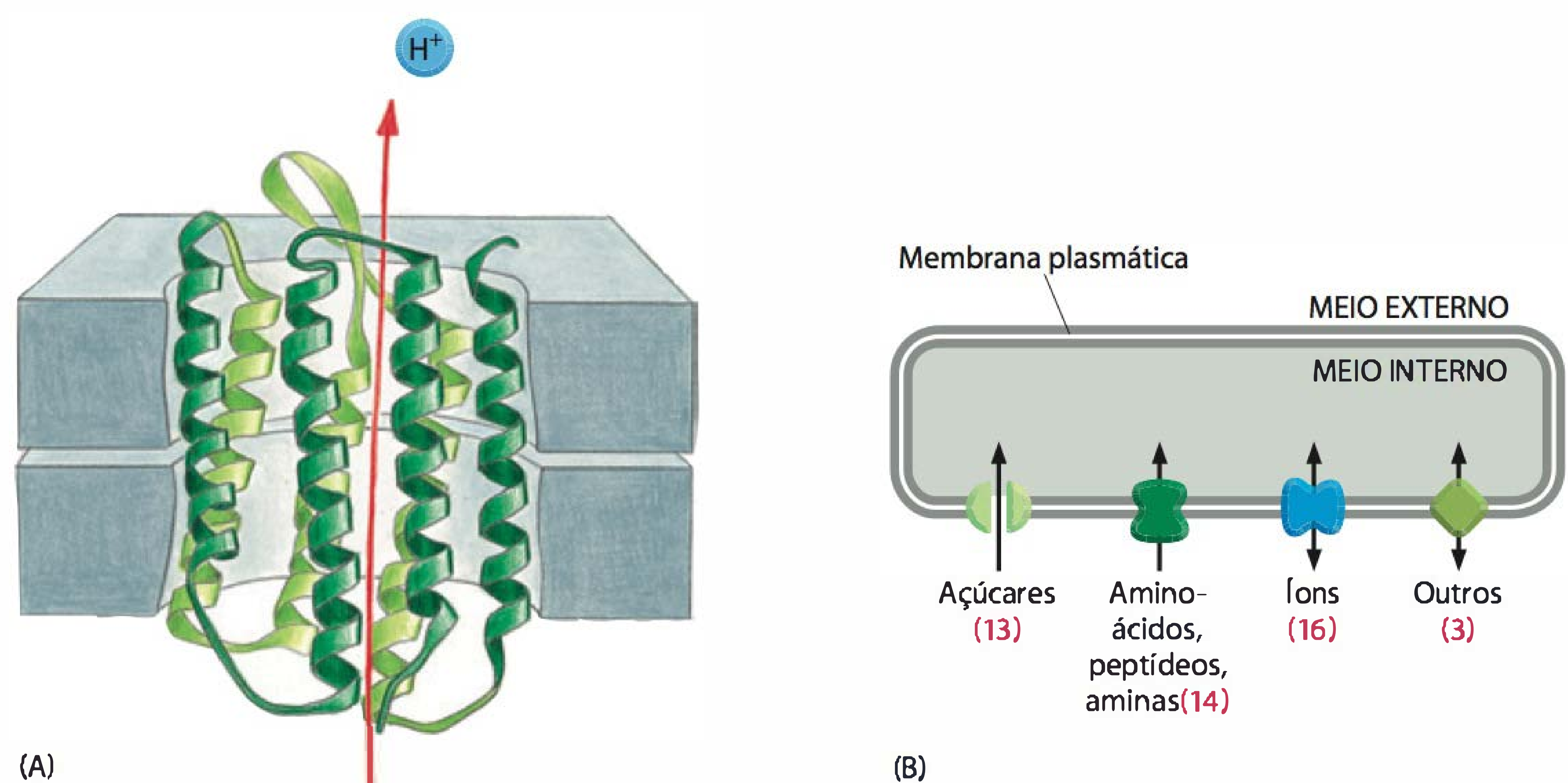
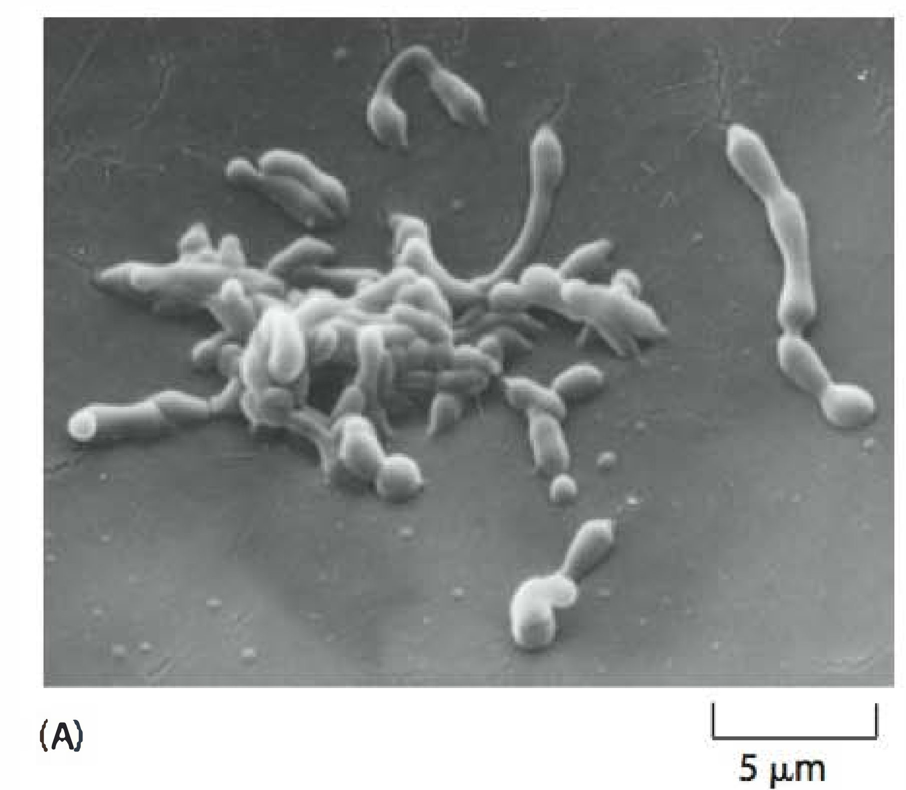


Figura 1-13 Proteínas transportadoras de membrana. (A) Estrutura da molécula de bacteriorrodopsina, da arquebactéria *Halobacterium halobium*. Esta proteína transportadora usa a energia absorvida da luz para bombear prótons (íons H+) para fora da célula. A cadeia polipeptídica atravessa a membrana; em muitas regiões, adquire uma conformação helicoidal; os segmentos helicoidais estão arranjados de maneira a formar as paredes de um canal por onde os íons são transportados. (B) Diagrama do conjunto das proteínas transportadoras encontradas na membrana da bactéria *Thermotoga maritima*. Os números entre parênteses referem-se ao número de diferentes proteínas transportadoras de cada tipo. A maioria das proteínas em cada classe está evolutivamente relacionada entre si e às suas contrapartes em outras espécies.



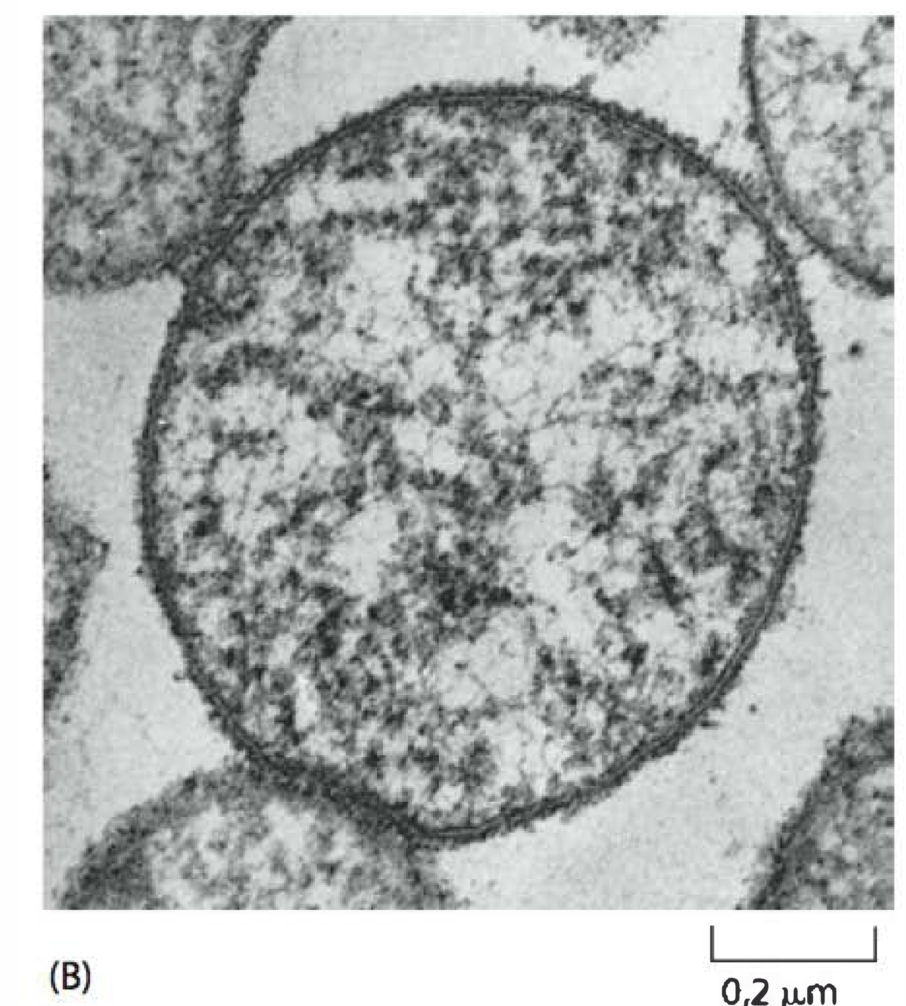


Figura 1-14 ***Mycoplasma genitalium.*** (A) Micrografia eletrônica de varredura mostrando a forma irregular desta pequena bactéria, refletindo a falta de alguma parede rígida. (B) Secção transversal (micrografia eletrônica de transmissão) de uma célula de *Mycoplasma*. Dos 477 genes de *Mycoplasma genitalium*, 37 codificam tRNAs, rRNAs e outros RNAs não-mensageiros. Algumas funções são conhecidas, ou podem ser supostas, para 297 dos genes que codificam proteínas: desses, 153 estão envolvidos na replicação, na transcrição, na tradução e em processos relacionados envolvendo DNA, RNA e proteínas; 29 nas estruturas de membrana e superfície celular; 33 no transporte de nutrientes e outras moléculas através da membrana; 71 na conversão de energia e na síntese e na degradação de pequenas moléculas; e 11 na regulação da divisão celular e outros processos. (A, de S. Razin et al., *Infect. Immun.* 30:538-546, 1980. Com permissão da American Society for Microbiology; B, cortesia de Roger Cole, in Medical Microbiology, 4ª ed., [S. Baron ed.]. Galveston: Univesity ofTexas Medical Branch, 1996.)

Resumo

Os organismos vivos se reproduzem pela transmissão de sua informação genética a sua progênie. A célula individual é a unidade mínima de autorreprodução, sendo o veículo para a transmissão da informação genética em todas as espécies vivas. Todas as células em nosso planeta estocam sua informação genética em uma mesma forma química – como DNA de fita dupla. As células replicam sua informação separando as fitas de DNA pareadas, e usam cada uma delas como molde para polimerização de uma fita nova de DNA com uma sequência de nucleotídeos complementares. A mesma estratégia de polimerização a partir de um molde é usada para transcrever parte das informações do DNA em moléculas de um polímero muito semelhante, o RNA. Estas, por sua vez, guiam a síntese de moléculas proteicas por meio da mais complexa maquinaria de tradução, envolvendo uma grande máquina de múltiplas moléculas, o ribossomo, o qual é composto de RNA e proteínas. As proteínas são as principais catalisadoras para quase todas as reações químicas na célula; as suas outras funções incluem a importação e exportação seletiva de pequenas moléculas através da membrana plasmática que forma o envoltório celular. A função específica de cada proteína depende de sua sequência de aminoácidos, que é especificada pela sequência de nucleotídeos do segmento de DNA correspondente – o gene que codifica para aquela proteína. Dessa forma, o genoma da célula determina sua química, e a química de toda célula viva é essencialmente similar, devendo prover a síntese de DNA, RNA e proteína. A célula mais simples conhecida possui menos de 500 genes.

A DIVERSIDADE DOS GENOMAS E A ÁRVORE DA VIDA

O sucesso dos organismos vivos com base em DNA, RNA e nas proteínas, além da infinidade de outras formas químicas que se possa imaginar, tem sido espetacular. Esses organismos têm povoado os oceanos, coberto toda a Terra, infiltrando-se na crosta terrestre e moldado a superfície de nosso planeta. A nossa atmosfera rica em oxigênio, os depósitos de carvão e de petróleo, as camadas de minério de ferro, os depósitos de calcário e de mármore – tudo isso são produtos, direta ou indiretamente, de atividades biológicas passadas da Terra.

Os organismos vivos não estão confinados ao familiar reino temperado das terras, das águas e da luz solar habitado por plantas e por animais herbívoros. Eles podem ser encontrados nas mais escuras e profundas águas dos oceanos, nas lamas vulcânicas, em pequenas lagoas abaixo da superfície congelada da Antártica e enterrados a quilômetros de profundidade na crosta terrestre. As criaturas que vivem nesses ambientes extremos não são familiares, não somente por serem inacessíveis, mas também por serem geralmente microscópicas. Nos habitats mais domésticos, a maioria dos organismos também é muito pequena para ser vista sem o auxílio de equipamento especial: eles geralmente passam despercebidos, a menos que causem uma doença ou apodreçam madeiras de nossas casas – ainda que componham a maior parte da massa total da matéria viva em nosso planeta. Apenas recentemente, por meio de novos métodos de análise molecular e, especificamente, pela análise de sequências de DNA, é que começamos a ter um retrato da vida na Terra não tão grosseiramente distorcido por nossa perspectiva influenciada de grandes animais vivendo em terras secas.

Nesta seção, vamos considerar a diversidade dos organismos e a relação entre eles. Devido ao fato de a informação genética de todos os organismos ser escrita em uma linguagem universal de sequências de DNA, e por ser possível a obtenção das sequências de DNA de qualquer organismo por técnicas-padrão em bioquímica, tornou-se possível agora caracterizar, catalogar e comparar qualquer grupo de organismos vivos a partir dessas sequências. De tais comparações podemos estimar o lugar de cada organismo na árvore genealógica das espécies vivas – a "árvore da vida". Mas antes de descrever o que esta abordagem revela, precisamos considerar as rotas pelas quais as células, em diferentes ambientes, obtêm a matéria-prima e a energia necessárias para sobreviver e proliferar-se, e de que modo algumas classes de organismos dependem de outras para suas necessidades químicas básicas.

As células podem ser alimentadas por várias fontes de energia livre

Os organismos vivos obtêm sua energia livre de diferentes maneiras. Alguns, como os animais, os fungos e as bactérias que vivem no intestino humano, adquirem essa energia livre alimentando-se de outros organismos vivos ou dos compostos orgânicos que eles produzem; tais organismos são chamados de *organotróficos* (do grego *trophe*, que significa "alimento"). Outros obtêm sua energia diretamente do mundo "não-vivente". Estes se dividem em duas classes: os que obtêm energia da luz solar e aqueles que capturam a sua energia de sistemas energeticamente ricos contendo compostos químicos inorgânicos do ambiente (sistemas químicos que estão longe do equilíbrio químico). Os organismos da primeira classe são chamados de *fototróficos* (alimentam-se da luz solar); os da segunda são chamados de *litotróficos* (que se alimentam de rochas). Os organismos organotróficos não poderiam existir sem esses conversores primários de energia, que são a forma de vida mais abundante.

Nós – e quase todos os organismos vivos que ordinariamente vemos ao nosso redor – dependemos dos organismos fototróficos que incluem diferentes tipos de bactérias, além de algas e plantas. Os organismos fototróficos mudaram toda a química de nosso ambiente: o oxigênio na atmosfera da Terra é um produto secundário de suas atividades biossintéticas.

Os organismos litotróficos não são um elemento óbvio em nosso mundo, pois são microscópicos e vivem em habitats não frequentados pelo homem – nos abismos oceânicos, no subsolo da crosta terrestre ou em vários outros ambientes inóspitos. Contudo, eles compreendem a maior parte do mundo vivo e são especialmente importantes em qualquer aspecto da história da vida na Terra.

Alguns litotróficos adquirem a energia de reações *aeróbicas*, usando moléculas de oxigênio do ambiente; uma vez que o O_2 atmosférico é o produto final de muitos organismos vivos, estes litotróficos aeróbios estão, de certa maneira, alimentando-se de produtos de uma vida passada. Existem, no entanto, outros litotróficos que vivem anaerobiamente, em lugares onde pouco ou nenhum oxigênio está presente, em condições similares àquelas que devem ter existido no início da vida na Terra, antes do acúmulo de oxigênio.

A mais dramática destas situações é a encontrada nas *fendas hidrotermais* no fundo dos oceanos Atlântico e Pacífico, em regiões onde o assoalho oceânico está em expansão, formando novas porções da crosta terrestre pelo gradual extravasamento de material do interior da Terra (**Figura 1-15**). A água do mar que percola para baixo é aquecida e dirigida de volta à superfície como um gêiser submarino, carregando com ela uma corrente de compostos químicos a partir das rochas quentes que estão embaixo. Um "coquetel" típico pode incluir H_2S, H_2, CO, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, CH_2 e NH_4^+, além de compostos fosforilados. Uma população densa de bactérias vive nas vizinhanças das fendas, bem-sucedida com essa dieta rigorosa e adquirindo energia livre a partir dos compostos químicos disponíveis. Outros organismos – moluscos, mexilhões e vermes marinhos gigantes –, por sua vez, alimentam-se de bactérias das fendas, formando todo um ecossistema análogo ao sistema das plantas e dos animais ao qual nós pertencemos, porém impulsionado por energia geoquímica, em vez de luz (**Figura 1-16**).

Algumas células fixam nitrogênio e dióxido de carbono para outras

Para se fazer uma célula é necessário matéria e energia na forma livre. O DNA, o RNA e as proteínas são compostos por apenas seis elementos químicos: hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Todos ocorrem abundantemente no ambiente, nas rochas, na água e na atmosfera da Terra, mas não na forma química que permite fácil incorporação às moléculas biológicas. Em particular, o N_2 e o CO_2 da atmosfera são extremamente não-reativos, e uma grande quantidade de energia livre é necessária para conduzir



Figura 1-15 A geologia de uma fenda hidrotermal quente no fundo do oceano. A água percola para baixo em direção à rocha derretida que extravasa do interior da Terra e é aquecida e enviada de volta à superfície, carregando grandes quantidades de minerais lixiviados da rocha quente. Próximo do centro da fenda, é atingido um gradiente de temperatura de mais de 350ºC, e menos de 2 a 3ºC no oceano circunvizinho. Os minerais precipitam da água à medida que ela resfria, formando uma chaminé. Diferentes classes de organismos, tolerantes a diferentes temperaturas, vivem em locais diferentes da chaminé. Uma chaminé típica possui uns poucos metros de altura, com uma taxa de fluxo médio de 1 a 2 m/seg.

as reações que utilizam essas moléculas inorgânicas na produção dos compostos orgânicos necessários à biossíntese – isto é, para *fixar* nitrogênio e dióxido de carbono, possibilitando que as moléculas de N e de C sejam utilizadas pelos organismos vivos. Muitos tipos de células vivas não possuem uma maquinaria bioquímica para fixar esses compostos, necessitando de outras classes de células para realizar essa tarefa. Somos animais dependentes das plantas para nosso suprimento de compostos de carbono e nitrogênio. As plantas, por sua vez, embora possam fixar o CO_2 da atmosfera, não possuem a habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico, dependendo em parte de bactérias fixadoras de nitrogênio para suprir as necessidades de compostos nitrogenados. As plantas da família das ervilhas, por exemplo, abrigam bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio nos nódulos de suas raízes.

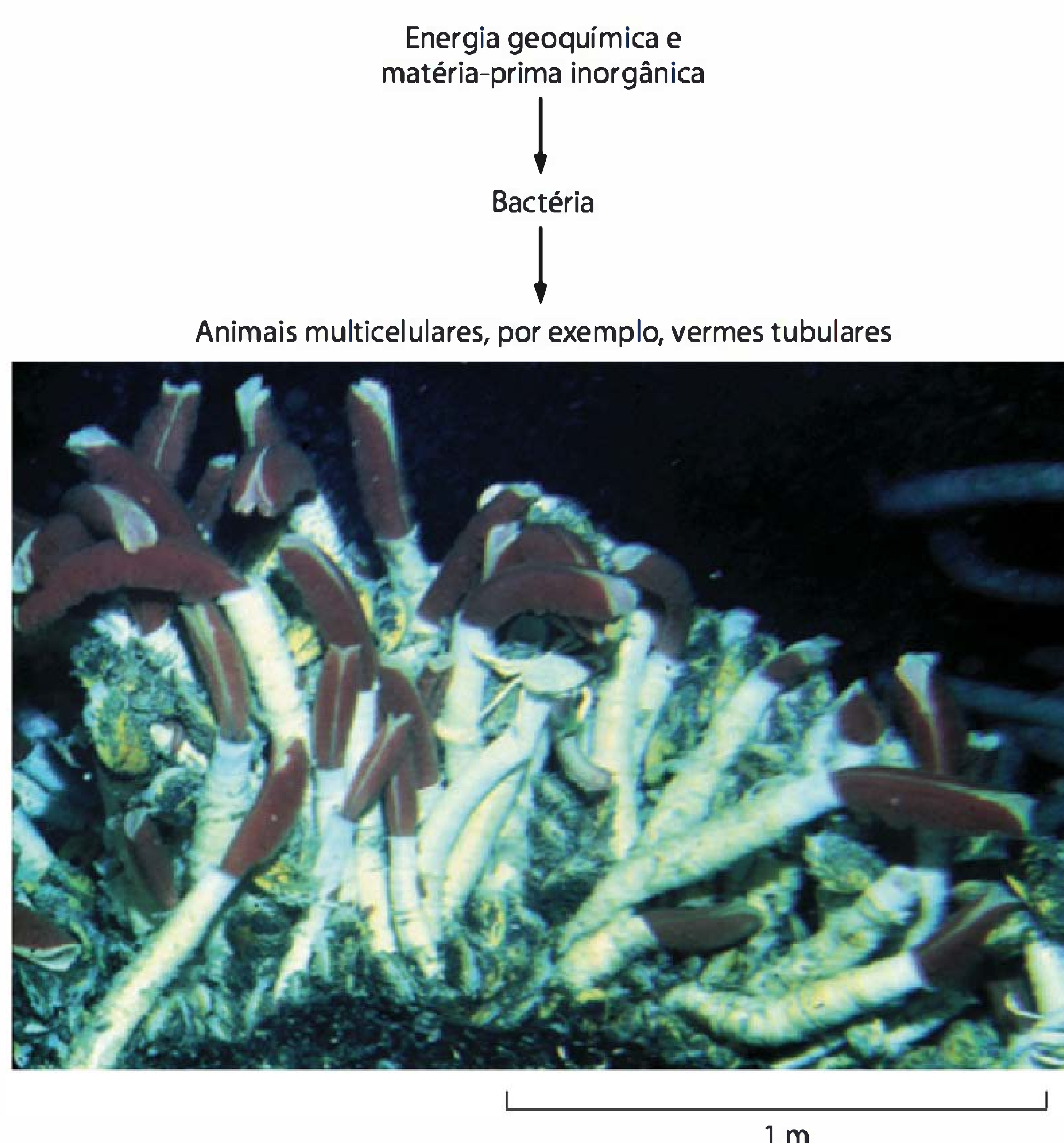


Figura 1-16 Organismos que vivem em fendas hidrotérmicas quentes. Próximo à fenda, em temperaturas de até 120ºC, vivem várias espécies litotróficas de bactérias e de arquebactérias, diretamente alimentadas por energia geoquímica. Um pouco mais distante, onde a temperatura é mais baixa, vivem vários animais invertebrados que se alimentam desses micro-organismos. Os mais fascinantes são os vermes tubulares gigantes (2 m), os quais, ao invés de alimentarem-se de células litotróficas, preferem viver em simbiose com elas: os órgãos especializados nesses vermes abrigam um grande número de bactérias simbiontes oxidantes de enxofre. Essas bactérias utilizam energia geoquímica e fornecem alimento a seus hospedeiros, que não possuem boca, intestino, nem ânus. A dependência que os vermes tubulares têm das bactérias no aproveitamento de energia geotérmica é análoga à dependência que as plantas têm dos cloroplastos no aproveitamento da energia solar, discutida mais adiante neste capítulo. Acredita-se, no entanto, que os vermes tubulares evoluíram de um animal mais convencional e que se tornaram secundariamente adaptados à vida em fendas hidrotermais. (Cortesia de Dudley Foster, Woods Hole Oceanographic Institution.)

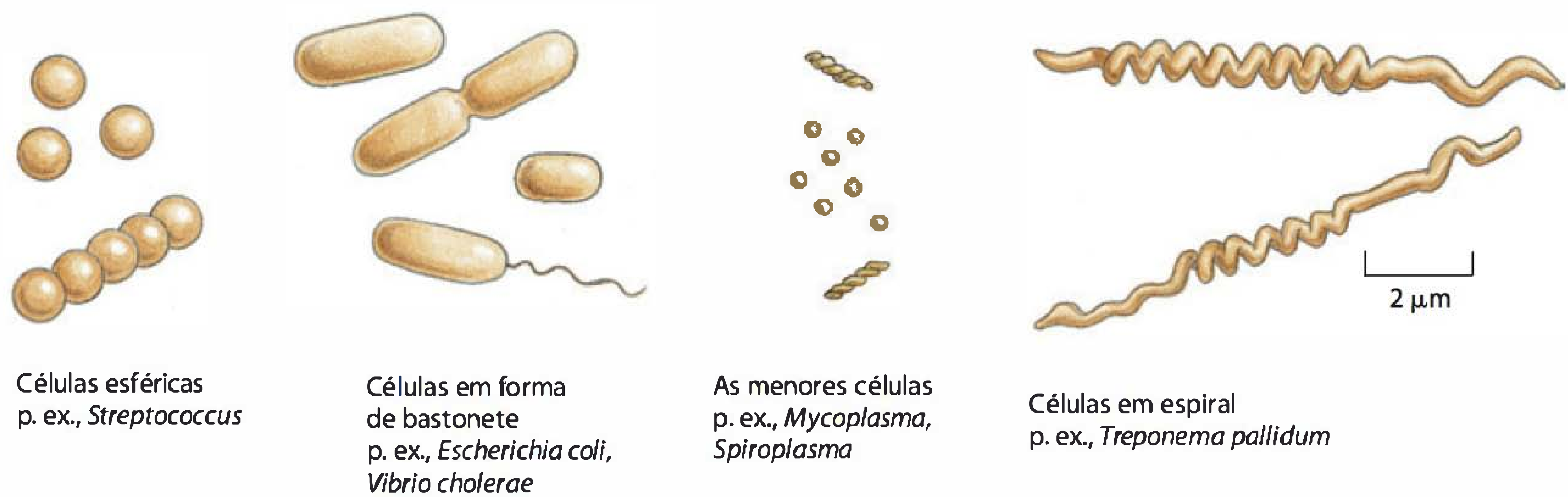


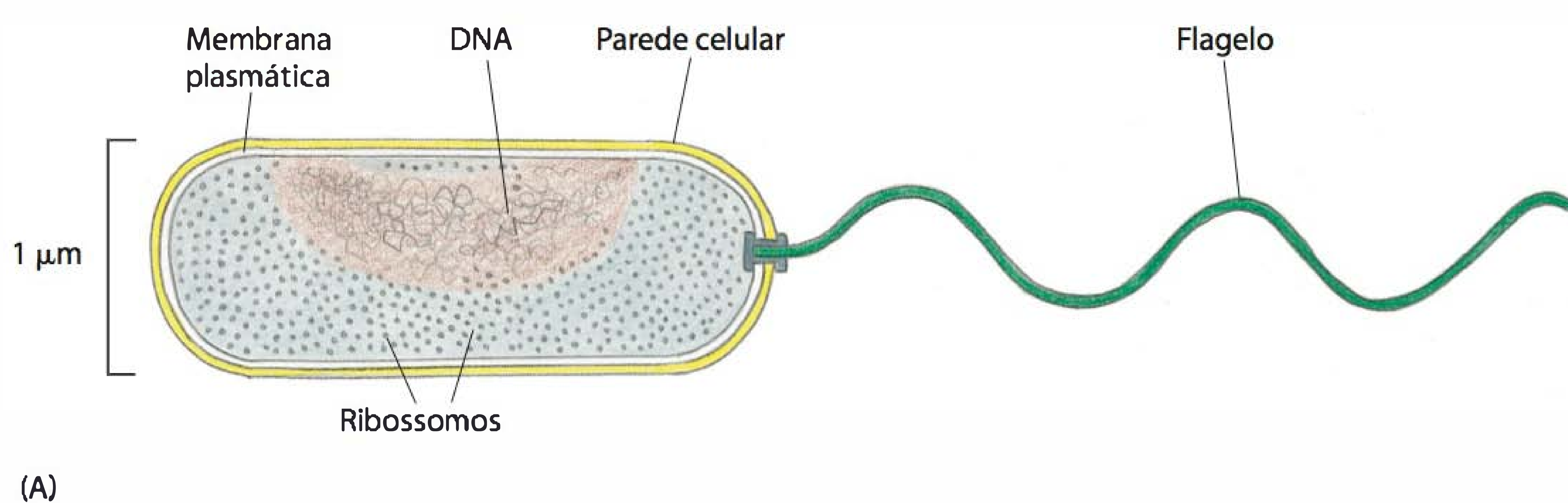
Figura 1-17 Formas e tamanhos de algumas bactérias. Apesar de a maioria ser pequena, como mostrado, medindo alguns micrômetros em uma extensão linear, existem também algumas espécies gigantes. Um exemplo extremo (não-mostrado) é a bactéria em forma de charuto *Epulopiscium fishelsoni*, que vive no intestino do peixe-cirurgião e pode medir até 600 μm de comprimento.

Consequentemente, as células vivas diferem muito em alguns aspectos básicos de sua bioquímica. Não surpreendentemente, as células com necessidades e capacidades complementares têm desenvolvido associações contíguas. Algumas dessas associações, como veremos a seguir, evoluíram a tal ponto que os parceiros perderem completamente a sua identidade individual: eles juntaram forças para formar uma única célula composta.

A maior diversidade bioquímica é vista entre as células procarióticas

Por meio da simples microscopia, sabe-se claramente que os organismos vivos podem ser classificados em dois grupos com base na estrutura celular: os **eucariotos** e os **procariotos**. Os eucariotos mantêm seu DNA em um compartimento limitado por uma membrana, chamado de núcleo (o nome vem do grego e significa "verdadeiramente nucleado", das palavras *eu*, "verdadeiro", e *karyon*, "núcleo"). Os procariotos não possuem um compartimento núcleo distinto para abrigar seu DNA. As plantas, os fungos e os animais são eucariotos; as bactérias são procariotos, assim como são as *archaea* – uma classe separada de células procarióticas que será discutida a seguir.

A maioria das células procarióticas aparentemente é pequena e simples (**Figura 1-17**). Na maioria das vezes, vivem como indivíduos independentes ou em comunidades organizadas livremente, ao invés de como organismos multicelulares. Os procariotos são tipicamente esféricos, ou possuem forma de bastonete, medindo poucos micrômetros de comprimento em uma dimensão linear. Frequentemente apresentam uma capa protetora flexível, chamada de *parede celular*, abaixo da qual se encontra a membrana plasmática envolvendo um único compartimento citoplasmático contendo DNA, RNA, proteínas e uma grande quantidade de moléculas pequenas necessárias à vida. Ao microscópio eletrônico, o interior dessa célula se parece com uma matriz de textura variável, sem nenhuma estrutura interna claramente organizada (**Figura 1-18**).



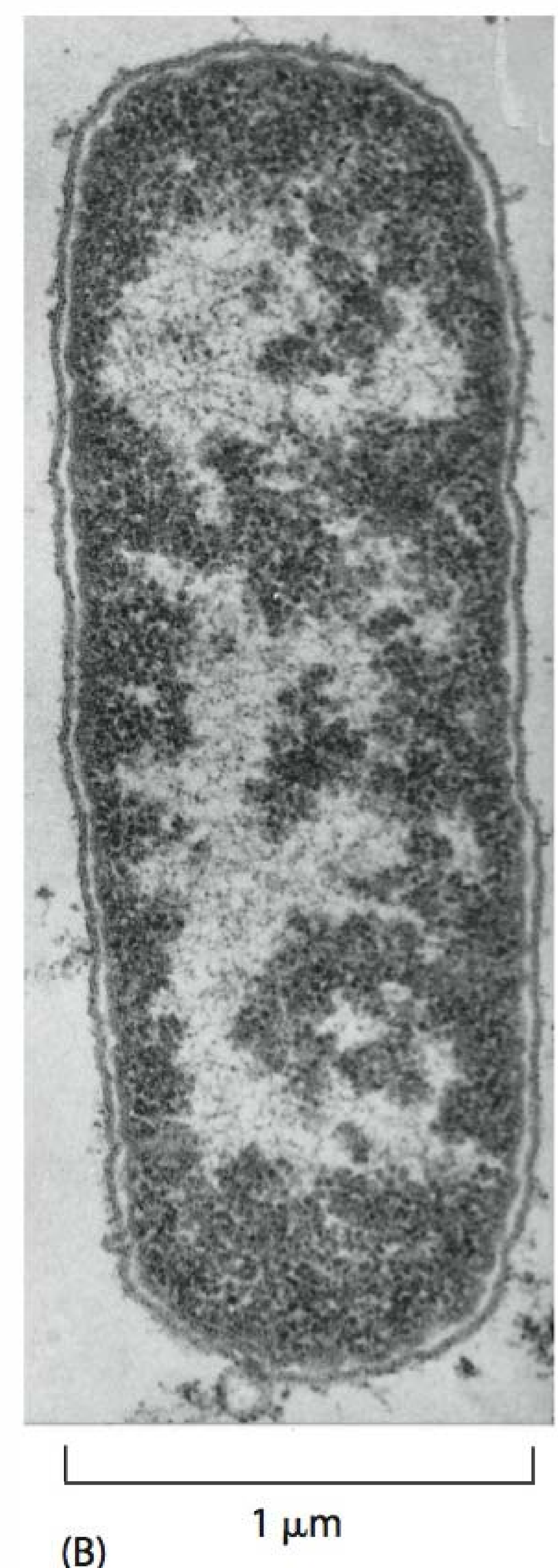


Figura 1-18 A estrutura de uma bactéria. (A) A bactéria *Vibrio cholerae* e sua simples organização interna. Como muitas outras espécies, a *Vibrio* possui um apêndice helicoidal em uma das extremidades – um flagelo –, que gira como uma turbina, impulsionando a célula. (B) Uma micrografia eletrônica mostrando um corte longitudinal da bactéria mais amplamente estudada, *Escherichia coli* (*E. coli*). Ela está relacionada ao *Vibrio*, mas possui muitos flagelos distribuídos ao longo de sua superfície (não mostrado neste corte). O DNA da célula está concentrado na região mais clara. (B, cortesia de E. Kellenberger.)

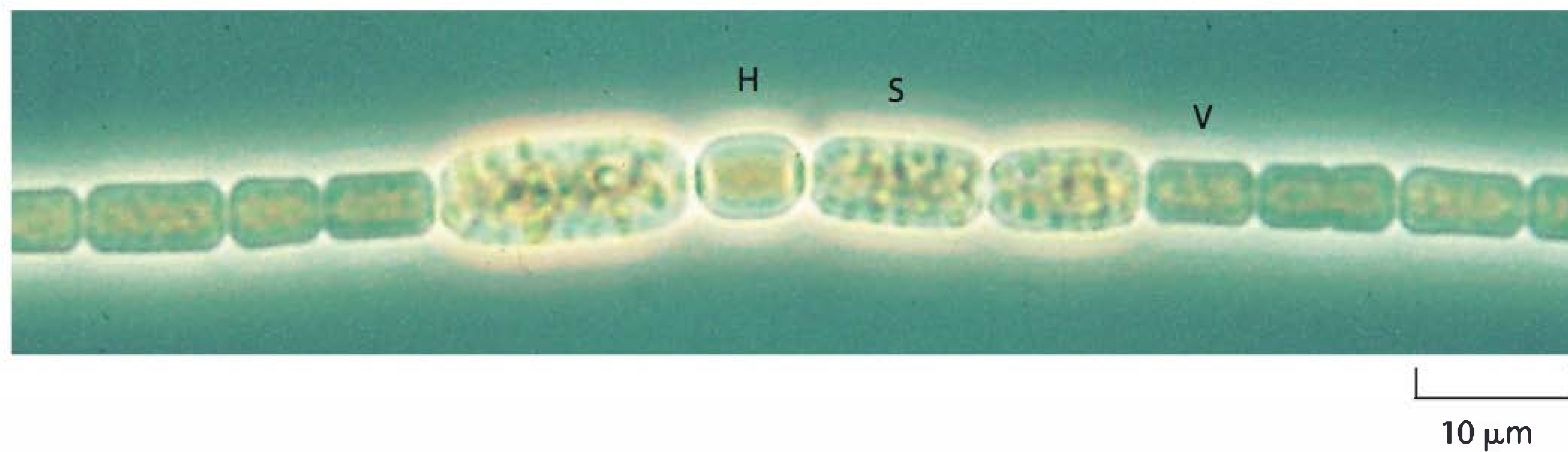


Figura 1-19 A bactéria fototrófica *Anabaena cylindrica* vista em microscópio óptico. As células dessa espécie formam longos filamentos multicelulares. Em sua maioria, as células (marcadas com *V*) realizam fotossíntese, enquanto que outras se tornaram especializadas na fixação do nitrogênio (marcadas com *H*) ou se desenvolveram em esporos resistentes (marcados com *S*). (Cortesia de Dave G. Adams.)

As células procarióticas vivem em uma enorme variedade de nichos e possuem uma capacidade bioquímica surpreendentemente variada – muito além das células eucarióticas. As espécies organotróficas podem utilizar praticamente qualquer tipo de molécula orgânica como alimento, de açúcares e aminoácidos a hidrocarbonetos e gás metano. Existem muitas espécies fototróficas (**Figura 1-19**), captando energia luminosa de maneiras diferentes; algumas delas gerando oxigênio como produto secundário, outras, não. As espécies litotróficas podem alimentar-se de uma dieta simples de nutrientes inorgânicos, absorvendo seu carbono do CO_2 e utilizando H_2S para abastecer suas necessidades energéticas (**Figura 1-20**) – ou de H_2, Fe^{2+}, enxofre, ou qualquer dentre muitos outros compostos químicos que ocorram no ambiente.

Muitos elementos desse mundo microscópico são praticamente inexplorados. Os métodos tradicionais de bacteriologia nos têm oferecido apenas o entendimento das espécies possíveis de serem isoladas e cultivadas em laboratório. Mas as análises de sequenciamento de DNA de populações de bactérias presentes em amostras de ambientes naturais – como solo ou água do mar, ou até nossa boca – nos têm alertado para o fato de que a maioria das espécies não pode ser cultivada com técnicas usuais de laboratório. De acordo com uma estimativa, falta caracterizar pelo menos 99% das espécies de procariotos existentes.

A árvore da vida possui três ramos principais: bactérias, arquebactérias e eucariotos

A classificação dos seres vivos tem sido tradicionalmente dependente das comparações de suas aparências externas: podemos ver que um peixe tem olhos, mandíbula, esqueleto, cérebro e assim por diante, e que um verme não tem; que uma roseira é parente de uma macieira, mas menos similar a uma gramínea. Como mostrado por Darwin, podemos interpretar prontamente tais semelhanças de familiares próximos em termos de evolução a partir de um ancestral comum, e encontrar vestígios de muitos desses ancestrais preservados no registro fóssil. Dessa maneira, tornou-se possível começar a desenhar a árvore genealógica das famílias dos organismos vivos, mostrando as várias linhagens de descendentes, bem como os pontos de ramificação na história, em que os ancestrais de um grupo de espécies tornaram-se diferentes dos outros.

Entretanto, quando as disparidades entre os organismos tornam-se muito grandes, esses métodos começam a falhar. Como podemos decidir se um fungo é parente mais próximo de uma planta ou de um animal? Quando se trata de um procarioto, essa tarefa torna-se ainda mais difícil: um bastonete ou uma esfera microscópica se parecem muito um com o outro. Os microbiólogos precisam, portanto, classificar os procariotos em termos de suas necessidades bioquímicas e nutricionais. Mas essa metodologia também possui suas armadilhas. Em meio a variações confusas de comportamentos bioquímicos, é difícil saber quais as diferenças realmente refletem as diferenças da história evolutiva.

As análises genômicas nos têm oferecido maneiras mais simples, diretas e eficazes para determinar as relações evolutivas. A sequência inteira de DNA de um organismo define a sua natureza com uma precisão quase perfeita e com detalhes minuciosos. Além disso, essa especificação está em uma forma digital – uma série de letras – que pode ser transferida diretamente para um computador e comparada à informação correspondente de qualquer outro organismo vivo. Devido ao fato de o DNA estar sujeito a mudanças aleatórias que se acumulam ao longo do tempo (como veremos brevemente), o número de diferenças entre as sequências de DNA de dois organismos pode oferecer indicações diretas, objetivas e quantitativas da distância evolutiva entre eles.

Essa abordagem tem mostrado que os organismos que foram tradicionalmente classificados no mesmo grupo como "bactérias" podem ser tão divergentes em suas origens evo-

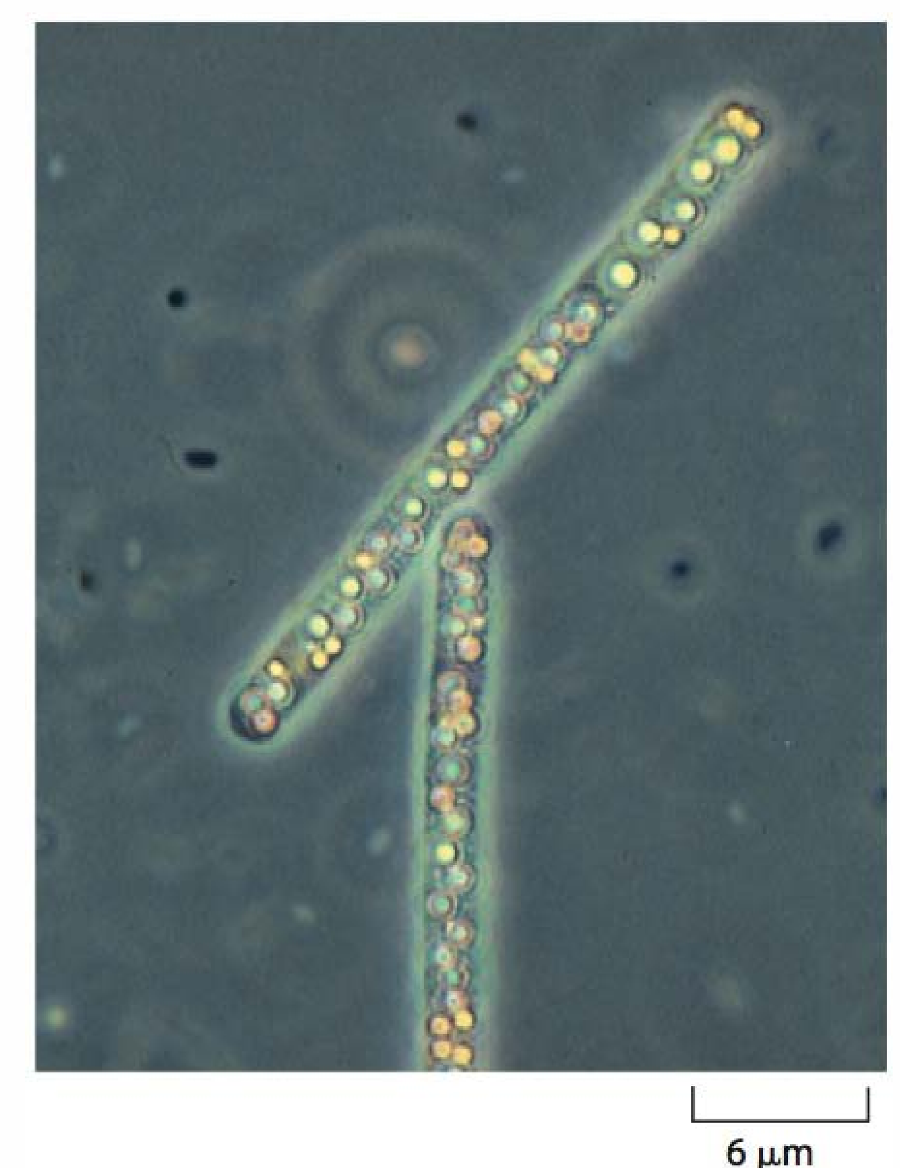


Figura 1-20 Uma bactéria litotrófica. *Beggiatoa*, que vive em ambientes sulfurosos, obtém sua energia da oxidação do H_2S, podendo fixar o carbono inclusive na ausência de luz. Note os depósitos de enxofre no interior das células. (Cortesia de Ralph W. Wolfe.)

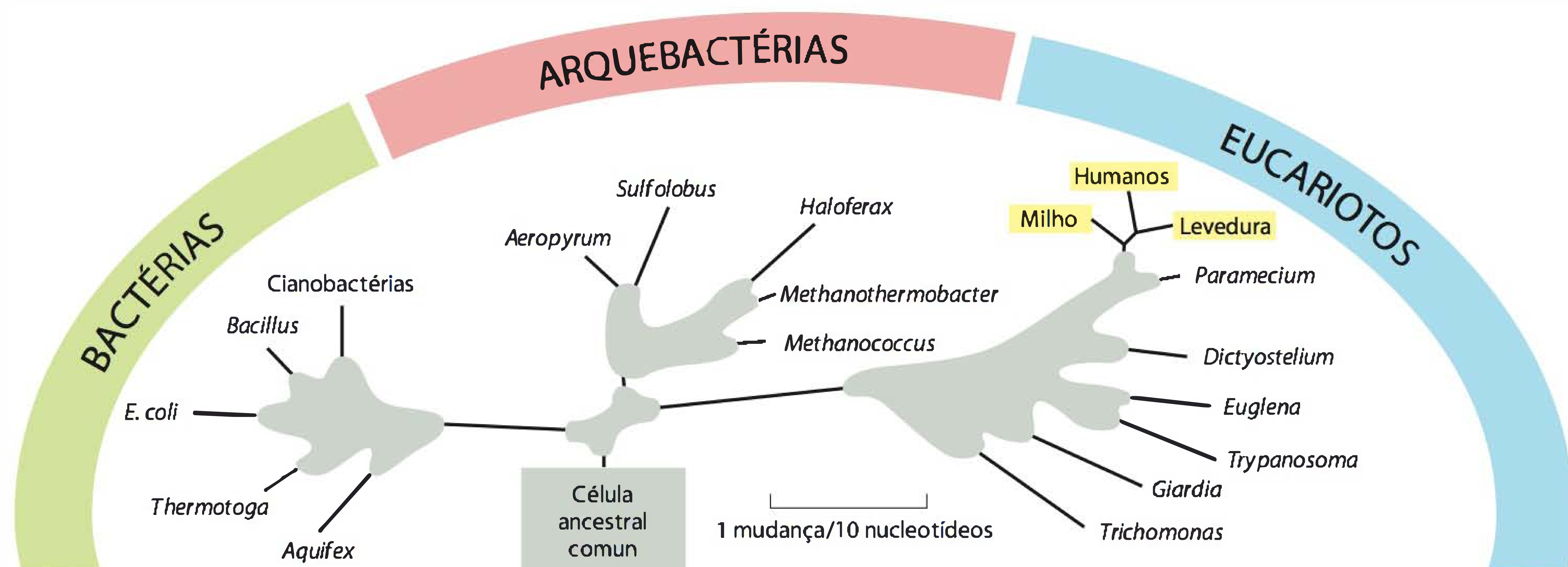


Figura 1-21 As três maiores divisões (domínios) do mundo vivo. Note que tradicionalmente o nome *bactérias* tem sido usado como referência para os procariotos em geral, porém mais recentemente foi redefinido para referir-se às eubactérias especificamente. A árvore genealógica mostrada aqui está baseada nas comparações da sequência nucleotídica de uma das subunidades do rRNA nas diferentes espécies, e a distância no diagrama representa uma estimativa do número de mudanças evolutivas que têm ocorrido nessa molécula em cada linhagem (ver Figura 1-22). As partes cobertas pela *nuvem cinza* representam as dúvidas em relação a alguns detalhes do verdadeiro padrão de divergência das espécies ao longo da evolução: as comparações de sequências nucleotídicas ou de aminoácidos de outras moléculas que não o rRNA, além de outros argumentos, resultaram em árvores genealógicas diferentes. No entanto, existe um consenso geral quanto à divergência antiga dos três domínios básicos – das bactérias, das arquebactérias e dos eucariotos.

lutivas quanto qualquer procarioto é divergente de um eucarioto. Parece que os procariotos compreendem dois grupos distintos que divergiram cedo na história da vida na Terra, antes mesmo dos ancestrais dos eucariotos divergirem como um grupo separado, ou ao mesmo tempo. Os dois grupos de procariotos são chamados de **bactérias** (ou eubactérias) e **archaea** (arquebactérias). Portanto, os organismos vivos são divididos em três grandes grupos ou *domínios*: bactérias, arquebactérias e eucariotos (**Figura 1-21**).

As arquebactérias geralmente são encontradas em ambientes não habituais que nós os seres humanos evitamos, como pântanos, esgotos, fundos oceânicos, salinas e quentes fontes ácidas. Contudo, estão amplamente distribuídas em ambientes menos extremos e mais familiares, desde solos e lagos até o estômago de bovinos. Na aparência externa não são facilmente distinguidas das bactérias. Do ponto de vista molecular, as arquebactérias, aparentemente, se assemelham mais aos eucariotos em relação à maquinaria de manipulação da informação genética (replicação, transcrição e tradução), mas se assemelham mais às bactérias em relação ao metabolismo e à conversão de energia. Discutiremos mais adiante como isso pode ser explicado.

Alguns genes evoluem rapidamente; outros são altamente conservados

Na manutenção e na cópia da informação genética, ocorrem acidentes e erros aleatórios alterando a sequência de nucleotídeos – isto é, criando **mutações**. Consequentemente, quando uma célula se divide, suas duas células-filhas muitas vezes não são idênticas umas às outras, ou à célula parental. Em raras ocasiões, o erro pode representar mudanças para melhor; mais provavelmente, isso não causará uma diferença significativa na perspectiva da célula; em muitos casos, o erro pode acarretar um sério dano – por exemplo, pela interrupção da sequência codificante para uma proteína essencial. As mudanças que ocorrem devido a erros do primeiro tipo tendem a ser perpetuadas, pois a célula alterada tem uma maior probabilidade de se autorreproduzir. As mudanças ocorridas devido a erros do segundo tipo – mudanças *seletivamente neutras* – podem ser perpetuadas ou não: em uma competição por recursos limitados, será uma questão de chance o sucesso da célula alterada ou de seus parentes. Porém, as mudanças que causam sérios danos levam a lugar nenhum: as células que sofrem tais mudanças morrem, não deixando progênie. Por meio de intermináveis repetições desse ciclo de tentativas e erros – de *mutação* e *seleção natural* – os organismos evo-

luem: suas especificações genéticas mudam, proporcionando a eles novos caminhos para explorar o ambiente mais efetivamente, para sobreviver em competições com outros e para se reproduzir com sucesso.

Claramente, algumas partes do genoma mudam com mais facilidade que outras no curso da evolução. Um segmento de DNA que não codifica proteínas e que não tem papel regulador significante está livre para sofrer mudanças limitadas apenas pela frequência randômica dos erros. Em contraste, um gene que codifica para uma proteína essencial ou para uma molécula de RNA não pode se alterar tão facilmente: quando ocorrem erros, as células defeituosas são quase sempre eliminadas. Portanto, os genes desse tipo são *altamente conservados*. Ao longo de 3,5 bilhões de anos ou mais da história evolutiva, muitas características do genoma têm mudado, mas a maioria dos genes altamente conservados permanece perfeitamente reconhecível em todas as espécies vivas.

Os genes altamente conservados são os únicos que devem ser examinados quando desejamos traçar as relações familiares entre os organismos relacionados mais distantemente na árvore da vida. Os estudos que levam à classificação do mundo vivo em três domínios – bactérias, arquebactérias e eucariotos – têm como base, sobretudo, a análise de um dos dois principais componentes do rRNA – o RNA da subunidade menor do ribossomo. Como o processo de tradução é fundamental a todos os organismos vivos, esse componente do ribossomo tem sido bem conservado desde o início da história da vida na Terra (**Figura 1-22**).

A maioria das bactérias e das arquebactérias tem entre 1.000 e 6.000 Genes

A seleção natural geralmente tem favorecido as células de procariotos que podem se reproduzir com mais rapidez, por captarem matérias-primas de seu ambiente e replicarem-se mais eficientemente, a uma taxa máxima permitida pelo suprimento alimentar disponível. O tamanho pequeno implica em uma alta razão entre a área superficial e o volume, facilitando, dessa forma, a maximização da aquisição de nutrientes através da membrana plasmática e impulsionando a taxa de reprodução celular.

Presumivelmente por essas razões, a maioria das células procarióticas carrega uma bagagem supérflua muito pequena; os seus genomas são pequenos, com genes empacotados muito próximos e quantidades mínimas de DNA regulador entre eles. O tamanho pequeno do genoma torna relativamente fácil a determinação completa da sequência de DNA. Atualmente conhecemos os genomas de várias espécies de bactérias, de arquebactérias e de poucas espécies de eucariotos. Como mostra a **Tabela 1-1**, a maioria dos genomas de bactérias e de arquebactérias contém entre 10^6 e 10^7 pares de nucleotídeos, codificando de 1.000 a 6.000 genes.

Uma sequência completa de DNA revela os genes que um organismo possui e aqueles que faltam. Quando comparamos os três domínios dos organismos vivos, podemos começar a ver quais os genes comuns a todos, e que devem, portanto, ter estado presentes na célula ancestral de todos os seres vivos atuais, e quais são peculiares a um ramo da árvore da vida. No entanto, para explicar as descobertas, devemos considerar mais atentamente como novos genes surgem e como os genomas evoluem.

```
GTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCC  Humano
GCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACGGGTGGAGCCTGCGGTTTAATTGGATTCAACGCCGGGCATCTTACCA  Methanococcus
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC.ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT  E. coli
GTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCC  Humano
```

Figura 1-22 A informação genética conservada desde a existência do ancestral comum de todos os seres vivos. É mostrada uma parte do gene de RNA da menor subunidade ribossomal. (O gene completo compreende cerca de 1.500 – 1.900 nucleotídeos, dependendo da espécie.) Estão alinhados os segmentos correspondentes da sequência de nucleotídeos de uma arquebactéria (*Methanococcus jannaschii*), uma bactéria (*Escherichia coli*) e um eucarioto (*Homo sapiens*). Os sítios onde os nucleotídeos são idênticos entre as espécies estão indicados por uma linha vertical; a sequência humana é repetida na parte final do alinhamento, de maneira que podem ser vistas as três comparações (duas a duas). Um ponto ao longo da sequência da *E. coli* denota uma posição em que um nucleotídeo foi removido da linhagem bacteriana durante o curso da evolução, ou inserido nas outras duas linhagens. Note que as sequências desses três organismos, representantes dos três domínios dos organismos vivos, diferem umas das outras de maneira quase similar, enquanto ainda retêm muitas semelhanças indiscutíveis.

Tabela 1-1 Alguns genomas completamente sequenciados

Espécie	Características especiais	Habitat	Tamanho do genoma (pares de nucleotídeos por genoma haploide x 1.000)	Número estimado de genes que codificam proteínas
Bactérias				
Mycoplasma genitalium	possui um dos menores genomas conhecidos	trato genital humano	580	468
Synechocystis sp.	fotossintética, geradora de oxigênio (cianobactéria)	lagos e rios	3.573	3.168
Escherichia coli	modelo de laboratório preferencialmente escolhido	intestino humano	4.639	4.289
Helicobacter pylori	causa úlceras de estômago e predispõe a câncer de estômago	estômago humano	1.667	1.590
Bacillus anthracis	causa antraz	solo	5.227	5.634
Aquifex aeolicus	litotrófica; vive em altas temperaturas	fendas hidrotermais	1.551	1.544
Streptomyces coelicolor	fonte de antibiótico; genoma gigante	solo	8.667	7.825
Treponema pallidum	espiroqueta; causa sífilis	tecidos humanos	1.138	1.041
Rickettsia prowazekii	bactéria mais próxima às mitocôndrias; causa tifo	piolhos e humanos (parasita intracelular)	1.111	834
Thermotoga maritima	organotrófica; vive em altas temperaturas	fendas hidrotermais	1.860	1.877
Arquebactérias				
Methanococcus jannaschii	litotrófica, anaeróbia, produtora de metano	fendas hidrotermais	1.664	1.750
Archaeoglobus fulgidus	litotrófica ou organotrófica, anaeróbia, redutora de sulfato	fendas hidrotermais	2.178	2.493
Nanoarchaeum equitans	menor arquebactéria conhecida; anaeróbia; parasita sobre outra arquebactéria maior	fendas hidrotermais e vulcânicas ativas	491	552
Eucariotos				
Saccharomyces cerevisiae (levedura formadora de brotos)	menor modelo eucarioto	casca de uvas, pele	12.069	~6.300
Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)	organismo modelo para plantas com flor	solo e ar	~142.000	~26.000
Caenorhabditis elegans (verme nematoide)	animal simples de desenvolvimento perfeitamente previsível	solo	~97.000	~20.000
Drosophila melanogaster (mosca-da-fruta)	organismo-chave para estudar a genética do desenvolvimento animal	frutas em decomposição	~137.000	~14.000
Homo sapiens (humanos)	mamífero mais extensivamente estudado	casas	~3.200.000	~24.000

O tamanho do genoma e o número de genes variam entre as linhagens de uma única espécie, especialmente em bactérias e arquebactérias. A tabela mostra os dados para linhagens específicas que foram sequenciadas. Em eucariotos, muitos genes podem originar variantes alternativas de proteínas, de forma que o número de proteínas especificado por um genoma é substancialmente maior do que o número de genes.

Novos genes são gerados a partir de genes preexistentes

A matéria-prima para a evolução é a sequência de DNA existente: não existe mecanismo natural para fabricar longas sequências a partir de novas sequências randômicas. Nesse sentido, nenhum gene é totalmente novo. Entretanto, a inovação pode ocorrer de várias maneiras (**Figura 1-23**):

1. *Mutação intragênica*: um gene existente pode ser modificado por mudanças em sua sequência de DNA por vários tipos de erros que ocorrem principalmente durante o processo de replicação do DNA.
2. *Duplicação gênica*: um gene existente pode ser duplicado, criando, assim, um par de genes inicialmente idênticos dentro de uma célula; esses dois genes podem, então, divergir ao longo do curso da evolução.

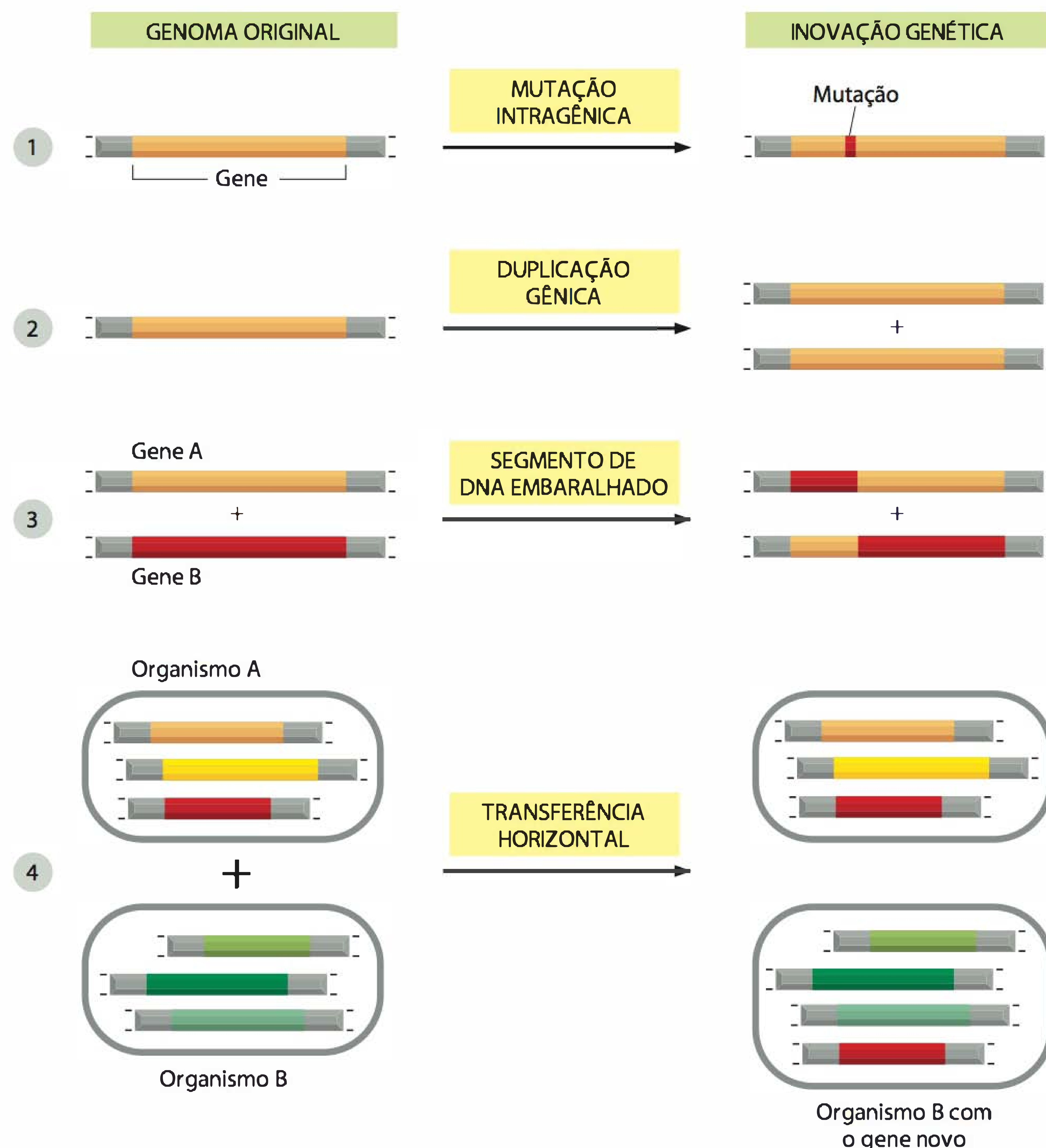


Figura 1-23 Quatro modos de inovação genética e seus efeitos na sequência de DNA de um organismo. Uma forma especial de transferência horizontal ocorre quando dois tipos diferentes de células iniciam uma associação simbiótica permanente. Os genes de uma das células podem então ser transferidos ao genoma da outra, como veremos a seguir ao discutir mitocôndrias e cloroplastos.

3. *Embaralhamento* (shuffling) *de segmentos*: dois ou mais genes existentes podem ser quebrados e religados para formar um gene híbrido constituído por segmentos de DNA originalmente pertencentes a genes separados.
4. *Transferência horizontal* (*intercelular*): uma porção de DNA pode ser transferida do genoma de uma célula para o genoma de outra – inclusive para uma de outra espécie. Esse processo contrasta com a habitual *transferência vertical* da informação genética que ocorre dos pais à progênie.

Cada um desses tipos de mudanças deixa um traço característico na sequência de DNA dos organismos, fornecendo evidências claras de que todos os quatro processos têm ocorrido. Nos últimos capítulos discutiremos os mecanismos básicos, mas neste nos focaremos nas consequências.

Duplicações gênicas dão origem às famílias de genes relacionados dentro de uma única célula

Uma célula duplica todo seu genoma cada vez que se divide em duas células-filhas. Entretanto, acidentes ocasionalmente resultam na duplicação de apenas parte do genoma, com retenção de segmentos originais e duplicados em uma única célula. Uma vez que um gene tenha sido duplicado dessa forma, uma das duas cópias gênicas estará livre para sofrer mutações e tornar-se especializada em realizar funções diferentes dentro de uma mesma célula. As sucessões repetidas desse processo de duplicação e de divergência, por milhares de anos, têm possibilitado que um gene forme famílias gênicas dentro de um único genoma. A análise da sequência do DNA de genomas procarióticos revelou muitos exemplos dessas famílias gênicas: em *Bacillus subtilis*, por exemplo, 47% dos genes possuem uma ou mais conexões óbvias (**Figura 1-24**).

Quando os genes duplicam e divergem dessa maneira, os indivíduos de uma espécie tornam-se fornecedores de múltiplas variantes de um gene primordial. Esse processo evolutivo deve ser distinguido das divergências genéticas que ocorrem quando uma espécie de

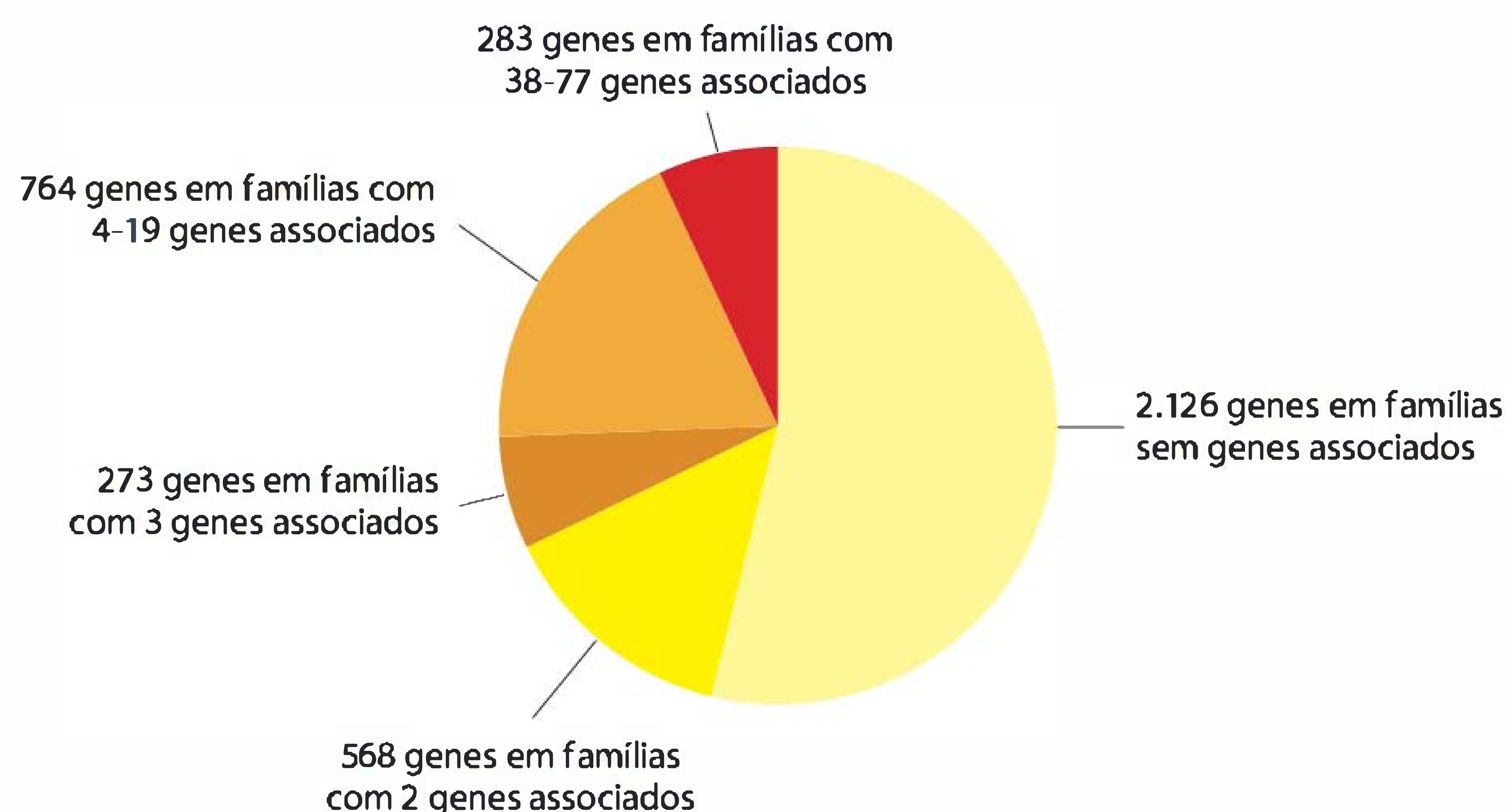


Figura 1-24 Famílias de genes relacionados evolutivamente no genoma de *Bacillus subtilis*. A maior família consiste em 77 genes que codificam para as variedades de transportadores ABC – uma classe de proteínas transportadoras de membrana encontrada em todos os três domínios do mundo vivo. (Adaptado de F. Kunst et al., *Nature* 390:249-256, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

organismo divide-se em duas linhas separadas de descendentes em um determinado ponto do ramo da árvore da vida – por exemplo, quando a linha dos nossos descendentes separou-se da linha dos chimpanzés. Assim, os genes se diferenciam gradualmente no curso da evolução, mas, provavelmente, continuam a ter uma função correspondente nas duas espécies-irmãs. Os genes que estão relacionados dessa maneira por descendência – isto é, genes de duas espécies diferentes, derivados do mesmo gene ancestral do último ancestral comum às duas espécies – são chamados de **ortólogos**. Os genes relacionados que resultaram de um evento de duplicação gênica dentro de um único genoma – e que provavelmente são divergentes em sua função – são chamados de **parálogos**. Os genes que estão relacionados por descendência de alguma das duas maneiras são chamados de **homólogos**, um termo geral usado para abranger os dois tipos de relação (**Figura 1-25**).

As relações familiares entre os genes podem se tornar muito complexas (**Figura 1-26**). Por exemplo, um organismo que possui uma família de genes parálogos (p. ex., o gene das sete hemoglobinas α, β, γ, δ, ε, ζ e θ) pode evoluir para duas espécies distintas (assim como humanos e chimpanzés), cada uma possuindo todo o conjunto de parálogos. Todos os 14 genes são homólogos, com a hemoglobina humana α ortóloga à hemoglobina α do chimpanzé, mas paráloga às hemoglobinas β do homem e do chimpanzé, e assim por diante. Além disso, as hemoglobinas dos vertebrados (as proteínas ligadoras de oxigênio presentes no sangue) são homólogas às mioglobinas dos vertebrados (as proteínas ligadoras de oxigênio presentes

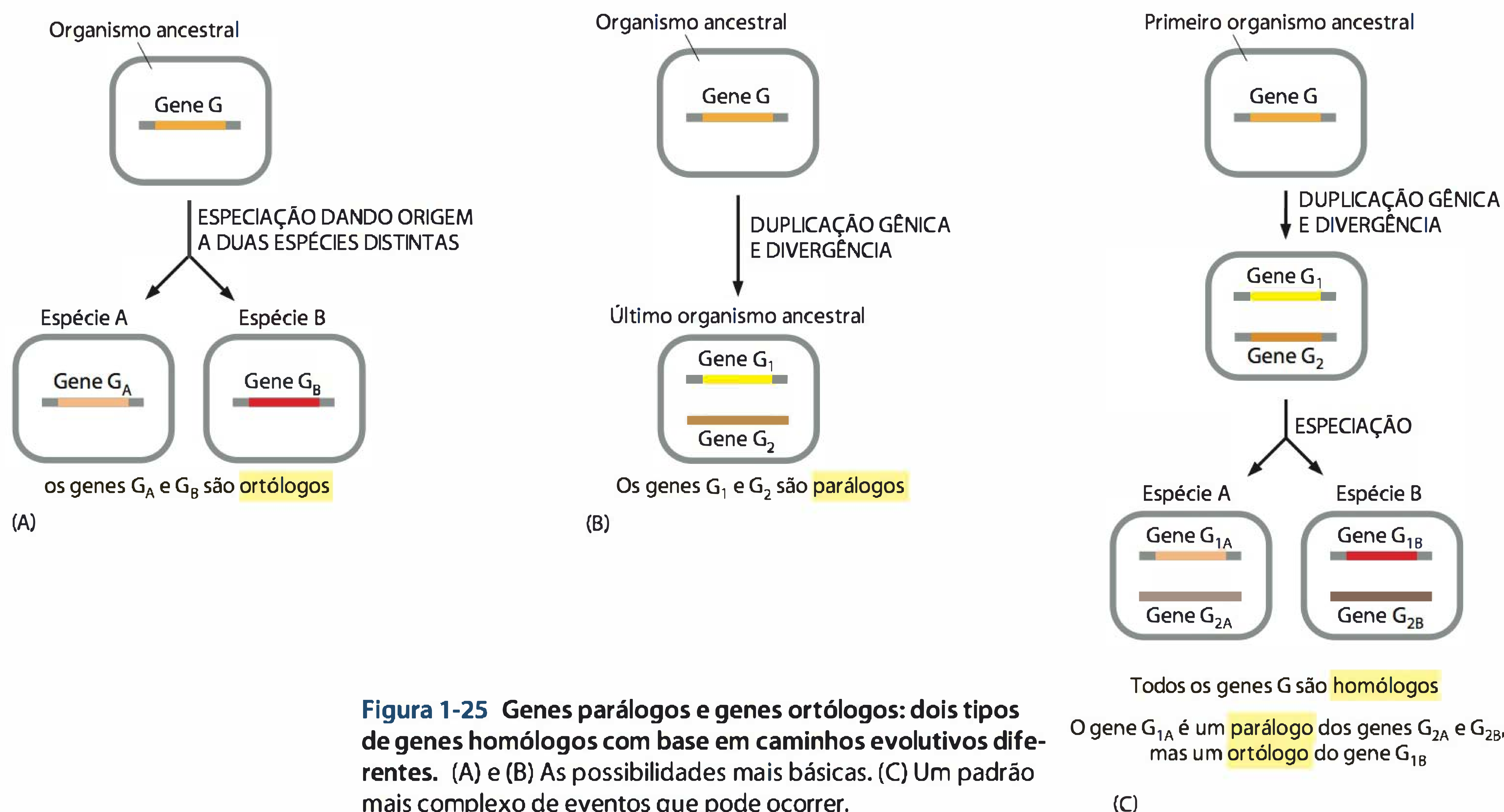


Figura 1-25 Genes parálogos e genes ortólogos: dois tipos de genes homólogos com base em caminhos evolutivos diferentes. (A) e (B) As possibilidades mais básicas. (C) Um padrão mais complexo de eventos que pode ocorrer.

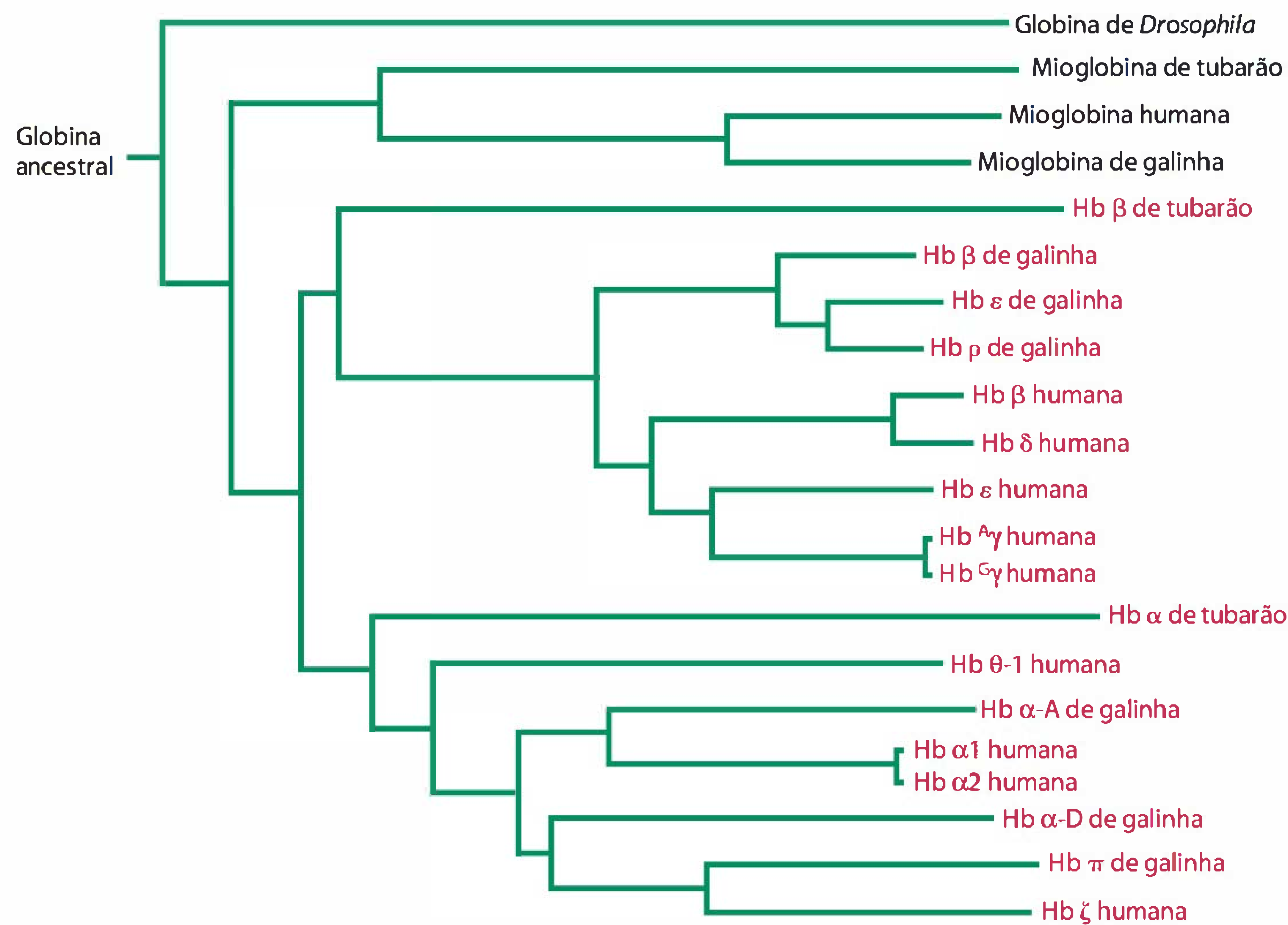


Figura 1-26 Uma família complexa de genes homólogos. Este diagrama mostra a genealogia dos genes da hemoglobina (Hb), da mioglobina e das globinas humana, de galinha, de tubarão e de *Drosophila*. Os comprimentos das linhas horizontais representam o grau de divergência nas sequências de aminoácidos.

nos músculos), assim como aos genes mais distantes que codificam para proteínas ligadoras de oxigênio em invertebrados, plantas, fungos e bactérias. Por meio das sequências de DNA em geral é fácil reconhecer que dois genes em duas espécies diferentes são homólogos; é muito mais difícil de decidir, sem outras informações, se eles são ortólogos.

Os genes podem ser transferidos entre os organismos tanto no laboratório quanto na natureza

Os procariotos também fornecem exemplos da transferência horizontal de genes entre duas espécies celulares. Os sinais mais indicadores dessas trocas são sequências reconhecidas como derivadas de vírus bacterianos, também chamados de *bacteriófagos* (**Figura 1-27**). Os **vírus** não são propriamente células vivas, mas podem atuar como vetores para a transferência gênica: eles são pequenos invólucros de material genético que evoluíram como parasitas sobre a maquinaria reprodutiva e biossintética das células hospedeiras. Eles replicam em uma célula, emergem desta com um envoltório protetor e, então, penetram e infectam outra célula, a qual pode ser da mesma espécie ou de uma espécie diferente. Geralmente, a célula infectada será morta pela proliferação massiva de partículas virais em seu interior. Contudo, ao invés de o DNA viral gerar diretamente essas partículas, ele pode permanecer no hospedeiro por muitas gerações celulares como um passageiro relativamente inócuo, tanto como um fragmento intracelular separado, conhecido como *plasmídeo*, quanto como uma sequência inserida no genoma habitual da célula. Em suas viagens, os vírus podem acidentalmente trazer fragmentos do DNA genômico de uma célula hospedeira e colocá-los em uma outra célula. Tais transferências de material genético frequentemente ocorrem em procariotos, podendo também ocorrer entre células eucarióticas da mesma espécie.

A transferência horizontal de genes entre células eucarióticas de diferentes espécies é muito rara, e não parece que tenha apresentado um papel significante na evolução eucariótica (embora transferências massivas de genomas bacterianos para genomas eucarióticos tenham ocorrido na evolução de mitocôndrias e cloroplastos, como discutiremos a seguir). Em contrapartida, a transferência horizontal de genes ocorre com frequência entre organismos procariotos de diferentes espécies. Muitos procariotos têm uma notável capacidade de captar até mesmo moléculas de DNA não-viral de sua vizinhança e, desse modo, capturar as informações genéticas que essas moléculas carregam. Por esse caminho, ou pela transferência mediada por vírus, bactérias e arquebactérias na natureza podem adquirir genes de maneira relativamente fácil de suas células vizinhas. Os genes que conferem resistência a um antibiótico, ou que são capazes de produzir uma toxina, por exemplo, podem ser

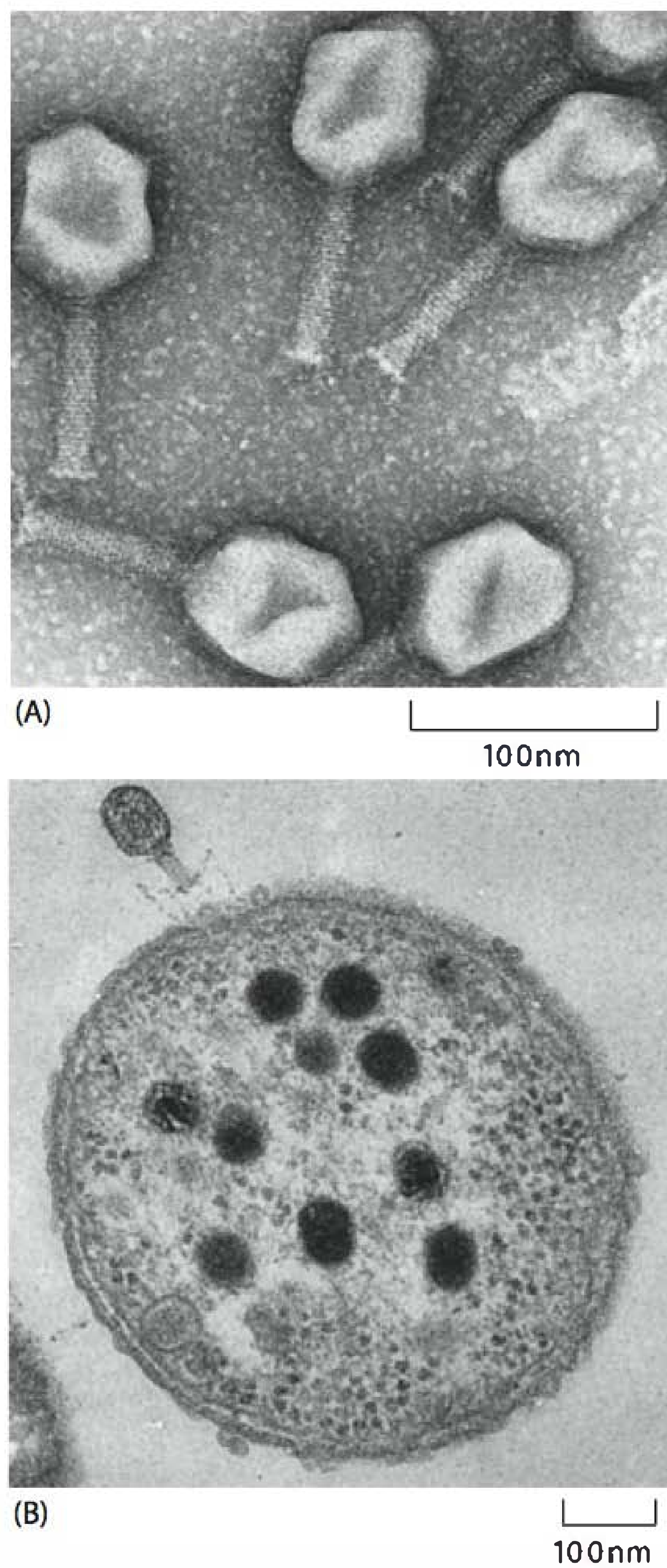


Figura 1-27 Transferência viral de DNA de uma célula para outra. (A) Micrografia eletrônica de partículas de um vírus bacteriano, o bacteriófago T4. A cabeça desse vírus contém o DNA viral; a cauda contém o aparato para injetar o DNA dentro de uma bactéria hospedeira. (B) Corte transversal de uma bactéria com um bacteriófago de T4 agarrado a sua superfície. Os grandes objetos escuros dentro da bactéria são as cabeças de novas partículas de T4 durante a montagem. Quando eles estiverem maduros, as bactérias se romperão para liberá-los. (A, cortesia de James Paulson; B, cortesia de Jonathan King e Erika Hartwig de G. Karp, Cell and Molecular Biology, 2ª ed., Nova York: John Wiley & Sons, 1999. Com permissão de John Wiley & Sons.)

transferidos de espécie para espécie, fornecendo à bactéria receptora uma vantagem seletiva. Desse modo, novas, e algumas vezes perigosas, linhagens de bactérias têm evoluído em ecossistemas bacterianos que habitam hospitais ou em diversos nichos do corpo humano. Por exemplo, a transferência horizontal de genes é a responsável, ao longo dos últimos 40 anos, pelas linhagens resistentes à penicilina de *Neisseria gonorrheae,* a bactéria que causa a gonorreia. Em uma escala de tempo mais longa, os resultados podem ser ainda mais profundos: estima-se que pelo menos 18% de todos os genes presentes no atual genoma de *E. coli* tenham sido adquiridos por transferência horizontal de outras espécies, nos últimos cem milhões de anos.

O sexo resulta em trocas horizontais da informação genética dentro de uma espécie

As trocas horizontais de informação genética têm um importante papel na evolução de bactérias e arquebactérias no mundo atual, e elas podem ter ocorrido até mesmo de forma mais frequente e promíscua no início da vida na Terra. Tais transferências horizontais poderiam explicar de outra maneira a enigmática observação de que os eucariotos são mais similares às arquebactérias com relação aos genes envolvidos em processos básicos de manejo de informação da replicação do DNA, transcrição e tradução, porém são mais similares às bactérias com relação aos genes envolvidos nos processos metabólicos. De qualquer forma, mesmo que a transferência horizontal de genes tenha ocorrido mais livremente no início da vida na Terra, ou tenha permanecido ao longo da história evolutiva com uma taxa lenta e constante, ela tem o efeito de complicar o conceito de célula ancestral como um todo, à medida que trata o genoma de uma célula como um complexo de elementos derivados de fontes independentes.

A transferência horizontal de genes entre procariotos pode parecer um processo surpreendente, mas possui um paralelo em um fenômeno familiar a todos nós: o sexo. Além da usual transferência horizontal do material genético dos pais à progênie, a reprodução sexual promove uma transferência horizontal de informação genética em grande escala entre duas linhagens celulares inicialmente distintas – aquelas pertencentes à mãe e ao pai. Um aspecto-chave do sexo, é claro, é que a troca genética normalmente ocorre entre indivíduos da mesma espécie. Mesmo ocorrendo indiferentemente dentro de uma espécie ou entre espécies, a transferência horizontal de genes deixa algumas características impressas: ela resulta tanto em indivíduos que estão mais proximamente relacionados a um conjunto de indivíduos parentais no que diz respeito a alguns genes, quanto ao outro conjunto de indivíduos parentais com relação a outros genes. Comparando-se as sequências de DNA de genomas humanos, um visitante inteligente de outro planeta poderia deduzir que os humanos se reproduzem sexuadamente, até mesmo se ele ignorasse por completo como funciona o comportamento humano.

A reprodução sexual é comum (embora não-universal), especialmente entre eucariotos. Até mesmo as bactérias realizam de tempos em tempos trocas sexuais controladas de DNA com outros membros de sua própria espécie. A seleção natural tem favorecido claramente os organismos que se reproduzem sexuadamente, embora os teoristas evolutivos ainda discutam qual é, precisamente, a vantagem seletiva do sexo.

A função de um gene com frequência pode ser deduzida a partir de sua sequência

As relações familiares entre os genes são importantes não só pelo seu interesse histórico, mas também porque simplificam a tarefa de decifrar as funções gênicas. Uma vez que a sequência de um gene recém-descoberto tenha sido determinada, um cientista pode, com alguns comandos no computador, pesquisar bases de dados inteiras de sequências gênicas conhecidas para genes relacionados a ele. Em muitos casos, a função de um ou mais desses homólogos já terá sido determinada experimentalmente e, portanto, uma vez que a sequência gênica determina a função de um gene, pode-se com frequência fazer uma boa suposição sobre a função do novo gene: é provável que ele seja similar àquele homólogo já conhecido.

Desse modo, torna-se possível decifrar o grande segredo da biologia de um organismo simplesmente analisando-se a sequência de DNA do seu genoma e usando as informações que já temos sobre as funções dos genes em outros organismos mais intensivamente estudados.

Mais de 200 famílias de genes são comuns a todos os três primeiros ramos da árvore da vida

Dada a sequência gênica completa de organismos representativos de todos os três domínios – arquebactérias, bactérias e eucariotos –, pode-se pesquisar sistematicamente as homologias que se estendem por essa enorme divisão evolutiva. Nesse sentido, podemos começar a fazer um levantamento do patrimônio comum de todas as coisas vivas. Existem algumas dificuldades consideráveis nessa iniciativa. Por exemplo, as espécies individuais com frequência perderam alguns dos genes ancestrais; outros genes provavelmente tenham sido adquiridos por transferência horizontal de outras espécies e, portanto, podem não ser verdadeiramente ancestrais, mesmo que compartilhados. Na verdade, as comparações de genoma sugerem fortemente que tanto a perda de genes de linhagens específicas quanto a transferência horizontal de genes, em alguns casos entre espécies distantes evolutivamente, têm sido os principais fatores da evolução, pelo menos entre procariotos. Finalmente, no curso de 2 ou 3 bilhões de anos, alguns genes que foram inicialmente compartilhados terão sofrido modificações além do reconhecimento pelos métodos atuais.

Por causa de todas essas excentricidades do processo evolutivo, parece que somente uma pequena proporção de famílias gênicas ancestrais tem sido universalmente retida em uma forma reconhecível. Assim, dentre as 4.873 famílias gênicas codificadoras de proteínas, definidas por meio da comparação dos genomas de 50 bactérias, 13 arquebactérias e 3 eucariotos unicelulares, somente 63 são verdadeiramente ubíquas (ou seja, representadas em todos os genomas analisados). A maioria dessas famílias universais inclui componentes dos sistemas de tradução e de transcrição. Aparentemente, essa não é uma aproximação realista de um conjunto genético ancestral. Uma ideia melhor – embora ainda não concluída – de um conjunto genético ancestral pode ser obtida registrando-se as famílias de genes que possuem representantes em várias (mas não necessariamente em todas) espécies dos três principais domínios. Tal análise revela 264 famílias ancestrais conservadas. Para cada família pode ser designada uma função (pelo menos no que diz respeito à atividade bioquímica geral, mas usualmente com mais precisão), com o maior número de famílias gênicas compartilhadas estando envolvido na tradução e no metabolismo e transporte de aminoácidos (**Tabela 1-2**). Esse conjunto de famílias gênicas altamente conservadas representa somente um esquema rudimentar da herança comum de toda a vida moderna; uma reconstrução mais precisa dos complementos gênicos do último ancestral universal comum poderia ser possível com sequenciamentos genômicos adicionais e análises comparativas mais detalhadas.

As mutações revelam as funções dos genes

Sem informações adicionais, nenhum estudo mais detalhista das sequências genômicas revelará as funções dos genes. Podemos reconhecer que um gene B é como um gene A, mas como descobrimos em primeiro lugar a função do gene A? E mesmo se conhecermos a função do gene A, como testar se a função do gene B é verdadeiramente a mesma sugerida pela similaridade de sequência? Como fazemos a conexão entre o mundo de informações genéticas abstratas e o mundo dos organismos vivos verdadeiros?

As análises das funções gênicas dependem de duas abordagens complementares: a genética e a bioquímica. A genética inicia com o estudo de mutantes: encontramos ou fazemos um organismo no qual um gene é alterado e examinamos os efeitos na estrutura e no desempenho do organismo (**Figura 1-28**). A bioquímica analisa as funções de moléculas: extraímos moléculas de um organismo e então estudamos suas atividades químicas. Colocando a genética e a bioquímica juntas e examinando as anormalidades químicas em um organismo mutante, é possível encontrar as moléculas cuja produção depende de um determinado gene. Ao mesmo tempo, os estudos do desempenho do organismo mutante nos mostram o papel que aquelas moléculas desempenham no funcionamento do organismo como um todo. Assim, a genética e a bioquímica combinadas fornecem um caminho para estabelecer as relações entre os genes, as moléculas e a estrutura e a função do organismo.

Nos últimos anos, a informação de sequências de DNA e as eficientes ferramentas da biologia molecular têm permitido rápidos progressos. A partir de comparações de sequências, frequentemente pode-se identificar subregiões particulares dentro de um gene preservadas quase inalteradas ao longo do curso da evolução. Essas subregiões conservadas são, provavelmente, as partes mais importantes do gene em termos de função. Podemos testar

Tabela 1-2 O número de famílias gênicas, classificadas por função, que são comuns a todos os três domínios dos seres vivos

Função da família gênica	Número de famílias "universais"
Processamento de informação	
Tradução	63
Transcrição	7
Replicação, recombinação e reparo	13
Processos celulares e sinalização	
Controle do ciclo celular, mitose e meiose	2
Mecanismos de defesa	3
Mecanismos de transdução de sinais	1
Parede celular/biogênese de membrana	2
Intercâmbio intracelular e secreção	4
Modificações pós-traducionais, *turnover* proteico e chaperonas	8
Metabolismo	
Produção e conversão de energia	19
Transporte e metabolismo de carboidratos	16
Transporte e metabolismo de aminoácidos	43
Transporte e metabolismo de nucleotídeos	15
Transporte e metabolismo de coenzimas	22
Transporte e metabolismo de lipídeos	9
Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	8
Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários	5
Pouco caracterizada	
Função bioquímica geral estabelecida; papel biológico específico desconhecido	24

Para o propósito dessa análise, as famílias gênicas são definidas como "universais" se estão representadas no genoma de pelo menos duas arquebactérias distintas (*Archaeoglobus fulgidus* e *Aeropyrum pernix*), duas bactérias distantes evolutivamente (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*) e um eucarioto (*Saccharomyces cerevisiae*, levedura). (Dados de R. L. Tatusov, E. V. Koonin e D. J. Lipman, *Science* 278:631-637, 1997, com permissão de AAAS; R. L. Tatusov et al., *BMC Bioinformatics* 4:41, 2003, com permissão de BioMed Central; e do banco de dados COGs da US National Library of Medicine.)

suas contribuições individuais à atividade do produto gênico, criando mutações em laboratório de sítios específicos dentro do gene, ou construindo artificialmente genes híbridos que combinam parte de um gene com parte de um outro. Os organismos podem ser manipulados para sintetizar tanto o RNA quanto a proteína especificada pelo gene em grandes quantidades, para facilitar as análises bioquímicas. Os especialistas em estrutura molecular podem determinar a conformação tridimensional do produto gênico, revelando a posição exata de todos os átomos na molécula. Os biólogos podem determinar como cada uma das partes das moléculas especificadas geneticamente contribui para seu comportamento químico. Os biologistas celulares podem analisar o comportamento das células que são manipuladas para expressar uma versão mutante do gene.

Entretanto, não há uma receita simples para se descobrir a função de um gene, nem mesmo algum critério universal simples para descrevê-la. Podemos descobrir, por exemplo, que o produto de um determinado gene catalisa certa reação química, e mesmo assim não termos ideia de como ou por que tal reação é importante para o organismo. A caracterização funcional de cada nova família de produtos gênicos, diferentemente da descrição das sequências gênicas, apresenta um novo desafio para a ingenuidade dos biólogos. Além disso, a função de um gene nunca é totalmente entendida até aprendermos seu papel na vida do organismo como um todo. Para estabelecer definitivamente o sentido das funções gênicas, portanto, temos que estudar todo o organismo, não somente moléculas ou células.

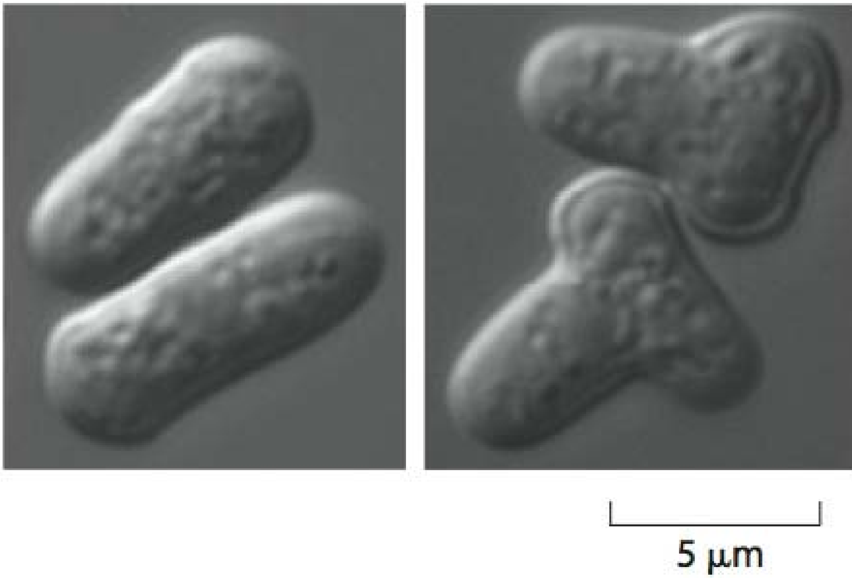


Figura 1-28 Um fenótipo mutante refletindo a função de um gene. Uma levedura normal (da espécie *Schizosaccharomices pombe*) é comparada a um mutante onde a mudança em um único gene converteu a célula em forma de charuto (*esquerda*) para a forma em T (*direita*). O gene mutante, portanto, tem a função de controlar a forma da célula. Porém, como, em termos moleculares, o produto desse gene pode desempenhar essa função? Essa é uma pergunta difícil, e necessita de análises bioquímicas para ser respondida. (Cortesia de Kenneth Sawin e Paul Nurse.)

Os biólogos moleculares têm se concentrado em *E. Coli*

Como os organismos vivos são muito complexos, quanto mais aprendemos sobre uma espécie em particular, mais atrativa ela se torna como objeto para estudos adicionais. Cada descoberta levanta novas questões e fornece novas ferramentas com as quais se captura

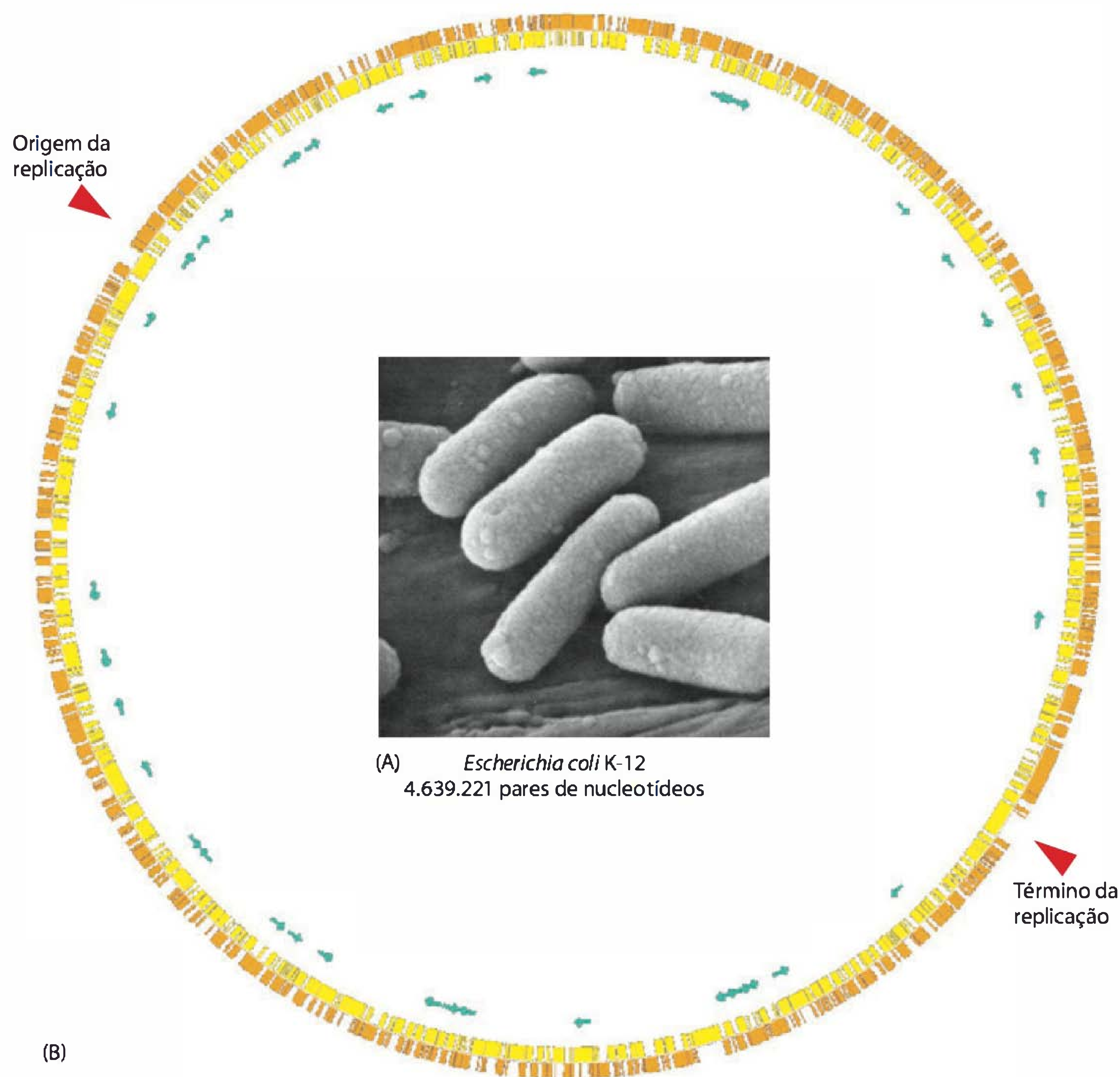


Figura 1-29 O genoma de *E. coli*. (A) Um grupo de células de *E. coli*. (B) Um diagrama do genoma de *E. coli* K-12. O diagrama é circular porque o DNA de *E. coli*, como o de outros procariotos, forma um único círculo fechado. Os genes codificadores de proteínas são mostrados em *amarelo* ou *laranja*, dependendo da fita de DNA a partir da qual são transcritos; os genes que codificam somente moléculas de RNA são indicados com *setas verdes*. Alguns genes são transcritos a partir de uma das fitas de DNA de dupla-hélice (na direção horária deste diagrama), outros a partir da outra fita (no sentido anti-horário). (A, cortesia de Dr. Toni Brain e David Parker/Photo Researchers; B, adaptada de F. R. Blattner et al., *Science* 277:1453-1462, 1997. Com permissão de AAAS.)

questões gerais no contexto do organismo escolhido. Por essa razão, muitas comunidades de biólogos têm se dedicado a estudar diferentes aspectos do mesmo **organismo-modelo**.

No variado mundo das bactérias, o holofote da biologia molecular tem, por um longo tempo, focado intensivamente apenas uma espécie: *Escherichia coli*, ou *E. coli* (ver Figuras 1-17 e 1-18). Esta pequena célula bacteriana em forma de bastão normalmente vive no intestino de humanos e de outros vertebrados, mas pode crescer facilmente em um meio simples com nutrientes, em um frasco de cultura. Ela se adapta a condições químicas variáveis e reproduz-se rapidamente, evoluindo de maneira extraordinariamente rápida por meio de mutação e seleção. Como em outras bactérias, diferentes linhagens de *E. coli*, embora classificadas como membros de uma mesma espécie, diferem muito mais geneticamente entre si do que diferentes organismos que se reproduzem sexualmente, como plantas ou animais. Uma determinada cepa de *E. coli* pode possuir milhares de genes ausentes em outra linhagem, e duas dessas cepas podem ter no mínimo 50% de genes em comum. A cepa K-12 de *E. coli* normalmente é utilizada em laboratório, possuindo um genoma de aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases, contendo cerca de 4.300 tipos diferentes de proteínas (**Figura 1-29**).

Em termos moleculares, sabemos muito mais sobre *E. coli* do que sobre qualquer outro organismo vivo. Muito do nosso entendimento a respeito dos mecanismos fundamentais da vida – por exemplo, como as células replicam o seu DNA para passar as informações genéticas para sua progênie, ou como codificam as informações representadas no DNA para dirigir a síntese de proteínas específicas – é resultado de estudos com *E. coli*. Os mecanismos genéticos básicos parecem ter sido conservados ao longo da evolução: esses mecanismos são, portanto, essencialmente os mesmos em nossas próprias células, assim como em *E. coli*.

Resumo

Os procariotos (células sem um núcleo distinto) são, bioquimicamente, os organismos mais diversos, incluindo espécies que podem obter toda sua energia e seus nutrientes de fontes químicas inorgânicas, como misturas reativas de minerais liberados em fendas hidrotermais no fundo do mar – a dieta que pode ter nutrido a primeira célula viva há 3,5 bilhões de anos. As comparações de sequências de DNA revelam o relacionamento familiar de organismos vivos e mostram que os procariotos se dividem em dois grupos, que divergiram recentemente no curso da evolução: as bactérias (eubactérias) e as arquebactérias. Junto com os eucariotos (células com um núcleo envolvido por membrana), constituem os três primeiros ramos da árvore da vida. Em sua maioria, as bactérias e arquebactérias são pequenos organismos unicelulares com genomas compactos, compreendendo de 1.000 a 6.000 genes. Vários dos genes dentro de um único organismo mostram fortes semelhanças familiares em suas sequências de DNA, sugerindo que tenham se originado do mesmo gene ancestral por duplicação e divergência gênica. As semelhanças familiares (homologias) são também claras quando sequências gênicas são comparadas entre diferentes espécies, e mais de 200 famílias de genes altamente conservadas podem ser identificadas como sendo comuns a todas as espécies dos três domínios do mundo vivo. Portanto, dada uma sequência de DNA de um gene descoberto recentemente, com frequência é possível deduzir a sua função a partir da função de um gene homólogo em um organismo-modelo intensivamente estudado, como a bactéria E. coli.

INFORMAÇÃO GENÉTICA EM EUCARIOTOS

As células eucarióticas, em geral, são maiores e mais elaboradas que as células procarióticas, e seus genomas também são maiores e mais elaborados. O tamanho maior é acompanhado por diferenças radicais nas estruturas e nas funções celulares. Além disso, muitas classes de células eucarióticas formam organismos multicelulares que atingem um nível de complexidade não alcançado pelos procariotos.

Em função de sua complexidade, os eucariotos confrontam os biólogos moleculares com desafios especiais, nos quais nos concentraremos pelo restante deste livro. Cada vez mais, os biólogos se deparam com esses desafios por meio da análise e da manipulação da informação genética de células e organismos. Portanto, é importante conhecer, desde o início, um pouco das características especiais do genoma eucarioto. Começamos discutindo brevemente como as células eucarióticas estão organizadas, como isso reflete na maneira em que vivem e como seus genomas diferem dos genomas de procariotos. Isso nos leva a um esquema da estratégia pela qual os biólogos moleculares, explorando a informação genética, estão tentando descobrir como os organismos eucariotos trabalham.

As células eucarióticas podem ter surgido como predadoras

Por definição, as células eucarióticas mantêm seus DNAs em um compartimento interno separado, chamado de núcleo. O *envelope nuclear*, uma membrana de camada dupla, circunda o núcleo e separa o DNA do citoplasma. Os eucariotos também possuem outros traços que os diferenciam dos procariotos (**Figura 1-30**). Suas células são, tipicamente, 10 vezes maiores na dimensão linear e mil vezes maiores em volume. Eles têm um *citoesqueleto* – um sistema de proteínas filamentosas entrelaçadas que cruzam o citoplasma e formam, junto com as muitas outras proteínas que se prendem a elas, um sistema de vigas, fios e motores que dão à célula força mecânica e controle da forma, além de guiar seus movimentos. O envelope nuclear é apenas uma parte de um conjunto de *membranas internas*. Cada uma delas é estruturalmente similar à membrana plasmática, confinando diferentes tipos de espaços dentro da célula, muitos deles envolvidos em processos relacionados à digestão e à secreção. Sem a parede celular rígida de muitas bactérias, as células animais e as células eucarióticas que vivem livremente, chamadas de *protozoários*, podem alterar sua forma rapidamente e englobar outras células e pequenos objetos por *fagocitose* (**Figura 1-31**).

Ainda é um mistério como todas essas propriedades evoluíram e em qual sequência. Uma visão plausível, entretanto, é de que todas elas são reflexos do modo de vida de uma célula eucariótica primordial que foi um predador, vivendo da captura de outras células e as comendo (**Figura 1-32**). Tal estilo de vida requer uma célula grande e uma membrana plasmática flexível, assim como um elaborado citoesqueleto para suportar e movimentar essa membrana. Pode também existir a necessidade de as células isolarem longas e frágeis

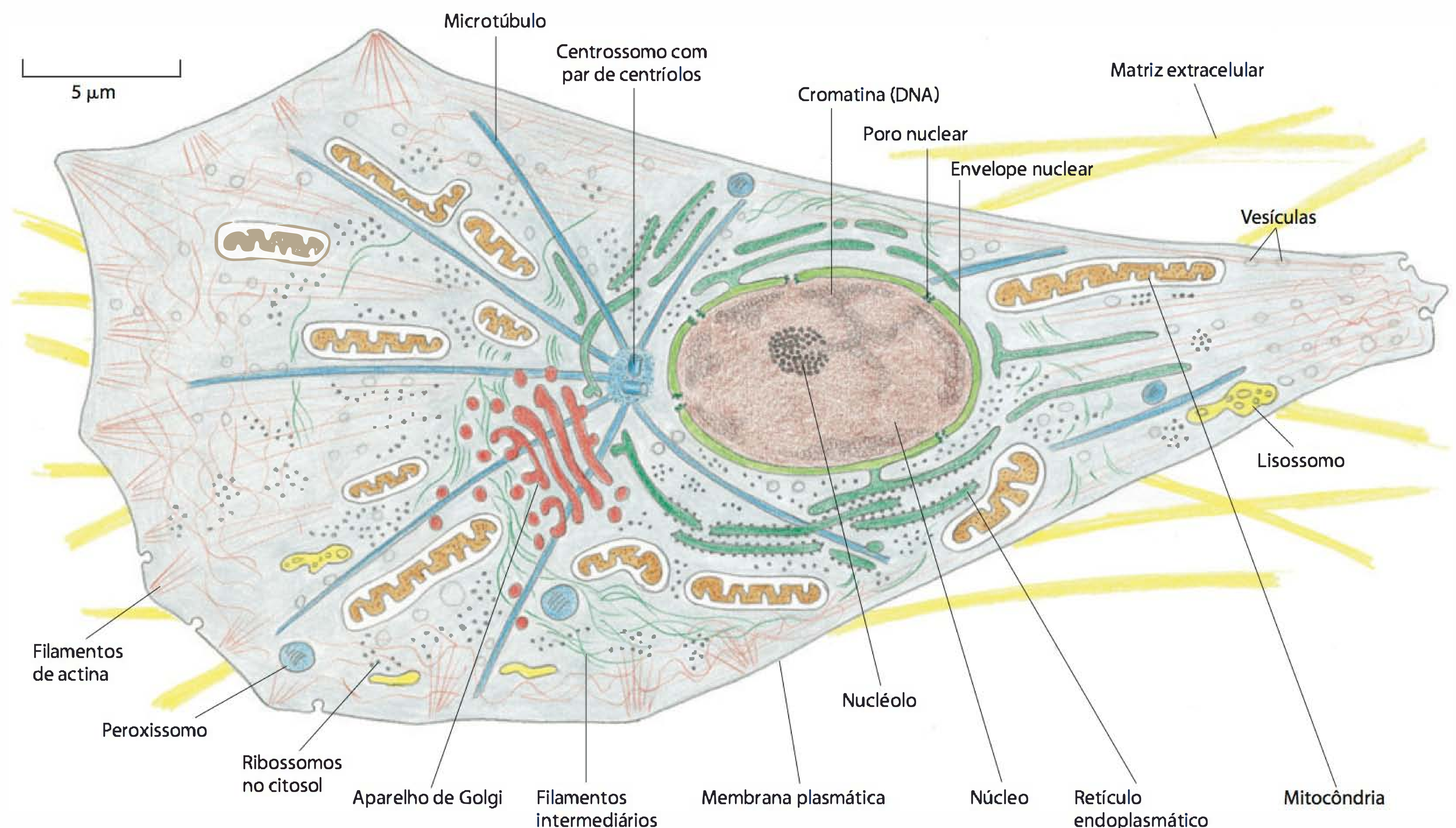


Figura 1-30 As principais características das células eucarióticas. O desenho representa uma célula animal típica, mas quase todos os componentes são encontrados em plantas, fungos e eucariotos unicelulares, como leveduras e protozoários. As células vegetais contêm cloroplastos, além dos componentes mostrados aqui, e sua membrana plasmática é circundada por uma parede externa rígida formada de celulose.

moléculas de DNA em um compartimento nuclear separado para proteger o genoma de danos promovidos pelos movimentos do citoesqueleto.

As células eucarióticas contemporâneas evoluíram de uma simbiose

Um meio de vida predatório ajuda a explicar outras características das células eucarióticas. Quase todas essas células possuem *mitocôndrias* (**Figura 1-33**). Estes pequenos corpos no citoplasma, envoltos por uma camada dupla de membrana, captam oxigênio e utilizam a energia da oxidação das moléculas do alimento – como açúcares – para produzir a maior parte do ATP que fornece energia para as atividades da célula. As mitocôndrias são similares em tamanho a pequenas bactérias e, como bactérias, têm seu próprio genoma (na forma de uma molécula de DNA circular), seus próprios ribossomos (que são diferentes daqueles de qualquer outra parte na célula eucariótica) e seus próprios tRNAs. Hoje em dia é aceito que as mitocôndrias originaram-se de bactérias de vida livre (*aeróbias*) que metabolizam oxigênio, engolfadas por uma célula eucariótica ancestral incapaz de fazer uso de oxigênio (isto é, *anaeróbia*). Escapando da digestão, essas bactérias evoluíram em simbiose com a célula maior e sua progênie, recebendo abrigo e alimento em troca da geração de energia que proporcionaram aos seus hospedeiros (**Figura 1-34**). Essa parceria entre uma célula

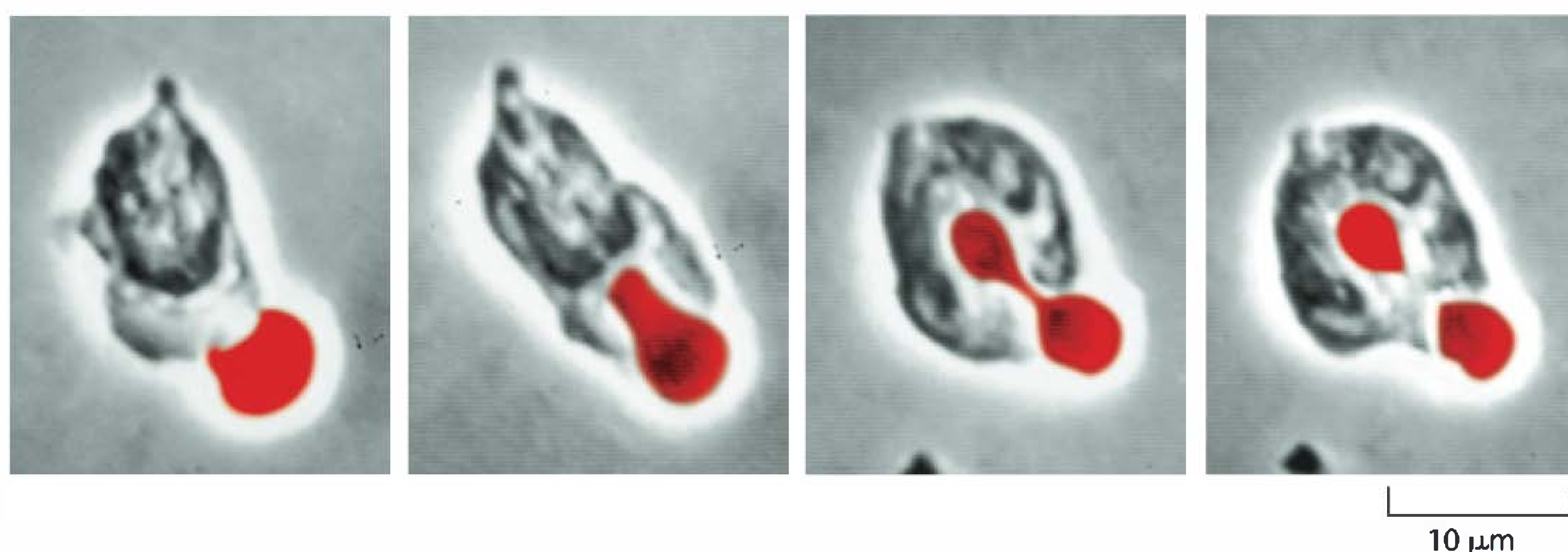


Figura 1-31 Fagocitose. Esta série de fotografias de um filme mostra uma célula branca de sangue humano (um neutrófilo) englobando uma célula vermelha (corada artificialmente de *vermelho*) que foi tratada com anticorpo. (Cortesia de Stephen E. Malawista e Anne de Boisfleury Chevance.)

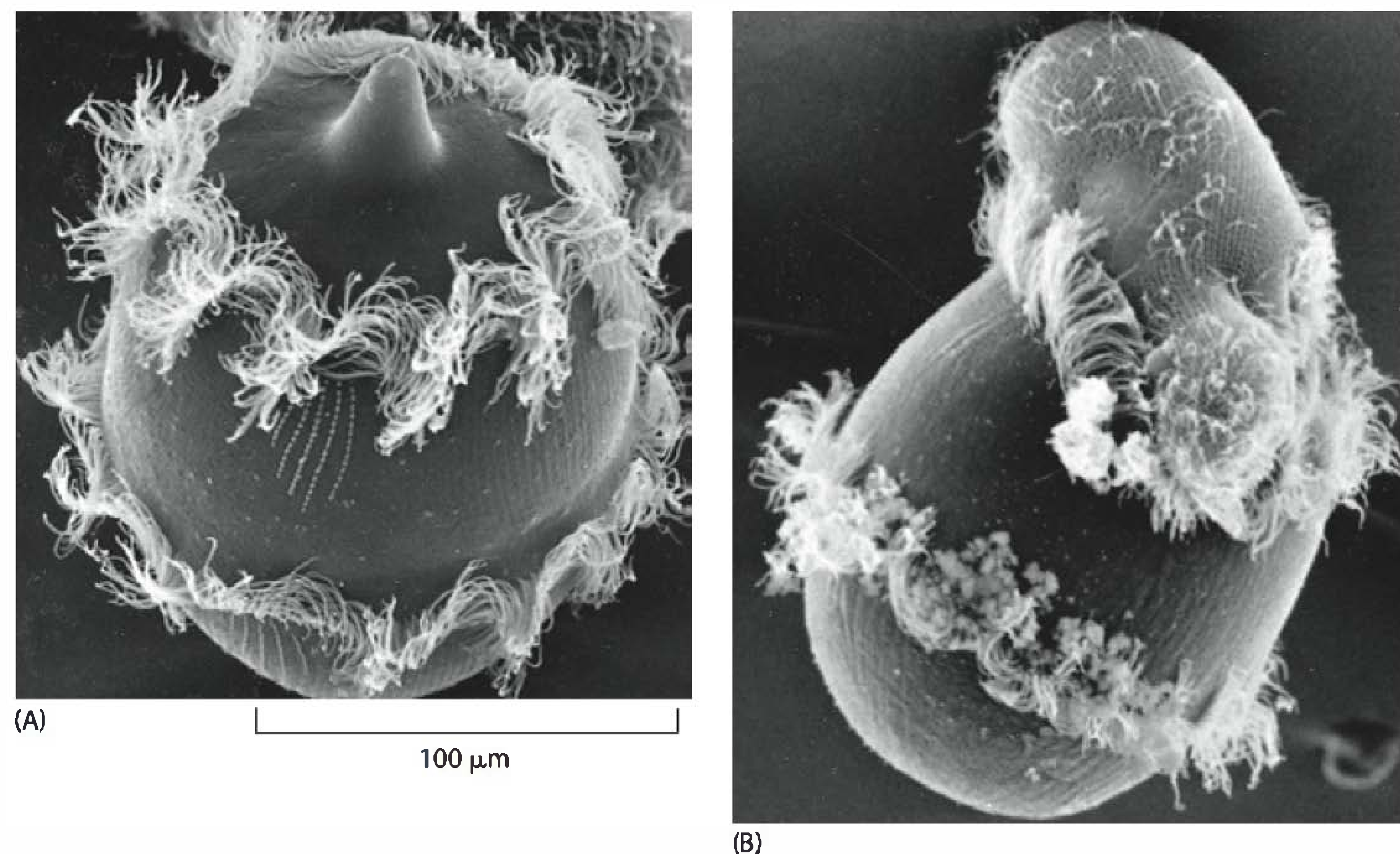
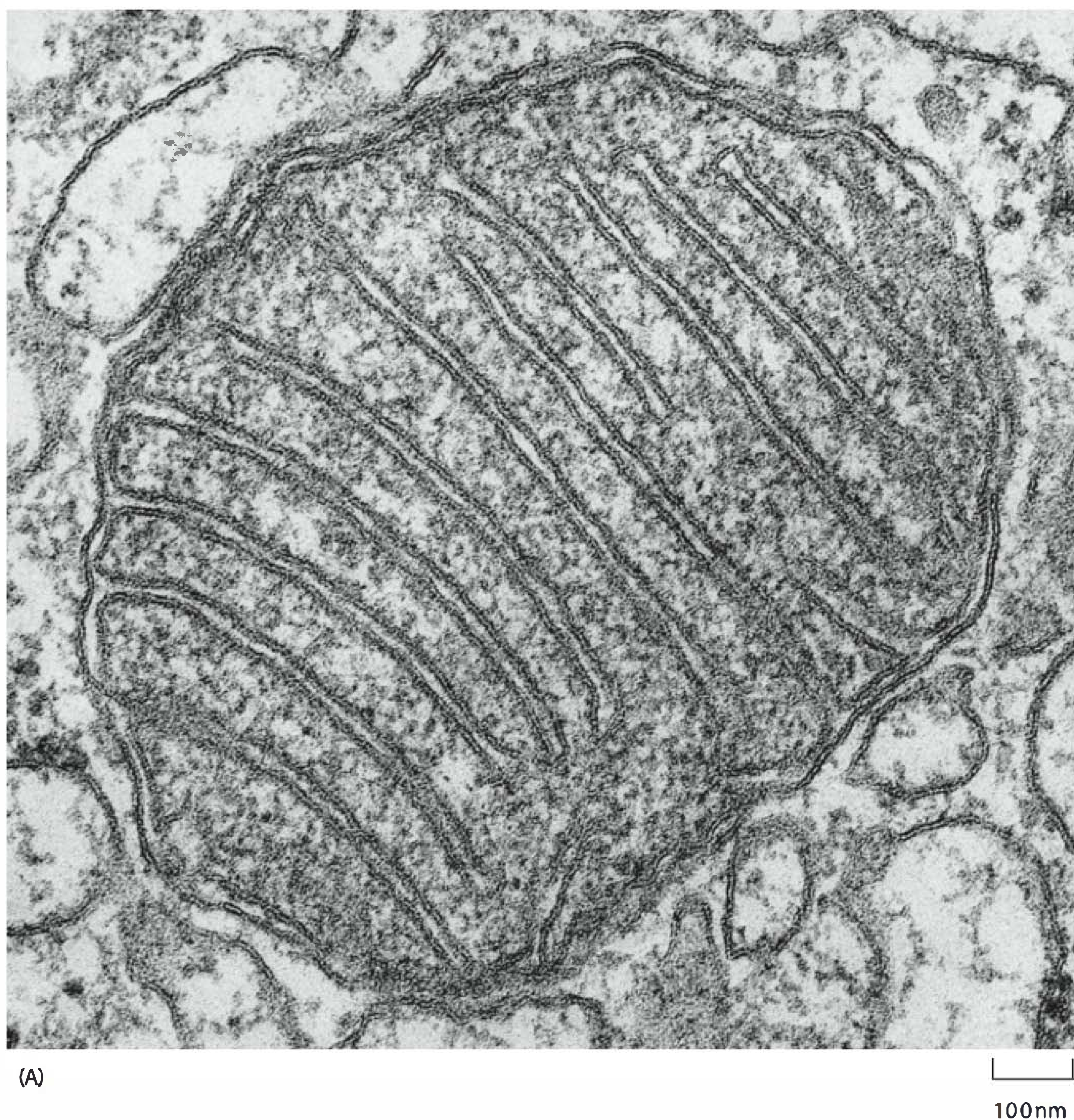
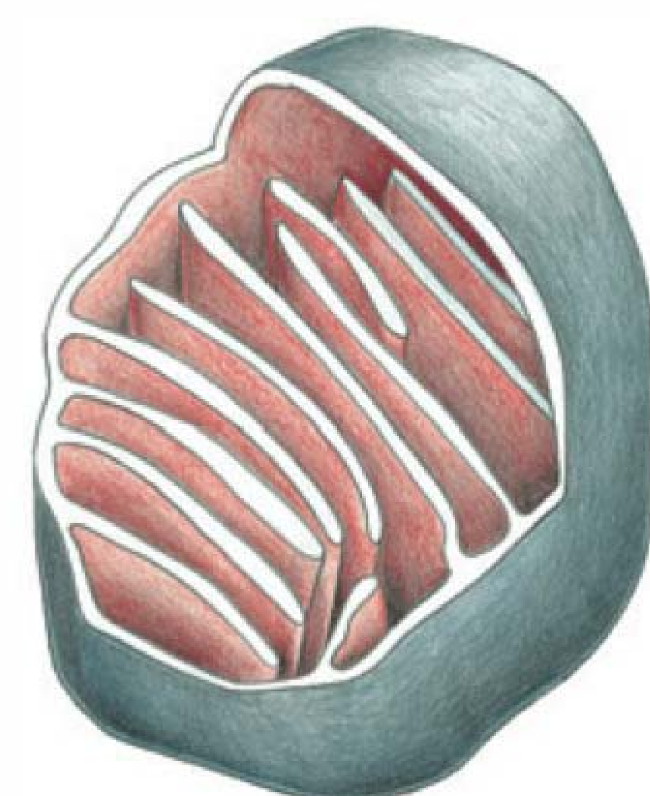


Figura 1-32 Um eucarioto unicelular que se alimenta de outras células. (A) *Didinium* é um protozoário carnívoro, pertencente ao grupo conhecido como *ciliados*. Tem corpo globular, com aproximadamente 150 μm de diâmetro, circundado por duas franjas de cílios sinuosos, apêndices do tipo chicote que batem continuamente; sua extremidade frontal é achatada de maneira a existir uma única protuberância, como uma tromba. (B) O *Didinium* normalmente nada na água em alta velocidade, pelo batimento sincronizado de seus cílios. Quando encontra presas apropriadas, em geral um outro tipo de protozoário, ele libera numerosos e pequenos dardos paralisantes a partir da região de sua tromba. Então, o *Didinium* ataca e devora a outra célula por fagocitose, invertendo-se como uma esfera oca e englobando sua vítima, a qual é quase tão grande quanto ele mesmo. (Cortesia de D. Barlow.)

predadora eucariótica anaeróbia primitiva e uma célula bacteriana aeróbia foi estabelecida há aproximadamente 1,5 bilhão de anos, quando a atmosfera terrestre começou a se tornar rica em oxigênio.





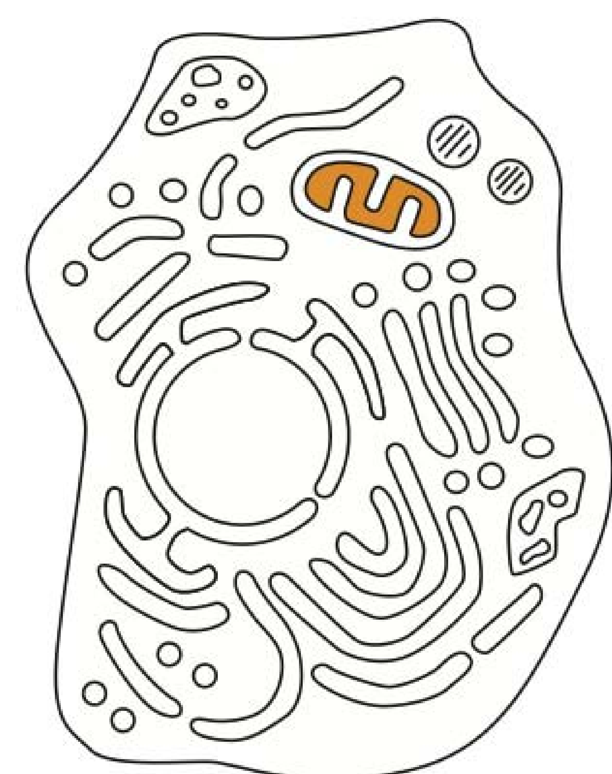


Figura 1-33 Uma mitocôndria. (A) Uma secção transversal vista por microscopia eletrônica. (B) Um desenho de uma mitocôndria com um corte ao longo de parte de sua extensão para mostrar a estrutura tridimensional. (C) Um esquema da célula eucariótica, com o espaço interior de uma mitocôndria, contendo o DNA mitocondrial e os ribossomos, colorido. Note a membrana externa lisa e a membrana interna com circunvoluções, a qual abriga as proteínas que geram ATP a partir da oxidação de moléculas do alimento. (A, cortesia de Daniel S. Friend.)

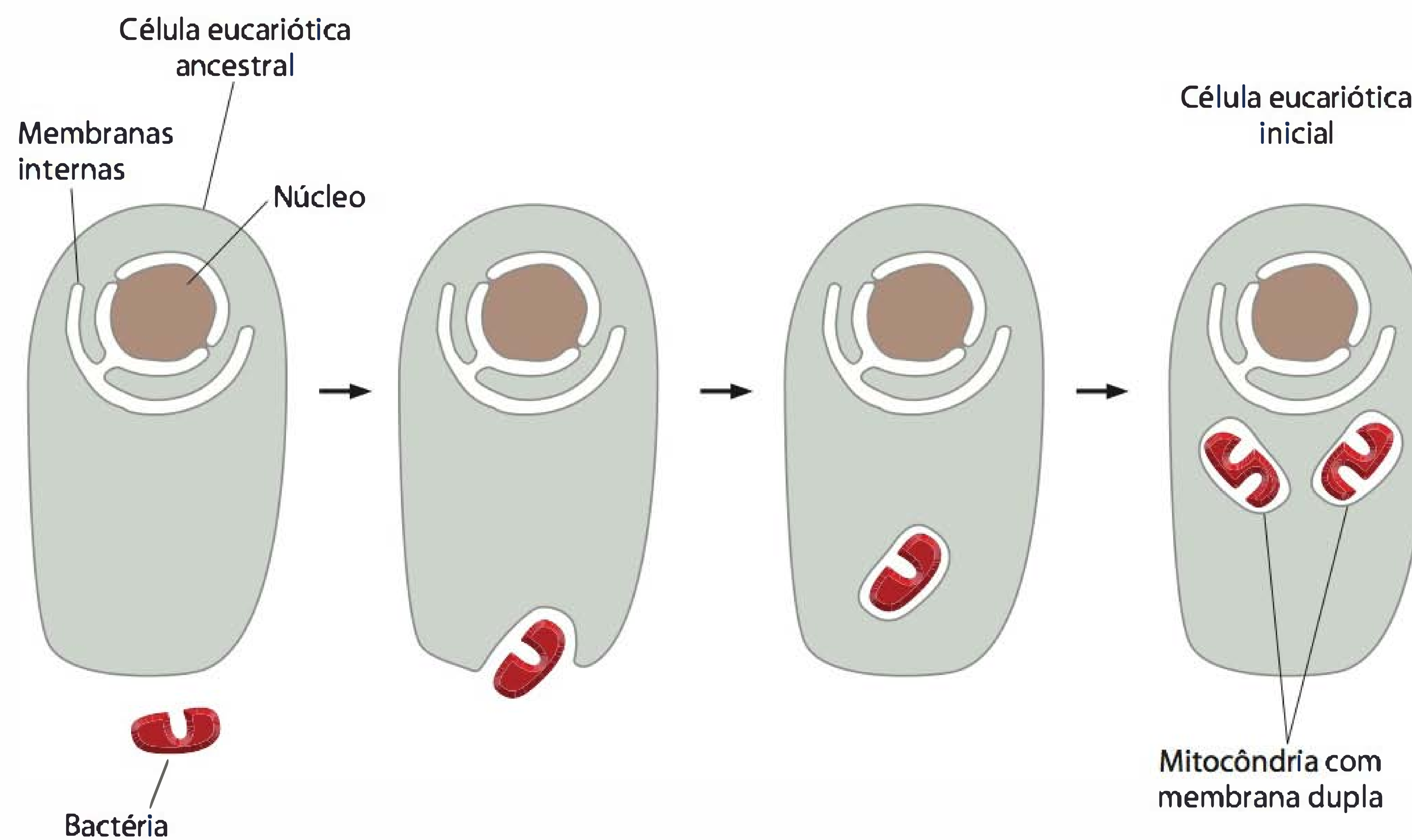


Figura 1-34 A origem da mitocôndria. Assume-se que uma célula eucariótica ancestral tenha englobado a bactéria ancestral da mitocôndria, iniciando uma relação simbiótica.

Muitas células eucarióticas – especialmente aquelas de plantas e de algas – também contêm uma outra classe de pequenas organelas envolvidas por membrana, de modo semelhante às mitocôndrias – os *cloroplastos* (**Figura 1-35**). Os cloroplastos realizam a fotossíntese usando a energia da luz solar para sintetizar carboidratos a partir de dióxido de carbono atmosférico e água, e liberam os produtos para a célula hospedeira na forma de alimento. Como as mitocôndrias, os cloroplastos têm seu próprio genoma quase que certamente originado de bactérias fotossintetizantes simbiontes, adquirido por células que já possuíam as mitocôndrias (**Figura 1-36**).

Uma célula eucariótica equipada com cloroplastos não tem necessidade de buscar outras células como presa; ela é nutrida pelos cloroplastos que herdou de seus ancestrais. Correspondentemente, as células vegetais, embora possuam o citoesqueleto para movimento, perderam a capacidade de alterar sua forma rapidamente e de englobar outras células por fagocitose. Ao contrário, elas criam ao seu redor uma dura parede celular protetora. Se o eucarioto ancestral foi na verdade um predador de outros organismos, podemos ver as células vegetais como eucariotos que fizeram a transição da caça para a lavoura.

Os fungos representam ainda outro modo de vida eucariótica. As células fúngicas, assim como as células animais, possuem mitocôndrias, mas não cloroplastos; ao contrário das células animais e dos protozoários, as células fúngicas possuem uma parede externa rígida que limita sua capacidade de se mover rapidamente ou de absorver outras células. Aparen-

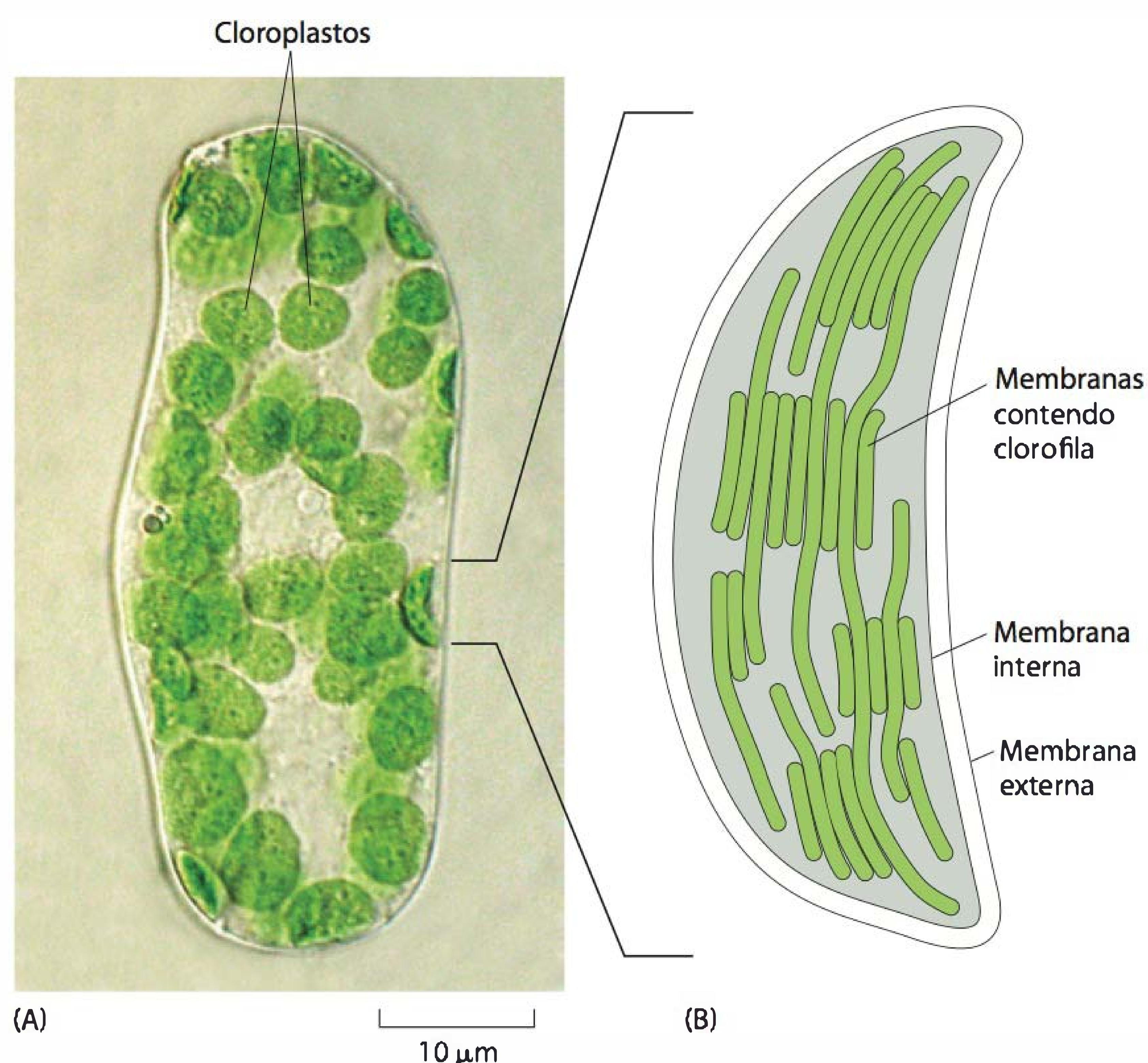


Figura 1-35 Cloroplastos. Estas organelas capturam a energia da luz solar em células vegetais e em alguns eucariotos unicelulares. (A) Uma única célula isolada da folha de uma planta com flor, vista em microscopia de luz, mostrando os cloroplastos verdes. (B) O desenho de um dos cloroplastos mostrando o sistema altamente pregueado de membranas internas contendo as moléculas de clorofila pelas quais a luz é absorvida. (A, cortesia de Preeti Dahiya.)

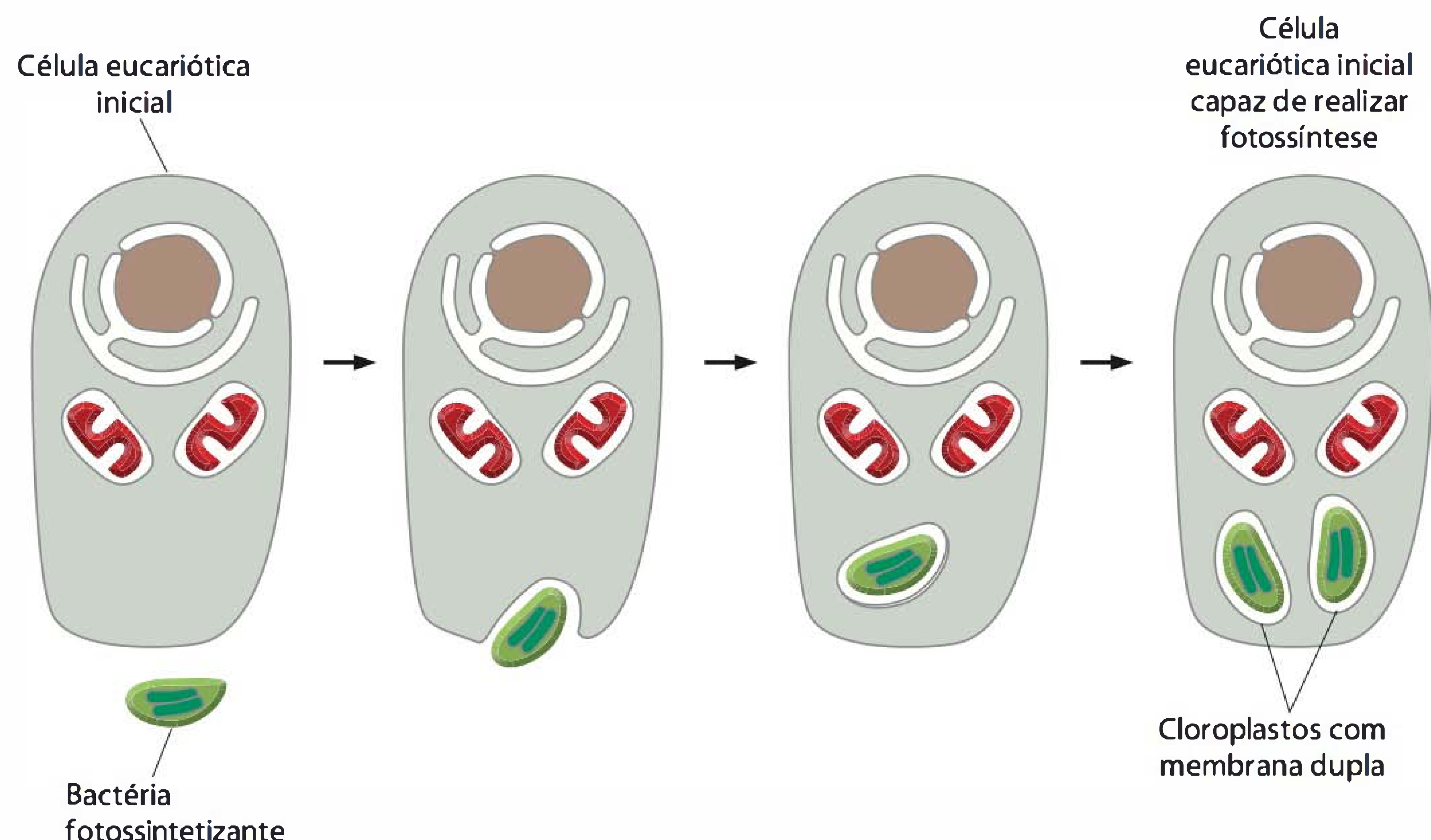


Figura 1-36 A origem dos cloroplastos. Uma célula eucariótica inicial, que já possuía uma mitocôndria, engloba uma bactéria fotossintetizante (uma cianobactéria) e a retém em simbiose. Acredita-se que todos os cloroplastos de hoje sejam ancestrais de uma única espécie de cianobactéria que foi adotada como simbionte interno (um endossimbionte) há bilhões de anos.

temente, os fungos transformaram-se de caçadores em organismos que se alimentam de restos: outras células secretam moléculas nutrientes ou as liberam quando morrem, e os fungos se alimentam desses restos – realizando qualquer que seja a digestão necessária de forma extracelular, pela secreção de enzimas digestivas para o exterior.

Os eucariotos possuem genomas híbridos

A informação genética das células eucarióticas possui uma origem híbrida – do eucarioto anaeróbio ancestral e das bactérias que ele adotou como simbiontes. A maior parte dessa informação é guardada no núcleo, mas uma pequena quantidade permanece dentro da mitocôndria e, em células de plantas e algas, dentro dos cloroplastos. O DNA mitocondrial e o DNA do cloroplasto podem ser separados do DNA nuclear e analisados e sequenciados individualmente. Os genomas de cloroplastos e de mitocôndrias são degenerados, versões reduzidas do genoma bacteriano, faltando genes para muitas funções essenciais. Em uma célula humana, por exemplo, o genoma mitocondrial consiste em somente 16.569 pares de nucleotídeos, codificando somente 13 proteínas, dois componentes do RNA ribossômico e 22 tRNAs.

Os genes que estão ausentes nas mitocôndrias e nos cloroplastos não foram totalmente perdidos; ao contrário, muitos foram movidos, de alguma forma, do genoma simbionte para o DNA do núcleo da célula hospedeira. O DNA nuclear dos humanos contém muitos genes que codificam proteínas com funções especiais dentro da mitocôndria; nas plantas, o DNA nuclear também contém muitos genes especificando proteínas necessárias nos cloroplastos.

Os genomas eucarióticos são grandes

A seleção natural, evidentemente, favoreceu as mitocôndrias com genomas pequenos, assim como as bactérias com genomas pequenos. Em contraste, o genoma nuclear de muitos eucariotos teve a possibilidade de aumentar. Talvez o modo de vida eucariótico tenha feito do grande tamanho uma vantagem: os predadores precisam ser tipicamente maiores que suas presas, e o tamanho celular normalmente aumenta em proporção ao tamanho do genoma. Talvez o aumento do genoma tenha ocorrido pelo acúmulo de elementos transponíveis parasitas (discutido no Capítulo 5) – segmentos "egoístas" do DNA podem inserir cópias de si mesmos em múltiplos lugares no genoma. Seja qual for a explicação, o fato é que os genomas da maioria dos eucariotos são ordens de magnitude maiores que os de bactérias e de arquebactérias (**Figura 1-37**). Esse tamanho aumentado em relação ao DNA tem tido profundas implicações.

Os eucariotos não só possuem mais genes que os procariotos, como também têm mais DNA que não codifica para proteína ou para nenhuma outra molécula com produto funcional. O genoma humano contém mil vezes mais pares de nucleotídeos que o genoma de uma bactéria típica, 20 vezes mais genes e aproximadamente 10 mil vezes mais DNA não-codifi-

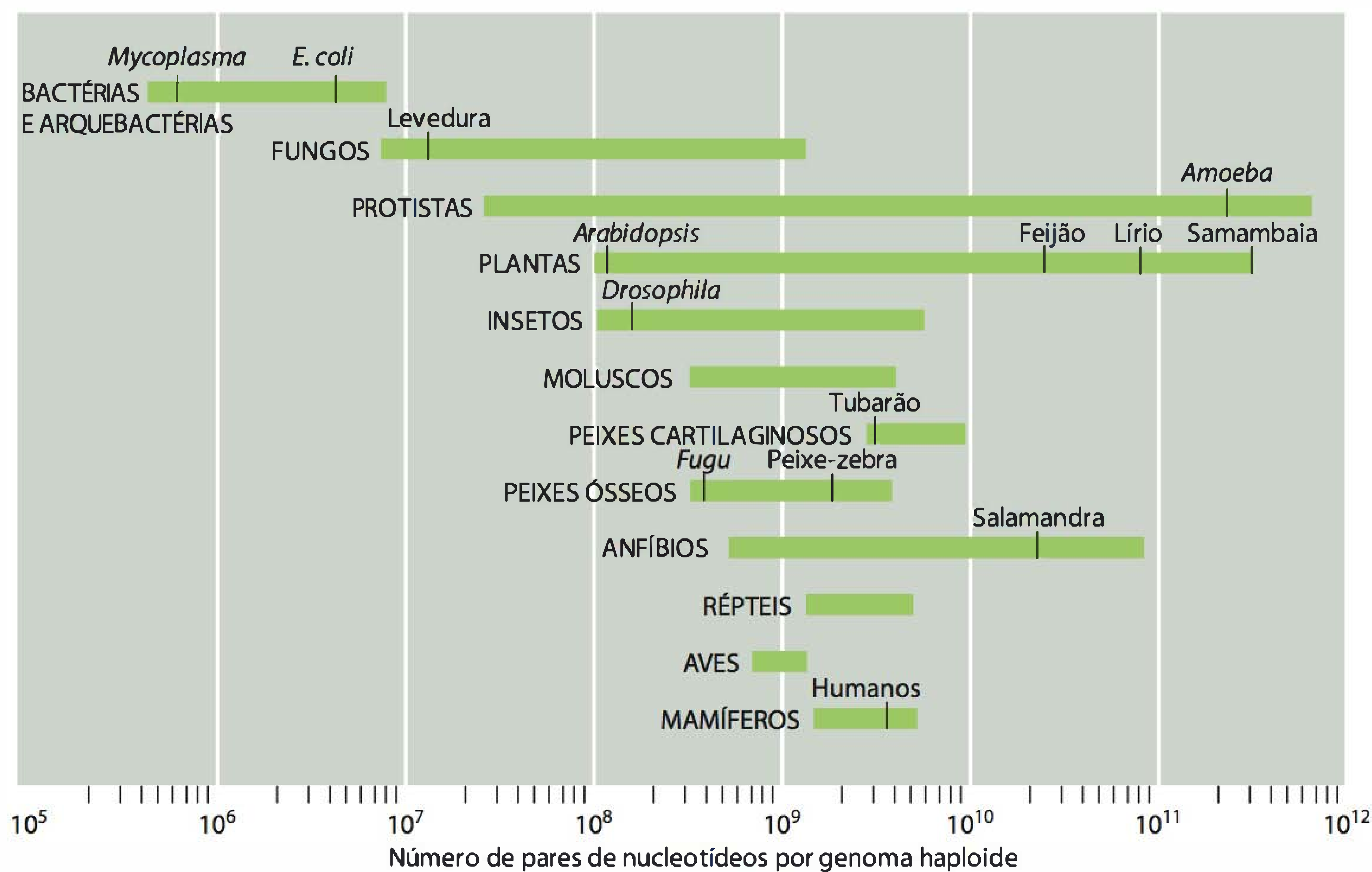


Figura 1-37 Comparação dos tamanhos de genomas. O tamanho genômico é medido em pares de nucleotídeos de DNA por genoma haploide, isto é, por simples cópia do genoma. (As células de organismos que se reproduzem sexuadamente, como nós mesmos, geralmente são diploides: elas contêm duas cópias do genoma, uma herdada da mãe e outra do pai.) Os organismos proximamente relacionados podem variar na quantidade de DNA em seus genomas, embora contenham números similares de genes funcionalmente distintos. (Dados de W. H. Li, Molecular Evolution, p. 380-383. Suderland, MA: Sinauer, 1997.)

cante (~98,5% do genoma humano é não-codificante em contraste com os 11% do genoma da bactéria *E. coli*).

Os genomas eucarióticos são ricos em DNA regulador

Muito do nosso DNA não-codificante certamente é "lixo" dispensável, retido como uma massa de papel velho, visto que quando há pouca pressão para manter um arquivo pequeno, é mais fácil guardar tudo do que selecionar a informação importante e descartar o resto. Certas espécies excepcionais de eucariotos, como o baiacu (**Figura 1-38**), são testemunhas da extravagância de seus parentes; eles conseguiram de alguma forma livrar-se de uma grande quantidade de DNA não-codificante. Ainda assim, parecem similares em estrutura, comportamento e adaptação com espécies relacionadas que apresentam maiores quantidades desse tipo de DNA. Até mesmo em genomas eucariotos compactos, como o do baiacu, há mais DNA não-codificante do que codificante, e pelo menos alguns DNAs não-codificantes certamente possuem funções importantes. Em particular, tal DNA serve para regular a expressão de genes adjacentes. Com esse DNA regulador, os eucariotos desenvolveram diferentes caminhos para controlar quando e onde um gene é ativado. Essa sofisticada regulação gênica é crucial para a formação de organismos multicelulares complexos.

O genoma define o programa de desenvolvimento multicelular

As células em animais e em plantas são extremamente variadas. As células gordurosas, as células epidérmicas, as células ósseas e as células nervosas parecem tão diferentes quanto possível. Todos esses tipos celulares são descendentes de uma única célula-ovo fertilizada, e todos (com poucas exceções) contêm cópias idênticas do genoma da espécie.

As diferenças resultam da maneira pela qual essas células fazem uso seletivo de suas instruções genéticas, de acordo com as pistas que conseguem de seu ambiente durante o desenvolvimento do embrião. O DNA não é somente uma lista de compras especificando as moléculas que todas as células devem ter, e a célula não é somente uma reunião de todos os itens da lista. Ao invés disso, a célula se comporta como uma máquina de múltiplos propósitos, com sensores que recebem sinais ambientais e habilidades altamente desenvolvidas para colocar em ação os diferentes grupos de genes, de acordo com a sequência de sinais à qual a célula foi exposta. O genoma em cada célula é grande o suficiente para acomodar a informação que especifica um organismo multicelular inteiro, mas em cada célula individual apenas parte dessa informação é usada.

Uma grande fração dos genes no genoma eucariótico codifica proteínas que servem para regular a atividade de outros genes. Muitas dessas *proteínas reguladoras de genes* atuam ligando-se, direta ou indiretamente, ao DNA regulador adjacente aos genes que devem ser controlados (**Figura 1-39**), ou por interferirem com a capacidade de outras proteínas de as-



Figura 1-38 O peixe baiacu (*Fugu rubripes*). Esse organismo tem um genoma com tamanho de 400 milhões de pares de nucleotídeos – aproximadamente um quarto a mais que um peixe-zebra, por exemplo, embora as duas espécies de peixes possuam um número similar de genes. (De uma xilogravura por Hiroshige, cortesia de Arts and Designs do Japão.)

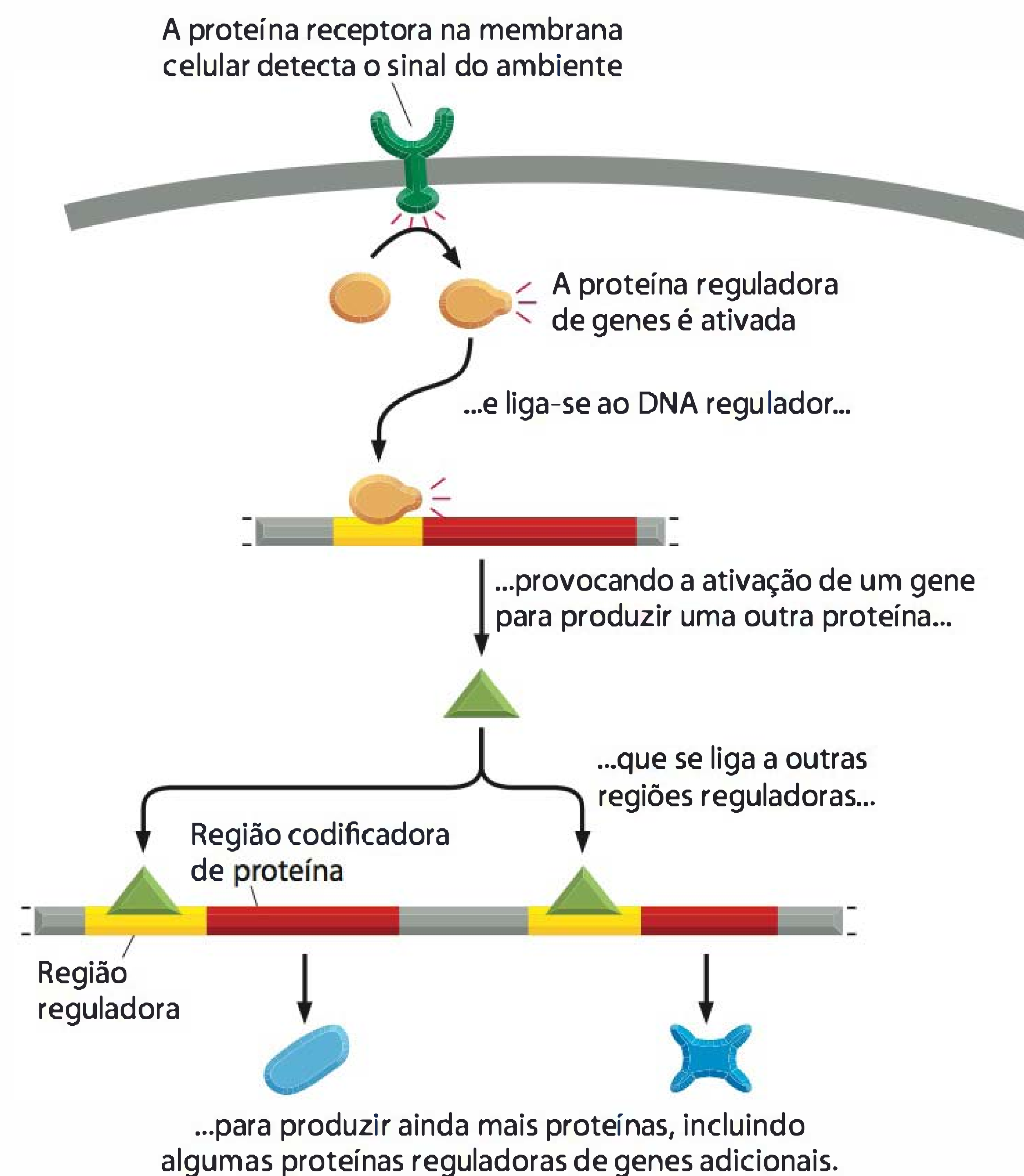


Figura 1-39 Controle de ativação do gene por sinais do ambiente. O DNA regulador permite que a expressão gênica seja controlada por proteínas reguladoras, as quais, por sua vez, são os produtos de outros genes. Este diagrama mostra como a expressão de um gene na célula é ajustada de acordo com um sinal do ambiente celular. O efeito inicial do sinal é a ativação de uma proteína reguladora já presente na célula; o sinal pode, por exemplo, iniciar a ligação de um grupo fosfato à proteína reguladora, alterando suas propriedades químicas.

sim o fazer. O genoma expandido dos eucariotos, portanto, serve não somente para especificar o "*hardware*" da célula, mas também para armazenar o "*software*" que controla como esse "*hardware*" é usado (**Figura 1-40**).

As células não apenas recebem os sinais passivamente; pelo contrário, elas trocam ativamente sinais com a sua vizinhança. Assim, em um organismo multicelular desenvolvido, cada célula é governada pelo mesmo sistema de controle, mas com diferentes consequências dependendo dos sinais que as células trocam. O resultado é, espantosamente, um arranjo preciso de células em diferentes estados, cada qual apresentando a característica apropriada para sua posição na estrutura multicelular.

Muitos eucariotos vivem como células solitárias: os protistas

Muitas espécies de células eucarióticas levam uma vida solitária – algumas como caçadoras (os *protozoários*), algumas como fotossintetizantes (as *algas* unicelulares) e algumas como organismos que se alimentam de restos de alimentos (os fungos unicelulares, ou *leveduras*). A **Figura 1-41** dá uma ideia da variedade de formas desses eucariotos unicelulares, ou *protistas*. A anatomia dos protozoários, em especial, é elaborada e inclui estruturas como



Figura 1-40 Controle genético do programa de desenvolvimento multicelular. O papel de um gene regulador é demonstrado na erva-bezerra *Antirrhium*. Nesse exemplo, uma mutação em um único gene que codifica uma proteína reguladora leva ao desenvolvimento de folhas no lugar de flores: por causa de uma proteína reguladora que foi alterada, as células adotam características que seriam apropriadas para uma diferente localização na planta normal. O mutante está à esquerda, a planta normal está à direita. (Cortesia de Enrico Coen e Rosemary Carpenter.)

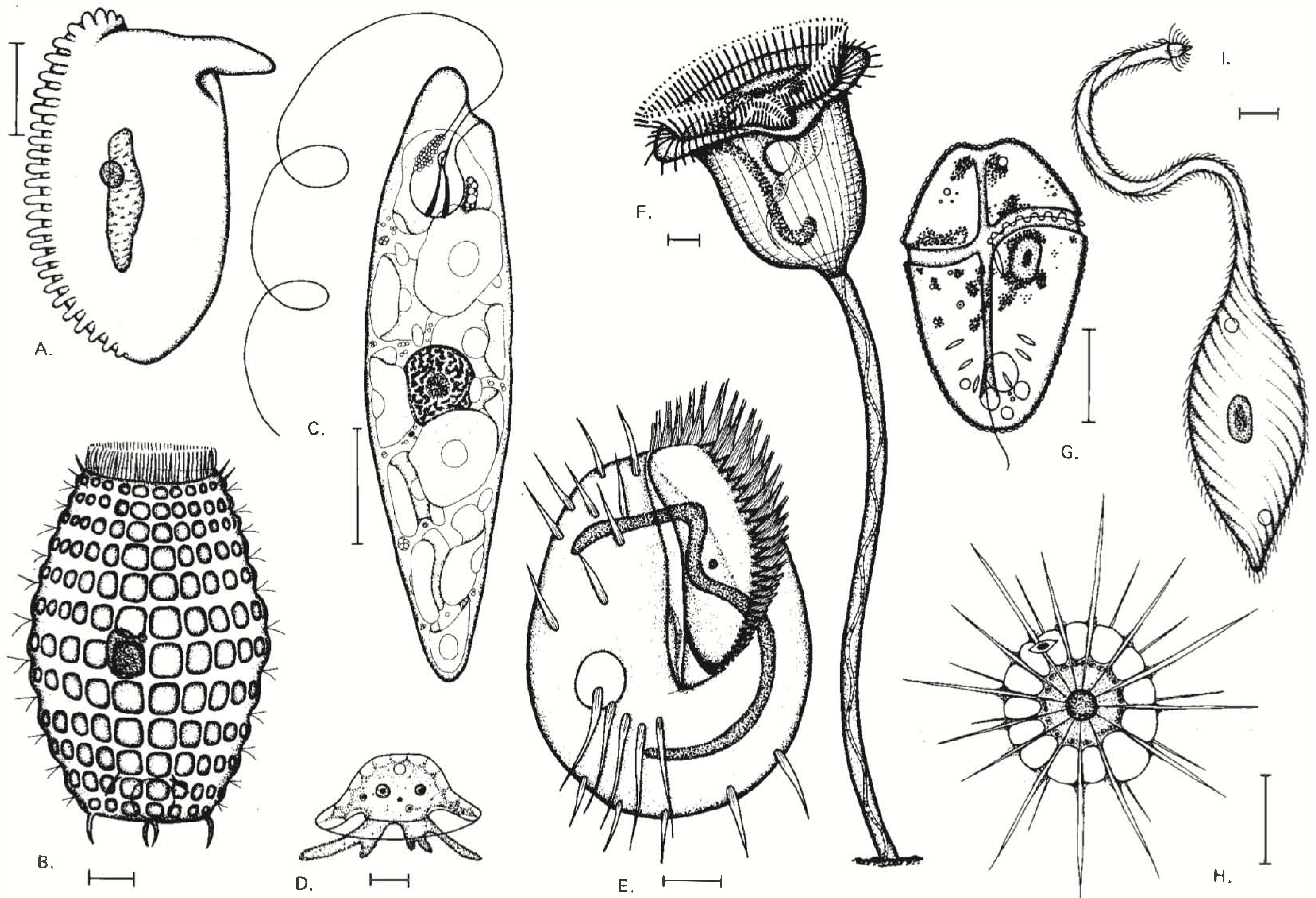


Figura 1-41 **Uma variedade de protistas: uma pequena amostra de uma classe de organismos extremamente diversa.** Os desenhos foram feitos em diferentes escalas, mas em cada caso a barra de escala representa 10 μm. Os organismos em (A), (B), (E), (F) e (I) são ciliados; (C) é um euglenoide; (D) é uma ameba; (G) é um dinoflagelado; (H) é um heliozoário. (De M. A. Sleigh, Biology of Protozoa. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1973.)

cerdas sensoriais, fotorreceptores, cílios que se movimentam sinuosamente, apêndices que se parecem com pernas, bocas, ferrão venenoso e estruturas contráteis parecidas com um músculo. Embora sejam unicelulares, os protozoários podem ser tanto elaborados quanto versáteis e complexos em seu comportamento como muitos organismos multicelulares (ver Figura 1-32).

Com relação a seus ancestrais e a suas sequências de DNA, os protistas são mais diversos que os animais multicelulares, as plantas e os fungos, os quais se originaram como três ramos comparativamente tardios da linhagem de eucariotos (ver Figura 1-21). Assim como os procariotos, os humanos tendem a desprezar os protistas, por serem estes microscópicos. Somente agora, com a ajuda de análises genômicas, estamos começando a entender sua posição na árvore da vida e a colocar no contexto os vestígios que estas estranhas criaturas nos oferecem a respeito de nosso distante passado evolutivo.

Uma levedura serve como um modelo mínimo de eucarioto

A complexidade genética e molecular dos eucariotos é assustadora. Mais até do que no caso dos procariotos, os biólogos precisam concentrar seus limitados recursos nos poucos organismos-modelo selecionados para compreender essa complexidade.

Para analisar o trabalho interno da célula eucariótica, sem os problemas adicionais do desenvolvimento multicelular, faz sentido o uso de uma espécie unicelular e tão simples quanto possível. A escolha popular para esse papel de modelo mínimo de eucarioto tem sido a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1-42**) – a mesma espécie é usada por cervejeiros e padeiros.

A levedura *S. cerevisiae* é um pequeno membro unicelular do reino dos fungos e, portanto, de acordo com visões modernas, está pelo menos tão intimamente relacionada a animais quanto a plantas. É robusta e fácil de crescer em um meio com nutrientes simples. Como outros fungos, tem uma parede celular rígida, é relativamente imóvel e possui mitocôndria, mas não cloroplasto. Quando os nutrientes são abundantes, ela cresce e se divide quase tão

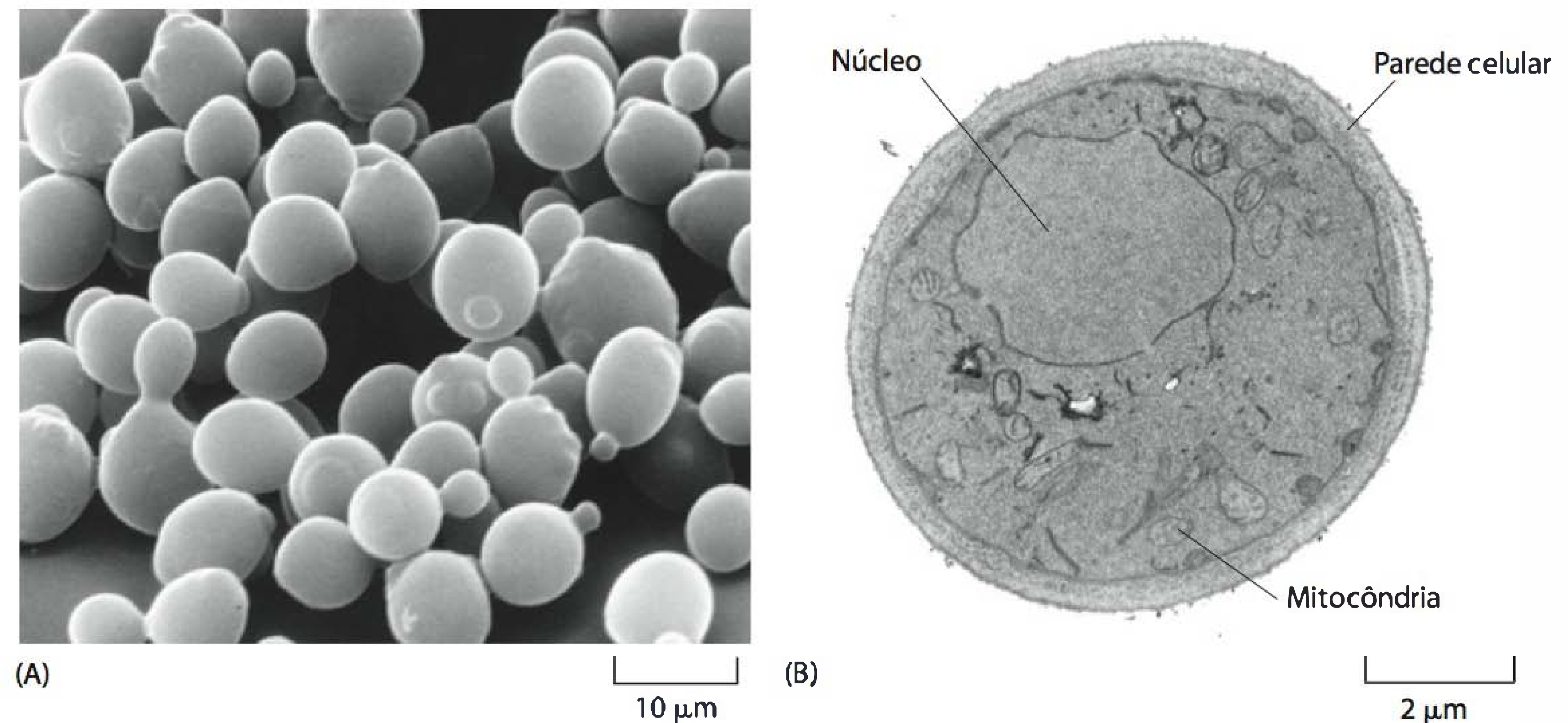


Figura 1-42 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Micrografia eletrônica de varredura de um grupo de células. Essa espécie também é conhecida como levedura formadora de brotos; ela prolifera formando uma saliência ou broto que aumenta e então se separa do resto da célula original. Muitas células com brotos são visíveis nesta micrografia. (B) Micrografia eletrônica de transmissão de uma secção transversal de uma célula de levedura, mostrando seu núcleo, a mitocôndria e uma parede celular espessa. (A, cortesia de Ira Herskowitz e Eric Schabatach.)

rapidamente quanto uma bactéria. Ela pode reproduzir-se tanto de forma vegetativa (isto é, por simples divisão celular) quanto sexuada: duas células de levedura que são *haploides* (possuindo uma única cópia do genoma) podem se fundir para criar uma célula que é *diploide* (contendo um genoma duplo); a célula diploide pode sofrer *meiose* (uma divisão reducional) para produzir células que são outra vez haploides (**Figura 1-43**). Em contraste com plantas superiores e animais, as leveduras podem dividir-se indefinidamente no estado haploide ou diploide, e o processo levando de um estado para o outro pode ser induzido ao se fazer mudanças nas condições de crescimento.

Em adição a todas essas características, a levedura possui mais uma propriedade que a torna um organismo conveniente para estudos genéticos: o seu genoma, para padrões eucarióticos, é excepcionalmente pequeno. No entanto, ela faz todas as tarefas básicas que as células eucarióticas podem realizar. Como veremos mais adiante neste livro, os estudos com leveduras (usando tanto *S. cerevisiae* como outras espécies) têm fornecido uma explicação para muitos processos cruciais, incluindo o ciclo de divisão celular eucariótica – a cadeia crítica de eventos pela qual o núcleo e todos os outros componentes de uma célula são duplicados e divididos para criar duas células-filhas a partir de uma. O sistema de controle que governa esses processos tem sido tão bem conservado ao longo do curso da evolução que muitos de seus componentes podem funcionar de maneira intercambiável em leveduras e em células humanas: se uma levedura mutante, na qual falta um gene do ciclo de divisão celular da levedura, é suprida com uma cópia do gene homólogo do ciclo de divisão celular dos humanos, a levedura é curada do seu defeito e se torna apta a dividir normalmente.

Os níveis de expressão de todos os genes de um organismo podem ser monitorados simultaneamente

A sequência genômica completa de *S. cerevisiae*, determinada em 1997, consiste em aproximadamente 13.117.000 pares de nucleotídeos, incluindo a pequena contribuição (78.520 pares de nucleotídeos) do DNA mitocondrial. Esse total representa somente cerca de 2,5 vezes mais DNA do que há em *E. coli*, e codifica apenas 1,5 vez mais proteínas distintas (aproximadamente 6.300 no total). O modo de vida da *S. cerevisiae* é similar em muitos pontos ao de uma bactéria, e parece que essa levedura também tem sido objeto de pressões seletivas que mantiveram o seu genoma compacto.

O conhecimento da sequência genômica completa de qualquer organismo – seja uma levedura ou um humano – abre novas perspectivas do funcionamento da célula: algo que parecia extremamente complexo agora parece estar ao nosso alcance. Usando técnicas que

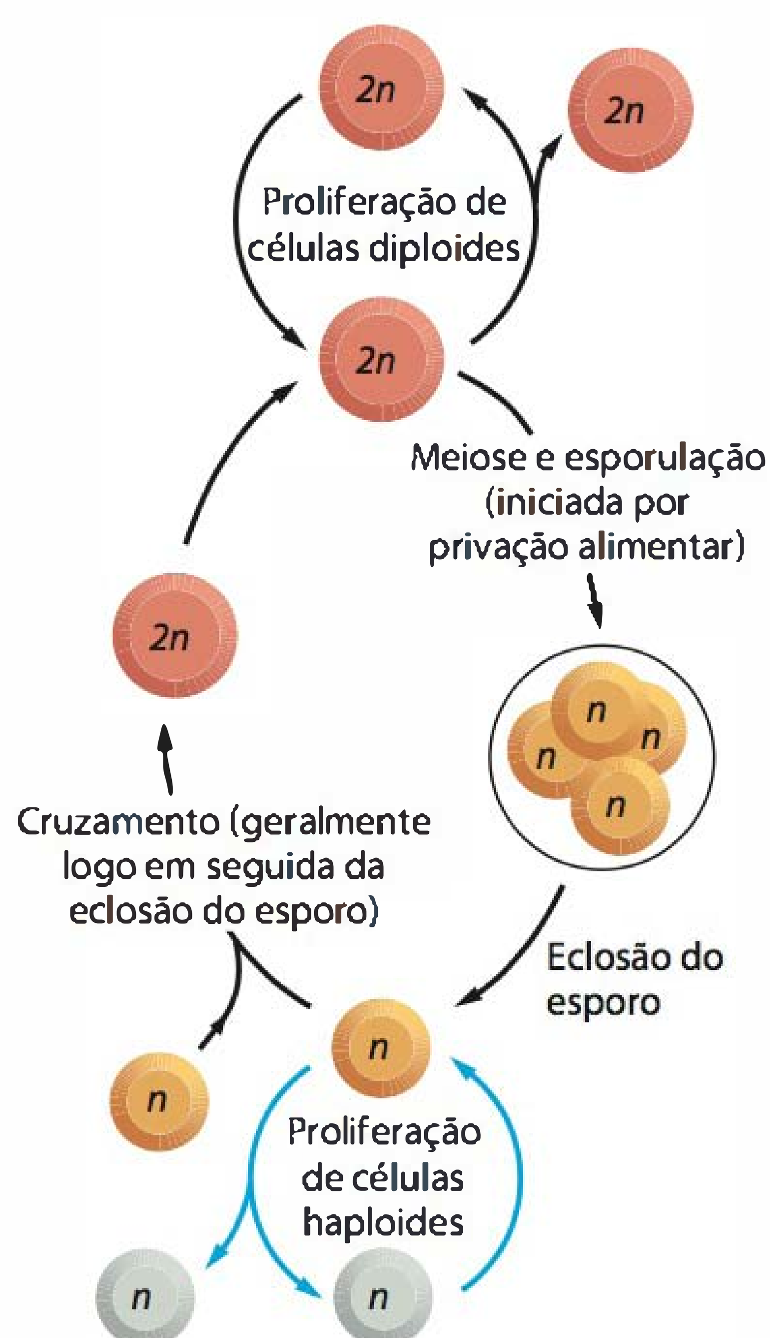


Figura 1-43 Os ciclos reprodutivos da levedura *S. cerevisiae*. Dependendo das condições ambientais e da particularidade do genótipo, as células dessa espécie podem existir tanto em um estado diploide (2*n*), com um duplo conjunto de cromossomos, quanto em um estado haploide (*n*), com um único conjunto cromossômico. A forma diploide pode proliferar por ciclos de divisão celular usuais ou sofrer meiose para produzir células haploides. A forma haploide pode proliferar por ciclos de divisão celular usuais ou sofrer fusão sexual com uma outra célula haploide para tornar-se diploide. A meiose é iniciada por privação alimentar e origina esporos – células haploides em um estado dormente, resistentes a condições ambientais severas.

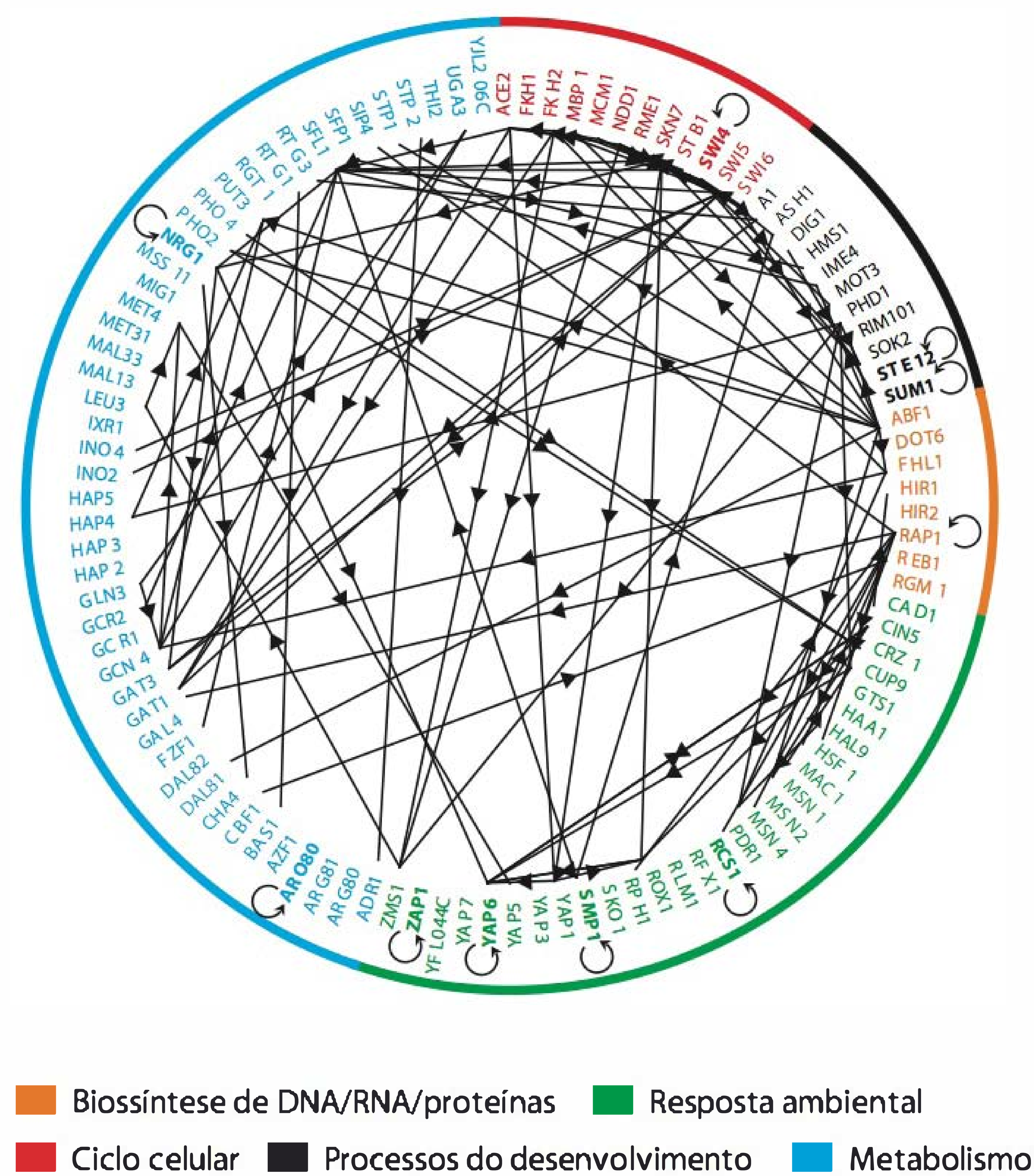


Figura 1-44 Rede de interações entre proteínas reguladoras de genes e os genes que as codificam na célula de levedura. São mostrados os resultados para 106 de um total de 141 proteínas reguladoras de genes em *Saccharomyces cerevisiae*. Cada proteína do grupo foi testada para a sua habilidade em ligar-se ao DNA regulador de cada um dos genes codificadores para esse grupo de proteínas. No diagrama, os genes foram organizados em círculos, e uma seta que aponta do gene A para o gene B significa que a proteína codificada por A se liga ao DNA regulador de B, e, portanto, provavelmente regula a expressão de B. Os círculos pequenos em forma de flecha indicam os genes cujos produtos regulam diretamente a sua própria expressão. Os genes que governam diferentes aspectos do comportamento celular estão mostrados em diferentes cores. Para animais e plantas multicelulares, o número de genes de proteínas reguladoras é cerca de 10 vezes maior, e a quantidade de DNA regulador talvez seja 100 vezes maior, de maneira que o diagrama correspondente seria muito mais complexo. (De T. I. Lee et al., *Science* 298:799-804, 2002. Com permissão de AAAS.)

serão descritas no Capítulo 8, é possível agora, por exemplo, monitorar simultaneamente a quantidade de mRNA transcrito produzido por cada gene no genoma da levedura sob qualquer condição escolhida, e verificar como esse padrão na atividade gênica muda quando as condições são variadas. A análise pode ser realizada com o mRNA preparado de mutantes nos quais um gene escolhido está ausente – qualquer gene que gostaríamos de testar. Em princípio, essa metodologia fornece um caminho para revelar todo o sistema do controle de relações que governa a expressão gênica – não somente em células de levedura, mas também em qualquer organismo cuja sequência genômica é conhecida.

Para compreendermos as células, necessitamos da matemática, da computação e da informação quantitativa

Por meio de tais métodos, utilizando o nosso conhecimento das sequências genômicas, podemos listar os genes e as proteínas em uma célula, e começar a descrever a rede de interações entre eles (**Figura 1-44**). No entanto, como faremos para usar toda essa informação para compreender como as células funcionam? Mesmo para um único tipo celular pertencente a uma única espécie de organismo, o atual volume de dados parece impressionante. O tipo de raciocínio informal que os biólogos geralmente propõem parece totalmente inadequado em face de tal complexidade. De fato, a dificuldade é muito mais uma questão de sobrecarga de informação. Os sistemas biológicos são, por exemplo, cheios de labirintos de retroalimentação, e o comportamento dos sistemas mais simples com retroalimentação é difícil de ser previsto apenas por intuição (**Figura 1-45**); pequenas mudanças nos parâmetros

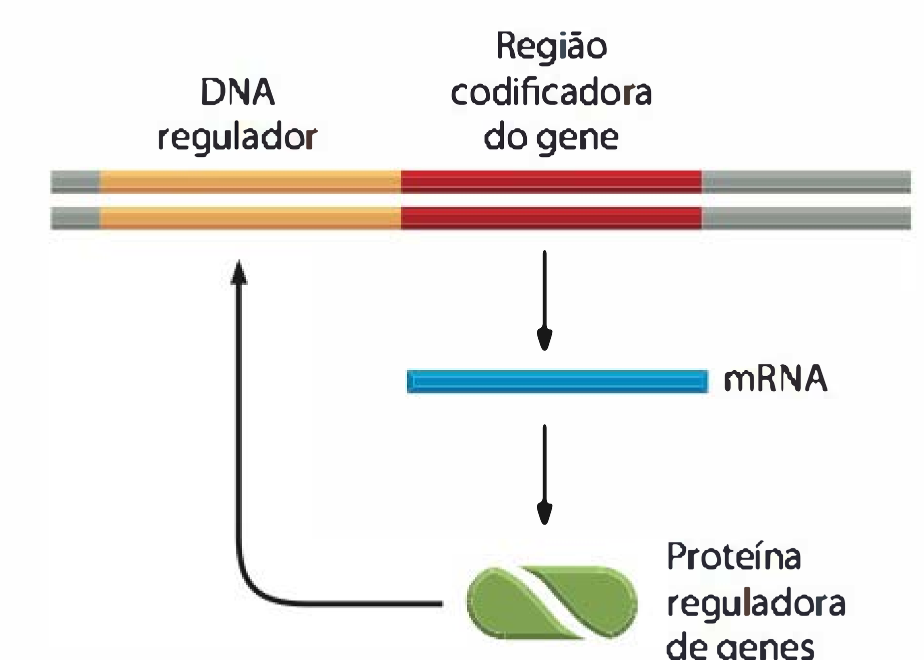


Figura 1-45 Um circuito muito simples de regulação gênica – um único gene regulando sua própria expressão pela ligação de seu produto proteico ao seu próprio DNA regulador. Um diagrama esquemático simples como este em geral é utilizado para resumir o que sabemos (assim como na Figura 1-44), mas deixa muitas questões sem respostas. Quando a proteína se liga, ela inibe ou estimula a transcrição? Como a taxa de transcrição precisamente depende da concentração da proteína? Quanto tempo, em média, uma molécula de proteína deve permanecer ligada ao DNA? Quanto tempo leva para se fazer cada molécula de mRNA ou proteína, e qual a velocidade de degradação de cada tipo de molécula? O modelamento matemático mostra que precisamos de respostas quantitativas para todas estas e outras questões antes de podermos predizer até mesmo o comportamento desse sistema contendo um único gene. Dependendo dos valores de cada parâmetro, o sistema pode acomodar-se a um único estado de equilíbrio, ou pode comportar-se como um interruptor, capaz de existir em uma condição ou outra de um grupo de estados alternativos, ou pode oscilar, ou pode apresentar grandes flutuações randômicas.



Figura 1-46 ***Arabidopsis thaliana*, a planta escolhida como modelo principal para o estudo da genética molecular de plantas.** (Cortesia de Toni Hayden e John Innes Foundation.)

podem causar modificações radicais no resultado. Para partir de um diagrama de circuito e predizer o comportamento de um sistema, precisamos de uma informação quantitativa detalhada, e para fazer deduções a partir dessa informação, necessitamos da matemática e da computação.

Essas ferramentas para um raciocínio quantitativo são essenciais, mas nem todas são poderosas. Pode-se pensar que, sabendo como cada proteína influencia uma outra proteína, e como a expressão de cada gene é regulada pelos produtos de outros genes, nós logo seremos capazes de calcular como a célula como um todo irá se comportar, assim como um astronauta consegue calcular as órbitas dos planetas, ou um engenheiro químico pode calcular os fluxos de uma fábrica química. Contudo, qualquer tentativa de executar essa façanha em uma célula viva rapidamente revela os limites do nosso estado atual de conhecimento. As informações que possuímos, por mais abundantes que sejam, estão cheias de lacunas e incertezas. Além disso, são muito mais qualitativas do que quantitativas. Na maioria das vezes, quando os biólogos celulares estudam o sistema de controle celular, eles resumem o seu conhecimento a diagramas esquemáticos simples – este livro está cheio deles – ao invés de números, gráficos e equações diferenciais. Progredir de descrições qualitativas e raciocínio intuitivo a descrições quantitativas e deduções matemáticas é um dos maiores desafios da biologia celular contemporânea. Até o momento, apenas o desafio de alguns fragmentos simples da maquinaria das células vivas tem sido elucidado – subsistemas envolvidos em algumas proteínas, ou dois ou três genes de regulação cruzada onde a teoria e o experimento podem andar juntos. Vamos discutir no livro alguns desses exemplos mais adiante.

A *Arabidopsis* foi escolhida dentre 300 mil espécies como uma planta-modelo

Os maiores organismos multicelulares que vemos ao nosso redor – as flores, as árvores e os animais – parecem fantasticamente variados, mas são mais próximos uns dos outros em sua origem evolutiva e mais similar em sua biologia celular básica do que o maior hospedeiro dos organismos unicelulares microscópicos. Portanto, enquanto as bactérias e os eucariotos estão separados por mais de 3 bilhões de anos de divergência evolutiva, os vertebrados e os insetos estão separados por aproximadamente 700 milhões de anos, os peixes e os mamíferos por aproximadamente 450 milhões de anos, e as diferentes espécies de plantas com flores por somente 150 milhões de anos.

Em função da relação evolutiva próxima entre todas as plantas com flores, podemos, novamente, ter uma ideia da biologia celular e molecular dessa classe inteira de organismos, focando somente uma ou algumas poucas espécies para análises detalhadas. Dentre as várias centenas de milhares de espécies de plantas com flores existentes na Terra hoje, os biólogos moleculares escolheram concentrar os seus esforços em uma pequena erva, a *Arabidopsis thaliana* (**Figura 1-46**), que pode crescer em grandes quantidades em ambientes fechados e produzir milhares de descendentes por planta após 8 a 10 semanas. A *Arabidopsis* tem um genoma de aproximadamente 140 milhões de pares de nucleotídeos, cerca de 11 vezes mais que a levedura, e sua sequência completa é conhecida.

O mundo das células animais é representado por um verme, uma mosca, um rato e um humano

Os animais multicelulares são responsáveis pela maior parte de todas as espécies conhecidas de organismos vivos e pela maior parte dos esforços da pesquisa biológica. Quatro espécies emergiram como os primeiros organismos-modelo para os estudos de genética molecular. Em ordem crescente de tamanho, eles são o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a mosca *Drosophila melanogaster*, o rato *Mus musculus* e o humano, *Homo sapiens*. Todos eles tiveram os seus genomas sequenciados.

O *Caenorhabditis elegans* (**Figura 1-47**) é um verme pequeno e inofensivo, parente do verme anguílula que ataca plantações. Com um ciclo de vida de poucos dias, uma capacidade de sobreviver no congelador indefinidamente em um estado de vida latente, um plano corporal simples e um ciclo de vida incomum que é bem adequado para estudos genéticos (descrito no Capítulo 23), é um organismo-modelo ideal. O *C. elegans* desenvolve-se com precisão a partir de um ovo fertilizado até o verme adulto, com exatamente 959 células corporais (mais um número variável de células-ovo e de espermatozoides) – um grau incomum de regularidade para um animal. Temos agora uma descrição minuciosa da sequência de

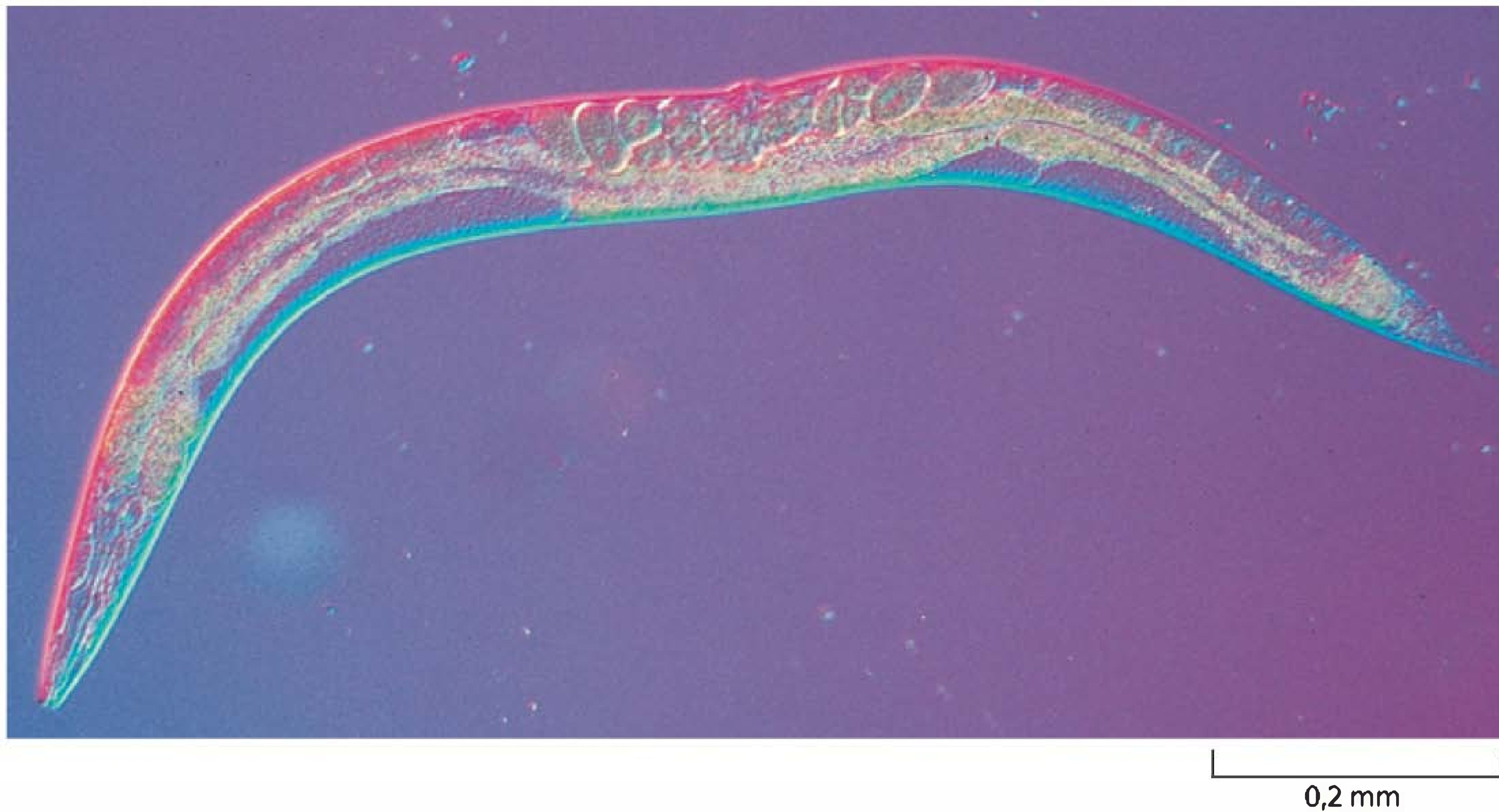


Figura 1-47 ***Caenorhabditis elegans*, o primeiro organismo multicelular que teve seu genoma sequenciado e determinado.** Esse pequeno nematoide, de aproximadamente 1 mm de comprimento, vive no solo. A maioria dos indivíduos é hermafrodita, produzindo tanto óvulos como esperma. O animal é visto aqui com a utilização de microscopia ótica de contraste por interferência, mostrando os limites dos tecidos em cores vibrantes; o animal por si só não é colorido quando visto na luz comum. (Cortesia de Ian Hope.)

eventos pela qual isso ocorre, como as células se dividem, movem-se e alteram suas características de acordo com regras exatas e previsíveis. O genoma de 97 milhões de pares de nucleotídeos codifica para aproximadamente 19 mil proteínas, e muitos mutantes e outras ferramentas estão disponíveis para testar as funções gênicas. Embora o verme tenha um plano corporal muito diferente do humano, a conservação de mecanismos biológicos tem sido suficiente para que o verme seja um ótimo modelo para muitos dos processos do desenvolvimento e da biologia da célula que ocorrem no corpo humano. Estudos do verme ajudam a entender, por exemplo, os programas de divisão celular e de morte celular que determinam o número de células no corpo – um tópico de grande importância na biologia do desenvolvimento e na pesquisa do câncer.

Os estudos em *Drosophila* explicam o desenvolvimento de vertebrados

A mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (**Figura 1-48**) tem sido utilizada como um organismo-modelo na genética por mais tempo que qualquer outro organismo; de fato, os fundamentos de genética clássica foram construídos, em boa parte, a partir de estudos desse inseto. Há mais de 80 anos ela forneceu, por exemplo, a prova definitiva de que os genes – as unidades abstratas da informação hereditária – são transportados nos cromossomos, objetos físicos concretos, cujo comportamento foi bem observado nas células eucarióticas com o uso de microscópio ótico, mas cuja função era inicialmente desconhecida. A comprovação dependeu de uma das muitas características que tornam a *Drosophila* particularmente con-



Figura 1-48 ***Drosophila melanogaster*.** Estudos de genética molecular nessa mosca têm fornecido a principal chave para o entendimento de como todos os animais se desenvolvem a partir de um óvulo fertilizado em um adulto. (De E. B. Lewis, *Science* 221: cover, 1983. Com permissão de AAAS.)



Figura 1-49 Cromossomos gigantes das células de glândulas salivares de *Drosophila*. Devido a muitos ciclos de replicação do DNA terem ocorrido sem a intervenção da divisão celular, cada um dos cromossomos nessas células incomuns contém mais de mil moléculas de DNA idênticas, todas alinhadas em ordem. Isso as torna fáceis de serem vistas à luz do microscópio, onde exibem um padrão de bandeamento característico e reproduzível. Bandas específicas podem ser identificadas como a localização de genes específicos: uma mosca mutante com uma região do padrão de bandeamento faltando mostra um fenótipo refletindo a perda de genes naquela região. Os genes que estão sendo transcritos em altas taxas correspondem a bandas com aparência de pufes. As bandas coloridas em castanho-escuro na micrografia são sítios onde uma proteína reguladora em particular está ligada ao DNA. (Cortesia de B. Zink e R. Paro, de R. Paro, *Trends Genet*. 6:416-421, 1990. Com permissão de Elsevier.)

veniente para a genética – os cromossomos gigantes, com a aparência bandeada característica, que são visíveis em algumas de suas células (**Figura 1-49**). As alterações específicas na informação hereditária, manifestadas em famílias de moscas mutantes, foram correlacionadas precisamente à perda ou à alteração de bandas específicas nos cromossomos gigantes.

Mais recentemente, a *Drosophila*, mais que qualquer outro organismo, tem nos mostrado como traçar a série de causas e de efeitos das instruções genéticas codificadas pelo DNA cromossomal para a estrutura do corpo multicelular adulto. Os mutantes de *Drosophila*, com partes do corpo estranhamente colocadas em lugares errados ou fora dos padrões, forneceram a chave para a identificação e a caracterização dos genes necessários para construir o corpo corretamente estruturado, com intestino, membros, olhos e todas as outras partes em seus lugares corretos. Uma vez que esses genes de *Drosophila* foram sequenciados, os genomas de vertebrados puderam ser examinados cuidadosamente em busca de homólogos, os quais foram encontrados e tiveram suas funções testadas em vertebrados, analisando-se ratos cujos respectivos genes tinham sido mutados. Os resultados, como veremos mais adiante neste livro, revelam um grau extraordinário de similaridade nos mecanismos moleculares do desenvolvimento de insetos e vertebrados.

A maioria das espécies de organismos vivos conhecidos é de insetos. Mesmo que a *Drosophila* não tivesse nada em comum com os vertebrados, mas somente com os insetos, ela ainda seria um importante modelo de organismo. Contudo, se entender a genética molecular de vertebrados é a meta, por que simplesmente não se ataca o problema de frente? Por que aproximar-se silenciosamente, por meio de estudos indiretos em *Drosophila*?

A *Drosophila* necessita somente de nove dias para evoluir do ovo a um adulto; é vastamente mais fácil e barato criá-la do que qualquer vertebrado, e seu genoma é muito menor – aproximadamente 170 milhões pares de nucleotídeos, em comparação com os 3 bilhões e 200 milhões em humanos. O genoma de *Drosophila* codifica aproximadamente 14 mil proteínas, e os mutantes agora podem ser obtidos para cada gene basicamente. Mas há também uma outra forte razão pela qual os mecanismos genéticos que são difíceis de ser descobertos em vertebrados são, muitas vezes, prontamente revelados em uma mosca. Isso está relacionado, como agora explicaremos, com a frequência de duplicação gênica, a qual é substancialmente maior em genomas de vertebrados que no genoma de mosca, o que provavelmente tem sido crucial para tornar os vertebrados as criaturas complexas e sutis que são.

O genoma dos vertebrados é um produto de duplicações repetidas

Quase todo gene no genoma de vertebrados possui parálogos – outros genes no mesmo genoma que estão inconfundivelmente relacionados e que devem ter surgido por duplicação gênica. Em muitos casos, um grupo inteiro de genes está intimamente relacionado a grupos similares presentes em qualquer outro lugar no genoma, sugerindo que os genes foram duplicados em grupos ligados, e não como indivíduos isolados. De acordo com uma hipótese, em um estágio inicial da evolução dos vertebrados, o genoma inteiro sofreu duas duplicações sucessivas, dando origem a quatro cópias de cada gene. Em alguns grupos de vertebrados, como os peixes da família do salmão e da carpa (incluindo o peixe-zebra, um popular animal de pesquisa), foi sugerido que houve ainda outra duplicação, criando uma multiplicidade óctupla de genes.

O curso preciso da evolução do genoma dos vertebrados permanece incerto, pois muitas outras mudanças evolutivas ocorreram desde os primeiros eventos. Genes que já foram idênticos divergiram; muitas das cópias gênicas foram perdidas por mutações disruptivas; alguns têm passado por adicionais rodadas de duplicação local; e o genoma, em cada ramo da árvore genealógica da família de vertebrados, tem sofrido repetidos rearranjos, rompendo a maioria das disposições originais dos genes. A comparação cuidadosa da disposição gênica em dois organismos relacionados, como o humano e o rato, revela que – na escala de tempo de evolução dos vertebrados – os cromossomos frequentemente fundem e fragmentam para mover grandes blocos de sequências de DNA por toda a parte. Na verdade, é possível, como discutiremos no Capítulo 7, que a presente situação de acontecimentos seja o resultado de muitas duplicações separadas de fragmentos do genoma, e não da duplicação do genoma como um todo.

Entretanto, não há dúvidas de que tais duplicações de todo o genoma ocorrem de tempos em tempos na evolução, pois podemos encontrar exemplos recentes nos quais grupos duplicados de cromossomos ainda são claramente identificáveis como tais. O gênero de



Figura 1-50 Duas espécies de sapos do gênero *Xenopus*. O *X. tropicalis*, acima, tem um genoma ordinário diploide; o *X. laevis*, abaixo, tem duas vezes mais DNA por célula. A partir dos padrões de bandeamento de seus cromossomos e o arranjo dos genes ao longo deles, assim como comparações de sequências gênicas, é claro que as espécies com um genoma abundante têm evoluído por meio de duplicações de todo o genoma. Acredita-se que essas duplicações ocorreram como consequência de cruzamentos entre sapos ligeiramente divergentes da espécie *Xenopus*. (Cortesia de E. Amaya, M. Offield e R. Grainger, *Trends Gent*. 14:253–255, 1998. Com permissão de Elsevier.)

sapo *Xenopus*, por exemplo, compreende um grupo de espécies intimamente similares relacionadas umas às outras por duplicações repetidas, ou triplicações, de todo o genoma. Entre esses sapos estão o *X. tropicalis*, com um genoma diploide ordinário; a espécie comum de laboratório *X. laevis*, com um genoma duplicado e duas vezes mais DNA por célula; e o *X. ruwenzoriensis*, com o genoma original seis vezes reduplicado e seis vezes mais DNA por célula (108 cromossomos, comparado com 36 em *X. laevis*, p. ex.). Estima-se que essas espécies tenham divergido uma da outra nos últimos 120 milhões de anos (**Figura 1-50**).

A redundância genética é um problema para os geneticistas, mas cria oportunidades para os organismos evoluírem

Sejam quais forem os detalhes da história evolutiva, está claro que a maioria dos genes no genoma de vertebrados existe em várias versões que já foram idênticas. Os genes com parentesco em geral continuam a ser funcionalmente invariáveis para vários propósitos. Esse fenômeno é chamado de **redundância genética**. Para o cientista que se esforça para descobrir todos os genes envolvidos em algum processo particular, a redundância complica a tarefa. Se um gene A está mutado, e nenhum efeito é observado, não pode ser concluído que o gene A é funcionalmente irrelevante – pode ser apenas que esse gene trabalhe normalmente em paralelo com seus genes relacionados, e estes sejam suficientes para manter uma função normal, mesmo quando o gene A é defectivo. No genoma menos repetitivo de *Drosophila*, em que a duplicação gênica é menos comum, a análise é mais direta: as funções de genes únicos são reveladas diretamente pelas consequências de mutações em genes únicos (um avião monomotor para de voar quando o motor falha).

A duplicação do genoma claramente tem permitido o desenvolvimento de formas de vida mais complexas; ela fornece a um organismo uma reserva abundante de cópias gênicas, que estão livres para mutar com a finalidade de servir a propósitos diferentes. Enquanto uma cópia torna-se otimizada para ser usada no fígado, outra pode se tornar otimizada para ser usada no cérebro, ou adaptada a um novo propósito. Desse modo, os genes adicionais permitem o aumento da complexidade e da sofisticação. À medida que os genes assumem novas funções, eles deixam de ser redundantes. No entanto, enquanto os genes adquirem papéis especializados individualmente, muitas vezes eles também continuam a realizar alguns aspectos de suas funções originais principais em paralelo, redundantemente. A mutação de um único gene, então, causa uma anormalidade relativamente pequena que revela somente uma parte da sua função gênica (**Figura 1-51**). As famílias de genes com funções divergentes, mas com sobreposição parcial, são uma característica difusa da biologia molecular de vertebrados, sendo encontradas repetidamente neste livro.

O camundongo serve como modelo para os mamíferos

Os mamíferos tipicamente têm três ou quatro vezes mais genes do que a *Drosophila*, um genoma que é 20 vezes maior e que contém milhões, ou bilhões, de vezes mais células em seu corpo adulto. Em termos de tamanho e de função de genoma, de biologia celular e de mecanismos moleculares, os mamíferos são, contudo, um grupo altamente uniforme de organismos. Até mesmo anatomicamente, as diferenças entre mamíferos são, sobretudo, uma questão de tamanho e de proporções; é difícil pensar em uma parte do corpo humano que não possua uma contraparte em elefantes e em camundongos, e vice-versa. A evolução brinca livremente com traços quantitativos, mas ela não muda prontamente a lógica da estrutura.

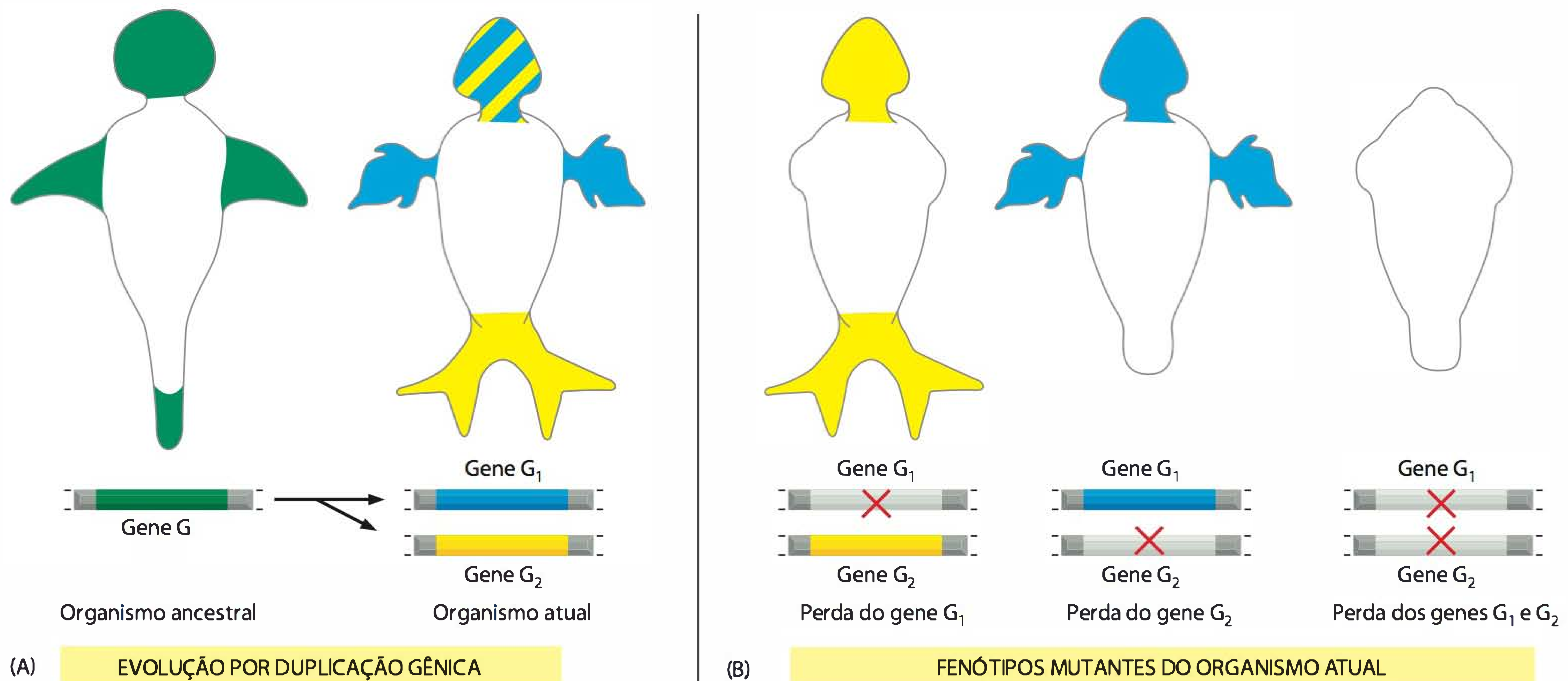


Figura 1-51 Consequências da duplicação gênica para análises mutacionais da função gênica. Neste exemplo hipotético, um organismo multicelular ancestral tem um genoma contendo uma única cópia do gene G, o qual realiza sua função em vários locais no corpo, indicado em *verde*. (A) Por meio da duplicação gênica, um descendente atual do organismo ancestral possui duas cópias do gene G, chamadas de G_1 e G_2. As cópias divergiram um pouco no padrão de expressão e nas suas atividades nos locais onde são expressas, mas ainda retêm importantes similaridades. Em alguns locais, G_1 e G_2 são expressos juntos, e cada um realiza independentemente a mesma função antiga que o gene G ancestral (alternando as *listras verdes* e *amarelas*); em outros locais, eles são expressos sozinhos e podem desempenhar novos propósitos. (B) Em função de uma sobreposição funcional, a perda de um dos dois genes por mutação (marcado com um x *vermelho*) revela apenas uma parte de seu papel; somente a perda de ambos os genes em um mutante duplo revela a completa variação dos processos pelos quais esses genes são responsáveis. Um princípio semelhante aplica-se a genes duplicados que atuam no mesmo local (p. ex., em um organismo unicelular), mas são solicitados para agirem em conjunto ou individualmente em resposta a circunstâncias variáveis. Portanto, a duplicação gênica complica as análises genéticas em todos os organismos.

Para uma medida mais exata de quanto as espécies de mamíferos assemelham-se geneticamente umas às outras, podemos comparar as sequências de nucleotídeos de genes correspondentes (ortólogos), ou as sequências de aminoácidos das proteínas que esses genes codificam. Os resultados para genes e para proteínas individuais variam bastante. No entanto, tipicamente, se alinharmos a sequência de aminoácidos de uma proteína humana com a de uma forma proteica ortóloga, digamos, de um elefante, aproximadamente 85% dos aminoácidos serão idênticos. Uma comparação similar entre humanos e pássaros mostra uma identidade de aminoácidos de aproximadamente 70% – duas vezes mais diferenças, porque as linhagens de pássaros e de mamíferos tiveram duas vezes mais tempo para divergir que as de elefantes e de humanos (**Figura 1-52**).

O camundongo, sendo pequeno, robusto e um rápido reprodutor, tornou-se o organismo-modelo preferido para estudos experimentais de genética molecular de vertebrados. Muitas das mutações que ocorrem naturalmente são conhecidas, em geral mimetizando os efeitos de mutações correspondentes em humanos (**Figura 1-53**). Além disso, métodos foram desenvolvidos para testar a função de qualquer gene escolhido de camundongo, ou de qualquer porção não-codificante do genoma do camundongo, pela geração de mutações, como explicaremos mais tarde neste livro.

Um mutante sob medida de camundongo pode fornecer uma riqueza de informações para biólogos celulares. Estas revelam os efeitos de uma mutação escolhida em um hospedeiro de diferentes contextos, testando simultaneamente a ação do gene em todos os tipos diferentes de células no corpo que podem, em princípio, ser afetadas.

Os humanos relatam suas próprias peculiaridades

Como humanos, temos um interesse especial no genoma humano. Queremos conhecer todo o conjunto de partes das quais somos feitos e descobrir como elas funcionam. Mas até mesmo se você fosse um camundongo, preocupado com a biologia molecular dos camundongos, os humanos seriam atrativos como modelo genético de organismos devido a uma propriedade especial: por meio de exames médicos e de autorrelatos, catalogamos nossas próprias doenças genéticas (e outras). A população humana é enorme, hoje constituída por cerca de 6 bilhões de indivíduos, e essa característica de autodocumentação significa que uma enorme base de dados de informação existe para mutações humanas. A sequência completa do genoma humano de mais de 3 bilhões de pares de nucleotídeos recentemente foi determinada, tornando até mais fácil que antes identificar, em nível molecular, o exato gene responsável por cada característica humana mutante.

Reunindo-se as pistas a partir de humanos, camundongos, moscas, vermes, leveduras, plantas e bactérias – utilizando as similaridades das sequências gênicas para mapear as correspondências entre um organismo-modelo e outro – enriquecemos nosso entendimento sobre todos eles.

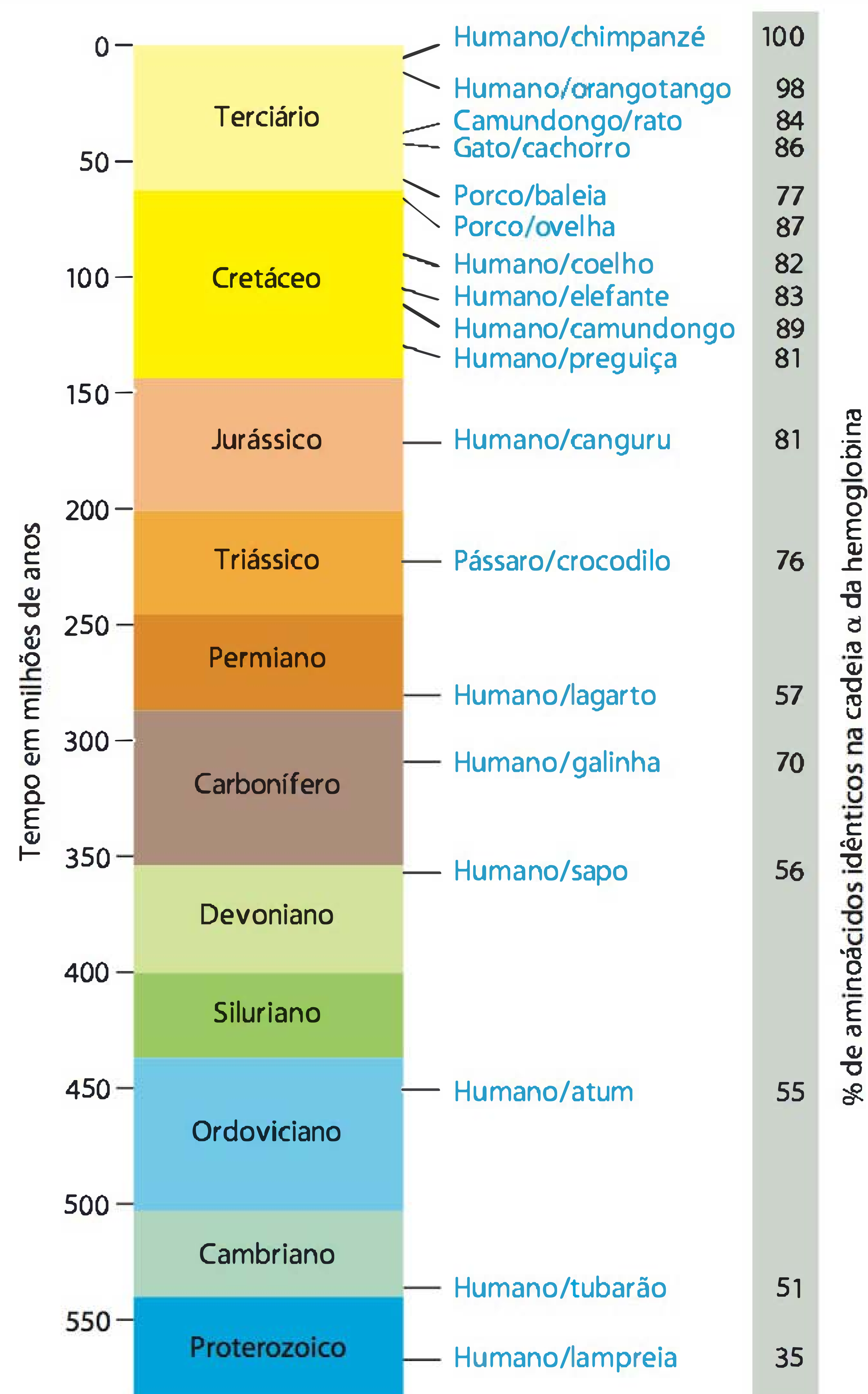


Figura 1-52 Tempos de divergência de diferentes vertebrados. A escala do lado esquerdo mostra a data estimada e a era geológica do último ancestral comum para cada par especificado de animais. Cada tempo estimado tem como base comparações das sequências de aminoácidos de proteínas ortólogas; quanto mais tempo um par de animais teve para evoluir independentemente, menor o percentual de aminoácidos que se manteve idêntico. Foram calculadas as médias dos dados para muitas classes de diferentes proteínas para chegar às estimativas finais, e a escala de tempo foi calibrada para corresponder à evidência fóssil de que o último ancestral comum de mamíferos e de aves viveu há 310 milhões de anos. As figuras do lado direito mostram dados da divergência de sequência para uma proteína em particular (escolhida arbitrariamente) – a cadeia α da hemoglobina. Note que embora exista uma tendência clara no aumento da divergência com o aumento do tempo para essa proteína, há também algumas irregularidades. Estas refletem a variabilidade dentro do processo evolutivo e, provavelmente, a ação da seleção natural conduzindo em especial a rápidas alterações na sequência da hemoglobina em alguns organismos que experimentaram necessidades fisiológicas especiais. Em média, dentro de qualquer linhagem evolutiva específica, as hemoglobinas acumulam trocas a uma taxa de cerca de seis aminoácidos alterados para cada cem, em cem milhões de anos. Algumas proteínas, sujeitas a limitações funcionais mais rígidas, evoluem muito mais lentamente do que isso, outras até cinco vezes mais rápido. Tudo isso origina consideráveis incertezas na estimativa dos tempos de divergência, e alguns especialistas acreditam que os principais grupos de mamíferos divergiram uns dos outros até 60 milhões de anos mais recentemente do que é mostrado aqui. (Adaptada de S. Kumar e S. B. Hedges, *Nature* 392:917-920, 1998. Com permissão de Macmillan Publishers Ldt.)

Somos todos minuciosamente diferentes

O que exatamente queremos propor quando falamos sobre *o genoma humano*? Genoma de quem? Em média, duas pessoas analisadas ao acaso diferem em aproximadamente um ou dois pares de nucleotídeos em sua sequência de DNA, a cada mil pares de nucleotídeos. O Projeto Genoma Humano tem selecionado arbitrariamente o DNA de um pequeno número de indivíduos anônimos para sequenciar. O genoma humano – o genoma da espécie humana – é, para ser exato, um pouco mais complexo, abrangendo todo o conjunto de genes variantes que é encontrado na população humana, e continuamente trocado e reorganizado no curso da reprodução sexual. Em última análise, esperamos poder documentar também essa variação. Esse conhecimento ajudará a entender, por exemplo, por que algumas pessoas são propensas a uma doença, e outras não; por que algumas respondem bem a um fármaco e outras mal. Ele também fornecerá novas pistas da nossa história – os deslocamentos populacionais e os cruzamentos de nossos ancestrais, as infecções que eles sofreram e as dietas que comiam. Tudo isso deixou indícios nas formas variantes dos genes que sobreviveram nas comunidades de humanos.





Figura 1-53 Humano e camundongo: genes e desenvolvimento similares. O bebê humano e o camundongo mostrados aqui possuem manchas brancas similares nas suas testas porque ambos têm mutações no mesmo gene (chamado de *Kit*), necessário para o desenvolvimento e a manutenção do pigmento das células. (Cortesia de R. A. Fleischman.)

O conhecimento e o entendimento resultam no poder de interferir – nos humanos, para evitar ou prevenir doenças; nas plantas, para criar melhores cultivares; nas bactérias, para mudá-las para nosso próprio uso. Todas essas iniciativas biológicas estão ligadas, porque a informação genética de todos os organismos vivos está escrita na mesma linguagem. A nova habilidade encontrada pelos biólogos moleculares para ler e decifrar essa linguagem já começou a transformar nosso relacionamento com o mundo vivo. Esperamos que a descrição da biologia celular nos capítulos subsequentes prepare você para entender e, possivelmente, contribuir com a grande aventura científica do século XXI.

Resumo

As células eucarióticas, por definição, mantêm seu DNA em um compartimento separado por uma membrana, o núcleo. Além disso, elas têm um citoesqueleto para suporte e movimento, compartimentos intracelulares elaborados para a digestão e a secreção, a capacidade (em muitas espécies) de englobar outras células e um metabolismo que depende da oxidação de moléculas orgânicas pela mitocôndria. Essas propriedades sugerem que os eucariotos se originaram como predadores de outras células. As mitocôndrias – e, em plantas, os cloroplastos – contêm seu próprio material genético e, evidentemente, evoluíram de bactérias que foram assimiladas no citoplasma da célula eucariótica e sobreviveram como simbiontes. As células eucarióticas tipicamente têm de 3 a 30 vezes mais genes que os procariotos e, com frequência, milhares de vezes mais DNA não-codificante. O DNA não-codificante permite uma regulação complexa da expressão gênica, necessária à construção de organismos multicelulares complexos. Entretanto, muitos eucariotos são unicelulares – entre eles, a levedura Saccharomyces cerevisiae, *a qual serve como um organismo-modelo simples para a biologia celular eucariótica, revelando a base molecular de processos fundamentais conservados, como o ciclo de divisão celular eucariótico. Um pequeno número de outros organismos tem sido escolhido como principal modelo para plantas e animais multicelulares, e o sequenciamento de seus genomas inteiros tem aberto caminho para análises metódicas e completas das funções dos genes, da regulação gênica e da diversidade gênica. Como resultado da duplicação gênica durante a evolução dos vertebrados, o genoma de vertebrados contém múltiplos homólogos intimamente relacionados para a maioria dos genes. Essa redundância genética tem permitido a diversificação e a especialização de genes para novos propósitos, mas também torna as funções gênicas mais difíceis de decifrar. Existe menos redundância genética no nematoide* Caenorhabditis elegans *e na mosca* Drosophila melanogaster, *os quais têm, portanto, desempenhado um papel-chave em revelar os mecanismos genéticos universais do desenvolvimento animal.*

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

1-1 Os genes da hemoglobina humana, que estão arranjados em grupos em dois cromossomos, fornecem um bom exemplo de um conjunto de genes ortólogos.

1-2 A transferência genética horizontal é mais predominante em organismos unicelulares do que em organismos multicelulares.

1-3 A maioria das sequências de DNA em um genoma bacteriano codifica proteínas, enquanto que a maioria das sequências no genoma humano não.

Discuta as seguintes questões.

1-4 Uma vez que o código genético foi decifrado há quatro décadas, alguns alegam que ele é um ancestral "congelado", enquanto outros têm afirmado que ele foi moldado por seleção natural. Uma característica notável do código genético é sua resistência inerente aos efeitos da mutação. Por exemplo, uma mudança na terceira posição de um códon geralmente especifica o mesmo aminoácido ou algum outro com as mesmas propriedades químicas. O código natural (espontâneo) resiste à mutação com mais eficiência (é menos suscetível ao erro) do que a maioria das outras versões possíveis, como ilustrado na **Figura Q1-1**. Apenas um entre um milhão de códigos gerados "ao acaso" pelo computador é mais resistente ao erro do que o código natural. A extraordinária resistência à mutação do código genético corrobora a favor de sua origem como um ancestral "congelado", ou como resultado da seleção natural? Explique o seu raciocínio.

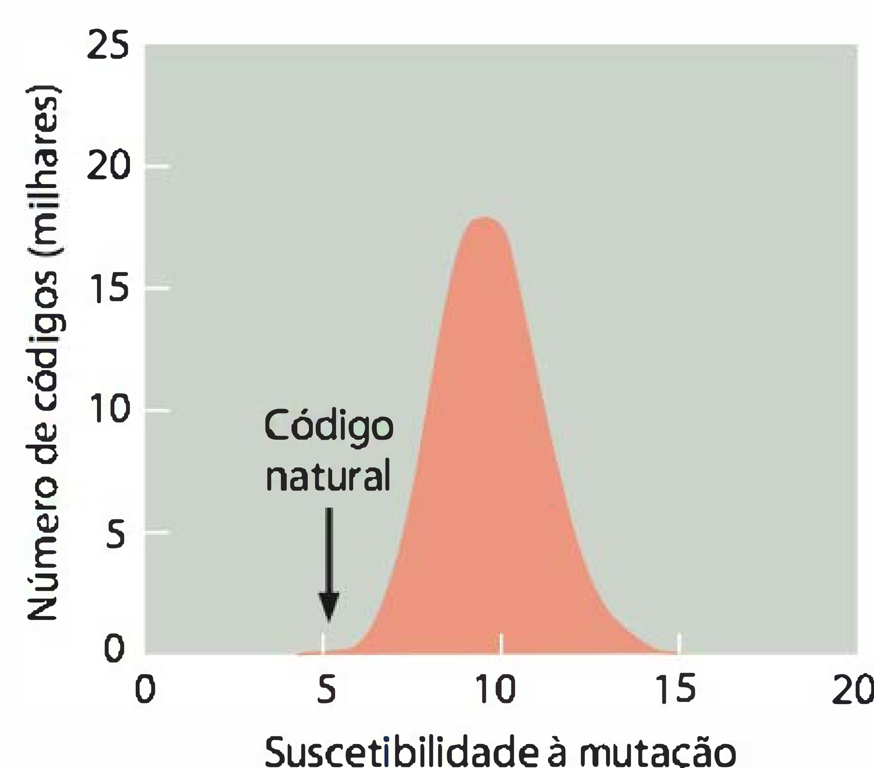


Figura Q1-1 A suscetibilidade do código natural referente a milhões de códigos gerados por computador (Questão 1-4). A suscetibilidade mede a média de mudanças nas propriedades dos aminoácidos causadas pelas mutações ao acaso. Um valor pequeno indica que as mutações tendem a causar mudanças menores. (Dados cortesia de Steven Freeland.)

1-5 Você começou a caracterizar uma amostra obtida das profundezas do oceano em um dos satélites de Júpiter. Para a sua surpresa, essa amostra contém uma forma de vida que cresce bem em um meio de cultura rico. A sua análise preliminar mostra que ela contém células, DNA, RNA e proteínas. Quando você mostra esse resul-

tado a um colega, ele insinua que a sua amostra foi contaminada com um organismo da Terra. Quais os métodos que se pode utilizar para distinguir entre contaminação e uma nova forma celular de vida com base em DNA, RNA e proteínas?

1-6 Não é tão difícil imaginar o que significa se alimentar de moléculas orgânicas que os organismos vivos produzem. Isto é, na verdade, o que fazemos. Mas o que significa "alimentar-se" da luz solar, como os organismos fototróficos fazem? Ou até mais estranho, "alimentar-se" de rochas, como os organismos litotróficos fazem? Onde está o "alimento", por exemplo, na mistura química (H_2S, H_2, CO, Mn^+, Fe^{2+}, Ni^{2+}, CH_4 e NH_4^+) expelida de uma fenda termal?

1-7 Quantas árvores (padrões dos ramos) podem ser desenhadas a partir de eubactérias, arquebactérias e eucariotos, assumindo que todos originaram-se de um mesmo ancestral comum?

1-8 Os genes para rRNA são altamente conservados (relativamente poucas mudanças na sequência) em todos os organismos na Terra; assim, eles evoluíram muito lentamente ao longo do tempo. Os genes de rRNA "nasceram" perfeitos?

1-9 Os genes que participam de processos informacionais, como replicação, transcrição e tradução, são transferidos entre espécies com muito menos frequência do que genes envolvidos no metabolismo. A base dessa desigualdade não está clara no momento, mas uma hipótese é que ela esteja relacionada à fundamental complexidade. Os processos informacionais tendem a envolver extensos agregados de produtos gênicos, nos quais as reações metabólicas em geral são catalisadas por enzimas compostas por uma só proteína. Por que a complexidade do processo fundamental – informacional ou metabólico – teria algum efeito na taxa de transferência horizontal gênica?

1-10 O processo de transferência gênica da mitocôndria para o genoma nuclear pode ser analisado em plantas. O gene respiratório *Cox2*, que codifica a subunidade 2 da citocromo-oxidase, foi funcionalmente transferido para o núcleo durante a evolução das plantas com flor. Análises extensivas de gêneros de plantas detectaram o tempo de surgimento da forma nuclear do gene e identificaram muitos intermediários semelhantes na principal perda do genoma mitocondrial. Um resumo da distribuição do gene *Cox2* entre mitocôndrias e núcleos, juntamente com os dados de transcrição, é mostrado em um contexto filogenético na **Figura Q1-2**.

A. Na hipótese de que a transferência do gene mitocondrial para o núcleo tenha ocorrido apenas uma vez (uma suposição sustentada pela estrutura dos genes nucleares), indique o ponto na árvore filogenética onde a transferência ocorreu.

B. Existem alguns exemplos de gêneros nos quais o gene transferido e o gene mitocondrial apareçam funcionais? Indique-os.

C. Qual é o número mínimo de vezes que o gene mitocondrial foi inativado ou perdido? Indique esses eventos na árvore filogenética.

D. Qual é o número mínimo de vezes que o gene nuclear foi inativado ou perdido? Indique esses eventos na árvore filogenética.

E. Com base nesta informação, proponha um esquema geral para a transferência dos genes mitocondriais para o genoma nuclear.

1-11 Quando os genes de hemoglobina das plantas foram descobertos pela primeira vez em legumes, foi tão surpreendente encontrar um gene típico do sangue animal que sugeriu-se que o gene em plantas surgiu por transferência horizontal de um animal. Agora, mais genes de hemoglobina foram sequenciados, e uma árvore filogenética com base em algumas dessas sequências é mostrada na **Figura Q1-3**.

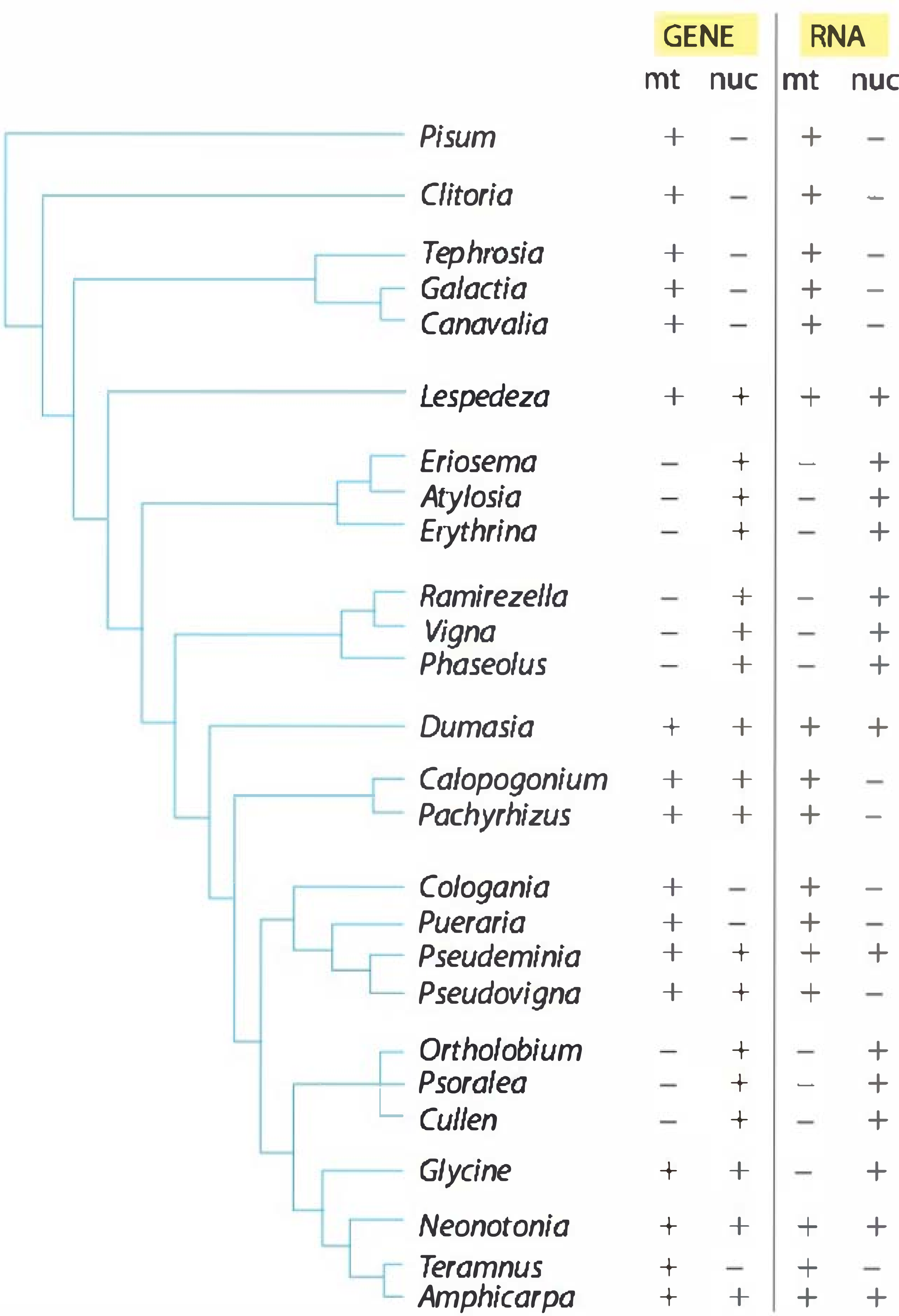


Figura Q1-2 Resumo da distribuição do gene *Cox2* e dados de transcrição em um contexto filogenético (Questão 1-10). A presença do gene íntegro ou transcrito funcional está indicada por (+); a ausência de um gene íntegro ou transcrito funcional está indicada por (−). mt, mitocôndrias; nc, núcleos.

A. Esta árvore corrobora ou contesta a hipótese de que as hemoglobinas de plantas surgiram por transferência horizontal?

B. Supondo que os genes das hemoglobinas de plantas derivaram originalmente, por exemplo, de um nematoide parasita, como você esperaria que a árvore filogenética parecesse?

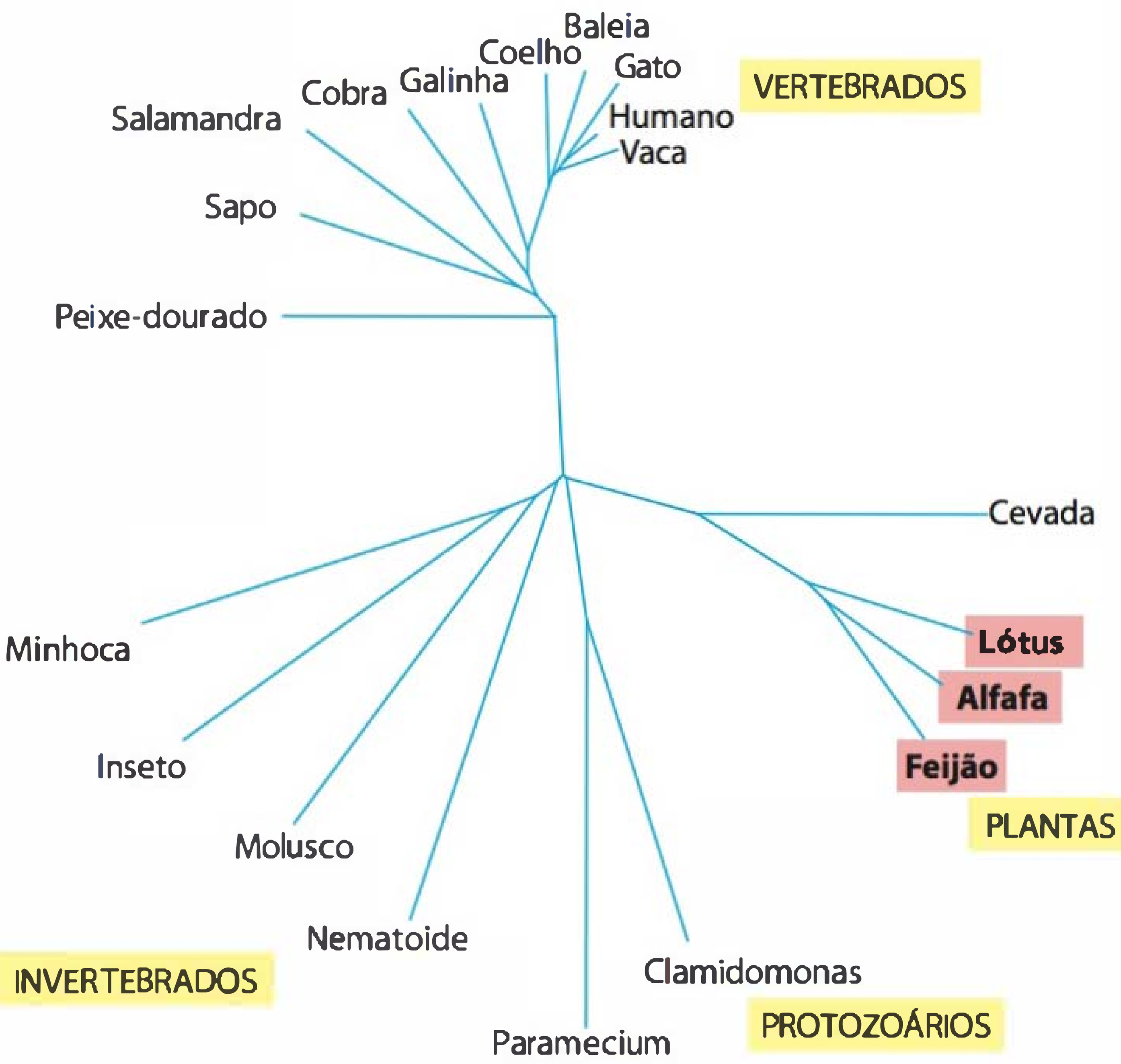


Figura Q1-3 Árvore filogenética dos genes de hemoglobina de uma variedade de espécies (Questão 1-11). Os legumes estão destacados em vermelho.

1-12 As taxas de evolução parecem variar em diferentes linhagens. Por exemplo, a taxa de evolução na linhagem do rato é significativamente maior do que na linhagem humana. Essa diferença na taxa é evidente se alguém olhar as mudanças em sequências de proteínas que estão sujeitas à pressão de seleção, ou as mudanças nas sequências de nucleotídeos não-codificantes que, obviamente, não estão sob evidente pressão de seleção. Você pode fornecer uma ou mais explicações para a menor taxa de trocas evolutivas na linhagem humana em comparação à linhagem do rato?

REFERÊNCIAS

Gerais

Alberts B, Bray D, Hopkin K et al (2004) Essential Cell Biology, 2nd ed. New York: Garland Science.

Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA et al (2007) Evolution. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Darwin C (1859) On the Origin of Species. London: Murray.

Graur D & Li W-H (1999) Fundamentals of Molecular Evolution, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Madigan MT & Martinko JM (2005) Brock's Biology of Microorganisms, 11th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Margulis L & Schwartz KV (1998) Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 3rd ed. New York: Freeman.

Watson JD, Baker TA, Bell SP et al (2007) Molecular Biology of the Gene, 6th ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings.

Características universais das células na Terra

Andersson SGE (2006) The bacterial world gets smaller. *Science* 314:259–260.

Brenner S, Jacob F & Meselson M (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.

Fraser CM, Gocayne JD, White O et al (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397–403.

Harris JK, Kelley ST, Spiegelman et al (2003)The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res* 13:407–413.

Koonin EV (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* 39:309–338.

Watson JD & Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738.

Yusupov MM,Yusupova GZ, Baucom A et al (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292:883–896.

A diversidade dos genomas e a árvore da vida

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA et al (1997)The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1474.

Boucher Y, Douady CJ, Papke RT et al (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu Rev Genet* 37:283–328.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.

Dixon B (1994) Power Unseen: How Microbes Rule the World. Oxford: Freeman.

Kerr RA (1997) Life goes to extremes in the deep earth—and elsewhere? *Science* 276:703–704.

Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F et al (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298:799–804.

Olsen GJ & Woese CR (1997) Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89:991–994.

Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734–740.

Woese C (1998) The universal ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6854–6859.

Informação genética em eucariotos

Adams MD, Celniker SE, Holt RA et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO et al (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133–140.

The *Arabidopsis* Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.

Carroll SB, Grenier JK & Weatherbee SD (2005) From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design, 2nd ed. Maldon, MA: Blackwell Science.

de Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395-403.

Delsuc F, Brinkmann H & Philippe H (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Rev Genet* 6:361–375.

DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H et al (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546–567.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

Kellis M, Birren BW & Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:617–624.

Lynch M & Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151–1155.

Mulley J & Holland P (2004) Comparative genomics: Small genome, big insights. *Nature* 431:916–917.

National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Owens K & King MC (1999) Genomic views of human history. *Science* 286:451–453.

Palmer JD & Delwiche CF (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7432–7435.

Pennisi E (2004) The birth of the nucleus. *Science* 305:766–768.

Plasterk RH (1999) The year of the worm. *BioEssays* 21:105–109.

Reed FA & Tishkoff SA (2006) African human diversity, origins and migrations. *Curr Opin Genet Dev* 16:597–605.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR et al (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204–2215.

Stillman B & Stewart D (2003) The genome of *Homo sapiens*. (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. LXVIII). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.

Tinsley RC & Kobel HR (eds) (1996) The Biology of *Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.

Tyson JJ, Chen KC & Novak B (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* 15:221–231.

Venter JC, Adams MD, Myers EW et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.

Química Celular e Biossíntese

2

Em um primeiro momento, é difícil aceitar a ideia de que cada um dos organismos vivos descritos no Capítulo 1 seja meramente um sistema químico. A inacreditável diversidade das formas vivas, com comportamentos aparentes de autodeterminação e a habilidade de crescer e se reproduzir, parece colocar os organismos vivos à parte do mundo dos sólidos, dos líquidos e dos gases normalmente descritos pela química. Realmente, até o século XIX foi amplamente aceito que os animais tinham uma força vital – um *animus* – que seria responsável pelas suas propriedades características.

Sabe-se agora que não há nada nos organismos vivos que desobedeça às leis da química e da física. Não obstante, a química da vida é especial. Primeiro, ela está baseada fundamentalmente em compostos de carbono, cujo estudo, por isso, é chamado de *química orgânica*. Segundo, as células são constituídas de 70% de água, e a vida depende quase que exclusivamente de reações químicas que ocorrem em soluções aquosas. Terceiro, e mais importante, a química das células é bastante complexa, sendo que mesmo a mais simples das células tem uma química muitas vezes mais complicada do que qualquer outro sistema químico conhecido. Embora as células possuam uma variedade de moléculas pequenas contendo carbono, a maior parte dos átomos de carbono de uma célula está incorporada em *moléculas poliméricas* enormes. Essas moléculas são formadas por cadeias com subunidades químicas ligadas pelas extremidades das subunidades. As propriedades únicas dessas macromoléculas permitem que as células e os organismos cresçam, se reproduzam e façam todas as outras coisas que são peculiares à vida.

Neste capítulo

OS COMPONENTES QUÍMICOS DA CÉLULA 45

CATÁLISE E O USO DE ENERGIA PELAS CÉLULAS 65

COMO AS CÉLULAS OBTÊM ENERGIA DOS ALIMENTOS 88

OS COMPONENTES QUÍMICOS DA CÉLULA

A matéria é feita da combinação de *elementos* – substâncias como o hidrogênio e o carbono que não podem ser decompostas ou convertidas em outras substâncias utilizando-se meios químicos. A menor partícula de qualquer elemento que ainda retém as propriedades químicas características do elemento é o *átomo* (**Figura 2-1**). Entretanto, as características de substâncias que não sejam os elementos puros (incluindo os materiais pelos quais as células são feitas) dependem da maneira pela qual os seus átomos estão ligados em grupos, formando *moléculas*. Portanto, para compreender como os seres vivos são formados a partir da matéria inanimada é essencial saber como são formadas as ligações que mantêm os átomos das moléculas unidos.

As células são formadas por poucos tipos de átomos

O **peso atômico** de um átomo, ou o **peso molecular** de uma molécula, é a sua massa em relação à massa do átomo de hidrogênio. Essencialmente, isso é igual ao número de prótons mais o número de nêutrons que o átomo ou a molécula contém, uma vez que os elétrons são muito leves e sua contribuição para o peso total é praticamente nula. Assim, o principal isótopo do carbono tem um peso atômico de 12, sendo simbolizado por ^{12}C, enquanto que o isótopo do carbono que tem um peso atômico de 14 é escrito como ^{14}C. A massa de um átomo ou molécula frequentemente é especificada em *dáltons* (D), sendo que um dálton é uma unidade de massa atômica aproximadamente igual à massa de um átomo de hidrogênio.

Os átomos são tão pequenos que é difícil imaginar seus tamanhos. Um átomo de carbono tem um diâmetro de cerca 0,2 nm, de modo que é necessário mais de 5 milhões deles, colocados em linha reta, para atingir um milímetro. Um próton, ou um nêutron, pesa aproximadamente $1/(6 \times 10^{23})$ gramas. Assim, um grama de hidrogênio contém 6×10^{23} átomos. Esse número enorme (6×10^{23}), chamado de **número de Avogadro**, é o fator-chave na escala que descreve as relações entre as grandezas da vida quotidiana e as grandezas medidas

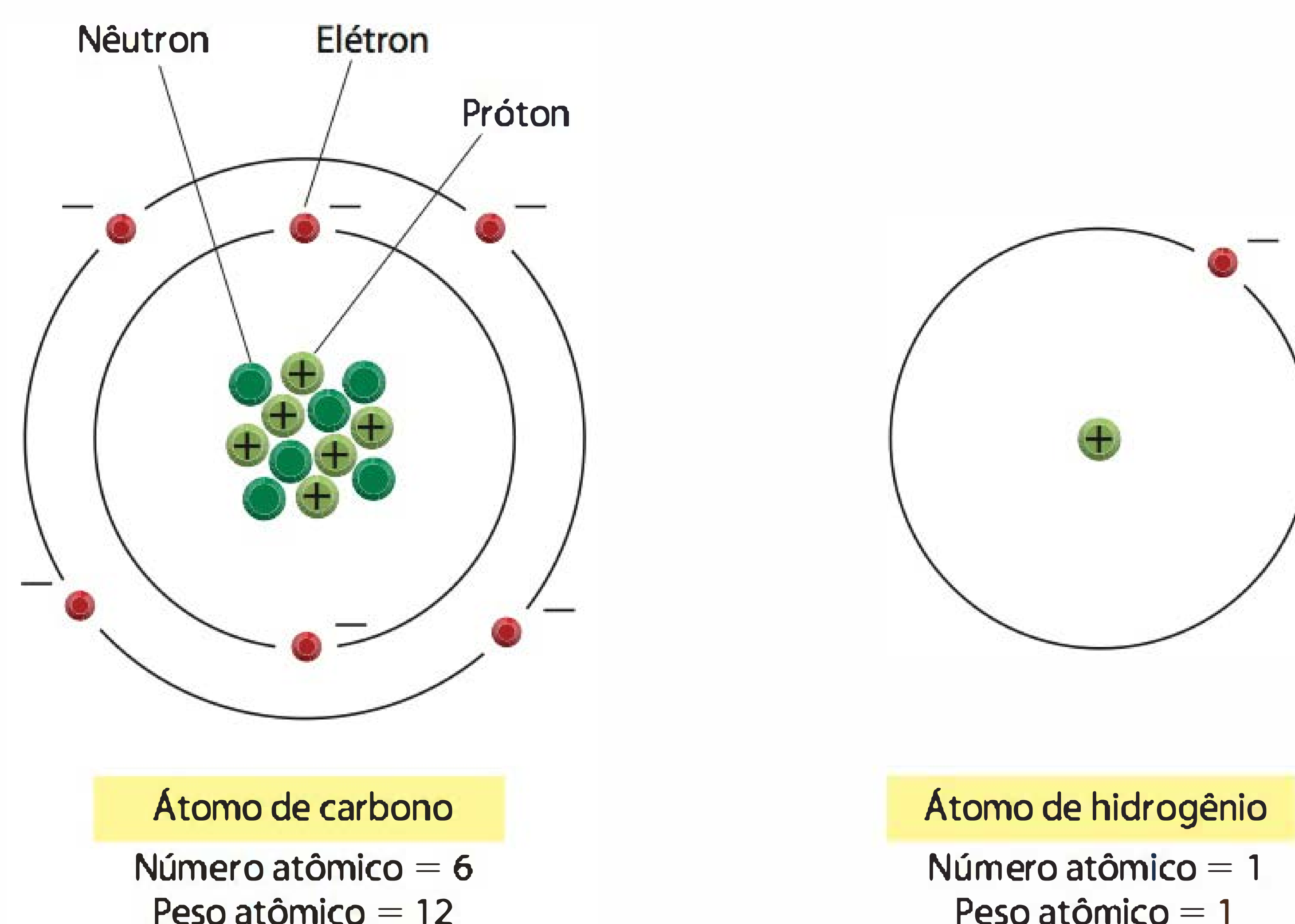


Figura 2-1 Representação altamente esquemática dos átomos de carbono e de hidrogênio. O *núcleo* de cada átomo, exceto do átomo de hidrogênio, consiste em *prótons*, carregados positivamente, e em *nêutrons*, eletricamente neutros. O número de elétrons de um átomo é igual ao número de prótons (o *número atômico*), de maneira que o átomo não tem carga líquida. Uma vez que são os elétrons que determinam o comportamento químico de um átomo, todos os átomos de um mesmo elemento têm o mesmo número atômico.

Os nêutrons são partículas subatômicas não carregadas que, essencialmente, possuem a mesma massa dos prótons. Eles contribuem para a estabilidade estrutural do núcleo; caso sejam muitos ou poucos, o núcleo pode desintegrar-se por decaimento radiativo, mas eles não alteram as propriedades químicas dos átomos. Devido aos nêutrons, um elemento pode existir em várias formas fisicamente distinguíveis, mas quimicamente iguais, denominadas *isótopos*. Cada isótopo tem um número diferente de nêutrons, mas o mesmo número de prótons. Vários isótopos de praticamente cada um dos elementos ocorrem naturalmente, incluindo alguns que são instáveis. Por exemplo, embora a maior parte do carbono existente na Terra exista como o isótopo estável carbono 12, com seis prótons e seis nêutrons, existe também pequena quantidade de um isótopo instável, o carbono 14, que é radiativo e cujos átomos têm seis prótons e oito nêutrons. O carbono 14 sofre decaimento radiativo a uma velocidade pequena, mas constante. Isso constituiu a base da técnica conhecida como datação por carbono 14, usada em arqueologia para terminar o tempo em que determinada matéria orgânica foi formada.

Os nêutrons, os prótons e os elétrons são, na realidade, diminutos em relação ao átomo como um todo. Os seus tamanhos estão bastante exagerados nesta figura. Na realidade, o diâmetro do núcleo tem apenas 10^{-4} vezes o diâmetro da nuvem eletrônica. Finalmente, embora os elétrons estejam representados como partículas individuais, na realidade o seu comportamento é governado pelas leis da mecânica quântica, e não há maneira de predizer exatamente onde um elétron esteja em determinado instante de tempo.

em termos de átomos ou moléculas individuais. Se uma substância tiver um peso molecular de X, 6×10^{23} moléculas da substância têm uma massa de X gramas. Essa quantidade é denominada **mol** da substância (**Figura 2-2**).

Existem 89 elementos de ocorrência natural, cada um diferindo dos demais pelo número de prótons e elétrons dos seus átomos. Os organismos vivos, entretanto, são feitos de somente uma pequena seleção de elementos, sendo que quatro deles – carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O) – perfazem 96,5% do peso de um organismo. Essa composição é bem diferente daquela do ambiente inorgânico não-vivo (**Figura 2-3**), sendo uma das evidências de um tipo distinto de química.

Os elétrons localizados nas posições mais externas determinam como os átomos interagem

Para entender como os átomos ligam-se entre si para formar as moléculas que compõem os organismos vivos, devemos prestar atenção especial aos seus elétrons. Os prótons e os elétrons são mantidos firmemente unidos uns aos outros no núcleo e trocam de parceiro somente em condições extremas, como durante o decaimento radiativo, no interior do sol, ou então, no interior de um reator nuclear. Nos tecidos vivos, apenas os elétrons dos átomos podem sofrer rearranjos. Os elétrons formam o exterior de um átomo e determinam as regras da química segundo as quais os átomos se combinam, formando assim as moléculas.

Os elétrons estão permanentemente movimentando-se ao redor do núcleo. Entretanto, nesse nível submicroscópico, a motilidade obedece a leis diferentes daquelas com que se está acostumado na vida do dia a dia. Essas leis determinam que, em um átomo, os elétrons somente poderão existir em determinados estados, chamados de orbitais, e que há um limite no número de elétrons que pode ser acomodado em um orbital de determinado tipo, a assim denominada *camada eletrônica*. Os elétrons que, em média, estão mais próximos ao núcleo, que tem carga positiva, são atraídos mais fortemente pelo núcleo e ocupam a região mais interna, estando ligados mais firmemente à camada eletrônica. Essa camada pode conter, no máximo, dois elétrons. A segunda camada está mais afastada do núcleo e seus elétrons estão ligados menos firmemente. Essa segunda camada pode conter até oito elétrons. A terceira camada contém elétrons que estão ligados ao núcleo ainda menos firmemente e também pode conter até oito elétrons. A quarta e a quinta camadas podem conter 18 elétrons cada uma. A presença de átomos que contenham mais do que quatro camadas é muito rara nas moléculas biológicas.

O arranjo eletrônico de um átomo é mais estável quando todos os seus elétrons estiverem no estado em que lhes seja possível estarem ligados mais firmemente, isto é, quando ocupam a camada mais interna. Portanto, com certas exceções no caso de átomos muito grandes, os elétrons de um átomo preenchem os orbitais ordenadamente: a primeira camada antes da segunda, a segunda antes da terceira, e assim por diante. O átomo cuja camada mais externa esteja preenchida completamente por elétrons é particularmente estável e, portanto, quimicamente inerte. Como exemplo, temos o hélio, que possui dois elétrons, o neon, que possui 2 + 8, e o argônio, que possui 2 + 8 + 8. Todos esses três elementos são gases inertes. Diferentemente, o hidrogênio, que possui apenas um elétron e, consequentemente, apenas meia camada preenchida, é extremamente reativo. De maneira semelhante, todos os outros átomos presentes nos tecidos vivos têm suas camadas eletrônicas mais

externas incompletas e, assim, podem doar, aceitar ou compartilhar elétrons entre si, para formarem moléculas e íons (**Figura 2-4**).

Uma vez que camadas eletrônicas que não estão totalmente preenchidas são menos estáveis do que camadas totalmente preenchidas, os átomos que possuem uma camada mais externa incompleta têm uma tendência maior a interagirem com outros átomos, de modo a ganharem ou perderem certo número de elétrons e, então, completarem a sua camada eletrônica mais externa. Essa troca de elétrons pode ocorrer tanto por transferência de elétrons de um átomo a outro, quanto pelo compartilhamento de elétrons entre dois átomos. Essas diferentes estratégias levam a dois tipos de **ligação química** entre os átomos. Quando os elétrons são doados de um átomo a outro, há a formação de uma *ligação iônica*; quando dois átomos compartilham um mesmo par de elétrons, há a formação de uma *ligação covalente* (**Figura 2-5**). Frequentemente, o compartilhamento do par de elétrons não é equânime. Portanto, pode haver uma transferência parcial de elétrons entre os átomos, pois eles têm capacidades diferentes de atrair elétrons – um é mais *eletronegativo* que o outro. Dessa estratégia intermediária resulta uma *ligação covalente polar*, que será vista mais adiante.

O átomo de H, que precisa somente de um elétron a mais para completar sua camada, geralmente adquire esse elétron por compartilhamento. Com isso, forma uma ligação covalente com algum outro átomo que, em muitos casos, é uma ligação covalente polar. Nas células vivas, os átomos que geralmente completam suas respectivas camadas mais externas de oito elétrons pelo compartilhamento de elétrons, formando ligações covalentes, são C, N e O (possuem a segunda camada incompleta) e P e S (possuem a terceira camada incompleta) (ver Figura 2-4). O número de elétrons que um átomo pode adquirir ou perder, tanto por compartilhamento quanto por transferência, para completar sua camada mais externa, é conhecido como *valência*.

O papel fundamental da camada mais externa na determinação das propriedades químicas de um elemento significa que, quando os elementos são listados segundo a ordem crescente dos seus números atômicos, há uma periodicidade de elementos com propriedades semelhantes. Um elemento que tem a segunda camada incompleta contendo um elétron comporta-se praticamente da mesma maneira que um elemento que tem sua segun-

Um mol é X gramas de uma substância, onde X é sua massa molecular relativa (peso molecular). Um mol contém 6×10^{23} moléculas da substância.

1 mol de carbono pesa 12 g.
1 mol de glicose pesa 180 g.
1 mol de cloreto de sódio pesa 58 g.

Uma solução molar tem uma concentração de 1 mol de substância por litro de solução. Uma solução molar (notação: 1 M) de glicose, por exemplo, tem 180 g/L, enquanto que uma solução milimolar (1 mM) tem 180 mg/L.

A abreviação-padrão para grama é g; a abreviação para litro é L.

Figura 2-2 Mol e solução molar.

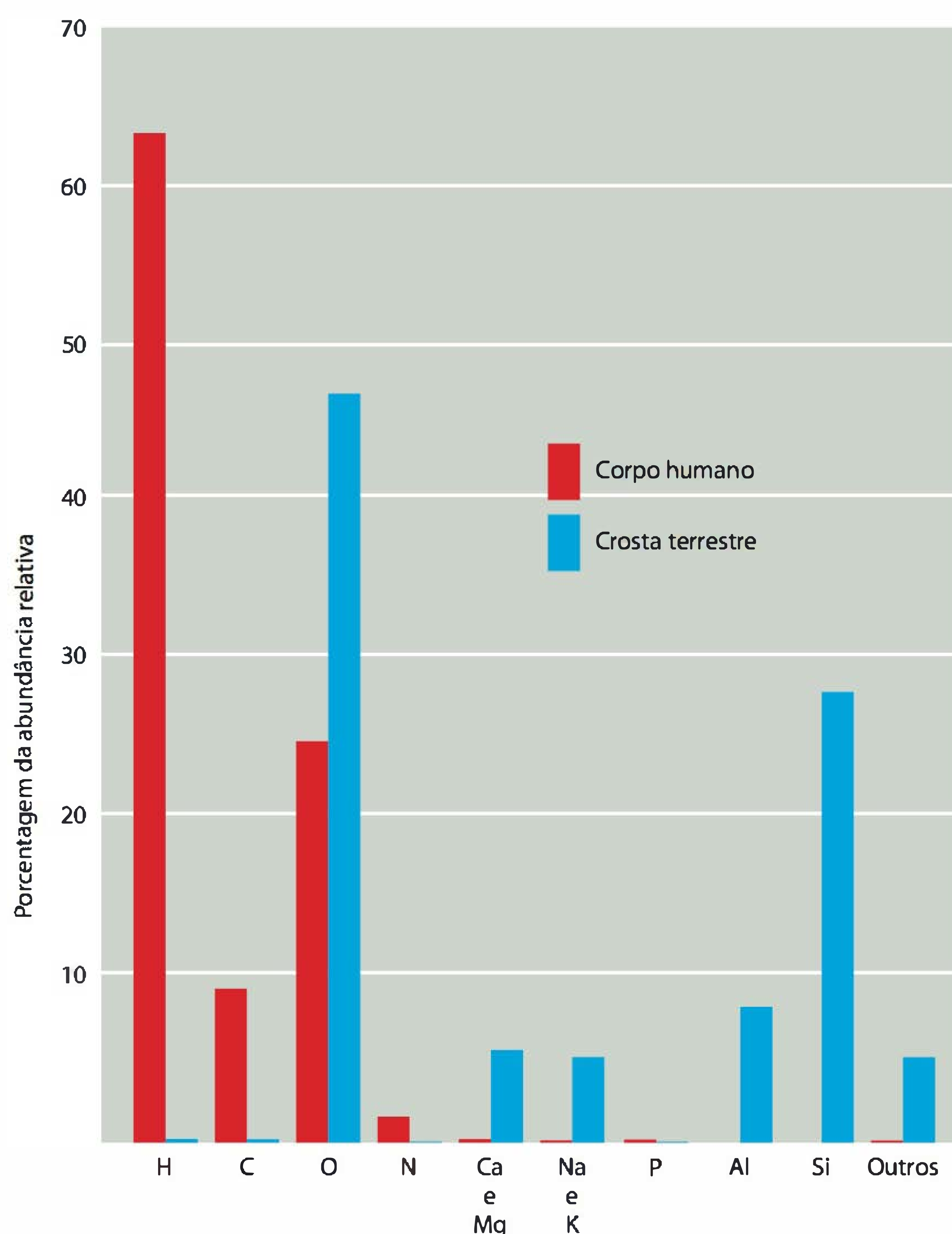


Figura 2-3 Comparação entre a abundância de alguns elementos químicos no mundo inanimado (a crosta terrestre) e nos tecidos animais. A abundância de cada elemento está expressa como porcentagem do número total de átomos presentes, incluindo a água. Assim, devido à abundância da água, mais de 60% dos átomos de um ser vivo são átomos de hidrogênio. A abundância relativa dos elementos é semelhante em todos os seres vivos.

Figura 2-4 Camadas eletrônicas completamente preenchidas e incompletas nos elementos mais comuns. Todos os elementos geralmente encontrados nos seres vivos têm suas camadas eletrônicas mais externas incompletas (*vermelho*), de modo que podem participar de reações químicas com outros átomos. Para efeito comparativo, estão mostrados alguns elementos que possuem apenas camadas completamente preenchidas (*amarelo*). Esses elementos são quimicamente não-reativos.

Número atômico

Número atômico	elemento	Camada eletrônica I	II	III	IV
1	Hidrogênio	●			
2	Hélio	●●			
6	Carbono	●●	●●●●		
7	Nitrogênio	●●	●●●●●		
8	Oxigênio	●●	●●●●●●		
10	Neon	●●	●●●●●●●●		
11	Sódio	●●	●●●●●●●●	●	
12	Magnésio	●●	●●●●●●●●	●●	
15	Fósforo	●●	●●●●●●●●	●●●●●	
16	Enxofre	●●	●●●●●●●●	●●●●●●	
17	Cloro	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●	
18	Argônio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	
19	Potássio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●
20	Cálcio	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●

da camada totalmente preenchida e a terceira camada incompleta, também contendo um elétron. Os metais, por exemplo, tem suas camadas mais externas incompletas, contendo apenas um ou poucos elétrons, enquanto que, como visto anteriormente, os gases inertes têm suas camadas mais externas totalmente preenchidas. Esse padrão origina a famosa *tabela periódica* dos elementos, mostrada na **Figura 2-6**, na qual os elementos presentes nos organismos vivos estão em negrito.

As ligações covalentes são formadas por compartilhamento de elétrons

Todas as características de uma célula dependem das moléculas que ela possui. Uma **molécula** é definida como um agregado de átomos mantidos unidos por meio de **ligações covalentes**, isto é, os átomos completam suas camadas mais externas por compartilhamento de elétrons e não pela troca de elétrons entre si. Na molécula mais simples que pode existir, a molécula de hidrogênio (H_2), dois átomos de H, cada um com um elétron único, compartilham dois elétrons, que é o numero necessário para completar a primeira camada. Esses elétrons compartilhados formam uma nuvem de carga negativa que é mais densa na região entre os dois núcleos de carga positiva e que ajuda a manter os átomos unidos, em oposição à repulsão natural entre cargas iguais que forçaria os átomos a se afastarem. As forças de atração e as de repulsão estão balanceadas quando os núcleos ficam afastados um do outro por uma distância característica, chamada de *comprimento de ligação*.

Uma outra propriedade das ligações, tanto covalentes como não-covalentes, é a *força de ligação*. A força de ligação é medida pela quantidade de energia que deve ser fornecida para romper a ligação. A unidade na qual ela geralmente é expressa é quilocaloria por mol

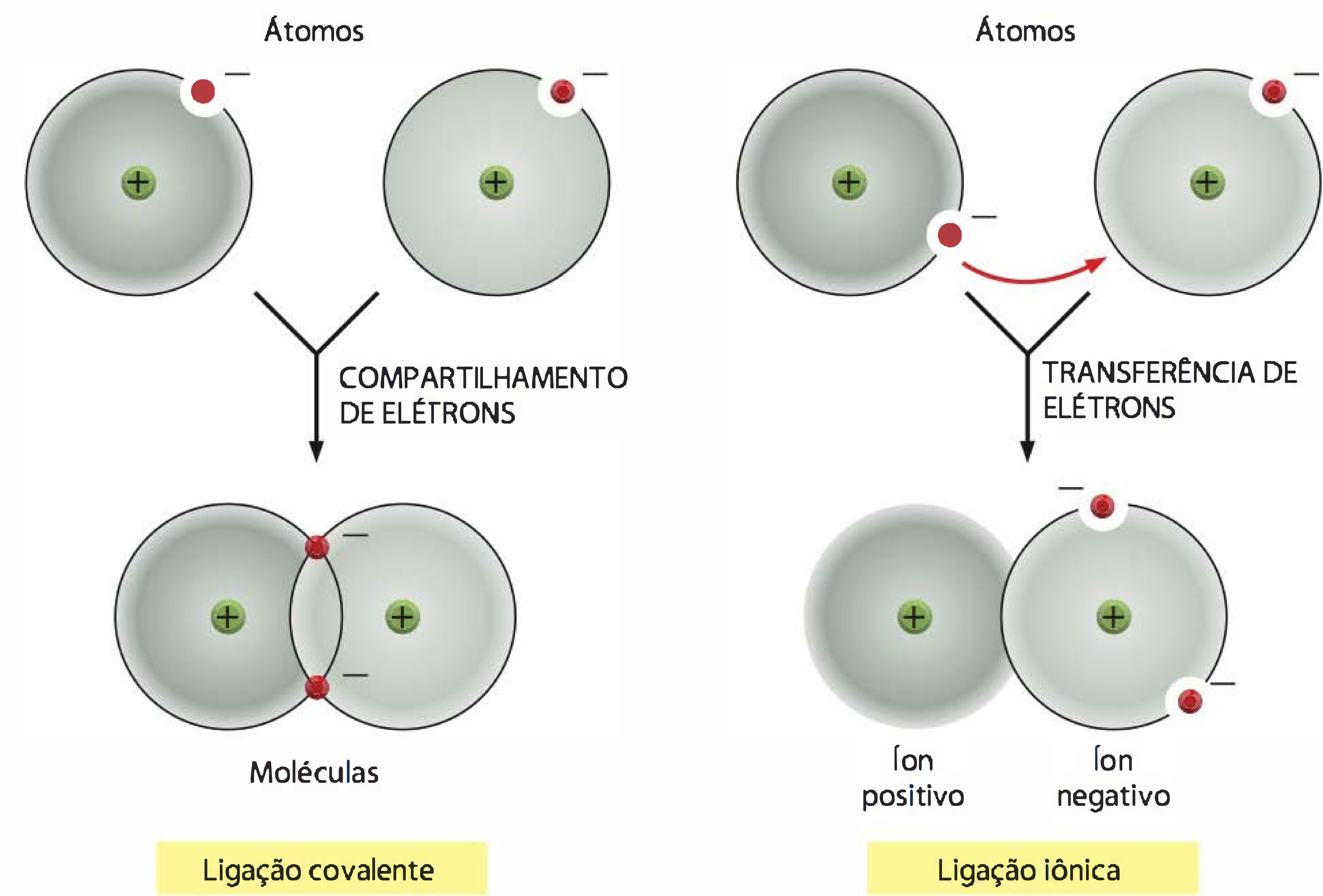


Figura 2-5 Comparação entre ligação covalente e ligação iônica. Um átomo pode atingir um arranjo de elétrons mais estável na sua última camada por meio de interações com outro átomo. Forma-se uma ligação iônica quando há transferência de elétrons de um átomo a outro. Quando os átomos compartilham elétrons, há formação de uma ligação covalente. Os dois casos apresentados nesta figura representam casos extremos. Frequentemente, formam-se ligações covalentes pela transferência parcial (compartilhamento não-equânime de elétrons), o que resulta na formação de uma ligação covalente polar (ver Figura 2-43).

Figura 2-6 Elementos em ordem segundo seus números atômicos formam a tabela periódica. Os elementos se encaixam em grupos com propriedades similares com base no número de elétrons que cada elemento possui em sua camada mais externa. Por exemplo, Mg e Ca têm a tendência de doarem os dois elétrons de suas camadas mais externas; C, N e O completam suas segundas camadas por compartilhamento de elétrons. Os quatro elementos destacados em *vermelho* constituem 99% do total do número de átomos no corpo humano. Os sete elementos destacados em *azul*, em conjunto, representam 0,9% do total. Outros elementos, destacados em *verde*, são necessários em quantidades-traço pelo homem. Permanece incerto se os elementos mostrados em *amarelo* são essenciais ou não para os humanos. Parece que a química da vida é, portanto, predominantemente a química dos elementos mais leves.

Os pesos atômicos, de acordo com a soma dos prótons e dos neutros do núcleo do átomo, variam para cada isótopo do elemento. Os pesos atômicos mostrados são os do isótopo mais comum de cada um dos elementos.

(kcal/mol), sendo que uma quilocaloria é a quantidade de energia necessária para elevar a temperatura de um litro de água em um grau Celsius (centígrado). Assim, se para romper 6×10^{23} ligações de determinado tipo (isto é, um mol de ligações) é necessário 1 kcal, a força dessa ligação é 1 kcal/mol. Uma unidade equivalente, bastante usada, é o quilo joule, que vale 0,239 kcal.

Para entender o significado da força de ligação, é útil compará-la à energia média dos impactos que as moléculas sofrem constantemente quando colidem com outras moléculas presentes em seu ambiente (energia térmica ou calor) e, também, com outras fontes de energia biológica, como a energia luminosa e a oxidação da glicose (**Figura 2-7**). Tipicamente, as ligações covalentes são cem vezes mais fortes que as energias térmicas (energia cinética), de modo que resistem ao rompimento por movimentos térmicos e, normalmente, só são rompidas por meio de reações químicas específicas com outras moléculas. A formação e a quebra de ligações covalentes são eventos violentos e, nas células vivas, são controladas cuidadosamente por catalisadores altamente específicos, chamados de *enzimas*. Como regra geral, as ligações não-covalentes são muito mais fracas. Como será visto adiante, elas têm importância para as células em muitas situações nas quais, para cumprirem determinadas funções, as moléculas devem associar-se e dissociar-se.

Enquanto um átomo de H pode formar uma única ligação covalente, os outros átomos, que nas células, participam de ligações covalentes (O, N, S e P, bem como o importantíssimo átomo de C), podem formar várias ligações. A camada mais externa desses átomos, como visto anteriormente, pode acomodar até oito elétrons, que formam ligações covalentes com tantos outros átomos quanto for necessário para que esse número de elétrons seja atingido. O oxigênio, que tem seis elétrons na última camada, é mais estável quando adquire dois elétrons extras pelo compartilhamento de elétrons com outros átomos, formando, consequentemente, até duas ligações covalentes. O nitrogênio, com cinco elétrons na camada mais externa, pode formar um máximo de três ligações covalentes, enquanto o carbono, com quatro elétrons na camada mais externa, pode formar até quatro ligações covalentes, compartilhando, assim, quatro pares de elétrons (ver Figura 2-4).

Quando um átomo forma ligações covalentes com vários outros átomos, essas ligações múltiplas têm orientações bem-definidas no espaço, umas em relação às outras, e refletem as orientações das órbitas dos elétrons que são compartilhados. As ligações covalentes entre vários átomos são, portanto, caracterizadas tanto por ângulos de ligação específicos quanto pelos comprimentos de ligações e pelas energias de ligação (**Figura 2-8**). As quatro ligações covalentes que podem se formar ao redor de um átomo de carbono, por exemplo, estão organizadas como se fossem as pontas dos quatro cantos de um tetraedro regular. A orientação precisa das ligações covalentes forma a base da geometria tridimensional das moléculas orgânicas.

Figura 2-7 Algumas energias importantes para as células. Observe que essas energias estão comparadas em escala logarítmica.

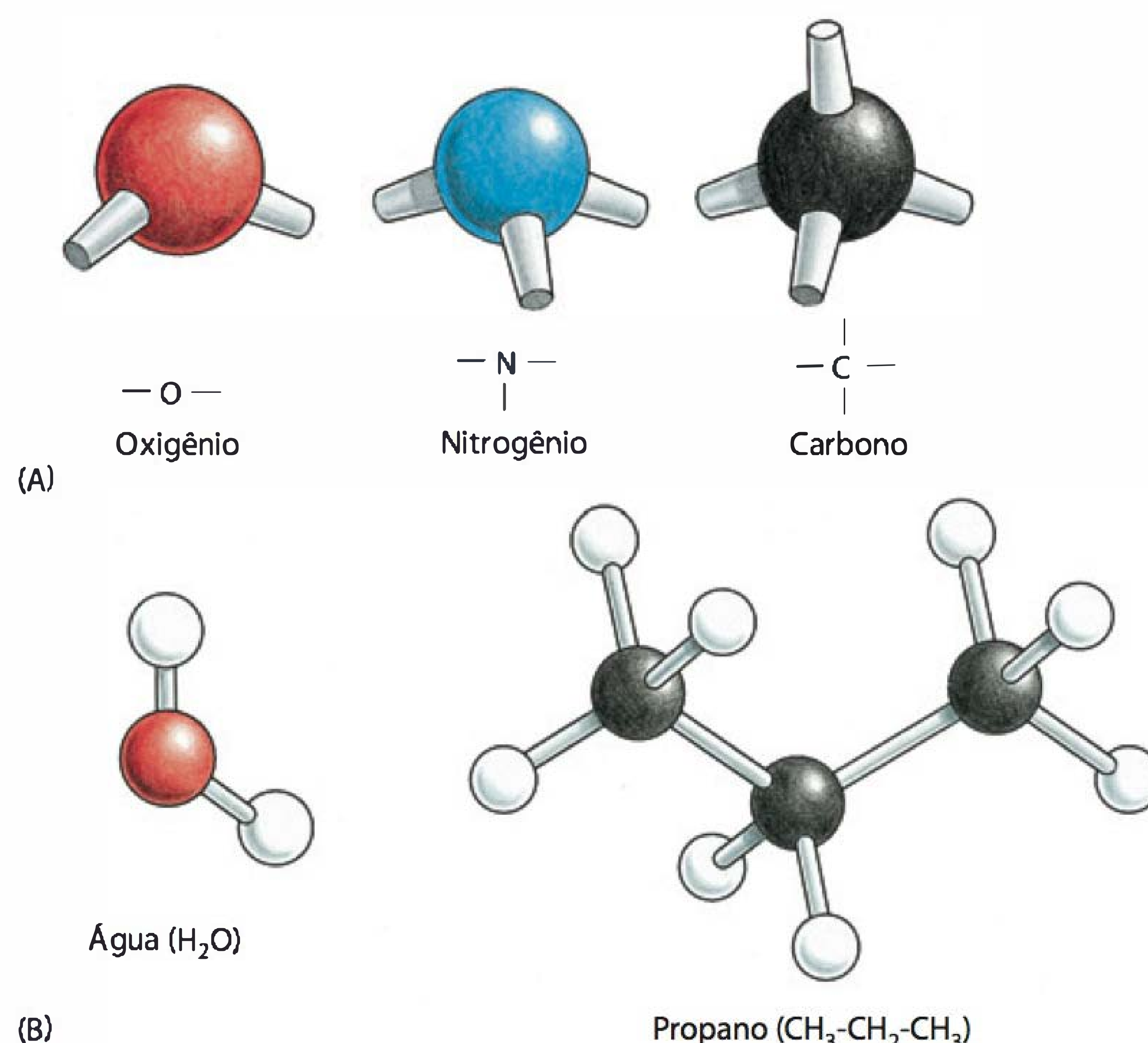


Figura 2-8 Geometria das ligações covalentes. (A) Arranjo espacial das ligações covalentes que podem ser formadas por oxigênio, nitrogênio e carbono. (B) As moléculas formadas por esses átomos têm uma estrutura tridimensional precisa, mostrada segundo o modelo de esfera e bastão da água e do propano. Uma estrutura pode ser especificada a partir dos valores dos ângulos e do comprimento de cada ligação covalente. Os átomos estão coloridos de acordo com a convenção geralmente usada: H, *branco*; C, *preto*; O, *vermelho*; N, *azul*.

Existem diferentes tipos de ligações covalentes

Muitas ligações covalentes envolvem o compartilhamento de dois elétrons; cada um dos átomos participantes doa um elétron. Essas ligações são chamadas de *ligações simples*. Algumas ligações covalentes, entretanto, envolvem o compartilhamento de mais do que um par de elétrons. Por exemplo, quatro elétrons podem ser compartilhados, sendo que cada um dos átomos participantes contribui com dois elétrons. Uma ligação dessas é chamada de *ligação dupla*. A ligação dupla é mais curta e mais forte que a ligação simples e provoca um efeito característico na geometria tridimensional das moléculas que a possuir. Em geral, uma ligação simples entre dois átomos permite que uma parte da molécula gire (em relação à outra parte da molécula) ao redor do eixo de ligação. Uma ligação dupla impede tal rotação, produzindo um arranjo de átomos mais rígido e menos flexível (**Figura 2-9** e Painel 2-1, p. 106-107).

Em algumas moléculas, os elétrons são compartilhados com três e até mais átomos, produzindo ligações com um caráter híbrido intermediário entre ligação simples e ligação dupla. Por exemplo, a molécula do benzeno, que é altamente estável, consiste em um anel de seis átomos de carbono nos quais os elétrons das ligações estão equitativamente distribuídos (embora em geral essa molécula seja representada por sequências alternadas de ligações simples e duplas, como mostrado no Painel 2-1).

Quando os átomos que são unidos por uma ligação covalente simples pertencem a elementos diferentes, geralmente atraem os elétrons compartilhados com graus diferentes. Por exemplo, em comparação com o átomo de C, os átomos de O e N atraem elétrons mais fortemente, ao passo que o átomo de H atrai elétrons mais fracamente. Por definição, uma estrutura **polar** (no sentido elétrico) é uma estrutura com uma carga positiva concentrada ao redor de uma das extremidades (o polo positivo) e uma carga negativa, que se concentra ao redor da outra extremidade (o polo negativo). Por isso, as ligações covalentes, nas quais os elétrons são compartilhados de maneira não-equitativa, são conhecidas como *ligações covalentes polares* (**Figura 2-10**). Por exemplo, a ligação covalente entre oxigênio e hidrogênio, –O–H, ou entre nitrogênio e hidrogênio, –N–H, é polar, enquanto que naquela entre carbono e hidrogênio, –C–H, os elétrons são atraídos pelos átomos muito mais equitativamente e ela é relativamente não-polar.

As ligações covalentes polares têm enorme importância biológica, pois criam *dipolos permanentes*, permitindo, assim, que a interação entre as moléculas ocorra por meio de forças elétricas. Qualquer molécula grande, que contenha muitos grupos polares, terá uma superfície com um padrão de distribuição de cargas parcialmente positivas e parcialmente negativas. Quando uma molécula dessas encontrar uma segunda molécula que possua um conjunto de cargas complementares, as duas poderão sofrer atração recíproca por meio de interações eletrostáticas que se assemelham (mas são mais fracas) às ligações iônicas consideradas anteriormente.

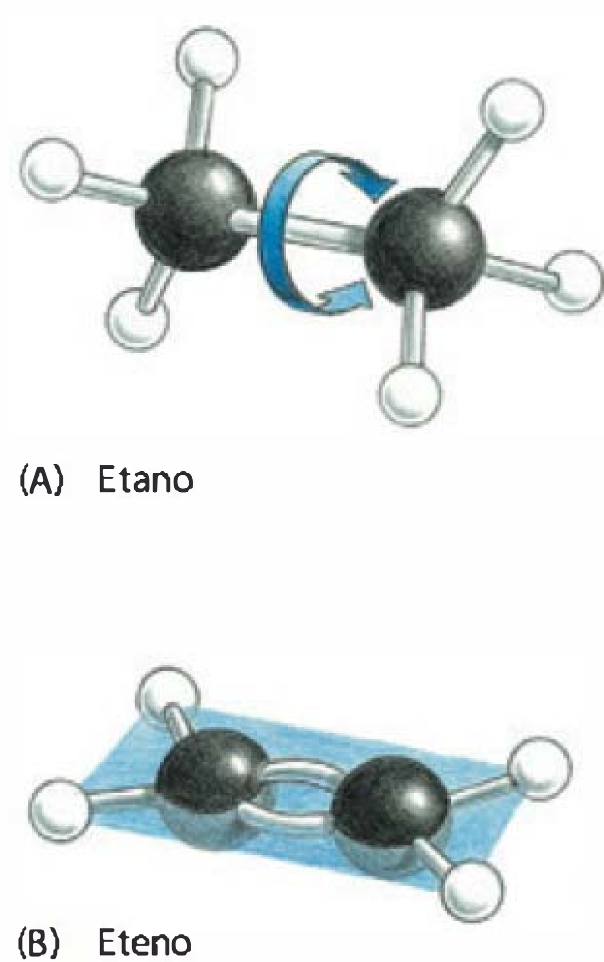


Figura 2-9 Comparação entre ligação dupla e ligação simples entre carbono-carbono. (A) A molécula do etano, que tem uma ligação covalente simples entre os dois átomos de carbono, ilustra o arranjo tetraédrico das ligações simples formadas pelo carbono. Um dos grupos CH_3 ligados pela ligação covalente pode girar (em relação ao outro grupo) ao redor do eixo da ligação. (B) A ligação dupla entre dois átomos de carbono da molécula de eteno (etileno) altera a geometria da ligação dos átomos de carbono e mantém os átomos em um mesmo plano (*azul*); a ligação dupla impede a rotação de um grupo CH_2 em relação ao outro.

Frequentemente um átomo comporta-se como se o seu raio fosse fixo

Quando dois átomos formam uma ligação covalente, o compartilhamento de elétrons faz com que os núcleos desses átomos normalmente fiquem mais próximos. Nas células, entretanto, a maior parte dos átomos que estão movimentando-se rapidamente e colidindo entre si pertence a moléculas diferentes. O que acontece quando dois desses átomos se tocam?

Para maior clareza e simplicidade, os átomos e as moléculas geralmente são representados de forma esquemática, tanto como uma linha representando a fórmula estrutural quanto pelo modelo de esfera e bastão. *Modelos de preenchimento espacial*, entretanto, fornecem uma representação mais acurada da estrutura molecular. Nesses modelos, um envelope sólido é usado para representar o raio da nuvem eletrônica que é impedido de se aproximar de um segundo átomo ao qual não esteja ligado, isto é o que se denomina *raio de van der Waals* de um átomo. Isso é possível porque a intensidade da repulsão aumenta rapidamente à medida que os dois átomos se aproximam muito intimamente. Em distâncias pouco maiores, os dois átomos sofrerão o efeito de uma força de atração fraca, conhecidas como *atração de van der Waals*. Desse modo, há uma distância na qual as forças repulsivas e as forças atrativas estarão perfeitamente balanceadas, de modo a haver uma energia mínima para a interação entre cada um desses átomos com um outro átomo pertencente a um elemento não-ligado (**Figura 2-11**).

Neste livro, dependendo do objetivo, as moléculas pequenas estão representadas desenhadas com linhas, por modelos de esfera e bastão ou ainda por modelos de preenchimento espacial. Para efeito de comparação, a molécula de água está representada na **Figura 2-12** segundo os três modelos. Frequentemente, quando se trabalha com moléculas muito grandes, como no caso das proteínas, pode-se necessitar de uma simplificação ainda maior (p. ex., ver Painel 3-2, p. 132-133).

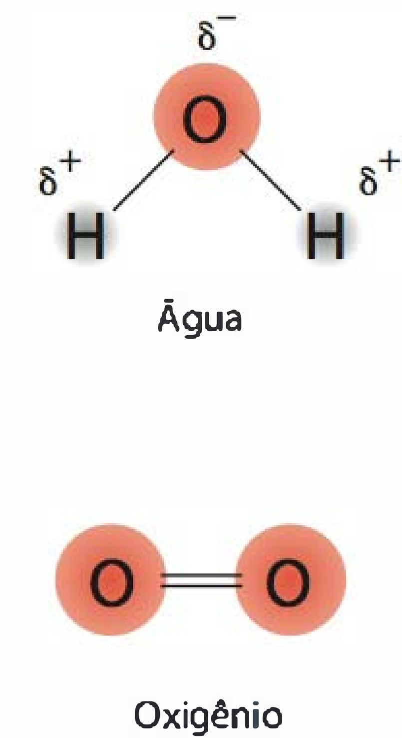


Figura 2-10 Ligações covalentes polar e apolar. Comparação entre a distribuição dos elétrons na molécula de água (H_2O), que é polar, e na molécula de oxigênio (O_2), que é apolar (δ^+, carga positiva parcial; δ^-, carga negativa parcial).

A água é a mais abundante das substâncias presentes nas células

A água perfaz cerca de 70% do peso de uma célula, e muitas das reações intracelulares ocorrem em ambiente aquoso. A vida na Terra começou nos oceanos, e as condições daquele ambiente primitivo determinaram características indeléveis na química dos seres vivos. Consequentemente, a vida fundamenta-se nas propriedades da água.

Na molécula de água (H_2O), os dois átomos de H ligam-se ao átomo de O por ligações covalentes (ver Figura 2-12). As duas ligações são altamente polares porque o O atrai fortemente elétrons, enquanto que o H os atrai fracamente. Em decorrência disso, na molécula de água há uma distribuição de elétrons não-equitativa, com predominância de carga positiva nos dois átomos de H e de carga negativa no átomo de O (ver Figura 2-10). Quando uma região carregada positivamente (isto é, um dos átomos de H) de uma molécula de água aproxima-se de uma região carregada negativamente (isto é, o átomo de O) de uma segunda molécula de água, a atração recíproca pode resultar em uma ligação fraca denominada *ligação de hidrogênio* (ver Figura 2-15). Essas ligações são muito mais fracas do que as ligações covalentes e são facilmente rompidas pelo movimento térmico aleatório que resulta da energia calorífica das moléculas; assim, tais ligações existem apenas por tempos extremamente curtos. Entretanto, o efeito combinado de um grande número dessas ligações pode ser grande. Cada molécula de água pode formar ligações de hidrogênio, por meio de seus dois átomos de H, com duas outras moléculas de água, formando uma rede na qual as ligações de hidro-

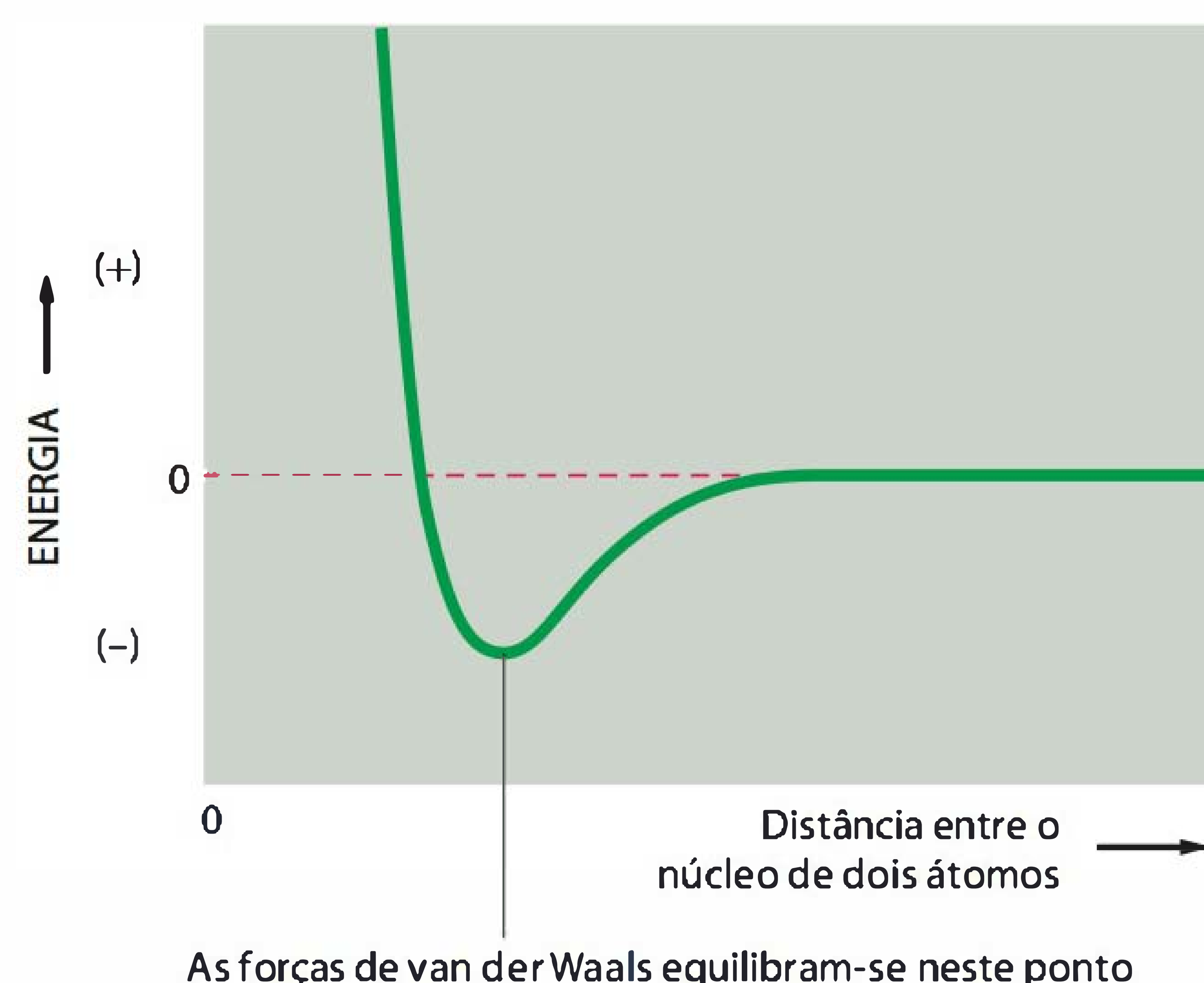


Figura 2-11 O equilíbrio das forças de van der Waals entre dois átomos. À medida que os núcleos de dois átomos aproximam-se um do outro, eles passam a apresentar uma interação de ligação fraca devido a oscilações nas suas cargas elétricas. Entretanto, os mesmos átomos se repelirão fortemente caso estiverem muito próximos um do outro. No ponto mínimo de energia, as forças de van der Waals, de atração e repulsão, equilibram-se. Esse mínimo determina a distância de contato entre dois átomos ligados por ligações não-covalentes. Essa distância é a soma dos respectivos raios de van der Waals. Por definição, zero de energia (indicado pela linha pontilhada *vermelha*) é a energia quando os dois núcleos estiverem separados a uma distância infinita.

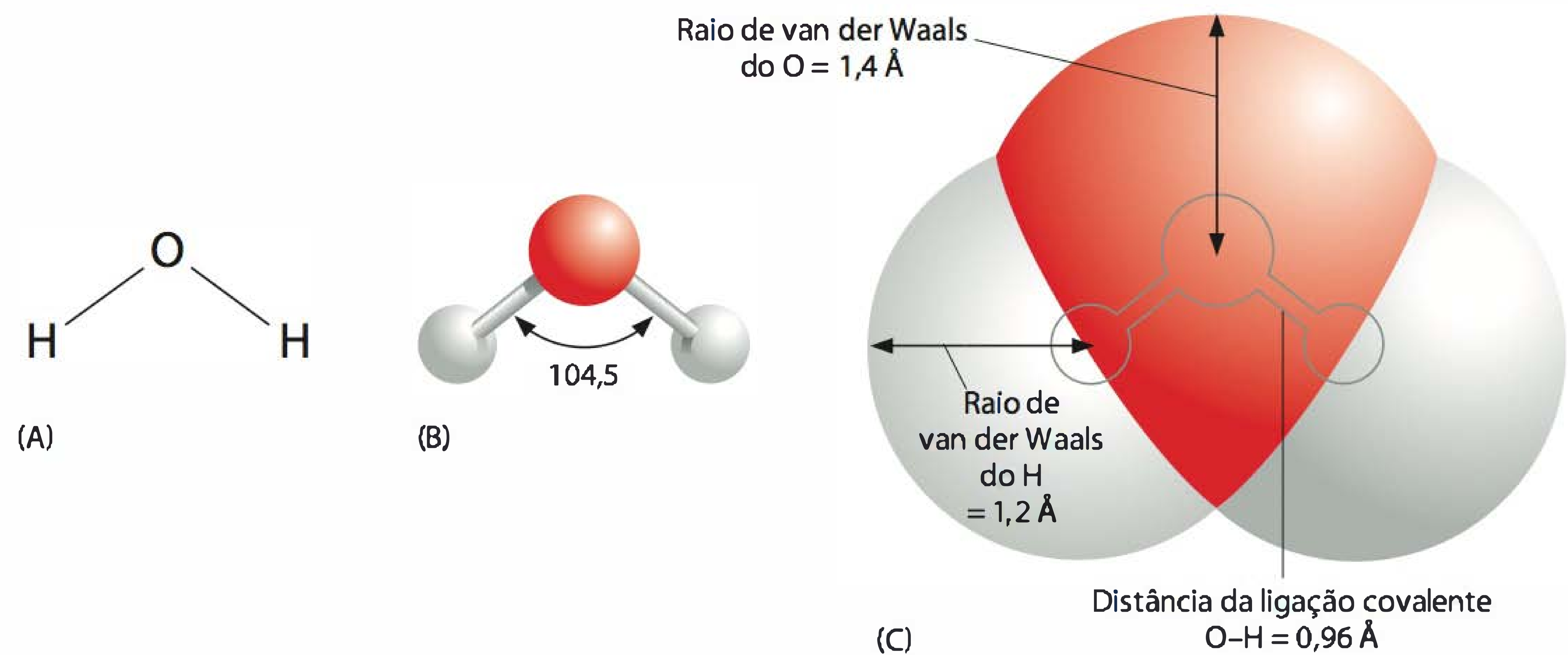


Figura 2-12 Três representações da molécula de água. (A) O mais comum é representar a fórmula estrutural da água por um desenho em linha no qual cada átomo é indicado pelo seu símbolo-padrão, com linhas representando as ligações covalentes que juntam dois átomos. (B) Modelo de esfera e bastão no qual os átomos são representados por esferas de diâmetros arbitrários ligadas por bastões, que representam as ligações covalentes. Nesse tipo de modelo, ao contrário de (A), os ângulos das ligações são representados com toda exatidão (ver também Figura 2-8). (C) Modelo de preenchimento espacial no qual tanto a geometria das ligações quanto os raios de van der Waals são representados mais acuradamente.

gênio são rompidas e formadas continuamente (Painel 2-2, p. 108-109). A água é um líquido à temperatura ambiente, com alto ponto de ebulição e alta tensão superficial, e não um gás, exatamente porque as moléculas são mantidas juntas devido a ligações de hidrogênio.

Moléculas como os álcoois, que possuem ligações covalentes polares e que podem formar ligações de hidrogênio com a água, dissolvem-se facilmente em água. Da mesma maneira, moléculas que possuem cargas positivas ou negativas (íons) interagem favoravelmente com a água. Essas moléculas são denominadas **hidrofílicas** para indicar que "gostam de água". Uma proporção muito grande das moléculas presentes no ambiente aquoso das células, incluindo os açúcares, o DNA, o RNA e a maioria das proteínas, forçosamente pertence a essa categoria. Contrariamente, moléculas **hidrofóbicas** (moléculas que "não gostam de água") não são carregadas e formam poucas ou nenhuma ligações de hidrogênio, de modo que não se dissolvem em água. Os hidrocarbonetos servem de exemplo importante (ver Painel 2-1, p. 106-107). Nessas moléculas, os átomos de H são ligados covalentemente a átomos de C por ligações significativamente não-polares. Uma vez que os átomos de H praticamente não possuem nenhuma carga positiva, não podem formar ligações de hidrogênio realmente efetivas com outras moléculas. Isso faz dos hidrocarbonetos uma massa hidrofóbica, propriedade que é aproveitada pelas células, cujas membranas, como será visto no Capítulo 10, são formadas por moléculas que possuem longas caudas hidrocarbonadas.

Algumas moléculas polares formam ácidos e bases em água

Um dos tipos de reação química mais simples, e que tem profundo significado para as células, ocorre quando uma molécula que possui alguma ligação covalente altamente polar entre um hidrogênio e um segundo átomo dissolve-se em água. O átomo de hidrogênio dessa molécula doa fortemente seu elétron para o átomo que estiver associado a ele, tornando-se um núcleo de hidrogênio praticamente despido de elétrons e, portanto, carregado positivamente; em outras palavras, um **próton (H^+)**. Quando moléculas de água rodeiam uma molécula polar, o próton é parcialmente atraído pela carga negativa parcial do átomo de O de uma molécula de água adjacente, podendo separar-se do oxigênio da molécula de água original para associar-se com átomos de oxigênio de outras moléculas de água, gerando um **íon hidrônio (H_3O^+)** (**Figura 2-13**A). Como a reação inversa ocorre muito prontamente, deve-se imaginar um estado de equilíbrio em que bilhões de prótons estão continuamente transitando de uma para outra das moléculas de água da solução.

O mesmo tipo de reação ocorre em uma solução de água pura. Conforme a ilustração da Figura 2-13B, as moléculas de água estão constantemente trocando prótons entre si. O resultado é que a água pura contém uma concentração igual e muito baixa de íons H_3O^+ e OH^-, ambos presentes em uma concentração de 10^{-7} M. (A concentração de H_2O na água pura é 55,5 M.)

As substâncias que ao se dissolverem em água liberam prótons para formar H_3O^+ são denominadas **ácidos**. Quanto maior a concentração de H_3O^+, mais ácida é a solução. À medida que a concentração de H_3O^+ aumenta, a concentração de OH^- diminui, segundo a equação de equilíbrio da água: $[H_3O^+][OH^-] = 1,0 \times 10^{-14}$, sendo que os colchetes indicam que as concentrações molares devem ser multiplicadas. Tradicionalmente, a concentração de H_3O^+ normalmente é indicada como concentração de H^+, embora quase todo o H^+ presente em uma solução aquosa esteja na forma de H_3O^+. Para evitar o uso de números de difícil manuseio, a concentração de H^+ é expressa utilizando-se uma escala logarítmica, chamada de **escala de pH**, como ilustrado no Painel 2-2 (p. 108-109). A água pura tem um pH de 7 e é neutra, isto é, não é nem ácida (pH $<$ 7,0) e nem básica (pH $>$ 7,0.)

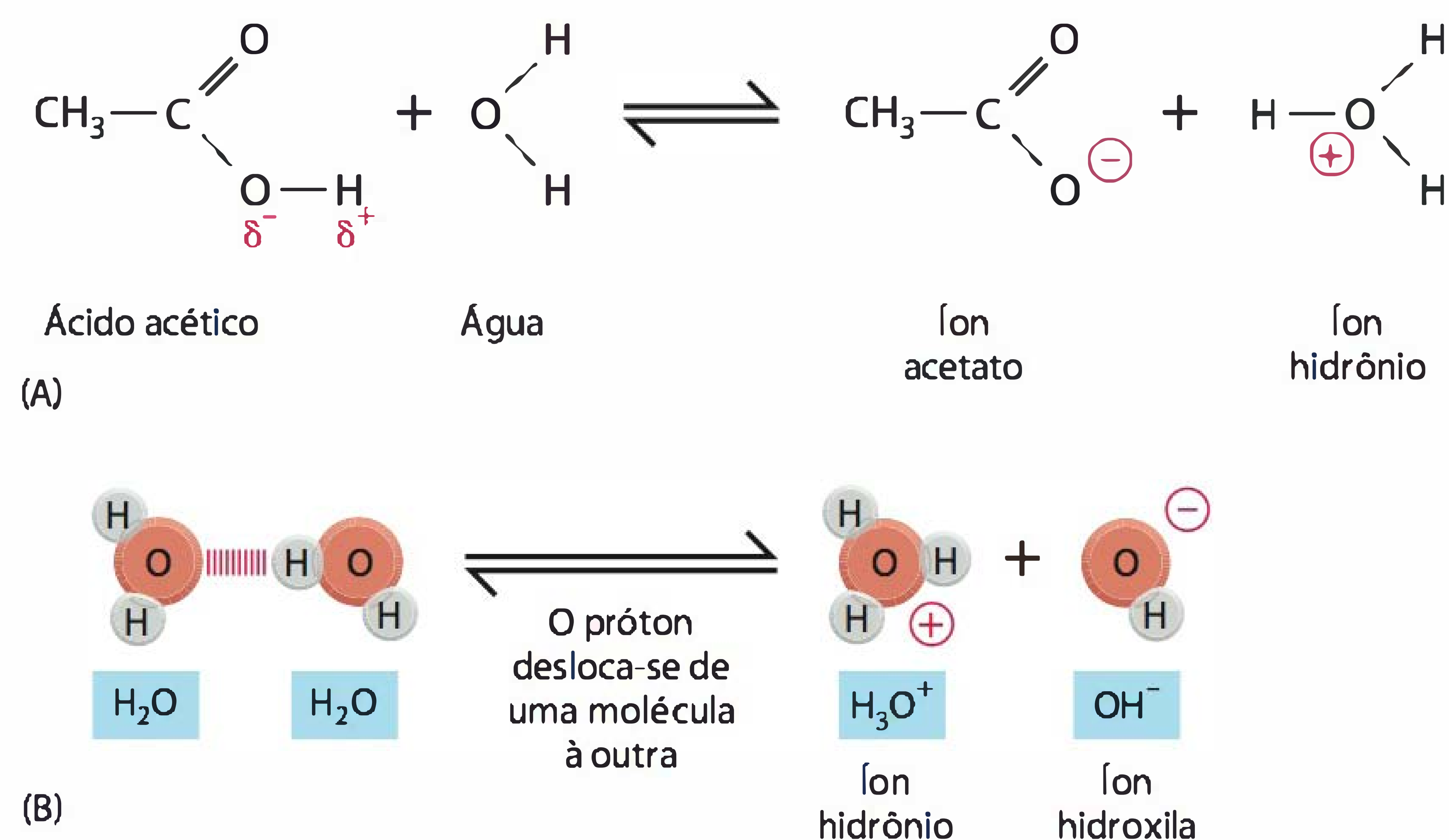


Figura 2-13 Ácidos em água. (A) Reação que ocorre quando uma molécula de ácido acético dissolve-se em água. (B) As moléculas de água estão continuamente trocando prótons umas com as outras, formando íons hidrônio e hidroxila. Por sua vez, esses íons rapidamente recombinam-se formando água.

Uma vez que os prótons de um íon hidrônio podem passar facilmente para muitos dos tipos de moléculas presentes nas células, a concentração de H_3O^+ dentro das células (a acidez) deve ser rigidamente regulada. O interior das células é mantido próximo à neutralidade, sendo tamponado pela presença de muitos grupos químicos que podem aceitar e liberar prótons próximo ao pH 7.

Base é o oposto de ácido. Exatamente assim como a propriedade que define um ácido é a sua tendência de doar prótons para moléculas de água, aumentando a concentração de íons H_3O^+, a propriedade que define uma base é sua capacidade de aceitar prótons, diminuindo assim a concentração de íons H_3O^+, e, portanto, aumentando a concentração de íons hidroxila (OH^-). Uma base tanto pode combinar-se diretamente com prótons quanto formar íons hidroxila, que imediatamente combinam-se com prótons, produzindo H_2O. O hidróxido de sódio (NaOH) é básico (o termo *alcalino* também é usado) porque, em soluções aquosas, ele dissocia-se formando íons Na^+ e íons OH^-. Outras bases com considerável importância nas células vivas são aquelas que possuem grupos NH_2. Esses grupos podem receber um próton diretamente da água: $-NH_2 + H_2O \rightarrow -NH_3{}^+ + OH^-$.

Todas as moléculas que aceitam prótons da água o fazem mais prontamente quando a concentração de H_3O^+ da solução for alta (solução ácida). Da mesma maneira, moléculas que podem doar prótons o fazem mais prontamente se a concentração de H_3O^+ da solução for baixa (solução básica), e tenderão a receber novamente um próton se a concentração de H_3O^+ da solução for alta.

Quatro tipos de interações não-covalentes contribuem para manter a associação entre as moléculas de uma célula

Em soluções aquosas, as ligações covalentes são de 10 a 100 vezes mais fortes do que as outras forças de atração entre átomos e, consequentemente, as suas conexões definem os limites das moléculas. Entretanto, boa parte da biologia depende de ligações específicas entre moléculas diferentes. Essas ligações são mediadas por um grupo de atrações não-covalentes que, individualmente, são muito fracas, mas a soma de suas energias de ligação pode criar uma força efetiva entre duas moléculas que estejam separadas. Três dessas forças não-covalentes já foram discutidas anteriormente: atração eletrostática (ligação iônica), ligação de hidrogênio e atrações de van der Waals. Na **Tabela 2-1**, as forças desses três tipos de ligações *não-covalentes* são comparadas com a força de uma ligação covalente característica, todas

Tabela 2-1 Ligações químicas covalentes e não-covalentes

Tipo de ligação		Comprimento (nm)	Intensidade (kcal/mol) No vácuo	Na água
Covalente		0,15	90	90
Não-covalente	iônica*	0,25	B0	3
	hidrogênio	0,30	4	1
	atração de van der Waals (por átomo)	0,35	0,1	0,1

* A ligação iônica é uma atração eletrostática entre dois átomos completamente carregados.

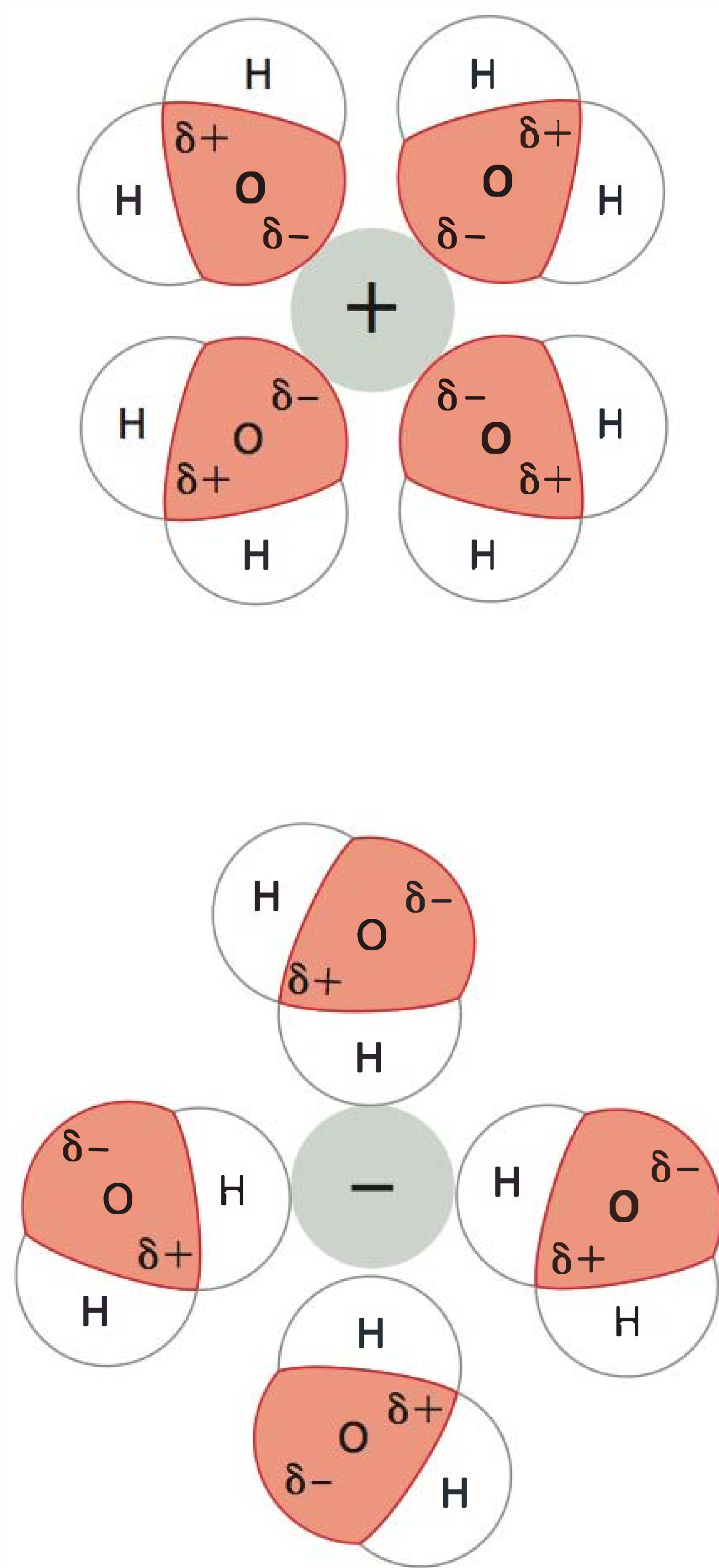


Figura 2-14 **Como os dipolos das moléculas de água orientam-se para diminuir a afinidade recíproca entre íons ou entre grupos polares de cargas opostas.**

na presença e na ausência de água. Devido à importância fundamental em todos os sistemas biológicos, as suas propriedades estão aqui resumidas:

- **Atrações eletrostáticas**. Resultam de forças de atração entre átomos carregados com cargas opostas, sendo mais fortes na ausência de água. Elas formam-se facilmente entre dipolos permanentes, mas são mais intensas quando estiverem envolvidos dois átomos com carga completa (*ligações iônicas*). Entretanto, as moléculas de água (polares) agregam-se ao redor de íons totalmente carregados e de moléculas polares que contenham dipolos permanentes (**Figura 2-14**). Isso, na maioria dos ambientes biológicos, reduz enormemente o potencial da atração recíproca que as espécies carregadas possuem.
- **Ligações de hidrogênio**. A estrutura de uma ligação de hidrogênio típica é ilustrada na **Figura 2-15**. Essas ligações correspondem a uma forma especial de interação polar na qual um átomo de hidrogênio, que é eletropositivo, é parcialmente compartilhado por dois átomos eletronegativos. Seus hidrogênios podem ser vistos como se fossem um próton que se dissociou apenas parcialmente de um átomo doador, possibilitando que seja compartilhado por um segundo átomo aceptor. Ao contrário de uma interação eletrostática típica, essa ligação é altamente direcionada – sendo mais intensa quando uma linha reta pode ser desenhada ligando todos os três átomos nela envolvidos. Como foi discutido anteriormente, a água enfraquece essas ligações pela formação de ligações de hidrogênio que competem com as moléculas envolvidas na ligação.
- **Atrações de van der Waals**. A nuvem eletrônica ao redor de um átomo não-polar flutua formando um dipolo oscilante. Tais dipolos induzem transitoriamente, em alguns dos átomos das proximidades, um dipolo também oscilante e com uma polarização oposta. Mas, como muitos átomos podem estar simultaneamente em contato, quando as superfícies de duas moléculas se encaixam perfeitamente, o resultado final frequentemente é significativo. Essas atrações, chamadas de atrações de van der Waals, não são enfraquecidas pela água.

O quarto efeito que normalmente une moléculas quando em presença de água, estritamente falando, não é propriamente uma ligação. Entretanto, uma **força hidrofóbica** muito importante é formada pela repulsão de superfícies não-polares da rede de água mantida por ligações de hidrogênio, onde essas superfícies não-polares interfeririam fisicamente com interação altamente favorável entre moléculas de água. Manter essas superfícies não-polares juntas reduz o contato com a água. Nesse sentido, a força é inespecífica. Apesar disso, o Capítulo 3 mostra que as forças hidrofóbicas são fundamentais para o enovelamento adequado das proteínas.

O Painel 2-3 mostra uma visão geral dos quatro tipos de interações recém-descritos. A **Figura 2-16** ilustra de maneira esquemática como tais interações podem somar-se e manter unidas as superfícies de duas macromoléculas que se ajustam, mesmo que cada uma das interações por si mesma seja muito fraca para ter algum efeito.

As células são formadas por compostos de carbono

Após serem enfocados as maneiras pelas quais os átomos de carbono combinam-se para formar moléculas pequenas e os seus comportamentos em ambiente aquoso, serão examinadas as principais classes de moléculas pequenas presentes nas células e seus papéis biológicos. Será visto que poucas categorias básicas de moléculas, formadas por poucos elementos diferentes, originam toda a extraordinária riqueza de formas e de comportamentos apresentadas pelos seres vivos.

Desconsiderando a água e os íons inorgânicos como o potássio, praticamente todas as moléculas de uma célula estão baseadas no carbono. Em comparação com todos os demais elementos, o carbono é inigualável na sua capacidade de formar moléculas grandes. O silício vem em segundo lugar, mas muito atrás. Devido ao seu pequeno tamanho e ao fato de possuir quatro elétrons e quatro vacâncias na última camada, o átomo de carbono pode formar quatro ligações covalentes com outros átomos. Mais importante ainda, um átomo de carbono pode ligar-se com outros átomos de carbono por meio da ligação C–C, que é altamente estável, de modo a formar cadeias e anéis e, assim, formar moléculas grandes e complexas, não havendo mesmo um limite imaginável para o tamanho das moléculas que podem ser

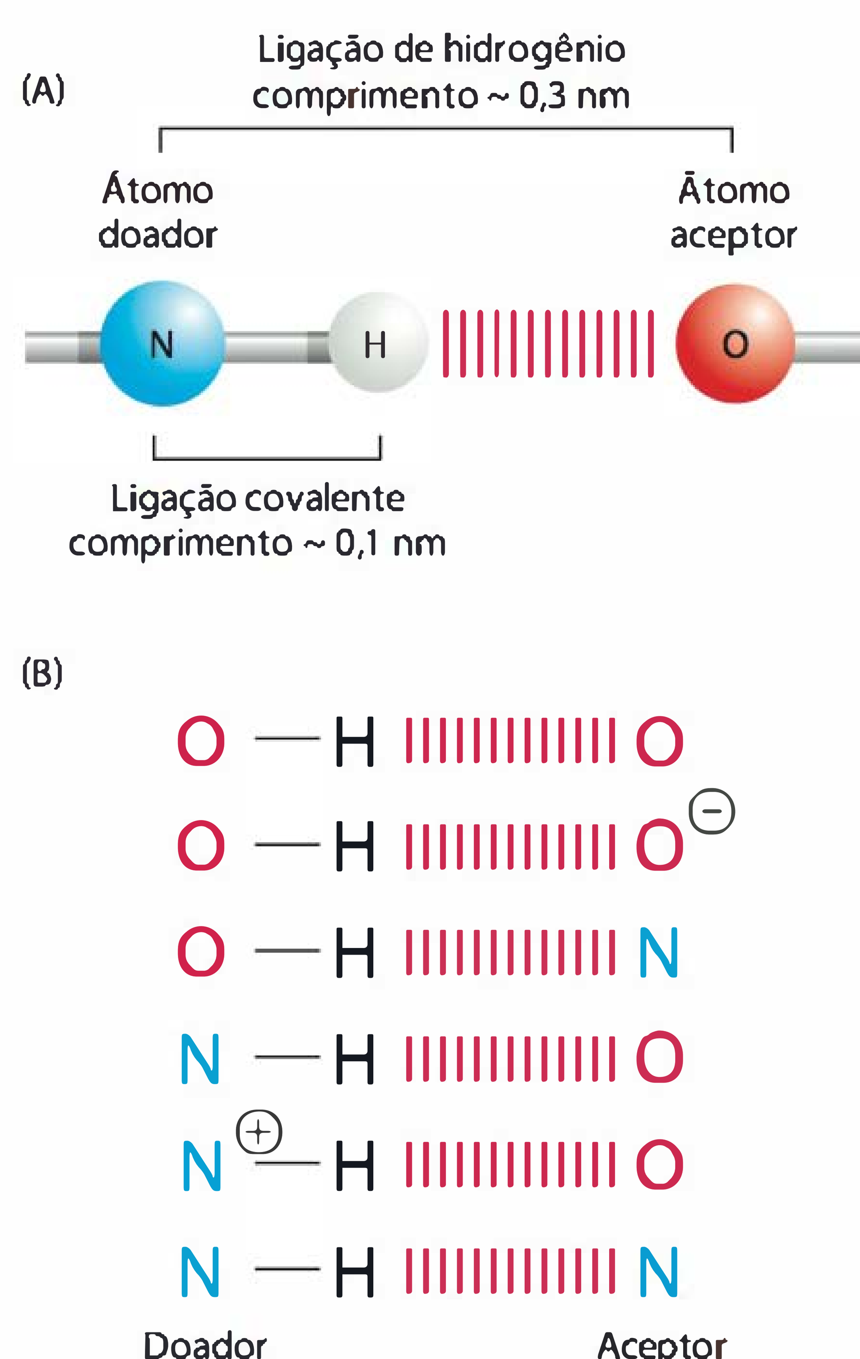


Figura 2-15 **Ligações de hidrogênio.** (A) Modelo de esfera e bastão de uma ligação de hidrogênio típica. A distância entre o átomo de hidrogênio e o de oxigênio é menor do que a soma dos seus raios de van der Waals, indicando um compartilhamento parcial de elétrons. (B) Ligações de hidrogênio mais comuns encontradas nas células.

formadas (ver Painel 2-1, p. 106-107). Os compostos de carbono, tanto grandes como pequenos, formados pelas células, são denominados *moléculas orgânicas*.

Certas combinações de átomos, como as dos grupos metila ($-CH_3$), hidroxila (–OH), carboxila (–COOH), carbonila (–C=O), fosfato ($-PO_3^{2-}$), sulfidrila (–SH) e amino ($-NH_2$), ocorrem repetidamente nas moléculas orgânicas. Cada um desses **grupos químicos** tem propriedades químicas e físicas distintas, as quais influenciam o comportamento das moléculas onde eles ocorrem. Os grupos químicos mais comuns e algumas de suas propriedades estão resumidos no Painel 2-1, p. 106-107.

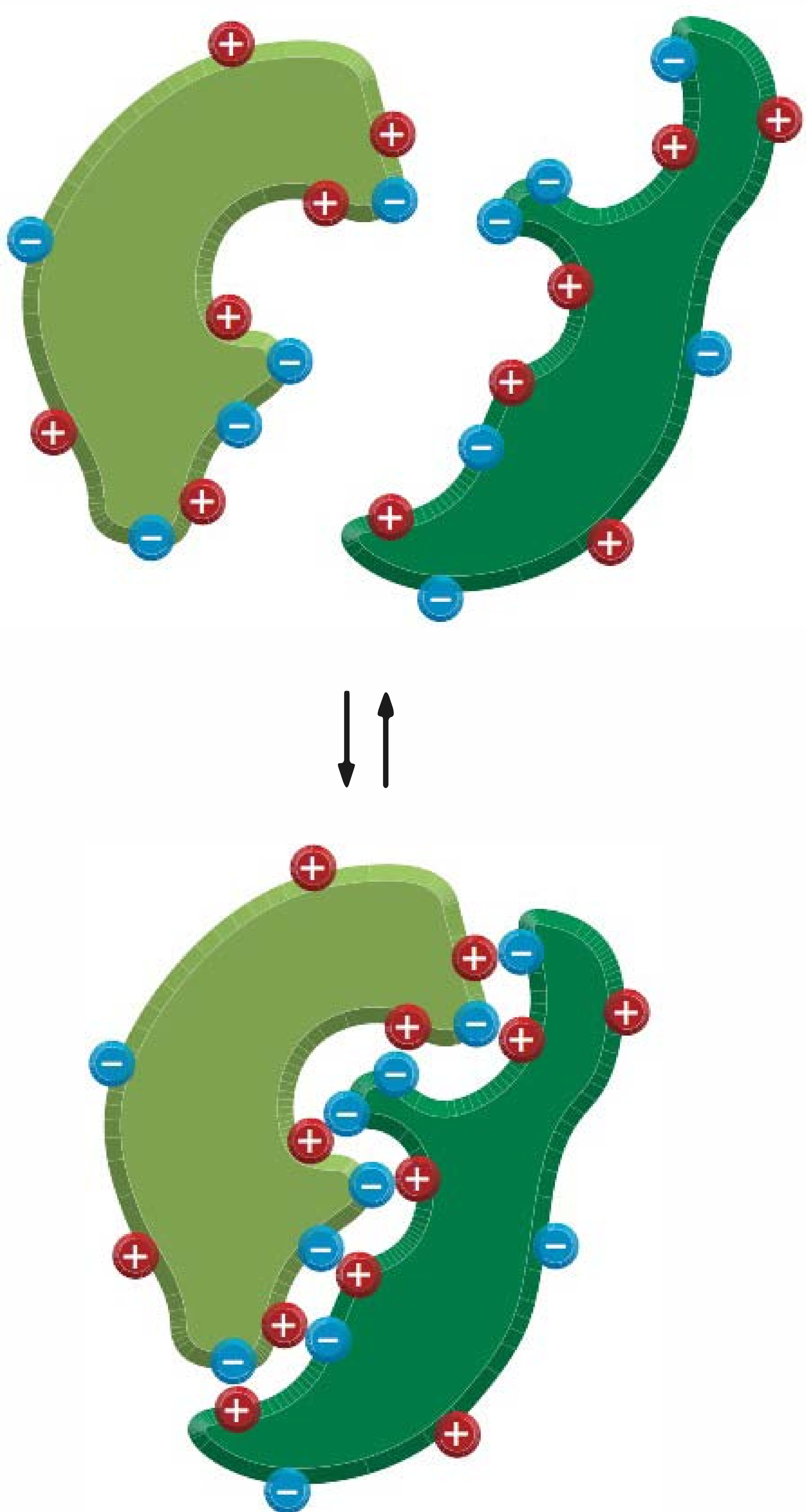


Figura 2-16 Esquema de como duas macromoléculas com superfícies complementares podem se ligar firmemente uma à outra por meio de ligações não-covalentes.

As células contêm quatro famílias principais de moléculas orgânicas pequenas

As moléculas orgânicas pequenas das células são compostos com base no carbono com peso molecular entre 100 e 1.000, contendo cerca de 30 átomos de carbono. Elas geralmente são encontradas livres em solução e têm vários destinos. Algumas são utilizadas como subunidades – *monômeros* – para construir as gigantescas *macromoléculas* poliméricas das células: as proteínas, os ácidos nucleicos e os grandes polissacarídeos. Outras agem como fonte de energia e são degradadas e transformadas em outras moléculas pequenas por meio do emaranhado de vias metabólicas intracelulares. Muitas das moléculas pequenas têm mais de um papel na célula; por exemplo, podem servir como subunidade de alguma macromolécula ou como fonte de energia. As moléculas orgânicas pequenas são muito menos abundantes que as macromoléculas orgânicas e perfazem somente cerca de um décimo do total da massa de matéria orgânica de uma célula (**Tabela 2-2**). Em uma célula podem existir cerca de um milhão de tipos diferentes de moléculas pequenas.

Todas as moléculas são sintetizadas a partir de um mesmo grupo de compostos simples e degradadas até ele. Tanto a síntese como a degradação ocorrem por meio de sequências de modificações químicas limitadas que seguem regras bem-definidas. Consequentemente, os compostos presentes nas células são relacionados entre si e podem ser classificados dentro de um pequeno grupo de famílias distintas. Considerando-se de uma maneira ampla, as células contêm quatro famílias principais de moléculas orgânicas pequenas: os *açúcares*, os *ácidos graxos*, os *aminoácidos* e os *nucleotídeos* (**Figura 2-17**). Embora muitos dos compostos presentes nas células não se enquadrem nessas categorias, as quatro famílias de moléculas orgânicas pequenas, juntamente com as macromoléculas formadas por suas ligações em longas cadeias, correspondem a uma grande proporção da massa celular (ver Tabela 2-2).

Os açúcares funcionam como uma fonte de energia para as células e são as subunidades dos polissacarídeos

Os **açúcares** mais simples, os *monossacarídeos*, são compostos que têm a fórmula geral $(CH_2O)_n$, onde *n* geralmente é 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Devido a essa fórmula básica, os açúcares e as moléculas formadas a partir deles são denominados *carboidratos*. A glicose, por exemplo, tem a fórmula $C_6H_{12}O_6$ (**Figura 2-18**). Essa fórmula, entretanto, não define completamente a molécula: o mesmo conjunto de carbonos, de hidrogênios e de oxigênios pode ser mantido em uma mesma molécula por meio de ligações covalentes diversas, criando estruturas com formas diferentes. Como é mostrado no Painel 2-4 (p. 112-113), por exemplo, a glicose pode ser convertida em açúcares diferentes – manose ou galactose – simplesmente pela troca da orientação, em relação

Tabela 2-2 Tipos de moléculas que formam uma célula de bactéria

	Porcentagem do peso total da célula	Número de tipos de cada molécula
Água	70	1
Íons inorgânicos	1	20
Açúcares e precursores	1	250
Aminoácidos e precursores	0,4	100
Nucleotídeos e precursores	0,4	100
Ácidos graxos e precursores	1	50
Outras moléculas pequenas	0,2	~300
Macromoléculas (proteínas, nucleotídeos e polissacarídeos)	26	~3.000

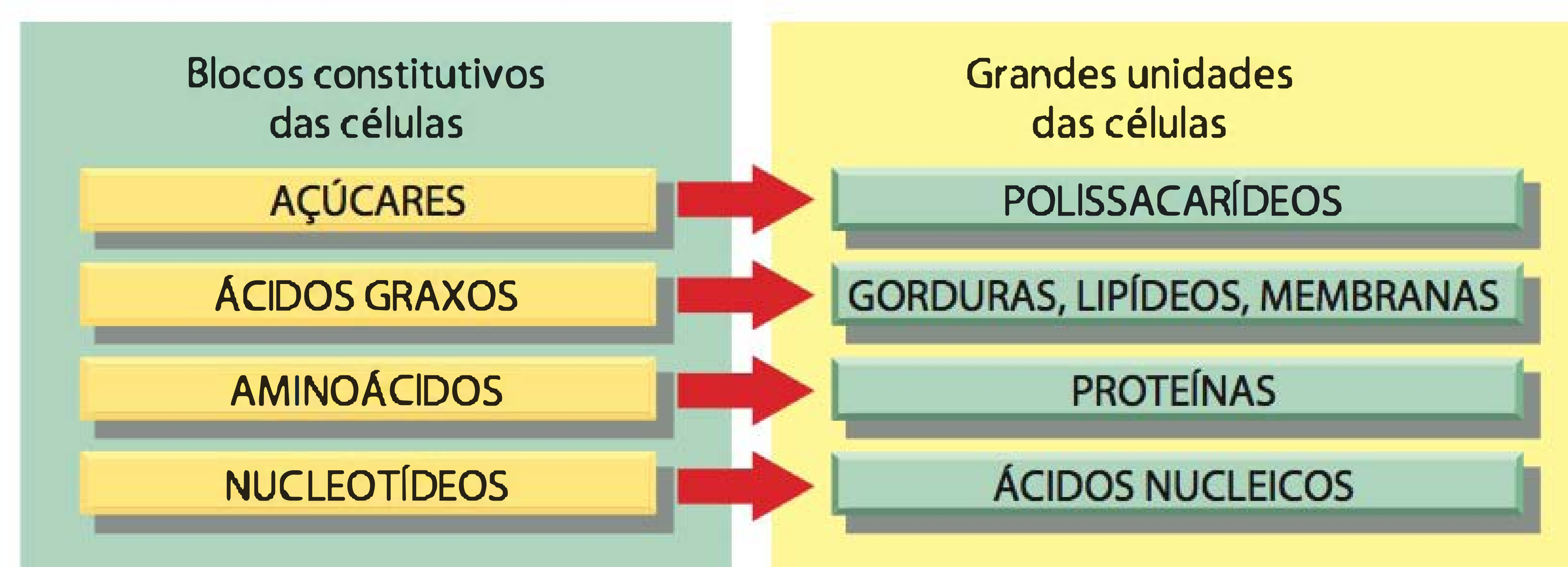


Figura 2-17 As quatro principais famílias de moléculas orgânicas pequenas encontradas nas células. Essas moléculas pequenas são os blocos constitutivos monoméricos, ou subunidades, da maioria das macromoléculas e de outros agregados celulares. Alguns deles, como os açúcares e os ácidos graxos, também são fontes de energia.

ao resto da molécula, de grupos OH específicos. Mais ainda, cada um desses açúcares pode existir em duas formas, chamadas de forma D e de forma L, que são imagens especulares entre si. Os conjuntos de moléculas que têm a mesma fórmula, mas estruturas diferentes, são chamados de *isômeros*, e os conjuntos de moléculas que formam pares especulares são denominados *isômeros ópticos*. Os isômeros são largamente distribuídos entre as moléculas orgânicas em geral e têm um papel fundamental na geração da enorme variedade de açúcares.

Uma visão geral da estrutura dos açúcares e de sua química é apresentada no Painel 2-4. Os açúcares podem existir tanto na forma de um anel, como na forma de uma cadeia aberta. Na sua forma de cadeia aberta, eles contêm certo número de grupos hidroxila e um grupo aldeído ($_{H}$>C = O) ou cetona (>C = O). O grupo aldeído ou o grupo cetona tem um papel especial. Primeiro, eles podem reagir com um grupo hidroxila da mesma molécula de modo a converter a molécula em um anel. Pode-se identificar facilmente que, na forma de anel, o carbono do aldeído ou da cetona original é o único que se liga a dois oxigênios. Segundo, uma vez que o anel esteja formado, esse mesmo carbono pode ligar-se ainda a um dos carbonos que estão ligados a grupos hidroxila de uma outra molécula de açúcar, criando um *dissacarídeo*, como a sacarose, que é composta de uma unidade de glicose e de uma unidade de frutose. Os polímeros maiores de açúcares variam desde *oligossacarídeos* (trissacarídeos, tetrassacarídeos, e assim por diante) até *polissacarídeos* gigantescos, que podem conter milhares de unidades monossarídicas.

A maneira pela qual os açúcares ligam-se entre si formando polímeros ilustra algumas das características comuns na formação das ligações bioquímicas. Uma ligação é formada entre um grupo –OH de um açúcar e um grupo –OH de outro açúcar por uma **reação de condensação**, havendo a liberação de uma molécula de água quando a ligação é formada (**Figura 2-19**). Em outros polímeros biológicos, como os ácidos nucleicos e as proteínas, as subunidades também são ligadas por reações de condensação nas quais há liberação de água. As ligações criadas por todas essas reações de condensação podem ser rompidas por **hidrólise**, o processo inverso, no qual há consumo de moléculas de água (ver Figura 2-19).

Uma vez que cada monossarídeo têm vários grupos hidroxila livres que podem formar uma ligação com um outro monossarídeo (ou com algum outro composto), os polímeros de açúcar podem ser ramificados e, consequentemente, o número de estruturas de polissacarídeos possíveis é muito grande. Mesmo um dissacarídeo simples, consistindo de dois resí-

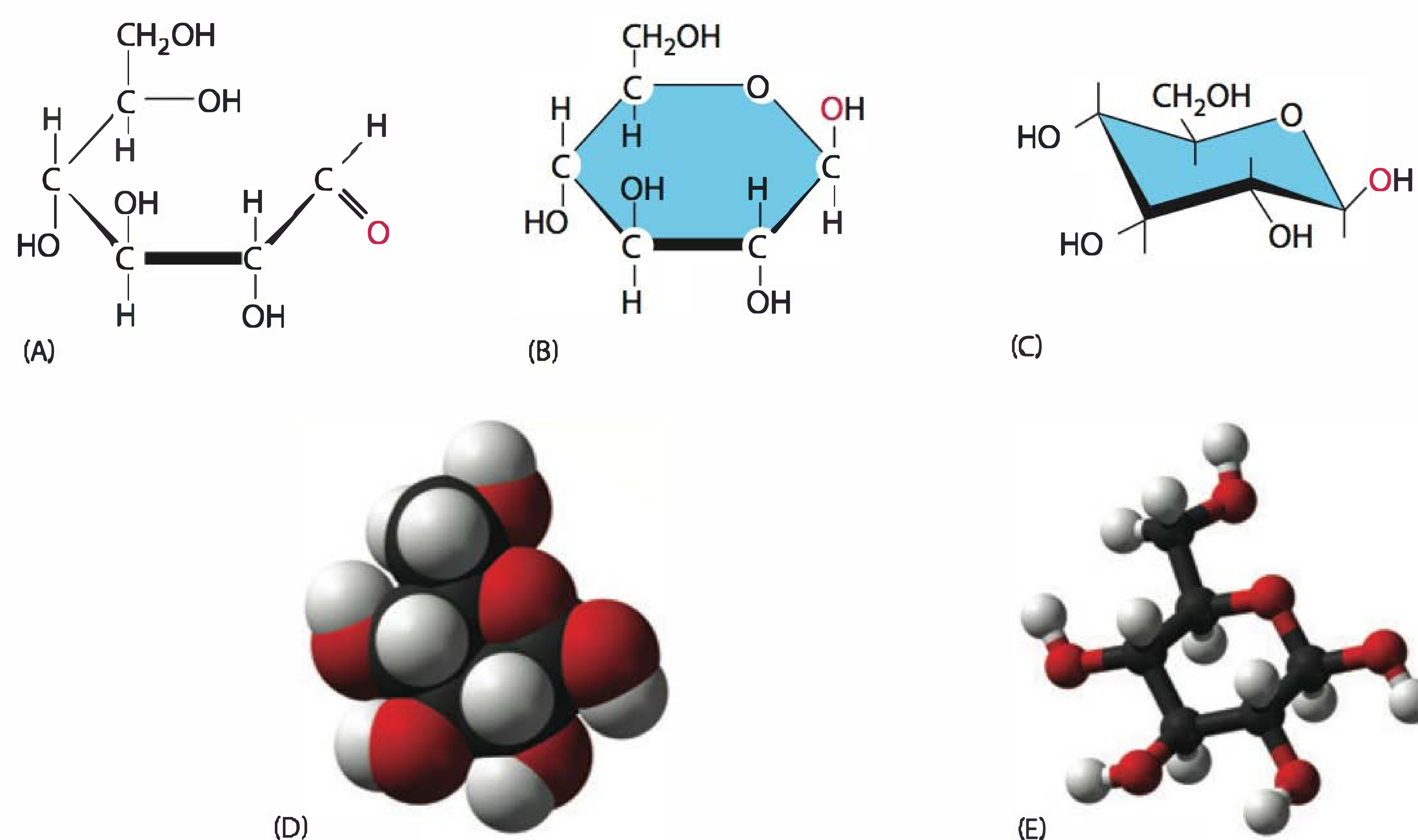


Figura 2-18 Estrutura da glicose, um açúcar simples. Assim como foi previamente ilustrado para a molécula de água (ver Figura 2-12), qualquer outra molécula também pode ser representada de várias maneiras. Nas fórmulas estruturais mostradas em (A), (B) e (C), os átomos estão indicados pelos seus símbolos químicos e ligados entre si por linhas que representam as ligações covalentes. Nesta figura, a *espessura das linhas* indica o plano do anel do açúcar para enfatizar que os grupos –H e –OH não estão no mesmo plano do anel. (A) A forma de cadeia aberta desse açúcar permanece em equilíbrio com a forma cíclica ou de anel, que é mais estável (B). (C) O modelo de esfera e bastão é uma maneira alternativa de desenhar a molécula cíclica, de modo a refletir mais acuradamente a geometria do que a fórmula estrutural em (B). (D) Modelo de preenchimento espacial que indica o arranjo tridimensional dos átomos e os seus raios de van der Waals, representando o contorno da superfície da molécula. (E) Modelo de esfera e bastão no qual a organização tridimensional dos átomos no espaço é mostrado (H, *branco*; C, *preto*; O, *vermelho*; N, *azul*).

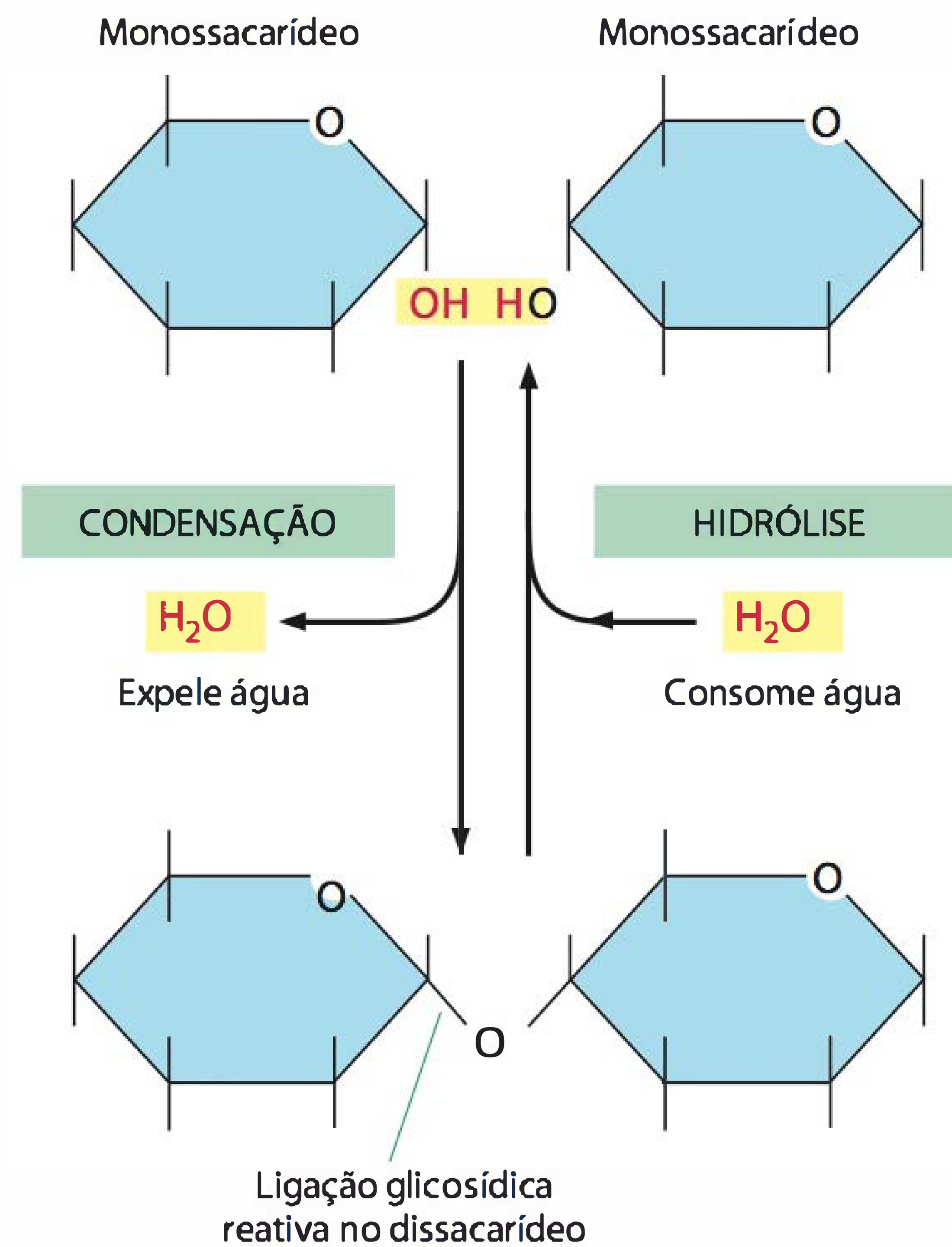


Figura 2-19 Reação entre dois monossacarídeos para formar um dissacarídeo. Essa reação pertence a uma categoria geral de reações denominadas *reações de condensação*, em que duas moléculas são mantidas juntas como resultado da perda de uma molécula de água. A reação inversa (na qual há adição de água) é denominada *hidrólise*. Observe que um dos componentes da ligação (mostrado à *esquerda*) é o carbono ligado a dois oxigênios, que forma o anel do açúcar (ver Figura 2-18). Esse tipo de ligação, muito comum entre os açúcares, é conhecido como *ligação glicosídica* (ver também Figura 2-20).

duos de glicose, pode existir em 11 variantes diferentes (**Figura 2-20**), enquanto três hexoses diferentes ($C_6H_{12}O_6$) podem se ligar de modo a formar vários milhares de trissacarídeos diferentes. Devido a isso, a tarefa de determinar o arranjo dos açúcares nos polissacarídeos é uma tarefa muito mais complexa do que a de determinar a sequência de uma molécula de DNA, onde cada unidade é ligada à seguinte exatamente da mesma maneira.

O monossacarídeo *glicose* tem um papel central como fonte de energia para as células. Em uma série de reações, a glicose é degradada em moléculas menores, liberando energia, que pode ser aproveitada pela célula para fazer algum trabalho útil, como será explicado mais adiante. As células utilizam polissacarídeos simples, compostos unicamente de unidades de glicose – principalmente *glicogênio* nos animais e *amido* nas plantas – como reservas de energia.

Os açúcares não funcionam somente na produção e no armazenamento de energia. Eles também podem ser usados, por exemplo, para dar sustentação mecânica. Assim, o composto químico mais abundante na Terra, a *celulose* da parede das células vegetais, é um polissacarídeo de glicose. Entretanto, como as ligações glicose-glicose da celulose são diferentes

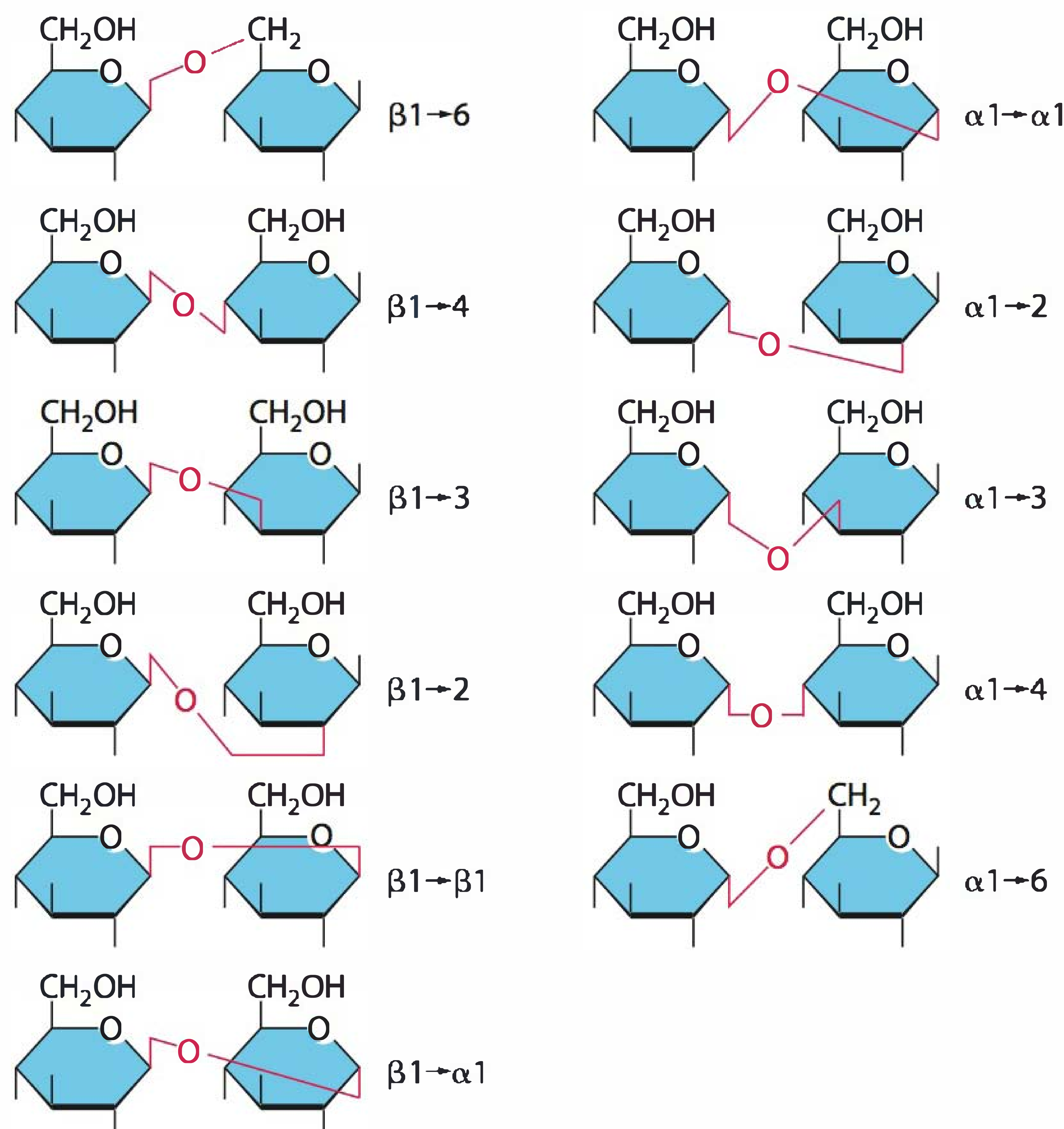


Figura 2-20 Onze dissacarídeos constituídos de duas unidades de D-glicose. Embora difiram apenas no tipo de ligação entre as duas moléculas de glicose, essas moléculas são quimicamente distintas. O número de tipos de oligossacarídeos que podem ser usados pelas células é extremamente grande, pois os oligossacarídeos associados a proteínas e a lipídeos podem ter até mais de seis tipos de açúcares ligados, tanto em arranjos lineares como ramificados, por meio de ligações glicosídicas como as ilustradas aqui. Para explicações sobre ligações α e β ver Painel 2-4 (p. 112-113). Linhas curtas terminando "cegas" indicam posições de OH. (Linhas *vermelhas* indicam meramente orientações de ligações dissacarídicas, e os "cantos" não implicam em átomos extra.)

daquelas encontradas no amido e no glicogênio, os seres humanos não podem digerir celulose e usar a glicose presente. Uma outra substância orgânica extraordinariamente abundante, a *quitina* do exoesqueleto de insetos e da parede das células dos fungos (nesse caso, um polímero linear de um derivado da glicose denominado *N*-acetilglicosamina), também é um polissacarídeo indigerível (ver Painel 2-4). Polissacarídeos de vários outros tipos são os principais componentes do limo, do muco e da cartilagem dos animais.

Os oligossacarídeos pequenos podem ser ligados a proteínas, formando glicoproteínas, e a lipídeos, formando *glicolipídeos*, sendo que ambos são encontrados nas membranas celulares. Como apresentado no Capítulo 10, a superfície da maioria das células é revestida e adornada com polímeros de açúcares que pertencem a glicoproteínas ou a glicolipídeos da membrana celular. As cadeias laterais desses açúcares frequentemente são reconhecidas seletivamente por outras células. As diferenças entre pessoas no que se refere aos detalhes dos açúcares da superfície das suas células constitui a base molecular para as diferenças entre os principais grupos sanguíneos humanos, denominados A, B, AB e O.

Os ácidos graxos são componentes das membranas celulares e também fonte de energia

Uma molécula de ácido graxo, como o *ácido palmítico*, tem duas regiões quimicamente distintas (**Figura 2-21**). Uma dessas regiões é formada por uma longa cadeia hidrocarbonada, que é hidrofóbica e não tem muita reatividade química. A outra região é um grupo carboxila (–COOH), que se comporta como um ácido (ácido carboxílico). Ele ioniza-se em solução ($–COO^-$), é extremamente hidrofílico e reativo quimicamente. A quase totalidade das moléculas de ácidos graxos de uma célula está ligada covalentemente a outras moléculas por meio de seu grupo ácido carboxílico.

A cauda hidrocarbonada do ácido palmítico é *saturada*: não há ligações duplas entre os átomos de carbono, contendo, portanto o número máximo de hidrogênios possível. O ácido esteárico, outro dos ácidos graxos comuns da gordura animal, também é saturado. Outros ácidos graxos, como o ácido oleico, possuem caudas *insaturadas* com uma ou mais ligações duplas ao longo da cadeia. As ligações duplas produzem torções nas moléculas, interferindo na capacidade de se agregarem em uma massa sólida. Essa é a diferença entre a margarina (saturada), que é sólida, e os óleos vegetais (poli-insaturados), que são líquidos. Os vários ácidos graxos diferentes encontrados nas células diferem entre si somente quanto ao comprimento das suas cadeias hidrocarbonadas e quanto ao número e as posições das ligações duplas carbono-carbono (ver Painel 2-5, p. 114-115).

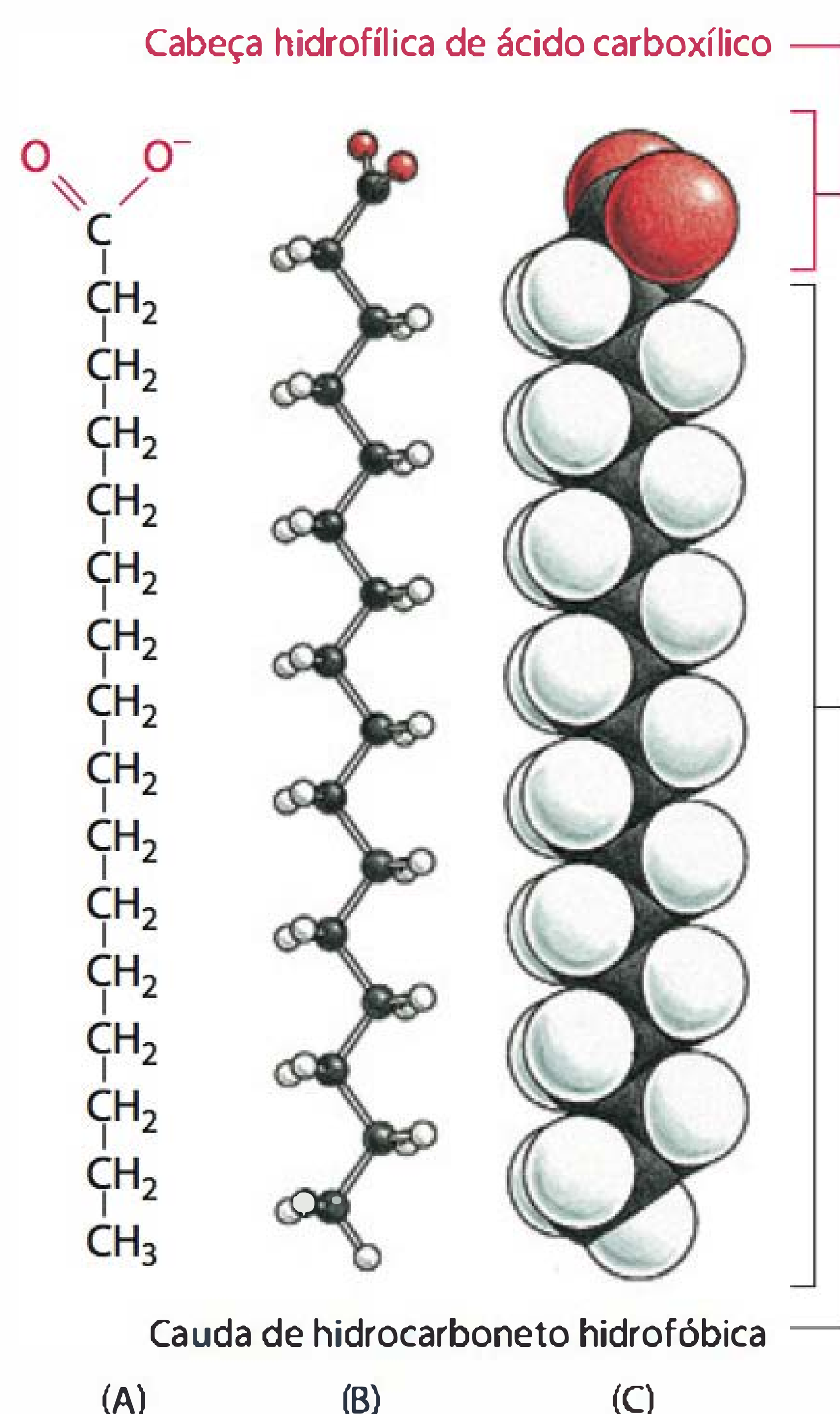


Figura 2-21 Ácidos graxos. Um ácido graxo é composto de uma cadeia hidrocarbonada hidrofóbica à qual um grupo ácido carboxílico hidrofílico se liga. Aqui está mostrado o ácido palmítico. Ácidos graxos diferentes possuem caudas hidrocarbonadas diferentes. (A) Fórmula estrutural. O grupo ácido carboxílico está mostrado na sua forma ionizada. (B) Modelo de esfera e bastão. (C) Modelo de preenchimento espacial.

Os ácidos graxos são armazenados no citoplasma de muitas células na forma de gotículas de moléculas de *triacilglicerol*, que consiste em três cadeias de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol (ver Painel 2-5). Essas moléculas constituem a gordura animal encontrada na carne, na manteiga e no creme de leite, assim como nos óleos vegetais, como o óleo de milho e o óleo de oliva. Quando mobilizadas para fornecer energia, as cadeias de ácidos graxos são liberadas dos triacilgliceróis e degradadas em unidades de dois carbonos. Essas unidades de dois carbonos são idênticas àquelas derivadas da degradação da glicose e entram na mesma via de reações produtoras de energia, como será descrito posteriormente neste capítulo. Nas células, os triglicerídeos funcionam como uma reserva concentrada de alimento, pois sua degradação produz cerca de seis vezes mais energia utilizável do que a degradação da glicose (relação peso/peso).

Os ácidos graxos e os seus derivados, como os triacilgliceróis, são exemplos de **lipídeos**. Os lipídeos englobam, em uma definição um tanto vaga, um conjunto de moléculas biológicas que têm a característica comum de serem insolúveis em água e solúveis em solventes de gorduras e em solventes orgânicos, como o benzeno. Caracteristicamente, eles contêm ou uma longa cadeia hidrocarbonada, como nos ácidos graxos e nos isoprenos, ou então múltiplos anéis aromáticos, como nos *esteróis*.

A função mais importante dos ácidos graxos em uma célula é participar na construção das membranas celulares. Essas laminas finas envolvem todas as células e também suas organelas internas. Elas são principalmente compostas de *fosfolipídeos*, moléculas pequenas que, como os triacilgliceróis, são constituídas principalmente de ácidos graxos e glicerol. Nos fosfolipídeos, o glicerol está ligado a duas cadeias de ácidos graxos em vez de três, como nos triacilgliceróis. O "terceiro" sítio do glicerol liga-se a um grupo fosfato hidrofílico, o qual, por sua vez, está ligado a um composto hidrofílico pequeno, como a colina (ver Painel 2-5). Cada molécula de fosfolipídeo, então, tem uma cauda hidrofóbica composta de duas cadeias de ácidos graxos e de uma cabeça hidrofílica, onde se localiza o fosfato. Isso lhes dá proprie-

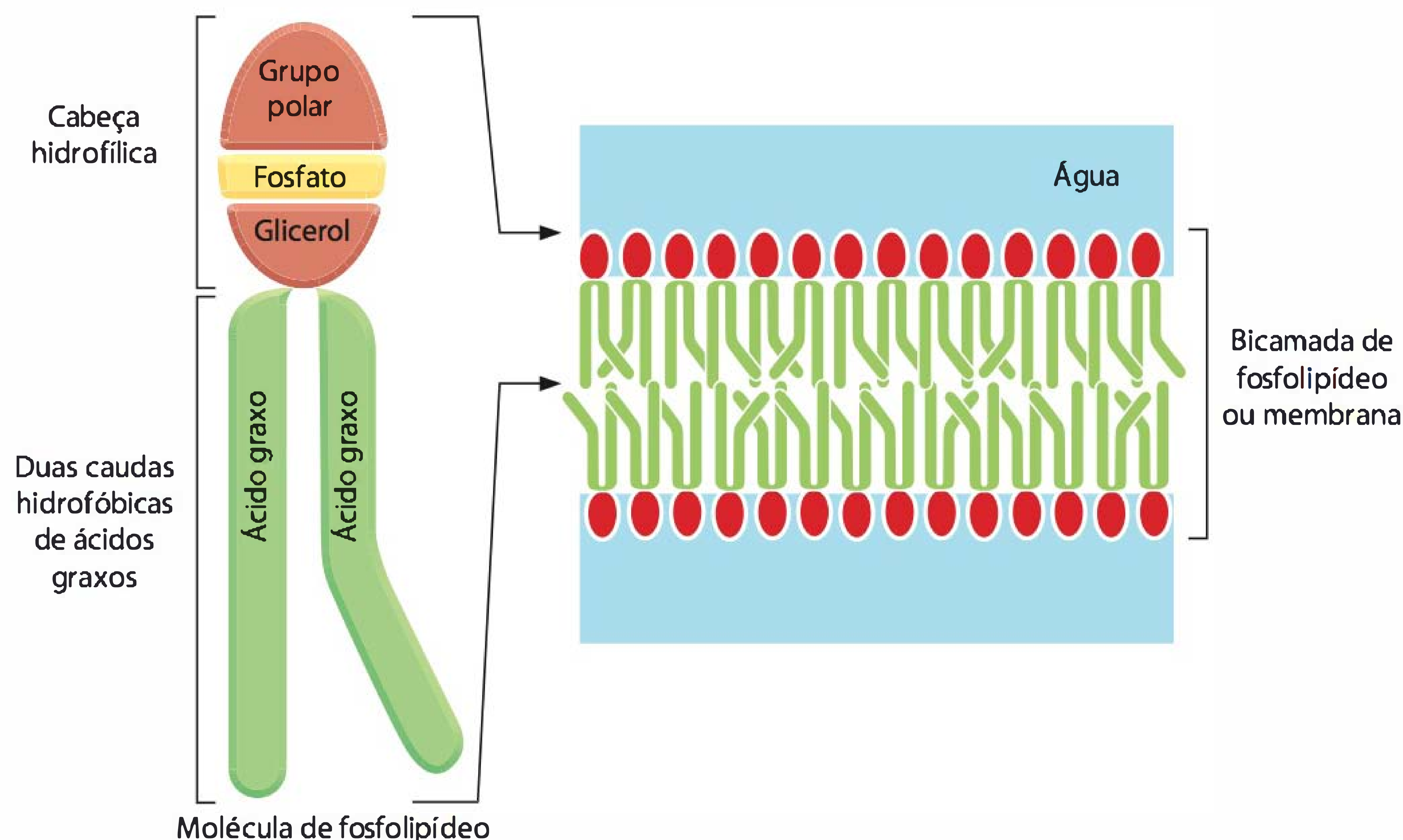


Figura 2-22 Estrutura de um fosfolipídeo e orientação dos fosfolipídeos nas membranas. Em um ambiente aquoso, as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídeos compactam-se entre si para expulsar a água. Aqui está ilustrado como formam uma bicamada na qual a cabeça hidrofílica de cada fosfolipídeo fica voltada para a água. As bicamadas lipídicas constituem a base das membranas celulares (discutido em detalhes no Capítulo 10).

dades físicas e químicas diferentes daquelas dos triacilgliceróis, que são predominantemente hidrofóbicos. Moléculas semelhantes aos fosfolipídeos, tanto com regiões hidrofóbicas como hidrofílicas, são denominadas *anfifílicas*.

A propriedade dos fosfolipídeos de formarem membranas deriva dessa natureza anfipática. Os fosfolipídeos esparramam-se sobre a superfície da água, formando uma monocamada de moléculas de fosfolipídeos com suas caudas hidrofóbicas expostas ao ar e suas cabeças hidrofílicas mantendo contato com a água. Duas dessas camadas, quando em água, podem combinar-se facilmente, cauda com cauda, formando um sanduíche de fosfolipídeos, ou melhor, uma *bicamada lipídica*, a qual constitui a base estrutural das membranas celulares (**Figura 2-22**).

Os aminoácidos são as subunidades das proteínas

Os aminoácidos formam uma classe variada de moléculas, mas apresentam uma propriedade comum que os define: todos possuem um grupo ácido carboxílico e um grupo amino, ambos ligados a um único átomo de carbono denominado carbono α (**Figura 2-23**). A variabilidade química dos aminoácidos deriva das cadeias laterais que são ligadas ao carbono α. A importância dos aminoácidos para as células deve-se ao papel que eles têm na construção de **proteínas**, que são polímeros de aminoácidos ligados cabeça com cauda formando uma longa cadeia que, então, é enovelada em uma estrutura tridimensional, única para cada proteína. A ligação covalente entre dois aminoácidos adjacentes em uma cadeia proteica forma um amido (ver Painel 2-1), sendo chamada de **ligação peptídica**; a cadeia de aminoácidos também é conhecida como *polipeptídeo* (**Figura 2-24**). Independentemente de quais sejam os aminoácidos que os formem, os polipeptídios possuem um grupo amino (NH_2) em uma de suas extremidades (seu *N-terminal*) e um grupo carboxila (COOH) na outra extremidade (seu *C-terminal*). Isso lhes dá uma direcionalidade definida, uma polaridade estrutural (comparando-se com a polaridade elétrica).

Normalmente, são encontrados 20 tipos de aminoácidos nas proteínas, cada um deles com uma cadeia diferente ligada ao átomo de carbono α (ver Painel 3-1, p. 128-129). Todos os organismos, sejam bactérias, plantas ou animais, possuem proteínas feitas dos mesmos 20 aminoácidos. A maneira como esse conjunto específico de 20 aminoácidos foi escolhido

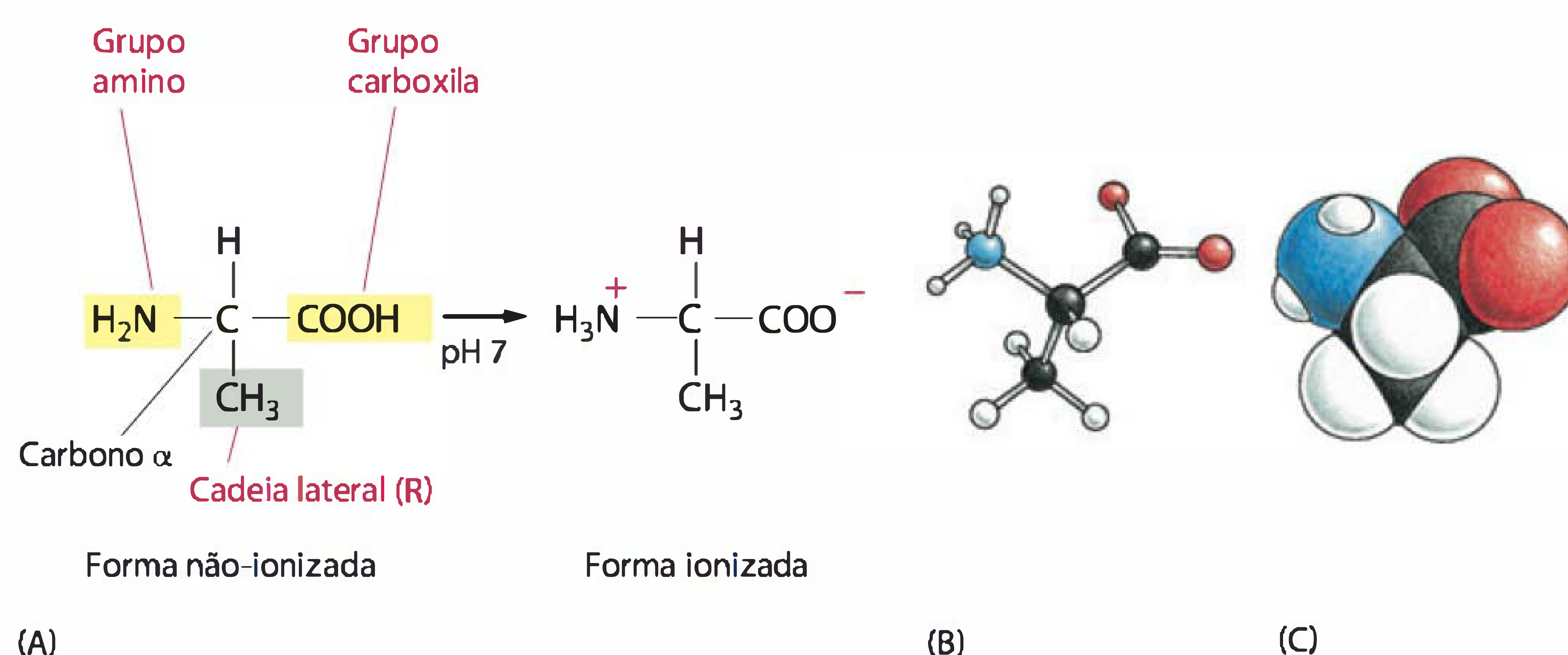


Figura 2-23 O aminoácido alanina. (A) No interior das células, onde o pH é quase 7, os aminoácidos livres ficam nas suas formas ionizadas, mas, quando incorporados em uma cadeia polipeptídica, as cargas dos grupos amino e carboxila desaparecem. (B) Modelo de esfera e bastão e (C) modelo de preenchimento espacial da alanina (H, *branco*; C, *preto*; O, *vermelho*; N, *azul*).

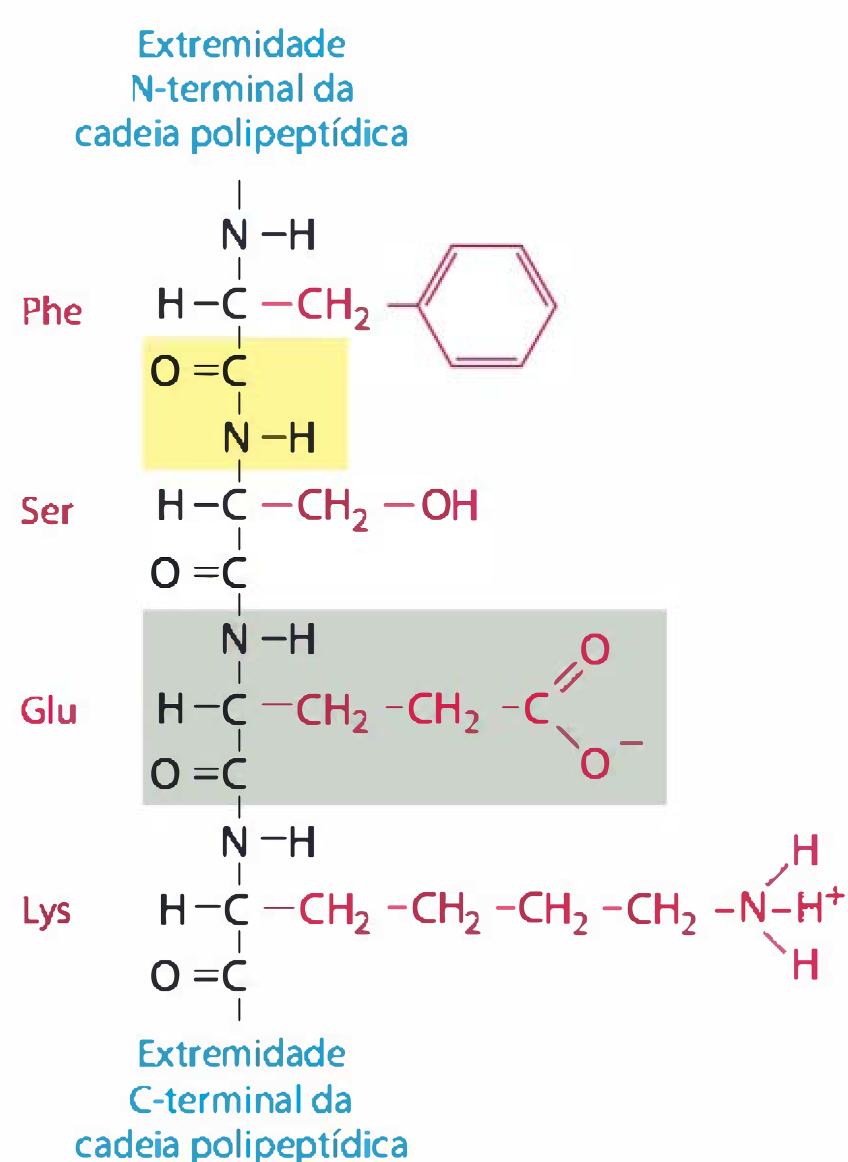


Figura 2-24 Pequena parte de uma molécula de proteína. Os quatro aminoácidos mostrados estão ligados por três ligações peptídicas, sendo que uma delas está realçada em *amarelo* e um dos aminoácidos está sombreado em *cinza*. As cadeias laterais dos aminoácidos estão mostradas em *vermelho*. As duas extremidades da cadeia polipeptídica são quimicamente distintas. Uma das extremidades, N-terminal, termina com um grupo amino e a outra, C-terminal, termina com um grupo carboxila. A sequência é sempre lida a partir da extremidade N-terminal; portanto, essa sequência é Phe-Ser-Glu-Lys.

pela natureza é um dos mistérios relacionados à evolução da vida. Não existe nenhuma razão química óbvia dos motivos pelos quais outros aminoácidos também não serviriam para essa finalidade. Mas, uma vez que a escolha foi feita, não pode haver mais mudanças, tal a dependência nesse conjunto de aminoácidos.

À semelhança dos açúcares, todos os aminoácidos, com exceção da glicina, existem como isômeros ópticos nas formas D e L (ver Painel 3-1). Entretanto, apenas as formas L são encontradas nas proteínas, embora D-aminoácidos ocorram como parte da parede de bactérias e em alguns antibióticos. A origem do uso de apenas L-aminoácidos na construção de proteínas é mais um dos mistérios da evolução.

A versatilidade química que os 20 aminoácidos-padrão possibilitam é de fundamental importância para a função das proteínas. Cinco deles possuem cadeias laterais que, quando em solução, podem formar íons e, assim, podem carregar uma carga (**Figura 2-25**). Os demais são não-carregados, alguns são polares e hidrofílicos, e outros são não-polares e hidrofóbicos. Como será discutido no Capítulo 3, as propriedades coletivas das cadeias laterais dos aminoácidos são a base da diversidade e da sofisticação das funções das proteínas.

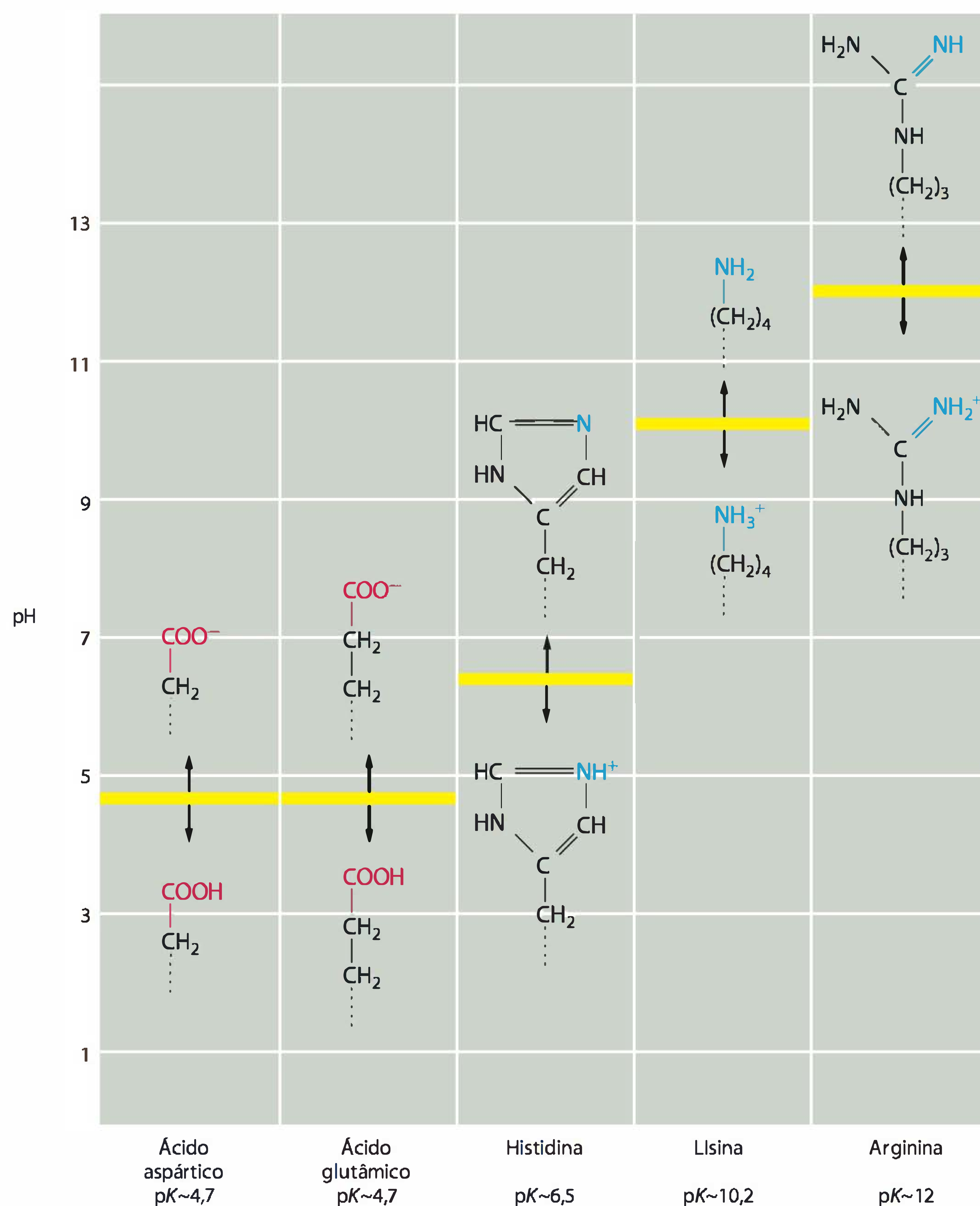


Figura 2-25 A carga das cadeias laterais dos aminoácidos depende do pH. Estão mostradas as cinco cadeias laterais que podem ter carga. Em soluções aquosas, os ácidos carboxílicos podem perder um H^+ com facilidade e formar um íon de carga negativa, que é nomeado com o sufixo "ato", como em aspartato ou glutamato. Uma situação semelhante ocorre com as aminas, que em soluções aquosas podem aceitar um H^+, formando um íon de carga positiva (que não recebe nome especial). Essas reações são prontamente reversíveis, e as quantidades de cada uma das formas, carregada e não-carregada, dependem do pH da solução. Em pH alto, os ácidos carboxílicos tendem a ficar carregados, e as aminas tendem a ficar descarregadas. Em pH baixo, ocorre o contrário, os ácidos carboxílicos ficam sem carga, e as aminas ficam carregadas. O pH no qual exatamente *metade* dos resíduos de ácido carboxílico ou de amina estão carregados é conhecido como o p*K* da cadeia lateral do aminoácido (indicado pela linha *amarela*). Nas células, o pH é de cerca de 7, e praticamente todos os ácidos carboxílicos e todas as aminas estão em suas formas totalmente carregadas.

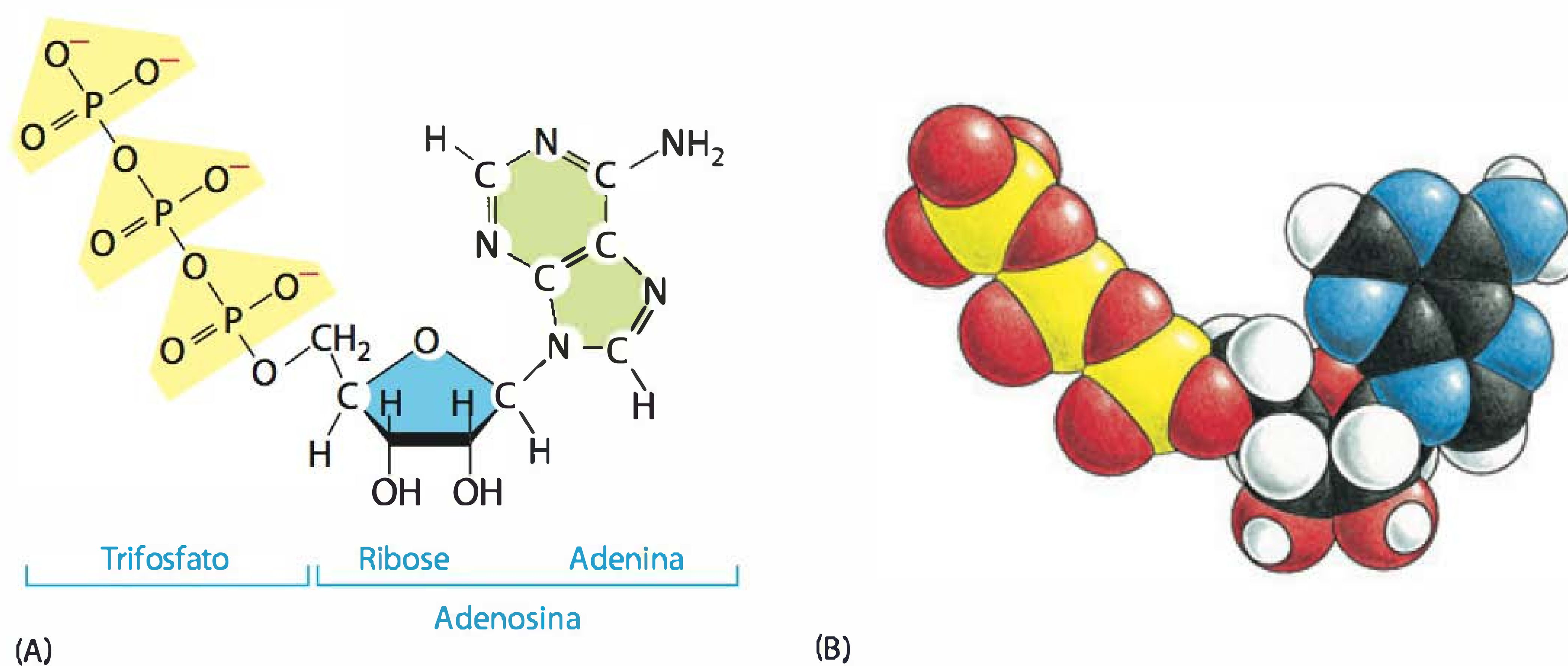


Figura 2-26 Estrutura química do trifosfato de adenosina (ATP). (A) Fórmula estrutural. (B) Modelo de preenchimento espacial. As cores dos átomos em (B) são: C, *preto*; N, *azul*; H, *branco*; O, *vermelho*; P, *amarelo*.

Os nucleotídeos são as subunidades do DNA e do RNA

Nucleotídeo é uma molécula formada por um anel que contém um nitrogênio ligado a um açúcar de cinco carbonos que, por sua vez, carrega um ou mais grupos fosfato (Painel 2-6, p. 116-117). O açúcar de cinco carbonos pode tanto ser ribose quanto desoxirribose. Os nucleotídeos que possuem ribose são conhecidos como ribonucleotídeos, e os que possuem desoxirribose são denominados desoxinucleotídeos. Os anéis contendo nitrogênio são denominados *bases*, devido a razões históricas: em condições ácidas, cada um deles pode ligar um H^+ (próton) e, assim, aumentar a concentração de íons OH^-, quando em solução aquosa. As diferentes bases guardam uma grande semelhança entre si. A *citosina* (*C*), a *timina* (*T*) e a *uracila* (*U*) são chamadas de pirimidinas porque são derivadas do anel das pirimidinas, que tem seis átomos. A *guanina* (*G*) e a *adenina* (*A*) são compostos das *purinas* e, portanto, possuem um segundo anel, de cinco membros, ligado ao anel de seis átomos. A denominação de cada um dos nucleotídeos fundamenta-se na base que eles contêm (ver Painel 2-6).

Os nucleotídeos podem atuar como carreadores de energia de curto prazo. Mais que qualquer outro carreador de energia, o nucleotídeo **trifosfato de adenosina**, ou **ATP** (***Adenosine Triphosphate***) (**Figura 2-26**), é usado para transferir energia em centenas de reações celulares. O ATP é formado por reações impelidas pela energia que é liberada na degradação oxidativa dos alimentos. Seus três fosfatos estão ligados em série por meio de duas *ligações anidrido fosfórico*, que, ao serem rompidas, liberam grandes quantidades de energia útil. O grupo fosfato terminal geralmente é liberado por hidrólise, com frequência transferindo o fosfato para uma outra molécula e liberando energia para as reações biossintéticas que necessitam de energia (**Figura 2-27**). Outros derivados de nucleotídeos servem de carreadores para a transferência de outros grupos químicos, como será descrito posteriormente.

O mais básico dos papéis dos nucleotídeos nas células é o armazenamento e a disponibilização da informação biológica. Os nucleotídeos servem como blocos ou módulos para a construção dos *ácidos nucleicos*, que são polímeros longos nos quais as subunidades nucleotídicas ficam ligadas covalentemente por meio da formação de uma **ligação fosfodiéster**

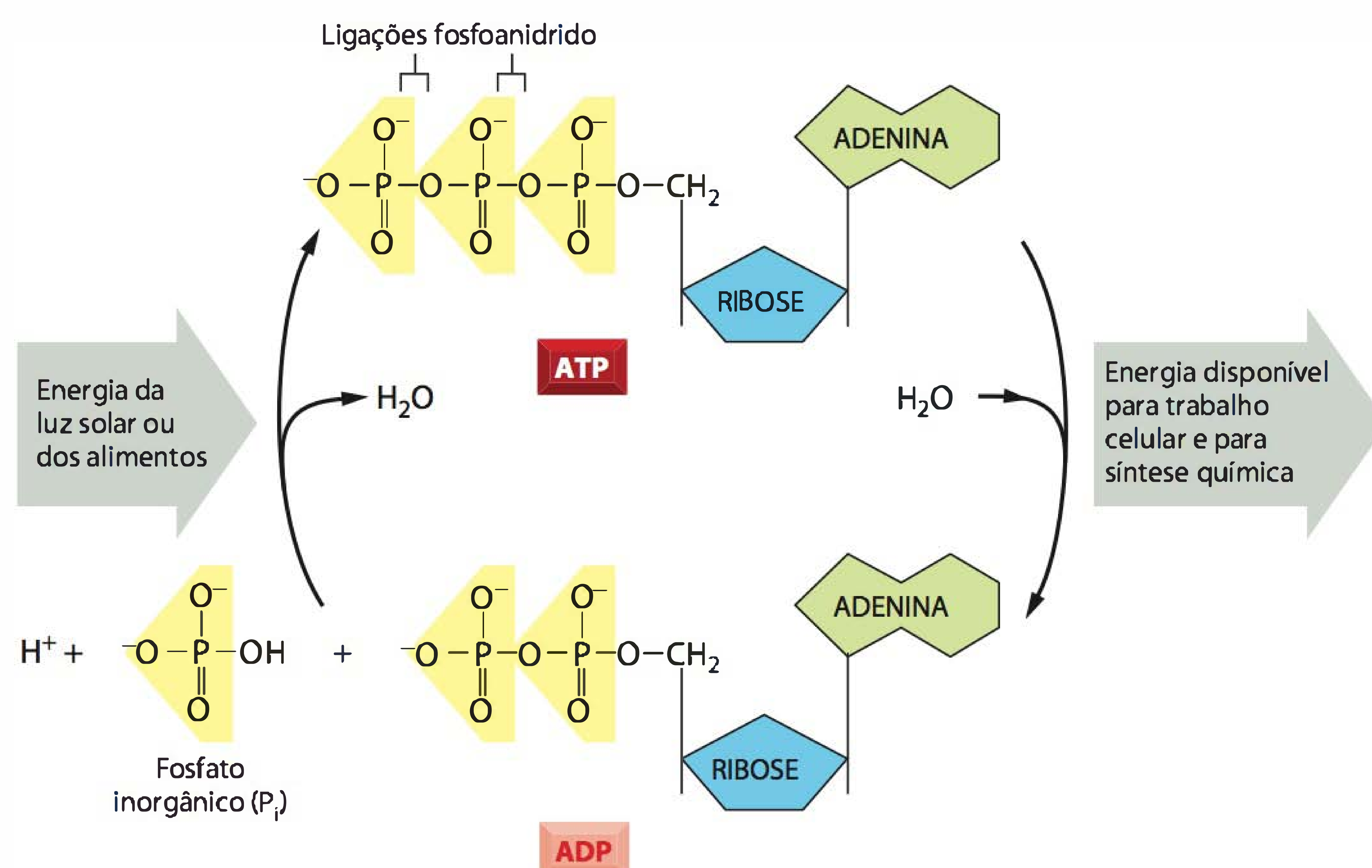


Figura 2-27 A molécula de ATP funciona como um carreador de energia nas células. A formação de ATP a partir de ADP e de fosfato inorgânico requer energia, sendo acoplada à oxidação dos alimentos, que libera energia (nas células animais, nos fungos e em algumas bactérias), ou então à captura da energia da luz (nas plantas e em algumas bactérias). Por sua vez, a hidrólise de ATP novamente em ADP e fosfato inorgânico supre a energia necessária para que ocorram muitas reações celulares.

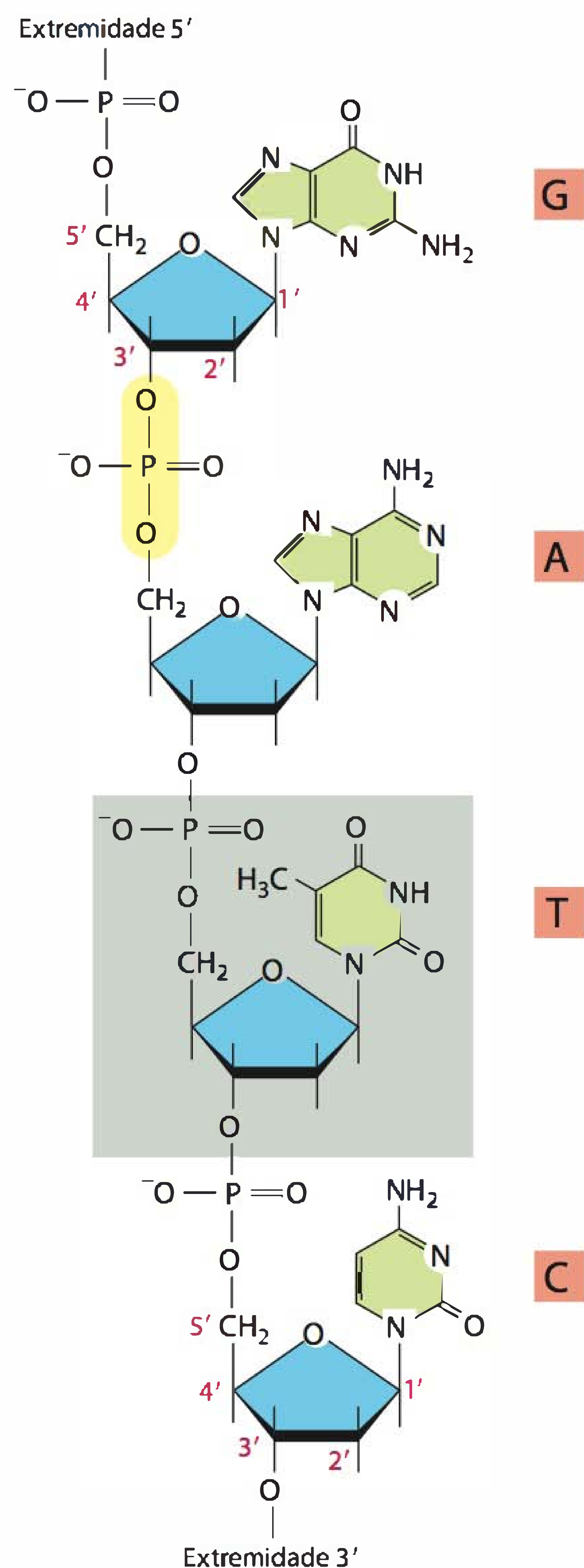


Figura 2-28 Pequeno segmento de uma cadeia de uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). Quatro nucleotídeos são mostrados. Uma das ligações fosfodiéster que liga resíduos de nucleotídeos adjacentes está realçada em *amarelo*, e um dos nucleotídeos está sombreado em *cinza*. Os nucleotídeos são ligados entre si por ligação fosfodiéster por meio de átomos específicos da ribose, conhecidos como átomos 5′ e 3′. Por essa razão, uma das extremidades da cadeia polinucleotídica, a *extremidade* 5′, deverá ter um grupo fosfato livre, e a outra extremidade, a *extremidade* 3′, um grupo hidroxila livre. A sequência linear de nucleotídeos da cadeia polinucleotídica geralmente é abreviada por um código de uma letra, e a sequência é sempre lida a partir da extremidade 5′. No exemplo desta ilustração, a sequência é G–A–T–C.

entre o grupo fosfato ligado ao açúcar de um nucleotídeo e o grupo hidroxila do açúcar do nucleotídeo seguinte (**Figura 2-28**). As cadeias de ácidos nucleicos são sintetizadas a partir dos trifosfatos de nucleosídeo (que são ricos em energia) por intermédio de uma reação de condensação que libera pirofosfato inorgânico durante a formação da ligação fosfodiéster.

Existem dois tipos principais de ácidos nucleicos, os quais diferem quanto ao tipo de açúcar fosfato em suas respectivas estruturas. Os nucleotídeos com base no açúcar *ribose* são conhecidos como **ácidos ribonucleicos**, ou **RNAs (*ribonucleic acids*),** e contêm as bases A, G, C e U. Aqueles que têm como base a *desoxirribose* na qual a hidroxila na posição 2' do anel de carbonos da ribose é substituída por um hidrogênio) são conhecidos como **ácidos desoxirribonucleicos,** ou **DNAs (deoxyribonucleic acids)**, e contêm as bases A, G, C e T (T é quimicamente semelhante à U do RNA, diferindo-se apenas pela adição de um grupo metila ao anel pirimidínico; ver Painel 2-6). Geralmente o RNA está presente nas células na forma de uma cadeia de polinucleotídeos única. O DNA, por outro lado, aparece quase sempre na forma de uma molécula de fita dupla. A dupla-hélice do DNA é formada por duas cadeias polinucleotídicas correndo de forma antiparalela uma em relação à outra, e mantidas juntas por ligações de hidrogênio que se formam entre as bases das duas cadeias.

A sequência linear dos nucleotídeos no DNA e no RNA codifica a informação genética das células. A habilidade das bases nas moléculas de ácidos nucleicos diferentes de reconhecerem-se e parearem-se umas com as outras, por meio de ligações de hidrogênio (denominados *pareamento de bases*) – G com C, e A tanto com T quanto com U –, fundamenta toda a hierarquia da evolução, como está explicado no Capítulo 4.

A química das células é dominada por macromoléculas com propriedades extraordinárias

Em termos de peso, as macromoléculas são de longe as mais abundantes das moléculas contendo carbono presentes em uma célula (**Figura 2-29** e **Tabela 2-3**). Elas são os principais blocos que servem para formar as células e também os componentes que conferem as características específicas dos seres vivos. Nas células, as macromoléculas são polímeros construídos simplesmente pela ligação covalente entre pequenas moléculas orgânicas (chamadas de *monômeros*, ou subunidades), formando longas cadeias (**Figura 2-30**). Ademais, essas macromoléculas possuem muitas propriedades extraordinárias que não podem ser previstas com base em seus constituintes simples.

As proteínas são especialmente abundantes e versáteis; executam milhares de funções diferentes nas células. Muitas proteínas funcionam como *enzimas*, os catalisadores que go-

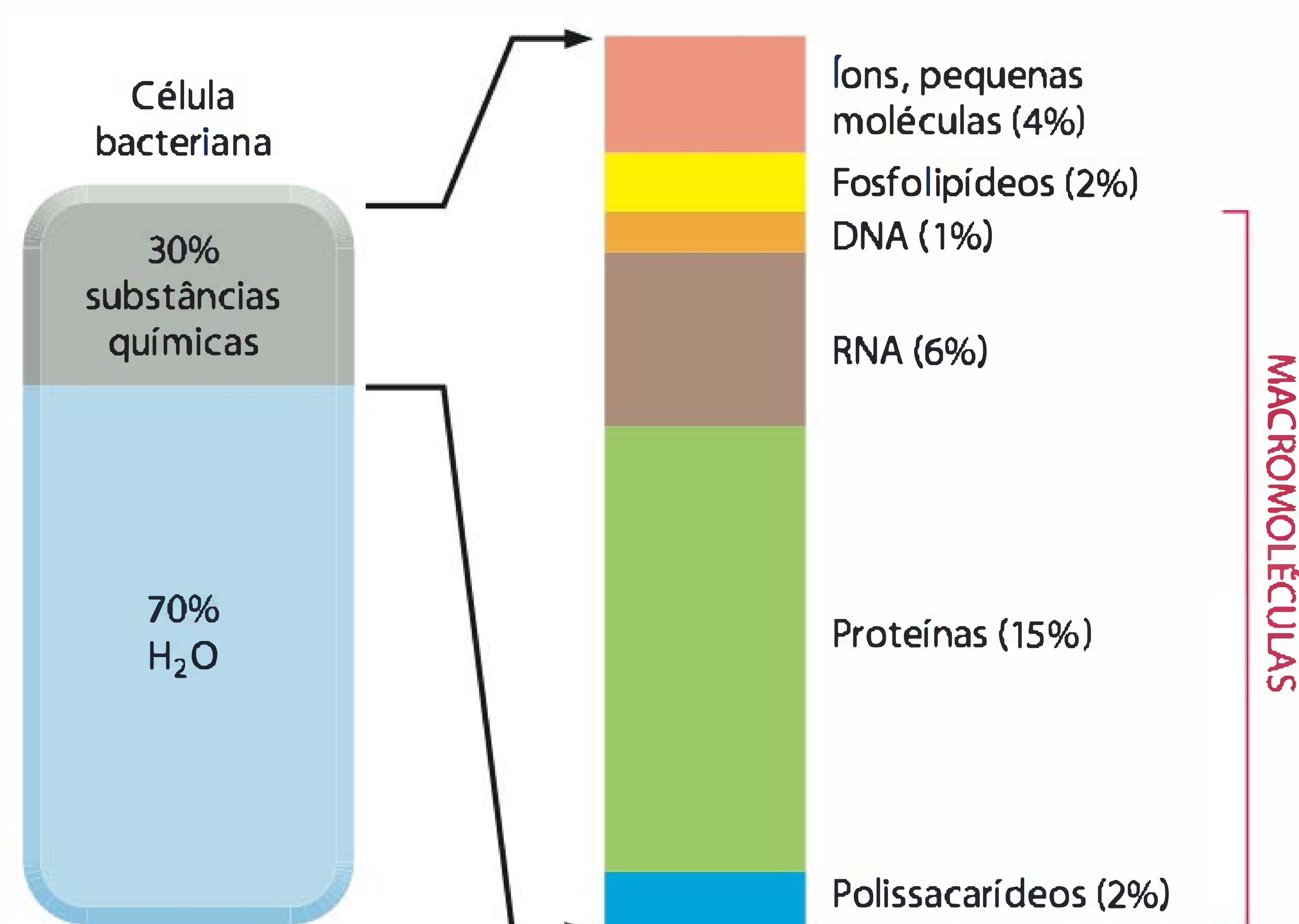


Figura 2-29 As macromoléculas são abundantes nas células. É apresentada, em relação ao peso, a composição aproximada de uma célula bacteriana. A composição das células animais é semelhante (verTabela 2-3).

Tabela 2-3 Composição química aproximada de células bacterianas e de mamíferos típicas

Componente	Porcentagem do peso total da célula	
	Bactéria *E. Coli*	Célula de mamífero
H_2O	70	70
Íons inorgânicos (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, etc.)	1	1
Miscelânea de metabólitos pequenos	3	3
Proteínas	15	1B
RNA	6	1,1
DNA	1	0,25
Fosfolipídeo	2	3
Outros lipídeos	-	2
Polissacarídeos	2	2
Volume celular total	2×10^{-12} cm^3	4×10^{-9} cm^3
Volume celular relativo	1	2.000

Proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA são macromoléculas. Os lipídeos geralmente não são classificados como macromoléculas, mesmo que compartilhem algumas de suas características; por exemplo, muitos são sintetizados como polímeros lineares de moléculas pequenas (grupo acetila ou acetil-CoA), e autoassociam-se em estruturas enormes (membranas). Observe que a água e as proteínas perfazem a maior parte da massa tanto de células de mamíferos como de células de bactérias.

vernam o enorme número de reações que formam e que rompem as ligações covalentes necessárias para as células. Todas as reações das quais as células extraem energia das moléculas dos alimentos são catalisadas por proteínas que funcionam como enzimas (p. ex., a enzima denominada carboxilase da bifosfatorribulose converte, nos organismos fotossintéticos, o CO_2 em açúcares), produzindo a maior parte da matéria orgânica necessária para a vida na Terra. Outras proteínas são utilizadas para construir componentes estruturais, como a tubulina, uma proteína que se autoagrupa para formar os longos microtúbulos das células, ou as histonas, proteínas que compactam o DNA nos cromossomos. Outras proteínas, ainda, atuam como motores moleculares que produzem força e movimento, como é o caso da miosina, nos músculos. As proteínas podem ter uma ampla variedade de outras funções. Ainda neste livro, as bases moleculares de muitas delas serão examinadas. Aqui estão mencionados apenas alguns dos princípios gerais da química das macromoléculas que tornam essas funções possíveis.

Embora as reações químicas que adicionam subunidades a cada polímero (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos) tenham detalhes diferentes, elas compartilham características comuns importantes. O crescimento dos polímeros ocorre pela adição de um monômero à extremidade da cadeia polimérica que está crescendo, por meio de uma *reação de condensação*, na qual uma molécula de água é perdida cada vez que uma subunidade é adicionada (ver Figura 2-19). A polimerização pela adição dos monômeros, um a um, para formar cadeias longas, é a maneira mais simples de construir uma molécula grande e complexa, pois as subunidades são adicionadas por uma mesma reação que é repetida muitas e muitas vezes pelo mesmo conjunto de enzimas. Em certo sentido, o processo assemelha-se às operações repetitivas das máquinas em uma fábrica, exceto por um aspecto crucial. Deixando de lado alguns dos polissacarídeos, a maior parte das macromoléculas é formada a partir de um conjunto de monômeros com pequenas diferenças entre si, como os 20 aminoácidos que participam da construção das proteínas. Para a vida, é especialmente crítico que as cadeias de polímeros não sejam feitas pela montagem das subunidades aleatoriamente. Ao contrário, as subunidades são adicionadas segundo uma ordem bem-definida, ou *sequência*. Os mecanismos sofisticados que permitem que isso ocorra estão relacionados às enzimas e encontram-se descritos em detalhes nos Capítulos 5 e 6.

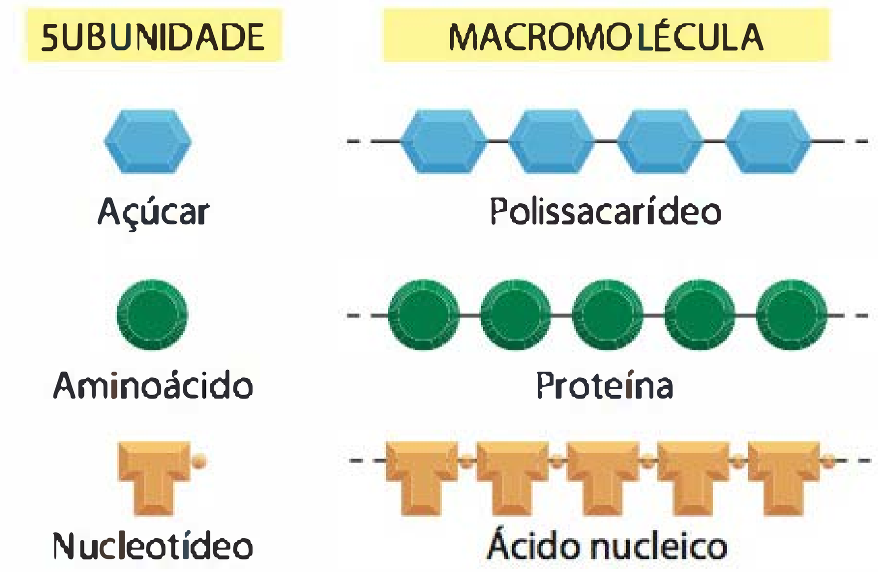


Figura 2-30 Três famílias de macromoléculas. Cada uma delas é um polímero formado por moléculas pequenas (denominadas monômeros) ligadas entre si por ligações covalentes.

As ligações monovalentes determinam tanto a forma precisa das macromoléculas como as ligações com outras moléculas

A maior parte das ligações covalentes das macromoléculas permite a rotação dos átomos que participam da reação, de modo que as cadeias de polímeros possuem enorme flexibilidade. Em princípio, isso possibilita que a macromolécula adote um número praticamente

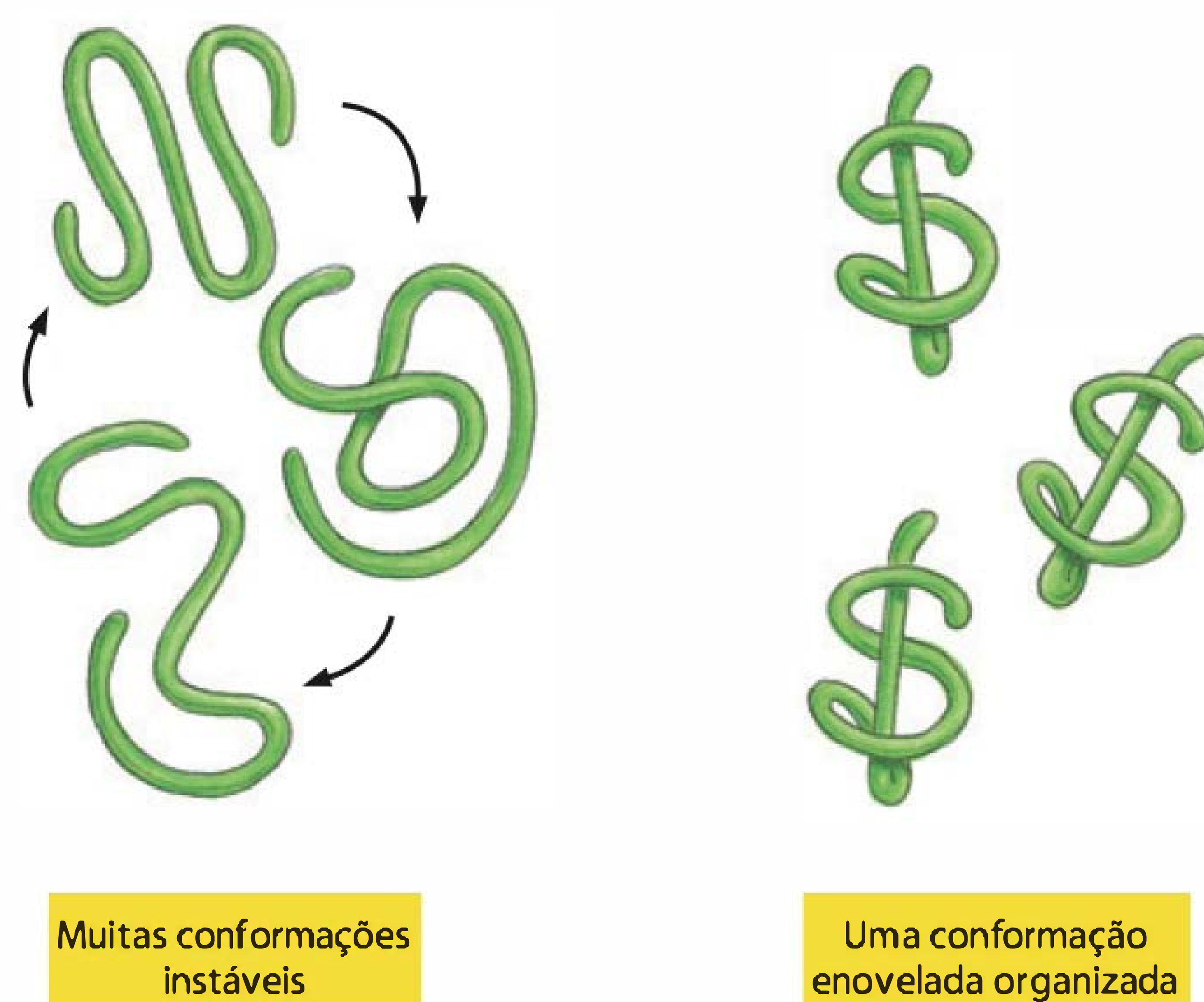


Figura 2-31 A maioria das moléculas de proteínas e muitas moléculas de RNA enovelam-se em apenas uma conformação estável. Se ligações não-covalentes que mantêm essa conformação estável forem rompidas, a molécula passa a ser uma cadeia flexível e, geralmente, sem valor biológico.

ilimitado de formas, ou *conformações*, devido a oscilações e giros causados pela energia térmica, que é aleatória. Entretanto, as formas específicas da maior parte das macromoléculas são altamente condicionadas pelas muitas ligações não-covalentes fracas formadas entre as diferentes partes da própria molécula. Caso essas ligações não-covalentes sejam formadas em número suficiente, a cadeia do polímero pode ter preferência por uma dada conformação, determinada pela sequência linear dos monômeros na cadeia. Por isso, praticamente todas as moléculas de proteína, e muitas das moléculas de RNAs pequenos encontradas nas células, organizam-se em uma conformação altamente preferencial (**Figura 2-31**).

Os quatro tipos de interações não-covalentes importantes nas moléculas biológicas foram descritos previamente neste capítulo e são revisados no Painel 2-3 (p. 110-111). Embora individualmente muito fracas, essas interações não somente cooperam para que as moléculas biológicas organizem-se nas suas formas características, mas também podem se somar para criar uma atração forte entre duas moléculas diferentes, quando encaixarem-se muito proximamente, como uma mão em uma luva. Essas formas de interações moleculares permitem uma grande especificidade porque os contatos múltiplos necessários para uma associação forte permitem que uma macromolécula selecione, por meio da associação, apenas um entre os muitos milhares de outros tipos de moléculas presentes nas células. Além disso, uma vez que a intensidade da associação depende do número de ligações não-covalentes formadas, é possível a ocorrência de interações com praticamente qualquer afinidade de modo a permitir, quando necessário, uma dissociação rápida.

Associações desse tipo permeiam todas as catálises biológicas, possibilitando que as proteínas funcionem como enzimas. As interações não-covalentes também permitem que as macromoléculas sejam usadas como blocos constitutivos de estruturas ainda maiores. Nas células, as macromoléculas frequentemente associam-se entre si, formando grandes complexos e, assim, criam maquinarias intricadas, com muitas partes móveis, que executam tarefas complexas, como a replicação do DNA e a síntese das proteínas (**Figura 2-32**).

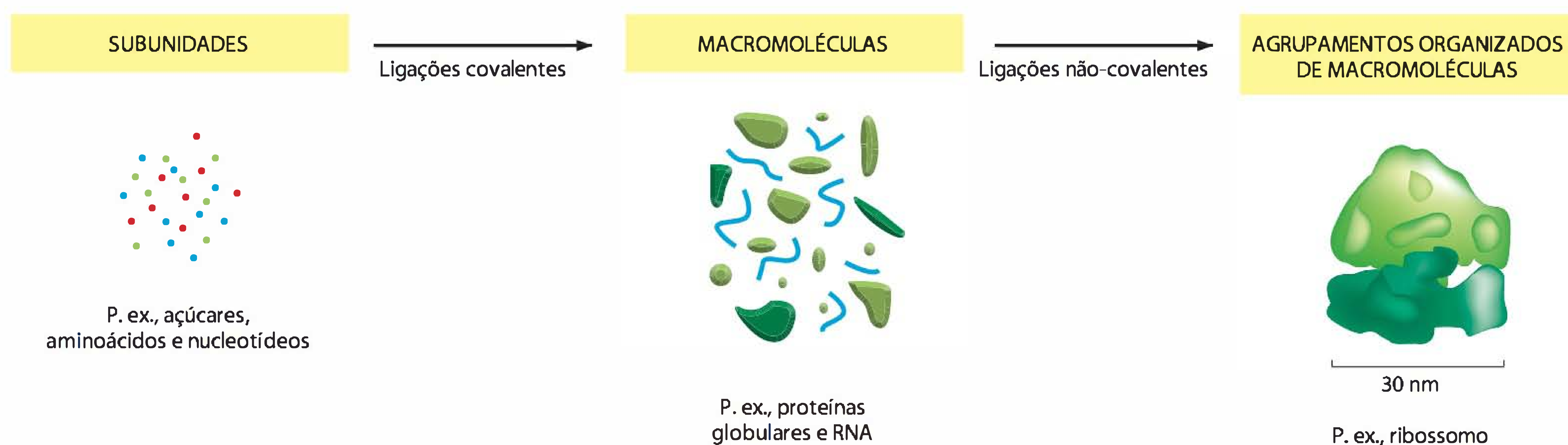


Figura 2-32 Moléculas pequenas, proteínas e um ribossomo desenhados em escala aproximada. Os ribossomos são parte central da maquinaria que as células utilizam para fazer as proteínas: cada ribossomo é um complexo de aproximadamente 90 macromoléculas (moléculas de proteínas e de RNA).

Resumo

Os organismos vivos são sistemas químicos autônomos que se autopropagam. Eles são feitos de um conjunto restrito e determinado de pequenas moléculas com base no carbono que, essencialmente, são as mesmas em todas as espécies de seres vivos. Cada uma dessas moléculas é formada por um conjunto pequeno de átomos ligados entre si por ligações covalentes em uma configuração precisa. As principais categorias são os açúcares, os ácidos graxos, os aminoácidos e os nucleotídeos. Os açúcares constituem-se na fonte primária de energia química das células e podem ser incorporados em polissacarídeos para o armazenamento de energia. Os ácidos graxos também são importantes como reserva de energia, mas sua função fundamental é a formação das membranas biológicas. Os polímeros constituídos de aminoácidos formam as moléculas, notavelmente diversas e versáteis, conhecidas como proteínas. Os nucleotídeos têm um papel central nas transferências de energia e também são subunidades que participam na formação das macromoléculas informacionais: RNA e DNA.

A maior parte da massa seca de uma célula consiste em macromoléculas que são polímeros lineares de aminoácidos (proteínas) ou de nucleotídeos (DNA e RNA) ligados entre si covalentemente, segundo uma ordem exata. As moléculas de proteínas e de muitos RNAs organizam-se em uma conformação única, que depende da sequência de suas subunidades. Esse processo de organização cria superfícies também únicas, que dependem de um conjunto grande de interações fracas produzidas por forças não-covalentes entre seus átomos. Essas forças são de quatro tipos: ligação iônica, ligação de hidrogênio, atrações de van der Waals e interações entre grupos não-polares causadas pela sua expulsão hidrofóbica da água. O mesmo conjunto de forças fracas governa a ligação específica de outras moléculas às macromoléculas, tornando possível a miríade de associações entre moléculas biológicas que formam as estruturas e a química das células.

CATÁLISE E O USO DE ENERGIA PELAS CÉLULAS

Uma propriedade dos seres vivos, mais do que qualquer outra, faz com que pareçam quase miraculosamente diferentes da matéria não-viva: eles criam e mantêm ordem em um universo que está sempre tendendo a aumentar a desordem (**Figura 2-33**). Para criar essa ordem, as células dos organismos vivos devem executar uma série de reações químicas que nunca termina. Em algumas dessas reações, as moléculas pequenas – aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e lipídeos – são usadas diretamente ou modificadas para suprir as células com todas as outras moléculas pequenas de que elas necessitam. Em outras reações, essas moléculas pequenas são usadas para construir a enorme e diversa gama de proteínas, de ácidos nucleicos e de outras macromoléculas que conferem todas as propriedades características dos sistemas vivos. Cada célula pode ser vista como se fosse uma pequena indústria química, executando milhões de reações a cada segundo.

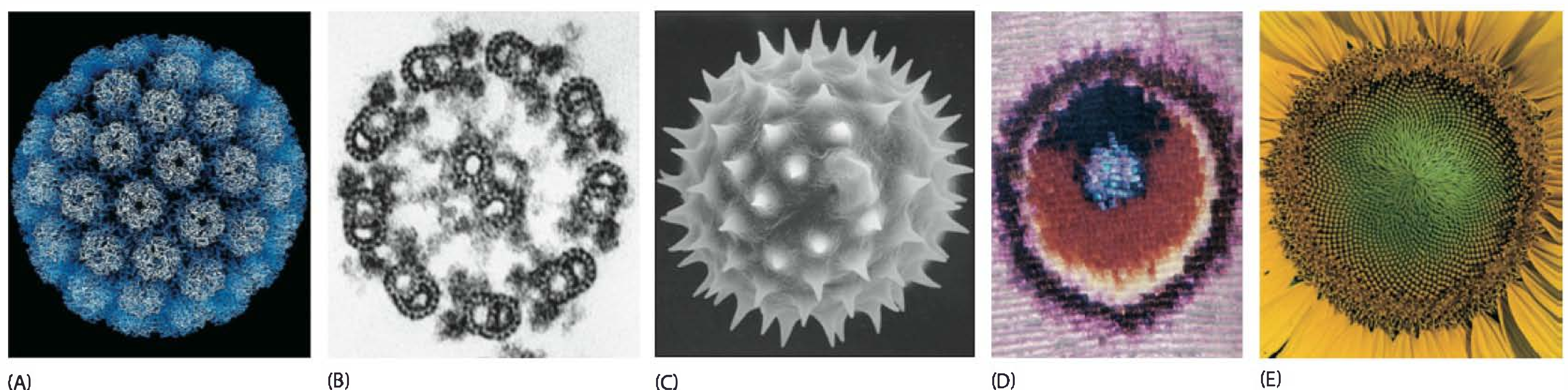


Figura 2-33 Ordem em estruturas biológicas. Padrões espaciais bem-definidos, rebuscados e bonitos, podem ser encontrados em cada um dos níveis de organização dos seres vivos. Por ordem crescente de tamanho: (A) moléculas de proteínas no revestimento de um vírus; (B) feixe regular de microtúbulos da cauda de um espermatozoide visto em secção transversal; (C) contorno da superfície de um grão de pólen (uma célula isolada); (D) amplificação da asa de uma borboleta mostrando o padrão escalonado, sendo que cada nível é o produto de uma única célula; (E) arranjo espiralado de sementes, formadas por milhões de células, da flor de girassol. (A, cortesia de R. A. Grant e J. M. Hogle; B, cortesia de Lewis Tilney; C, cortesia de Colin MacFarlane e Chris Jeffree; D, cortesia de Kjell B. Sandved.)

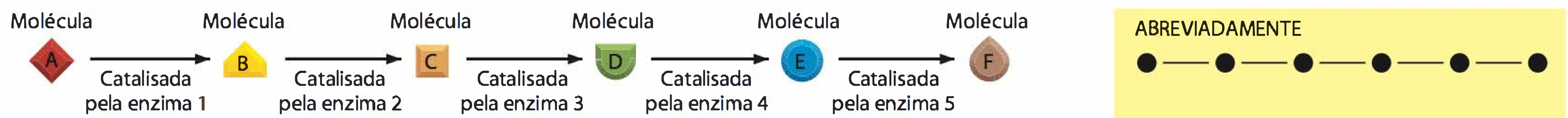


Figura 2-34 Como um conjunto de reações catalisadas por enzimas origina uma via metabólica. Cada uma das enzimas catalisa uma dada reação química sem que a enzima seja modificada. Neste exemplo, um conjunto de enzimas age em série para converter a molécula A na molécula F, formando uma via metabólica.

O metabolismo celular é organizado por enzimas

As reações químicas que as células executam normalmente ocorreriam apenas em temperaturas muito maiores do que as que existem no interior das células. Por isso, cada reação requer um potenciador específico das reatividades químicas. Esse requisito é crucial, porque permite que a célula controle cada reação. Esse controle é exercido por proteínas especializadas chamadas de *enzimas*, cada uma delas acelerando, ou *catalisando*, somente um entre os vários tipos de reações possíveis das quais uma determinada molécula pode participar. As reações catalisadas por enzimas geralmente são conectadas em série, de modo que o produto de uma reação torna-se o material de partida, ou substrato, da reação seguinte (**Figura 2-34**). Essas vias de reações são lineares e longas e, por sua vez, estão ligadas umas às outras, formando um emaranhado de reações interconectadas. É isso que permite às células sobreviverem, crescerem e se reproduzirem (**Figura 2-35**).

Duas vertentes de reações opostas ocorrem nas células: (1) as vias *catabólicas* degradam os alimentos em moléculas menores, de modo a gerar tanto uma forma de energia utilizável pela célula, quanto as pequenas moléculas que a célula necessita como blocos constitutivos, e (2) as rotas *anabólicas*, ou *biossintéticas*, usam a energia liberada pelo catabolismo de maneira controlada para a síntese de todas as outras moléculas que formam as células. O conjunto desses dois grupos de reações constitui o **metabolismo** celular (**Figura 2-36**).

Muitos dos pormenores do metabolismo celular são o assunto tradicional da *bioquímica* e não dizem respeito ao assunto tratado aqui. Entretanto, os princípios gerais pelos quais a célula obtém energia a partir do seu ambiente e a utilizam para criar ordem é um ponto central da biologia celular. Inicialmente, será discutido por que é necessário haver um suprimento constante de energia para que os organismos vivos se sustentem.

A ordem biológica é possibilitada pela liberação de energia térmica pelas células

A tendência universal das coisas tornarem-se desordenadas é expressa em uma lei fundamental da física – a *segunda lei da termodinâmica*. Ela diz que, no universo, ou em qualquer sistema isolado (uma coleção de matéria completamente isolada do resto do universo), o grau de desordem somente pode crescer. Essa lei tem implicações tão profundas para todos os seres vivos, que merece ser abordada de várias maneiras.

Por exemplo, pode-se apresentar a segunda lei em termos de probabilidades e estabelecer que o sistema mudará, espontaneamente, para a organização de maior possibilidade. Considerando-se, por exemplo, uma caixa contendo cem moedas com o lado da cara virado para cima, uma sequência de acidentes que perturbem a caixa fará com que o arranjo se altere para uma mistura com 50 moedas com a cara para cima e 50 com a coroa para cima. A razão é simples: existe um número enorme de arranjos possíveis na mistura, nos quais cada moeda individualmente pode chegar a um resultado de 50-50, mas existe somente um arranjo que mantém todas as moedas orientadas com a cara para cima. Devido ao fato de que a mistura 50-50 é a mais provável, dizemos que ela é mais "desordenada". Pela mesma razão,

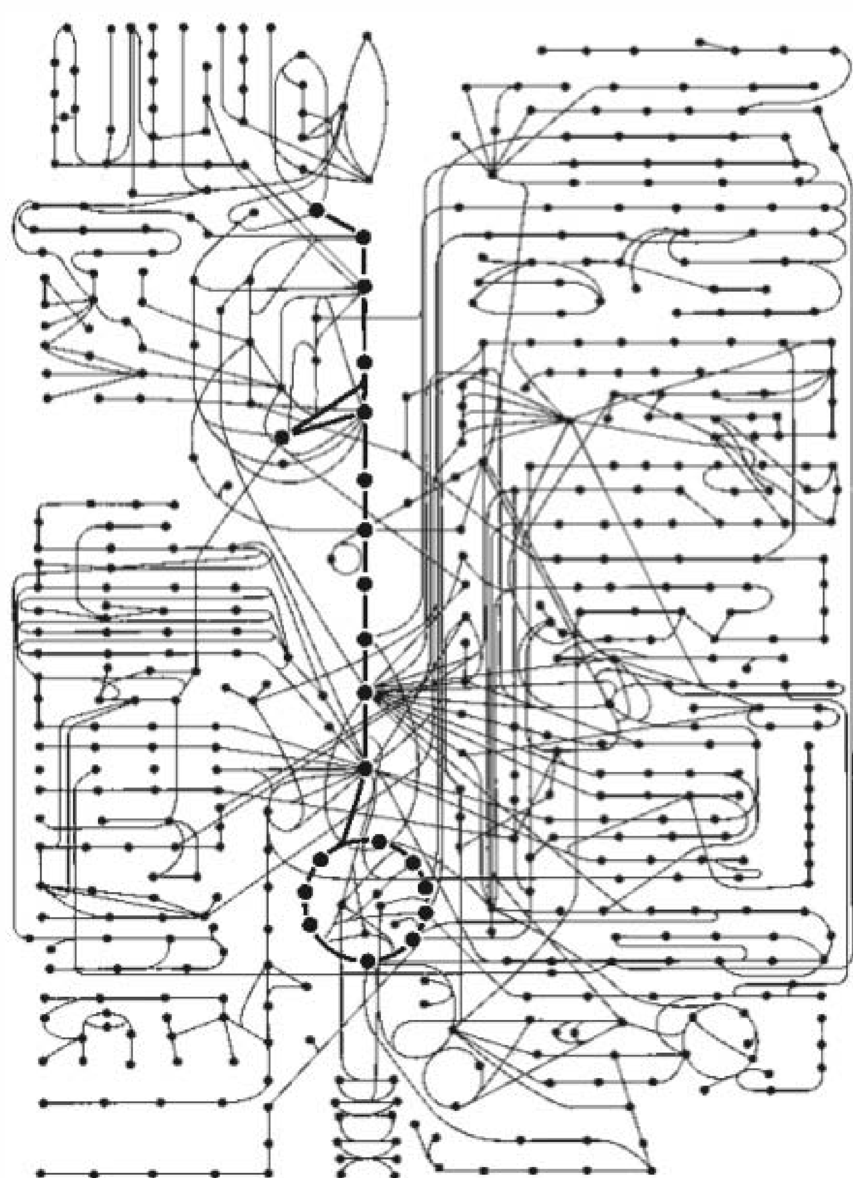


Figura 2-35 Algumas vias metabólicas e suas interconexões em uma célula típica. Cerca de 500 reações metabólicas comuns estão mostradas no diagrama; cada molécula das vias metabólicas está representada por um círculo preenchido, da mesma maneira que na caixa *amarela* da Figura 2-34. A via que está ressaltada no diagrama com círculos maiores e linhas de conexão é a via central do metabolismo dos açúcares, que será discutido resumidamente.

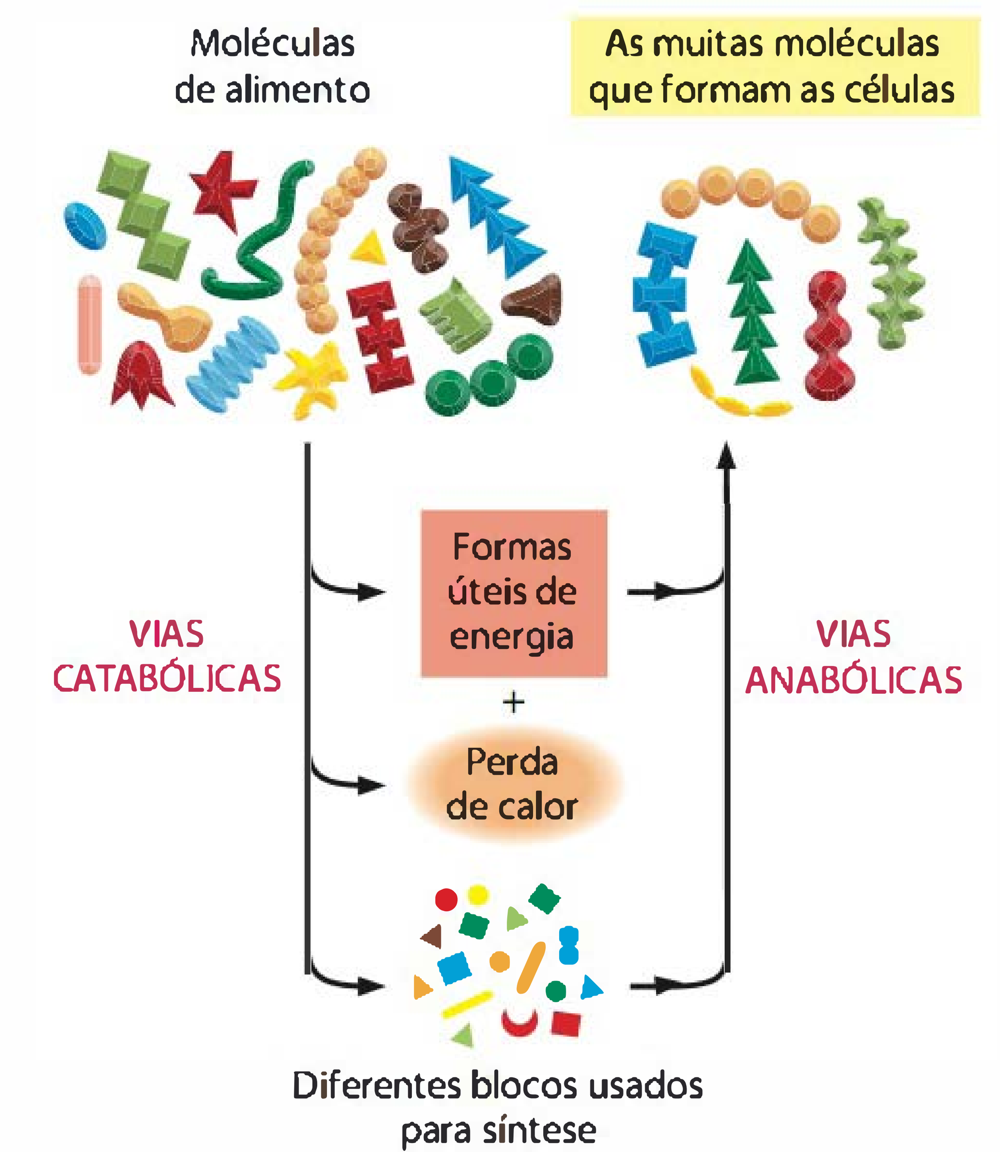


Figura 2-36 Representação esquemática das relações entre as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo. Uma vez que a maior parte da energia armazenada nas ligações químicas das moléculas dos alimentos é dissipada na forma de calor, a massa de alimento de que um organismo necessita para obter toda a sua energia do catabolismo é muito maior do que a massa de moléculas que pode ser produzida pelo anabolismo.

é muito frequente que as casas das pessoas tornem-se cada vez mais desordenadas caso não seja feito algum esforço intencional. O movimento na direção da desordem é um *processo espontâneo*, sendo necessário um esforço periódico para revertê-lo (**Figura 2-37**).

A desordem em um sistema pode ser quantificada. A grandeza usada para medir esse tipo de desordem é a **entropia** do sistema: maior a desordem, maior a entropia. Assim, uma terceira maneira de expressar a segunda lei da termodinâmica é dizer que o sistema mudará espontaneamente para o estado de organização que tiver a maior entropia.

As células vivas, por sobreviverem, crescerem e formarem organismos complexos, estão continuamente gerando ordem e, assim, pode parecer que desafiam a segunda lei da termodinâmica. Como isso é possível? A resposta é que a célula não constitui um sistema isolado. Ela toma energia do ambiente, na forma de alimento, ou como fótons do sol (ou mesmo, como ocorre em certas bactérias quimossintéticas, apenas de moléculas inorgânicas), e usa essa energia para gerar ordem para si mesma. No curso das reações químicas que geram ordem, parte da energia que as células usam é convertida em calor. O calor é descarregado no ambiente onde as células se encontram e o deixa mais desorganizado, de maneira que a entropia total – a da célula mais a dos seus arredores – aumenta, exatamente como as leis da física determinam.

Para se entender os princípios que governam essas conversões de energia, é conveniente imaginar que as células estivessem em um mar de matéria que representasse o resto do universo. À medida que as células vivem e crescem, elas criam uma ordem interna, mas também permanentemente liberam energia térmica, quando sintetizam moléculas e as organizam em estruturas celulares. Calor é energia na sua forma mais desordenada – a colisão aleatória de moléculas. Quando as células liberam calor para o mar, esse calor produz um aumento na intensidade do movimento molecular no mar (movimento térmico) e, assim, há aumento da aleatoriedade, ou da desordem do mar. A segunda lei da termodinâmica é obedecida porque o aumento de ordem no interior das células é mais do que compensado pelo enorme decréscimo na ordem (aumento da entropia) nos arredores do mar de matéria (**Figura 2-38**).

De onde vem o calor que as células liberam? Aqui aparece outra lei importante da termodinâmica. A *primeira lei da termodinâmica* estabelece que a energia pode ser con-



Figura 2-37 Ilustração tomada da vida cotidiana sobre a tendência espontânea para a desordem. Reverter essa tendência em direção à desordem requer um esforço intencional e um gasto de energia: isso não é espontâneo. De fato, pela segunda lei da termodinâmica, é certo que a intervenção humana necessária irá liberar calor suficiente para o ambiente com o objetivo de compensar o reordenamento dos objetos no quarto.

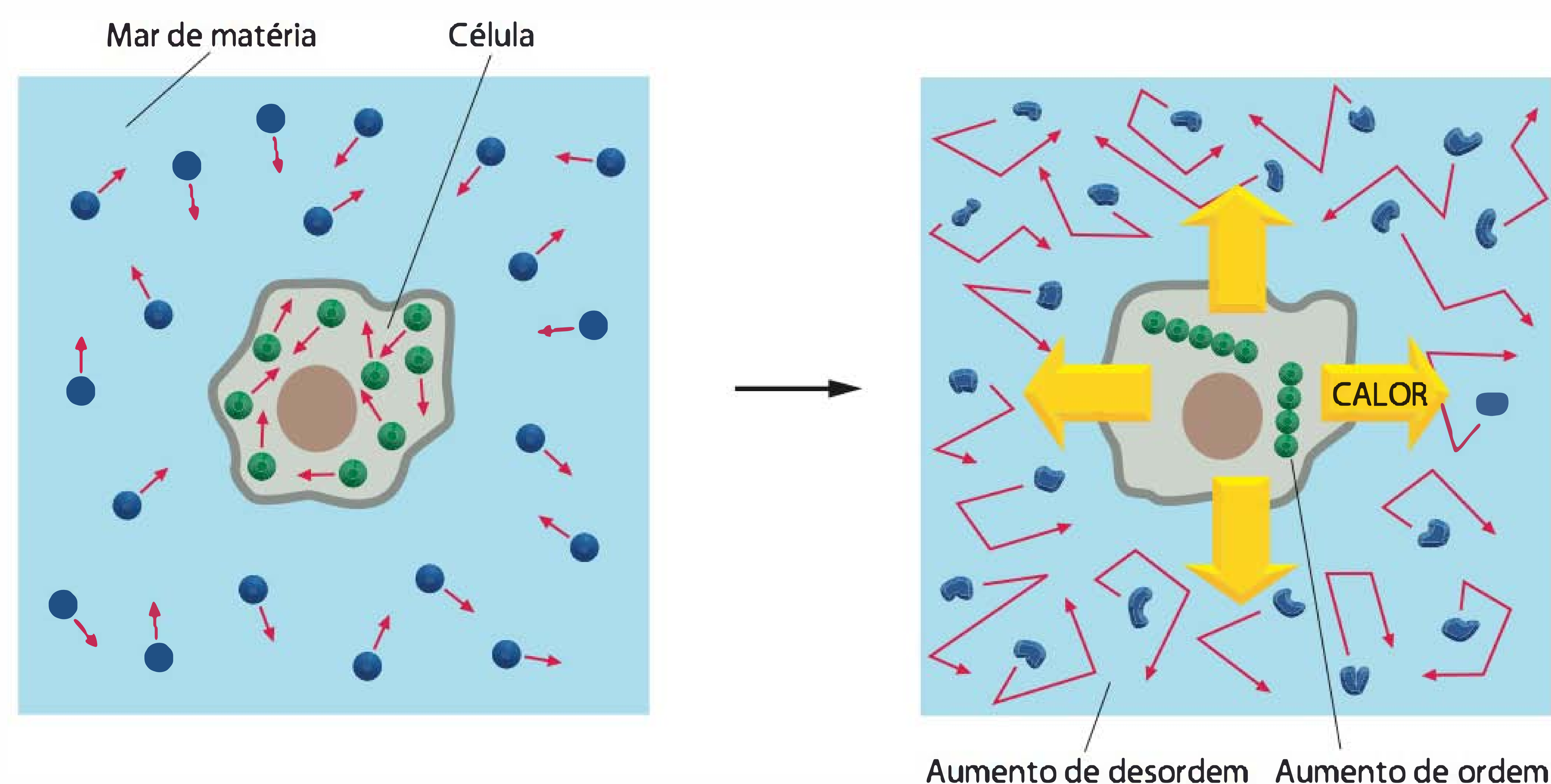


Figura 2-38 Análise termodinâmica simplificada de uma célula viva. No diagrama da esquerda, as moléculas, tanto da célula como do restante do universo (o mar de matéria), estão em um estado de relativa desordem. No diagrama da direita, observa-se que a célula obteve energia das moléculas dos alimentos e que as reações que ordenam as moléculas que a célula possui liberaram calor. Como o calor aumenta a desordem do ambiente que circunda a célula (esquematizado como flechas dobradas e moléculas destorcidas, para indicar o aumento na energia cinética causado pelo calor), a segunda lei da termodinâmica estabelece que a quantidade de desordem do universo sempre deve aumentar, é satisfeita, e a célula pode crescer e dividir-se. Para uma discussão em detalhes, ver Painel 2-7 (p. 118-119).

vertida de uma forma a outra, mas não pode ser criada ou destruída. Algumas das formas de energia estão ilustradas na **Figura 2-39**. A quantidade de energia sob diferentes formas poderá mudar como resultado das reações químicas que ocorrem dentro das células, mas a primeira lei da termodinâmica estabelece que a quantidade total de energia deve sempre ser a mesma. Por exemplo, uma célula animal apreende um alimento e converte parte da energia presente nas ligações químicas entre os átomos das moléculas desse alimento (energia de ligação química) em movimento térmico aleatório de moléculas (energia térmica). Essa conversão de energia química em energia térmica é essencial para que as reações que ocorrem dentro da célula façam o universo como um todo ficar mais desordenado, como requer a segunda lei.

As células não podem tirar qualquer benefício da energia térmica que liberam, a menos que as reações que geram calor no seu interior estejam ligadas diretamente aos processos que geram ordem molecular. É o *acoplamento* íntimo entre a produção de calor e o aumento na ordem que distingue o metabolismo de uma célula do desperdício que ocorre na queima de um combustível no fogo. Posteriormente, será mostrado como ocorre esse acoplamento. Por ora, é suficiente reconhecer que é necessária uma associação direta entre a "queima" das moléculas dos alimentos e a geração de ordem biológica, para que as células tenham capacidade de criar e manter ilhas de ordem em um universo que tende para o caos.

Os organismos fotossintéticos utilizam a luz solar para sintetizar moléculas orgânicas

A vida de todos os animais tem como base a energia armazenada nas ligações químicas de moléculas orgânicas feitas por outros organismos e que são assimiladas na forma de alimento. As moléculas dos alimentos também fornecem os átomos de que os animais necessitam para construir nova matéria viva. Alguns animais obtêm o alimento comendo outros animais. Porém, na base dessa cadeia alimentar, estão animais que se alimentam de plantas. As plantas, por sua vez, obtêm energia diretamente da luz solar. Assim, no fundo, toda a energia utilizada pelas células animais provém do sol.

A energia solar é incorporada ao mundo dos seres vivos por meio da **fotossíntese,** que ocorre nas plantas e nas bactérias fotossintéticas. A fotossíntese permite que a energia eletromagnética da luz solar seja convertida pelas células em energia de ligação química. As plantas obtêm todos os átomos de que necessitam a partir de fontes inorgânicas: o carbono, a partir do dióxido de carbono atmosférico; o hidrogênio e o oxigênio, da água; o nitrogênio, da amônia e dos nitratos do solo, e os outros elementos que são necessários em pequenas

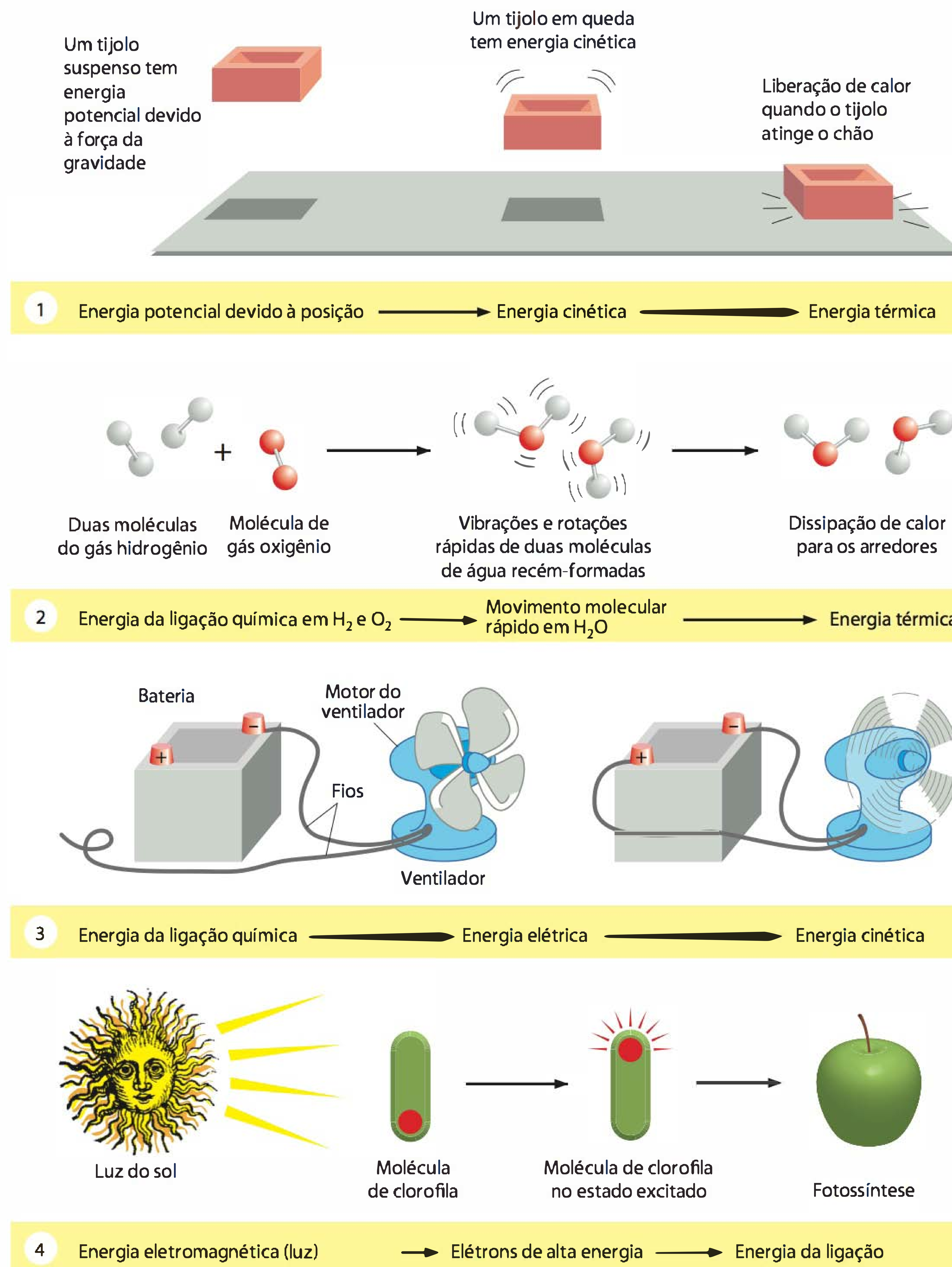


Figura 2-39 Algumas interconversões entre diferentes formas de energia. Todas as formas de energia, em princípio, são interconversíveis. Em todos os processos desse tipo, a quantidade total de energia mantém-se conservada. Assim, por exemplo, a partir da altura e do peso do tijolo em (1) pode-se predizer exatamente quanto calor será liberado quando o tijolo atingir o chão. Observe em (2) que uma grande quantidade de energia de ligação química, liberada quando da formação de água, é inicialmente convertida em energia cinética do movimento muito rápido das duas novas moléculas de água. Entretanto, as colisões com outras moléculas fazem com que, instantaneamente, essa energia cinética distribua-se por igual no ambiente (transferência de calor), fazendo com que as novas moléculas sejam indistinguíveis de todas as demais.

quantidades, a partir de sais inorgânicos do solo. Elas utilizam a energia que obtêm da luz solar para construir açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos a partir dos átomos citados anteriormente. Essas moléculas pequenas, por sua vez, são convertidas nas proteínas, nos ácidos nucleicos, nos polissacarídeos e nos lipídeos que formam as plantas. Todas essas substâncias servem como moléculas de alimento para os animais, quando as plantas são finalmente comidas.

As reações da fotossíntese ocorrem em dois estágios (**Figura 2-40**). No primeiro, a energia da luz solar é capturada e armazenada temporariamente como energia de ligação química em pequenas moléculas especializadas, que agem como carreadores de energia e como grupos químicos reativos. (Esses "carreadores ativados" serão discutidos posteriormente.) Nesse estágio, o oxigênio molecular (gás O_2), proveniente da quebra da água, é liberado como produto de descarte.

No segundo estágio, as moléculas que servem como carreadores de energia são usadas para ajudar na realização do processo de *fixação de carbono*, no qual os açúcares são produzidos a partir do gás dióxido de carbono (CO_2) e de água (H_2O), disponibilizando uma fonte útil de reserva de energia de ligação química e de materiais para a própria planta e para qualquer animal que venha a comê-la. Os elegantes mecanismos desses dois estágios da fotossíntese são descritos no Capítulo 14.

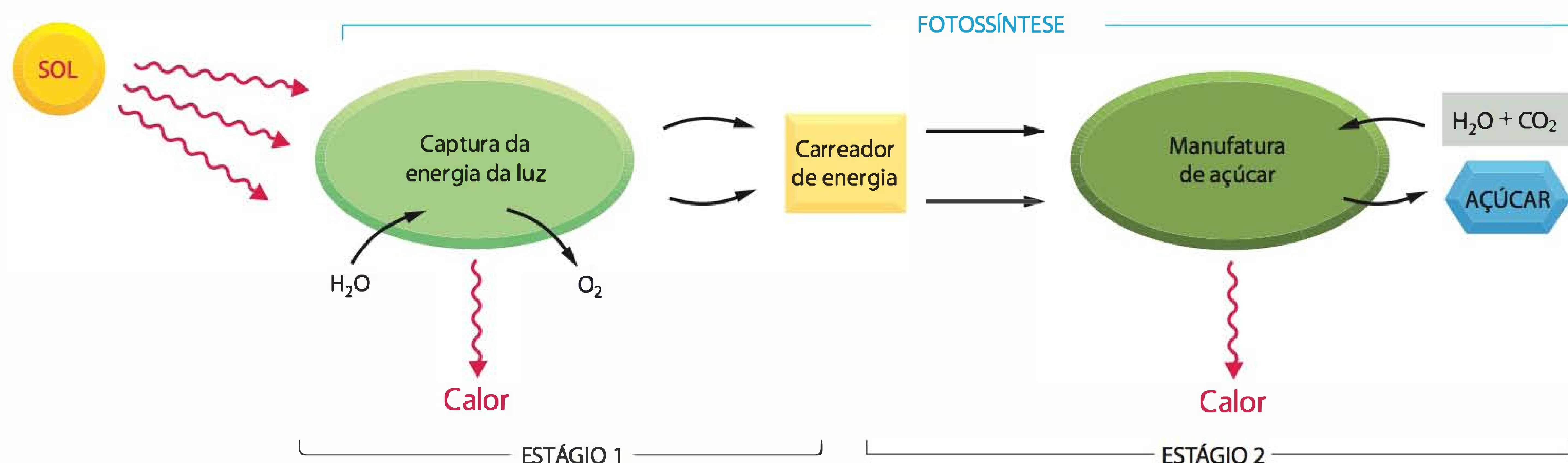
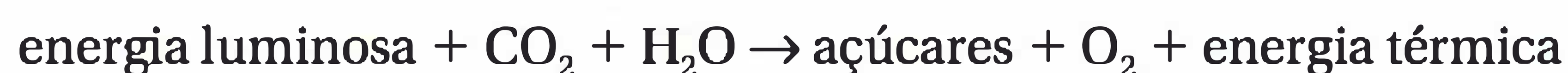


Figura 2-40 Fotossíntese. Os dois estágios da fotossíntese. Os carreadores de energia formados no primeiro estágio são duas moléculas que serão discutidas brevemente, ATP e NADPH.

O resultado líquido de todo o processo da fotossíntese, no que se refere às plantas verdes, pode ser resumido simplesmente na equação



$$\text{energia luminosa} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{açúcares} + O_2 + \text{energia térmica}$$

Os açúcares produzidos são então utilizados como fonte de energia de ligação química e como fonte de materiais para a produção das várias outras moléculas orgânicas, pequenas e grandes, essenciais para a célula vegetal.

As células obtêm energia pela oxidação de moléculas orgânicas

Todas as células animais e vegetais são mantidas pela energia armazenada nas ligações químicas de moléculas orgânicas, independentemente de serem açúcares sintetizados pelas plantas para nutrir a si mesmas, ou de serem ligações químicas de moléculas, grandes ou pequenas, que os animais tiverem comido. Para que essa energia seja usada para que vivam, cresçam e se reproduzam, os organismos devem extraí-la de uma forma utilizável. Tanto nas plantas como nos animais, a energia é extraída das moléculas dos alimentos por um processo de oxidação gradual, ou queima controlada.

A atmosfera terrestre contém uma grande quantidade de oxigênio e, na presença do oxigênio, a forma de carbono mais estável energeticamente é o CO_2; o mesmo ocorre com o hidrogênio e com a água. Dessa maneira, a célula é capaz de obter energia de açúcares e de outras moléculas orgânicas pela combinação dos átomos de carbono e de hidrogênio com oxigênio, para produzir CO_2 e H_2O, respectivamente, em um processo chamado de **respiração**.

A fotossíntese e a respiração são processos complementares (**Figura 2-41**). Isso significa que as interações entre as plantas e os animais não ocorrem em uma única direção. As plantas, os animais e os micro-organismos convivem neste planeta há tanto tempo que uns tornaram-se parte essencial do ambiente dos outros. O oxigênio liberado pela fotossíntese é consumido na combustão de moléculas orgânicas por praticamente todos os organismos. Mais ainda, uma parte das moléculas de CO_2, que hoje estejam sendo fixadas nas moléculas orgânicas de uma folha verde pela fotossíntese, foi liberada ontem, na atmosfera, pela respiração de um animal (ou por um fungo ou uma bactéria que esteja decompondo matéria orgânica morta). Dessa forma, vê-se que a utilização do carbono forma um ciclo enorme que

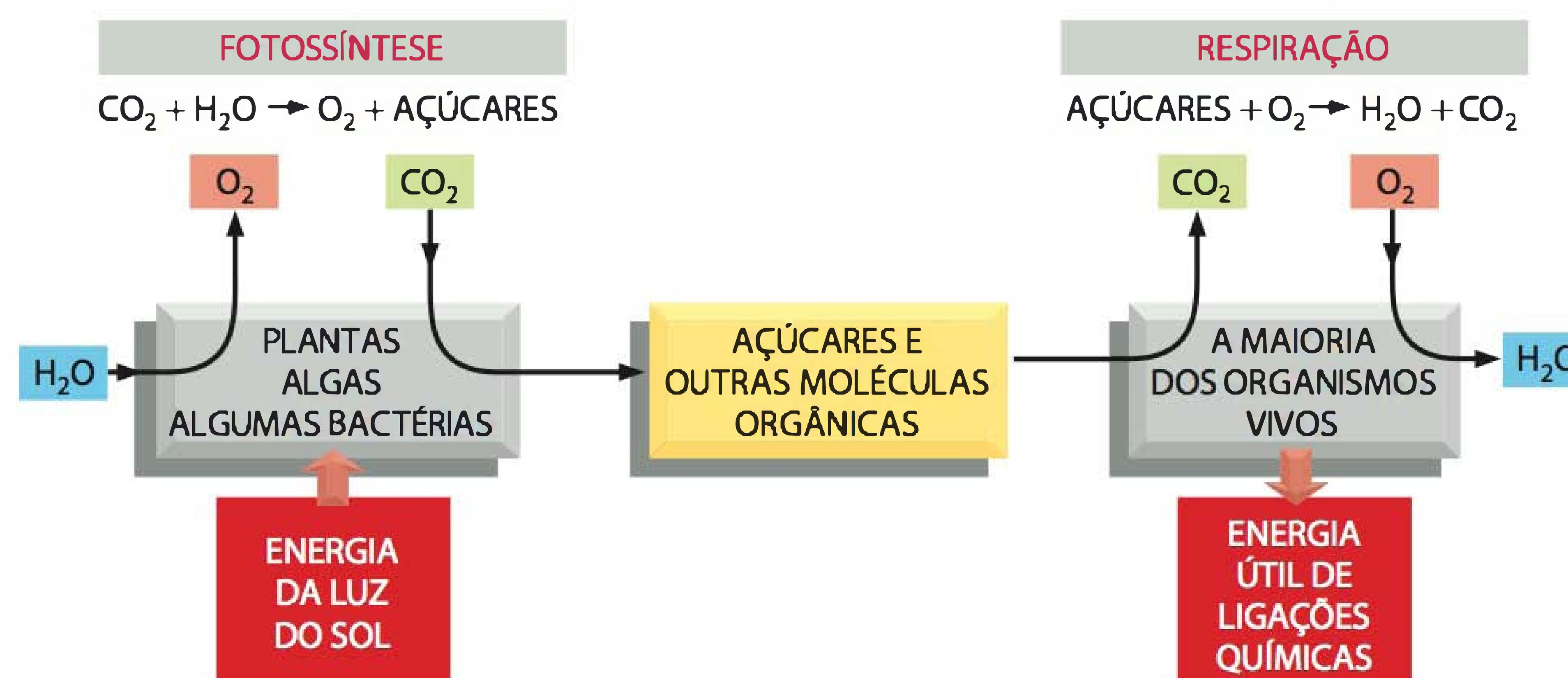


Figura 2-41 Fotossíntese e respiração são processos complementares do mundo vivo. A fotossíntese utiliza a energia da luz solar para produzir açúcares e outras moléculas orgânicas. Por sua vez, essas moléculas servem de alimento para outros organismos. Muitos desses organismos fazem respiração, um processo que utiliza O_2 para formar CO_2, a partir dos mesmos átomos de carbono que foram tomados do CO_2 e convertidos em açúcares pela fotossíntese. Nesse processo, os organismos que respiram aproveitam a energia de ligação química para obter a energia de que necessitam para sobreviver. Sabe-se que as primeiras células da face da Terra não eram capazes de realizar nem fotossíntese, nem respiração (discutido no Capítulo 14). Entretanto, na história da Terra, a fotossíntese deve ter antecedido a respiração, pois há evidências de que seriam necessários bilhões de anos de fotossíntese antes que tivesse sido liberado O_2 em quantidades suficientes para criar uma atmosfera rica nesse gás. (Atualmente, a atmosfera terrestre contém 20% de O_2.)

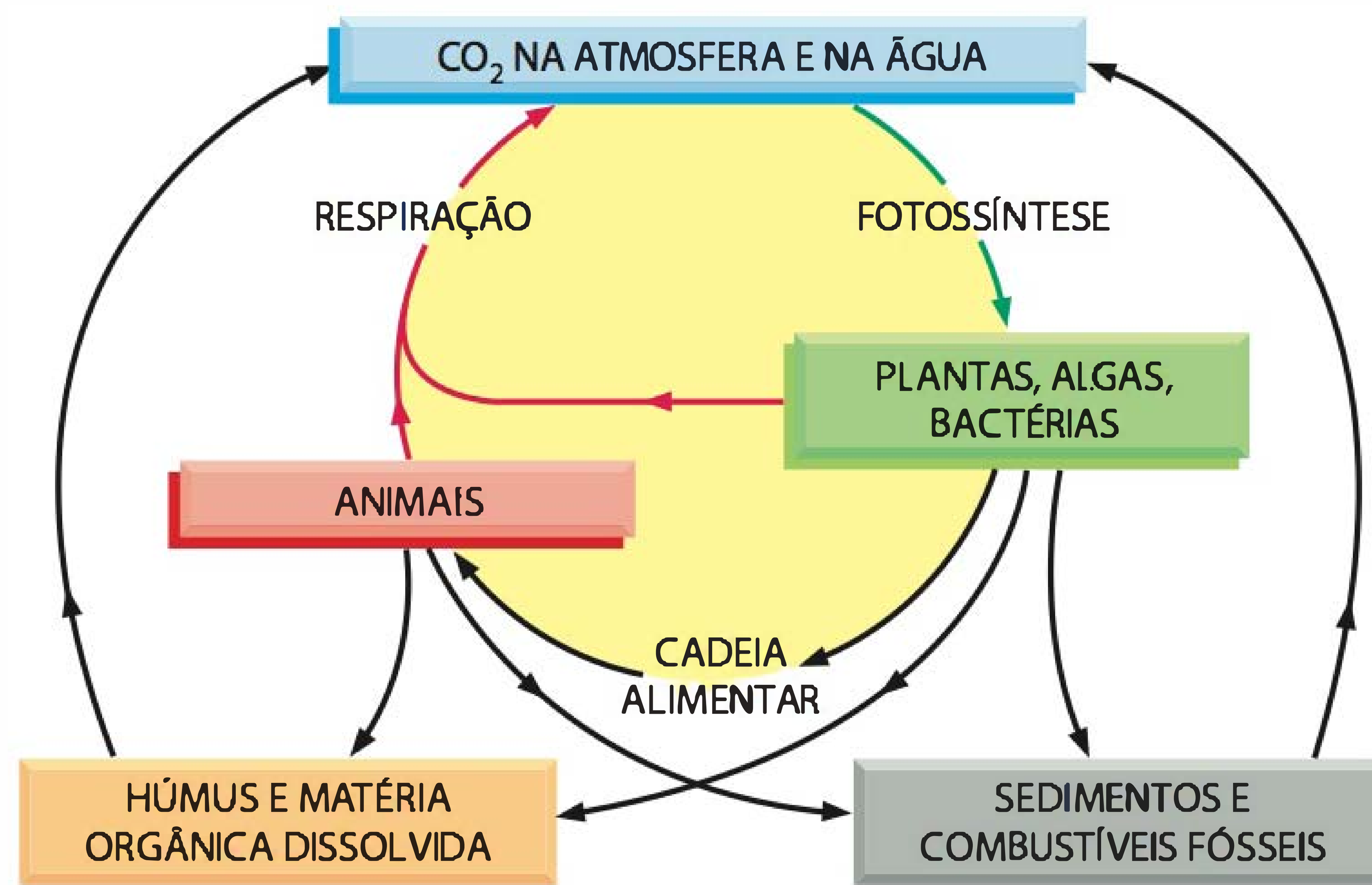


Figura 2-42 O ciclo do carbono. Átomos individuais de carbono são incorporados em moléculas orgânicas do mundo vivo por meio da atividade fotossintética de bactérias e plantas (incluindo as algas). Eles passam por animais, micro-organismos e materiais orgânicos do solo e dos oceanos, em ciclos sucessivos. Quando as moléculas orgânicas são oxidadas pelas células, ou queimadas pelo homem na forma de combustíveis fósseis, o CO_2 é reposto na atmosfera.

envolve toda a *biosfera* (todos os seres vivos da Terra), com ligações cruzadas entre organismos individuais (**Figura 2-42**). De maneira similar, os átomos de nitrogênio, de fósforo e de enxofre transitam entre os mundos dos seres vivos e dos não-vivos em ciclos que envolvem as plantas, os animais, os fungos e as bactérias.

Oxidação e redução envolvem transferência de elétrons

As células não oxidam as moléculas orgânicas em apenas uma etapa, como acontece quando uma molécula orgânica é queimada no fogo. Por meio do uso de catalisadores enzimáticos, o metabolismo processa as moléculas por um grande número de reações que, muito raramente, envolvem a adição direta de oxigênio. Antes de examinar algumas dessas reações e suas finalidades, é conveniente discutir o que se entende como processo de oxidação.

Oxidação não significa apenas a adição de átomos de oxigênio. Esse termo tem uma aplicação mais geral, que inclui qualquer reação que implique transferência de elétrons entre átomos. Nesse sentido, oxidação refere-se à remoção de elétrons, e **redução**, o contrário da oxidação, significa adição de elétrons. Desse modo, o Fe^{2+} é oxidado quando perde um elétron (tornado-se Fe^{3+}), e o átomo de cloro é reduzido caso ganhe um elétron para tornar-se Cl^{-}. Uma vez que em uma reação química o número de elétrons é conservado (sem perda ou ganho), a oxidação e a redução sempre ocorrem simultaneamente, isto é, se uma molécula ganha um elétron na reação (redução), uma segunda molécula perderá um elétron (oxidação). Quando uma molécula de açúcar é oxidada até CO_2 e H_2O, por exemplo, a molécula de O_2 envolvida na formação de H_2O ganha elétrons e, assim, diz-se que ela foi reduzida.

Os termos "oxidação" e "redução" são aplicados mesmo quando ocorre apenas uma troca parcial de elétrons entre átomos ligados por uma ligação covalente (**Figura 2-43**). Quando

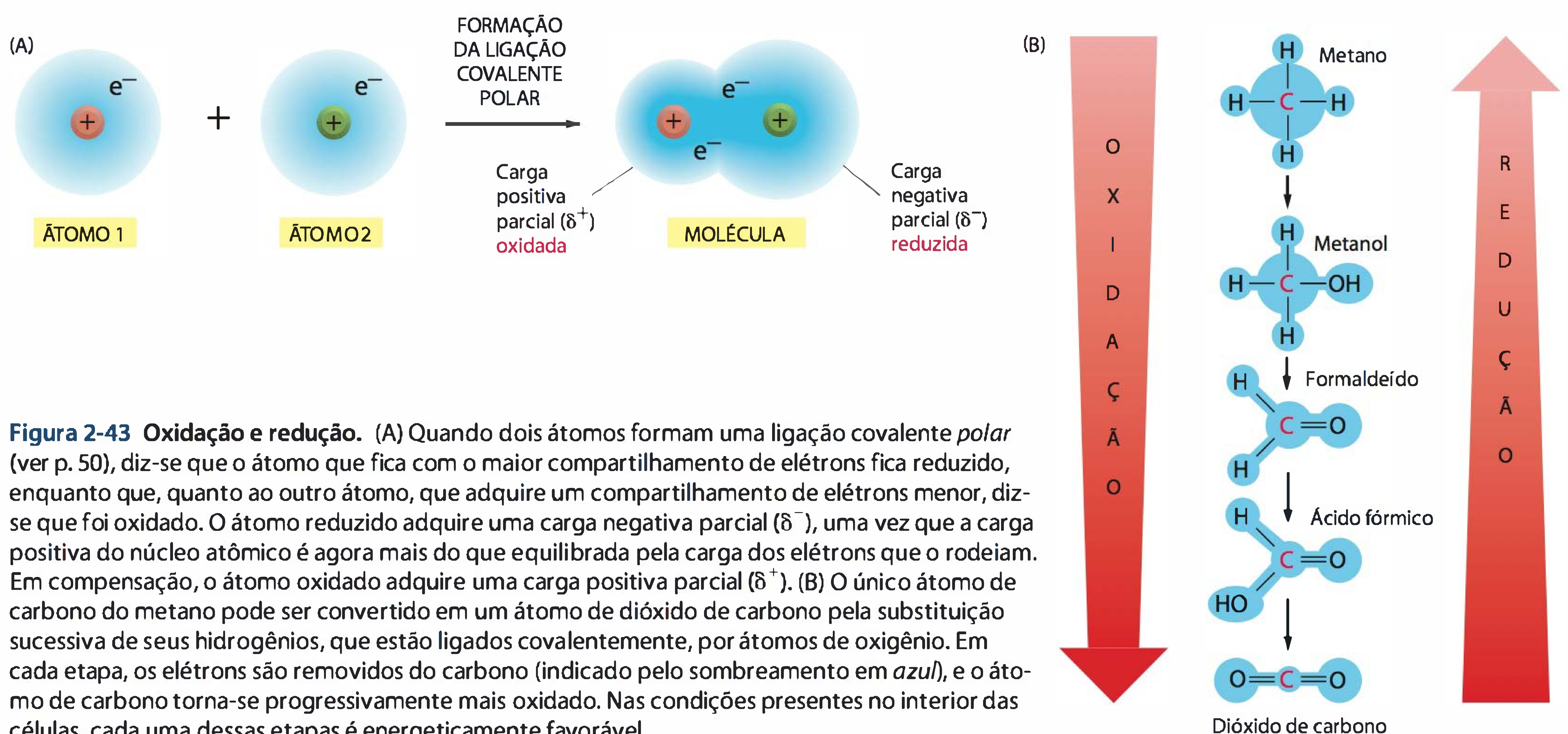


Figura 2-43 Oxidação e redução. (A) Quando dois átomos formam uma ligação covalente *polar* (ver p. 50), diz-se que o átomo que fica com o maior compartilhamento de elétrons fica reduzido, enquanto que, quanto ao outro átomo, que adquire um compartilhamento de elétrons menor, diz-se que foi oxidado. O átomo reduzido adquire uma carga negativa parcial (δ^-), uma vez que a carga positiva do núcleo atômico é agora mais do que equilibrada pela carga dos elétrons que o rodeiam. Em compensação, o átomo oxidado adquire uma carga positiva parcial (δ^+). (B) O único átomo de carbono do metano pode ser convertido em um átomo de dióxido de carbono pela substituição sucessiva de seus hidrogênios, que estão ligados covalentemente, por átomos de oxigênio. Em cada etapa, os elétrons são removidos do carbono (indicado pelo sombreamento em *azul*), e o átomo de carbono torna-se progressivamente mais oxidado. Nas condições presentes no interior das células, cada uma dessas etapas é energeticamente favorável.

um átomo de carbono liga-se covalentemente a átomos que tenham uma grande afinidade por elétrons, como o oxigênio, o cloro ou o enxofre, há mais do que um compartilhamento de elétrons equitativo e forma-se uma ligação covalente *polar*: a carga positiva do núcleo do carbono está agora ligeiramente maior do que a carga negativa devida apenas a seus próprios elétrons, de modo que o átomo adquire uma carga parcial positiva e se diz que ele está oxidado. De maneira equivalente, o átomo de carbono de uma ligação C–H tem mais do que apenas os seus próprios elétrons emparelhados; diz-se, então que ele está reduzido (ver Figura 2-43).

Quando uma molécula presente em uma célula ganha um elétron (e^-), geralmente ela também ganha um próton (H^+) (prótons estão totalmente disponíveis na água). Nesse caso, o efeito líquido é a adição de um átomo de hidrogênio à molécula



$$A + e^- + H^+ \rightarrow AH$$

Mesmo quando há o envolvimento de um próton e de um elétron (ao invés de apenas um elétron), as reações de *hidrogenação* são reações de redução, e a reação inversa, *desidrogenação*, é uma reação de oxidação. É muito fácil ver que, quando uma molécula orgânica é oxidada ou reduzida, há redução quando o número de ligações C–H na molécula aumentar, e haverá oxidação quando o número de ligações C–H da molécula diminuir (ver Figura 2-43B).

As células utilizam enzimas para catalisar a oxidação de moléculas orgânicas em pequenas etapas, por meio de sequências de reações que permitem que a energia utilizável seja aproveitada. A seguir será explicado o modo como as enzimas trabalham e também algumas das limitações sob as quais elas operam.

As enzimas diminuem as barreiras que impedem as reações químicas

Considere a reação



$$\text{papel} + O_2 \rightarrow \text{fumaça} + \text{cinzas} + \text{calor} + CO_2 + H_2O$$

O papel queima rapidamente, liberando para a atmosfera tanto energia na forma de calor, como água e dióxido de carbono na forma de gases, mas nunca a fumaça e a cinza tomam espontaneamente esses elementos da atmosfera aquecida para reconstituirem-se formando o papel novamente. Quando o papel queima, sua energia química é dissipada como calor. Ela não é perdida pelo universo, uma vez que a energia não pode ser nem criada nem destruída, mas é dispersa na caótica movimentação térmica das moléculas. Ao mesmo tempo, os átomos e as moléculas do papel ficam dispersos e desordenados. Na linguagem da termodinâmica, há uma perda de *energia livre*, isto é, a energia pode ser aproveitada para fazer trabalho, ou para fazer ligações químicas. Essa perda reflete a perda da organização com que a energia e as moléculas estavam armazenadas no papel. Detalhes sobre a energia livre serão discutidos brevemente, mas o princípio geral é claro o suficiente para ser intuitivo: as reações químicas ocorrem somente na direção que leva a uma perda da energia livre; em outras palavras, a espontaneidade da direção de qualquer reação é a direção que leva "morro abaixo". Nesse contexto, a reação "morro abaixo" frequentemente significa *energeticamente favorável*.

Embora a forma energeticamente mais favorável do carbono seja CO_2, e a do hidrogênio, H_2O, os organismos vivos não desaparecem subitamente em uma baforada de fumaça, nem este livro se consome repentinamente em chamas. Isso se deve ao fato de que as moléculas, tanto as dos seres vivos como as do livro, estão em estados relativamente estáveis e não podem passar a um estado de energia mínima sem que recebam certa dose de energia. Em outras palavras, uma molécula necessita de uma **energia de ativação** (um empurrão para poder ultrapassar uma barreira energética) antes de sofrer uma reação química que a leve a um estado mais favorável (**Figura 2-44**). No caso da queima do livro, a energia de ativação é fornecida pelo calor de um palito de fósforo aceso. Para moléculas que estejam em solução aquosa no interior das células, esse pulo energético é obtido por colisões energéticas aleatórias que tenham um grau de energia incomum, colisões que se tornam cada vez mais violentas à medida que a temperatura aumenta.

Nas células vivas, esse pulo sobre a barreira energética é bastante auxiliado por uma classe especializada de proteínas, as **enzimas**. Cada enzima liga-se firmemente a uma ou mais moléculas, denominadas **substratos**, e as prende de uma maneira tal que a energia de ativação de uma reação química à qual a molécula seja suscetível é bastante reduzida. Uma substância que pode diminuir a energia de ativação de uma reação é denominada **catalisador**. Os catalisadores aumentam a velocidade das reações químicas porque permitem

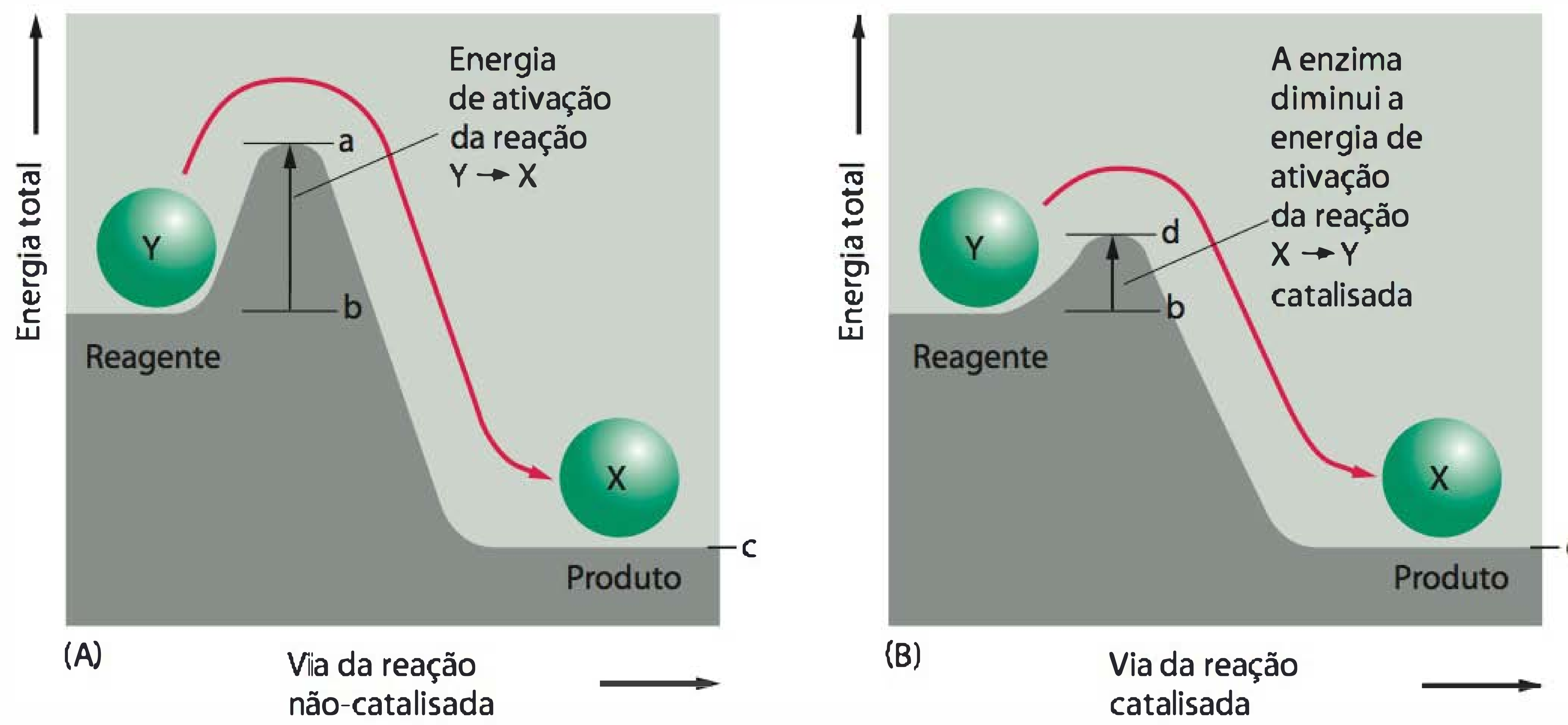


Figura 2-44 O importante princípio da energia de ativação. (A) O composto Y (reagente) é relativamente estável, sendo necessária a adição de energia para convertê-lo no composto X (produto), mesmo que X tenha um menor nível energético que Y. Entretanto, essa conversão não ocorrerá a menos que o composto Y possa adquirir energia de ativação (*energia a menos energia b*) suficiente dos arredores para permitir que a reação o converta no composto X. Essa energia pode ser fornecida por meio de uma colisão inusitadamente rica em energia com outra molécula. Para a reação inversa, X → Y, a energia de ativação será muito maior (*energia a menos energia c*). Portanto, essa reação ocorrerá muito mais raramente. Energias de ativação são sempre positivas. Observe, entretanto, que o total de mudança de energia para uma reação energeticamente favorável Y → X *é energia c menos energia b*, um número negativo. (B) Barreira energética para reações específicas podem ser diminuídas por um catalisador, indicado pela linha marcada com *d*. As enzimas são catalisadores especialmente eficazes por reduzirem bastante a energia de ativação das reações que elas executam.

uma proporção muito maior de colisões ao acaso com as moléculas ao seu redor para que os substratos sobrepassem a barreira de energia, como ilustrado na **Figura 2-45**. As enzimas estão incluídas entre os catalisadores mais eficazes conhecidos; elas aceleram as reações por fatores tão grandes como 10^{14}, permitindo, assim, que reações que não poderiam ocorrer por outros meios ocorram rapidamente em temperaturas normais.

As enzimas são altamente seletivas. Normalmente, cada enzima catalisa apenas uma determinada reação. Em outras palavras, elas baixam seletivamente a energia de ativação de apenas uma das várias reações químicas que os substratos ligados a elas podem sofrer. Dessa maneira, cada enzima direciona cada uma das inúmeras moléculas de uma célula para vias de reações específicas (**Figura 2-46**).

O sucesso dos seres vivos é atribuído à capacidade que as células têm de produzir muitos tipos de enzimas, cada uma com propriedades muito específicas. Cada enzima tem uma forma única, que contém um *sítio ativo* (um bolsão ou uma fenda) no qual apenas um determinado substrato pode se encaixar (**Figura 2-47**). Assim como todos os outros catalisadores, as moléculas de enzima permanecem inalteradas após participarem de uma reação, de modo que podem funcionar de novo por muitos e muitos ciclos. No Capítulo 3 será discutido em mais detalhes como as enzimas agem.

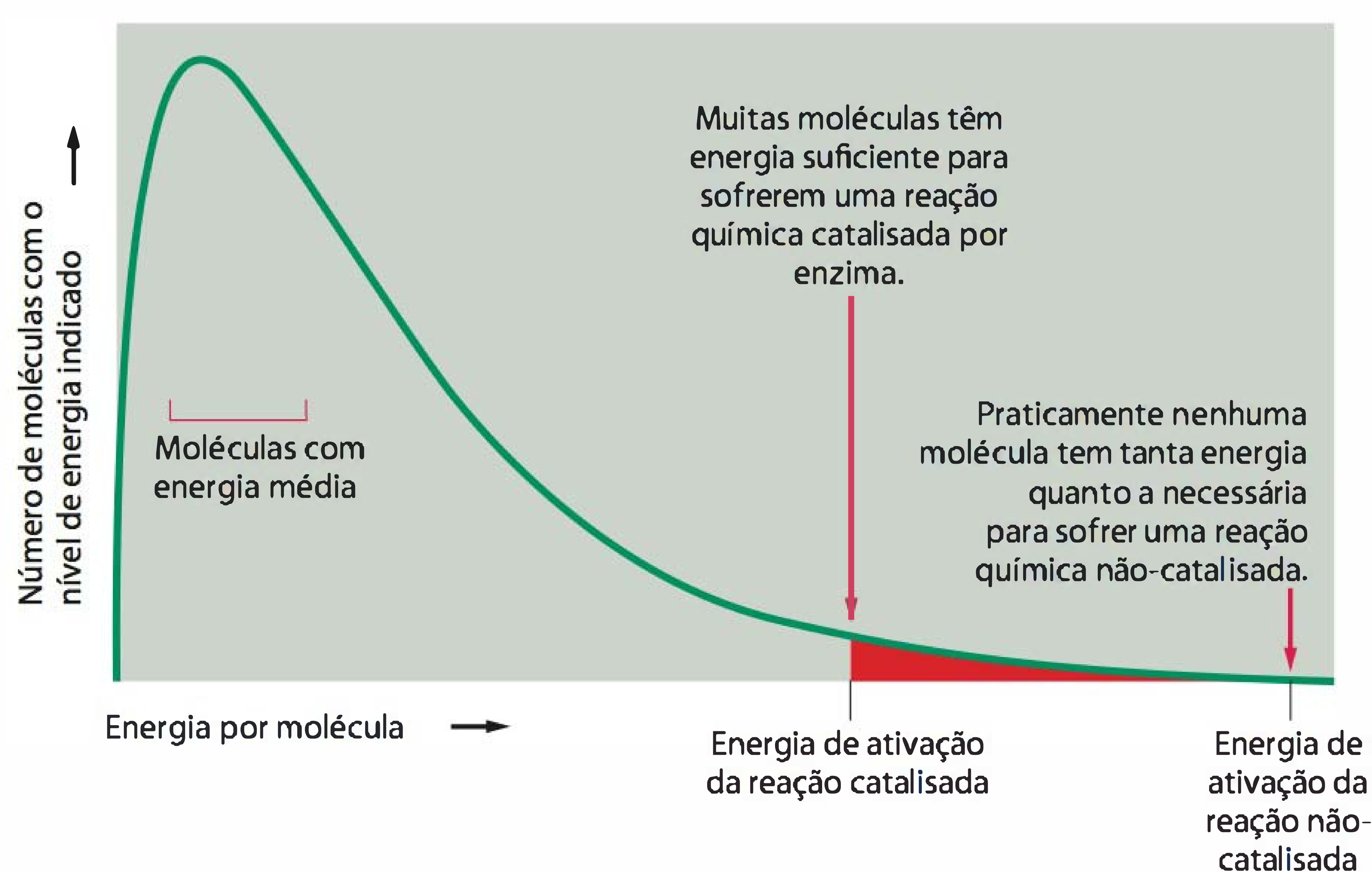


Figura 2-45 A diminuição da energia de ativação aumenta em muito a probabilidade de ocorrência de uma reação. Em cada momento, uma população de moléculas idênticas de determinado substrato distribue-se em uma faixa de energia, conforme mostrado no gráfico. Essas variações de energia decorrem de colisões com moléculas das proximidades que fazem com que as moléculas oscilem, vibrem e girem. No caso de uma molécula que participe de uma reação química, a energia da molécula deve ser maior do que a energia de ativação da reação. Na maioria das reações biológicas, isso nunca acontece, a menos que haja catálise enzimática. Mesmo na catálise enzimática, as moléculas de substrato devem sofrer uma colisão com determinada energia para reagirem (*área sombreada em vermelho*). Um aumento de temperatura pode aumentar o número de moléculas com energia suficiente para superar a energia de ativação necessária para a reação; entretanto, ao contrário dos catalisadores enzimáticos, esse efeito não é seletivo, acelerando todas as reações.

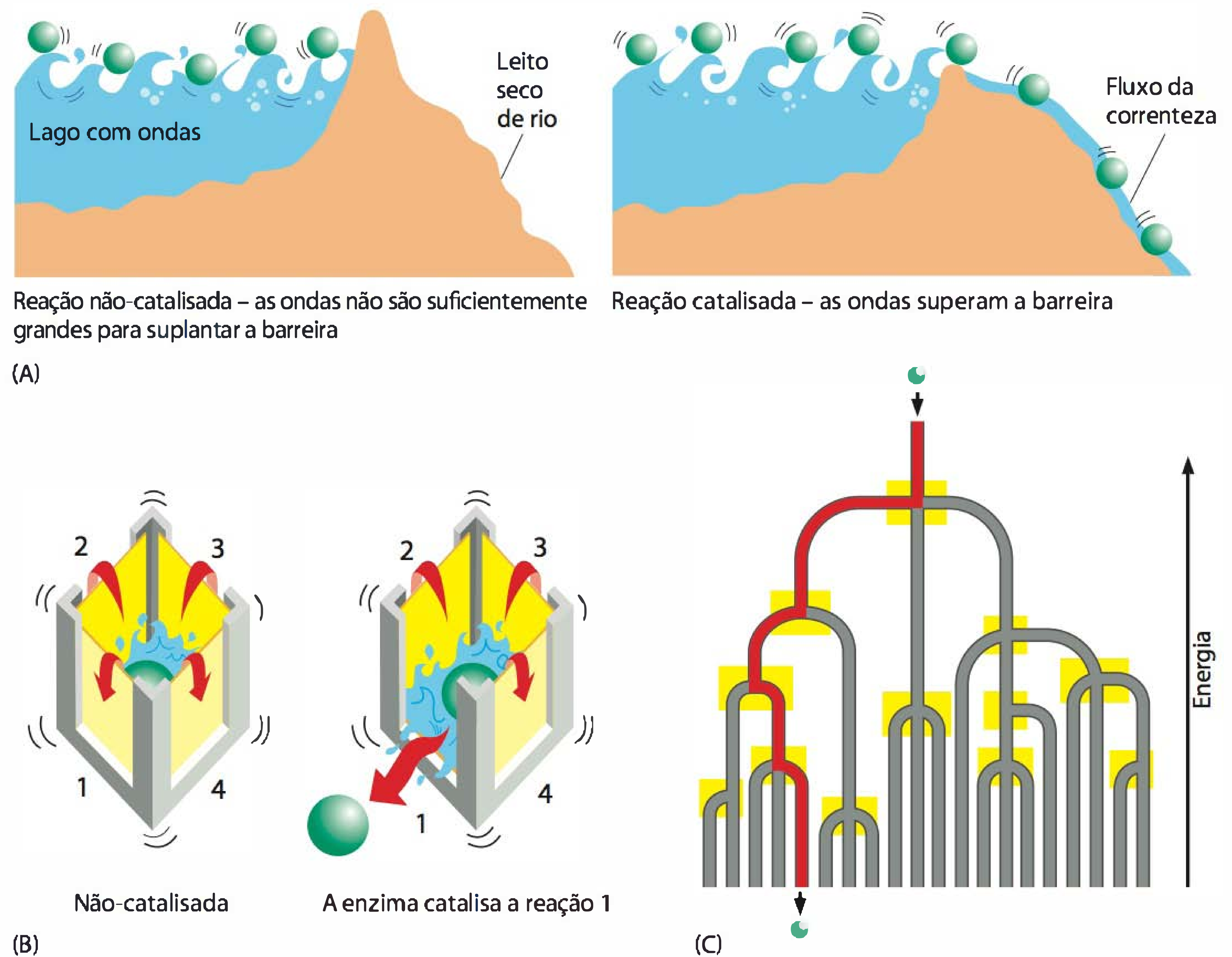


Figura 2-46 Analogia com bolas flutuantes para explicar a catálise enzimática. (A) A barreira formada por um dique serve para ilustrar a catálise enzimática. As *bolas verdes* representam os possíveis substratos de uma enzima (composto Y) que sofrem flutuações nos níveis de energia para mais e para menos, devido ao encontro constante com as ondas (analogia para indicar o bombardeamento térmico do substrato por moléculas de água adjacentes). Quando a barreira (energia de ativação) diminui significativamente, ela permite que as bolas que estiverem em um momento energeticamente favorável desçam à encosta. (B) As quatro paredes de uma caixa representam a energia de ativação de quatro reações químicas diferentes, todas energeticamente favoráveis, no sentido de que os produtos têm menor nível energético que os substratos. No caso da *caixa da esquerda*, não ocorre nenhuma das reações, porque mesmo as ondas mais altas não são grandes o suficiente para suplantar qualquer das barreiras energéticas. Na *caixa da direita*, a catálise enzimática diminui a energia de ativação apenas da reação 1. Agora, a ondulação das ondas permite a passagem de moléculas apenas sobre essa barreira energética, induzindo a reação 1. (C) Um rio com ramificações e com um conjunto de represas (*quadros amarelos*) serve para ilustrar como uma série de reações catalisadas por enzimas determina com toda a exatidão as vias de reações que serão seguidas por cada uma das moléculas da célula.

Como as enzimas encontram seus substratos: a grande rapidez do movimento molecular

Uma enzima normalmente catalisa uma reação por cerca de mil moléculas do substrato a cada segundo. Isso significa que ela deve ser capaz de ligar uma nova molécula de substrato em frações de milissegundo. Entretanto, tanto as enzimas como os seus substratos estão presentes nas células em um número relativamente pequeno. Como eles se encontram tão rapidamente? A rapidez da associação é possível porque, no nível molecular, o movimento causado pela energia térmica é muito veloz. Essa movimentação molecular pode ser classificada em três tipos: (1) o movimento de uma molécula de um lugar a outro (*movimento de translação*), (2) o rápido movimento para a frente e para trás de átomos que estejam ligados covalentemente, um em relação ao outro (vibração), e (3) rotações. Todos esses movimentos são importantes para que as superfícies das moléculas que interagem sejam mantidas unidas.

As velocidades desses movimentos moleculares podem ser medidas por diversas técnicas espectroscópicas. Uma grande molécula de proteína globular tomba constantemente, girando ao redor do seu próprio eixo cerca de um milhão de vezes por segundo. As moléculas também estão em constante movimento translacional, o que faz elas explorarem o espaço intracelular com muita eficiência, pois ficam vagando pelo interior da célula – esse processo é denominado **difusão**. Dessa maneira, a cada segundo, cada uma das moléculas de uma célula colide com um número enorme de outras moléculas. Uma vez que as moléculas presentes em um líquido colidem e ricocheteiam entre si, seus percursos terminam por ser um *caminho aleatório* (**Figura 2-48**). Nesse caminho, a distância média que cada molécula viaja (como uma mosca zanzando) a partir de seu ponto de partida é proporcional à raiz quadrada do tempo envolvido. Isso é, se uma molécula leva 1 segundo para se deslocar uma média de 1μm, leva 4 segundos para andar 2 μm, 100 segundos para andar 10 μm, e assim por diante.

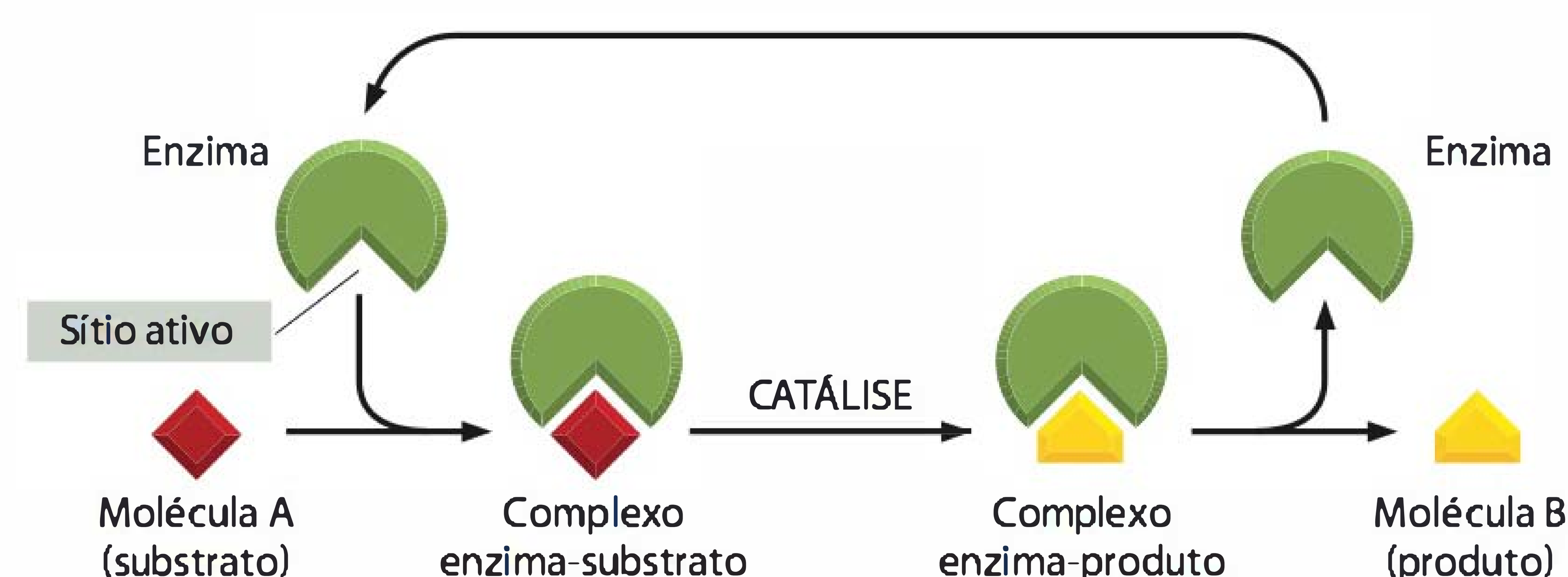


Figura 2-47 Como as enzimas funcionam. Cada enzima tem um sítio ativo ao qual se ligam uma ou mais moléculas de *substrato*, formando um complexo enzima-substrato. A reação ocorre no sítio ativo e produz um complexo enzima-produto. O *produto* é então liberado, possibilitando que a enzima se ligue a uma outra molécula de substrato.

O interior das células é muito congestionado (**Figura 2-49**). Mesmo assim, experimentos nos quais corantes fluorescentes e outras moléculas marcadas foram injetados em células mostram que as moléculas orgânicas pequenas difundem-se através do gel aquoso do citosol praticamente tão rápido quanto na água. Uma molécula orgânica pequena, por exemplo, leva apenas cerca de um quinto de segundo, em média, para difundir-se a uma distância de 10 μm. A difusão é, portanto, uma maneira eficiente que as moléculas pequenas têm para, nas células, moverem-se a distâncias limitadas (uma típica célula animal tem um diâmetro de 15 μm).

Uma vez que, em uma célula, as enzimas movem-se mais vagarosamente do que os substratos, pode-se considerar que elas estejam paradas. A proporção de encontros de cada molécula de enzima com seus substratos depende da concentração de moléculas do substrato nas células. Por exemplo, alguns dos substratos mais abundantes estão presentes em concentrações de 0,5 mM. Como a concentração da água pura é 55 M, há apenas uma dessas moléculas de substrato nas células para cada 10^5 moléculas de água. Mesmo assim, o sítio ativo de uma molécula de enzima que liga o substrato será bombardeado com cerca de 500 mil colisões aleatórias desse substrato por segundo. (Para uma concentração de substrato 10 vezes menor, o número de colisões diminui para 50.000, e assim por diante.) Um encontro aleatório entre a superfície de uma enzima e a superfície correspondente da molécula do substrato, frequentemente, leva à formação imediata de um complexo enzima-substrato pronto para reagir. Assim, a reação pela qual uma ligação covalente é formada ou rompida pode ocorrer com extrema rapidez. Quando se percebe o quão rapidamente as moléculas movimentam-se e reagem, as velocidades das reações enzimáticas não parecem tão extraordinárias assim.

Uma vez que a enzima e o substrato tenham colidido e se encaixado apropriadamente no sítio ativo, elas formam muitas ligações fracas entre si, que persistem até que o movimento térmico leve a uma nova dissociação das moléculas. Geralmente, quanto mais intensa for a ligação da enzima com seu substrato, menor será sua constante de dissociação. Entretanto, quando duas moléculas que colidem possuem superfícies que se encaixam mal, são formadas poucas ligações não-covalentes, e a sua energia total é desprezível, em comparação à energia térmica. Nesse caso, as duas moléculas dissociam-se tão rapidamente quanto se juntam. É isso que evita associações incorretas e indesejadas entre moléculas que não se encaixam, como ocorre entre uma enzima e um substrato errado.

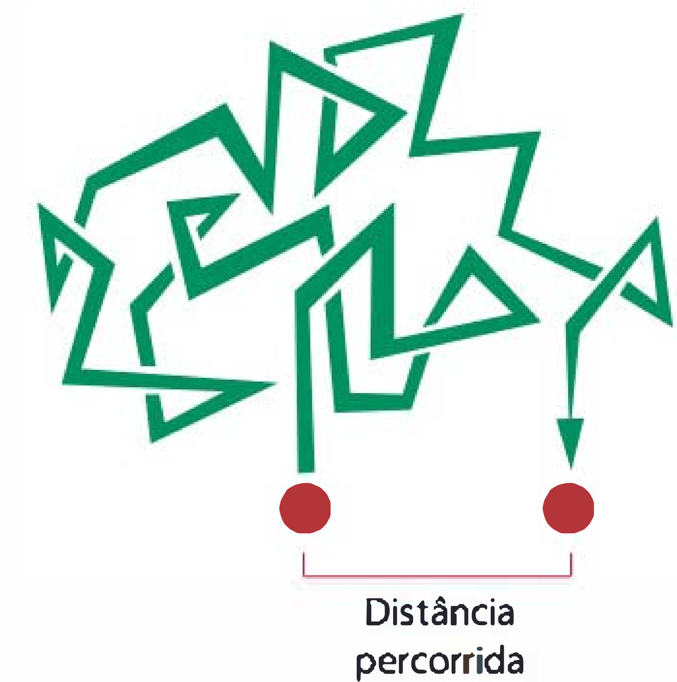


Figura 2-48 Caminho aleatório. Em uma solução, as moléculas movem-se de maneira aleatória, devido aos constantes golpes que recebem pelas colisões com outras moléculas. Esse movimento, como descrito no texto, permite que as moléculas pequenas difundam-se rapidamente de uma parte à outra da célula.

A mudança de energia livre de uma reação determina se ela pode ocorrer

Para abordar certos aspectos da química fundamental, serão feitas algumas considerações iniciais. As células são sistemas químicos que devem obedecer necessariamente a todas as leis da química e da física. Embora as enzimas acelerem as reações, elas, por si mesmas, não podem fazer com que ocorram reações desfavoráveis. Fazendo uma analogia à água, as enzimas por si mesmas não podem fazer a água "correr morro acima". As células, entretanto, devem fazer exatamente isso para crescer e se dividir, pois devem construir, a partir de moléculas simples, moléculas altamente organizadas e ricas energeticamente. Veremos que isso é feito através de enzimas que *acoplam* diretamente reações energeticamente favoráveis, que liberam energia e produzem calor, a reações energeticamente desfavoráveis, que produzem ordem biológica.

Antes do exame de como esses acoplamentos são obtidos, deve-se analisar mais cuidadosamente o significado do termo "energeticamente favorável". De acordo com a segunda lei da termodinâmica, uma reação química só pode ocorrer espontaneamente se levar a um aumento líquido da desordem do universo (ver Figura 2-38). O critério para avaliar o aumento da desordem do universo pode ser mais convenientemente expresso na forma de uma grandeza denominada **energia livre (*G*)** do sistema. O valor de *G* interessa somente quando os sistemas passam por alguma *variação*, e a variação de *G*, que recebe a notação **Δ*G*** (delta *G*), é critica. Suponha-se que o sistema em consideração seja um conjunto de moléculas. Como explicado no Painel 2-7 (p.118-119), a energia livre é definida de tal forma que Δ*G* mede diretamente a quantidade de desordem criada no universo, quando ocorre uma reação envolvendo essas moléculas. As *reações energeticamente favoráveis*, por definição, são aquelas que diminuem a energia livre, ou, em outras palavras, têm um Δ*G negativo* e aumentam a desordem do universo (**Figura 2-50**).

Um exemplo, em escala macroscópica, de uma reação energerticamente favorável é a "reação" pela qual uma mola que esteja comprimida relaxa até um estado expandido, liberando no ambiente, em forma de calor, a energia elástica que estava armazenada. Um exemplo em escala microscópica é a dissolução do sal em água. Consequentemente, as *reações energerticamente desfavoráveis*, com Δ*G positivo*, como aquelas nas quais dois aminoácidos são ligados para

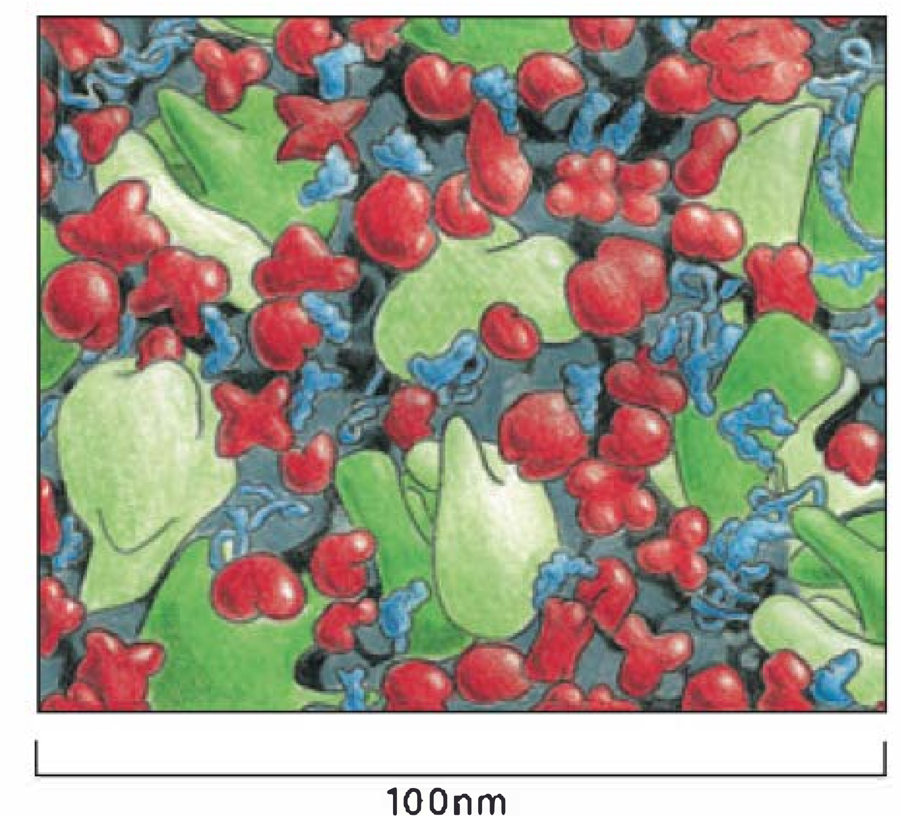


Figura 2-49 A estrutura do citoplasma. O desenho foi feito em uma escala aproximada para enfatizar como o citoplasma é congestionado. Apenas as macromoléculas são mostradas: os RNAs estão em *azul*, os ribossomos, em *verde*, e as proteínas, em *vermelho*. As enzimas e as outras macromoléculas difundem-se no citoplasma com relativa lentidão devido, em parte, ao fato de interagirem com um grande número de outras macromoléculas. As moléculas pequenas, no entanto, difundem-se tão rápido quanto o fazem em água. (Adaptado de D. S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci*. 16:203-206, 1991. Com permissão de Elsevier.)



Figura 2-50 Distinção entre reações energeticamente favoráveis e reações energeticamente desfavoráveis.

formar uma ligação peptídica, criam por si mesmas ordem no universo. Por conseguinte, essas reações só podem ocorrer se estiverem acopladas a uma segunda reação que tenha um ΔG negativo suficientemente grande para que o ΔG do processo todo seja negativo (**Figura 2-51**).

A concentração dos reagentes influi na variação de energia livre e na direção da reação

Como foi descrito recentemente, uma reação $Y \leftrightharpoons X$ irá na direção $Y \rightarrow X$ quando a mudança (ΔG) associada à reação for negativa, exatamente do mesmo modo que uma mola tencionada deixada por si própria relaxa, perdendo a energia que tinha armazenada para o ambiente, na forma de calor. Nas reações químicas, entretanto, o ΔG depende não somente da energia armazenada em cada uma das moléculas, mas também depende da concentração de moléculas na mistura de reação. Observe que o ΔG reflete o grau pelo qual uma reação cria mais desordem; dito em outras palavras, leva a um estado do universo que é mais provável. Retomando a analogia com a moeda, é muito mais provável que uma moeda mude da posição cara para a coroa se o cesto de embaralhar moedas tiver 90 moedas na posição cara e 10 na posição coroa. Por outro lado, esse evento será muito menos provável se o cesto tiver 10 moedas na posição cara e 90 na posição coroa.

Exatamente pela mesma razão, a reação reversível $Y \leftrightharpoons X$ tenderá a ocorrer na direção $Y \rightarrow X$ quando houver grande excesso de Y em relação a X. Isto é, haverá uma tendência para que mais moléculas façam a transição na direção $Y \rightarrow X$ do que de moléculas fazendo a transição $X \rightarrow Y$. Se a relação entre Y e X aumentar, ΔG torna-se mais negativo para a transição $Y \rightarrow X$ (e mais positivo para a transição $X \rightarrow Y$).

Quanto deve ser a diferença entre as concentrações para compensar uma dada diminuição na energia de ligação química (e a correspondente liberação de calor)? A resposta não é óbvia e nem intuitiva. Entretanto, ela pode ser determinada por meio de análise termodinâmica, que permite separar os componentes da mudança de energia livre dependentes da concentração dos componentes que independem da concentração. Assim, o valor de ΔG para uma dada reação pode ser escrito como a soma de dois componentes. O primeiro, chamado de *variação da energia livre padrão*, $\boldsymbol{\Delta G^o}$, depende das características intrínsecas das moléculas reagentes, e o segundo depende das respectivas concentrações. Para uma reação simples como $Y \rightarrow X$, a 37°C,

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 0{,}616 \ln \frac{[X]}{[Y]} = \Delta G^\circ + 1{,}42 \log \frac{[X]}{[Y]}$$

onde ΔG é expresso em quilocalorias por mol, [Y] e [X] denotam as concentrações de Y e de X, ln é o logaritmo natural, e 0,616 é igual a RT (o produto da constante dos gases, R, e da temperatura absoluta, T).

Observe que ΔG é igual ao valor de $\Delta G°$, quando as concentrações molares de Y e de X forem iguais ($\log 1 = 0$). Como é de esperar, ΔG torna-se mais negativo à medida que a proporção de X em relação a Y decresce (o log de um número < 1 é negativo).

O exame da equação revela que ΔG é igual ao valor de $\Delta G°$ quando as concentrações de Y e X forem iguais. Mas, à medida que a reação $Y \rightarrow X$ continua, a concentração do produto X aumenta e a concentração do substrato Y diminui. Essa mudança nas concentrações relativas faz com que a relação [X]/[Y] fique cada vez maior e o ΔG inicialmente favorável torne-se cada vez mais negativo. Em dado momento, quando $\Delta G = 0$, será atingido o **equilíbrio** químico, isto é, o efeito da concentração balanceará exatamente o empurrão dado à reação pelo ΔG, e a relação entre substrato e produto atinge um valor constante (**Figura 2-52**).

O quanto a reação avança antes de atingir o equilíbrio e parar? Para responder a essa questão, é necessário introduzir o conceito de **constante de equilíbrio, *K***. O valor de K é diferente para reações diferentes e reflete a relação entre produto e substrato no equilíbrio. Para a reação $Y \rightarrow X$:

$$K = \frac{[X]}{[Y]}$$

A equação que associa ΔG e a relação [X]/[Y] permite que se associe $\Delta G°$ diretamente com K. Uma vez que no equilíbrio $\Delta G = 0$, as concentrações de Y e de X neste ponto serão:

$$\Delta G^\circ = -1{,}42 \log \frac{[X]}{[Y]} \quad \text{ou,} \quad \Delta G^\circ = -1{,}42 \log K$$

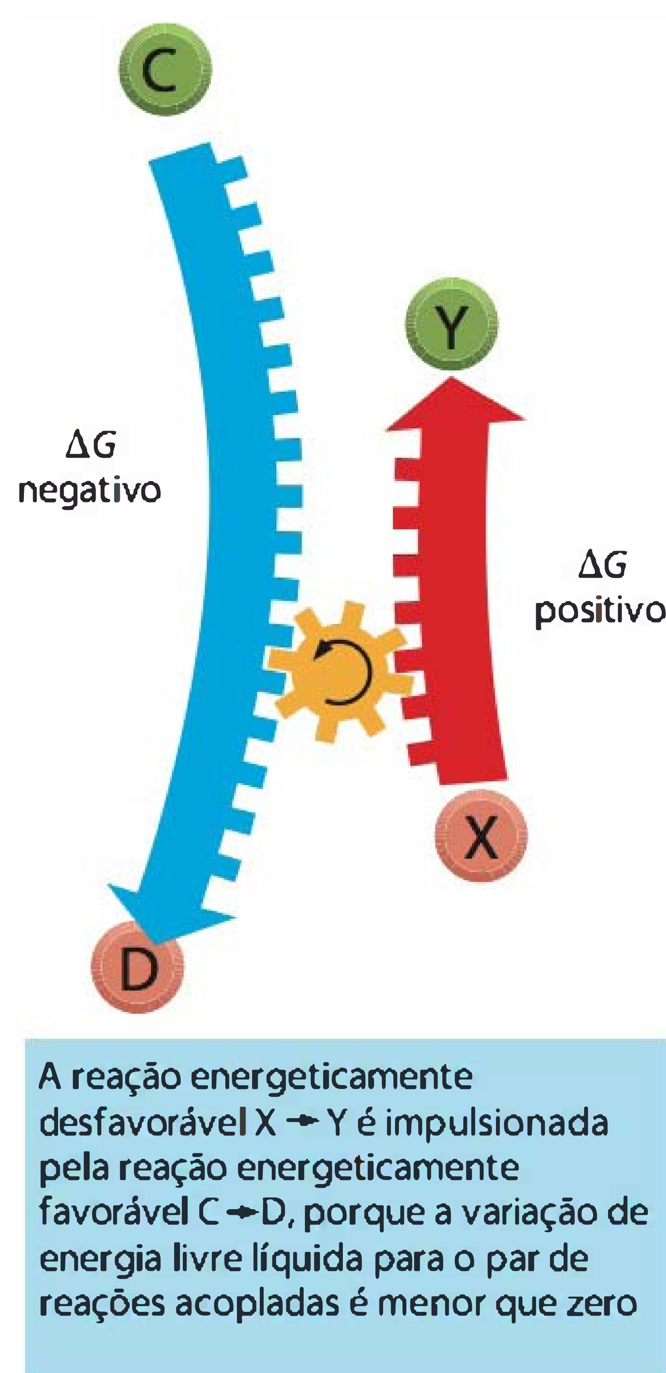


Figura 2-51 Como o acoplamento de reações é utilizado para fazer reações energeticamente desfavoráveis ocorrerem.

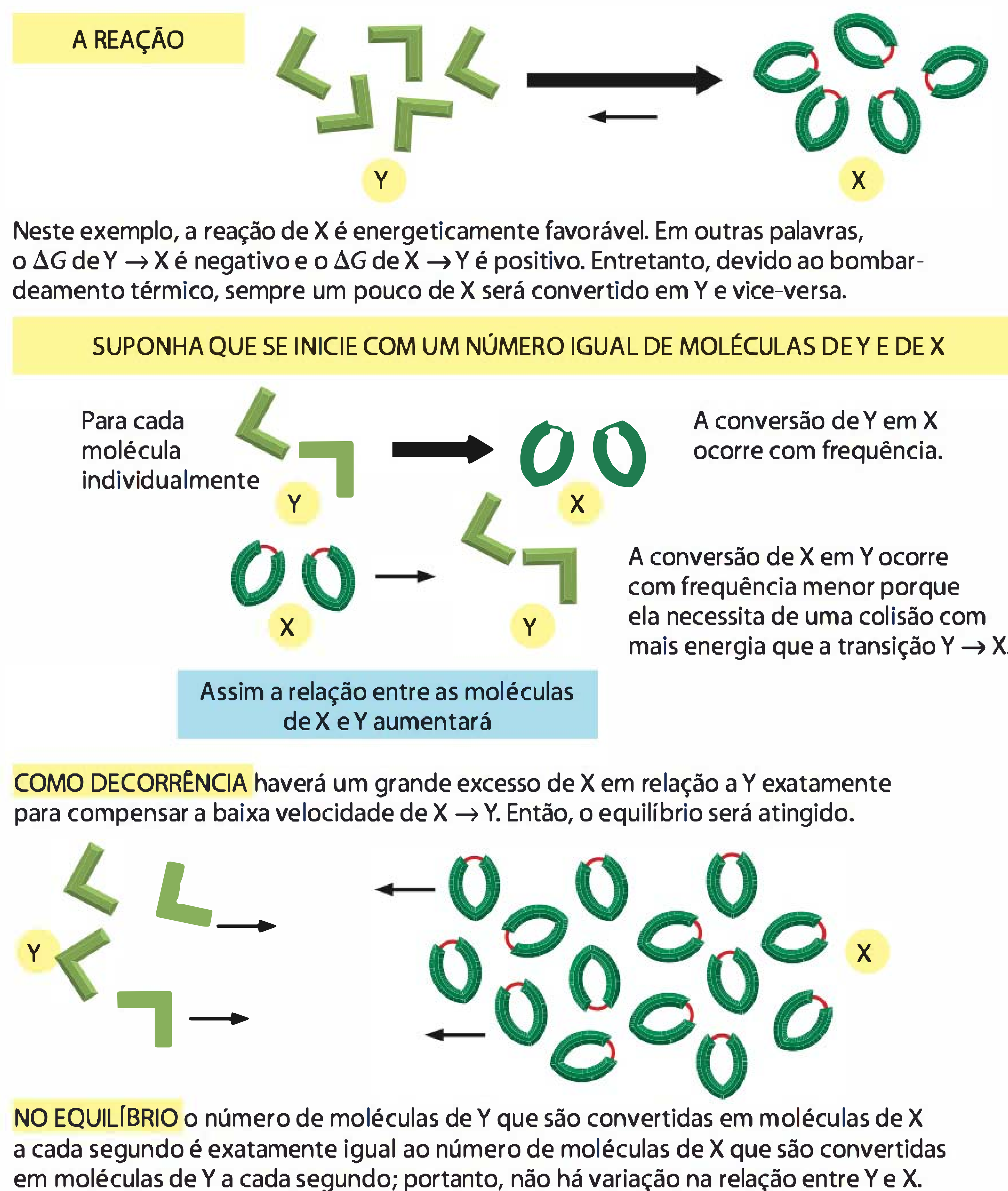


Figura 2-52 Equilíbrio químico. Quando uma reação atinge o equilíbrio, os fluxos de moléculas reagentes de um lado da reação a outro são iguais e opostos.

Usando a última equação, pode-se ver que a relação de equilíbrio X para Y (expressa como constante de equilíbrio, K) depende de características intrínsecas das moléculas, expressas pelos valores de $\Delta G°$ (**Tabela 2-4**). Observe que, para cada 1,4 kcal/mol (5,9 kJ/mol) de diferença na energia livre (a 37°C), a constante de equilíbrio é alterada por um fator de 10.

Quando uma enzima (ou qualquer outro catalisador) diminui a energia de ativação da reação Y → X, ela também diminui a energia de reação de X → Y exatamente pelo mesmo valor (ver Figura 2-44). Assim, as enzimas aceleram as reações direta e reversa pelo mesmo fator, e o ponto de equilíbrio da reação não se modifica (**Figura 2-53**).

Tabela 2-4 Relação entre a variação de energia livre padrão, $\Delta G°$, e a constante de equilíbrio

Constante de equilíbrio $\frac{[X]}{[Y]} = K$	Energia livre de X menos energia livre de Y kcal/mol (kJ/mol)
10^5	−7,1 (−29,7)
10^4	−5,7 (−23,8)
10^3	−4,3 (−18,0)
10^2	−2,8 (−11,7)
10^1	−1,4 (−5,9)
1	0 (0)
10^{-1}	1,4 (5,9)
10^{-2}	2,8 (11,7)
10^{-3}	4,3 (18,0)
10^{-4}	5,7 (23,8)
10^{-5}	7,1 (29,7)

Os valores das constantes de equilíbrio foram calculados para uma reação química simples (Y ⇆ X), usando a equação apresentada no texto.

O $\Delta G°$ está indicado em quilocalorias por mol a 37°C com quilojoules por mol entre parênteses (1 quilocaloria é igual a 4,184 quilojoules). Como está explicado no texto, $\Delta G°$ representa a diferença de energia livre sob condições-padrão (quando todos os componentes estão presentes na concentração de 1 mol/L).

A partir dessa tabela, observe que, se há uma variação de energia livre favorável ($\Delta G°$) de −4,3 kcal/mol para a transição de Y → X, existem mil vezes mais moléculas no estado Y do que no estado Y no ponto de equilíbrio (K = 1.000).

Em uma sequência de reações, os valores de $\Delta G°$ são aditivos

O curso da maioria das reações pode ser previsto quantitativamente. O grande volume de dados termodinâmicos já coletado torna possível calcular as mudanças-padrão de energia livre ($\Delta G°$) para a maior parte das reações metabólicas celulares importantes. A mudança de energia livre final de uma via metabólica é simplesmente a soma das mudanças na energia livre de cada uma das etapas que compõem a via. Considerando, por exemplo, duas reações em sequência



$$X \rightarrow Y \quad e \quad Y \rightarrow Z$$

onde os valores de $\Delta G°$ são +5 e −13 kcal/mol, respectivamente. (Relembrar que um mol é 6×10^{23} moléculas de substância.) Se essas duas reações ocorrerem sequencialmente, o $\Delta G°$ para a reação acoplada será −8 kcal/mol. Desse modo, a ocorrência da reação desfavorável X →Y, que não ocorre espontaneamente, pode ser possibilitada pela reação Y →Z, desde que a segunda reação ocorra logo depois da primeira.

As células podem assim fazer com que uma transição energeticamente desfavorável (X → Y) ocorra, caso, além da enzima que catalisa a reação X → Y, haja uma segunda enzima que catalise a reação energeticamente *favorável*, Y → Z. Efetivamente, a reação Y → Z atuará como um "sifão" que força a conversão de todas as moléculas X em moléculas Y e, então, essas últimas em moléculas Z (**Figura 2-54**). Por exemplo, várias das reações da longa via que converte os açúcares em CO_2 e H_2O seriam energeticamente desfavoráveis, caso fossem

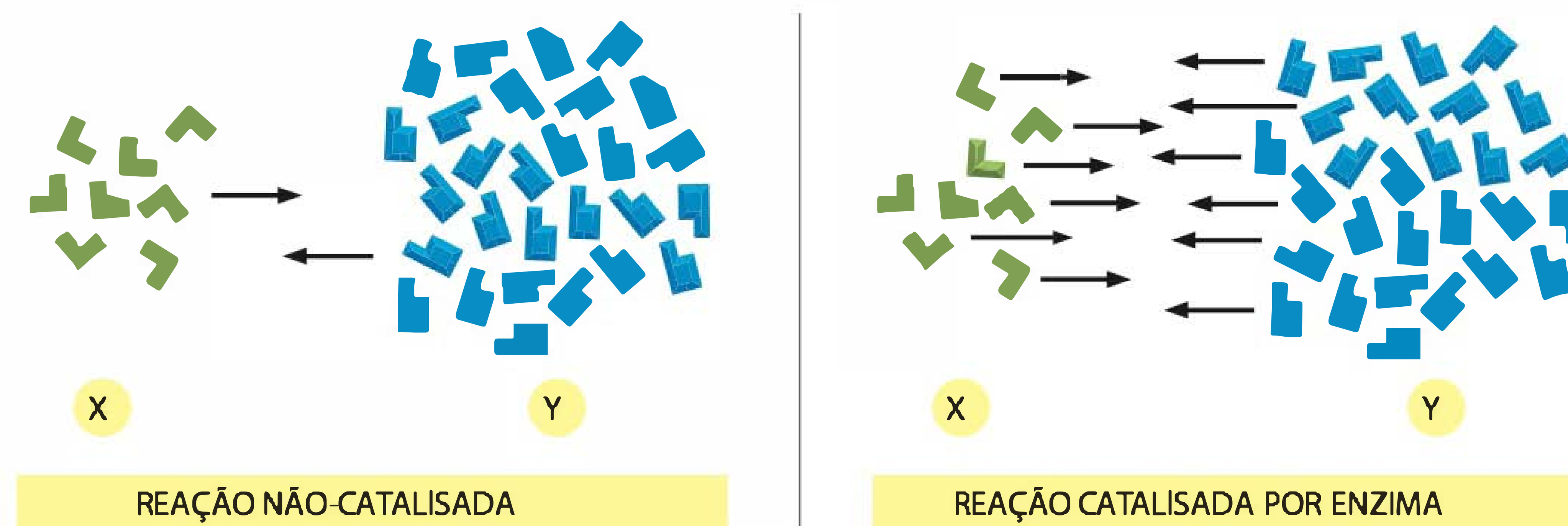


Figura 2-53 As enzimas não mudam o ponto de equilíbrio das reações. As enzimas, assim como qualquer catalisador, aceleram a velocidade das reações no sentido direto e no sentido inverso, pelo mesmo fator. Consequentemente, tanto para a reação catalisada quanto para a reação não-catalisada mostradas aqui, o número de moléculas sofrendo transição X → Y é igual ao número de moléculas que sofre a transição Y → X, quando a relação entre o número de moléculas de Y e de X for de 3,5 a 1. Em outras palavras, as duas reações atingiram o equilíbrio exatamente no mesmo ponto.

consideradas isoladamente. Porém, a via ocorre porque o $\Delta G°$ total para toda a série de reações em sequência tem um enorme valor negativo.

Entretanto, para muitas finalidades, a formação de uma via sequencial não é adequada. Frequentemente, a via desejada é apenas X → Y, sem que Y seja posteriormente convertido em outro produto. Felizmente, existem ainda outros meios de usar enzimas para acoplar reações. Esse é o próximo tópico discutido.

Carreadores de moléculas ativados são essenciais bara a biossíntese

A energia liberada pela oxidação das moléculas dos alimentos deve ser armazenada temporariamente antes que possa ser canalizada para a construção das muitas outras moléculas de que a célula necessita. Em muitos casos, a energia é armazenada como energia de ligação química em um pequeno número de "moléculas carreadoras", as quais contêm uma ou mais ligações covalentes ricas em energia. Essas moléculas difundem-se rapidamente pela célula, carregando, assim, energias de ligação dos locais de geração de energia para locais que utilizam energia para a biossíntese e outras atividades necessárias para as células (**Figura 2-55**).

Os **carreadores ativados** armazenam energia de uma maneira facilmente permutável, tanto na forma de um grupo químico que pode ser prontamente transferido, quanto como elétrons ricos em energia, de modo que esses carreadores exercem um papel duplo nas reações biossintéticas: como fonte de energia e também como transportadores de grupos químicos. Devido a razões históricas, essas moléculas muitas vezes são chamadas de *coenzimas*. As mais importantes dessas moléculas carreadoras ativadas são o ATP e duas moléculas intimamente relacionadas entre si, o NADH e o NADPH, que serão brevemente discutidas em detalhes. Será visto que as células usam carreadores de moléculas ativadas como se fossem uma forma de dinheiro para pagar por reações que, de outro modo, não poderiam ocorrer.

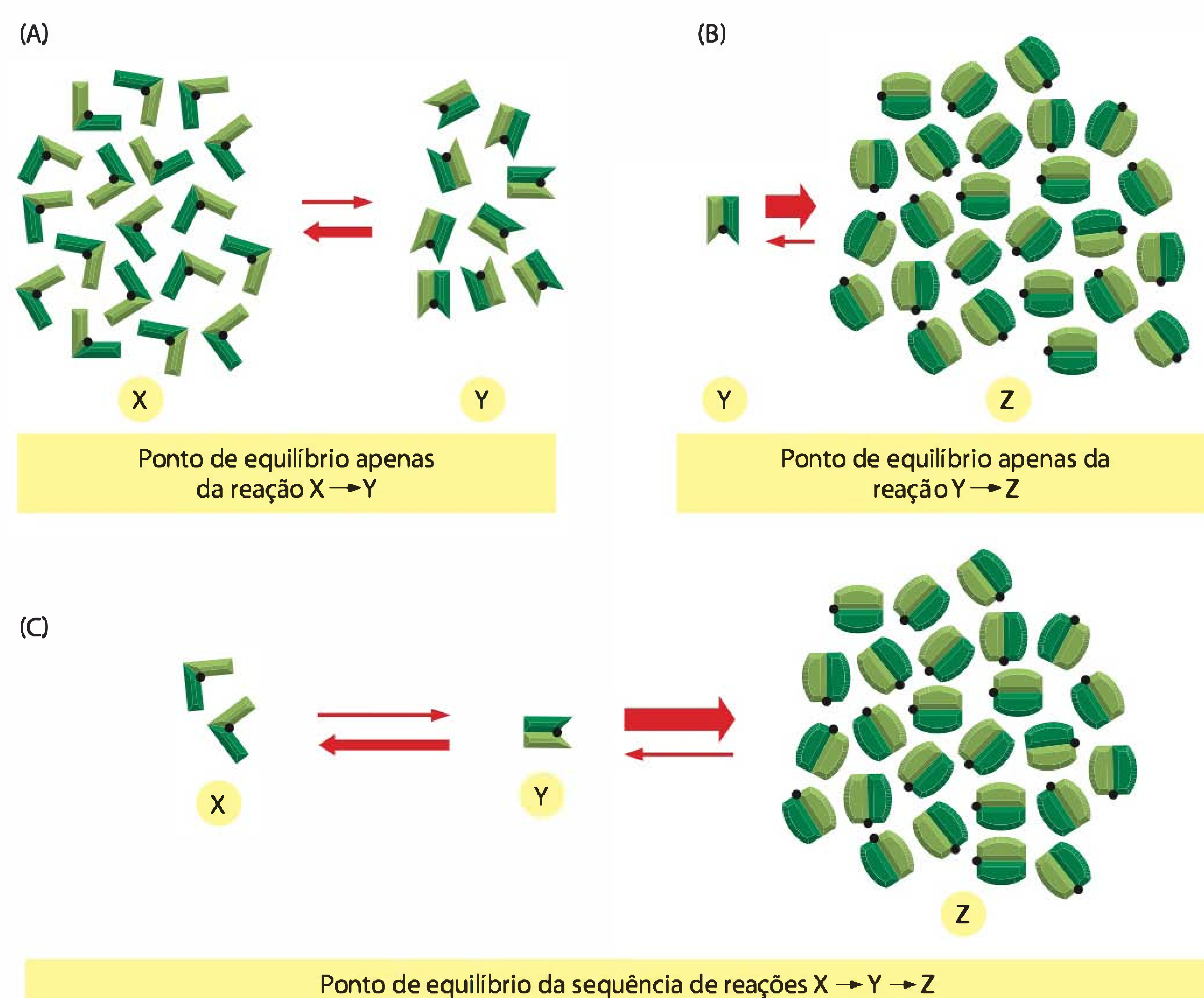


Figura 2-54 Como uma reação energeticamente desfavorável pode ser impulsionada por uma segunda reação que se segue. (A) No equilíbrio, há duas vezes mais moléculas de X do que de Y porque X tem um nível energético menor do que Y. (B) No equilíbrio, há 25 vezes mais moléculas de Z do que de Y porque Z tem um nível energético muito menor do que Y. (C) Caso as reações em (A) e (B) estejam acopladas, praticamente todas as moléculas de X serão convertidas em moléculas de Z.

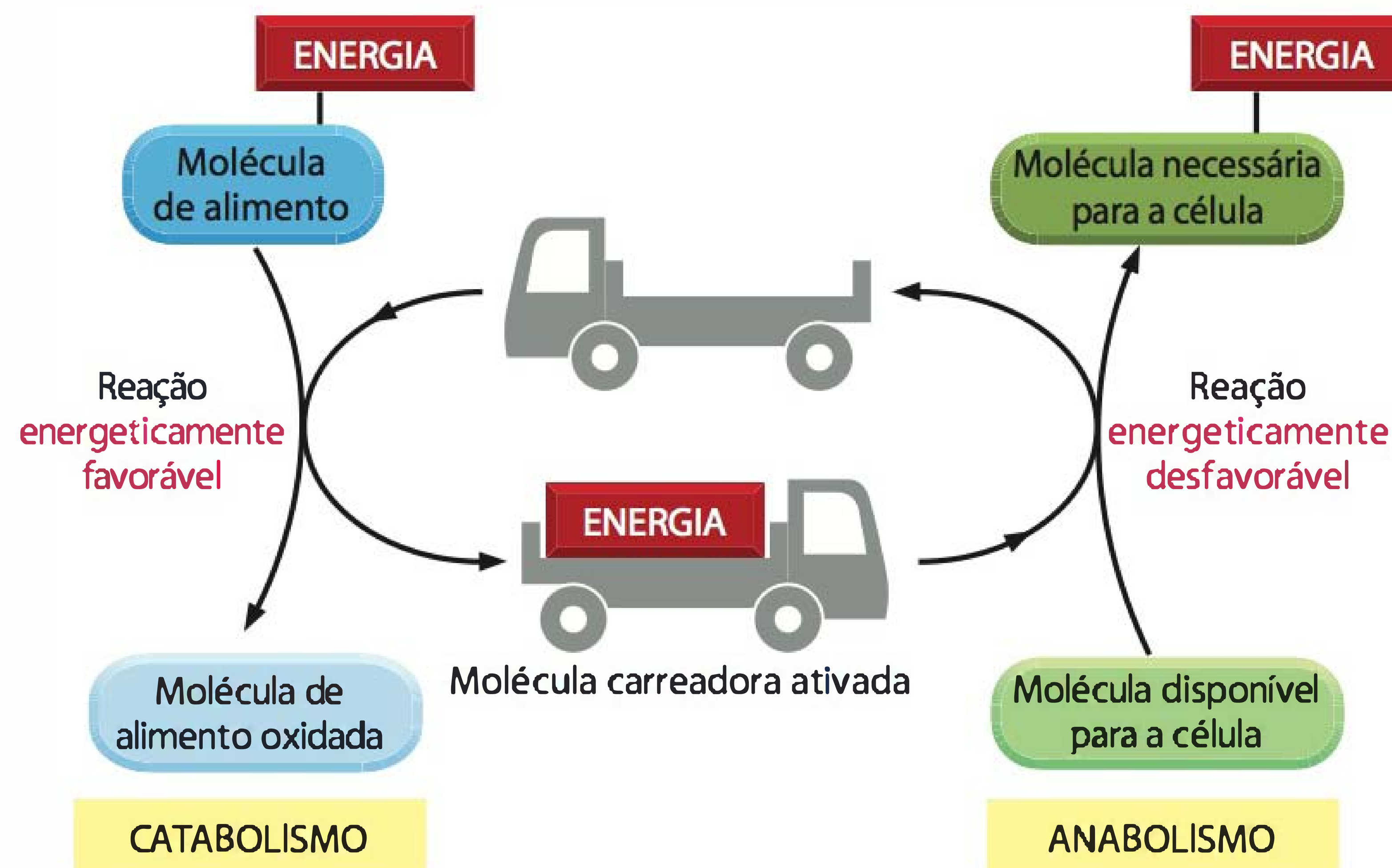


Figura 2-55 Transferência de energia e o papel dos carreadores ativados no metabolismo. Por servirem como carreadores de energia, as moléculas carreadoras ativadas atuam como intermediários que associam a degradação das moléculas de alimento e a liberação de energia (*catabolismo*) à biossíntese de moléculas orgânicas, pequenas e grandes, que requerem energia (*anabolismo*).

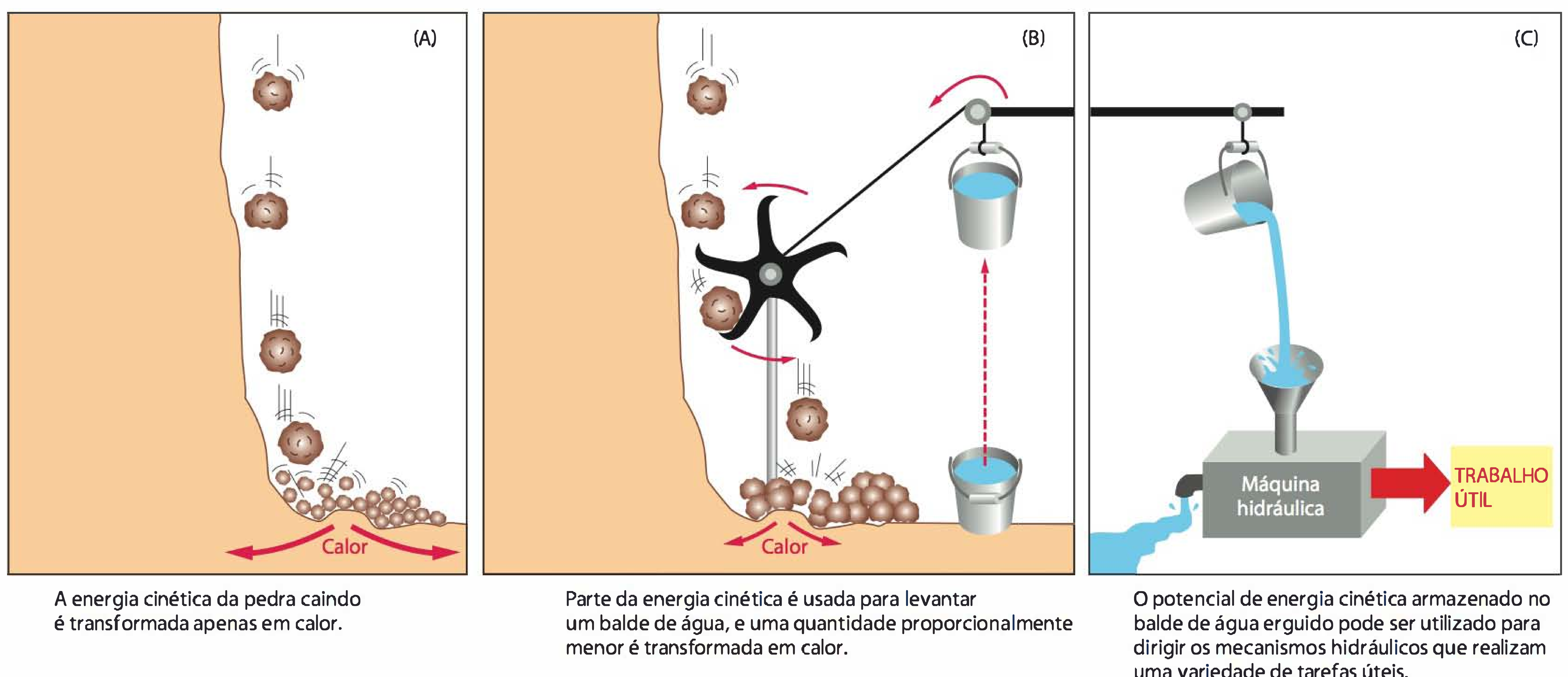
A formação de um carreador ativado é acoplada a uma reação energeticamente favorável

Quando uma molécula como a glicose é oxidada em uma célula, as reações catalisadas por enzimas garantem que grande parte da energia livre liberada pela oxidação seja capturada em alguma forma quimicamente útil, em vez de ser simplesmente dissipada como calor. Isso é possível por meio de **reações acopladas**, nas quais uma reação energeticamente favorável é usada para impulsionar uma reação desfavorável que produza uma molécula carreadora ativada, ou alguma outra forma de armazenamento de energia. Os mecanismos de acoplamento necessitam de enzimas e são fundamentais para todas as transferências de energia das células.

A natureza do acoplamento de reações está ilustrada na **Figura 2-56** por meio de uma analogia mecânica, onde uma reação química favorável é representada por pedras despencando de um penhasco. A energia das pedras que caem seria totalmente desperdiçada na forma de calor, gerado pela fricção das pedras ao atingirem o solo (ver diagrama do tijolo caindo na Figura 2-39). Por meio de um sistema cuidadosamente montado, entretanto, parte dessa energia pode ser usada para movimentar uma roda de pás, que levanta um balde (Figura 2-56B). Como agora as pedras só podem atingir o solo depois de acionar a roda, pode-se dizer que a reação energeticamente favorável da queda das pedras foi *acoplada* diretamente à reação energeticamente desfavorável de levantar o balde de água. Observe ainda que, como parte da energia foi usada para realizar um trabalho (em B), as pedras chegam ao solo com uma velocidade menor do que em (A) e, assim, uma energia proporcionalmente menor é desperdiçada como calor.

Um processo semelhante ocorre nas células, onde as enzimas fazem o papel da roda de pás usada na analogia. Por meio de mecanismos que serão discutidos posteriormente neste capítulo, as enzimas acoplam reações energeticamente favoráveis (como a oxidação dos alimentos) a reações energeticamente desfavoráveis, como a geração de moléculas car-

Figura 2-56 Modelo mecânico que ilustra o princípio de acoplamento de reações químicas. A reação espontânea mostrada em (A) serve de analogia para a oxidação direta de glicose a CO_2 e H_2O, que produz apenas calor. Em (B), a mesma reação está acoplada a uma segunda reação. Essa segunda reação pode servir como uma analogia da síntese de moléculas carreadoras ativadas. A energia que é produzida em (B) está em uma forma muito mais útil do que a produzida em (A), podendo ser usada para que ocorra uma variedade de reações que, de outra maneira, seriam energeticamente desfavoráveis (C).



A energia cinética da pedra caindo é transformada apenas em calor.

Parte da energia cinética é usada para levantar um balde de água, e uma quantidade proporcionalmente menor é transformada em calor.

O potencial de energia cinética armazenado no balde de água erguido pode ser utilizado para dirigir os mecanismos hidráulicos que realizam uma variedade de tarefas úteis.

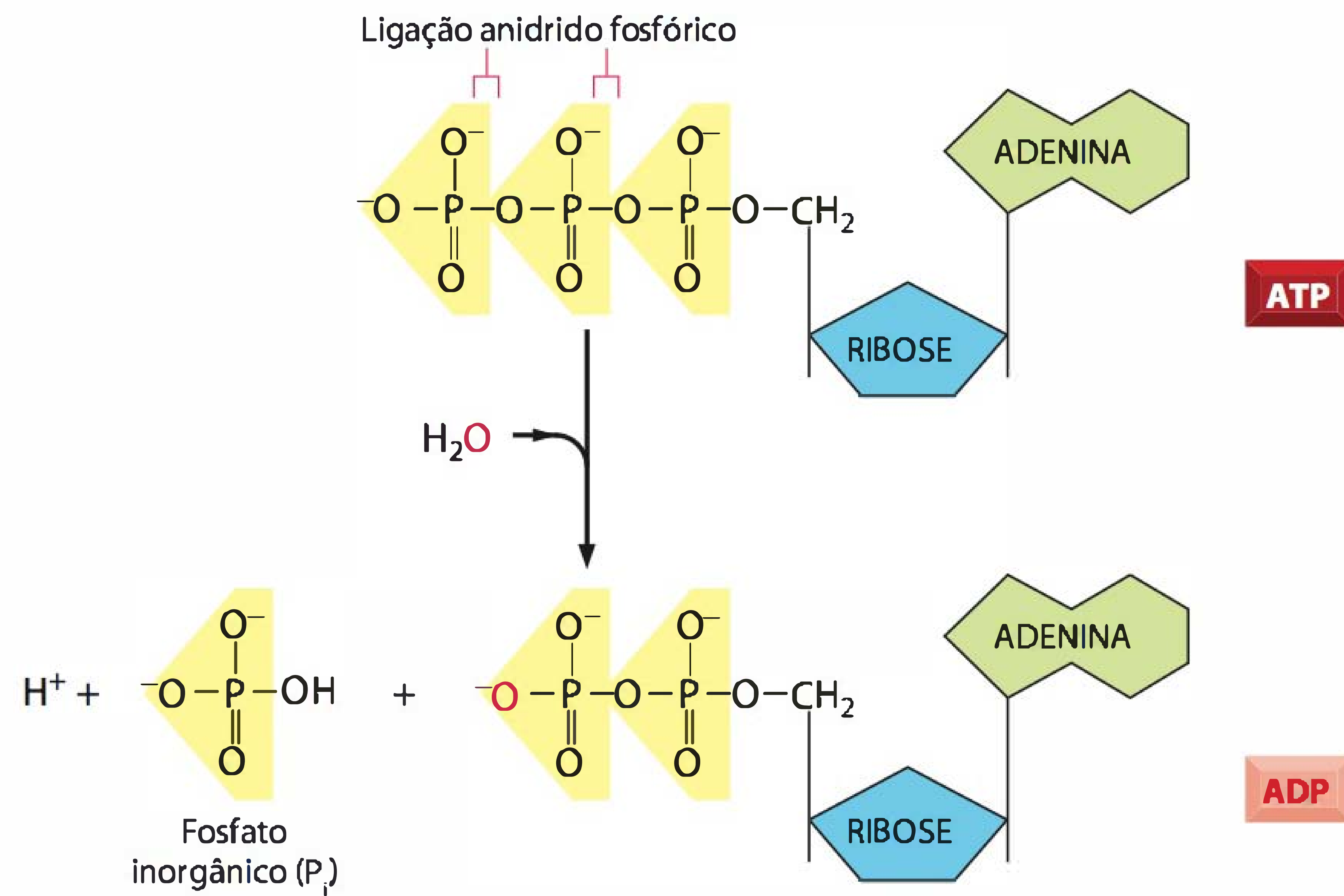


Figura 2-57 Hidrólise de ATP a ADP e fosfato inorgânico. Os dois fosfatos mais externos do ATP são mantidos presos ao resto da molécula por ligações anidrido fosfórico ricas em energia e que podem ser transferidas com facilidade. Como indicado, a adição de água ao ATP pode formar ADP e fosfato inorgânico (P_i). Essa hidrólise do fosfato terminal do ATP produz entre 11 e 13 kcal/mol de energia utilizável, dependendo das condições intracelulares. O grande valor negativo de ΔG dessa reação provém de vários fatores. A liberação do grupo fosfato terminal elimina uma repulsão desfavorável entre cargas negativas adjacentes. Além disso, o íon fosfato inorgânico (P_i) liberado é estabilizado por ressonância e pela formação de ligações de hidrogênio favoráveis com a água.

readoras ativadas. Isso faz com que a quantidade de calor liberado nas reações de oxidação seja reduzida a um valor exatamente igual à quantidade de energia armazenada nas ligações covalentes ricas em energia das moléculas carreadoras ativadas. Por sua vez, essa molécula carreadora ativada recebe um tanto de energia que é suficiente para fazer com que uma reação possa ocorrer em outro lugar da célula.

O ATP é a molécula carreadora ativada mais usada

O mais importante e versátil dos carreadores ativados das células é o **ATP**. Exatamente da mesma maneira que a energia armazenada pela elevação do balde de água na Figura 2-56B pode ser usada para movimentar as mais diversas máquinas hidráulicas, o ATP funciona como um depósito conveniente e versátil, uma forma de moeda corrente de energia, usado para que uma grande variedade de reações químicas possa ocorrer nas células. O ATP é sintetizado em uma reação de fosforilação altamente desfavorável do ponto de vista energético, na qual um grupo fosfato é adicionado ao **ADP** (*adenosine diphosphate*–difosfato de adenosina). Quando necessário, o ATP doa uma porção de energia por meio de sua hidrólise, altamente favorável energeticamente, formando ADP e fosfato inorgânico (**Figura 2-57**). O ADP que foi assim regenerado fica então disponível para ser utilizado em uma outra rodada da reação de fosforilação que forma ATP de novo.

A reação energeticamente favorável da hidrólise do ATP é acoplada a muitas outras reações (que sem esse acoplamento seriam desfavoráveis) nas quais são sintetizadas outras moléculas. No próximo capítulo serão mostradas algumas dessas reações. Muitas delas envolvem a transferência do fosfato terminal do ATP para alguma outra molécula, como ilustrado na reação de fosforilação mostrada na **Figura 2-58**.

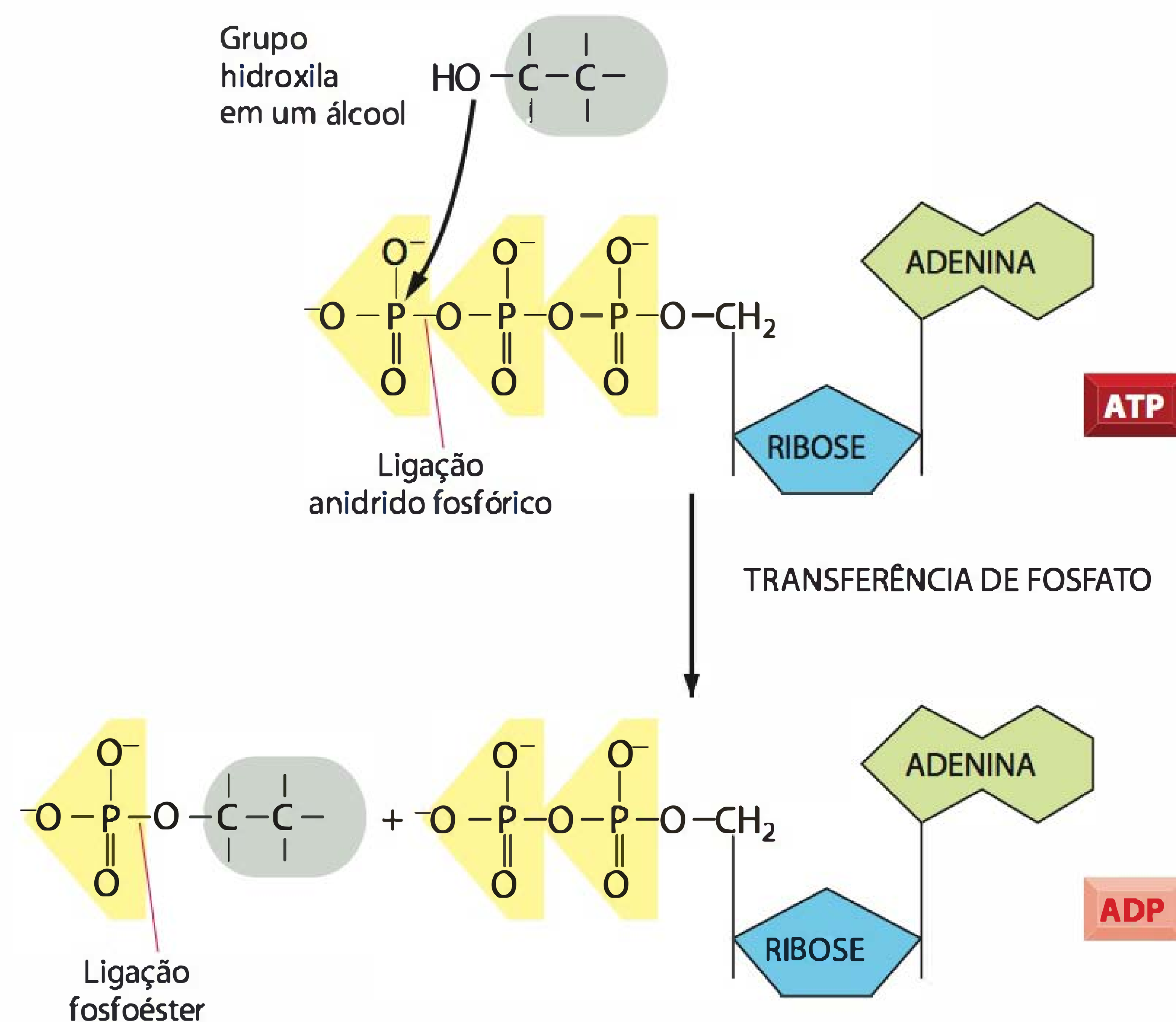


Figura 2-58 Exemplo de reação de transferência de grupo fosfato. Uma vez que a ligação rica em energia da ligação anidrido fosfórico do ATP é convertida em ligação fosfoéster, essa reação é energeticamente favorável e, então, possui um valor muito negativo de ΔG. Reações desse tipo estão envolvidas na síntese dos fosfolipídeos e nas etapas iniciais do catabolismo dos açúcares.

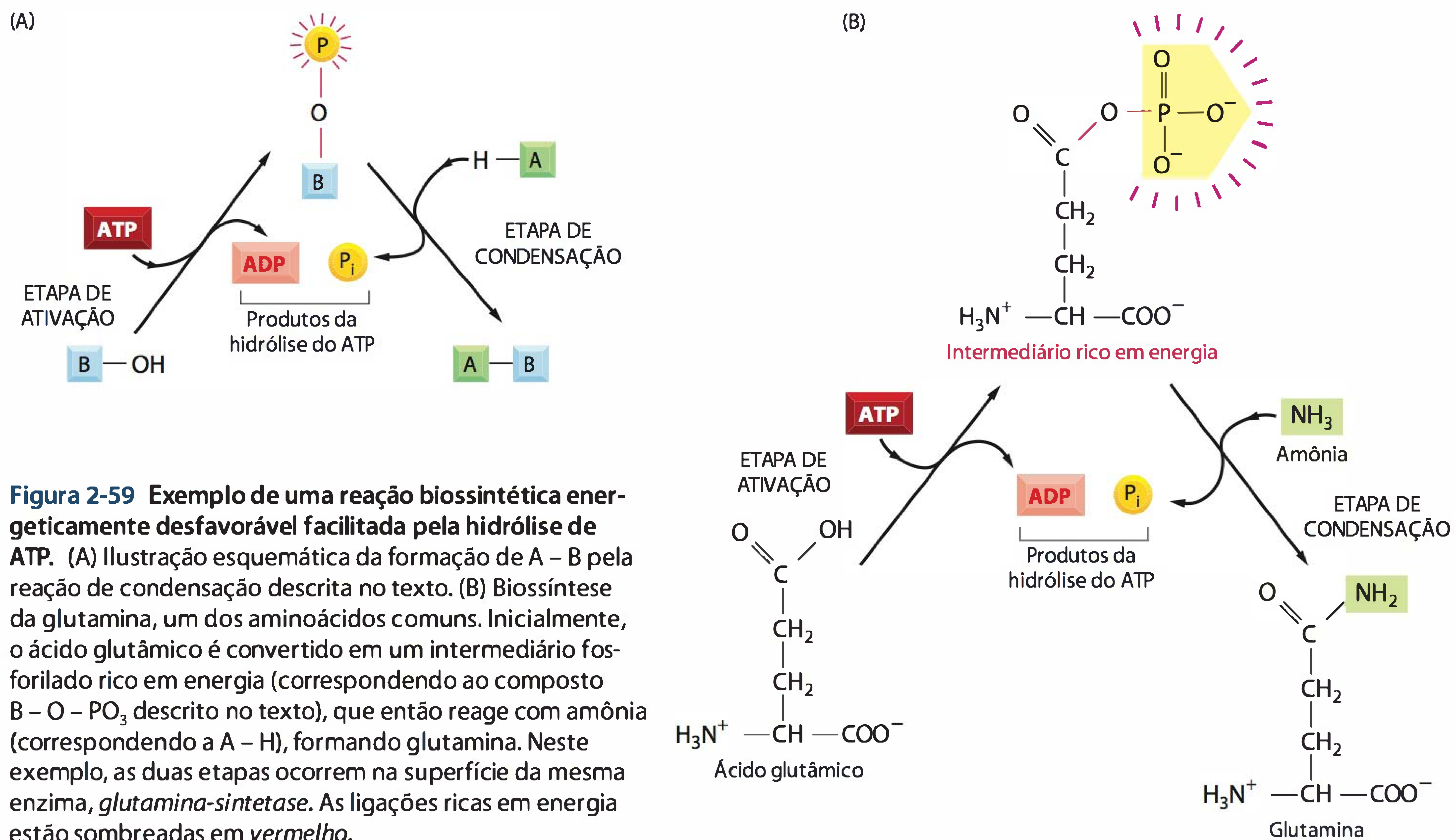


Figura 2-59 Exemplo de uma reação biossintética energeticamente desfavorável facilitada pela hidrólise de ATP. (A) Ilustração esquemática da formação de A – B pela reação de condensação descrita no texto. (B) Biossíntese da glutamina, um dos aminoácidos comuns. Inicialmente, o ácido glutâmico é convertido em um intermediário fosforilado rico em energia (correspondendo ao composto B – O – PO_3 descrito no texto), que então reage com amônia (correspondendo a A – H), formando glutamina. Neste exemplo, as duas etapas ocorrem na superfície da mesma enzima, *glutamina-sintetase*. As ligações ricas em energia estão sombreadas em *vermelho*.

O ATP é o mais abundante dos carreadores ativos das células. Para dar apenas um exemplo, ele é utilizado como suprimento de energia para muitas das bombas que transportam substâncias para dentro e para fora das células (discutido no Capítulo 11). Ele também fornece energia aos motores moleculares que permitem que as células dos músculos se contraiam e as células nervosas transportem materiais de uma a outra das extremidades de seus longos axônios (discutido no Capítulo 16).

A energia armazenada no ATP geralmente está atrelada para unir duas moléculas

Discutiu-se anteriormente a maneira pela qual reações energeticamente favoráveis podem ser acopladas a reações desfavoráveis, X → Y, permitindo assim que ocorram. Em um esquema desses, uma segunda enzima catalisa a reação energeticamente favorável Y → Z, transformando todo o X em Y (ver Figura 2-54). Entretanto, esse mecanismo não terá utilidade quando o produto necessário for Y e não Z.

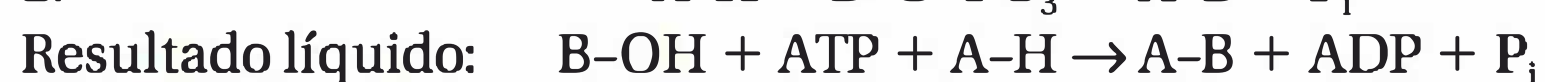
Geralmente, uma reação típica necessária para as biossínteses é aquela na qual duas moléculas, A e B, são ligadas para produzir A–B em uma reação de condensação altamente desfavorável


$$\text{A–H} + \text{B–OH} \rightarrow \text{A–B} + H_2O$$

Existe uma via indireta que permite que A–H e B–OH formemA–B, na qual o acoplamento da reação de hidrólise do ATP permite sua ocorrência. Neste caso, a energia da hidrólise do ATP é inicialmente utilizada para converter B–OH em um composto intermediário rico em energia que, então, reage diretamente com A–H, resultando em A–B. O mecanismo mais simples envolve a transferência de um fosfato do ATP para B-OH, produzindo B–OPO_3. Nesse caso, a via terá apenas duas etapas:


1. $\text{B–OH} + \text{ATP} \rightarrow \text{B–O–}PO_3 + \text{ADP}$


2. $\text{A–H} + \text{B–O–}PO_3 \rightarrow \text{A–B} + P_i$


Resultado líquido: $\text{B–OH} + \text{ATP} + \text{A–H} \rightarrow \text{A–B} + \text{ADP} + P_i$

A reação de condensação, que é energeticamente desfavorável, é forçada a ocorrer, porque está diretamente acoplada à hidrólise do ATP em uma via de reações catalisadas por enzimas (**Figura 2-59**A).

Uma reação biossintética desse tipo é usada para sintetizar o aminoácido glutamina (Figura 2-59B). Logo, será visto que mecanismos muito similares, mas mais complexos, são usados na produção de quase todas as moléculas grandes das células.

NADH e NADPH são importantes carreadores de elétrons

Outras moléculas carreadoras ativadas participam em reações de oxidação-redução e em geral também participam de reações celulares acopladas. Esses carreadores ativados são especializados em transportar elétrons e átomos de hidrogênio ricos em energia. Os mais importantes desses carreadores de elétrons são o **NAD**$^+$ (*nicotinamide adenine dinucleotide*–nicotinamida adenina dinucleotídeo) e a molécula intimamente relacionada, **NADP**$^+$ (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo). Posteriormente, serão examinadas algumas das reações nas quais eles participam. Tanto o NAD$^+$ quanto o NADP$^+$ carregam um "pacote de energia", correspondendo a dois elétrons ricos em energia e um próton (H^+), e são convertidos a **NADH** (nicotinamida adenina dinucleotídeo *reduzido*) e a **NADPH** (reduced *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo *reduzido*), respectivamente. Por isso, essas moléculas podem ser vistas como carreadores de íons hidreto (o H^+ mais dois elétrons, ou H^-).

Assim como o ATP, o NADPH é um carreador ativado que participa de muitas reações biossintéticas importantes que, não fosse isso, seriam energeticamente desfavoráveis. O NADPH é produzido segundo o esquema geral mostrado na **Figura 2-60**A. Em um conjunto especial de reações catabólicas produtoras de energia, um átomo de hidrogênio e dois elétrons são removidos da molécula de substrato e adicionados ao anel nicotínico do NADP$^+$, formando NADPH e, concomitantemente, um próton (H^+) é liberado na solução. Essa é uma reação de oxidação-redução típica; o substrato é oxidado, e o NADP$^+$ é reduzido. As estruturas do NADP$^+$ e do NADPH estão apresentadas na Figura 2-60B.

O íon hidreto carregado pelo NADPH é doado rapidamente por meio de uma reação de oxidação-redução subsequente, pois sem o íon hidreto o anel fica com um arranjo de elétrons mais estável. Nessas reações subsequentes, que regeneram o NADP$^+$, é o NADPH que se torna oxidado, e o substrato fica reduzido. O NADPH é um doador efetivo de íon hidreto

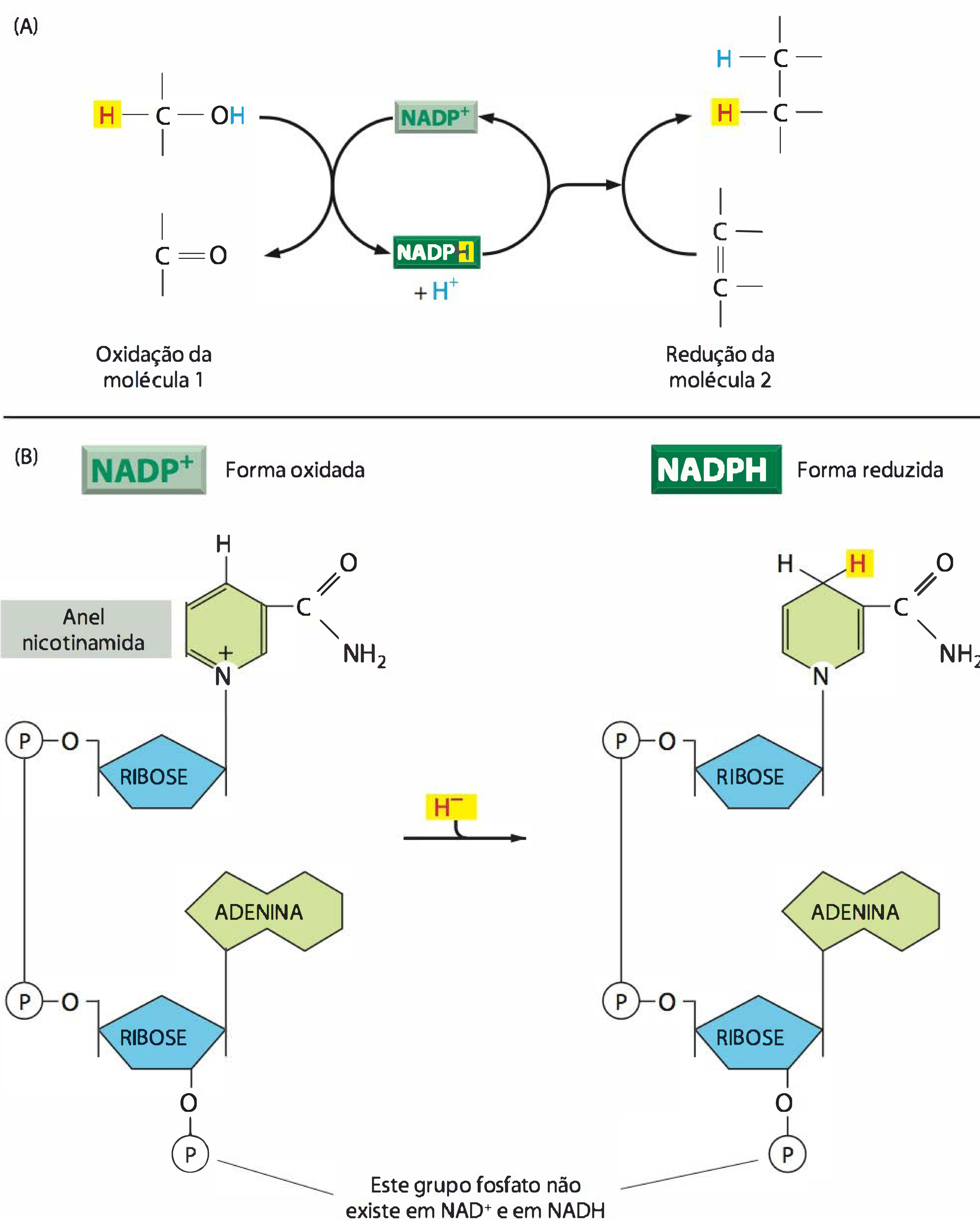


Figura 2-60 NADPH, um carreador de elétrons importante. (A) NADPH é produzido em reações do tipo geral mostradas no lado esquerdo, nas quais há remoção de dois átomos de hidrogênio de um substrato. A forma oxidada da molécula carreadora, NADP$^+$, recebe um átomo de hidrogênio e um elétron (um íon hidreto); o próton (H^+), de um outro átomo de H, é liberado para a solução. Uma vez que NADPH mantém o íon hidreto por meio de uma ligação rica em energia, esse íon direto que foi adicionado pode ser facilmente transferido para outras moléculas, como é mostrado no lado direito da figura. (B) Estrutura de NADP$^+$ e NADPH. A parte da molécula de NADP$^+$ conhecida como anel da nicotinamida aceita dois elétrons juntamente com um próton (o equivalente a um íon hidreto, H^-), formando, assim, NADPH. As moléculas de NAD$^+$ e NADH têm estrutura idêntica às de NADP$^+$ e NADPH, respectivamente, exceto quanto à ausência do grupo fosfato mostrado.

para outras moléculas, pela mesma razão pela qual o ATP transfere fosfatos com facilidade. Em ambos os casos, a transferência é acompanhada por uma grande variação negativa na energia livre. Um exemplo do uso do NADPH na biossíntese é mostrado na **Figura 2-61**.

O grupo fosfato extra não tem efeito nas propriedades de transferência de elétrons do NADPH em relação ao NADH por localizar-se distante da região que participa da transferência de elétrons (ver Figura 2-60B). Ele, entretanto, deixa a molécula de NADPH com uma forma levemente diferente da forma do NADH, de modo que o NADPH e o NADH ligam-se como substratos a diferentes grupos de enzimas. Assim, os dois tipos de carreadores são usados para transferir elétrons (ou íons hidreto) entre diferentes conjuntos de moléculas.

Por que existe essa divisão de trabalho? A resposta baseia-se na necessidade da regulação independentemente de dois conjuntos de reações de transferência de elétrons. O NADPH funciona principalmente com enzimas que catalisam reações anabólicas, provendo os elétrons ricos em energia que são necessários para a síntese de moléculas biológicas ricas em energia. O NADH, ao contrário, tem um papel específico como intermediário no sistema de reações catabólicas que geram ATP pela oxidação das moléculas dos alimentos, como será discutido brevemente. A geração do NADH a partir do NAD^+ (e a geração do NADPH a partir do $NADP^+$) ocorre por vias diferentes, que são reguladas independentemente, de maneira que as células podem ajustar o suprimento de elétrons para esses dois propósitos antagônicos de maneira independente uma da outra. No interior das células, a proporção entre NAD^+ e NADH é mantida alta, enquanto que a relação entre $NADP^+$ e NADPH é mantida baixa. Isso assegura uma enorme disponibilidade de NAD^+ para funcionar como agente oxidante e NADPH em abundância para agir como agente redutor, atendendo assim às exigências de suas funções específicas no catabolismo e no anabolismo, respectivamente.

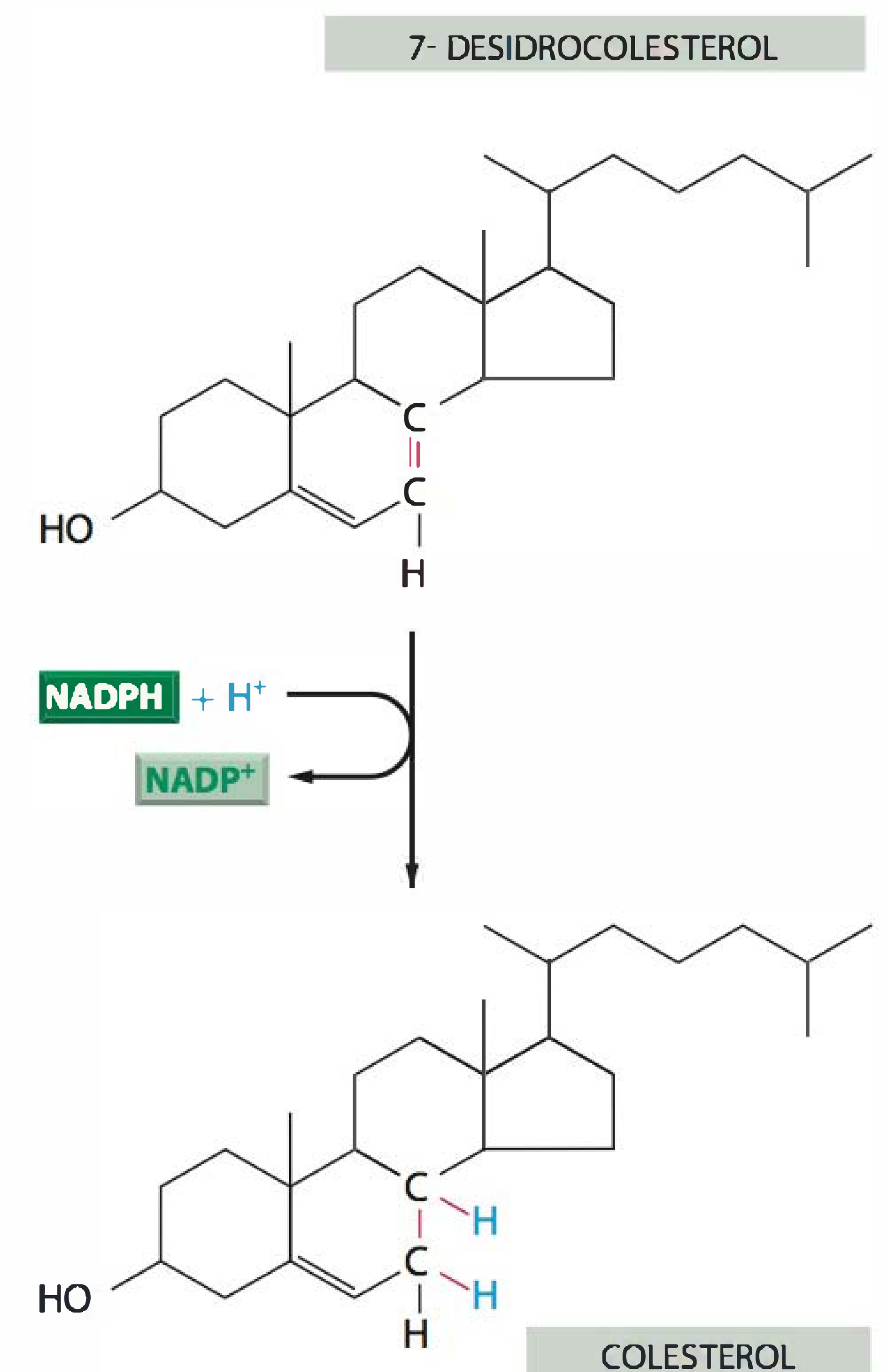


Figura 2-61 Estágio final de uma das vias biossintéticas que leva ao colesterol. Assim como em muitas outras reações biossintéticas, a redução da ligação C=C é feita pela transferência de um íon hidreto, proveniente da molécula de NADPH, e de um próton (H^+) da solução.

Existem muitas outras moléculas de carreadores ativados nas células

Outros carreadores ativados também recolhem e carregam grupos químicos pela transferência de ligações ricas em energia que ocorrem com facilidade. Por exemplo, a coenzima A carrega um grupo acetila por meio de uma ligação prontamente transferível. Essa forma ativada é conhecida como **acetil-CoA** (acetil coenzima A), cuja estrutura está ilustrada na **Figura 2-62**. Ela é utilizada para adicionar unidades de dois carbonos na biossíntese de moléculas grandes.

Na acetil-CoA, assim como em outras moléculas carreadoras, os grupos transferíveis constituem apenas uma pequena parte da molécula. O resto consiste em uma grande por-

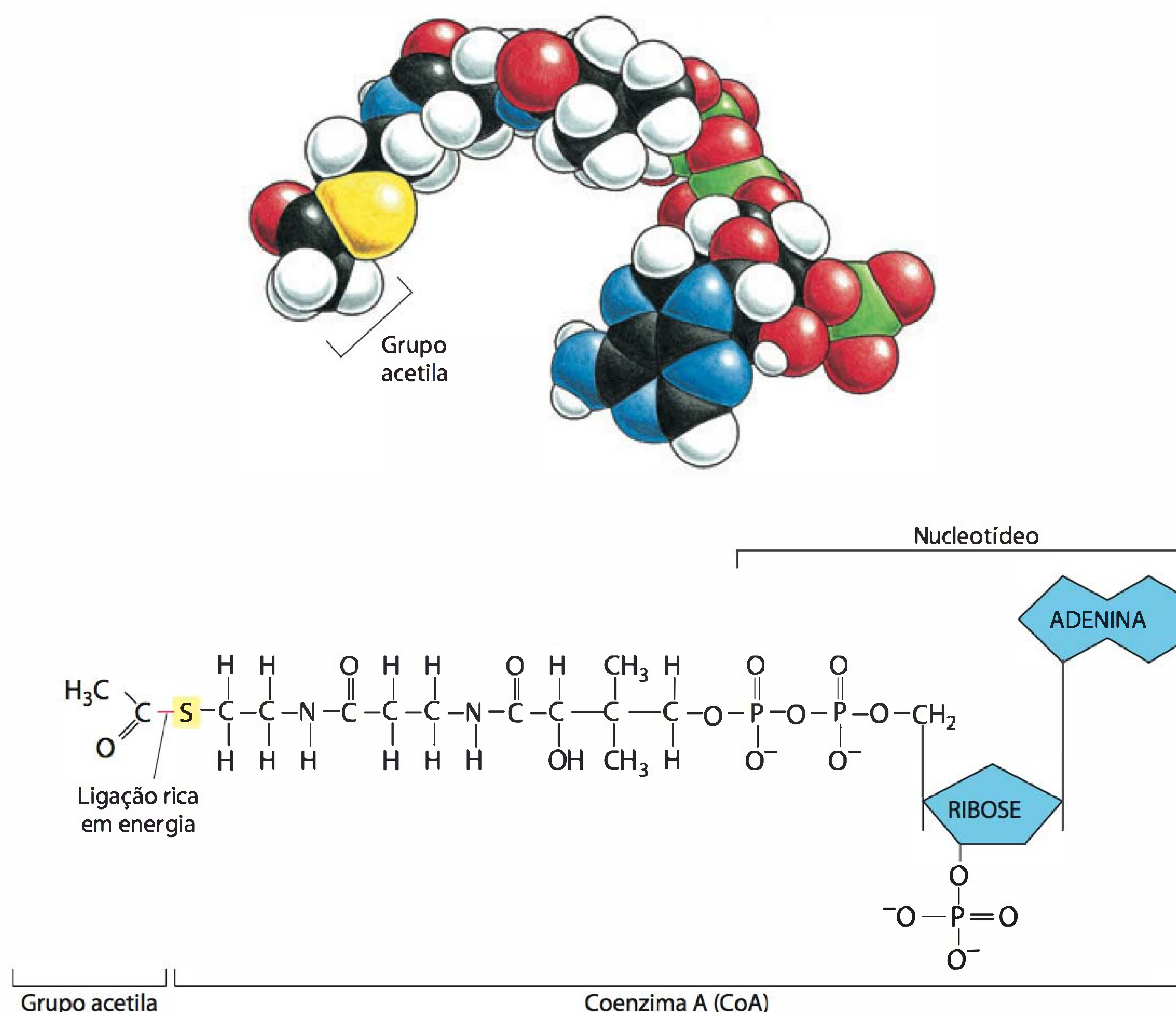


Figura 2-62 Estrutura da molécula de acetil-CoA, importante molécula carreadora. O modelo de preenchimento espacial é mostrado acima da estrutura. O átomo de enxofre (*amarelo*) forma uma ligação tioéster com o acetato. Uma vez que a molécula de acetato pode ser facilmente transferida para outra molécula, porque essa ligação rica em energia libera uma grande quantidade de energia ao ser hidrolisada, a molécula de acetato pode ser facilmente transferida para outras moléculas.

Tabela 2-5 Algumas das moléculas carreadoras ativadas amplamente utilizadas no metabolismo

Carreador ativado	Grupo carreado na ligação rica em energia
ATP	fosfato
NADH, NADPH, $FADH_2$	elétrons e hidrogênios
Acetil-CoA	grupo acetila
Biotina carboxilada	grupo carboxila
S-Adenosilmetionina	grupo metila
Uridina-difosfato-glicose	glicose

ção orgânica que serve como um "portador" conveniente que facilita o reconhecimento da molécula carreadora por enzimas específicas. Assim como no caso da acetil-CoA, geralmente essa "porção portadora" contém um nucleotídeo (em geral adenosina). Esse fato curioso talvez seja uma relíquia do princípio da evolução. Diz-se correntemente que o principal catalisador das primeiras formas de vida, antes do DNA ou das proteínas, foram moléculas de RNA (ou seus parentes próximos), como é descrito no Capítulo 6. É tentador especular se as diversas moléculas carreadoras de hoje foram originadas nesse mundo primitivo de RNA, em que as porções nucleotídicas poderiam ter utilidade para ligá-las a enzimas de RNA.

Alguns exemplos dos tipos de reações de transferência catalisadas pelas moléculas carreadoras ativadas ATP (transferência de fosfato) e NADPH (transferência de elétrons e de hidrogênio) estão mostrados nas Figuras 2-58 e 2-61 respectivamente. As reações de outras moléculas carreadoras ativadas envolvem a transferência de grupos metila, carbonila ou de glicose em reações de biossíntese (**Tabela 2-5**). Esses carreadores ativados são produzidos em reações nas quais há acoplamento com a hidrólise de ATP (mostrado no exemplo da **Figura 2-63**). Desse modo, a energia que possibilita a utilização desses grupos em biossínteses vem de reações catabólicas que produzem ATP. Um processo semelhante ocorre nas sínteses das grandes moléculas das células, os ácidos nucleicos, as proteínas e os polissacarídeos, discutidas a seguir.

A síntese dos polímeros biológicos é impulsionada pela hidrólise de ATP

Anteriormente discutiu-se que as macromoléculas são responsáveis pela grande maioria da massa seca das células, isto é, a massa após a eliminação total de água (ver Figura 2-29).

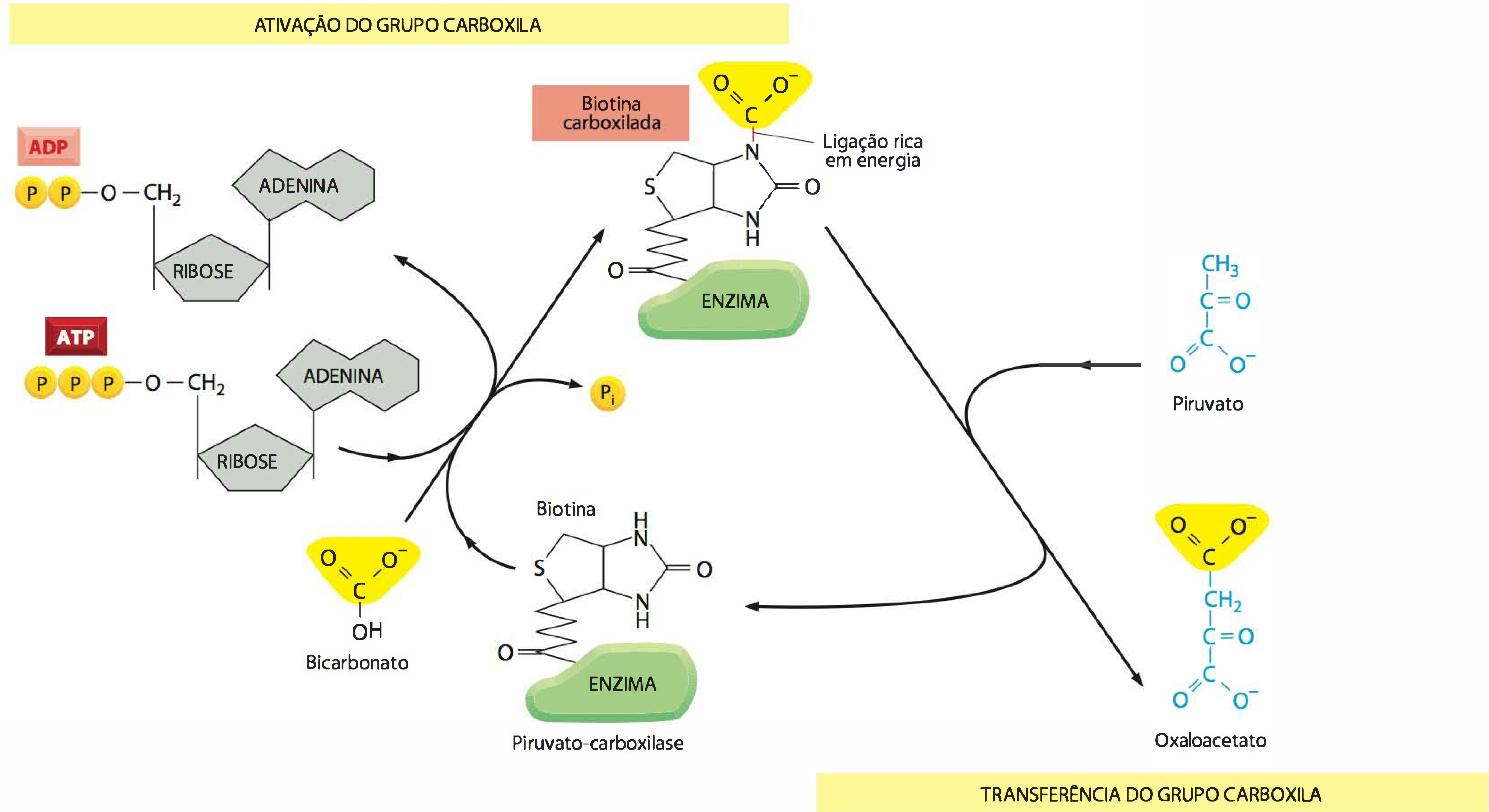


Figura 2-63 Reação de transferência de grupos carboxila usando uma molécula carreadora ativada. A biotina carboxilada é usada pela enzima *piruvato carboxilase* para transferir um grupo carboxila na produção de oxaloacetato, uma das moléculas necessárias para o ciclo do ácido cítrico. A molécula aceptora nessa reação de transferência de grupo é o piruvato. Outras enzimas também usam a biotina para transferir grupos carboxila para outras moléculas aceptoras. Observe que a síntese de biotina carboxilada requer energia derivada do ATP – uma propriedade geral de muitos carreadores ativados.

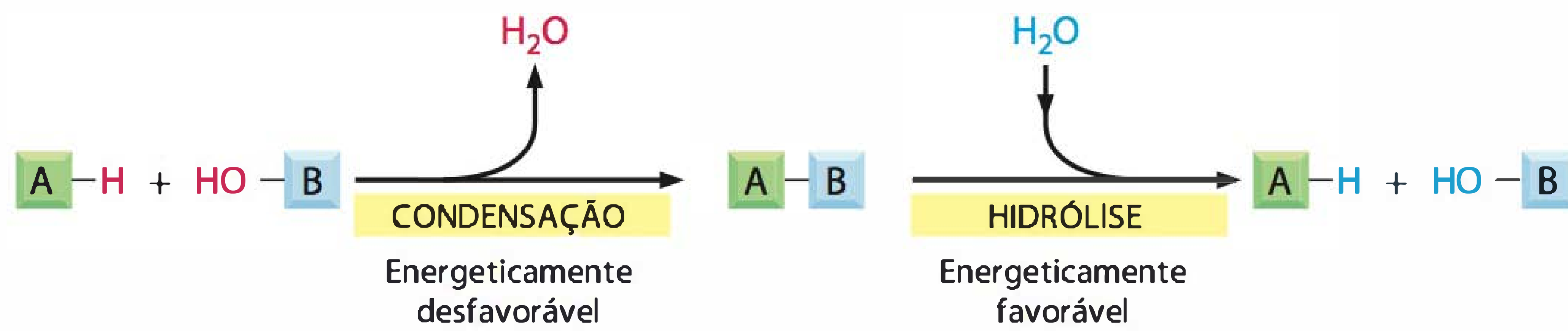


Figura 2-64 A condensação e a hidrólise são reações opostas. As macromoléculas das células são polímeros formados por subunidades (ou monômeros) por meio de reações de condensação, sendo degradadas por reações de hidrólise. Todas as reações de condensação são energeticamente desaforáveis.

Essas moléculas são constituídas por subunidades (ou monômeros) que são ligadas por reações de *condensação*, nas quais os constituintes de uma molécula de água (um OH e um H) são removidos dos dois reagentes. Consequentemente, a reação inversa, a degradação dos três tipos de polímeros, ocorre por adição de água catalisada por enzimas (*hidrólise*). Essas reações de hidrólise são energeticamente favoráveis, ao passo que as reações biossinteticas necessitam de adição de energia e são muito mais complexas (**Figura 2-64**).

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA), as proteínas e os polissacarídeos são polímeros produzidos pela adição repetitiva de subunidades (também chamadas de monômeros) a uma das extremidades da cadeia em crescimento. As reações de síntese desses três tipos de macromoléculas estão esquematizadas na **Figura 2-65**. Como indicado, a etapa de condensação de cada um dos casos depende da energia proveniente da hidrólise de um trifosfato de nucleosídeo. Ainda, exceto no caso dos ácidos nucleicos, nenhum grupo fosfato é adicionado às moléculas que são produto final dessas reações. De que maneira as reações que liberam energia por hidrólise de ATP acoplam-se à síntese dos polímeros?

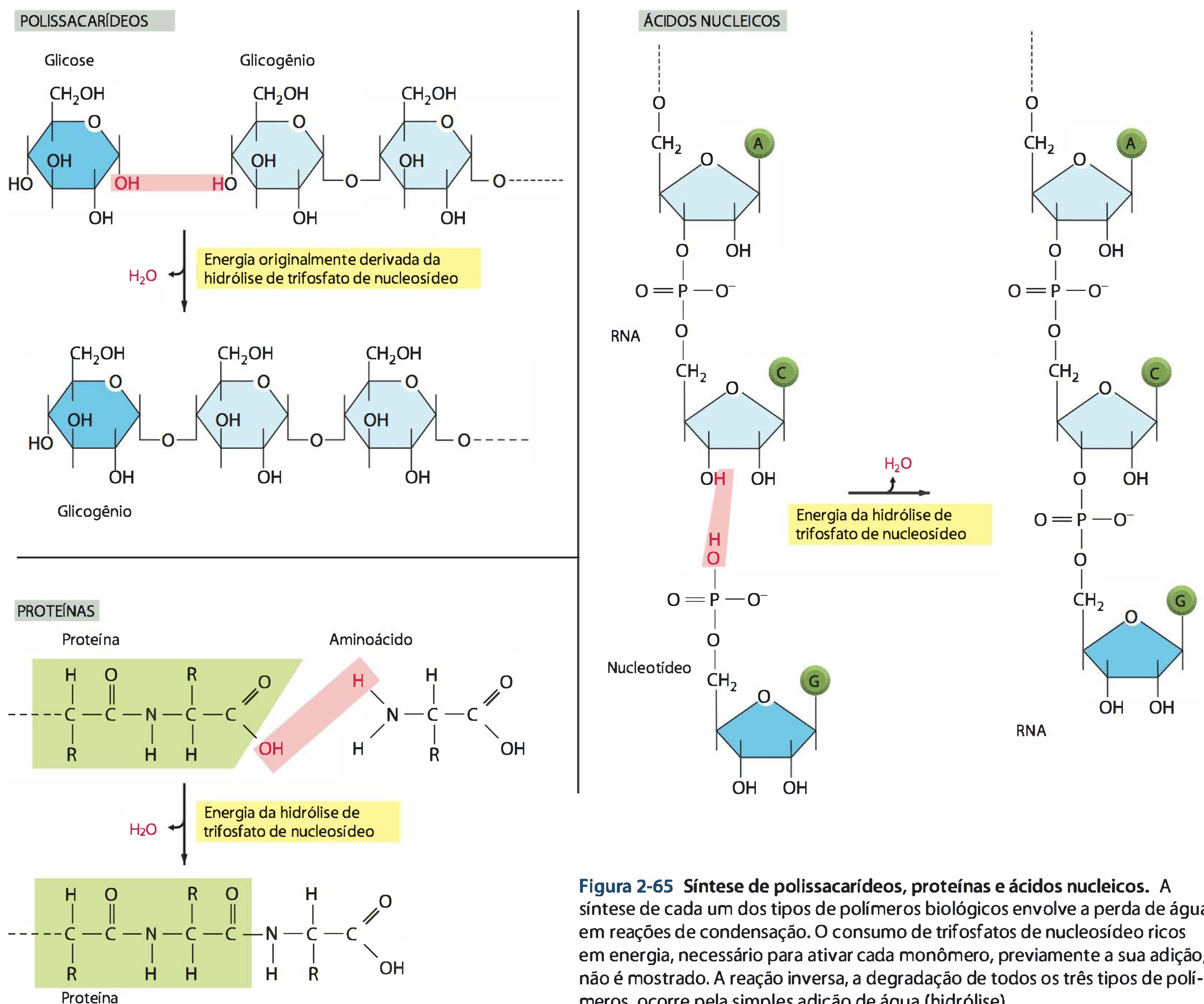


Figura 2-65 Síntese de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A síntese de cada um dos tipos de polímeros biológicos envolve a perda de água em reações de condensação. O consumo de trifosfatos de nucleosídeo ricos em energia, necessário para ativar cada monômero, previamente a sua adição, não é mostrado. A reação inversa, a degradação de todos os três tipos de polímeros, ocorre pela simples adição de água (hidrólise).

Para cada um dos tipos de macromolécula, existe uma via catalisada por enzimas semelhante à via discutida previamente para a síntese do aminoácido glutamina (ver Figura 2-59). O princípio é exatamente o mesmo, pois o grupo OH que será removido na reação de condensação é inicialmente ativado pelo envolvimento em uma ligação rica em energia com uma segunda molécula. Entretanto, o mecanismo realmente usado para ligar a hidrólise de ATP à síntese das proteínas e de polissacarídeos é mais complexo do que o usado na síntese de glutamina, pois há necessidade de uma série de intermediários ricos em energia para produzir a ligação rica em energia que finalmente é quebrada na etapa de condensação (discutido no Capítulo 6 quanto à síntese proteica).

Existem limitações na capacidade de cada carreador ativado favorecer a biossíntese. O ΔG para a hidrólise de ATP, produzindo ADP e fosfato inorgânico (P_i), depende das concentrações de todos os reagentes, mas, nas concentrações geralmente encontradas nas células, ele situa-se entre -11 e -13 kcal/mol (entre -45 e -54 kJ/mol). Em princípio, essa reação de hidrólise pode ser usada para que ocorra uma reação desfavorável com um ΔG, talvez de $+10$ kcal/mol, desde que exista uma via de reações adequadas. No caso de algumas reações biossintéticas, entretanto, mesmo -13 kcal/mol ainda pode ser insuficiente. Nesses casos, a via de hidrólise do ATP pode ser alterada de tal maneira que ela primeiro produza AMP e pirofosfato (PP_i), que por sua vez é hidrolisado em uma etapa subsequente (**Figura 2-66**). Esse processo como um todo disponibiliza uma variação de energia livre de cerca de -26 kcal/mol. Uma reação biossintética importante que ocorre dessa maneira é a síntese de ácidos nucleicos (polinucleotídeos), ilustrada no lado direito da **Figura 2-67**.

É interessante observar que as reações de polimerização que produzem macromoléculas podem ser orientadas de duas maneiras, com a molécula crescendo pela polimerização dos monômeros na cabeça ou na cauda do polímero. Na *polimerização pela cabeça*, a ligação ativada necessária para a reação de condensação fica na extremidade final do polímero em crescimento e, então, deve ser regenerada a cada vez que uma nova unidade do monômero é adicionada. Nesse caso, cada monômero carrega a ligação reativa que será usada na adição do monômero seguinte. Ao contrário, na *polimerização pela cauda*, a ligação ativada é carregada por cada monômero, sendo usada imediatamente na adição deste mesmo monômero (**Figura 2-68**).

Nos próximos capítulos, será visto que os dois tipos de polimerização são usados. A síntese de polinucleotídeos e de alguns polissacarídeos simples ocorre por polimerização pela cauda, enquanto que a síntese das proteínas ocorre por um processo de polimerização pela cabeça.

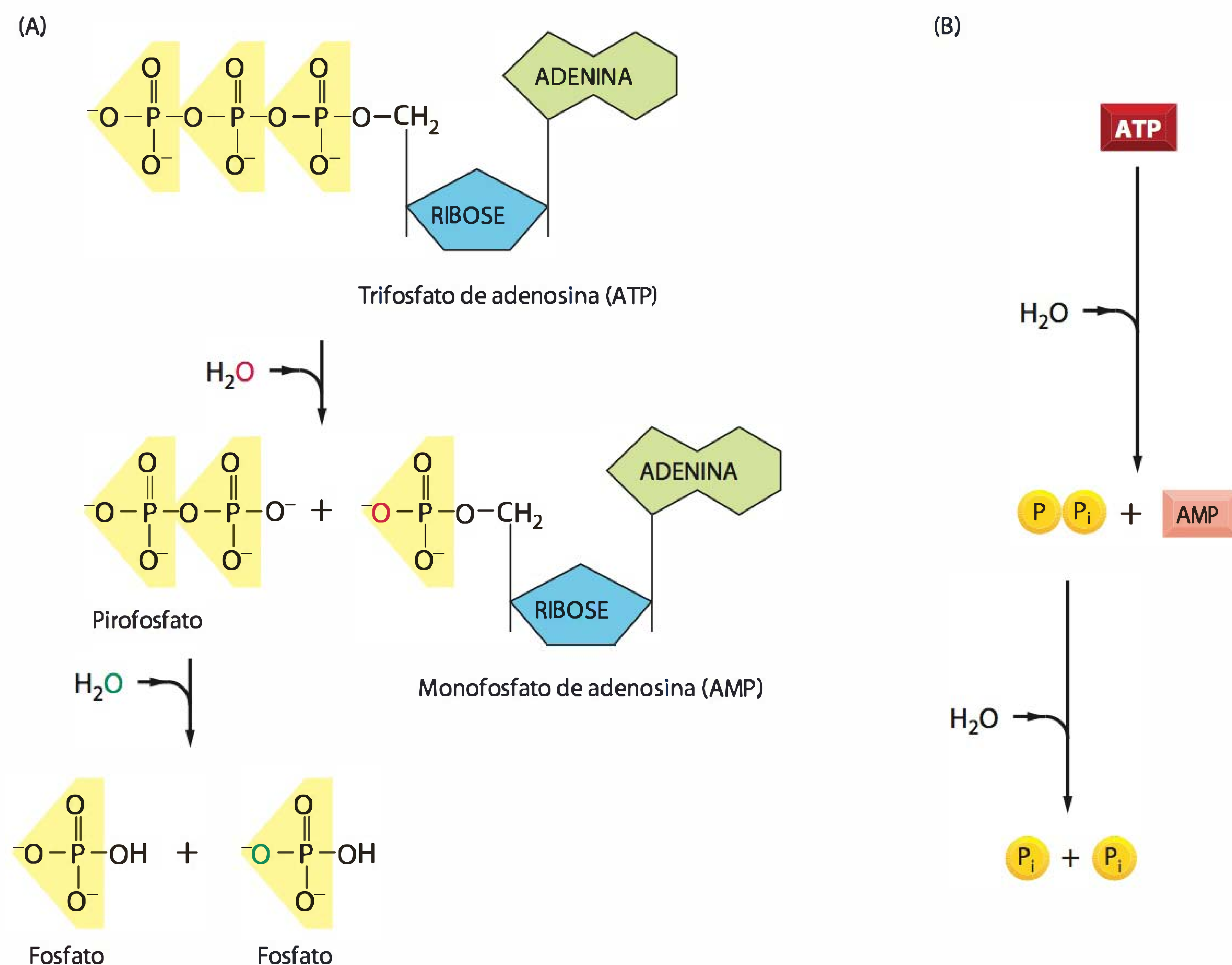


Figura 2-66 Rota alternativa para a hidrólise de ATP, na qual, inicialmente, há formação de pirofosfato que, depois, é hidrolisado. Essa rota libera cerca de duas vezes mais energia livre do que a reação mostrada anteriormente, na Figura 2-57, e forma AMP no lugar de ADP. (A) Nas duas reações de hidrólise sucessivas, os átomos de oxigênio das moléculas de água que participam da reação são retidos nos produtos, como mostrado, enquanto os átomos de hidrogênio dissociam-se formando íons de hidrogênio livres (H^+, não-mostrado). (B) Diagrama resumido da reação total.

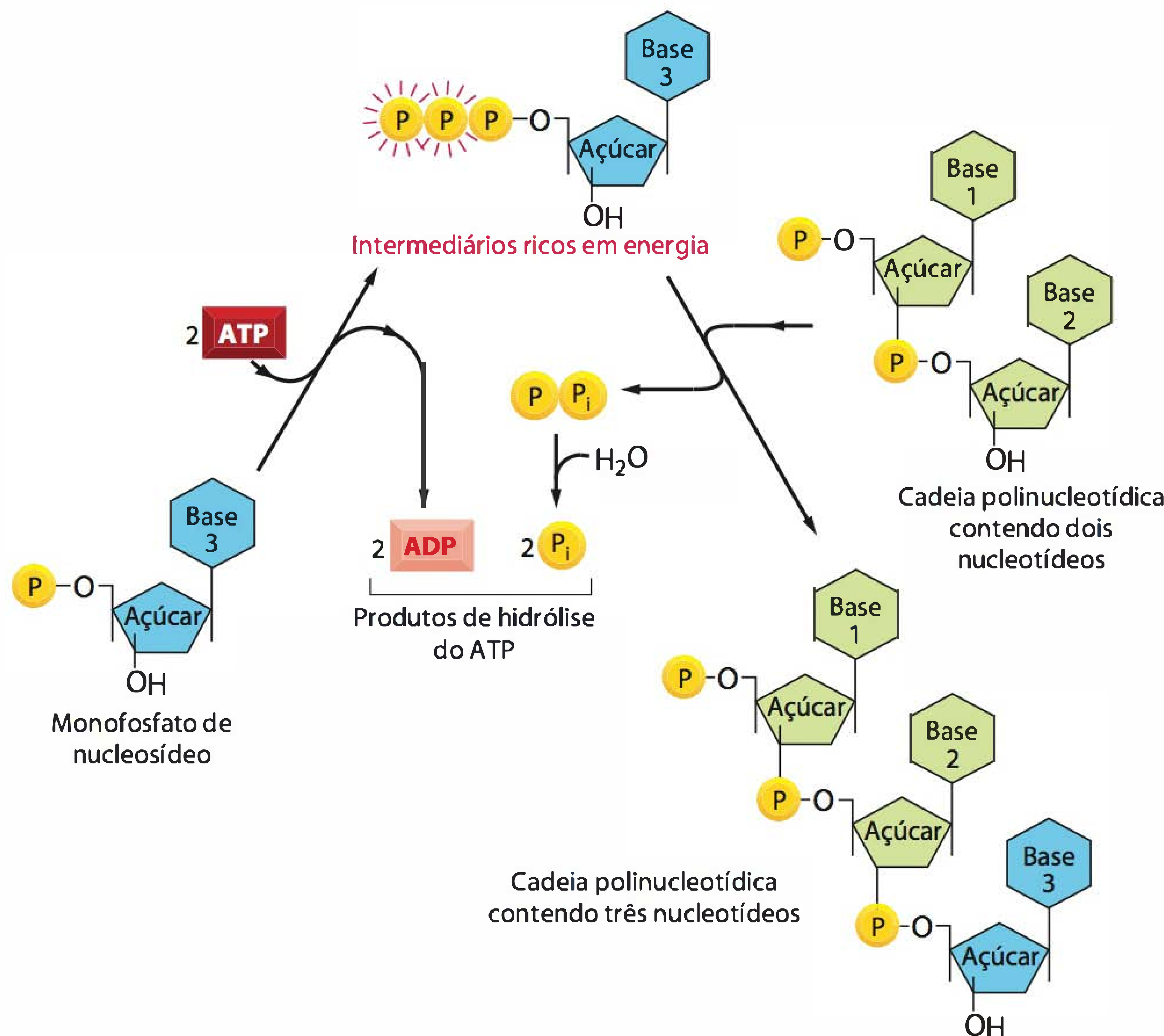
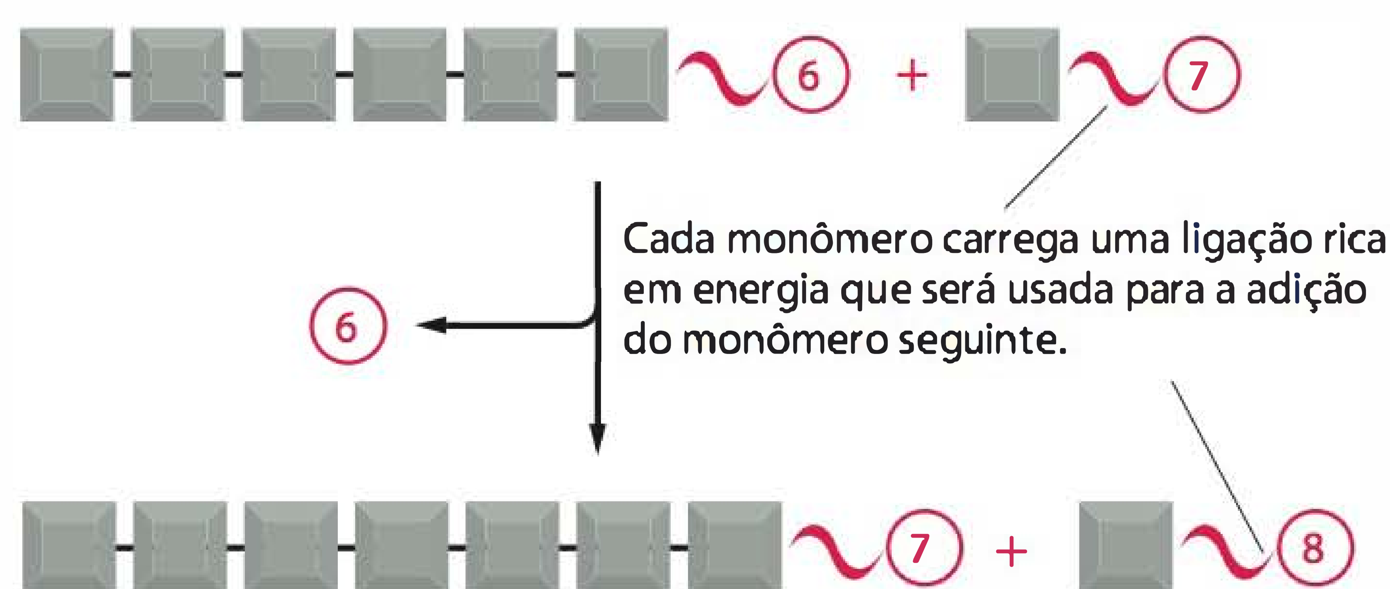


Figura 2-67 A síntese de um polinucleotídeo, RNA ou DNA, é um processo de muitas etapas impelido pela hidrólise de ATP. Na primeira etapa, um monofosfato de nucleosídeo é ativado pela transferência sequencial de dois grupos fosfato terminais de duas moléculas de ATP. O intermediário rico em energia que é formado, um trifosfato de nucleosídeo, permanece livre na solução até que reaja com a extremidade da cadeia de RNA ou de DNA que está crescendo, liberando, então, pirofosfato. A hidrólise desse último fosfato inorgânico é altamente favorável e contribui para fazer a reação como um todo seguir na direção da síntese do polinucleotídeo. Para mais detalhes, ver Capítulo 5.

Resumo

As células vivas são altamente ordenadas e necessitam criar ordem por si mesmas para que possam sobreviver e crescer. Isso é termodinamicamente possível devido a um contínuo fornecimento de energia, sendo que as células devem liberar parte dessa energia ao ambiente, na forma de calor. A energia vem, em última análise, da radiação eletromagnética do sol, que possibilita a formação de moléculas orgânicas pelos organismos fotossintéticos, como as plantas. Os animais obtêm energia alimentando-se dessas moléculas orgânicas e oxidando-as em uma série de reações catalisadas por enzimas e que estão acopladas à formação de ATP, a moeda corrente de energia de todas as células.

A contínua geração de ordem nas células é possível devido ao acoplamento da reação de hidrólise de ATP (energeticamente favorável) a reações energeticamente desfavoráveis. Na biossíntese de macromoléculas, isto é feito pela transferência de grupos fosfato para formar intermediários fosforilados reativos. Como as reações energeticamente desfavoráveis passam a energeticamente favoráveis, diz-se que a hidrólise do ATP impulsiona essas reações. As moléculas poliméricas, como as proteínas, os ácidos nucleicos e os polissacarídeos, são montadas a partir de pequenas moléculas precursoras ativadas por reações de condensação repetitivas que são impelidas por esse mecanismo. Outras moléculas reativas, chamadas de carreadores ativados, ou coenzimas, transferem outros grupos químicos durante as biossínteses. Por exemplo, o NADPH transfere hidrogênio na forma de um próton e mais dois elétrons (um íon hidreto), enquanto a acetil-CoA transfere um grupo acetila.



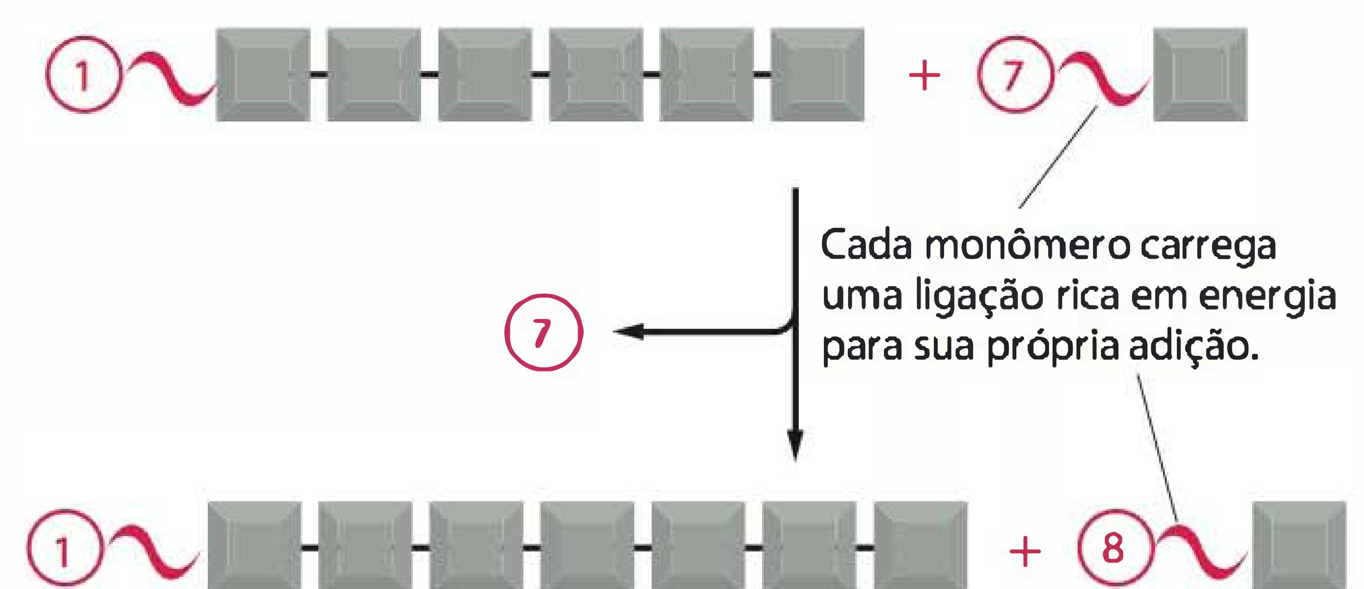


Figura 2-68 Orientação dos intermediários ativos nas reações de condensação sucessivas de polimerização que formam os polímeros biológicos. Comparação entre o crescimento de um polímero pela cabeça com a alternativa oposta, crescimento pela cauda. Como indicado, esses dois mecanismos são usados na produção de diversas moléculas biológicas.

COMO AS CÉLULAS OBTÊM ENERGIA DOS ALIMENTOS

O constante suprimento de energia que as células necessitam para gerar e manter a ordem biológica que as mantém vivas vem da energia das ligações químicas das moléculas dos alimentos, as quais, portanto, servem de combustíveis para as células.

As proteínas, os lipídeos e os polissacarídeos que constituem a maior parte dos alimentos que comemos devem ser degradados em moléculas pequenas antes que nossas células os utilizem, tanto como fonte de energia como fonte de blocos para formar outras moléculas. A digestão enzimática degrada as grandes moléculas poliméricas dos alimentos até suas subunidades monoméricas, as proteínas em aminoácidos, os polissacarídeos em açúcares e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. Após a digestão, as pequenas moléculas orgânicas derivadas dos alimentos entram no citosol das células, onde a sua oxidação gradual inicia.

Os açúcares são moléculas combustíveis especialmente importantes; são oxidados em várias etapas controladamente até dióxido de carbono (CO_2) e água (**Figura 2-69**). Nesta seção, serão examinadas as principais etapas na degradação, ou no catabolismo, dos açúcares e será mostrado como, nas células animais, eles produzem ATP, NADH e outras moléculas carreadoras ativadas. Uma via muito semelhante ocorre nas plantas, nos fungos e em muitas bactérias. Veremos que também a oxidação dos ácidos graxos é igualmente importante. Outras moléculas, como as proteínas, também servem de fonte de energia, quando canalizadas por vias enzimáticas apropriadas.

A glicólise é uma via central na produção de ATP

O principal processo de oxidação dos açúcares é a sequência de reações conhecida como **glicólise** (do grego *glukus*, “doce”, e *lusis*, “ruptura”). A glicólise produz ATP sem a participação de oxigênio molecular (gás O_2). Ela ocorre no citosol da maioria das células, incluindo as de muitos micro-organismos anaeróbios (aqueles que podem viver sem utilizar oxigênio molecular). A glicólise provavelmente apareceu cedo na história da vida, antes que os organismos fotossintéticos colocassem oxigênio na atmosfera. Durante a glicólise, uma molécula de glicose (possui seis átomos de carbono) é convertida em duas moléculas de *piruvato* (cada uma das quais contém três átomos de carbono). Para cada molécula de glicose, duas moléculas de ATP são hidrolisadas para fornecer energia para impulsionar as primeiras etapas, mas quatro moléculas de ATP são produzidas nas etapas finais. Ao final da glicólise, consequentemente, há um ganho líquido de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é degradada.

A via glicolítica está esboçada na **Figura 2-70** e mostrada em mais detalhes no Painel 2-8 (p. 120-121). A glicólise envolve uma sequência de 10 reações separadas, cada uma produzindo um açúcar intermediário diferente e cada uma catalisada por uma enzima diferen-

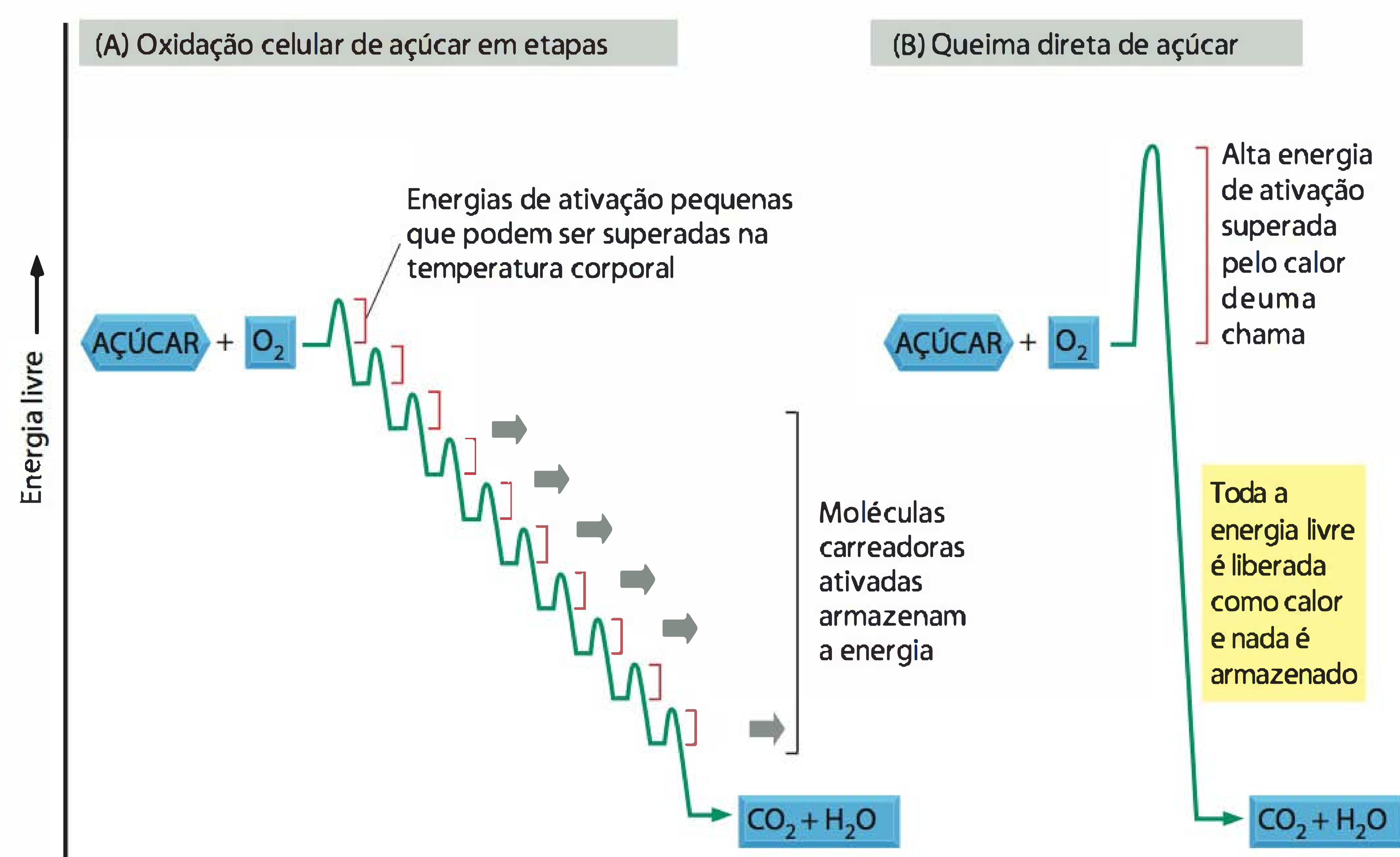


Figura 2-69 Representação esquemática da oxidação em etapas controladas dos açúcares nas células, comparada à queima normal. (A) Nas células, as enzimas catalisam oxidações por meio de uma série de pequenas etapas nas quais a energia livre é transferida para moléculas carreadoras, frequentemente ATP e NADH, em pacotes de tamanho conveniente. Em cada etapa, uma enzima controla a reação reduzindo a barreira de energia de ativação que deve ser suplantada para que a reação possa ocorrer. O total de energia livre liberado é exatamente o mesmo tanto em (A) quanto em (B). Caso o açúcar seja oxidado a CO_2 e H_2O em uma única etapa, como em (B), ele liberará uma quantidade de energia maior do que aquela que pode ser capturada para propósitos úteis.

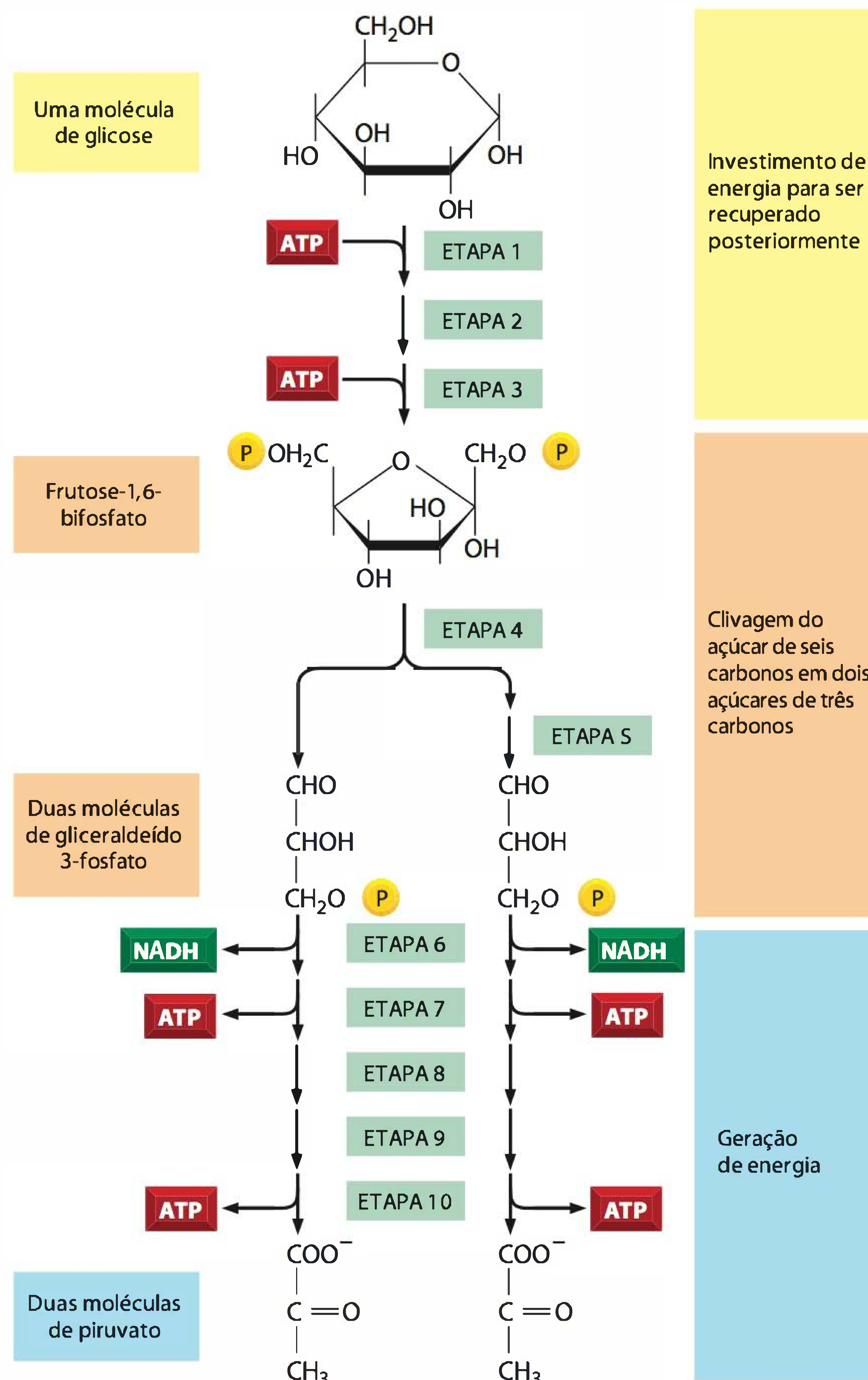


Figura 2-70 Esquema da glicólise. Cada uma das 10 etapas mostradas é catalisada por uma enzima diferente. Observe que a etapa 4 cliva um açúcar de seis carbonos em dois açúcares de três carbonos, de maneira que o número de moléculas em cada um dos estágios seguintes é duplicado. Como indicado, a etapa 6 inicia a etapa de geração de energia da glicólise. Já que duas moléculas de ATP são hidrolisadas no início, a fase de investimento de energia, a glicólise resulta na síntese líquida de 2 ATPS e 2 NADHS por molécula de glicose (ver também Painel 2-8).

te. Do mesmo modo que a maioria das enzimas, elas têm os nomes com a terminação *ase*, como isomer*ase* e desidrogen*ase*, para indicar o tipo de reação que catalisam.

Embora oxigênio molecular não seja usado na glicólise, ocorre oxidação: elétrons dos carbonos derivados da molécula de glicose são removidos por NAD^+ (produzindo NADH). A natureza em etapas do processo libera a energia da oxidação em pequenas quantidades, de maneira que boa parte dessa energia pode ser armazenada em moléculas de carreadores ativados em vez de ser liberada como calor (ver Figura 2-69). Assim, parte da energia liberada pela oxidação impulsiona diretamente a síntese de moléculas de ATP a partir de ADP e P_i e parte permanece com os elétrons no carreador de elétrons rico em energia NADH.

Durante a glicólise, são formadas duas moléculas de NADH para cada molécula de glicose. Nos organismos aeróbios (aqueles que necessitam de oxigênio molecular para viverem), essas moléculas de NADH doam seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons descrita no Capítulo 14, e o NAD^+ formado a partir do NADH é usado novamente para a glicólise (ver etapa 6 do Painel 2-8, p. 120-121).

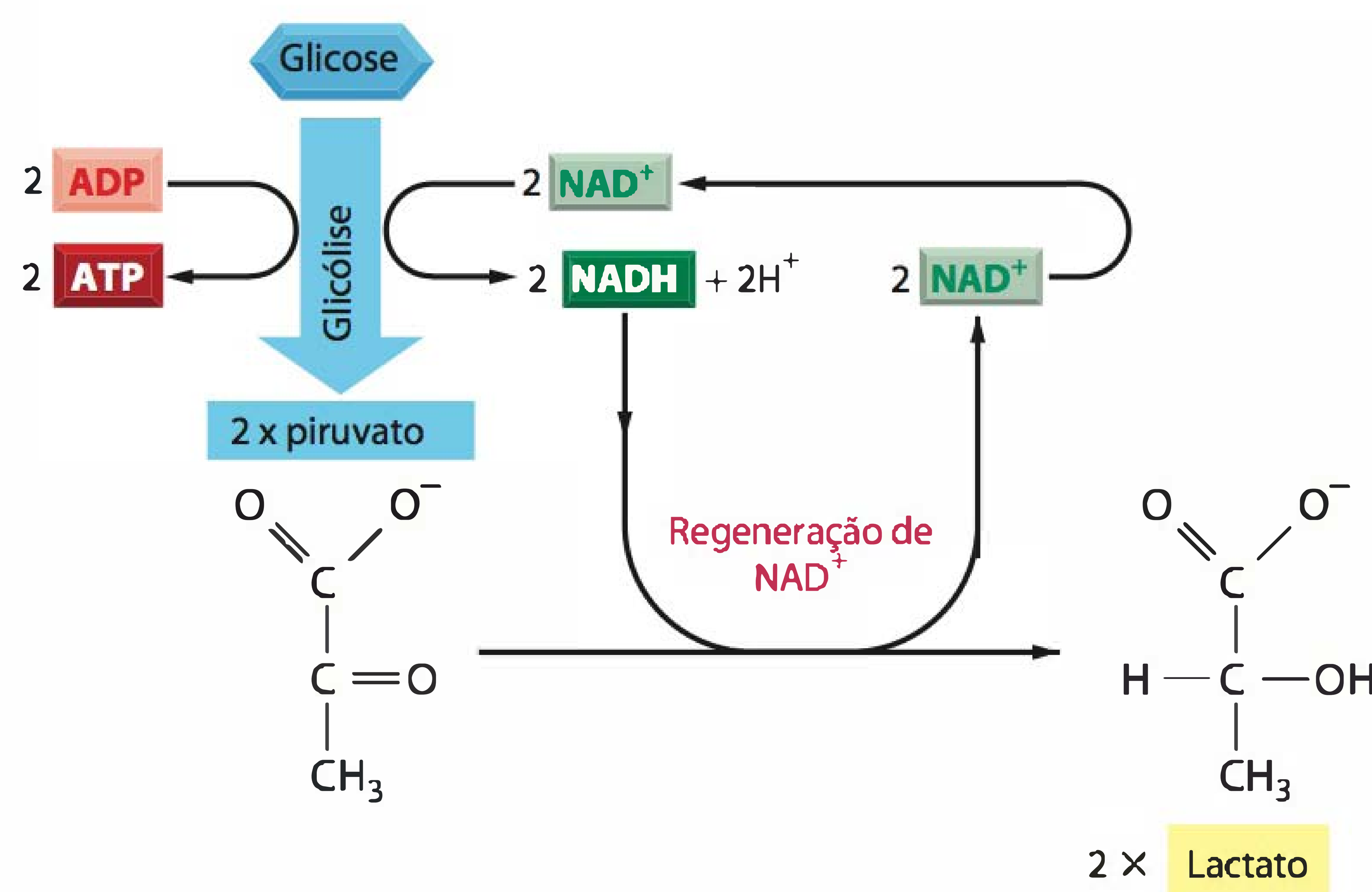
A fermentação produz ATP em ausência de oxigênio

Na maioria dos animais e das plantas, a glicólise é apenas o prelúdio da etapa final da degradação das moléculas dos alimentos. Nas células desses organismos, o piruvato que foi

formado pela glicólise é transportado rapidamente para dentro das mitocôndrias e é convertido em CO_2 e em acetil-CoA que, por sua vez, é completamente oxidada até CO_2 e H_2O.

Diferentemente, em muitos organismos anaeróbios, que não utilizam oxigênio molecular e podem crescer e se dividir na ausência de oxigênio, a glicólise é a principal fonte do ATP das células. Isso também ocorre em certos tecidos animais (como o músculo esquelético), que podem continuar funcionando, mesmo quando o oxigênio molecular é limitante. No caso dessas condições anaeróbias, o piruvato e o os elétrons do NADH permanecem no citosol. O piruvato é convertido em produtos que são excretados pelas células, como etanol e CO_2, no caso das leveduras usadas na fabricação de cerveja e de pão, ou lactato, no caso do músculo. Nesses processos, o NADH doa seus elétrons e é reconvertido em NAD^+. A regeneração do NAD^+ é necessária para a manutenção das reações da glicólise (**Figura 2-71**).

Vias de produção de energia anaeróbias como essas são denominadas **fermentações**. Os estudos sobre fermentações comercialmente importantes presentes em leveduras inspiraram muito dos primórdios da bioquímica. Trabalhos feitos no século XIX levaram ao reconhecimento, em 1896, de que esses processos podem ser estudados fora de um organismo vivo, ou seja, em extratos celulares. Essa descoberta revolucionária levou a que fosse possível dissecar e estudar externamente cada uma das reações do processo de fermentação. A elucidação completa de todas as peças da via glicolítica, que ocorreu na década de 1930, constituiu-se em um dos principais triunfos da bioquímica e foi seguida rapidamente pelo reconhecimento do papel central do ATP nos processos celulares. Portanto, a maior parte dos conceitos fundamentais discutidos neste capítulo já é conhecida há mais de 50 anos.



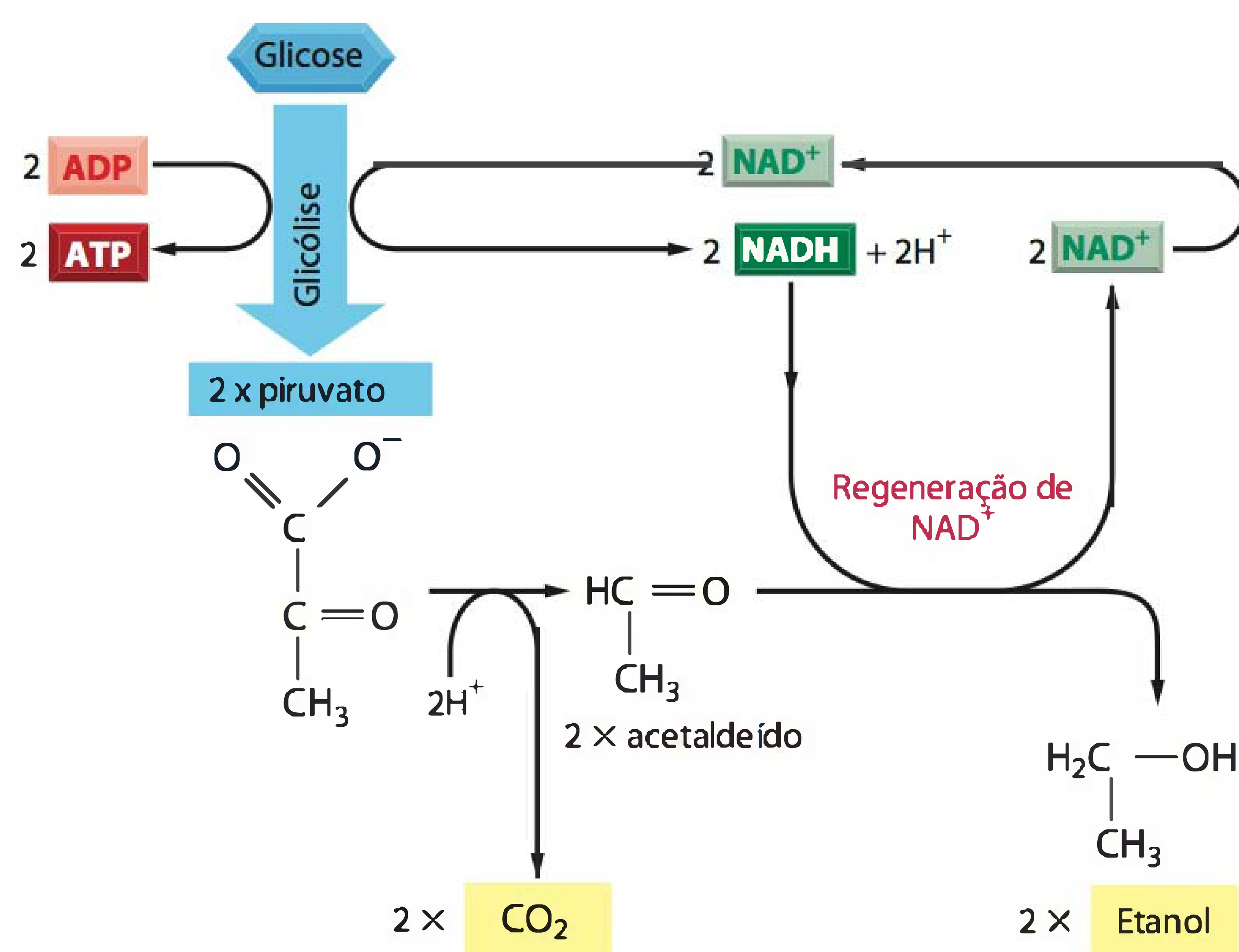


Figura 2-71 Duas vias para a degradação anaeróbia do piruvato. (A) Quando o suprimento de oxigênio é insuficiente, como em uma célula muscular em contração vigorosa, o piruvato produzido pela glicólise é convertido em lactato, como mostrado. Essa reação regenera o NAD^+ consumido na etapa 6 da glicólise, e a via total rende muito menos energia do que a oxidação completa. (B) Em alguns organismos, aqueles que podem crescer anaerobiamente, como as leveduras, o piruvato é convertido, via acetaldeído, em dióxido de carbono e em etanol. Novamente, essa via regenera o NAD^+, a partir de NADH, que é necessário para permitir que a glicólise continue. Tanto (A) quanto (B) são exemplos de *fermentação*.

A glicólise ilustra como as enzimas acoplam a oxidação ao armazenamento de energia

Retomando a analogia com a roda de pás que foi utilizada para explicar o conceito de reações acopladas (ver Figura 2-56), pode-se agora comparar as enzimas à roda de pás. As enzimas funcionam coletando a energia útil da oxidação de moléculas orgânicas por meio do acoplamento de uma reação energeticamente desfavorável a uma reação energeticamente favorável. Para demonstrar esse acoplamento, uma etapa da glicólise será examinada de modo a mostrar exatamente como essas reações acopladas ocorrem.

Duas reações centrais da glicólise (etapas 6 e 7) convertem o intermediário gliceraldeído-3-fosfato, um açúcar de três carbonos, em 3-fosfoglicerato (um ácido carboxílico; ver Painel2-8, p.120-121). Isso corresponde à oxidação de um grupo aldeído a um grupo ácido carboxílico, o que ocorre em duas etapas. A reação total libera energia livre suficiente para converter uma molécula de ADP em ATP e para transferir dois elétrons do aldeído para o NAD^+, formando NADH, restando ainda energia suficiente para liberar calor para o meio, de modo a tornar a reação total energeticamente favorável (o $\Delta G°$ para a reação total é -3 kcal/mol).

A **Figura 2-72** apresenta um esboço da maneira pela qual essa impressionante façanha de coleta de energia é feita. As reações químicas indicadas são precisamente conduzidas por duas enzimas às quais os açúcares intermediários estão ligados firmemente.

A via pela qual esse feito impressionante é atingido está esboçada na Figura 2-72. Essas reações químicas são guiadas por duas enzimas, às quais os açúcares intermediários ficam firmemente ligados. De fato, é mostrado em detalhes na Figura 2-72, a primeira enzima (gliceraldeído-3-fosfato – desidrogenase) forma uma ligação covalente de vida curta com o aldeído por meio do grupo –SH reativo da enzima, catalisando a oxidação desse aldeído pelo NAD^+, ainda quando ligado à enzima. A ligação enzima-substrato é então deslocada por um íon fosfato inorgânico para formar o açúcar fosfato intermediário rico em energia que, então, é liberado da enzima. Esse intermediário liga-se a uma segunda enzima (fosfoglicerato-cinase). Essa enzima catalisa a transferência altamente favorável do fosfato rico em energia formado justamente para ADP, formando ATP e completando, assim, o processo de oxidação de aldeído a ácido carboxílico.

Essa oxidação específica foi vista em detalhes porque é um exemplo claro de armazenamento de energia mediado por enzimas por meio do acoplamento de reações (**Figura 2-73**). As reações das etapas 6 e 7 são as únicas na glicólise que criam uma ligação fosfato rica em energia diretamente a partir de fosfato inorgânico. Desse modo, elas são responsáveis pelo rendimento líquido de duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH por molécula de glicose (ver Painel 2-8, p.120-121).

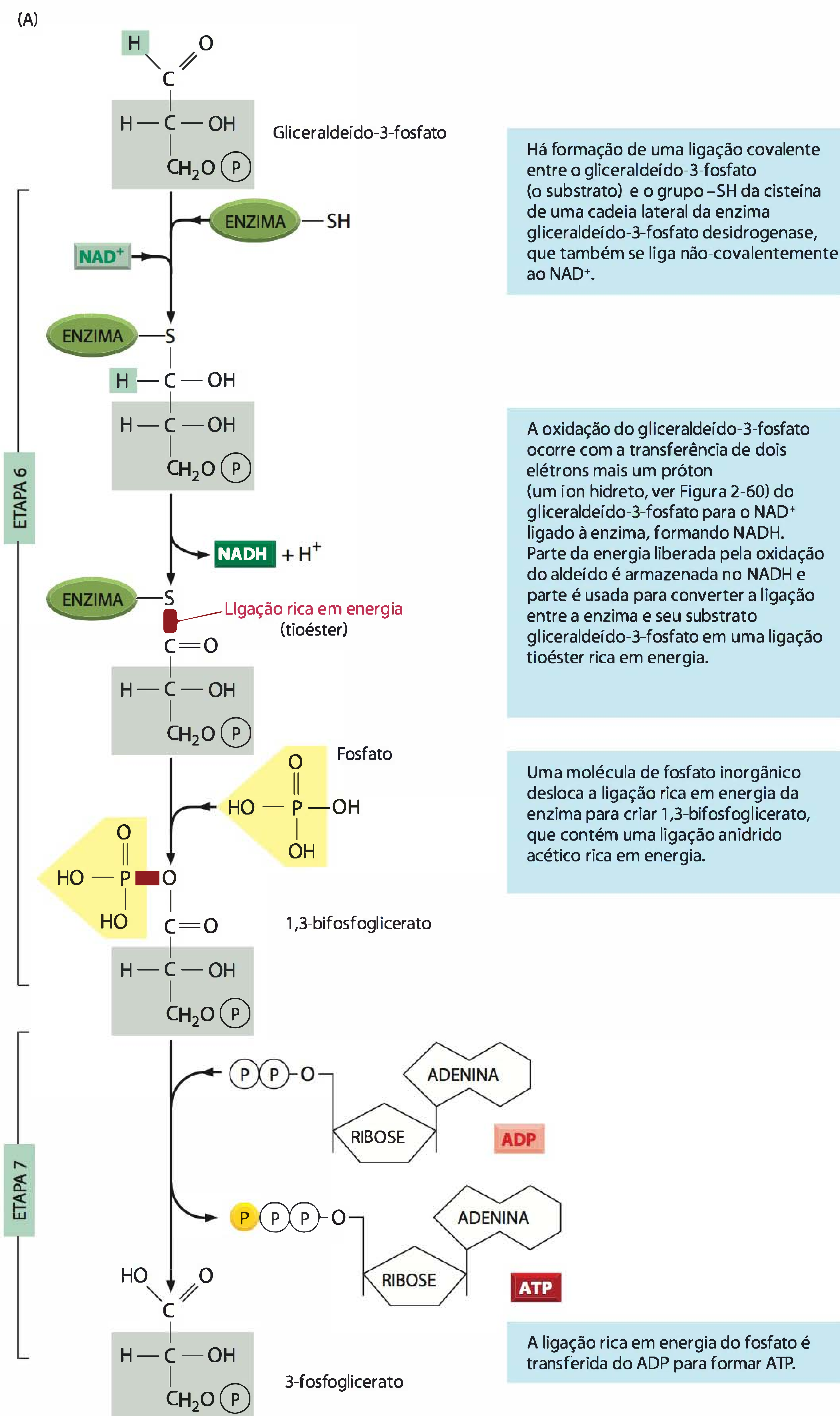
Como foi visto recentemente, o ATP pode ser formado rapidamente a partir de ADP, quando ocorrerem reações intermediárias com ligações fosfato com energia mais alta do que a presente na ligação fosfato do ATP. As ligações de fosfato podem ser ordenadas, segundo o nível de energia, comparando-se a variação de energia livre-padrão ($\Delta G°$) para sua quebra de cada ligação por hidrólise. A **Figura 2-74** compara as ligações anidrido fosfórico ricas em energia do ATP com outras ligações fosfato, muitas delas geradas durante a glicólise.

Os organismos armazenam as moléculas de alimento em compartimentos especiais

Todos os organismos necessitam manter uma relação ATP/ADP alta para manter a ordem biológica em suas células. No entanto, o acesso dos animais aos alimentos é periódico, e as plantas devem sobreviver à noite, quando ficam impossibilitadas de produzir açúcares pela fotossíntese. Por isso, tanto os animais quanto as plantas convertem açúcares e gorduras em formas que são armazenadas para uso posterior (**Figura 2-75**).

Para compensar períodos longos de jejum, os animais armazenam ácidos graxos na forma de gotículas de gordura (insolúveis em água) compostas por triacilgliceróis, principalmente em células gordurosas especializadas denominadas adipócitos. No caso de armazenamento de curto prazo, os açúcares são armazenados como subunidades de glicose no **glicogênio**, um polissacarídeo grande e ramificado, presente na forma de grânulos no citoplasma de muitas células, inclusive no fígado e no músculo. A síntese e a degradação do glicogênio são prontamente reguladas, segundo a necessidade. Quando as células necessitam de uma quantidade de ATP maior do que aquela que pode ser gerada a partir das moléculas de alimento captadas da corrente sanguínea, essas células degradam glicogênio por meio de uma reação que produz glicose-1-fosfato, que é rapidamente convertida em glicose-6-fosfato para a glicólise.

Figura 2-72 Energia armazenada nas etapas 6 e 7 da glicólise. Nessas etapas, a oxidação de um aldeído a ácido carboxílico é acoplada à formação de ATP e de NADH. (A) A etapa 6 começa com a formação de uma ligação covalente entre o substrato (gliceraldeído-3-fosfato) e um grupo –SH exposto na superfície da enzima (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). A enzima, então, catalisa a transferência do hidrogênio (na forma de íon hidreto – um próton mais dois elétrons) do gliceraldeído-3-fosfato a ela ligado para uma molécula de NAD^+. Parte da energia liberada nessa oxidação é usada para formar uma molécula de NADH e parte é usada para converter a ligação original entre a enzima e seu substrato em uma ligação tioéster rica em energia (mostrada em *vermelho*). Uma molécula de fosfato inorgânico desloca essa ligação rica em energia da enzima e cria em seu lugar uma ligação açúcar-fosfato rica em energia (*vermelho*). Nesse ponto, a enzima não apenas armazenou energia em NADH, mas também acoplou a reação favorável da oxidação de um aldeído com a formação energeticamente desfavorável de uma ligação fosfato rica em energia. A segunda reação é possibilitada pela primeira, assim como o acoplamento da roda de pás da Figura 2-56. Na reação da etapa 7, o intermediário açúcar-fosfato rico em energia recém-formado, 1,3-bifosfoglicerato, liga-se a uma segunda enzima, fosfoglicerato-cinase. O fosfato reativo é transferido para o ADP, formando uma molécula de ATP e deixando um grupo ácido carboxílico livre no açúcar oxidado. (B) Resumo de toda a mudança química produzida pelas reações 6 e 7.

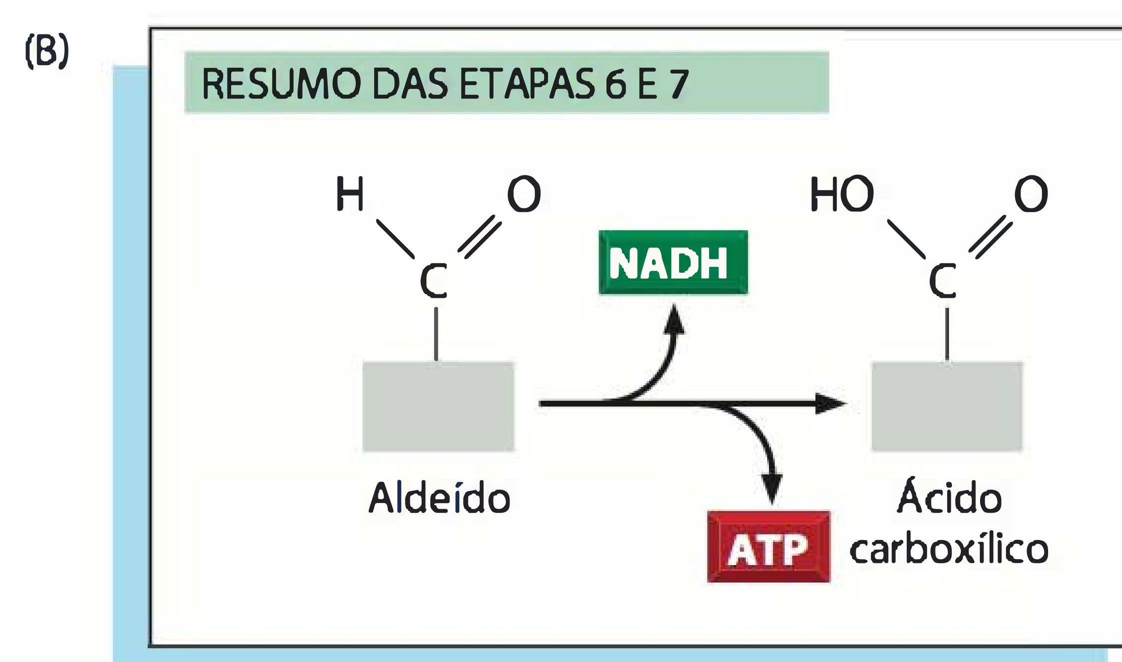


Há formação de uma ligação covalente entre o gliceraldeído-3-fosfato (o substrato) e o grupo –SH da cisteína de uma cadeia lateral da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que também se liga não-covalentemente ao NAD^+.

A oxidação do gliceraldeído-3-fosfato ocorre com a transferência de dois elétrons mais um próton (um íon hidreto, ver Figura 2-60) do gliceraldeído-3-fosfato para o NAD^+ ligado à enzima, formando NADH. Parte da energia liberada pela oxidação do aldeído é armazenada no NADH e parte é usada para converter a ligação entre a enzima e seu substrato gliceraldeído-3-fosfato em uma ligação tioéster rica em energia.

Uma molécula de fosfato inorgânico desloca a ligação rica em energia da enzima para criar 1,3-bifosfoglicerato, que contém uma ligação anidrido acético rica em energia.

A ligação rica em energia do fosfato é transferida do ADP para formar ATP.



A maior parte da energia da oxidação foi armazenada nos carreadores ativados ATP e NADH.

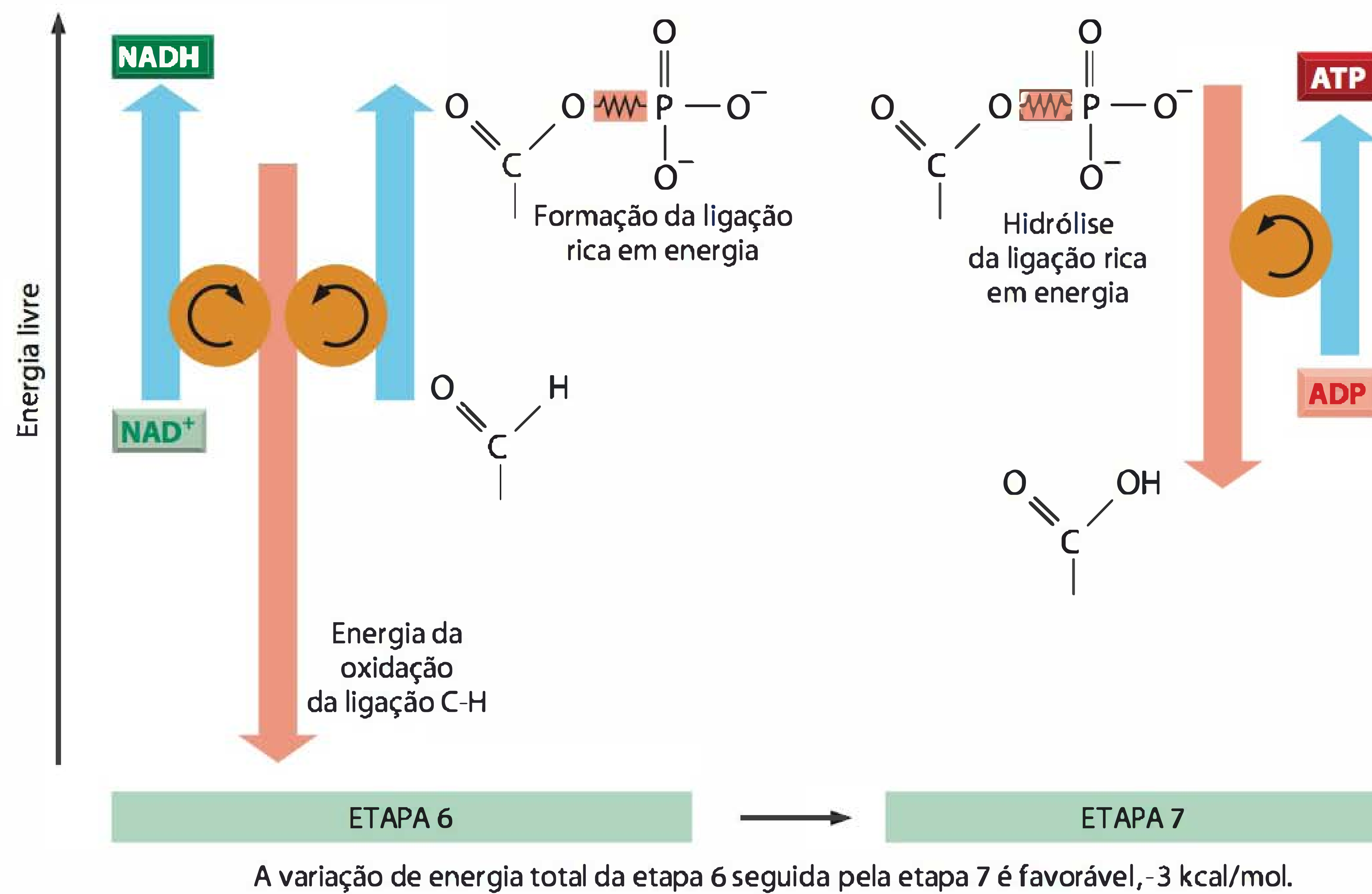


Figura 2-73 Visão esquemática das reações acopladas que formam NADH e ATP nas etapas 6 e 7 da glicólise. A oxidação da ligação C–H impulsiona a formação tanto de NADH como de ligações fosfato ricas em energia. A quebra da ligação rica em energia permite a formação de ATP.

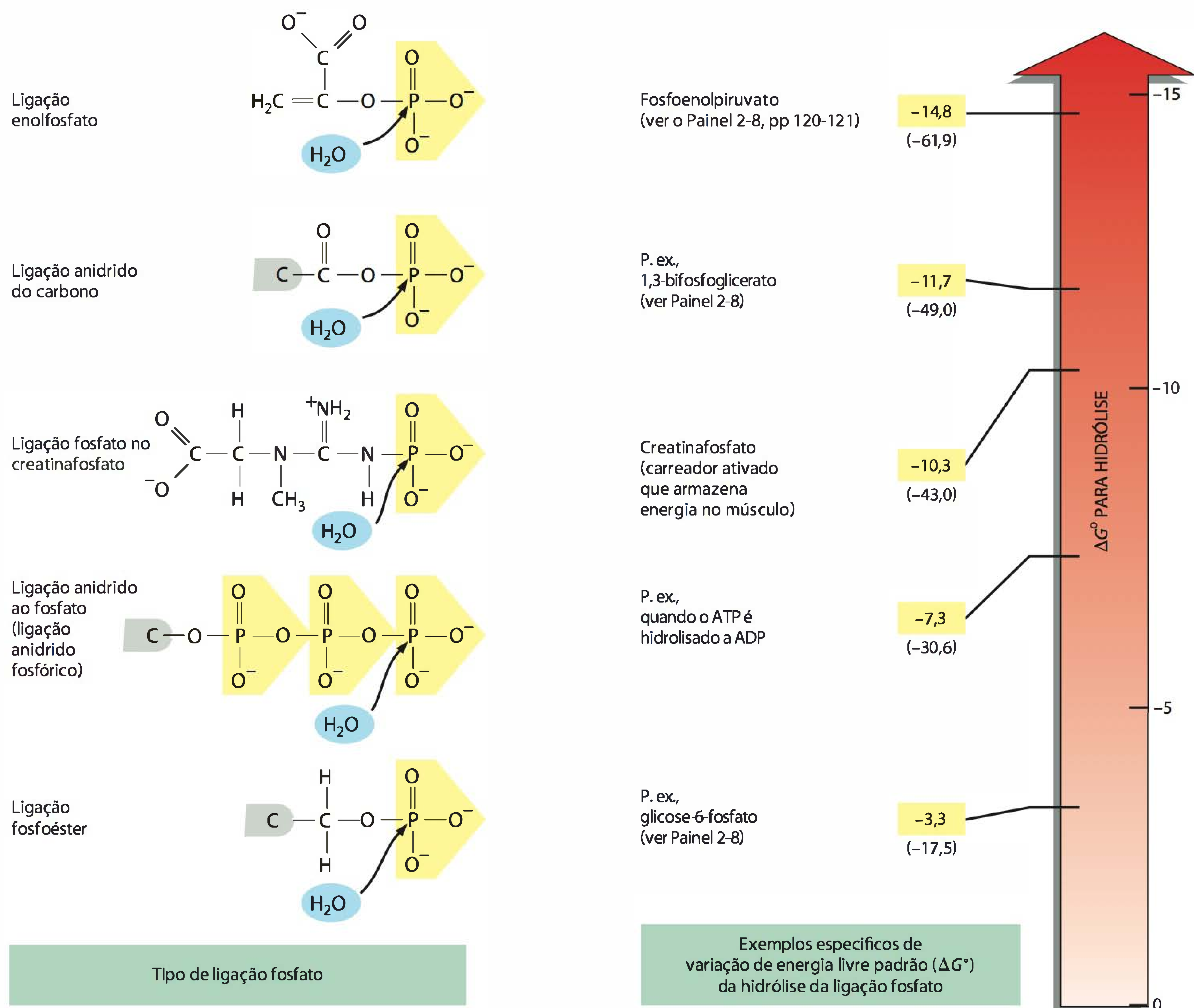


Figura 2-74 Ligações fosfato têm energias diferentes. Exemplos de diferentes tipos de ligação fosfato com os seus sítios de hidrólise estão mostrados nas moléculas desenhadas no lado esquerdo. Aquelas começando com um átomo de carbono em *cinza* mostram apenas parte da molécula. Exemplos de moléculas contendo essas ligações estão mostrados no lado direito, com a variação de energia livre para a hidrólise em quilocalorias (quilojoule entre parênteses). A transferência de um grupo fosfato de uma molécula para outra é energeticamente favorável se a variação de energia livre ($\Delta G°$) para a hidrólise da ligação fosfato na primeira molécula for mais negativa do que a hidrólise da ligação de fosfato na segunda molécula. Assim, por exemplo, um grupo fosfato é prontamente transferido de 1,3-bifosfoglicerato a ADP, formando ATP. Observe que a reação de hidrólise pode ser vista como a transferência de um grupo fosfato para a água.

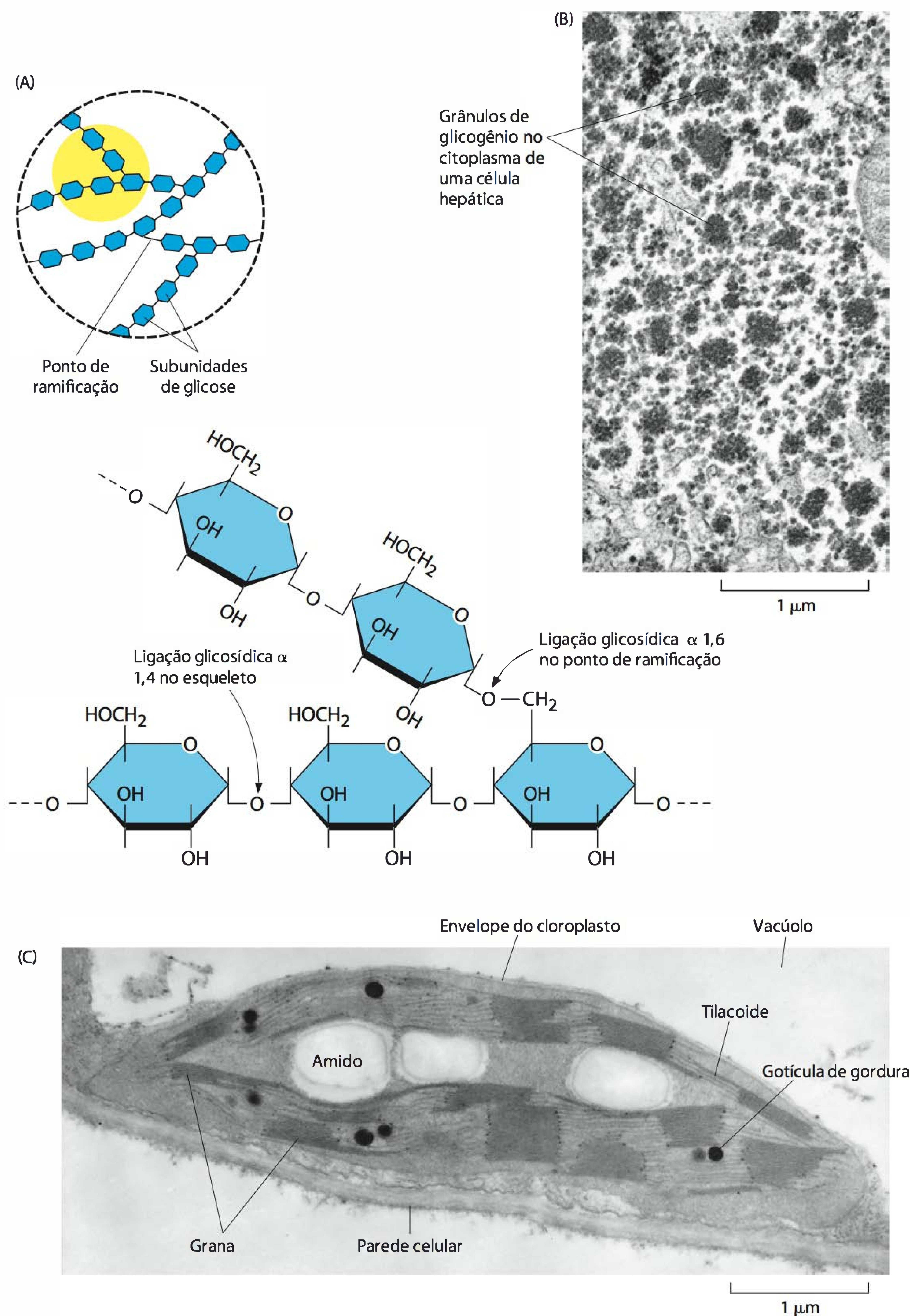


Figura 2-75 Armazenamento de açúcares e de gorduras em células animais e vegetais. (A) Estruturas do amido e do glicogênio, formas de armazenamento de açúcar nas plantas e nos animais, respectivamente. Os dois são polímeros de reserva do açúcar glicose e diferem somente na frequência dos pontos de ramificação (a região em *amarelo* está ampliada mais abaixo). Há muito mais ramificações no glicogênio do que no amido. (B) Micrografia eletrônica mostrando grânulos de glicogênio no citoplasma de uma célula hepática. (C) Seção fina de um único cloroplasto de uma célula vegetal mostrando os grânulos de amido e lipídeos (gotículas de gordura) que se acumularam como resultado da biossíntese que ali ocorre. (D) Início do acúmulo de gotículas de gordura (coradas em *vermelho*) em células de gordura animais em desenvolvimento. (B, cortesia de Robert Fletterick e Daniel S. Friend; C, cortesia de K. Plaskitt; D, cortesia de Ronald M. Evans e Peter Totonoz.)

Do ponto de vista quantitativo, a **gordura** é de longe uma forma de armazenamento mais importante para os animais do que o glicogênio, provavelmente porque proporciona uma armazenagem mais eficiente. A oxidação de um grama de gordura libera cerca de duas vezes mais energia que a oxidação de um grama de glicogênio. Ademais, o glicogênio diferencia-se das gorduras por incorporar uma grande quantidade de água. Isso leva a uma diferença de massa de maneira que, para armazenar a mesma quantidade de energia, a massa do glicogênio deve ser seis vezes maior do que a massa de gordura. Em média, um homem adulto armazena glicogênio suficiente para apenas cerca de um dia de atividades normais, mas armazena uma quantidade de gordura que poderia durar quase um mês. Caso nossa reserva energética, que está na forma de gordura, estivesse na forma de glicogênio, o peso corporal deveria aumentar em cerca de 30 kg.

Embora as plantas produzam NADPH e ATP pela fotossíntese, esse importante processo ocorre em uma organela especializada, denominada cloroplasto, isolada do resto da célula vegetal por uma membrana impermeável a ambos os tipos de moléculas carreadoras ati-

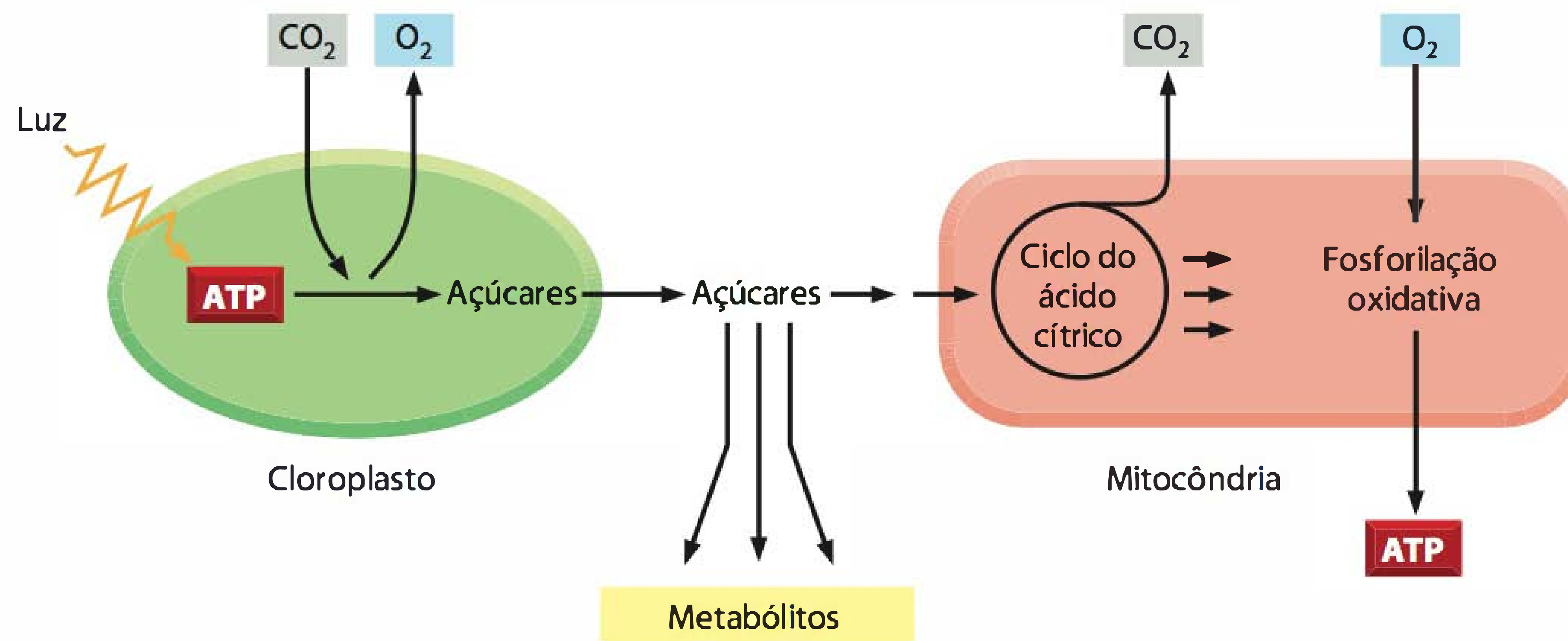


Figura 2-76 Como o ATP necessário para a maior parte do metabolismo das células vegetais é feito. Nas plantas, os cloroplastos e as mitocôndrias colaboram para suprir as células com metabólitos e ATP. (Para detalhes, ver Capítulo 14.)

vadas. Ademais, as plantas contêm muitas outras células, como as das raízes, onde não há cloroplastos e consequentemente não podem produzir seus próprios açúcares. Portanto, para a maior parte da produção de ATP, a planta depende da exportação de açúcares dos cloroplastos para as mitocôndrias, presentes em todas as plantas vegetais. A maior parte do ATP de que a planta necessita é sintetizada nas mitocôndrias e exportada para o resto da célula vegetal, utilizando exatamente as mesmas vias para a degradação oxidativa dos açúcares que os organismos não-fotossintéticos (**Figura 2-76**).

Durante o dia, nos períodos de excesso de capacidade fotossintética, os cloroplastos convertem parte dos açúcares que produzem em gordura e em **amido**, um polímero de glicose análogo ao glicogênio dos animais. Nas plantas, as gorduras são triacilgliceróis, assim como a gordura dos animais, diferindo apenas nos tipos de ácidos graxos que predominam. Tanto a gordura como o amido são armazenados nos cloroplastos como reserva para serem mobilizados como fonte energética durante os períodos de escuridão (ver Figura 2-75C).

Os embriões presentes nas sementes dos vegetais devem viver apenas das fontes de energia armazenadas por um período prolongado, isto é, até que germinem e produzam folhas que possam coletar a energia solar. Por essa razão, as sementes das plantas geralmente contêm grandes quantidades de gordura e de amido, o que as torna uma fonte importante de alimento para os animais, incluindo o homem (**Figura 2-77**).

A maioria das células animais obtém dos ácidos graxos a energia para os períodos entre as refeições

Após as refeições, a maior parte da energia de que os animais necessitam vem dos açúcares provenientes dos alimentos. O excesso de açúcares, se houver, é usado para repor as reservas de glicogênio que foram consumidas ou para sintetizar gordura como reserva alimentar. Entretanto, assim que a gordura é armazenada no tecido adiposo, ela é convocada, pois, logo pela manhã, após uma noite de jejum, a oxidação dos ácidos graxos gera a maior parte do ATP necessário.

Baixos níveis sanguíneos de glicose levam à degradação de ácidos graxos para a produção de energia. Como ilustrado na **Figura 2-78**, os triacilgliceróis armazenados nas gotículas de gordura nos adipócitos são hidrolisados produzindo ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são liberados e transferidos para as células do organismo por meio da corrente sanguínea. Embora os animais convertam facilmente açúcares em gorduras, eles não são capazes de converter gordura em açúcares, e então os ácidos graxos são oxidados diretamente.



Figura 2-77 Algumas sementes de plantas servem como alimentos importantes para o homem. Milho, nozes e ervilhas possuem reservas ricas de amido e gordura que suprem o embrião na semente com energia e blocos constitutivos para a biossíntese. (Cortesia de John Innes Foundation.)

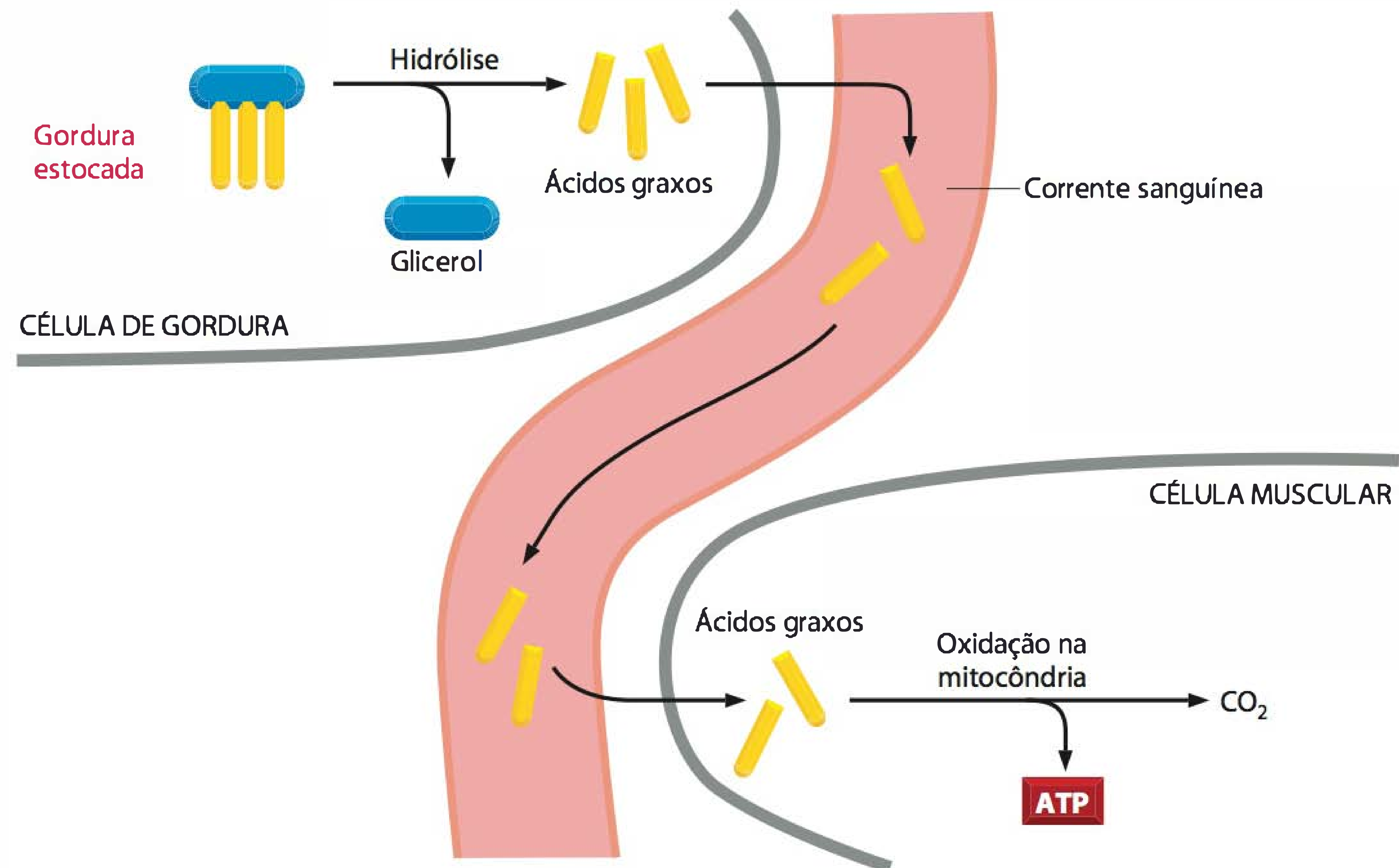


Figura 2-78 Como as gorduras estocadas são mobilizadas para a produção de energia nos animais. Níveis baixos de glicose no sangue desencadeiam a hidrólise de moléculas de triacilglicerol das gotas de gordura para ácidos graxos livres e glicerol, como ilustrado. Esses ácidos graxos entram na corrente sanguínea, onde se ligam à proteína abundante do sangue denominada albumina sérica. Transportadores especiais de ácidos graxos na membrana plasmática das células que oxidam os ácidos graxos, como células musculares, passam então esses ácidos graxos para o citosol, a partir do qual são movidos para as mitocôndrias para a produção de energia (ver Figura 2-80).

Tanto os açúcares quanto as gorduras são degradados a acetil-CoA nas mitocôndrias

No metabolismo aeróbio, o piruvato que é produzido no citosol pela glicólise a partir dos açucares é transportado para a *mitocôndria* das células eucarióticas onde é rapidamente descarboxilado por um gigantesco complexo de três enzimas denominado *complexo da piruvato--desidrogenase*. Os produtos da descarboxilação do piruvato são uma molécula de CO_2 (um produto de refugo), uma molécula de NADH e uma molécula de acetil-CoA (**Figura 2-79**).

Os ácidos graxos importados da corrente sanguínea são levados para as mitocôndrias onde ocorre toda a oxidação (**Figura 2-80**). Cada molécula de ácido graxo (na forma da molécula ativada *acilgraxo-CoA*) é degradada completamente por um ciclo de reações que corta dois carbonos de cada vez, a partir da carbonila terminal, gerando uma molécula de acetil-CoA em cada volta do ciclo. Uma molécula de NADH e uma molécula de $FADH_2$ (*flavin adenine dinucleotide* – flavina adenina dinucleotídeo) (forma reduzida) também são geradas nesse processo (**Figura 2-81**).

Os açúcares e as gorduras constituem as principais fontes de energia para a maioria dos organismos que não fazem fotossíntese, incluindo o ser humano. Entretanto, a maior parte

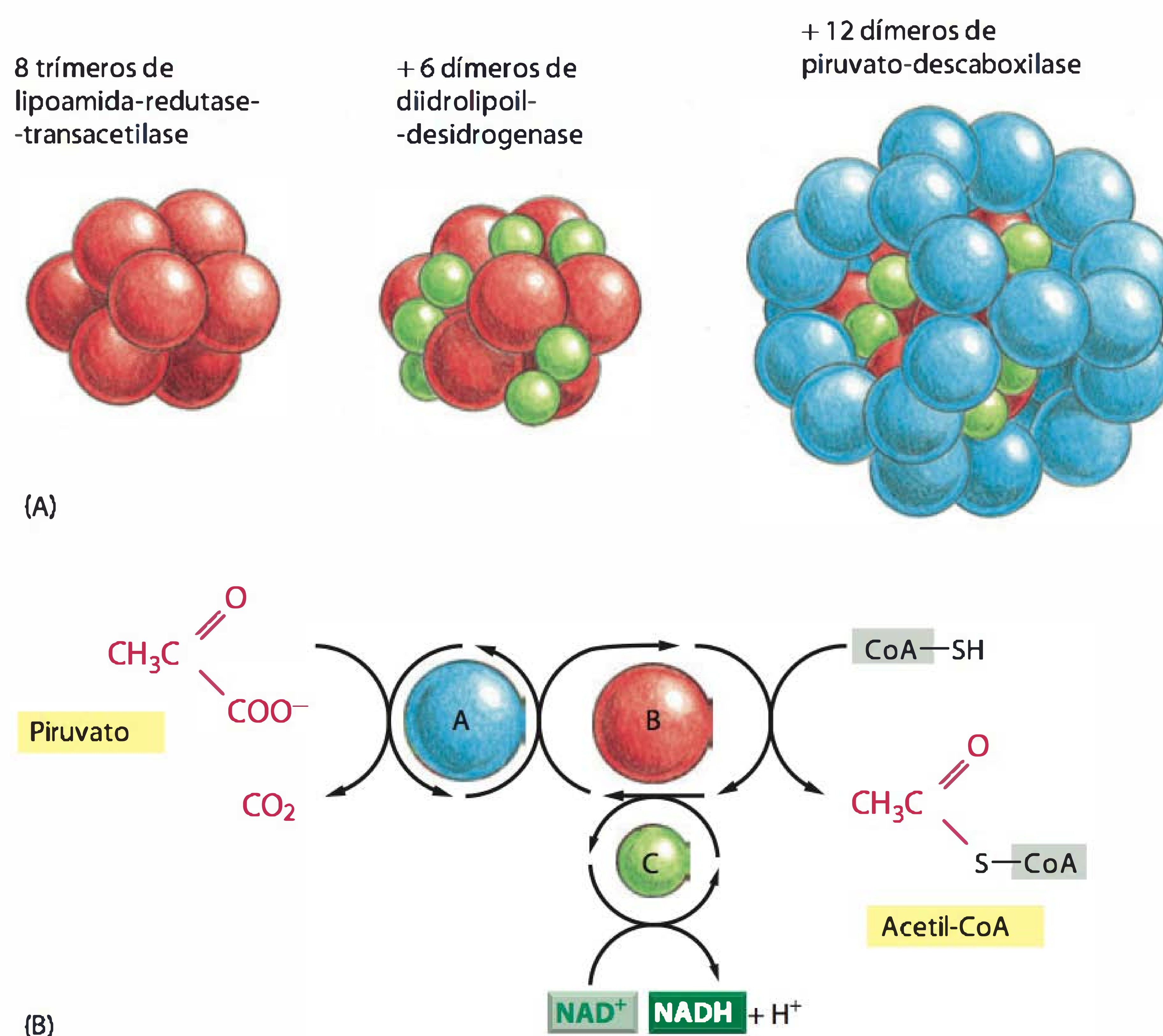


Figura 2-79 Oxidação do piruvato a acetil-CoA e CO_2. (A) A estrutura do complexo da piruvato-desidrogenase contém 60 cadeias polipeptídicas. Ela é um exemplo de um complexo multienzimático grande em que os intermediários das reações passam diretamente de uma enzima à outra. Nas células eucarióticas, esse complexo localiza-se nas mitocôndrias. (B) Reações processadas pelo complexo da desidrogenase pirúvica. O complexo converte piruvato em acetil-CoA na matriz das mitocôndrias; nessa reação também há produção de NADH. A, B e C são as três enzimas do complexo, *piruvato-descarboxilase*, *lipoamida-redutase-transacetilase* e *diidrolipoil- desidrogenase*, respectivamente. Essas enzimas estão ilustradas em (A), e suas atividades estão conectadas como mostrado.

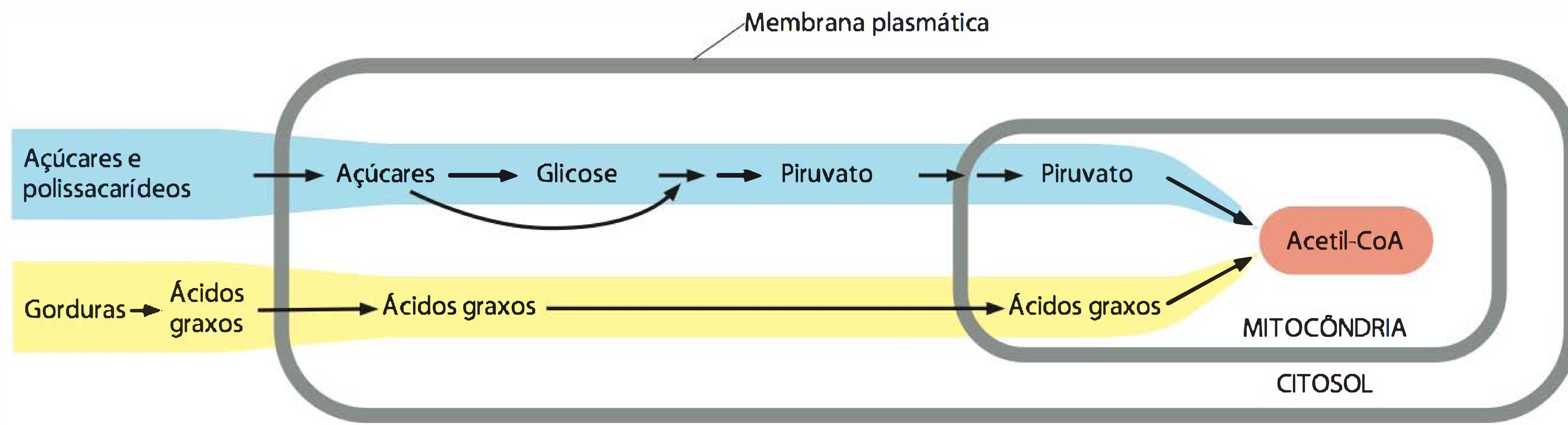


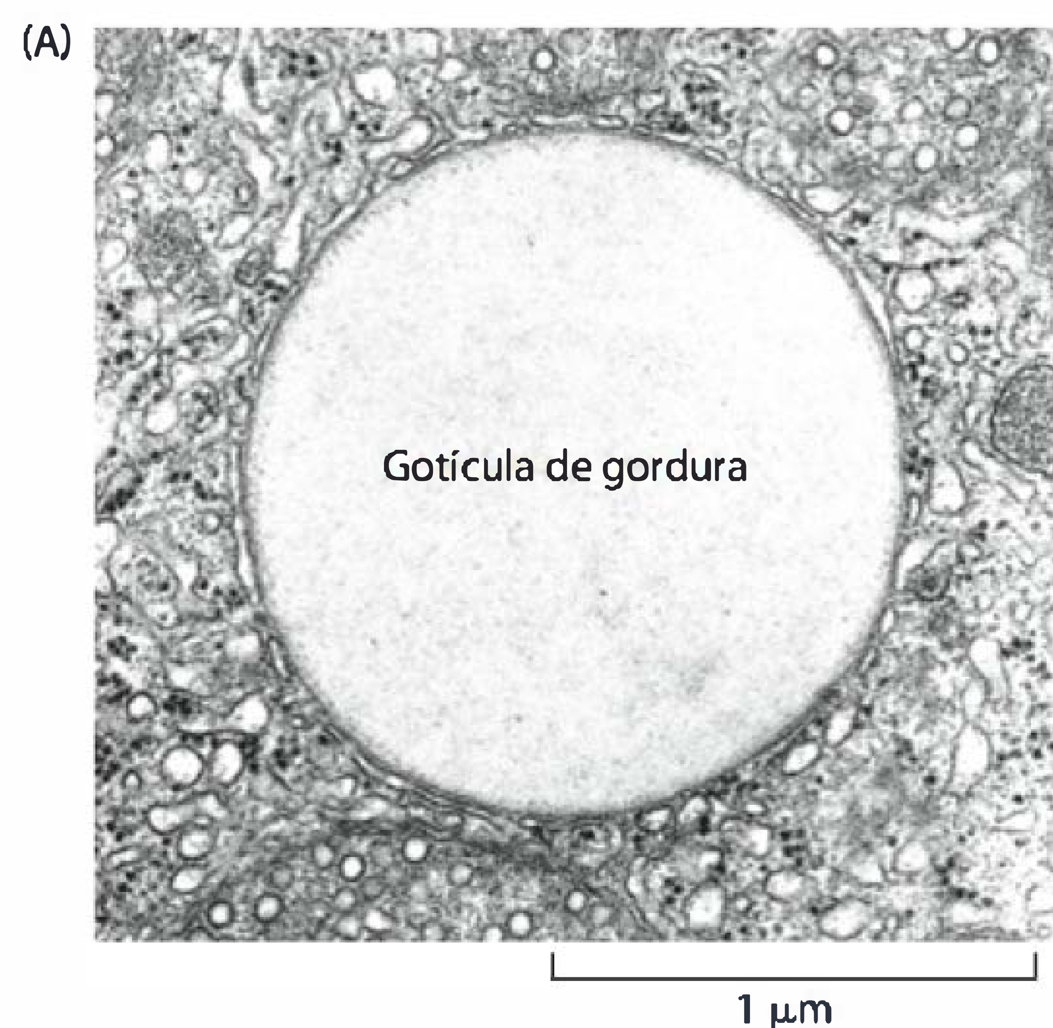
Figura 2-80 Vias de produção de acetil-CoA a partir de açúcares e gorduras. Nas células eucarióticas, a mitocôndria é o local onde a acetil-CoA é produzida a partir de ambos os tipos principais de moléculas alimentares. Portanto, é o local onde a maior parte das reações de oxidação celulares ocorre e onde a maior parte do ATP é feita. A estrutura e o papel da mitocôndria estão discutidos detalhadamente no Capítulo 14.

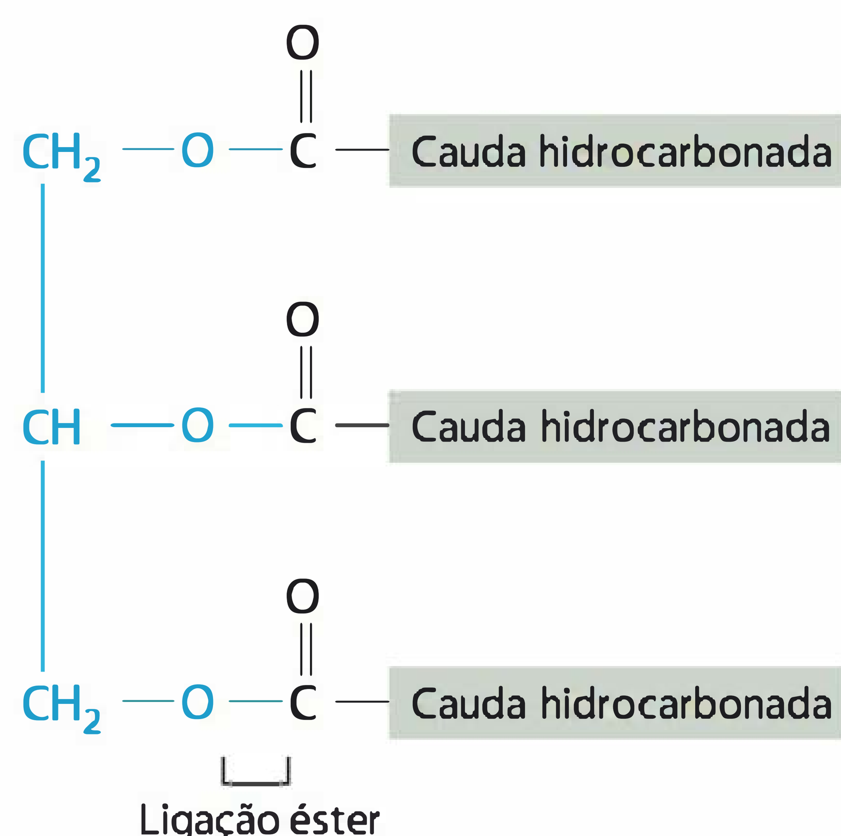
da energia útil que pode ser extraída da oxidação de ambos os tipos de alimento permanece armazenada nas moléculas de acetil-CoA que são produzidas pelos dois tipos de reações recém-descritas. O ciclo de reações do ácido cítrico, em que o grupo acetila da acetil-CoA é oxidado até CO_2 e H_2O, é, portanto, central para o metabolismo energético dos organismos aeróbios. Nos eucariotos, todas essas reações ocorrem nas mitocôndrias. Não se deve ficar surpreso em descobrir que a mitocôndria é o local onde a maior parte do ATP é produzida nas células animais. Diferentemente, as bactérias aeróbias realizam suas reações em um único compartimento, o citosol, o local onde ocorre o ciclo do ácido cítrico dessas células.

O ciclo do ácido cítrico gera NADH pela oxidação de grupos acetila a CO_2

No século XIX, os biólogos observaram que, na ausência de ar (condições de anaerobiose), as células produzem ácido láctico (p. ex., no músculo) ou etanol (p. ex., em leveduras), enquanto que, na presença de ar (condições de aerobiose), elas consomem O_2 e produzem CO_2 e H_2O. Os esforços feitos para definir as vias do metabolismo aeróbio, focados na oxidação

(A)





(B)

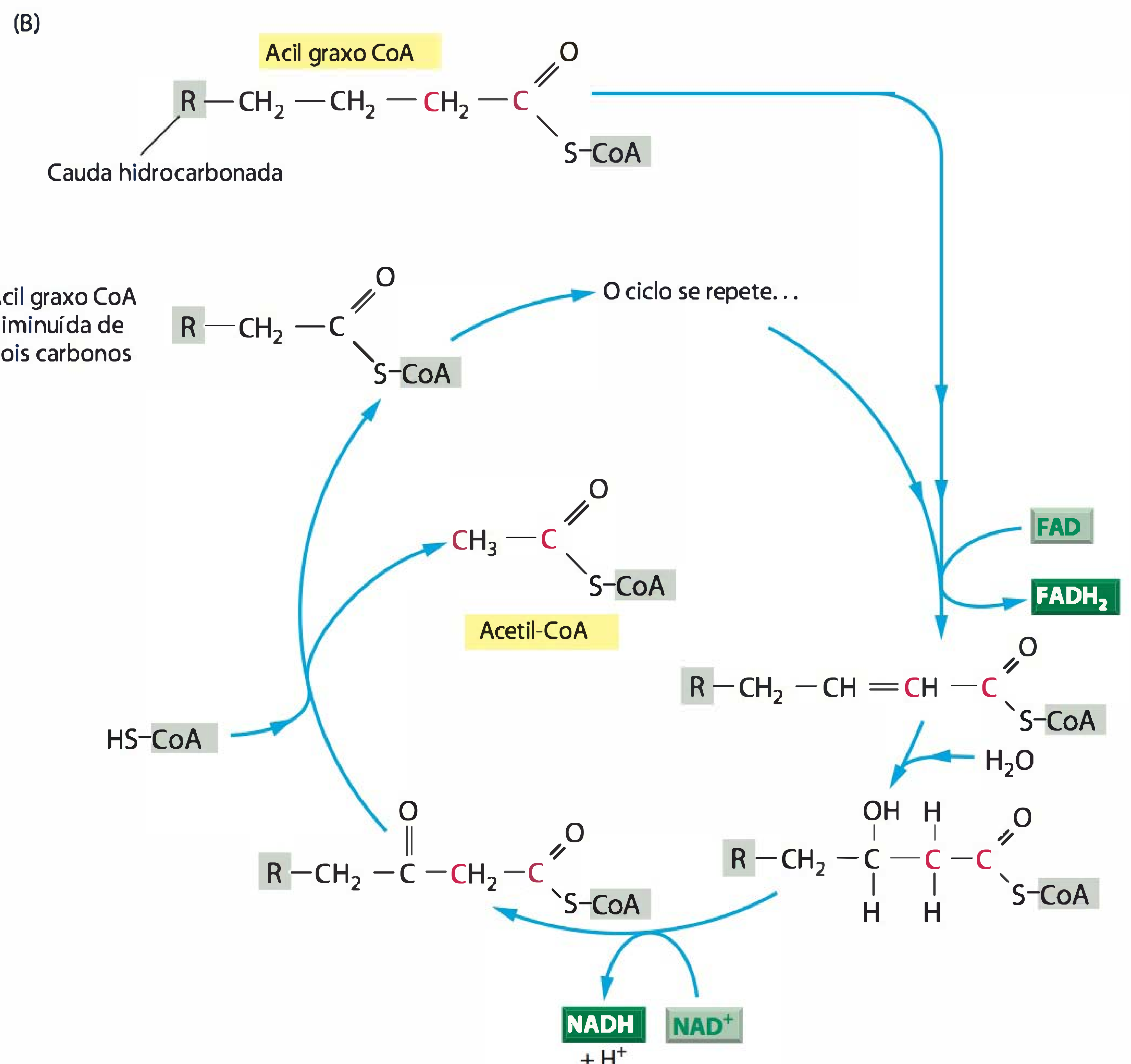


Figura 2-81 Oxidação dos ácidos graxos à acetil-CoA. (A) Micrografia eletrônica de uma gotícula de gordura no citoplasma (*acima*) e estrutura das gorduras (*abaixo*). As gorduras são triacilgliceróis. A porção do glicerol, ao qual são ligados três ácidos graxos por ligações éster, está mostrada em *azul*. As gorduras são insolúveis em água e formam grandes gotículas no interior das células de gordura especializadas (denominadas adipócitos) que as armazenam. (B) Ciclo de oxidação dos ácidos graxos. O ciclo é catalisado por uma série de quatro enzimas e ocorre na mitocôndria. Cada volta do ciclo encurta a cadeia de ácido graxo em dois carbonos (mostrados em *vermelho*), gerando uma molécula de acetil-CoA, uma molécula de NADH e uma molécula de $FADH_2$. A estrutura do $FADH_2$ está mostrada na Figura 2-83B. (A, cortesia de Daniel S. Friend.)

do piruvato, levaram à descoberta, em 1937, do **ciclo do ácido cítrico**, também conhecido como *ciclo dos ácidos tricarboxílicos* ou, ainda, *ciclo de Krebs*. O ciclo do ácido cítrico é responsável por cerca de dois terços do total da oxidação de carbonos que ocorre na maioria das células. Os principais produtos dessa via são CO_2 e elétrons ricos em energia na forma de NADH. O CO_2 é liberado como um produto de descarte, enquanto os elétrons ricos em energia do NADH passam por uma cadeia transportadora de elétrons ligada à membrana (discutido no Capítulo 14) e finalmente combinam-se com O_2, produzindo H_2O. Embora o ciclo do ácido cítrico, em si, não utilize O_2, ele necessita de O_2 para prosseguir, pois não existe nenhuma outra maneira eficiente de o NADH livrar-se de elétrons e, assim, regenerar o NAD^+ necessário para manter o ciclo funcionando.

O ciclo do ácido cítrico, que nas células eucarióticas ocorre dentro das mitocôndrias, leva à oxidação completa dos átomos de carbono dos grupos acetila da acetil-CoA, convertendo-os a CO_2. Entretanto, o grupo acetila não é oxidado diretamente. Em vez disso, ele é transferido da acetil-CoA para uma molécula maior (de quatro carbonos), o *oxaloacetato*, formando o ácido tricarboxílico de seis carbonos, o *ácido cítrico*, que dá origem ao nome de ciclo de reações. A molécula de ácido cítrico é então oxidada gradualmente, possibilitando que a energia dessa oxidação seja atrelada à produção de moléculas carreadoras ricas em energia ativadas. A sequência de oito reações forma um ciclo porque, ao final, há regeneração do oxaloacetato que, então, entra novamente no ciclo, conforme esquematizado na **Figura 2-82**.

Até agora, foi considerado apenas um dos três tipos de moléculas carreadoras ativadas que são produzidas pelo ciclo do ácido cítrico: o par NAD^+- NADH (ver Figura 2-60). Além de três moléculas de NADH, cada volta do ciclo também produz uma molécula de **$FADH_2$**, a partir de FAD, e uma molécula do ribonucleotídeo **GTP** (*guanosine triphosphate*, trifosfato de guanosina) a partir do GDP (*guanosine disphosphate*, difosfato de adenosina). A estrutura dessas duas moléculas carreadoras está ilustrada na **Figura 2-83**. O GTP é um parente muito próximo do ATP, sendo que a transferência do seu grupo fosfato terminal para o ADP produz uma molécula de ATP em cada ciclo. Assim como o NADH, o $FADH_2$ é um carreador de elétrons ricos em energia e de hidrogênio. Resumidamente, pode-se considerar que a energia armazenada nos elétrons ricos em energia altamente transferíveis do NADH e do $FADH_2$ são a seguir utilizados para a produção de ATP pelo processo de *fosforização oxidativa*, a única etapa do catabolismo oxidativo dos nutrientes que necessita diretamente do oxigênio gasoso (O_2) da atmosfera.

O Painel 2-9 (p. 122-123) apresenta o ciclo do ácido cítrico completo. Os átomos de oxigênio extras necessários para produzir CO_2 a partir dos grupos acetila que entram no ciclo do ácido cítrico não são supridos pelo oxigênio molecular, mas pela água. Como ilustrado no

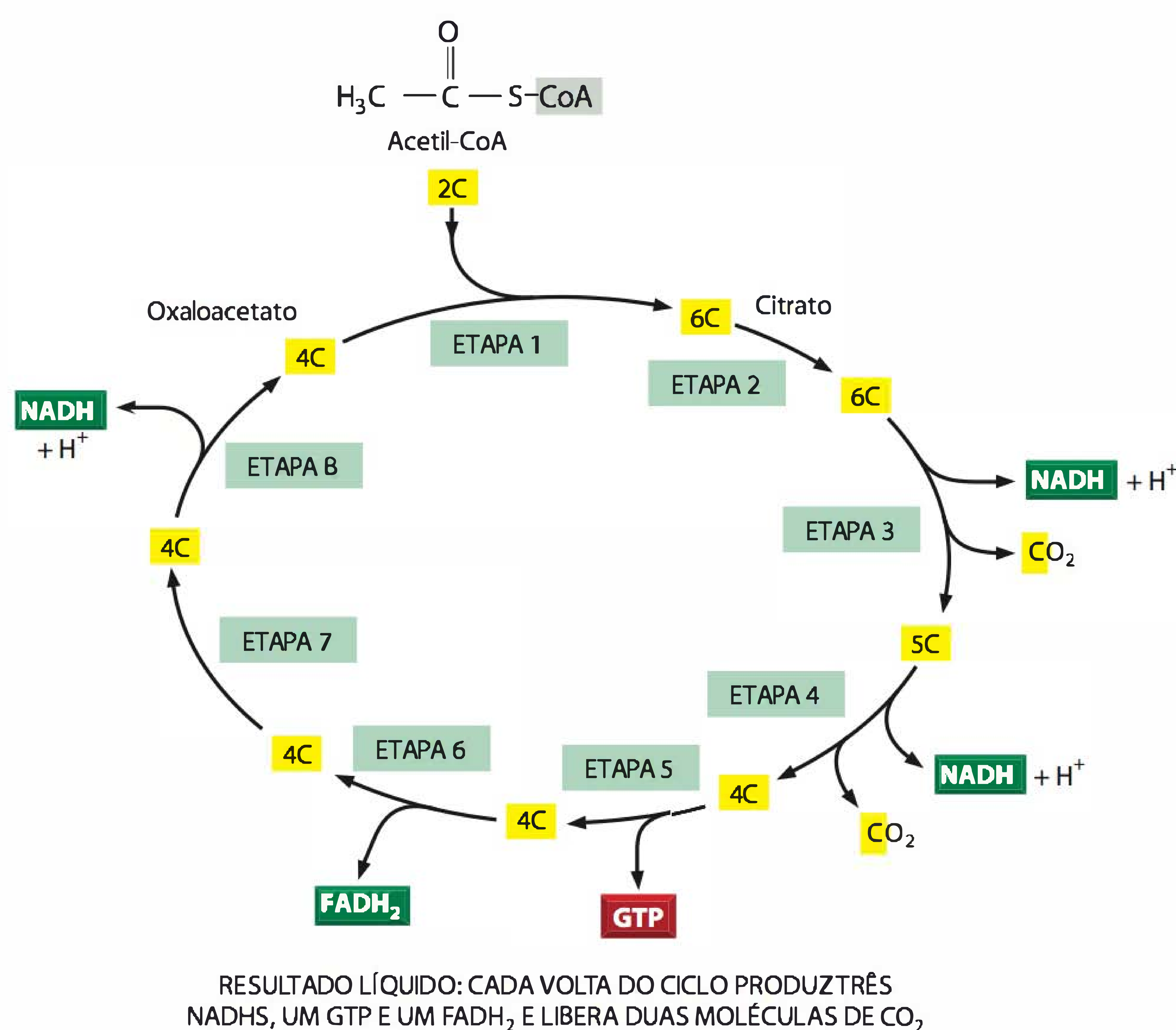


Figura 2-82 Visão geral do ciclo do ácido cítrico. A reação da acetil-CoA com o oxaloacetato inicia o ciclo, produzindo citrato (ácido cítrico). Em cada volta do ciclo, duas moléculas de CO_2 são produzidas como produtos de dejeto e, ainda, três moléculas de NADH, uma molécula de GTP e uma molécula de $FADH_2$. O número de átomos de carbono de cada intermediário é mostrado nos *quadros amarelos*. Ver Painel 2-9 (p.122- 123) para maiores detalhes.

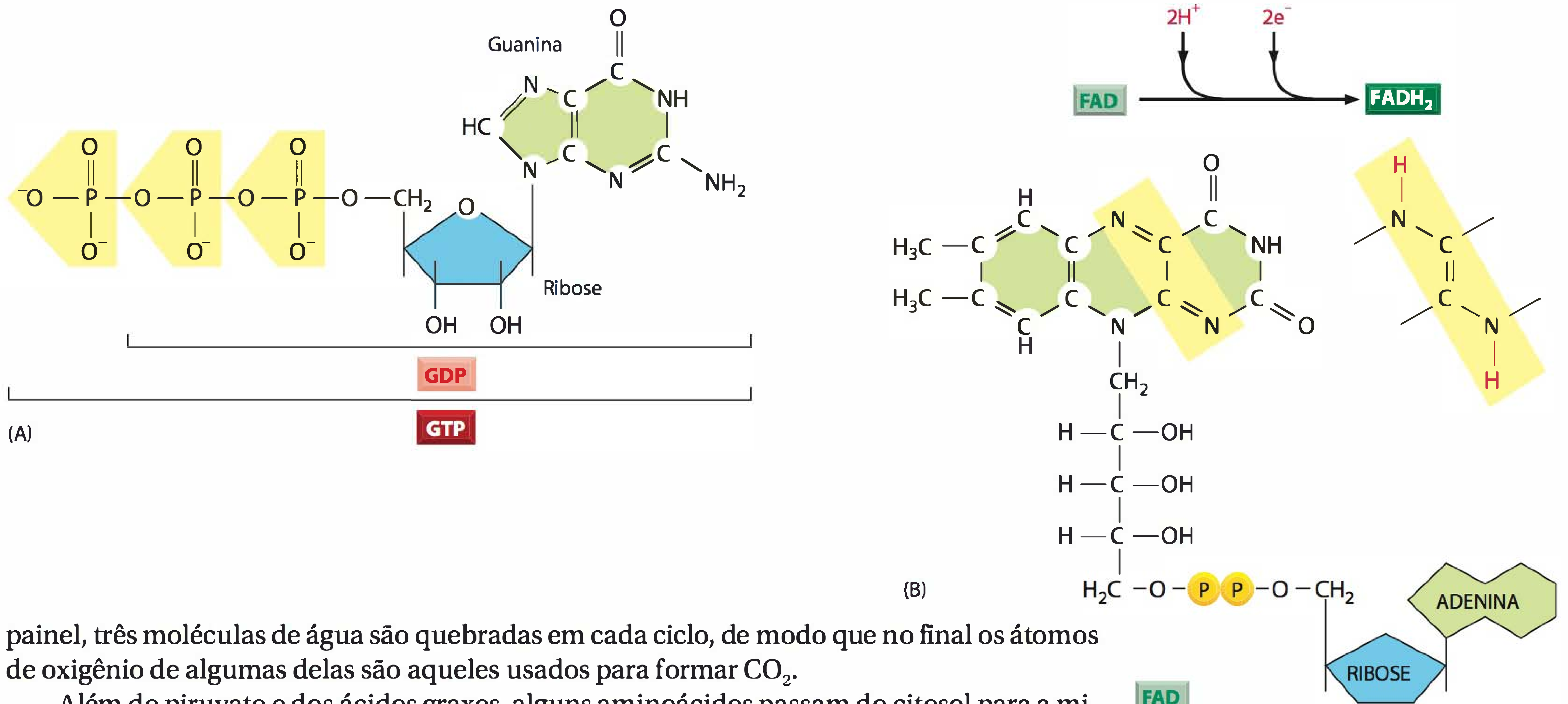


Figura 2-83 **As estruturas do GTP e do $FADH_2$.** (A) O GTP e o GDP são moléculas muito relacionadas com o ATP e o ADP, respectivamente. (B) O $FADH_2$ é um carreador de hidrogênios e de elétrons rico em energia, assim como o NADH e o NADPH. Ele é mostrado aqui em sua forma oxidada (FAD), com os átomos que carregam hidrogênio realçados em *amarelo*.

painel, três moléculas de água são quebradas em cada ciclo, de modo que no final os átomos de oxigênio de algumas delas são aqueles usados para formar CO_2.

Além do piruvato e dos ácidos graxos, alguns aminoácidos passam do citosol para a mitocôndria, onde também são convertidos em acetil-CoA ou em algum outro intermediário do ciclo do ácido cítrico. Assim, nas células eucarióticas, as mitocôndrias são o centro de todos os processos que produzem energia, independentemente de começarem a partir de açúcares, de gorduras ou de proteínas.

Tanto o ciclo do ácido cítrico quanto a glicólise funcionam como ponto de início de reações biossintéticas importantes por produzir intermediários contendo carbono e que são de importância vital, como *oxaloacetato* e *α-cetoglutarato*. Algumas dessas substâncias produzidas pelo catabolismo são transferidas da mitocôndria de volta para o citosol, onde servem como precursores de reações anabólicas de síntese de muitas moléculas essenciais, como os aminoácidos (**Figura 2-84**).

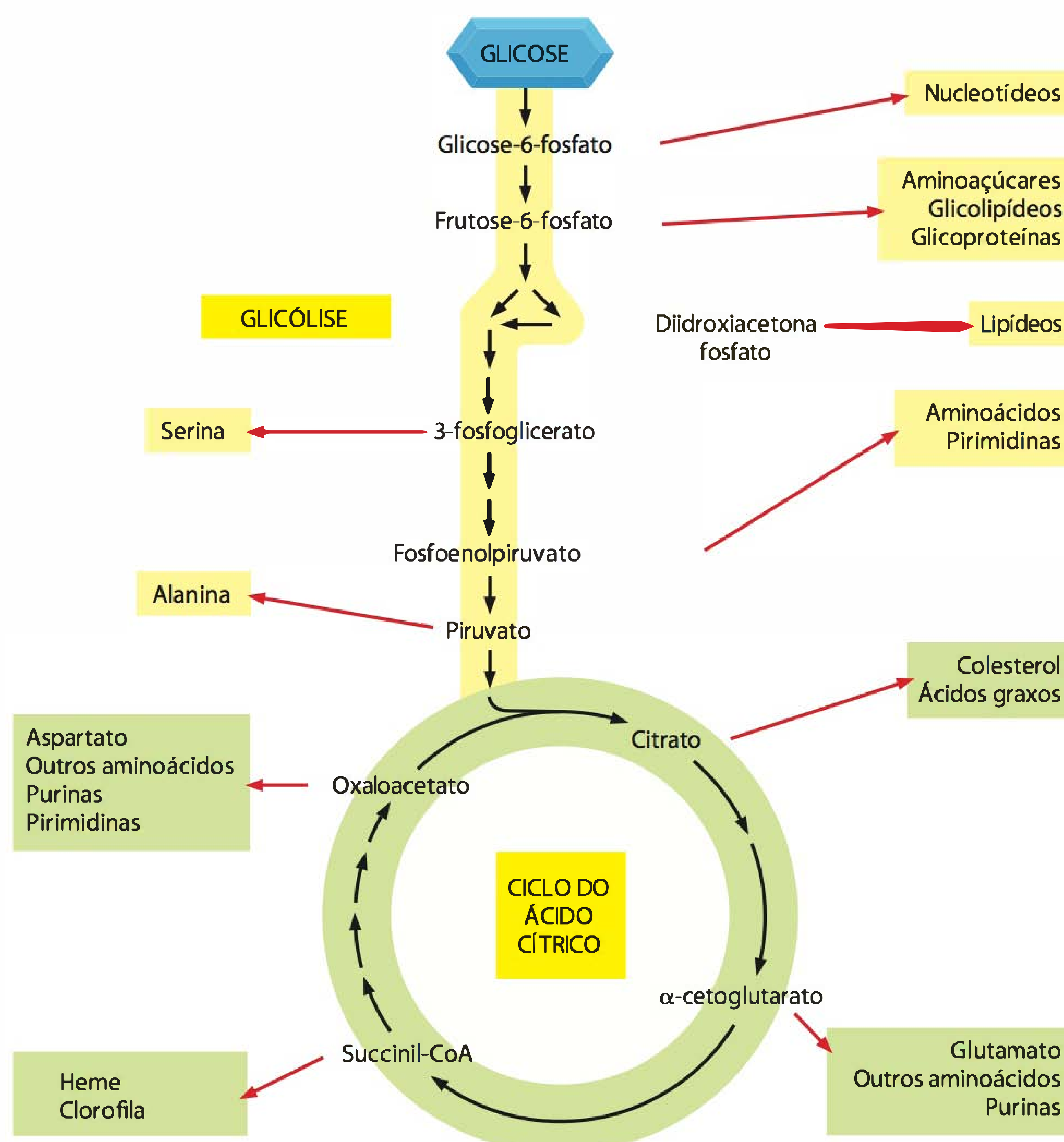


Figura 2-84 **A glicólise e o ciclo do ácido cítrico fornecem os precursores necessários para a síntese de muitas moléculas biológicas importantes.** Aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, açúcares e outras moléculas (mostrados aqui como produtos) servem como precursores de muitas macromoléculas da célula. Neste diagrama, as *setas pretas* indicam uma única reação catalisada por uma enzima. As *setas vermelhas* geralmente representam as vias com muitas etapas que são necessárias para produzir os produtos indicados.

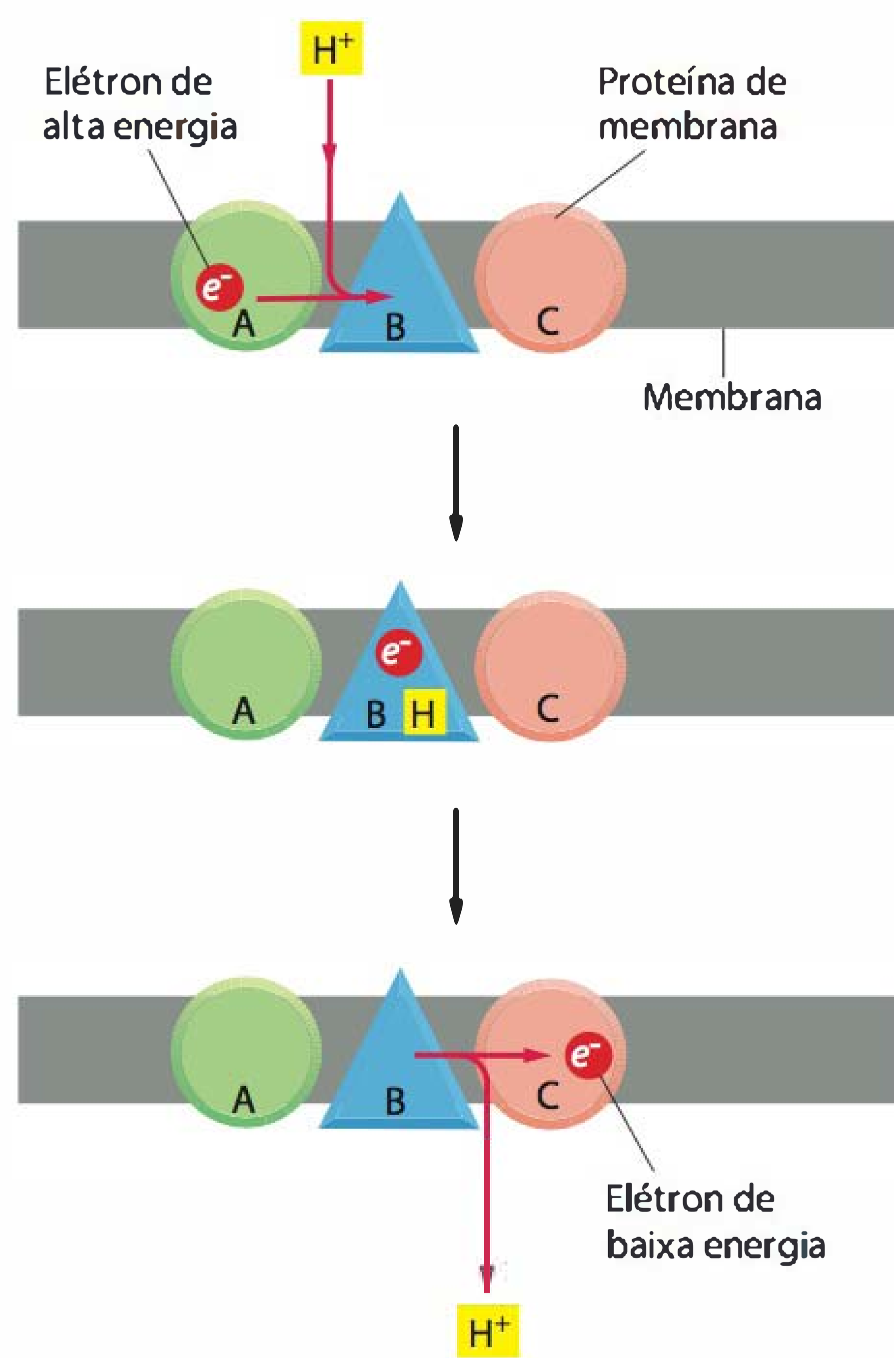


Figura 2-85 Geração de um gradiente de H^+ através da membrana por meio de reações de transporte de elétrons. Um elétron de alta energia (provindo, por exemplo, da oxidação de um metabólito) passa sequencialmente pelos carreadores A, B e C até um estado de menor energia. Neste diagrama, o carreador B está organizado na membrana de tal maneira que, quando um elétron passa por ele, o carreador pega um H^+ de um lado e libera-o do outro lado da membrana. O resultado é um gradiente de H^+. Como discutido no Capítulo 14, esse gradiente é uma importante forma de armazenamento de energia que se atrela a outras proteínas de membrana para impulsionar a formação de ATP.

Na maioria das células, o transporte de elétrons leva à síntese da maior parte do ATP

A maior parte da energia das moléculas dos alimentos é liberada na última etapa da degradação. É nesse processo final que os transportadores de elétrons NADH e $FADH_2$ transferem os elétrons que receberam ao oxidar outras moléculas para a **cadeia transportadora de elétrons**, incrustada na membrana interna da mitocôndria (ver Figura 14-10). À medida que os elétrons atravessam essa longa cadeia de moléculas especializadas em aceitar e doar elétrons, eles passam sucessivamente a estados de menor energia. A energia liberada pelos elétrons durante esse processo é utilizada para bombear íons H^+ (prótons) através da membrana, do interior do compartimento mitocondrial para fora (**Figura 2-85**). Dessa forma, há a formação de um gradiente de íons H^+. Esse gradiente serve de fonte de energia, armazenada de maneira semelhante a uma pilha, para ser usada em uma grande variedade de reações que necessitam de energia. A fosforilação de ADP, formando ATP, é a mais proeminente dessas reações.

Ao final dessa série de transferências de elétrons, eles passam para moléculas de oxigênio gasoso (O_2) que se difundiram para a mitocôndria e que se combinam com os prótons (H^+) presentes em solução, produzindo moléculas de água. Nesse momento, os elétrons atingem o menor nível energético, de modo que foi extraída toda a energia disponível pela oxidação das moléculas dos alimentos. Esse processo, denominado **fosforização oxidativa** (**Figura 2-86**), também ocorre na membrana plasmática das bactérias. Efetivamente, ele é um dos ápices da evolução das células e é o tópico central do Capítulo 14.

Assim, a oxidação completa de uma molécula de glicose até H_2O e CO_2 é utilizada pela célula para produzir 30 moléculas de ATP. Diferentemente, considerando apenas a glicólise, apenas duas moléculas de ATP são produzidas por cada molécula de glicose.

Os aminoácidos e os nucleotídeos fazem parte do ciclo do nitrogênio

A discussão feita até agora se concentrou principalmente no metabolismo dos hidratos de carbono, e os metabolismos do nitrogênio e do enxofre não foram abordados. Esses dois elementos são constituintes importantes das macromoléculas biológicas. Os átomos de nitrogênio e de enxofre, por meio de uma série de ciclos reversíveis, passam de composto a composto e também entre os organismos e o ambiente em que vivem.

Embora o nitrogênio molecular seja abundante na atmosfera da Terra, ele é um gás quimicamente inerte. Somente poucas espécies de seres vivos têm capacidade de incorporá-lo em moléculas orgânicas, um processo denominado **fixação do nitrogênio**. A fixação do nitrogênio ocorre em alguns micro-organismos e em alguns processos geofísicos, como as descargas de raios durante as tempestades. A fixação do nitrogênio é essencial para toda a biosfera: sem ela não haveria vida no planeta. Apenas uma pequena parte de todos os compostos nitrogenados presentes nos organismos vivendo hoje vem de produtos formados por nitrogênio recém-fixado da atmosfera. A maior parte do nitrogênio está circulando há muito tempo, passando de um ser vivo para outro. Assim, podemos considerar que as reações de

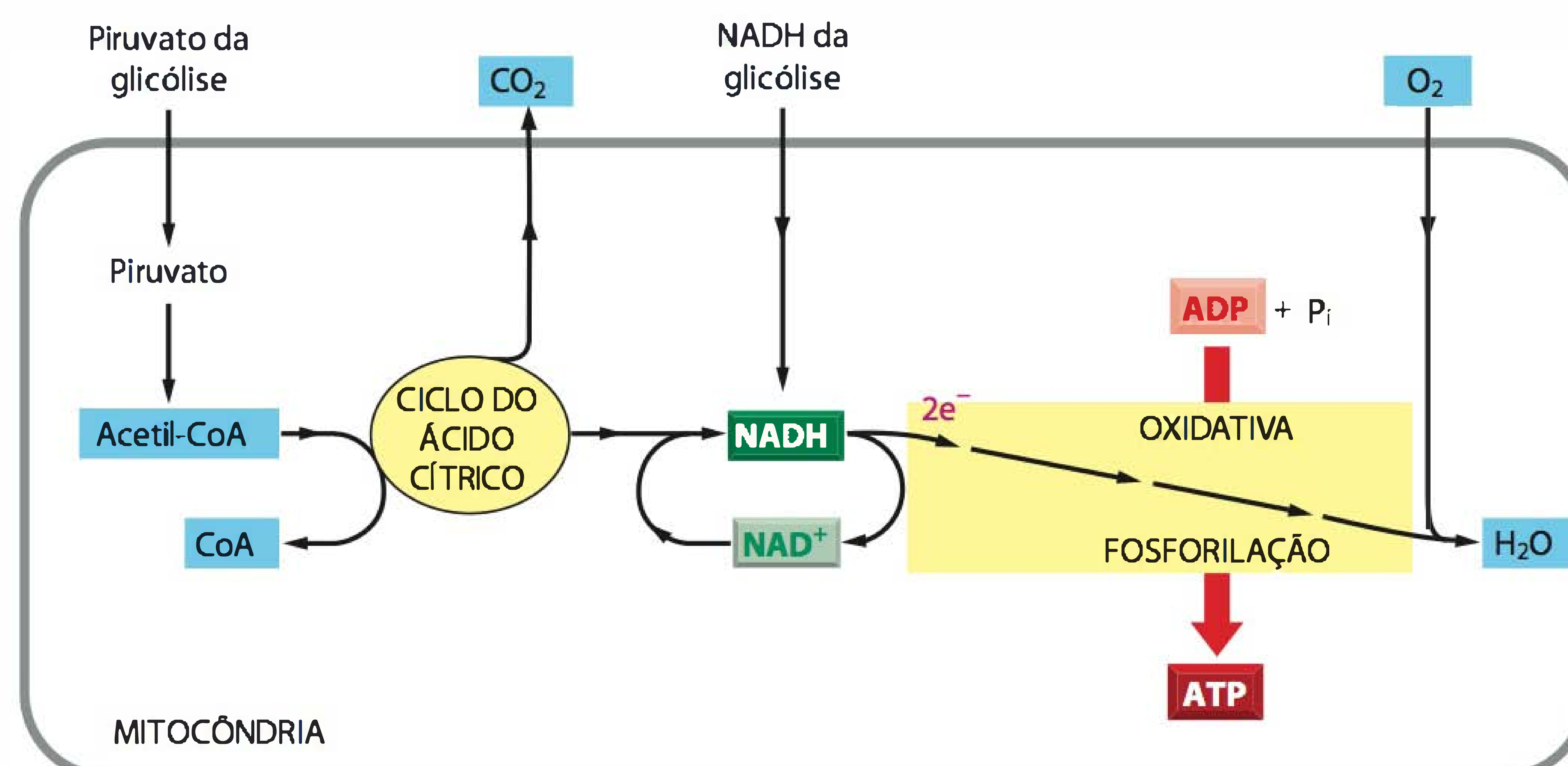


Figura 2-86 Estágios finais da oxidação das moléculas dos alimentos. As moléculas de NADH e $FADH_2$ ($FADH_2$ não é mostrado) são produzidas pelo ciclo do ácido cítrico. Esses carreadores ativados doam elétrons de alta energia que serão usados para reduzir oxigênio gasoso, formando água. A maior parte da energia liberada durante essas transferências de elétrons, que ocorrem ao longo da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria (ou na membrana plasmática de bactérias), é atrelada à síntese de ATP – daí o nome fosforilação oxidativa (discutido no Capítulo 14).

fixação de nitrogênio que ocorrem atualmente têm a função de completar a disponibilidade total de nitrogênio existente.

Os vertebrados recebem praticamente quase todo seu nitrogênio pela ingestão de uma dieta contendo proteínas e ácidos nucleicos. Essas macromoléculas no organismo são degradadas até aminoácidos e nos componentes dos nucleotídeos. O nitrogênio que elas contêm é utilizado para produzir novas proteínas e novos ácidos nucleicos, ou para a construção de outras macromoléculas. Cerca de metade dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são aminoácidos essenciais para os vertebrados (**Figura 2-87**), isto é, não podem ser sintetizados a partir dos demais ingredientes da dieta. Os outros aminoácidos podem ser sintetizados utilizando-se vários materiais, inclusive os intermediários do ciclo do ácido cítrico descritos anteriormente. Os aminoácidos essenciais são sintetizados pelas plantas e por organismos invertebrados, geralmente utilizando vias longas com alto dispêndio de energia e que foram perdidas durante a evolução dos vertebrados.

Os nucleotídeos necessários para a síntese de RNA e de DNA podem ser sintetizados por vias biossintéticas especializadas. Todos os nitrogênios das bases púricas e pirimídicas (bem como alguns dos carbonos) provêm dos aminoácidos glutamina, ácido aspártico e glicina, que são abundantes. Por outro lado, os açúcares ribose e desoxirribose são derivados da glicose. Não existem "nucleotídeos essenciais" que devam ser fornecidos pela dieta.

Os aminoácidos que não são utilizados em vias biossintéticas podem ser oxidados para a geração de energia metabólica. A maior parte dos seus carbonos e hidrogênios forma CO_2 e H_2O, enquanto os seus átomos de nitrogênio são desviados de várias formas até aparecerem como ureia que, então, é excretada. Cada aminoácido é processado de uma maneira diferente e existe toda uma constelação de reações enzimáticas para catabolizá-los.

O enxofre é abundante na Terra na sua forma mais oxidada, sulfato (SO_4^{2-}). Para ser convertido em uma forma utilizável para a vida, o sulfato deve ser reduzido para sulfito (S^{2-}), o estado de oxidação do enxofre necessário para a síntese de moléculas orgânicas essenciais. Estas moléculas incluem os aminoácidos metionina e cisteína, a coenzima A (ver Figura 2-62) e os centros ferro-enxofre essenciais para o transporte de elétrons (ver Figura 14-23). O processo inicia-se em bactérias, fungos e plantas, onde um grupo especial de enzimas usa ATP e poder redutor para produzir a via de assimilação de enxofre. Os humanos e os outros animais não podem reduzir sulfato e, portanto, devem adquirir o enxofre que necessitam para seus metabolismos dos alimentos que consomem.

OS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS

TREONINA
METIONINA
LISINA
VALINA
LEUCINA
ISOLEUCINA
HISTIDINA
FENILALANINA
TRIPTOFANO

Figura 2-87 Os nove aminoácidos essenciais. Eles não podem ser sintetizados pelas células do homem e, portanto, devem ser fornecidos pela dieta.

O metabolismo é organizado e regulado

Pode-se ter uma ideia de como é intricada a maquinaria química de uma célula, partindo-se das relações entre a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e as outras vias metabólicas esboçadas na **Figura 2-88**. Esse tipo de mapa, usado anteriormente neste capítulo para introduzir o conceito de metabolismo, representa apenas algumas das muitas vias enzimáticas das células. É óbvio que a discussão do metabolismo celular feita até agora abrangeu apenas uma fração diminuta da química das células.

Todas essas reações ocorrem em células que têm menos de 0,1 mm de diâmetro, sendo que cada uma dessas reações necessita de uma enzima própria. Como a Figura 2-88 deixa claro, frequentemente a mesma molécula pode fazer parte de vias diferentes. O piruvato, por exemplo, é substrato para mais de meia dúzia de enzimas diferentes; cada uma delas modifica-o quimicamente de uma maneira diferente. Uma enzima converte piruvato em acetil-CoA; outra, em oxaloacetato; uma terceira, no aminoácido alanina; uma quarta, em lactato, e assim por diante. Todas essas vias competem pela mesma molécula de piruvato. Simultaneamente, ocorrem milhares de competições semelhantes por outras moléculas pequenas.

A situação é ainda mais complicada nos organismos multicelulares. Diferentes tipos celulares em geral necessitam de um conjunto diferente de enzimas. Ainda, diferentes tecidos contribuem diferentemente para a química do organismo como um todo. Além das diferenças quanto a produtos especializados como os hormônios e os anticorpos, existem diferenças significativas nas vias metabólicas "comuns" entre os vários tipos de células de um mesmo organismo.

Embora praticamente todas as células contenham as enzimas da glicólise, do ciclo do ácido cítrico, da síntese e da degradação das gorduras e do metabolismo dos aminoácidos, os níveis de cada um desses processos necessários, em cada um dos diferentes tecidos, não são os mesmos. Por exemplo, a célula nervosa, a célula que mais trabalha no organismo, praticamente não mantém nenhuma reserva de glicogênio ou de ácido graxo e depende quase

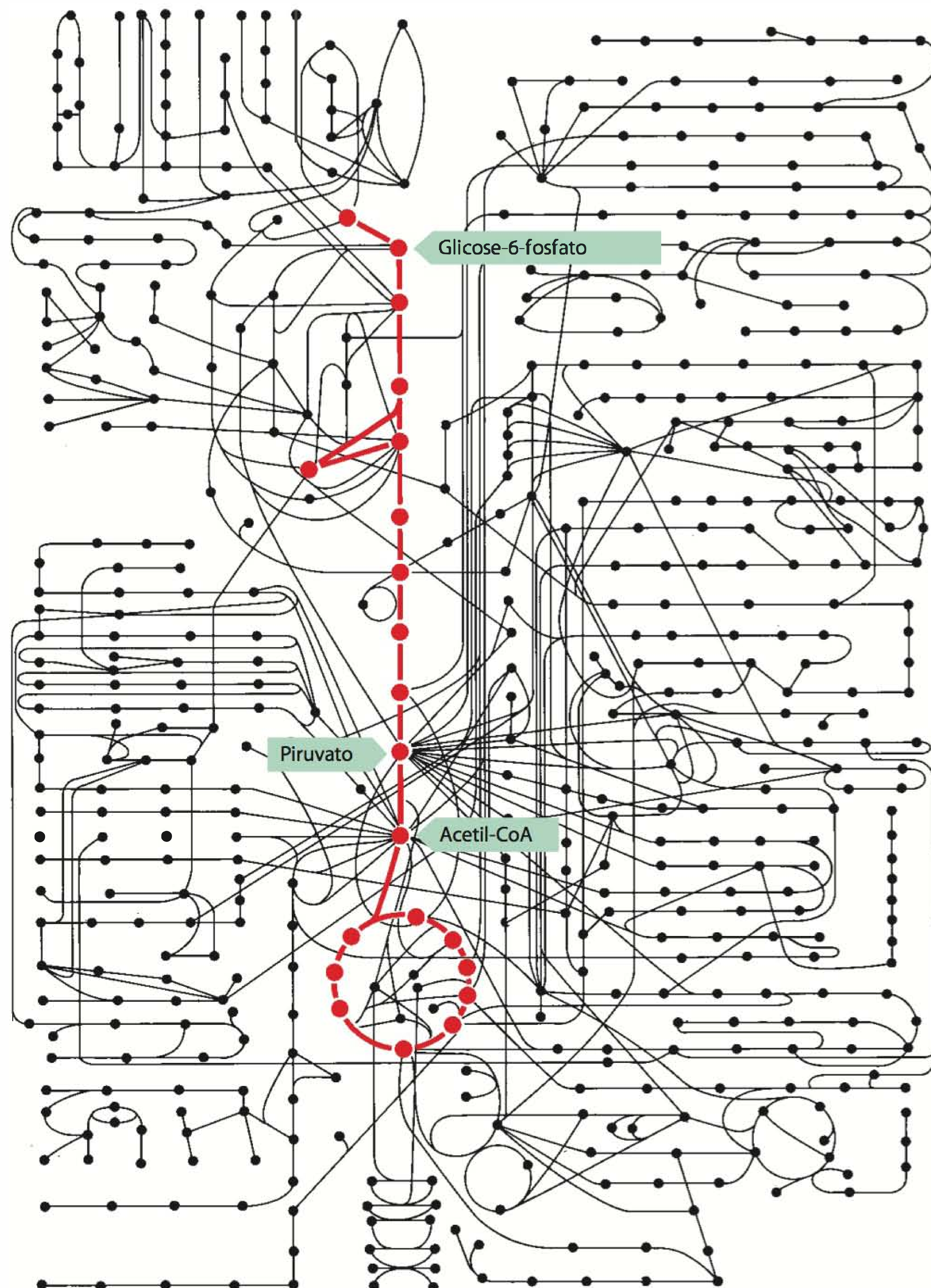


Figura 2-88 A glicólise e o ciclo do ácido cítrico são o centro do metabolismo. Cerca de 500 reações metabólicas de uma célula típica estão mostradas esquematicamente, sendo que as reações da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão mostradas em *vermelho*. Outras reações também levam a essa via central, fornecendo moléculas pequenas para serem catabolisadas, com a consequente produção de energia, ou desviadas para suprir a biossíntese com compostos de carbono.

que totalmente de um suprimento de glicose da corrente sanguínea. De maneira oposta, as células do fígado fornecem glicose para as células musculares que estiverem se contraindo e reciclam o ácido láctico produzido pelas células do músculo novamente em glicose. Todos os tipos de células têm vias metabólicas características e devem cooperar tanto para o estado de normalidade como para a resposta a um estresse ou ao jejum. Pode-se pensar que o sistema como um todo necessita ser equilibrado com tal grau de precisão, que qualquer distúrbio, por menor que seja, como uma mudança temporária na ingestão de alimento, pode ser desastroso.

Na realidade, o equilíbrio metabólico das células é espantosamente estável. Independentemente de como o equilíbrio é perturbado, as células reagem no sentido de restabelecer o estado inicial. As células podem adaptar-se e continuar a funcionar durante jejum ou doença. Muitos tipos de mutações podem prejudicar ou mesmo eliminar determinadas vias e, ainda assim, permitir que certas necessidades mínimas sejam satisfeitas, de modo que a célula sobreviva. Isso acontece porque uma rede muito elaborada de *mecanismos de controle* regula e coordena as velocidades de todas essas reações. Esses controles apoiam-se fundamentalmente na habilidade impressionante que as proteínas têm de modificar sua forma e sua química em resposta a mudanças no ambiente em que estejam. Os princípios que regem o modo como as grandes moléculas como as proteínas são construídas e a química de sua regulação são abordados a seguir.

Resumo

A glicose e outras moléculas dos alimentos são degradadas por meio de etapas de oxidação controladas para fornecer energia química na forma de ATP e de NADH. Existem três conjuntos de reações que agem em série, sendo que os produtos finais de cada um são o material inicial para o próximo: a glicólise (que ocorre no citosol), o ciclo do ácido cítrico (na matriz da mitocôndria) e a fosforização oxidativa (na membrana interna da mitocôndria). Os produtos intermediários da glicólise e os do ciclo do ácido cítrico são usados como fonte de energia metabólica e também para produzir muitas das moléculas pequenas usadas como matéria-prima para as biossínteses. As células armazenam moléculas de açúcar na forma de glicogênio, nos animais, e na forma de amido, nas plantas. Tanto os animais como as plantas usam intensamente as gorduras como reserva de alimento. Esses materiais de reserva, por sua vez, servem como a principal fonte de alimento para o homem, juntamente com as proteínas, que consistem na maior parte do peso seco das células nos alimentos que ingerimos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

2-1 Apenas 1/1.000 da radioatividade original de uma amostra permanece após 10 meias-vidas.

2-2 Uma solução 10^{-8} M de HCl tem pH 8.

2-3 A maioria das interações entre macromoléculas pode ser mediada tanto por ligações covalentes como por ligações não-covalentes.

2-4 Animais e plantas utilizam a oxidação para extrair energia das moléculas dos alimentos.

2-5 Caso ocorra oxidação em uma reação, também deverá haver uma redução.

2-6 O acoplamento da reação energeticamente desfavorável A → B a uma segunda reação B → C, que seja favorável, deslocará a constante de equilíbrio da primeira reação.

2-7 O critério que define que uma reação ocorre espontaneamente é ΔG e não $\Delta G°$, porque ΔG leva em consideração as concentrações dos reagentes e dos produtos.

2-8 A glicólise não é realmente importante para as células humanas por ser apenas o prelúdio da oxidação da glicose na mitocôndria, que produz 15 vezes mais ATP.

2-9 O oxigênio consumido durante a oxidação da glicose nas células animais retorna para a atmosfera na forma de CO_2.

Discuta as seguintes questões

2-10 Diz-se que a química orgânica das células vivas é especial por duas razões: ocorre em um ambiente aquoso e realiza algumas reações muito complexas. Entretanto, pode-se supor que ela seja realmente tão diferente da química orgânica executada nos principais laboratórios do mundo? Justifique.

2-11 O peso molecular do etanol (CH_3CH_2OH) é 46 e a densidade é 0,789 g/cm^3.

A. Qual a molaridade do etanol na cerveja, que tem 5% de etanol (em volume). (O conteúdo alcoólico da cerveja varia entre 4% [cervejas fracas] e 8% [cervejas fortes].)

B. O limite legal* do conteúdo alcoólico no sangue varia, mas 80 mg de etanol por 100 mL de sangue (geralmente considerado como um nível de álcool no sangue de 0,08) é o mais comum. Nesse limite legal, qual é a molaridade do etanol em uma pessoa?

C. Quantas garrafas de cerveja (de 5%) de 355 mL uma pessoa de 70 kg pode beber e ainda permanecer no limite legal? Uma pessoa de 70 kg contém cerca de 40 L de água. Ignore o metabolismo do etanol e suponha que o conteúdo de água da pessoa permaneça constante.

D. O etanol é metabolizado a uma velocidade de cerca de 120 mg por hora por kg de peso, independentemente de sua concentração. Se uma pessoa de 70 kg tiver duas vezes o limite legal de álcool no sangue (160 mg/100 mL), quanto tempo levará para que o limite de álcool no sangue diminua até o limite legal**?

Tabela Q2-1 Isótopos radiativos e algumas de suas propriedades (Questão 2-12)

Isótopos Radiativos	Emissão	Meia-vida	Atividade Específica Máxima (Ci/mmol)
^{14}C	partícula β	5.730 anos	0,062
^{3}H	partícula β	12,3 anos	29
^{35}S	partícula β	87,4 dias	1.490
^{32}P	partícula β	14,3 dias	9.120

2-12 Atividade específica refere-se à quantidade de radiatividade por unidade de quantidade de substância, normalmente expressa na biologia em bases molares, como Ci/mmol. (Um curie [Ci] corresponde a 2,22 × 10^{12} desintegrações por minuto [dpm].) Examinando a **Tabela Q2-1**, que lista as propriedades dos quatro isótopos mais comuns usados na biologia, fica aparente que há uma relação inversa entre a atividade específica máxima e a meia-vida. Seria apenas uma coincidência ou há alguma razão para isso? Explique sua resposta.

2-13 Devido a uma coincidência conveniente, o produto iônico da água, $K_W = [H^+][OH^-]$, é um número redondo: 1,0 × 10^{-14} M^2.

A. Por que uma solução em pH 7,0 é considerada neutra?

B. Qual é a concentração de H^+ e o pH de uma solução 1 mM de NaOH?

C. Se o pH de uma solução for 5,0, qual será a concentração de íons OH^-?

* N. de R. T. Os valores apresentados na questão estão relacionados às leis americanas.

** N. de R. T. No Brasil, segundo a lei sancionada em 19 de junho de 2008, o condutor apresentando 0,2 g de álcool por litro de sangue ou 0,1 mg de ácool por litro de ar expelido no exame do etilômetro estará sujeito a multa e suspensão da carteira de habilitação por um ano, sendo considerado crime com pena de até 3 anos de prisão se apresentar mais de 0,6 g de álcool por litro de sangue.

2-14 Sugira um escalonamento para os valores de p*K* (do menor para o maior) do grupo carboxila na cadeia lateral do aspartato no ambiente das proteínas a seguir. Explique sua proposta.

1. Uma cadeia lateral de aspartato na superfície da proteína com nenhum outro grupo ionizável nas proximidades.

2. Uma cadeia lateral de aspartato enterrada em um bolsão hidrofóbico na superfície da proteína.

3. Uma cadeia lateral de aspartato em um bolsão hidrofóbico e adjacente a uma cadeia lateral de glutamato.

4. Uma cadeia lateral de aspartato em um bolsão hidrofóbico e adjacente a uma cadeia lateral de lisina.

2-15 Sabe-se que a cadeia lateral da histidina tem um papel importante no mecanismo catalítico de determinada enzima. Entretanto, não está claro o quanto a histidina é necessária nos estados protonado (carregada) e não-protonado (não-carregada). Para responder a essa questão, a atividade da enzima deve ser medida em um amplo espectro de pH. Os resultados estão mostrados na **Figura Q2-1**. Qual a forma de histidina necessária para a atividade enzimática?

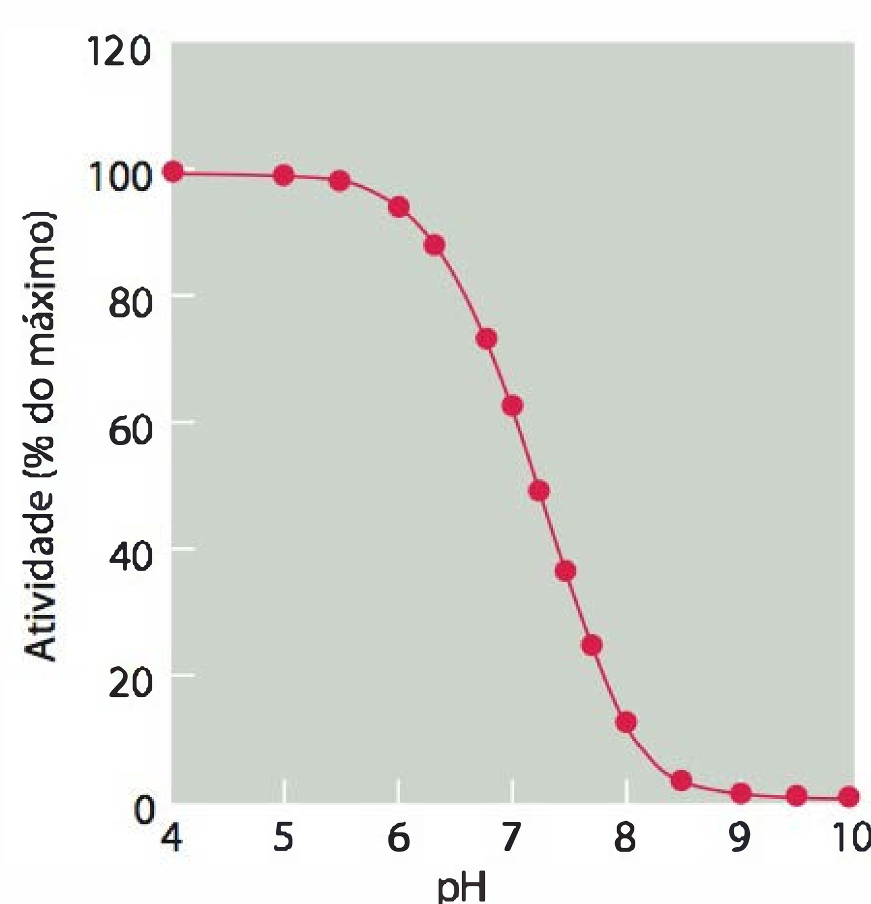
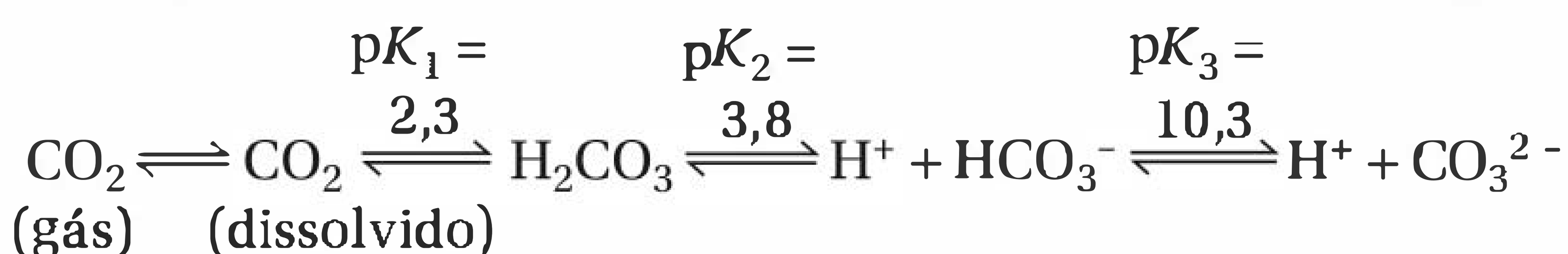


Figura Q2-1 Atividade enzimática como uma função de pH (Questão 2-15).

2-16 Durante uma corrida de curta distância, os músculos metabolizam a glicose anaerobicamente, produzindo uma grande concentração de ácido láctico, o que faz o pH diminuir tanto no sangue quanto no citosol e contribui para a fadiga que os atletas sentem bem antes de suas reservas de energia se exaurirem. O principal tampão do sangue contra mudanças de pH é o sistema bicarbonato/CO_2.



$$\underset{\text{(gás)}}{CO_2} \rightleftharpoons \underset{\text{(dissolvido)}}{CO_2} \underset{}{\overset{pK_1 = 2{,}3}{\rightleftharpoons}} H_2CO_3 \overset{pK_2 = 3{,}8}{\rightleftharpoons} H^+ + HCO_3^- \overset{pK_3 = 10{,}3}{\rightleftharpoons} H^+ + CO_3^{2-}$$

Para aumentar o desempenho, estes atletas devem ser aconselhados a suspender a respiração ou a respirar rapidamente durante um minuto antes da corrida? Por quê?

2-17 As três moléculas mostradas na **Figura Q2-2** contêm os sete grupos mais reativos na biologia. A maioria das moléculas que formam as células é feita a partir desses grupos funcionais. Indique e nomeie os grupos funcionais dessas moléculas.

2-18 A "difusão" pode parecer vagarosa na vida quotidiana, mas, em uma escala do ponto de vista celular, ela é muito rápida. A velocidade instantânea média de uma partícula em solução, isto é, a velocidade entre cada colisão, é

$$V = (kT/m)^{1/2}$$

em que $k = 1{,}38 \times 10^{-16}$ g cm²/K seg², T = temperatura em K (37° são 310 K), m = massa em g/molécula.

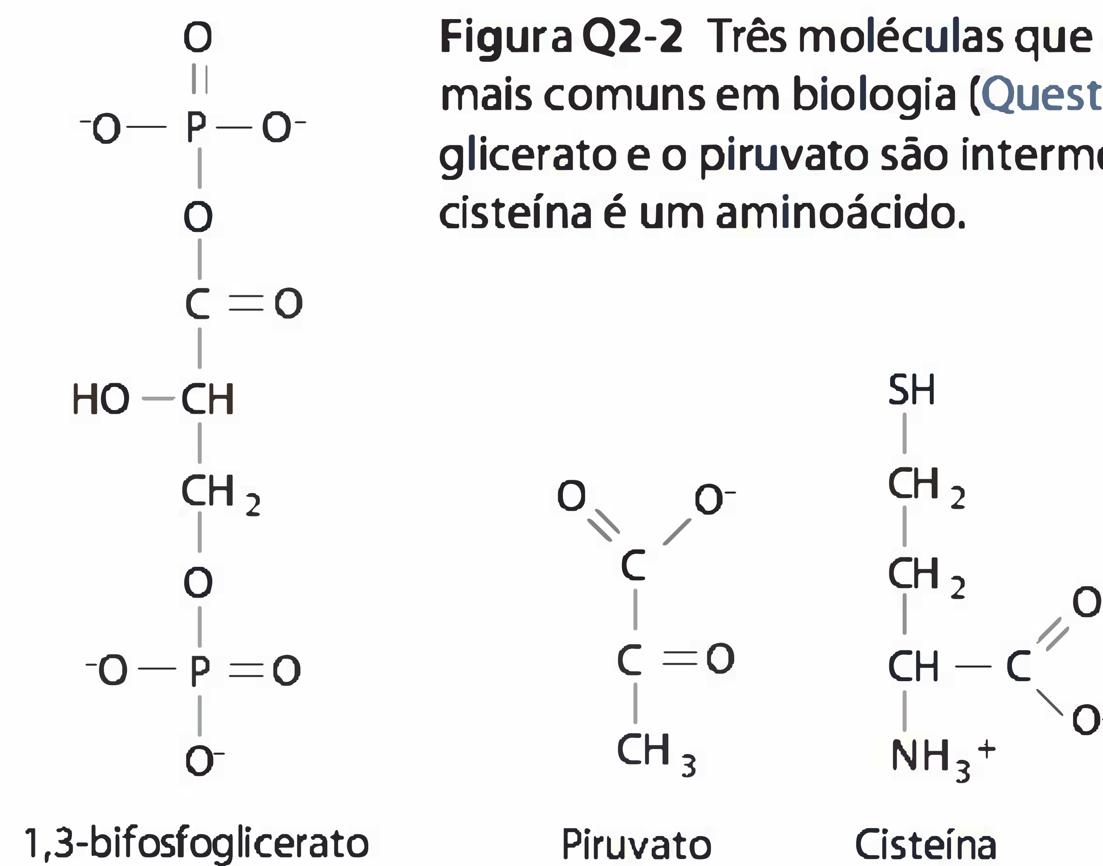


Figura Q2-2 Três moléculas que ilustram os sete grupos mais comuns em biologia (Questão 2-17). O 1,3-bifosfoglicerato e o piruvato são intermediários da glicólise, e a cisteína é um aminoácido.

Calcule a velocidade instantânea de uma molécula de água (massa molecular = 18 dáltons), de uma molécula de glicose (massa molecular = 180 dáltons) e de uma molécula de mioglobina (massa molecular = 15.000 dáltons), a 37°C. Apenas para se divertir, converta esses números em km/hora. Antes de iniciar os cálculos tente imaginar se essas moléculas estão se movendo como um nadador de nado livre lento (<1 km/h), como uma pessoa em caminhada leve (5 km/h) ou como um recordista de corrida (40 km/h).

2-19 A polimerização das unidades de tubulina formando microtúbulos ocorre com um aumento no ordenamento das subunidades (**Figura Q2-3**). Mesmo assim, a polimerização da tubulina ocorre com um aumento na entropia (diminuição da ordem). Como isso acontece?

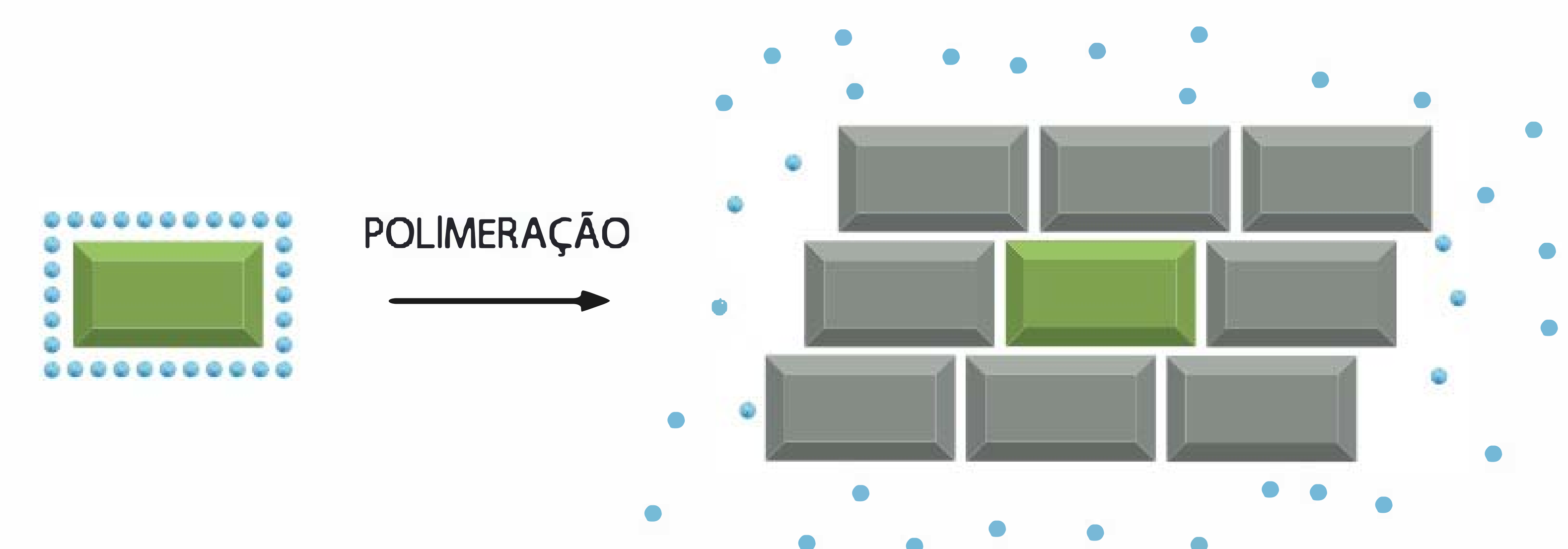


Figura Q2-3 Polimerização das subunidades da tubulina nos microtúbulos (Questão 2-19). Estão mostrados o destino de uma subunidade (*sombreado*) e as moléculas de água a ela associadas (*esferas pequenas*).

2-20 Um humano adulto normal de 70 kg pode conseguir toda a energia que precisa para um dia comendo 3 moles de glicose (540 g). (Isso não é recomendado.) Cada molécula de glicose gera 30 ATPs quando oxidada até CO_2. A concentração de ATPs celular é mantida em cerca de 2 mM, e um adulto de 70 kg tem cerca de 25 L de fluido intracelular. Uma vez que o ATP permanece constante nas células, calcule quantas vezes por dia, em média, cada molécula de ATP do corpo é hidrolisada e ressintetizada.

2-21 Supondo que existem 5×10^{13} células no corpo humano e que a reciclagem (*turnover*) do ATP é de 10^9 ATP por minuto em cada célula, quantos watts o corpo humano consome? (Um watt é um joule por segundo e o mesmo que 4,18 calorias.) Considere que a hidrólise do ATP produz 12 kcal/mol.

2-22 Uma barra de cereal de 65 g (325 kcal) supre energia suficiente para escalar desde o monte Zermatt (1.660 m de altitude) nos Alpes até o topo do monte Matterhorn (4.478 m), **Figura Q2-4**), ou se deve parar no Hörnli Hut (3.260 m) para comer mais uma barra? Imagine que o alpinista e seu equipamento tenham uma massa de



Figura Q2-4 O Matterhorn (Questão 2-22). (Cortesia de ZermattTourism.)

75 kg e que todo o esforço seja feito contra a gravidade (isto é, escalada o tempo todo). Relembre das suas aulas de física que

$$\text{trabalho (J)} = \text{massa (kg)} \times g\ (\text{m/seg}^2) \times \text{altura ganha (m)}$$

onde g é a aceleração da gravidade (9,8 m/seg^2). Um joule é 1 kg m^2/seg^2 e são 4,18 kJ por kcal.

Qual das suposições consideradas no enunciado faz com que a necessidade de comer seja enormemente subestimada?

2-23 À primeira vista, a fermentação do piruvato para lactato parece ser uma reação de ajuda opcional na glicólise. Afinal, como as células podem crescer em ausência de oxigênio e simplesmente não eliminar piruvato como um produto de descarte? Na ausência da fermentação, que produtos derivados da glicose se acumulariam em células sob condições anaeróbias? O metabolismo da glicose pela via glicolítica pode continuar em ausência de oxigênio em células que não realizam fermentação? Justifique.

2-24 Na ausência de oxigênio, as células consomem glicose a uma velocidade alta e constante. A adição de oxigênio faz com que o consumo de glicose diminua abruptamente e permaneça em um nível mais baixo. Por que a glicose é consumida em alta velocidade na ausência de oxigênio e em baixa velocidade na presença de oxigênio?

2-25 Durante o intervalo entre as refeições, o fígado fornece glicose para o resto do organismo. Isso é feito pela degradação do glicogênio, formando glicose-6-fosfato na penúltima etapa. A glicose-6-fosfato é convertida em glicose pela quebra do fosfato ($\Delta G°$ = -3,3 kcal/mol). Por que se supõe que o fígado remova o fosfato por hidrólise em vez de reverter à reação pela qual a glicose-6-fosfato (G6P) é formada a partir da glicose (glicose + ATP $\rightarrow$ G6P + ADP, $\Delta G° = -4{,}0$ kcal/mol)? Revertendo essa reação, o fígado pode gerar tanto glicose como ATP.

2-26 Em 1904, Franz Knoop realizou o que, provavelmente, foi o primeiro experimento de sucesso usando marcação para estudar vias metabólicas. Ele alimentou cães com diferentes ácidos graxos marcados com um anel benzênico terminal e analisou a urina quanto à presença de derivados do benzeno. Quando os ácidos graxos tinham um número par de átomos de carbono, fenilacetato era excretado (**Figura Q2-5**A). Quando os ácidos graxos tinham número ímpar de carbonos, benzoato era excretado (Figura Q2-5B).

A partir desses experimentos, Knoop deduziu que a oxidação dos ácidos graxos até CO_2 e H_2O envolve a remoção de fragmentos de dois carbonos a partir da extremidade carboxílica da cadeia.

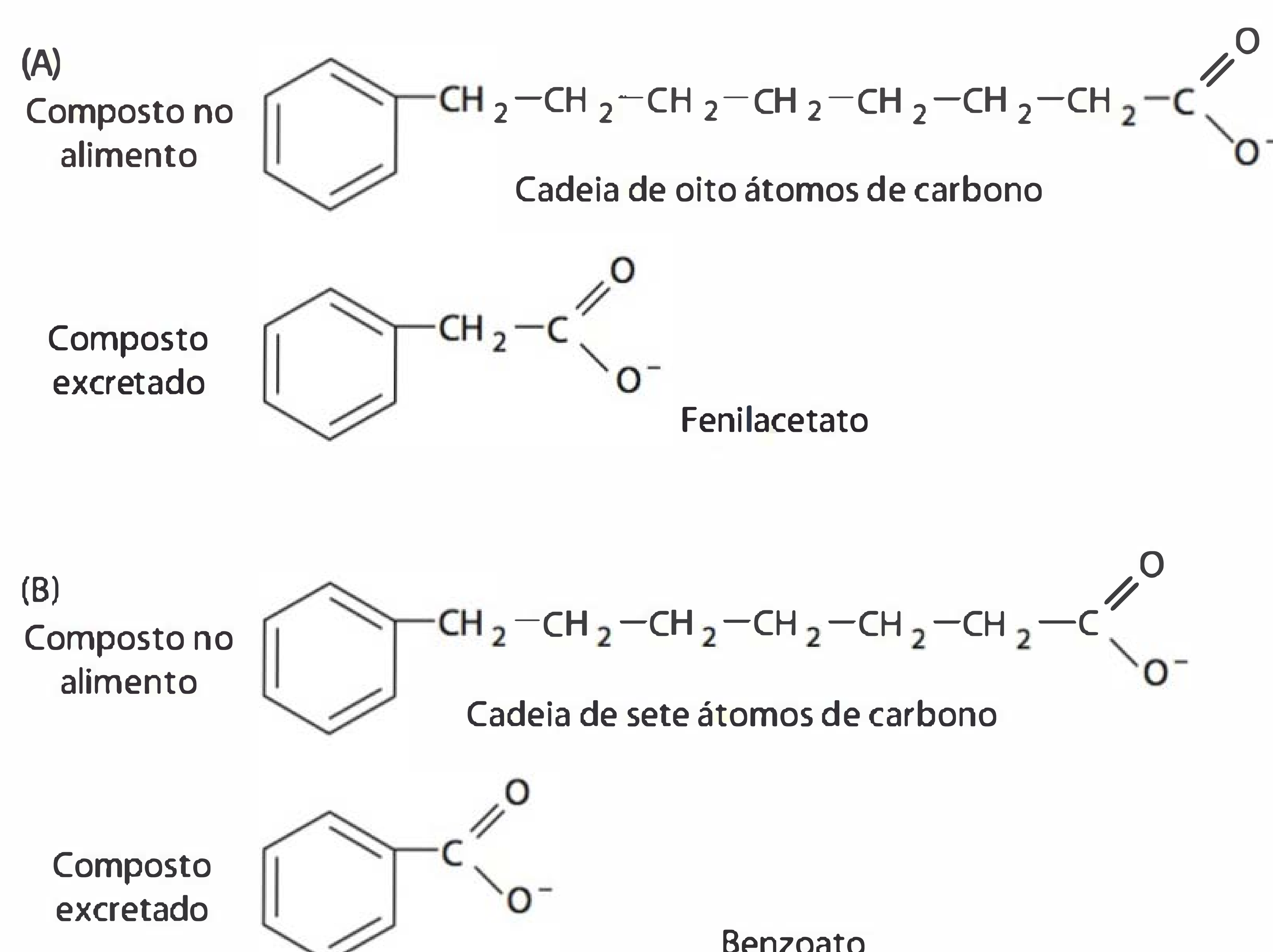


Figura Q2-5 Experimento original de marcação para analisar a oxidação dos ácidos graxos (Questão 2-26). (A) Derivados de uma cadeia de ácidos graxos de número par de carbonos adicionados à dieta e excretados. (8) Derivados de uma cadeia de ácidos graxos de número ímpar de carbonos adicionados à dieta e excretados.

Você pode explicar a razão que o levou a concluir que os dois fragmentos de carbono, ao contrário de qualquer outro número, foram removidos e que a degradação ocorreu a partir da extremidade do ácido carboxílico, ao contrário da outra extremidade?

2-27 As vias da síntese de aminoácidos em micro-organismos foram, em parte, estudadas por experimentos de alimentação cruzada entre organismos mutantes com defeitos em etapas individuais das vias. Os resultados de experimentos de alimentação cruzada de três mutantes com defeito na via do triptofano ($TrpB^-$, $TrpD^-$ e $TrpE^-$) estão mostrados na **Figura Q2-6**. Os mutantes eram semeados em uma placa de Petri e deixados para crescer na presença de uma quantidade muito pequena de triptofano, produzindo três faixas tênues. Como mostrado, ocorreu um maior crescimento onde algumas faixas de semeadura estavam próximas a outras faixas. Esses pontos de crescimento mais intenso indicam que alguns mutantes podem alimentar um ao outro.

A partir do padrão de alimentação cruzada mostrado na Figura Q2-6, deduza a ordem das etapas controladas pelos produtos dos genes *TrpB*, *TrpD* e *TrpE*. Explique seu raciocínio.

RESULTADOS DE ALIMENTAÇÃO CRUZADA

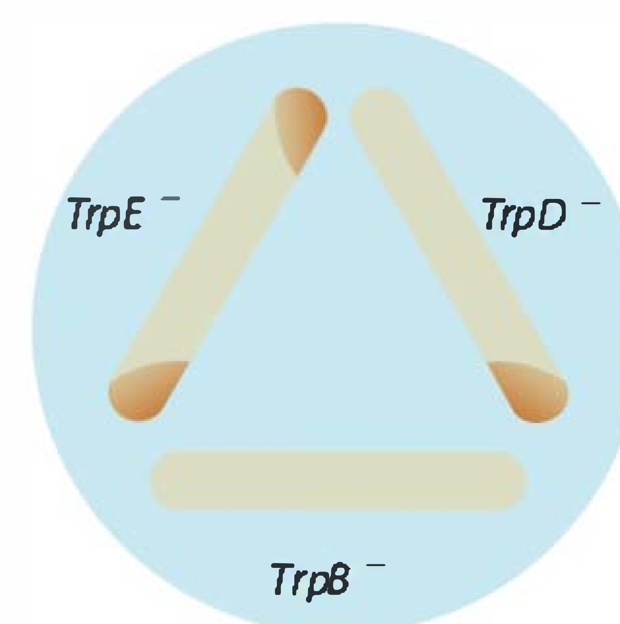
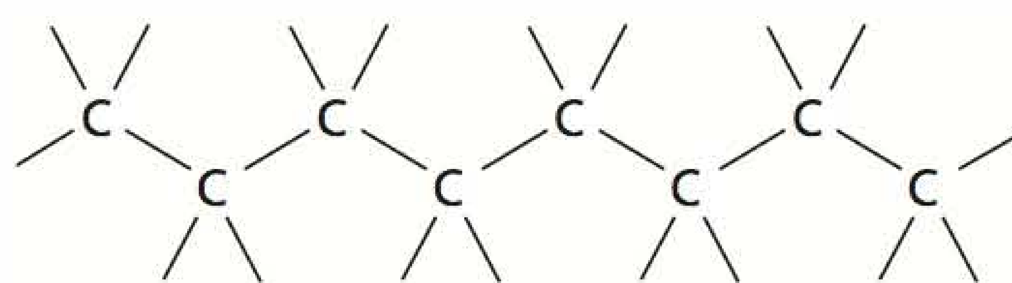


Figura Q2-6 Determinação da via de síntese do triptofano por meio de experimentos de alimentação cruzada (Questão 2-27). Resultados de um experimento de alimentação cruzada entre mutantes deficientes em etapas da via de biossíntese do triptofano. As *áreas escuras* da placa de Petri mostram regiões de crescimento celular.

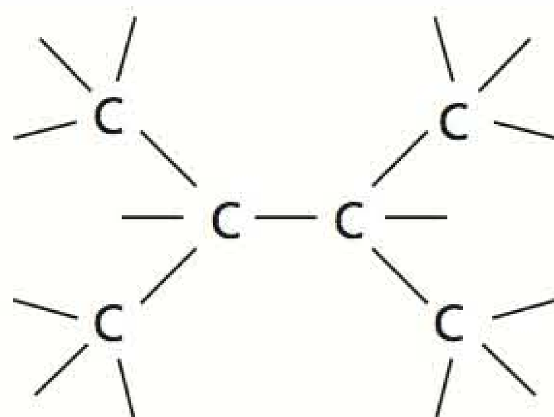
ESQUELETOS DE CARBONO

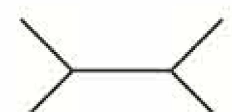
O carbono tem um papel único nas células devido a sua capacidade de formar ligações covalentes fortes com outros átomos de carbono. Assim, os átomos de carbono podem se juntar para formar cadeias



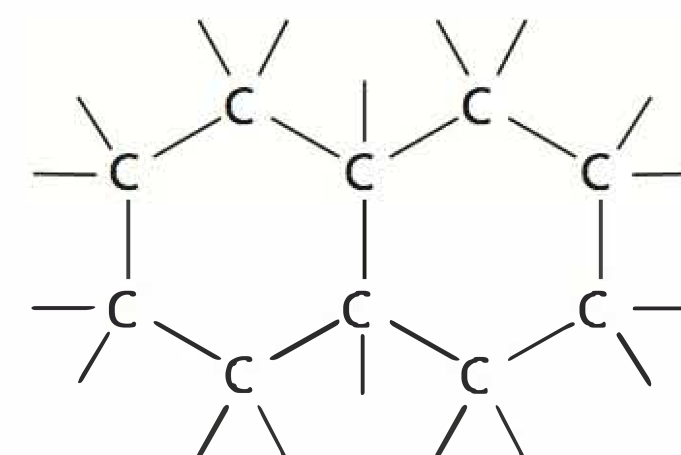
Também escrito como 

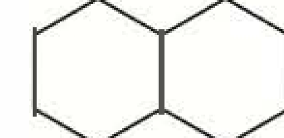
ou árvores ramificadas



Também escrito como 

ou anéis.



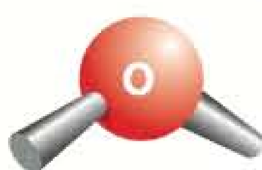
Também escrito como 

LIGAÇÕES COVALENTES

Há formação de uma ligação covalente quando dois átomos ficam muito próximos um do outro e compartilham um ou mais elétrons. Na ligação simples, há o compartilhamento de um elétron de cada um dos dois átomos participantes da ligação. Na ligação dupla, há o compartilhamento de um total de quatro elétrons.
Cada átomo forma um número fixo de ligações covalentes com um arranjo espacial bem-definido. Por exemplo, o carbono forma quatro ligações simples organizadas segundo um tetraedro, enquanto o nitrogênio forma três ligações simples, e o oxigênio, duas ligações simples, cujo arranjo é mostrado a seguir.





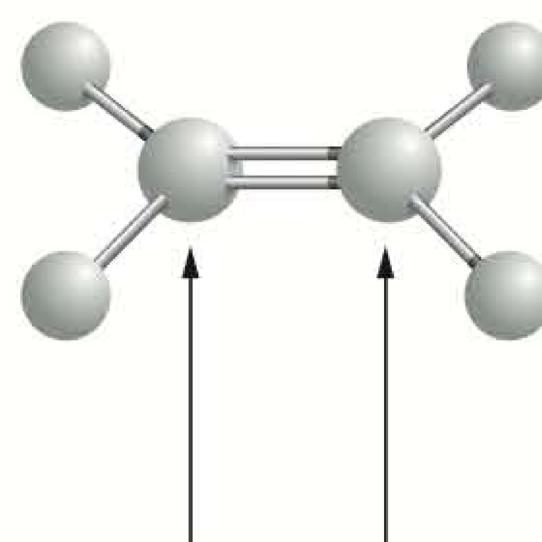


Existem ligações duplas e elas apresentam um arranjo espacial diferente.





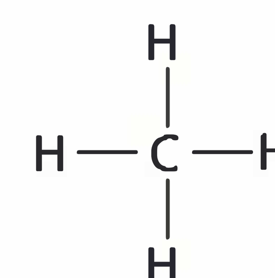




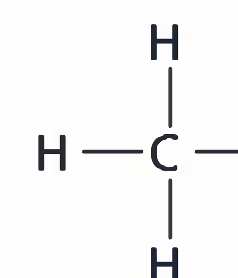
Os átomos ligados por duas ou mais ligações covalentes não podem girar livremente ao redor do eixo da ligação. Essa restrição tem grande influência na forma tridimensional de muitas macromoléculas.

HIDROCARBONETOS

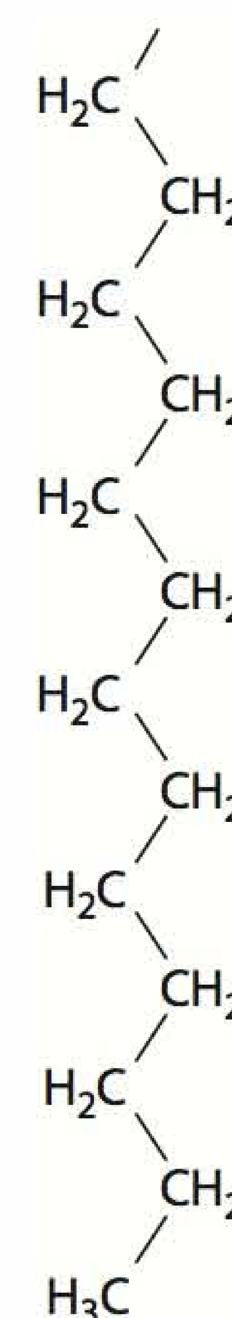
O carbono e o hidrogênio combinam-se entre si para formar compostos estáveis (ou grupos químicos) denominados hidrocarbonetos. Eles são não-polares, não formam ligações de hidrogênio e, geralmente, são insolúveis em água.



Metano



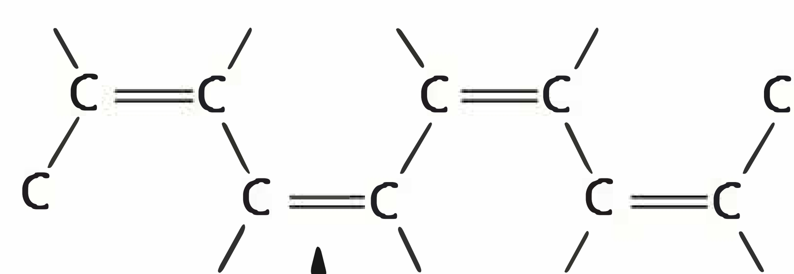
Grupo metila



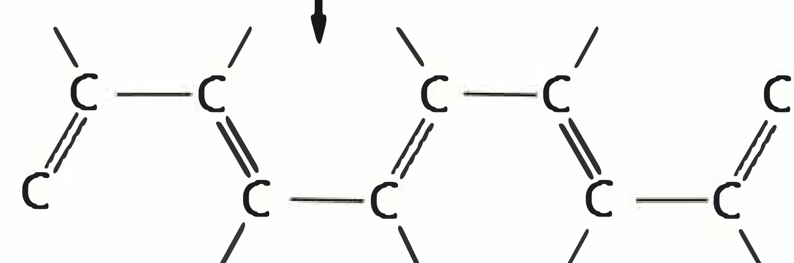
Parte da "cauda" hidrocarbonada de uma molécula de ácido graxo

LIGAÇÕES DUPLAS ALTERNADAS

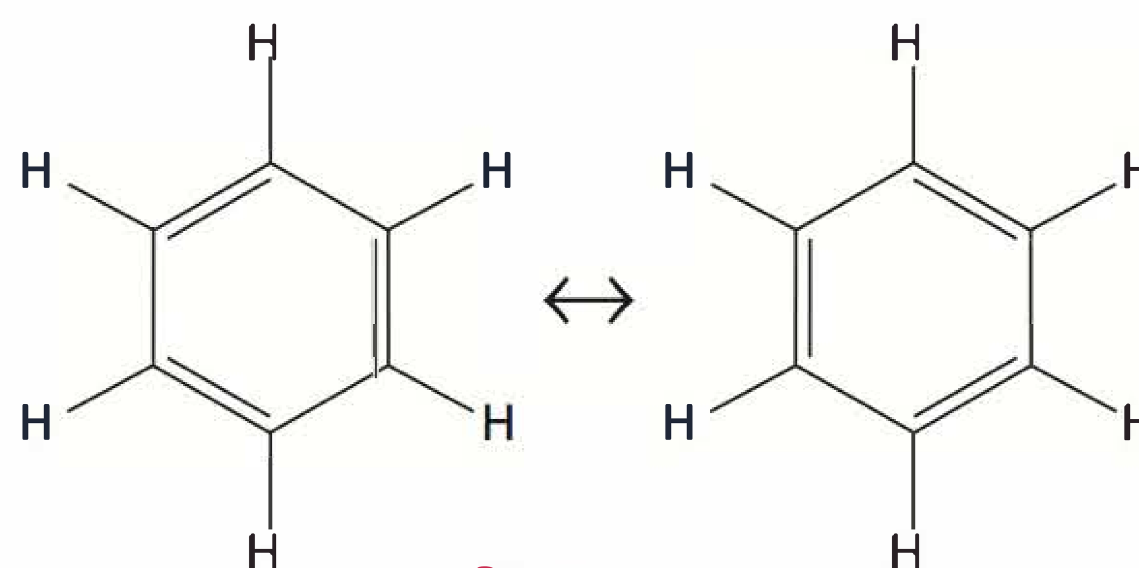
As cadeias de carbono podem ter ligações duplas. Caso essas ligações estejam em átomos de carbono alternados, os elétrons das ligações movem-se pela molécula e estabilizam a estrutura, fenômeno denominado ressonância.



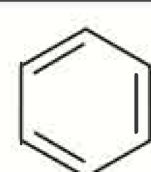
A estrutura real está em algum lugar entre essas duas estruturas



A alternância de ligações duplas em um anel pode gerar estruturas muito estáveis.

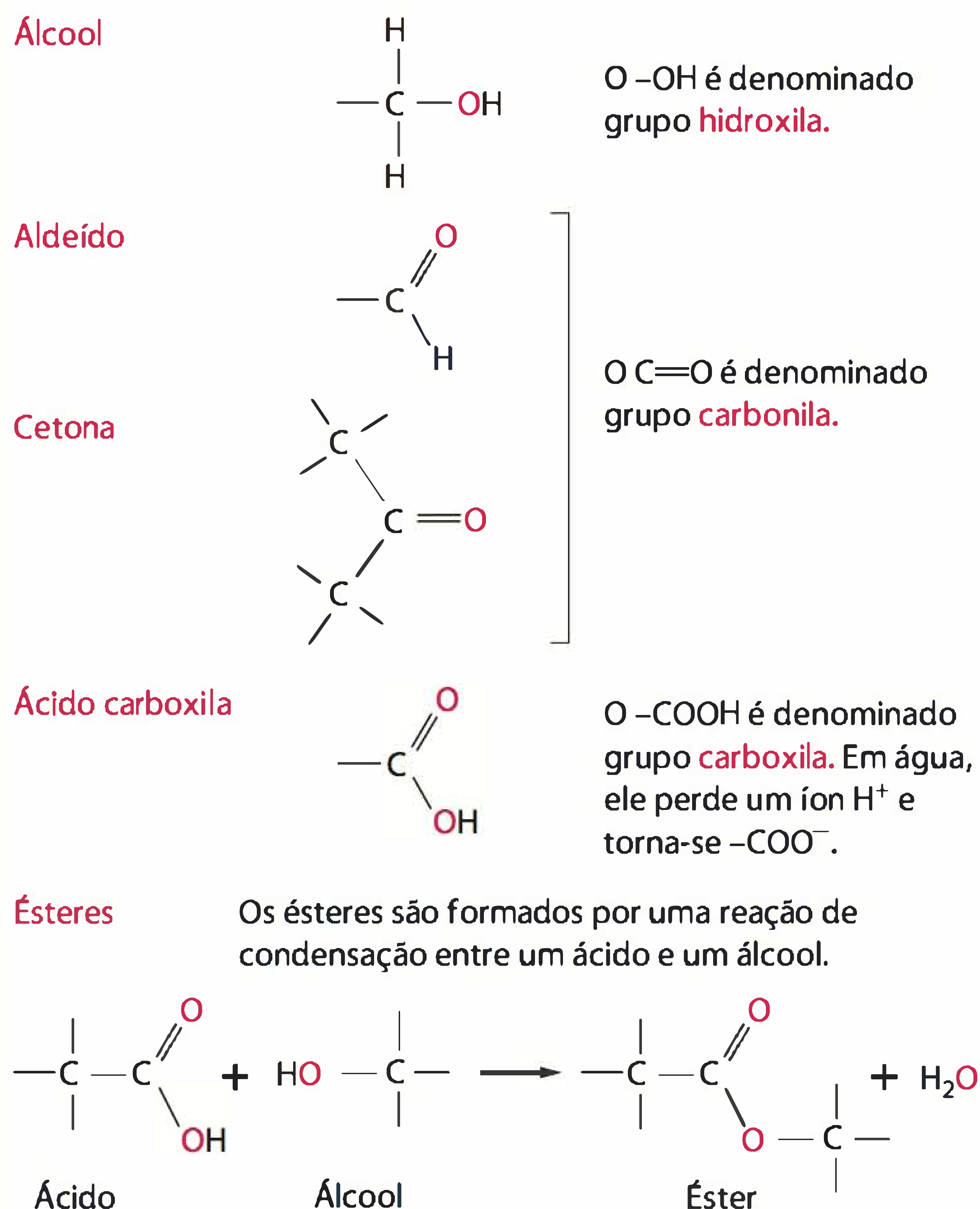


Benzeno

Também escrito como 

GRUPOS QUÍMICOS C–O

Muitos compostos biológicos contêm um carbono ligado a um oxigênio. Por exemplo,







O –OH é denominado grupo hidroxila.

O C═O é denominado grupo carbonila.

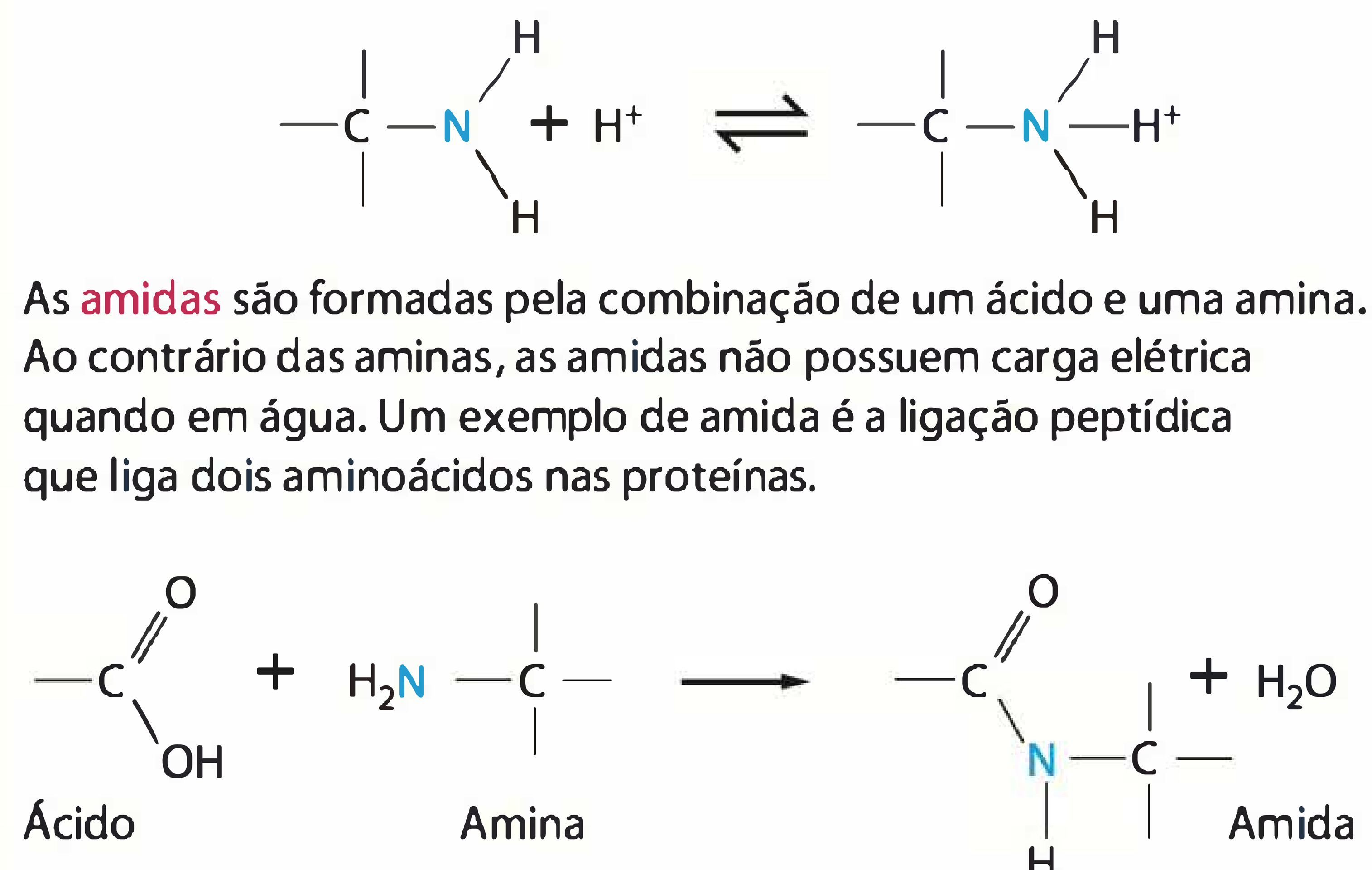
O –COOH é denominado grupo carboxila. Em água, ele perde um íon H^+ e torna-se $-COO^-$.

Os ésteres são formados por uma reação de condensação entre um ácido e um álcool.

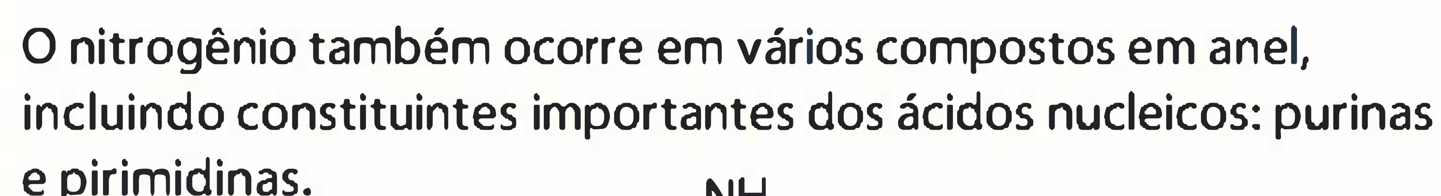
GRUPOS QUÍMICOS C–N

As aminas e as amidas são exemplos importantes de compostos que contêm um carbono ligado a um nitrogênio.

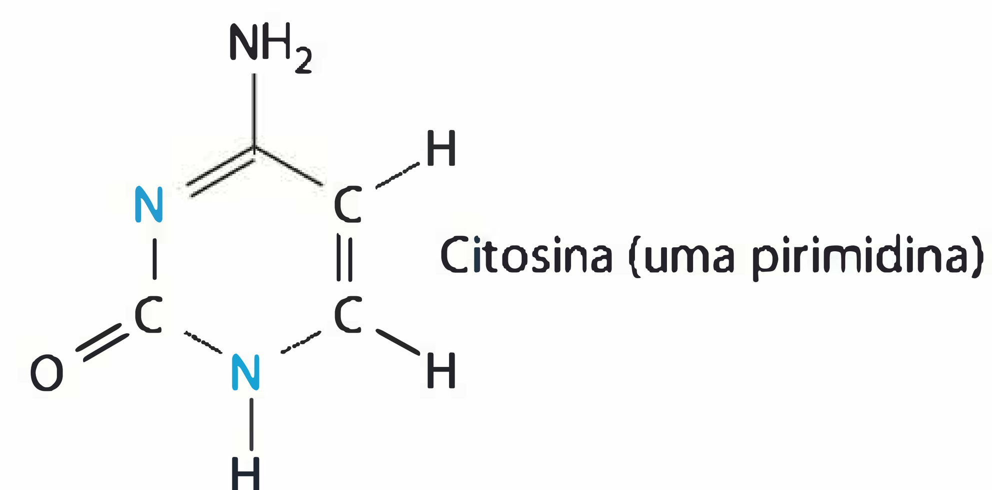
As aminas, em água, combinam-se com um íon H^+ e ficam carregadas positivamente.



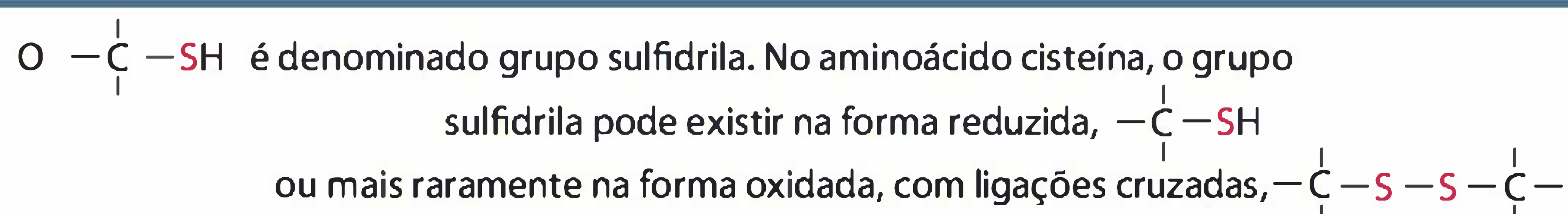
As amidas são formadas pela combinação de um ácido e uma amina. Ao contrário das aminas, as amidas não possuem carga elétrica quando em água. Um exemplo de amida é a ligação peptídica que liga dois aminoácidos nas proteínas.



O nitrogênio também ocorre em vários compostos em anel, incluindo constituintes importantes dos ácidos nucleicos: purinas e pirimidinas.



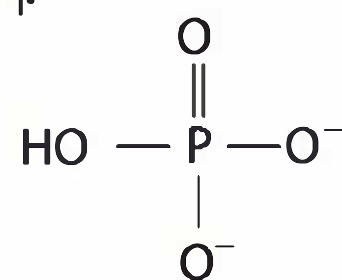
GRUPO SULFIDRILA



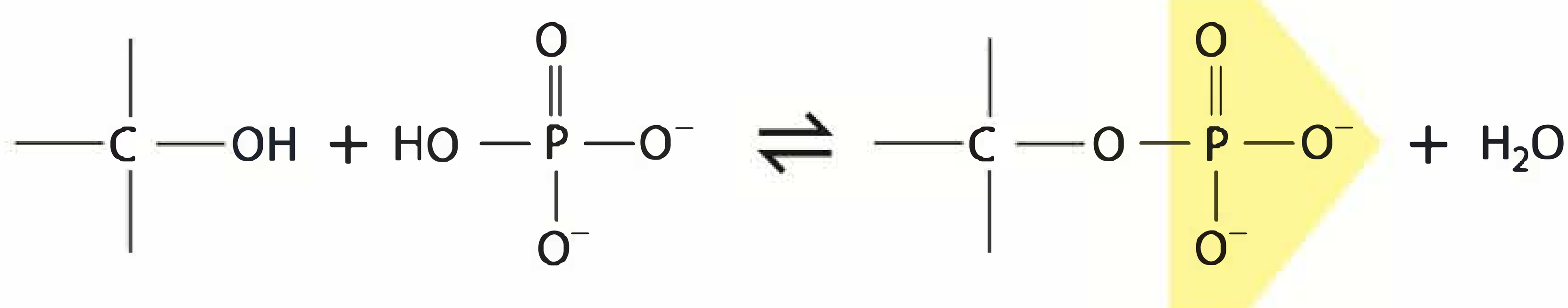
O –C–SH é denominado grupo sulfidrila. No aminoácido cisteína, o grupo sulfidrila pode existir na forma reduzida, –C–SH ou mais raramente na forma oxidada, com ligações cruzadas, –C–S–S–C–

FOSFATOS

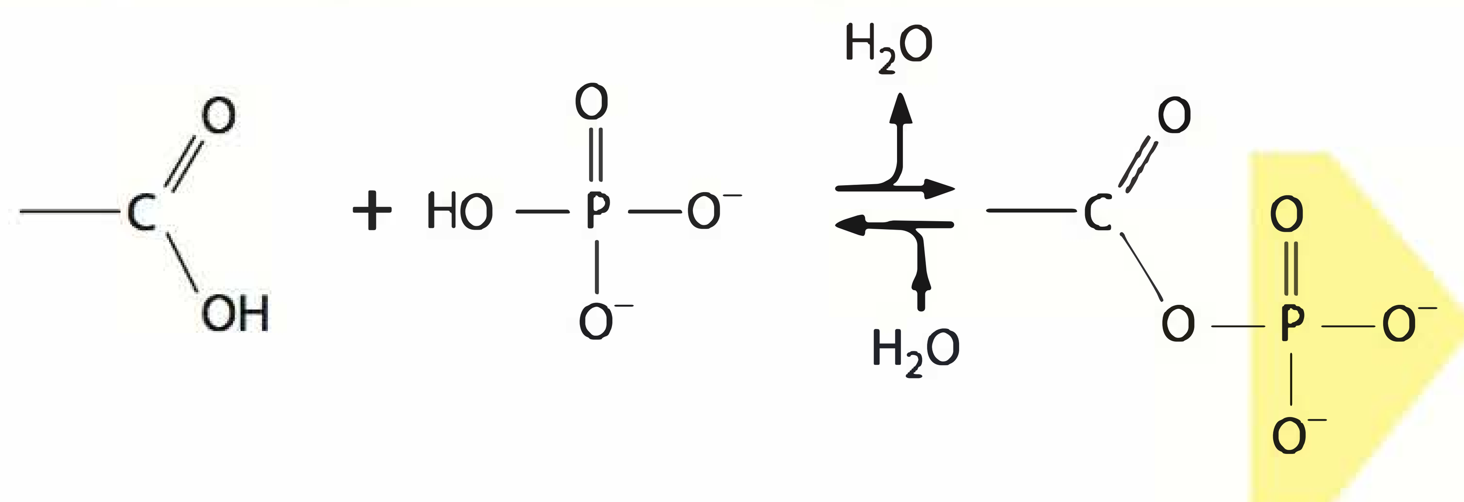
O fosfato inorgânico é um íon estável formado a partir do ácido fosfórico, H_3PO_4. Frequentemente, é escrito como P_i.



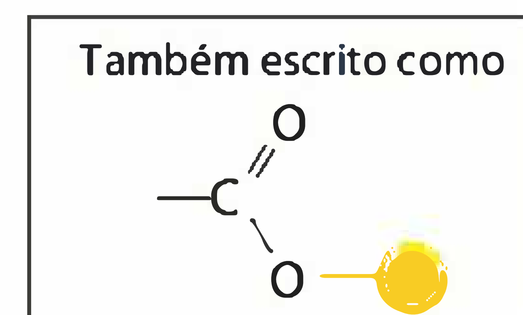
Entre um fosfato e um grupo hidroxila livre pode ser formado um éster de fosfato. Os grupos fosfato são frequentemente ligados a proteínas desta maneira.

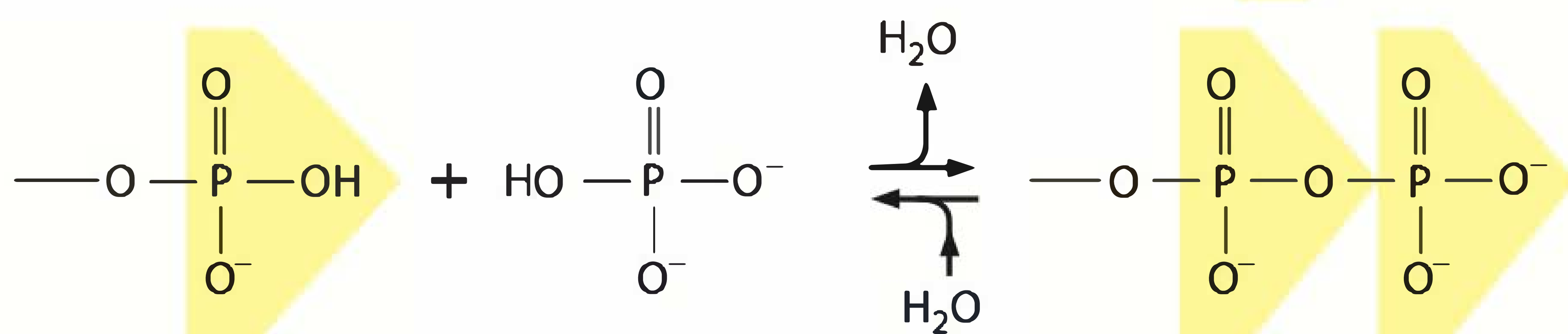


A combinação de um grupo fosfato e de um grupo carboxila, ou de dois ou mais grupos fosfato, produz um anidrido ácido.



Ligação acil fosfato rica em energia (anidrido ácido carboxílico-fosfórico) encontrada em alguns metabólitos.



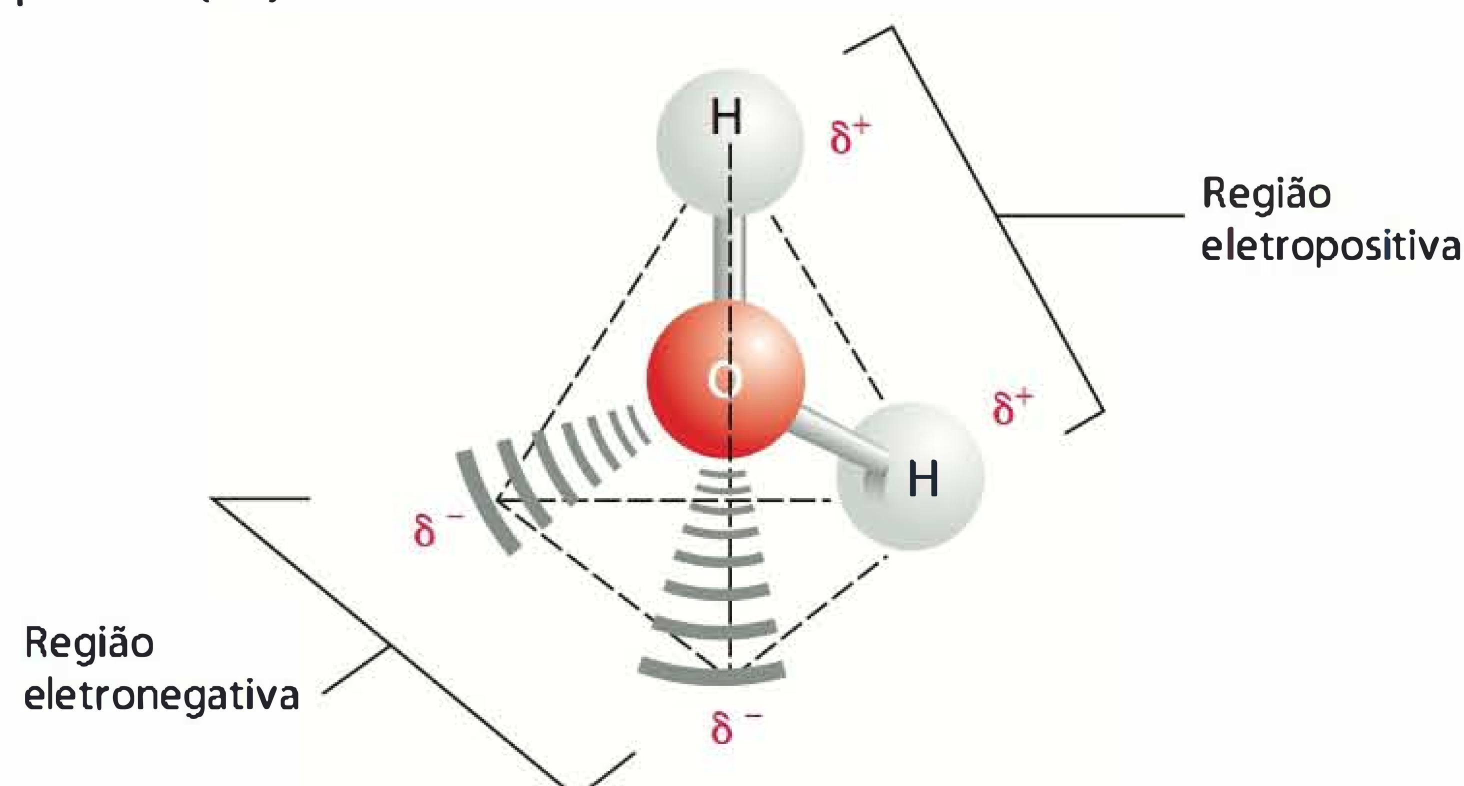


Anidrido fosfórico, uma ligação rica em energia encontrada em moléculas como o ATP.



ÁGUA

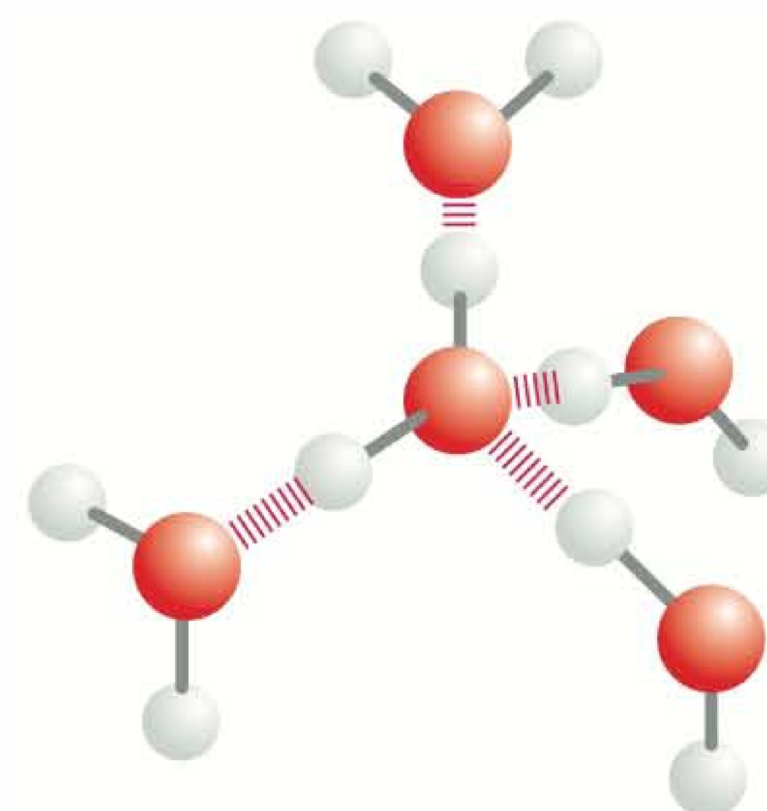
Dois átomos que estejam ligados por uma ligação covalente podem exercer atrações diferentes sobre os elétrons da ligação. Nesses casos, a ligação é polar, sendo que uma das extremidades tem uma carga levemente negativa (δ^-) e a outra tem uma carga levemente positiva (δ^+).



Embora a molécula de água tenha uma carga absoluta neutra (pois tem o mesmo número de elétrons e prótons), os elétrons distribuem-se assimetricamente, fazendo com que a molécula seja polar. O núcleo de oxigênio atrai elétrons do núcleo de hidrogênio, deixando-o com uma pequena carga líquida positiva. A densidade eletrônica excessiva do átomo de oxigênio cria regiões negativas fracas nas extremidades de dois cantos de um tetraedro imaginário.

ESTRUTURA DA ÁGUA

As moléculas de água juntam-se transitoriamente entre si por meio de uma rede de ligações de hidrogênio. Mesmo a 37°C, 15% das moléculas de água são mantidos unidos a quatro outras moléculas de água em um arranjo de vida curta conhecido como "agregado oscilante".

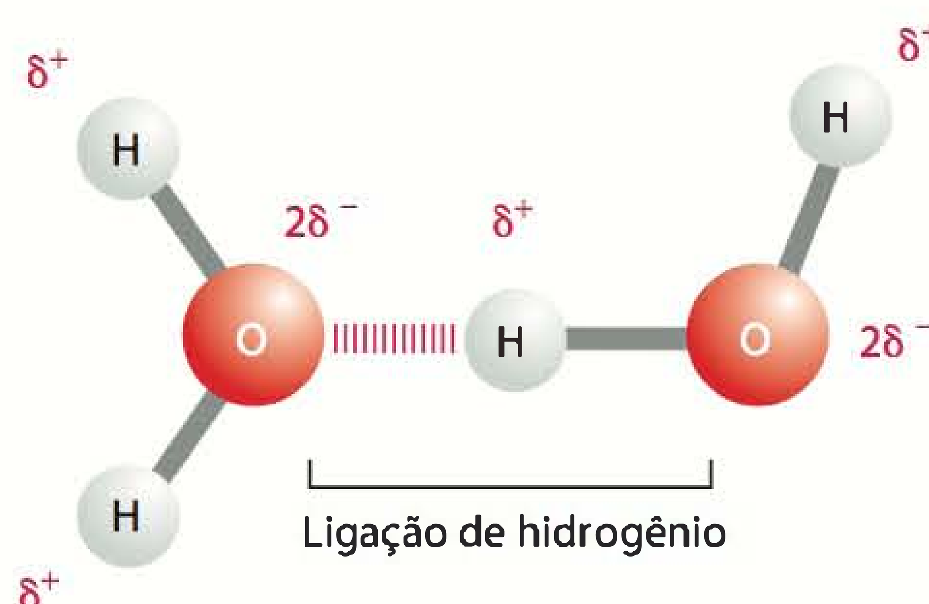


A natureza coesiva da água é responsável por muitas das suas propriedades incomuns, como a alta tensão superficial, o calor específico e o calor de vaporização.

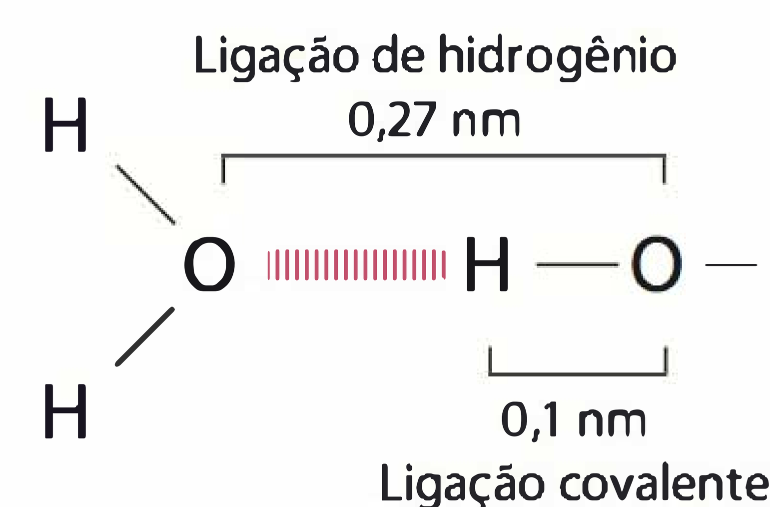
LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO

Como são polarizadas, duas moléculas adjacentes de H_2O podem formar uma ligação conhecida como ligação de hidrogênio. As ligações de hidrogênio têm apenas 1/20 da intensidade de uma ligação covalente.

As ligações de hidrogênio são mais fortes quando os três átomos estão alinhados.

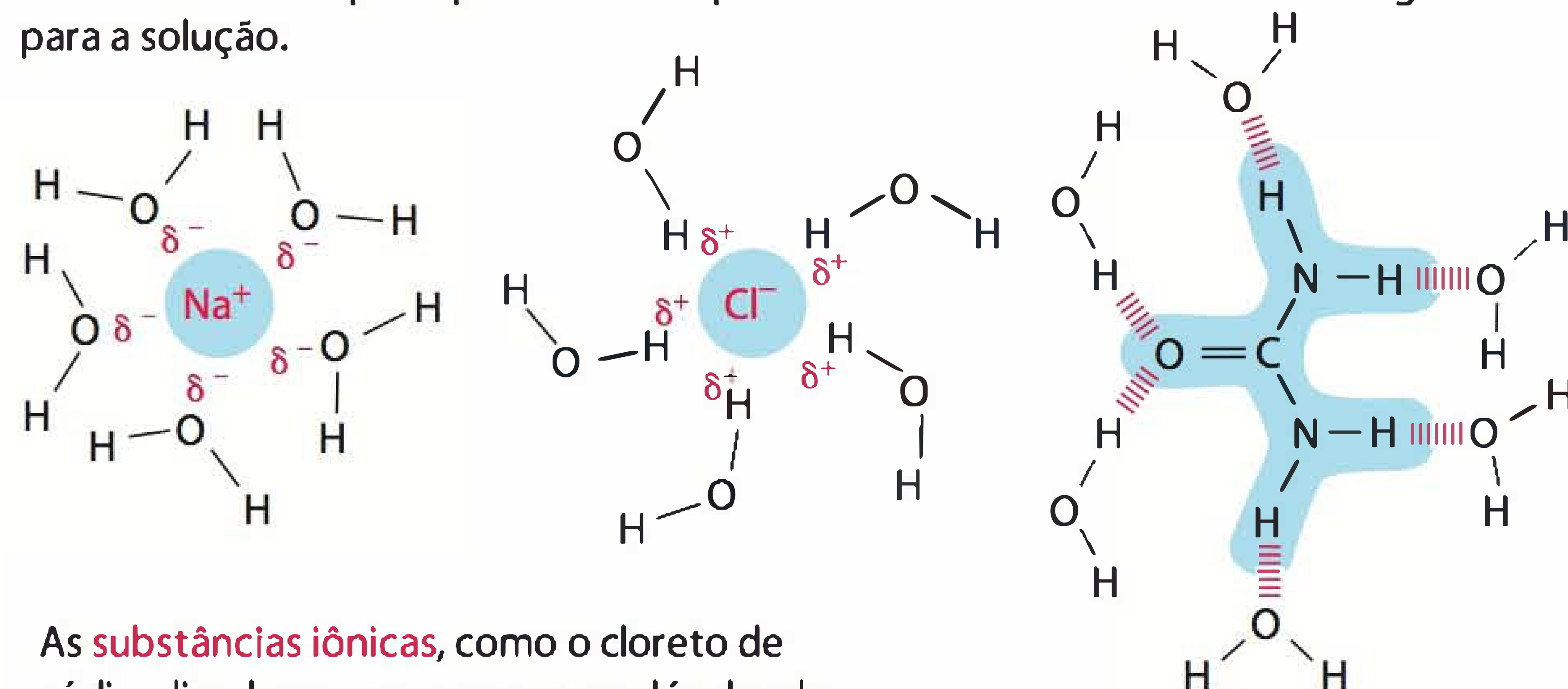


Comprimento das ligações



MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS

As substâncias que se dissolvem facilmente em água são denominadas hidrofílicas. São compostas por íons e moléculas polares que atraem moléculas de água por meio dos efeitos das cargas elétricas. As moléculas de água rodeiam cada íon ou cada molécula polar presente na superfície de substâncias sólidas e carregam-nas para a solução.

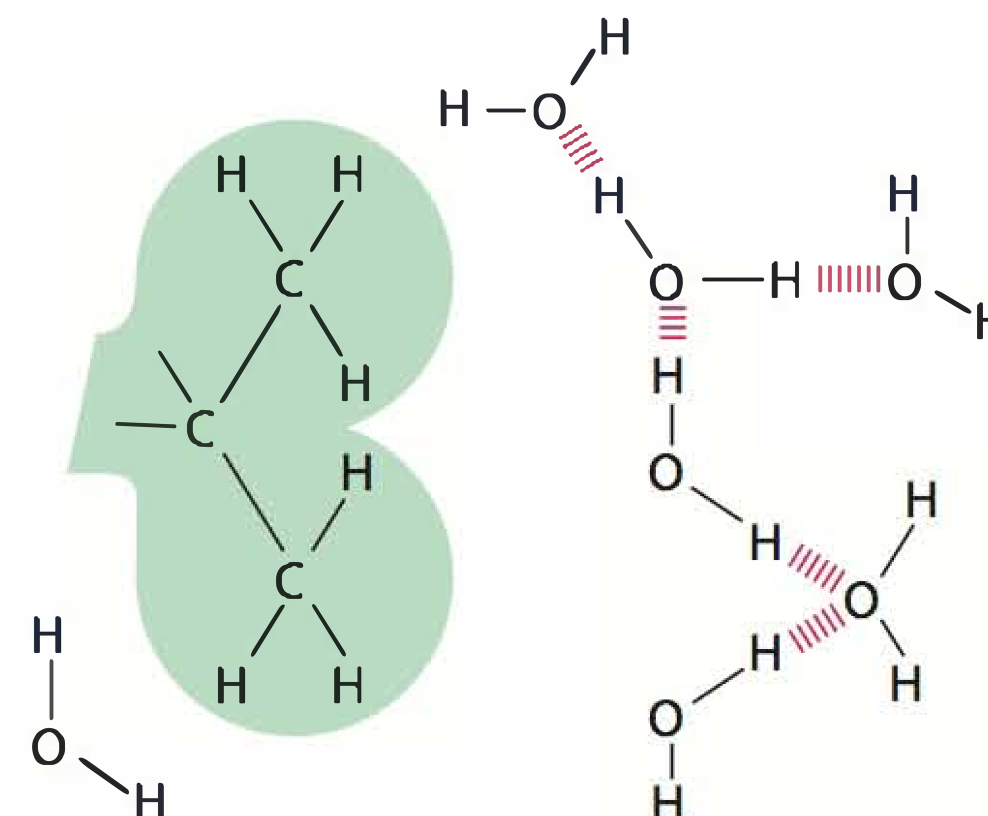


As substâncias iônicas, como o cloreto de sódio, dissolvem-se porque as moléculas de água são atraídas para a carga positiva (Na^+) ou para a carga negativa (Cl^-) de cada íon.

As substâncias polares, como a ureia, dissolvem-se porque suas moléculas formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água que as rodeiam.

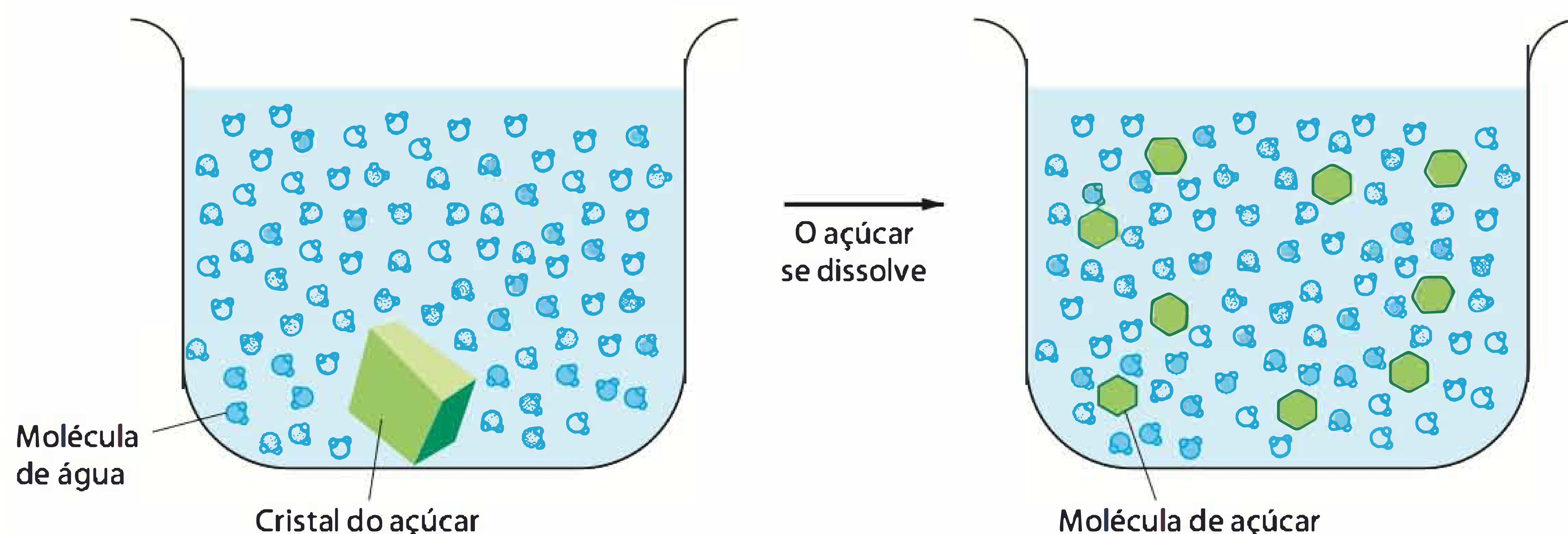
MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS

As moléculas com preponderância de ligações não-covalentes geralmente são insolúveis em água e são denominadas hidrofóbicas. Isso é verdadeiro principalmente para os hidrocarbonetos, que contêm muitas ligações C–H. As moléculas de água não são atraídas por esse tipo de moléculas e, assim, a água tem pouca tendência em circundar e carregar essas moléculas para a solução.



A ÁGUA COMO SOLVENTE

Muitas substâncias, como o açúcar comum, dissolvem-se em água. Isto é, suas moléculas separam-se umas das outras, sendo que cada uma delas fica rodeada por moléculas de água.



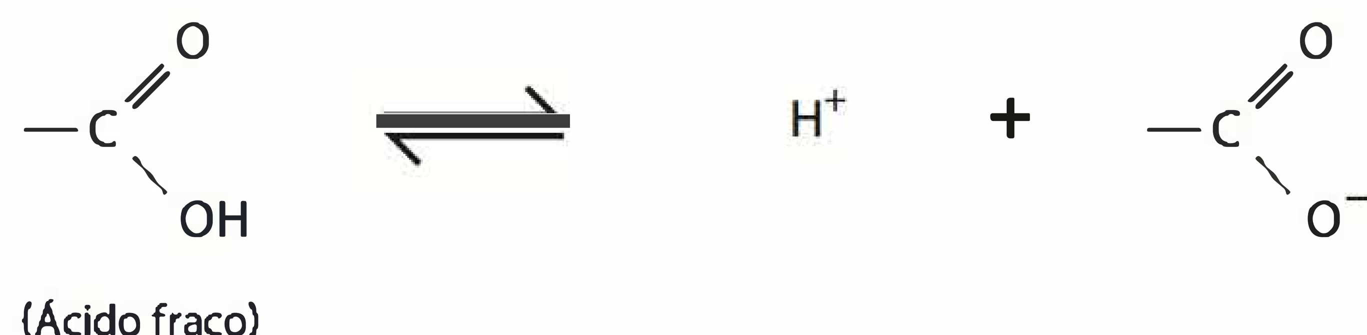
Quando uma substância dissolve-se em um líquido, a mistura é denominada solução. A substância dissolvida (o açúcar, neste caso) é o soluto, e o líquido no qual ele se dissolve (a água, neste caso) é o solvente. A água é um solvente excelente para muitas substâncias devido as suas ligações polares.

ÁCIDOS

Substâncias que, em solução, liberam íons hidrogênio são chamadas de ácidos.



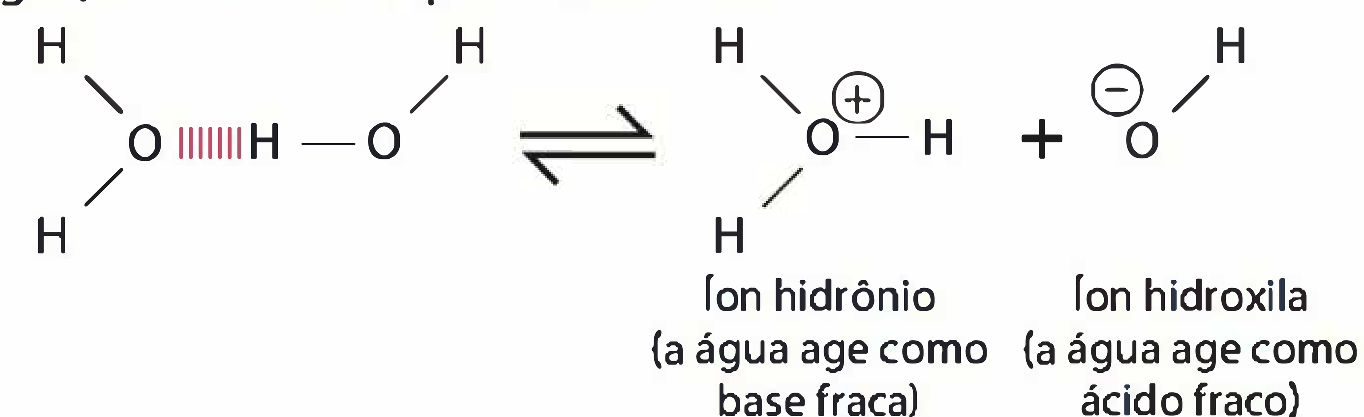
Muitos dos ácidos importantes para as células dissociam-se apenas parcialmente, sendo, assim, ácidos fracos.
Por exemplo, o grupo carboxila (–COOH) dissocia-se liberando um íon hidrogênio para a solução.

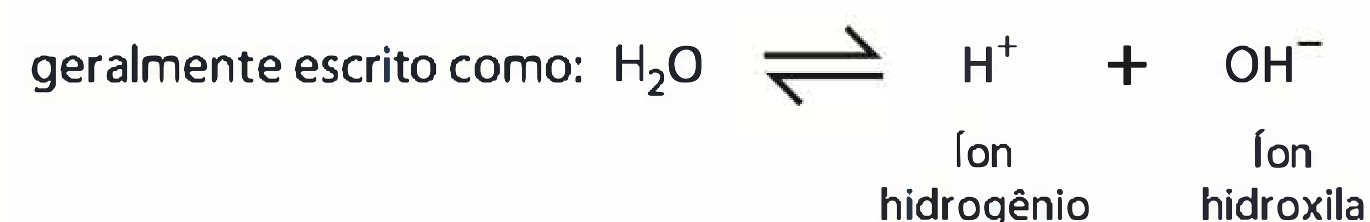


Observe que esta é uma reação reversível.

TROCAS DE ÍON HIDROGÊNIO

O íon hidrogênio (H^+), carregado positivamente, pode passar espontaneamente de uma a outra molécula de água, criando dois espécimes de íons



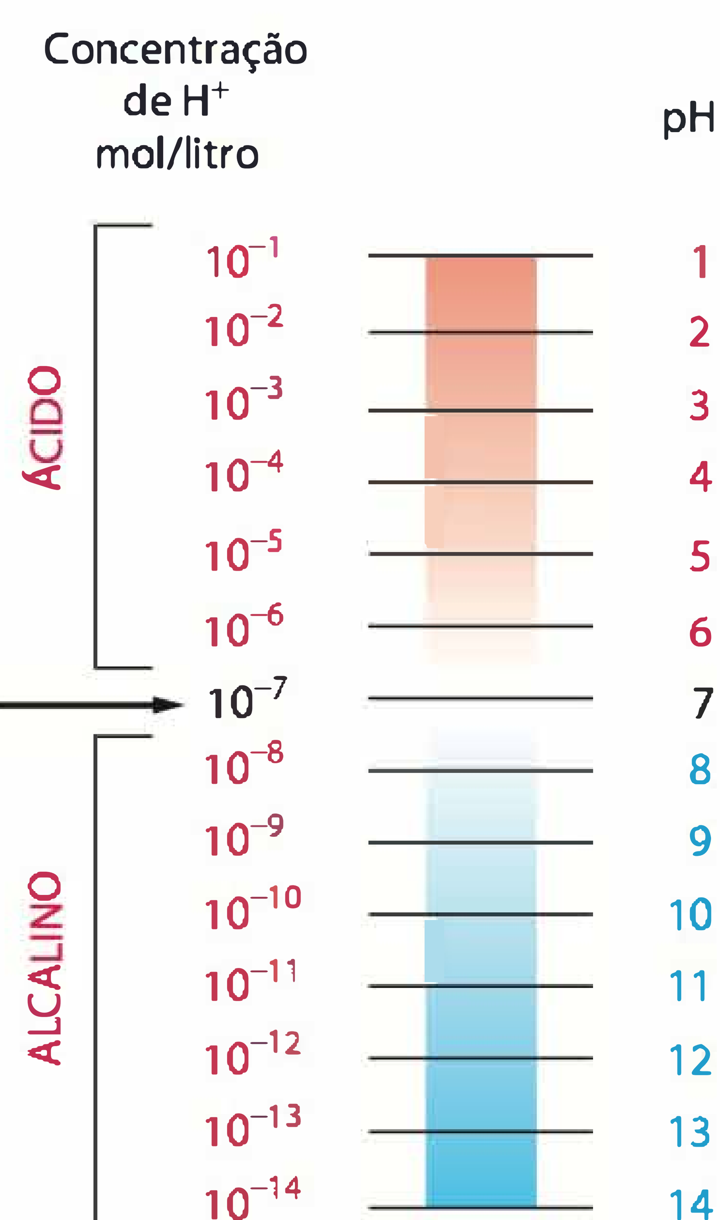


Uma vez que esse processo é facilmente reversível, os íons hidrogênio estão constantemente cambiando-se entre as moléculas de água. A água pura contêm uma concentração constante de íons hidrogênio e de íons hidroxila (10^{-7} M cada um).

pH

A acidez de uma solução é definida pela concentração de íons H^+ que ela possui. Por conveniência, usa-se a escala de pH, onde

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$



Para água pura

$[H^+] = 10^{-7}$ mol/litro

BASES

Substâncias que fazem com que o número de íons hidrogênio das soluções diminua são denominadas bases. Algumas bases, como a amônia, combinam-se diretamente com íons hidrogênio.



Outras bases, como o hidróxido de sódio, reduzem o número de íons H^+ de maneira indireta por produzirem íons OH^- que então combinam-se diretamente com íons H^+, formando H_2O.

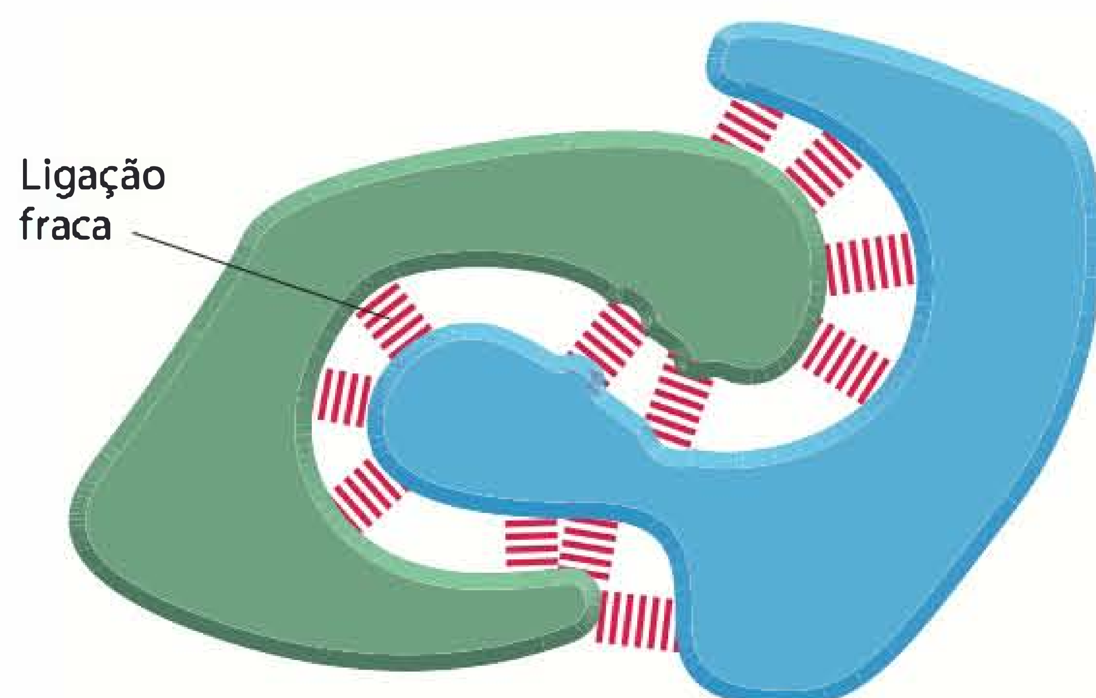


Muitas das bases encontradas nas células dissociam-se parcialmente e são denominadas bases fracas. Isso acontece com compostos que contenham um grupo amino ($-NH_2$), que tem uma tendência fraca em aceitar de maneira reversível um íon H^+ da água, aumentando, assim, a quantidade de íons OH^- livres.



LIGAÇÕES QUÍMICAS FRACAS

As moléculas orgânicas podem interagir com outras moléculas por meio de três tipos de forças atrativas de curta distância conhecidas como *ligações não-covalentes*: atrações de van der Waals, atrações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. A repulsão de grupos hidrofóbicos pela água é importante na organização das moléculas biológicas.



As ligações químicas fracas têm menos de 1/20 da intensidade de uma ligação covalente, que é uma ligação forte. Elas têm força suficiente para fazer uma associação forte apenas quando estiverem em grande numero simultaneamente.

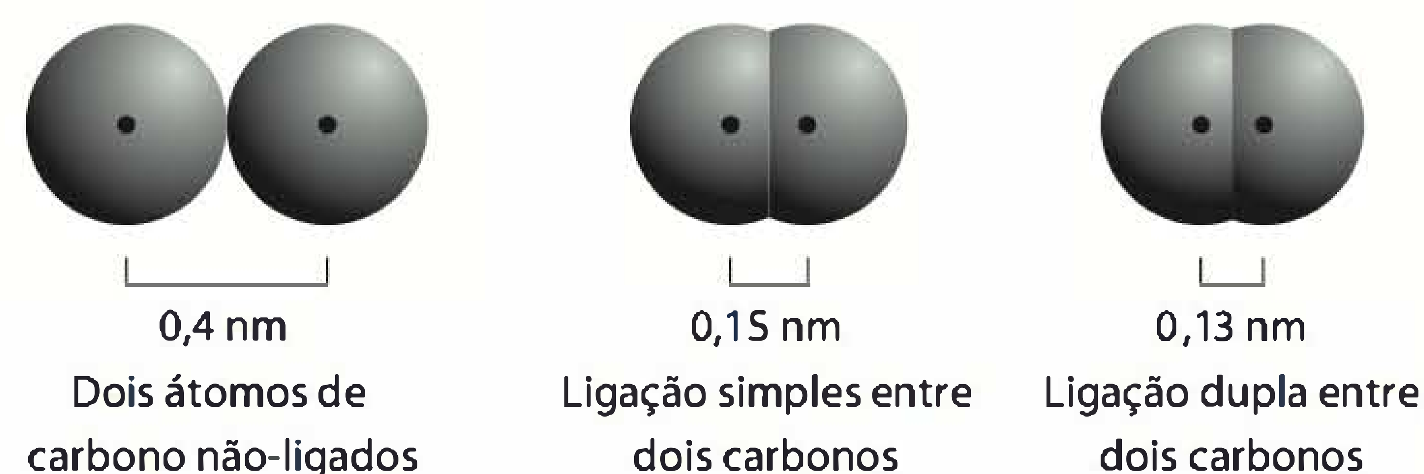
ATRAÇÕES DE VAN DER WAALS

Se dois átomos estiverem muito próximos, eles terão uma repulsão recíproca muito forte. Devido a isso, geralmente um átomo pode ser tratado como uma esfera de raio fixo. O "tamanho" característico de cada átomo é determinado pelo raio de van der Waals específico de cada um. A distância entre dois átomos quaisquer que estiverem ligados por ligações não-covalentes será a soma dos seus raios de van der Waals.



Em distâncias muito curtas, cada um dos dois átomos apresenta interações de ligações fracas porque suas cargas elétricas flutuam. Dessa maneira, os dois átomos serão atraídos um ao outro até que a distancia entre seus núcleos seja aproximadamente igual à soma dos seus raios de van der Waals. Embora individualmente as atrações de van der Waals sejam muito fracas, elas, devido ao envolvimento de muitos átomos, tornam-se importantes caso as superfícies de duas macromoléculas puderem se encaixar muito proximamente.

Observe que, quando dois átomos estiverem formando uma ligação covalente, o centro dos dois átomos (os dois núcleos atômicos) estarão muito mais próximos do que a soma dos dois raios de van der Waals. Assim,



LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO

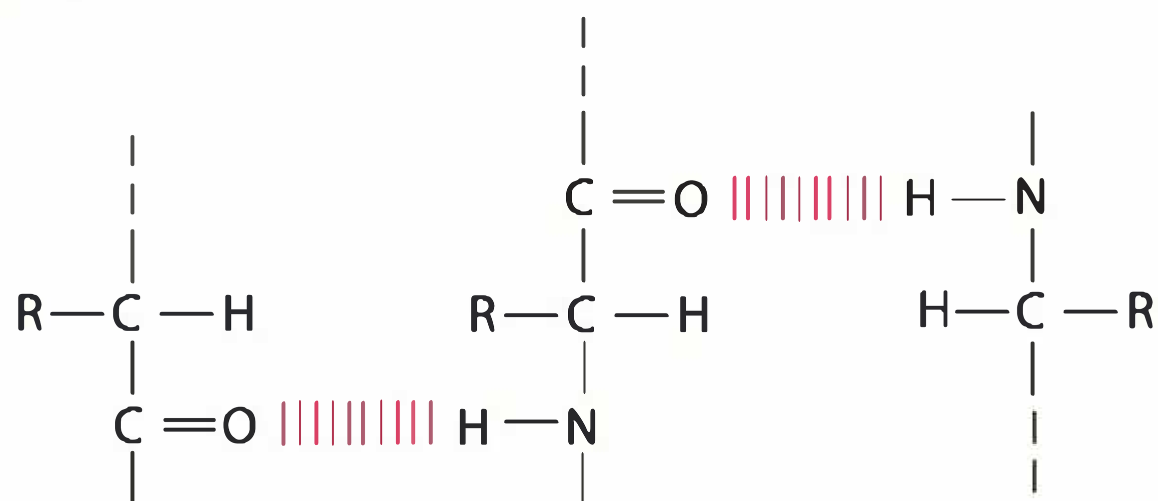
Como anteriormente descrito (ver Painel 2-2), há formação de uma ligação de hidrogênio quando um átomo de hidrogênio é "prensado" entre dois átomos que atraem elétrons, geralmente oxigênio ou nitrogênio.

A ligação de hidrogênio é mais forte quando os três átomos estiverem alinhados em uma reta.

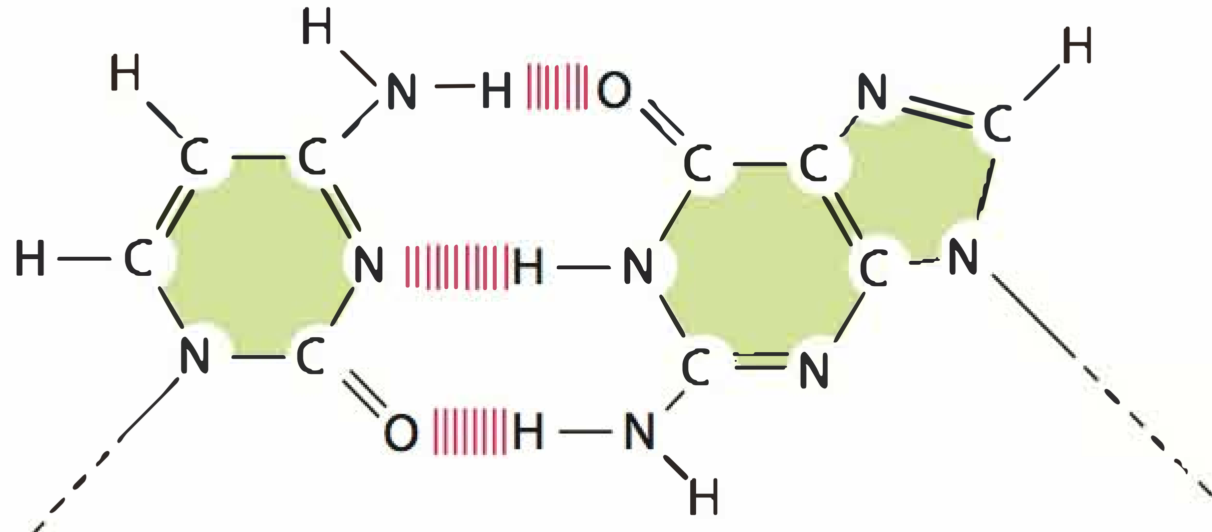


Exemplos em macromoléculas:

Aminoácidos de cadeias polipeptídicas mantidos unidos por ligações de hidrogênio.

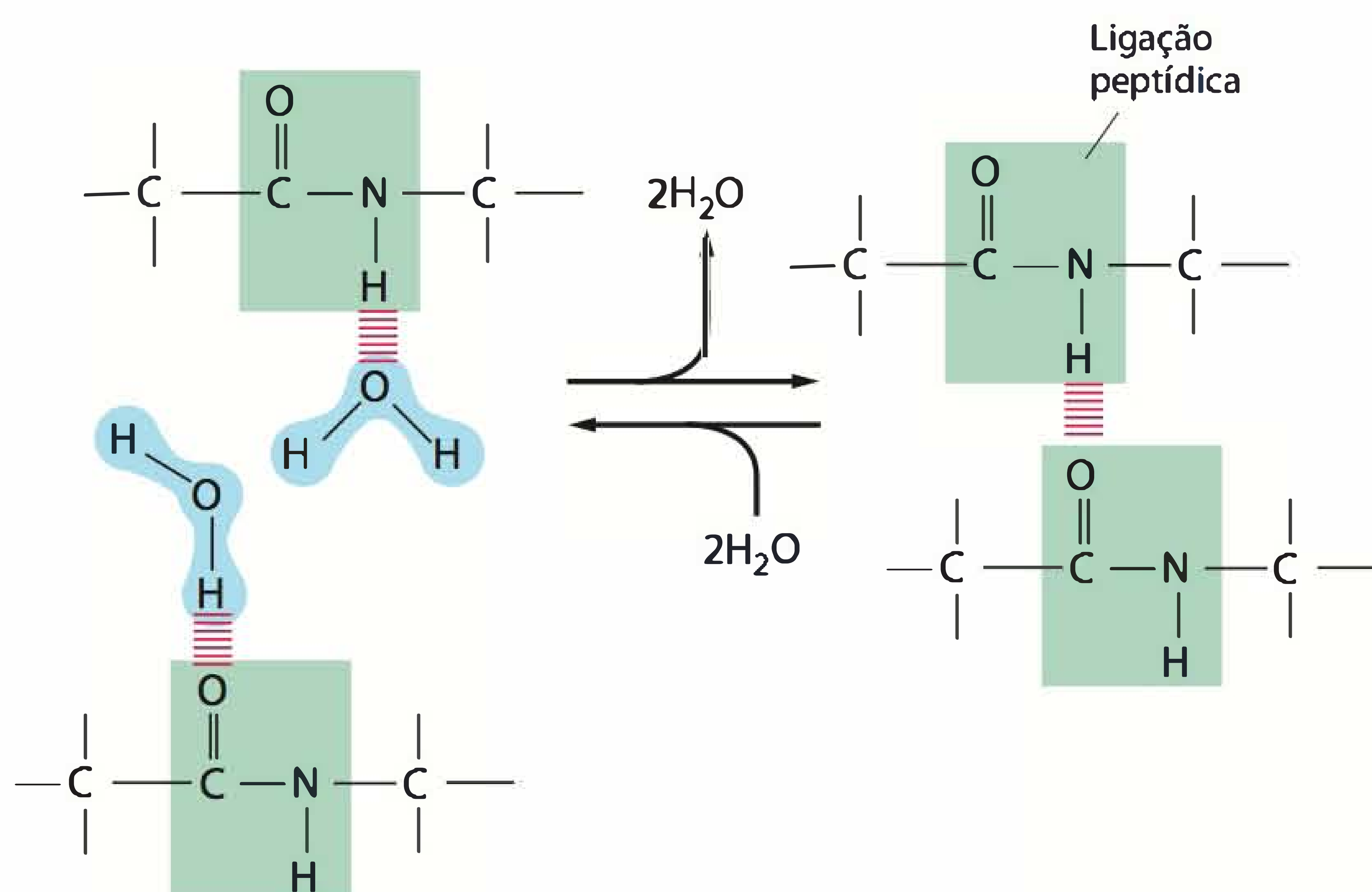


Duas bases, G e C, do DNA ou do RNA mantidas juntas por ligação de hidrogênio.

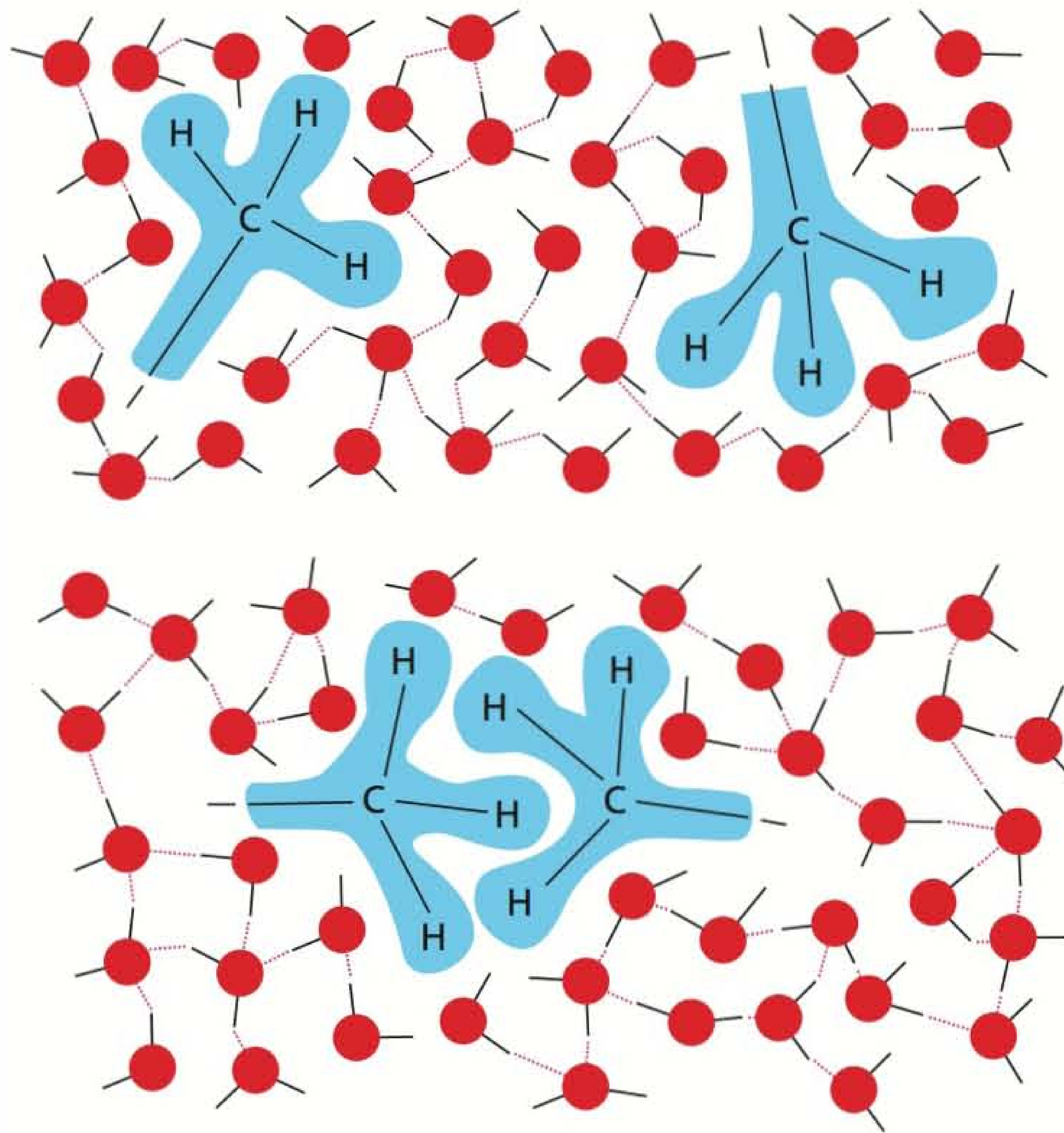


LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO NA ÁGUA

Moléculas que puderem formar ligações de hidrogênio entre si poderão, alternativamente, formar ligações de hidrogênio com moléculas de água. Devido a essa competição com as moléculas de água, as ligações de hidrogênio formadas entre duas moléculas dissolvidas em água são relativamente fracas.



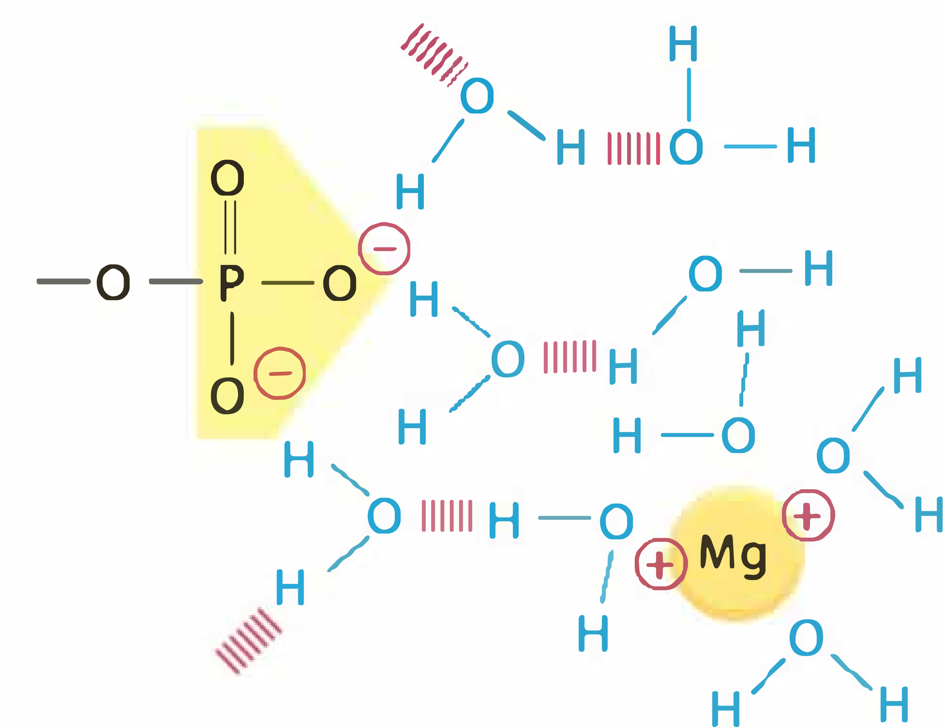
FORÇAS HIDROFÓBICAS



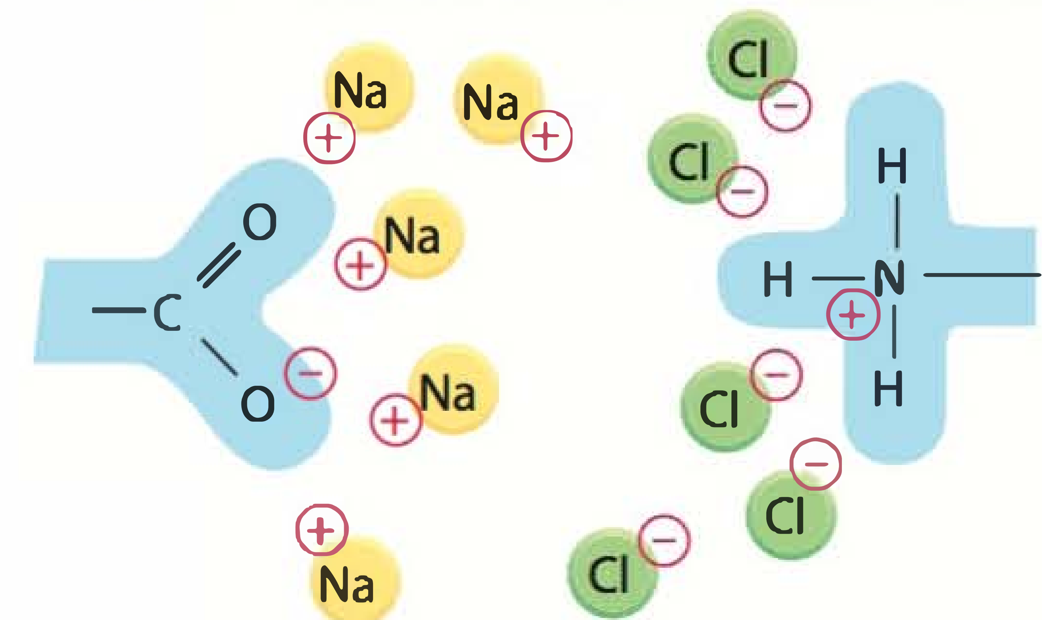
A água força os grupos hidrofóbicos a ficarem juntos porque, ao fazer isso, diminui os efeitos de disrupção desses grupos na rede de água mantida por ligações de hidrogênio. Algumas vezes se diz que os grupos hidrofóbicos mantidos unidos dessa maneira são mantidos por "ligação hidrofóbica" embora, na verdade, a atração seja provocada pela repulsão da água.

ATRAÇÕES ELETROSTÁTICAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS

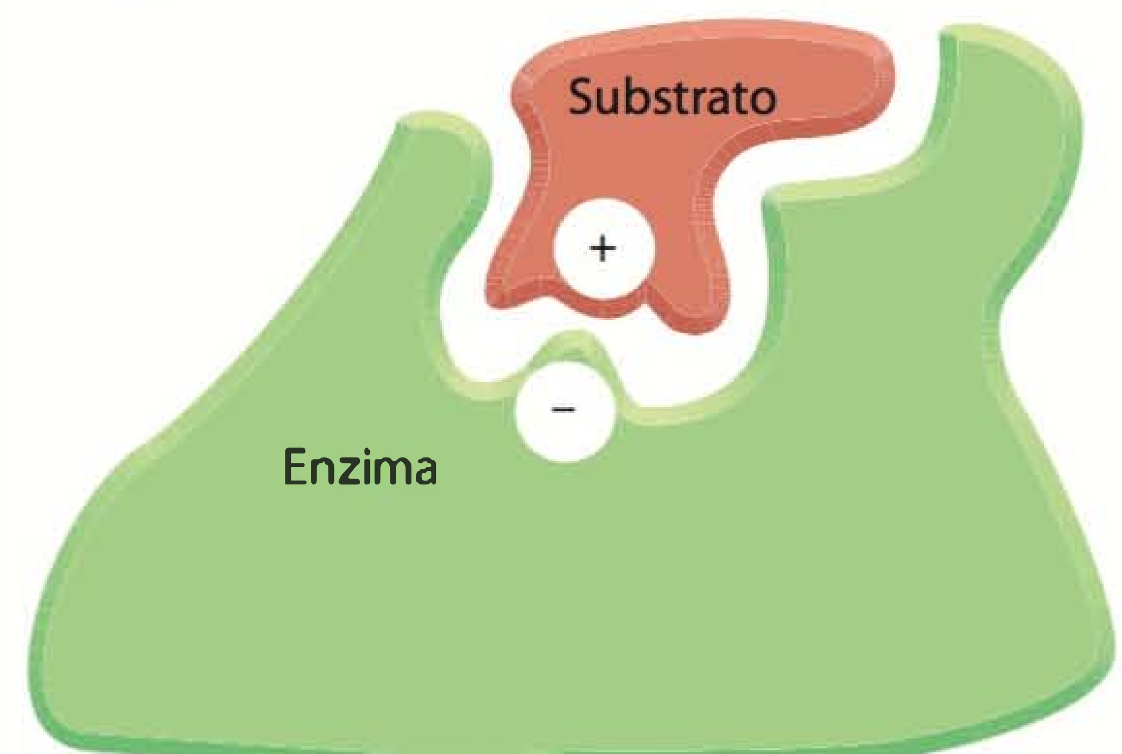
Os grupos carregados são protegidos pela interação com moléculas de água. Por isso, as atrações eletrostáticas são fracas em água.



De maneira semelhante, quando em solução, os íons podem agregar-se ao redor de grupos carregados e enfraquecer ainda mais essas atrações.



Apesar de serem enfraquecidas por água e por sais, as atrações eletrostáticas são muito importantes nos sistemas biológicos. Por exemplo, enzimas que liguem um substrato carregado positivamente em geral têm uma cadeia lateral de aminoácido carregada negativamente em um lugar apropriado.



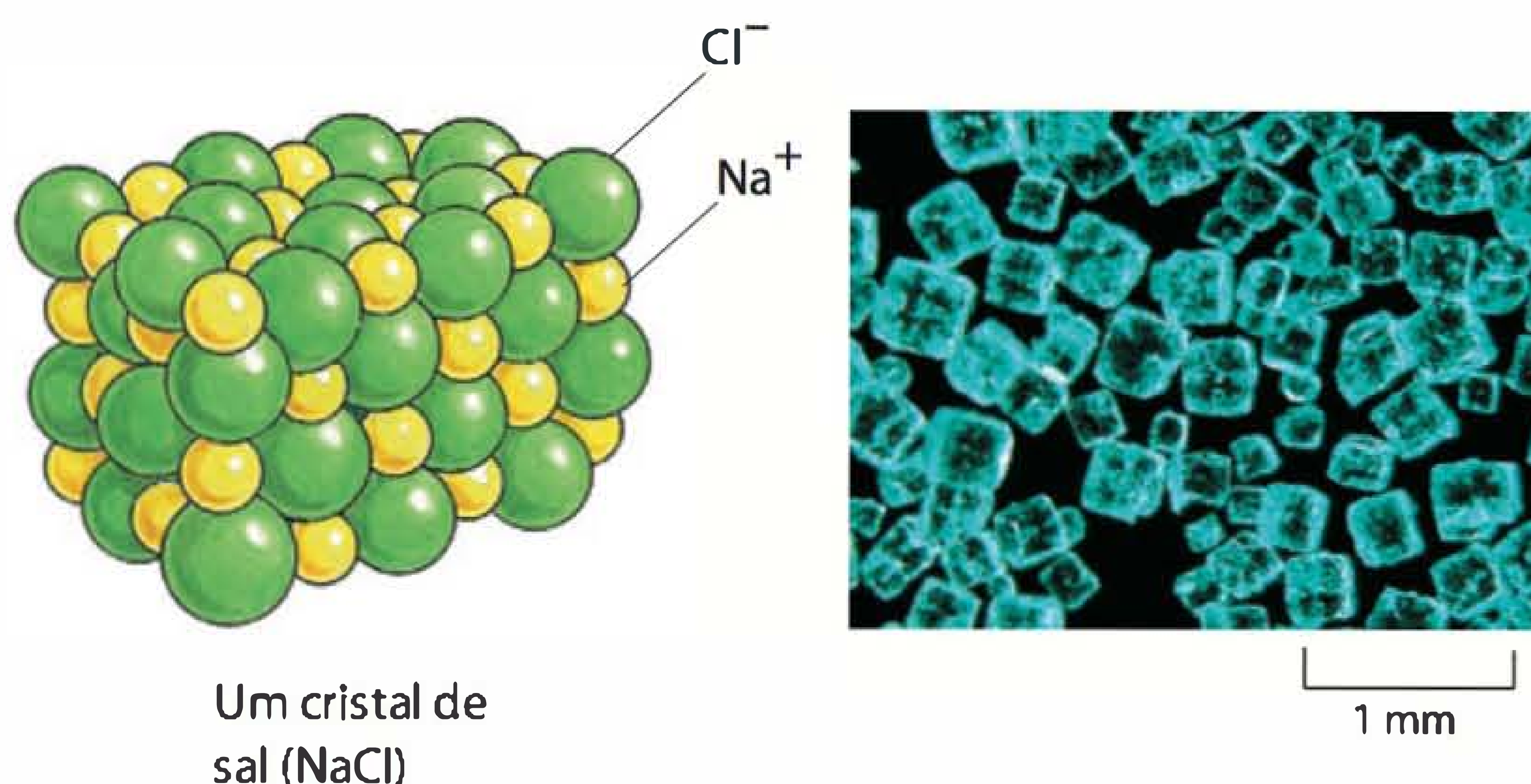
ATRAÇÕES ELETROSTÁTICAS

Forças de atração podem ocorrer entre grupos totalmente carregados (ligação iônica) e entre grupos parcialmente carregados ou moléculas polares.



A força de atração entre duas cargas, δ^+ e δ^-, diminui rapidamente à medida que a distância entre as cargas aumenta.

Na ausência de água, as forças eletrostáticas são muito fortes. Elas são responsáveis pela dureza de minerais como o mármore e a ágata, e também pela formação dos cristais de sal de cozinha, NaCl.



Um cristal de sal (NaCl)

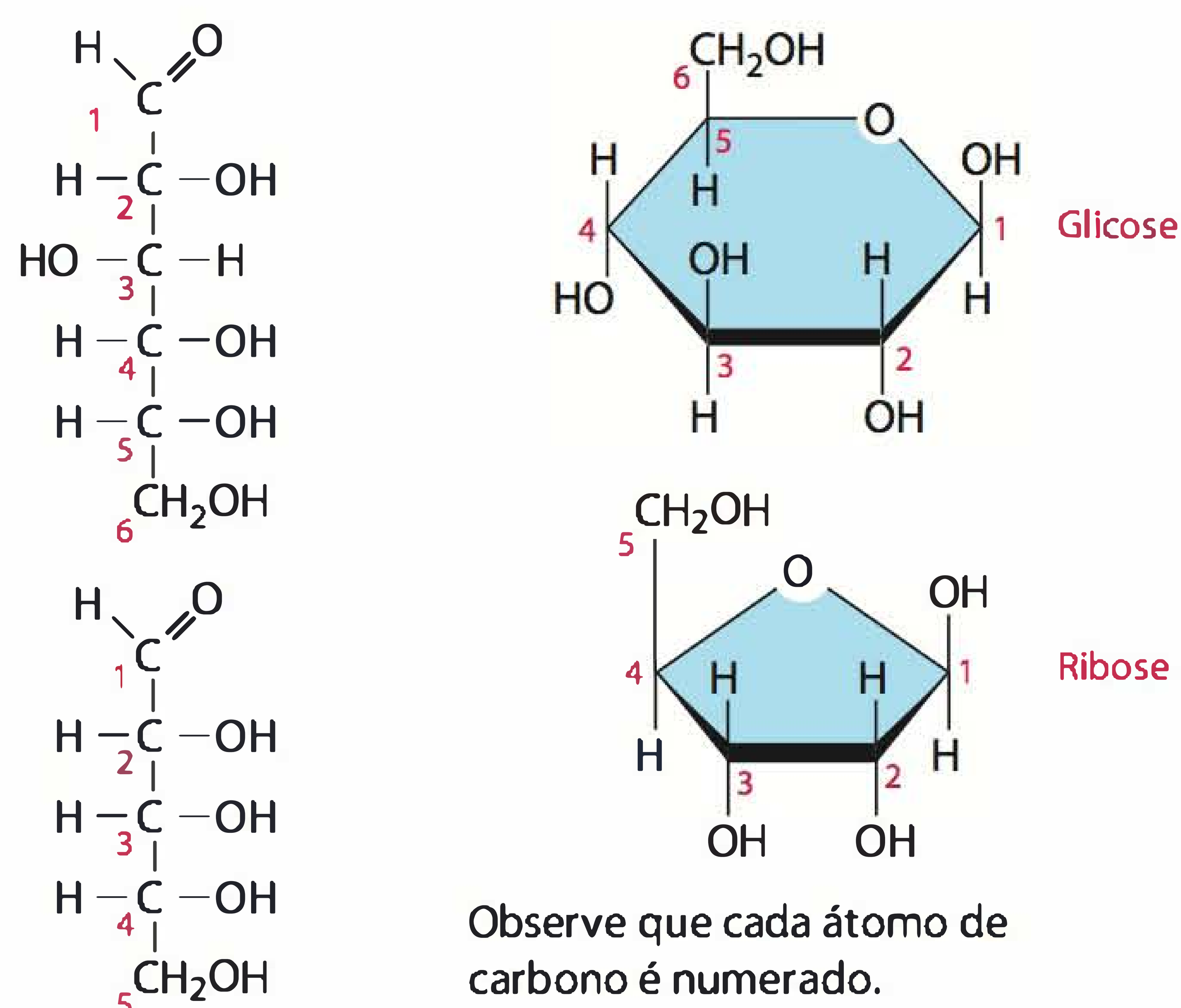
MONOSSACARÍDEOS

Os monossacarídeos normalmente têm a fórmula $(CH_2O)_n$, em que *n* pode ser 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, e possuem dois ou mais grupos hidroxila. Eles contêm um grupo aldeído ($-C{\overset{O}{\underset{H}{\lessgtr}}}$), sendo denominados aldoses, ou um grupo cetona ($>C=O$), sendo então denominados cetoses.

	3 carbonos (TRIOSES)	5 carbonos (PENTOSES)	6 carbonos (HEXOSES)
ALDOSES	Gliceraldeído	Ribose	Glicose
CETOSES	Diidroxiacetona	Ribulose	Frutose

FORMAÇÃO DO ANEL

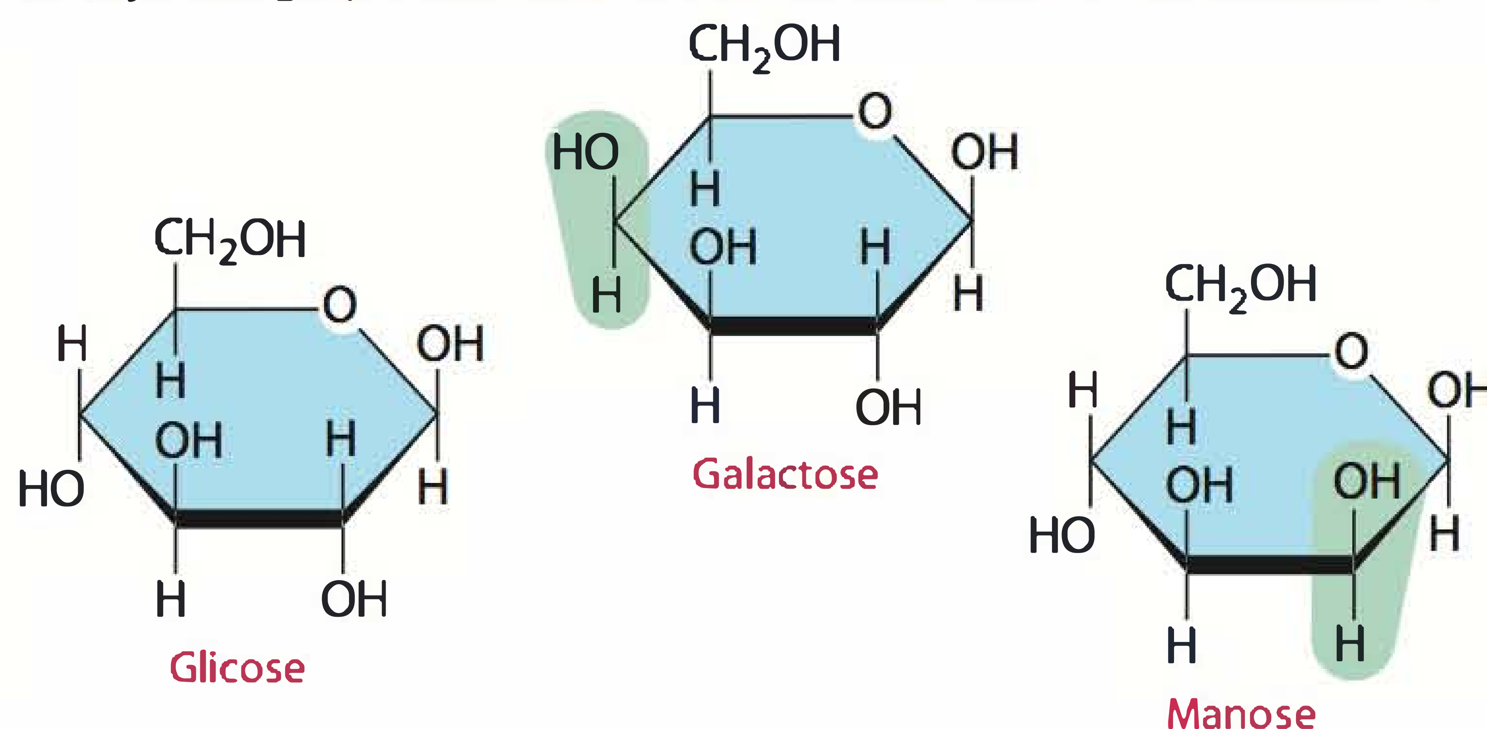
Em soluções aquosas, os grupos aldeído e cetona das moléculas de açúcar tendem a reagir com um grupo hidroxila da mesma molécula, assim fechando a molécula em um anel.



Observe que cada átomo de carbono é numerado.

ISÔMEROS

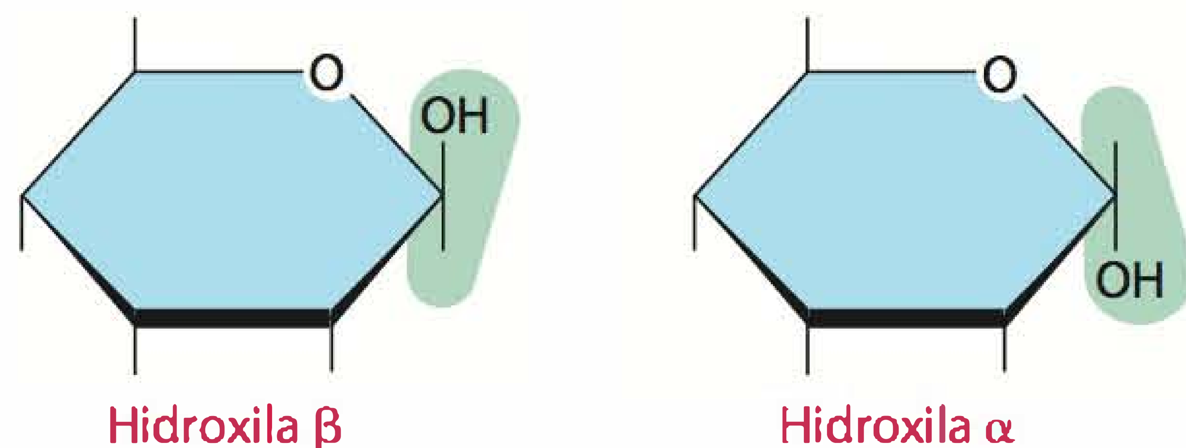
Muitos monossacarídeos diferem apenas quanto ao arranjo espacial dos seus átomos, isto é, são isômeros. Por exemplo, a glicose, a galactose e a manose possuem a mesma fórmula ($C_6H_{12}O_6$), mas cada uma dessas moléculas difere uma da outra quando ao arranjo dos grupos ao redor de um ou de dois átomos de carbono.



Essas pequenas diferenças produzem apenas leve modificação nas propriedades químicas dos açúcares. Entretanto, são reconhecidas por enzimas e outras proteínas, de modo que podem ter efeitos biológicos muito importantes.

LIGAÇÕES α E β

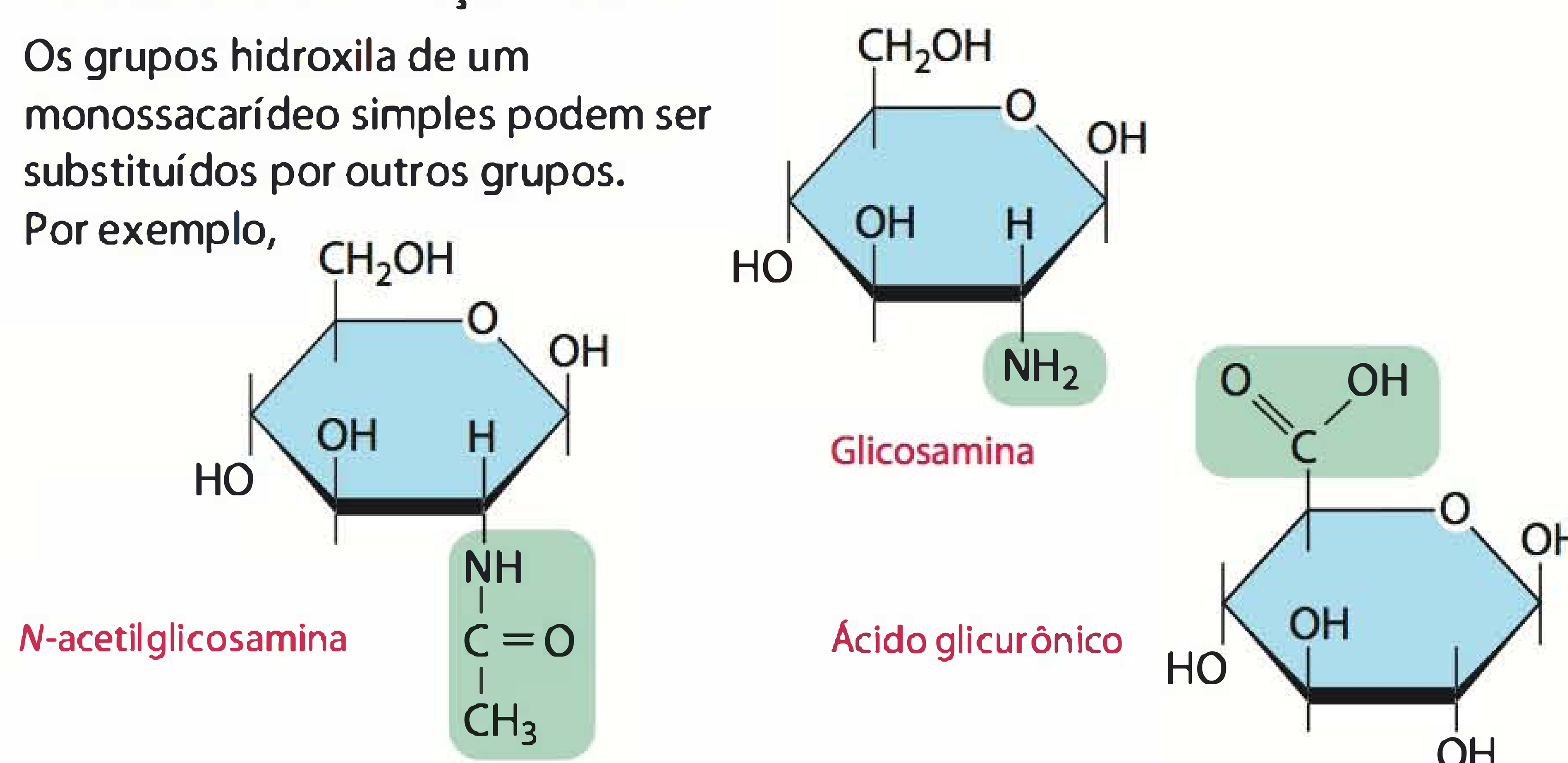
O grupo hidroxila do carbono que carrega o aldeído ou a cetona pode mudar facilmente de uma posição a outra. Essas duas posições possíveis são denominadas α e β.



Tão logo um açúcar liga-se a outro, as formas α e β são fixadas.

DERIVADOS DE AÇÚCARES

Os grupos hidroxila de um monossacarídeo simples podem ser substituídos por outros grupos. Por exemplo,



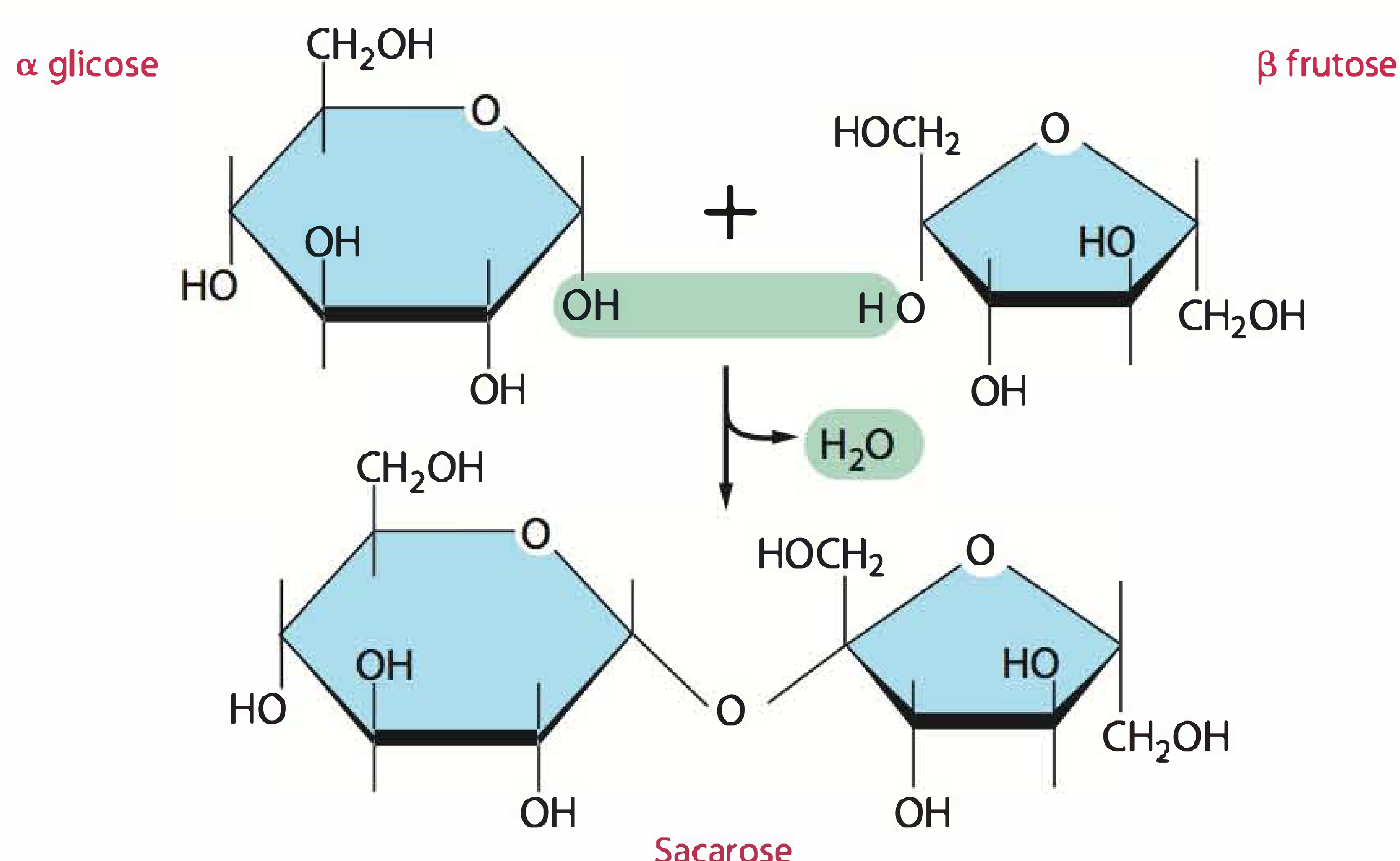
DISSACARÍDEOS

O carbono que carrega o aldeído ou a cetona pode reagir com qualquer grupo hidroxila de uma segunda molécula de açúcar e formar um dissacarídeo. Essa ligação é denominada ligação glicosídica.

Os dissacarídeos mais comuns são

maltose (glicose + glicose)
lactose (galactose + glicose)
sacarose (glicose + frutose)

As reações que formam a sacarose são mostradas ao lado.



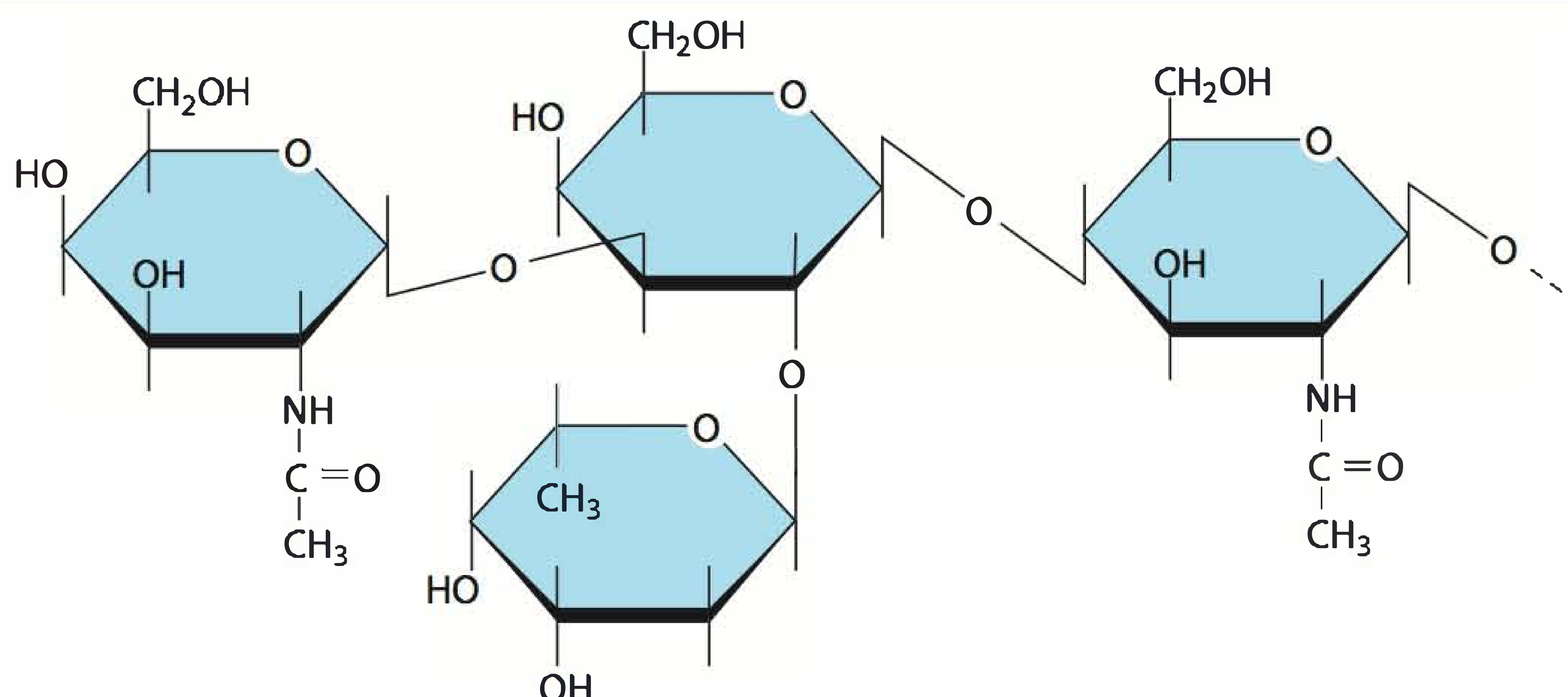
OLIGOSSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS

Moléculas grandes, lineares e ramificadas podem ser feitas a partir da simples repetição de subunidades de açúcares. Quando as cadeias são curtas, a molécula é denominada oligossacarídeo e, no caso de cadeias longas, é denominada polissacarídeo. O glicogênio, por exemplo, é um polissacarídeo formado inteiramente por unidades de glicose ligadas entre si.



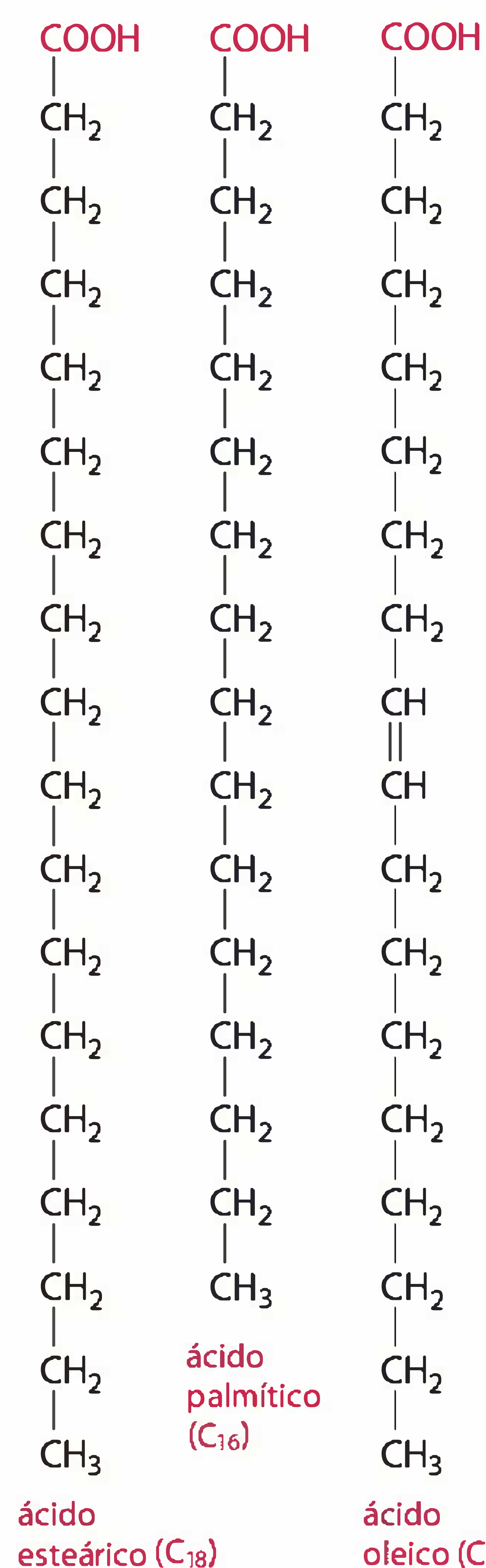
OLIGOSSACARÍDEOS COMPLEXOS

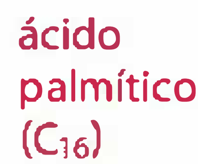
Em muitos casos, a sequência de açúcares não é repetitiva, possibilitando a formação de muitas moléculas diferentes. Tais oligossacarídeos complexos geralmente são ligados a proteínas e a lipídeos, como no caso do oligossacarídeo ao lado, que é parte de uma molécula da superfície da célula que caracteriza um determinado grupo sanguíneo.



ÁCIDOS GRAXOS MAIS COMUNS

Estes são ácidos carboxílicos com uma longa cauda hidrocarbonada.



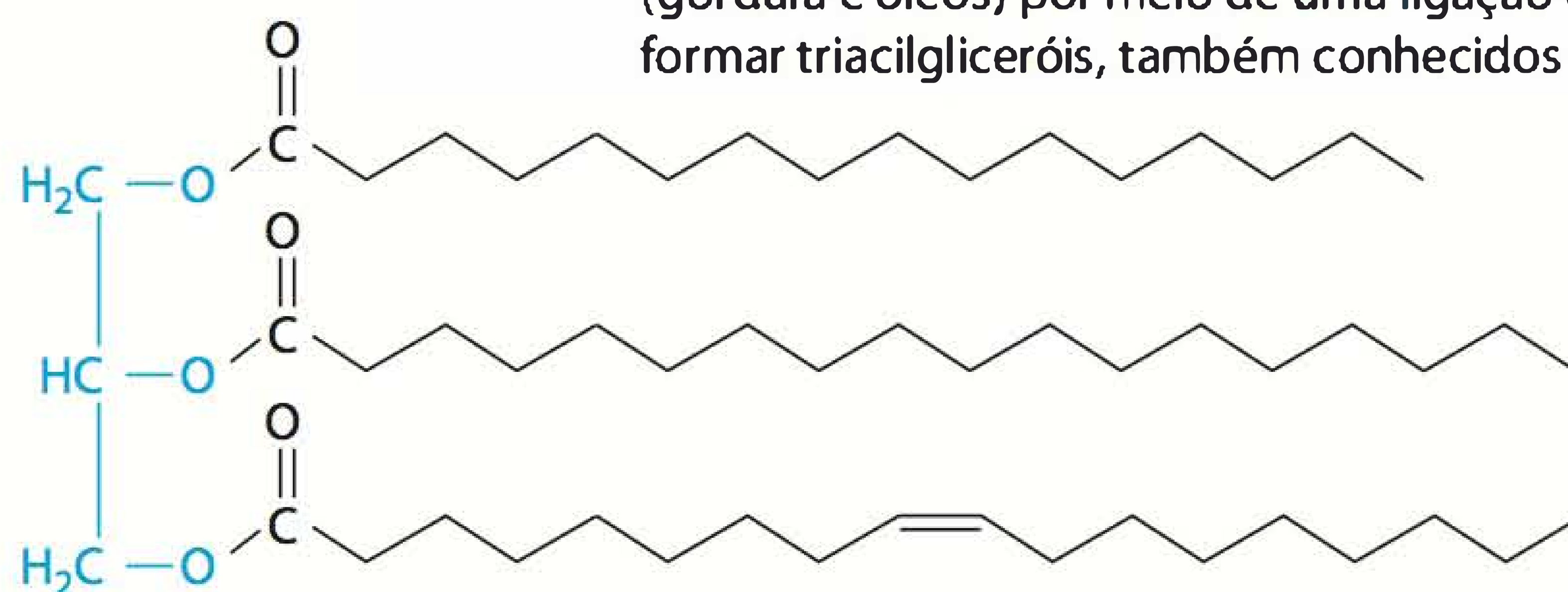


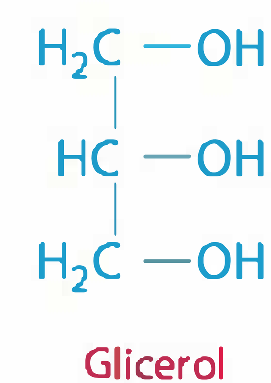
ácido palmítico (C_{16})



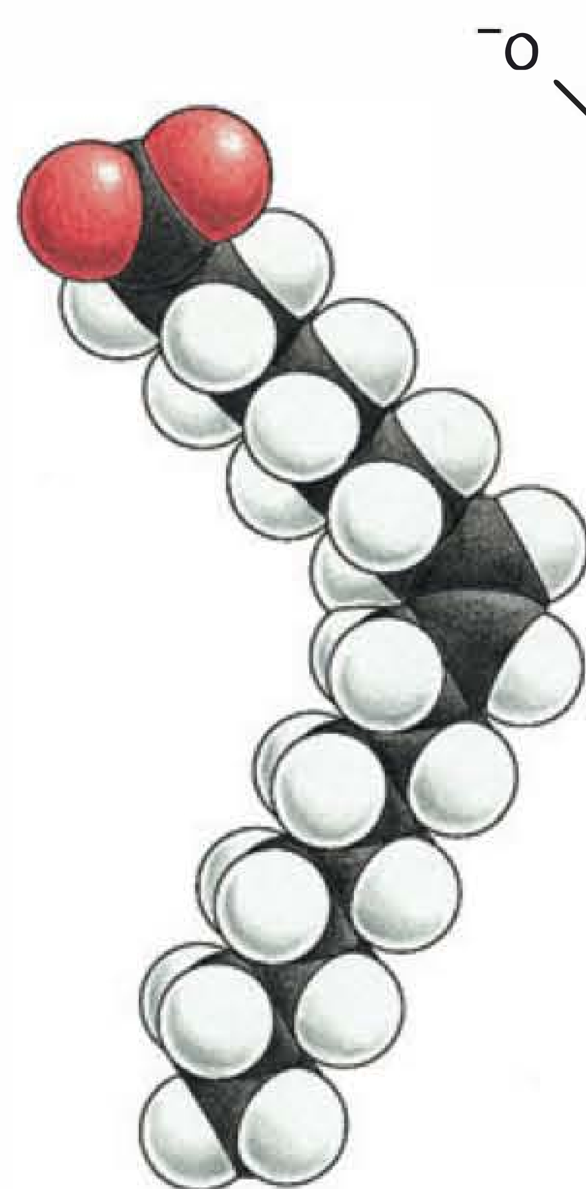
TRIACILGLICERÓIS

Os ácidos graxos são estocados como uma reserva de energia (gordura e óleos) por meio de uma ligação éster ao glicerol para formar triacilgliceróis, também conhecidos como triglicerídeos.



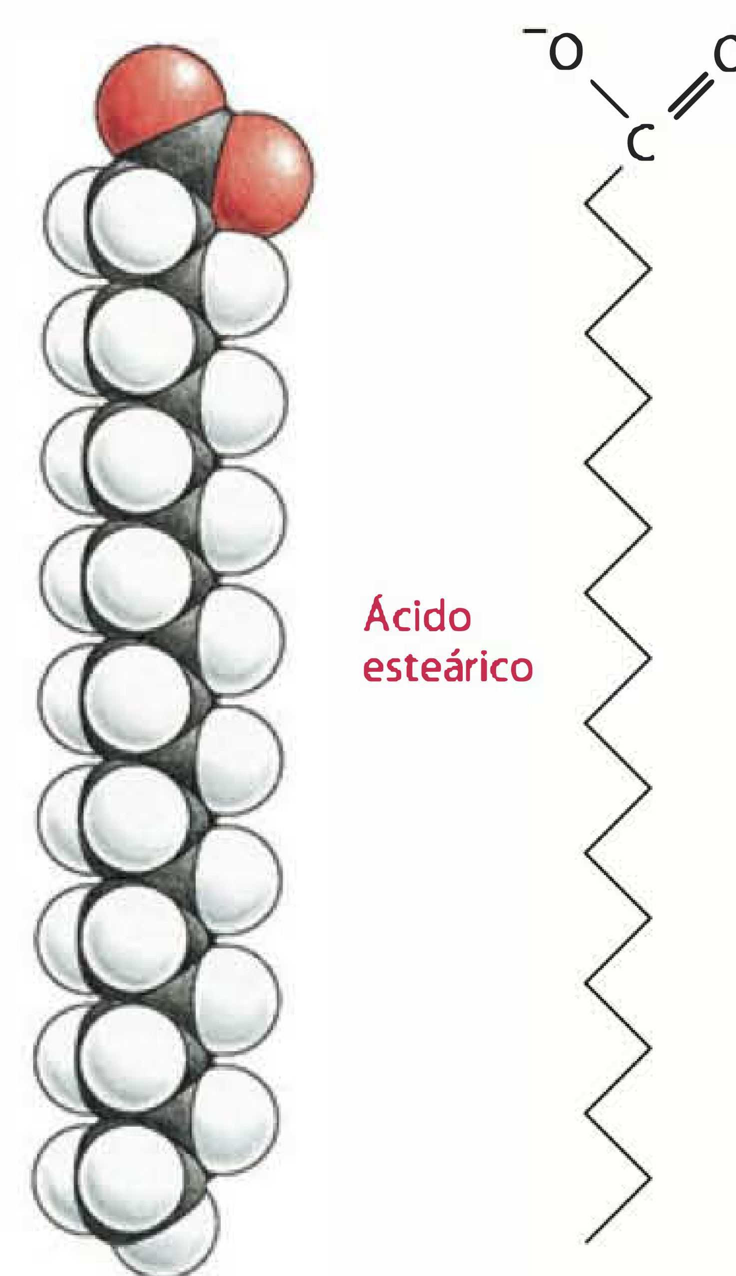


Existem centenas de tipos diferentes de ácidos graxos. Alguns têm uma ou mais ligações duplas e diz-se ser insaturados. Os ácidos graxos sem ligações duplas são saturados.





Essa ligação dupla é rígida e cria uma dobra na cadeia. O resto da cadeia é livre para girar ao redor das outras ligações C–C.

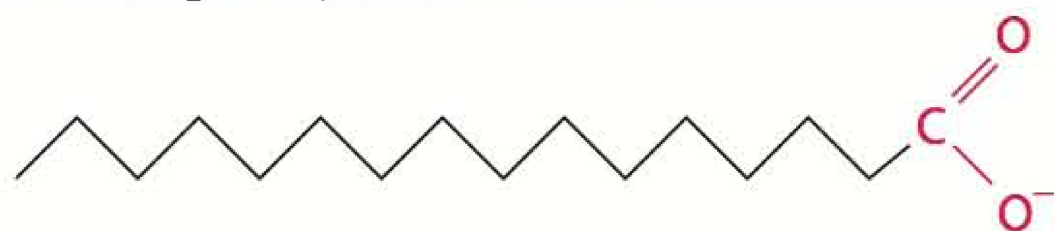


Modelo de preenchimento espacial — Esqueleto de carbono

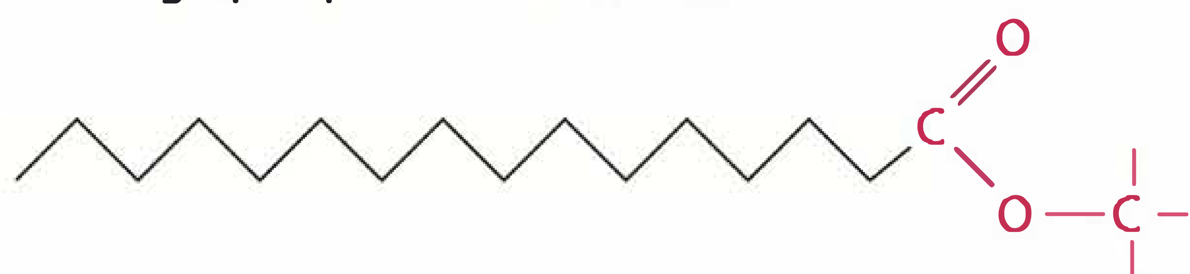
INSATURADO — SATURADO

GRUPO CARBOXILA

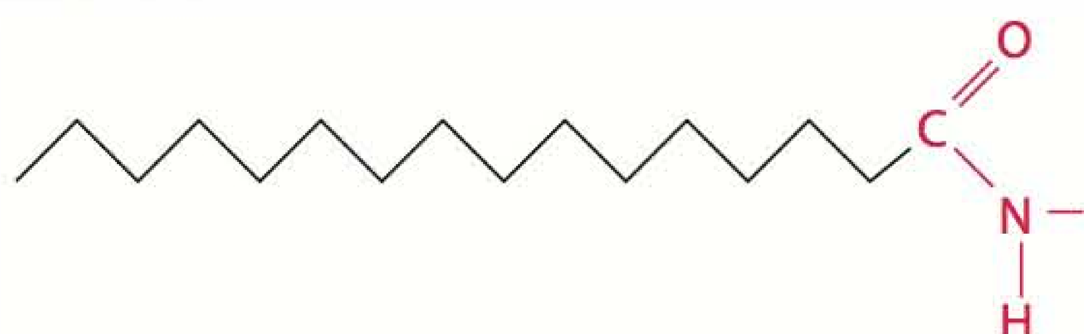
Se estiver livre, o grupo carboxila de um ácido graxo pode ionizar-se.



Entretanto, geralmente ele está ligado a outros grupos para formar ésteres.

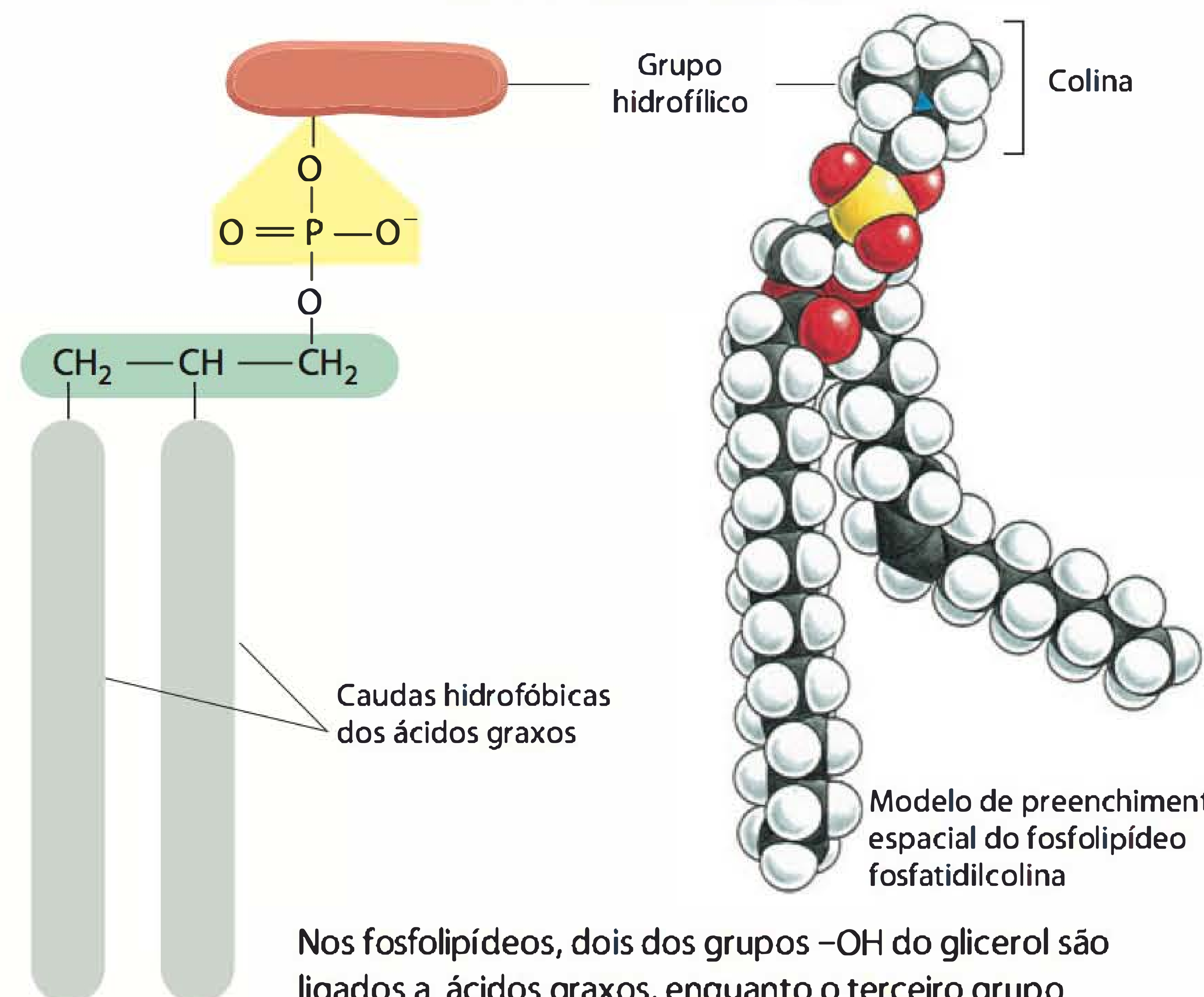


ou amidas.



FOSFOLIPÍDEOS

Os fosfolipídeos são os principais constituintes das membranas celulares.

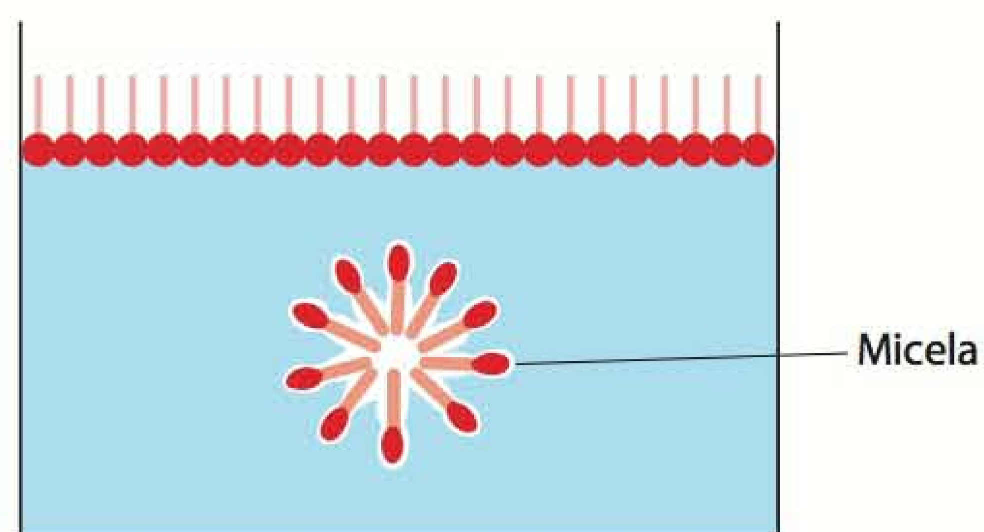


Nos fosfolipídeos, dois dos grupos –OH do glicerol são ligados a ácidos graxos, enquanto o terceiro grupo –OH é ligado ao ácido fosfórico. O fosfato é ainda ligado a um dos vários pequenos grupos polares (álcoois).

AGREGADOS DE LIPÍDEOS

Os ácidos graxos têm uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica.





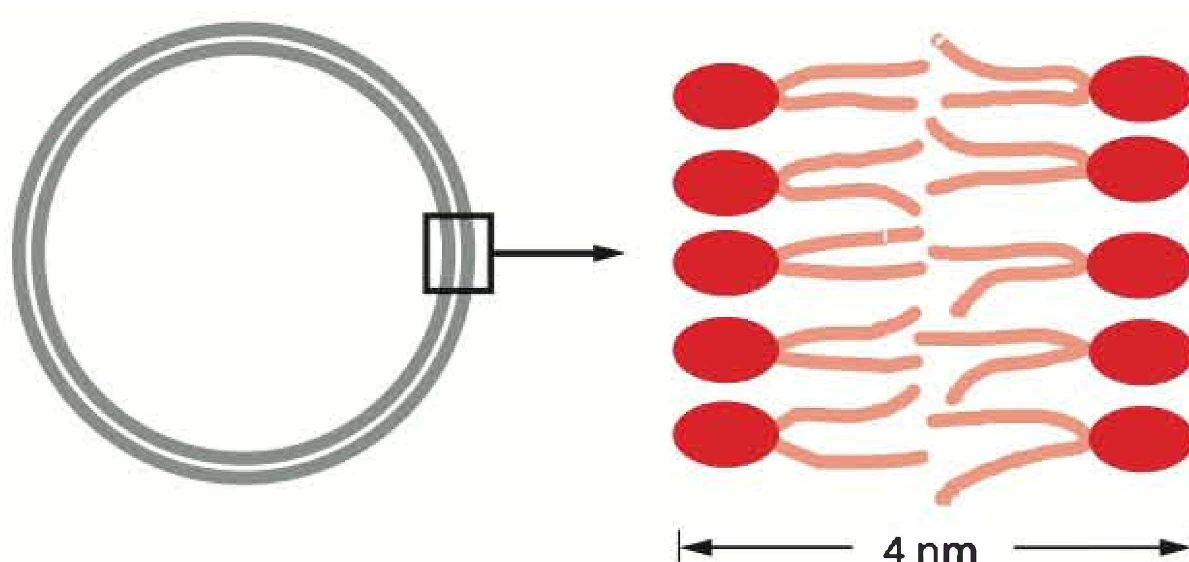
Quando em água, eles podem formar um filme na superfície, ou então pequenas micelas.

Seus derivados podem formar grandes agregados que são mantidos unidos por meio de forças hidrofóbicas:

Os triglicerídeos podem formar gotículas de gordura esféricas no citoplasma das células.

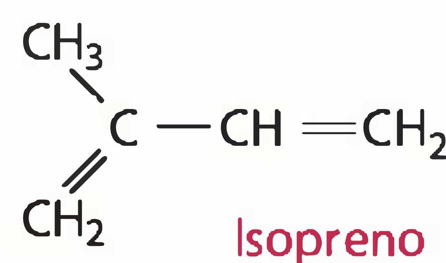


Os fosfolipídeos e os glicolipídeos formam uma bicamada lipídica autosselante que se constitui na base de todas as membranas das células.



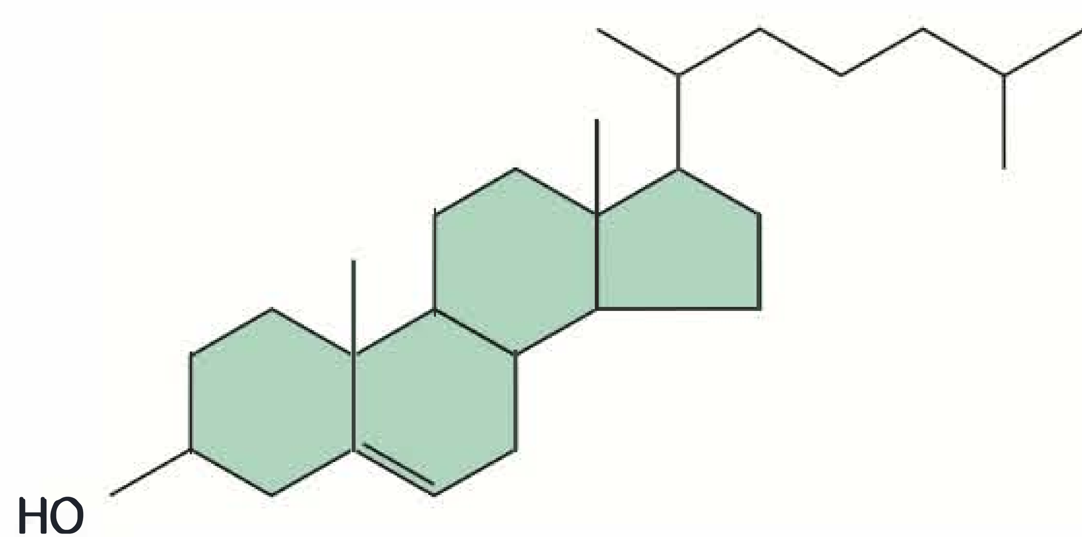
OUTROS LIPÍDEOS

Os lipídeos são definidos como moléculas celulares insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Outros dois tipos muito comuns de lipídeos são os esterois e os poli-isoprenoides. Ambos são formados por unidades de isopreno.

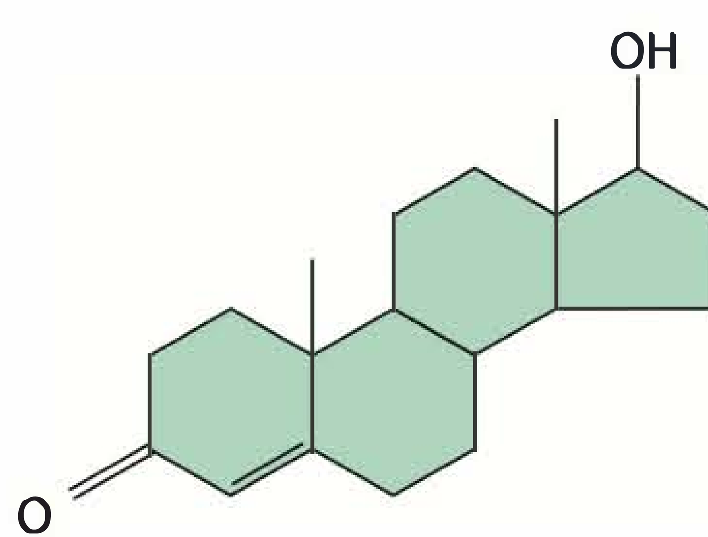


ESTEROIDES

Os esteroides têm uma estrutura de anéis múltiplos em comum.



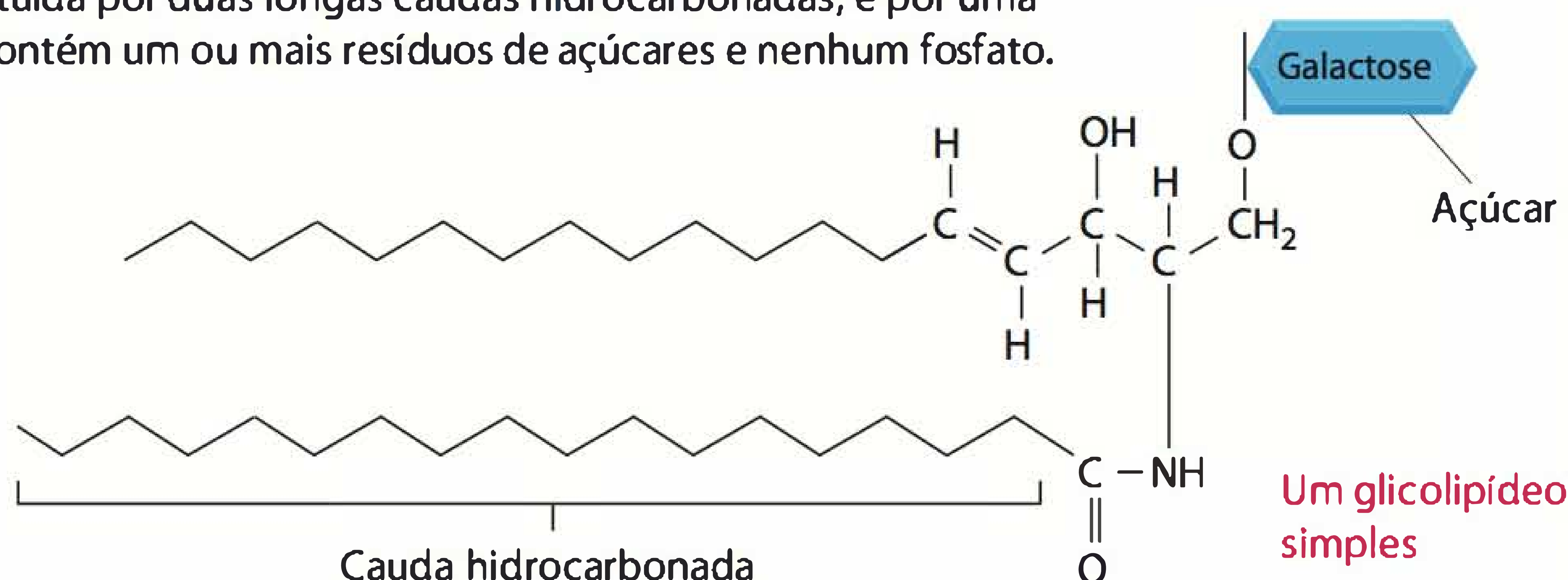
Colesterol – encontrado em muitas membranas



Testosterona – hormônio esteroide masculino

GLICOLIPÍDEOS

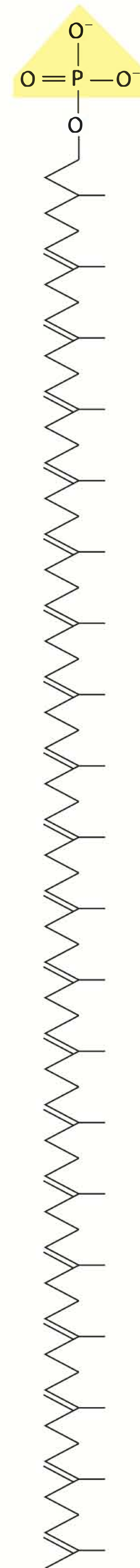
Assim como os fosfolipídeos, esses compostos são formados por uma região hidrofóbica, constituída por duas longas caudas hidrocarbonadas, e por uma região polar, que contém um ou mais resíduos de açúcares e nenhum fosfato.



Um glicolipídeo simples

POLI-ISOPRENOIDES

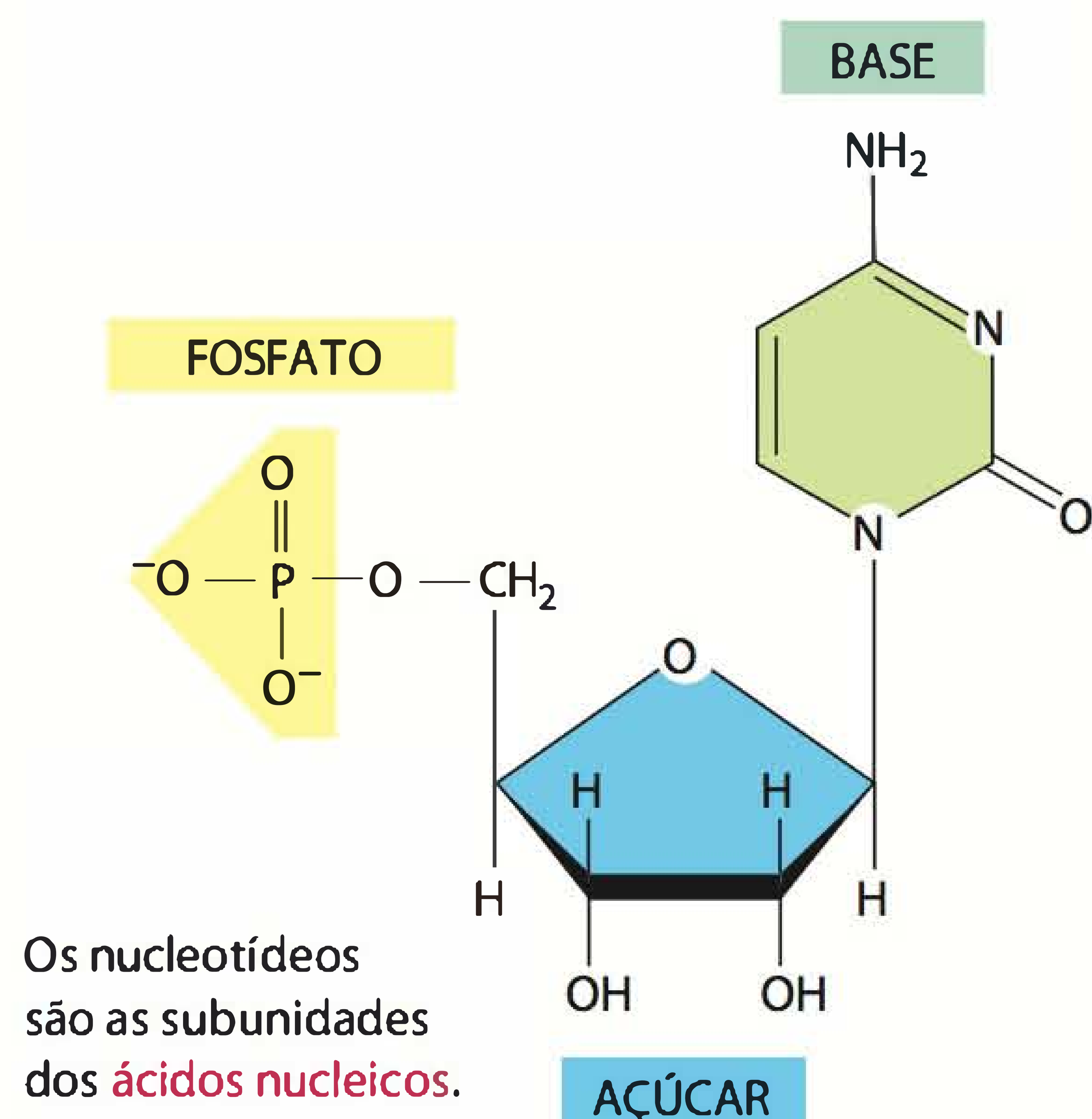
polímeros longos de isopreno



Dolicol fosfato — usado para carrear açúcares ativados na síntese, ligada à membrana, de glicoproteínas e de outros polissacarídeos

NUCLEOTÍDEOS

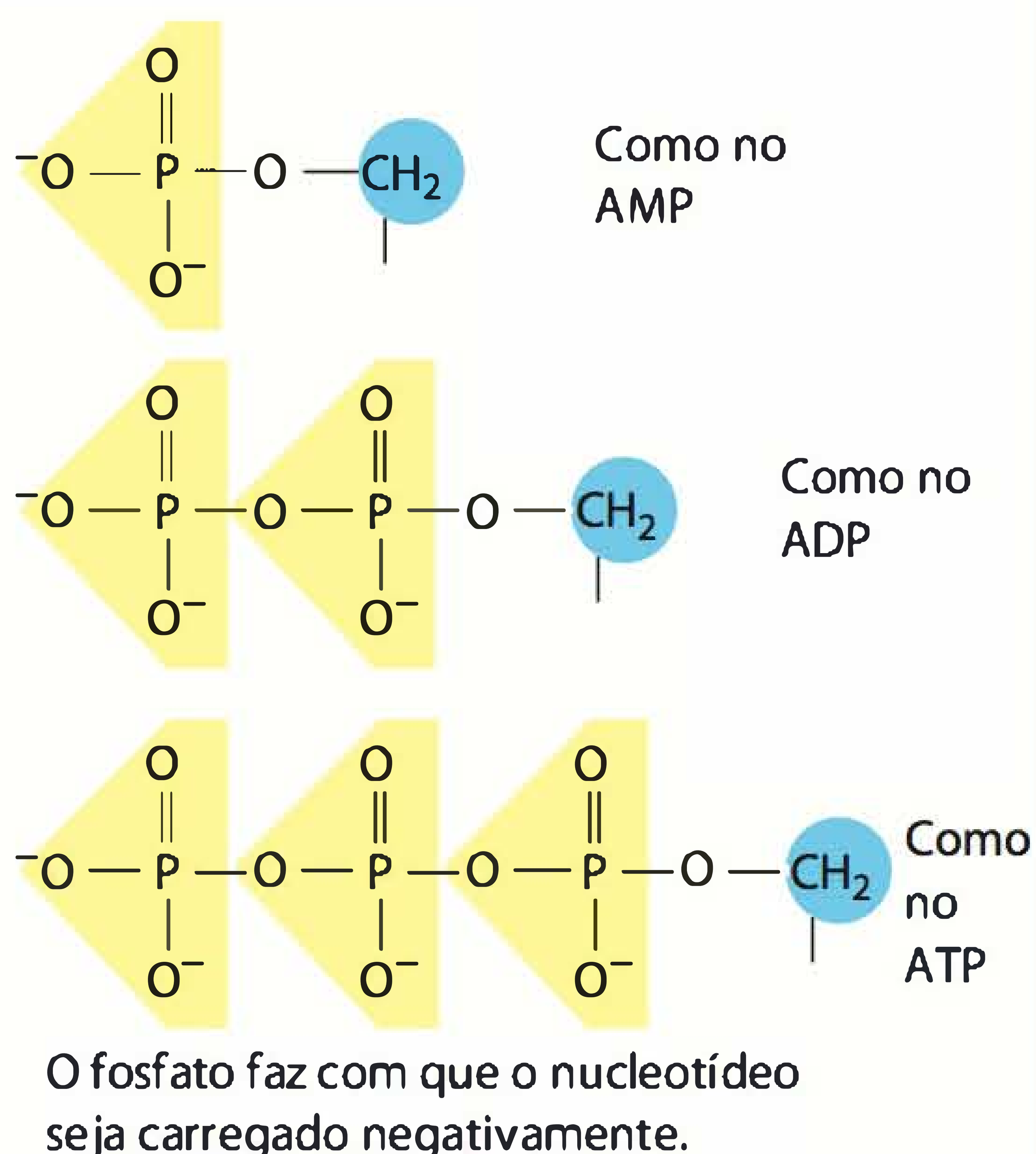
Um nucleotídeo consiste em uma base contendo nitrogênio, um açúcar de cinco carbonos e um ou mais grupos fosfato.



Os nucleotídeos são as subunidades dos ácidos nucleicos.

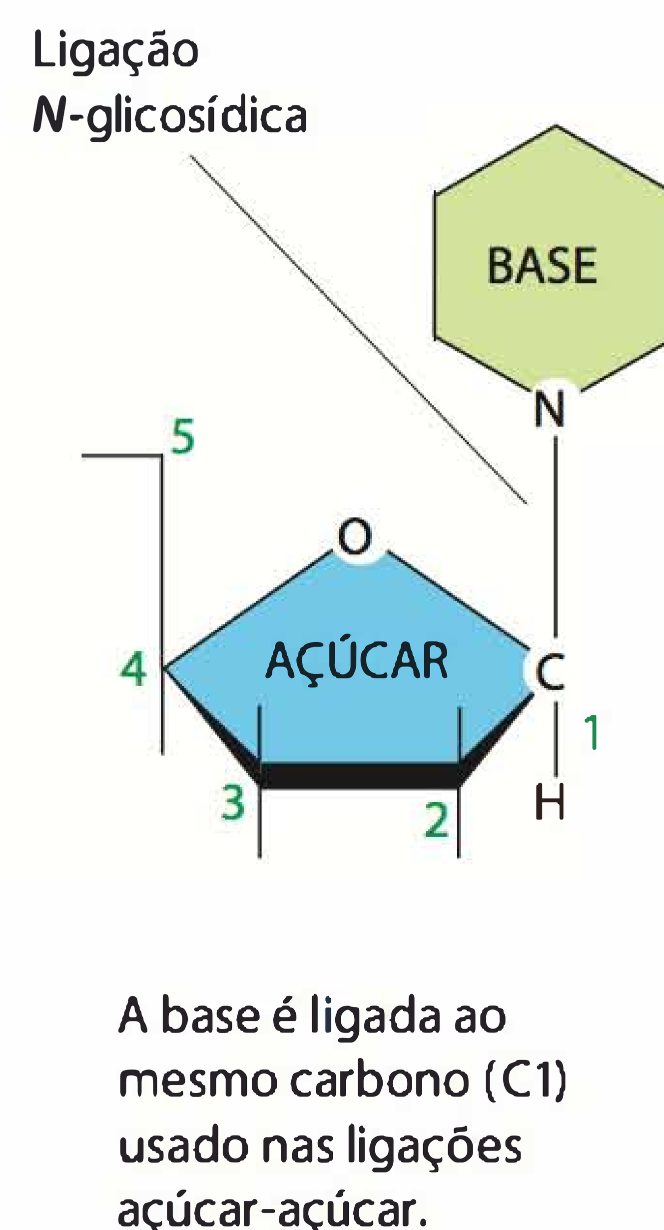
FOSFATOS

Os fosfatos normalmente são ligados no C5 hidroxila da ribose ou da desoxirribose (designado 5'). Mono, di e trisfosfatos são comuns.



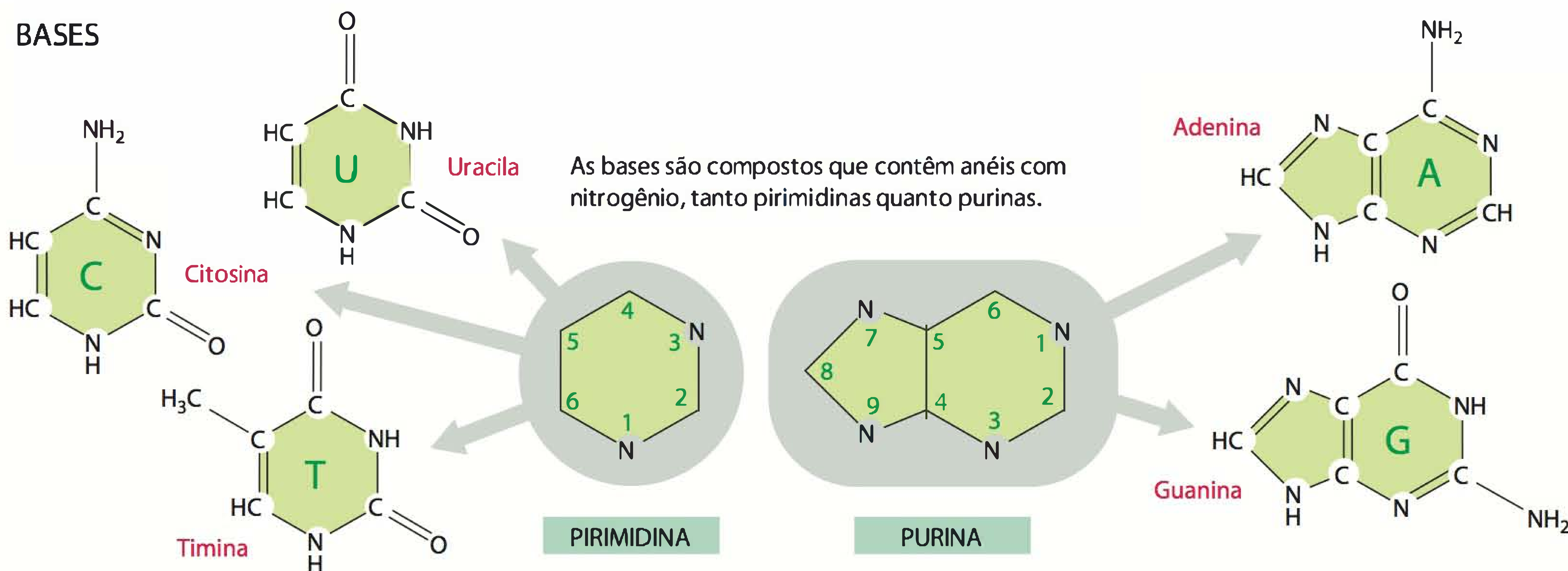
O fosfato faz com que o nucleotídeo seja carregado negativamente.

LIGAÇÃO DA BASE COM O AÇÚCAR



A base é ligada ao mesmo carbono (C1) usado nas ligações açúcar-açúcar.

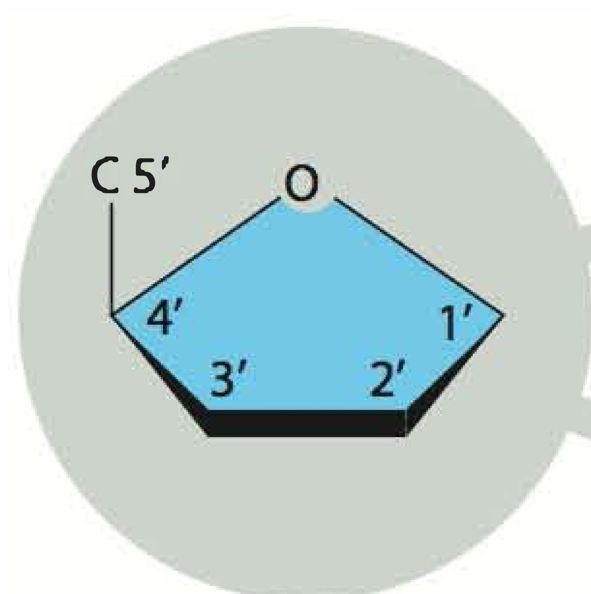
BASES



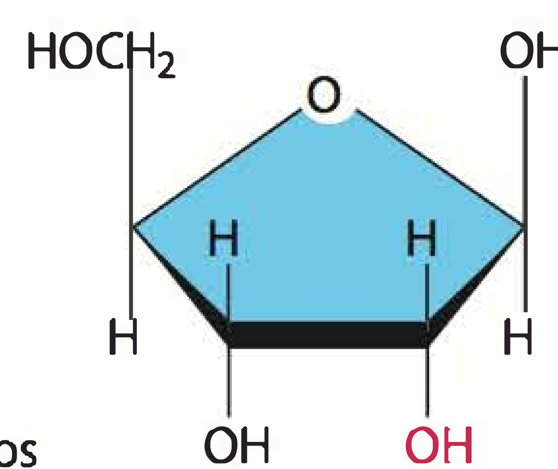
AÇÚCARES

PENTOSE

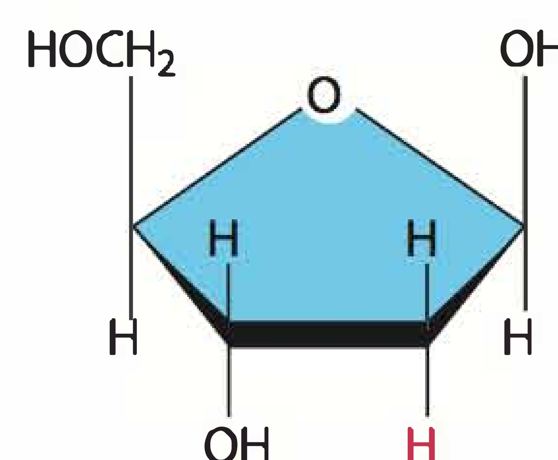
açúcar de 5 carbonos



são usados dois tipos



β-D-ribose
usada no ácido ribonucleico



β-D-2-desoxirribose
usada no ácido desoxirribonucleico

A numeração dos carbonos do açúcar no nucleotídeo é seguida do sinal gráfico de apóstrofe; assim fala-se do "carbono 5 linha", etc.

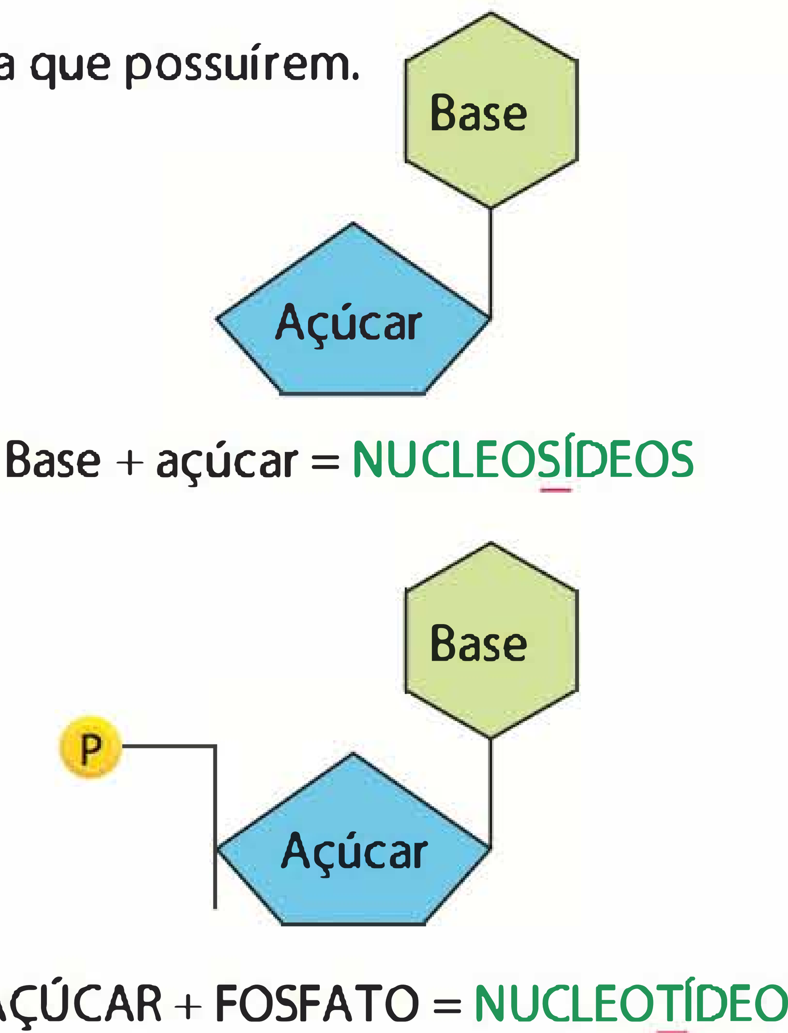
NOMENCLATURA

Os nucleosídeos e os nucleotídeos são denominados segundo a base nitrogenada que possuírem.

BASE	NUCLEOSÍDEO	ABREV.
Adenina	Adenosina	A
Guanina	Guanosina	G
Citosina	Citidina	C
Uracila	Uridina	U
Timina	Timidina	T

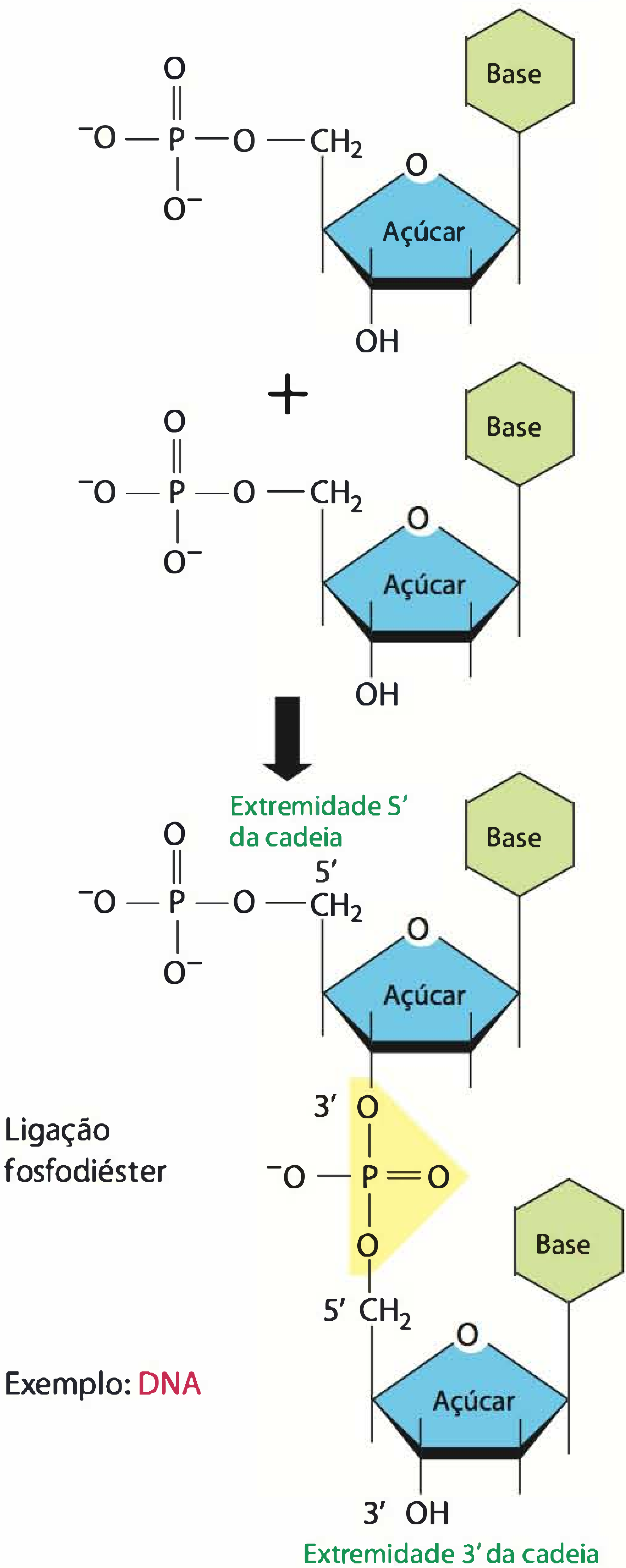
A abreviatura de uma só letra é usada para abreviar (1) apenas a base, (2) apenas o nucleosídeo ou (3) apenas o nucleotídeo. Normalmente, o contexto deixa claro de qual dos três sentidos se trata. Quando o contexto não é suficiente, adiciona-se os termos "base", "nucleosídeo" ou "nucleotídeo", como no exemplo abaixo, usando o código de 3 letras dos nucleotídeos.

AMP = monofosfato de adenosina
dAMP = monofosfato de desoxiadenosina
UDP = difosfato de uridina
ATP = trifosfato de adenosina



ÁCIDOS NUCLEICOS

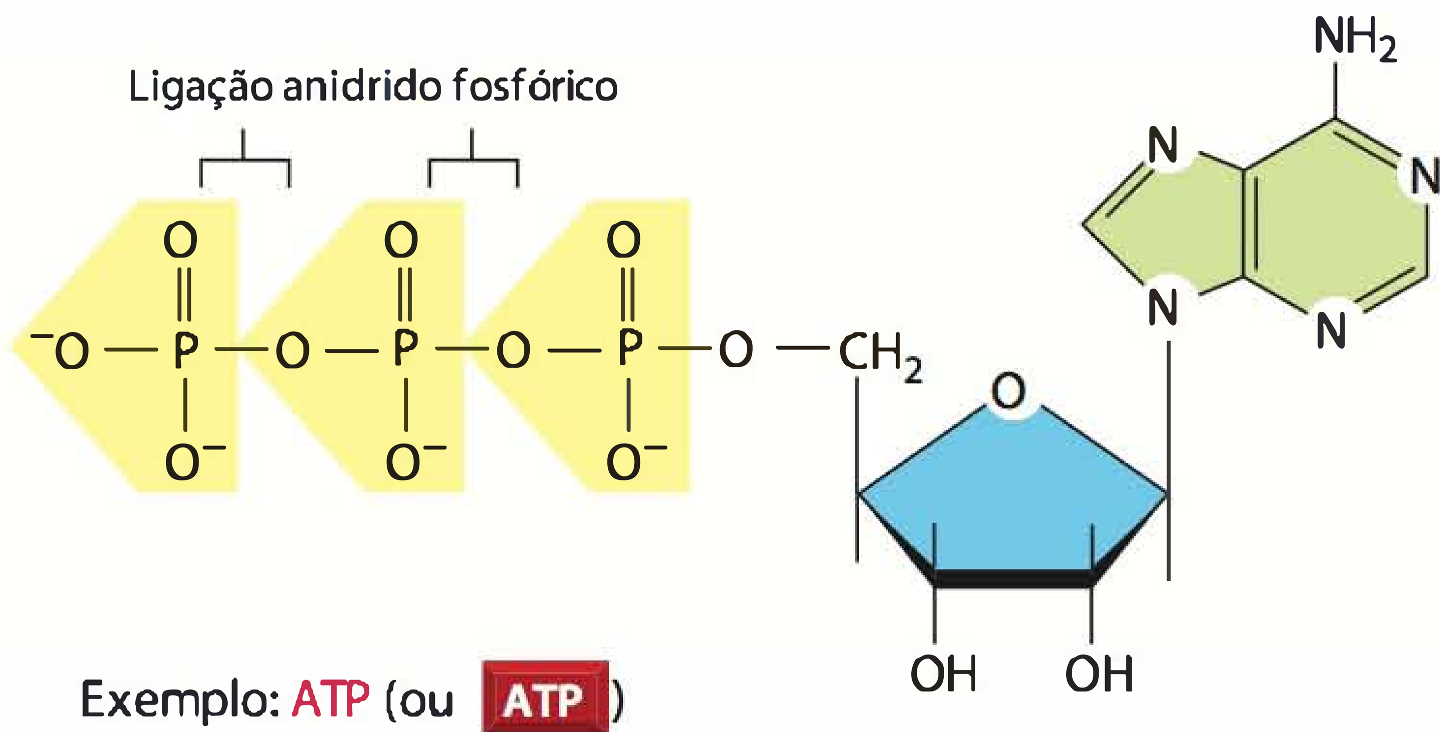
Os nucleotídeos são ligados entre si por meio de ligações fosfodiéster entre os átomos de carbono 5' e 3', formando os ácidos nucleicos. A sequência linear de nucleotídeos em uma cadeia de ácido nucleico geralmente é abreviada por um código de uma letra, A–G–C–T–T–A–C–A–, com a extremidade 5′ colocada à esquerda.



Exemplo: DNA

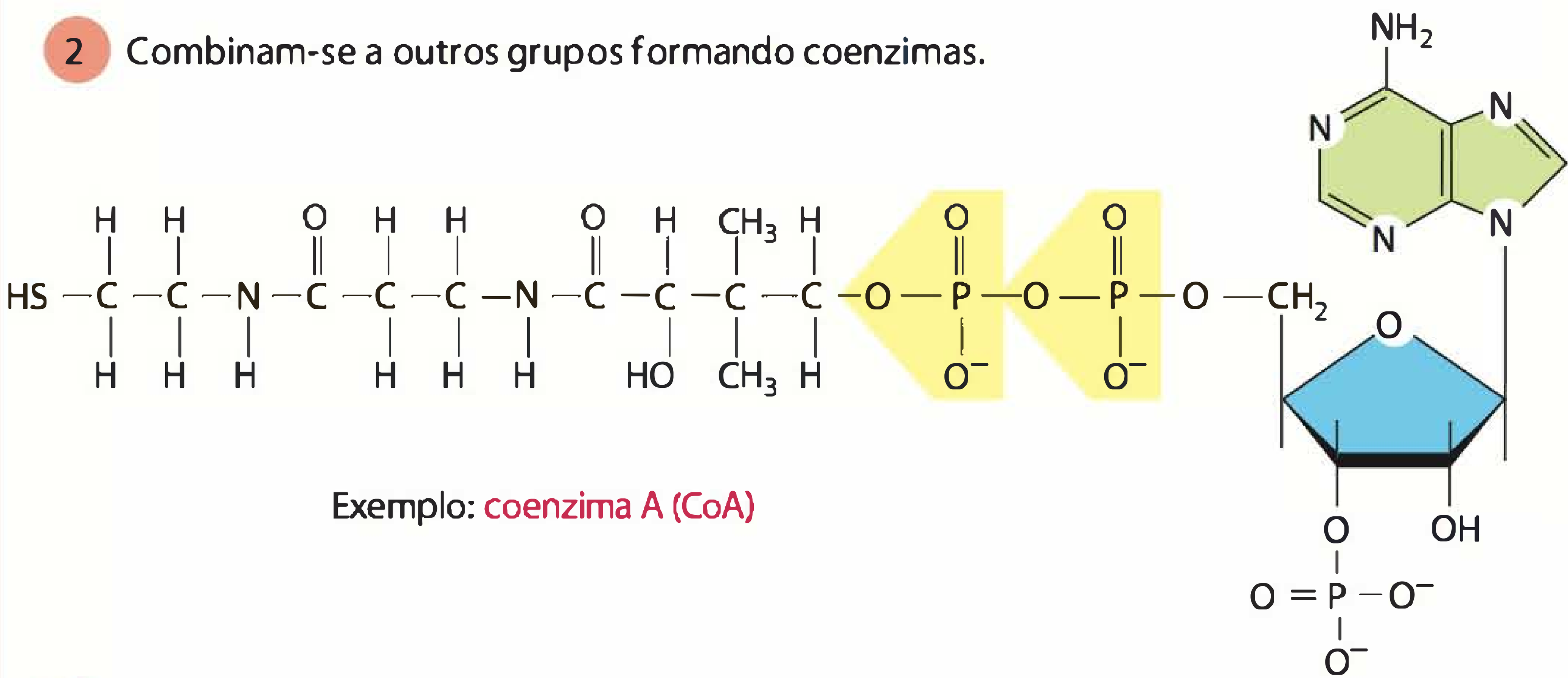
OS NUCLEOTÍDEOS TÊM MUITAS OUTRAS FUNÇÕES

1 Carregam energia química nas suas ligações anidrido fosfórico facilmente hidrolisáveis.



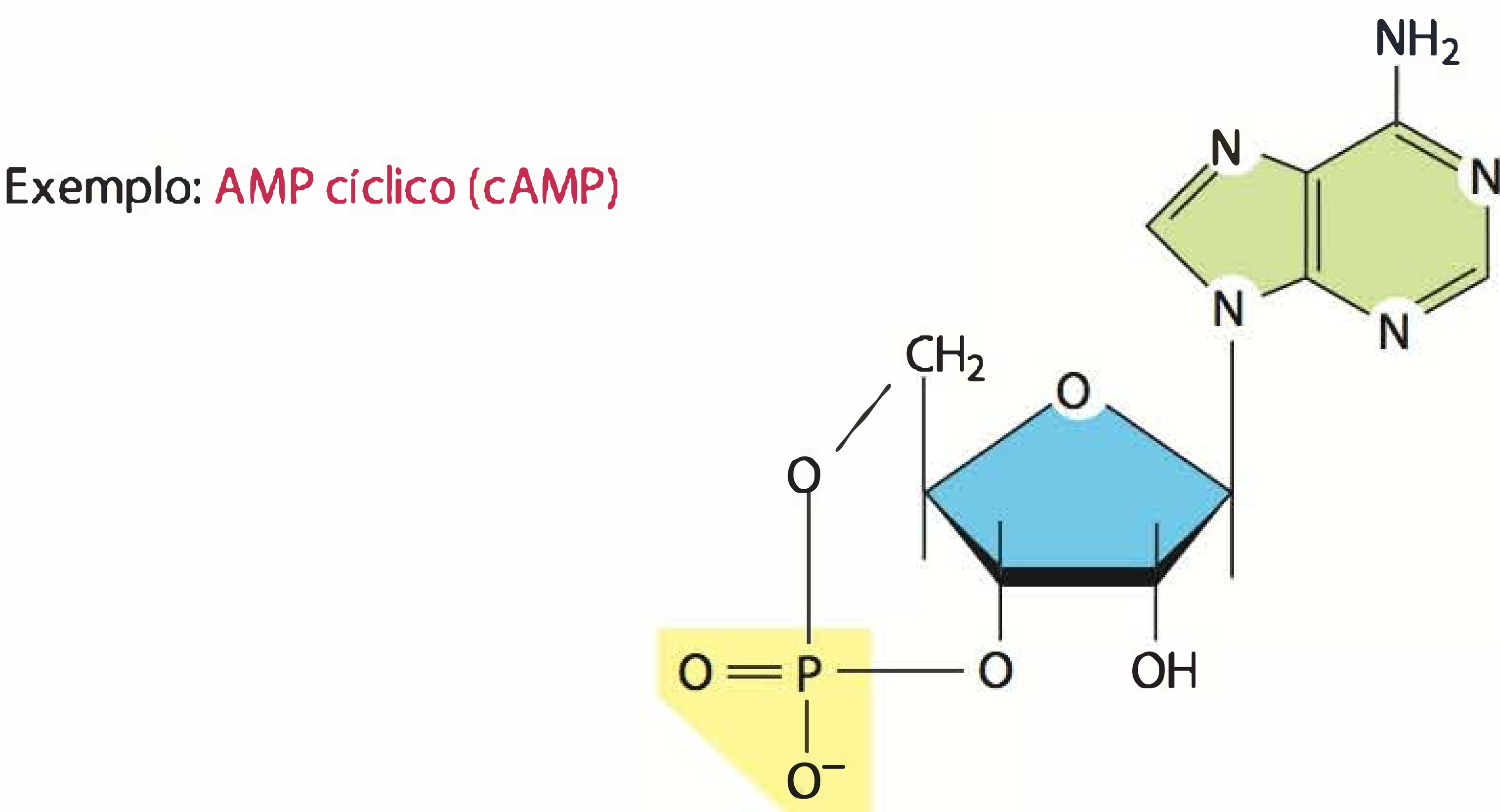
Exemplo: ATP (ou ATP)

2 Combinam-se a outros grupos formando coenzimas.



Exemplo: coenzima A (CoA)

3 São usados como moléculas sinalizadoras específicas pelas células.

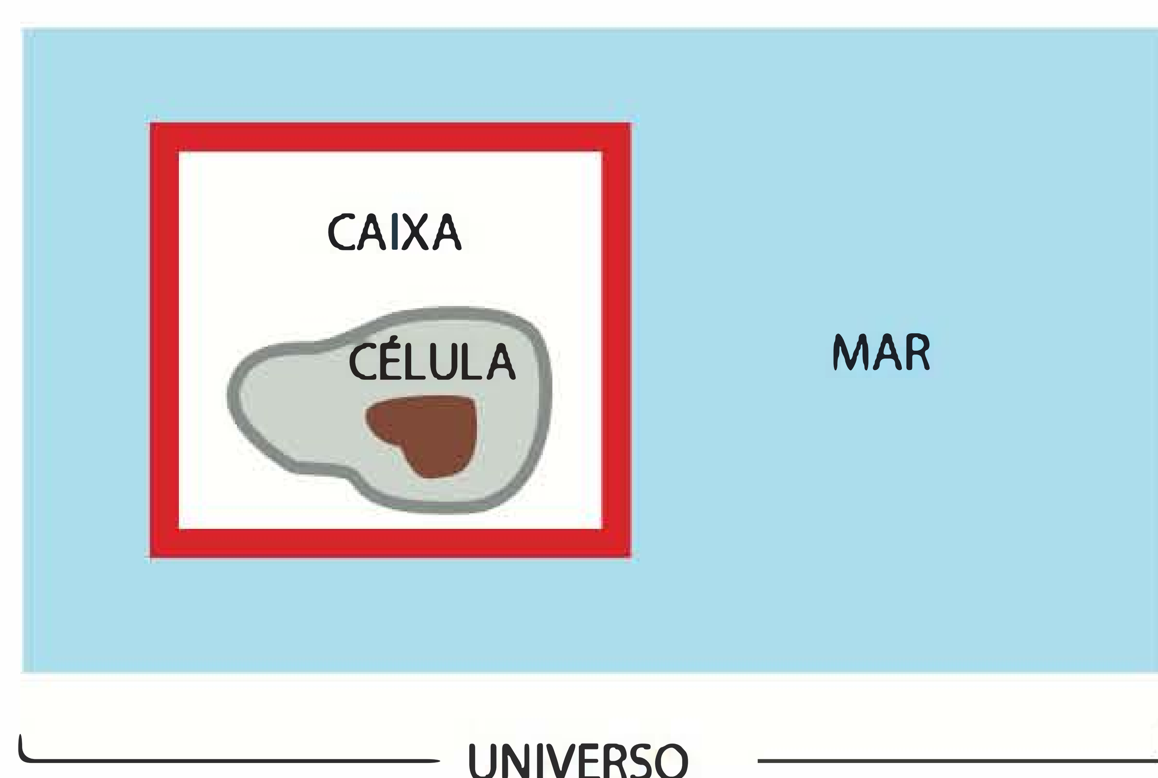


Exemplo: AMP cíclico (cAMP)

A IMPORTÂNCIA DA ENERGIA LIVRE PARA AS CÉLULAS

A vida só é possível devido à complexa rede de interações que há entre todas as reações químicas que ocorrem em cada célula. Observando-se as vias metabólicas que formam essa rede, suspeita-se que as células devem possuir a habilidade de conseguir enzimas que processem cada uma das reações que lhe são necessárias. Entretanto, esse não é o caso. Embora as enzimas sejam catalisadores potentes, elas somente podem acelerar reações que sejam termodinamicamente possíveis. As outras reações que ocorrem nas células apenas são possíveis porque estão *acopladas* a reações muito favoráveis que as impulsionam. A questão quanto ao fato de uma reação poder ocorrer espontaneamente ou necessitar acoplar-se a outra reação é um ponto central na biologia celular. A resposta é obtida considerando-se a grandeza denominada *energia livre*: a variação total de energia livre que ocorre durante um conjunto de reações determina se toda a sequência de reações pode ocorrer ou não. Neste painel, são explicadas algumas das ideias – provenientes de um ramo especial da química e da física denominado *termodinâmica* – que são fundamentais para entender o que é energia livre e por que ela é tão importante para as células.

A ENERGIA LIVRE LIBERADA POR MUDANÇAS NAS LIGAÇÕES QUÍMICAS É CONVERTIDA EM CALOR



Um *sistema fechado* é definido como um conjunto de moléculas que não troca matéria com o resto do universo (p. ex., "a célula na caixa" mostrada acima). Um sistema desses conterá moléculas com uma energia total *E*. Essa energia será distribuída de várias maneiras: uma parte como energia de translação das moléculas, outra como energia vibracional e rotacional das moléculas; a maior parte, entretanto, será distribuída como energia de ligação entre os átomos que formam moléculas. Suponha-se que ocorra uma reação no sistema. A primeira lei da termodinâmica determina restrições aos tipos de reações que podem ocorrer: essa lei determina que "em qualquer processo, a energia total do universo permanece constante". Por exemplo, supondo-se que a reação A → B ocorra em algum lugar da caixa e libere uma grande quantidade de energia da ligação química; essa energia, inicialmente, aumentará a intensidade do movimento das moléculas (translacional, vibracional e rotacional) do sistema, o que equivale a um aumento na temperatura. Entretanto, esse aumento no movimento será logo transferido para fora do sistema por uma série de colisões moleculares que esquentarão primeiro as paredes da caixa e, então, o mundo exterior (representado pelo mar, no exemplo da figura). Segundo a primeira lei, a variação na energia da caixa (ΔE_{caixa}, que terá a notação ΔE) deve ser igual e oposta à quantidade de energia térmica transferida, que será designada de *h*. Isto é, $\Delta E = -h$. Assim, a energia da caixa (*E*) diminui à medida que o calor deixa o sistema.

E também pode mudar durante a reação devido ao trabalho realizado no mundo exterior. Por exemplo, suponha-se que haja um pequeno aumento no volume (ΔV) da caixa durante a reação. Uma vez que as paredes da caixa devem forçar contra a pressão (*P*) constante do ambiente de modo a se expandir, há um trabalho sobre o mundo externo, que demanda energia. A energia usada é $P(\Delta V)$, a qual, de acordo com a primeira lei, provoca diminuição na energia da caixa (*E*), exatamente na mesma quantidade. Na maioria das reações, a energia de ligação química é convertida tanto em trabalho quanto em calor. *Entalpia* (*H*) é uma função composta que inclui ambos ($H = E + PV$). Rigorosamente, em um sistema fechado, a variação na entalpia (ΔH) é igual ao calor transferido para o mundo externo durante a reação. As reações nas quais *H* diminui liberam calor para o ambiente e são chamadas de "exotérmicas". As reações nas quais *H* aumenta absorvem calor do ambiente e são chamadas de "endotérmicas". Assim, $-h = \Delta H$. Entretanto, na maioria das reações biológicas as alterações de volume são desprezíveis, de modo que uma boa aproximação é:

$$-h = \Delta H \cong \Delta E$$

A SEGUNDA LEI DA TERMODINÂMICA

Considere-se um recipiente no qual mil moedas estejam com a cara virada para cima. Se o recipiente for sacudido vigorosamente (submetendo as moedas a todos os tipos de movimentos aleatórios que as moléculas possam sofrer devido a colisões frequentes com outras moléculas), ao final cerca de metade das moedas estará orientada com a cara para baixo. O motivo para essa reorientação é que existe uma única maneira pela qual o ordenamento inicial das moedas pode ser restabelecido (com todas as moedas com a cara para cima), enquanto que há várias maneiras (cerca de 10^{298}) para atingir o estado desordenado no qual a mistura de caras e coroas se iguale. Na realidade, existem mais maneiras de alcançar uma situação 50 a 50% do que de atingir qualquer outra situação. Cada situação tem uma probabilidade de ocorrer proporcional ao número formas que possam levar a ela. A segunda lei da termodinâmica estabelece que "os sistemas mudarão espontaneamente de estados de baixa a para estados de alta probabilidade". Uma vez que os estados de baixa probabilidade são mais "organizados" que os estados de alta probabilidade, a segunda lei pode ser reescrita: "o universo modifica-se constantemente para tornar-se mais desordenado".

A ENTROPIA, *S*

A segunda (e não a primeira) lei permite que a direção de uma dada reação seja prevista. Entretanto, para isso, há necessidade de se ter uma maneira de medir convenientemente a probabilidade ou o grau de desordem de um determinado estado. A entropia (S) é essa grandeza. Ela é uma função logarítmica da probabilidade, de modo que a *variação na entropia* (ΔS) que ocorre quando a reação A → B converte um mol de A em mol de B

$$\Delta S = R \ln p_B / p_A$$

onde p_A e p_B são as probabilidades de ocorrência dos estados A e B, R e a constante dos gases (2 cal deg^{-1} mole^{-1}) e ΔS é medida em unidades de entropia (ue). No exemplo inicial das mil moedas, a probabilidade relativa de estarem todas elas com a cara para cima (estado A), em comparação com o estado no qual metade das moedas está com a cara e metade com a coroa para cima (estado B), é igual à proporção do número de maneiras diferentes palas quais os dois estados podem ser alcançados. Pode-se calcular que $p_A = 1$ e $p_B = 1000!(500! \times 500!) = 10^{299}$. Entretanto, a variação de entropia para a reordenação das moedas quando o recipiente é sacudido vigorosamente é $R \ln (10^{298})$, ou cerca de 1.370 ue por mol de tais recipientes (6×10^{23} recipientes). Uma vez que o ΔS definido acima é positivo para a transição do estado A para o estado B ($p_B/p_A > 1$), observa-se que reações com um grande *aumento* em S (isto é, para as quais $\Delta S > 0$) são favoráveis e ocorrerão espontaneamente.

Conforme discutido no Capítulo 2, a energia térmica provoca uma comoção aleatória nas moléculas. Como uma transferência de calor de um sistema fechado para seu ambiente aumenta o número de diferentes arranjos que as moléculas do mundo externo possam ter, ela aumenta a entropia do mundo externo. Pode-se mostrar que a liberação de uma quantidade fixa de energia térmica tem um efeito maior em desorganizar sistemas em baixa temperaturas do que em altas temperaturas, e que o valor de ΔS do ambiente, como definido anteriormente (ΔS_{mar}), é exatamente igual à quantidade de calor transferido para o ambiente pelo sistema (h), divido pela temperatura absoluta (T):

$$\Delta S_{mar} = h / T$$

A ENERGIA LIVRE DE GIBBS, *G*

Ao se trabalhar com um sistema biológico fechado, seria desejável haver uma maneira simples de prever se uma dada reação do sistema ocorrerá espontaneamente ou não. Quanto a isso, foi visto anteriormente que a questão crucial é o quanto a variação de entropia do universo é positiva ou negativa. No sistema idealizado anteriormente, uma célula em uma caixa, existem dois componentes separados relacionados com a variação de entropia do universo: a variação de entropia do sistema delimitado pela caixa e a variação de entropia do "mar" que o rodeia. Ambos devem ser tomados em conjunto antes que qualquer previsão possa ser feita. Por exemplo, é possível que uma reação absorva calor, diminuindo a entropia do mar ($\Delta S_{mar} < 0$) e, ao mesmo tempo, causando tal grau de desordem dentro da caixa ($\Delta S_{caixa} > 0$) que o total $\Delta S_{universo} = \Delta S_{mar} + \Delta S_{caixa}$ seja maior que 0. Nesse caso, a reação ocorrerá espontaneamente, mesmo que o mar precise fornecer calor para a caixa durante a reação. Um exemplo é a reação de dissolução de cloreto de sódio em um becker contendo água (a "caixa"), que é um processo espontâneo, embora a temperatura da água diminua à medida que o sal se dissolve.

Os químicos descobriram que seria prático definir algumas novas "funções compostas" para descrever combinações de propriedades físicas dos sistemas. As propriedades que podem ser combinadas incluem temperatura (T), pressão (P), volume (V), energia (E) e entropia (S). A entalpia (H) é uma dessas funções compostas. Mas, de longe, a função composta de maior utilidade para os biólogos é a *energia livre de Gibbs*, *G*. Ela serve como um auxiliar de cálculo que permite deduzir as variações na entropia do universo decorrentes de uma reação química na caixa, evitando qualquer consideração separadamente quanto à mudança de entropia no mar. A definição de G é

$$G = H - TS$$

onde, para uma caixa de volume V, H é a entalpia descrita acima ($E + PV$), sendo T a temperatura absoluta e S a entropia. Cada uma dessas grandezas aplica-se apenas ao interior da caixa. A mudança na energia livre durante a reação na caixa (a G dos produtos menos a G dos materiais iniciais) tem a notação ΔG e, como será demonstrado agora, ela é uma medida direta da desordem que a ocorrência da reação cria no universo.

A uma temperatura constante, a mudança na energia livre (ΔG) durante uma reação é igual a $\Delta H - T\Delta S$. Recordando que $\Delta H = -h$ (o calor absorvido do mar), têm-se que

$$-\Delta G = -\Delta H + T\Delta S$$
$$-\Delta G = h + T\Delta S, \text{ de modo que } -\Delta G/T = h/T + \Delta S$$

Mas h/T é igual à mudança de entropia do mar (ΔS_{mar}) e ΔS na equação acima é ΔS_{caixa}. Portanto,

$$-\Delta G/T = \Delta S_{mar} + \Delta S_{caixa} = \Delta S_{universo}$$

Conclui-se, então, que a variação de energia livre é uma medida direta da variação de entropia do universo. Assim, uma reação ocorrerá na direção que causar uma variação na energia livre (ΔG) menor que zero porque, nesse caso, a reação produz uma variação positiva na entropia do universo.

No caso dos conjuntos complexos de reações acopladas que envolvem muitas moléculas diferentes, a variação de energia livre total pode ser calculada simplesmente somando-se as energias livres de todas as diferentes espécies moleculares depois das reações e comparando-se esse valor com a soma das energias livres antes das reações. Os valores de energia livre das substâncias mais comuns podem ser encontrados em tabelas já publicadas. Dessa maneira, pode-se prever a direção de uma reação e, assim, confirmar facilmente a factibilidade de qualquer mecanismo que seja proposto. Por exemplo, a partir dos valores observados para a magnitude do gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria e o ΔG da hidrólise do ATP dentro da mitocôndria, pode-se ter certeza que a síntese de ATP requer a passagem de mais de um próton por cada molécula de ATP que é sintetizada.

O valor de ΔG de uma reação é uma medida direta de quanto a reação está longe do equilíbrio. O grande valor negativo da hidrólise do ATP nas células reflete meramente o fato de que as células mantêm a reação de hidrólise do ATP longe do equilíbrio em cerca de 10 ordens de magnitude. Se uma reação atingir o equilíbrio, $\Delta G = 0$, a reação ocorrerá exatamente na mesma velocidade tanto na direção direta, como na reversa. Na hidrólise do ATP, o equilíbrio é alcançado quando a maior parte do ATP for hidrolisada, como ocorre em uma célula morta.

Em cada etapa, a parte da molécula que sofre alguma mudança está sombreada em azul, e o nome da enzima que catalisa a reação está em um quadro amarelo.

ETAPA 1 A glicose é fosforilada pelo ATP e forma um açúcar-fosfato. A carga negativa do fosfato evita a passagem do açúcar-fosfato através da membrana plasmática, prendendo a molécula dentro da célula.

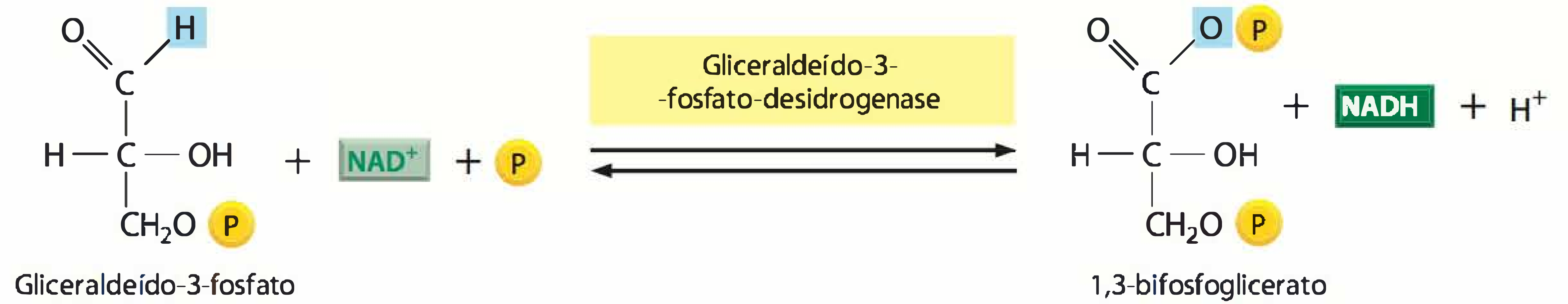
ETAPA 2 Um rearranjo facilmente reversível da estrutura química (isomerização) troca o oxigênio da carbonila do carbono 1 para o carbono 2, formando uma cetose a partir de um açúcar aldose. (Ver Painel 2-4.)

ETAPA 3 O novo grupo hidroxila do carbono 1 é fosforilado pelo ATP, preparando a formação de um açúcar-fosfato de três carbonos. A entrada de açúcar na glicólise é controlada nesta etapa por meio da regulação da enzima *fosfofrutocinase*.

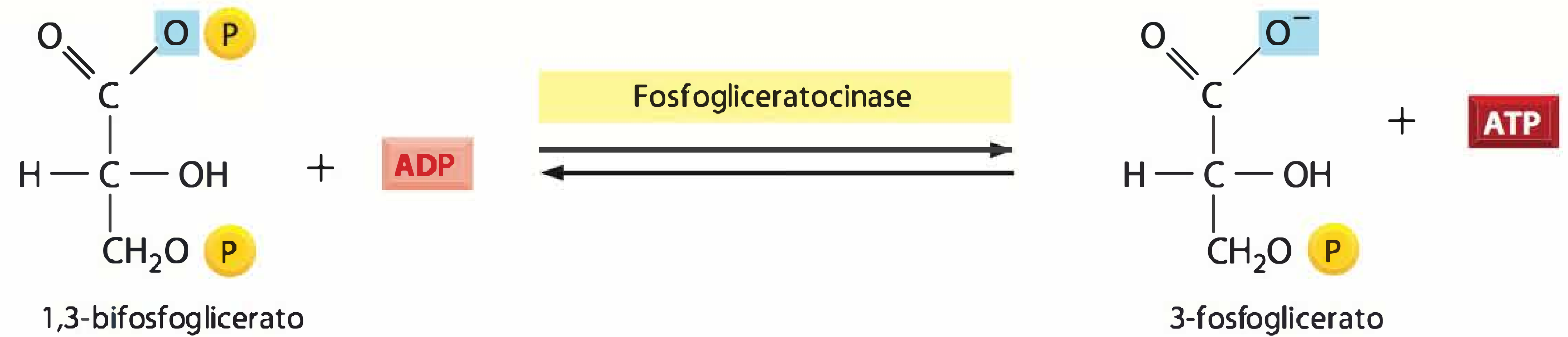
ETAPA 4 O açúcar de seis carbonos é clivado, produzindo duas moléculas de três carbonos. Apenas o gliceraldeído-3-fosfato pode seguir diretamente na glicólise.

ETAPA 5 O outro produto da etapa 4, fosfato de diidroxiacetona, é isomerisado, formando gliceraldeído-3-fosfato.

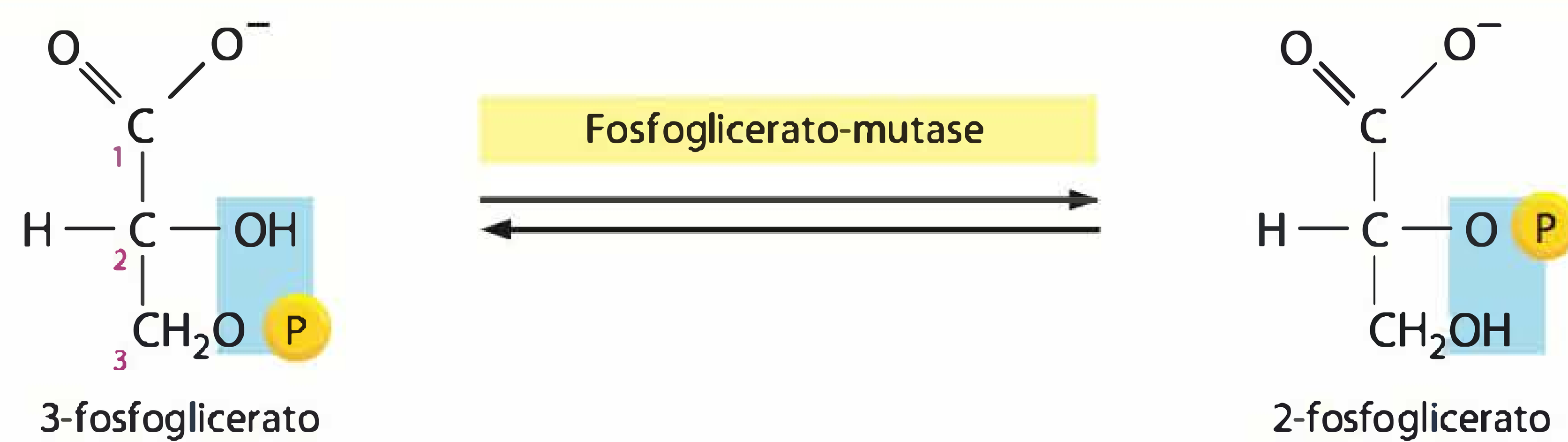
ETAPA 6 As duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são oxidadas. Começa a fase de geração de energia da glicólise, pois são formados NADH e uma nova ligação anidrido de alta energia com o fosfato (ver Figura 2-73).



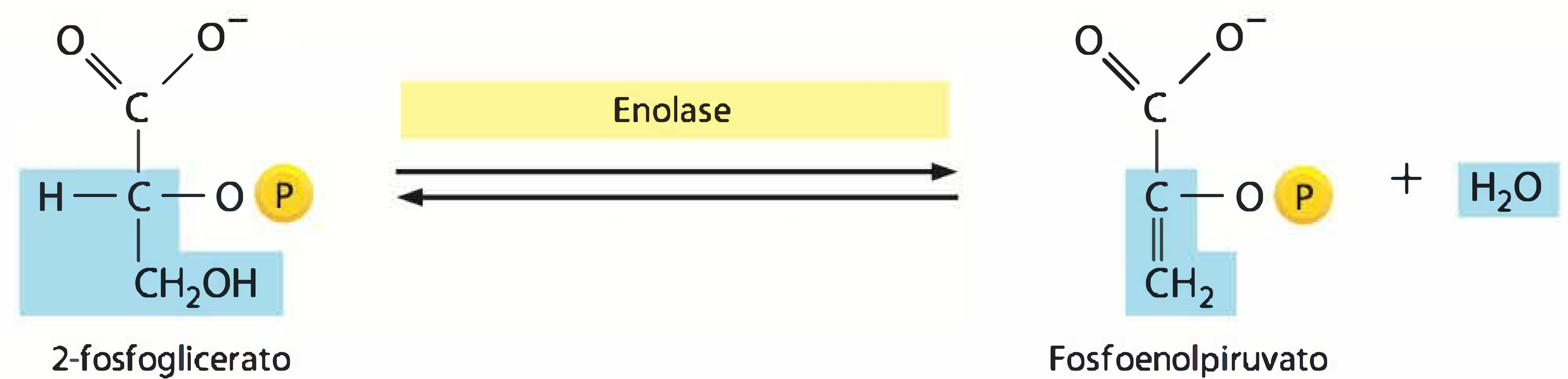
ETAPA 7 Transferência do grupo fosfato de alta energia gerado na etapa 6 ao ADP forma ATP.



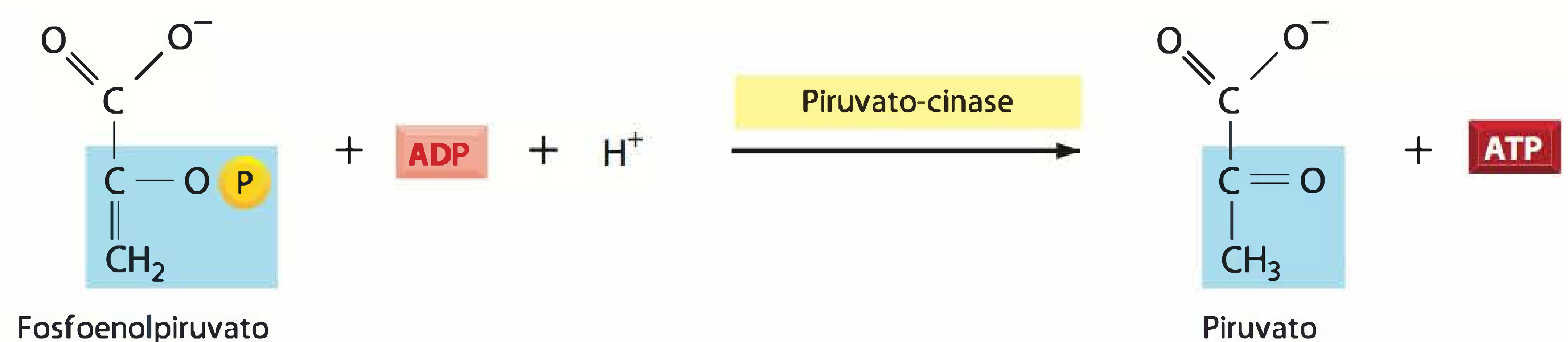
ETAPA 8 A ligação éster de fosfato remanescente no 3-fosfoglicerato, que tem uma energia livre de hidrólise relativamente baixa, é transferida do carbono 3 para o carbono 2, formando 2-fosfoglicerato.



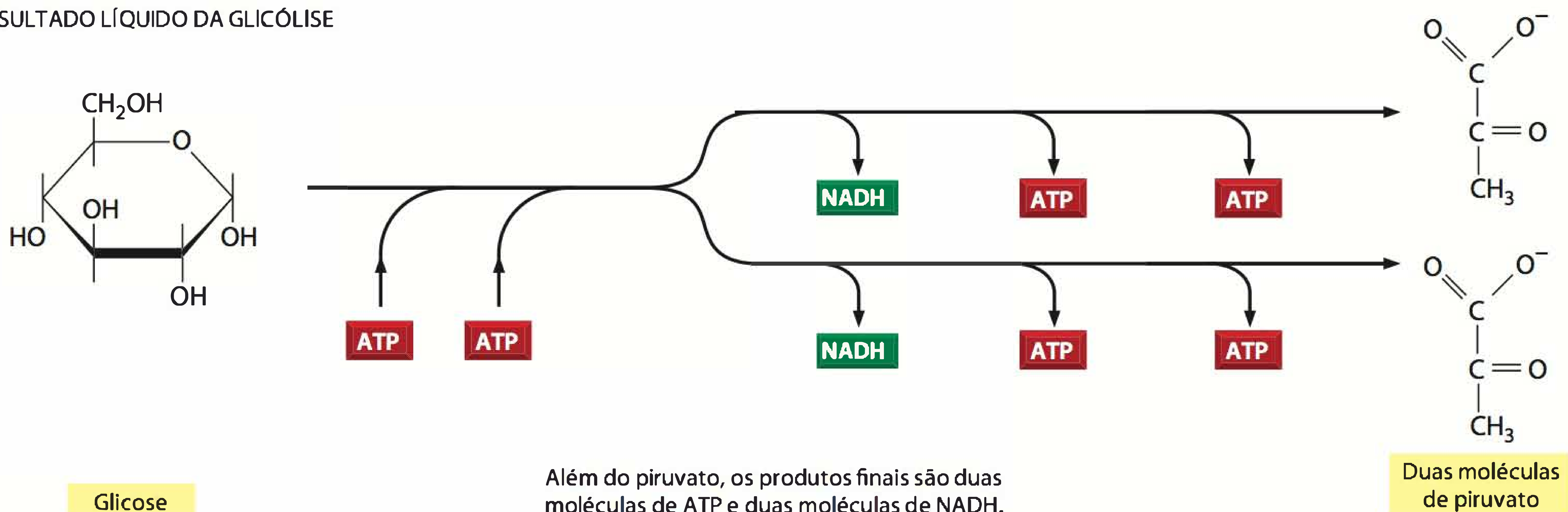
ETAPA 9 A remoção de água do 2-fosfoglicerato cria uma ligação enol-fosfato rica em energia.

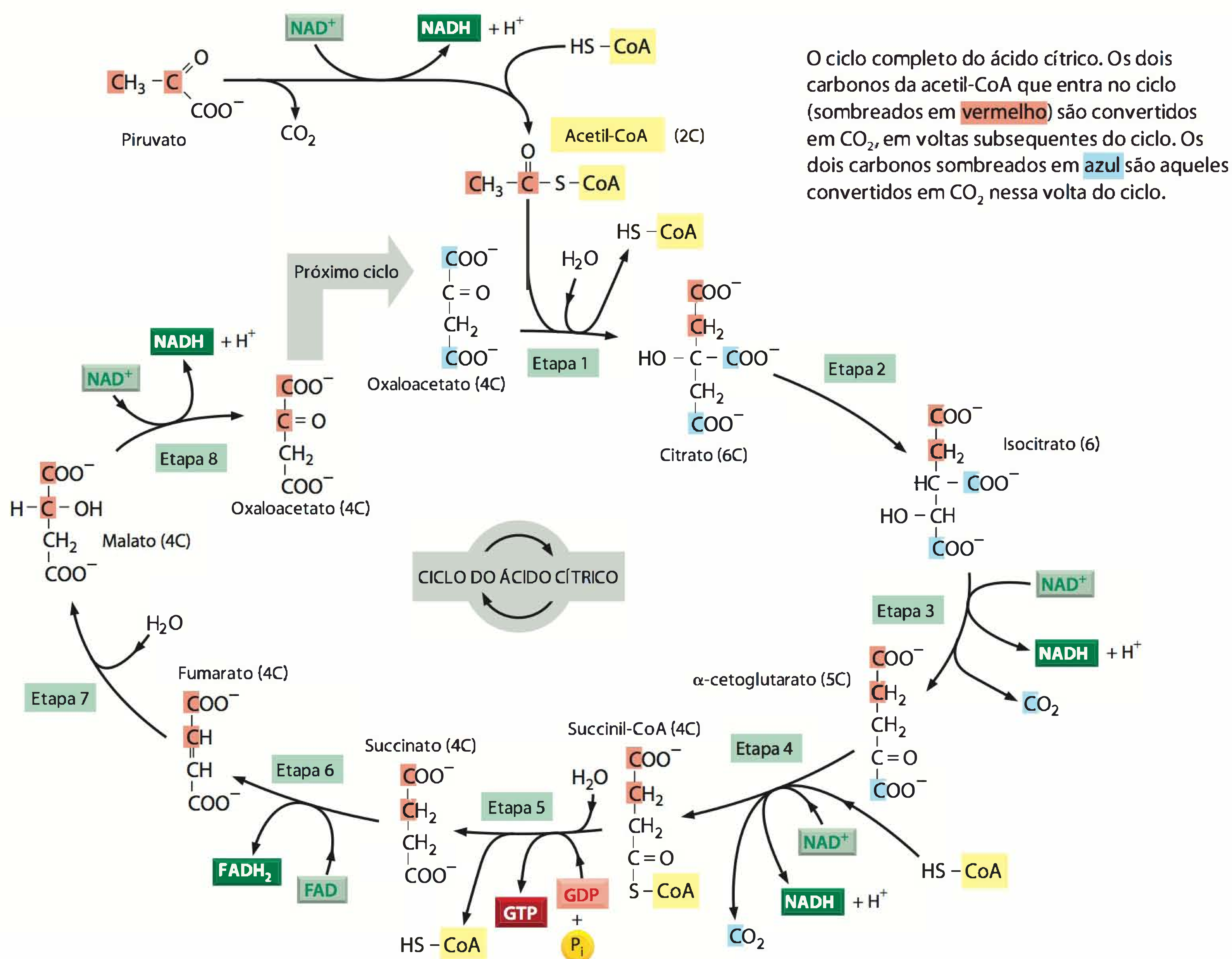


ETAPA 10 Transferência da ligação rica em energia do grupo fosfato que foi gerado na etapa 9 para o ADP, formando ATP e completando a glicólise.



RESULTADO LÍQUIDO DA GLICÓLISE

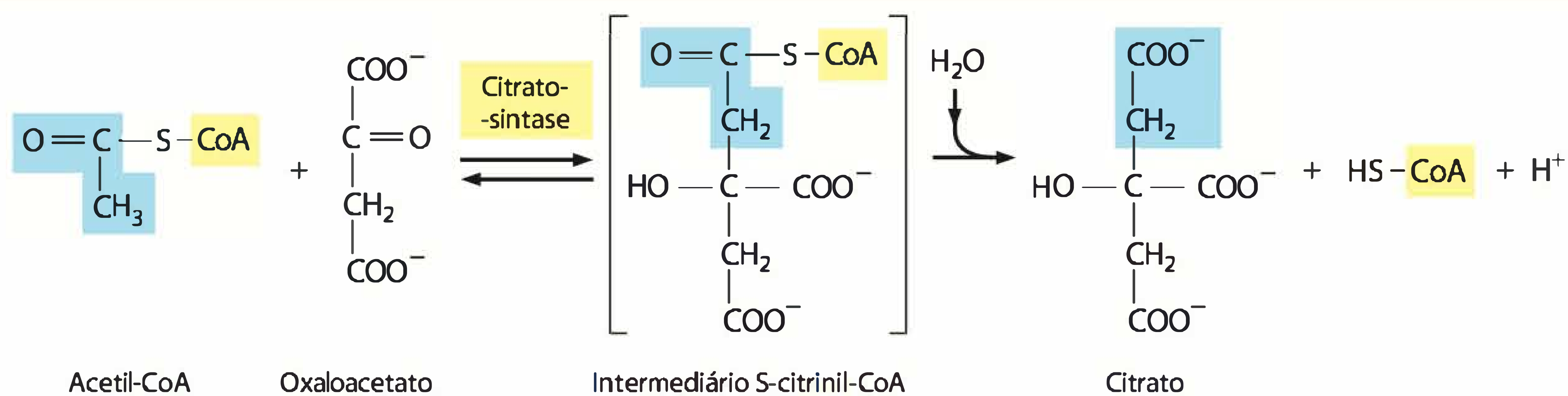




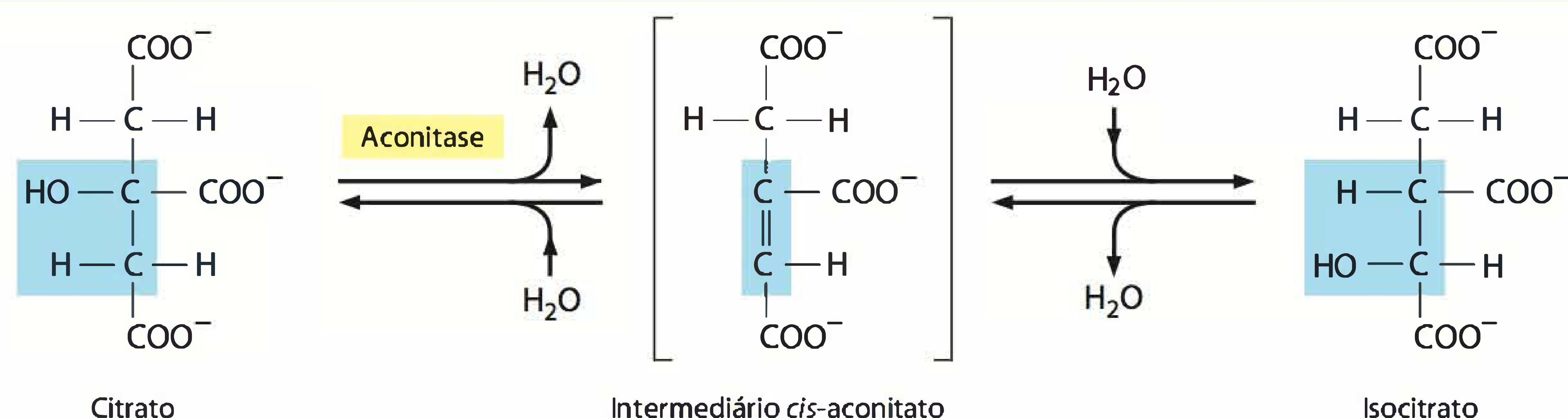
O ciclo completo do ácido cítrico. Os dois carbonos da acetil-CoA que entra no ciclo (sombreados em vermelho) são convertidos em CO_2, em voltas subsequentes do ciclo. Os dois carbonos sombreados em azul são aqueles convertidos em CO_2 nessa volta do ciclo.

Detalhes das oito etapas são mostrados a seguir. Em cada etapa, a parte da molécula que sofre modificação está sombreada em azul e o nome da enzima que catalisa a reação está em um quadro amarelo.

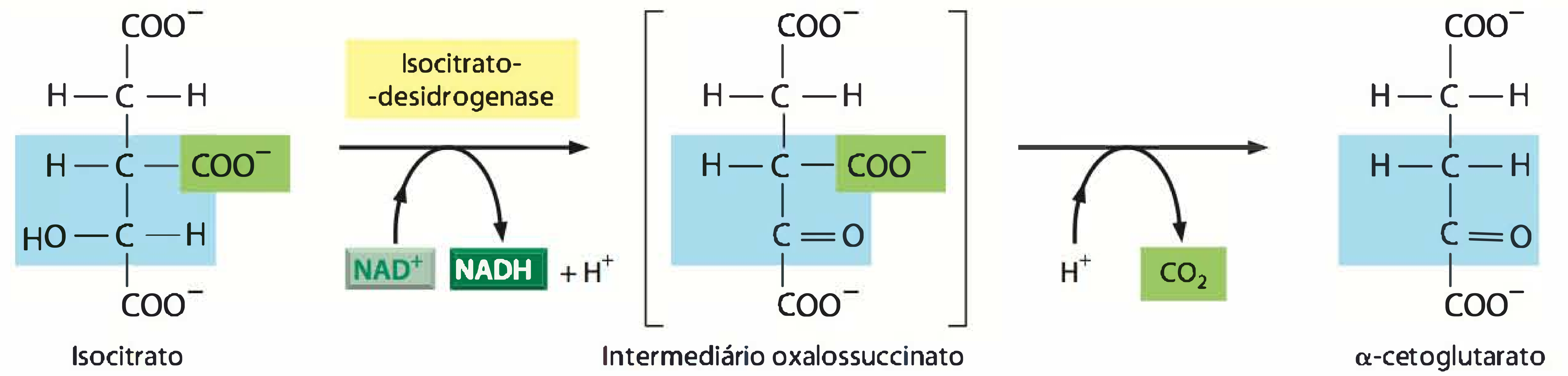
ETAPA 1 Depois que a enzima remove um próton do grupo CH_3 da acetil-CoA, o CH_2– carregado negativamente forma uma ligação com o carbono da carbonila do oxaloacetato. A perda subsequente da coenzima A (CoA) por hidrólise impulsiona a reação a ir adiante.



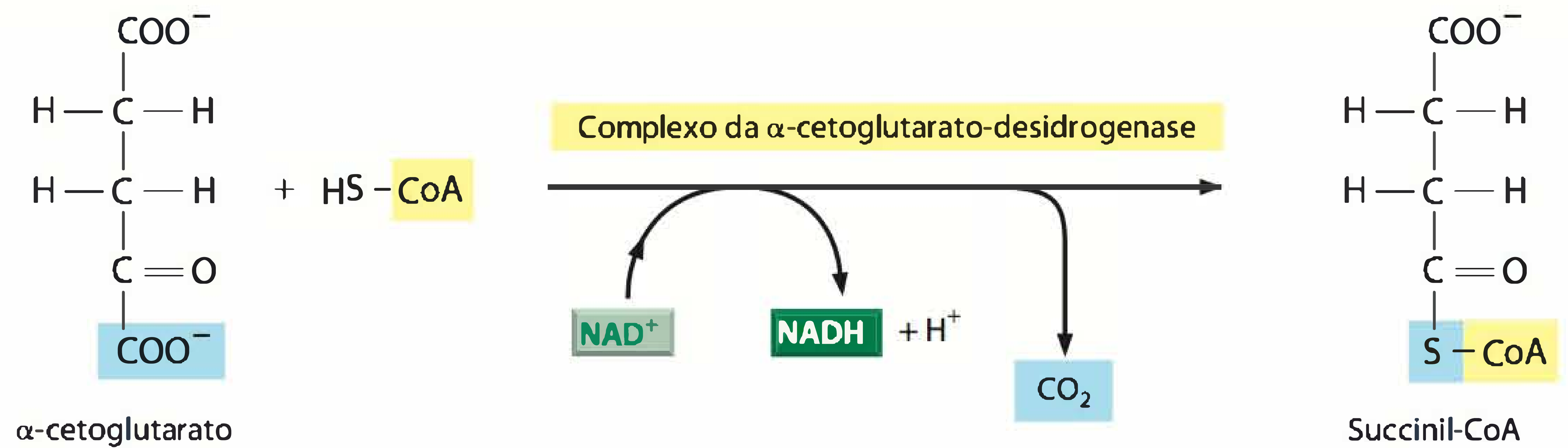
ETAPA 2 Uma reação de isomerização, na qual inicialmente há remoção de água que, depois, é adicionada novamente, move o grupo hidroxila de um átomo de carbono para o seu vizinho.



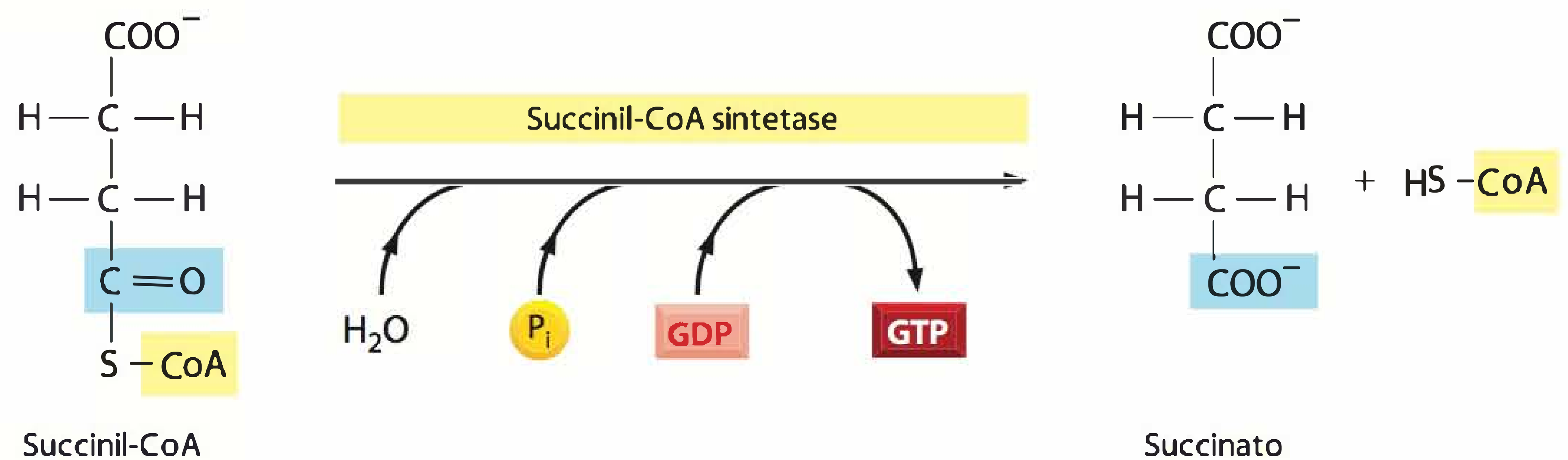
ETAPA 3 Na primeira das quatro etapas de oxidação do ciclo, o carbono que carrega o grupo hidroxila é convertido em um grupo carbonila. O intermediário formado é instável e perde CO_2 quando ainda está ligado à enzima.



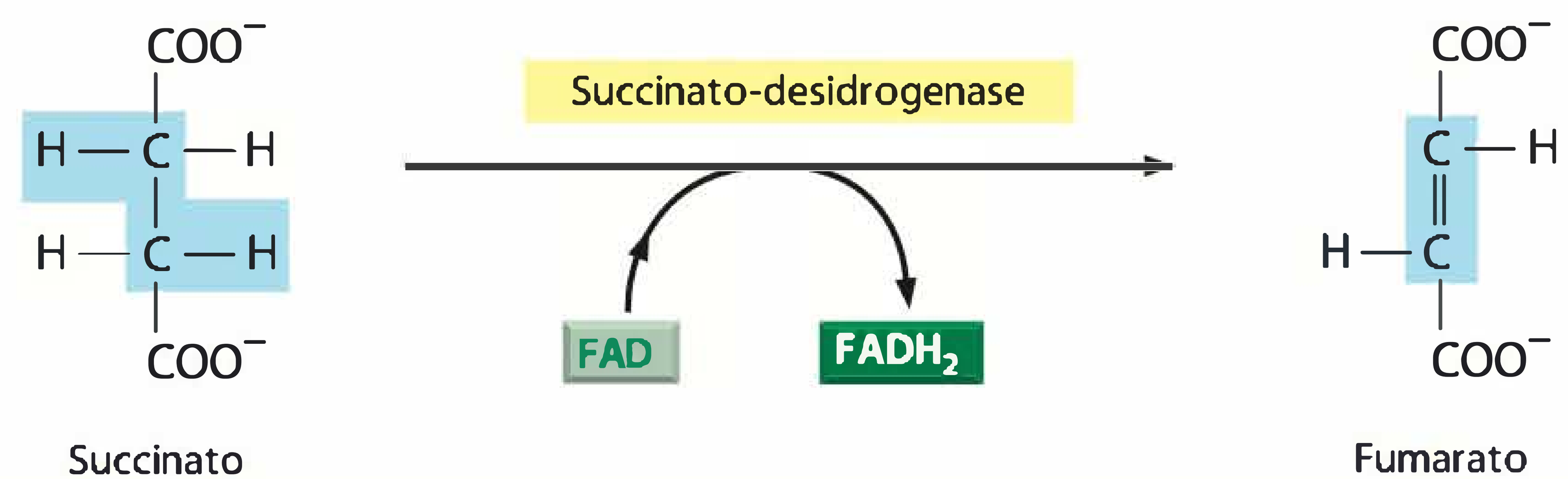
ETAPA 4 O complexo da *α-cetoglurarato-desidrogenase* tem muita semelhança com o complexo que converte piruvato em acetil-CoA (*piruvato-desidrogenase*). Da mesma maneira, ele catalisa uma oxidação que produz NADH, CO_2 e uma ligação tioéster rica em energia com a coenzima A (CoA).



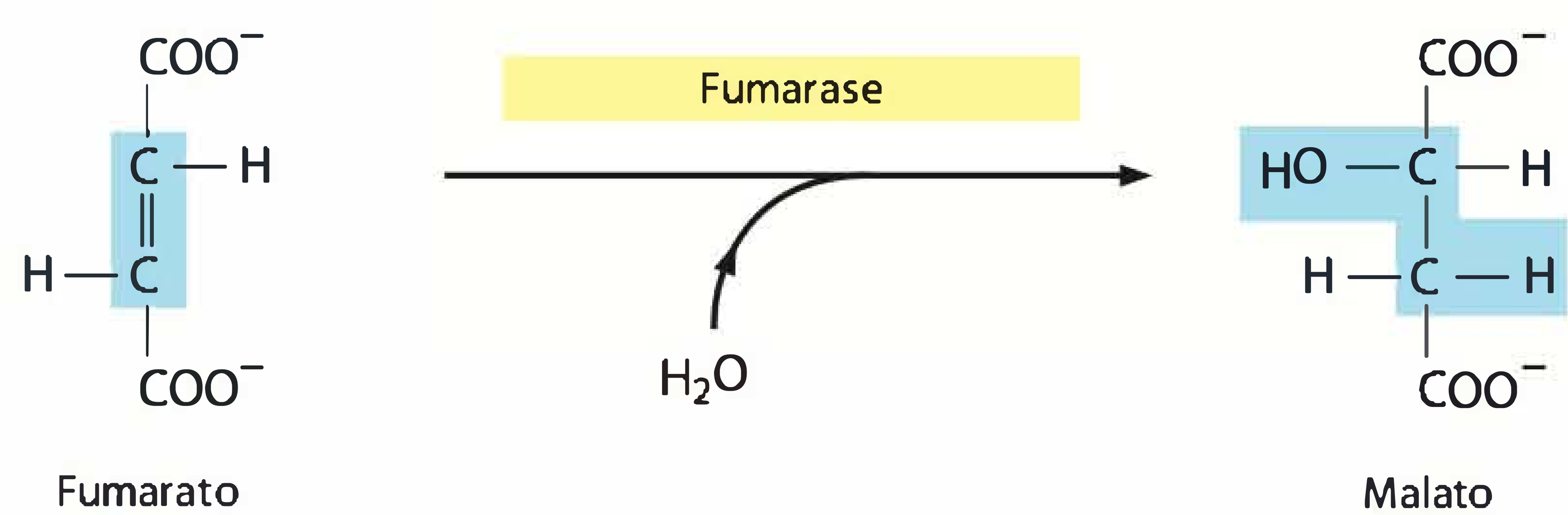
ETAPA 5 Uma molécula de fosfato da solução desloca a CoA, formando uma ligação fosfato rica em energia com o succinato. Este fosfato é então passado ao GDP, formando GTP. (Nas bactérias e plantas, forma-se ATP ao invés de GTP.)



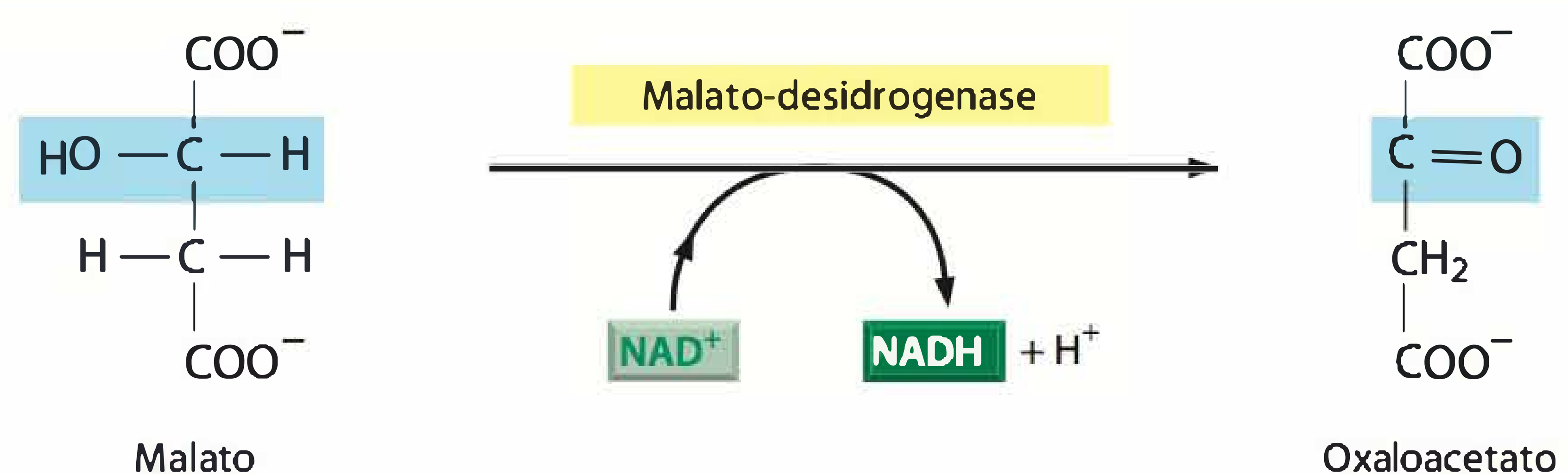
ETAPA 6 Na terceira etapa de oxidação do ciclo, FAD remove dois átomos de hidrogênio do succinato.



ETAPA 7 A adição de água ao fumarato coloca um grupo hidroxila próximo a um carbono de carbonila.



ETAPA 8 Na última das quatro etapas de oxidação do ciclo, o carbono que carrega o grupo hidroxila é convertido em um grupo carbonila, regenerando o oxaloacetato necessário para a etapa 1.



REFERÊNCIAS

Gerais

Berg, JM, Tymoczko, JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6th ed. New York: WH Freeman.
Garrett RH & Grisham CM (2005) Biochemistry, 3rd ed. Philadelphia: Thomson Brooks/Cole.
Horton HR, Moran LA, Scrimgeour et al. (2005) Principles of Biochemistry, 4th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
Nelson DL & Cox MM (2004) Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed. New York: Worth.
Nicholls DG & Ferguson SJ (2002) Bioenergetics, 3rd ed. New York: Academic Press.
Mathews CK, van Holde KE & Ahern K-G (2000) Biochemistry, 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cummings.
Moore JA (1993) Science As a Way of Knowing. Cambridge, MA: Harvard University Press.
Voet D, Voet JG & Pratt CW (2004) Fundamentals of Biochemistry. 2nd ed. New York: Wiley.

Os componentes químicos da célula

Abeles RH, Frey PA & Jencks WP (1992) Biochemistry. Boston: Jones & Bartlett.
Atkins PW (1996) Molecules. New York: WH Freeman.
Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.
Bretscher MS (1985) The molecules of the cell membrane. *Sci Am* 253:100-109.
Burley SK & Petsko GA (1988) Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* 39:125-189.
DeDuve C (2005) Singularities: Landmarks on the Pathways of Life. Cambridge: Cambridge University Press.
Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann Rev Biochem* 66:199-232.
Eisenberg D & Kauzman W (1969) The Structure and Properties of Water. Oxford: Oxford University Press.
Fersht AR (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci* 12:301-304.
Franks F (1993) Water. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
Henderson LJ (1927) The Fitness of the Environment, 1958 ed. Boston: Beacon.
Neidhardt FC, Ingraham JL & Schaechter M (1990) Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA: Sinauer.
Pauling L (1960) The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed. Ithaca, NY: Cornell University Press.
Saenger W (1984) Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer.
Sharon N (1980) Carbohydrates. *Sci Am* 243:90-116.
Stillinger FH (1980) Water revisited. *Science* 209:451-457.
Tanford C (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200:1012-1018.
Tanford C (1980) The Hydrophobic. Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed. New York: John Wiley.

Catálise e o uso de energia pelas células

Atkins PW (1994) The Second Law: Energy, Chaos and Form. New York: Scientific American Books.
Atkins PW & De Paula JD (2006) Physical Chemistry for the Life Sciences. Oxford: Oxiford University Press.
Baldwin JE f Krebs H (1981) The Evolution of Metabolic Cycles. *Nature* 291:381-382
Berg HC (1983) Random Walks in Biology. Princeton, NJ: Princeton University Press.
Dickerson RE (1969) Molecular Thermodynamics. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.
Dill KA & Bromberg S (2003) Molecular Driving Forces: Statistics Thermodynamics in Chemistry and Biology. New York: Garland Science.
Dressler D & Potter H (1991) Discovering Enzymes. New York. Scientific American Library.
Einsten A (1956) Investigations on the Theory of Brownian Movement. New York: Dover.
Fruton JS (1999) Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biology. New Haven: Yale University Press.
Goodsell DS (1991) Inside a living cell. *Trends Biochem Sci* 16:203-206.
Karplus M & McCammon JA (1986) The dynamics of proteins. *Sci Am* 254:42-51.
Karplus M & Petsko GA (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631-639.
Kauzmann W (1967) Thermodynamics and Statistics: with Applications to Gases. In Thermal Properties of Matter, vol 2, New York: WA Benjamin Inc.
Kornberg A (1989) For the Love of Enzymes. Cambridge, MA: Harvard University Press.
Lavenda BH (1985) Brownian Motion. *Sci Am* 252:70-85.
Lawlor DW (2001) Photosynthesis, 3rd ed. Oxford: BIOS.
Lehninger AL (1971) The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.
Lipmann F (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1:99-162.
Lipmann F (1971) Wanderings of a Biochemist. New York: Wiley.
Nisbet EE & Sleep NH (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* 409:1083-1091.
Racker E (1980) From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed Proc* 39:210-215.
Schödinger E (1944 & 1958) What is Life?: The Physical Aspect of the Living Cell and Mind and Matter, 1992 combined ed. Cambridge: Cambridge University Press.
van Holde KE, Johnson WC & Ho PS (2005) Principles of Physical Biochemistry, 2nd ed. Upper Saddle River. NJ: Prentice Hall.
Walsh C (2001) Enabling the chemistry of life. *Nature* 409:226-231.
Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173-1178.
Youvan DC & Marrs BL (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis *Sci Am* 256:42-49.

Como as células obtêm energia dos alimentos

Cramer WA & Knaff DB (1990) Energy Transduction in Biological Membranes. New York: Sphinger-Verlag.
Dismukes GC, Klimov W, Baranov SV et al. (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:2170-2175.
Fell D (1997) Understanding the Control of Metabolism. London: Portland Press.
Flatt JP (1995) Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 61:952S-959S.
Friedmann HC (2004) From *futybacterium* to *E. coli*: An essay on unity in biochemistry. *Perspect Biol Med* 47:66.
Fothergill-Gilmore LA (1986) The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem Sci* 11:47-51.
Heinrich R, Melendez-Hevia E, Montero F et al. (1999) The structural design of glycolysis: An evolutionary approach. *Biochem Soc Trans* 27:294-298.
Huynen MA, Dandekar T & Bork P (1999) Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol* 7:281-291.
Kornberg HL (2000) Krebs an his trinity of cicles. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1:225-228.
Krebs HA & Martin A (1981) Reminiscences and Reflections. Oxford/New York: Clarendon Press/Oxford University Press.
Krebs HA (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med* 14:154-170.
Martin BR (1987) Metabolic Regulation: A Molecular Approach. Oxford: Blackwell Scientific.
McGilvery RW (1983) Biochemistry: A Functional Approach, 3rd ed. Philadelphia: Saunders.
Morowitz HJ (1993) Beginnings of Cellular Life: Metabolism Recapitulates Biogenesis. New Haven: Yale University Press.
Newsholme EA & Stark C (1973) Regulation in Metabolism. New York: Wiley.

Proteínas

3

Neste capítulo

A FORMA E A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS 125

FUNÇÃO PROTEICA 152

Quando olhamos uma célula ao microscópio ou analisamos sua atividade elétrica ou bioquímica, estamos, na verdade, observando proteínas. As proteínas constituem a maior parte da massa celular seca. Não são meramente os blocos que constroem as células; elas também executam praticamente todas as funções celulares. Assim, as enzimas constituem as intricadas superfícies moleculares que promovem suas múltiplas reações químicas em uma célula. As proteínas imersas na membrana plasmática formam canais e bombas que controlam a passagem de pequenas moléculas para dentro e para fora das células. Outras proteínas carregam mensagens de uma célula para a outra, ou agem como integradoras de sinais, direcionando conjuntos de sinais da membrana plasmática para o núcleo celular. Outras, ainda, funcionam como minúsculas máquinas moleculares com partes móveis: as *cinesinas*, por exemplo, impulsionam organelas pelo citoplasma; as *topoisomerases* podem desenrolar moléculas de DNA enoveladas. Outras proteínas especializadas agem como anticorpos, toxinas, hormônios, moléculas anticongelantes, fibras elásticas, cordas ou como fontes de luminescência. Antes que possamos entender como os genes funcionam, como os músculos se contraem, como os nervos conduzem eletricidade, como os embriões se desenvolvem ou como o nosso corpo funciona, precisamos ter um profundo conhecimento acerca das proteínas.

A FORMA E A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

Do ponto de vista químico, as proteínas são as moléculas estruturalmente mais complexas e funcionalmente mais sofisticadas que conhecemos. Isso talvez não seja surpreendente, uma vez que se compreenda que a estrutura e a química de cada proteína foram desenvolvidas e ajustadas por bilhões de anos de história evolutiva. Mesmo para especialistas, a notável versatilidade das proteínas pode parecer realmente fantástica.

Nesta seção consideraremos como a localização de cada aminoácido em uma longa cadeia de aminoácidos que compõe uma proteína determina sua estrutura tridimensional. Mais adiante no capítulo, utilizaremos esse conhecimento da estrutura proteica em nível atômico para descrever como a forma precisa de cada molécula proteica determina sua função em uma célula.

A forma de uma proteína é especificada pela sua sequência de aminoácidos

Existem 20 tipos diferentes de aminoácidos nas proteínas, cada um com propriedades químicas distintas. Uma molécula de **proteína** é formada a partir de uma longa cadeia de aminoácidos, cada um ligado ao seu vizinho por uma ligação peptídica covalente. As proteínas são, portanto, também chamadas de *polipeptídeos*. Cada tipo de proteína tem uma sequência exclusiva de aminoácido, e existem milhares de proteínas diferentes, cada qual com a sua própria sequência de aminoácidos.

A sequência repetitiva dos átomos ao longo do centro da cadeia polipeptídica é denominada **cadeia principal polipeptídica**. Ligadas a essa cadeia repetitiva estão as porções dos aminoácidos que não estão envolvidas na formação da ligação peptídica e que conferem a cada aminoácido suas propriedades únicas: as 20 diferentes **cadeias laterais** dos aminoácidos (**Figura 3-1**). Algumas dessas cadeias laterais são apolares e hidrofóbicas ("com medo de água"), outras são carregadas negativa ou positivamente, algumas formam ligações covalentes rapidamente, e assim por diante. O **Painel 3-1** (p. 128-129) mostra suas estruturas atômicas e a **Figura 3-2** lista as suas abreviações.

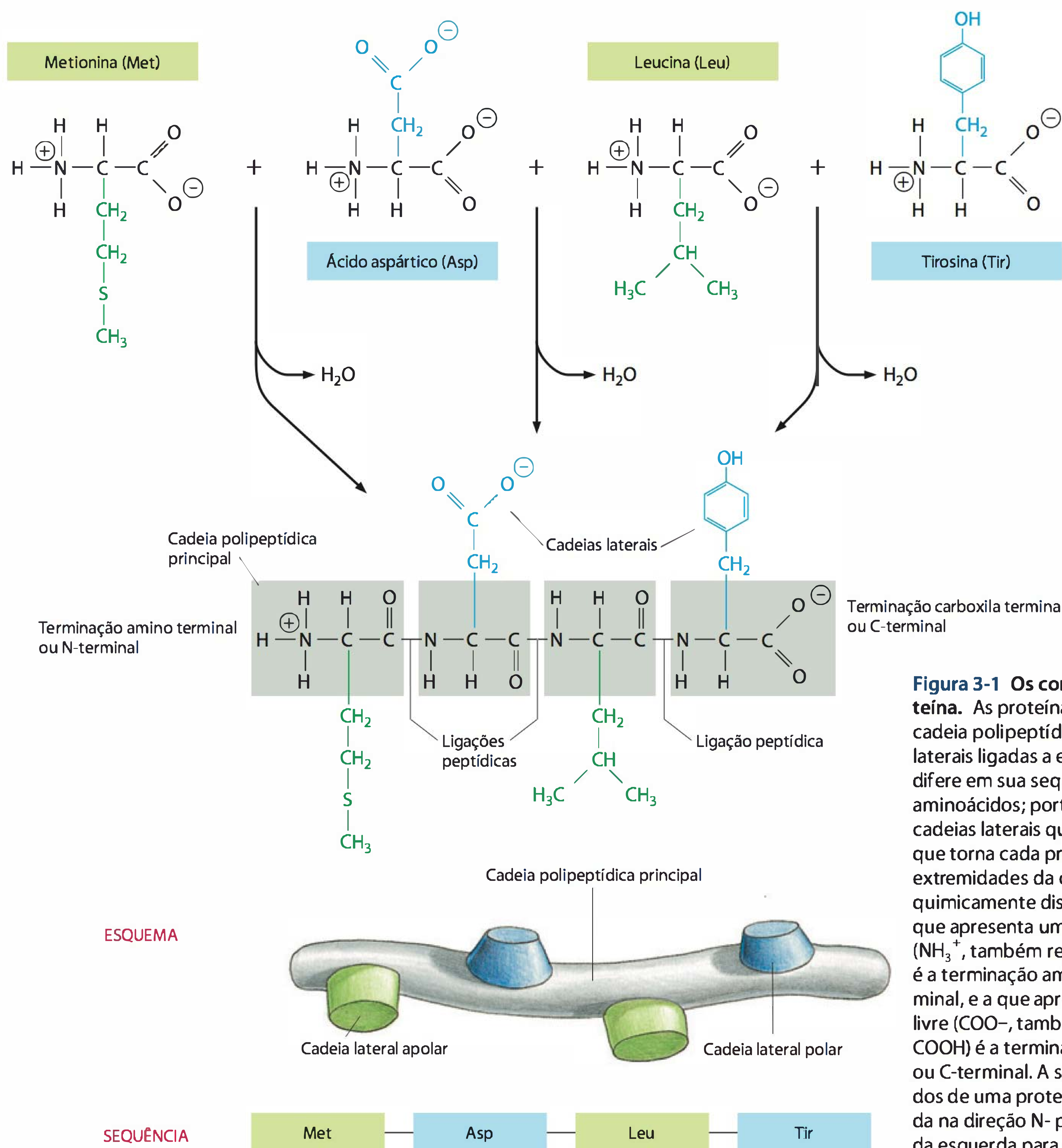


Figura 3-1 Os componentes de uma proteína. As proteínas consistem em uma cadeia polipeptídica principal com grupos laterais ligadas a ela. Cada tipo de proteína difere em sua sequência e seu número de aminoácidos; portanto, é a sequência de cadeias laterais quimicamente distintas que torna cada proteína diferente. As duas extremidades da cadeia polipeptídica são quimicamente distintas: a extremidade que apresenta um grupo amino livre (NH_3^+, também representado como NH_2) é a terminação amino terminal, ou N-terminal, e a que apresenta o grupo carboxila livre (COO–, também representado como COOH) é a terminação carboxila terminal ou C-terminal. A sequência de aminoácidos de uma proteína é sempre apresentada na direção N- para C-terminal, lendo-se da esquerda para a direita.

Como discutido no Capítulo 2, os átomos comportam-se como se fossem esferas rígidas, com um raio definido (seu raio de van der Waals). A condição em que dois átomos não podem se sobrepor limita fortemente os possíveis ângulos de ligação em uma cadeia polipeptídica (**Figura 3-3**). Essas limitações e outras interações estéricas restringem bastante a variedade de arranjos tridimensionais de átomos (ou *conformações*) possíveis. Todavia, uma longa cadeia flexível, como a de uma proteína, pode ainda enovelar-se de várias maneiras.

O enovelamento de uma cadeia polipeptídica é, entretanto, adicionalmente limitado por diferentes conjuntos de *ligações não-covalentes* fracas que se formam entre uma parte e outra da cadeia. Essas ligações envolvem tanto átomos da cadeia principal polipeptídica quanto átomos da cadeia lateral dos aminoácidos. Existem três tipos de ligações fracas: *ligações de hidrogênio*, *atrações eletrostáticas* e *atrações de van der Waals*, como explicado no Capítulo 2 (ver p. 54). As ligações não-covalentes são 30 a 300 vezes mais fracas que as ligações covalentes típicas que formam as moléculas biológicas. No entanto, muitas ligações fracas agindo em paralelo podem manter duas regiões de uma cadeia polipeptídica fortemente unidas. Dessa forma, a força combinada de um grande número dessas ligações não-covalentes determina a estabilidade de cada forma enovelada (**Figura 3-4**).

AMINOÁCIDO			CADEIA LATERAL
Ácido aspártico	Asp	D	Negativa
Ácido glutâmico	Glu	E	Negativa
Arginina	Arg	R	Positiva
Lisina	Lis	K	Positiva
Histidina	His	H	Positiva
Asparagina	Asn	N	Polar não-carregada
Glutamina	Gln	Q	Polar não-carregada
Serina	Ser	S	Polar não-carregada
Treonina	Tre	T	Polar não-carregada
Tirosina	Tir	Y	Polar não-carregada

AMINOÁCIDOS POLARES

AMINOÁCIDO			CADEIA LATERAL
Alanina	Ala	A	Apolar
Glicina	Gli	G	Apolar
Valina	Val	V	Apolar
Leucina	Leu	L	Apolar
Isoleucina	Ile	I	Apolar
Prolina	Pro	P	Apolar
Fenilalanina	Phe	F	Apolar
Metionina	Met	M	Apolar
Triptofano	Trp	W	Apolar
Cisteína	Cys	C	Apolar

AMINOÁCIDOS APOLARES

Figura 3-2 Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas. Cada aminoácido possui uma abreviação de três letras e de uma letra. Existe um número igual de cadeias laterais polares e apolares; no entanto, algumas cadeias laterais listadas aqui como polares são grandes o suficiente para apresentarem algumas propriedades apolares (p. ex, Tir, Tre, Arg, Lis). Para estruturas atômicas, ver Painel 3-1 (p. 128-129).

Um quarto tipo de ligação fraca também tem um papel central na determinação da forma de uma proteína. Como descrito no Capítulo 2, moléculas hidrofóbicas, incluindo as cadeias laterais apolares de certos aminoácidos, tendem a se agrupar em um meio aquoso a fim de minimizar o seu efeito desorganizador sobre a rede de ligações de hidrogênio das moléculas de água (ver p. 54 e Painel 2-2, p. 108-109). Por essa razão, um fator importante que governa o enovelamento de qualquer proteína é a distribuição de seus aminoácidos polares e apolares. As cadeias laterais apolares (hidrofóbicas) de uma proteína, como aquelas pertencentes aos aminoácidos fenilalanina, leucina, valina e triptofano, tendem a se agrupar no interior da molécula (exatamente como pequenas gotas de óleo hidrofóbicas se unem na água para formar uma grande gota). Isso permite que elas evitem o contato com a água que as cerca no interior de uma célula. Ao contrário, as cadeias laterais polares – como aquelas pertencentes à arginina, à glutamina e à histidina – tendem a se posicionar na superfície da molécula, onde podem formar ligações de hidrogênio com a água e com outras moléculas polares (**Figura 3-5**). Aminoácidos polares localizados no interior da proteína geralmente formam ligações de hidrogênio com outros aminoácidos polares, ou com a cadeia principal.

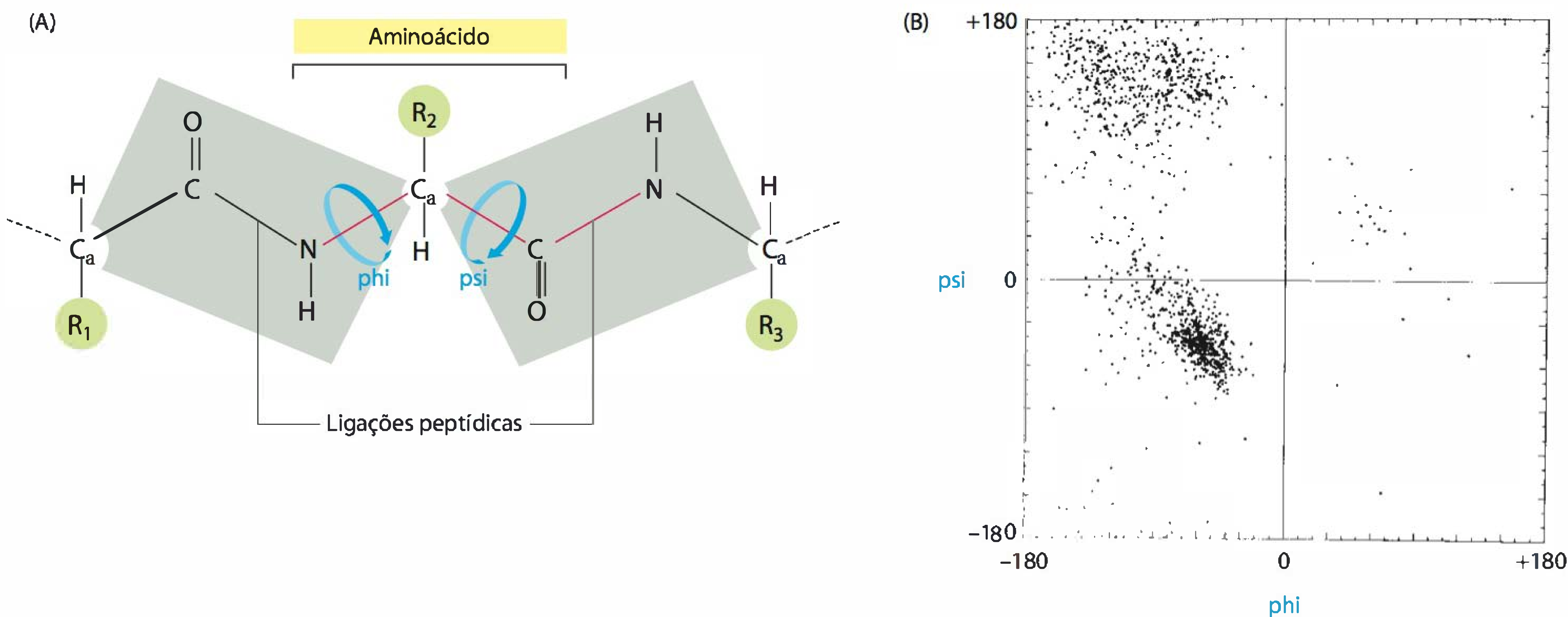
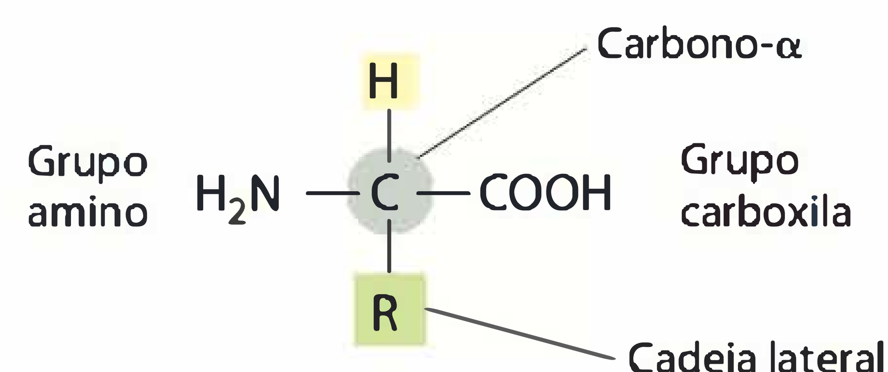


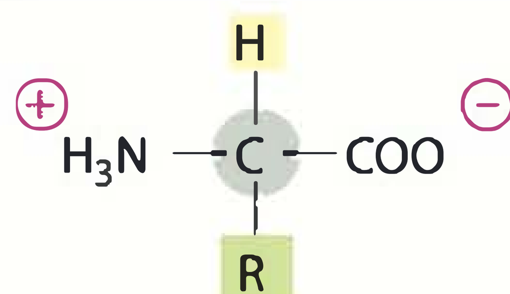
Figura 3-3 Limitações estéricas nos ângulos de ligação na cadeia polipeptídica. (A) Cada aminoácido contribui com três ligações (em *vermelho*) para a cadeia principal. A ligação peptídica é planar (em *cinza sombreado*) e não permite rotação. Ao contrário, a rotação pode ocorrer na ligação entre C_α–C, cujo ângulo de rotação é chamado de psi (ψ), e na ligação entre N–C_α, cujo ângulo de rotação é chamado de phi (ϕ). Por convenção, um grupo R muitas vezes é utilizado para simbolizar a cadeia lateral de um aminoácido (*círculos verdes*). (B) A conformação dos átomos da cadeia principal de uma proteína é determinada por um par de ângulos ϕ e ψ para cada aminoácido; devido a colisões estéricas entre os átomos de cada aminoácido, muitos pares de ângulos ϕ e ψ não ocorrem. Nesse gráfico, denominado gráfico de Ramachandran, cada ponto representa um par de ângulos observado em uma proteína. O conjunto de pontos no quadrante inferior esquerdo representa todos os aminoácidos em conformação estrutural de hélice α (ver Figura 3-7A). (B, de J. Richardson, *Adv. Prot. Chem.* 34:174-175, 1981. Com permissão da Academic Press.)

AMINOÁCIDO

A fórmula geral de um aminoácido é

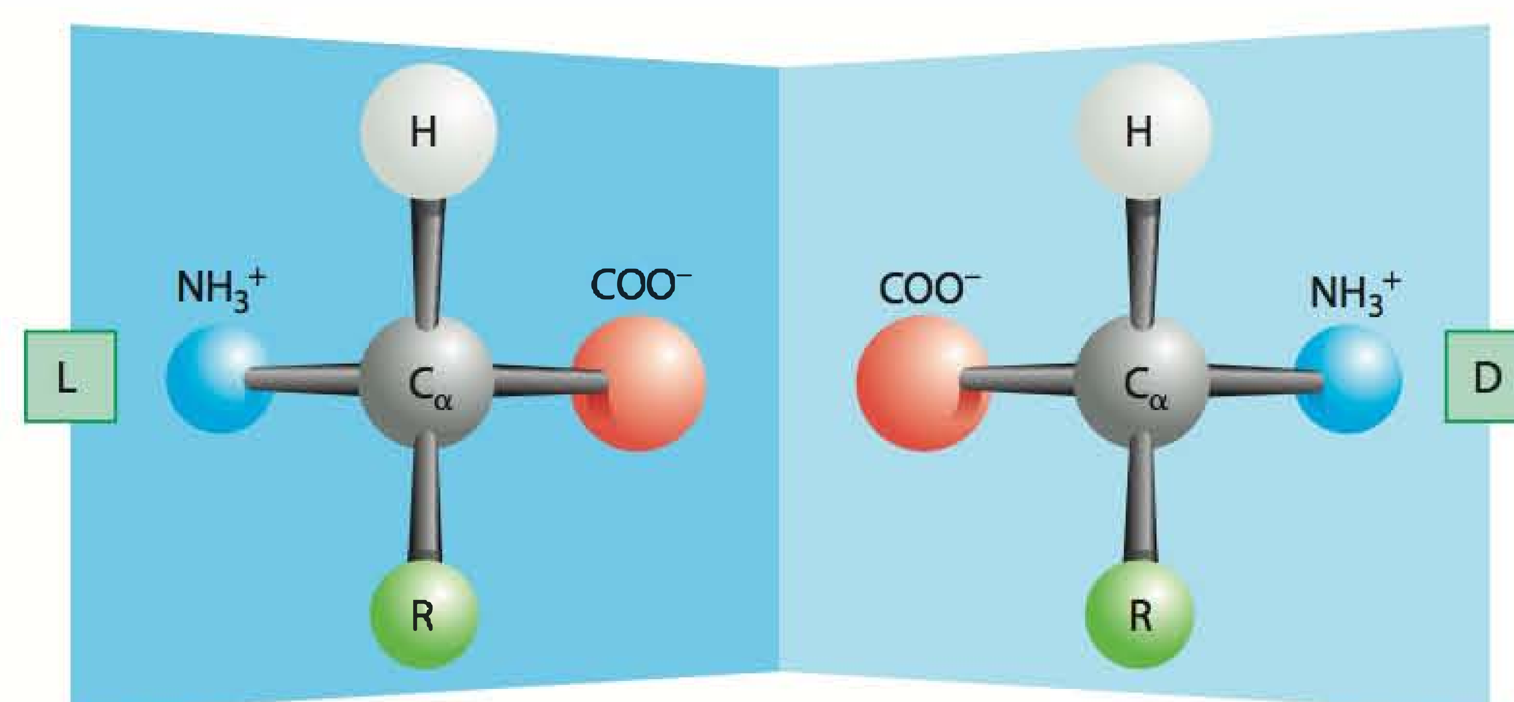


R é comumente uma das 20 cadeias laterais diferentes. Em pH 7, tanto o grupo amino quanto o grupo carboxila estão ionizados.



ISÔMEROS ÓPTICOS

O carbono a é assimétrico, o que permite duas formas especulares isômeras (ou estereoisômeros), L e D.



Proteínas são formadas exclusivamente por L-aminoácidos.

FAMÍLIAS DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos mais comuns são agrupados conforme suas cadeias laterais sejam

- ácidas
- básicas
- polares não-carregadas
- apolares

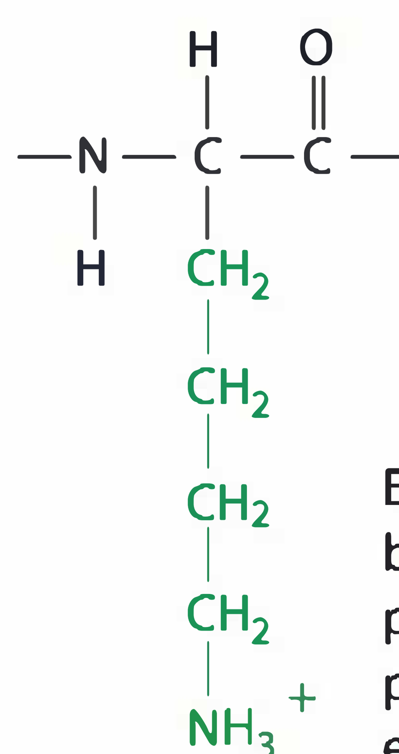
A estes 20 aminoácidos mais comuns foram atribuídas abreviações de três letras e de uma letra.

Assim, alanina = Ala = A

CADEIAS LATERIAS BÁSICAS

Lisina

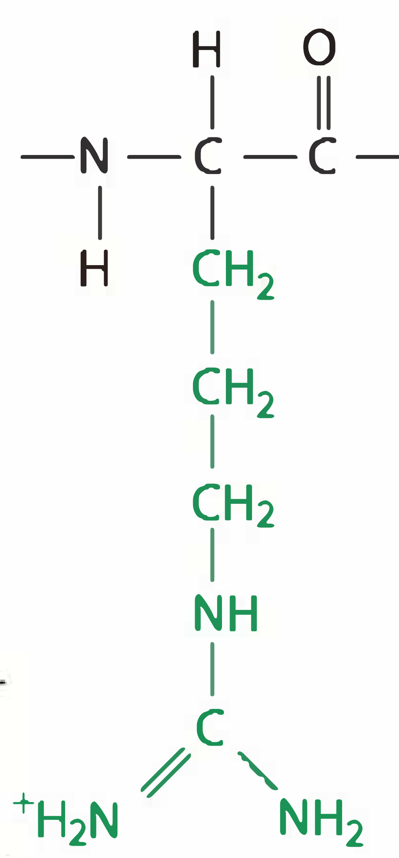
(Lis ou K)



Este grupo é bastante básico, pois sua carga positiva é estabilizada por ressonância.

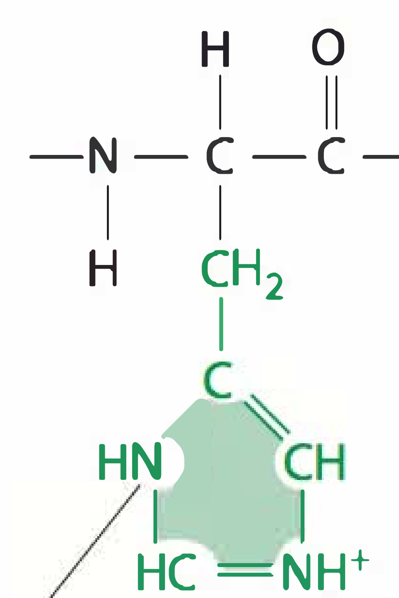
Arginina

(Arg, ou R)



Histidina

(His, ou H)

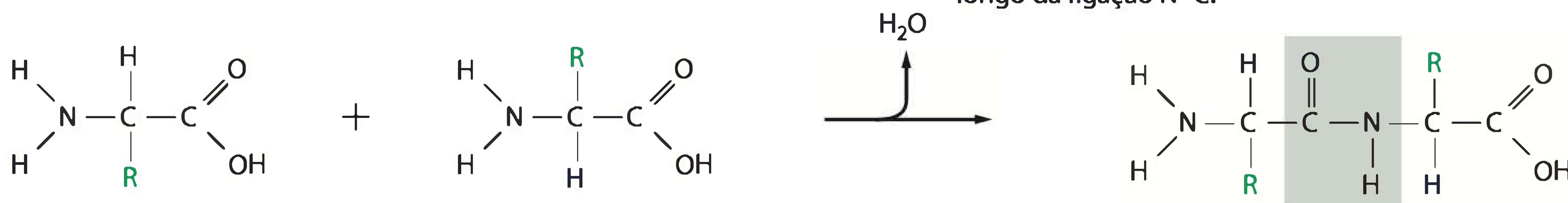


Estes átomos de nitrogênio possuem uma afinidade relativamente fraca por um H^+ e são apenas parcialmente positivos em pH neutro.

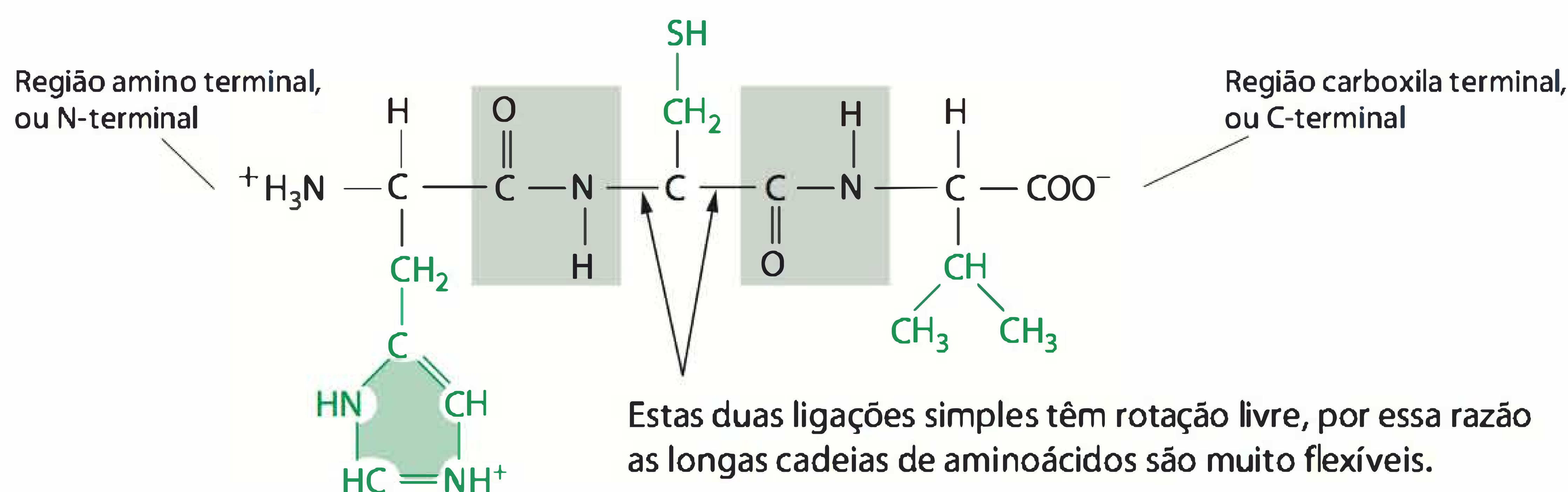
LIGAÇÕES PEPTÍDICAS

Os aminoácidos são comumente unidos por uma ligação amida, denominada ligação peptídica.

Ligação peptídica: os quatro átomos em cada *caixa cinza* formam uma unidade planar rígida. Não existe rotação ao longo da ligação N–C.



Proteínas são logos polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, e são sempre representadas com a região N-terminal à esquerda. A sequência deste tripeptídeo é histidina-cisteína-valina.

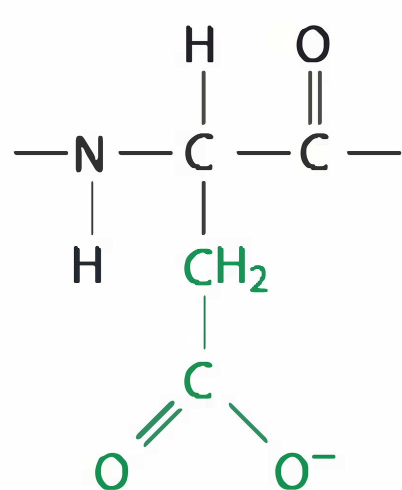


Estas duas ligações simples têm rotação livre, por essa razão as longas cadeias de aminoácidos são muito flexíveis.

CADEIAS LATERAIS ÁCIDAS

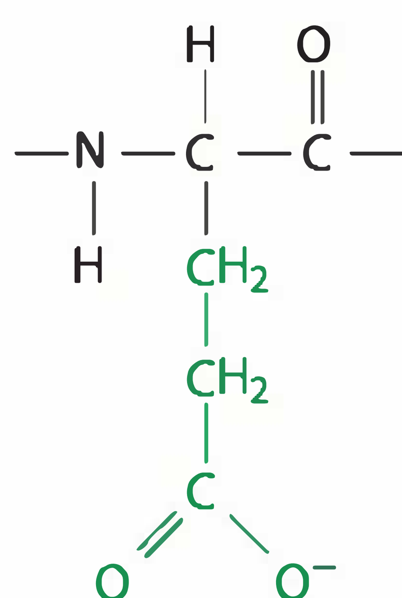
Ácido aspártico

(Asp, ou D)



Ácido glutâmico

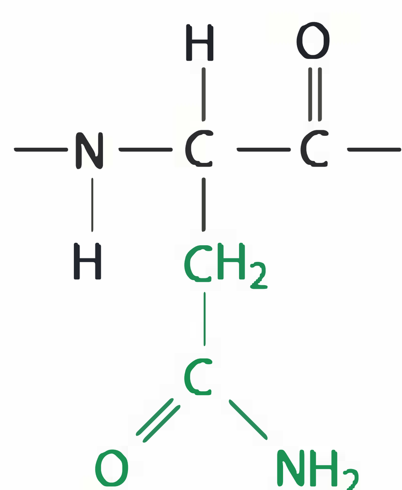
(Glu, ou E)



CADEIAS LATERIAS POLARES NÃO-CARREGADAS

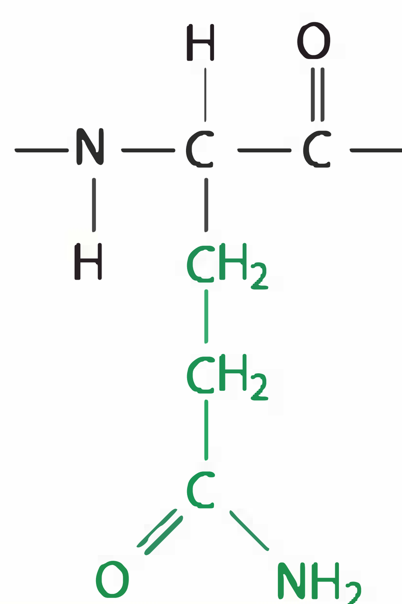
Asparagina

(Asn, ou N)



Glutamina

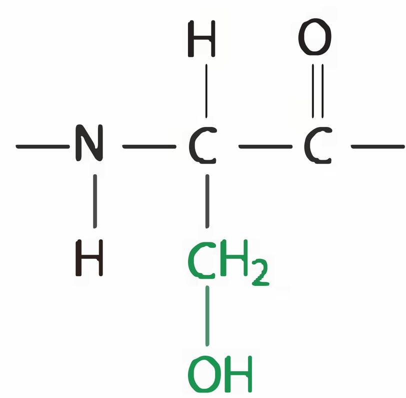
(Gln, ou Q)



Apesar de o átomo de N da amida não ser carregado em pH neutro, ele é polar.

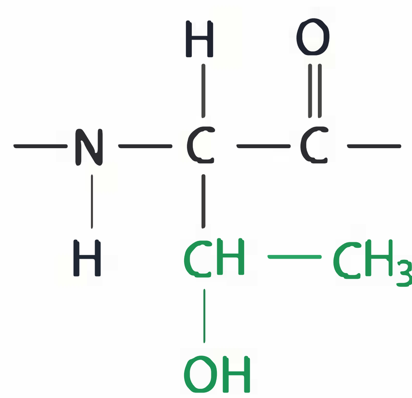
Serina

(Ser, ou S)



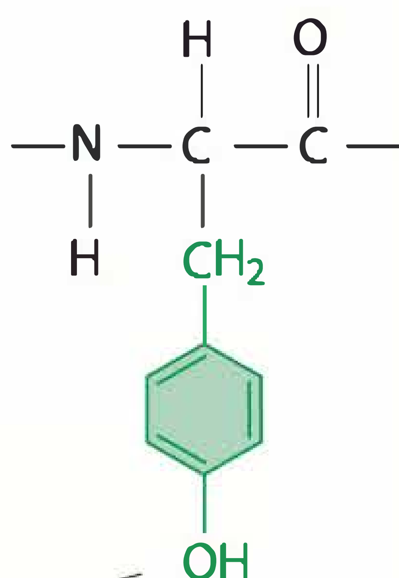
Treonina

(Tre, ou T)



Tirosina

(Tir, ou Y)

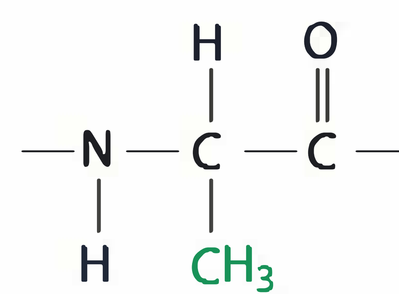


O grupo –OH é polar.

CADEIAS LATERIAS APOLARES

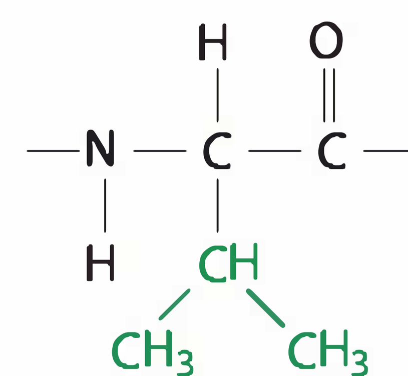
Alanina

(Ala, ou A)



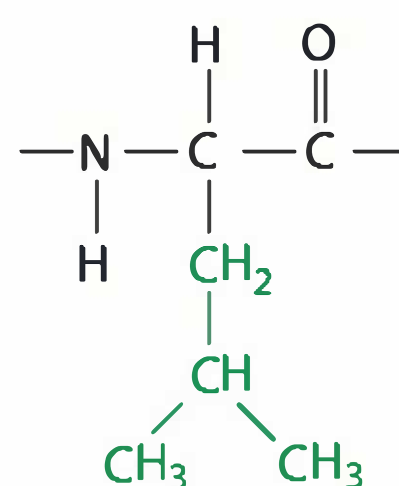
Valina

(Val, ou V)



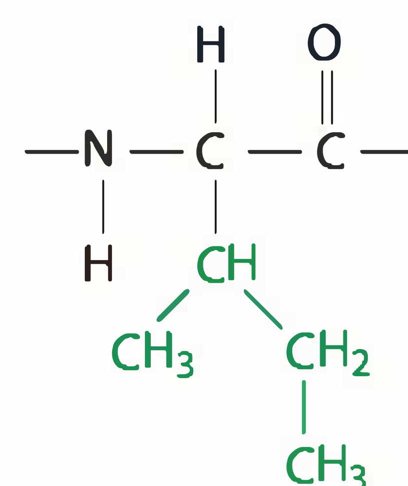
Leucina

(Leu, ou L)



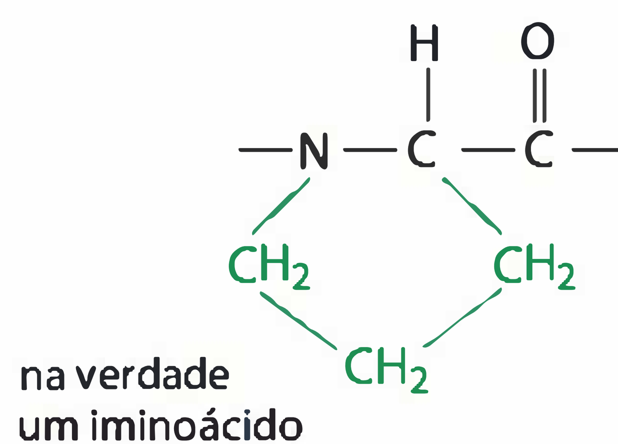
Isoleucina

(Ile, ou I)



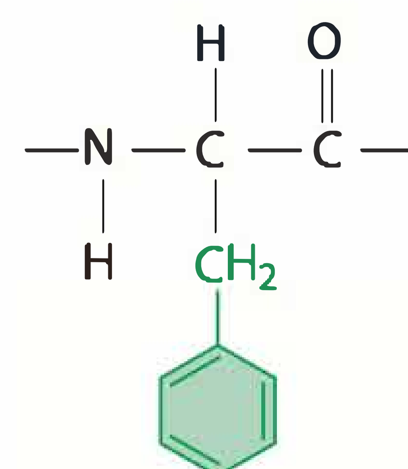
Prolina

(Pro, ou P)



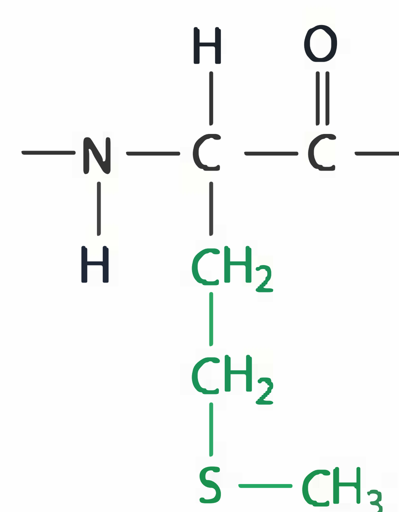
Fenilalanina

(Phe, ou F)



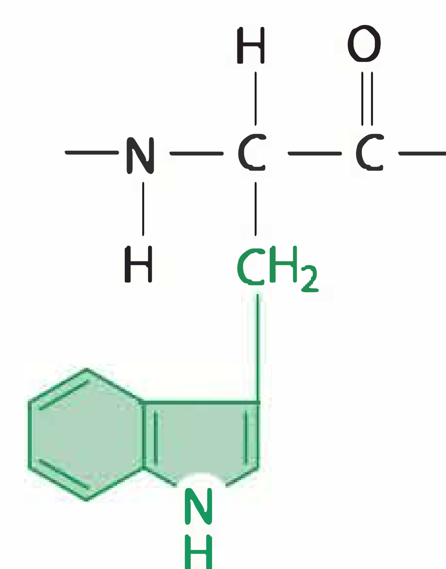
Metionina

(Met, ou M)



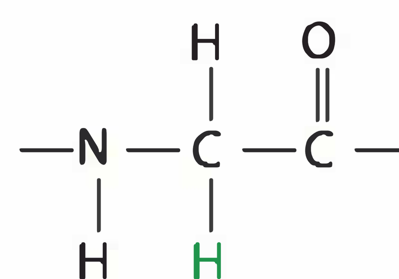
Triptofano

(Trp, ou W)



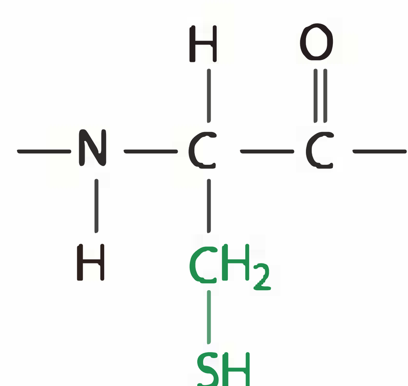
Glicina

(Gly, ou G)



Cisteína

(Cys, ou C)



Ligações dissulfeto podem se formar entre as cadeias laterais de duas cisteínas nas proteínas.



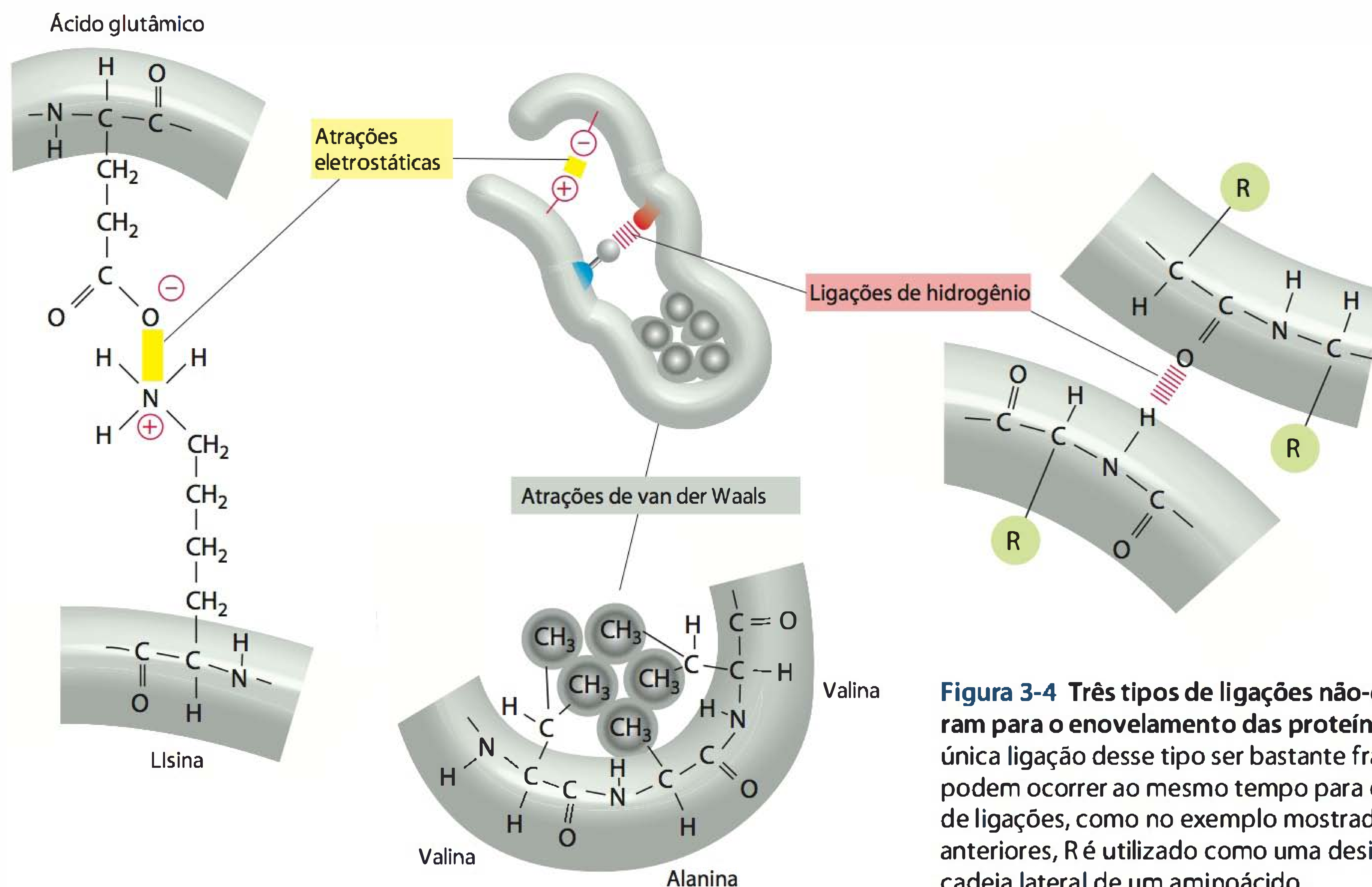


Figura 3-4 Três tipos de ligações não-covalentes colaboram para o enovelamento das proteínas. Apesar de uma única ligação desse tipo ser bastante fraca, muitas delas podem ocorrer ao mesmo tempo para criar um forte arranjo de ligações, como no exemplo mostrado. Como nas figuras anteriores, R é utilizado como uma designação geral para a cadeia lateral de um aminoácido.

As proteínas se enovelam na conformação de menor energia

Como resultado de todas essas interações, a maioria das proteínas tem uma estrutura tridimensional particular, que é determinada pela sequência dos aminoácidos na sua cadeia. A estrutura final enovelada, ou **conformação**, de qualquer cadeia polipeptídica geralmente é aquela que minimiza a sua energia livre. Biólogos têm estudado o enovelamento em tubos de ensaio, utilizando proteínas altamente purificadas. Tratamentos com certos solventes, que rompem as interações não-covalentes que mantêm unida a cadeia enovelada, desenovelam, ou *desnaturam*, a proteína. Esse tratamento converte a proteína em uma cadeia polipeptídica flexível, que perdeu a sua forma natural. Quando o solvente desnaturante é removido, a proteína geralmente reenovela espontaneamente, ou *renatura*, na sua conformação original (**Figura 3-6**). Isso indica que a sequência de aminoácidos contém toda a informação necessária para a especificação da forma tridimensional de uma proteína, o que é um ponto fundamental para a compreensão da função celular.

Cada proteína, normalmente, enovela-se em uma única conformação estável. Entretanto, a conformação em geral varia levemente quando a proteína interage com outras moléculas dentro da célula. Essa variação na forma normalmente é crucial para a função da proteína, como veremos adiante.

Embora a cadeia proteica possa enovelar-se na sua conformação correta sem ajuda externa, nas células vivas proteínas especiais denominadas *chaperonas moleculares* geralmente auxiliam o processo de enovelamento proteico. Chaperonas moleculares ligam-se às

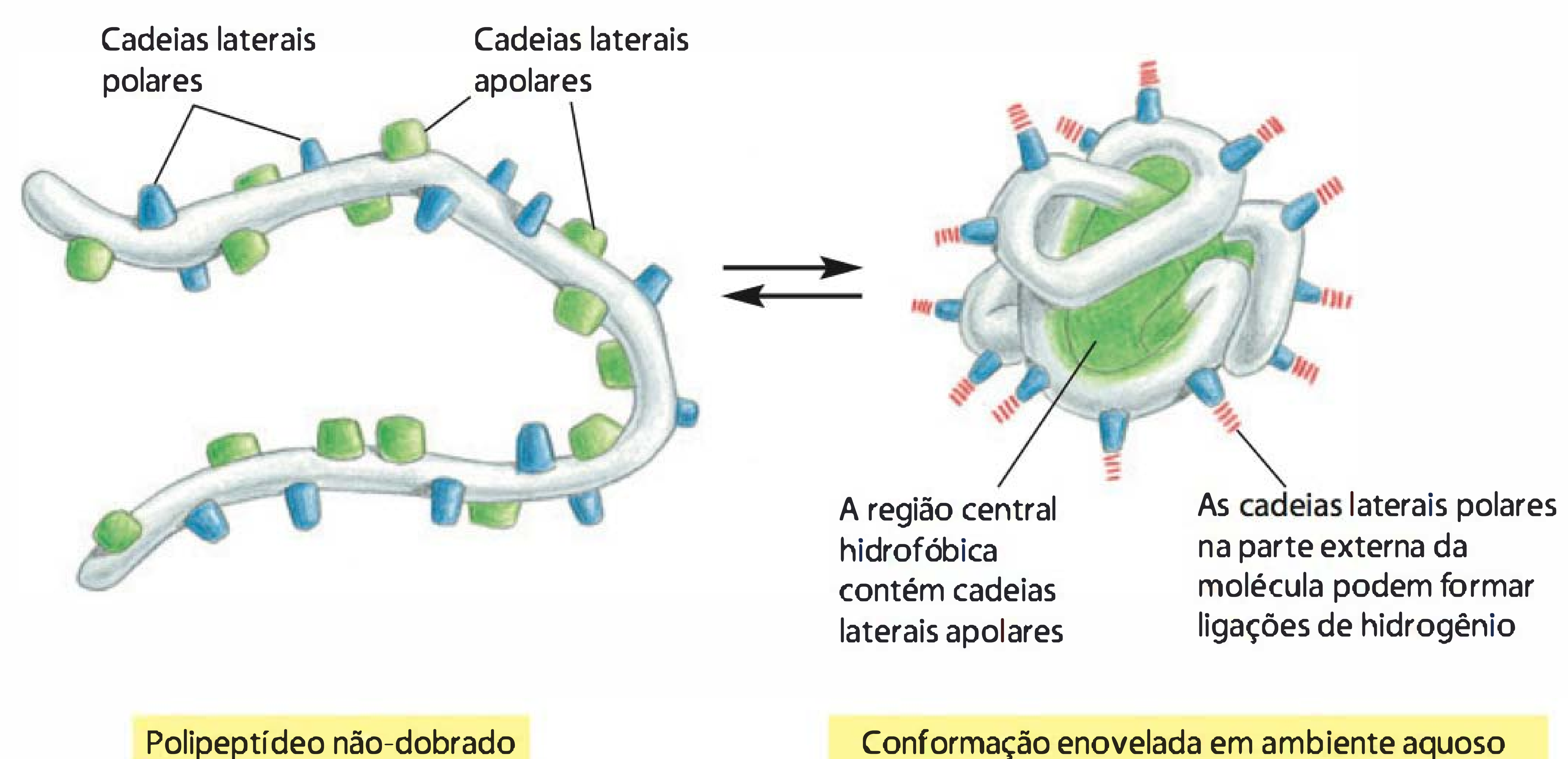


Figura 3-5 Como uma proteína se dobra em uma formação compacta. As cadeias laterais de aminoácidos polares tendem a se agrupar na parte externa da proteína, onde elas podem interagir com a água; as cadeias laterais de aminoácidos apolares se concentram no interior para formar um centro hidrófobico empacotado de átomos que se escondem da água. Neste desenho esquemático, a proteína contém apenas cerca de 30 aminoácidos.

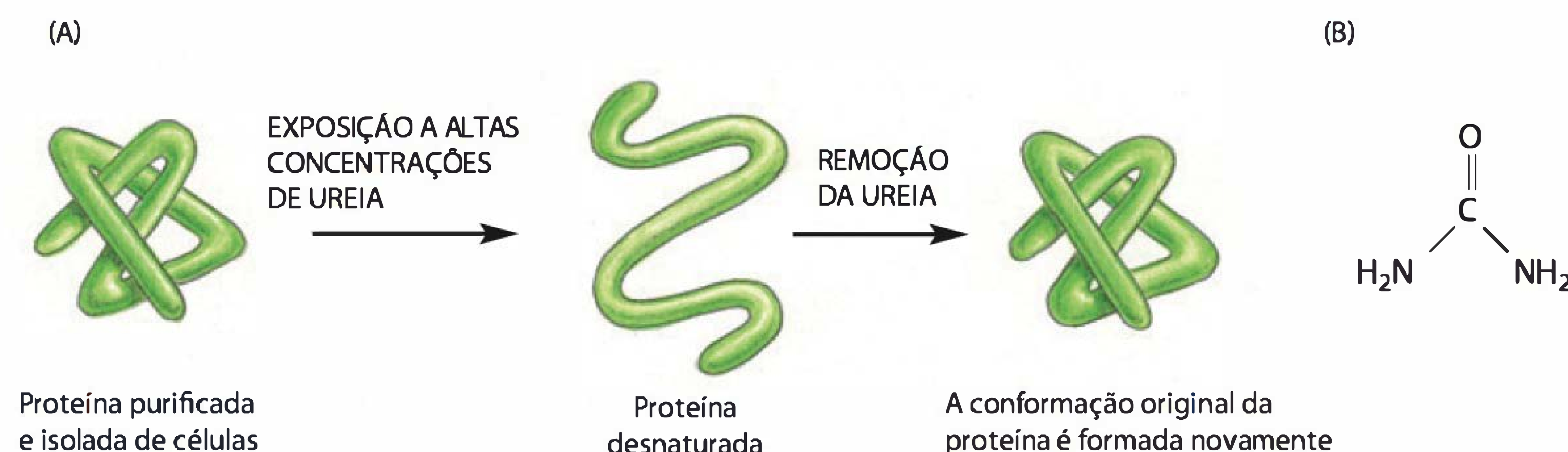


Figura 3-6 Reenovelamento de uma proteína desnaturada. (A) Esse tipo de experimento, realizado pela primeira vez há mais de 40 anos, demonstra que a conformação de uma proteína é determinada somente por sua sequência de aminoácidos. (B) Estrutura da ureia. A ureia é muito solúvel em água e desnatura proteínas em altas concentrações, ou seja, onde existe cerca de uma molécula de ureia para cada seis moléculas de água.

cadeias polipeptídicas parcialmente enoveladas e conduzem o processo de enovelamento pela rota energeticamente mais favorável. Nas condições de alta concentração proteica do citoplasma, as chaperonas evitam que as regiões hidrofóbicas das cadeias polipeptídicas recentemente sintetizadas, temporariamente expostas, associem-se entre si, formando agregados proteicos (ver p. 388). Entretanto, a forma tridimensional final das proteínas ainda é determinada por suas sequências de aminoácidos: as chaperonas apenas garantem um processo de enovelamento mais confiável.

As proteínas apresentam uma ampla variedade de formas e em geral têm entre 50 e 2.000 aminoácidos. As proteínas grandes normalmente são constituídas por diversos *domínios proteicos* distintos – unidades estruturais que se enovelam de forma mais ou menos independente umas das outras, como será discutido adiante. Como a estrutura detalhada de qualquer proteína é complicada, diferentes representações são utilizadas para a descrição da estrutura proteica, cada uma enfatizando um aspecto diferente da proteína.

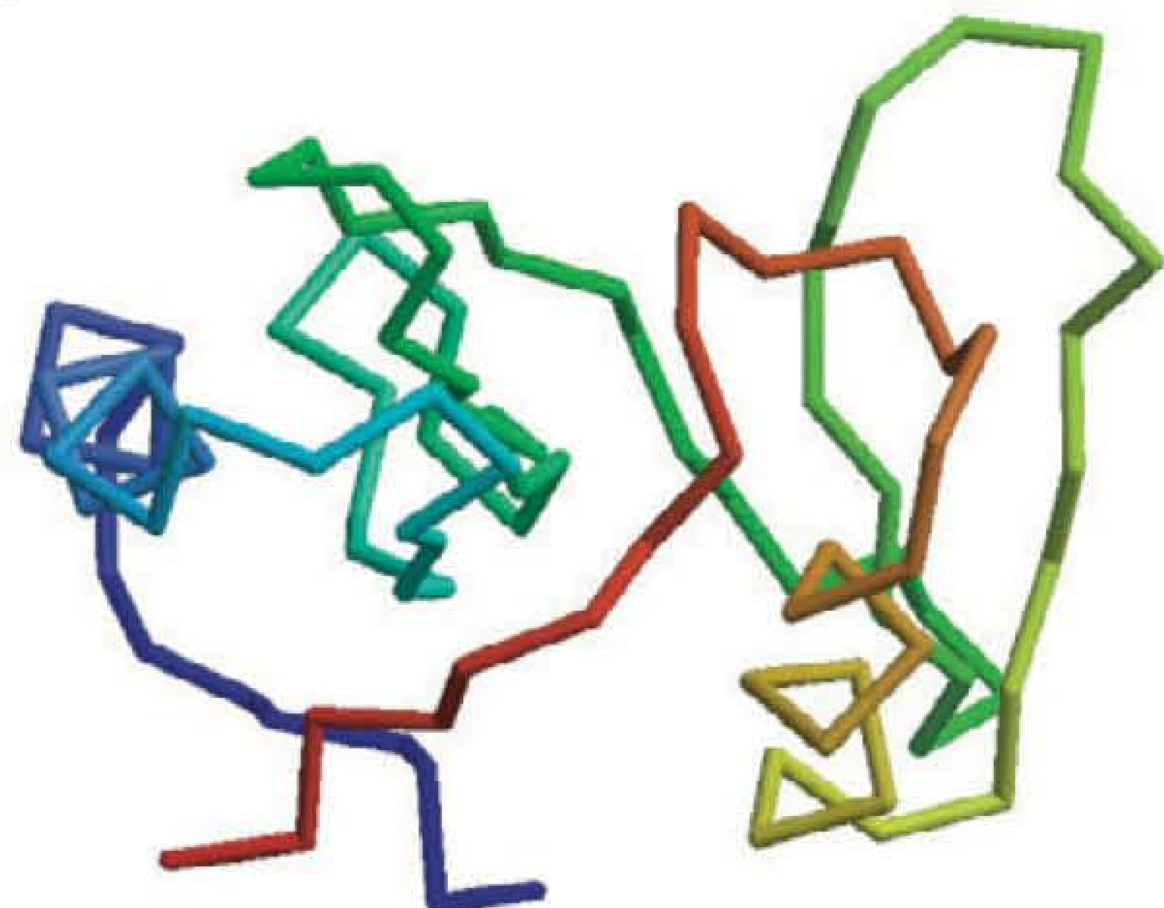
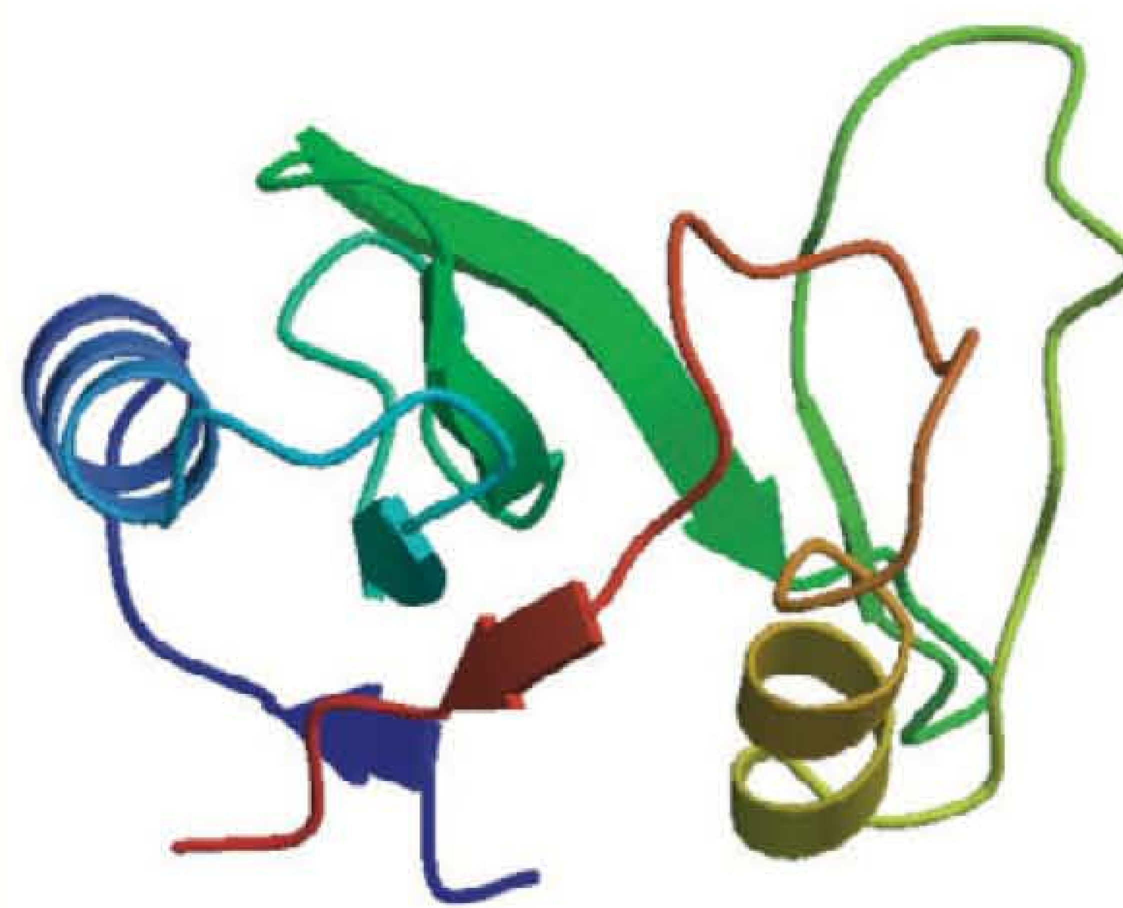
O **Painel 3-2** (p. 132-133) apresenta quatro representações diferentes do domínio proteico chamado de SH2, que tem importantes funções nas células eucarióticas. Constituída por uma cadeia de cem aminoácidos a estrutura é ilustrada como (A) um modelo de esqueleto polipeptídico, (B) um modelo de fitas, (C) um esqueleto polipeptídico que inclui as cadeias laterais dos aminoácidos e (D) um modelo de preenchimento espacial. Cada uma das três fileiras horizontais mostra a proteína em uma orientação diferente, e a imagem é colorida de forma que a cadeia polipeptídica possa ser seguida da região N-terminal (*roxo*) para a C-terminal (*vermelho*).

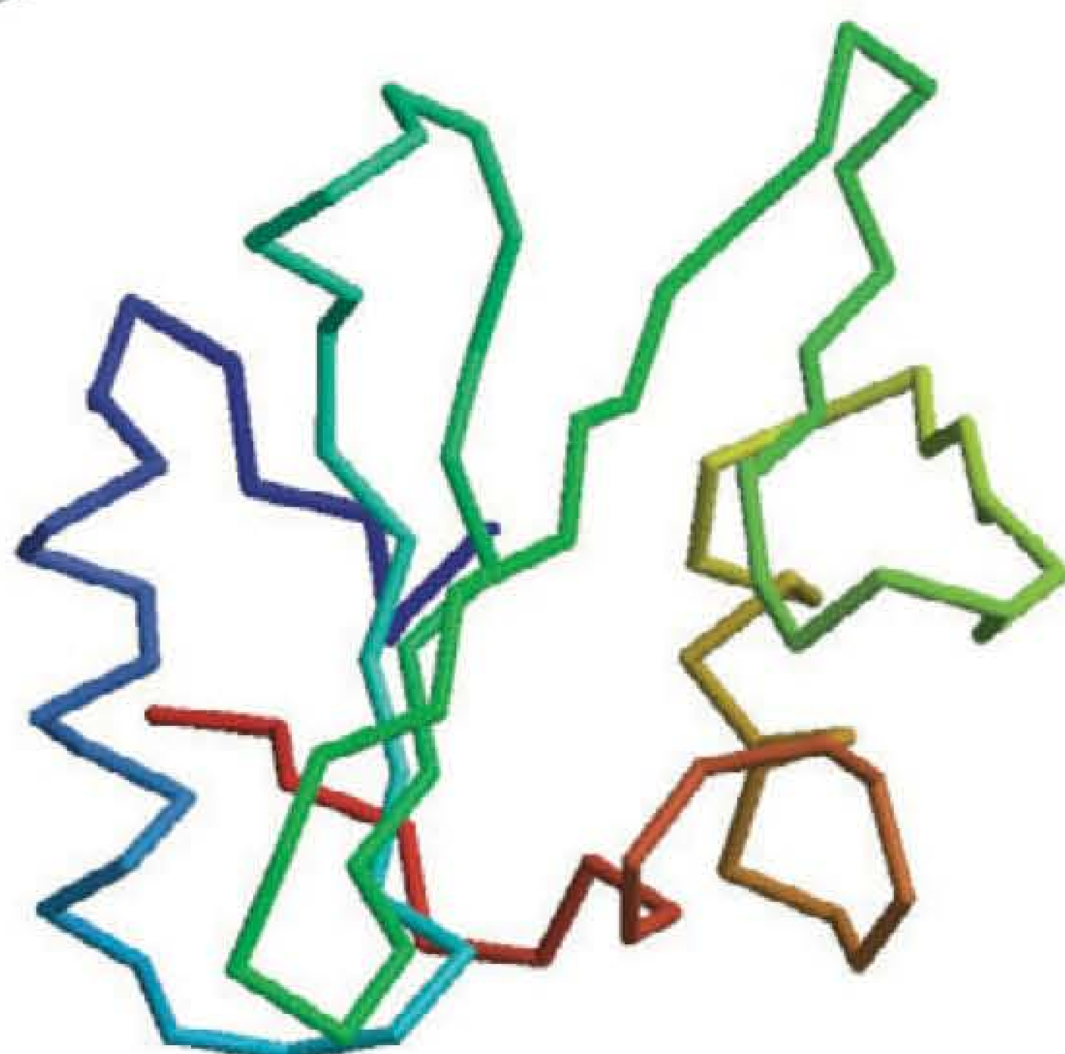
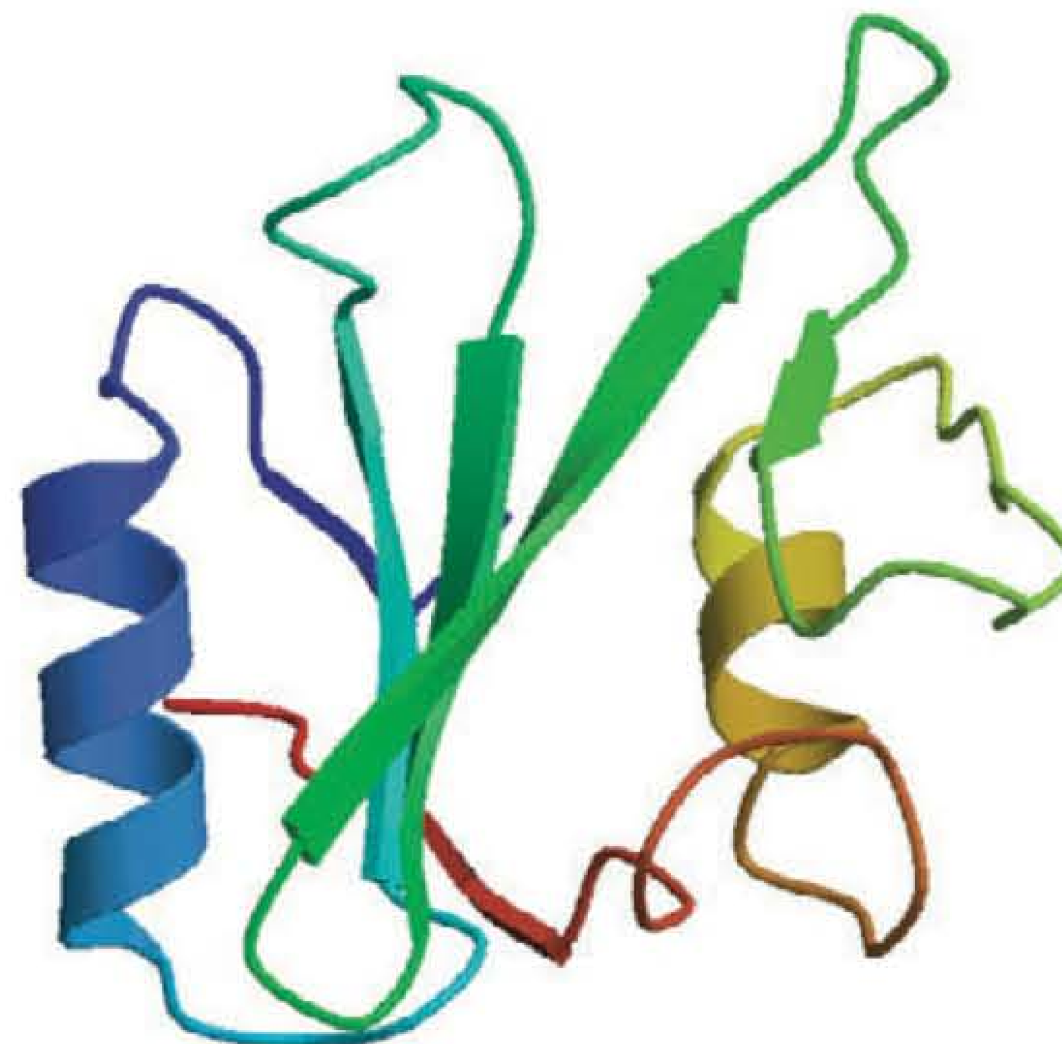
O Painel 3-2 mostra que a conformação de uma proteína é surpreendentemente complexa, mesmo para uma estrutura tão pequena como o domínio SH2. No entanto, a descrição da estrutura proteica pode ser simplificada, pois é formada pela combinação de diversos motivos estruturais, como discutiremos a seguir.

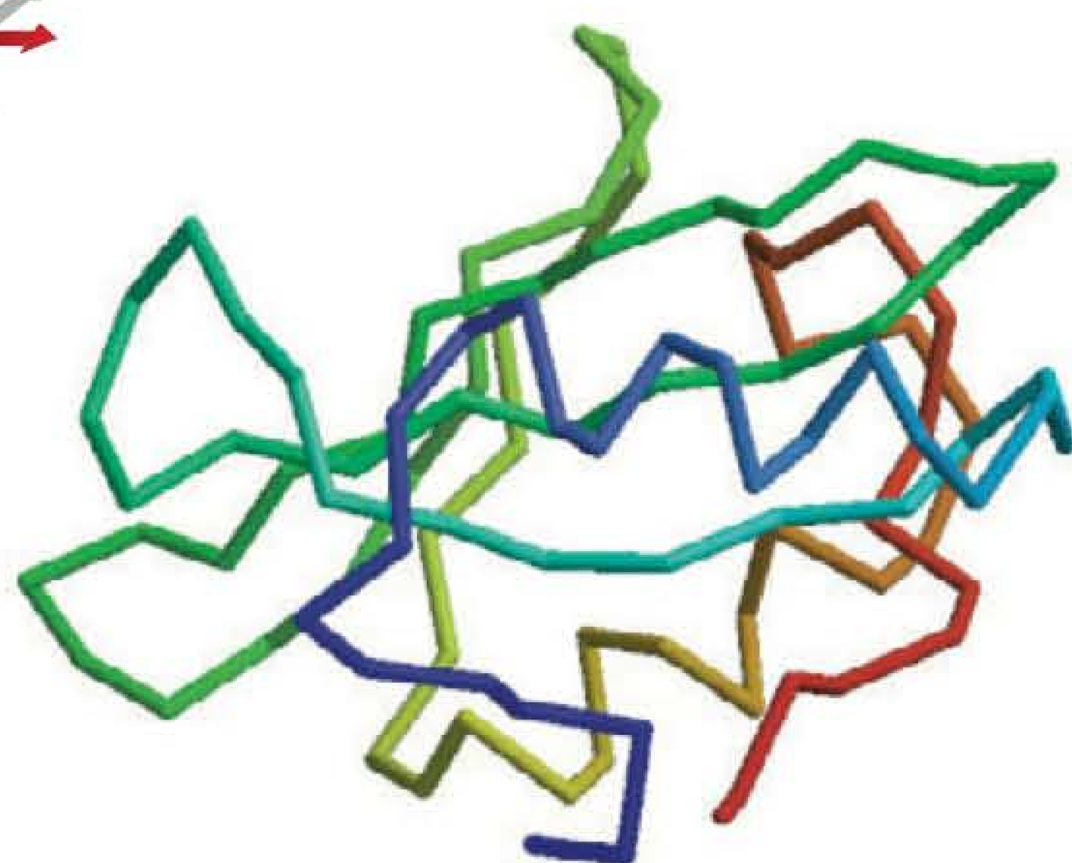
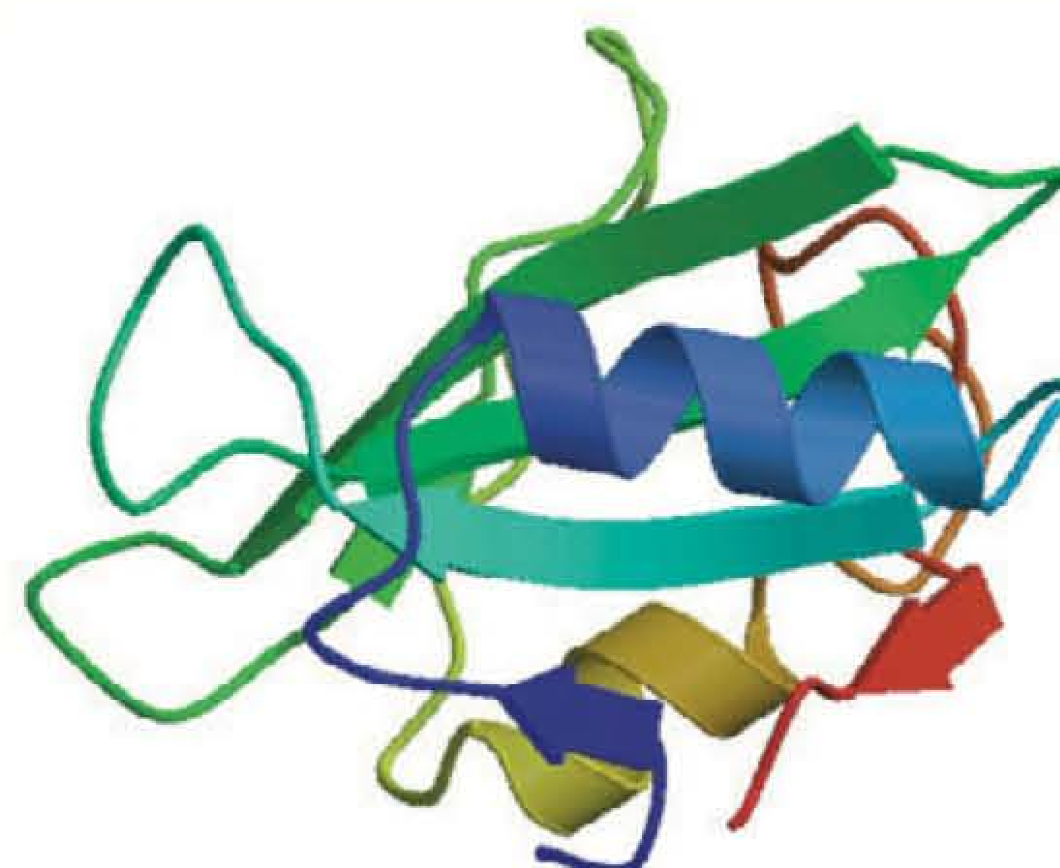
As hélices α e as folhas β são motivos comuns de enovelamento

Quando comparamos as estruturas tridimensionais de diversas moléculas de proteínas diferentes, torna-se claro que, embora a conformação final de cada proteína seja única, dois padrões de enovelamento frequentemente são encontrados como parte delas. Ambos os padrões foram descobertos há mais de 50 anos em estudos com o cabelo e a seda. O primeiro padrão estrutural de enovelamento a ser descoberto, chamado de **hélice α**, foi encontrado na proteína chamada *α-queratina*, que é abundante na pele e nos seus tecidos derivados, como cabelo, unha e chifres. Menos de um ano após a descoberta da hélice α, um segundo padrão de enovelamento, chamado de **folha β**, foi descoberto na proteína *fibroína*, o principal componente da seda. Esses dois padrões estruturais são particularmente comuns, pois resultam da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos N–H e C=O na cadeia principal polipeptídica, sem envolver as cadeias laterais dos aminoácidos. Assim, tais padrões podem ser formados por várias sequências diferentes de aminoácidos. Em cada caso, a cadeia proteica assume uma conformação regular e repetitiva. A **Figura 3-7** mostra essas duas conformações, assim como as abreviações utilizadas para designá-las no modelo de fitas de proteínas.

O centro de muitas proteínas contém extensas regiões de folhas β. Como mostrado na **Figura 3-8**, essas folhas β podem ser formadas de cadeias polipeptídicas vizinhas que possuem a mesma direção (cadeias paralelas) ou formadas a partir de uma cadeia polipeptídica que se enovela, indo e voltando sobre si mesma, com cada seção da cadeia apresentando orientação oposta à da seção adjacente (cadeias antiparalelas). Ambos os tipos de folhas β produzem estruturas bastante rígidas, mantidas por ligações de hidrogênio que interligam as ligações peptídicas de cadeias vizinhas (ver Figura 3-7D).

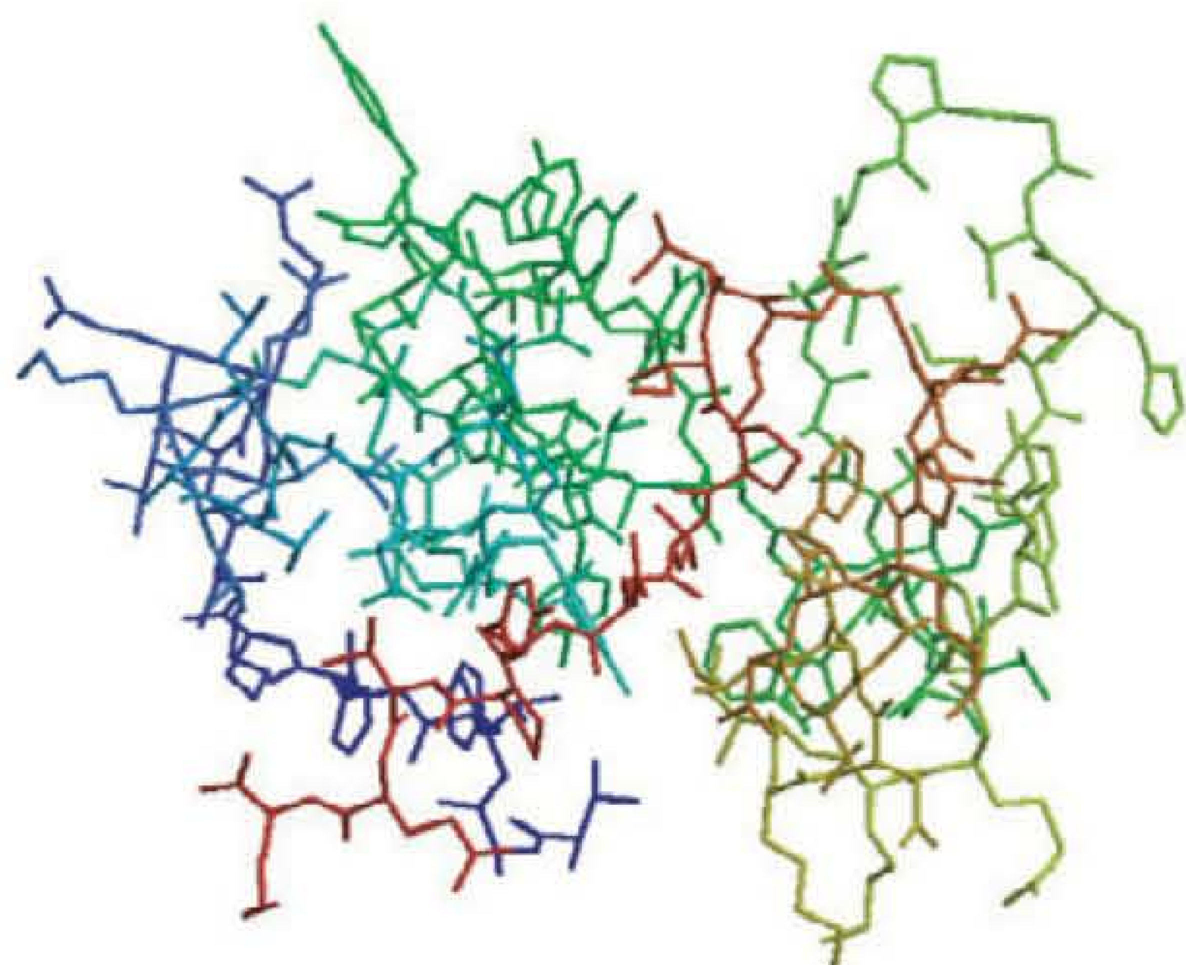




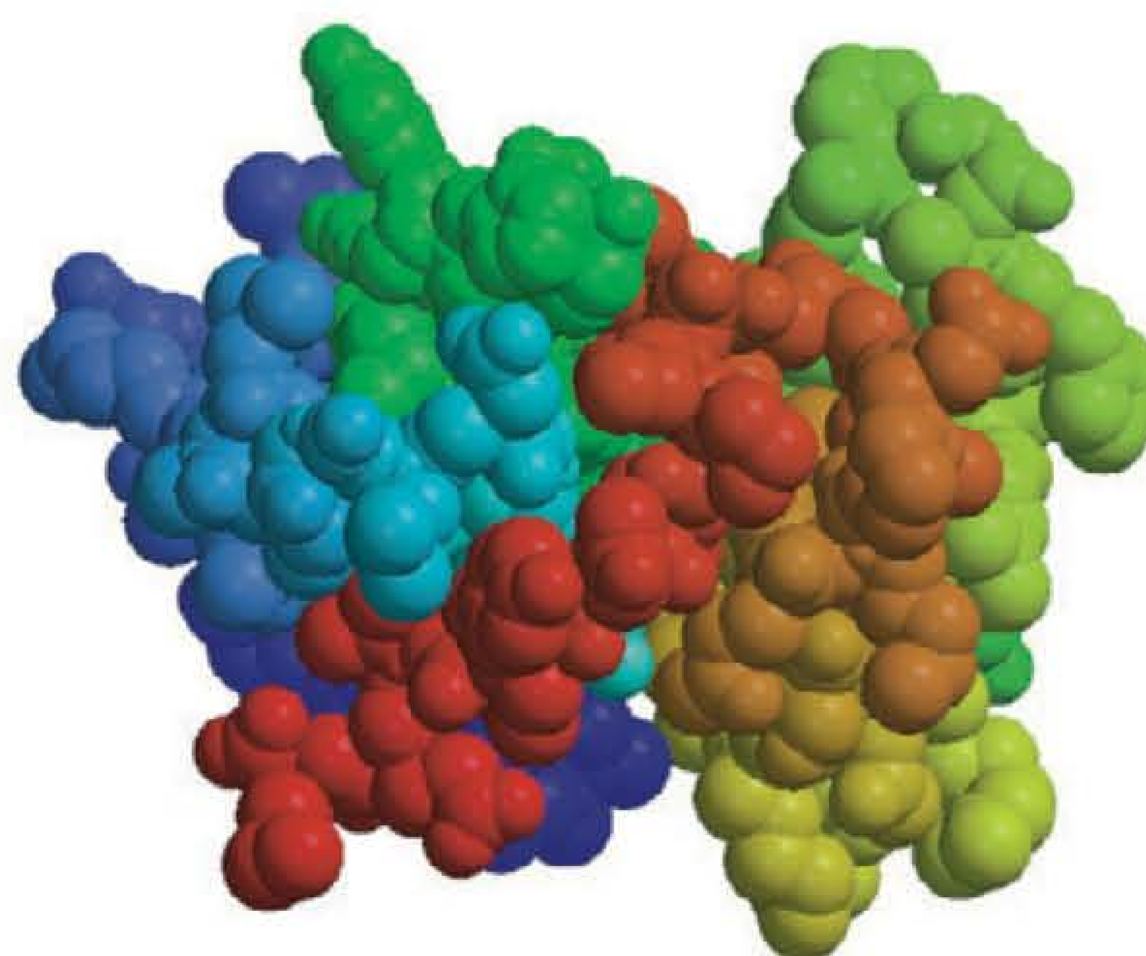



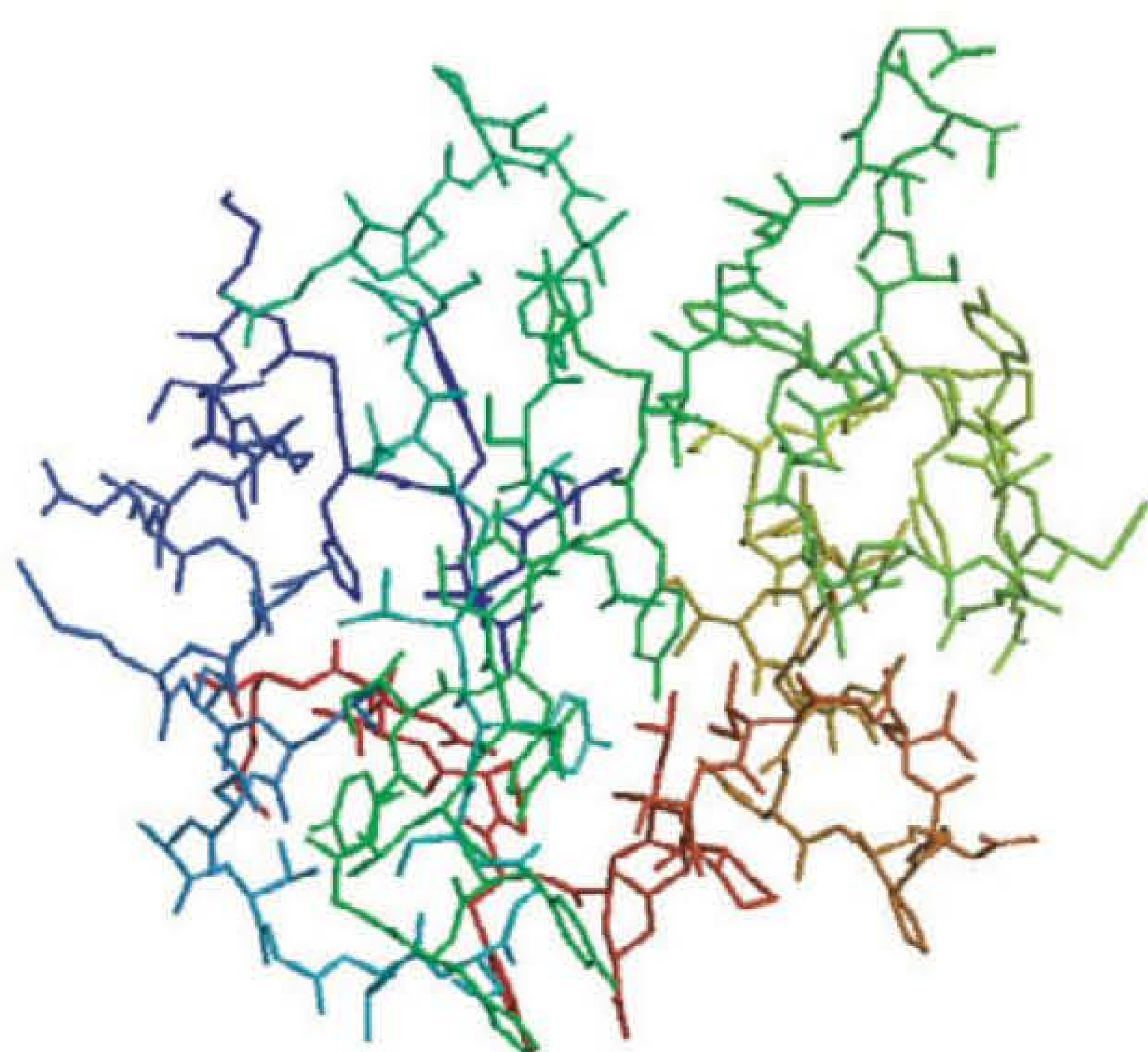



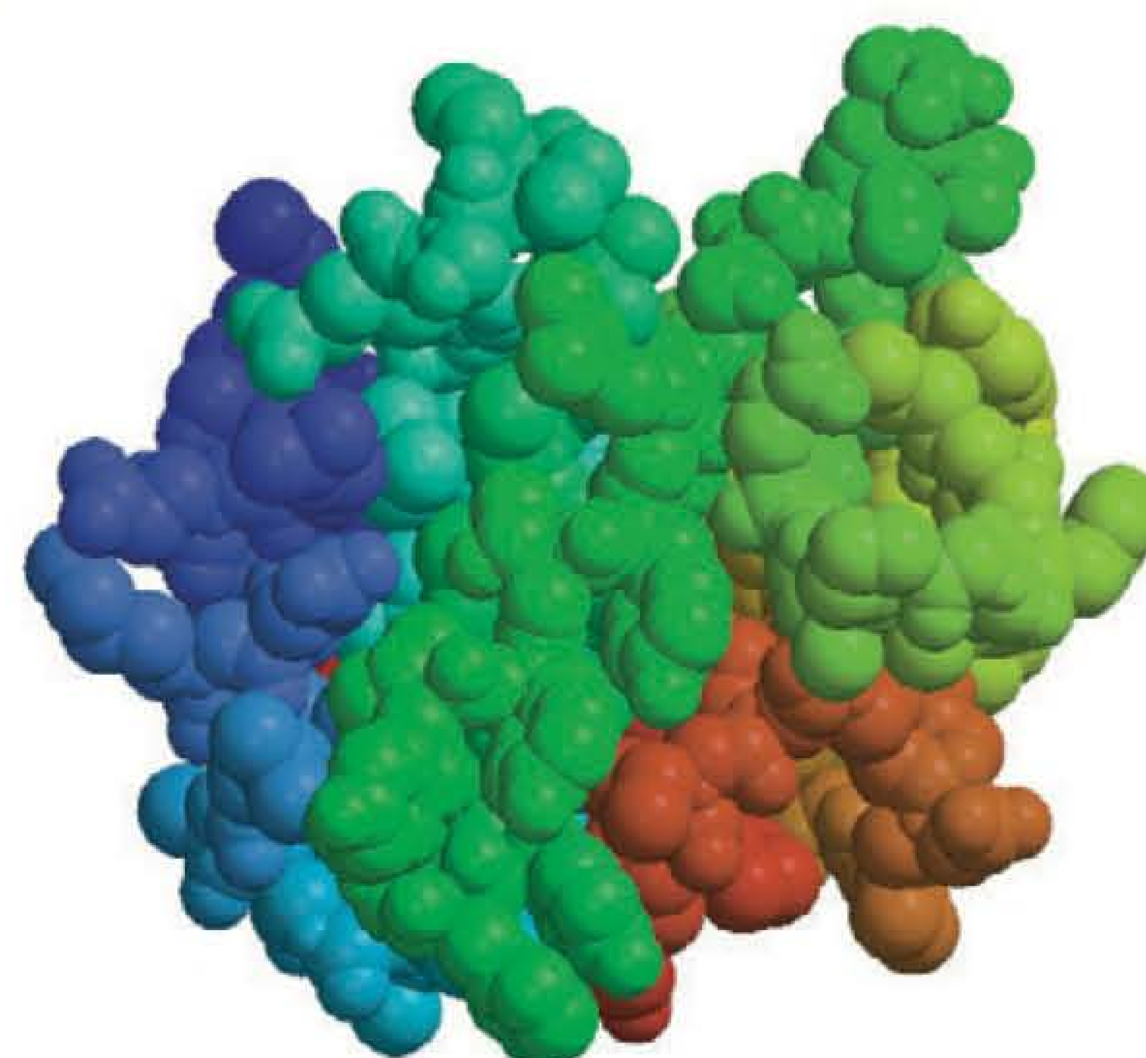
(A) Cadeia Principal: Mostra a organização geral da cadeia polipeptídica, uma forma mais clara de comparar as estruturas de proteínas relacionadas.

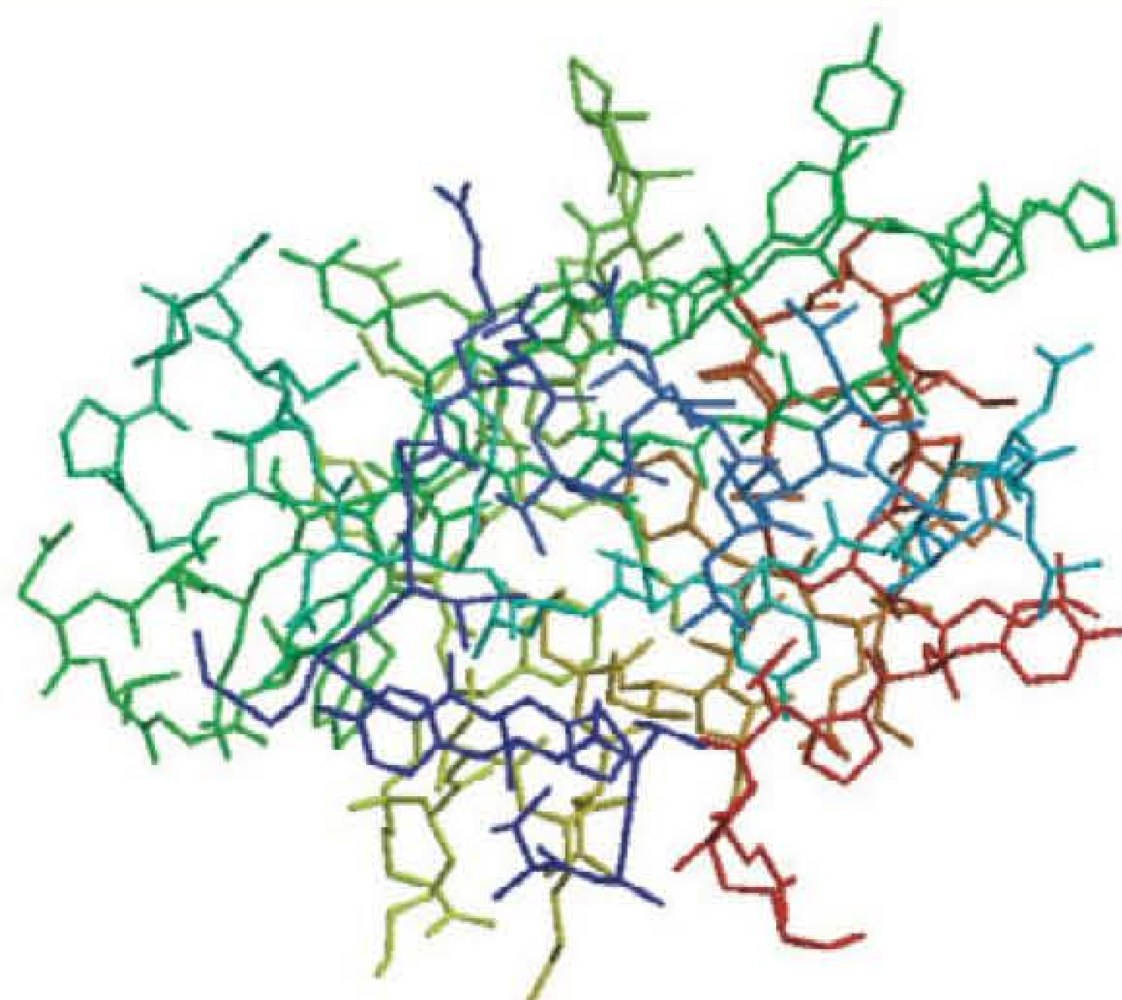
(B) Fitas: Forma simples de visualizar estruturas secundárias, como hélices α e folhas β.

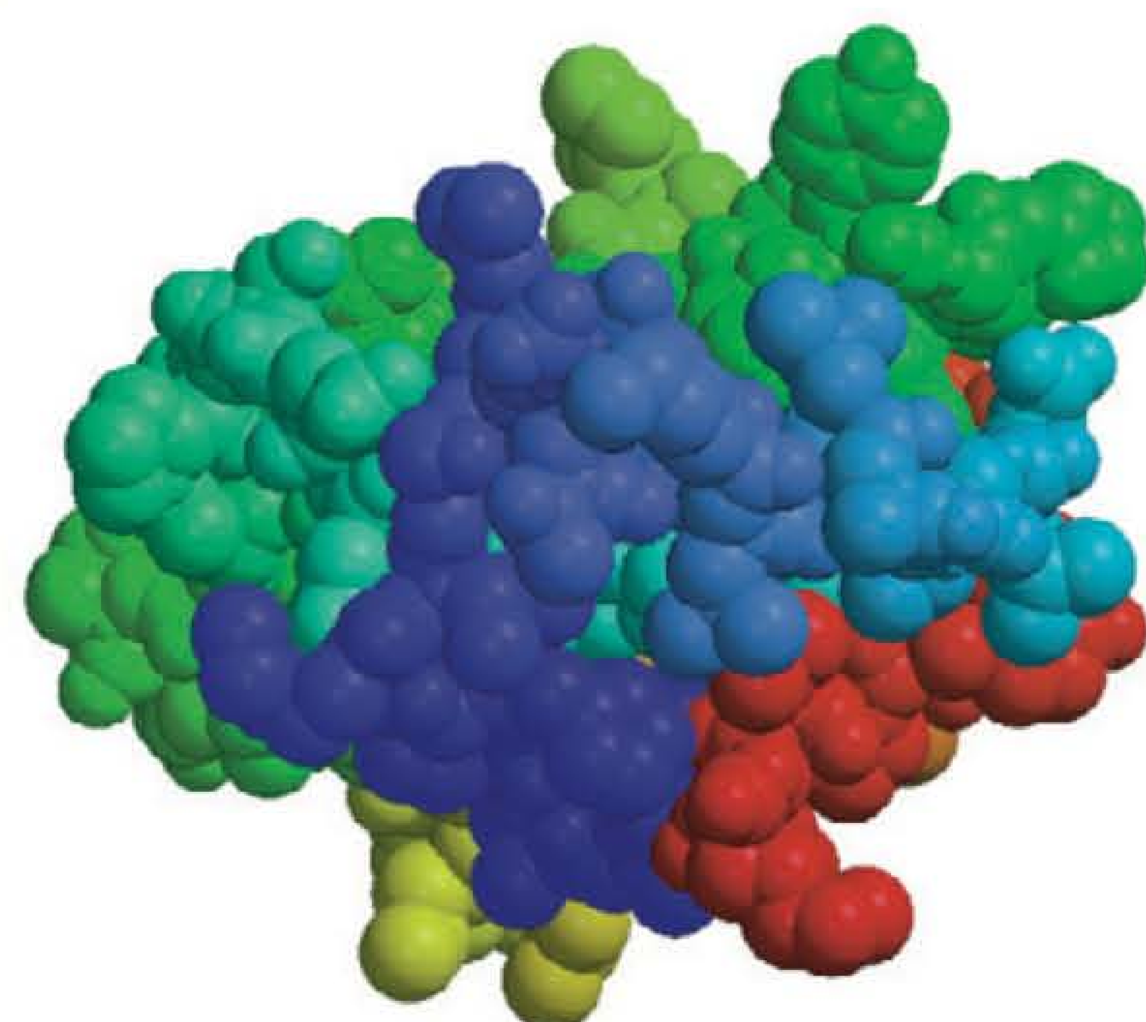












(Cortesia de David Lawson.)

(C) Esqueleto: Destaca as cadeias laterais e a sua proximidade relativa; útil para a predição dos aminoácidos que podem estar relacionados à atividade da proteína, particularmente se a proteína for uma enzima.

(D) Preenchimento Espacial: Provê o mapa de contorno da proteína, fornece uma ideia da forma da proteína e mostra quais cadeias de aminoácidos estão expostas na sua superfície. Mostra como a proteína pode parecer para uma molécula pequena como a água, ou para outra proteína.

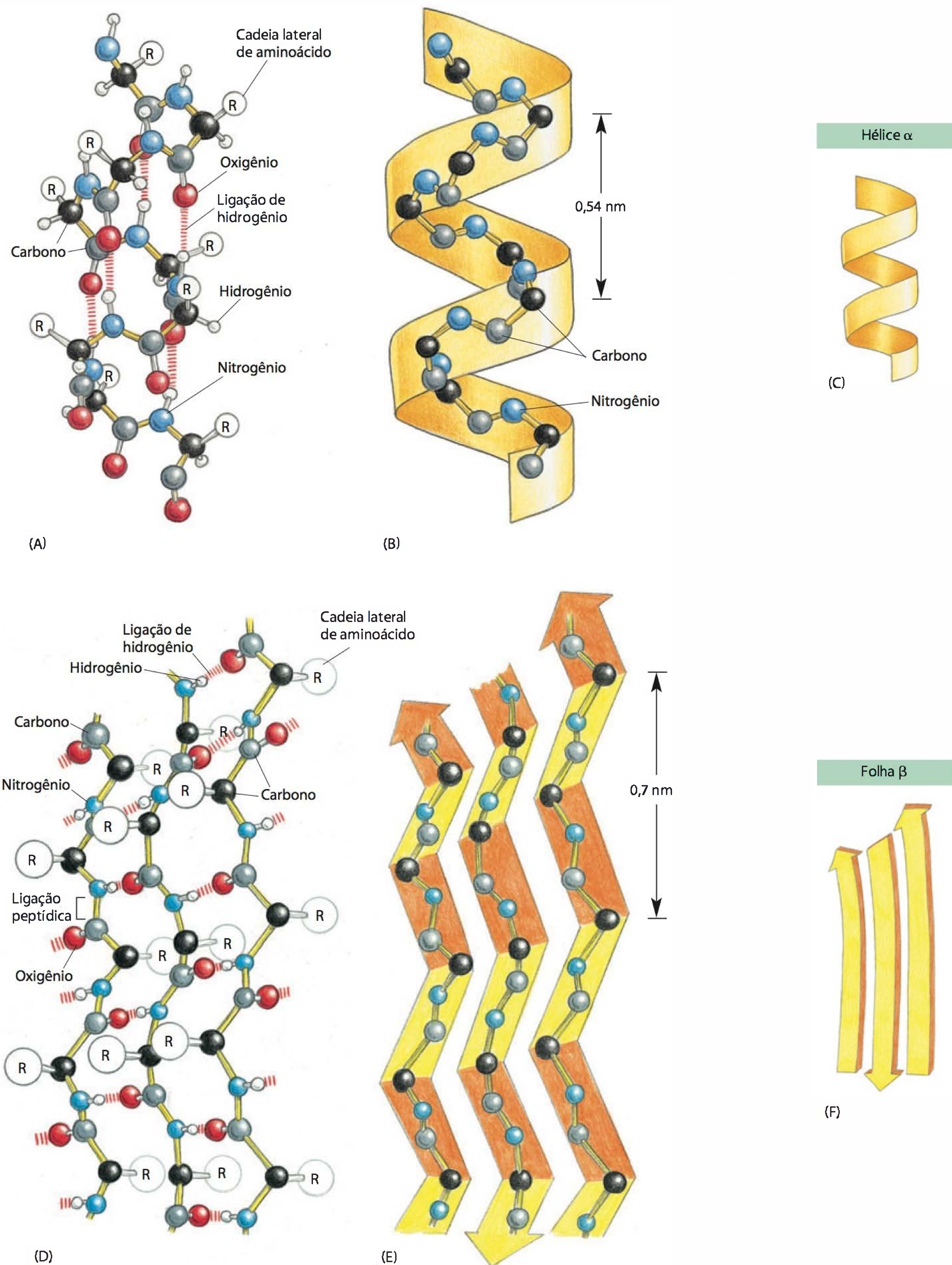


Figura 3-7 **Conformação regular da cadeia principal polipeptídica na hélice α e na folha β.** (A, B e C) A hélice α. O N–H de todas as ligações peptídicas forma uma ligação de hidrogênio com o C=O de outra ligação peptídica localizada a quatro resíduos de aminoácidos de distância na mesma cadeia. Note que todos os grupos N–H apontam para cima no diagrama e que todos os grupos C=O apontam para baixo (em direção ao C-terminal); essa disposição confere a orientação da hélice, com o C-terminal apresentando carga parcial negativa e o N-terminal apresentando carga parcial positiva. (D, E e F) A folha β. Nesse exemplo, as cadeias peptídicas adjacentes têm orientações em direções opostas (antiparalelas). Ligações de hidrogênio entre as ligações peptídicas localizadas em diferentes fitas mantêm as cadeias polipeptídicas individuais (fitas) unidas em uma folha β, e as cadeias laterais de aminoácidos em cada fita se projetam alternadamente acima e abaixo do plano da folha β. (A) e (D) mostram todos os átomos na cadeia principal polipeptídica, com as cadeias laterais dos aminoácidos truncadas e representadas por um R. Ao contrário, (B) e (E) mostram apenas os átomos da cadeia principal, enquanto (C) e (F) mostram os símbolos utilizados para representar a hélice α e a folha β em modelos de fitas de proteínas (ver Painel 3-2B).

Uma hélice α é formada quando uma única cadeia polipeptídica enrola-se sobre si mesma para formar um cilindro rígido. Uma ligação de hidrogênio é formada a cada quatro ligações peptídicas, ligando o C=O de uma ligação peptídica ao N–H de outra (ver Figura 3-7A). Isso dá origem a uma hélice regular com voltas completas a cada 3,6 resíduos de aminoácidos. Note que o domínio proteico ilustrado no Painel 3-2 contém duas hélices α, bem como uma folha β formada por três fitas antiparalelas.

As regiões de hélice α são particularmente abundantes em proteínas localizadas nas membranas celulares, como proteínas transportadoras e receptores. Como discutiremos no Capítulo 10, essas porções de uma proteína transmembrana que atravessam a bicamada lipídica em geral o fazem como hélices α compostas principalmente de aminoácidos com cadeias laterais apolares. A cadeia polipeptídica, que é hidrofílica, faz ligações de hidrogênio com ela mesma, formando uma hélice α protegida do ambiente lipídico e hidrofóbico da membrana pelas suas cadeias laterais apolares protuberantes (ver Figura 3-78).

Em outras proteínas, as hélices α enrolam-se umas sobre as outras para formar uma estrutura particularmente estável, conhecida como **super-hélice** (em inglês, *coiled-coil*). Essa estrutura se forma quando duas (ou em alguns casos três) hélices α apresentam a maioria de suas cadeias laterais apolares (hidrofóbicas) de um só lado, de modo que podem enrolar-se uma sobre a outra com essas cadeias laterais voltadas para o interior (**Figura 3-9**). Longas super-hélices em forma de bastão fornecem a base estrutural para muitas proteínas alongadas. Exemplos são a α-queratina, que forma as fibras intracelulares que reforçam a camada externa da pele e seus apêndices, e as moléculas de miosina, responsáveis pela contração muscular.

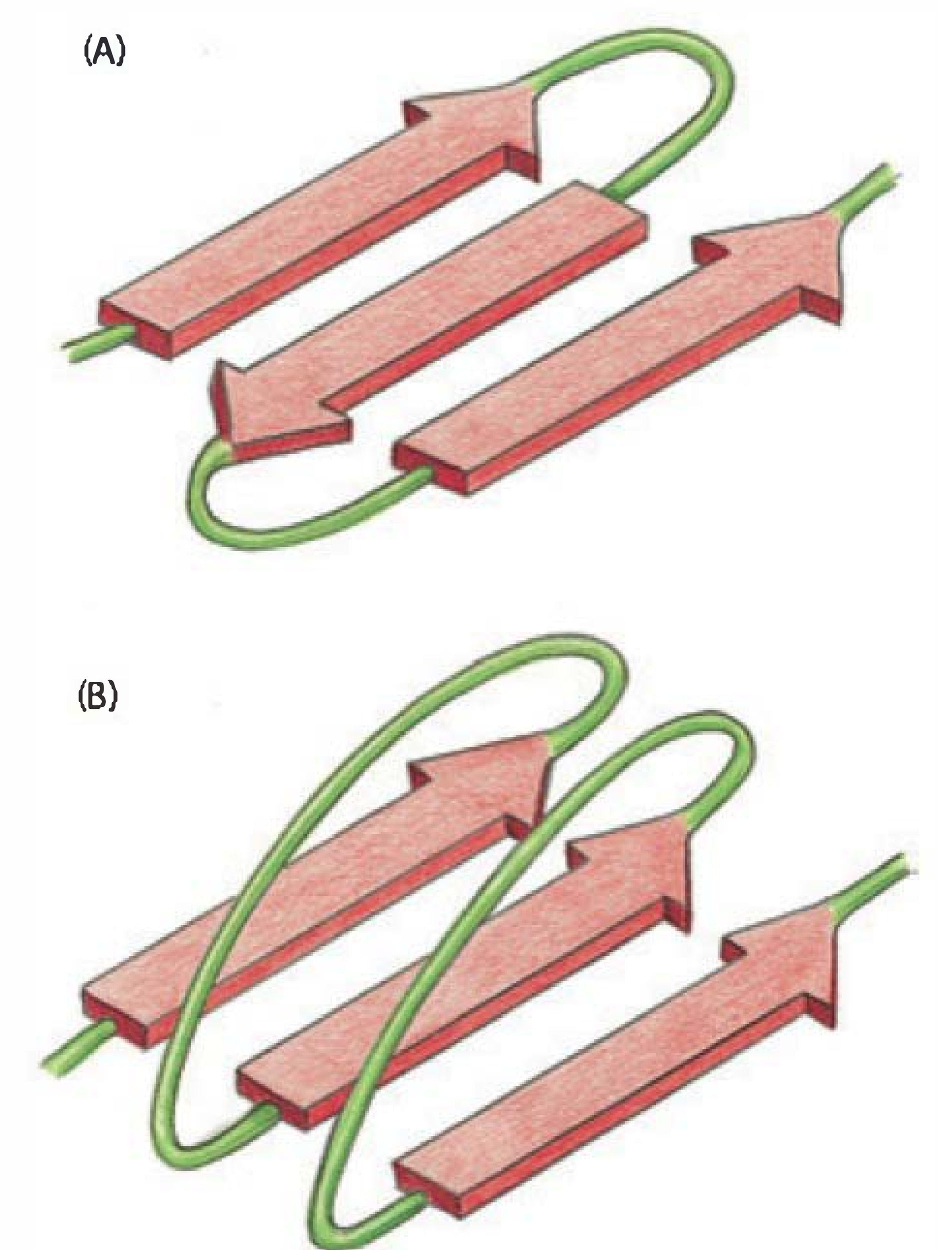


Figura 3-8 Dois tipos de estruturas em folha β. (A) Folha β antiparalela (ver Figura 3-7D). (B) Folha β paralela. Ambos os tipos de estruturas são comuns em proteínas.

Os domínios proteicos são as unidades modulares a partir das quais as proteínas maiores são construídas

Mesmo uma pequena molécula de proteína é constituída por milhares de átomos interligados por ligações covalentes e não-covalentes precisamente orientadas, sendo extremamente difícil visualizar uma estrutura tão complicada sem métodos tridimensionais de visualização. Por essa razão, biólogos utilizam diversos recursos gráficos e computacionais.

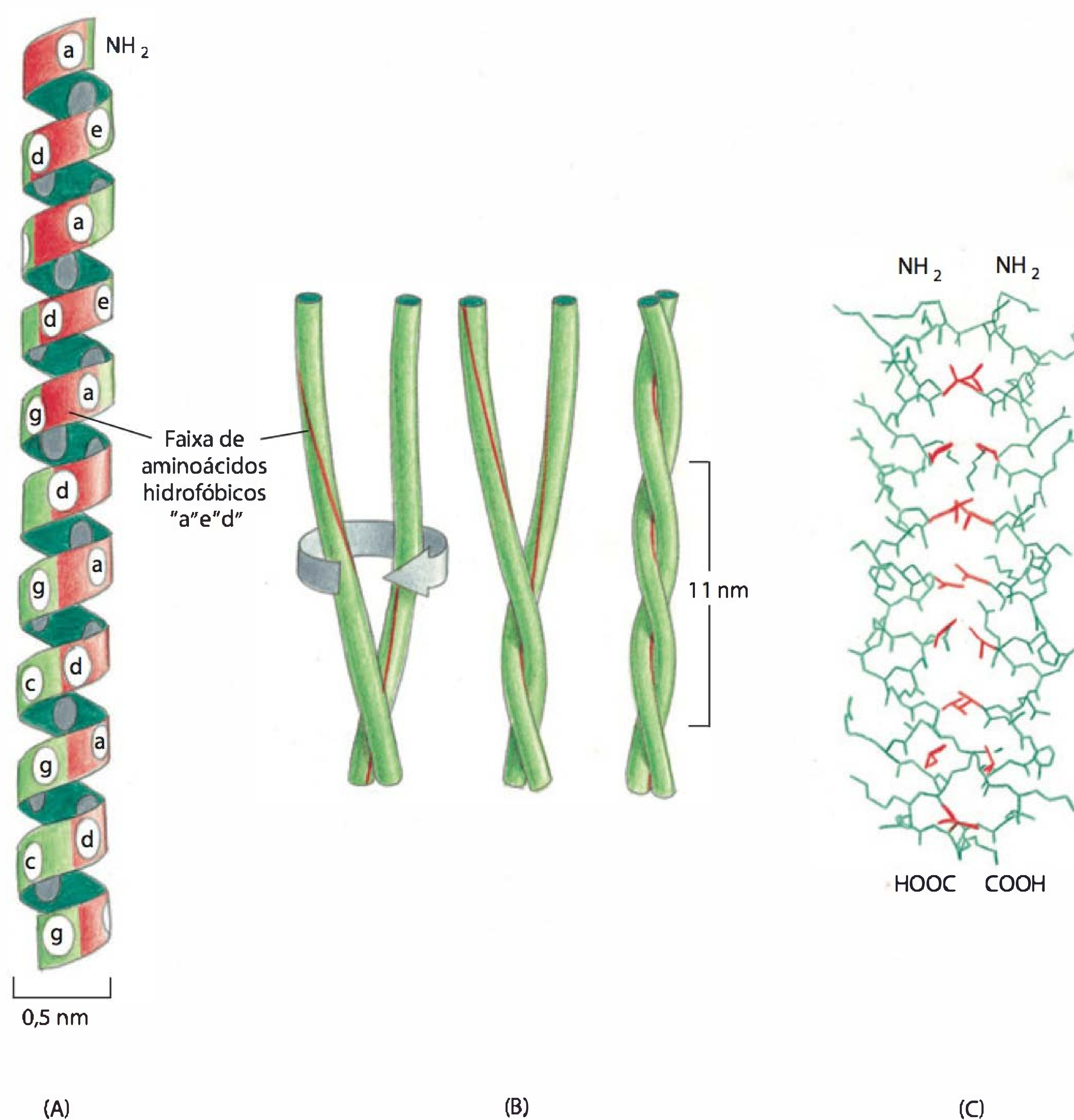


Figura 3-9 Super-hélice. (A) Uma única hélice α, com as cadeias laterais dos aminoácidos sucessivos marcadas com a sequência "abcdefg" repetindo-se sete vezes (*de baixo para cima*). Os aminoácidos "a" e "d" nessa sequência ficam próximos um do outro na superfície do cilindro, formando uma "listra" (em *vermelho*) que se enrola lentamente ao redor da hélice α. As proteínas que formam super-hélices apresentam, tipicamente, aminoácidos apolares nas posições "a" e "d". Consequentemente, como mostrado em (B), duas hélices α podem se enrolar uma sobre a outra, com as cadeias laterais apolares de uma hélice α interagindo com as cadeias laterais apolares da outra, enquanto as cadeias laterais de aminoácidos mais hidrofílicos são mantidas expostas ao meio aquoso. (C) A estrutura atômica de uma super-hélice determinada por cristalografia por difração de raios X. As cadeias laterais em *vermelho* são apolares.

Os biólogos distinguem quatro níveis de organização na estrutura de uma proteína. A sequência de aminoácidos é conhecida como **estrutura primária**. Os trechos da cadeia polipeptídica que formam hélices α e folhas β constituem a **estrutura secundária** da proteína. A conformação tridimensional completa da cadeia polipeptídica algumas vezes é chamada de **estrutura terciária** e, se uma proteína em particular é formada por um complexo de mais de uma cadeia polipeptídica, a estrutura completa é designada **estrutura quaternária**.

Estudos da conformação, da função e da evolução das proteínas revelaram a importância de um nível de organização estrutural distinto daqueles descritos anteriormente. Esse é o **domínio proteico**, uma subestrutura gerada em qualquer parte da cadeia polipeptídica e que pode se enovelar independentemente em uma estrutura compacta e estável. Um domínio proteico geralmente contém entre 40 e 350 aminoácidos, sendo a unidade modular da qual muitas proteínas maiores são construídas.

Os diferentes domínios de uma proteína geralmente estão associados a diferentes funções. A **Figura 3-10** mostra um exemplo – a proteína-cinase Src, que funciona na via de transmissão de sinais no interior de células de vertebrados (Src é pronunciado "sarc", em inglês). Considera-se que essa proteína possua três domínios: os domínios SH2 e SH3 apresentam atividade reguladora, enquanto o domínio C-terminal é responsável pela atividade cinase catalítica. Posteriormente, neste capítulo, retornaremos a essa proteína, a fim de explicar como as proteínas podem formar interruptores moleculares que transmitem informação por todas as partes da célula.

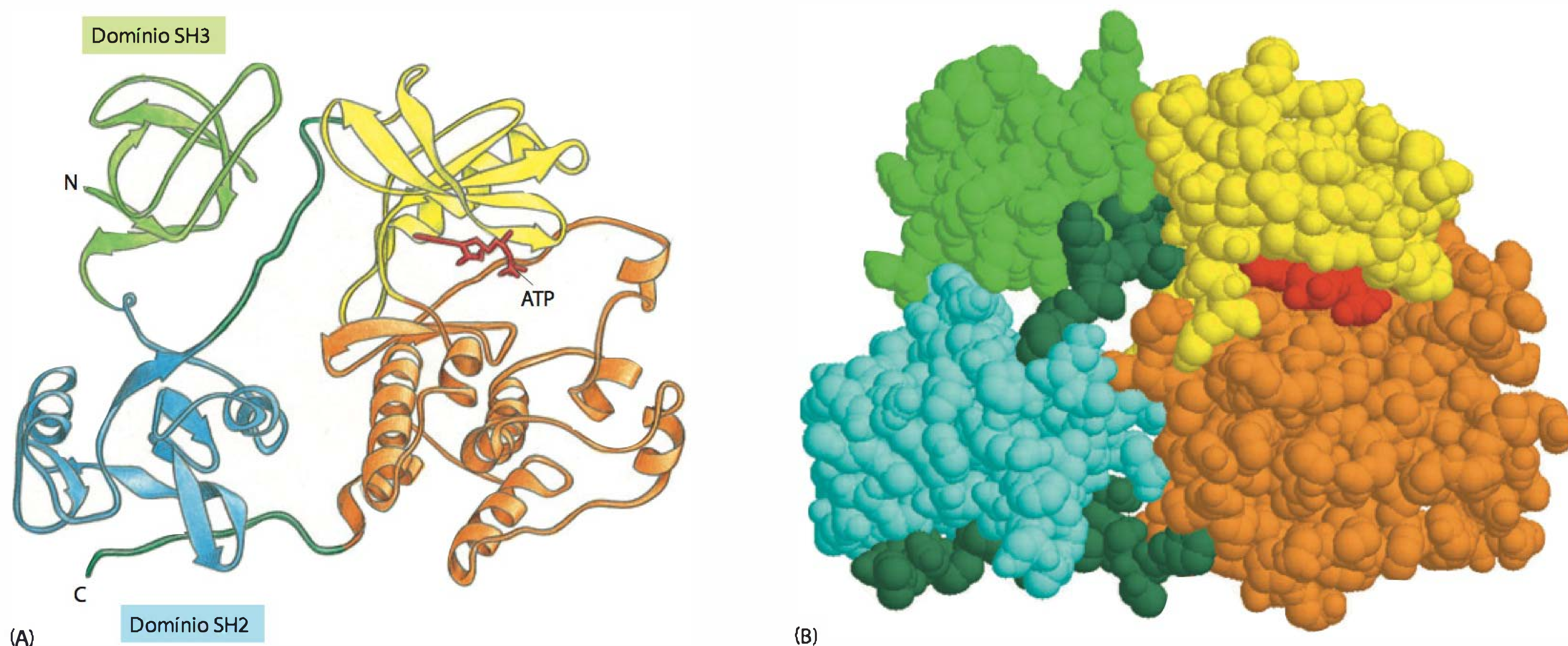
A **Figura 3-11** mostra modelos de fita de três domínios proteicos organizados de maneiras distintas. Como esses exemplos ilustram, a cadeia polipeptídica tende a cruzar todo do domínio antes de fazer uma curva acentuada na sua superfície. A parte central de um domínio pode ser composta por hélices α, folhas β e por diversas combinações desses dois elementos fundamentais de enovelamento.

As menores moléculas proteicas contêm apenas um único domínio, enquanto as proteínas maiores podem conter até várias dezenas de domínios, geralmente conectados uns aos outros por porções da cadeia polipeptídica pequenas e relativamente desestruturadas.

Apenas poucas de muitas cadeias polipeptídicas possíveis serão úteis para as células

Uma vez que cada um dos 20 aminoácidos é quimicamente distinto, podendo, em princípio, ocorrer em qualquer posição de uma cadeia de proteínas, existem $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160.000$ possíveis cadeias polipeptídicas compostas por quatro aminoácidos, ou ainda 20^n possibilidades de haver uma proteína com n aminoácidos de comprimento. Para o comprimento típico das proteínas, com cerca de 300 aminoácidos, uma célula pode teoricamente produzir mais de 10^{390} (20^{300}) diferentes cadeias polipeptídicas. Esse é um número tão grande

Figura 3-10 Proteína formada por múltiplos domínios. Na proteína Src mostrada, um domínio C-terminal bilobado (*amarelo* e *laranja*) forma a proteína-cinase, enquanto os domínios SH2 e SH3 desempenham funções reguladoras. (A) Um modelo de fita com o substrato ATP em *vermelho*. (B) Um modelo de preenchimento espacial, com o substrato ATP em *vermelho*. Observe que o sítio de ligação de ATP está posicionado na interface dos dois lóbulos que formam a cinase. A estrutura detalhada do domínio SH2 está ilustrada no Painel 3-2 (p. 132-133).



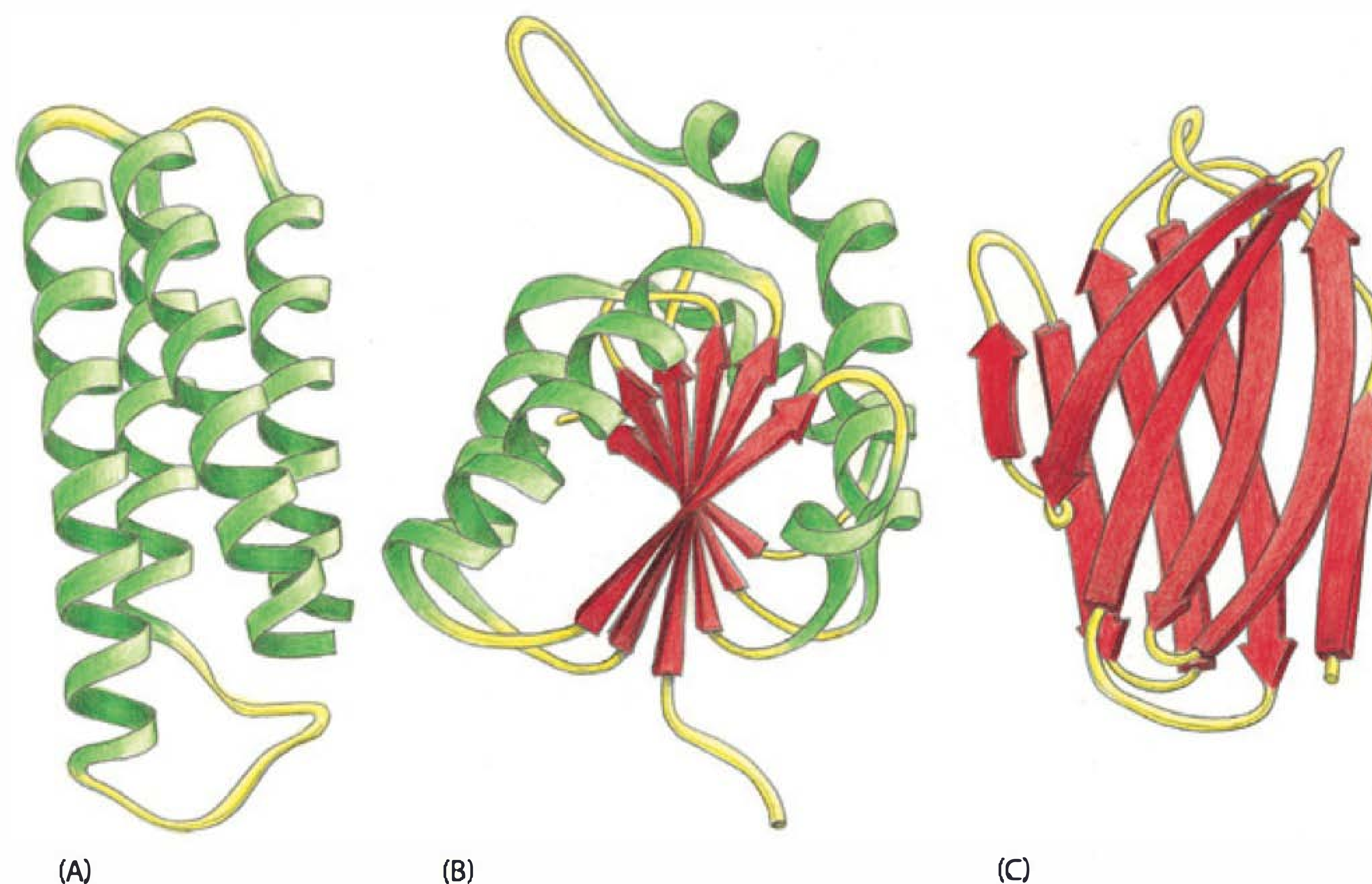


Figura 3-11 Modelos de fita de três diferentes domínios proteicos. (A) Citocromo b_{562}, proteína com apenas um domínio, envolvida no transporte de elétrons na mitocôndria. Essa proteína é composta quase que exclusivamente por hélices α. (B) Domínio de ligação de NAD da enzima lactato-desidrogenase, que é composto de uma mistura de hélices α e de folhas β paralelas. (C) Domínio variável da cadeia leve de uma imunoglobulina (anticorpo), formado por um sanduíche de duas folhas β antiparalelas. Nesses exemplos, as hélices α são mostradas em *verde*, enquanto as cadeias organizadas como folhas β são indicadas como *setas vermelhas*. Observe que a cadeia polipeptídica geralmente se estende ao longo de todo o domínio, com dobras acentuadas apenas na superfície da proteína. As regiões de alça protrundentes (em *amarelo*) frequentemente formam sítios de ligação para outras moléculas. (Cortesia de Jane Richardson.)

que, para produzir apenas uma molécula de cada tipo, seriam necessários mais átomos do que os existentes no universo.

Apenas uma pequena fração desse vasto conjunto de cadeias polipeptídicas teóricas vai adotar uma única conformação tridimensional estável – segundo algumas estimativas, menos de uma em um bilhão. Ainda assim, a maioria das proteínas presentes em uma célula adota conformações únicas e estáveis. Como isso é possível? A resposta se baseia na seleção natural. Uma proteína com estrutura e atividade bioquímica imprevisíveis e variáveis tem poucas probabilidades de colaborar com a sobrevivência da célula que a contém. Tais proteínas teriam sido, portanto, eliminadas por seleção natural no curso do longo processo de tentativa e erro, no qual se baseia a evolução biológica.

Como a evolução atuou na seleção das funções proteicas nos organismos vivos, a sequência de aminoácidos da maioria das proteínas atuais corresponde a uma única conformação, extremamente estável. Além disso, essa conformação tem suas propriedades químicas refinadas para permitir que a proteína desempenhe uma atividade catalítica ou uma função estrutural particular na célula. As proteínas são organizadas com tamanha precisão que alterações de mesmo alguns poucos átomos em um aminoácido podem, em alguns casos, afetar a estrutura de toda a molécula de tal forma que toda a sua função é perdida.

As proteínas podem ser classificadas em muitas famílias

Uma vez que uma proteína tenha evoluído para assumir uma conformação estável, com propriedades úteis, sua estrutura pode ter sido modificada, ao longo da evolução, para permitir-lhe desempenhar novas funções. Esse processo foi bastante acelerado por mecanismos genéticos que possibilitam a duplicação ocasional de genes, permitindo que uma das cópias evolua de forma independente para desempenhar uma nova função (conforme discutido no Capítulo 4). Esse tipo de evento ocorreu com alguma frequência no passado, e como resultado muitas das proteínas atuais podem ser agrupadas em famílias de proteínas, onde cada membro de uma família apresenta uma sequência de aminoácidos e uma conformação tridimensional similar a todos os outros membros da família.

Considere, por exemplo, as *serina-proteases*, uma grande família de enzimas que hidrolisam proteínas (proteolíticas), que inclui as enzimas digestivas quimotripsina, tripsina e elastase, além de algumas das proteinases envolvidas na coagulação sanguínea. Quando a porção protease de duas dessas enzimas são comparadas, partes de suas sequências de aminoácidos mostram-se quase idênticas. A semelhança de suas conformações tridimensionais é ainda mais impressionante: a maioria das dobras e das voltas de suas cadeias polipeptídicas, que têm algumas centenas de aminoácidos de comprimento, é praticamente idêntica (**Figura 3-12**). As várias serina-proteases apresentam, no entan-

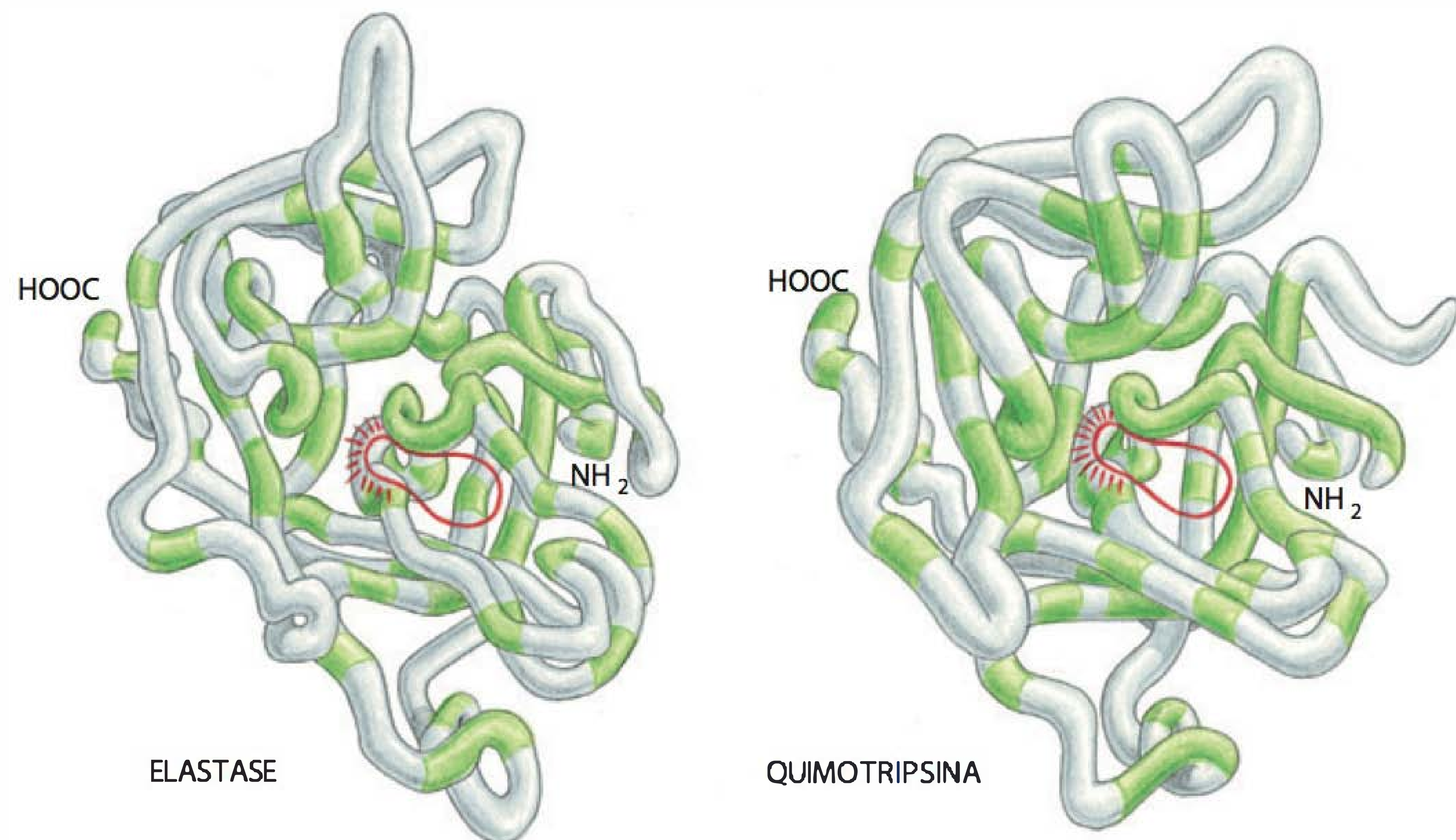


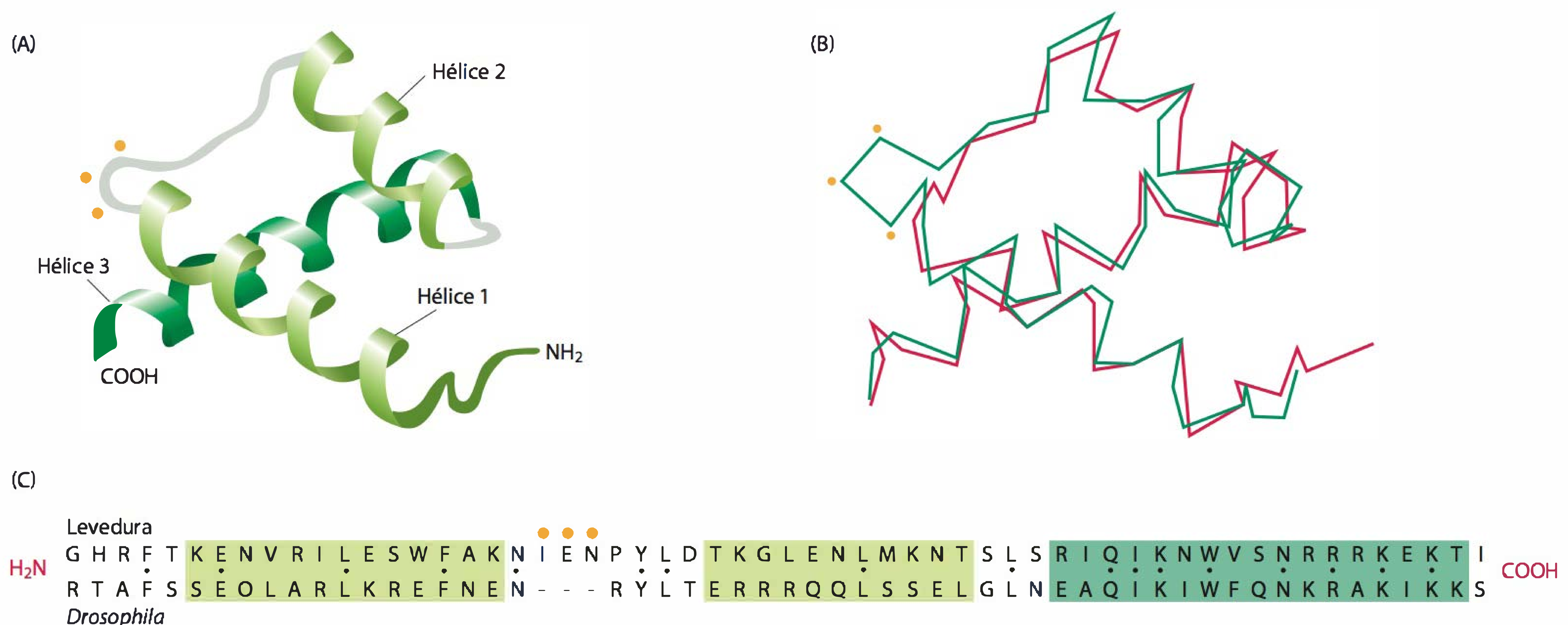
Figura 3-12 Comparação das conformações de duas serina-proteases. As conformações da cadeia principal da elastase e da quimotripsina. Apesar de somente os aminoácidos da cadeia polipeptídica mostrados em *verde* serem os mesmos nas duas proteínas, ambas as conformações são muito similares entre si em todos os pontos da cadeia. O sítio ativo de cada enzima está marcado com um círculo *vermelho*; é ali que as ligações peptídicas das proteínas que servem como substrato são posicionadas e clivadas por hidrólise. As serina-proteases têm o seu nome derivado do aminoácido serina, cuja cadeia lateral faz parte do sítio ativo de cada enzima; participando diretamente na reação de clivagem.

to, atividades enzimáticas diferentes, cada qual clivando proteínas diferentes ou ligações peptídicas entre diferentes tipos de aminoácidos. Cada uma, portanto, desempenha uma função distinta no organismo.

A história que contamos sobre as serina-proteases poderia ser repetida quanto a centenas de outras famílias de proteínas. Em geral, a estrutura dos diferentes membros de uma família de proteínas é mais conservada do que as suas sequências de aminoácidos. Em muitos casos, as sequências de aminoácidos divergiram de tal forma que não é possível determinar as relações entre duas proteínas de uma família sem a determinação de suas estruturas tridimensionais. A proteína $\alpha 2$ de levedura e a proteína *engrailed* da *Drosophila*, por exemplo, são proteínas de regulação gênica da família de homeodomínio (discutido no Capítulo 7). Por serem idênticas em apenas 17 dos seus 60 resíduos de aminoácidos, sua relação foi estabelecida somente quando as estruturas tridimensionais foram comparadas (**Figura 3-13**). Muitos exemplos similares mostram que duas proteínas com mais de 25% de identidade entre as suas sequências de aminoácidos com frequência compartilham a mesma estrutura geral.

Os diversos membros de uma grande família de proteínas geralmente têm funções distintas. Algumas mudanças de aminoácidos que tornam os membros de uma família distintos foram, indubitavelmente, selecionadas no curso da evolução, pois resultam em variações úteis para a atividade biológica, fornecendo aos membros individuais da família as diferentes propriedades funcionais que eles têm hoje. Mas muitas outras variações nos aminoácidos são efetivamente "neutras", não tendo efeito nem benéfico, nem danoso na estrutura

Figura 3-13 Comparação de uma classe de domínios de ligação ao DNA, denominados homeodomínios, em um par de proteínas de dois organismos separados por mais de um bilhão de anos de evolução. (A) Modelo de fita da estrutura comum de ambas as proteínas. (B) Um desenho mostrando as posições dos carbonos α. As estruturas tridimensionais mostradas foram determinadas por cristalografia por difração de raios X para a proteína $\alpha 2$ de levedura (*verde*) e para a proteína *engrailed* de *Drosophila* (*vermelho*). (C) Uma comparação da sequência de aminoácidos das regiões das proteínas mostradas em (A) e (B). Os *pontos em preto* marcam os locais com aminoácidos idênticos. Os *pontos em laranja* indicam a posição da inserção de três aminoácidos na proteína $\alpha 2$. (Adaptada de C. Wolberger et al., *Cell* 67:517-528, 1991. Com permissão da Elsevier.)



básica e na função da proteína. Além disso, visto que a mutação é um processo aleatório, deve ter havido muitas mudanças deletérias que alteraram a estrutura tridimensional dessas proteínas o suficiente para danificá-las. Tais proteínas defeituosas teriam sido perdidas sempre que os organismos individuais que as produziam ficavam em desvantagem e foram eliminadas pela seleção natural.

As famílias de proteínas são prontamente reconhecidas quando o genoma de qualquer organismo é sequenciado; por exemplo, a determinação da sequência de DNA completa do genoma humano revelou que ele contém cerca de 24.000 genes que codificam proteínas. Por meio da comparação das sequências, podemos determinar os produtos de cerca de 40% desses genes para conhecer as estruturas das proteínas codificadas, que pertencem a mais de 500 famílias diferentes de proteínas. Muitas das proteínas em cada família evoluíram para desempenhar funções levemente distintas, como as enzimas elastase e quimotripsina, ilustradas anteriormente na Figura 3-12. Enzimas como estas algumas vezes são referidas como *parálogas*, para distinguí-las de enzimas correspondentes em diferentes organismos (*ortólogas*, como a elastase de camundongos e de humanos).

Conforme descrito no Capítulo 8, como resultado de técnicas poderosas como a cristalografia por difração de raios X e a ressonância magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic ressonance*), agora conhecemos as estruturas tridimensionais, ou conformações, de mais de 20.000 proteínas. Por meio da comparação cuidadosa das conformações dessas proteínas, biólogos estruturais (ou seja, especialistas na estrutura de moléculas biológicas) concluíram que existe um número limitado de conformações adotadas pelos domínios proteicos na natureza – talvez um número tão pequeno como 2.000. As estruturas de cerca de 800 desses motivos estruturais já foram determinadas. Esses motivos conhecidos tendem a ser os mais representativos no universo das estruturas de proteínas: por exemplo, 50 motivos representam cerca de três quartos das famílias de domínios com estruturas preditas. Um catálogo completo dos motivos estruturais mais significantes observados nos organismos vivos parece estar ao nosso alcance.

As buscas de sequências podem identificar parentes próximos

Os bancos de dados atuais das sequências conhecidas de proteínas contêm mais de dez milhões de entradas e estão aumentando muito rapidamente, conforme mais e mais genomas são sequenciados – revelando um grande número de novos genes que codificam proteínas. Poderosos programas computacionais de busca estão disponíveis e permitem comparar cada proteína recentemente descoberta com o banco de dados completo, em busca de possíveis parentes. Muitas proteínas cujo genoma evoluiu a partir de um ancestral comum podem ser identificadas pela descoberta de similaridades estatisticamente significativas entre suas sequências de aminoácidos.

Com um número tão grande de proteínas em um banco de dados, os programas de busca encontram similaridades que não são significativas, resultando em artefatos da técnica, que tornam difícil a identificação dos parentes mais próximos. De uma forma geral, uma identidade de 30% na sequência de duas proteínas é necessária para se ter certeza de que um bom par foi encontrado. Entretanto, sabemos a função de muitas pequenas "assinaturas" de sequências ("impressões digitais"), e as utilizamos para a identificação de relações de parentesco mais distantes (**Figura 3-14**).

Comparações de proteínas são importantes, pois estruturas parecidas geralmente implicam funções parecidas. Muitos anos de experimentos podem ser evitados pela descoberta de que uma nova proteína tem uma sequência de aminoácidos similar a outra proteína de função conhecida. Essas relações entre as sequências, por exemplo, indicaram inicialmente que certos genes que fazem células de mamíferos tornarem-se cancerosas são proteína-cinases. Da mesma forma, muitas proteínas que controlam o padrão de formação durante o desenvolvimento embrionário da mosca-da-fruta *Drosophila* foram rapidamente reconhecidas como proteínas de regulação gênica.

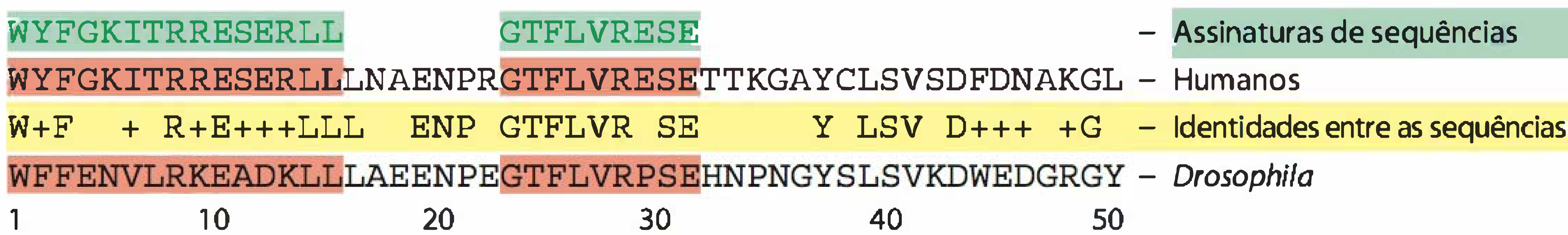


Figura 3-14 Uso de pequenas assinaturas de sequências para encontrar domínios proteicos relacionados. As duas sequências curtas de 15 e 9 aminoácidos mostradas (em *verde*) podem ser usadas para pesquisar grandes bancos de dados para um domínio proteico encontrado em muitas proteínas, o domínio SH2. Aqui, os primeiros 50 aminoácidos dos 100 aminoácidos do domínio SH2 são comparados com a proteína Src humana e a de *Drosophila* (ver Figura 3-10). Na comparação gerada por computador entre as duas sequências (*linha amarela*), a identidade entre a proteína humana e a de *Drosophila* é representada pela abreviação de uma letra dos aminoácidos; as posições que apresentam aminoácidos similares, mas não idênticos, são indicadas por +, e as regiões que não apresentam identidade estão em branco. Nesse diagrama, quando uma ou ambas as proteínas possuem uma região idêntica para uma determinada posição da sequência (em *verde*), ambas estão marcadas em *vermelho*.

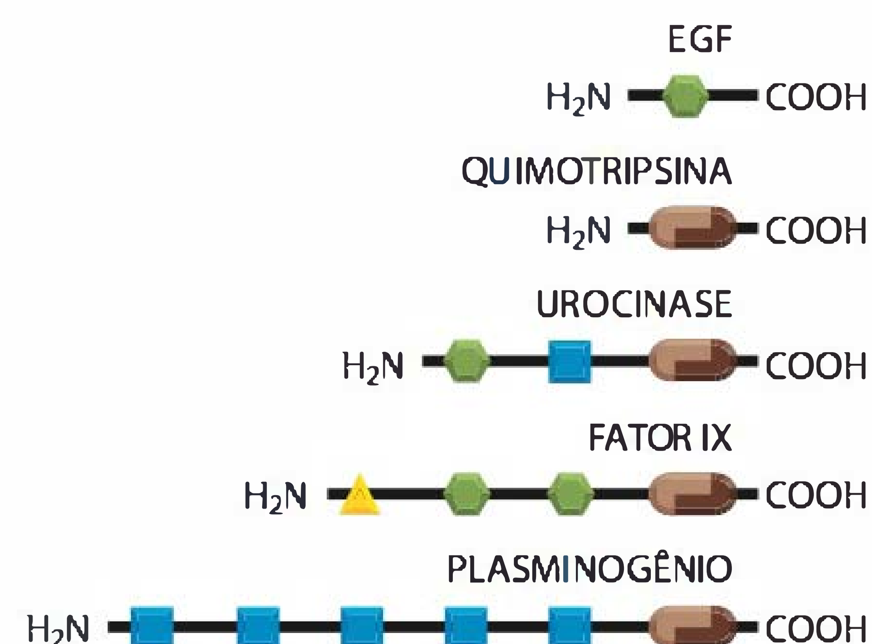


Figura 3-15 Embaralhamento de domínios. Um embaralhamento extensivo de blocos de sequências de proteínas (domínios proteicos) ocorreu durante a evolução das proteínas. As porções da proteína representadas pela mesma forma e cor nesse diagrama são evolutivamente relacionadas. As serina-proteases, como a quimotripsina, são formadas por dois domínios (*marrom*). Nas três outras proteases mostradas, as quais são altamente reguladas e mais especializadas, esses dois domínios da protease são conectados por um ou mais domínios, similares aos domínios encontrados no fator de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor; verde*), na proteína ligadora de cálcio (*amarelo*) ou no domínio *kringle* (*azul*) que contém três ligações dissulfeto internas. A quimotripsina é ilustrada na Figura 3-12.

Alguns domínios proteicos formam partes de várias proteínas diferentes

Como foi previamente estabelecido, a maioria das proteínas é composta de uma série de domínios proteicos, nos quais regiões diferentes da cadeia polipeptídica são enoveladas independentemente para formar estruturas compactas. Acredita-se que tais proteínas com multidomínios originaram-se pela junção acidental de sequências de DNA que codificam cada domínio, criando um novo gene. Novas superfícies de contato foram criadas na justaposição de domínios, e muitos sítios funcionais onde as proteínas se ligam a pequenas moléculas são localizados nessas justaposições de domínios. No processo evolutivo denominado *embaralhamento de domínios*, muitas proteínas grandes evoluíram pela junção de domínios já existentes em novas combinações (**Figura 3-15**).

Um subconjunto de domínios proteicos foi especialmente lábil durante a evolução; apresentam estruturas particularmente versáteis e são referidos algumas vezes como *módulos proteicos*. A estrutura de um módulo, o domínio SH2, foi ilustrada no Painel 3-2 (p. 132-133). Outros domínios proteicos de alta ocorrência são ilustrados na **Figura 3-16**.

Cada um dos domínios mostrados tem um núcleo de estrutura estável, formado por fitas da folha β, a partir das quais se estendem alças menos ordenadas da cadeia polipeptídica (*verde*). As alças estão idealmente localizadas para formar sítios de ligação para outras moléculas, como demonstrado mais claramente pelo enovelamento da imunoglobulina, que forma a base para as moléculas de anticorpos (ver Figura 3-41). Muito provavelmente, os domínios com base em folhas β atingiram tal sucesso evolutivo por formarem uma estrutura para a geração de novos sítios de ligação para ligantes por meio de pequenas modificações nas alças protuberantes.

Um segundo aspecto desses domínios proteicos que explica sua utilidade é a facilidade com que podem ser integrados em outras proteínas. Cinco dos seis módulos proteicos ilustrados na Figura 3-16 têm suas regiões N-terminal e C-terminal em lados opostos do domínio. Quando o DNA que codifica um desses domínios sofre duplicação em *tandem*, o que não é incomum na evolução dos genomas (discutido no Capítulo 4), as moléculas duplicadas com esse arranjo "em linha" podem ser prontamente conectadas em série para

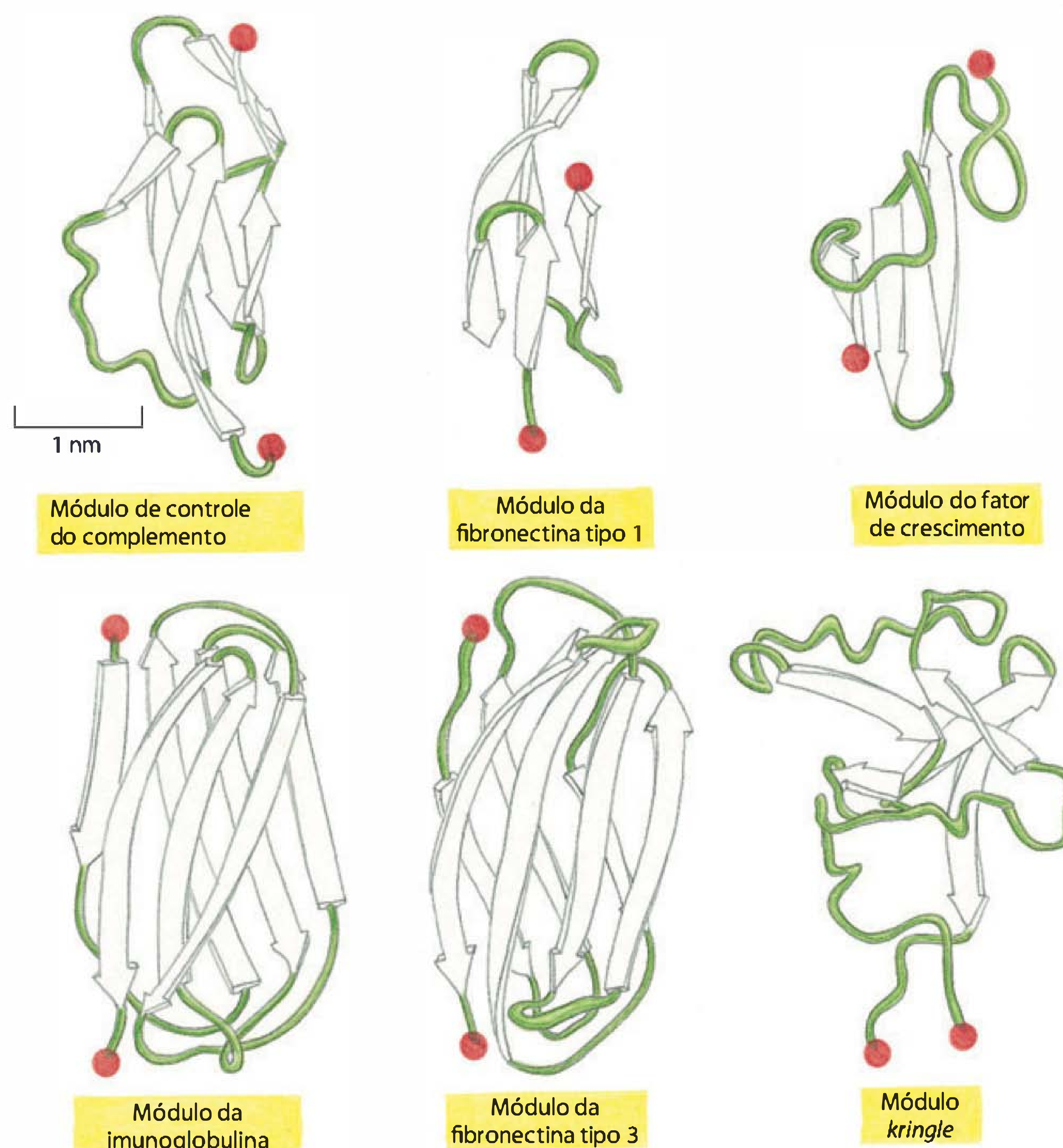


Figura 3-16 Estruturas tridimensionais de alguns módulos proteicos. Nesses diagramas no modelo de fitas, as fitas das folhas β são mostradas como *setas*, e as regiões N- e C-terminais são indicadas por esferas *vermelhas*. (Adaptada de M. Baron, D.G. Norman e I. D. Campbell, *Trends Biochem. Sci.* 16:13-17, 1991, com permissão de Elsevier, e D. J. Leahy et al., *Science* 258:987-991, 1992, com permissão de AAAS.)

formar estruturas estendidas – com elas próprias ou com outros domínios em linha (**Figura 3-17**). Estruturas estendidas rígidas compostas por uma série de domínios são especialmente comuns em moléculas da matriz extracelular e em porções extracelulares de proteínas receptoras da superfície celular. Outros módulos, incluindo o domínio SH2 e o domínio *kringle* ilustrados na Figura 3-16, são do tipo *plug-in*, com suas regiões N-terminal e C-terminal bastante próximas. Após rearranjos genômicos, tais domínios geralmente são acomodados como uma inserção em uma região de alças de uma segunda proteína.

Uma comparação da frequência relativa da utilização dos domínios em diferentes eucariotos revelou que, para muitos domínios comuns, como as proteína-cinases, essa frequência é similar em organismos tão diversos como leveduras, plantas, vermes, moscas e humanos (**Figura 3-18**). Mas existem algumas exceções notáveis, como o domínio de reconhecimento de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) (ver Figura 25-52), presente em 57 cópias em humanos, mas ausente nos outros quatro organismos citados. Presume-se que esses domínios tenham funções especializadas que não são compartilhadas com outros organismos eucariotos, sendo fortemente selecionadas ao longo da evolução para originar as múltiplas cópias observadas. De modo similar, um domínio como o SH2, que apresenta um aumento incomum em seu número nos organismos superiores, pode ser especialmente útil para a multicelularidade (compare os organismos multicelulares com as leveduras na Figura 3-18).

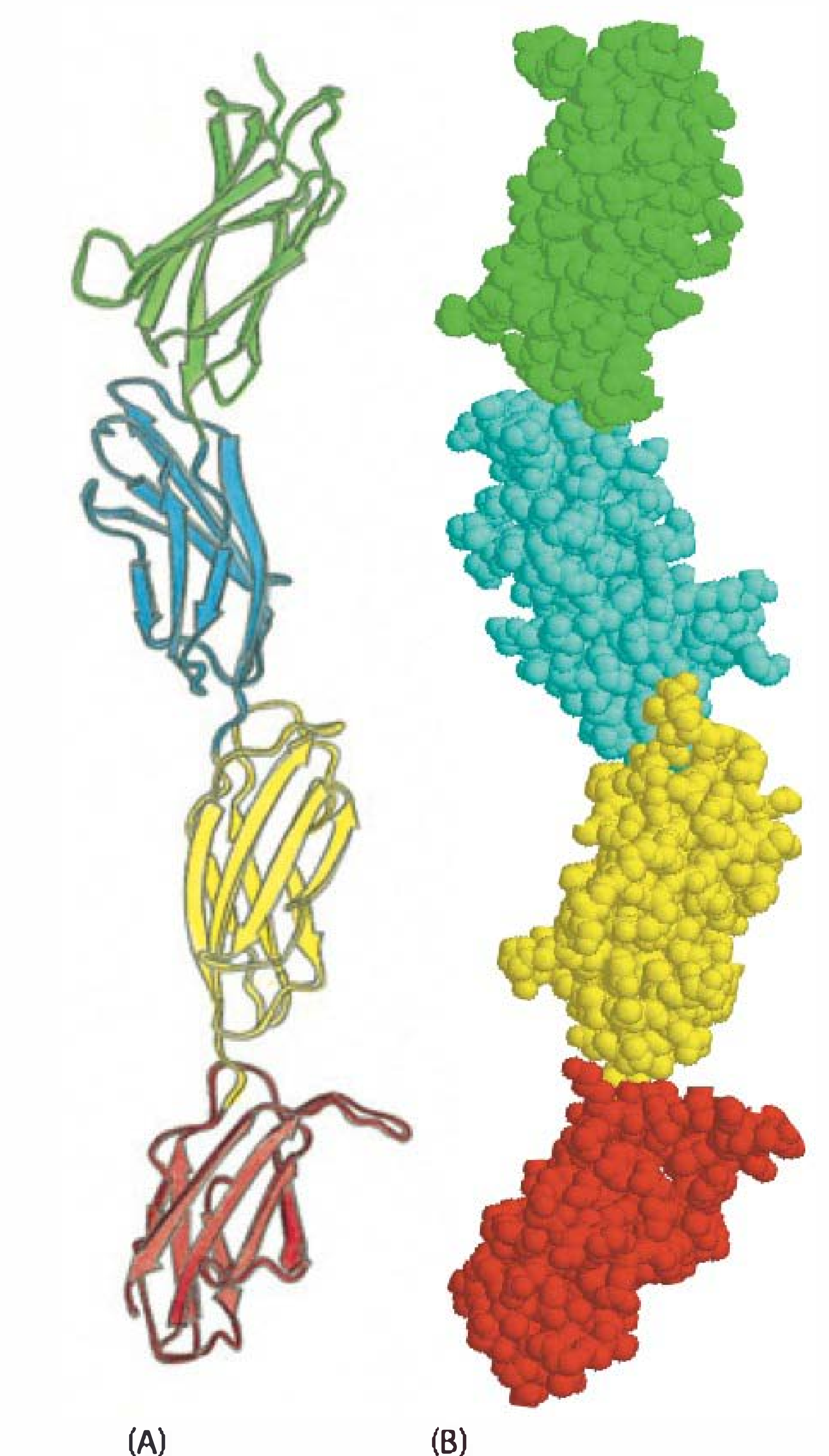


Figura 3-17 Estrutura alongada formada por uma série de módulos proteicos em série. Quatro módulos de fibronectina tipo 3 (ver Figura 3-16) da molécula fibronectina da matriz extracelular são ilustrados no (A) modelo de fitas e no (B) modelo de preenchimento espacial. (Adaptada de D. J. Leahy, I. Aukhil e H. P. Erickson, *Cell* 84:155-164, 1996. Com permissão de Elsevier.)

Certos pares de domínios são encontrados juntos em muitas proteínas

Podemos construir uma grande tabela mostrando o uso de domínios em cada organismo cuja sequência genômica é conhecida. Por exemplo, estima-se que o genoma humano contenha cerca de 1.000 domínios de imunoglobulinas, 500 domínios de proteína-cinases, 250 homeodomínios de ligação ao DNA, 300 domínios SH3 e 120 domínios SH2. Importantes informações adicionais podem ser derivadas da comparação das frequências e dos arranjos de domínios em mais de 100 genomas de eucariotos, bactérias e arquebactérias que tenham sido completamente sequenciados. Por exemplo, descobrimos que mais de dois terços das proteínas consistem em dois ou mais domínios, e que os mesmos pares de domínios ocorrem repetidamente nos mesmos arranjos relativos em uma proteína. Apesar de metade de todas as famílias de domínios serem comuns entre arquebactérias, bactérias e eucariotos, apenas 5% das combinações de dois domínios são, similarmente, compartilhados. Esse padrão sugere que a maior parte das proteínas contendo combinações especialmente úteis de dois domínios surgiu relativamente tarde na evolução.

As 200 combinações de dois domínios mais abundantes ocorrem em cerca de um quarto de todas as proteínas com domínios reconhecidos em todo o banco de dados. Pode então ser bastante útil a determinação das estruturas tridimensionais precisas de pelo menos uma proteína de cada uma das combinações de dois domínios mais comuns, para revelar como esses domínios interagem nesse tipo de estrutura proteica.

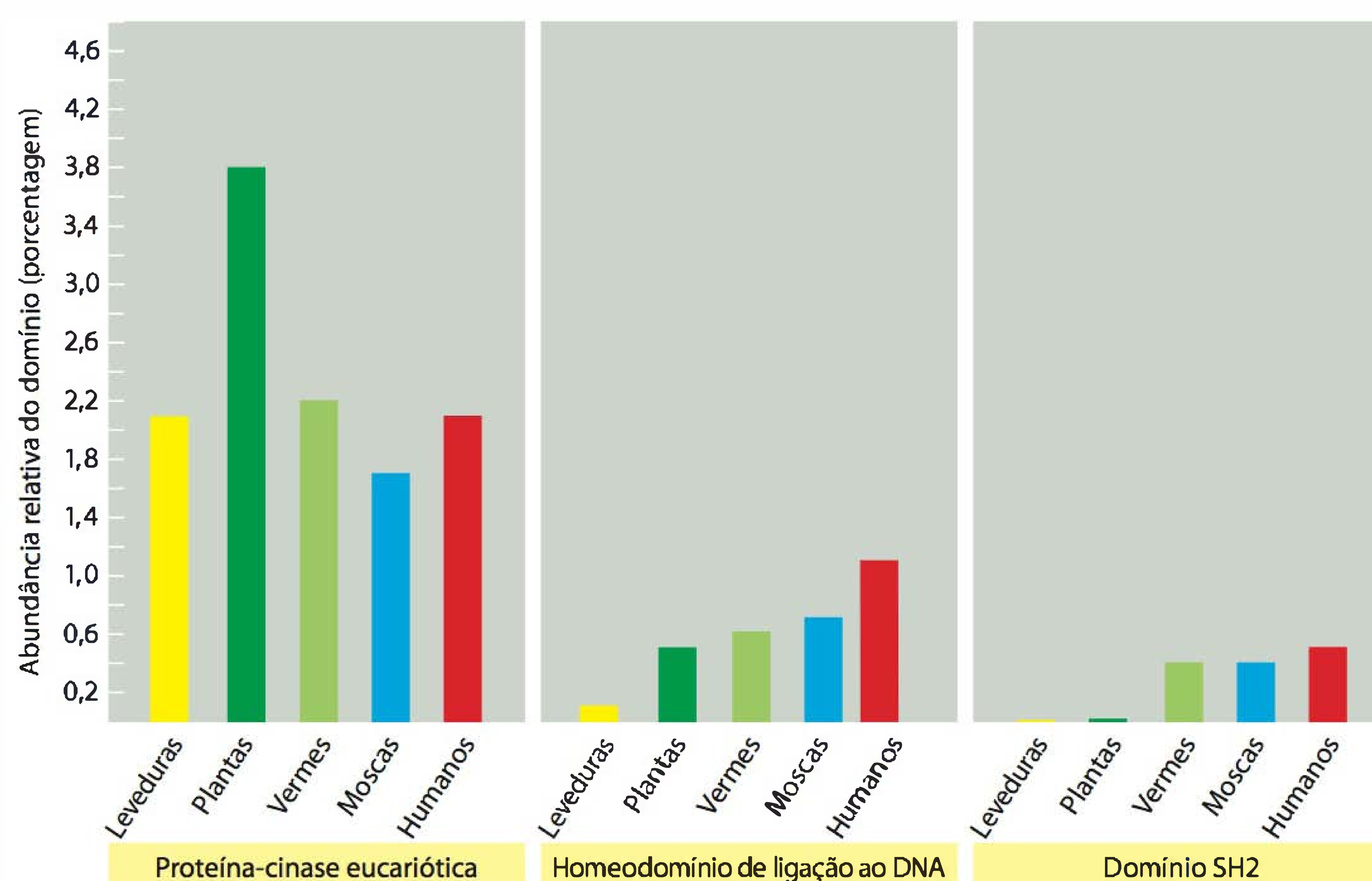


Figura 3-18 Frequência relativa de três domínios proteicos em cinco organismos eucarióticos. As porcentagens aproximadas foram determinadas pela divisão do número de cópias de cada domínio pelo número total de proteínas distintas codificadas pelos organismos, individualmente, conforme determinado pela sequência de seus respectivos genomas. Assim, para os domínios SH2 em humanos, 120/24.000 = 0,005.

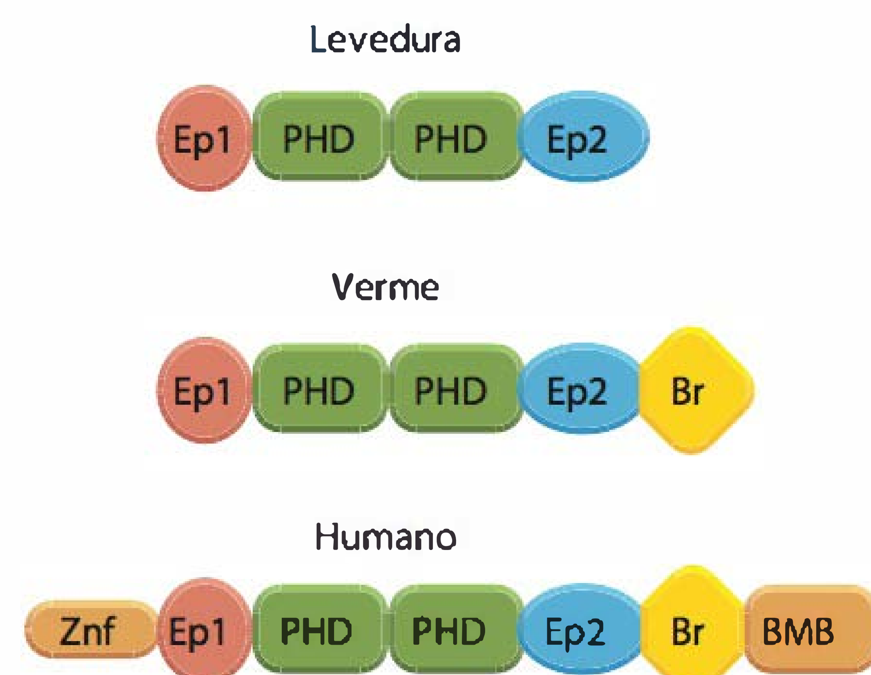


Figura 3-19 Estrutura de domínio de um grupo de proteínas relacionadas evolutivamente, consideradas como tendo funções similares. Em geral, exite a tendência de as proteínas em organismos mais complexos, como em humanos, conterem domínios adicionais – como no caso da proteína de ligação ao DNA aqui comparada.

O genoma humano codifica um conjunto complexo de proteínas, revelando muito do que permanece desconhecido

O resultado do sequenciamento do genoma humano foi surpreendente, pois revelou que nossos cromossomos contêm somente cerca de 25.000 genes. Considerando-se apenas o número de genes, parecemos ser não mais complexos que a pequena erva de mostarda, *Arabidopsis*, e apenas cerca de 1,3 vez mais complexos que um verme nematoide. As sequências dos genomas também revelam que os vertebrados herdaram aproximadamente todos os domínios proteicos dos invertebrados – com somente 7% dos domínios humanos identificados sendo específicos de vertebrados.

Entretanto, cada uma das nossas proteínas é relativamente mais complicada (**Figura 3-19**). Um processo de embaralhamento de domínios, durante a evolução dos vertebrados, deu origem a muitas combinações novas de domínios proteicos, resultando em quase duas vezes mais combinações de domínios em proteínas humanas que em um verme ou em uma mosca. Dessa forma, por exemplo, o domínio da serina-protease similar à tripsina está ligado a pelo menos 18 outros tipos de domínios proteicos em proteínas humanas, enquanto é encontrado covalentemente ligado a somente cinco domínios em vermes. Essa variedade adicional em nossas proteínas aumenta a faixa de interações possíveis proteína-proteína (ver Figura 3-82), mas não sabemos como isso contribui para nos tornar humanos.

A complexidade dos organismos vivos é impressionante, sendo importante notar que atualmente carecemos da mais simples pista de qual possa ser a função de mais de 10 mil proteínas que até o momento foram identificadas no genoma humano. Há certamente grandes desafios à frente para a próxima geração de biólogos celulares, com muitos mistérios interessantes a serem resolvidos.

As grandes moléculas proteicas geralmente contêm mais de uma cadeia polipeptídica

As mesmas ligações fracas não-covalentes que permitem a uma cadeia proteica se enovelar em uma conformação específica também permitem que as proteínas se liguem umas às outras para produzir estruturas maiores na célula. Qualquer região de uma superfície proteica que possa interagir com uma outra molécula, por meio de conjuntos de ligações não-covalentes, é chamada de **sítio de ligação**. Uma proteína pode conter sítios de ligação para várias moléculas, pequenas e grandes. Se um sítio de ligação reconhece a superfície de uma segunda proteína, a forte ligação das duas cadeias polipeptídicas enoveladas nesse sítio cria uma molécula de proteína maior, com uma geometria precisamente definida. Cada cadeia polipeptídica nessa proteína é chamada de **subunidade proteica**.

Em um caso mais simples, duas cadeias polipeptídicas idênticas se ligam uma à outra, em um arranjo "cabeça-a-cabeça", formando um complexo simétrico de duas subunidades proteicas (um *dímero*) mantidas juntas por interações entre os dois sítios de ligação idênticos. A *proteína repressora Cro* – uma proteína de regulação de genes virais, que se liga ao DNA e reprime a expressão dos genes virais em células bacterianas infectadas – nos fornece um exemplo (**Figura 3-20**). As células contêm muitos outros tipos de complexos simétricos de proteínas, formados a partir de cópias múltiplas de uma única cadeia polipeptídica. A enzima *neuroaminidase*, por exemplo, consiste em quatro subunidades proteicas idênticas, cada uma ligada à próxima em um arranjo "cabeça-a-cauda" que forma um anel fechado (**Figura 3-21**).

Muitas das proteínas nas células contêm dois ou mais tipos de cadeias polipeptídicas. A *hemoglobina*, proteína que transporta o oxigênio nas células vermelhas do sangue, contém

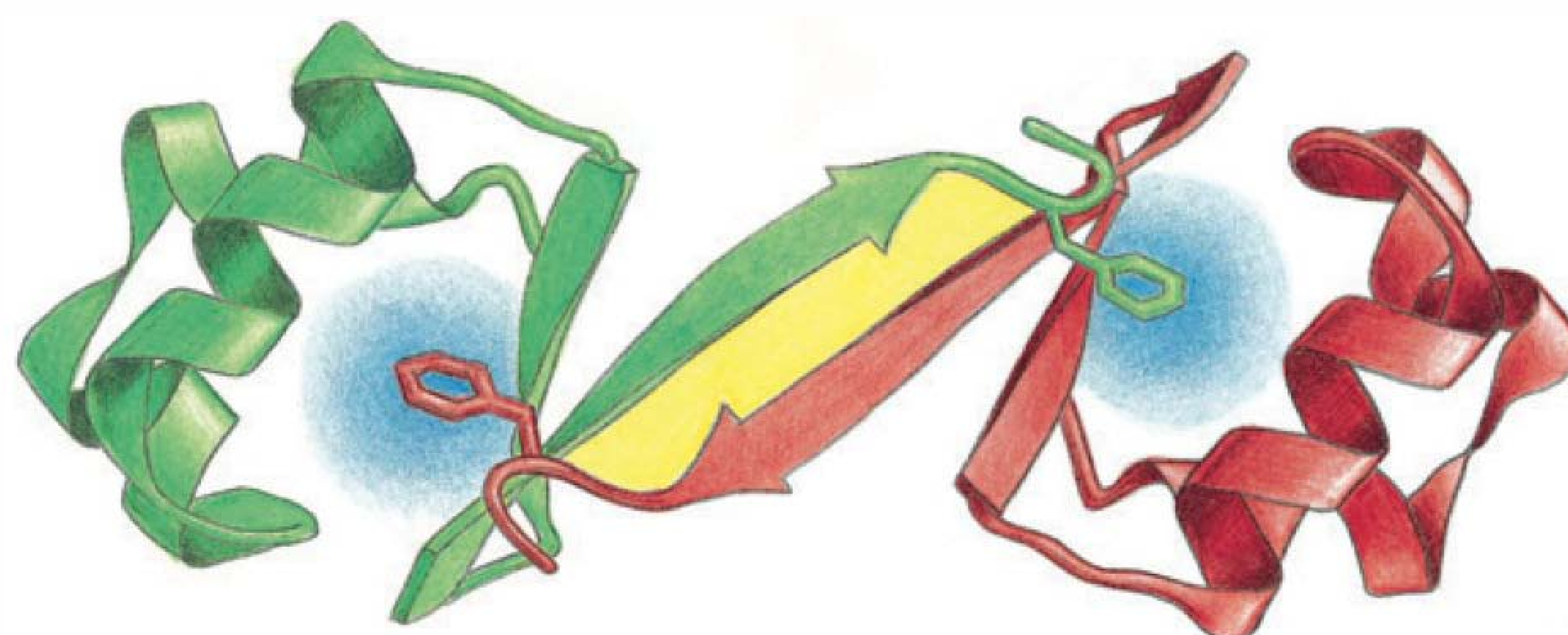


Figura 3-20 Duas subunidades proteicas idênticas unidas para formar um dímero simétrico. A proteína repressora Cro do bacteriófago lambda liga-se ao DNA para reprimir a expressão de genes virais. Suas duas subunidades idênticas se ligam cabeça-a-cabeça e se mantêm unidas por interações hidrofóbicas (*azul*) e por um conjunto de ligações de hidrogênio (região *amarela*). (Adaptado de D. H. Ohlendorf, D. E. Tronrud e B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* 280:129-136, 1998. Com permissão de Academic Press.)

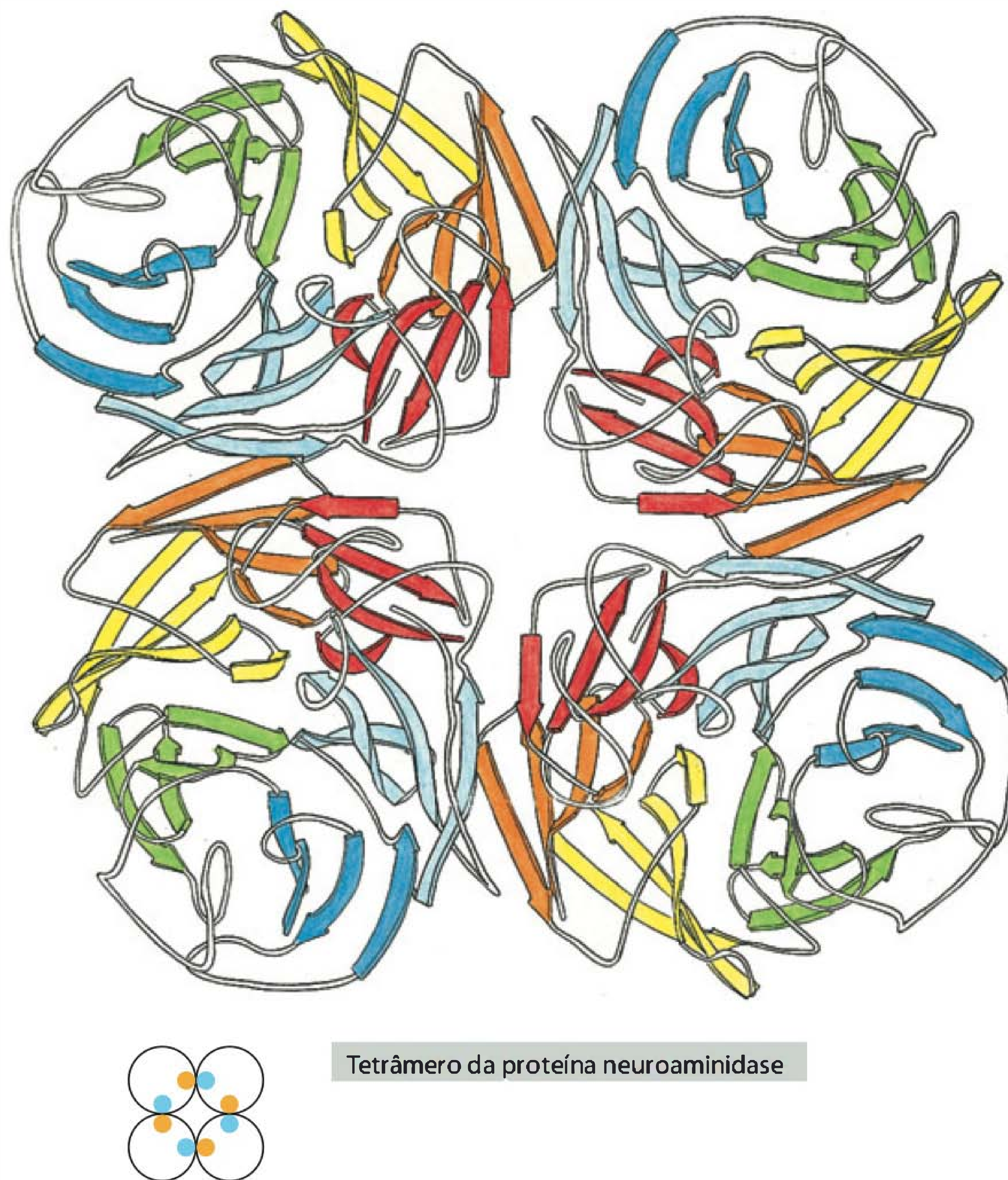


Figura 3-21 Uma molécula de proteína contém múltiplas cópias de uma única subunidade proteica. A enzima neuraminidase consiste em um anel de quatro cadeias polipeptídicas idênticas. Cada uma dessas cadeias é formada por seis repetições de folhas β formadas por quatro fitas, como indicado pelas setas coloridas. O diagrama menor enfatiza como o uso repetido do mesmo tipo de sítio de ligação forma a estrutura.

duas subunidades globina α idênticas e duas subunidades globina β idênticas, simetricamente dispostas (**Figura 3-22**). Tais proteínas de multissubunidades são muito comuns em células e podem ser bastante grandes. A **Figura 3-23** fornece uma amostragem de proteínas cujas estruturas são conhecidas, e compara seus tamanhos e suas formas com algumas proteínas relativamente menores, já apresentadas como modelos.

Algumas proteínas formam longos filamentos helicoidais

Algumas moléculas de proteínas podem agrupar-se para formar filamentos que podem se estender por todo o comprimento de uma célula. Na forma mais simples, uma longa cadeia de moléculas de proteínas idênticas pode ser construída, se cada molécula tiver um sítio de ligação complementar a uma outra região da superfície da mesma molécula (**Figura 3-24**). Um filamento de actina, por exemplo, é uma longa estrutura helicoidal produzida a partir de muitas moléculas da proteína *actina* (**Figura 3-25**). A actina é muito abundante em células eucarióticas, nas quais ela constitui um dos maiores sistemas filamentares do citoesqueleto (discutido no Capítulo 16).

Por que uma hélice é uma estrutura tão comum na biologia? Como vimos, as estruturas biológicas geralmente são formadas pela ligação de subunidades similares – como aminoácidos ou moléculas de proteínas – em cadeias longas e repetitivas. Se todas as subunidades são idênticas, as subunidades adjacentes na cadeia geralmente podem manter-se unidas de uma única maneira, ajustando suas posições relativas para minimizar a energia livre do contato entre elas. Como resultado, cada subunidade está posicionada exatamente da mesma maneira em relação à próxima, de forma que a subunidade 3 ajusta-se à subunidade 2 da mesma maneira que a subunidade 2 ajusta-se à subunidade 1, e assim sucessivamente. Como é muito raro que as subunidades se unam em uma linha reta, esse arranjo geralmente resulta em uma hélice – uma estrutura regular que se assemelha a uma escada em espiral, como ilustrado na **Figura 3-26**. Dependendo da torção da escada, diz-se que a orientação da hélice é dextrógira (para a direita) ou levógira (para a esquerda) (Ver Figura 3-26E). A direção não é afetada ao virar-se a hélice de cabeça para baixo, mas é revertida se a hélice é refletida no espelho.

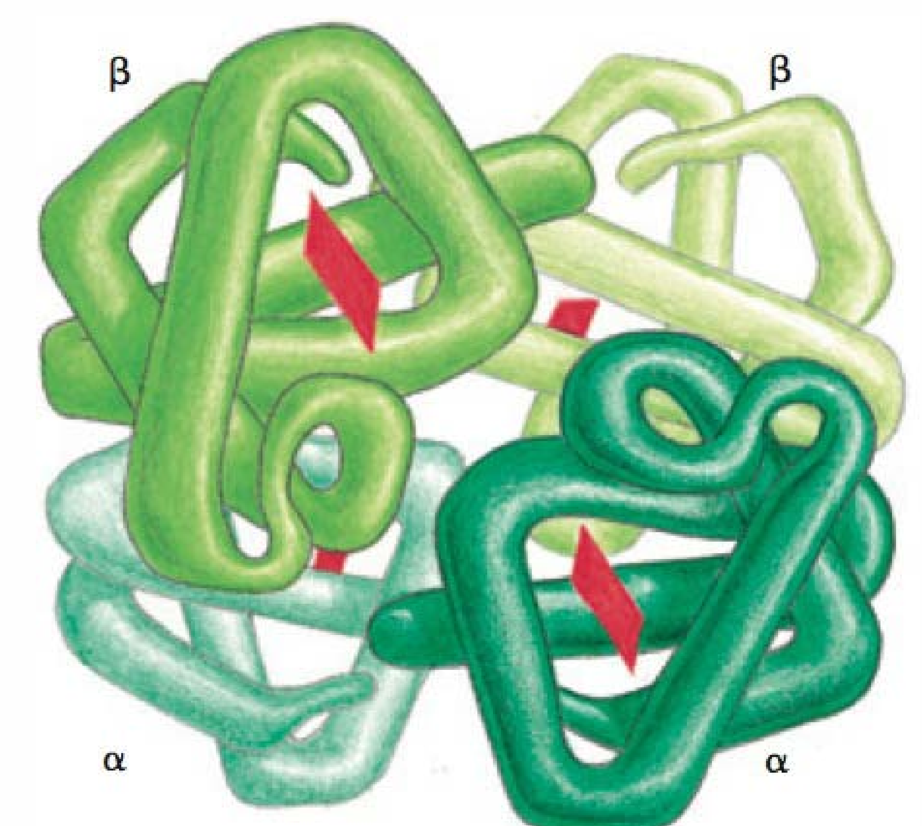


Figura 3-22 Proteína formada pelo arranjo simétrico de duas subunidades diferentes. A hemoglobina é uma proteína abundante em células vermelhas do sangue e contém duas cópias de globina α e duas cópias de globina β. Cada uma dessas quatro cadeias polipeptídicas contém uma molécula de heme (*vermelho*), que é o sítio de ligação do oxigênio (O_2). Portanto, cada molécula de hemoglobina no sangue carrega quatro moléculas de oxigênio.

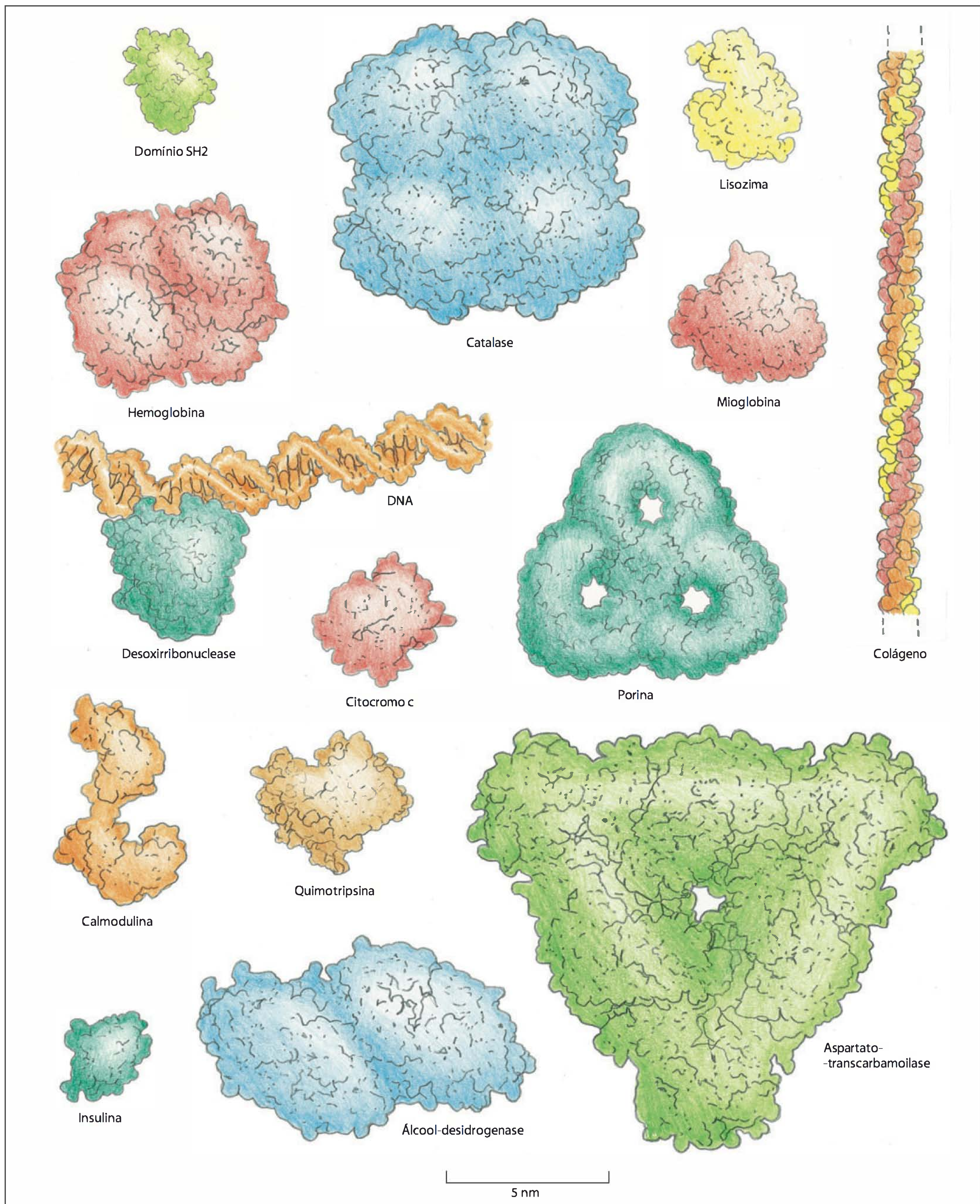


Figura 3-23 Conjunto de moléculas proteicas, mostradas na mesma escala. Para comparação, uma molécula de DNA ligada a uma proteína também é mostrada. Esses modelos de preenchimento espacial representam a variedade de tamanhos e formas. Hemoglobina, catalase, porina, álcool-desidrogenase e aspartato-transcarbamoilase são formadas de múltiplas cópias de uma única subunidade. O domínio SH2 (*em cima à esquerda*) é apresentado em detalhes no Painel 3-2 (p. 132-133). (Com permissão de David S. Goodsell, Our Molecule Nature. New York: Springer-Verlag, 1996. Com permissão de Springler Science and Business Media.)

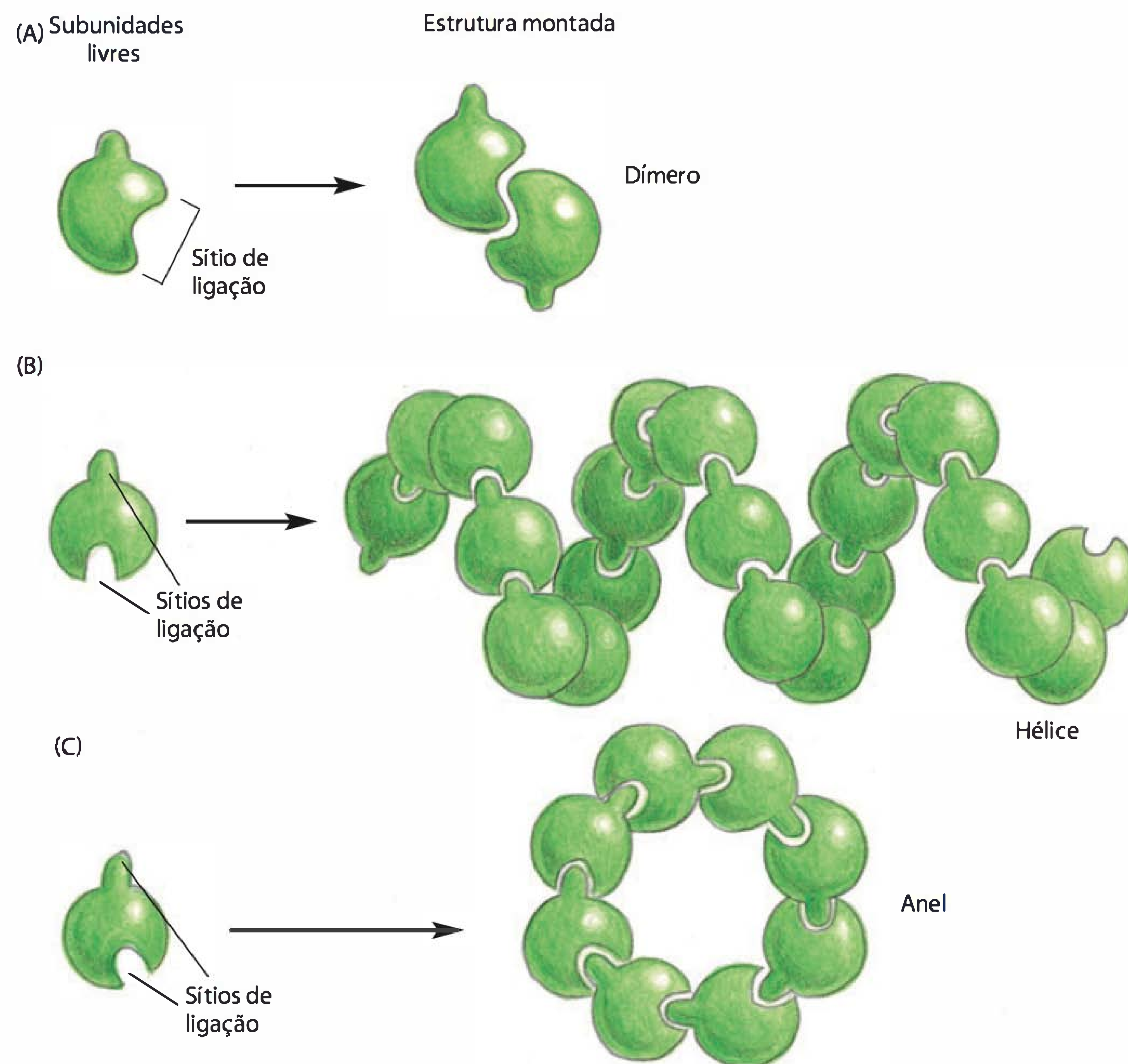


Figura 3-24 Montagens de proteínas. (A) Uma proteína com apenas um sítio de ligação pode formar um dímero com outra proteína idêntica. (B) Proteínas idênticas com dois sítios de ligação diferentes frequentemente formam longos filamentos helicoidais. (C) Se os dois sítios de ligação estiverem dispostos apropriadamente um em relação ao outro, as subunidades proteicas podem formar um anel fechado em vez de uma hélice. (Para um exemplo de [A], ver Figura 3-20; para um exemplo de [C], ver Figura 3-21.)

As hélices são comumente encontradas em estruturas biológicas, sejam as subunidades pequenas moléculas unidas por ligações covalentes (p. ex., os aminoácidos em uma hélice α) sejam grandes moléculas de proteínas unidas por forças não-covalentes (p. ex., moléculas de actina nos filamentos de actina). Isso não é surpreendente. Uma hélice é uma estrutura comum, sendo gerada simplesmente colocando-se subunidades similares próximas umas às outras; cada uma com exatamente a mesma relação com a antecedente, repetidamente – ou seja, com uma rotação fixa seguida por uma translação ao longo do eixo da hélice, como uma escada em espiral.

Muitas moléculas proteicas apresentam formas alongadas e fibrosas

A maioria das proteínas discutidas até agora são *proteínas globulares*, nas quais a cadeia polipeptídica enovela-se em uma forma compacta como uma bola de superfície irregular. As enzimas tendem a ser proteínas globulares: mesmo que muitas sejam grandes e complicadas, com múltiplas subunidades, a maioria tem uma forma geral arredondada (ver Figura 3-23). Ao contrário, outras proteínas têm funções na célula que requerem que cada molécula individualmente estenda-se por uma grande distância. Essas proteínas em geral têm uma estrutura tridimensional alongada relativamente simples e são comumente chamadas de *proteínas fibrosas*.

Uma grande família de proteínas fibrosas intracelulares consiste em α-queratina, apresentada anteriormente quando falamos das hélices α, e seus parentes. Os filamentos de queratina são extremamente estáveis e são os principais componentes em estruturas duradouras como os cabelos, os chifres e as unhas. Uma molécula de α-queratina é um dímero de duas subunidades idênticas, com as longas hélices α de cada subunidade formando uma super-hélice (ver Figura 3-9). As regiões de super-hélice são cobertas em cada extremidade por domínios globulares que contêm os sítios de ligação. Isso permite a essa classe de proteínas juntar-se em uma forma de corda de *filamentos intermediários* – um componente importante do citoesqueleto que cria o arcabouço estrutural interno da célula (ver Figura 16-19).

As proteínas fibrosas são especialmente abundantes no meio extracelular, onde são o principal componente da *matriz extracelular* gelatinosa que ajuda os conjuntos de células a se ligarem e formarem os tecidos. As células secretam as proteínas da matriz extracelular nas suas imediações, onde frequentemente se associam formando camadas ou longas fibras.

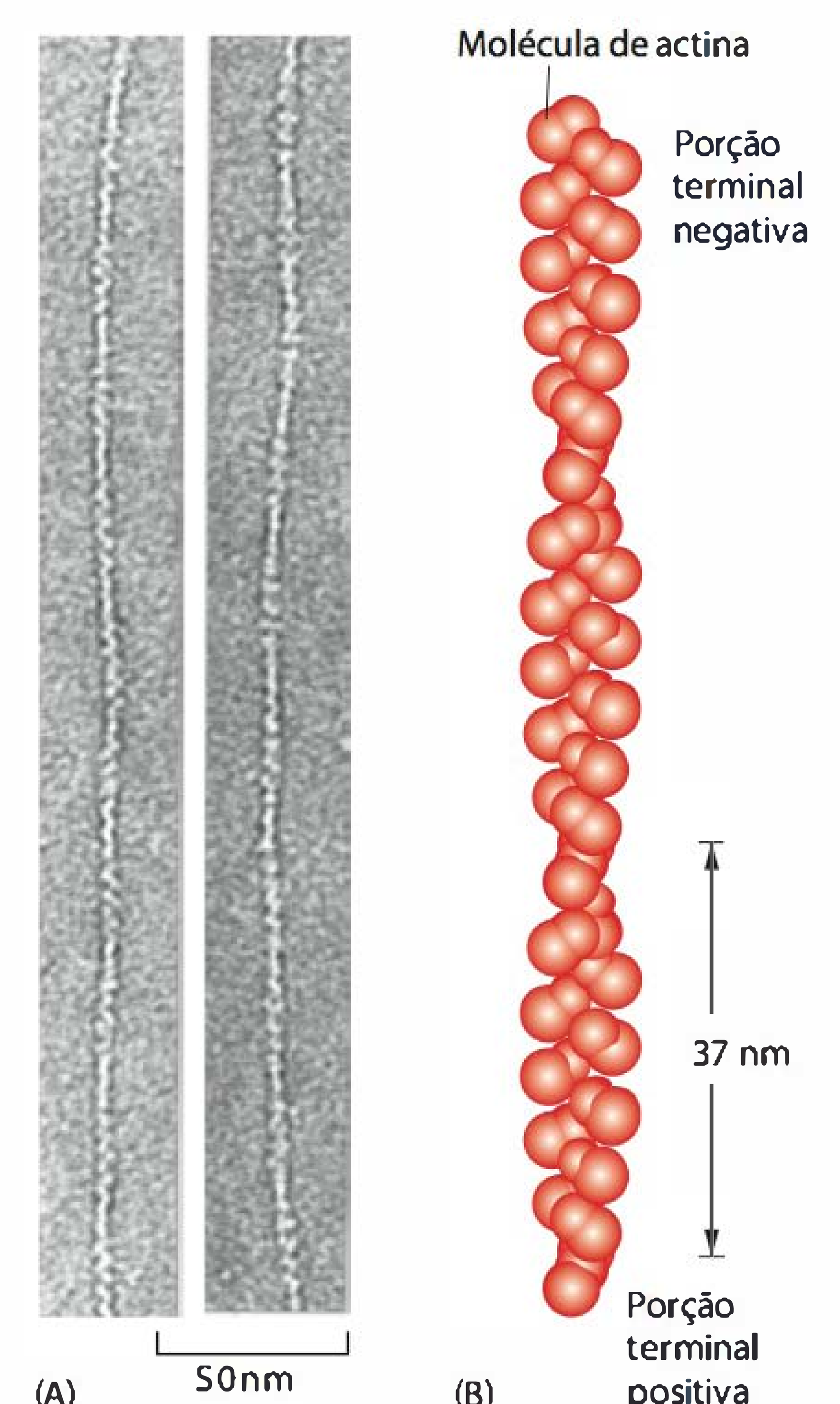


Figura 3-25 Filamentos de actina. (A) Micrografia de transmissão eletrônica de filamentos de actina marcados negativamente. (B) Arranjo helicoidal de moléculas de actina em um filamento de actina. (A, cortesia de Roger Craig.)

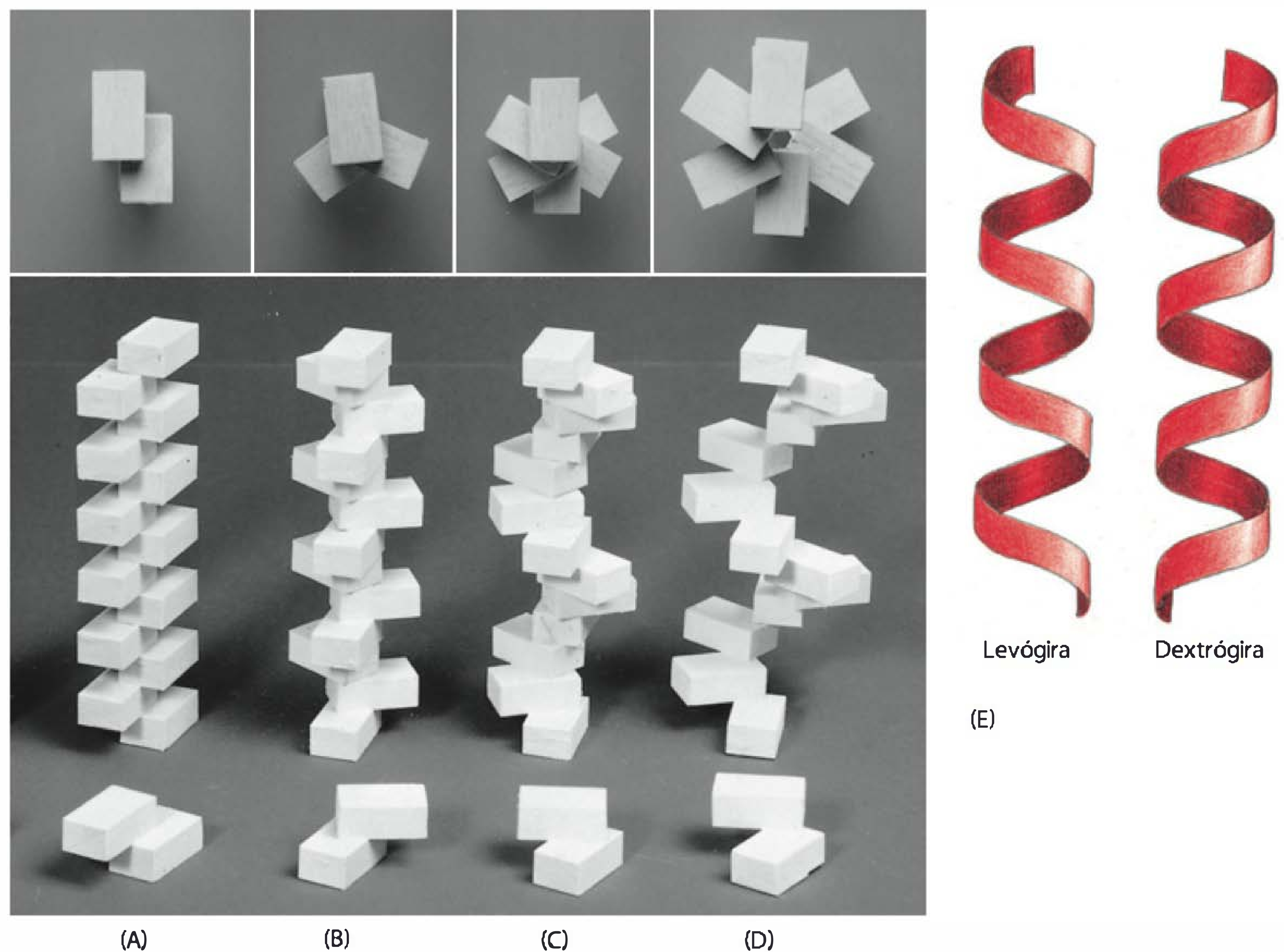
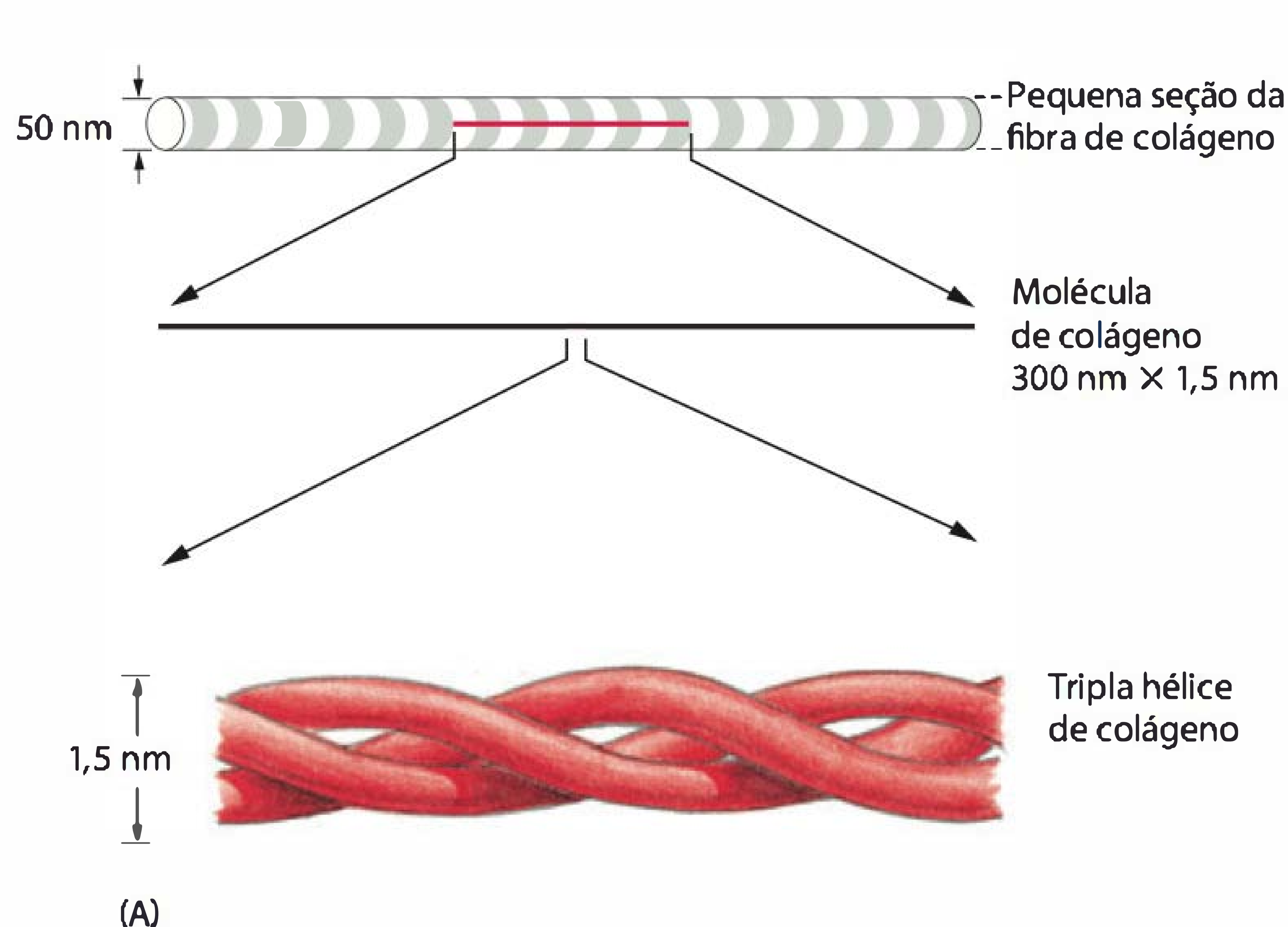


Figura 3-26 Algumas propriedades de uma hélice. (A-D) Uma hélice se forma quando várias subunidades ligam-se umas às outras de uma maneira regular. Na parte inferior, a interação entre duas subunidades é mostrada; logo acima estão os tipos de hélices resultantes. Essas hélices possuem duas (A), três (B) e seis (C e D) subunidades por volta da hélice. As fotografias na parte superior mostram o arranjo das subunidades vistas de cima. Observe que a hélice em (D) apresenta um espaçamento maior do que aquela em (C), mas o mesmo número de subunidades por volta. (E) Uma hélice pode ser orientada tanto para a direita quanto para a esquerda. Como uma referência, vale lembrar que as chaves de fenda comuns, que aparafusam quando giradas no sentido horário, são orientadas para a direita. Observe que a hélice mantém a mesma direção mesmo quando é girada de cabeça para baixo.

O *colágeno* é a mais abundante dessas proteínas nos tecidos animais. Uma molécula de colágeno consiste em três longas cadeias polipeptídicas, cada uma contendo um aminoácido glicina não-polar a cada três posições. Essa estrutura regular permite que as três cadeias se enovelem uma sobre a outra para gerar uma longa tripla hélice (**Figura 3-27**A). Muitas moléculas de colágeno então se ligam umas às outras, lado a lado e de ponta a ponta, para criar longos feixes sobrepostos – dessa maneira formam uma fibra de colágeno extremamente forte que confere a resistência elástica aos tecidos conectivos, como descrito no Capítulo 19.

Muitas proteínas contêm uma surpreendente quantidade da cadeia polipeptídica não-estruturada

Sabe-se há bastante tempo que, em contraste com o colágeno, outra proteína abundante na matriz extracelular, a *elastina*, é formada por polipeptídeos altamente desordenados. Essa desordem é essencial às funções da elastina. Suas cadeias polipeptídicas relativamente frouxas



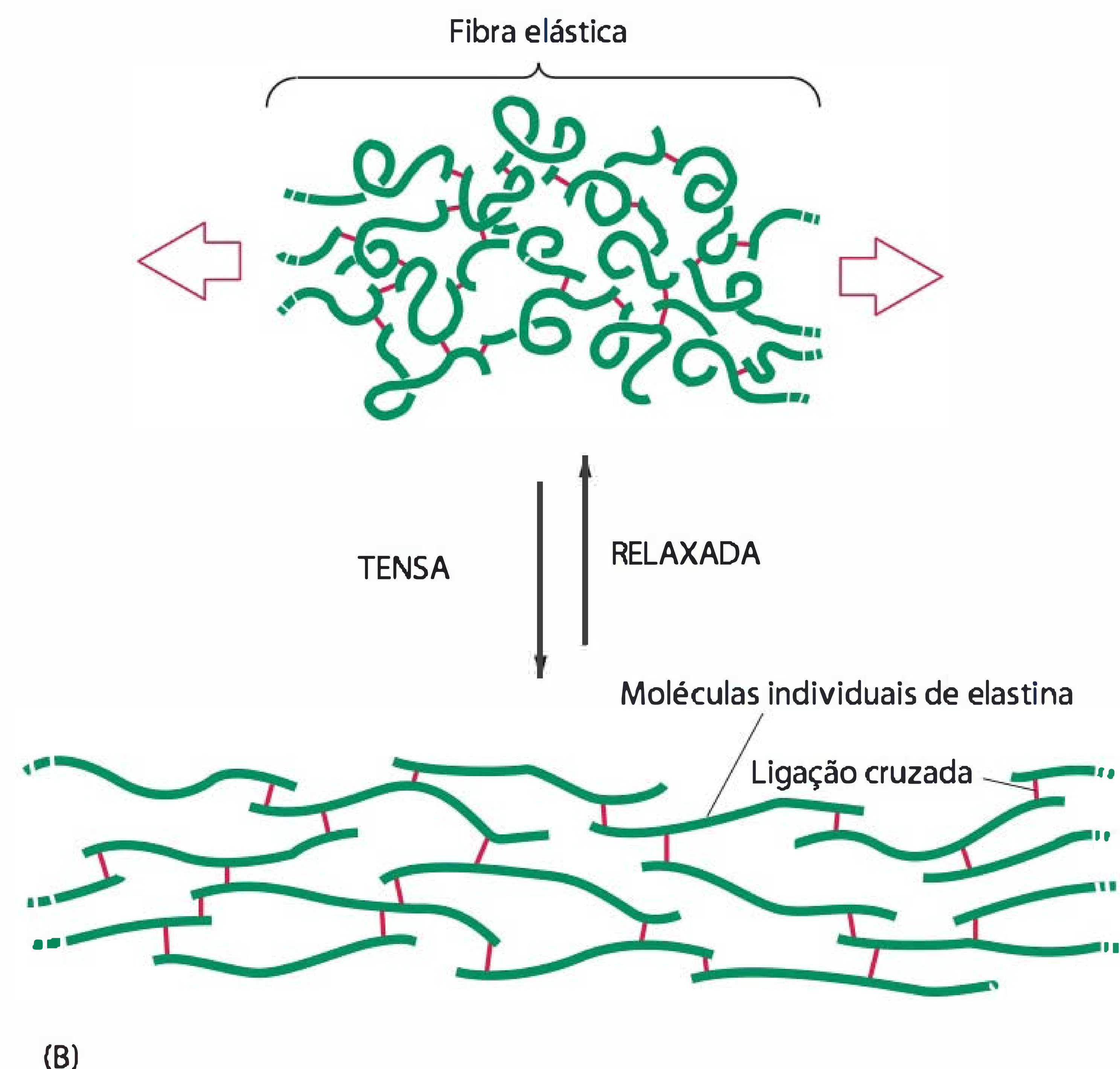


Figura 3-27 Colágeno e elastina. (A) O colágeno é uma tripla hélice formada por três cadeias estendidas que se enrolam umas nas outras (*parte inferior*). Muitas das moléculas em forma de bastão do colágeno fazem ligações cruzadas no espaço extracelular, para formar fibrilas inextensíveis (*acima*), com a força tênsil do aço. O padrão de listras na fibrila de colágeno é causado pelo arranjo regular repetido das moléculas de colágeno dentro da fibrila. (B) As cadeias polipeptídicas da elastina apresentam ligações cruzadas entre si de modo a formar fibras de elastina, semelhantes à borracha. Cada molécula de elastina desenovela-se para uma conformação mais distendida quando a fibra é tracionada e retorna a sua forma enovelada espontaneamente tão logo a força de tração seja relaxada.

e não-estruturadas apresentam ligações covalentes cruzadas, produzindo uma rede elástica como borracha, que pode ser espichada de forma reversível de uma conformação à outra, conforme ilustrado na Figura 3-27B. As fibras elásticas formadas pela elastina permitem que a pele e outros tecidos, como as artérias e os pulmões, sejam expandidos e retraídos sem se romper.

Regiões intrinsecamente não-estruturadas das proteínas são bastante frequentes na natureza, apresentando funções importantes no interior das células. Conforme já vimos, as proteínas utilizam pequenas voltas da cadeia polipeptídica que geralmente se projetam da porção central para se ligar a outras moléculas. De forma similar, muitas proteínas apresentam longas regiões de sequências de aminoácidos não-estruturadas, que interagem com outras moléculas (frequentemente DNA ou uma proteína), e sofrem uma transição estrutural para uma conformação enovelada específica quando a outra molécula está ligada. Outras proteínas lembram a elastina, pois suas funções requerem que elas se mantenham não-estruturadas. Por exemplo, as numerosas nucleoporinas que revestem a superfície interna do complexo do poro nuclear formam uma rede de enovelamento aleatório que está intimamente envolvida no transporte nuclear (ver Figura 12-10). Por fim, como será discutido adiante neste capítulo (ver Figura 3-80C), regiões não-estruturadas da cadeia polipeptídica geralmente são utilizadas para conectar os sítios de ligação de enzimas que atuam juntas na catálise de uma reação biológica. Por exemplo, na facilitação da sinalização celular, grandes *proteínas de sustentação*, ou *organizadoras*, utilizam essas regiões flexíveis como "amarras" que concentram conjuntos de proteínas que interagem entre si, frequentemente as confinando a locais específicos da célula (discutido no Capítulo 15).

Podemos reconhecer as regiões não-estruturadas de muitas proteínas pela sua composição tendenciosa de aminoácidos: elas contêm poucos dos grandes aminoácidos hidrofóbicos que compõem o núcleo de uma proteína enovelada, sendo compostas por uma alta proporção de aminoácidos Gln, Ser, Pro, Glu e Lis. Essas regiões "naturalmente não-enoveladas" com frequência também contêm repetições de aminoácidos.

Ligações cruzadas covalentes frequentemente estabilizam proteínas extracelulares

Muitas moléculas de proteínas estão presas na face externa da membrana plasmática da célula ou são secretadas como parte da matriz extracelular. Todas essas proteínas são diretamente expostas às condições extracelulares. Para ajudar a manter suas estruturas, as cadeias polipeptídicas dessas proteínas frequentemente são estabilizadas por ligações covalentes. Tais ligações podem ligar dois aminoácidos na mesma cadeia ou conectar diferentes cadeias polipeptídicas em uma proteína multimérica. As mais comuns dessas ligações em proteínas são as ligações covalentes enxofre-enxofre. Essas *ligações dissulfeto* (também chamadas de *ligações S-S*, ou *pontes dissulfeto*) formam-se enquanto as células preparam as proteínas recém-sintetizadas para exportação. Como descrito no Capítulo 12, sua formação é catalisada no retículo endoplasmático por uma enzima que liga dois grupos –SH de cadeias laterais de cisteínas adjacentes na proteína enovelada (**Figura 3-28**). As ligações dissulfeto não mudam a conformação de uma proteína, mas agem como "grampos" atômicos que reforçam sua

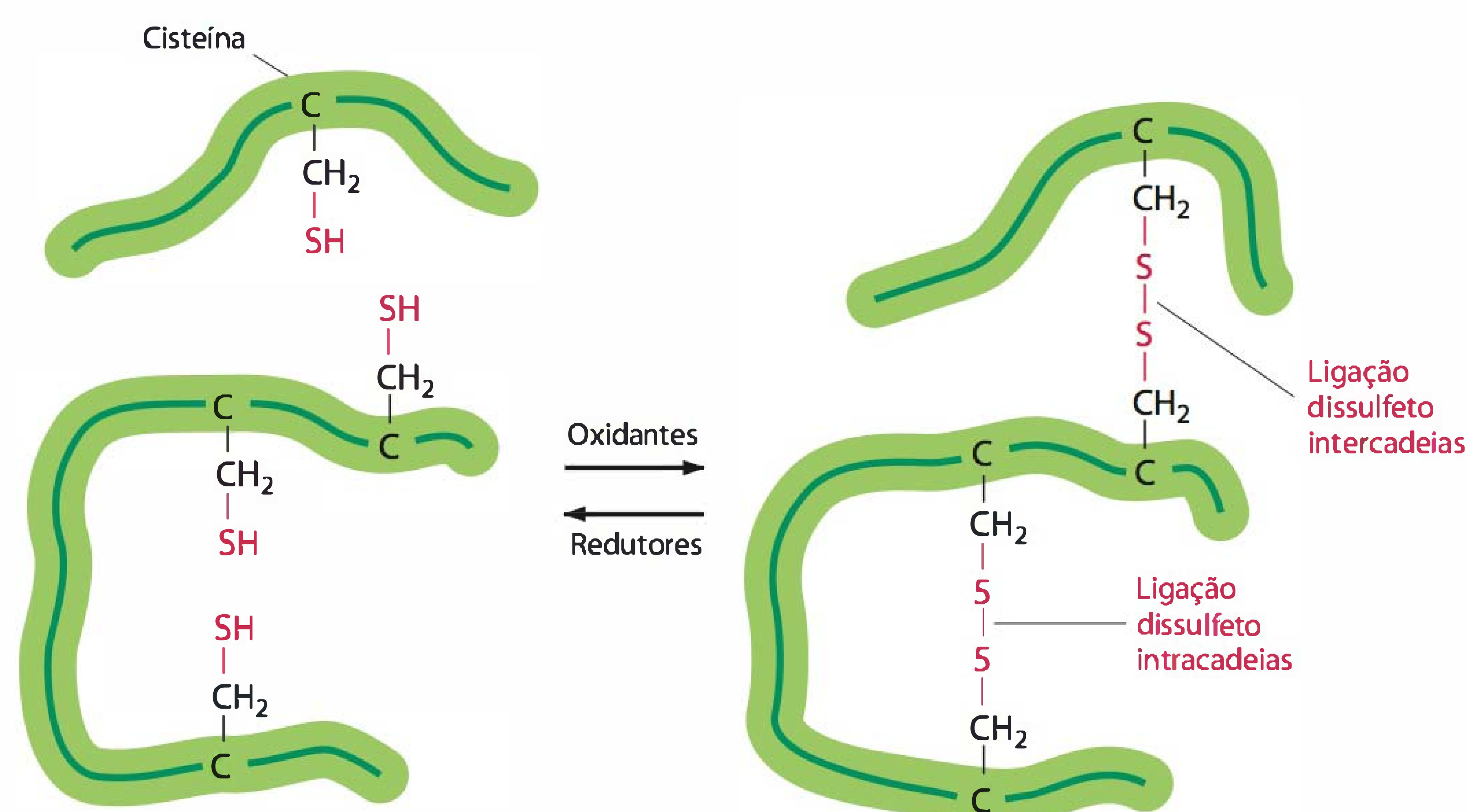


Figura 3-28 Ligações dissulfeto. Esse diagrama ilustra como ligações dissulfeto covalentes se formam entre cadeias laterais adjacentes de cisteínas. Como indicado, essas ligações cruzadas podem unir tanto duas partes da mesma cadeia polipeptídica como duas cadeias polipeptídicas diferentes. Uma vez que a energia requerida para romper uma ligação covalente é muito maior do que a energia requerida para romper todo um conjunto de ligações não-covalentes (ver Tabela 2-1, p. 53), uma ligação dissulfeto pode ter um efeito estabilizador maior em uma proteína.

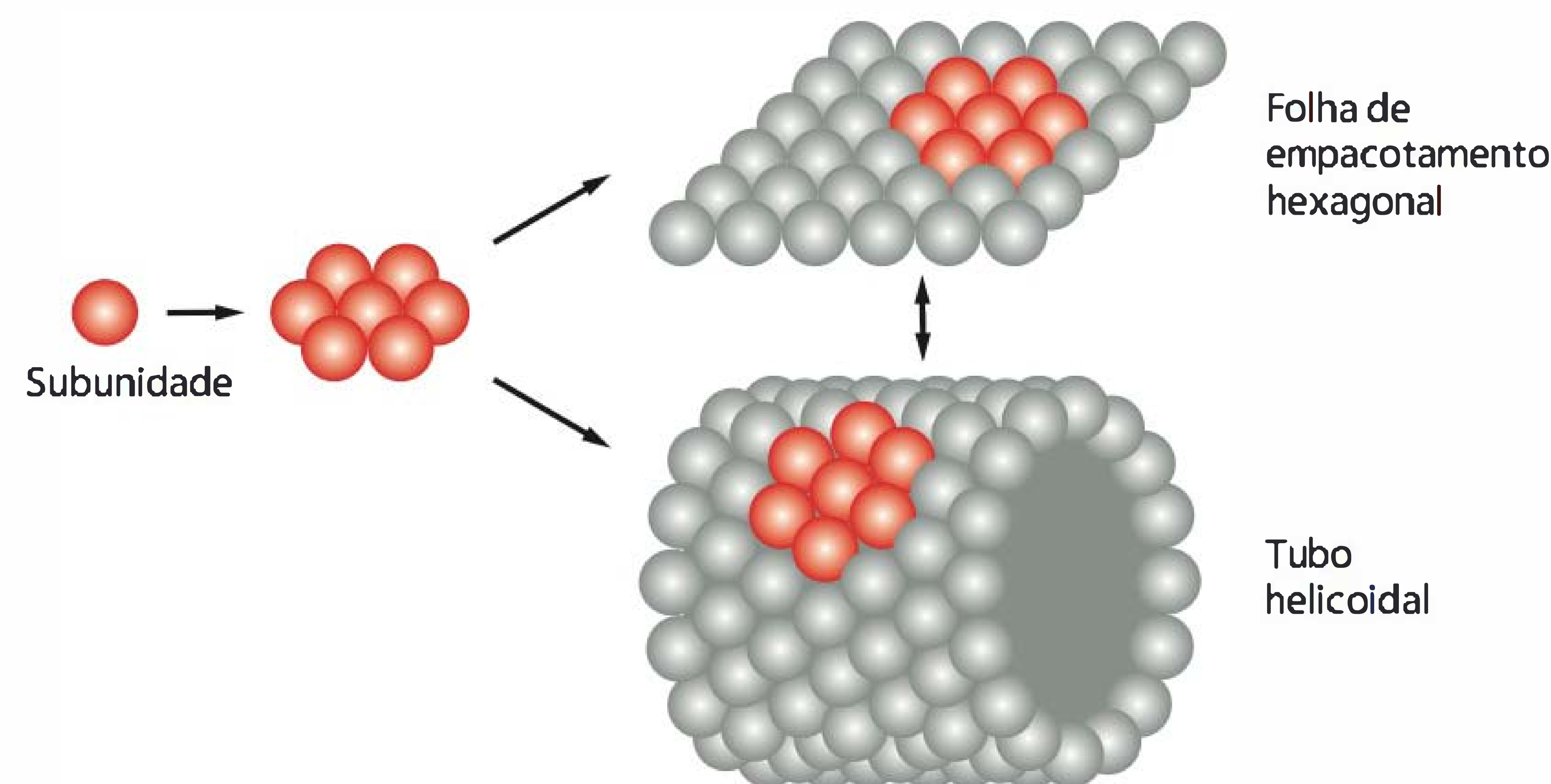


Figura 3-29 Exemplo da associação de uma única subunidade proteica que requer múltiplos contatos entre as proteínas. As subunidades de uma proteína globular compactada hexagonalmente podem formar tanto uma folha plana, ou lâmina, como um tubo.

conformação mais favorável. Por exemplo, a lisozima – uma enzima presente nas lágrimas que dissolve paredes celulares bacterianas – mantém a sua atividade antibacteriana por um longo tempo, por ser estabilizada por esse tipo de ligações.

As ligações dissulfeto geralmente não se formam no citoplasma das células, onde uma alta concentração de agentes redutores converte ligações S–S de volta a grupos –SH das cisteínas. Aparentemente, as proteínas não requerem esse tipo de reforço em um ambiente relativamente ameno, como o interior da célula.

Moléculas proteicas frequentemente servem como subunidades na formação de grandes estruturas

Os mesmos princípios que permitem que a molécula de proteína se associe consigo mesma para formar anéis ou filamentos funcionam para gerar estruturas maiores na célula – estruturas supramoleculares, como os complexos enzimáticos, os ribossomos, os filamentos proteicos, os vírus e as membranas. Esses grandes objetos não são formados por moléculas gigantes únicas, covalentemente ligadas. Ao contrário, são formados por associação não-covalente de muitas moléculas produzidas separadamente, que servem como subunidades da estrutura final.

O uso de pequenas subunidades para formar grandes estruturas oferece várias vantagens:

1. Uma grande estrutura construída com uma ou algumas subunidades menores repetidas requer somente uma pequena quantidade de informação genética.
2. Tanto a associação quanto a dissociação podem ser facilmente controladas como processos reversíveis, pois as subunidades se associam por meio de múltiplas ligações de energia relativamente baixa.
3. Os erros na síntese da proteína podem ser evitados mais facilmente, já que os mecanismos de correção podem operar durante o curso da montagem, para excluir subunidades malformadas.

Algumas subunidades proteicas são montadas em folhas planas, nas quais as subunidades são arranjadas em padrões hexagonais. As proteínas de membrana especializadas algumas vezes são arranjadas desse modo em bicamadas lipídicas. Com uma leve mudança na geometria das subunidades individuais, uma folha hexagonal pode ser convertida em um tubo (**Figura 3-29**) ou, com mudanças adicionais, em uma esfera oca. Os tubos e as esferas proteicas que se ligam a moléculas específicas de RNA e de DNA no seu interior formam o revestimento dos vírus.

A formação de estruturas fechadas, como anéis, tubos ou esferas, provê uma estabilidade adicional devido ao aumento do número de ligações entre as subunidades proteicas. Além disso, como a estrutura é criada por interações cooperativas mutuamente dependentes entre as subunidades, uma alteração relativamente pequena que afete cada subunidade individualmente pode levar à montagem ou desmontagem da estrutura. Esses princípios são ilustrados na camada proteica, ou *capsídeo*, de muitos vírus simples, os quais tomam a forma de uma esfera oca com base em um icosaedro (**Figura 3-30**). Os capsídeos frequentemente são formados por centenas de subunidades proteicas idênticas que envolvem e protegem o ácido nucleico viral (**Figura 3-31**). A proteína nesse capsídeo deve ter uma estrutura particularmente adaptável: deve não somente fazer vários tipos diferentes de contatos para criar a esfera, como também mudar seu arranjo para liberar o ácido nucleico para iniciar a replicação viral depois que o vírus tenha entrado em uma célula.

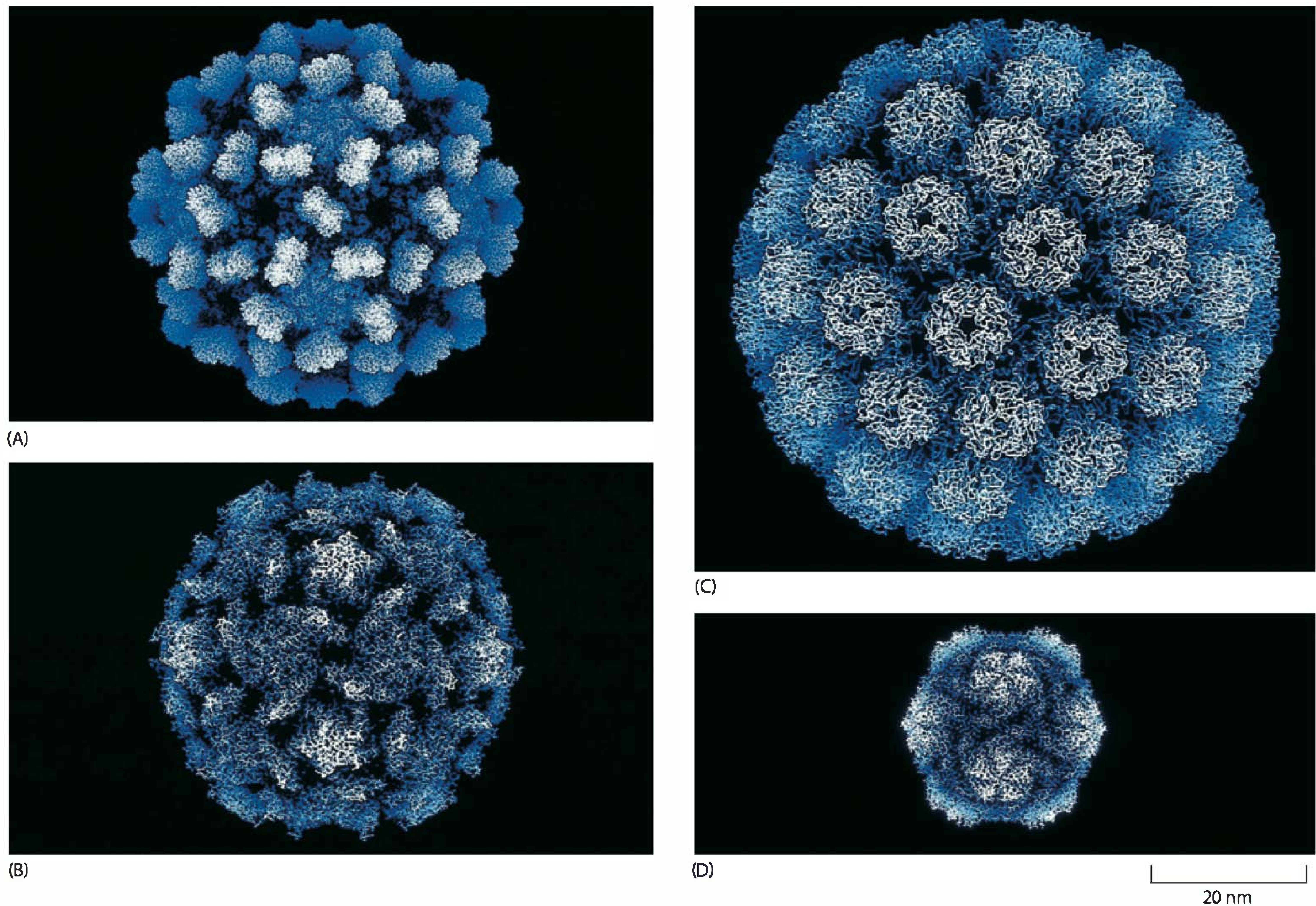


Figura 3-30 Capsídeos de alguns vírus, todos mostrados na mesma escala. (A) Vírus que impede o crescimento de tomateiros (*bushy stunt*); (B) poliovírus; (C) vírus símio 40 (SV40, *simian vírus 40*); (D) vírus satélite necrosante do tabaco. As estruturas de todos esses capsídeos foram determinadas por cristalografia por difração de raios X e são conhecidas em seus detalhes atômicos. (Cortesia de Robert Grant, Stephan Crainic e James M. Hogle.)

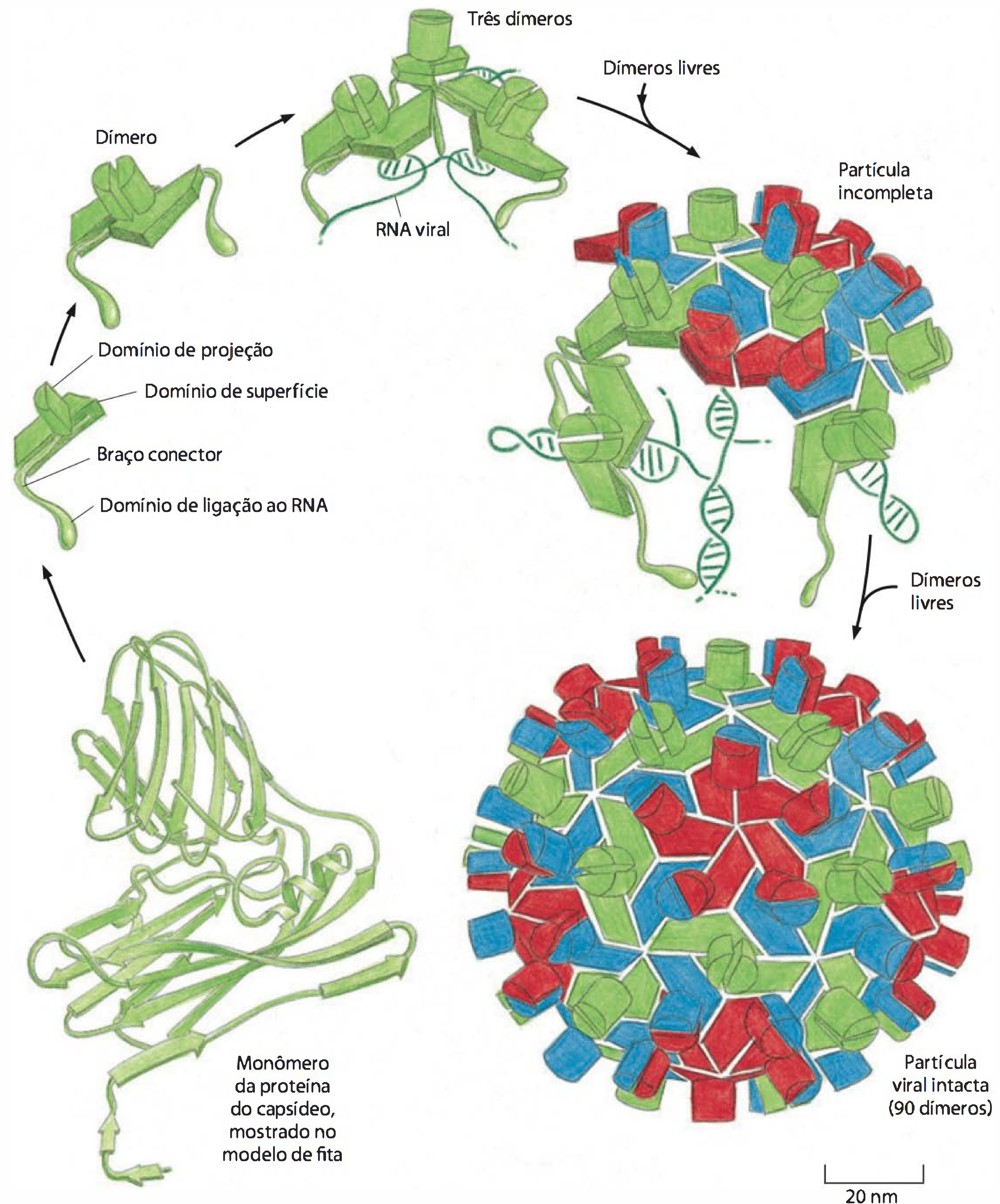
Muitas estruturas nas células são capazes de autoassociação

A informação para formar muitos dos conjuntos complexos de macromoléculas das células deve estar contida nas próprias subunidades, pois as subunidades purificadas podem associar-se espontaneamente na estrutura final, sob condições apropriadas. O primeiro grande agregado macromolecular que mostrou ser capaz de autoassociar-se a partir das suas partes constituintes foi o ***vírus do mosaico do tabaco*** (*TMV, Tobacco Mosaic Vírus*). Esse vírus é um longo bastonete, no qual um cilindro de proteína é arranjado em torno do centro helicoidal de RNA (**Figura 3-32**). Se o RNA dissociado e as subunidades proteicas são misturados em solução, eles se reassociam para formar partículas de vírus completamente ativas. O processo de associação é bastante complexo e inclui a formação de anéis duplos de proteínas, os quais servem como intermediários que se adicionam ao invólucro viral em crescimento.

Outro agregado macromolecular complexo que pode se reassociar a partir de seus componentes é o ribossomo bacteriano. Essa estrutura é composta por cerca de 55 moléculas de proteínas diferentes e 3 moléculas diferentes de RNA ribossomal (rRNA). Incubando os componentes individuais, sob condições apropriadas, em um tubo de ensaio, eles reconstroem espontaneamente a estrutura original. Mais importante, tais reconstituições ribossomais são capazes de realizar a síntese de proteínas. Como esperado, a reassociação de ribossomos segue uma trajetória específica: após certas proteínas terem se ligado ao RNA, esse complexo é reconhecido por outras proteínas, e assim por diante, até a estrutura estar completa.

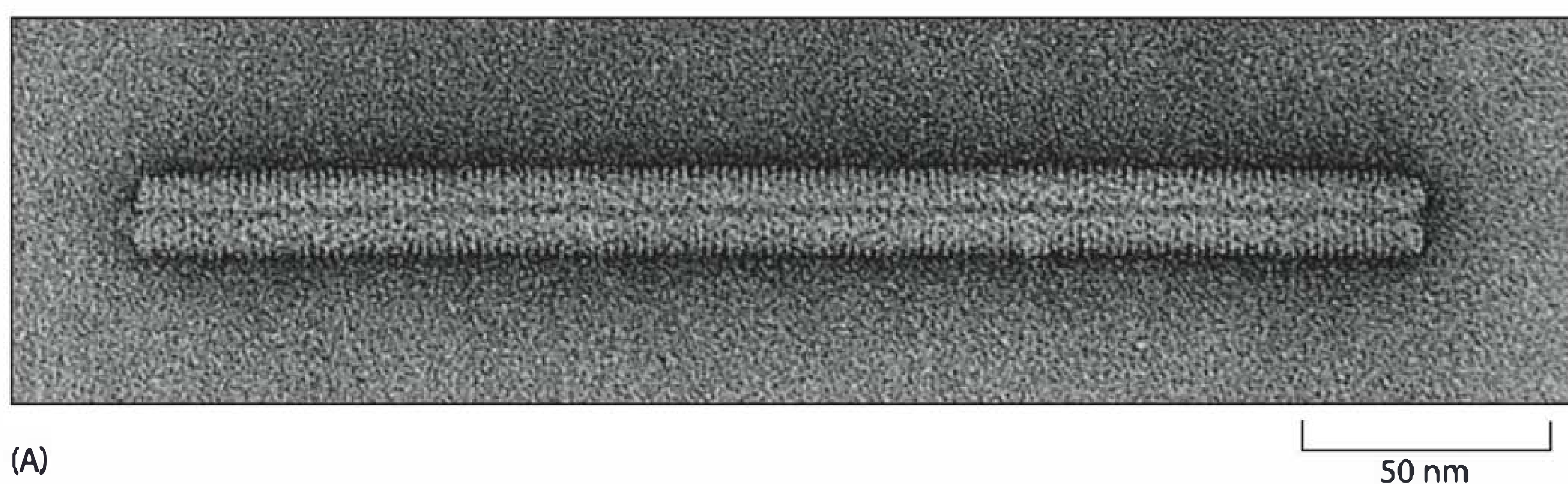
Ainda não está claro como alguns processos de autoassociação mais elaborados são regulados. Muitas estruturas na célula, por exemplo, parecem ter um comprimento precisamente definido, que muitas vezes é maior do que os seus componentes macromolecu-

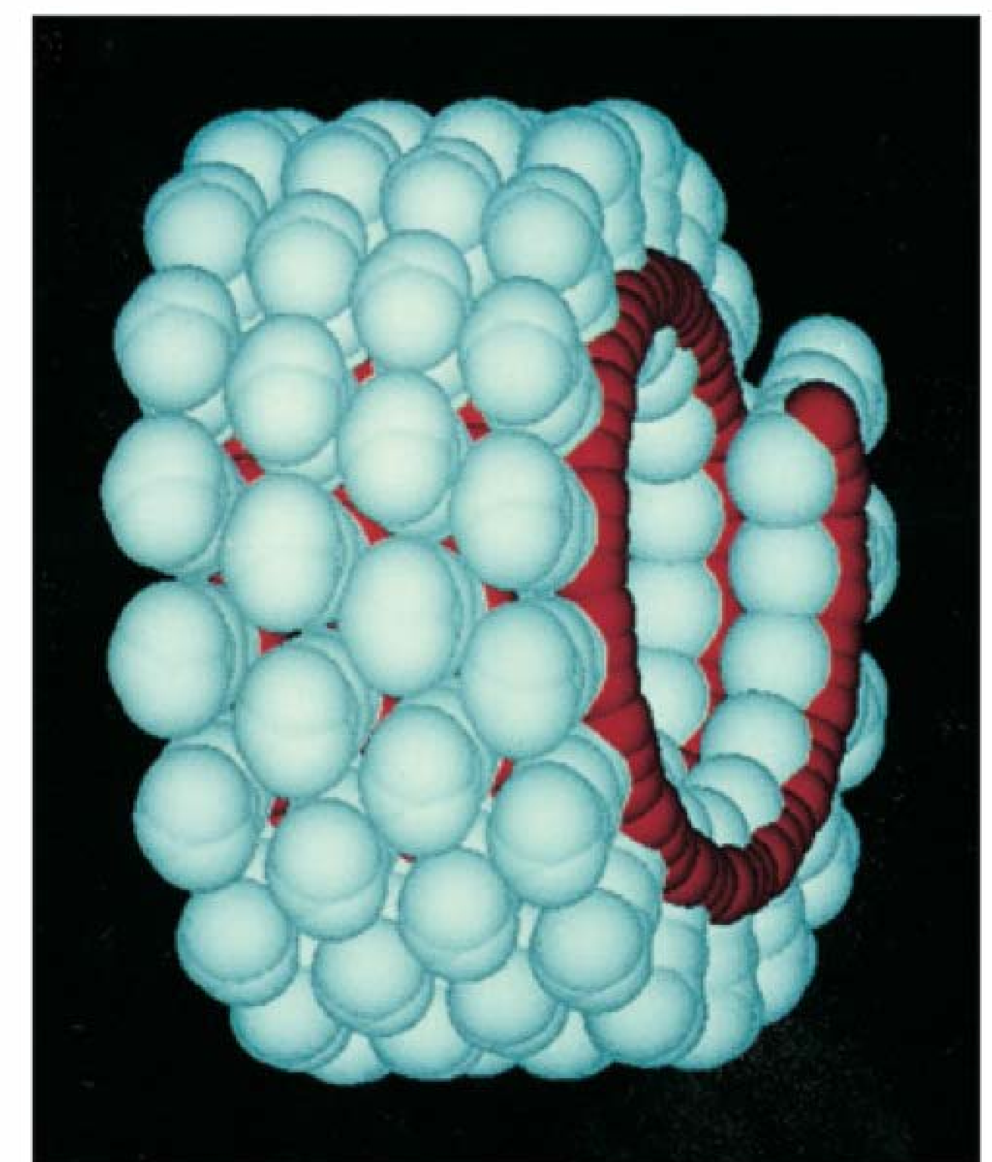
Figura 3-31 Estrutura de um vírus esférico. Em muitos vírus, as subunidades proteicas idênticas se juntam para criar uma cápsula esférica (um capsídeo) que envolve o genoma viral, composto de RNA ou DNA (ver também Figura 3-30). Por razões geométricas, não mais do que 60 subunidades idênticas podem se juntar de forma precisamente simétrica. Se pequenas irregularidades são permitidas, no entanto, mais subunidades podem ser usadas para produzir um grande capsídeo que mantém a simetria icosaédrica. O vírus *bushy stunt* do tomate (TBSV, *tomato bushy stant virus*) mostrado aqui, por exemplo, é um vírus esférico com cerca de 33 nm de diâmetro, formado por 180 cópias idênticas de uma proteína de capsídeo com 386 aminoácidos, mais o genoma de RNA de 4.500 nucleotídeos. Para formar um capsídeo tão grande, a proteína deve ser capaz de se encaixar em três meios diferentes, cada um representado em uma cor na partícula viral mostrada aqui. A via de formação é mostrada; a estrutura tridimensional precisa foi determinada por difração de raios X. (Cortesia de Steve Harrison.)



lares. Como é obtida a determinação de tal comprimento é, em muitos casos, um mistério. Três mecanismos possíveis são ilustrados na **Figura 3-33**. No caso mais simples, uma longa proteína central, ou outra macromolécula, fornece o suporte que determina o comprimento

Figura 3-32 Estrutura do vírus do mosaico do tabaco (TMV). (A) Uma micrografia eletrônica de uma partícula viral, que consistem em uma única molécula longa de RNA, envolvida por um invólucro proteico cilíndrico, composto por subunidades proteicas idênticas. (B) Modelo mostrando parte da estrutura do TMV. Uma molécula de RNA de fita simples de 6.395 nucleotídeos é empacotada em um invólucro helicoidal de 2.130 cópias de uma proteína de invólucro com 158 aminoácidos. As partículas infecciosas de vírus podem se autoassociar em um tubo de ensaio a partir do RNA e das moléculas proteicas purificadas. (A, cortesia de Robley Williams; B. cortesia de Richard J. Feldmann.)





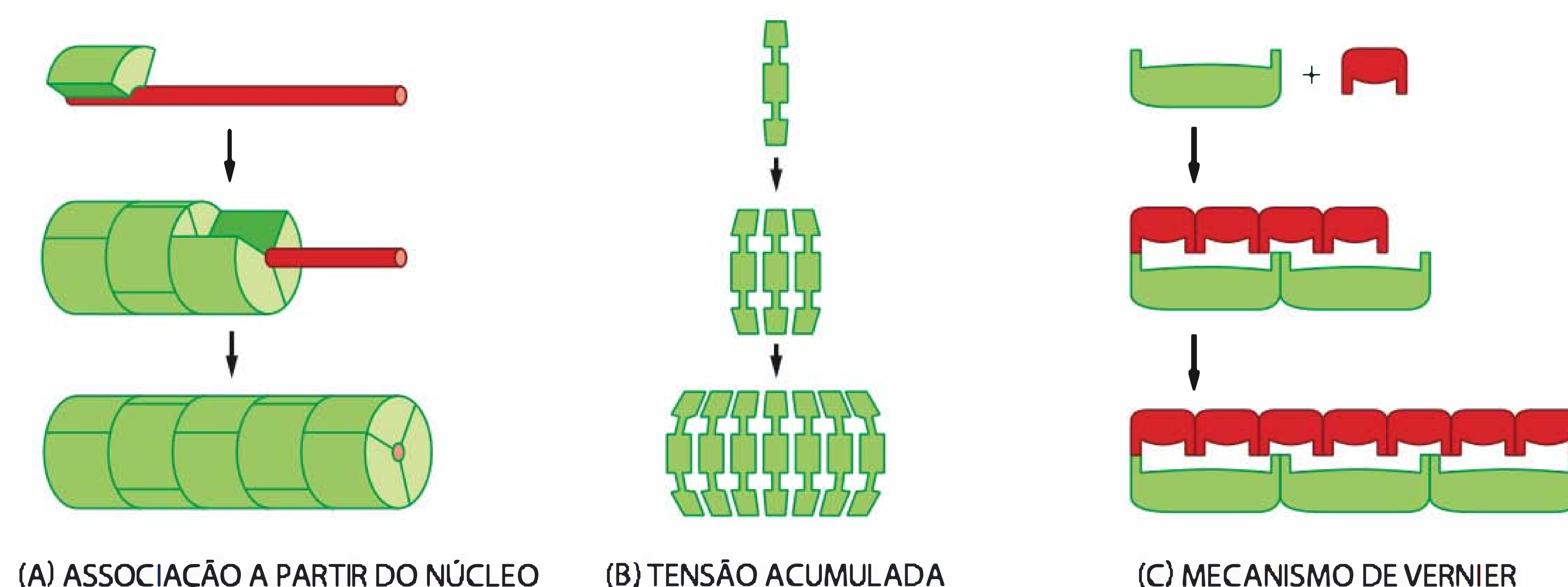


Figura 3-33 Três maneiras de determinação do comprimento de grandes conjuntos proteicos. (A) Coassociação ao longo de uma cadeia proteica central alongada ou outra macromolécula que age como um esquema de medidas. (B) Terminação da associação pela tensão que se acumula na estrutura polimérica, quando mais subunidades são adicionadas, de forma que além de um certo comprimento a energia requerida para o encaixe de outra subunidade na cadeia torna-se excessivamente grande. (C) Um tipo de associação de Vernier, no qual dois conjuntos de moléculas cilíndricas, de comprimentos diferentes, formam um complexo que cresce até que suas terminações se encaixem perfeitamente. O nome deriva de um mecanismo de medida com base no mesmo princípio, utilizado nos instrumentos mecânicos.

da associação final. Esse é o mecanismo que determina o comprimento da partícula de TMV, em que a cadeia de RNA fornece o suporte. De forma similar, uma proteína central é responsável pela determinação do comprimento dos filamentos finos no músculo, bem como o comprimento das longas caudas de alguns vírus bacterianos (**Figura 3-34**).

Fatores de associação frequentemente auxiliam na formação de estruturas biológicas complexas

Nem todas as estruturas celulares que se mantêm unidas por ligações não-covalentes são capazes de auto-associação. Uma mitocôndria, um cílio ou uma miofibrila de uma célula muscular, por exemplo, não podem se formar espontaneamente a partir de uma solução de suas macromoléculas componentes. Nesses casos, parte da informação de associação é fornecida por enzimas especiais e por outras proteínas que desempenham a função de moldes, orientando a construção, mas não tomando parte na estrutura final.

Até mesmo estruturas relativamente simples podem não apresentar alguns dos ingredientes necessários para sua própria associação. Na formação de certos vírus bacterianos, por exemplo, a cabeça, que é composta de muitas cópias de uma única subunidade proteica, é montada em um suporte temporário composto de uma segunda proteína. Pelo fato de a segunda proteína estar ausente da partícula final do vírus, a estrutura da cabeça, uma vez dissociada, não pode associar-se espontaneamente. Outros exemplos são conhecidos em que a clivagem proteolítica é uma etapa essencial e irreversível no processo de associação normal. É o caso de algumas pequenas associações de proteínas, incluindo a proteína estrutural de colágeno e do hormônio insulina (**Figura 3-35**). A partir desses exemplos relativamente simples, parece muito provável que estruturas complexas, como uma mitocôndria ou um cílio, envolvam a organização temporal e espacial compartilhada por outros numerosos componentes celulares.

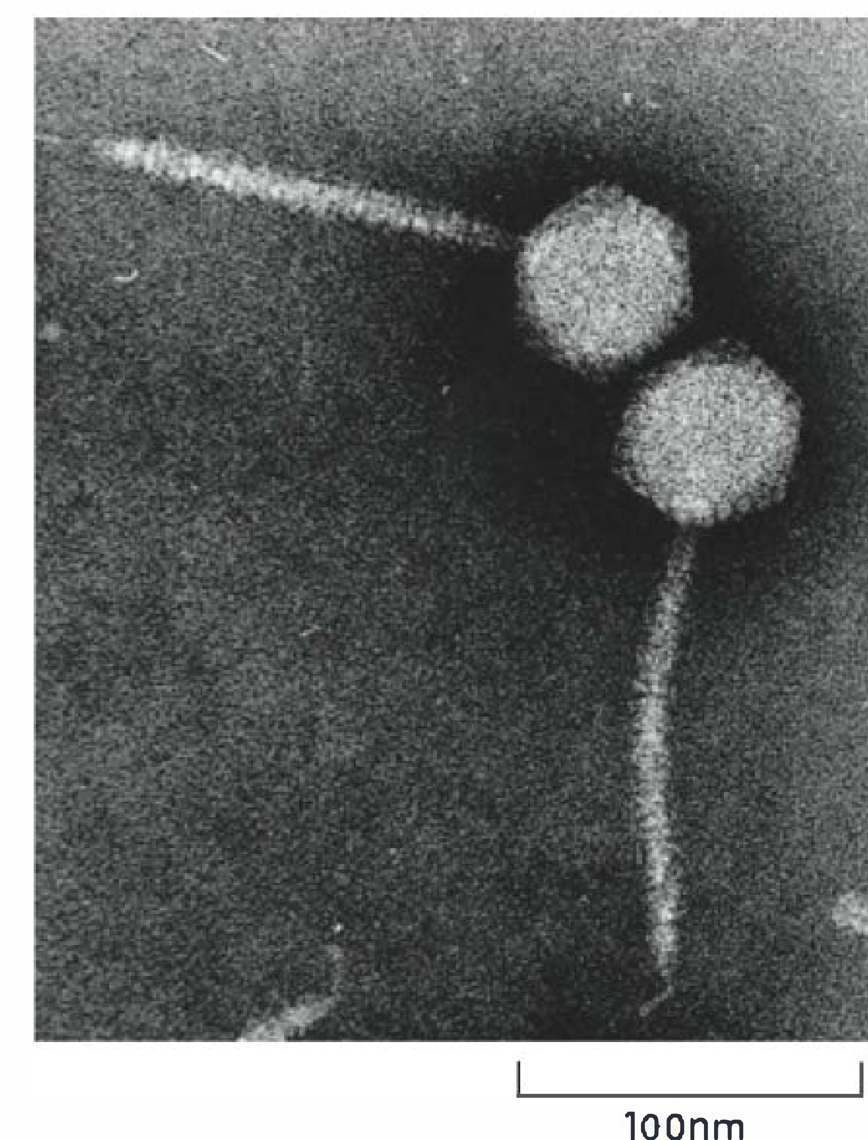


Figura 3-34 Micrografia eletrônica do bacteriófago lambda. A ponta da cauda do vírus se fixa a proteínas específicas da superfície de uma célula bacteriana, seguido pela injeção do DNA empacotado no capsídeo para dentro da célula, através da cauda. A cauda tem um comprimento preciso, determinado pelo mecanismo mostrado na Figura 3-33A.

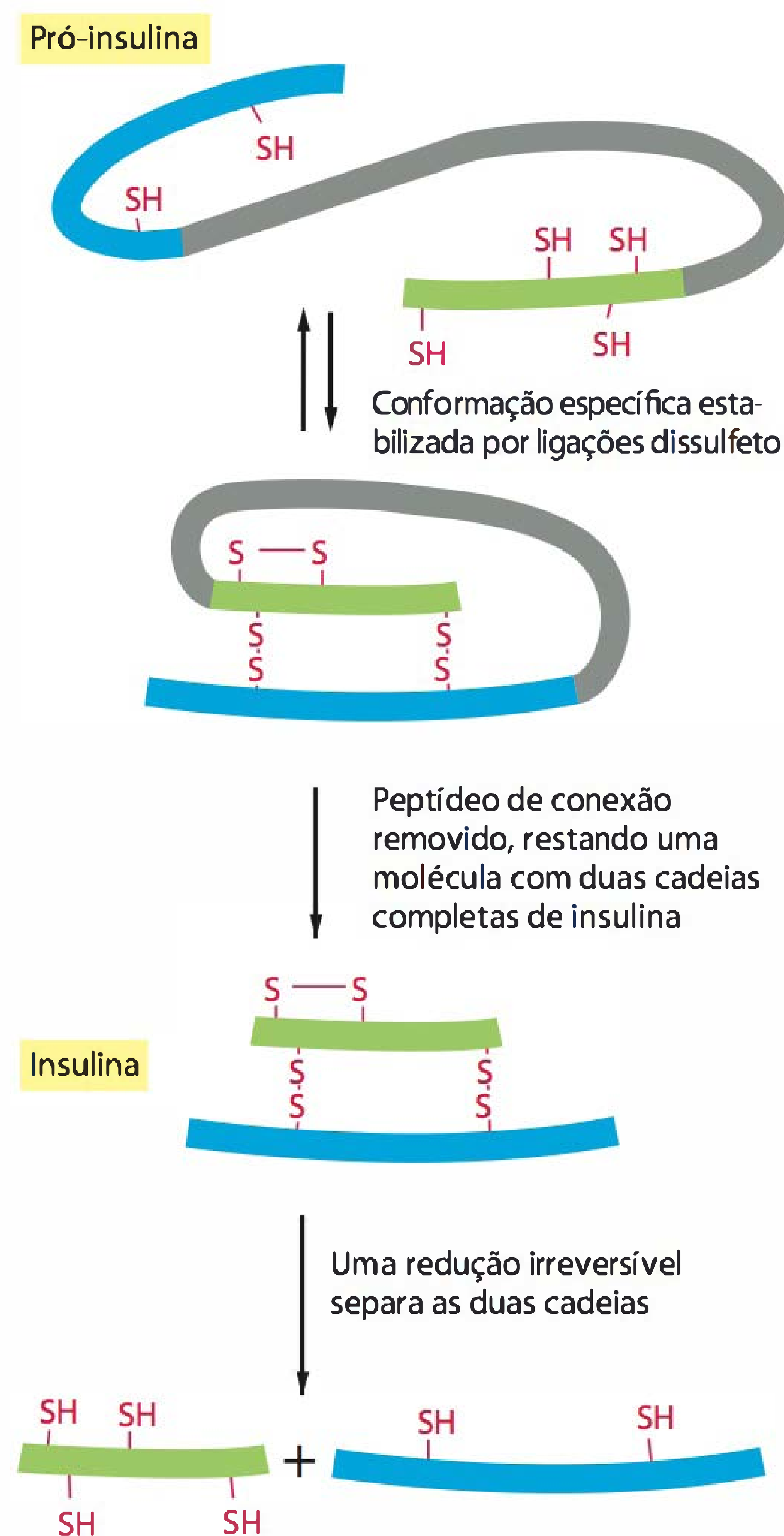


Figura 3-35 Clivagem proteolítica na associação da insulina. O hormônio polipeptídico insulina não pode se formar novamente de maneira espontânea e eficaz se suas ligações dissulfeto forem destruídas. Ele é sintetizado como uma grande proteína (*pró-insulina*), que é clivada por uma proteína proteolítica, após a cadeia proteica ter se enovelado em uma conformação específica. A remoção de parte da cadeia polipeptídica da pró-insulina retira algumas das informações necessárias para que a proteína se enovele espontaneamente em sua conformação normal. Uma vez que a insulina tenha sido desnaturada e suas duas cadeias polipeptídicas sejam separadas, a sua habilidade de associação é perdida.

Resumo

A sequência de aminoácidos de uma proteína define a sua conformação tridimensional. Interações não-covalentes entre partes distintas da cadeia polipeptídica estabilizam a estrutura enovelada. Os aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas tendem a se agrupar no interior da molécula, e as ligações de hidrogênio locais entre ligações peptídicas vizinhas originam hélices α e folhas β.

As regiões globulares, conhecidas como domínios, são as unidades modulares a partir das quais muitas proteínas são construídas; tais domínios geralmente contêm de 40 a 350 aminoácidos. As proteínas pequenas tipicamente contêm somente um domínio, enquanto grandes proteínas são formadas por vários domínios ligados uns aos outros por segmentos de cadeia polipeptídica de extensão variada, alguns relativamente desordenados. Conforme as proteínas evoluíram, os domínios foram modificados e combinados com outros domínios para construir novas proteínas. Até o presente momento, cerca de 800 formas diferentes de enovelamento de um domínio já foram observadas, entre as mais de 20.000 estruturas já conhecidas de proteínas.

As proteínas são unidas em grandes estruturas pelas mesmas forças não-covalentes que determinam seu enovelamento. As proteínas com sítios de ligação para as suas próprias superfícies podem associar-se em dímeros, em anéis fechados, em cápsulas esféricas ou em polímeros helicoidais. Embora misturas de proteínas e de ácidos nucleicos possam se associar espontaneamente em estruturas complexas no tubo de ensaio, muitos processos biológicos de associação envolvem etapas irreversíveis. Consequentemente, nem todas as estruturas na célula são capazes de se reconstruir espontaneamente depois de terem sido dissociadas em suas partes componentes.

FUNÇÃO PROTEICA

Temos observado que cada tipo de proteína consiste em uma sequência de aminoácidos precisa que permite o seu enovelamento em uma forma ou conformação tridimensional particular. Mas as proteínas não são rígidas. Elas podem ter partes móveis, cujos mecanismos de ação são acoplados a eventos químicos. Essa combinação de propriedades químicas e movimento é o que dá às proteínas a extraordinária capacidade de sustentar os processos dinâmicos das células vivas.

Nesta seção, explicaremos como as proteínas se ligam a outras moléculas selecionadas e como suas atividades dependem dessa ligação. Mostramos que a habilidade de uma molécula de se ligar a outras capacita as proteínas a agirem como catalisadoras, receptoras de sinais, ativadoras ou desativadoras, motoras ou minúsculas bombas. Os exemplos discutidos neste capítulo não esgotam as vastas propriedades funcionais das proteínas. Você encontrará as funções especializadas de muitas proteínas em outros trechos deste livro, com base em princípios similares.

Todas as proteínas ligam-se a outras moléculas

As propriedades biológicas de uma molécula proteica dependem de suas interações físicas com outras moléculas. Assim, os anticorpos ligam-se aos vírus ou às bactérias como um sinal para sua destruição; a enzima hexocinase liga-se à glicose e ao Tristosfato de Adenosina (ATP, *Adenosine Triphosphate*) para catalisar uma reação entre eles; as moléculas de actina, ligam-se umas às outras para formar um filamento de actina e assim por diante. Na verdade, todas as proteínas grudam-se, ou *ligam-se*, a outras moléculas. Em alguns casos, essa ligação é muito forte; em outros, ela é fraca e muito breve. No entanto, a ligação sempre apresenta alta *especificidade*, o que significa que cada molécula de proteína pode ligar apenas uma, ou umas poucas moléculas, entre os muitos milhares de diferentes tipos de moléculas que ela encontra. A substância que se liga a uma proteína – seja ela um íon, uma molécula pequena ou uma macromolécula – é chamada de **ligante** daquela proteína (da palavra em latim *ligare*, significando "ligar").

A habilidade de uma proteína de se ligar seletivamente e com alta afinidade a um ligante depende da formação de um conjunto de ligações fracas não-covalentes – ligações de hidrogênio, atrações eletrostáticas e de van der Waals – além das interações hidrofóbicas favoráveis (ver Painel 2-3, p. 110-111). Devido ao fato de cada ligação individual ser fraca, uma interação efetiva ocorre apenas quando muitas ligações fracas são formadas simultaneamente. Uma ligação somente é possível se a superfície de contorno da molécula do ligante se ajusta muito precisamente à proteína, encaixando-se nela como uma mão em uma luva (**Figura 3-36**).

A região de uma proteína que se associa com um ligante, conhecida como *sítio de ligação* do ligante, normalmente consiste em uma cavidade na superfície da proteína, formada por um arranjo particular de aminoácidos. Esses aminoácidos podem pertencer a regiões diferentes da cadeia polipeptídica que são aproximadas quando a proteína se enovela (**Figura 3-37**). Regiões separadas na superfície da proteína geralmente formam sítios de ligação para diferentes ligantes, permitindo que a atividade da proteína seja regulada, como veremos adiante. Outras partes da proteína podem servir como um mecanismo para posicionar a proteína em uma localização particular na célula – um exemplo é o domínio SH2 discutido anteriormente, que frequentemente desloca a proteína que o contém para locais intracelulares particulares, em resposta a sinais específicos.

Apesar de os átomos localizados no interior de uma proteína não terem contato direto com o ligante, eles formam a estrutura que fornece à superfície seu contorno e suas propriedades químicas mecânicas. Até mesmo pequenas mudanças nos aminoácidos no interior de uma molécula de proteína podem mudar sua forma tridimensional o bastante para destruir o seu sítio de ligação na superfície.

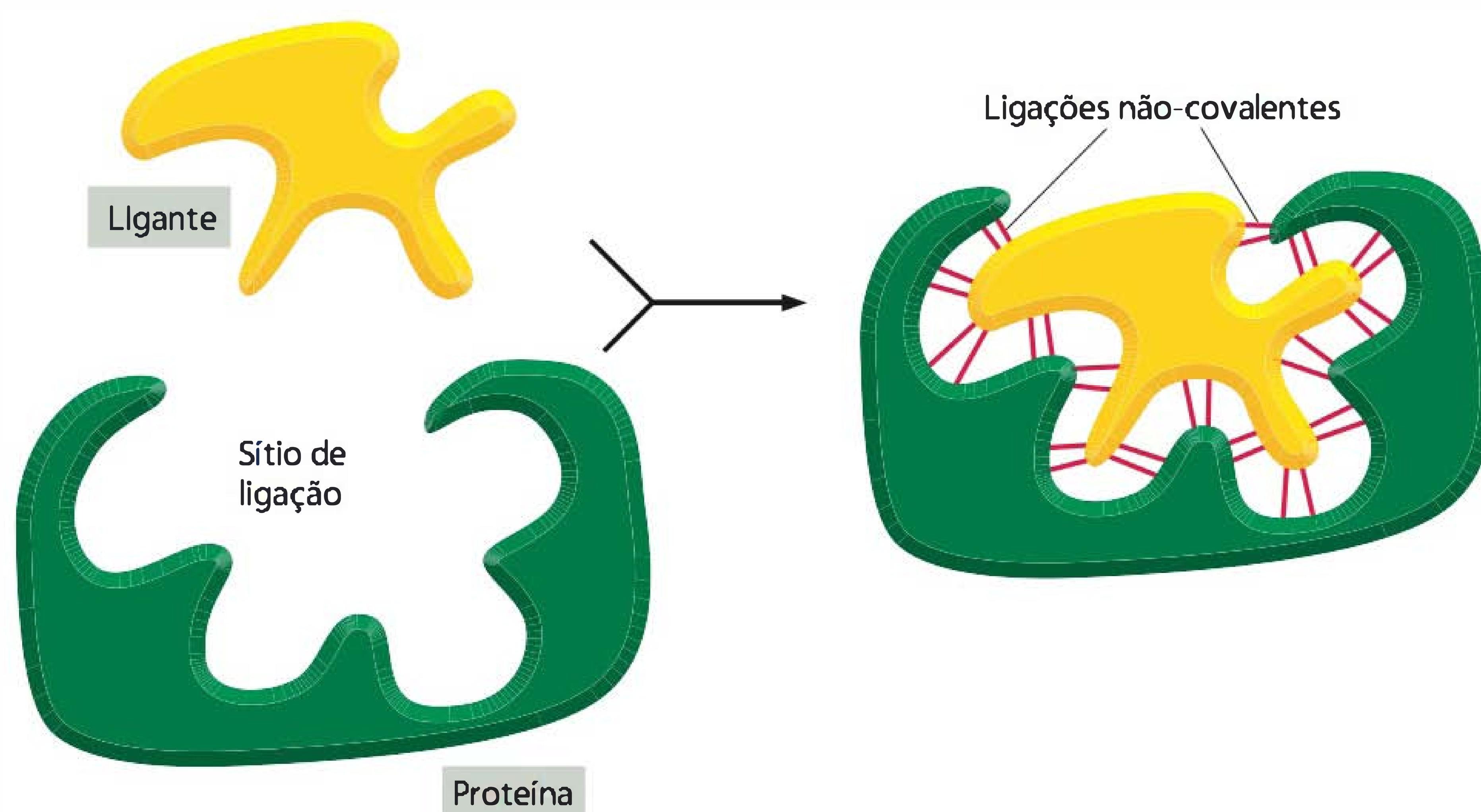


Figura 3-36 Ligação seletiva de uma proteína a uma outra molécula. Muitas ligações fracas são necessárias para possibilitar que uma proteína se ligue fortemente a uma segunda molécula, a qual é chamada de *ligante* da proteína. Um ligante deve, portanto, encaixar-se precisamente ao sítio de ligação da proteína, como uma mão em uma luva, de modo que um grande número de ligações não-covalentes se forme entre a proteína e o ligante.

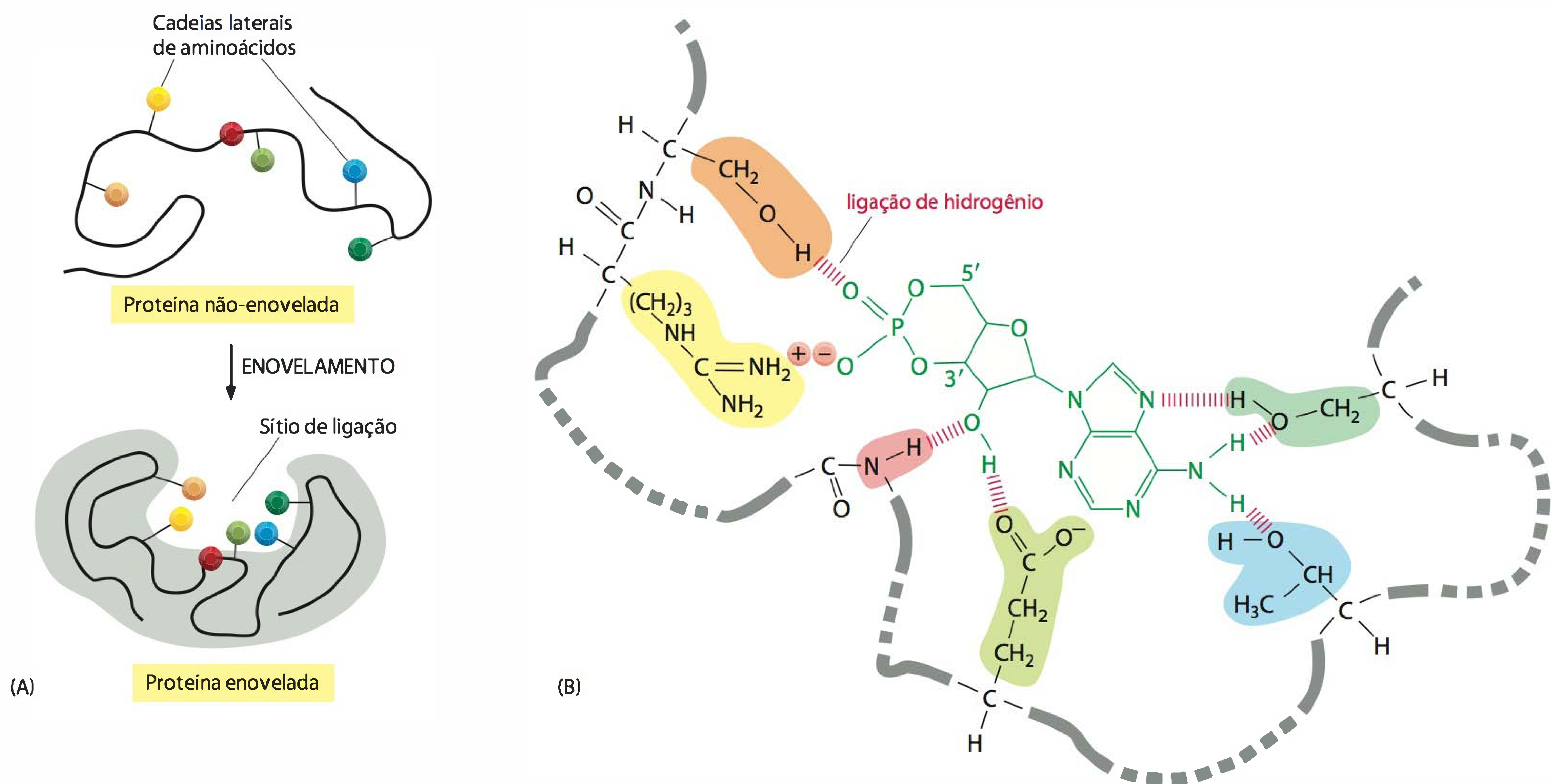


Figura 3-37 Sítio de ligação de uma proteína. (A) O enovelamento de uma cadeia polipeptídica tipicamente cria uma fenda, ou uma cavidade, na superfície da proteína. Essa fenda contém um conjunto de cadeias laterais de aminoácidos dispostas de tal maneira que possam fazer ligações não-covalentes somente com certos ligantes. (B) Uma visão detalhada de um sítio de ligação mostrando as ligações de hidrogênio e as interações iônicas formadas entre a proteína e o seu ligante. Nesse exemplo, o Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP, de *Cyclic AdenosineMonophosphate*) é o ligante.

A conformação da superfície de uma proteína determina a sua química

As proteínas têm capacidades químicas impressionantes devido aos grupos químicos vizinhos na sua superfície que frequentemente interagem de uma maneira que aumenta a reatividade química das cadeias laterais dos aminoácidos. Essas interações pertencem a duas categorias principais.

Primeiro, a interação de partes vizinhas da cadeia polipeptídica pode restringir o acesso de moléculas de água a um sítio de ligação de um ligante da proteína. Isso é importante pois as moléculas de água rapidamente formam ligações de hidrogênio, que podem competir com os ligantes pelos sítios na superfície da proteína. Proteínas e seus ligantes formam fortes ligações de hidrogênio (e interações eletrostáticas) apenas se a proteína puder excluir as moléculas de água do seu sítio de ligação. Pode ser difícil imaginar um mecanismo que exclua uma molécula tão pequena como a água da superfície de uma proteína sem afetar o acesso do ligante a ela. No entanto, pela forte tendência que as moléculas de água têm de formar ligações de hidrogênio entre si, elas estão presentes formando uma grande rede de ligações de hidrogênio (ver Painel 2-2, p. 108-109). Com efeito, a proteína pode manter um sítio de ligação de um ligante seco porque é energeticamente desfavorável para uma molécula de água individual se afastar dessa rede, condição necessária para que ela alcance uma fenda na superfície de uma proteína.

Segundo, o agrupamento de cadeias laterais de aminoácidos polares vizinhos pode alterar suas reatividades. Se um número de cadeias laterais carregadas negativamente é forçado contra suas repulsões mútuas pelo modo como as proteínas se enovelam, por exemplo, a afinidade do sítio por um íon carregado positivamente é bastante aumentada. Além disso, quando as cadeias laterais dos aminoácidos interagem umas com as outras por meio de ligações de hidrogênio, normalmente os grupos laterais não-reativos (como o $-CH_2OH$ na serina, mostrado na **Figura 3-38**) podem se tornar reativos, permitindo que sejam utilizados para formar ou romper ligações covalentes selecionadas.

A superfície de cada molécula de proteína tem, desse modo, uma única reatividade química, que depende não somente de quais cadeias laterais de aminoácidos estão expostas, mas também de suas orientações exatas em relação umas às outras. Por essa razão, mesmo

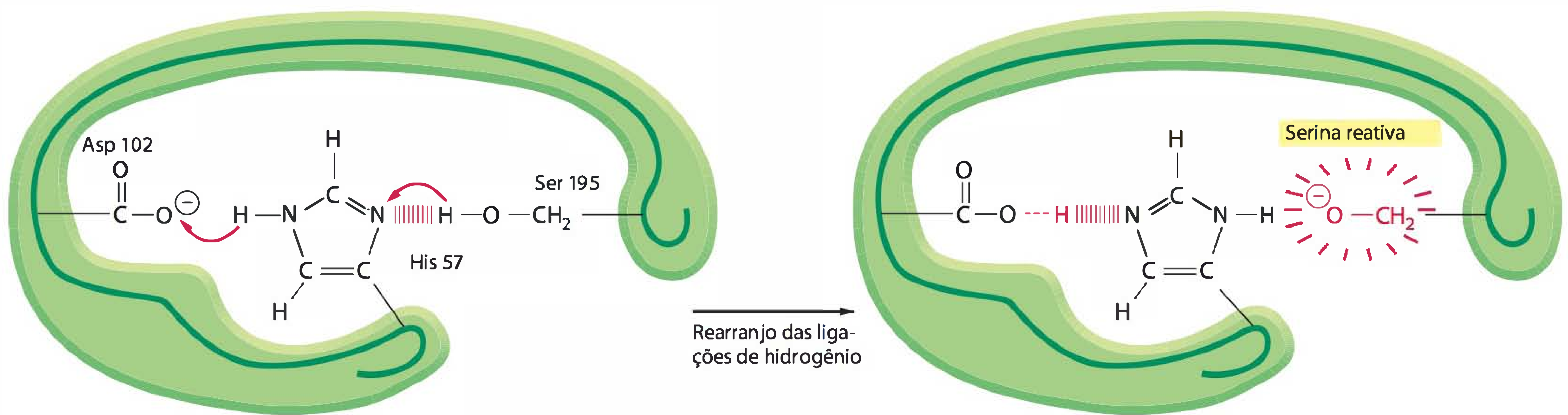


Figura 3-38 Aminoácido reativo incomum no sítio ativo de uma enzima. Esse exemplo é a "tríade catalítica" encontrada na quimotripsina, na elastase e em outras serina-proteases (ver Figura 3-12). A cadeia lateral do ácido aspártico (Asp 102) induz a histidina (His 57) a remover o próton da serina 195. Isso leva a serina a formar uma ligação covalente com o substrato da enzima, hidrolisando uma ligação peptídica. As diversas superfícies da cadeia polipeptídica foram omitidas aqui.

duas conformações apenas um pouco diferentes da mesma molécula de proteína podem diferir muito em sua química.

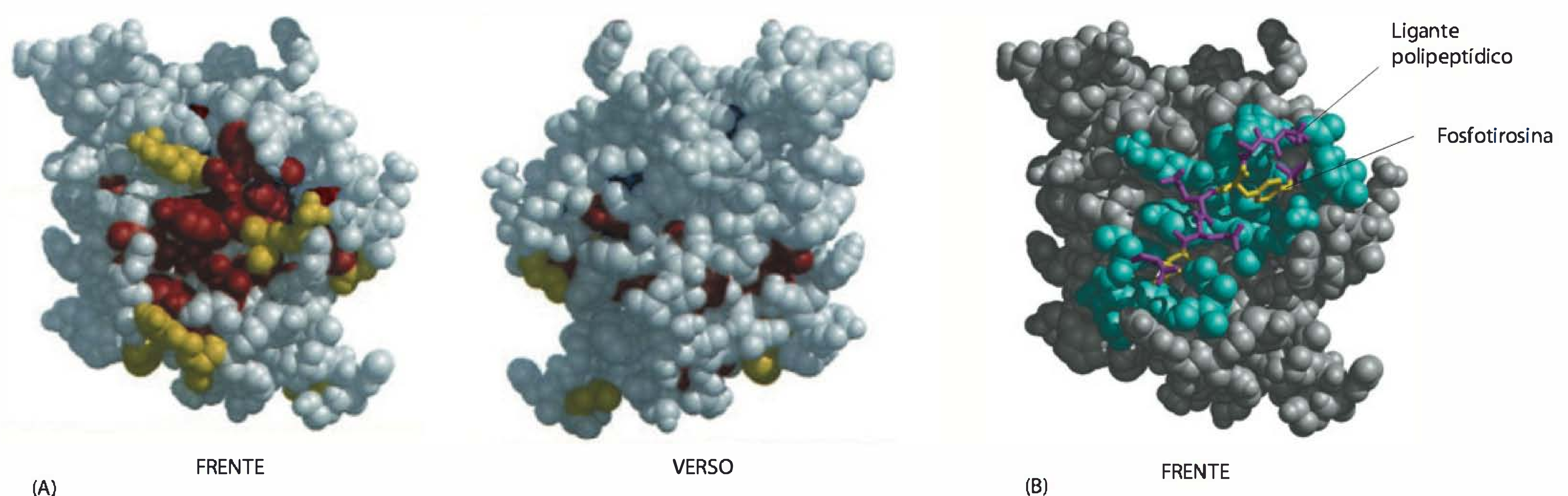
Comparações entre as sequências de proteínas pertencentes a uma mesma família destacam sítios de ligação a ligantes

Como descrito anteriormente, as sequências genômicas nos permitiram agrupar muitos dos domínios proteicos em famílias de proteínas que mostram evidências claras da sua evolução a partir de um ancestral comum. As estruturas tridimensionais dos membros de uma mesma família de domínios são notavelmente similares. Por exemplo, mesmo quando a identidade da sequência de aminoácido diminui para 25%, os átomos da cadeia principal em um domínio mantêm um enovelamento proteico comum a 0,2 nanômetro (2 Å) de diferença entre eles.

Podemos portanto, utilizar um método chamado de "traço evolutivo" para identificar aqueles sítios em um domínio de proteína que são mais cruciais para o funcionamento do domínio. Para tal finalidade, os aminoácidos que são inalterados, ou quase inalterados, em todos os membros conhecidos da família de proteínas são mapeados em um modelo estrutural da estrutura tridimensional de um membro da família. Quando isso é feito, as posições menos variáveis formam, normalmente, um ou mais agrupamentos na superfície da proteína, como ilustrado na **Figura 3-39**A para o domínio SH2, descrito anteriormente (ver Painel 3-2, p. 132-133). Esses arranjos geralmente correspondem aos sítios de ligação dos ligantes.

O domínio SH2 é um módulo que atua nas interações proteína-proteína. Ele liga a proteína que o contém a uma segunda proteína contendo uma cadeia lateral de tirosina fosforilada em um contexto específico de sequência de aminoácidos, como mostrado na Figura 3-39B. Os aminoácidos localizados no sítio de ligação para o polipeptídeo fosforilado sofreram as mudanças mais lentas durante o longo processo evolutivo que produziu a grande família SH2 de domínios de reconhecimento de peptídeos. Uma vez que a mutação é um processo aleatório, esse resultado é atribuído à eliminação preferencial, durante a evolução, de todos os organismos cujos domínios SH2 tornaram-se alterados de maneira a desativar o sítio de ligação do SH2, destruindo, assim, a função desse domínio.

Figura 3-39 Método do traço evolutivo aplicado ao domínio SH2. (A) Visualização frontal e sua visão do verso do modelo de preenchimento espacial do domínio SH2, com os aminoácidos evolutivamente conservados da superfície da proteína coloridos em *amarelo*, e os aminoácidos mais internos coloridos em *vermelho*. (B) A estrutura do domínio SH2, com seu substrato polipeptídico ligado. Aqui, aqueles aminoácidos localizados a 0,4 nm do ligante ligado estão coloridos em *azul*. Os dois principais aminoácidos do ligante estão em *amarelo*, e os demais estão em *roxo*. Note o alto grau de correspondência entre (A) e (B). (Adaptada de O. Lichtarge, H. R. Bourne e F. E. Cohen, *J. Mol. Biol.* 257:342-358, 1996. Com permissão de Elsevier.)



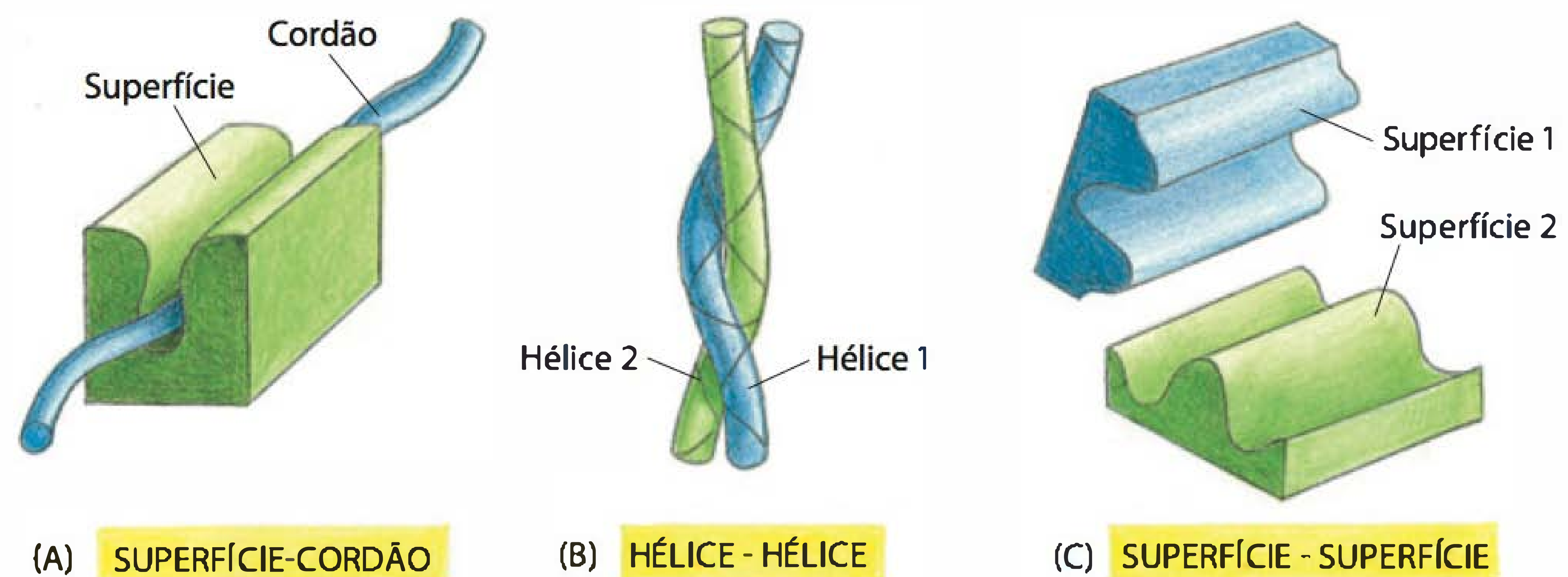


Figura 3-40 Três maneiras pelas quais duas proteínas podem se ligar uma à outra. Somente as regiões que interagem nas proteínas são mostradas. (A) Uma superfície rígida de uma proteína pode se ligar a uma alça estendida da cadeia polipeptídica ("cordão") de uma segunda proteína. (B) Duas hélices α podem se ligar para formar uma super-hélice. (C) Duas superfícies rígidas complementares frequentemente ligam duas proteínas.

Na era dos sequenciamentos extensivos de genomas, foram descobertas muitas novas famílias de proteínas cujas funções são desconhecidas. Uma vez que a estrutura tridimensional de um membro de uma dessas famílias tiver sido determinada, o método do traço evolutivo permitirá aos biólogos determinar os sítios de ligação para todos os membros da família, ajudando a decifrar a função da proteína.

Proteínas ligam-se umas às outras por meio de diversos tipos de interfaces

As proteínas podem se ligar a outras proteínas de pelo menos três maneiras. Em muitos casos, uma parte da superfície de uma proteína entra em contato com uma alça estendida (um "cordão") da cadeia polipeptídica de uma segunda proteína (**Figura 3-40**A). Tais interações supefície-cordão, por exemplo, permitem ao domínio SH2 reconhecer uma alça de polipeptídeo fosforilado em uma segunda proteína, como descrito anteriormente, ou capacitar uma proteína-cinase a reconhecer as proteínas que ela irá fosforilar (ver a seguir).

Um segundo tipo de interface proteína-proteína é formado quando duas hélices α, uma de cada proteína, pareiam-se para formar uma super-hélice (Figura 3-40B). Esse tipo de interface proteica é encontrado em muitas famílias de proteínas reguladoras de genes, como discutido no Capítulo 7.

A forma mais comum de as proteínas interagirem, contudo, dá-se pela combinação precisa de uma superfície rígida com outra (Figura 3-40C). Tais interações podem ser muito fortes, uma vez que um grande número de ligações fracas pode se formar entre duas superfícies afins. Pela mesma razão, as interações superfície-superfície podem ser extremamente específicas, capacitando uma proteína a selecionar apenas uma combinação dentre milhares de proteínas encontradas em uma célula.

Os sítios de ligação dos anticorpos são especialmente versáteis

Todas as proteínas precisam juntar-se a ligantes particulares para efetuar as suas várias funções. A família dos anticorpos é notável pela capacidade de formar ligações seletivas fortes (discutido em detalhes no Capítulo 25).

Os **anticorpos**, ou imunoglobulinas, são proteínas produzidas pelo sistema imunológico em resposta a moléculas estranhas, como aquelas presentes na superfície de micro-organismos invasores. Cada anticorpo liga-se a uma molécula-alvo particular de maneira extremamente forte, inativando a molécula-alvo diretamente ou marcando-a para ser destruída. Um anticorpo reconhece seu alvo (chamado de **antígeno**) com notável especificidade. Como possivelmente existam bilhões de diferentes antígenos que os humanos podem encontrar, temos que ser capazes de produzir bilhões de anticorpos diferentes.

Os anticorpos são moléculas em forma de "Y" com dois sítios de ligação idênticos, complementares a uma pequena porção da superfície da molécula de antígeno. Um exame detalhado do sítio de ligação de antígeno nos anticorpos revela que eles são formados por diversas alças de cadeias polipeptídicas que sobressaem das extremidades de um par de domínios proteicos justapostos (**Figura 3-41**). Diferentes anticorpos geram uma enorme diversidade de sítios de ligação de antígenos pela alteração apenas do comprimento e da sequência de aminoácidos nessas alças, sem alterar a estrutura proteica básica.

As alças desse tipo são ideais para "segurar" outras moléculas. Elas permitem que um grande número de grupos químicos envolva um ligante para que a proteína possa se ligar

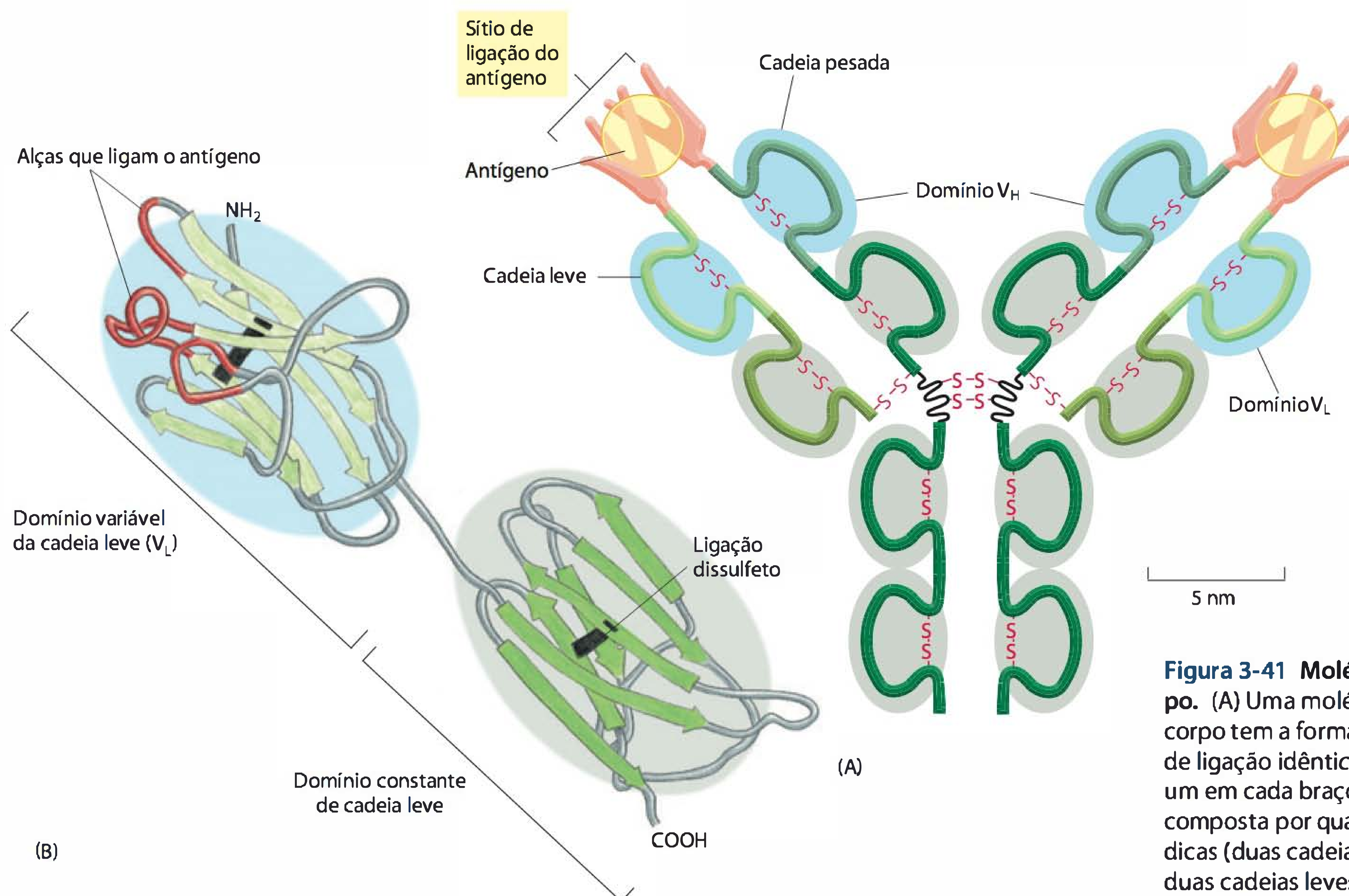


Figura 3-41 Molécula de anticorpo. (A) Uma molécula típica de anticorpo tem a forma de "Y" e dois sítios de ligação idênticos para seu antígeno, um em cada braço do "Y". A proteína é composta por quatro cadeias polipeptídicas (duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves, menores e também idênticas) mantidas unidas por ligações dissulfeto. Cada cadeia é composta de vários domínios diferentes de imunoglobulinas, aqui mostrado em *azul* ou *cinza*. O sítio de ligação do antígeno é formado pela aproximação do domínio variável de uma cadeia pesada (V_H) e do domínio variável de uma cadeia leve (V_L). Esses são os domínios que mais diferem nas suas sequências e nas suas estruturas entre os diferentes anticorpos. Os domínios na porção final de cada um dos braços da molécula de anticorpo formam alças que se ligam ao antígeno. Em (B) podemos ver essas alças na forma de dedos (*vermelho*) oriundas do domínio V_L.

a esse ligante por meio de muitas ligações fracas. Por essa razão, as alças frequentemente formam sítios de ligação nas proteínas.

A constante de equilíbrio mede a força de ligação

As moléculas na célula frequentemente se encontram devido aos seus contínuos movimentos térmicos aleatórios. Duas moléculas que colidem com superfícies fracamente complementares formam ligações não-covalentes uma com a outra, e as duas dissociam-se tão rapidamente quanto colidiram. Em outro extremo, quando muitas ligações não-covalentes são formadas entre duas moléculas que colidem, a associação pode persistir por um longo período (**Figura 3-42**). Interações fortes ocorrem na célula sempre que uma função biológica requer que as moléculas permaneçam associadas por um logo período de tempo – por exemplo, quando um grupo de RNA e moléculas proteicas aproximam-se para formar uma estrutura subcelular, como o ribossomo.

Podemos medir a força com que duas moléculas quaisquer se ligam uma à outra. Por exemplo, considere uma população de moléculas de anticorpos idênticos que repentinamente encontra uma população de ligantes que se difundem no meio fluido que os circunda. Em intervalos frequentes, uma das moléculas de ligante irá colidir com o sítio de ligação de um anticorpo e formará um complexo anticorpo-ligante. A população de complexos anticorpo-ligante consequentemente aumentará, mas não indefinidamente: com o tempo, um segundo processo, em que os complexos individuais se desfazem devido ao movimento termicamente induzido, tornar-se-á cada vez mais importante. Eventualmente, qualquer população de moléculas de anticorpos e ligantes atingirá o estado estacionário, ou equilíbrio, no qual o número de eventos de ligação (associações) por segundo é precisamente igual ao número de eventos de separação (dissociação) (ver Figura 2-52).

A partir das concentrações de ligantes, de anticorpos e de complexos anticorpo-ligante em equilíbrio, pode ser calculada uma medida conveniente – a **constante de equilíbrio** (***K***), da força de ligação (**Figura 3-43**A). A constante de equilíbrio para uma reação em que duas moléculas (A e B) ligam-se uma à outra para formar um complexo (AB) tem unidade de litros/mol, e metade dos sítios de ligação estarão ocupados pelo ligante quando a concentração de ligante (em litros/mol) alcançar um valor igual a $1/K$. A constante de equilíbrio é maior quanto maior for a força de ligação, sendo uma medida direta da diferença de energia

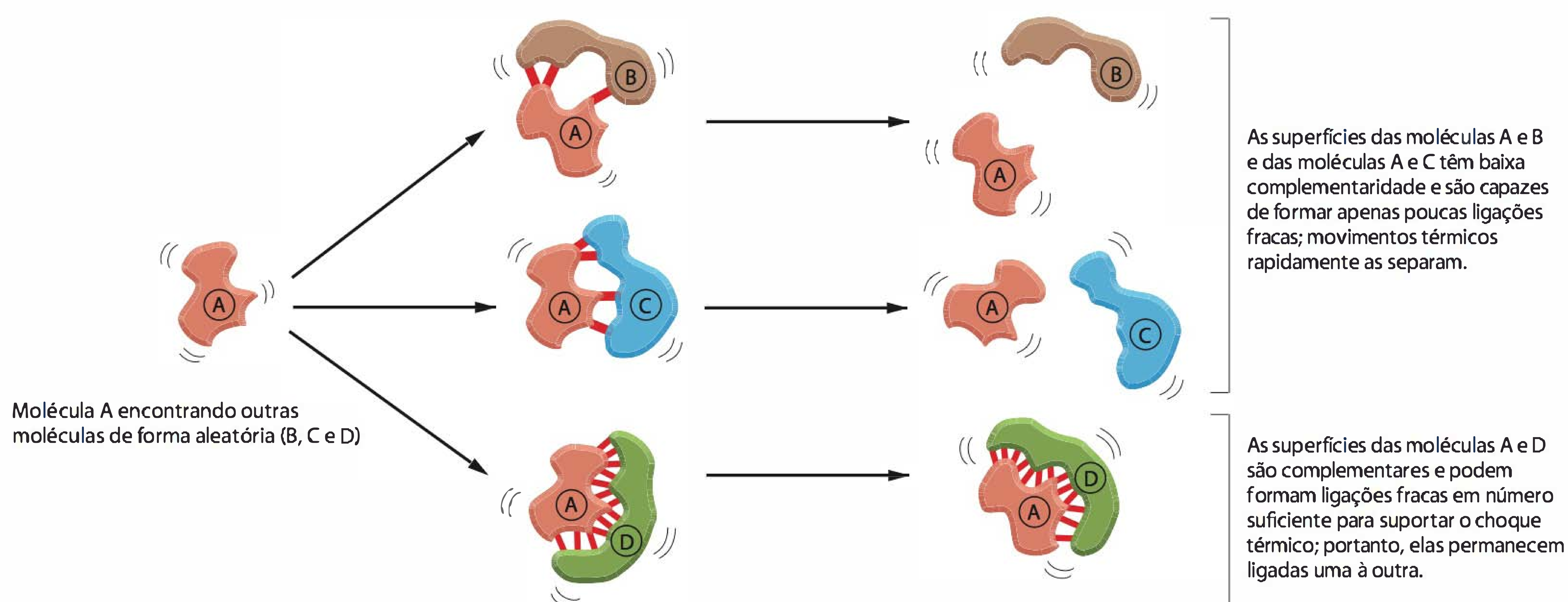
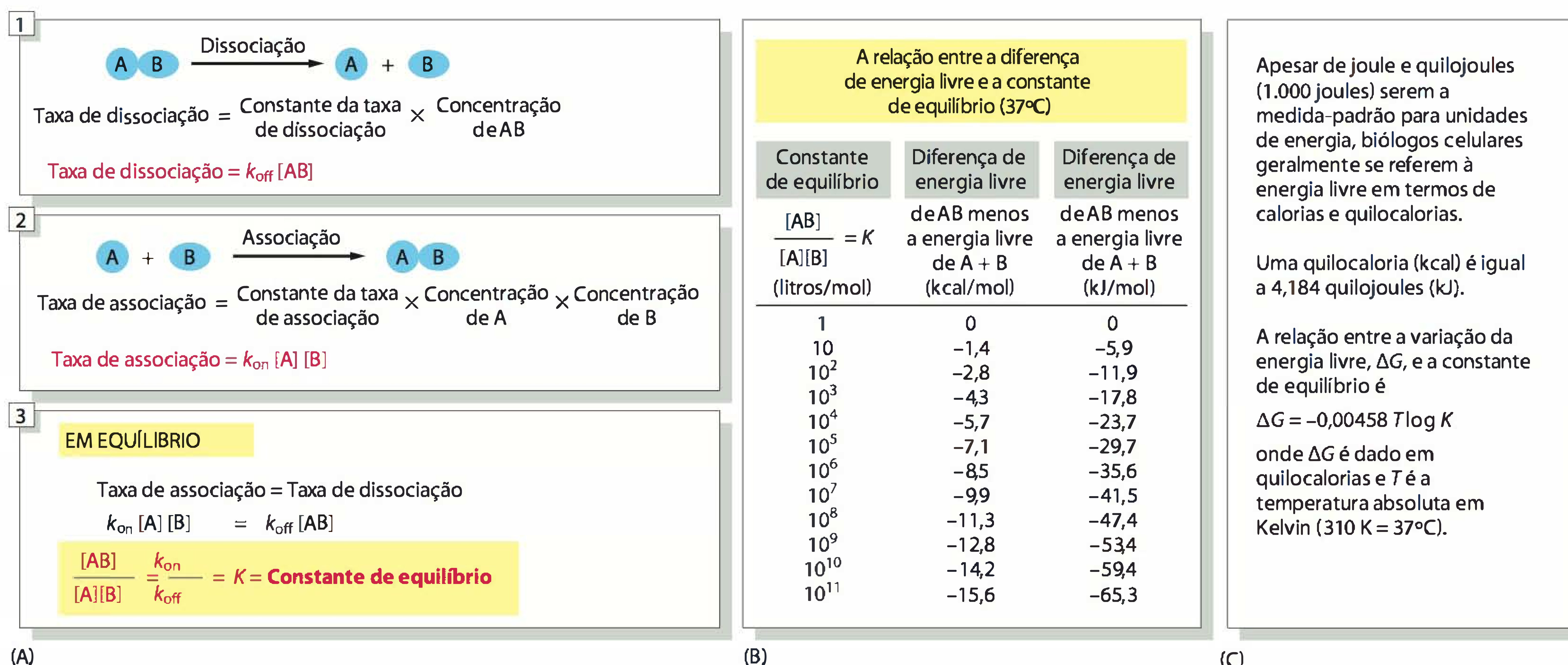


Figura 3-42 Como as ligações não-covalentes conseguem mediar as interações entre macromoléculas.

livre entre os estados ligado e livre (Figura 3-43B e C). Mesmo uma mudança de poucas ligações não-covalentes pode ter um efeito profundo na interação de ligação, como mostrado pelo exemplo na **Figura 3-44**. (Note que a constante de equilíbrio, como definida aqui, também é conhecida como constante de associação ou de afinidade, K_a.)

Usamos o caso de um anticorpo ligando-se ao seu ligante para ilustrar o efeito da força de ligação no estado de equilíbrio, mas os mesmos princípios se aplicam a qualquer proteína e seu ligante. Muitas proteínas são enzimas que, como discutiremos agora, primeiramente ligam-se aos seus ligantes e depois catalisam a quebra ou a formação de ligações covalentes nessas moléculas.



Constante de equilíbrio $\frac{[AB]}{[A][B]} = K$ (litros/mol)	Diferença de energia livre de AB menos a energia livre de A + B (kcal/mol)	Diferença de energia livre de AB menos a energia livre de A + B (kJ/mol)
1	0	0
10	−1,4	−5,9
10^2	−2,8	−11,9
10^3	−4,3	−17,8
10^4	−5,7	−23,7
10^5	−7,1	−29,7
10^6	−8,5	−35,6
10^7	−9,9	−41,5
10^8	−11,3	−47,4
10^9	−12,8	−53,4
10^{10}	−14,2	−59,4
10^{11}	−15,6	−65,3

Figura 3-43 Relação entre energia de ligação e constante de equilíbrio para uma reação de associação. (A) O equilíbrio entre as moléculas A e B e o complexo AB é mantido por um equilíbrio entre as duas reações opostas mostradas nos painéis 1 e 2. As moléculas A e B precisam colidir para reagir, e a taxa de associação é, portanto, proporcional ao produto de suas concentrações individuais [A] × [B] (os colchetes indicam concentrações). Como mostrado no painel 3, a razão entre as constantes das taxas de associação e de dissociação das reações é igual à constante de equilíbrio (K) da reação. (B) A constante de equilíbrio no painel 3 é a mesma da reação A + B ⇆ AB, e quanto maior for o seu valor, mais forte é a ligação entre A e B. Observe que, para cada 1,4 kcal/mol (5,91 kJ/mol) a menos na energia livre, a constante de equilíbrio aumenta em um fator igual a 10 a 37ºC.

A constante de equilíbrio aqui tem suas unidades dadas em litros/mol: para ligações simples também é chamada de *constante de afinidade* ou *constante de associação*, K_a. A recíproca da K_a é chamada de *constante de dissociação*, K_d (em unidades de mol/litro).

Enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

Muitas proteínas podem realizar suas funções simplesmente pela ligação a outra molécula. Uma molécula de actina, por exemplo, somente precisa se associar a outras moléculas de actina para formar um filamento. Há outras proteínas, contudo, nas quais a ligação do ligante é somente a primeira etapa necessária nas suas funções. Esse é o caso de uma grande e importante classe de proteínas chamadas de **enzimas**. Como descrito no Capítulo 2, as enzimas são moléculas extraordinárias que determinam todas as transformações químicas que formam ou quebram ligações covalentes nas células. Elas ligam um ou mais ligantes, chamados de **substratos**, e os convertem em um ou mais *produtos* quimicamente modificados, fazendo isso muitas vezes, em uma rapidez incrível. As enzimas aceleram reações, frequentemente por fatores de milhões de vezes ou mais, sem que elas próprias sejam modificadas – isto é, elas agem como **catalisadores** que permitem às células fazer e desfazer ligações covalentes de forma controlada. É a catálise por enzimas de conjuntos organizados de reações químicas que cria e mantém uma célula, tornando a vida possível.

Podemos agrupar as enzimas em classes funcionais que realizam reações químicas similares (**Tabela 3-1**). Cada tipo de enzima dessas classes é altamente específica, catalisando apenas um único tipo de reação. Assim, a *hexocinase* adiciona um grupo fosfato à D-glicose, mas ignorará seu isômero óptico L-glicose; a enzima da coagulação sanguínea, a *trombina*, quebra a cadeia de apenas um tipo de proteína do sangue, entre um resíduo particular de arginina e uma glicina adjacente, e em nenhum outro lugar. Como discutido em detalhes no Capítulo 2, as enzimas trabalham em conjunto, sendo que o produto de uma enzima é o substrato para a enzima seguinte. O resultado disso é uma elaborada rede de rotas metabólicas que suprem a célula com energia e geram as muitas moléculas, grandes ou pequenas, de que uma célula precisa (ver Figura 2-35).

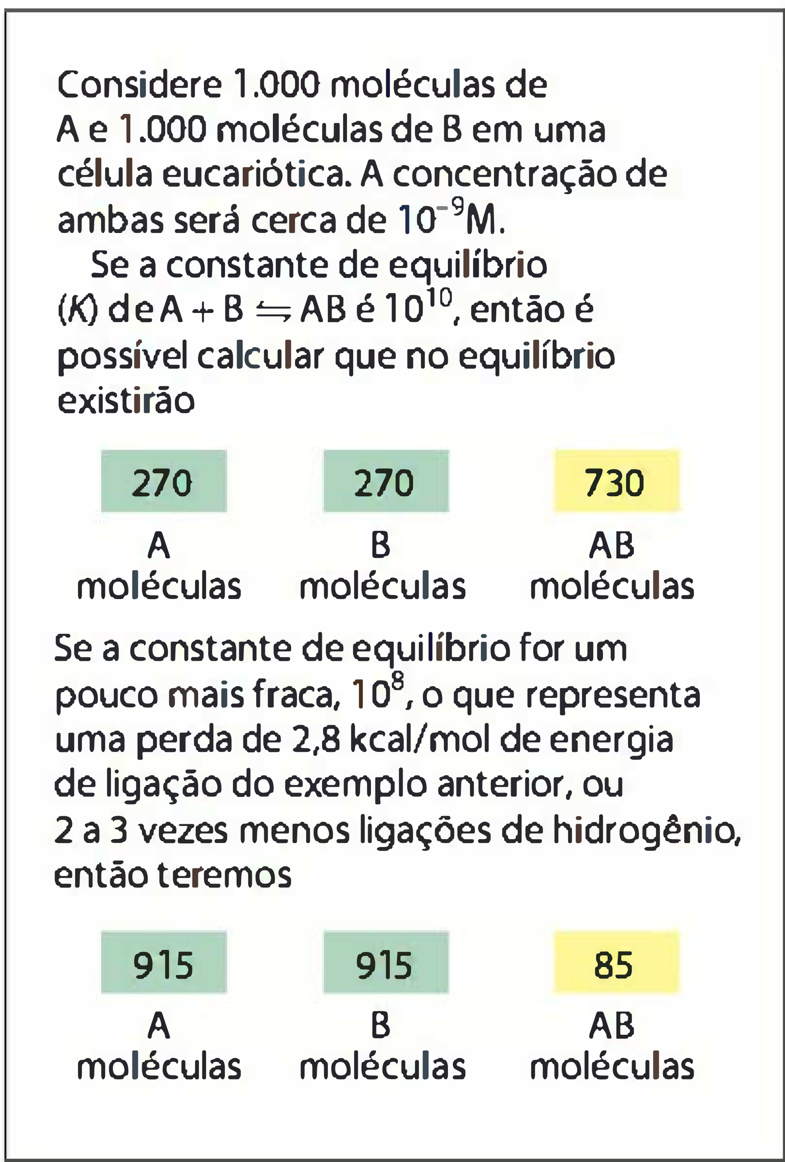


Figura 3-44 Pequenas alterações no número de ligações fracas podem ter efeitos drásticos na interação de ligação. Este exemplo ilustra o efeito dramático da presença ou ausência de poucas ligações não-covalentes fracas em um contexto biológico.

A ligação do substrato é a primeira etapa na catálise enzimática

Para uma proteína que catalisa uma reação química (uma enzima), a ligação de cada molécula de substrato à proteína é uma etapa essencial. No caso simples, se chamamos a enzima de E, o substrato de S, e o produto de P, o caminho básico da reação é E + S → ES → EP → E + P. A partir dessa simples equação, vemos que há um limite para a quantidade de substrato que uma única molécula de enzima pode processar em um dado tempo. Um aumento na concentração do substrato também aumenta a velocidade na qual o produto é formado até um valor máximo (**Figura 3-45**). Nesse ponto, a molécula da enzima está saturada com substrato, e a velocidade da reação máxima ($V_{máx}$) depende somente da rapidez da enzima em processar a molécula de substrato. Essa razão máxima dividida pela concentração de enzima

Tabela 3-1 Alguns tipos comuns de enzimas

Enzima	Reação catalisada
Hidrolases	Termo geral para enzimas que catalisam reações de clivagem hidrolítica; *nucleases* e *proteases* são nomes mais específicos para subclasses dessas enzimas.
Nucleases	Clivagem de ácidos nucleicos pela hidrólise das ligações entre os nucleotídeos.
Proteases	Clivagem de proteínas pela hidrólise das ligações entre os aminoácidos.
Sintases	Síntese de moléculas em reações anabólicas pela condensação de duas pequenas moléculas.
Isomerases	Catálise do rearranjo das ligações de uma única molécula.
Polimerases	Catálise de reações de polimerização como a síntese de DNA e RNA.
Cinases	Catálise da adição de grupos fosfato a moléculas. Proteína cinases são um importante grupo de cinases, que ligam grupos fosfato a proteínas.
Fosfatases	Catalise da remoção hidrolítica de grupos fosfato de uma molécula.
Óxido-redutases	Nome genérico para enzimas que catalisam reações em que uma molécula é oxidada enquanto outra é reduzida. Enzimas desse tipo frequentemente são chamadas pelo nome mais específico de *oxidases*, *redutases* ou *desidrogenases*.
ATPases	Hidrólise de ATP. Muitas proteínas com amplas funções apresentam atividade de ATPase como parte de suas funções; por exemplo, proteínas motoras, como *miosina*, e proteínas de transporte da membrana, como a *bomba de sódio e potássio*.

Os nomes das enzimas tipicamente terminam com "-ase", com exceção de algumas enzimas, como pepsina, tripsina, trombina e lisozima, que foram descobertas e nomeadas antes da convenção ser amplamente aceita no final do século XIX. O nome comum de uma enzima em geral indica o substrato e a natureza da reação catalisada. Por exemplo, citrato-sintase catalisa a síntese de citrato por uma reação entre acetil-CoA e oxaloacetato.

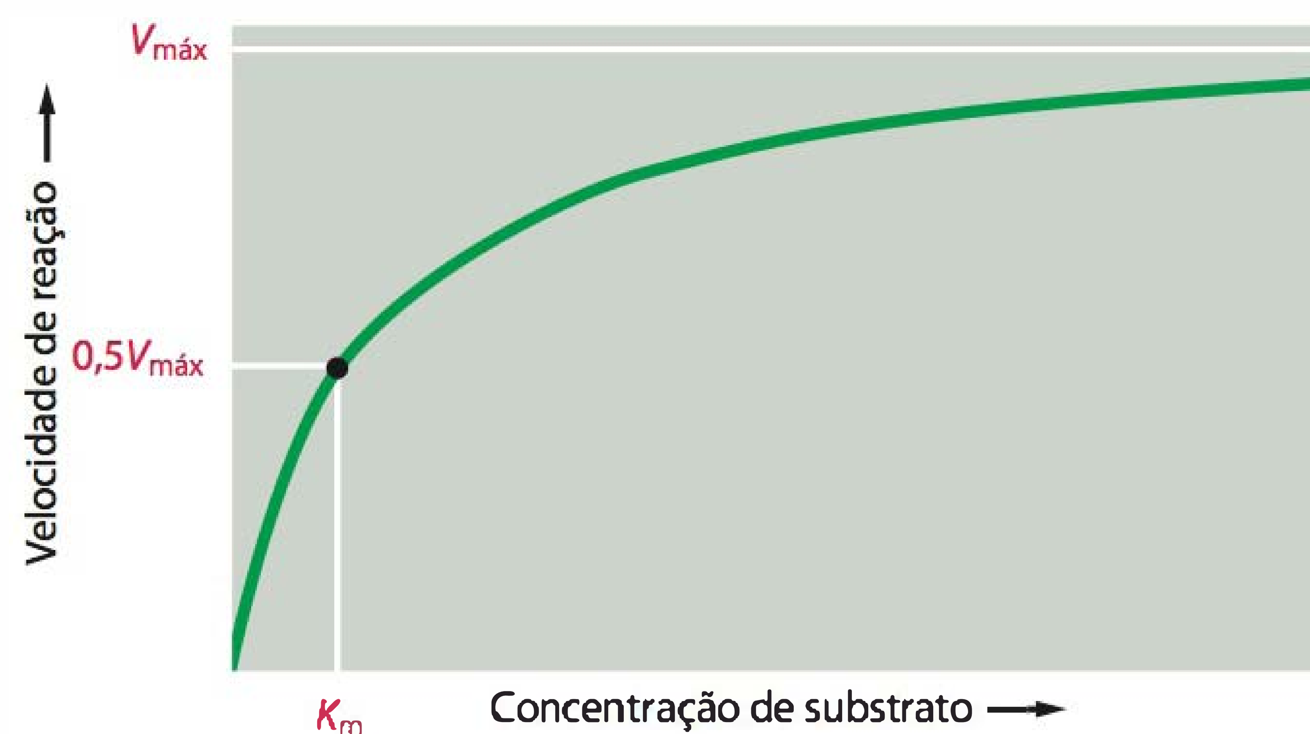


Figura 3-45 Cinética enzimática. A velocidade da reação enzimática (*V*) aumenta com o aumento da concentração do substrato até que um valor máximo ($V_{máx}$) seja atingido. Nesse ponto, todos os sítios de ligação do substrato nas moléculas de enzima estão totalmente ocupados, e a velocidade da reação é limitada pela velocidade do processo catalítico na superfície da enzima. Para a maioria das enzimas, a concentração de substrato (K_m) em que a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima (*ponto preto*) fornece uma medida direta da força de ligação do substrato, sendo que um valor alto de K_m corresponde a uma ligação fraca.

é chamada de número de *turnover*. O número de *turnover* em geral é cerca de 1.000 moléculas de substrato processadas por segundo, por molécula de enzima, embora se conheçam números de *turnover* entre 1 e 10 mil.

O outro parâmetro cinético frequentemente utilizado para caracterizar uma enzima é seu K_m, a concentração de substrato que permite que a reação chegue à metade de sua velocidade máxima (0,5 $V_{máx}$) (ver Figura 3-45). Um valor *baixo* de K_m significa que a enzima atinge sua velocidade catalítica máxima com uma *baixa concentração* de substrato e, geralmente, indica que a enzima se liga fortemente ao substrato; enquanto um valor *alto* de K_m corresponde a uma ligação fraca. Os métodos utilizados para caracterizar enzimas são explicados no **Painel 3-3** (p. 162-163).

As enzimas aceleram reações estabilizando seletivamente os estados de transição

As enzimas atingem velocidades de reação extremamente altas – velocidades maiores que qualquer catalisador sintético. Existem diversas razões para essa eficiência. Primeiro, a enzima aumenta a concentração local de moléculas de substrato no sítio catalítico e mantém todos os átomos na orientação correta para que a reação se processe. Mais importante, no entanto, é que um pouco da energia de ligação contribui diretamente para a catálise. As moléculas de substrato passam por uma série de estados intermediários de geometria e de distribuição de elétrons alterados antes de formarem os produtos finais da reação. A energia livre requerida para se atingir o **estado de transição** mais instável é chamada de *energia de ativação* da reação, e esse é o maior determinante da velocidade de reação. As enzimas têm afinidade muito maior pelo estado de transição do substrato do que pela sua forma estável. Como essa forte ligação reduz bastante a energia do estado de transição, a enzima acelera uma reação particular pela diminuição da energia de ativação requerida (**Figura 3-46**).

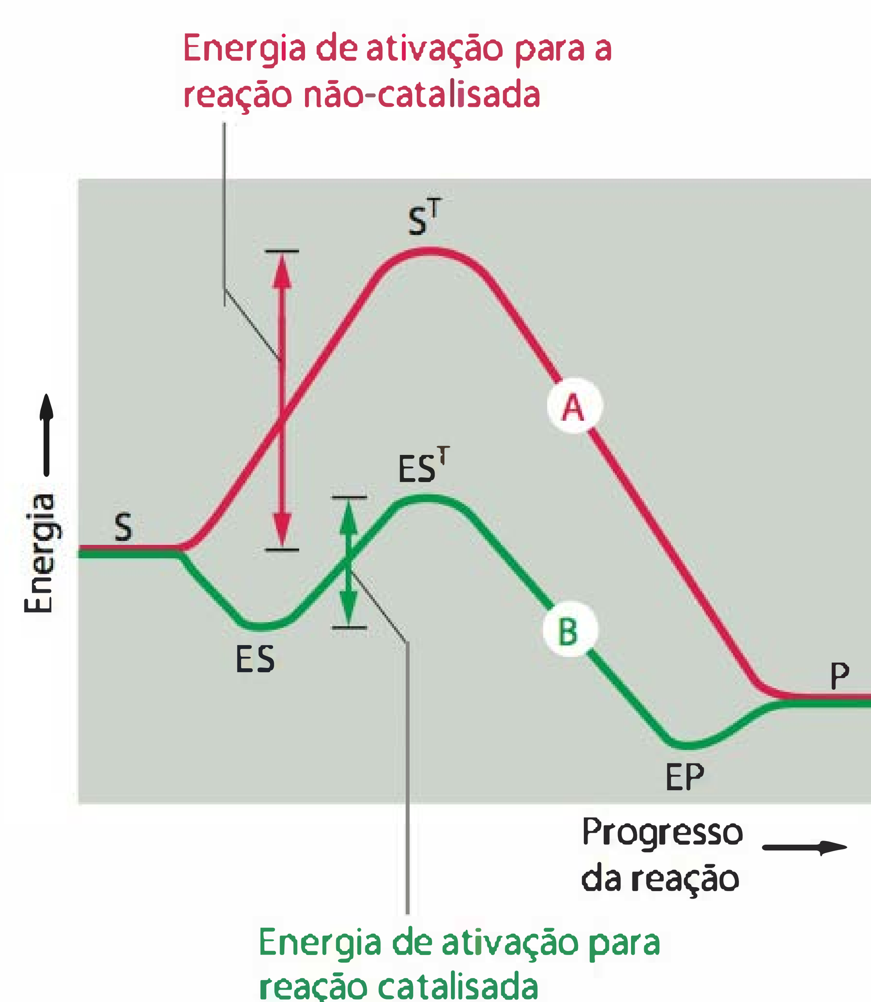


Figura 3-46 Aceleração enzimática de reações químicas pela diminuição da energia de ativação. Muitas vezes as reações não-catalisadas (A) e as reações catalisadas (B) por uma enzima, podem ter vários estados de transição. É o estado de transição com maior energia (S^T e ES^T) que determina a energia de ativação e limita a velocidade de reação. (S = substrato; P = produto da reação; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto.)

Com a produção intencional de anticorpos que atuam como enzimas, podemos demonstrar que a estabilidade do estado de transição pode aumentar em muito a velocidade de reação. Considere, por exemplo, a hidrólise de uma ligação amida, que é semelhante à ligação peptídica que une aminoácidos adjacentes em uma proteína. Em uma solução aquosa, uma ligação amida é hidrolisada muito lentamente pelo mecanismo mostrado na **Figura 3-47**A. No intermediário central, ou estado de transição, o carbono da carbonila está ligado a quatro átomos arranjados nos cantos de um tetraedro. Gerando-se anticorpos monoclonais, que se ligam fortemente a um análogo estável desse *intermediário tetraédrico* bastante instável, pode ser obtido um anticorpo que funciona como uma enzima (Figura 3-47B). Como esse *anticorpo catalítico* liga, e estabiliza o intermediário tetraédrico, ele aumenta a velocidade de hidrólise espontânea de ligações amida mais de 10 mil vezes.

As enzimas podem utilizar simultaneamente a catálise ácida e básica

A **Figura 3-48** compara as velocidades de reação espontânea e as correspondentes velocidades catalisadas para cinco enzimas. As taxas de aceleração variam entre 10^9 e 10^{23}. Claramente, as enzimas são muito melhores catalisadores do que anticorpos catalíticos. As enzimas não somente se ligam fortemente a um estado de transição, como também con-

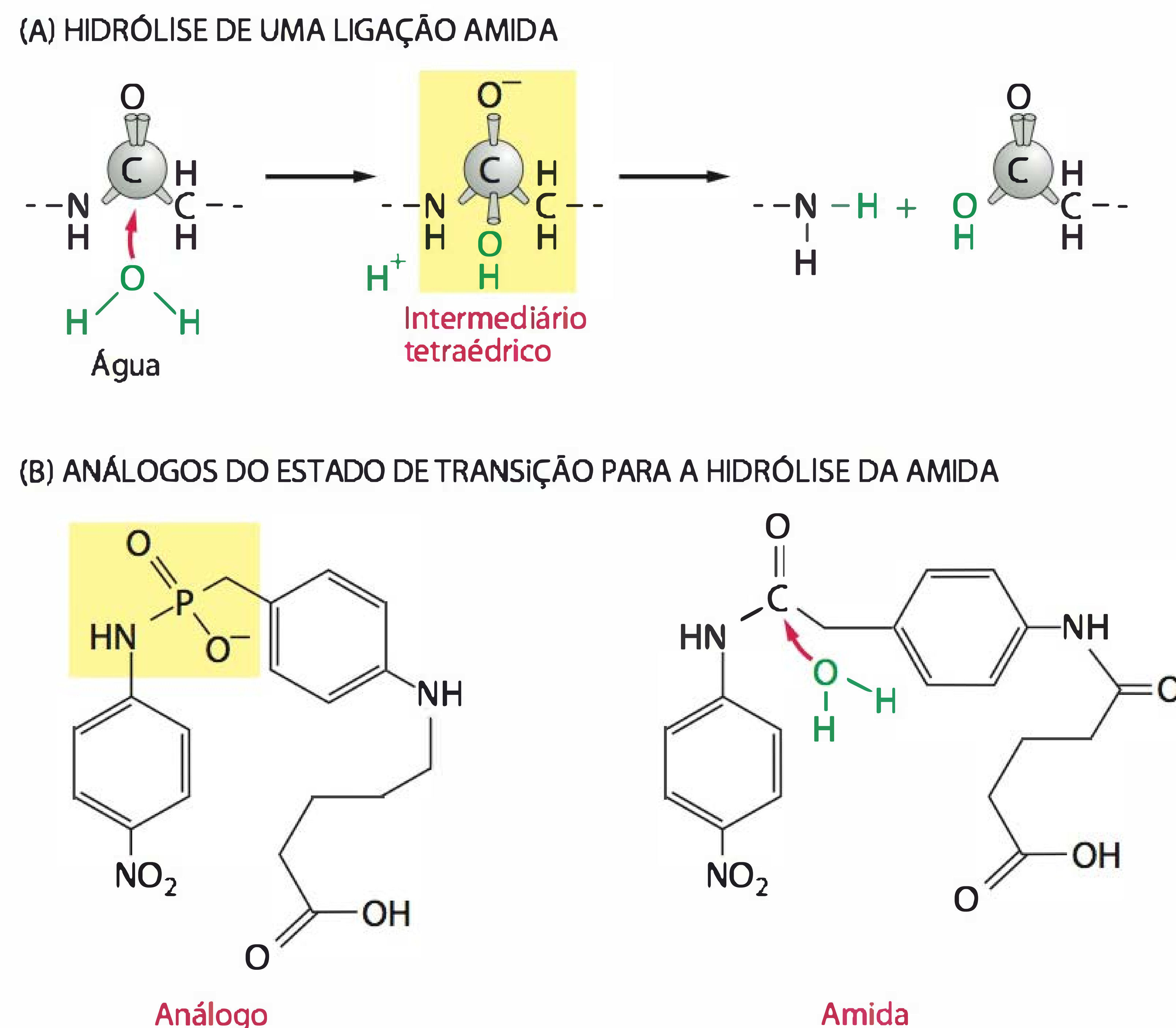


Figura 3-47 Anticorpos catalíticos. A estabilização de um estado de transição por um anticorpo cria uma enzima. (A) O caminho da reação para a hidrólise de uma ligação amida ocorre por meio de um intermediário tetraédrico, o estado de transição de maior energia para a reação. (B) A molécula à esquerda foi covalentemente ligada a uma proteína e usada como um antígeno para gerar um anticorpo que se liga fortemente na região da molécula mostrada em *amarelo*. Por causa disso, o anticorpo também se liga fortemente ao estado de transição em (A), funcionando como uma enzima que catalisa com eficiência a hidrólise da ligação amida na molécula à direita.

têm átomos precisamente posicionados que alteram as distribuições eletrônicas naqueles átomos que participam diretamente na formação e na quebra de ligações covalentes. As ligações peptídicas, por exemplo, podem ser hidrolisadas na ausência de uma enzima, pela exposição de um polipeptídeo tanto a ácidos fortes quanto a bases fortes, como ilustrado na **Figura 3-49**. As enzimas são as únicas, entretanto, capazes de realizar, simultaneamente, as catálises ácida e básica, uma vez que o arranjo rígido da proteína retém os resíduos de aminoácidos ácidos e básicos e previne que eles se combinem entre si (como fariam se estivessem livres em solução) (Figura 3-49D).

O encaixe entre a enzima e seu substrato deve ser preciso. Uma pequena mudança introduzida por engenharia genética no sítio ativo de uma enzima pode ter um efeito drástico. Substituindo um ácido glutâmico por um ácido aspártico em uma enzima, por exemplo, há uma mudança na posição do íon catalítico carboxilato de somente 1 Å (aproximadamente o raio de um átomo de hidrogênio); mesmo assim, isso é suficiente para diminuir em mil vezes a atividade da enzima.

A lisozima ilustra como uma enzima funciona

Para demonstrar como as enzimas catalisam reações químicas, examinaremos uma enzima que age como um antibiótico natural na clara do ovo, na saliva, nas lágrimas e em outras secreções. A **lisozima** catalisa a remoção de cadeias de polissacarídeos da parede de bactérias. Como a bactéria está sob pressão ocasionada por forças osmóticas, mesmo a remoção de um número reduzido de cadeias de polissacarídeos provoca a ruptura de sua parede celular e, consequentemente, a morte da bactéria. A lisozima é uma proteína relativamente pequena

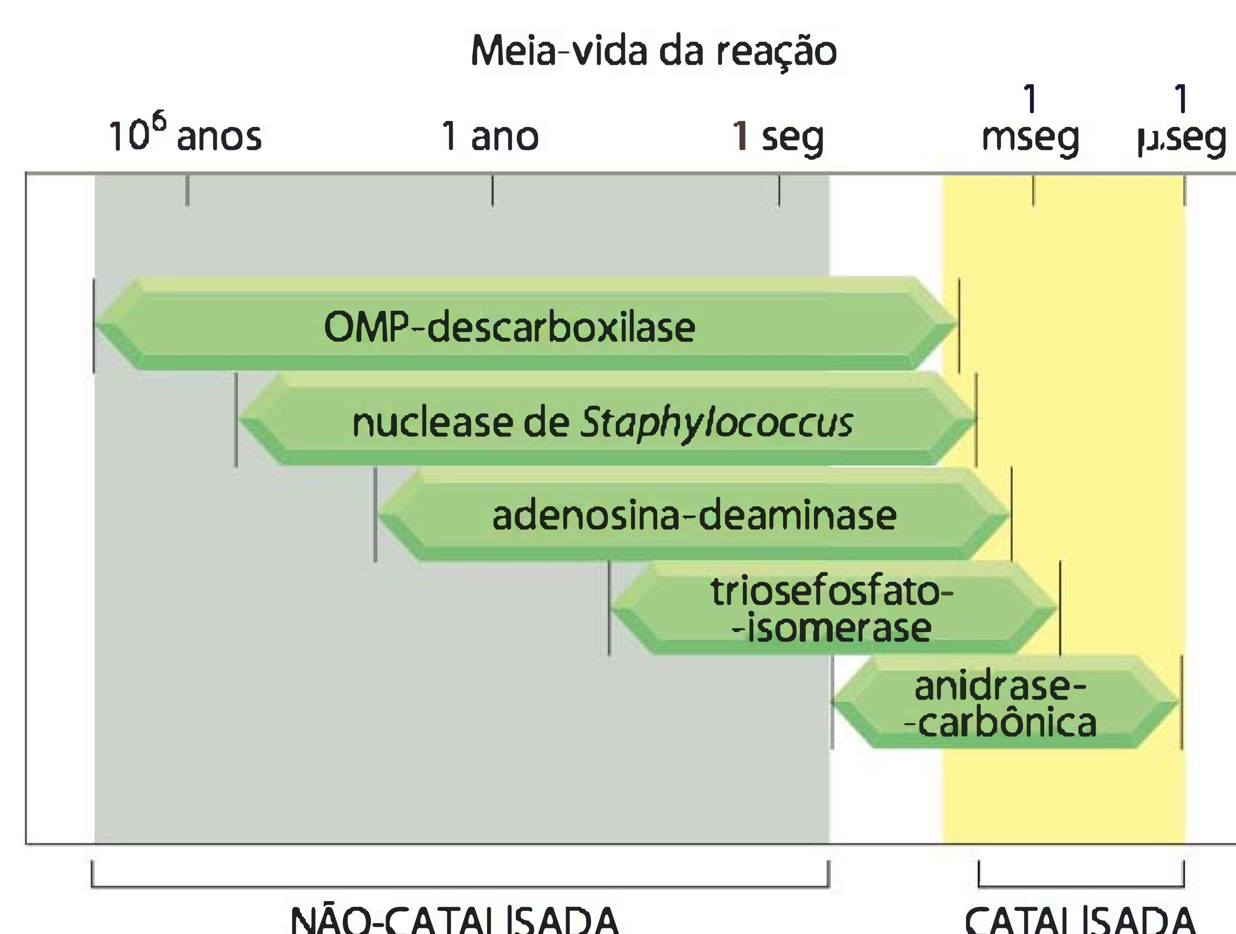


Figura 3-48 Taxas de aceleração causadas por cinco enzimas diferentes. (Adaptado de A. Radzicka e R. Wolfenden, *Science* 267:90-93, 1995. Com permissão de AAAS.)

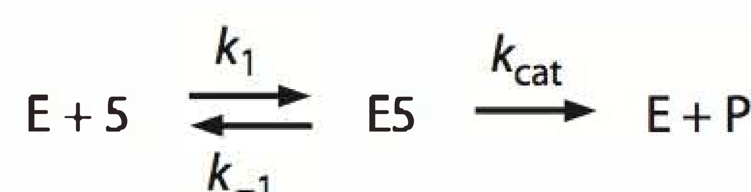
POR QUE ANALISAR A CINÉTICA DAS ENZIMAS?

As enzimas são os mais poderosos e seletivos catalisadores conhecidos. Um entendimento detalhado de seus mecanismos é uma ferramenta fundamental para o descobrimento de novas substâncias, para a síntese industrial em larga escala de produtos químicos úteis e para a compreensão da química das células e dos organismos. Um estudo detalhado das velocidades das reações químicas que são catalisadas por uma enzima purificada – mais especificamente como essas velocidades mudam com mudanças em condições como concentrações de substratos, de produtos, de inibidores e ligantes reguladores – permite aos bioquímicos compreenderem exatamente como as enzimas trabalham. Por exemplo, essa foi a maneira pela qual as reações de produção de ATP na glicólise, mostrada previamente na Figura 2-72, foram decifradas, permitindo apreciar a lógica dessa via enzimática crítica.

Neste painel, introduzimos a importante área da cinética enzimática, que tem sido indispensável para se derivar muito do conhecimento detalhado que agora temos sobre a química celular.

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ESTADO ESTACIONÁRIO

Muitas enzimas têm somente um substrato, o qual elas ligam e então iniciam a produzir produtos, de acordo com o esquema da Figura 3-50A. Nesse caso, a reação é escrita como



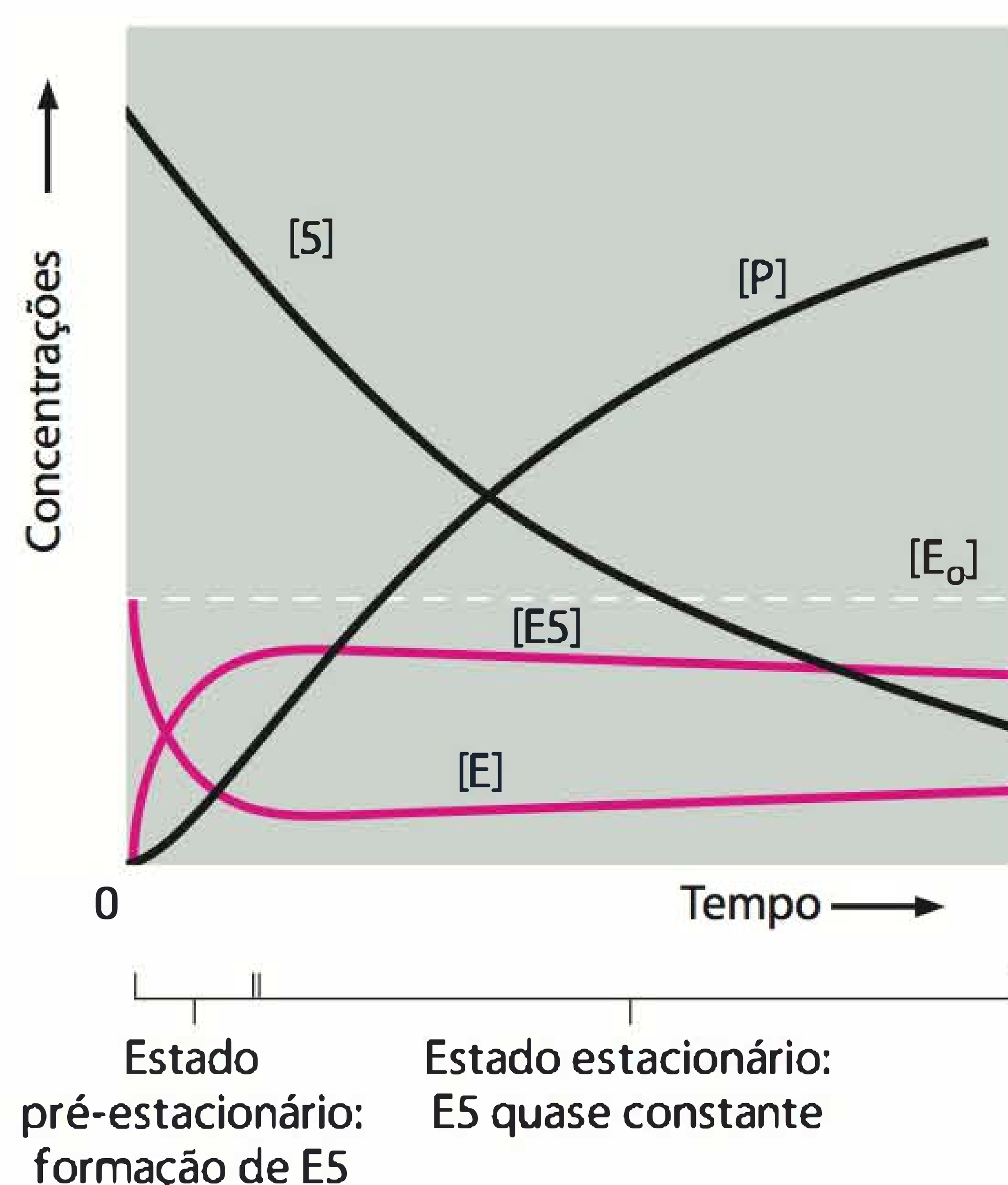
$$E + 5 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E5 \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

Aqui consideramos que a reação reversa, na qual E + P recombinam para formar EP e então E5, ocorre tão raramente que podemos ignorá-la. Nesse caso, EP não precisa ser representado, e podemos expressar a taxa da reação – conhecida como sua velocidade, *V*, como

$$V = k_{cat}\,[ES]$$

onde [E5] é a concentração de complexos enzima-substrato, e k_{cat} é o número de *turnover*, uma velocidade constante que tem valor igual ao número de moléculas de substrato processadas por moléculas de enzima a cada segundo.

Mas como o valor de [E5] se relaciona a concentrações que conhecemos diretamente, que são a concentração total da enzima, $[E_o]$, e a concentração do substrato, [5]? Quando a enzima e o substrato são inicialmente misturados, a concentração [ES] aumentará rapidamente a partir do zero para o chamado estado de equilíbrio, como ilustrado abaixo.



No estado de transição, [E5] é quase constante, ou seja,

Taxa de quebra de E5		Taxa de formação de E5
k_{-1} [E5] + k_{cat} [E5]	=	k_1 [E][5]

ou, desde que a concentração de enzima livre, [E], seja igual a $[E_o]$ – [E5]

$$[E5] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}}\right)[E][5] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}}\right)\left([E_o] - [E5]\right)[5]$$

Rearranjando e definindo a constante K_m como

$$\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

temos

$$[E5] = \frac{[E_o][5]}{K_m + [5]}$$

ou, lembrando que $V = k_{cat}$ [E5], obtemos a famosa equação de Michaelis-Menten

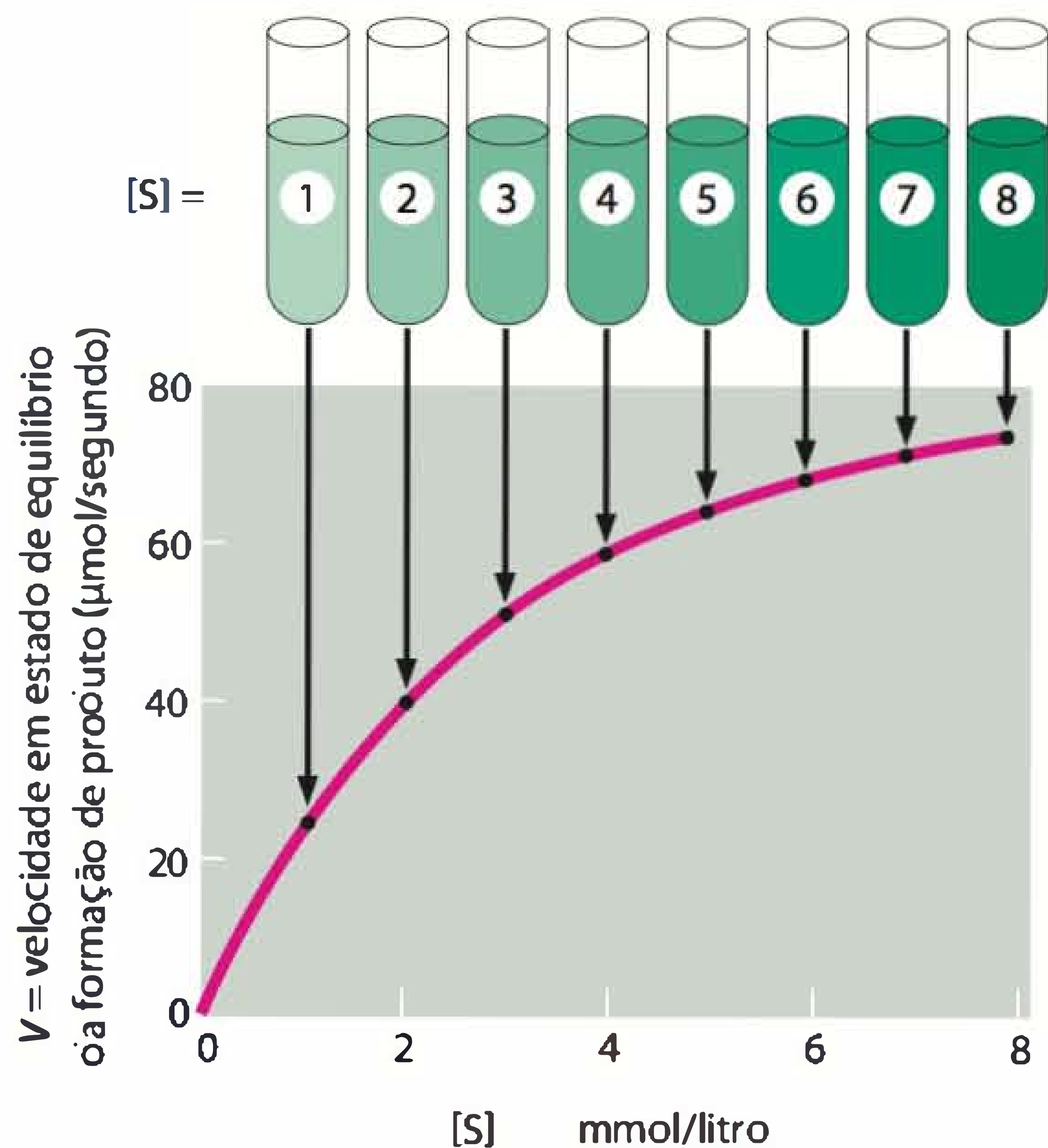
$$V = \frac{k_{cat}\,[E_o][5]}{K_m + [5]}$$

À medida que a [5] aumenta a níveis cada vez maiores, essencialmente toda a enzima estará ligada ao substrato no estado de equilíbrio; nesse ponto, uma velocidade máxima de reação, $V_{máx}$, será atingida, onde $V = V_{máx} = k_{cat}\,[E_o]$. Assim, é conveniente reescrever a equação de Michaelis-Menten como

$$V = \frac{V_{máx}\,[5]}{K_m + [5]}$$

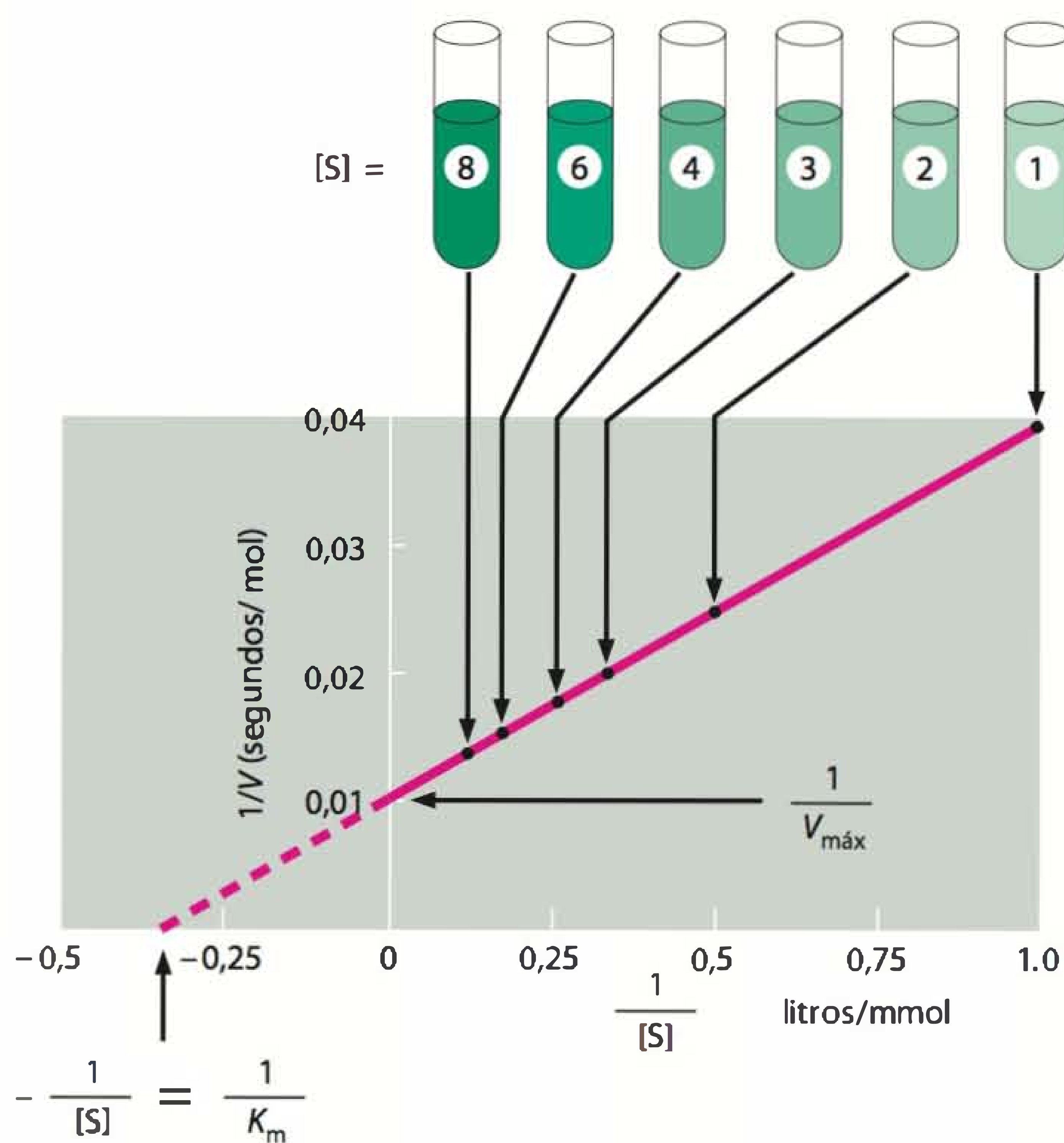
GRÁFICO DUPLO-RECÍPROCO

Um típico gráfico de V *versus* [S] para uma enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten é mostrado abaixo. Desse gráfico, os valores de $V_{máx}$ e K_m não são obtidos diretamente.



Para se obter $V_{máx}$ e K_m a partir de tais dados, um gráfico duplo-recíproco muitas vezes é usado, no qual a equação de Michaelis-Menten foi rearranjada, para que $1/V$ possa ser apresentado em gráficos *versus* $1/[S]$.

$$1/V = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) + 1/V_{máx}$$



SIGNIFICADO DE K_m, k_{cat} e k_{cat}/K_m

Como descrito no texto, K_m é uma medida aproximada da afinidade do substrato pela enzima: é numericamente igual à concentração de [S] em $V = 0{,}5\ V_{máx}$. Em geral, um valor baixo de K_m significa forte ligação ao substrato. De fato, nos casos em que k_{cat} é muito menor que k_{-1}, K_m será igual a K_d, a constante de dissociação do substrato à enzima ($K_d = 1/K_a$)

Vimos que k_{cat} é o número de *turnover* para a enzima. Em baixas concentrações de substrato, onde [S] << K_m, a maioria das enzimas está livre. Assim, podemos considerar [E] = [E_o], de modo que a equação de Michaelis-Menten venha a ser $V = k_{cat}/K_m$ [E][S]. Portanto, a proporção k_{cat}/K_m é equivalente à velocidade constante para a reação entre a enzima livre e o substrato livre.

Uma comparação de k_{cat}/K_m para a mesma enzima com diferentes substratos, ou para duas enzimas com seus diferentes substratos, é muita usada como medida da efetividade da enzima.

Para simplificar, neste painel discutimos as enzimas que têm somente um substrato, como a lisozima, descrita no texto (ver p. 164). Várias enzimas têm dois substratos, um dos quais muitas vezes é usado como molécula ativadora – como o nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) ou o ATP.

Uma análise similar, mas mais complexa, é usada para determinar a cinética de tais enzimas – permitindo que a ordem de ligação dos substratos e a presença de intermediários covalentes ao longo da reação possam ser revelados.

ALGUMAS ENZIMAS SÃO LIMITADAS PELA DIFUSÃO

Os valores de k_{cat}, K_m e k_{cat}/K_m de algumas enzimas selecionadas são mostrados abaixo:

Enzima	Substrato	k_{cat} (seg^{-1})	K_m (M)	k_{at}/K_m ($seg^{-1}M^{-1}$)
acetilcolinesterase	acetilcolina	$1{,}4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1{,}6 \times 10^8$
catalase	H_2O_2	4×10^7	1	4×10^7
fumarase	fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1{,}6 \times 10^8$

Como uma enzima e seu substrato precisam colidir antes que possam reagir, k_{cat}/K_m têm um valor máximo possível limitado pela velocidade de colisões. Se toda colisão forma um complexo enzima-substrato, é possível calcular a partir da teoria da difusão onde k_{cat}/K_m estará entre 10^8 e $10^9\ seg^{-1}M^{-1}$, no caso em que todas as etapas subsequentes acontecem imediatamente. Assim, pode-se dizer que enzimas como a acetilcolinesterase e a fumarase são "enzimas perfeitas", onde cada enzima evoluiu ao ponto em que praticamente toda colisão com seu substrato o converte em produto.

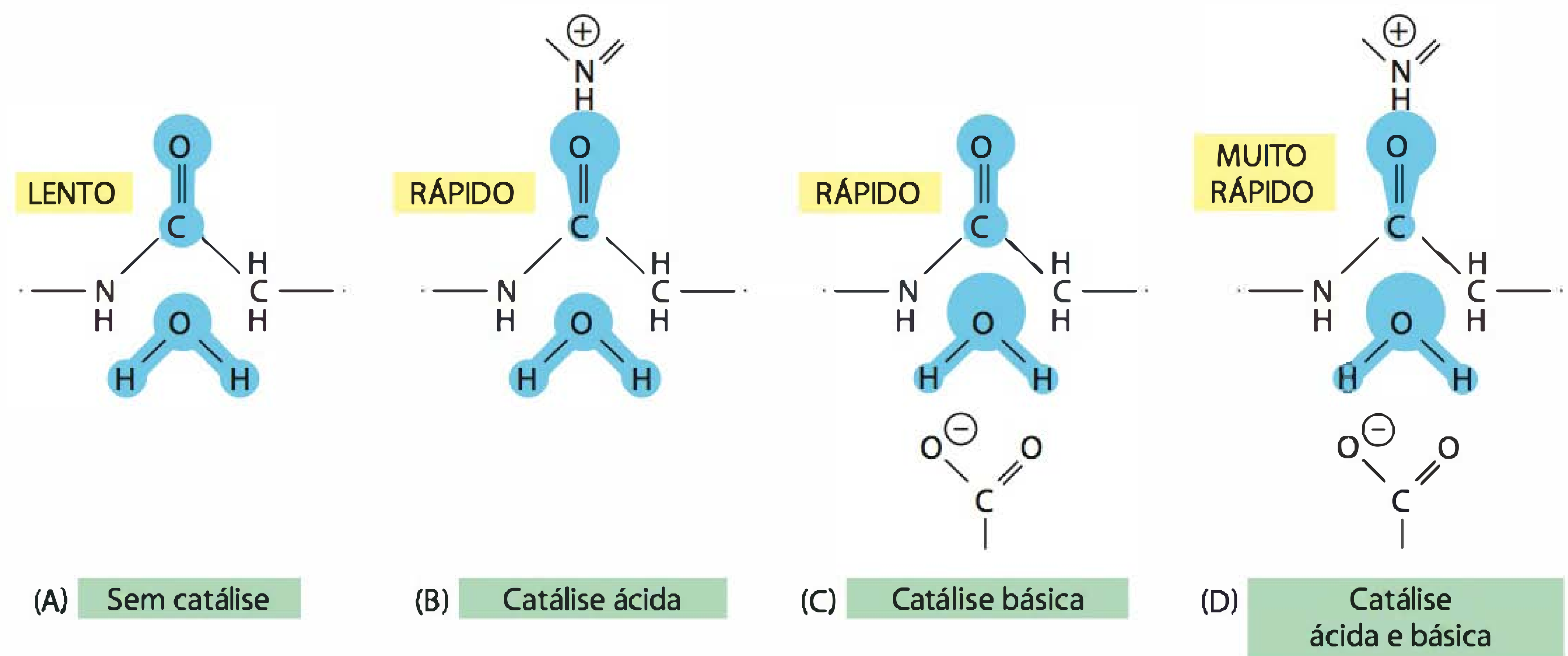


Figura 3-49 Catálise ácida e catálise básica. (A) O início da reação não-catalisada mostrada na Figura 3-47A; em *azul* está indicada a distribuição de elétrons das ligações na água e na carbonila. (B) Um ácido doa um próton (H^+) a outros átomos. Pelo pareamento com o oxigênio da carbonila, um ácido movimenta os elétrons para longe do carbono da carbonila, tornando esse átomo muito mais atrativo ao oxigênio eletronegativo de uma molécula de água. (C) Uma base recebe H^+. Pelo pareamento com o hidrogênio da molécula de água, uma base provoca o movimento de elétrons em direção ao oxigênio da água, tornando-o um grupo melhor para o ataque ao carbono da carbonila. (D) Por ter átomos apropriadamente posicionados sob sua superfície, uma enzima pode executar as catálises ácida e básica ao mesmo tempo.

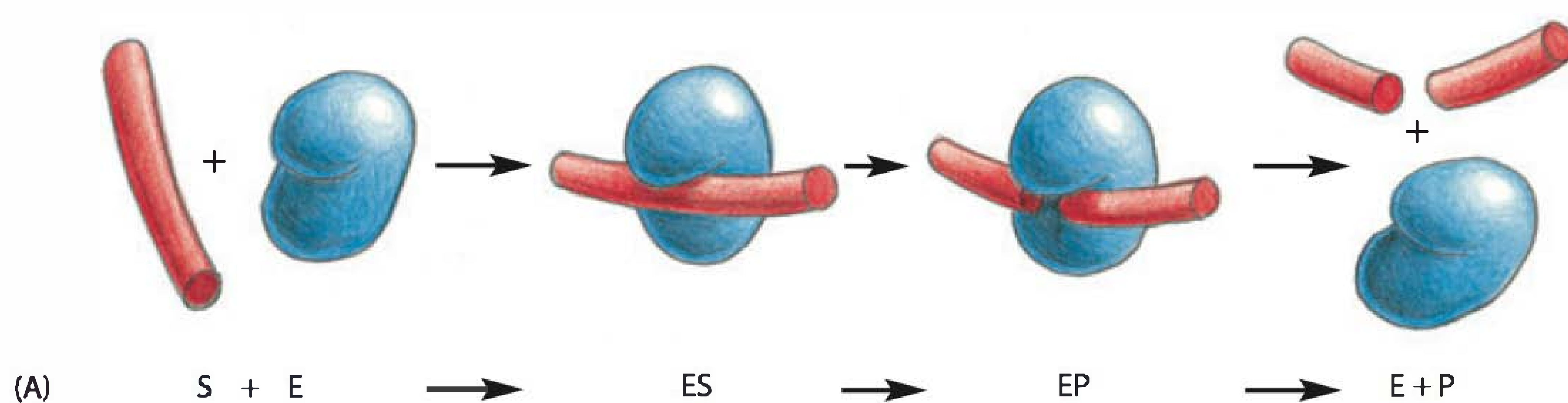
e estável e pode ser isolada facilmente em grandes quantidades. Por essas razões, ela tem sido intensamente estudada, e foi a primeira enzima a ter sua estrutura resolvida em nível atômico, por cristalografia de raios X.

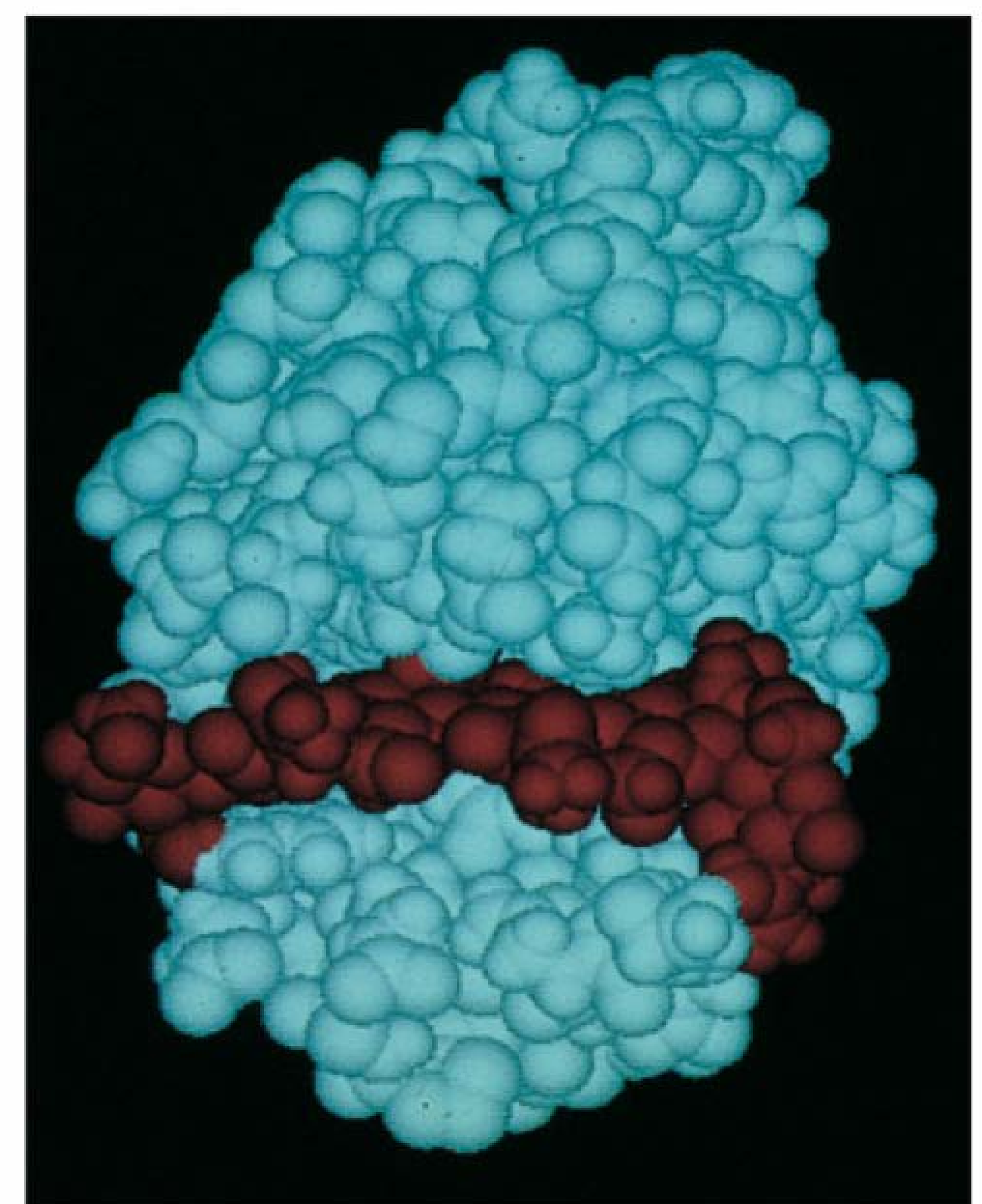
A reação que a lisozima catalisa é uma hidrólise: ela adiciona uma molécula de água a uma ligação simples entre dois grupos de açúcar adjacentes na cadeia polissacarídica, causando dessa maneira a quebra da cadeia (ver Figura 2-19). A reação é energeticamente favorável, porque a energia livre da cadeia polissacarídica rompida é menor do que a energia livre da cadeia intacta. No entanto, o polissacarídeo puro pode ficar por anos dissolvido em água sem ser hidrolisado em um nível detectável. Isso ocorre devido à existência de uma barreira energética para a reação, como discutido no Capítulo 2 (ver Figura 2-46). Uma molécula de água somente pode romper uma ligação entre dois açúcares se a cadeia polissacarídica estiver distorcida em uma forma específica – o estado de transição – na qual os átomos em torno da ligação têm uma geometria e uma distribuição de elétrons alteradas. Por causa dessa distorção, colisões aleatórias precisam fornecer um grande aporte de energia de ativação para que a reação ocorra. Em uma solução aquosa à temperatura ambiente, a energia resultante de colisões moleculares quase nunca excede a energia de ativação. Consequentemente, a hidrólise ocorre de maneira extremamente lenta, se ocorrer.

Essa situação muda drasticamente quando o polissacarídeo se liga à lisozima. O sítio ativo da lisozima, uma vez que seu substrato é um polímero, é um longo sulco que pode acomodar até seis açúcares ao mesmo tempo. Tão logo o polissacarídeo se liga para formar o complexo enzima-substrato, a enzima cliva o polissacarídeo pela adição de uma molécula de água a uma das ligações açúcar-açúcar. As duas novas cadeias resultantes dissociam-se da enzima, rapidamente liberando a enzima para outros ciclos de reação (**Figura 3-50**).

O processo químico que determina a ligação da lisozima ao seu substrato é o mesmo no qual a interação do anticorpo com seu antígeno se baseia – a formação de múltiplas ligações

Figura 3-50 Reação catalisada pela lisozima. (A) A enzima lisozima (E) catalisa a quebra de uma cadeia polissacarídica, que é o seu substrato (S). A enzima inicialmente se liga à cadeia, formando um complexo enzima-substrato (ES) e então catalisa a clivagem de uma ligação covalente específica da cadeia principal do polissacarídeo, formando um complexo enzima-produto (EP), que rapidamente se dissocia. A liberação da cadeia polissacarídica clivada (os produtos P) deixa a enzima livre para agir sobre outra molécula de substrato. (B) Modelo de preenchimento espacial da molécula de lisozima ligada a uma cadeia polissacarídica curta antes da clivagem. (B, cortesia de Richard J. Feldmann.)





não-covalentes. No entanto, a lisozima segura o seu substrato polissacarídico de uma maneira particular, distorcendo um dos açúcares da ligação que será rompida da sua conformação normal e mais estável. A ligação a ser rompida também é posicionada na proximidade de dois aminoácidos com cadeias laterais ácidas (um ácido glutâmico e um ácido aspártico) localizados no sítio ativo.

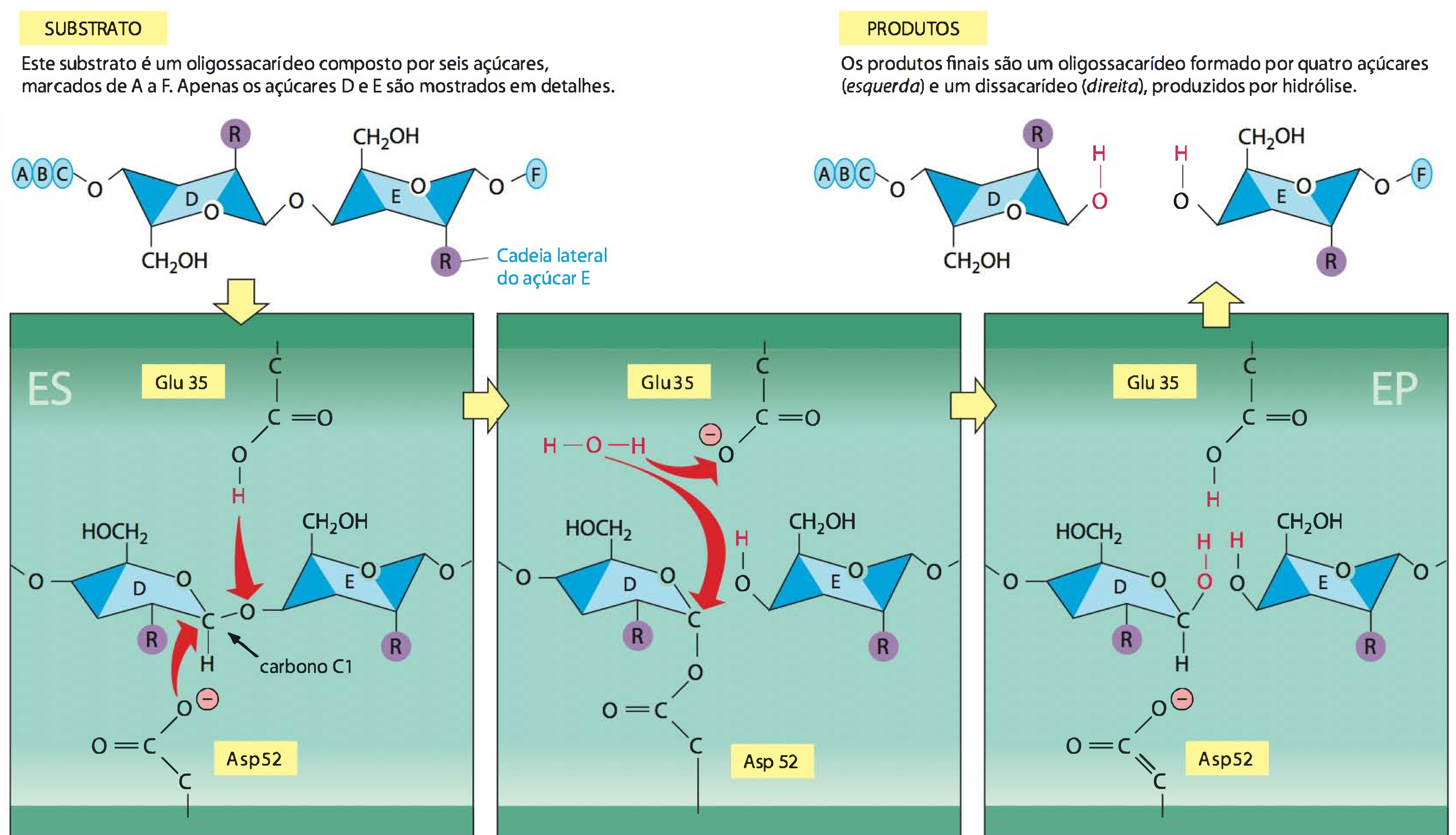
São assim criadas condições, dentro do microambiente do sítio ativo da lisozima, que reduzem bastante a energia de ativação necessária para que ocorra a hidrólise. A **Figura 3-51** mostra três etapas centrais nessa reação catalisada enzimaticamente.

1. A enzima "estica" a molécula do substrato ligado a ela, de modo que a forma de um dos açúcares se pareça mais com a forma do estado de transição de alta energia formado durante a reação.
2. O ácido aspártico negativamente carregado reage com o átomo de carbono C1 no açúcar destorcido, e o ácido glutâmico doa o seu próton para o oxigênio que liga esse açúcar ao açúcar adjacente. Isso promove o rompimento da ligação açúcar-açúcar e deixa a cadeia lateral do ácido aspártico covalentemente ligada ao sítio de clivagem da ligação.
3. Auxiliada pelo ácido glutâmico negativamente carregado, a molécula de água reage com o átomo de carbono C1, deslocando a cadeia lateral do ácido aspártico, completando o processo de hidrólise.

A reação química completa, que vai da ligação inicial de polissacarídeos na superfície da enzima até a liberação final de cadeiais separadas, ocorre milhões de vezes mais rápido do que ocorreria na ausência da enzima.

Outras enzimas utilizam mecanismos similares para reduzir a energia de ativação e acelerar as reações que elas catalisam. Em reações que envolvem dois ou mais reagentes, o sítio ativo atua como um molde, posicionando as moléculas de substrato na orientação apropriada para que a reação entre elas possa ocorrer (**Figura 3-52**A). Como vimos no caso da liso-

Figura 3-51 Eventos no sítio ativo da lisozima. Os desenhos localizados no canto superior esquerdo e direito representam o substrato e o produto livres, respectivamente, enquanto os outros três desenhos mostram a sequência de eventos no sítio ativo da enzima. Observe a mudança na conformação do açúcar D no complexo enzima-substrato; essa mudança na conformação estabiliza o estado de transição tipo íon oxocarbênio necessário para a formação e a hidrólise do intermediário covalente mostrado no painel central. Também é possível que um intermediário íon carbônio seja formado na etapa 2, uma vez que o intermediário covalente mostrado no painel do meio só foi detectado com substratos sintéticos. (Com base em D. J. Vocadlo et al., *Nature* 412:835-838, 2001.)

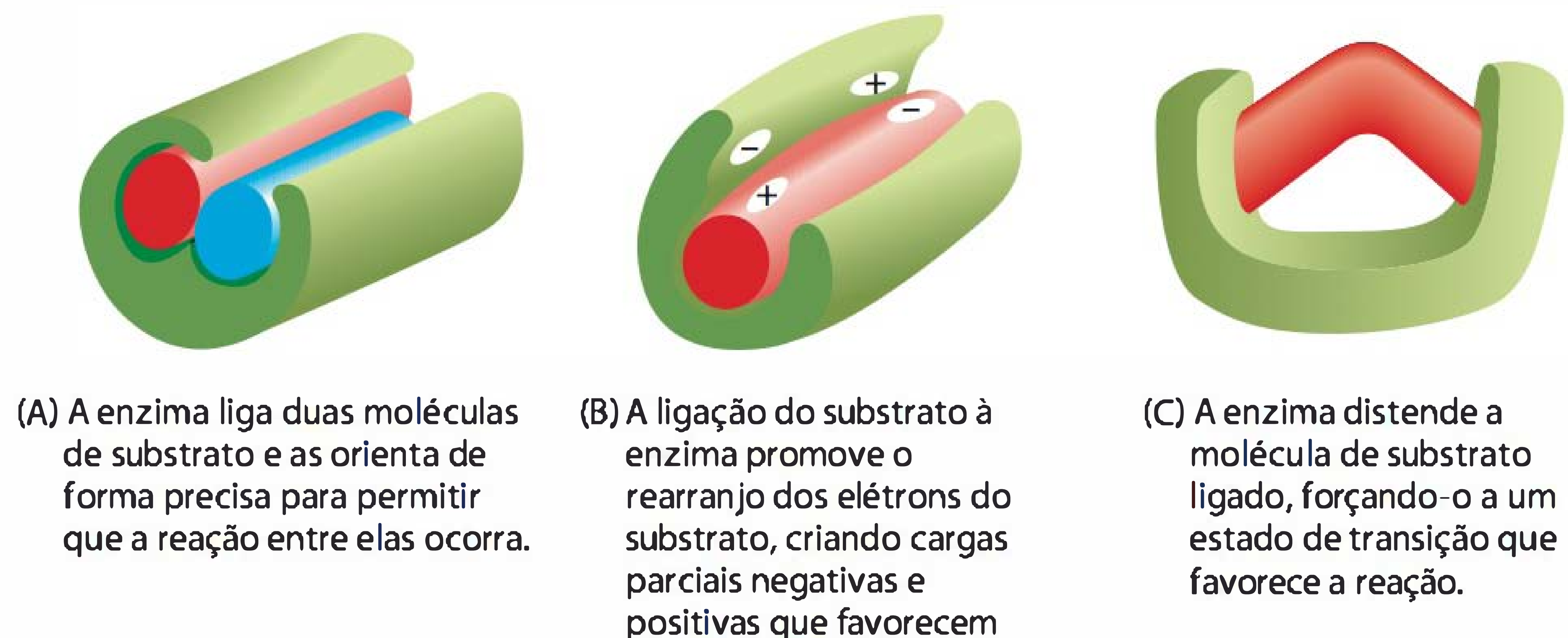


No complexo enzima-substrato (ES), a enzima força o açúcar D a assumir uma conformação estendida, com o resíduo Glu 35 da lisozima posicionado de modo a servir como um ácido que ataca a ligação açúcar-açúcar adjacente, doando um próton (H^+) ao açúcar E, e Asp 52 posicionado de modo a atacar o átomo de carbono C1.

O resíduo Asp 52 forma uma ligação covalente entre a enzima e o átomo de carbono C1 do açúcar D. O resíduo Glu 35 polariza então uma molécula de água (*vermelho*), de forma que o seu átomo de oxigênio possa atacar rapidamente o átomo de carbono C1 e liberar o resíduo Asp 52.

A reação com a molécula de água (*vermelho*) completa a hidrólise e restaura a enzima ao seu estado inicial, formando o complexo final enzima-produto (EP).

Figura 3-52 Algumas estratégias gerais da catálise enzimática. (A) Substratos mantidos juntos em um alinhamento preciso. (B) Estabilização de cargas dos intermediários da reação. (C) Aplicação de forças que distorcem as ligações do substrato e aumentam a velocidade de uma reação específica.



zima, o sítio ativo de uma enzima contém átomos precisamente posicionados que aceleram a reação através de grupos carregados que alteram a distribuição de elétrons nos substratos (Figura 3-52B). Além disso, quando um substrato se liga à enzima, as ligações na molécula de substrato frequentemente são distorcidas, alterando a conformação do substrato. Essas alterações, juntamente com forças mecânicas, direcionam o substrato para um estado de transição particular (Figura 3-52C). Finalmente, tal como a lisozima, muitas enzimas participam intimamente na reação por formarem brevemente uma ligação covalente entre o substrato e uma cadeia lateral da enzima. Etapas subsequentes da reação restauram a cadeia lateral de volta ao seu estado original de maneira que a enzima permanece inalterada ao final da reação (ver Figura 2-72).

Pequenas moléculas que se ligam fortemente às proteínas lhes conferem novas funções

Apesar de termos enfatizado a versatilidade das proteínas como cadeias de aminoácidos que desempenham diferentes funções, há diversas ocasiões em que os aminoácidos por si próprios não são suficientes para tanto. Assim como os homens empregam ferramentas para melhorar e estender a capacidade de suas mãos, também as proteínas frequentemente utilizam pequenas moléculas não-proteicas no desempenho de funções que seriam difíceis ou impossíveis de serem executadas somente com os aminoácidos. Assim, a proteína receptora de sinais *rodopsina* – que é produzida por células fotorreceptoras da retina detecta luz por meio de uma molécula pequena, o *retinal*, que fica embebida na proteína (**Figura 3-53**A). O retinal muda de forma quando absorve um fóton de luz, e essa mudança faz com que a proteína desencadeie uma cascata de reações enzimáticas, eventualmente culminando com um sinal elétrico enviado para o cérebro.

Outro exemplo de proteína que contém uma porção não-proteica é a hemoglobina (ver Figura 3-22). A molécula de hemoglobina carrega quatro grupos *heme*, moléculas em forma de anel, cada uma com um átomo de ferro no centro (Figura 3-53B). O heme dá à hemoglobina (e ao sangue) a cor vermelha. Por ligar-se reversivelmente ao oxigênio gasoso por meio do átomo de ferro, o heme possibilita que a hemoglobina capture oxigênio nos pulmões e o libere nos tecidos.

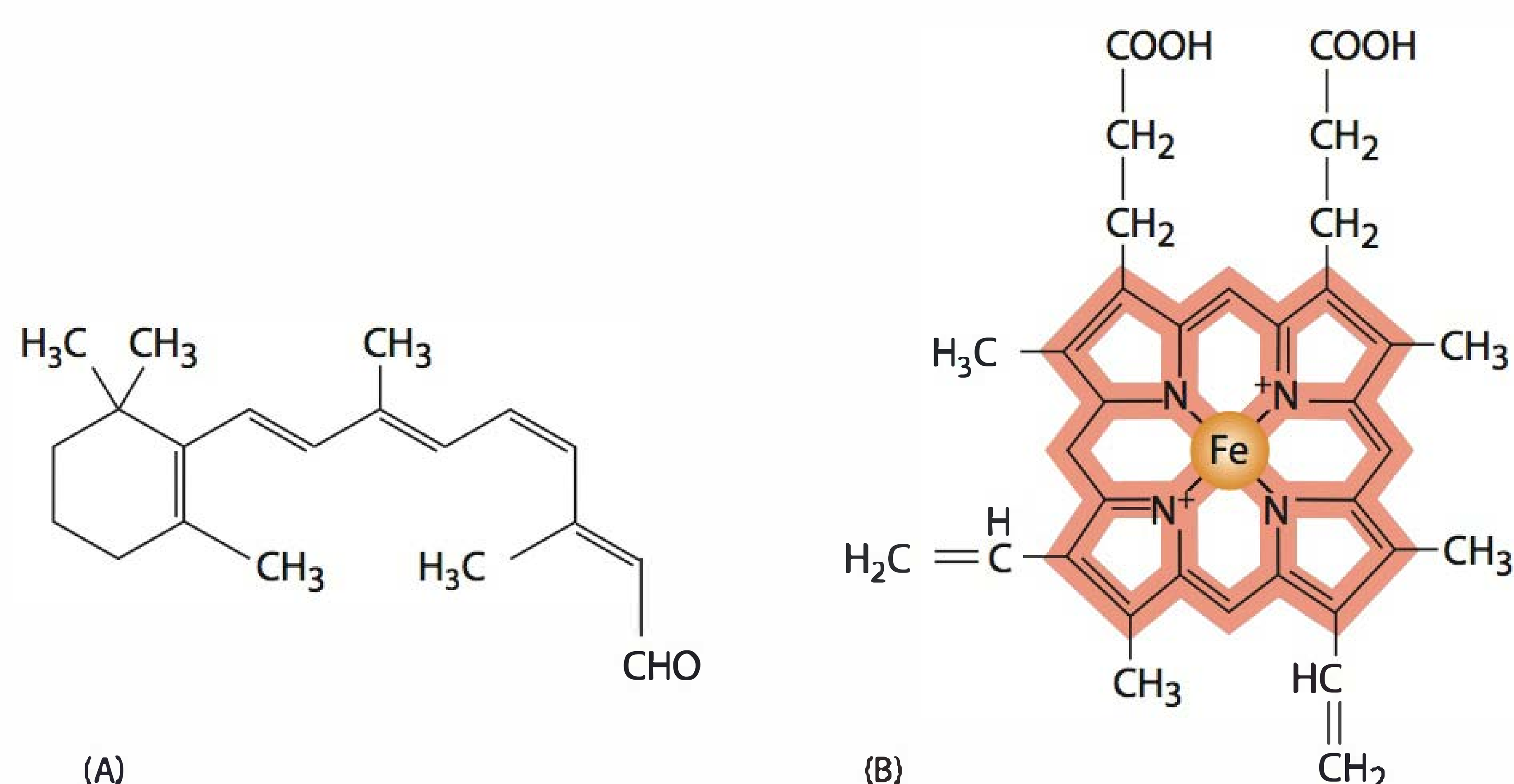


Figura 3-53 Retinal e heme. (A) Estrutura do retinal, a molécula sensível à luz ligada à rodopsina nos olhos. (B) Estrutura do grupo heme. O anel de carbono que contém o heme é mostrado em *vermelho*, e o átomo de ferro no centro é mostrado em *laranja*. O grupo heme é fortemente ligado a cada uma das quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina, a proteína carregadora de oxigênio cuja estrutura é mostrada na Figura 3-22.

Tabela 3-2 Muitas vitaminas fornecem coenzimas fundamentais às células humanas

Vitamina	Coenzima	Reações catalisadas por enzimas e que requerem estas coenzimas
Tiamina (vitamina B_1)	Tiamina pirofosfato	Ativação e transferência de aldeídos
Riboflavina (vitamina B_2)	FADH	Oxidação-redução
Niacina	NADH, NADPH	Oxidação-redução
Ácido pantotênico	Coenzima A	Ativação de grupos acil e transferência
Piridoxina	Piridoxal fosfato	Ativação de aminoácidos e também fosforilação do glicogênio
Biotina	Biotina	Ativação de CO_2 e transferência
Ácido lipoico	Lipoamida	Ativação de grupos acil e oxidação-redução
Ácido fólico	Tetraidrofolato	Ativação e transferência de grupos carbono simples
Vitamina B_{12}	Coenzima cobalamina	Isomerização e transferência de grupos metil

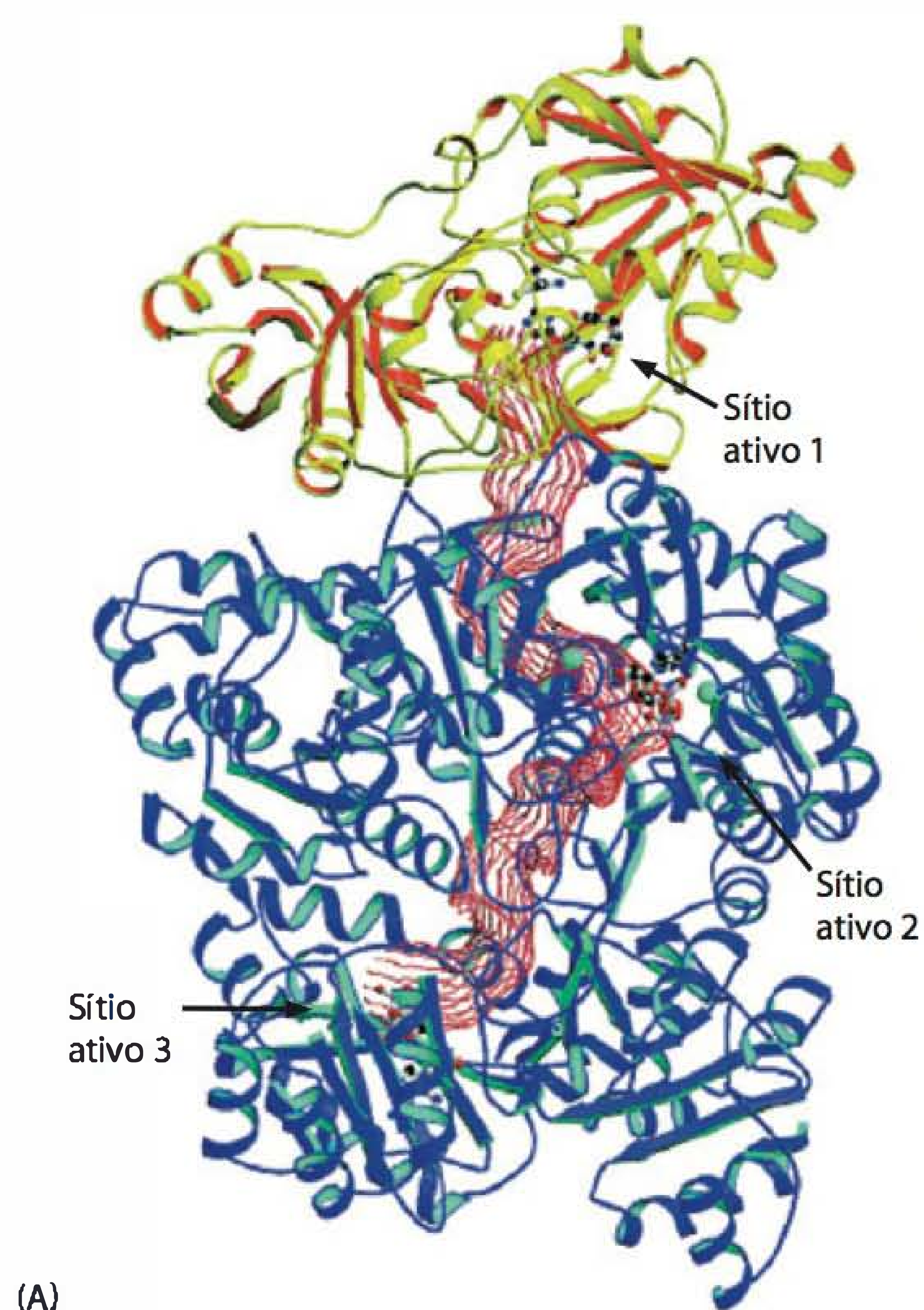
Algumas vezes essas pequenas moléculas estão ligadas covalente e permanentemente às suas proteínas, tornando-se parte integrante da própria molécula proteica. Veremos no Capítulo 10 que as proteínas frequentemente se ancoram à membrana celular por intermédio de moléculas lipídicas covalentemente ligadas. As proteínas de membrana expostas na superfície da célula, bem como proteínas secretadas para fora da célula, frequentemente são modificadas por adição covalente de açúcares e de oligossacarídeos.

As enzimas muitas vezes possuem pequenas moléculas ou átomos de metal fortemente associados ao seu sítio ativo que auxiliam a função catalítica. A *carboxipeptidase*, por exemplo, uma enzima que cliva cadeias polipeptídicas, possui um átomo de zinco fortemente ligado ao seu sítio ativo. Durante a clivagem de uma ligação peptídica pela carboxipeptidase, o íon de zinco forma uma ligação transitória com um dos átomos do substrato, auxiliando a reação hidrolítica. Em outras enzimas, uma pequena molécula orgânica tem propósitos similares. Tais moléculas orgânicas frequentemente são referidas como **coenzimas**. Um exemplo é a *biotina*, encontrada em enzimas que transferem um grupo carboxilato ($-COO^-$) de uma molécula para outra (ver Figura 2-63). A biotina participa dessas reações formando uma ligação covalente transitória com o grupo $-COO^-$ a ser transferido, sendo mais apropriada para essa função do que qualquer um dos aminoácidos utilizados para compor as proteínas. Uma vez que não pode ser sintetizada pelo homem e, portanto, deve ser suplementada em pequenas quantidades em nossa dieta, a biotina é uma *vitamina*. Muitas outras coenzimas são produzidas a partir das vitaminas (**Tabela 3-2**). Vitaminas também são necessárias para a síntese de outros tipos de pequenas moléculas que são componentes essenciais de nossas proteínas; a vitamina A, por exemplo, é necessária na nossa dieta para a síntese do retinal, o componente sensível à luz da rodopsina.

Túneis moleculares direcionam substratos em enzimas com múltiplos sítios catalíticos

Algumas das reações químicas catalisadas pelas enzimas nas células produzem intermediários que são muito instáveis, ou que podem se difundir para fora da célula através da membrana plasmática se liberados no citosol. Para preservar esses intermediários, as enzimas evoluíram *túneis moleculares* que conectam dois ou mais sítios ativos, permitindo que um intermediário seja rapidamente processado em seu produto final – sem nunca deixar a enzima.

Considere, por exemplo, a enzima carbamoil fosfato-sintetase, que utiliza amônia derivada de glutamina, juntamente com duas moléculas de ATP, para converter bicarbonato (HCO_3^-) em carbamoil fosfato – um importante intermediário em diversas vias metabólicas (**Figura 3-54**). Essa enzima contém três sítios ativos bastante separados que são conectados uns aos outros por um túnel. A reação começa no sítio ativo 2, localizado no meio do túnel, onde ATP é utilizado para fosforilar (adicionar um grupo fosfato) ao bicarbonato, formando carboxifosfato. Essa reação induz a hidrólise da glutamina em ácido glutâmico, no sítio ativo 1, liberando amônia no túnel. A amônia se difunde imediatamente através da primeira metade do túnel até o sítio 2, onde reage com o carboxifosfato para formar carbamato. Esse intermediário instável se difunde então através da segunda metade no túnel até o sítio ativo 3, onde é fosforilado pelo ATP no produto final, carbamoil fosfato.



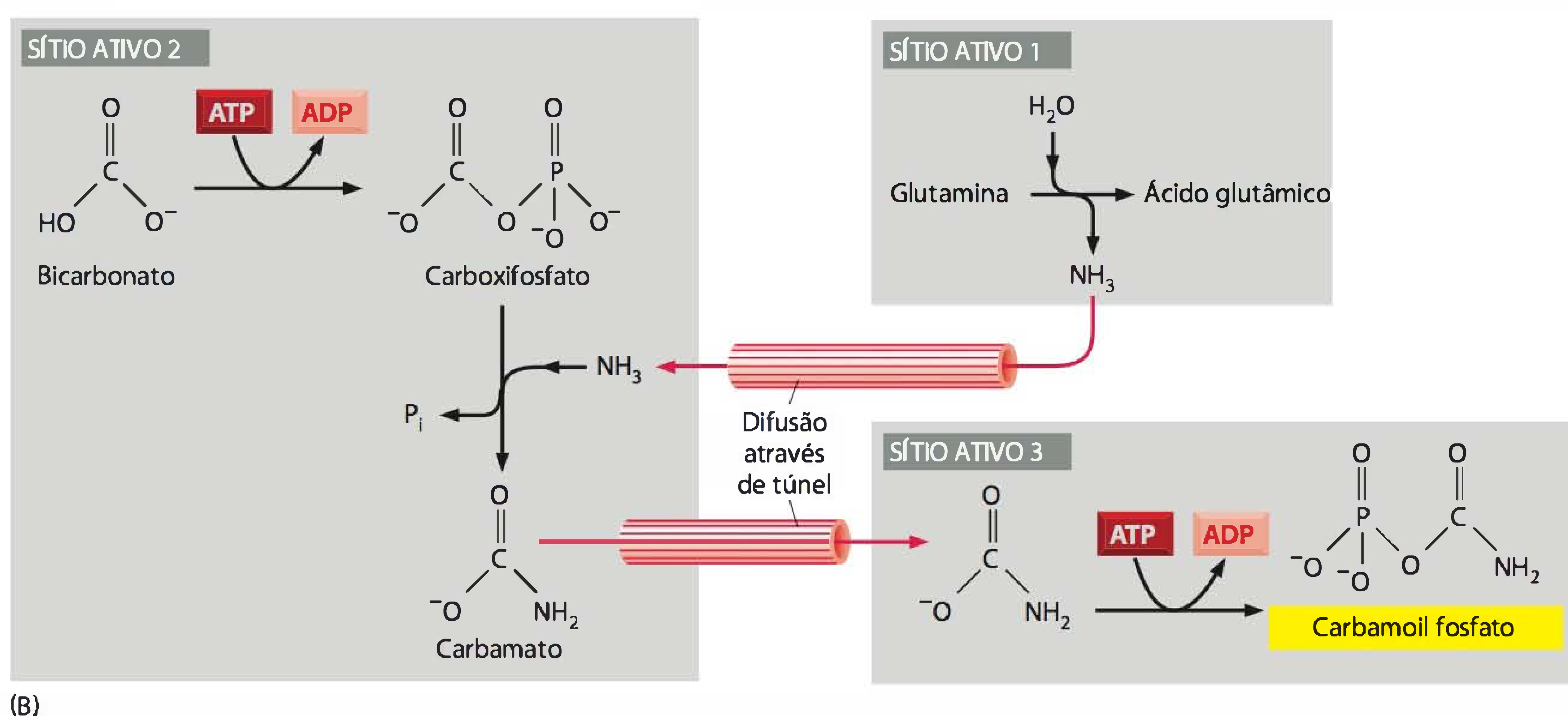


Figura 3-54 Direcionamento dos intermediários de reação na enzima carbamoil fosfato-sintetase. (A) Diagrama da estrutura da enzima, em que a faixa *vermelha* foi utilizada para delimitar o túnel no interior da proteína, conectando os três sítios ativos. As subunidades pequena e grande dessa enzima dimérica estão coloridas em *amarelo* e *azul*, respectivamente. (B) Caminho da reação. Conforme indicado, o sítio ativo 1 produz amônia, que se difunde até o sítio ativo 2, onde se combina com carboxifosfato para formar carbamato. Esse intermediário altamente instável difunde-se através do túnel até o sítio ativo 3, onde é fosforilado pelo ATP para produzir o produto final, carbamoil fosfato. (A, modificada de F. M. Raushel, J. B. Thoden e H. M. Holden, *Acc. Chem. Res.* 36:539-548, 2003. Com permissão da American Chemical Society.)

Muitas outras enzimas bem-caracterizadas contêm túneis moleculares similares. A amônia, um intermediário de difusão rápida que poderia de outra forma ser perdido pela célula, é o substrato mais comumente canalizado nos exemplos de túneis moleculares até então conhecidos.

Complexos multienzimáticos ajudam a aumentar a taxa de metabolismo celular

A eficiência das enzimas na aceleração de reações químicas é crucial para a manutenção da vida. As células, na verdade, precisam combater o inevitável processo de deterioração, o qual, se deixado sem cuidados, leva as macromoléculas a uma grande desordem. Se a taxa de reações favoráveis não for maior do que a taxa de reações colaterais (reações desfavoráveis), a célula pode morrer rapidamente. Uma ideia de como a taxa do metabolismo celular avança pode ser obtida pela medida da taxa de utilização de ATP. Uma célula de mamífero típica renova (isto é, realiza hidrólise e restauração por fosforilação), todo seu ATP intracelular uma vez a cada 1 ou 2 minutos. Para cada célula, essa renovação representa a utilização de aproximadamente 10^7 moléculas de ATP por segundo (ou, para o corpo humano, cerca de 1 g de ATP a cada minuto).

As taxas de reações nas células são rápidas devido à eficiência da catálise enzimática. Muitas enzimas importantes se tornaram tão eficientes que não há como melhorá-las. O fator que limita a taxa de reação não é a velocidade intrínseca da ação enzimática, mas a frequência com que as enzimas formam complexos com seus substratos. Tais reações são ditas *limitadas pela difusão* (ver Painel 3-3, p. 162-163).

Se uma reação catalisada por uma enzima é limitada pela difusão, sua taxa depende de ambas as concentrações, da enzima e do substrato. Se uma sequência de reações deve ocorrer de maneira extremamente rápida, cada intermediário metabólico e enzima envolvida deve estar presente em altas concentrações. Entretanto, dado o grande número de diferentes reações que ocorrem nas células, há um limite para a concentração que pode ser alcançado. De fato, a maioria dos metabólitos está presente em concentrações micromolares (10^{-6} M), e a maioria das enzimas está presente em concentrações ainda mais baixas. Como é possível, desse modo, manter a taxa metabólica bastante rápida?

A resposta está na organização espacial dos componentes da célula. A célula pode aumentar as taxas de reações sem acréscimo da concentração de substratos pela aproximação das várias enzimas envolvidas em uma sequência de reações, formando um grande conjunto de enzimas conhecido como *complexo multienzimático* (**Figura 3-55**). Como isso permite que o produto da enzima A passe diretamente para a enzima B e assim por diante, a taxa de difusão não é limitante, mesmo quando a concentração de substrato é bastante baixa na célula como um todo. Assim talvez não seja surpreendente que tais complexos enzimáticos sejam tão comuns e estejam envolvidos em aproximadamente todos as aspectos do metabolismo – incluindo os processos genéticos centrais, como o processamento do DNA, do RNA e a síntese de proteínas. De fato, poucas enzimas das células eucarióticas se difundem livremente em solução; em vez disso, a maioria parece ter desenvolvido sítios de ligação que as concentram junto a outras proteínas de funções parecidas, em determinadas regiões da célula, aumentando, assim, a taxa e a eficiência das reações que elas catalisam.

As células eucarióticas ainda possuem outra maneira de aumentar a taxa de reações metabólicas, utilizando seu sistema de membranas intracelular. Essas membranas podem segregar substratos particulares e enzimas que agem sobre eles dentro do mesmo compartimento delimitado, como o retículo endoplasmático ou o núcleo celular. Se, por exemplo, um compartimento ocupa um total de 10% do volume da célula, a concentração de reagentes no compartimento pode ser aumentada 10 vezes, comparada à mesma célula com o mesmo número de moléculas de enzima e de substrato, mas não-compartimentada. As reações que de outra forma seriam limitadas pela velocidade de difusão podem, desse modo, ser aceleradas por um fator de 10.

A célula regula a atividade catalítica de suas enzimas

As células contêm milhares de enzimas, muitas das quais operam simultaneamente no pequeno volume do citosol. Por suas funções catalíticas, as enzimas geram uma complexa rede de vias metabólicas, cada qual composta de uma sequência de reações químicas na qual o produto de uma enzima torna-se o substrato da próxima. Nesse labirinto de vias, existem muitos pontos de ramificação em que diferentes enzimas competem pelo mesmo substrato. O sistema é tão complexo (ver Figura 2-88) que são necessários controles elaborados para regular quando e em que velocidade cada reação deve ocorrer.

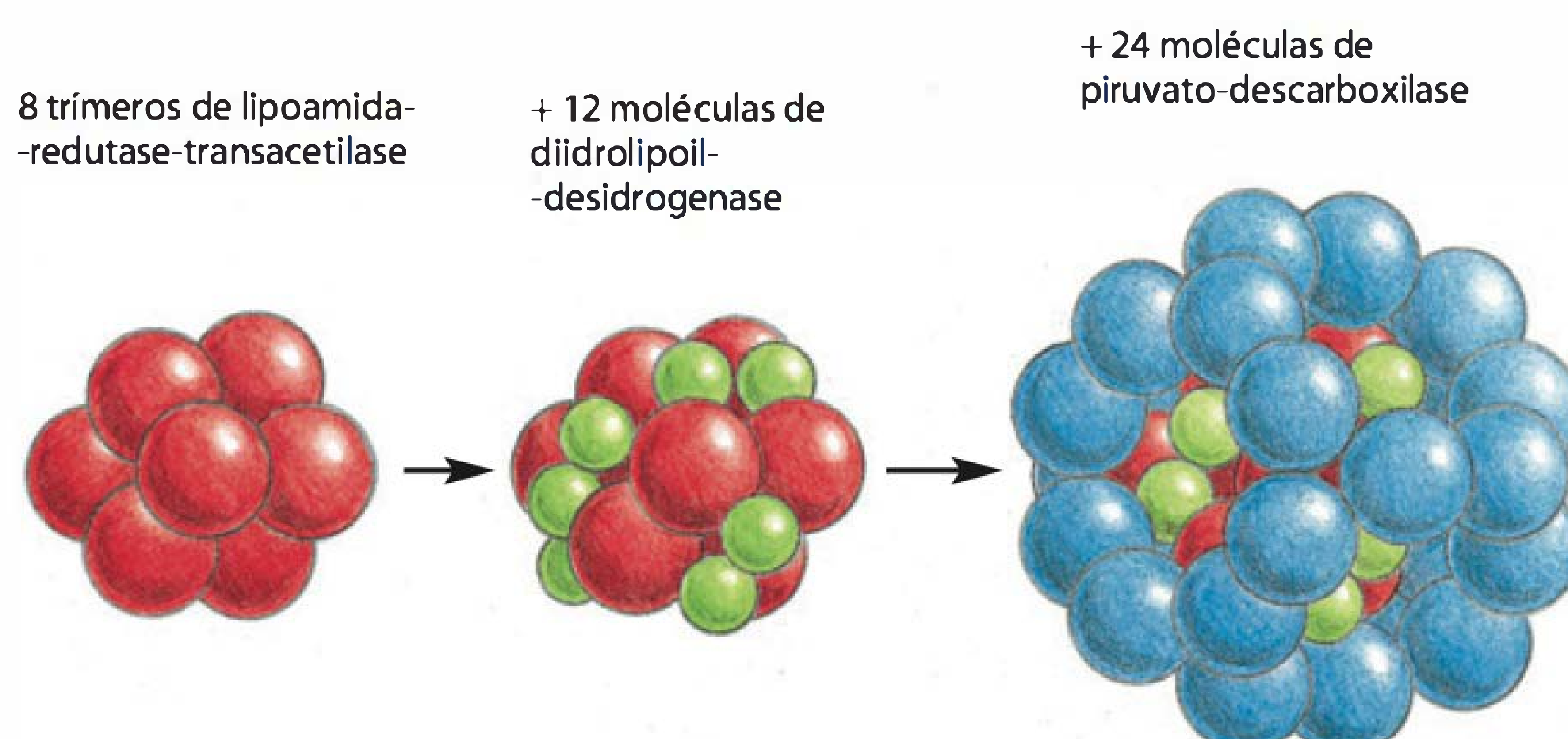


Figura 3-55 Estrutura da piruvato-desidrogenase. Esse complexo enzimático catalisa a conversão do piruvato a acetil-CoA, como parte da via que oxida açúcares a CO_2 e a H_2O (ver Figura 2-79). É um exemplo de um grande complexo multienzimático em que os produtos intermediários da reação são transferidos diretamente de uma enzima para outra.

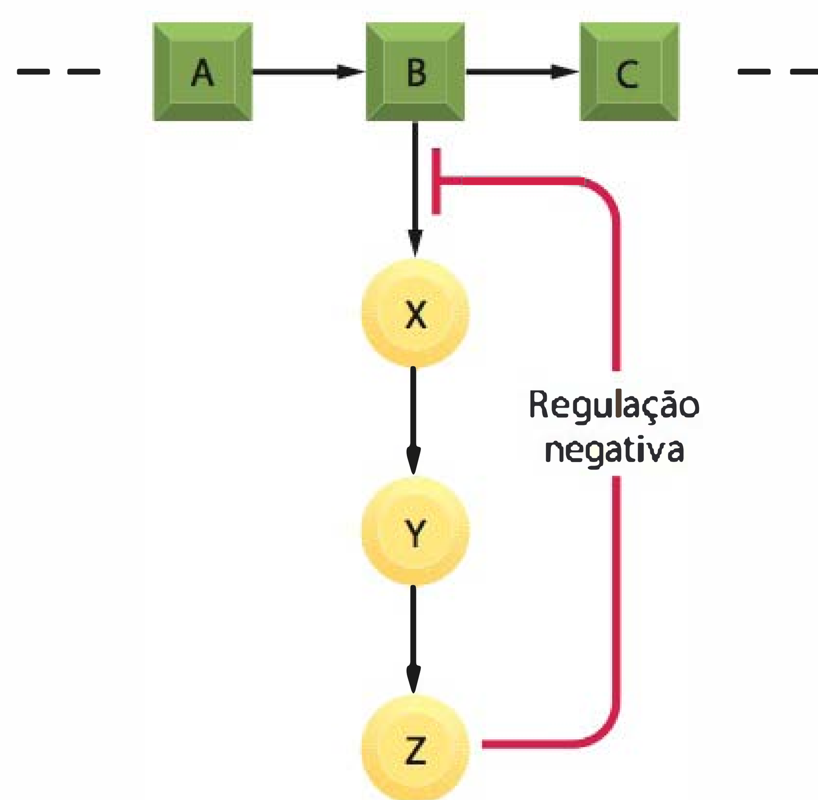


Figura 3-56 Inibição por retroalimentação de uma via biossintética simples. O produto final Z inibe a primeira enzima, que é fundamental na via de síntese, controlando o seu próprio nível na célula. Esse é um exemplo de regulação negativa.

A regulação ocorre em vários níveis. Em um nível, a célula controla quantas moléculas de cada enzima ela sintetiza, regulando a expressão do gene que codifica essa enzima (discutido no Capítulo 7). A célula também controla as atividades enzimáticas confinando conjuntos de enzimas em certos compartimentos celulares delimitados por membranas distintas (discutido nos Capítulos 12 e 14). Como será discutido mais adiante neste capítulo, as enzimas frequentemente são modificadas covalentemente para controlar suas atividades. A taxa de destruição de uma proteína pela sua marcação para proteólise representa outro mecanismo regulador importante (ver p. 395). No entanto, o modo mais geral de ajustar as velocidades das reações opera através de uma alteração direta e reversível na atividade de uma enzima em resposta a pequenas moléculas específicas que ela encontra.

O tipo mais comum de controle ocorre quando uma molécula diferente dos substratos liga-se a uma enzima em um sítio regulador especial fora do sítio ativo e, dessa maneira, altera a velocidade com que a enzima converte seu substrato em produto. Na **inibição por retroalimentação**, ou **retroalimentação negativa**, uma enzima atuando em uma etapa anterior em uma via metabólica é inibida por um produto posterior da mesma via. Assim, toda vez que grandes quantidades do produto final começam a se acumular, esse produto liga-se à enzima, diminuindo sua atividade catalítica e, assim, limitando o aporte de mais substratos na sequência de reações (**Figura 3-56**). Nos pontos de bifurcação ou de intersecção de vias metabólicas, geralmente existem múltiplos pontos de controle por diferentes produtos finais, cada qual atuando para regular a sua própria síntese (**Figura 3-57**). A inibição por retroalimentação pode funcionar quase instantaneamente, vendo rapidamente revertida quando o nível do produto diminui.

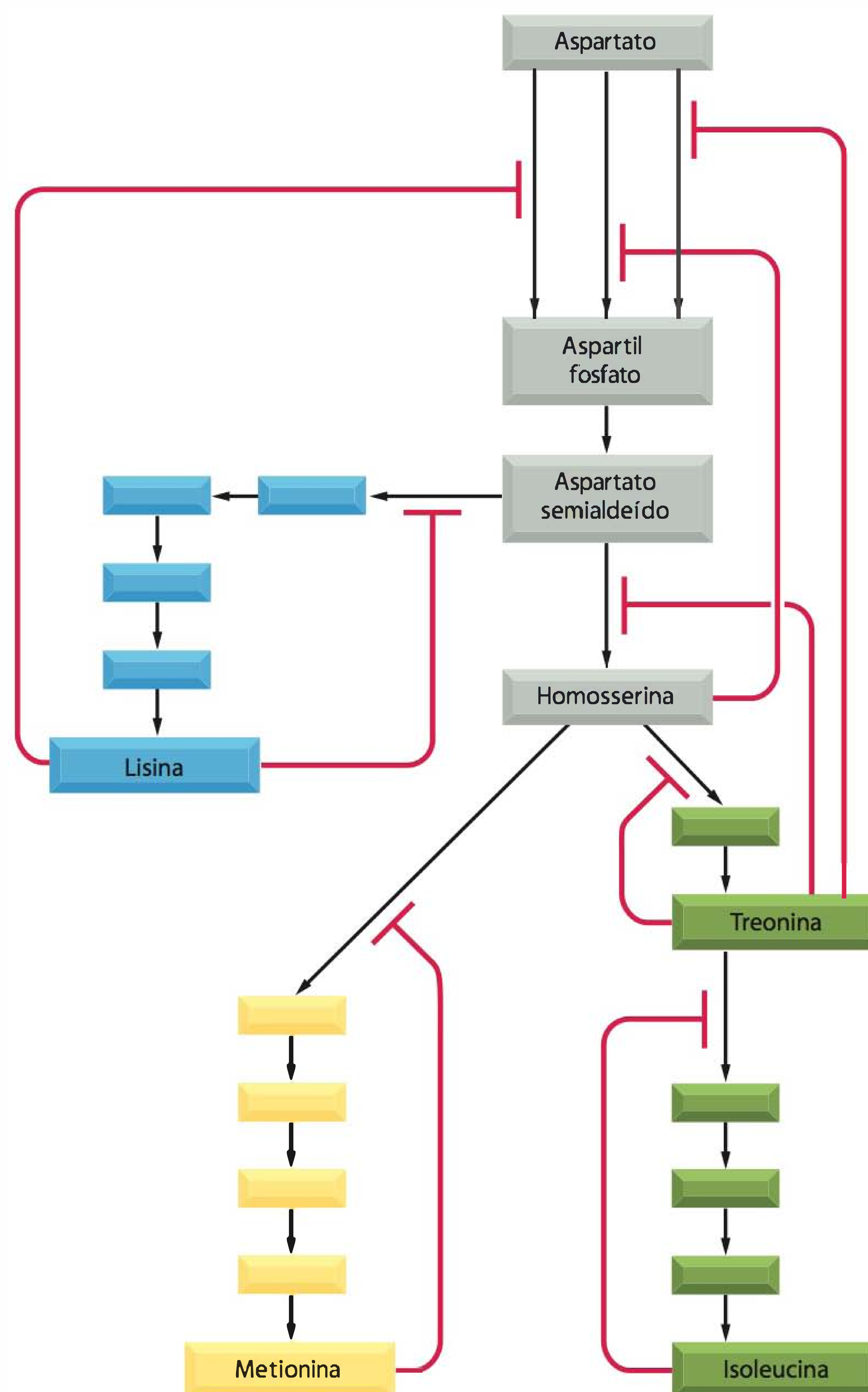


Figura 3-57 Múltipla inibição por retroalimentação. Nesse exemplo, que mostra as vias biossintéticas de quatro diferentes aminoácidos em bactéria, as *flechas vermelhas* indicam as posições nas quais os produtos inibem as enzimas por retroalimentação. Cada aminoácido controla a primeira enzima específica para sua própria síntese, controlando, assim, o seu próprio nível e evitando o acúmulo desnecessário, e mesmo perigoso, de intermediários. Os produtos também podem inibir separadamente o conjunto inicial de reações comuns para todas as sínteses; nesse caso, três diferentes enzimas catalisam a reação inicial, cada qual sendo inibida por um produto diferente.

A inibição por retroalimentação é uma *regulação negativa*: ela impede uma enzima de atuar. No entanto, as enzimas também podem ser alvo de uma *regulação positiva*, na qual a atividade enzimática é estimulada por uma molécula reguladora, em vez de ser inibida. A regulação positiva ocorre quando um produto de uma via da rede metabólica estimula a atividade de uma enzima de uma outra via. Como exemplo, o acúmulo de difosfato de adenosina (ADP, *adenosine diphosphate*) ativa várias enzimas envolvidas com a oxidação de moléculas de açúcar, estimulando, assim, a célula a converter mais ADP em ATP.

Enzimas alostéricas possuem dois ou mais sítios de ligação interativos

Um aspecto intrigante da regulação por retroalimentação positiva e negativa é que a molécula reguladora com frequência tem uma forma totalmente diferente daquela do substrato da enzima. Por esse motivo, essa forma de regulação é denominada *alosteria* (do grego *allos*, outro, e *stereos*, sólido ou tridimensional). À medida os que biólogos aprenderam mais sobre a regulação, eles reconheceram que as enzimas envolvidas devem ter pelo menos dois sítios de ligação diferentes em sua superfície – um **sítio ativo**, que reconhece os substratos, e um **sítio regulador**, que reconhece uma molécula reguladora. Esses dois sítios devem comunicar-se de modo a permitir que os eventos catalíticos no sítio ativo sejam influenciados pela ligação da molécula reguladora ao seu próprio sítio, na superfície da proteína.

A interação entre os diferentes sítios de uma molécula proteica depende de uma *mudança conformacional* da proteína: a ocupação de um sítio faz a molécula passar de uma forma de enovelamento para uma outra ligeiramente diferente. Durante a inibição por retroalimentação, por exemplo, a ligação de um inibidor em um sítio da proteína faz com que ela mude para uma conformação na qual seu sítio ativo – localizado em outra parte da proteína – se torne incapacitado.

Aparentemente, a maioria das moléculas proteicas é alostérica. Elas podem adotar duas ou mais conformações ligeiramente diferentes, e a passagem de uma para a outra, causada pela ligação de um ligante, pode alterar sua atividade. Isso vale não apenas para enzimas, mas também para várias outras proteínas, inclusive receptores, proteínas estruturais e proteínas motoras. Em todas as instâncias da regulação alostérica, cada conformação da proteína apresenta diferenças nos contornos da superfície da molécula; os seus sítios de ligação são alterados quando a forma da proteína é modificada. Além disso, como discutiremos a seguir, cada ligante estabiliza a conformação à qual ele se liga mais fortemente e, assim, em concentrações suficientemente altas, ele tenderá a induzir a mudança da proteína para a sua conformação preferida.

Dois ligantes cujos sítios de ligação estão acoplados devem afetar reciprocamente a ligação um do outro

O efeito da ligação de um ligante em uma proteína segue um princípio fundamental da química conhecido como **ligação**. Suponha, por exemplo, que uma proteína que liga glicose também ligue outra molécula, X, em um sítio distante da sua superfície. Se o sítio de ligação para X mudar de forma, devido a uma mudança conformacional induzida pela ligação da glicose, o sítio de ligação de X e o da glicose são considerados *acoplados*. Sempre que dois ligantes preferem se ligar à *mesma* conformação de uma proteína alostérica, segundo os princípios básicos da termodinâmica, cada ligante deve aumentar a afinidade da proteína pelo outro ligante. Assim, se ocorre uma mudança na proteína da **Figura 3-58** para a conformação fechada que melhor liga a glicose, isso fará com que o sítio de ligação para X também ligue melhor a molécula X; então, a proteína ligará mais fortemente a glicose quando X está presente do que quando X está ausente.

Inversamente, a ligação recíproca pode operar de forma negativa quando dois ligantes preferem ligar-se a conformações *diferentes* de uma mesma proteína. Nesse caso, a ligação do primeiro ligante desencoraja a ligação do segundo ligante. Assim, se uma mudança da forma causada pela ligação da glicose diminui a afinidade de uma proteína pela molécula X, a ligação de X também deve diminuir a afinidade da proteína por glicose (**Figura 3-59**). Essa relação é quantitativamente recíproca, por exemplo, se a glicose tem um grande efeito sobre a ligação de X, e X também terá um grande efeito sobre a ligação da glicose.

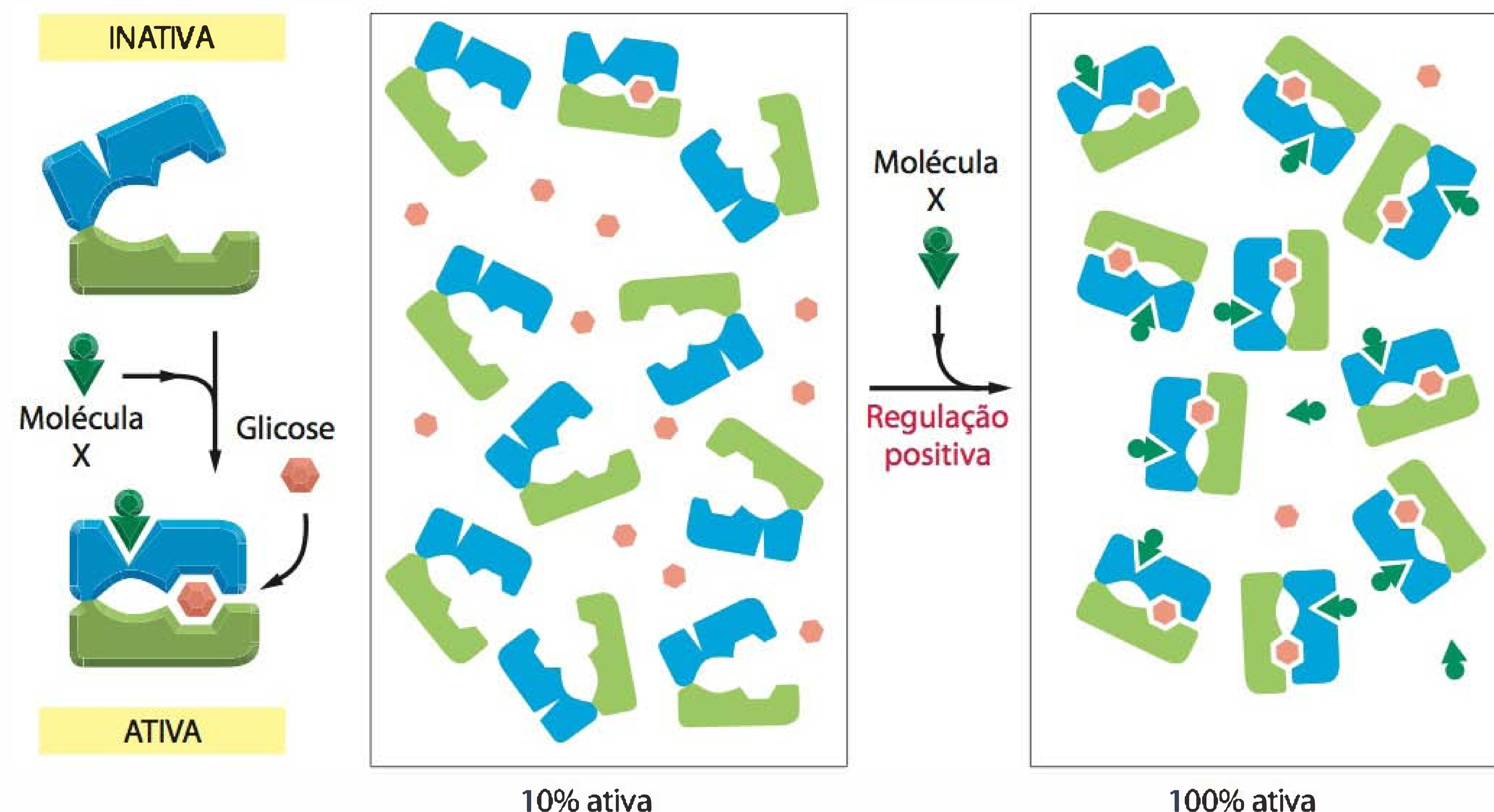


Figura 3-58 Regulação positiva causada pelo acoplamento conformacional entre dois sítios de ligação distantes. Nesse exemplo, tanto a glicose quanto a molécula X se ligam melhor à conformação *fechada* da proteína constituída de dois domínios. Como tanto a glicose quanto a molécula X induzem uma alteração conformacional da proteína para a forma fechada, cada ligante ajuda o outro a se ligar. Portanto, é dito que a glicose e a molécula X se ligam *cooperativamente* à proteína.

As relações mostradas nas Figuras 3-58 e 3-59 se aplicam a todas as proteínas e fundamentam toda a biologia celular. Elas parecem tão óbvias, em retrospecto, que hoje as consideramos banais. Mas a descoberta da ligação recíproca a partir de estudos com algumas poucas enzimas, em 1950, seguida por uma análise extensiva dos mecanismos da alosteria nas proteínas, no início da década de 1960, foi revolucionária para nosso entendimento da biologia. Desde que a molécula X desses exemplos liga-se a um sítio distinto do sítio onde ocorre a catálise, necessariamente não há relação química com a glicose ou com qualquer outro ligante que se ligue no sítio ativo. Como já vimos, para enzimas que são reguladas dessa maneira, a molécula X pode tornar a enzima ativa (regulação positiva) ou inativa (regulação negativa). Por meio desse mecanismo, as **proteínas alostéricas** servem como chaves gerais que, em princípio, permitem que uma molécula em uma célula afete o destino de qualquer outra.

Agregados proteicos simétricos geram transições alostéricas cooperativas

Uma única subunidade enzimática regulada por uma retroalimentação negativa pode ter uma diminuição na sua atividade de 90% a 10% em resposta a um aumento de cem vezes na concentração de um inibidor (**Figura 3-60**, *linha vermelha*). Aparentemente, respostas desse tipo não são suficientes para uma ótima regulação da célula, e a maioria das enzimas é ligada ou desligada pela ligação de ligantes que consiste de associações simétricas de subunidades idênticas. Com essa organização, a ligação de uma molécula do ligante a um único sítio ativo de uma subunidade pode iniciar uma alteração alostérica em toda a associação proteica, ajudando as subunidades vizinhas a ligarem o mesmo ligante. Como resultado, ocorre uma *transição alostérica cooperativa* (Figura 3-60, *linha azul*), permitindo que uma alteração relativamente pequena na concentração do ligante na célula possa modificar a associação de proteínas como um todo, de uma conformação ativa a uma conformação quase que totalmente inativa (ou vice-versa).

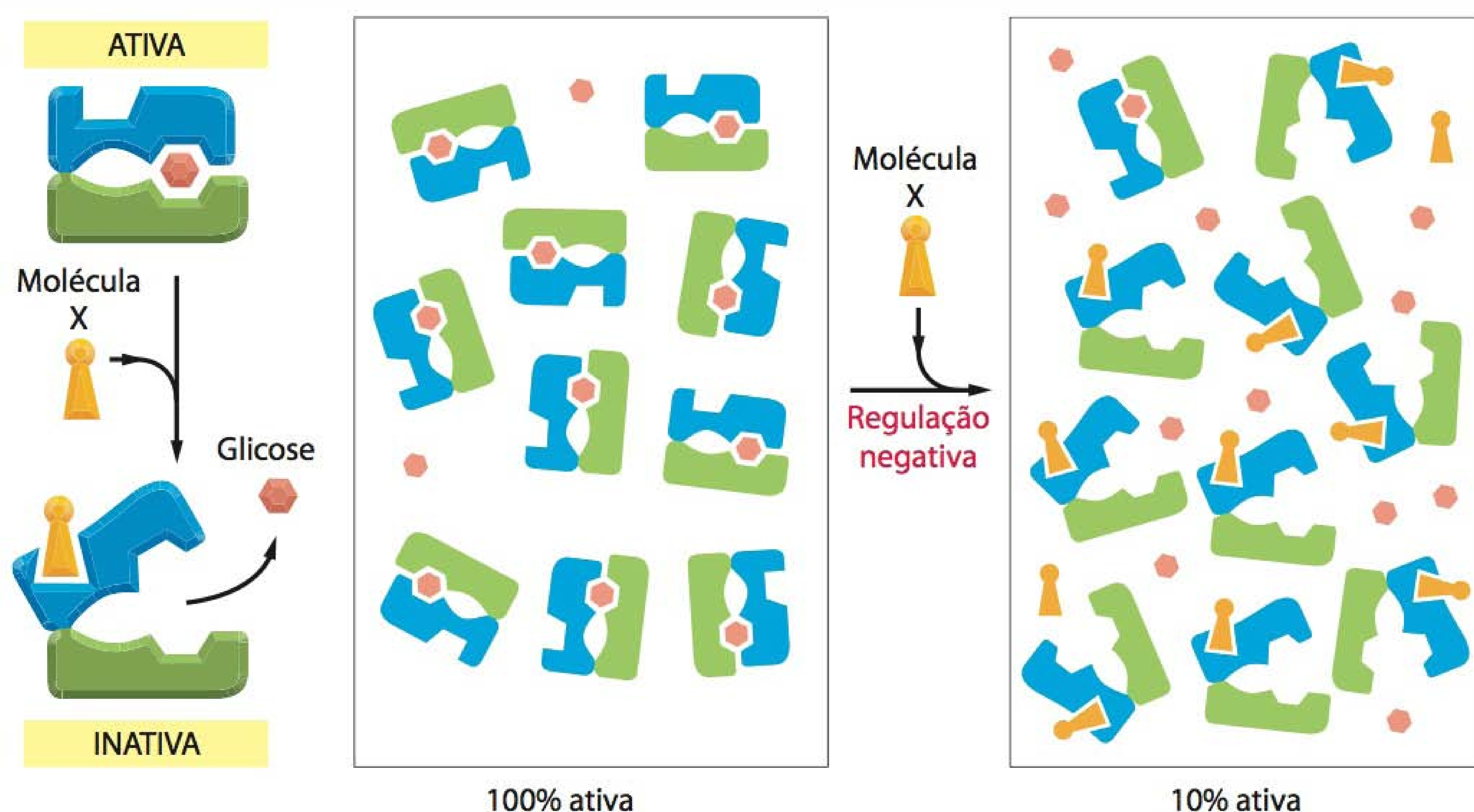


Figura 3-59 Regulação negativa causada pelo acoplamento conformacional entre dois sítios de ligação distantes. O esquema mostrado parece com o anterior, mas aqui a molécula X prefere a conformação *aberta*, enquanto a glicose prefere a conformação *fechada*. Como a glicose e a molécula X induzem alterações conformacionais opostas na enzima (fechada e aberta, respectivamente), a presença de um dos ligantes interfere na ligação do outro.

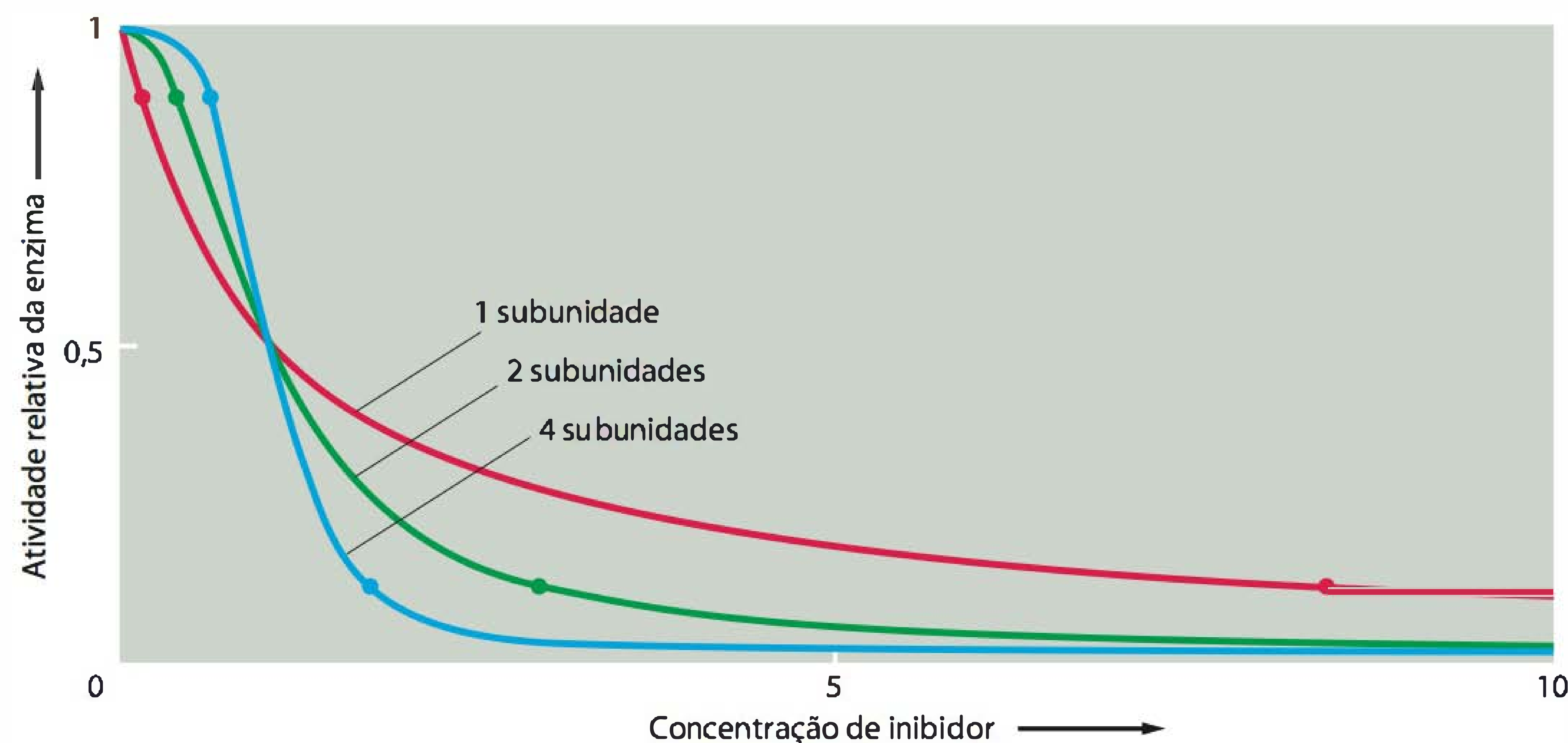


Figura 3-60 Atividade enzimática *versus* concentração do inibidor para enzimas alostéricas monoméricas e enzimas com múltiplas subunidades. Para uma enzima com uma única subunidade (*linha vermelha*), uma queda na atividade enzimática de 90 para 10% (indicada por dois pontos na curva) requer um aumento de cem vezes na concentração do inibidor. A atividade enzimática é calculada a partir da relação de equilíbrio $K = [IP]/[I][P]$, onde P é a proteína ativa, I é o inibidor, e IP é a proteína inativa ligada ao inibidor. Uma curva idêntica se aplica a qualquer interação de ligação entre duas moléculas A e B. Em contraste, uma enzima alostérica com múltiplas subunidades pode responder diferentemente a mudanças na concentração do ligante: a resposta abrupta é causada por uma ligação cooperativa de moléculas ligantes, como mostrado na Figura 3-61. Aqui, a *linha verde* representa o resultado ideal para a ligação cooperativa de duas moléculas ligantes inibitórias a uma enzima alostérica com duas subunidades, e a *linha azul* mostra o resultado ideal de uma enzima com quatro subunidades. Como indicado pelos dois pontos em cada curva, a atividade das enzimas mais complexas dimuinui de 90 para 10% com uma concentração bem menor do inibidor do que a enzima composta de uma única subunidade.

Os princípios envolvidos em uma transição cooperativa do tipo tudo-ou-nada são os mesmos para todas as proteínas, sejam elas enzimas ou não. Talvez eles sejam visualizados mais facilmente em uma enzima que forma um dímero simétrico. No exemplo mostrado na **Figura 3-61**, a primeira molécula de um inibidor agora liga-se com grande dificuldade, pois sua ligação desarranja a interação energeticamente favorável entre os dois monômeros idênticos do dímero. Entretanto, uma segunda molécula do inibidor agora liga-se mais facilmente, pois sua ligação restaura o contato monômero-monômero energeticamente favorável de um dímero simétrico (também inativa completamente a enzima).

Como alternativa a esse modelo de *encaixe induzido*, para a transição alostérica cooperativa, podemos considerar a enzima simétrica como possuindo duas conformações possíveis, correspondendo às conformações da enzima ativa e da enzima inativa na Figura 3-61. Nesse modelo, a ligação do ligante perturba o equilíbrio tudo-ou-nada entre esses dois estados, alterando portanto a proporção de moléculas ativas. Esses dois modelos representam conceitos verdadeiros e úteis; é o segundo modelo que descreveremos a seguir.

A transição alostérica na aspartato-transcarbamoilase é compreendida em nível atômico

Uma enzima utilizada nos primeiros estudos de regulação alostérica foi a aspartato-transcarbamoilase de *E. coli*. Essa enzima catalisa a importante reação que inicia a síntese do anel pirimídico dos nucleotídeos C, U e T: carbamoilfosfato + aspartato → *N*-carbamoilaspartato. Um dos produtos finais dessa via metabólica, trifosfato de citosina (CTP, *cytosine triphosphate*), liga-se à enzima para inibir sua atividade sempre que CTP for abundante.

A aspartato-transcarbamoilase é um grande complexo de seis subunidades reguladoras e seis subunidades catalíticas. As subunidades catalíticas formam dois trímeros, cada um organizado na forma de um triângulo equilátero; os dois trímeros, de frente um

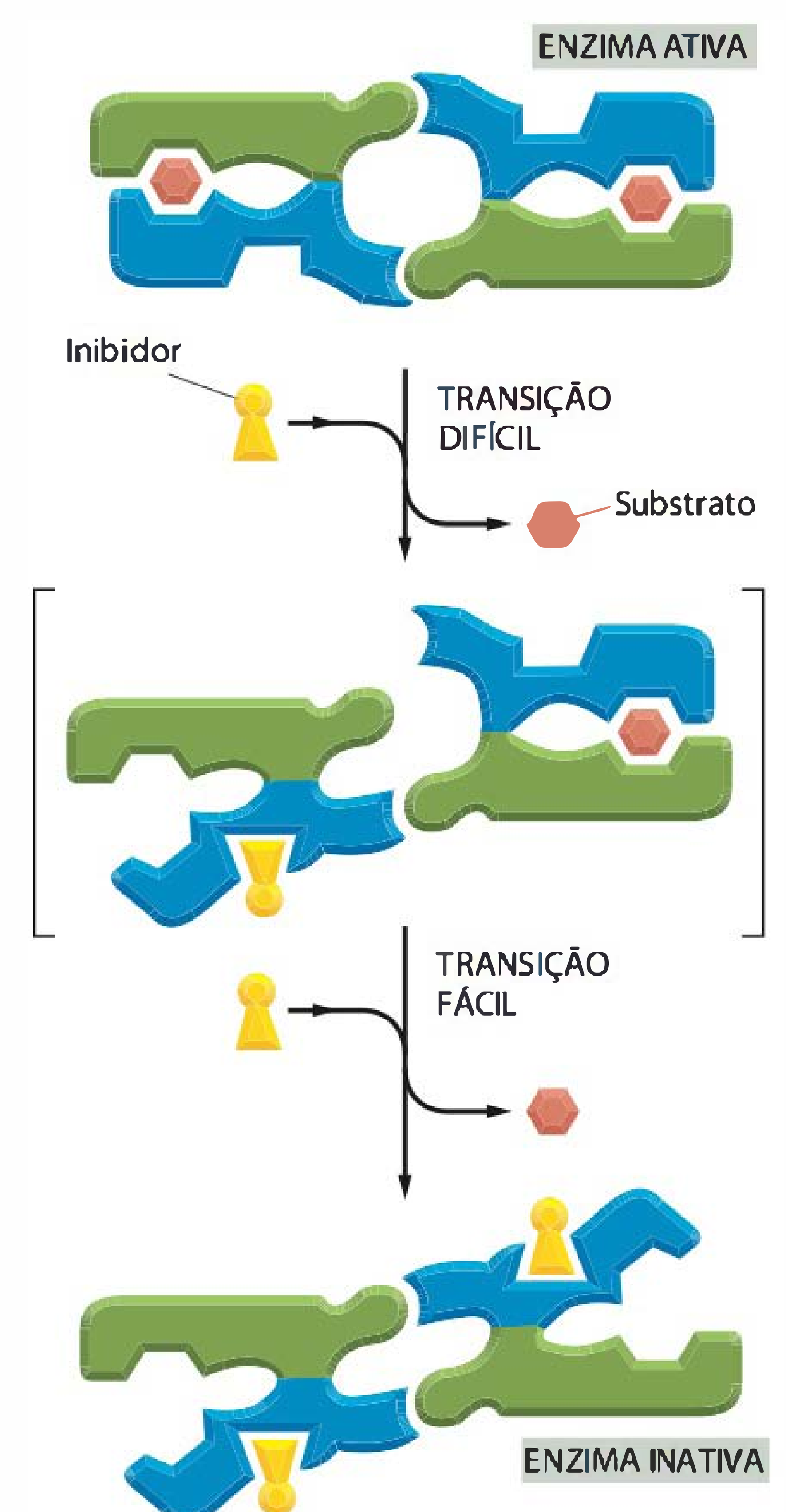


Figura 3-61 Transição alostérica cooperativa em uma enzima composta de duas subunidades idênticas. Esse diagrama ilustra como a conformação de uma subunidade pode influenciar a conformação da subunidade adjacente. A ligação de uma única molécula de um ligante inibidor (*amarelo*) a uma das subunidades da enzima ocorre com dificuldade, pois o inibidor muda a conformação dessa subunidade, destruindo a simetria da enzima. Uma vez que essa mudança de conformação tenha ocorrido, no entanto, o ganho de energia para restaurar o pareamento simétrico entre as duas subunidades torna especialmente fácil para a segunda subunidade ligar o segundo ligante inibidor e sofrer a mesma alteração conformacional. Como a ligação da primeira molécula do ligante aumenta a afinidade de ligação com que a outra subunidade liga o mesmo ligante, a resposta da enzima a mudanças na concentração do ligante será muito mais acentuada do que a resposta de uma enzima monomérica (ver Figura 3-60).

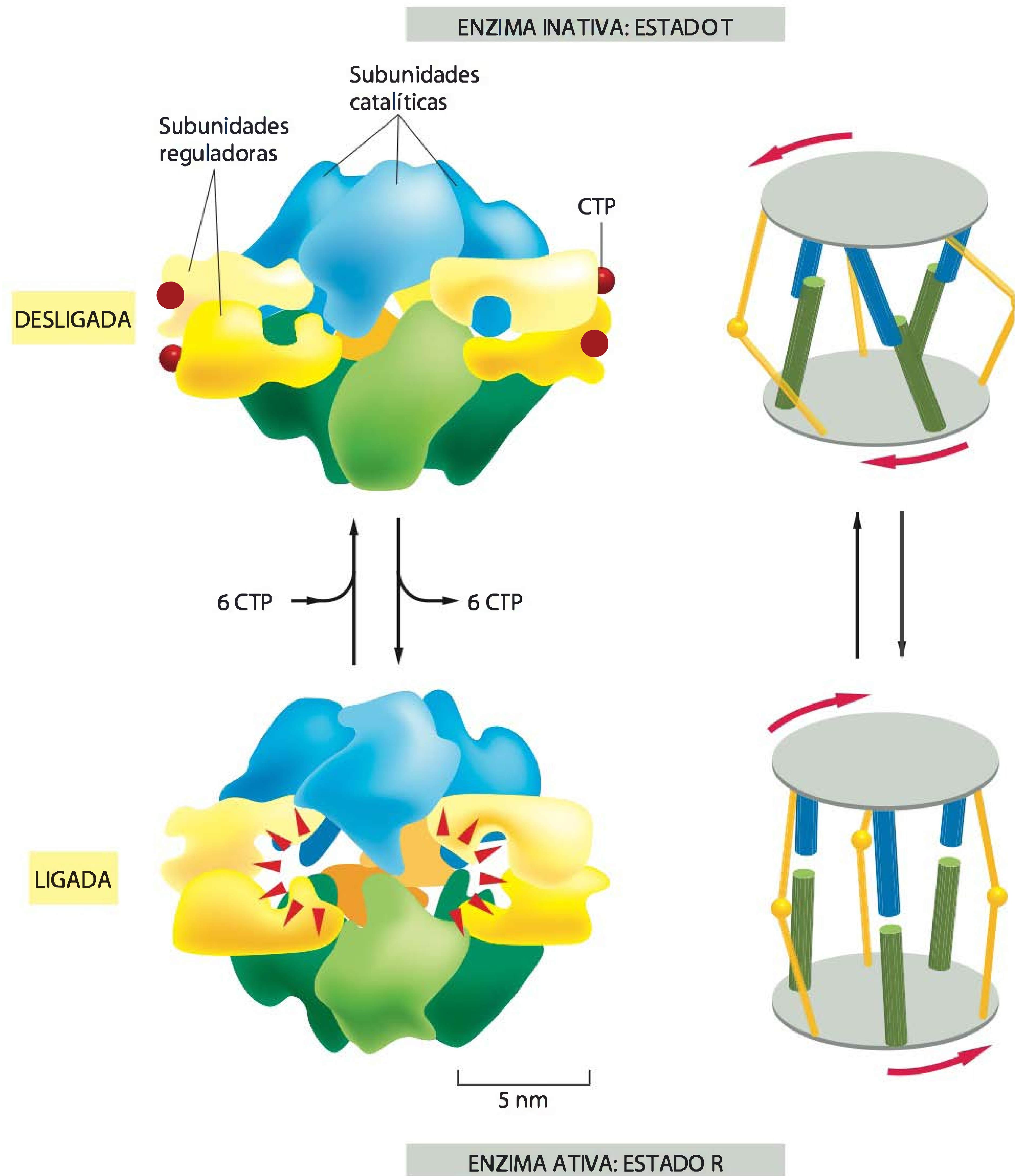


Figura 3-62 Transição entre os estados R e T na enzima aspartato-transcarbamoilase. A enzima consiste em um complexo de seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras, e as estruturas na sua forma inativa (estado T) e ativa (estado R) foram determinadas por cristalografia por difração de raios X. A enzima é desativada por retroalimentação negativa quando a concentração de CTP aumenta. Cada uma das subunidades regulatórias pode ligar uma molécula de CTP, que é um dos produtos finais da via biossintética. Por meio dessa regulação por retroalimentação negativa, evita-se que a via produza mais CTP do que necessário à célula. (Com base em K. L. Krause, K. W. Volz e W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1643-1647, 1985. Com permissão da National Academy of Sciences.)

para o outro, são unidos por três dímeros reguladores que formam uma ponte entre eles. A molécula inteira está em posição para iniciar uma transição alostérica coordenada do tipo tudo-ou-nada entre duas conformações, designadas como estados T (tenso) e R (relaxado) (**Figura 3-62**).

A ligação dos substratos (carbamoilfosfato e aspartato) nos trímeros catalíticos induz a aspartato-transcarbamoilase ao estado R cataliticamente ativo, no qual as moléculas de CTP reguladoras se dissociam. Em contraste, a ligação do CTP aos dímeros reguladores converte a enzima ao estado T inativo, no qual os substratos se dissociam. Essa disputa entre CTP e os substratos é idêntica, em princípio, àquela descrita previamente na Figura 3-59 para uma proteína monomérica alostérica. Entretanto, como essa estratégia ocorre em uma molécula simétrica com sítios múltiplos de ligação, a enzima precisa sofrer uma transição alostérica cooperativa que pode ativá-la subitamente à medida que o substrato se acumula (formando o estado R), ou pode torná-la rapidamente inativa, quando há o acúmulo de CTP (formando o estado T).

A combinação entre a bioquímica e a cristalografia de raios X tem revelado muitos detalhes fascinantes dessa transição alostérica. Cada subunidade reguladora tem dois domínios, e a ligação do CTP faz com que esses domínios se movam um em relação ao outro, de forma que funcionem como uma alavanca, girando os dois trímeros catalíticos, empurrando-os e aproximando-os para formar o estado T (ver Figura 3-62). Quando isso ocorre, são formadas ligações de hidrogênio entre as subunidades catalíticas opostas. Isso ajuda a alargar a fenda que forma o sítio ativo em cada subunidade catalítica, destruindo, portanto, o sítio de ligação para os substratos (**Figura 3-63**). A adição de grandes quantidades de substrato tem um efeito oposto, favorecendo o estado R pela ligação na fenda de cada subunidade catalítica e se opondo à mudança conformacional acima. Conformações intermediárias entre R e T são instáveis, de modo que a enzima vai e volta entre as formas R e T, produzindo uma mistura dessas duas espécies em proporções que dependem das concentrações relativas de CTP e substratos.

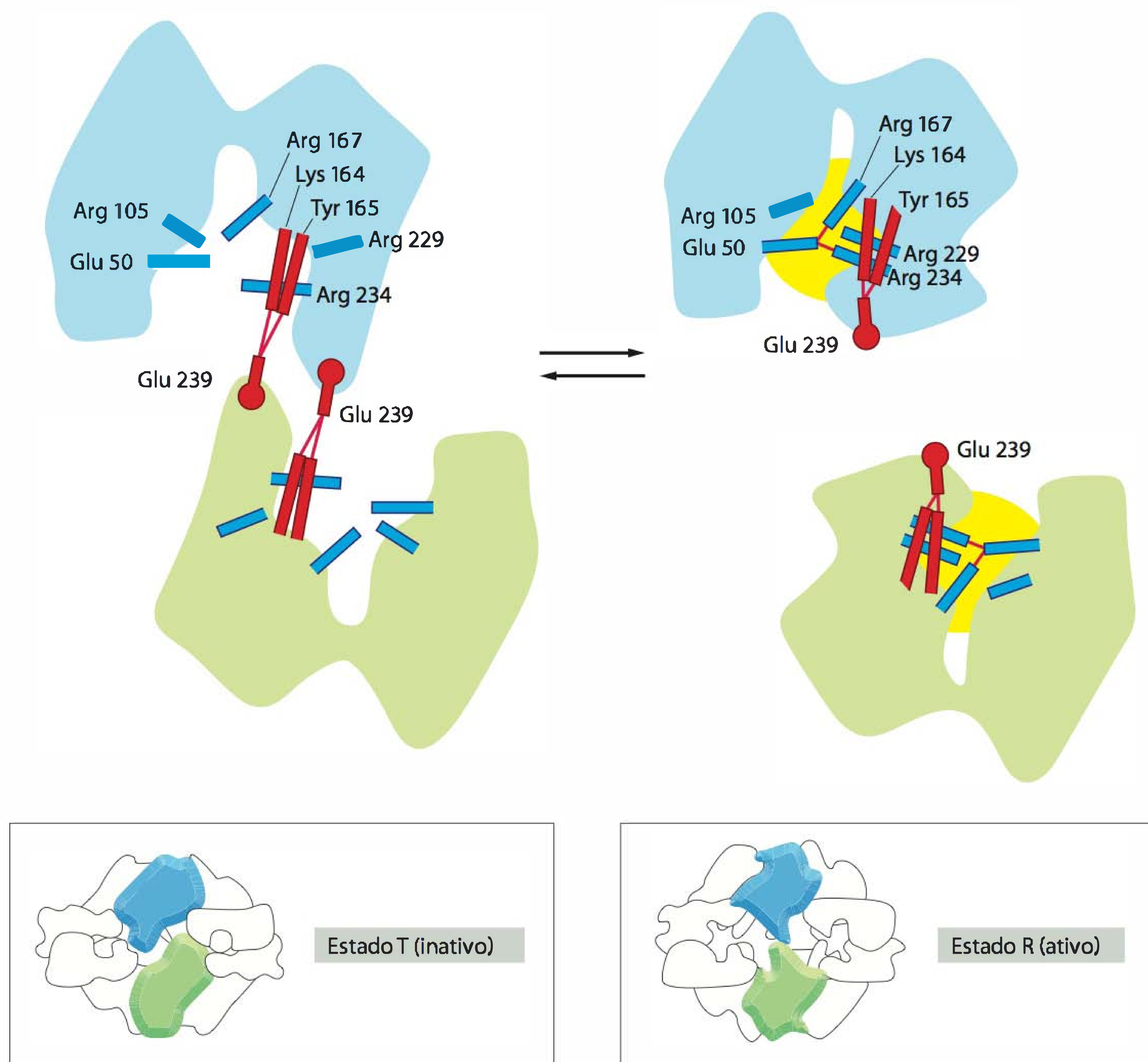


Figura 3-63 Parte do mecanismo de ativação e inativação das subunidades catalíticas da aspartato-transcarbamoilase. As mudanças indicadas nas ligações de hidrogênio são parcialmente responsáveis pelas mudanças no sítio ativo dessa enzima entre as conformações ativa (*amarelo*) e inativa. As ligações de hidrogênio estão indicadas por *linhas vermelhas finas*. Os aminoácidos envolvidos na interação subunidade-subunidade no estado T são mostrados em *vermelho*, enquanto aqueles que formam o sítio ativo da enzima no estado R são mostrados em *azul*. A parte superior do diagrama mostra o sítio catalítico, localizado no interior da enzima; as figuras da parte inferior mostram as mesmas subunidades vistas a partir da superfície externa da enzima. (Adaptado de E. R. Kantrowitz e W. N. Lipscomb, *Trends Biochem. Sci.* 15:53-59, 1990. Com permissão de Elsevier.)

Muitas alterações nas proteínas são induzidas por fosforilação

As proteínas são reguladas de outras formas além da ligação reversível de outras moléculas. Um segundo método que as células eucarióticas utilizam para regular a função de uma proteína é a adição covalente de uma pequena molécula ou mais à cadeia lateral de seus aminoácidos. A modificação reguladora mais comum em eucariotos superiores é a adição de um grupo fosfato. Utilizaremos, portanto, a fosforilação de proteínas para ilustrar alguns dos princípios gerais envolvidos no controle da função de proteínas através da modificação das cadeias laterais de aminoácidos.

O evento da fosforilação pode afetar a proteína modificada de duas maneiras. Primeiro, pelo fato de o grupo fosfato carregar duas cargas negativas, a adição enzimaticamente catalisada de um grupo fosfato a uma proteína pode causar uma mudança conformacional significativa, por exemplo, pela atração de um grupo de cadeias laterais de aminoácidos carregados positivamente. Isso pode, por sua vez, afetar a ligação de novos ligantes na superfície da proteína, mudando de forma dramática a atividade da proteína. Quando uma segunda enzima remove o grupo fosfato, a proteína retorna à sua conformação original e restabelece sua atividade inicial.

Segundo, a ligação de um grupo fosfato pode formar parte de uma estrutura que os sítios de ligação de outras proteínas podem reconhecer. Como previamente discutido, certos domínios proteicos, chamados de módulos, aparecem frequentemente como partes de proteínas maiores. Um desses módulos é o domínio SH2, descrito previamente, o qual se liga a uma curta sequência peptídica que contém uma cadeia lateral de tirosina fosforilada (ver Figura 3-39B). Mais de dez outros domínios comuns apresentam sítios de ligação que permitem a ligação das proteínas que os contêm a peptídeos fosforilados em outras moléculas proteicas, cada um reconhecendo uma cadeia lateral fosforilada de aminoácidos diferente, em contextos distintos. Como resultado, os eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas têm um papel importante na regulação dos processos de montagem e de desmontagem de complexos proteicos (ver Figura 15-22).

A fosforilação reversível de proteínas controla a atividade, a estrutura e a localização celular tanto de enzimas quanto de muitos tipos de proteínas das células eucarióticas. De

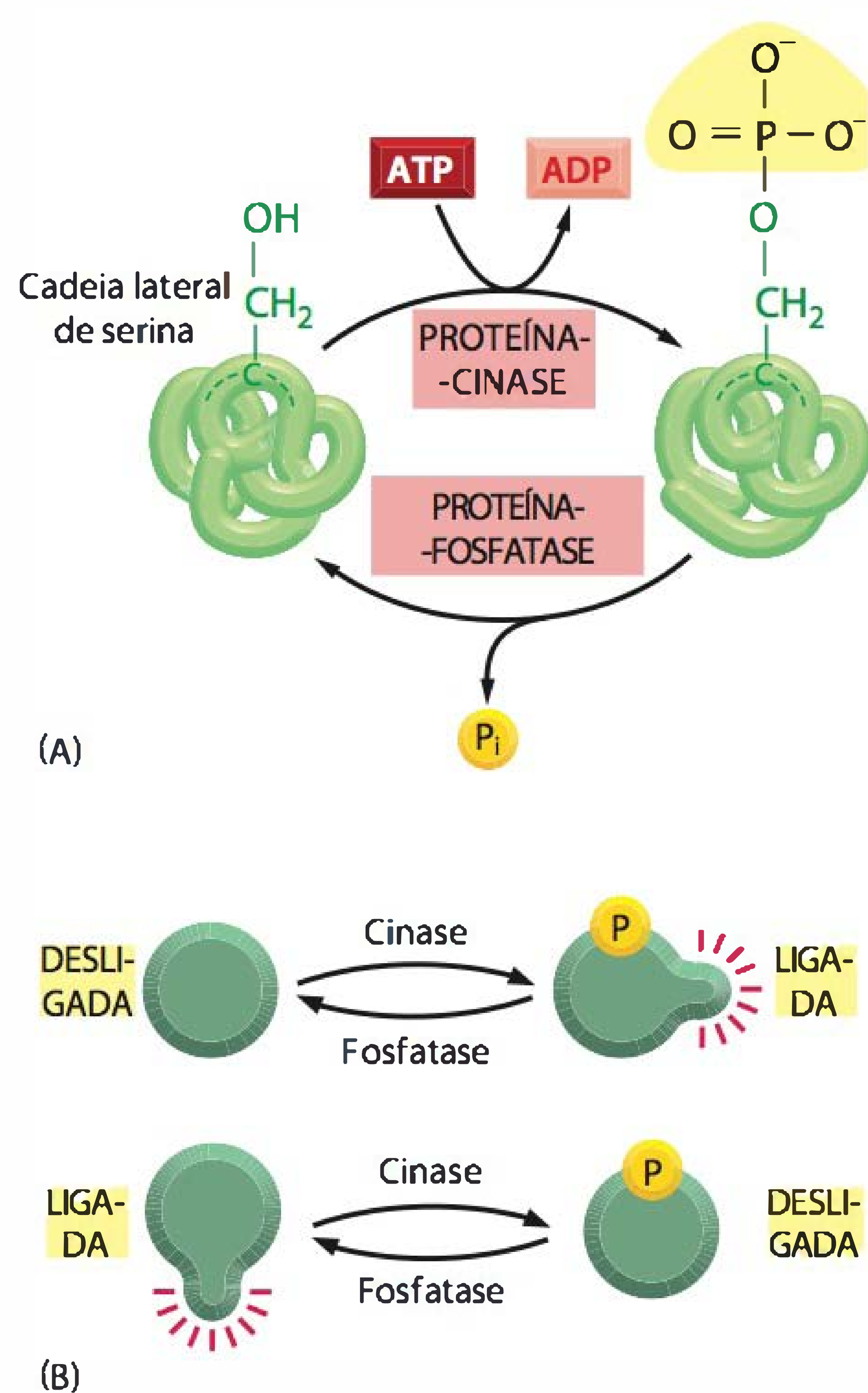


Figura 3-64 Fosforilação proteica. Centenas de proteínas em uma célula eucariótica típica são modificadas pela adição covalente de um grupo fosfato. (A) A reação geral, mostrada aqui, transfere um grupo fosfato do ATP para a cadeia lateral de um aminoácido da proteína-alvo por uma proteína-cinase. A remoção do grupo fosfato é catalisada por uma segunda enzima, uma proteína-fosfatase. Nesse exemplo, o fosfato é adicionado à cadeia lateral da serina; em outros casos, ele é ligado ao grupo OH de uma treonina ou de uma tirosina. (B) A fosforilação da proteína por uma proteína-cinase pode aumentar ou diminuir a atividade da proteína, dependendo do sítio de fosforilação e da estrutura da proteína.

fato, essa regulação é tão ampla que mais de um terço das 10 mil ou mais proteínas em uma célula típica de mamíferos pode ser fosforilado em um dado momento – muitas proteínas com mais de um fosfato. Como poderia ser esperado, a adição e a remoção de grupos fosfato em proteínas específicas muitas vezes ocorre em resposta a sinais que especificam alguma mudança no estado da célula. Por exemplo, a complicada sucessão de eventos que ocorre durante a divisão celular de eucariotos é, em grande parte, controlada por esse processo (discutido no Capítulo 17), e muitos dos sinais que medeiam as interações célula-célula são transmitidos da membrana plasmática para o núcleo por uma cascata de eventos de fosforilação de proteínas (discutido no Capítulo 15).

Uma célula eucariótica contém uma ampla coleção de proteína-cinases e proteína-fosfatases

A fosforilação de proteínas envolve a transferência enzimática do grupo fosfato terminal de uma molécula de ATP para uma hidroxila da cadeia lateral dos aminoácidos de serina, de treonina ou de tirosina na proteína (**Figura 3-64**). Uma **proteína-cinase** catalisa essa reação, e a reação é essencialmente unidirecional, devido à grande quantidade de energia livre liberada quando a ligação fosfato-fosfato do ATP é quebrada para produzir ADP (discutido no Capítulo 2). Uma **proteína-fosfatase** catalisa a reação inversa de remoção do grupo fosfato, ou *desfosforilação*. As células contêm centenas de proteína-cinases diferente, cada uma responsável pela fosforilação de uma proteína diferente ou de um conjunto de proteínas. Há também muitas proteína-fosfatases diferentes; algumas delas são altamente específicas e removem grupos fosfato de apenas uma ou poucas proteínas, enquanto outras agem sobre um amplo espectro de proteínas e são direcionadas a substratos específicos por meio de subunidades reguladoras. O estado de fosforilação de uma proteína em um dado momento, bem como sua atividade, dependerão das atividades relativas das proteína-cinases e proteína-fosfatases que agem sobre ela.

As proteína-cinases que fosforilam outras proteínas nas células eucarióticas pertencem a uma grande família de enzimas que compartilham uma sequência catalítica (cinase) de 290 aminoácidos. Os vários membros da família contêm diferentes sequências de aminoácidos em ambas as terminações da sequência cinase (p. ex., ver Figura 3-10) e, frequentemente, possuem curtas sequências de aminoácidos inseridas em alças (*setas vermelhas* na **Figura 3-65**). Algumas dessas sequências de aminoácidos adicionais permitem que cada cinase reconheça um grupo específico das proteínas a serem fosforiladas ou ligue-se a estruturas que se localizam em regiões específicas da célula. Outras partes da proteína permitem a regulação da atividade de cada cinase, podendo, assim, ser ativada e desativada em resposta a diferentes sinais específicos, como descrito a seguir.

Comparando-se o número de diferentes sequências de aminoácidos entre os vários membros de uma família de proteínas, pode-se construir uma "árvore evolutiva" que, aparentemente, reflete o padrão de duplicação e divergência dos genes que deram origem à família. A **Figura 3-66** mostra uma árvore evolutiva de proteína-cinases. Cinases com funções relacionadas frequentemente localizam-se em ramos próximos da árvore: as proteína-cinases envolvidas na sinalização celular e que fosforilam cadeias laterais de tirosina, por exemplo, estão todas agrupadas no canto superior esquerdo da árvore. As outras cinases mostradas fosforilam cadeias laterais de resíduos de serina ou de treonina, e muitas estão organizadas em grupos que parecem refletir sua função – na transdução de sinais transmembrana, na amplificação de sinais intracelulares, no controle do ciclo celular, e assim por diante.

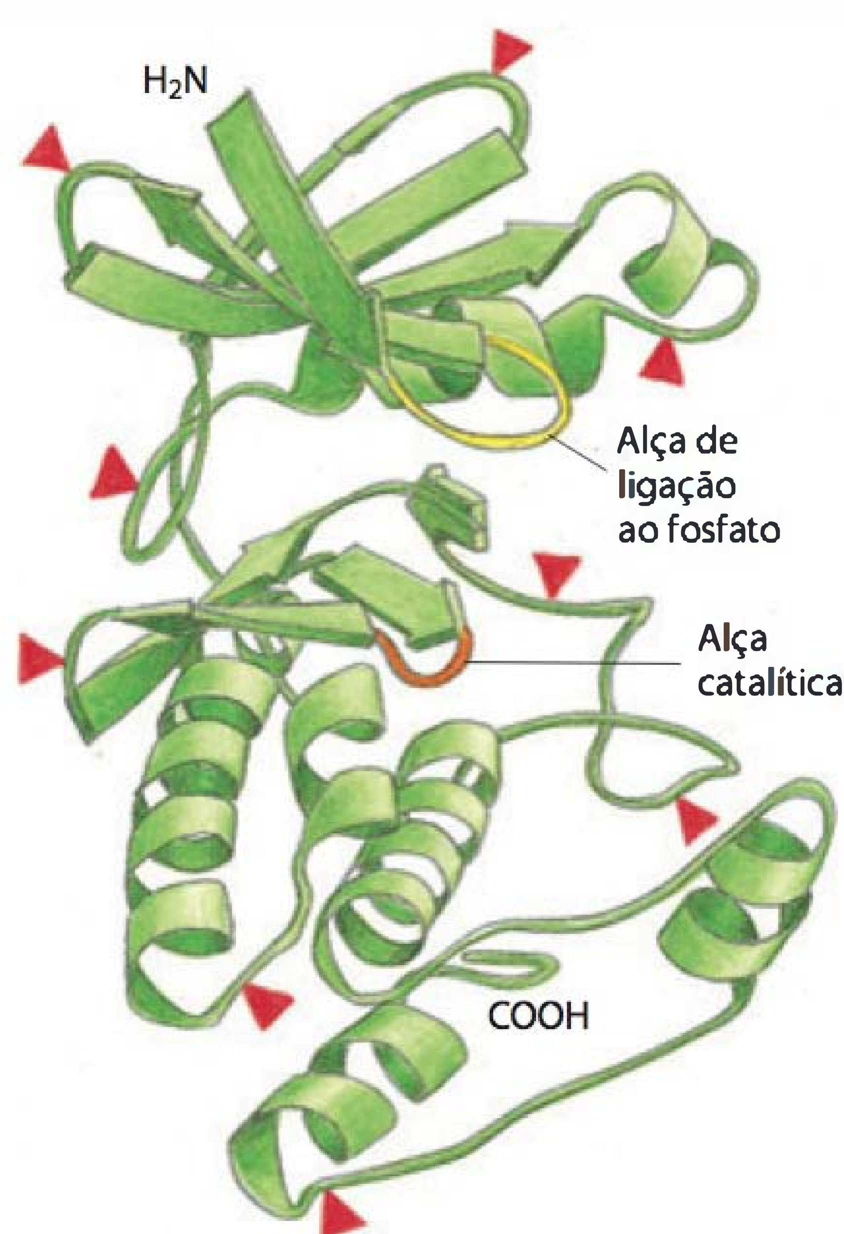


Figura 3-65 Estrutura tridimensional de uma proteína-cinase. As *setas vermelhas* sobrepostas à estrutura indicam os sítios onde inserções de 5 a 100 aminoácidos são encontradas em alguns membros da família das proteína--cinases. Essas inserções estão localizadas em alças na superfície da enzima, onde outros ligantes interagem com a proteína. Assim, os aminoácidos distinguem as diferentes cinases conferindo a elas a capacidade de interagir de diferentes maneiras com outras proteínas. O ATP (que doará o grupo fosfato) e o peptídeo a ser fosforilado ficam presos ao sítio ativo, que se estende entre a alça de ligação ao fosfato (*amarelo*) e a alça catalítica (*laranja*). Ver também Figura 3-10. (Adaptada de D. R. Knighton et al., *Science* 253:407-414, 1991. Com permissão de AAAS.)

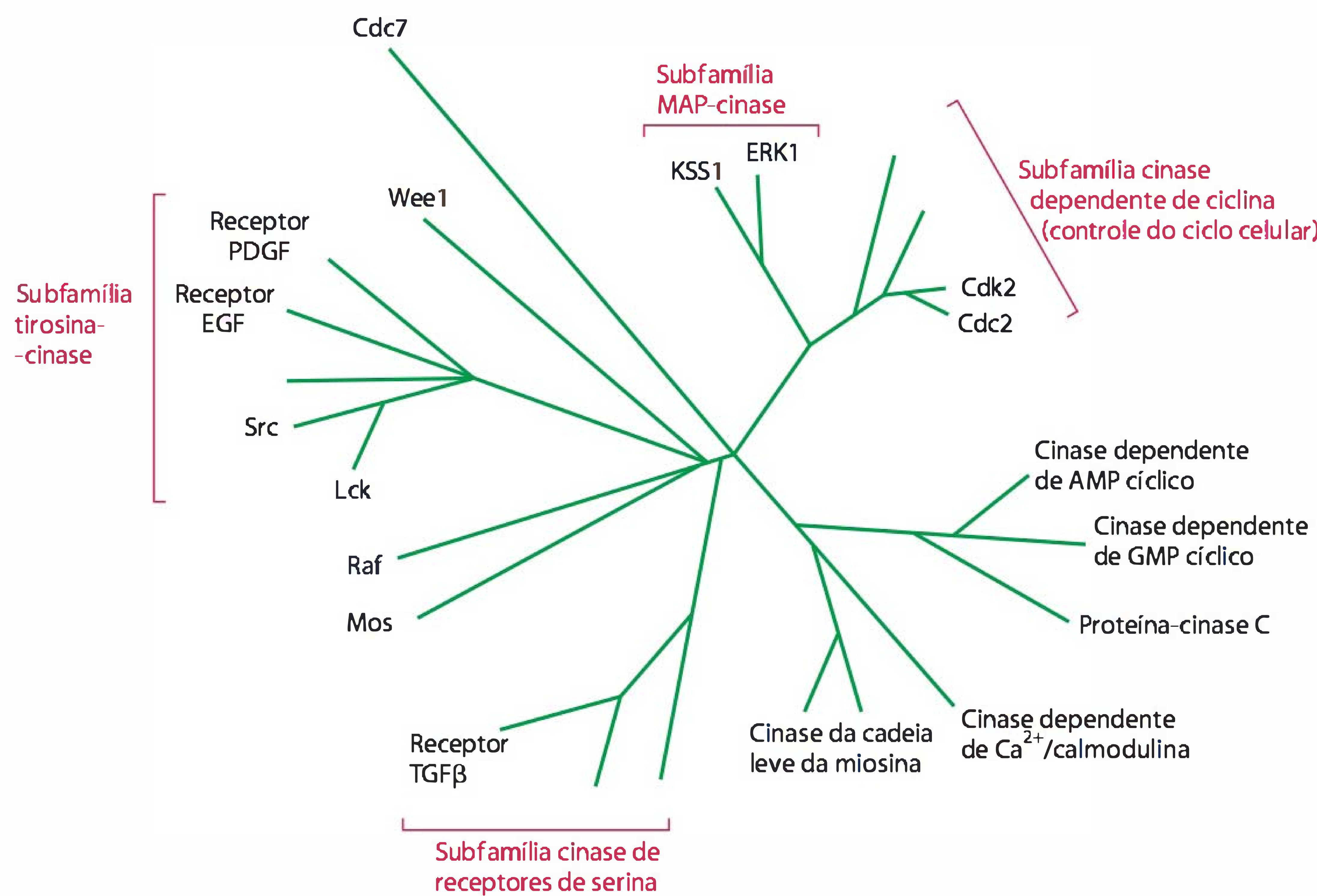


Figura 3-66 Árvore evolutiva de algumas proteína-cinases selecionadas. Apesar de as células de eucariotos superiores conterem centenas dessas enzimas, e o genoma humano codificar mais de 500, somente algumas das proteínas discutidas neste livro são mostradas.

Como resultado da atividade combinada de proteína-cinases e proteína-fosfatases, os grupos fosfato das proteínas estão continuamente sendo adicionados e, em seguida, rapidamente removidos. Tais ciclos de fosforilação podem parecer desperdícios para a célula, mas são importantes, pois permitem que as proteínas fosforiladas passem rapidamente de um estado a outro: quanto mais rápido ocorre o ciclo, mais depressa a população de moléculas da proteína pode mudar seu estado de fosforilação em resposta a um estímulo repentino, que altera sua taxa de fosforilação (ver Figura 15-11). A energia necessária para a manutenção desse ciclo vem da energia livre da hidrólise do ATP, com uma molécula sendo consumida a cada evento de fosforilação.

A regulação das proteína-cinases Cdk e Src mostram como uma proteína pode funcionar como um *Microchip*

As centenas de diferentes proteína-cinases de uma célula eucariótica são organizadas em complexas redes de vias de sinalização que ajudam a coordenar as atividades da célula, controlar o ciclo celular e retransmitir sinais dentro do ambiente celular. Muitos dos sinais extracelulares envolvidos precisam ser integrados e amplificados pela célula. As proteína-cinases individuais (e outras proteínas sinalizadoras) servem como dispositivos de ativação-desativação, ou *microchip*, no processo de integração. Uma parte importante da ativação dessas proteínas de processamento de sinais vem do controle exercido pela adição e pela remoção de grupos fosfato a essas proteínas, realizadas pelas proteína-cinase e proteína-fosfatases respectivamente.

Em geral, conjuntos específicos de grupos fosfato servem para ativar a proteína, enquanto outros grupos podem inativá-la. Uma proteína-cinase dependente de ciclina (Cdk, *cyclin-dependent protein kinase*) é um bom exemplo. As cinases nesta classe de fosforilação de serinas e de treoninas são componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular em células eucarióticas, como discutido em detalhes no Capítulo 17. Em uma célula de vertebrado, proteínas Cdks individuais são ativadas e desativadas sucessivamente, conforme a célula passa pelas diferentes fases de seu ciclo de divisão. Quando uma cinase é ativada, ela influencia vários aspectos do comportamento da célula, por meio de efeitos nas proteínas que ela fosforila.

A proteína Cdkse torna ativa como uma proteína-cinase serina/treonina somente quando está ligada a uma segunda proteína chamada de *ciclina*. Mas, como mostra a **Figura 3-67**, a ligação da ciclina é somente uma das três contribuições exigidas para ativar a Cdk. Além da ligação à ciclina, um grupo fosfato deve ser acrescentado à cadeia lateral de uma treonina específica, e um fosfato em outro resíduo da proteína (covalentemente ligado à cadeia lateral de uma tirosina específica) deve ser removido. Dessa maneira, as Cdks monitoram um

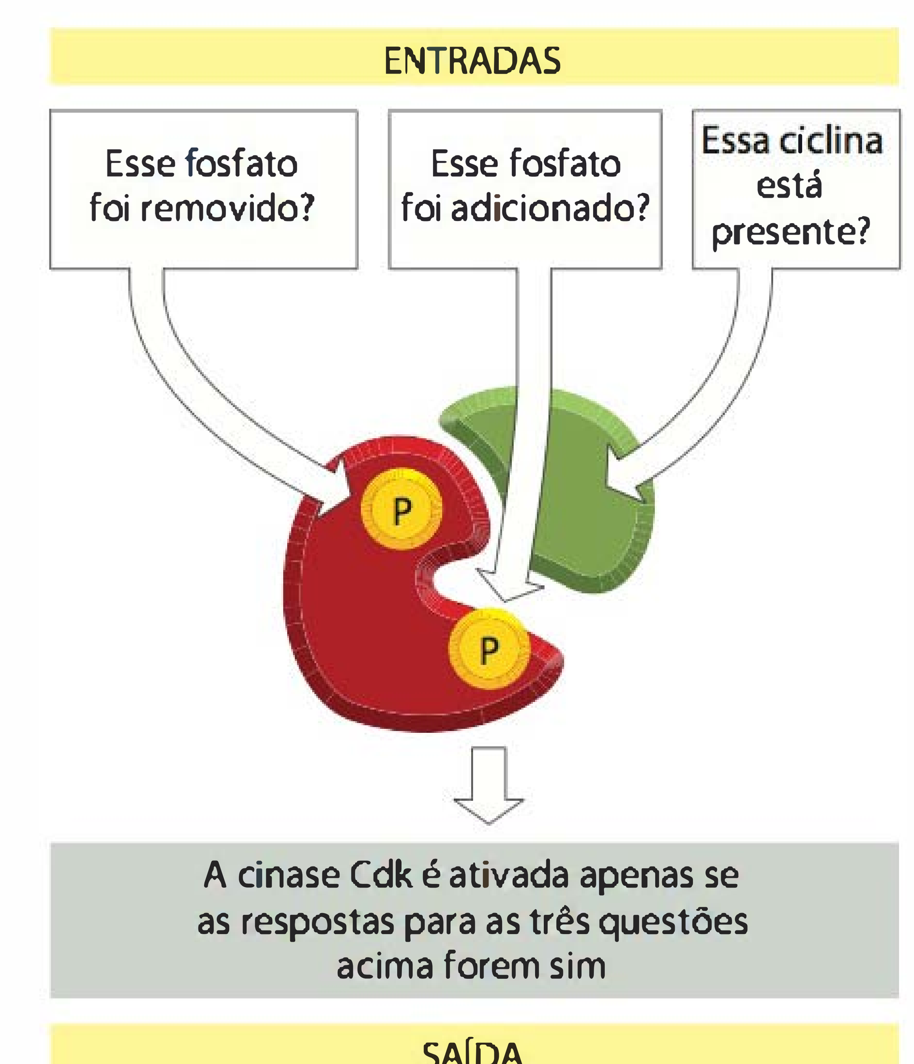


Figura 3-67 Como a proteína Cdk age como um integrador. A função desses reguladores centrais do ciclo celular é discutida no Capítulo 17.



Figura 3-68 A estrutura do domínio da família Src de proteína-cinases, mapeada ao longo da sequência de aminoácidos. Para a estrutura tridimensional da proteína Src, ver Figura 3-10.

conjunto específico de componentes da célula – uma ciclina, uma proteína-cinase e uma proteína-fosfatase – e agem como um dispositivo de ativação-desativação se, e somente se, cada um desses componentes atingir seu estado apropriado de atividade. Algumas ciclinas aumentam ou diminuem sua concentração em cada etapa do ciclo celular, aumentando gradualmente a concentração, até que sejam subitamente destruídas em um ponto específico do ciclo. A destruição súbita de uma ciclina (por proteólise) imediatamente inativa a Cdk correspondente, e isso ativa um passo específico no ciclo celular.

A família Src de proteína-cinases (ver Figura 3-10) exibe um comportamento de *microchip* semelhante. A *proteína Src* (pronuncia-se "sarc", denominada pelo tipo de tumor causado pela sua desregulação, o sarcoma) foi a primeira tirosina-cinase a ser descoberta. Sabe-se hoje que ela faz parte de uma subfamília de nove proteína-cinases semelhantes, somente encontradas em animais multicelulares. Como indicado pela árvore evolutiva na Figura 3-66, as comparações das sequências sugerem que as tirosina-cinases, como um grupo, são uma inovação relativamente recente que se separou das cinases, com serina/treonino-cinases sendo a subfamília Src apenas um subgrupo das tirosina-cinases assim originadas.

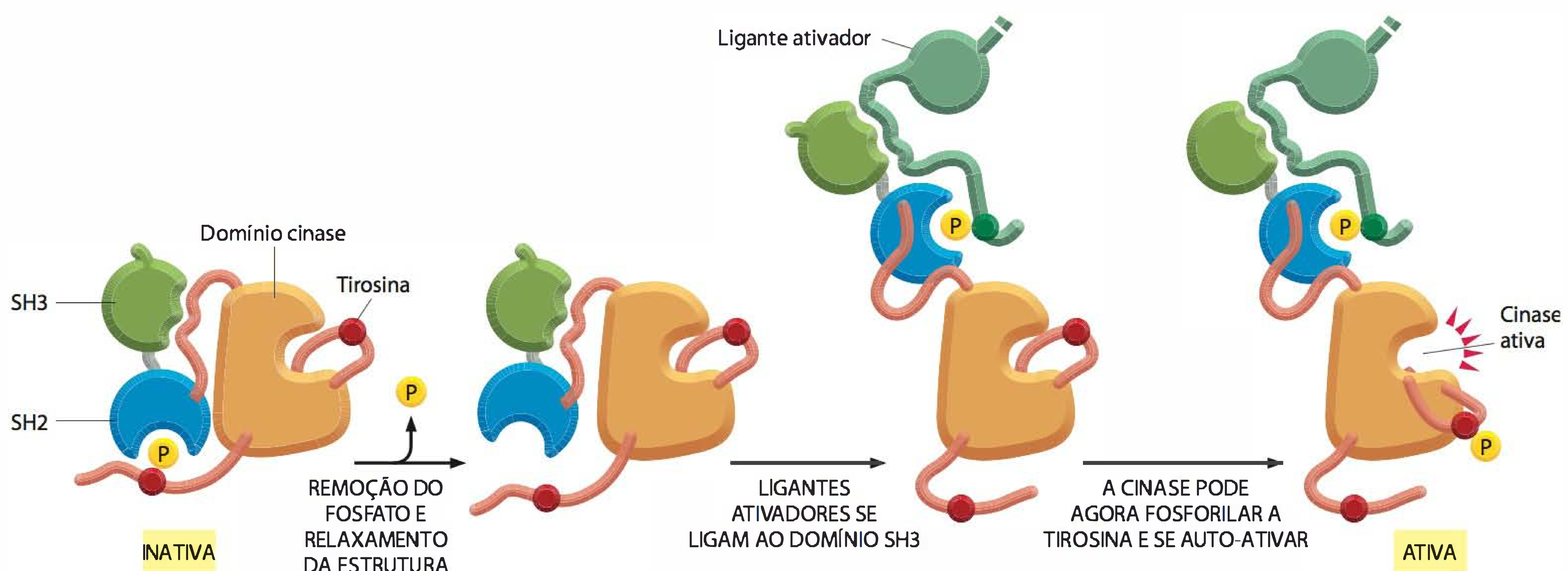
As proteínas Src e seus homólogos contêm uma região N-terminal curta que se torna covalentemente ligada a um ácido graxo fortemente hidrofóbico e que mantém a cinase na face citoplasmática da membrana. Nas proximidades existem dois módulos de ligação aos peptídeos, um domínio Src 3 homólogo (SH3) e um domínio SH2, seguido pelo domínio catalítico da cinase (**Figura 3-68**). Essas cinases normalmente existem em uma conformação inativa, na qual uma tirosina fosforilada próxima ao C-terminal está ligada ao domínio SH2, e o domínio SH3 está ligado ao peptídeo interno, de modo a distorcer o sítio ativo da enzima, ajudando a mantê-la inativa.

A ativação da cinase envolve pelo menos duas ativações específicas: a remoção do fosfato da porção C-terminal e a ligação do domínio SH3 por uma proteína ativadora específica (**Figura 3-69**). Como a ativação da Cdk, a ativação da cinase Src significa a completude de um conjunto particular de eventos distintos, localizados em um nível superior da via de sinalização (**Figura 3-70**). Assim, ambas as famílias de proteínas, Cdk e Src, servem como integradores de sinais específicos, ajudando a gerar uma complexa rede de eventos de processamento de informação que permite que a célula tenha respostas lógicas para um complexo conjunto de condições.

Proteínas que ligam e hidrolisam GTP são reguladores celulares onipresentes

Temos descrito como a adição e a remoção de grupos fosfato a uma proteína pode ser utilizada pela célula para controlar a atividade da proteína. Nos exemplos discutidos até agora,

Figura 3-69 A ativação de uma proteína-cinase do tipo Src por dois eventos sequenciais. (Adaptada de S. C. Harrison et al., *Cell* 112:737-740, 2003. Com permissão de Elsevier.)



o fosfato é transferido de uma molécula de ATP para a cadeia lateral de um aminoácido de uma proteína, em uma reação catalisada por uma proteína-cinase específica. As células eucarióticas também possuem outro meio de controlar a atividade de uma proteína pela adição e remoção de grupos fosfato. Nesse caso, o fosfato não é ligado diretamente à proteína, mas faz parte do nucleotídeo de guanina trifosfato de guanosina (GTP, *guanosine triphosphate*), que se liga fortemente à proteína. Em geral, as proteínas reguladas dessa forma estão na sua conformação ativa quando ligadas a GTP. A perda do grupo fosfato ocorre quando o GTP ligado é hidrolisado a difosfato de guanosina (GDP, *guanosine diphosphate*) em uma reação catalisada pela própria proteína, e no estado ligado ao GDP a proteína é inativa. Assim, proteínas que ligam GTP são dispositivos de ativação-desativação, cuja atividade é determinada pela presença ou ausência de um fosfato adicional na molécula de GDP ligada (**Figura 3-71**).

As **proteínas que ligam GTP** (também chamadas de **GTPases** devido à hidrólise do GTP que elas catalisam) compreendem uma grande família de proteínas que apresentam variações no mesmo domínio globular de ligação ao GTP. Quando um GTP ligado fortemente é hidrolisado a GDP, esse domínio sofre uma alteração conformacional que o torna inativo. A estrutura tridimensional de um membro típico dessa família, a GTPase monomérica denominada Ras, é mostrada na **Figura 3-72**.

A *proteína Ras* tem um importante papel na sinalização celular (discutido no Capítulo 15). Na sua forma ligada a GTP, ela é ativa e estimula uma cascata de fosforilação de proteínas na célula. Ela se torna ativa quando troca seu GDP por uma molécula de GTP em resposta a sinais extracelulares, como fatores de crescimento, que se ligam a receptores na membrana plasmática (ver Figura 15-58).

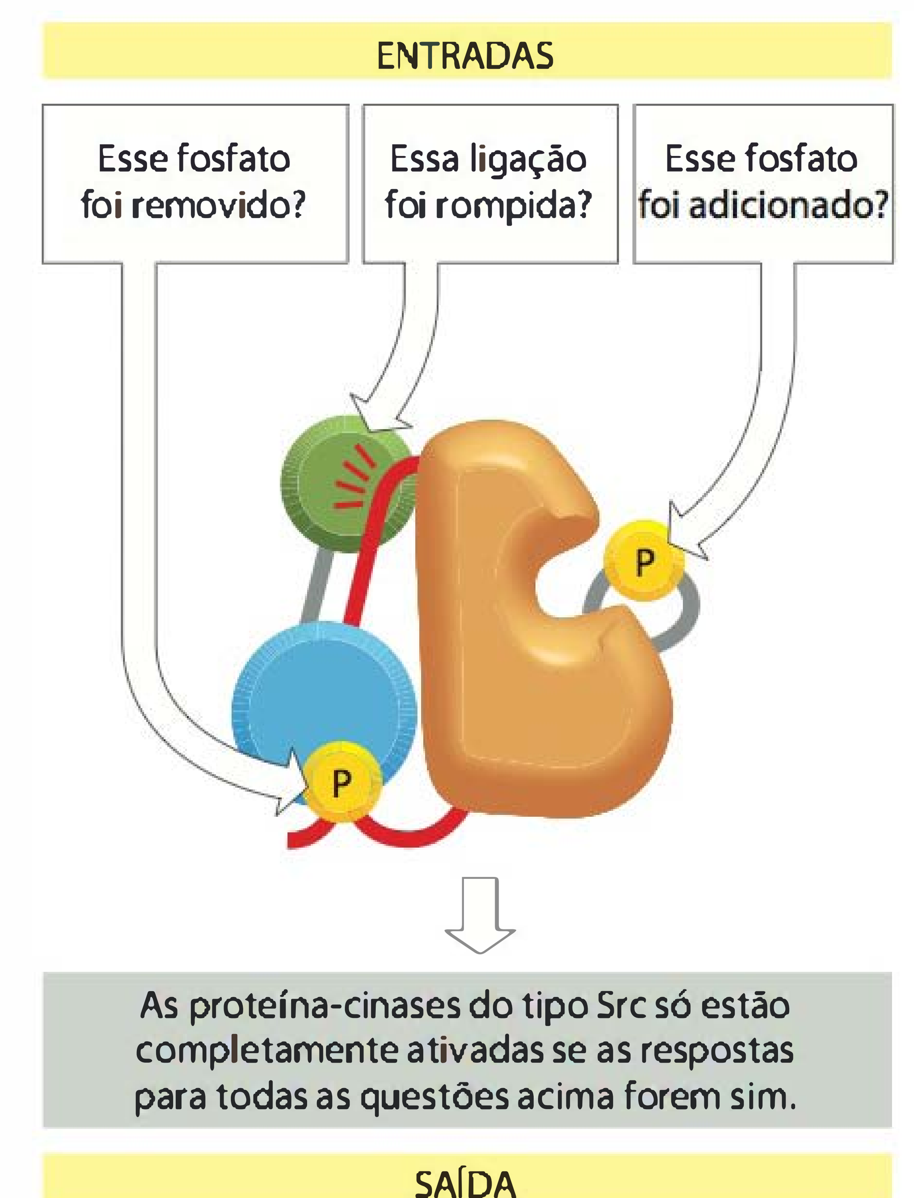


Figura 3-70 Como a proteína-cinase do tipo Src age como um integrador. O rompimento da interação do domínio SH3 (*verde*) envolve a substituição da sua ligação com a região de conexão indicada em *vermelho* pela forte interação com um ligante ativador, como ilustrado na Figura 3-69.

As proteínas reguladoras controlam a atividade de proteínas que ligam GTP por determinar se uma molécula de GTP ou de GDP está ligada

As proteínas que ligam GTP são controladas por proteínas reguladoras que determinam se o GTP ou o GDP está ligado, da mesma maneira que proteínas fosforiladas são ativadas e desativadas por proteína-cinases e proteína-fosfatases. Assim, a proteína Ras é inativada pela *proteína ativadora de GTPase* (GAP, *GTPase-activating protein*), a qual se liga à proteína Ras e induz a hidrólise de sua molécula de GTP a GDP – que permanece firmemente ligado – e a fosfato inorgânico (P_i) – que é rapidamente libertado. A proteína Ras permanece em seu estado inativo na conformação com o GDP ligado até que ela encontre um *fator de troca do nucleotídeo guanina* (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*), que se liga a GDP-Ras e faz com que ela libere seu GDP. Como o sítio vazio de ligação do nucleotídeo é imediatamente preenchido por uma molécula de GTP (GTP está presente em maior concentração em relação ao GDP nas células) o GEF ativa a Ras *indiretamente*; pela adição do fosfato removido pela hidrólise de GTP. De certo modo, as funções de GAP e de GEF são análogas àquelas de proteína-fosfatases e proteína-cinases, respectivamente (**Figura 3-73**).

Os movimentos de grandes proteínas podem ser gerados por pequenas proteínas

As proteínas Ras pertencem a uma grande superfamília de *GTPases monoméricas*, e cada uma delas consiste em um único domínio de cerca de 200 aminoácidos que liga GTP. Ao longo da evolução, esse domínio também se uniu a proteínas maiores, com domínios adicionais, criando uma grande família de proteínas que ligam GTP. Os membros dessa família incluem a proteína G trimérica associada a receptores, envolvida na sinalização celular (discutido no Capítulo 15), as proteínas que regulam o tráfico de vesículas entre compartimentos intracelulares (discutido no Capítulo 13) e as proteínas que ligam e transferem RNA e são necessárias como fatores de associação para a síntese de proteínas no

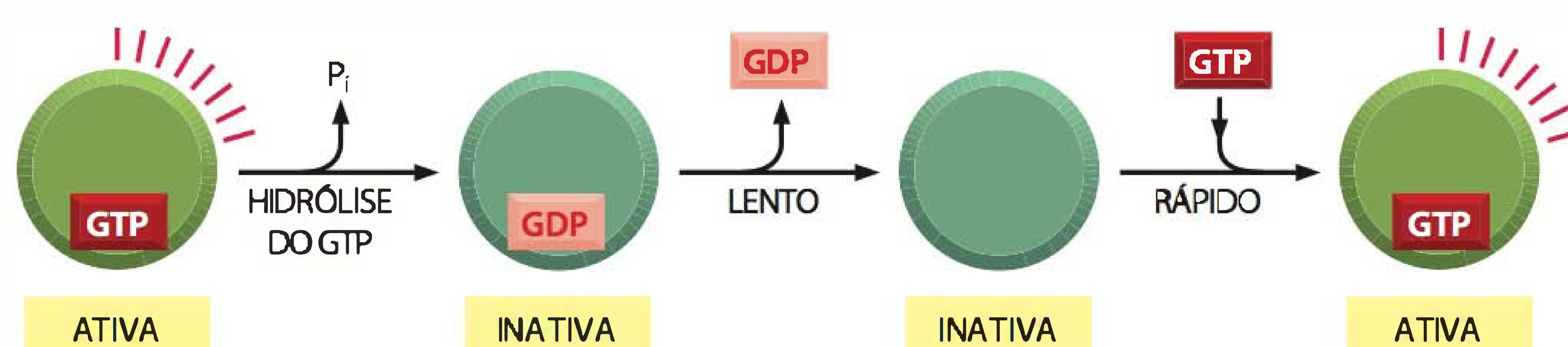


Figura 3-71 Proteínas que ligam GTP como interruptores moleculares. A atividade da proteína que liga GTP (também chamada de GTPase) geralmente requer a presença de uma molécula de GTP fortemente ligada (interruptor ligado). A hidrólise dessa molécula de GTP produz GDP e fosfato inorgânico (P_i) e causa a conversão da proteína a uma conformação diferente, usualmente inativa (interruptor desligado). Como mostrado aqui, a reversão do interruptor requer que o GDP fortemente ligado se dissocie, um passo lento que é bastante acelerado por sinais específicos; quando o GDP for dissociado, a molécula de GTP é rapidamente religada.

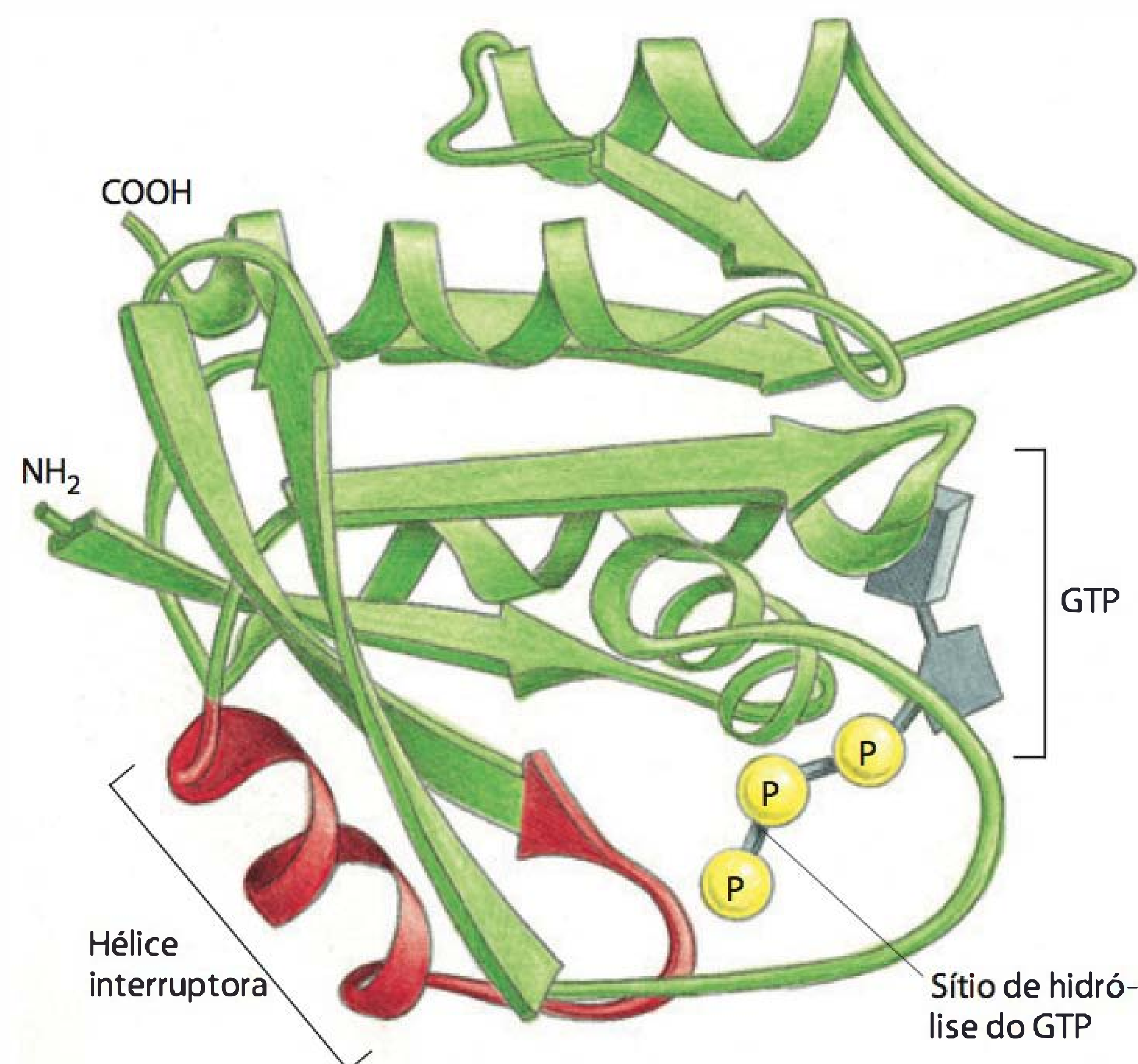


Figura 3-72 Estrutura da proteína Ras em sua forma ligada ao GTP. Essa proteína monomérica GTPase ilustra a estrutura de um domínio de ligação de GTP, presente na grande família de proteínas que ligam GTP. As regiões mostradas em *vermelho* alteram sua conformação quando a molécula de GTP é hidrolisada a GDP e a fosfato inorgânico; o GDP permanece ligado à proteína, enquanto o fosfato inorgânico é liberado. A função principal da "hélice interruptora" nas proteínas relacionadas a Ras é explicada a seguir (ver Figura 3-75).

ribossomo (discutido no Capítulo 6). Em cada caso, uma atividade biológica importante é controlada pela mudança conformacional da proteína, causada pela hidrólise de GTP em um domínio do tipo Ras.

A *proteína EF-Tu* provê um bom exemplo de como essa família de proteínas age. A EF-Tu é uma molécula abundante que serve como um fator de alongamento (EF, *elongation factor*) na síntese de proteínas, levando cada aminoacil tRNA (RNA de transferência) para o ribossomo. A molécula de tRNA forma um complexo com a EF-Tu ligada ao GTP (**Figura 3-74**). Nesse complexo, o aminoácido ligado ao tRNA é posicionado de forma incorreta para a síntese de proteínas. O tRNA somente pode transferir seu aminoácido depois que o GTP ligado à EF-Tu é hidrolisado no ribossomo, permitindo que a EF-Tu se dissocie. Uma vez que a hidrólise de GTP é induzida por um ajuste próprio do tRNA à molécula de RNA mensageiro (mRNA) no ribossomo, a EF-Tu serve como um fator de discriminação entre pareamentos corretos e incorretos de mRNA e tRNA, (ver Figura 6-67 para uma discussão adicional da função da EF-Tu).

Por meio da comparação da estrutura tridimensional de EF-Tu em suas formas ligadas a GTP e a GDP, podemos ver como aconteceu o desbloqueamento do tRNA. A dissociação do grupo fosfato inorgânico (P_i), que ocorre na reação GTP → GDP + P_i, causa a mudança de alguns décimos de nanômetros no sítio de ligação de GTP, assim como o faz na proteína Ras. Esse sutil movimento, equivalente a algumas vezes o diâmetro de um átomo de

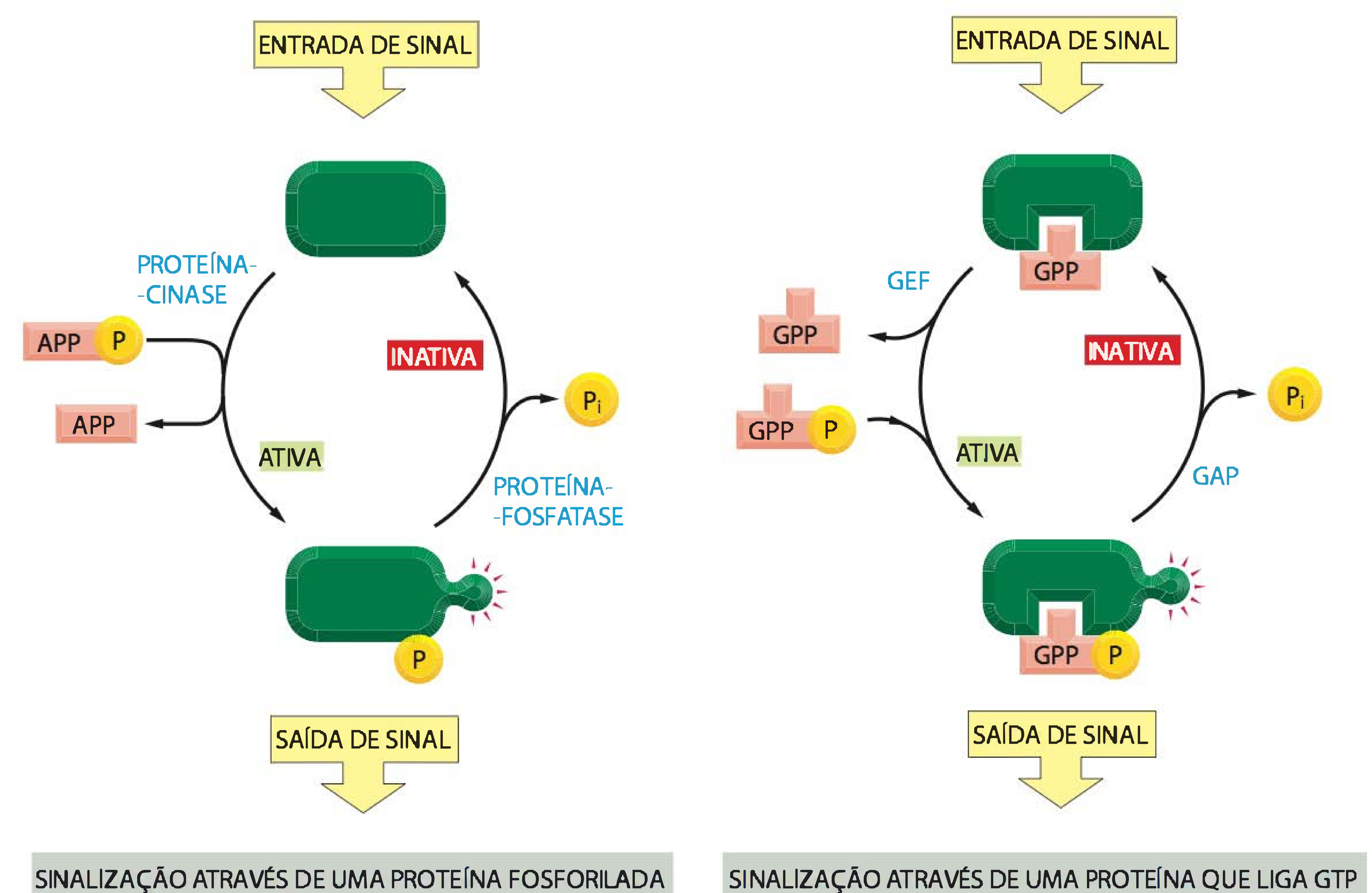


Figura 3-73 Uma comparação entre os dois principais mecanismos de sinalização intracelular em células eucarióticas. Em ambos os casos, a proteína sinalizadora é ativada pela adição de um grupo fosfato e inativada pela remoção desse fosfato. Para enfatizar as similaridades das duas vias, o ATP e o GTP estão indicados como APPP e GPPP, e ADP e o GDP, como APP e GPP, respectivamente. Como mostrado na Figura 3-64, a adição de um fosfato a uma proteína também pode ter um efeito inibitório.

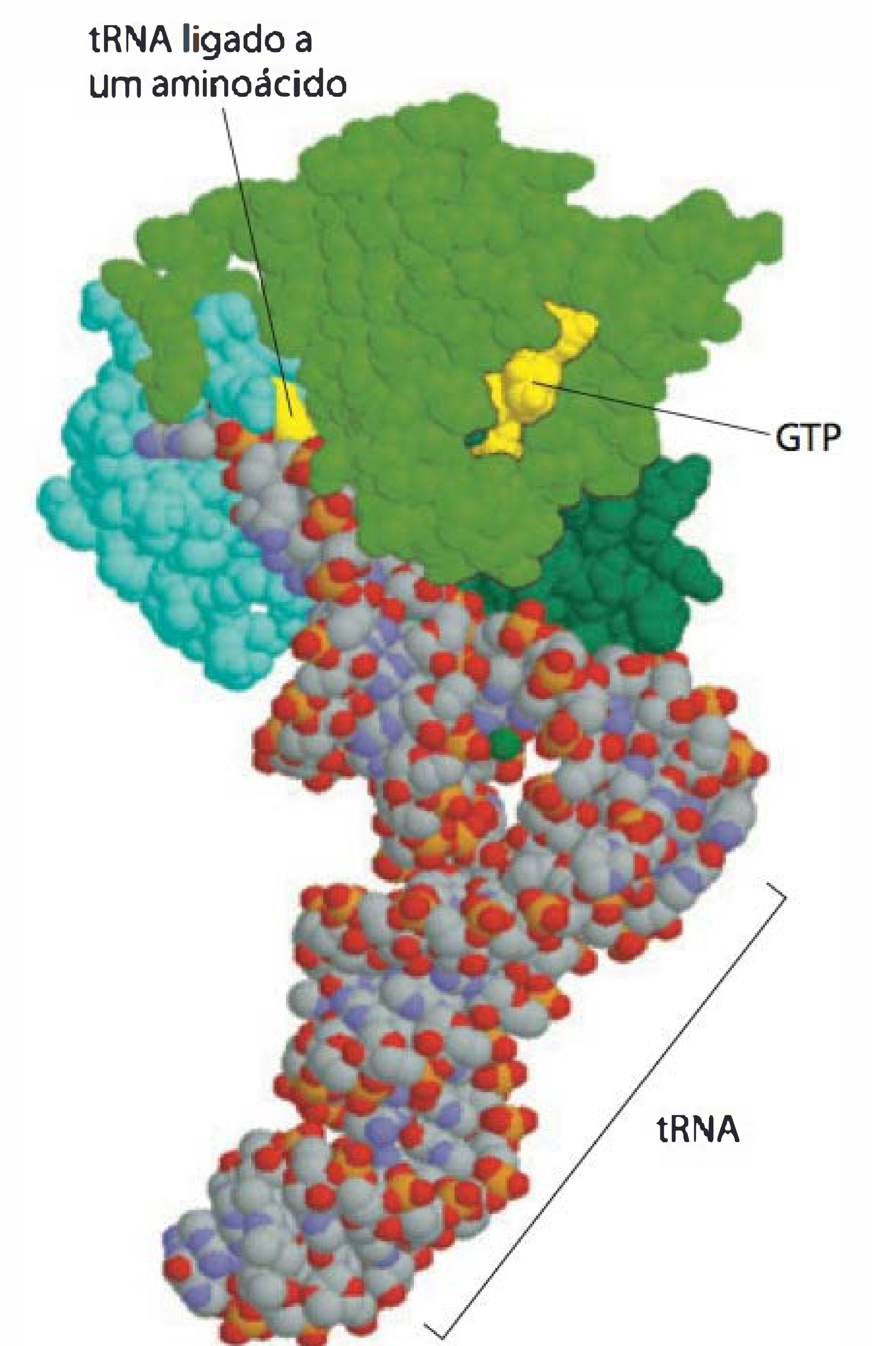


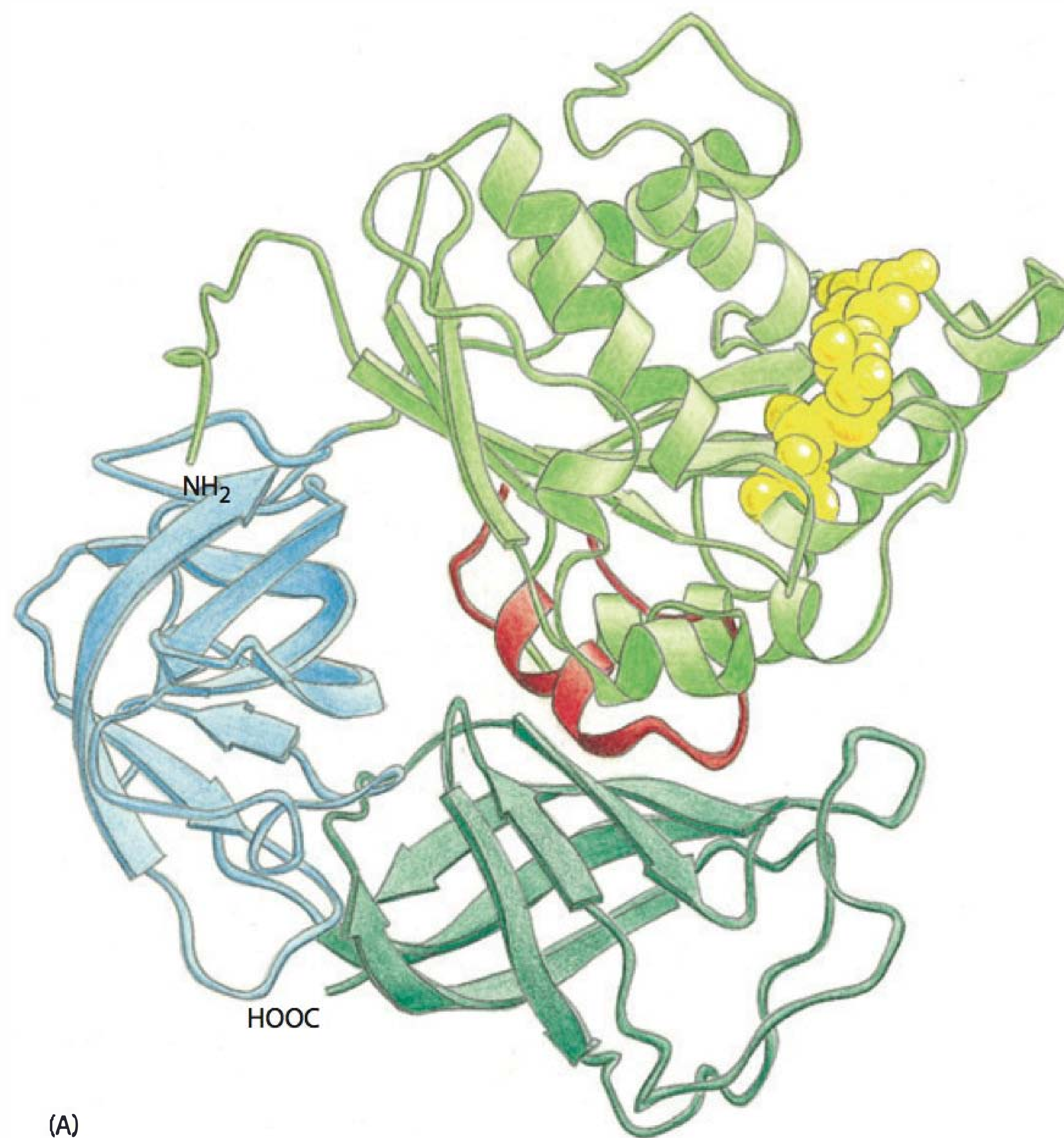
Figura 3-74 Molécula aminoacil tRNA ligada a EF-Tu. Os três domínios da proteína EF-Tu são coloridos diferentemente, assim como na Figura 3-75. Essa é uma proteína bacteriana; entretanto, proteínas muito similares existem em eucariotos, onde são chamadas de EF-1. (Coordenadas determinadas por P. Nissen et al., *Science* 270:1464-1472,1995. Com permissão de AAAS.)

hidrogênio, causa uma mudança conformacional que se propaga ao longo de um pedaço crucial de hélice α, chamado de ***hélice interruptora***, no domínio do tipo Ras da proteína. A hélice interruptora parece servir como um trinco que se adere a um sítio específico de outro domínio da molécula, mantendo a proteína em uma "conformação fechada". A mudança conformacional desencadeada pela hidrólise de GTP faz a hélice interruptora separar-se, permitindo que os domínios separados da proteína possam se afastar, por uma distância de cerca de 4 nm. Isso libera a molécula de tRNA, possibilitando que o aminoácido ligado a ela seja utilizado (**Figura 3-75**).

Pode-se obsevar, por esse exemplo, como as células exploram uma simples mudança química que ocorre na superfície de um pequeno domínio proteico para criar um movimento 50 vezes maior. As mudanças conformacionais dramáticas desse tipo também ocorrem nas proteínas motoras, como discutiremos a seguir.

As proteínas motoras geram grandes movimentos nas células

Já vimos como mudanças conformacionais nas proteínas têm um papel central na regulação de enzimas e na sinalização celular. Vamos discutir agora as proteínas cuja função principal é mover outras moléculas. Essas **proteínas motoras** geram as forças responsáveis pela contração muscular e também por movimentos das células do tipo rastejar e nadar. As proteínas motoras também realizam movimentos sutis dentro da célula: ajudam a mover os cromossomos para os polos opostos da célula durante a mitose (discutido no Capítulo 18), movimen-



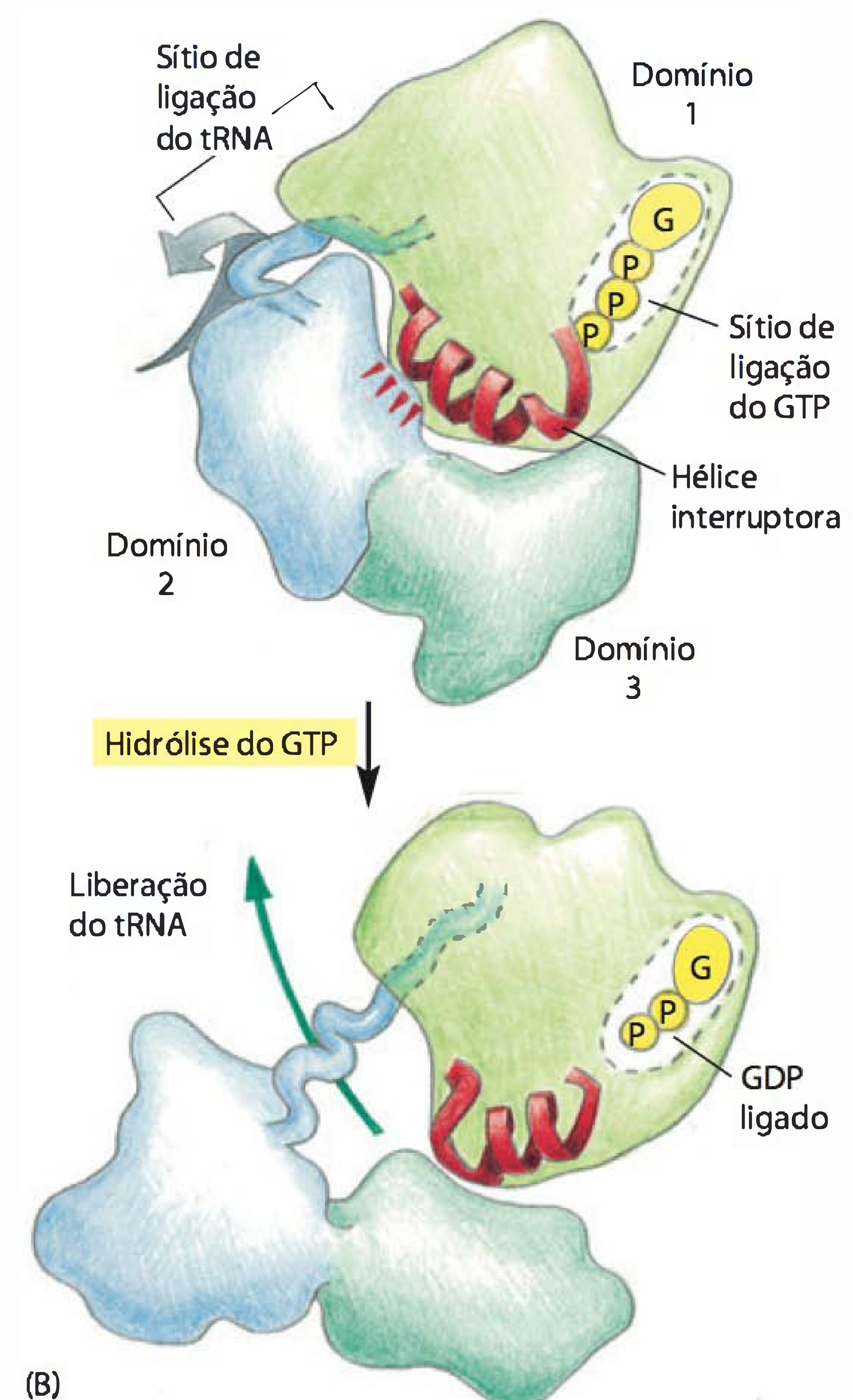


Figura 3-75 Ampla mudança conformacional da EF-Tu causada pela hidrólise de GTP. (A) Estrutura tridimensional de EF-Tu ligada ao GTP. O domínio na parte superior da figura tem uma estrutura similar à da proteína Ras, e sua hélice α em *vermelho* é a hélice "interruptora", que se move após a hidrólise do GTP. (B) A alteração na conformação da hélice "interruptora" do domínio 1 faz com que os domínios 2 e 3 girem como uma unidade, cerca de 90° na direção do observador, o que libera o tRNA, mostrado ligado à estrutura na Figura 3-74. (A, adaptada de H. Berchtold et al., *Nature* 365:126-132,1993. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd. B, cortesia de Mathias Sprinzl e Rolf Hilgenfeld.)

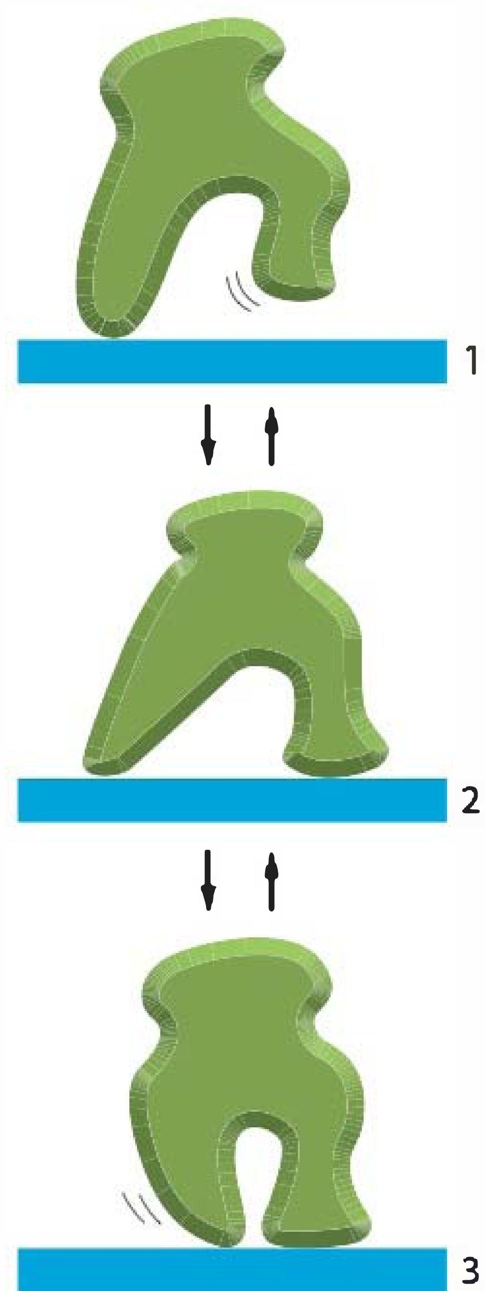


Figura 3-76 Uma proteína alostérica que se desloca. Apesar de as suas três diferentes conformações permitirem que ela se mova aleatoriamente para a frente e para trás, enquanto ligada a um filamento, a proteína não pode se mover uniformemente em uma única direção.

tam organelas ao longo de trilhas moleculares dentro da célula (discutido no Capítulo 16) e deslocam enzimas ao longo da cadeia de DNA durante a síntese de uma nova molécula de DNA (discutido no Capítulo 5). Todos esses processos fundamentais dependem de proteínas que operam como máquinas geradoras de força.

Como essas máquinas trabalham? Em outras palavras, como as células utilizam mudanças na forma das proteínas para gerar movimentos ordenados? Se, por exemplo, uma proteína precisa mover-se ao longo de uma linha estreita como a fita de DNA, ela poderá fazê-lo passando por uma série de mudanças conformacionais, como ilustrado na **Figura 3-76**. No entanto, sem que nada oriente essas mudanças em uma sequência ordenada, elas serão perfeitamente reversíveis, e a proteína poderá vagar ao acaso de um lado para outro ao longo da linha. Podemos olhar para essa situação de uma outra maneira. Uma vez que o movimento direcionado de uma proteína realiza trabalho, as leis da termodinâmica (discutidas no Capítulo 2) impõem que tal movimento utilize energia livre de alguma outra fonte (caso contrário, a proteína poderia ser usada como uma máquina de movimento contínuo). Então, sem uma contribuição de energia, a molécula de proteína poderá apenas vagar sem propósito.

Como, então, uma série de mudanças conformacionais pode se tornar unidirecional? Para obrigar que todo o ciclo proceda em uma única direção, basta apenas que uma das mudanças conformacionais seja irreversível. Para a maioria das proteínas que são capazes de se deslocar em uma direção por longas distâncias, isso é conseguido acoplando-se a mudança conformacional à hidrólise de uma molécula de ATP ligada à proteína. Esse mecanismo é semelhante àquele já descrito que provoca mudanças alostéricas na forma da proteína através da hidrólise de GTP. Uma vez que uma quantidade razoável de energia livre é liberada quando o ATP (ou GTP) é hidrolisado, é pouco provável que uma proteína que liga nucleotídeos sofra uma mudança reversível de forma, já que isso implicaria também na reversão da hidrólise de ATP, adicionando-se um grupo fosfato ao ADP para formar ATP.

No modelo mostrado na **Figura 3-77**, a ligação de ATP a uma proteína motora promove a passagem da conformação 1 para a conformação 2. O ATP ligado é então hidrolisado para produzir ADP e fosfato inorgânico (P_i), causando a mudança da conformação 2 para a conformação 3. Finalmente, a liberação do ADP e do P_i para o meio leva a proteína de volta à conformação 1. Uma vez que a transição $2 \rightarrow 3$ é promovida pela energia derivada da hidrólise do ATP, essa série de mudanças conformacionais será efetivamente irreversível. Assim, o ciclo inteiro acontecerá em uma única direção, fazendo com que a proteína se desloque continuamente para a direita nesse exemplo.

Muitas proteínas motoras geram movimentos direcionados dessa forma, incluindo a proteína motora do músculo, *miosina*, que caminha ao longo de filamentos de actina para realizar a contração muscular, e a proteína *cinesina*, que se desloca ao longo de microtúbulos (ambas discutidas no Capítulo 16). Esses movimentos podem ser rápidos: algumas proteínas motoras envolvidas na replicação de DNA (as DNA-helicases) deslocam-se ao longo da fita de DNA a uma velocidade tão alta quanto mil nucleotídeos por segundo.

Os transportadores ligados à membrana aproveitam energia para bombear moléculas através das membranas

Vimos como proteínas alostéricas podem agir como *microchips* (nas cinases Cdk e Src), como fatores de união (EF-Tu) e como geradoras de força mecânica e de movimento (proteínas motoras). As proteínas alostéricas também podem usar energia derivada da hidrólise de ATP, de gradientes iônicos ou de processos de transporte de elétrons para bombear íons específicos ou pequenas moléculas através da membrana. Consideraremos um exemplo aqui; outros serão discutidos no Capítulo 11.

Os transportadores ABC (cassete de ligação ao ATP, *ATP-Binding cassete*) constituem uma importante classe de bombas proteicas ligadas à membrana. Em humanos, pelo menos 48 genes codificam tais proteínas. Esses transportadores agem principalmente na exportação de moléculas hidrofóbicas do citoplasma, atuando na remoção de moléculas tóxicas na

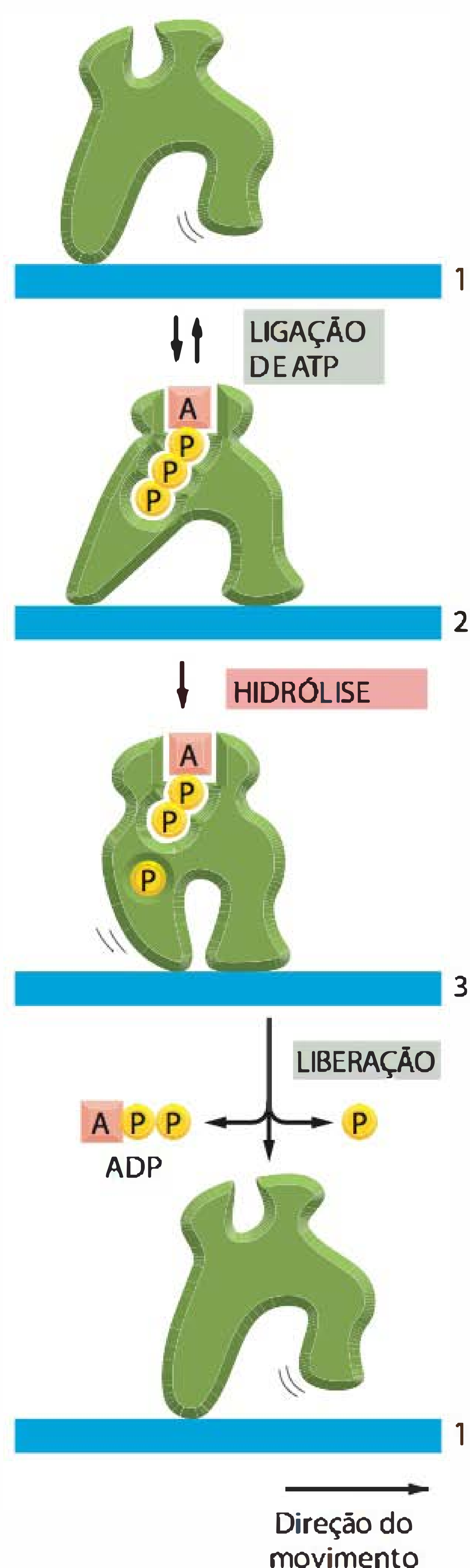


Figura 3-77 Uma proteína motora alostérica. A transição entre as três diferentes conformações inclui uma etapa induzida pela hidrólise de uma molécula de ATP, o que torna todo o ciclo irreversível. Por meio de repetidos ciclos, a proteína se move continuamente para a direita ao longo do filamento.

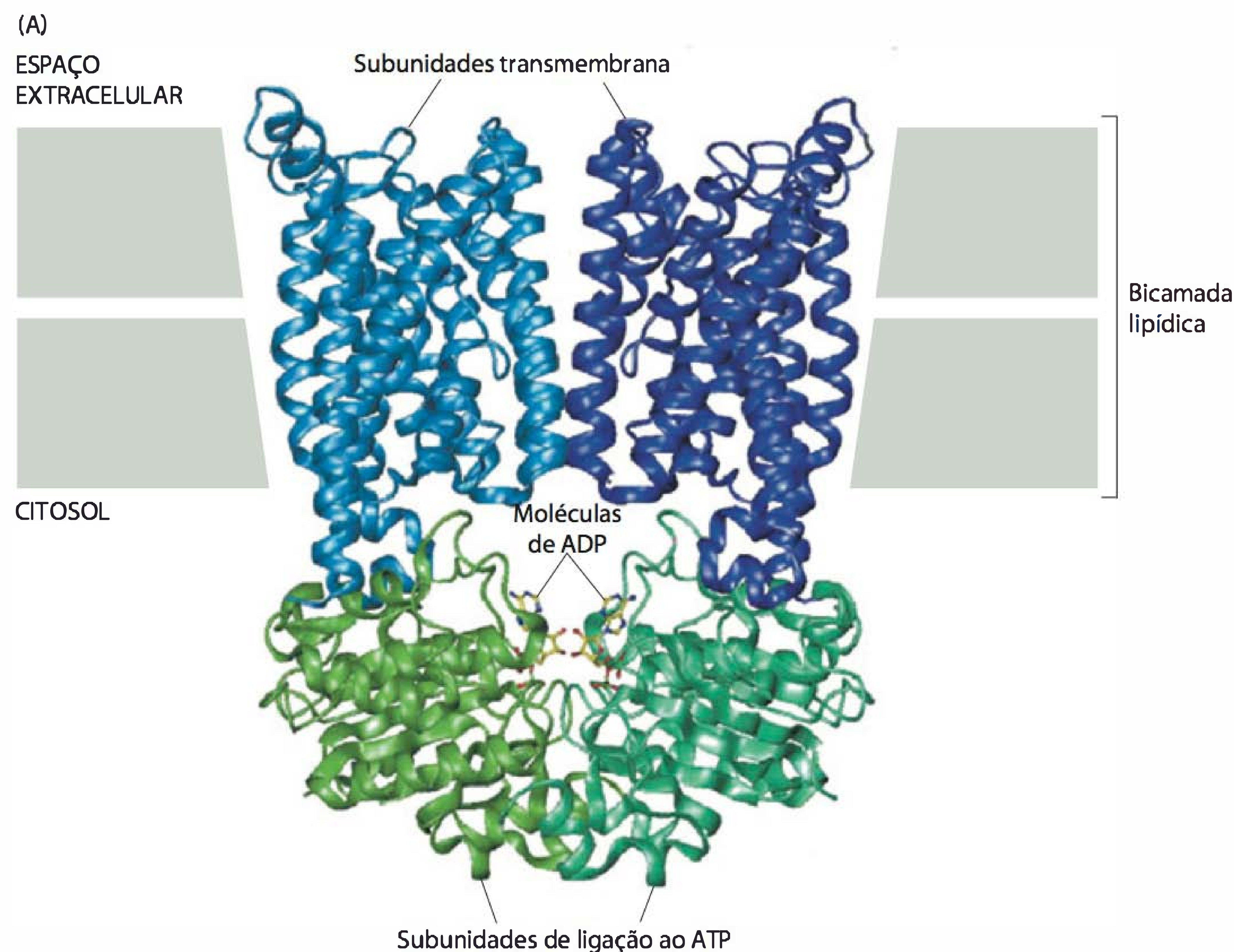
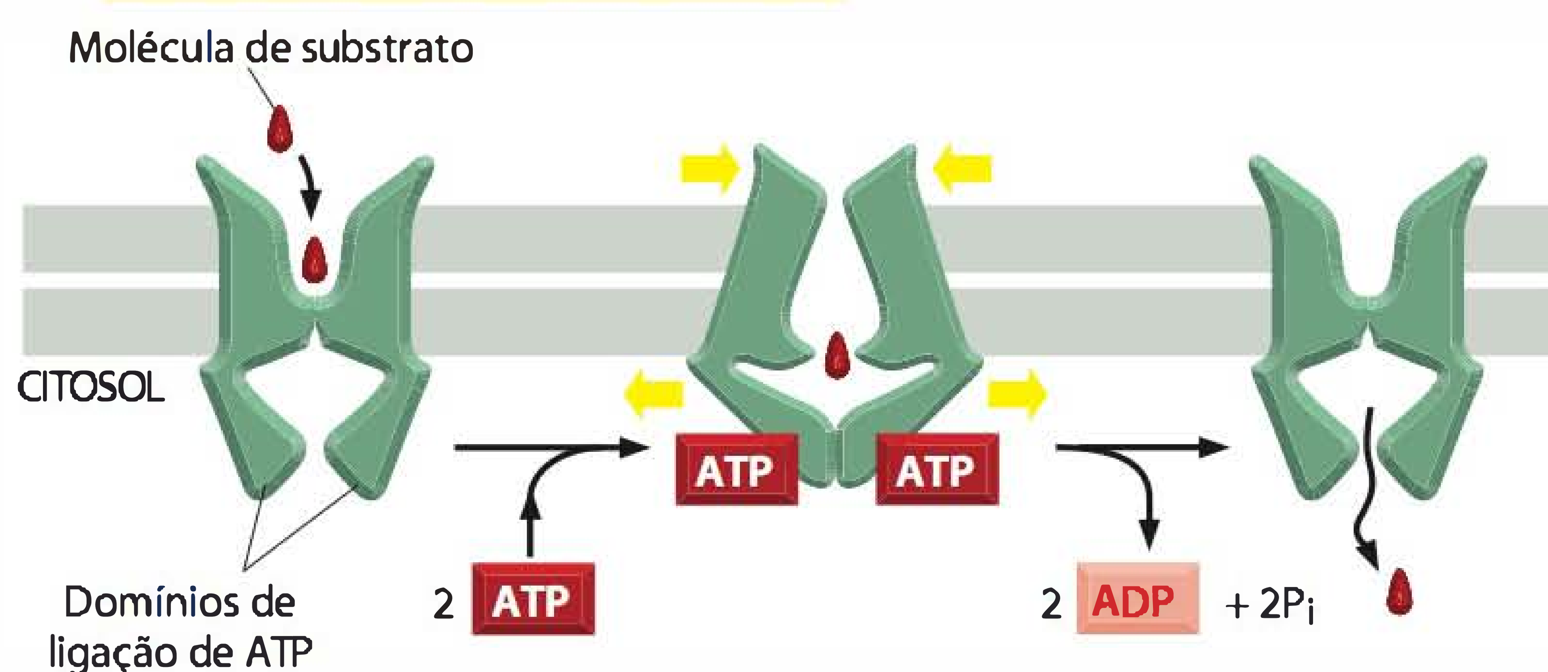
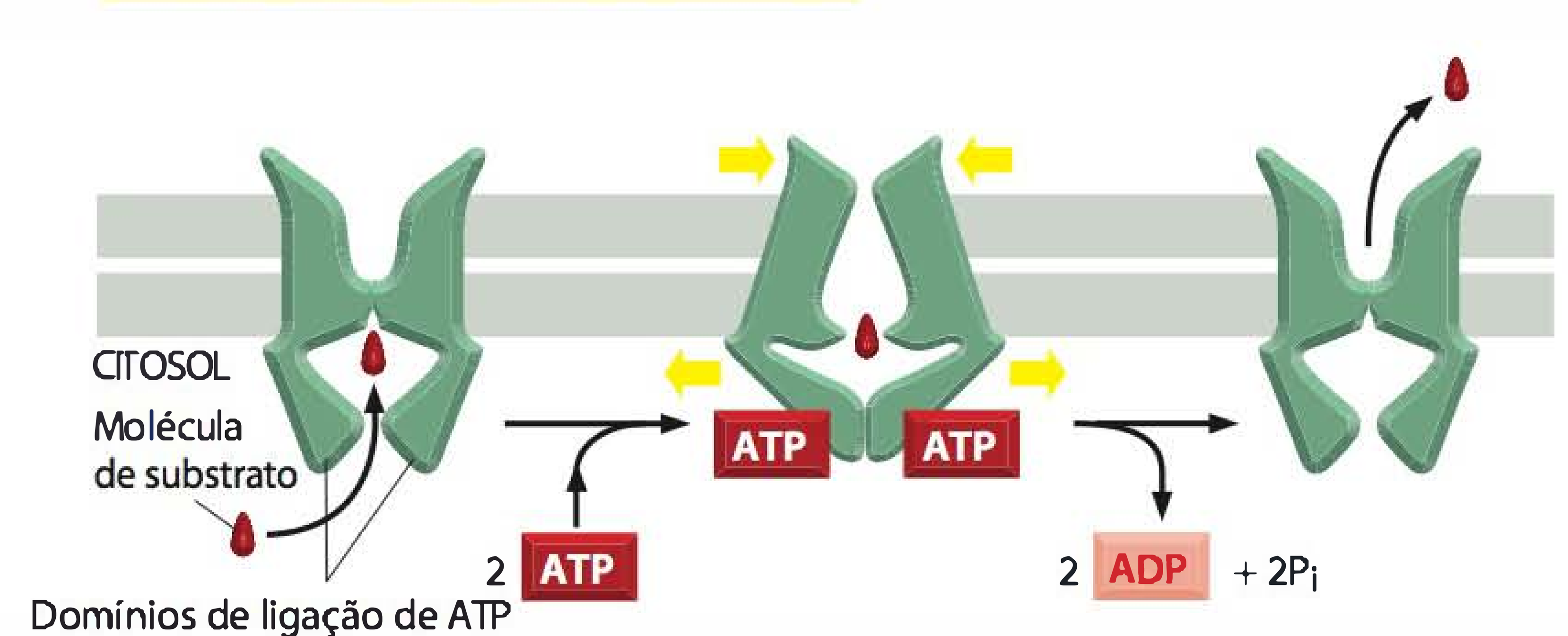


Figura 3-78 O transportador ABC, uma máquina proteica que bombeia grandes moléculas hidrofóbicas através da membrana. (A) A proteína bacteriana BtuCD, que capta a vitamina B_{12} para as células de *E. coli* utilizando a energia da hidrólise do ATP. A ligação de duas moléculas de ATP mantém unidas as duas subunidades de ligação ao ATP. A estrutura é mostrada na sua conformação ligada ao ADP, onde o canal para o espaço extracelular pode ser visto na conformação aberta, mas a abertura para o citosol permanece fechada. (B) Ilustração esquemática do bombeamento de substrato por transportadores ABC. Em bactérias, a ligação de uma molécula de substrato na face extracelular do complexo proteico desencadeia a hidrólise do ATP, seguida pela liberação de ADP, o que abre o poro de acesso ao citoplasma; a bomba então retorna ao estado inicial para um novo ciclo. Em eucariotos, ocorre um processo inverso, levando ao bombeamento das moléculas de substrato para fora da célula. (A, adaptada de K. P. Locher, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14:426-441, 2004. Com permissão de Elsevier.)





superfície da mucosa de células do trato intestinal, por exemplo, ou na barreira hematencefálica. O estudo dos transportadores ABC é de grande interesse para a área médica, pois a superprodução de proteínas dessa classe de transportadores contribui para a resistência de células tumorais a fármacos quimioterápicos. Nas bactérias, o mesmo tipo de proteínas atua principalmente na captação de nutrientes essenciais para a célula.

O transportador ABC é um tetrâmero, com um par de subunidades transmembrana ligado ao par de subunidades que ligam ATP, localizadas na adjacência da membrana plasmática (**Figura 3-78**A). Como nos outros exemplos que já discutimos, a hidrólise das moléculas de ATP ligadas à proteína induz alterações conformacionais na proteína, transmitindo as forças que levam as subunidades transmembrana a deslocar moléculas ligadas a elas através da bicamada lipídica (Figura 3-78B).

Os humanos inventaram muitos tipos de bombas mecânicas, e não deveria ser surpreendente que as células também contenham bombas ligadas à sua membrana que funcionam de outras maneiras. Dentre as mais notáveis estão as bombas rotativas que acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de íons H^+ (prótons). Essas bombas se assemelham a pequenas turbinas e são usadas para acidificar o interior de lisossomos e de outras organelas de células eucarióticas. Assim como outras bombas de íons que criam gradientes iônicos, elas podem funcionar ao contrário para catalisar a reação ADP + $P_i \rightarrow$ ATP, se houver um acentuado gradiente de íons a serem transportados através da membrana.

Uma dessas bombas, a ATP-sintase, aproveita um gradiente de concentração de prótons produzido pelo processo de transporte de elétrons para produzir a maioria do ATP utilizado pelos organismos vivos. Essa bomba ubíquia tem um papel central na conversão de energia, e discutiremos a sua estrutura tridimensional e seu mecanismo de ação no Capítulo 14.

As proteínas frequentemente formam complexos grandes, que funcionam como máquinas proteicas

Proteínas grandes, formadas por diversos domínios, são capazes de desempenhar funções mais elaboradas que proteínas pequenas e monoméricas. As tarefas mais impressionantes, no entanto, são realizadas por grandes complexos proteicos formados por várias proteínas. Agora que se tornou possível reconstruir a maior parte dos processos biológicos em sistemas livres de células em laboratório, ficou claro que cada um dos principais processos de uma célula – como a replicação de DNA, a síntese de proteínas, a formação de vesículas ou a sinalização transmembrana – é catalisado por um conjunto altamente organizado de 10 ou mais proteínas interligadas. Na maioria dessas *máquinas proteicas*, uma reação energeticamente favorável, como a hidrólise de trifosfatos de nucleotídeo (ATP ou GTP), induz uma série ordenada de mudanças conformacionais em uma ou mais subunidades proteicas, permitindo ao complexo mover-se coordenadamente. Assim, as enzimas podem ser posicionadas diretamente no local onde são necessárias, conforme a máquina catalisa uma sucessão de reações. Isso é o que acontece, por exemplo, na síntese de proteínas em um ribossomo (discutido no Capítulo 6) ou na replicação do DNA, em que um grande complexo multiproteico movimenta-se rapidamente ao longo do DNA (discutido no Capítulo 5).

As células desenvolveram máquinas proteicas pela mesma razão que os humanos inventaram máquinas mecânicas e eletrônicas. Para realizar qualquer tipo de tarefa, as etapas temporal e espacialmente coordenadas por processos interligados são muito mais eficientes do que o uso sequencial de ferramentas individuais.

Máquinas proteicas com partes intercambiáveis maximizam o uso da informação genética

Para compreender mais profundamente a natureza das máquinas proteicas, devemos considerar um exemplo relativamente simples: a **ubiquitina-ligase SCF**. Esse complexo proteico se liga a diferentes alvos proteicos em diferentes momentos do ciclo celular e adiciona covalentemente cadeias polipeptídicas de multiubiquitinas a essas proteínas. A sua estrutura em forma da C é composta por cinco subunidades proteicas, sendo a maior delas uma proteica que serve como uma *proteína de suporte* sobre a qual o restante da estrutura é montada. A estrutura releva um mecanismo notável (**Figura 3-79**). Em uma das terminações da estrutura em C está localizada a enzima E2 conjugadora de ubiquitina. Na outra extremidade se localiza um braço de ligação de substrato, a subunidade conhecida como *proteína F-box*. Essas duas subunidades são separadas em uma distância de 5 nm. Quando o complexo proteico é ativado, a proteína F-box se liga a um local específico da proteína-alvo, posicionando essa proteína no espaço entre as duas extremidades da estrutura em C, de forma que algumas das suas cadeias laterais de lisina entrem em contato com a enzima conjugadora de ubiquitina. A enzima pode então catalisar a adição repetida de polipeptídeos de ubiquitina a essas lisinas (ver Figura 3-79C), gerando uma cadeia poliubiquitina que marca a proteína-alvo para a destruição no interior do proteassomo (ver p. 393).

Dessa forma, proteínas específicas são marcadas para uma destruição rápida em resposta a sinais específicos, colaborando no andamento do ciclo celular (discutido no Capítulo 17). A marcação para a destruição frequentemente envolve a criação de um padrão específico de fosforilação na proteína-alvo, necessário para o seu reconhecimento pela subunidade F-box. A marcação também requer a ativação de uma ubiquitina-ligase SCF que contenha o braço de ligação ao substrato apropriado. Muitos desses braços (as subunidades F-box) são intercambiáveis no complexo proteico (ver Figura 3-79B), e existem mais de 70 genes humanos que os codificam.

Como enfatizado anteriormente, uma vez que uma proteína bem adaptada tenha evoluído, sua informação genética tende a ser duplicada para gerar uma família de proteínas correlatas. Dessa forma, por exemplo, não existem apenas diversas proteínas F-box – tornando possível o reconhecimento de diferentes conjuntos de proteínas-alvo mas também uma família de proteínas-molde (conhecidas como culinas) que deu origem à família de ubiquitina-ligases do tipo SCF.

A pressão nos organismos para minimizar o número de seus genes (ver p. 265) provavelmente ajuda a explicar por que o *splicing* do RNA é tão prevalente em eucariotos superiores, permitindo que diversas proteínas correlacionadas sejam sintetizadas a partir de um único gene (discutido no Capítulo 6). Uma máquina proteica como a ubiquitina-ligase SCF, com suas partes intercambiáveis, também faz um uso econômico da informação genética nas

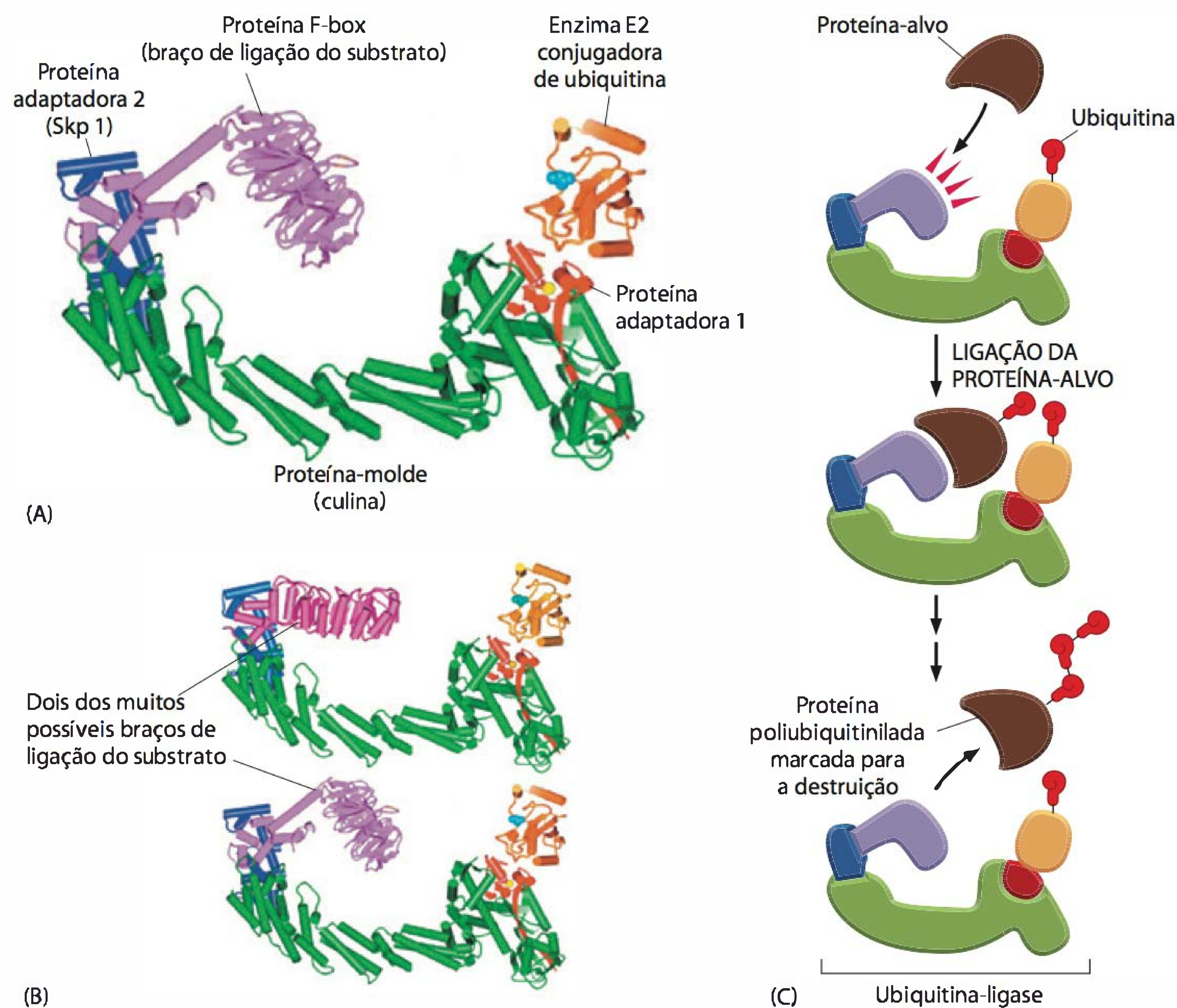


Figura 3-79 Estrutura e modo de ação da ubiquitina-ligase SCF. (A) A estrutura do complexo formado por cinco enzimas, incluindo a ubiquitina-ligase E2. A proteína representada aqui como proteína adaptadora 1 é a proteína Rbx/Hrt1, a proteína adaptadora 2 é a proteína Skp 1, e a culina é a proteína Cul1. (B) Comparação do mesmo complexo com dois braços de ligação de substrato diferentes, as proteínas F-box Skp2 (*acima*) e β-trCP1 (*abaixo*), respectivamente. (C) Ligação e ubiquitinação de uma proteína-alvo pela ubiquitina-ligase SCF. Se, conforme indicado, uma cadeia de moléculas de ubiquitina é adiciona à mesma lisina da proteína-alvo, esta proteína fica marcada para a destruição rápida pelo proteassomo. (A e B, adaptadas de G. Wu et al., *Mol. Cell* 11:1445-1456, 2003. Com permissão de Elsevier.)

células dessa mesma forma, assim como funções novas podem evoluir para todo o complexo simplesmente com a produção de uma versão alternativa de uma das suas subunidades.

A ativação de máquinas proteicas frequentemente envolve o seu posicionamento em locais específicos

Conforme os cientistas aprenderam mais sobre os detalhes da biologia celular, eles reconheceram o crescente grau de sofisticação da química celular. Dessa forma, não apenas sabemos que as máquinas proteicas desempenham papéis principais, como também se tornou claro recentemente que elas são formadas em locais específicos da célula, sendo ativadas apenas quando necessário. Utilizando proteínas de fusão fluorescentes marcadas com proteína verde fluorescente (GFP, *green flurescent protein*), em células vivas (ver p. 593), os biólogos celulares são capazes de seguir o reposicionamento de proteínas individuais, que ocorre em, resposta a sinais específicos. Assim, quando certas moléculas sinalizadoras extracelulares se ligam a proteínas receptoras na membrana plasmática, elas frequentemente recrutam um conjunto de outras proteínas na face interior da membrana plasmática para formar máquinas proteicas que propagam o sinal. Como exemplo, a **Figura 3-80A** ilustra o movimento rápido da proteína-cinase C (PKC, *protein kinase C*) para um complexo na membrana plasmática, onde se associa com proteínas que são substratos específicos para a fosforilação.

Existem mais de 10 enzimas PKC diferentes nas células humanas, que diferem tanto em seus modos de regulação quanto em suas funções. Quando ativadas, essas enzimas movem-se do citoplasma para diferentes locais intracelulares, formando complexos específicos com outras proteínas, o que permite que elas fosforilem diferentes substratos proteicos (Figura 3-80B). As ubiquitina-ligases SCF também se deslocam para locais específicos para realizar suas funções em momentos adequados. Conforme será explicado quando discutirmos sinalização celular no Capítulo 15, esses mecanismos frequentemente envolvem fosforilação proteica, assim como **proteínas de sustentação**, que unem um conjunto de ativadores, inibidores, adaptadores e substratos proteicos em locais específicos da célula.

Esse fenômeno geral é conhecido como *proximidade induzida*, e explica a observação, outrora desconcertante, de que formas de enzimas ligeiramente diferentes, mas com o mesmo sítio catalítico, frequentemente apresentam funções biológicas bastante distintas. As células alteram a localização de suas proteínas modificando-as covalentemente em uma variedade de maneiras, como parte do "código regulador" explicado a seguir. Essas modificações

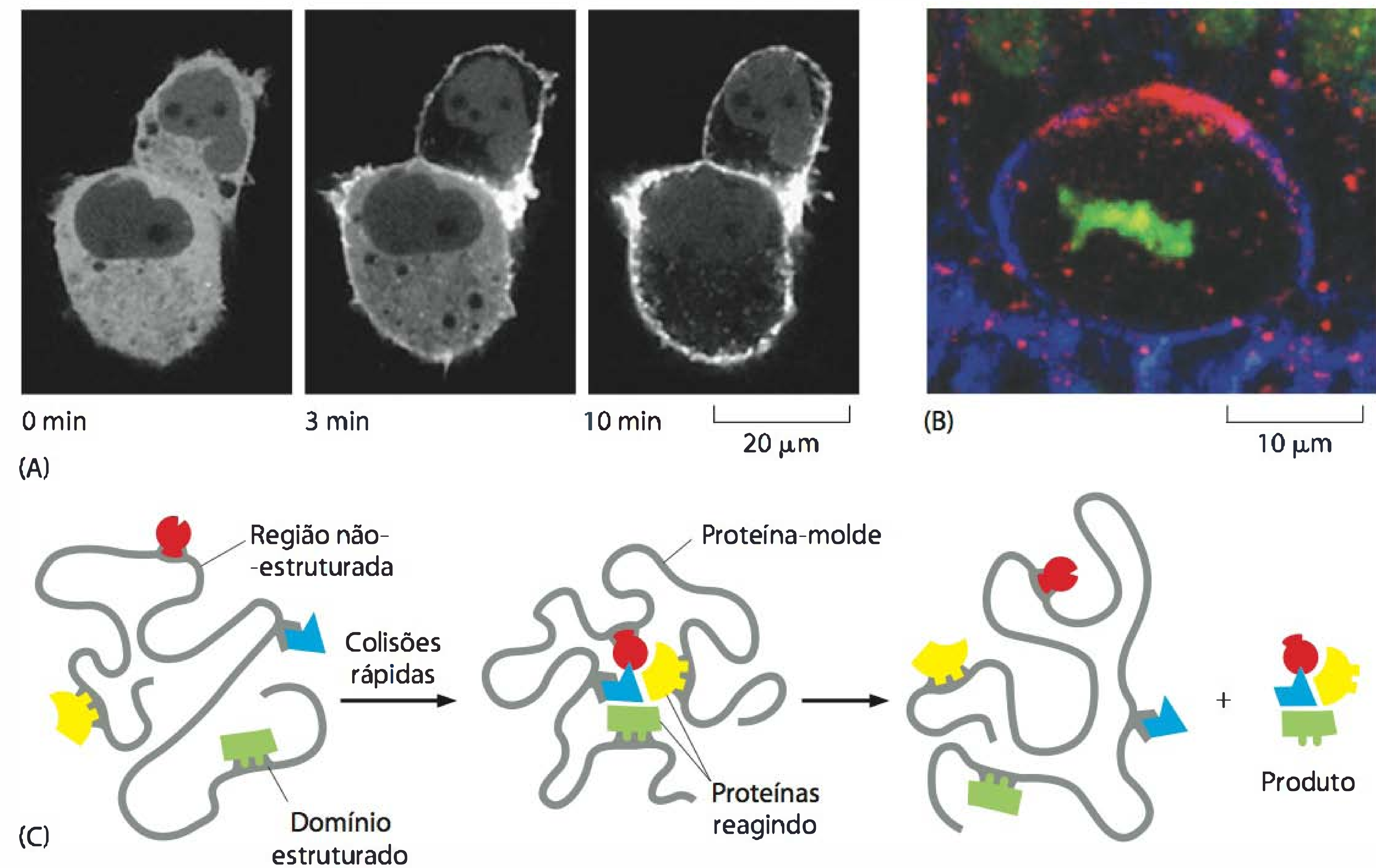


Figura 3-80 Formação de máquinas proteicas em locais específicos da célula. (A) Em resposta a um sinal (aqui um ésterforbol), uma gama de subespécies de proteína-cinases C se move rapidamente do citosol para a membrana plasmática. A proteína-cinase é fluorescente nessas células vivas pois um gene modificado por engenharia genética no interior dessas células codifica uma proteína fusionada que une a cinase à GFP. (B) A associação específica de diferentes subespécies de proteína-cinase C (aPKC) com neuroblastos atípicos em diferenciação em um embrião inicial de *Drosophila*. A cinase está marcada em *vermelho* e o núcleo da célula em *verde*. (C) Diagrama ilustrando como a simples proximidade criada por proteínas-molde pode acelerar bastante a velocidade de reações nas células. Neste exemplo, longas regiões não-estruturadas da cadeia polipeptídica em uma grande proteína-molde conectam uma série de domínios estruturados que ligam um conjunto de proteínas que reagem entre si. As regiões não-estruturadas servem como conexões flexíveis que aumentam a velocidade das taxas de reação por causarem colisões rápidas e aleatórias entre todas as proteínas ligadas à proteína-molde. (Para um exemplo simples desse tipo de ligação, ver Figura 16-38.) (A, de N. Sakai et al., *J. Cell. Biol.* 139:1465-1476, 1997. Com permissão de The Rockefeller University Press. B, cortesia de Andreas Wodarz, Instituto de Genética, Universidade de Düsseldorf, Alemanha.)

criam sítios de ligação nas proteínas que as ligam a proteínas-molde específicas, agrupando as proteínas necessárias para uma reação em uma região específica da célula. A maior parte das reações biológicas é catalisada por conjuntos de 5 ou mais proteínas, e esse agrupamento de proteínas frequentemente é necessário para que a reação ocorra. Os moldes proteicos permitem que as células compartimentem reações mesmo na ausência de membranas. Apesar de ter sido reconhecido como um fenômeno corriqueiro apenas recentemente, esse tipo de agrupamento é particularmente evidente no núcleo celular (ver Figura 4-69).

Muitas proteínas de sustentação parecem ser bastante distintas da culina ilustrada previamente na Figura 3-79: ao invés de manter as proteínas ligadas em um arranjo preciso umas em relação às outras, algumas proteínas-molde conectam as proteínas através de regiões não-estruturadas de cadeia polipeptídica. Isso mantém as proteínas unidas, fazendo com que colidam umas com as outras frequentemente, em orientações aleatórias – e algumas delas levarão a reações produtivas (Figura 3-80C). Em essência, esse mecanismo acelera bastante as reações pela criação de um local de alta concentração de espécies reativas. Por essa razão, o uso de proteínas-molde representa uma forma especialmente versátil de controlar a química celular (ver também Figura 15-61).

Muitas proteínas são controladas por modificações covalentes em diversos sítios

Até agora descrevemos apenas um tipo de modificação pós-tradução das proteínas – aquela em que um fosfato é ligado covalentemente à cadeia lateral de um aminoácido (ver Figura 3-64). Mas um grande número de outras modificações também ocorre, sendo conhecidos mais de 200 tipos distintos. Para dar uma ideia dessa variedade, a **Tabela 3-3** apresenta um

Tabela 3-3 Algumas moléculas ligadas covalentemente às proteínas regulam a função proteica

Grupo modificador	Algumas funções proeminentes
Fosfato em Ser, Tre ou Tir	Induz a associação da proteína em complexos maiores (ver Figura 15-19).
Metil em Lis	Ajuda a criar o código de histonas na cromatina pela formação de mono, di ou trimetil lisina (ver Figura 4-38).
Acetil em Lis	Ajuda a criar o código de histonas na cromatina (ver Figura 4-38).
Grupo **palmitil** em Cis	A adição desse ácido graxo induz a associação de proteínas com membranas (ver Figura 10-20).
***N*-acetilglucosamina** em Ser ou Tre	Controla a atividade enzimática e a expressão gênica na homeostase da glicose.
Ubiquitina em Lis	A adição de monoubiquitina regula o transporte de proteínas de membrana em vesículas (ver Figura 13-58). A poliubiquitinação marca a proteína para a degradação (ver Figura 3-79).

A ubiquitina é um polipeptídeo de 76 aminoácidos; existem pelo menos 10 outras proteínas relacionadas à ubiquitina, como as proteínas SUMO, que modificam proteínas de modo similar.

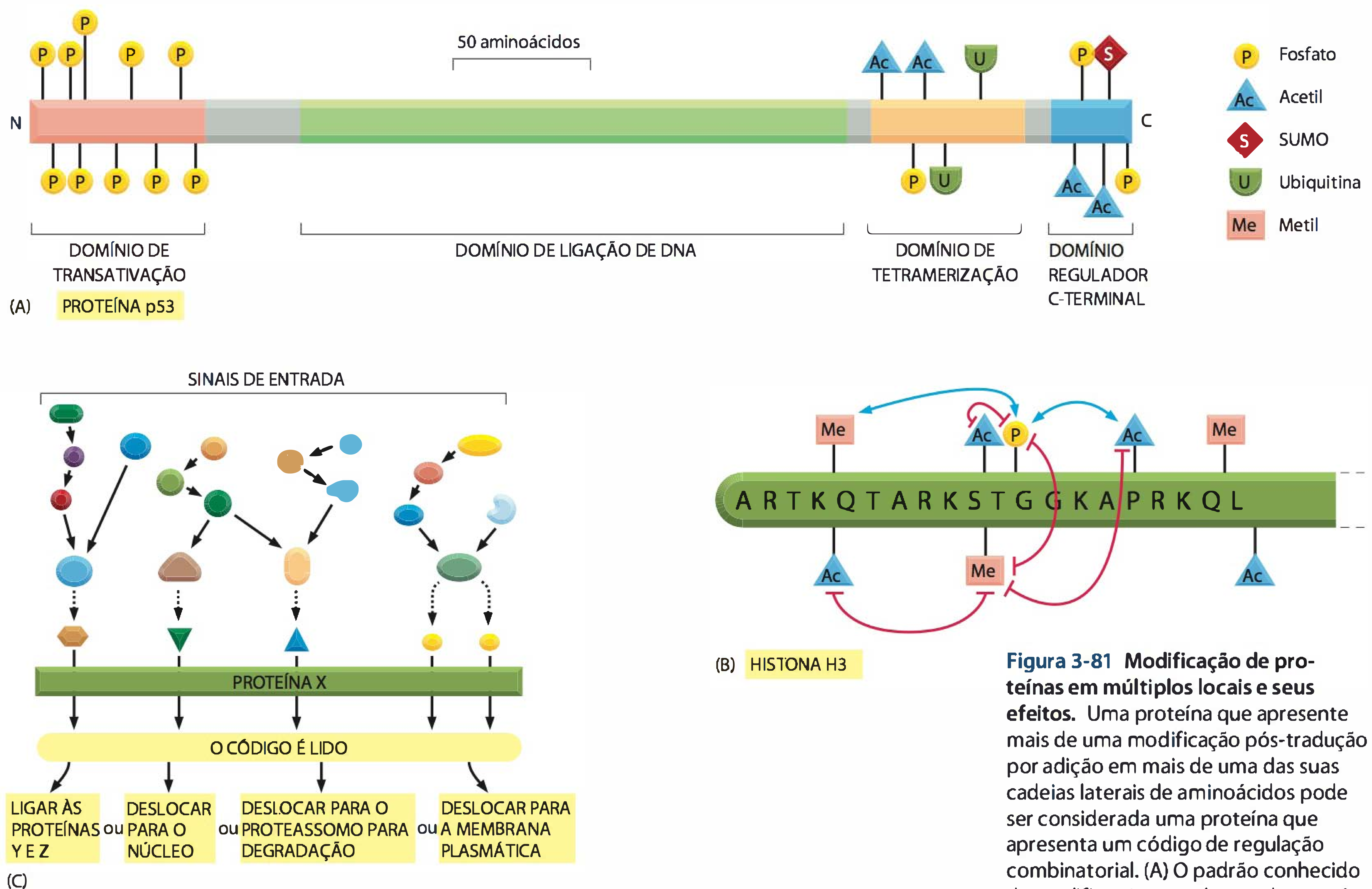


Figura 3-81 Modificação de proteínas em múltiplos locais e seus efeitos. Uma proteína que apresente mais de uma modificação pós-tradução por adição em mais de uma das suas cadeias laterais de aminoácidos pode ser considerada uma proteína que apresenta um código de regulação combinatorial. (A) O padrão conhecido de modificações covalentes da proteína p53; a ubiquitina e a SUMO são polipeptídeos similares (ver Tabela 3-3). (B) As modificações possíveis nos primeiros 20 aminoácidos da porção N-terminal da histona H3, mostrando não apenas a sua localização, mas também seus efeitos de ativação (*azul*) e de inibição (*vermelho*) nas modificações covalentes adjacentes. Além dos efeitos mostrados, a acetilação e a metilação de uma lisina são reações mutuamente exclusivas (ver Figura 4-38). (C) Diagrama mostrando a forma geral com que modificações em múltiplos domínios são adicionadas (e removidas) a proteínas através de redes de sinalização, e como o código regulador combinatorial resultante é interpretado para alterar o comportamento de uma célula.

subconjunto de grupos modificadores com papel regulador conhecido. Como na adição de fosfato, esses grupos são adicionados e removidos das proteínas de acordo com as necessidades da célula.

Sabe-se que um grande número de proteínas é modificado em mais de uma cadeia lateral de aminoácido, com diferentes eventos reguladores causando diferentes padrões dessas modificações. Um exemplo notório é a proteína p53, que tem papel central no controle da resposta celular a circunstâncias adversas (ver p. 1105). Por meio de um entre quatro tipos diferentes de adições moleculares, essa proteína pode ser modificada em 20 sítios distintos (**Figura 3-81**A). Como é possível um enorme número de combinações dessas 20 modificações distintas, o comportamento da proteína pode, em princípio, ser alterado de diversas formas. Inclusive, o padrão de modificações de uma proteína pode determinar sua suscetibilidade a mais modificações, como ilustrado pela histona H3 na Figura 3-81B.

Os biólogos celulares reconheceram apenas recentemente que cada conjunto de modificações covalentes de uma proteína constitui um importante *código de regulação combinatorial*. Conforme grupos modificadores específicos são adicionados ou removidos de uma proteína, esse código leva a diferentes conjuntos de comportamentos da proteína – alterando a sua atividade ou estabilidade, seus ligantes e sua localização específica no interior da célula (Figura 3-81C). Isso ajuda a célula a responder rapidamente e com grande versatilidade às alterações nas suas condições ou no ambiente.

Uma complexa rede de interação de proteínas é a base da função da célula

Há muitos desafios para os biólogos celulares nesta era pós-genômica, quando sequências de genomas completos são conhecidas. Um desafio é a necessidade de dissecar e reconstruir cada uma das milhares de máquinas proteicas que existem em um organismo como o nosso. Para entender esses notáveis complexos proteicos, cada um deve ser reconstituído a partir de suas partes proteicas purificadas – para que possamos estudar detalhadamente, em um tubo de ensaio e sob condições controladas, seu modo de operação, livre de todos os outros

componentes da célula. Essa é uma tarefa árdua. Mas agora sabemos que cada um desses subcomponentes de uma célula também interage com outras macromoléculas, criando uma grande rede de interações proteína-proteína e proteína-ácidos nucleicos por toda a célula. Para entender a célula, então, será necessário analisar a maioria dessas outras interações.

Uma ideia da complexidade das redes de proteína intracelulares pode ser obtida a partir de um exemplo particularmente bem-estudado descrito no Capítulo 16: as muitas dúzias de proteínas que interagem com o citoesqueleto de actina na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ver Figura 16-18). A extensão de tais interações proteína-proteína também pode ser estimada de uma forma mais geral. Uma grande quantidade de informações valiosas está agora disponível livremente na Internet em bancos de dados de proteínas: dezenas de milhares de estruturas tridimensionais de proteínas e milhões de sequências de proteínas derivadas de sequências de nucleotídeos de genes. Os cientistas têm desenvolvido novos métodos de mineração de dados dessa grande fonte para aumentar nossa compreensão das células. Em particular, ferramentas de bioinformática têm sido combinadas com tecnologias de robótica e microarranjos (ver p. 574) para permitir que milhares de proteínas sejam investigadas em um único conjunto de experimentos. **Proteômica** é o termo utilizado para descrever tais pesquisas focadas em análises de proteínas em larga escala, em analogia ao termo *genômica*, utilizado para descrever a análise em larga escala de sequências de DNA e de genes.

Os biólogos utilizam dois métodos diferentes para mapear as interações de ligação direta entre as muitas proteínas diferentes de uma célula. O método inicial de escolha tinha como base a genética: por meio de uma engenhosa técnica conhecida como varredura de dois híbridos de levedura (ver Figura 8-24), dezenas de milhares de interações entre milhares de proteínas foram mapeadas em leveduras, nematódeos e na mosca-da-fruta, *Drosophila*. Mais recentemente, um método com base na marcação por afinidade e em espectroscopia de massas tem ganhado vantagem (discutido no Capítulo 18), pois parece gerar resultados mais fidedignos. Os resultados dessas e de outras análises de predição da interação entre proteínas ligantes já foram tabulados e organizados em bancos de dados disponíveis na Internet. Isso permite que um biólogo celular que esteja estudando um pequeno conjunto de proteínas descubra facilmente quais outras proteínas na mesma célula ligam e interagem com o conjunto de proteínas em estudo. Quando representadas graficamente em um *mapa de interação de proteínas*, cada proteína aparece como um retângulo ou um ponto na rede bidimensional, com uma linha reta conectando aquelas proteínas que se ligam uma à outra.

Quando centenas ou milhares de proteínas são mostradas no mesmo mapa, o diagrama da rede se torna bastante complicado, servindo para ilustrar o quanto mais temos que aprender antes de afirmarmos que realmente compreendemos a célula. Os mapas menores, subseções dos mapas citados anteriormente, focados em algumas proteínas de interesse, são muito mais úteis. Dessa forma, a **Figura 3-82** mostra a rede de interações proteína-proteína para as cinco proteínas que formam a ubiquitina-ligase SCF nas células de levedura (ver Figura 3-79). Quatro das subunidades dessa ligase estão localizadas no canto inferior direito da Figura 3-82. A subunidade restante, a proteína F-box, que atua como o braço de ligação do substrato, aparece como o conjunto de 15 produtos de diferentes genes que se ligam à proteína adaptadora 2 (a proteína Skp1). Ao longo da parte superior e à esquerda da figura estão os conjuntos adicionais de interações proteicas, marcados com sombreamento *amarelo* e *verde*: conforme indicado, esses conjuntos da proteínas atuam na origem da replicação do DNA, no controle do ciclo celular, na síntese da metionina, no cinetócoro e na formação da ATPase-H^+ vacuolar. Utilizaremos essa figura para explicar como tais mapas de interações de proteínas são empregados, o que eles significam e o que eles não significam.

1. Mapas de interações de proteínas são úteis para a identificação de funções correlatas de proteínas ainda não-caracterizadas. Por exemplo, os produtos dos genes cuja existência foi apenas inferida até agora, a partir da sequência genômica de leveduras, que são as seis proteínas na figura que não apresentam abreviação de três letras (*letras brancas*, começando com Y). Uma dessas proteínas, produto da assim chamada *fase de leitura aberta* YDR196C, está localizada no grupo de origem de replicação, sendo provável que tenha algum papel na iniciação de forquilhas de replicação. As outras cinco proteínas restantes no diagrama são proteínas F-box que ligam Skp1 e provavelmente fazem parte da ubiquitina-ligase, atuando como braços de ligação de substrato, reconhecendo diferentes alvos proteicos. No

entanto, como discutiremos a seguir, nenhuma dessas inferências pode ser considerada correta sem dados adicionais.

2. Redes de interações de proteínas devem ser interpretadas com cuidado, pois, como a evolução utiliza a informação genética de um organismo de maneira eficiente, a mesma proteína pode fazer parte de dois complexos proteicos distintos, com diferentes tipos de funções. Dessa forma, apesar de a proteína A se ligar à proteína B e a proteína B se ligar à proteína C, as proteínas A e C não necessariamente atuam no mesmo processo. Por exemplo, sabemos a partir de estudos bioquímicos detalhados que as funções da proteína Skp1 no cinetócoro e na formação da ATPase-H^+ vacuolar (*sombreado amarelo*) são separadas da sua função na ubiquitina-ligase. De fato, apenas as três funções restantes da Skp1 ilustradas no diagrama – síntese de metionina, regulação do ciclo celular e origem de replicação (*sombreado verde*) – envolvem ubiquitinação.
3. Em comparações entre espécies, é provável que as proteínas que apresentam padrões de interações similares nos dois mapas de interações tenham a mesma função na célula. Dessa forma, conforme os cientistas geram mapas mais e mais detalhados para diversos organismos, estes resultados se tornarão cada vez mais úteis na inferência de funções de proteínas. Essas comparações de mapas são uma ferramenta particularmente poderosa para decifrar as funções de proteínas humanas. Existe uma ampla gama de informações que podem ser obtidas diretamente a partir

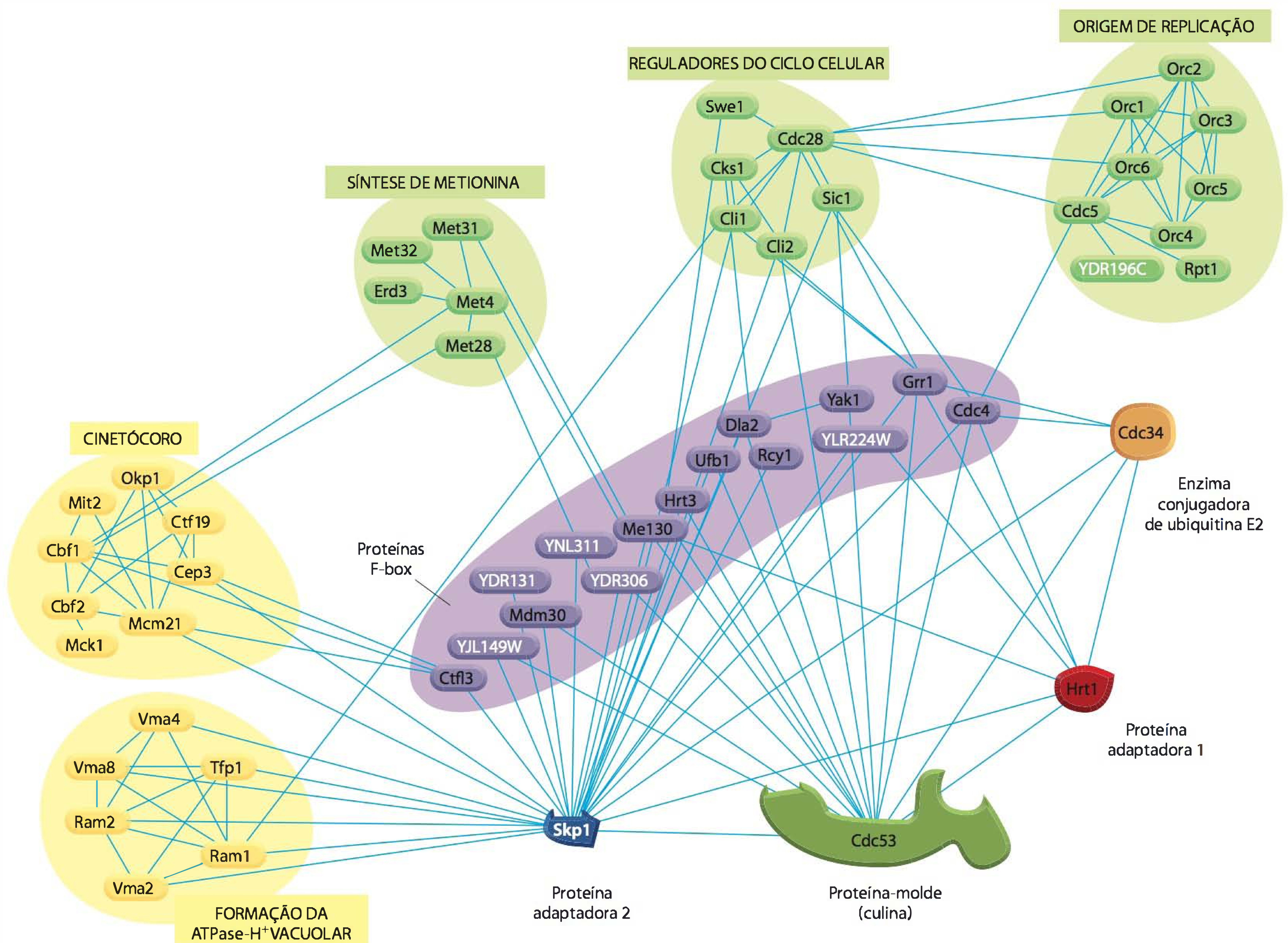


Figura 3-82 Mapa de algumas interações proteína-proteína da ubiquitina-ligase SCF e outras proteínas na levedura *S. cerevisiae*. Os símbolos e/ou as cores utilizados para as 5 proteínas da ligase são os mesmos utilizados na Figura 3-79. Note que 15 proteínas F-box diferentes são mostradas (*roxo*); aquelas em letras *brancas* (começando com Y) são conhecidas apenas a partir da sequência genômica como ORFs (*open reading frames*). Para detalhes adicionais, consulte o texto. (Cortesia de Peter Bowers e David Eisenberg, UCLA-DOE, Instituto de Genômica e Proteômica, UCLA.)

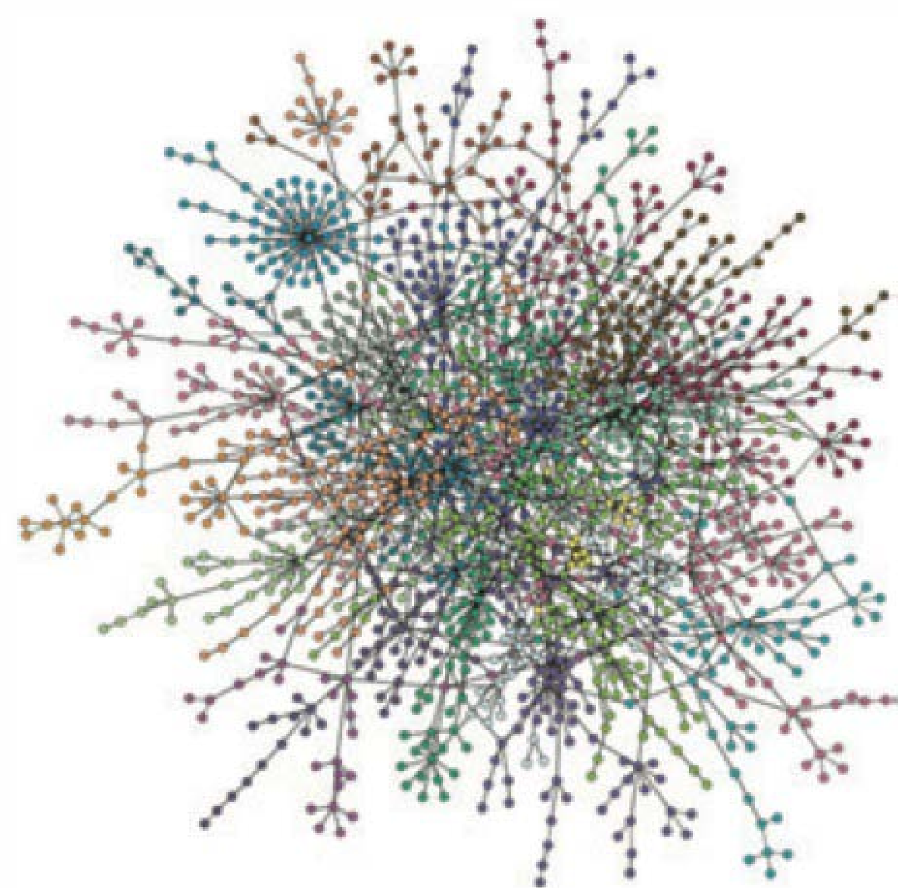


Figura 3-83 Rede de interações proteína-proteína em uma célula de levedura. Cada linha que conecta dois pontos (proteínas) indica uma interação proteína-proteína. (De A. Guimerá e M. Sales-Pardo, *Mol. Syst. Biol.* 2:42, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltda.)

de engenharia genética, mutações e análises genéticas em organismos – modelo – como leveduras, vermes e moscas – e que não estão disponíveis para humanos.

Os dados disponíveis sugerem que uma proteína típica em uma célula humana pode interagir com 5 a 15 outras proteínas distintas. Frequentemente, cada um dos diferentes domínios de uma proteína multidomínio interage com conjuntos diferentes de ligantes; de fato, podemos especular que as estruturas multidomínio particularmente extensas observadas nas proteínas humanas podem ter evoluído para facilitar tais interações. Dada a enorme complexidade das redes de interações de macromoléculas nas células (**Figura 3-83**), decifrar todo o seu modo de ação pode muito bem manter os cientistas ocupados por séculos.

Resumo

As proteínas podem formar dispositivos químicos bastante sofisticados, cujas funções dependem, em grande parte, das propriedades químicas detalhadas de sua superfície. Os sítios de ligação para ligantes são formados nas cavidades da superfície, nas quais estão precisamente posicionadas cadeias laterais de aminoácidos arranjadas a partir do enovelamento da proteína. Da mesma maneira, cadeias laterais de aminoácido normalmente não-reativas podem ser ativadas, sendo então capazes de formar e romper ligações covalentes. As enzimas são proteínas catalíticas que aceleram muito as reações pela ligação ao estado de transição de alta energia para uma reação específica; elas também executam simultaneamente catálise ácida e básica. A velocidade das reações enzimáticas frequentemente é tão alta que só é limitada pela difusão; a velocidade pode ser aumentada ainda mais se as enzimas que agem sequencialmente sobre um substrato são reunidas em um único complexo multienzimático, ou se as enzimas e seus substratos são limitados ao mesmo compartimento da célula.

As proteínas mudam reversivelmente sua forma quando ligantes ligam-se à sua superfície. As mudanças alostéricas na conformação da proteína, produzidas por um ligante, afetam a ligação de um segundo ligante, e esse acoplamento entre os dois ligantes ao sítio de ligação provê um mecanismo crucial para regular os processos da célula. Por exemplo, as vias metabólicas são controladas pela regulação por retroalimentação: algumas moléculas pequenas inibem e outras ativam enzimas da via. As enzimas controladas dessa forma geralmente constituem complexos simétricos, empregando mudanças conformacionais cooperativas para criar uma súbita resposta a mudanças nas concentrações do ligante que as regulam.

As mudanças na conformação das proteínas podem ser induzidas de maneira unidirecional pela liberação de energia química. Nas mudanças alostéricas acopladas à hidrólise de ATP, por exemplo, as proteínas podem realizar trabalho, gerando uma força mecânica ou movimentando-se por longas distâncias em uma única direção. As estruturas tridimensionais de proteínas, determinadas por cristalografia de raios X, têm revelado como uma pequena mudança local causada pela hidrólise do trifosfato de nucleotídeo é amplificada para criar maiores mudanças em outro local na proteína. Isso significa que essas proteínas podem atuar como dispositivos de ativação-desativação que transmitem informação, como fatores de associação, como motores ou como bombas ligadas a membranas. Máquinas proteicas altamente eficientes são formadas pela incorporação de muitas moléculas de proteínas diferentes em grandes complexos que coordenam os movimentos alostéricos dos componentes individuais. Hoje sabemos que essas máquinas executam muitas das reações mais importantes nas células.

As proteínas são alvo de diferentes modificações pós-tradução, como a adição covalente de um grupo fosfato ou de um grupo acetil à cadeia lateral de um aminoácido específico. A adição desses grupos modificadores é utilizada para regular a atividade da proteína, alterando sua conformação, sua ligação a outras proteínas e sua localização na célula. Uma proteína típica em uma célula irá interagir com mais de outras 5 proteínas. Utilizando as novas tecnologias de proteômica, os biólogos podem analisar milhares de proteínas em um único conjunto de experimentos. Um resultado importante é a produção de mapas detalhados de interações proteicas que almejam descrever todas as interações de ligação entre milhares de proteínas distintas de uma célula.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

3-1 Cada fita em uma folha β é uma hélice com dois aminoácidos por volta.

3-2 As alças dos polipeptídeos que se projetam da superfície da proteína frequentemente formam sítios de ligação para outras moléculas.

3-3 Uma enzima atinge a velocidade máxima em altas concentrações de substrato pois ela tem um número fixo de sítios ativos onde o substrato pode se ligar.

3-4 Altas concentrações de enzima acarretam um maior número de *turnover*.

3-5 Enzimas como a aspartato-transcarbamoilase, que sofrem transições alostéricas cooperativas, contêm, invariavelmente, múltiplas subunidades idênticas.

3-6 A adição e a remoção contínua de fosfatos pelas proteína-cinases e proteína-fosfatases é um gasto de energia – uma vez que sua ação combinada consome ATP – mas é uma consequência necessária da regulação efetiva por fosforilação.

Discuta as seguintes questões.

3-7 Considere a seguinte afirmação. "Para produzir uma molécula de cada tipo possível de cadeia polipeptídica de 300 aminoácidos de comprimento, seriam necessários mais átomos do que os que existem no universo". Dado o tamanho do universo, você acha que essa afirmação é correta? Uma vez que contar átomos é bastante complicado, considere o problema do ponto de vista das massas. A massa observável do universo é estimada em cerca de 10^{80} gramas, com uma ordem de grandeza a mais ou a menos. Assumindo que a massa média de um aminoácido é de 110 dáltons, qual seria a massa de uma das cadeias polipeptídicas possíveis de 300 aminoácidos? O valor final é maior que a massa do universo?

3-8 Uma estratégia comum para a identificação de proteínas com relação distante é a busca em bancos de dados utilizando sequências de assinatura que indicam uma função proteica em particular. Por que é melhor fazer essa busca com uma sequência curta do que com uma sequência longa? Haverá mais chances de encontrar um *hit* no banco de dados com a sequência longa?

3-9 O chamado motivo "*kelch*" consiste em uma folha β composta por quatro fitas, que forma o que conhecemos como propulsor β. Esse motivo geralmente é encontrado em repetições de quatro a sete unidades, formando um domínio de repetição *kelch* em uma proteína multidomínio. Um desses domínios de repetição *kelch* é mostrado na **Figura Q3-1**. Você classificaria esse domínio como sendo do tipo linha ou do tipo encaixe?

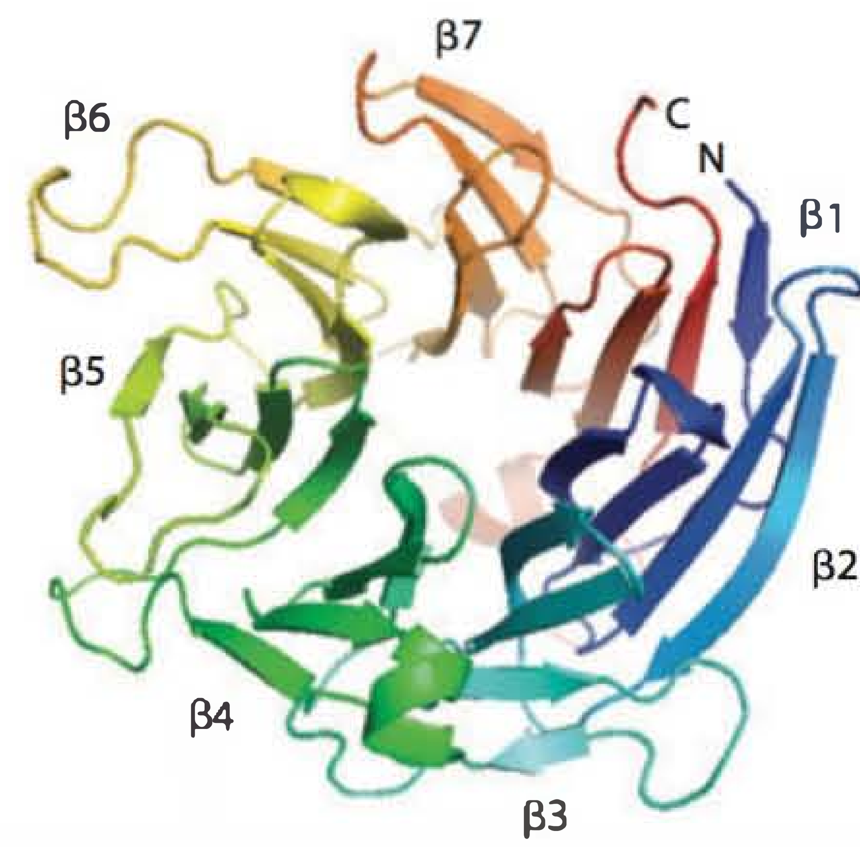


Figura Q3-1 O domínio de repetição *kelch* da galactose-oxidase de *D. dendroides* (Questão 3-9). Os sete propulsores β individuais estão indicados. As porções N-terminal e C-terminal são indicadas por N e C.

3-10 A titina, com massa molecular de 3×10^6 dáltons, é o maior polipeptídeo já descrito. Moléculas de titina se estendem dos filamentos finos musculares até a placa Z, onde agem como molas para manter os filamentos finos centrados nos sarcômeros. A titina é composta por um grande número de sequências de 89 aminoácidos de imunoglobulinas (Ig) repetidas, cada uma enovelada em um domínio de cerca de 4 nm de extensão (**Figura Q3-2A**).

Você desconfia que esse comportamento como molas da titina é causado pela perda sequencial de sua estrutura (e enovelamento) dos domínios Ig individuais. Você testa essa hipótese utilizando um microscópio de força atômica, que permite pegar uma terminação da molécula proteica e puxá-la com uma força mensurada com precisão. Para um fragmento de titina contendo sete repetições do domínio Ig, esse experimento forneceu uma curva serrilhada de força *versus* extensão, mostrada na Figura Q3-2B. Quando o experimento é repetido em uma solução de ureia 8 M (um desnaturante de proteínas), os picos desaparecem e a extensão medida se torna muito maior para a mesma força aplicada. Se o experimento é repetido após a proteína ter sido interligada com um tratamento com glutaraldeído, mais uma vez os picos desaparecem, mas a extensão se torna muito menor para a mesma força aplicada.

A. Os dados são consistentes com a sua hipótese de que o comportamento de molas da titina se deve à perda sequencial da estrutura dos domínios Ig individuais? Justifique.
B. A extensão de cada evento de desenovelamento dos domínios tem a magnitude esperada? (Em uma cadeia polipeptídica estendida, os aminoácidos são separados por intervalos de 0,34 nm.)
C. Por que cada pico na Figura Q3-2B é um pouco maior que o pico anterior?
D. Por que a força diminui tão abruptamente após cada pico?

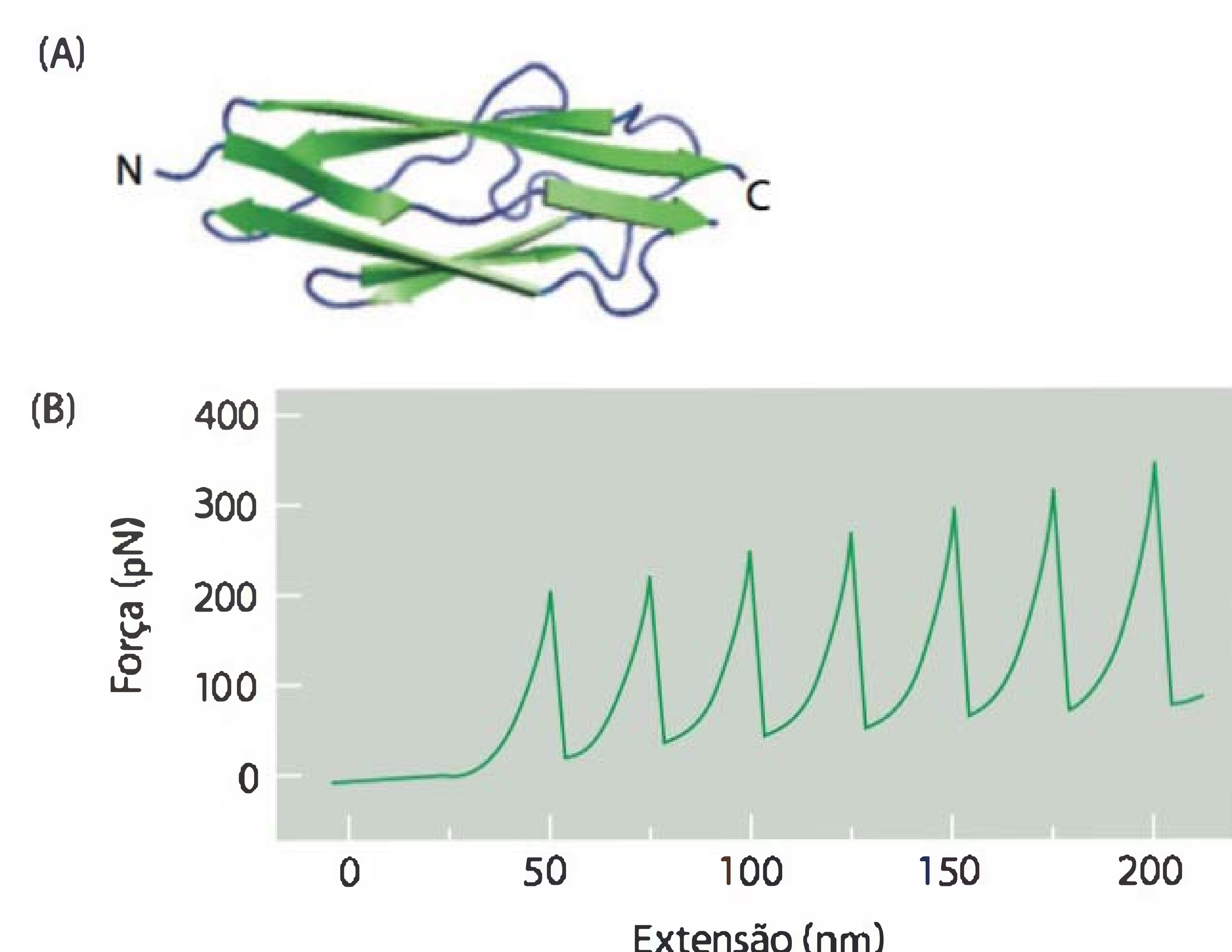


Figura Q3-2 O comportamento como uma mola da titina (Questão 3-10). (A) Estrutura de um domínio Ig individual. (B) Força em piconewtons *versus* extensão em nanômetros, obtida por microscopia de força atômica.

3-11 É dito frequentemente que os complexos proteicos são formados por subunidades (ou seja, proteínas sintetizadas individualmente) e não por uma longa proteína, pois através de subunidades é mais provável que a estrutura final correta seja obtida.

A. Assumindo que a maquinaria de síntese proteica incorpora um aminoácido incorreto a cada 10.000 inseridos, calcule a fração de ribossomos bacterianos que se formarão de maneira correta se a proteína fosse sintetizada como uma grande proteína e não construída a partir de proteínas individuais. Para o cálculo, assuma que o ribossomo é composto por 50 proteínas, cada uma com 200 aminoácidos de extensão, e que as subunidades, corretas e incorretas, são adicionadas com igual probabilidade ao ribossomo completo. (A probabilidade de que um polipeptídeo seja sintetizado corretamente, P_C, é igual à fração correta de cada operação, f_C, elevada à potência igual ao número de operações, n: $P_C = [f_C]^n$. Para um erro de 1/10.000, $f_C = 0{,}9999$.)
B. A premissa de que subunidades corretas e incorretas são adicionadas ao complexo com igual probabilidade é correta? Justifique. Como uma alteração nessa premissa afeta o cálculo realizado em A?

3-12 O vírus de sarcoma Rous (RSV, *Rous sarcoma virus*) possui um oncogene chamado de Src, que codifica uma tirosina-cinase continuamente ativa que induz a proliferação celular sem controle. Normalmente a Src carrega um grupo ácido graxo (miristoilato) ligado que permite a sua ligação à face citoplasmática da membrana plasmática. Uma versão mutante da Src não permite a ligação do miristoilato e não se liga à membrana. A infecção de células com RSV que codifica tanto a proteína Src normal quanto a mutante leva à mesma alta atividade da proteína tirosina-cinase, mas a mutante Src não causa a proliferação celular.

A. Assumindo que todas as proteínas Src normais estão ligadas à membrana plasmática e que a forma mutante Src está distribuída pelo citosol, calcule suas concentrações relativas nas adjacências da membrana plasmática. Para esse cálculo, assuma que a célula é uma esfera com raio de 10 μm e que a mutante Src está distribuída uniformemente enquanto a Src normal está confinada em uma camada de 4 nm de extensão imediatamente abaixo da membrana. (Para este problema, considere que a membrana não tem espessura. O volume da esfera é dado por $[4/3]\pi r^3$.)
B. O alvo (X) para a fosforilação mediada pela Src está localizado na membrana. Explique por que a mutante Src não causa proliferação celular.

3-13 Um anticorpo se liga a outra proteína com uma constante de equilíbrio, K, de $5 \times 10^9\ M^{-1}$. Quando se liga a uma segunda proteína relacionada, ele forma três ligações de hidrogênio a menos, reduzindo sua afinidade de ligação em 2,8 kcal/mol. Qual é o valor de K para a ligação da segunda proteína? (A alteração da energia livre está relacionada à constante de equilíbrio através da equação $\Delta G^o = -2{,}3\,RT \log K$, onde R é $1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/(mol K) e T é 310 K.)

3-14 A proteína SmpB se liga a tipos especiais de tRNA, tmRNA, para eliminar proteínas incompletas feitas a partir de moléculas de mRNA truncadas em bactérias. Se a ligação da SmpB ao tmRNA for mostrada graficamente como a fração de tmRNA ligado *versus* a concentração de SmpB, obtém-se uma curva simétrica em forma de S, conforme mostrado na **Figura Q3-3**. Essa curva é a demonstração visual de uma relação bastante útil entre K_d e concentração, tendo uma grande aplicabilidade. A expressão geral para a fração de ligante ligado é derivada da equação para K_d (K_d = [Pr] [L]/[Pr − L]), pela substituição de ($[L]_{TOT}$ − [L]) por [Pr − L] e rearranjo. Como a concentração total de ligante ($[L]_{TOT}$) é igual à concentração de ligante livre ([L]) mais o ligante ligado ([Pr − L]),

$$\text{a fração ligada é} = [L]/[L]_{TOT} = [Pr]/([Pr] + K_d).$$

Para SmpB e tmRNA, a fração ligada é = $[tmRNA]/[tmRNA]_{TOT}$ = $[SmpB]/([SmpB] + K_d)$. Utilizando essa relação, calcule a fração de tmRNA ligado para concentrações de SmpB iguais a 10^4K_d, 10^3K_d, 10^2K_d, 10^1K_d, K^d, $10^{-1}K_d$, $10^{-2}K_d$, $10^{-3}K_d$ e $10^{-4}K_d$.

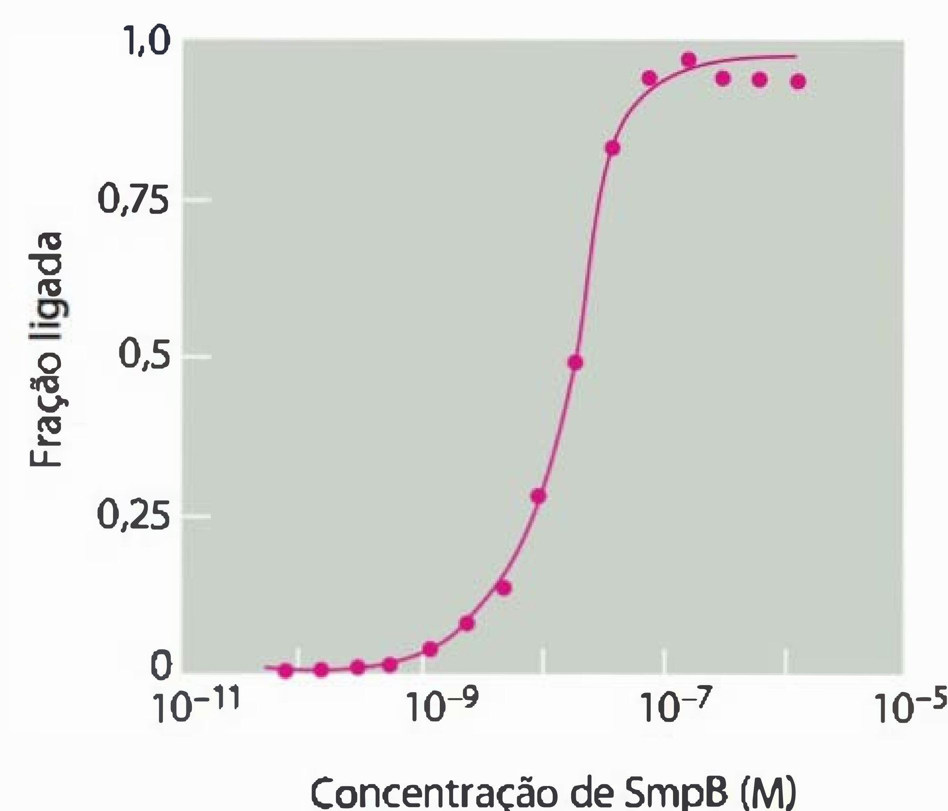


Figura Q3-3 Fração de tmRNA ligado *versus* concentração de SmpB (Questão 3-14).

3-15 Muitas enzimas seguem a cinética simples de Michaelis-Menten; que pode ser resumida pela equação:

$$\text{velocidade} = V_{máx}\,[S]/([S] + K_m)$$

onde $V_{máx}$ = velocidade máxima, [S] = concentração de substrato, e K_m = constante de Michaelis.

É instrutivo testar diferentes valores de [S] na equação para ver como a velocidade é afetada. Quais os valores da velocidade de reação para [S] igual a zero, igual ao K_m e igual à concentração infinita?

3-16 A enzima hexocinase adiciona um fosfato à D-glicose, mas ignora a sua imagem especular, a L-glicose. Suponha que você seja capaz de sintetizar uma hexocinase totalmente a partir de D-aminoácidos, que são a imagem especular dos L-aminoácidos.

A. Assumindo que uma enzima "D" irá se enovelar em uma conformação estável, qual relação você esperaria com a enzima "L" normal?
B. Você acha que uma enzima "D" vá acicionar um fosfato à L-glicose e ignorar a D-glicose?

3-17 Como você acha que uma molécula de hemoglobina é capaz de ligar de maneira eficaz o oxigênio nos pulmões e liberá-lo também com alta eficiência nos tecidos?

3-18 A síntese de nucleotídeos de purina AMP e GMP ocorre por uma ramificação da via que começa com ribose-5-fosfato (R5P), conforme mostrado esquematicamente na **Figura Q3-4**. Utilizando os princípios de inibição por retroalimentação, proponha uma estratégia reguladora para essa via de forma a garantir quantidades suficientes de AMP e GMP e minimizar a síntese de intermediários ($A - I$) quando houver quantidades adequadas de AMP e GMP.

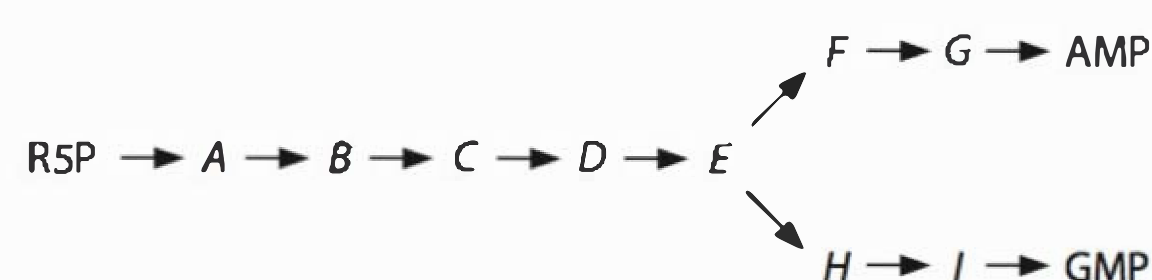


Figura Q3-4 Diagrama esquemático da via metabólica para a síntese de AMP e GMP a partir de R5P (Questão 3-18).

REFERÊNCIAS

Geral

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6th ed. New York: WK Freeman.

Branden C & Tooze (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Dickerson RE (2005) Present at The Flood: How Structural Molecular Biology Came About. Sunderland, MA: Sinauer.

Kyte J (2006) Structure in Protein Chemistry. New York: Routledge.

Petsko GA & Ringe D (2004) Protein Structure and Function. London: New Science Press.

Perutz M (1992) Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy. New York: WH Freeman.

A forma e a estrutura das proteínas

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.

Bray D (2005) Flexible peptides and cytoplasmic gels. *Genome Biol* 6:106-109.

Burkhard P, Stetefeld J & Strelkov SV (2001) coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*. 11: 82-88.

Caspar DLD & Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27: 1-24.

Doolittle RF (1995)The multiplicity of domains in proteins. *Annu Rev Biochem* 64:287-314.

Eisenberg D (2003) The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principle structural features of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11207-11210.

Fraenkel-Conrat H & Williams RC (1955) Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 41:690-698.

Goodsell DS & Olson AJ (2000) Structural symmetry and protein function. *Anu Rev Biophys Biomol Struct* 29:105-153.

Harrison SC (1992) Viruses. *Curr Opin Struc Bio* 2: 293-299.

Harrison SC (2004) Whither structural biology? *Nature Struct Mol Biol* 11:12-15.

Hudder A, Nathanson L & Deutscher MP (2003) Organization of mammalian cytoplasm. *Mol Cell Biol* 23:9318-9326.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Meiler J & Baker D (2003) Coupled prediction of protein secondary and tertiary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12105-12110.

Nomura M (1973) Assembly of bacterial ribosomes. *Science* 179: 864-873.

Orengo CA & Thornton JM (2005) Protein families and their evolution – a structural perspective. *Annu Rev Biochem* 7:867-900.

Pauling L & Corey RB (1951) Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc Natl Acad Sci* USA 37; 729-740.

Pauling L & Corey RB & Branson HR (1951) The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci* USA 37:205-211.

Ponting CP, Schultz J, Copley RR et al. (2000) Evolution of domain families. *Adv Protein Chem* 54:185-244.

Trinick J (1992) Understanding the functions of titin and nebulin. *FEBS Lett* 307:44-48.

Vogel C, Bashton M. Kerrison ND et al (2004) Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr Opin Struct Biol* 14:208-216.

Zhang C & Kim SH (2003) Overview of structural genomics: from structure to function. *Curr Opin Chem Biol* 7:28-32.

Função proteica

Alberts B (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92:291-294.

Benkovic SJ (1992) Catalytic antibodies. *Annu Rev Biochem* 61:29-54.

Berg OG & von Hippel PH (1985) Diffusion-controled macromolecular interactions. *Annu Rev Biophis Biophis Chem* 14: 131-160.

Bhattacharyya RP, Remenyi A, Yeh BJ & Lim WA (2006) Domains, motifs, and scaffolds: The role of molecular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem* 75:655-680.

Bourne HR (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos Trans R Soc Lond B* 349: 283-289.

Braden BC & Poljak RJ (1995) Structural features of the reaction between antibodies and protein antigens. *FASEB J* 9:9-16.

Dickerson RE & Geis I (1983) Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Dressler D & Potter H (1991) Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library.

Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I & Yeates TO (2000) Protein Function in the post-genomic era. *Nature* 405:823-826.

Fersht AR (1999) Structure and Mechanisms in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis. New York: WH Freeman.

Johnson LN & Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 101:2209-2242.

Kantrowitz ER & Lipscomb WN (1988) *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: the relation between structure and function. *Science* 241: 669-674.

Khosla C & Harbury PB (2001) Modular enzymes. *Nature* 409: 247-252.

Kim E & Sheng M (2004) PDZ domais proteins of synapses. *Nature Rev Neurosci* 5:771-781.

Koshland DE, Jr (1984) Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem Sci* 9:155-159.

Kraut DA, Carroll KS & Herschlag D (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu Rev Biochem* 72:517-571.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H et al (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440:637-643.

Lichtarge O, Bourne HR & Cohen FE (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 257: 342-358.

Marcotte EM, Pellegrini M, Ng HL et al. (1999) Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* 285: 751-753.

Monod J, Changeux JP & Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 6: 306-329.

Pawson T & Nash P (2003) Assembly of regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300:445-452.

Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821-828.

Pellicena P & Kuriyan J (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. *CurrOpin Struct Biol* 16:702-709.

Perutz M (1990) Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. Cambridge: Cambridge University Press.

Raushel F, Thoden JB & Holden HM (2003) Enzymes with molecular tunnels. *Acc Chem Res* 36:539-548.

Radzicka A & Wolfenden R (1995) A proficient enzyme. *Science* 267:90-93.

Sato TK, Overduin M & Emr S (2001) Location, location, location: Membrane targeting directed by PX domains. *Science* 294:1881-1885.

Schramm VL (1998) Enzymatic transitions states analog design. *Annu Rev Biochem* 67: 693-720.

Schultz PG & Lerner RA (1995) From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune systems. *Science* 269:1835-1842.

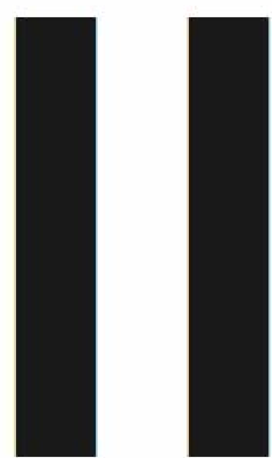
Vale RD & Milligan RA (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288:88-95.

Vocadlo DJ, Davis GJ, Laine R & Withers SG (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412:835-838.

Walsh C (2001) Enabling the chemistry of life. *Nature* 409:226-231.

Yang XJ (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24:1653-1662,

Zhu H, Bilgin M & Snyder M (2003) Proteomics. *Annu RevBiochem* 72:783-812.



MECANISMOS GENÉTICOS BÁSICOS

Parte II

Capítulos

4 DNA, Cromossomos e Genomas

5 Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

6 Como as Células Leem o Genoma: Do DNA à Proteína

7 Controle da Expressão Gênica



DNA, Cromossomos e Genomas

4

Neste capítulo

ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA 197

DNA CROMOSSÔMICO E SEU EMPACOTAMENTO NA FIBRA DE CROMATINA 202

REGULAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA 219

ESTRUTURA GERAL DOS CROMOSSOMOS 233

COMO OS GENOMAS EVOLUEM 245

A vida depende da capacidade das células de armazenar, obter e traduzir as instruções genéticas necessárias para manter o organismo vivo. Essa informação *hereditária* é passada de uma célula às suas células-filhas durante a divisão celular, e de uma geração de um organismo a outra, por meio de células reprodutoras. Em todas as células vivas, essas instruções são armazenadas nos **genes**, os elementos que contêm a informação que determina as características de uma espécie como um todo, bem como as de um indivíduo.

Logo que a genética surgiu como uma ciência, no início do século XX, os cientistas ficaram intrigados com a estrutura química dos genes. A informação contida nos genes é copiada e transmitida de uma célula para as células-filhas milhões de vezes durante a vida de um organismo multicelular, sobrevivendo a esse processo praticamente sem alterações. Que tipo de molécula pode ser capaz de tal replicação tão acurada e quase ilimitada e de direcionar o desenvolvimento de um organismo e a vida diária de uma célula? Que tipos de instruções estão contidas na informação genética? Como essa enormidade de informações, necessárias ao desenvolvimento e à manutenção do mais simples organismo, está organizada para caber no pequeno espaço de uma célula?

As respostas para várias dessas questões começaram a surgir na década de 1940, quando os pesquisadores descobriram, ao estudar os fungos, que a informação genética consistia, principalmente, de instruções para a produção de proteínas. As proteínas são as macromoléculas que realizam a maioria das funções celulares. Elas formam os tijolos das estruturas celulares e as enzimas que catalisam todas as reações químicas das células (Capítulo 3), regulam a expressão gênica (Capítulo 7), permitem que as células se comuniquem umas com as outras (Capítulo 15) e se movam (Capítulo 16). As propriedades e as funções de uma célula são determinadas quase que inteiramente pelas proteínas que elas produzem. Nesse contexto, é difícil imaginar que outro tipo de instrução a informação genética poderia conter.

Observações meticulosas de células e embriões, no final do século XIX, levaram ao reconhecimento de que a informação genética é transmitida pelos *cromossomos*, estruturas com forma de cordão, presentes no núcleo das células eucarióticas, visíveis em microscopia ótica no início da divisão celular (**Figura 4-1**). Mais tarde, com o avanço das análises bioquímicas, foi descoberto que os cromossomos são compostos por ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*) e proteínas. Por várias décadas, o DNA era visto como um mero elemento estrutural. Contudo, um outro avanço crucial que ocorreu na década de 1940 foi a identificação do DNA como o provável portador da informação genética. Essa espantosa descoberta no entendimento dos processos celulares surgiu a partir de estudos de hereditariedade em bactérias (**Figura 4-2**). Entretanto, no início da década de 1950, a forma como as proteínas são especificadas pelas instruções no DNA e como a informação

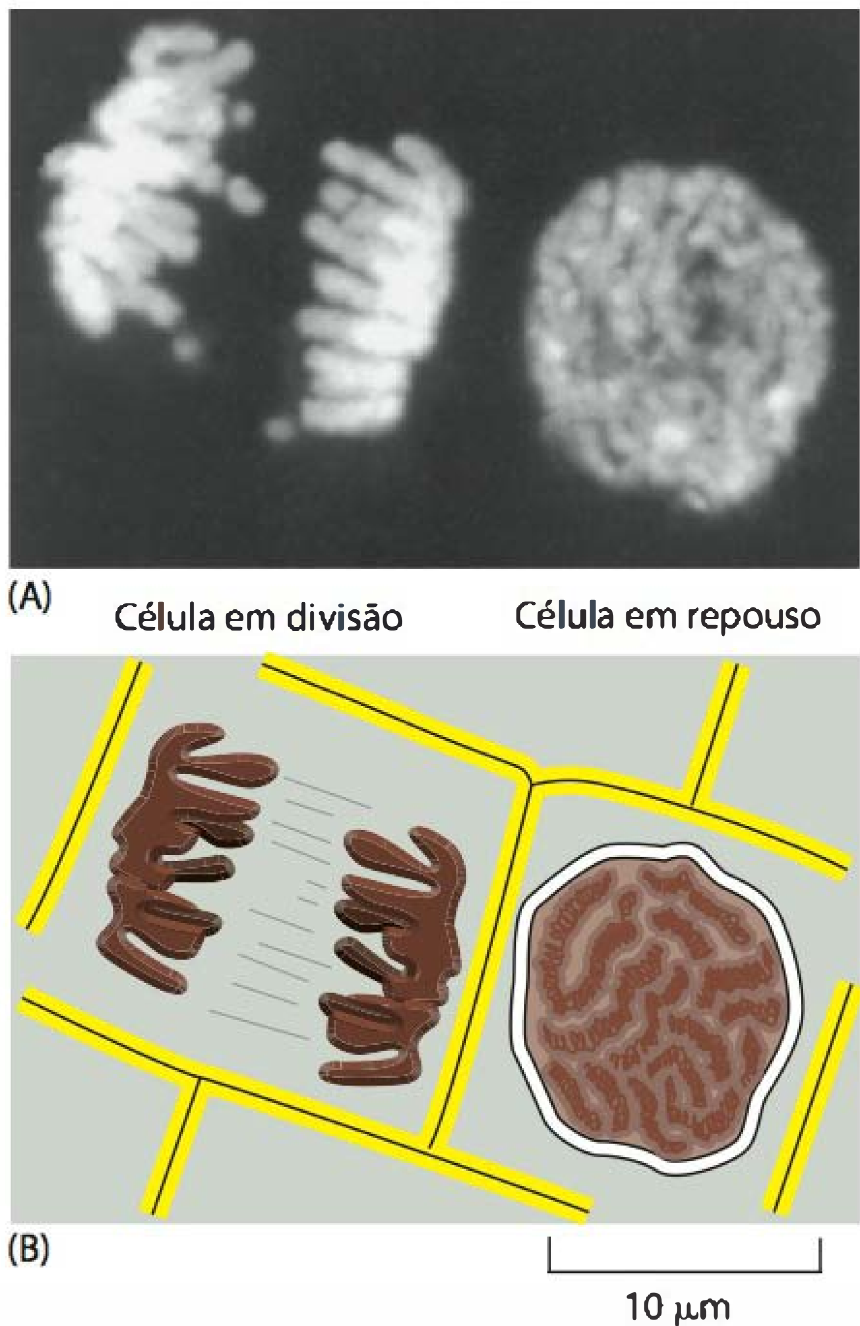


Figura 4-1 Cromossomos nas células. (A) Duas células vegetais adjacentes fotografadas ao microscópio óptico. O DNA foi corado com um corante fluorescente (DAPI) que se liga ao DNA. O DNA está presente nos cromossomos, podendo ser visualizado ao microscópio somente quando forma uma estrutura cilíndrica compacta, na preparação para a divisão celular, como pode ser visto à esquerda. A célula à direita, que não se encontra em divisão, contém cromossomos idênticos, mas que não podem ser facilmente distinguíveis ao microscópio nesta fase do ciclo celular por estarem em uma conformação mais estendida. (B) Diagrama esquemático das duas células com seus cromossomos. (A, cortesia de Peter Shaw.)

hereditária é copiada e transmitida de célula a célula ainda era um completo mistério. Em 1953 esse mistério foi resolvido, quando a estrutura do DNA foi corretamente determinada por James Watson e Francis Crick. Como mencionado no Capítulo 1, a estrutura helicoidal dupla do DNA resolveu imediatamente o problema de como a informação contida nessa molécula é copiada ou *replicada*. Ela também forneceu as primeiras indicações de como a molécula de DNA utiliza uma sequência de suas subunidades para codificar as instruções para produzir proteínas. Atualmente, o fato de o DNA ser o material genético é tão fundamental ao pensamento biológico que é difícil imaginar o enorme vazio intelectual que essa descoberta preencheu.

Neste capítulo iniciaremos descrevendo a estrutura do DNA. Veremos como, apesar de sua simplicidade química, sua estrutura e suas propriedades químicas o tornam perfeitamente adequado como matéria-prima dos genes. A seguir, consideraremos como as diversas proteínas nos cromossomos organizam e empacotam o DNA. Esse empacotamento deve ser realizado de forma ordenada, de modo que cada cromossomo possa ser replicado e dividido corretamente entre duas células-filhas a cada divisão celular. Deve, também, permitir o acesso das enzimas de reparo ao DNA cromossômico quando ele for danificado e das proteínas especializadas que coordenam a expressão de seus inúmeros genes. Veremos também como o empacotamento do DNA difere de acordo com o comprimento de cada cromossomo em eucariotos e como ele armazena um registro valioso da história do desenvolvimento de cada célula.

Nas últimas duas décadas, houve uma revolução na nossa capacidade de determinar a sequência exata das subunidades nas moléculas de DNA. Como resultado, atualmente conhecemos a ordem dos 3 bilhões de subunidades de DNA que contêm a informação para produzir um humano adulto a partir de um óvulo fertilizado, assim como a sequência de DNA de milhares de outros organismos. Análises detalhadas dessas sequências têm fornecido informações preciosas sobre o processo de evolução, o tema que finaliza este capítulo.

Este é o primeiro de quatro capítulos que tratam dos mecanismos genéticos básicos – a forma pela qual a célula mantém, replica, expressa e, ocasionalmente, melhora a informação genética contida no seu DNA. Este capítulo apresenta um panorama geral do DNA e como ele é empacotado nos cromossomos. No Capítulo 5, o capítulo seguinte, discutiremos os mecanismos pelos quais a célula replica e repara seu DNA de forma precisa. Também

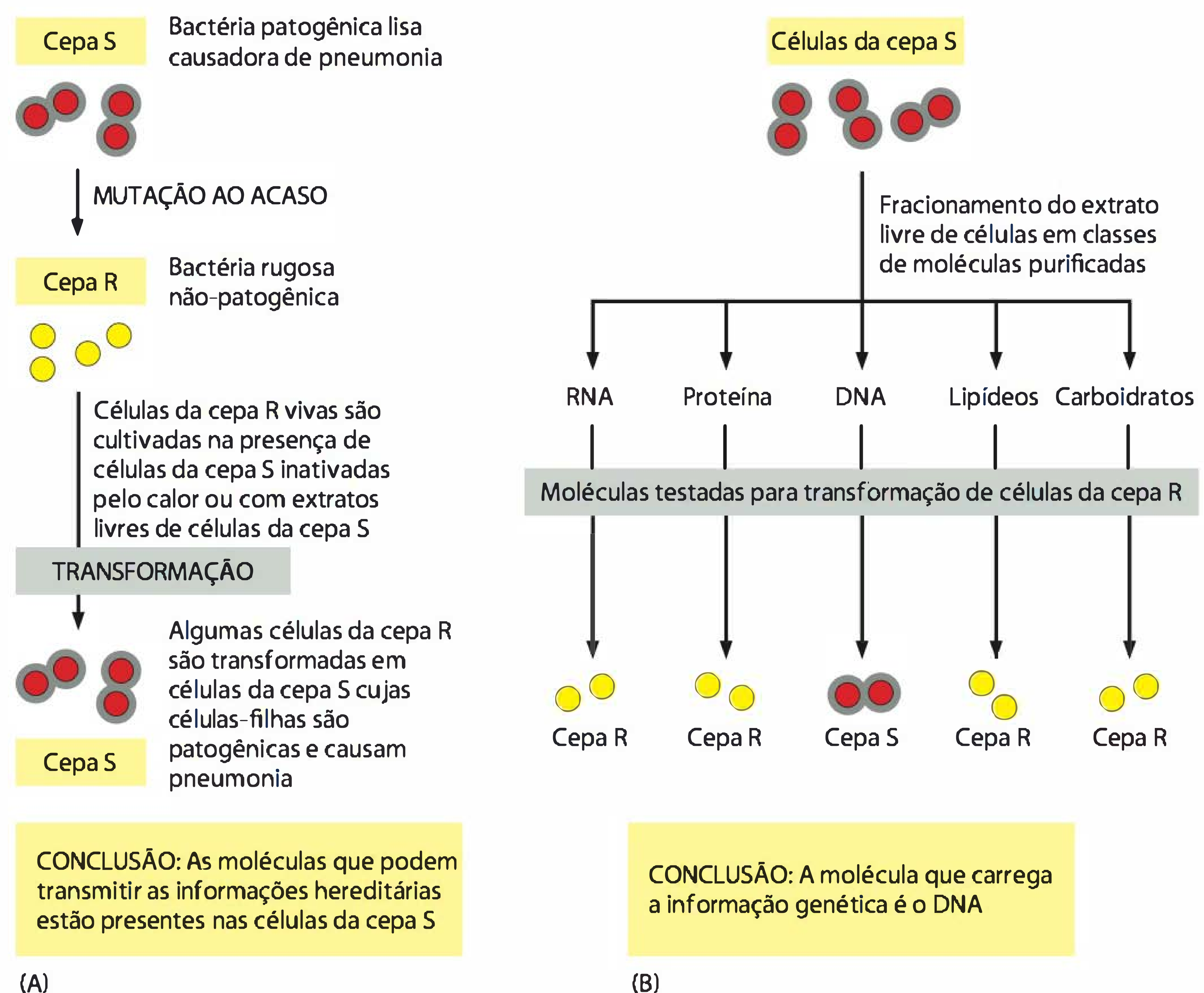


Figura 4-2 Primeira demonstração experimental de que o DNA é o material genético. Esses experimentos, realizados na década de 1940, mostraram que a adição de um DNA purificado a uma bactéria alterou suas propriedades, e essas alterações são fielmente transmitidas para as gerações subsequentes. Duas cepas relacionadas da bactéria *Streptococcus pneumoniae* diferem uma da outra por sua aparência ao microscópio e sua patogenicidade. Uma cepa tem aspecto liso (S) e causa morte quando injetada em camundongos, e a outra tem aspecto rugoso (R) e não é letal. (A) Um experimento inicial mostra que a substância presente na cepa S pode transformar a cepa R em uma cepa S, e que essa mudança é herdada pelas gerações subsequentes de bactérias. (B) Esse experimento, no qual a cepa R foi incubada com várias classes de moléculas biológicas obtidas da cepa S, identifica o DNA como a substância responsável pela informação genética.

descreveremos como as sequências de DNA podem ser rearranjadas pelo processo de recombinação genética. A expressão gênica – o processo pelo qual a informação codificada no DNA é interpretada pela célula para conduzir a síntese de proteínas – é o principal tópico do Capítulo 6. No Capítulo 7, descreveremos como a expressão gênica é controlada pela célula para assegurar que cada uma das milhares de proteínas e moléculas de RNA codificadas no DNA seja produzida apenas no momento e no local apropriado.

ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA

Os biólogos tinham dificuldade em aceitar, na década de 1940, que o DNA era o material genético, devido à sua aparente simplicidade química. O DNA era conhecido como um longo polímero composto apenas por quatro tipos de subunidades, semelhantes quimicamente entre si. No início de 1950, o DNA foi examinado por difração de raios X, uma técnica utilizada para determinar a estrutura atômica tridimensional de uma molécula (discutida no Capítulo 8). Os primeiros resultados indicaram que o DNA era composto de duas fitas de um polímero enroladas como uma hélice. A observação de que o DNA era uma fita dupla teve um significado fundamental e forneceu uma das principais indicações que culminaram no modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA. Somente quando esse modelo foi proposto, em 1953, o potencial do DNA para a replicação e a codificação da informação tornou-se aparente. Nesta seção, examinaremos a estrutura da molécula de DNA e explicaremos, em termos gerais, como ela é capaz de armazenar a informação hereditária.

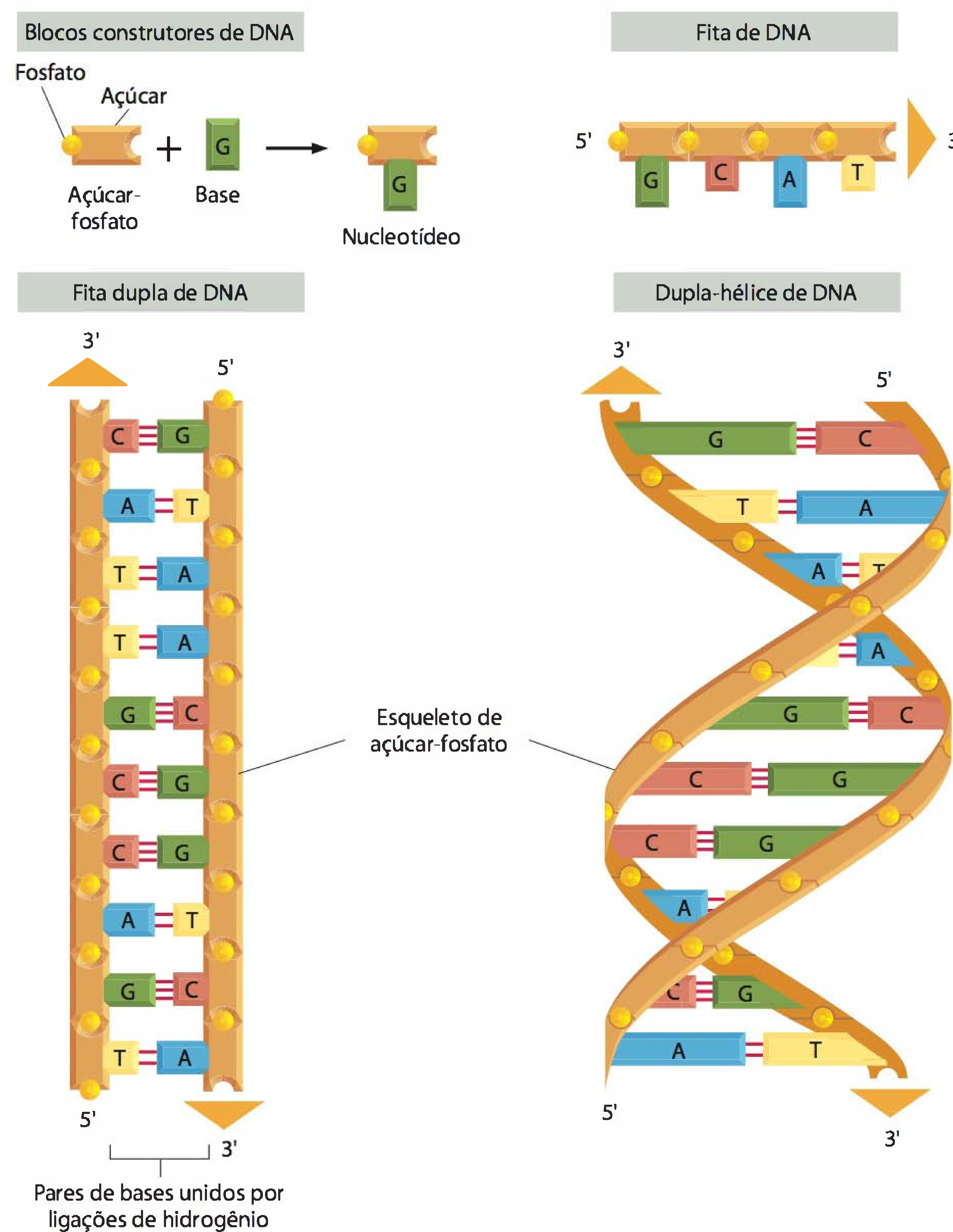
A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos complementares

Uma molécula de **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**) consiste em duas longas cadeias polipeptídicas compostas por quatro tipos de subunidades nucleotídicas. Cada uma dessas cadeias é conhecida como uma *cadeia de DNA*, ou *fita de DNA*. As *ligações de hidrogênio* entre as bases dos nucleotídeos mantêm as duas cadeias unidas (**Figura 4-3**). Como vimos no Capítulo 2 (Painel 2-6, p. 116-117), os nucleotídeos são compostos de açúcares com cinco carbonos, aos quais um ou mais grupos fosfato estão ligados, e uma base contendo nitrogênio. No caso dos nucleotídeos do DNA, o açúcar é uma desoxirribose ligada a um único grupo fosfato (por isso o nome ácido desoxirribonucleico), e a base pode ser *adenina* (*A*), *citosina* (*C*), *guanina* (*G*) ou *timina* (*T*). Os nucleotídeos estão covalentemente ligados em uma cadeia por açúcares e fosfatos, os quais formam a estrutura principal alternada de açúcar-fosfato-açúcar-fosfato, chamada de "esqueleto". Como somente as bases são diferentes nos quatro tipos de subunidades, cada cadeia polinucleotídica de DNA é semelhante a um colar (esqueleto) com quatro tipos de contas diferentes (as quatro bases A, C, G e T). Esses mesmos símbolos (A, C, G e T) normalmente são usados para representar os quatro diferentes nucleotídeos – isto é, as bases ligadas com seus grupos fosfato e açúcar.

A forma na qual as subunidades nucleotídicas estão ligadas confere uma polaridade química à fita de DNA. Se imaginarmos cada açúcar como um bloco com uma protuberância (o fosfato 5') em um lado e uma cavidade (a hidroxila 3') no outro (ver Figura 4-3), cada cadeia completa, formada por protuberâncias e cavidades entrelaçados, terá todas as suas subunidades alinhadas na mesma orientação. Além disso, as duas extremidades da cadeia serão facilmente distinguíveis por apresentarem, uma delas, uma cavidade (a hidroxila 3'), e a outra, uma protuberância (o fosfato 5'). Essa polaridade na cadeia de DNA é indicada pela denominação das extremidades como *extremidade 3'* e *extremidade 5'.*

A estrutura tridimensional do DNA – a **dupla-hélice** – é decorrente das características químicas e estruturais de suas duas cadeias polinucleotídicas. Uma vez que essas duas cadeias são mantidas unidas por ligações de hidrogênio entre as bases das duas fitas, todas as bases estão voltadas para o interior da dupla-hélice, e o esqueleto de açúcar-fosfato encontra-se na região externa (ver Figura 4-3). Em cada um dos casos, a base mais robusta, com dois anéis (uma purina, ver Painel 2-6, p. 116-117), forma par com uma base com um anel único (uma pirimidina); A sempre forma par com T, e G com C (**Figura 4-4**). Essa *comple-*

Figura 4-3 DNA e seus blocos de construção. O DNA é composto de quatro tipos de nucleotídeos, ligados covalentemente, formando uma cadeia polinucleotídica (uma fita de DNA), com um esqueleto de açúcar-fosfato a partir do qual as bases (A, C, G e T) se estendem. Uma molécula de DNA é composta de duas fitas de DNA unidas por ligações de hidrogênio entre as bases pareadas. As *setas* nas extremidades das fitas de DNA indicam as polaridades das fitas, que são antiparalelas entre si na molécula de DNA. No diagrama abaixo e à esquerda da figura, o DNA está mostrado de forma plana; na realidade, ele é torcido formando uma dupla-hélice, como mostrado à direita. Para detalhes ver Figura 4-5.



mentaridade de bases permite que os **pares de bases** sejam dispostos em um arranjo energético mais favorável no interior da dupla-hélice. Nesse arranjo, cada par de bases possui uma largura similar, mantendo a estrutura de açúcar-fosfato equidistante ao longo da molécula

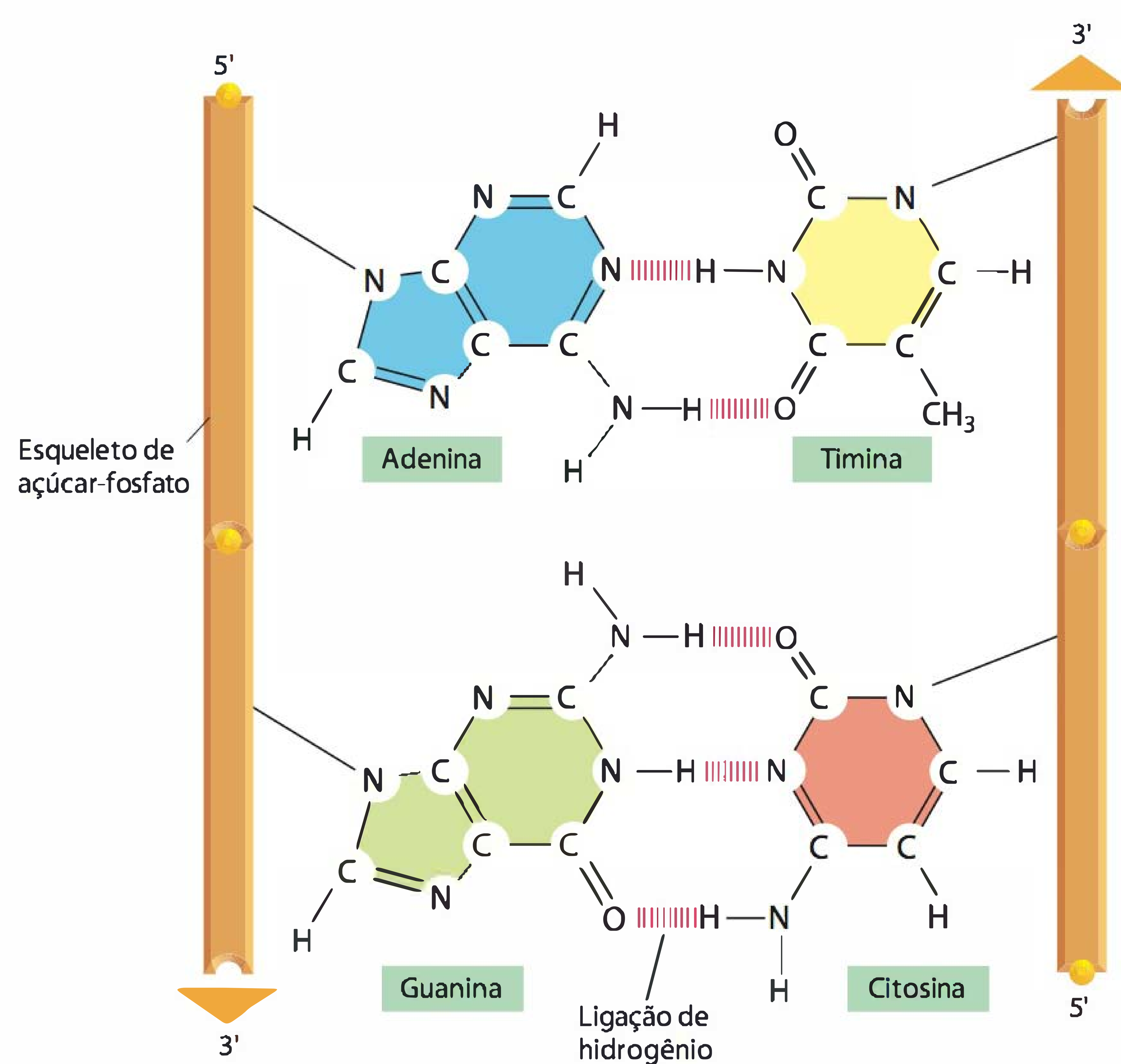


Figura 4-4 Pares de bases complementares na dupla-hélice de DNA. As formas e a estrutura química das bases permitem que as ligações de hidrogênio sejam formadas eficientemente apenas entre A e T e entre G e C, onde os átomos que são capazes de formar pontes de hidrogênio (ver Painel 2-3 e p. 110-111) podem se aproximar sem distorcer a dupla-hélice. Como indicado, duas ligações de hidrogênio são formadas entre A e T, enquanto que três são formadas entre G e C. As bases podem formar par dessa forma somente quando as duas cadeias polinucleotídicas que contêm as bases forem antiparalelas entre si.

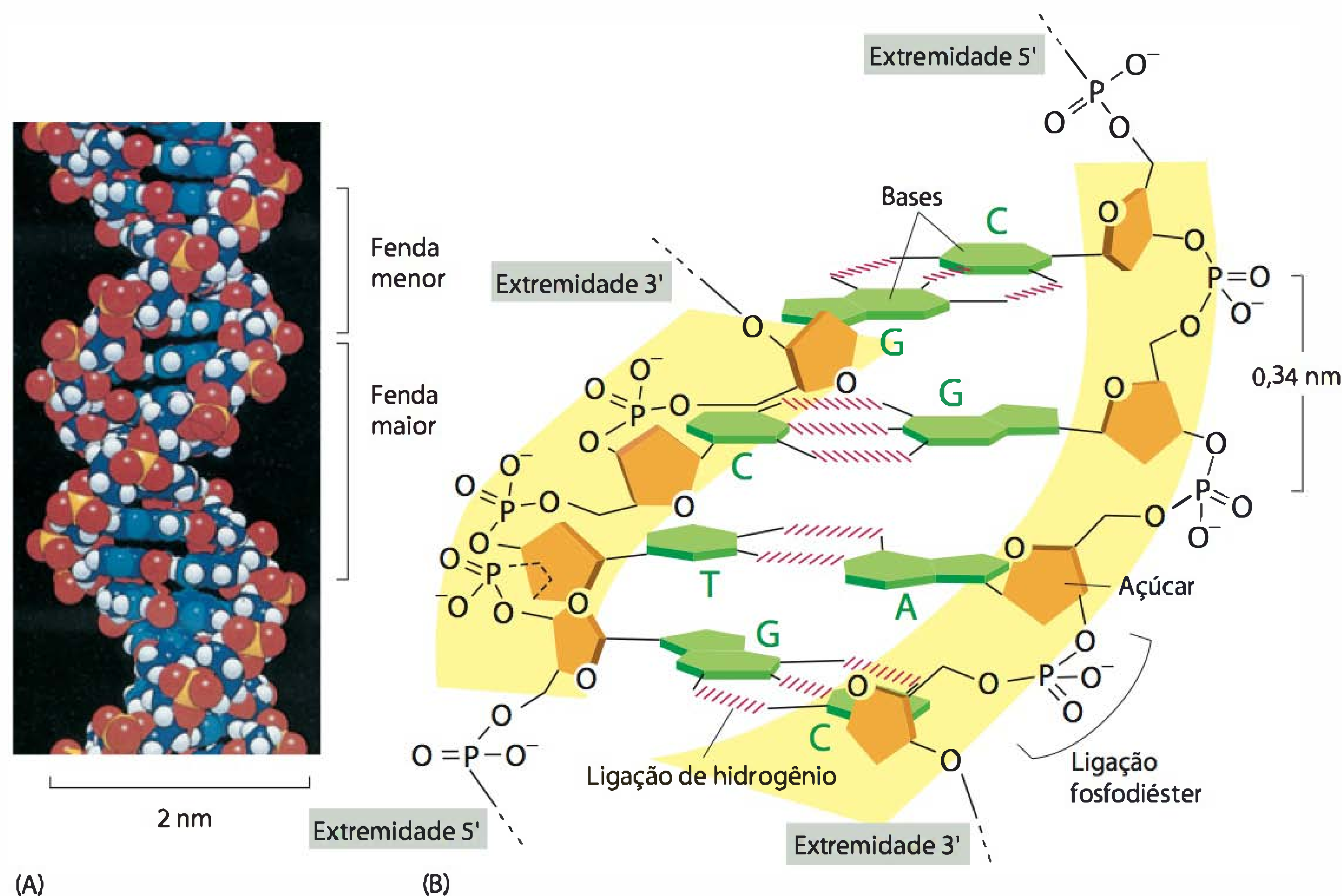


Figura 4-5 A dupla-hélice do DNA. (A) Modelo de preenchimento de 1,5 volta da dupla-hélice do DNA. Cada volta do DNA contém 10,4 pares de nucleotídeos, e a distância entre pares adjacentes de centro-a-centro é de 3,4 nm. O enrolamento das duas fitas, uma ao redor da outra, cria duas fendas na dupla-hélice: a fenda mais larga é chamada de fenda maior, e a mais estreita, de fenda menor. (B) Uma pequena secção da dupla-hélice vista lateralmente, mostrando quatro pares de bases. Os nucleotídeos são ligados covalentemente por ligações fosfodiéster pelo grupo 3'-hidroxila (–OH) de um açúcar e o grupo 5'-hidroxila (P) do próximo açúcar. Assim, cada fita polinucleotídica tem uma polaridade química; isto é, as duas extremidades são quimicamente diferentes. A extremidade 5' do DNA é, por convenção, ilustrada carregando o grupo fosfato, enquanto a extremidade 3' é ilustrada com um grupo hidroxila.

de DNA. Para maximizar a eficiência da compactação pelo pareamento, as duas cadeias enrolam-se uma ao redor da outra para formar a dupla-hélice, com uma volta completa a cada 10 pares de bases (**Figura 4-5**).

Os membros de cada par de bases somente encaixam-se na dupla-hélice se as duas fitas da hélice estiverem na posição **antiparalela** – isto é, somente se a polaridade de uma fita estiver em orientação oposta à da outra fita (ver Figuras 4-3 e 4-4). Uma consequência desse pareamento de bases é que cada fita de uma molécula de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente **complementar** à sequência de nucleotídeos da outra fita.

A estrutura do DNA fornece um mecanismo para a hereditariedade

Os genes contêm as informações biológicas que devem ser copiadas com precisão para serem transmitidas às próximas gerações cada vez que a célula se divide para formar duas células-filhas. Duas questões biológicas importantes surgem desses requerimentos: como a informação que origina um organismo pode ser transmitida quimicamente e como ela é copiada com precisão? A descoberta da estrutura da dupla-hélice de DNA foi um marco na biologia no século XX porque forneceu, imediatamente, as respostas a ambas as questões, resolvendo em nível molecular o problema da hereditariedade. Discutiremos brevemente as respostas a essas questões nesta seção e as examinaremos com maiores detalhes nos capítulos subsequentes.

O DNA codifica a informação por meio da ordem de nucleotídeos ao longo da fita. Cada base – A, C, T ou G – pode ser considerada como uma letra de um alfabeto de quatro letras que escrevem mensagens biológicas na estrutura química do DNA. Como vimos no Capítulo 1, os organismos diferem uns dos outros porque suas respectivas moléculas de DNA possuem diferentes sequências de nucleotídeos e, consequentemente, carregam diferentes mensagens biológicas. Mas, como esse alfabeto é usado para produzir as mensagens e o que elas significam?

Como discutido anteriormente, antes que a estrutura da molécula de DNA fosse determinada, sabia-se que os genes continham as instruções para produzir as proteínas. Portanto, as mensagens de DNA deveriam, de algum modo, codificar proteínas (**Figura 4-6**). Essa relação imediatamente tornou o problema fácil de ser entendido. Como discutido no Capítulo 3, as propriedades de uma proteína, as quais são responsáveis pela sua função biológica, são determinadas por sua estrutura tridimensional que, por sua vez, é determinada pela sequência linear de aminoácidos que a compõem. A sequência linear de nucleotídeos em um gene deve, portanto, corresponder à sequência linear de aminoácidos em uma proteína. A correspondência exata entre as quatro letras do alfabeto de nucleotídeos do DNA e as vinte letras do alfabeto dos aminoácidos das proteínas – o código genético – não é óbvia a partir da estrutura do DNA, e somente foi compreendida uma década após a descoberta da dupla-

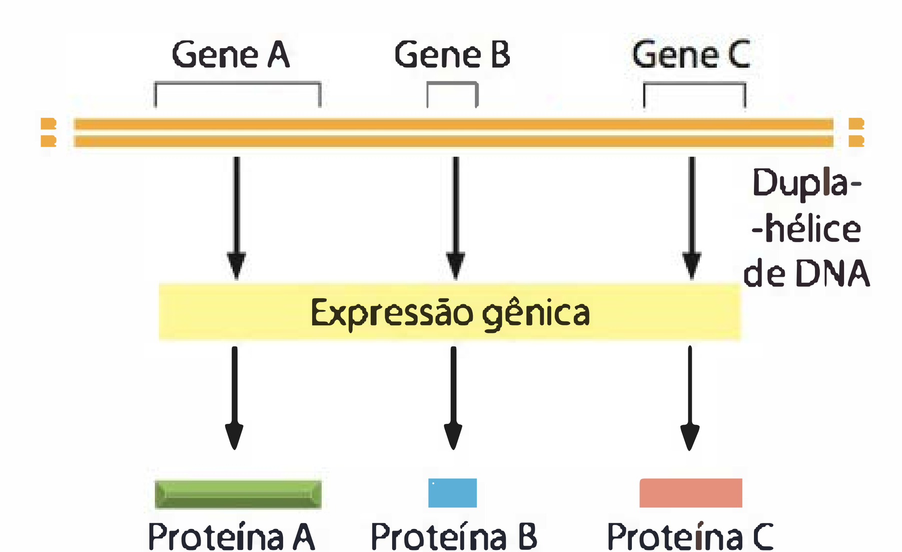


Figura 4-6 Correlação entre a informação genética contida no DNA e as proteínas (discutido no Capítulo 1).

hélice. No Capítulo 6, descrevemos esse código em detalhes durante um processo elaborado conhecido como *expressão gênica*, em que a célula converte a sequência nucleotídica de um gene primeiro em uma sequência de nucleotídeos na molécula de RNA, e então na sequência de aminoácidos de uma proteína.

A série completa de informações do DNA de um organismo é chamada de **genoma**, e contém a informação para todas as proteínas e moléculas de RNA que o organismo irá sintetizar durante sua existência. (O termo genoma também é usado para descrever o DNA que contém essa informação.) A quantidade de informação contida nos genomas encontra-se dispersa. Por exemplo, uma célula diploide humana típica contém 2 metros de dupla-hélice de DNA. Escrita na forma de alfabeto de quatro letras, a sequência nucleotídica de um gene humano muito pequeno ocupa um quarto de uma página de texto (**Figura 4-7**), enquanto que a sequência de nucleotídeos completa do genoma humano preencheria mais de mil livros do tamanho deste. Além de outras informações críticas, o genoma contém instruções para cerca de 24 mil proteínas distintas.

A cada divisão celular, a célula deve copiar seu genoma e passá-lo para as duas células-filhas. A descoberta da estrutura do DNA também revelou o princípio que torna possível copiar a informação: como cada fita de DNA contém uma sequência de nucleotídeos que é exatamente complementar à sequência de nucleotídeos da fita associada, cada fita pode atuar como um **molde** para a síntese de uma nova fita complementar. Em outras palavras, se designarmos as duas fitas de DNA com S e S', a fita S pode servir como um molde para síntese de uma nova fita S', enquanto que a fita S' pode ser usada como molde para fazer uma nova fita S (**Figura 4-8**). Assim, a informação genética no DNA pode ser precisamente copiada por meio de um processo simples no qual a fita S separa-se da fita S' e cada fita separada atua como molde para a produção de novas fitas complementares idênticas a sua fita associada.

A capacidade de cada fita de DNA de atuar como um molde para a produção de uma fita complementar permite que a célula possa copiar ou *replicar* seus genes antes de passá-los a suas descendentes. No próximo capítulo, descreveremos a elegante maquinaria que a célula usa para realizar essa grande tarefa.

Em eucariotos, o DNA é localizado no núcleo celular

Como descrito no Capítulo 1, quase todo o DNA de uma célula eucariótica está contido em um núcleo que ocupa cerca de 10% do volume celular total. Esse compartimento é delimitado por um *envelope nuclear* formado por duas membranas de bicamada lipídica concêntricas (**Figura 4-9**). Essas membranas são perfuradas em intervalos por grandes poros nucleares, que transportam moléculas entre o núcleo e o citoplasma. O envelope nuclear está diretamente ligado à extensa membrana do retículo endoplasmático, que se estende do núcleo ao citoplasma. O núcleo é sustentado mecanicamente por uma rede de filamentos intermediários, chamada de *lâmina nuclear*, que forma uma fina rede de camadas dentro do núcleo logo abaixo da membrana nuclear interna (ver Figura 4-9B).

O envelope nuclear permite que muitas proteínas que atuam no DNA sejam concentradas onde são necessárias à célula e, como veremos nos próximos capítulos, ele mantém as enzimas nucleares separadas das enzimas citoplasmáticas, uma característica crucial para o funcionamento adequado das células eucarióticas. A compartimentalização,

```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTC
TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTT
TTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCT
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGAGGTCAGTGCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTC
AAACCTTGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCTCATGAATGTCTTTTC
```

Figura 4-7 Sequência de nucleotídeos no gene da β-globina humana. Por convenção, uma sequência nucleotídica é escrita sempre da extremidade 5' para a 3', e deve ser lida da esquerda para a direita e nas linhas sucessivas em direção ao final da página como é lido um texto normal. Esse gene contém a informação para a sequência de aminoácidos de um dos dois tipos de subunidades da molécula de hemoglobina, a proteína que transporta o oxigênio no sangue. Um gene diferente, o gene da α-globina, carrega a informação para o outro tipo de subunidade de hemoglobina (uma molécula de hemoglobina tem quatro subunidades, duas de cada tipo). Apenas uma das duas fitas da dupla-hélice do DNA contendo o gene da β-globina é mostrada; a outra fita tem a sequência complementar exata. As sequências de DNA destacadas em *amarelo* mostram as três regiões do gene que codificam a sequência de aminoácidos da proteína β-globina. Veremos no Capítulo 6 como a célula processa e une essas três sequências para sintetizar uma proteína β-globina completa.

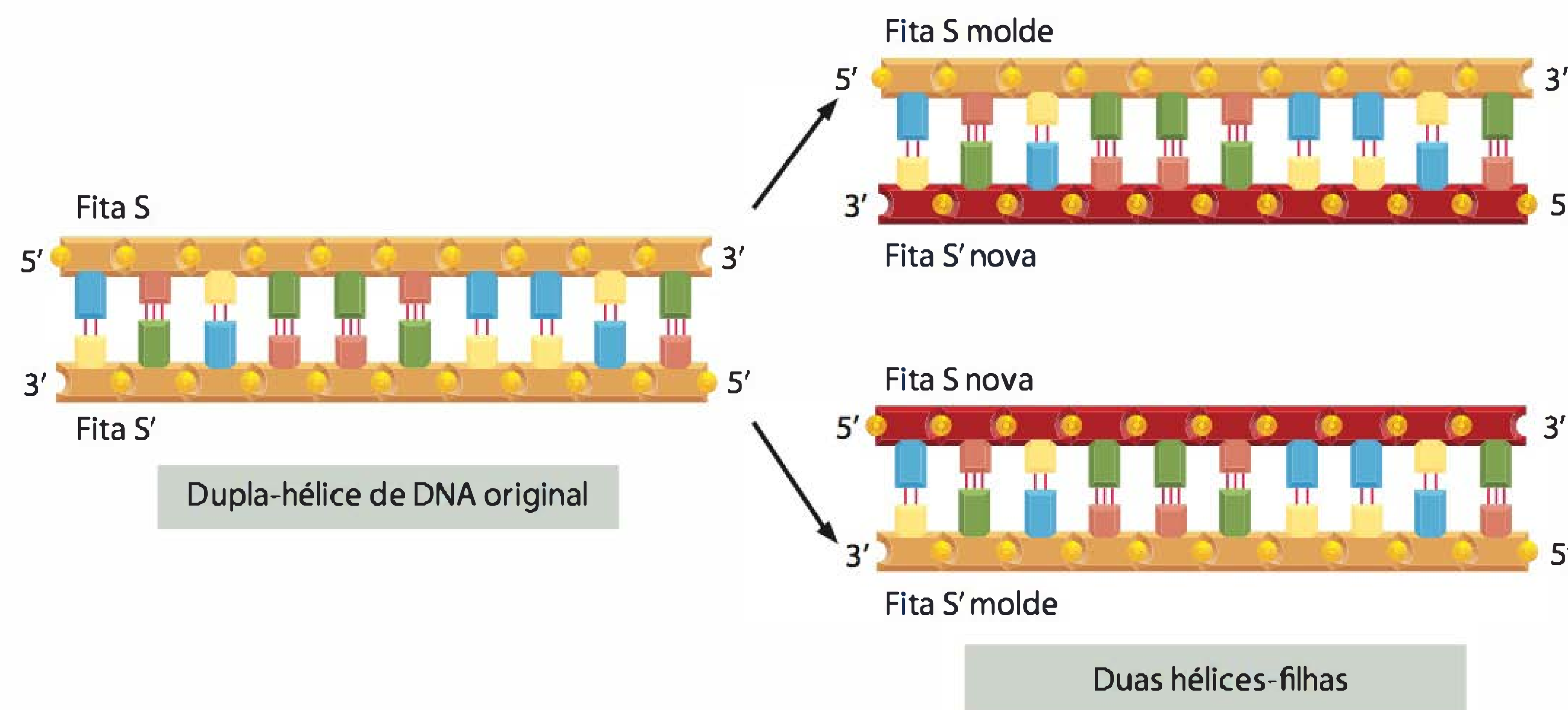


Figura 4-8 O DNA atua como molde para a sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A irá parear eficientemente apenas com T, e G apenas com C, cada fita de DNA pode atuar como molde e especificar a sequência de nucleotídeos na sua fita complementar. Dessa forma, a dupla-hélice de DNA pode ser precisamente copiada, e cada hélice de DNA original produz duas hélices-filhas idênticas.

da qual o núcleo é um exemplo, é um princípio importante da biologia, que serve para estabelecer um ambiente em que as reações bioquímicas são facilitadas pela alta concentração dos substratos e das enzimas. A compartimentalização também impede que enzimas necessárias em uma parte da célula interfiram em vias bioquímicas ordenadas em outra parte.

Resumo

A informação genética é armazenada em uma sequência linear de nucleotídeos no DNA. Cada molécula de DNA é uma dupla-hélice formada por duas fitas complementares de nucleotídeos que são mantidas unidas por ligações de hidrogênio entre os pares de bases G-C e A-T. A duplicação da informação genética ocorre usando uma fita de DNA como molde para a formação da fita complementar. A informação genética contida no DNA de um organismo contém as instruções para todas as proteínas que o organismo irá sintetizar, compondo o genoma do organismo. Nos eucariotos, o DNA está localizado no núcleo celular, um grande compartimento delimitado por membrana.

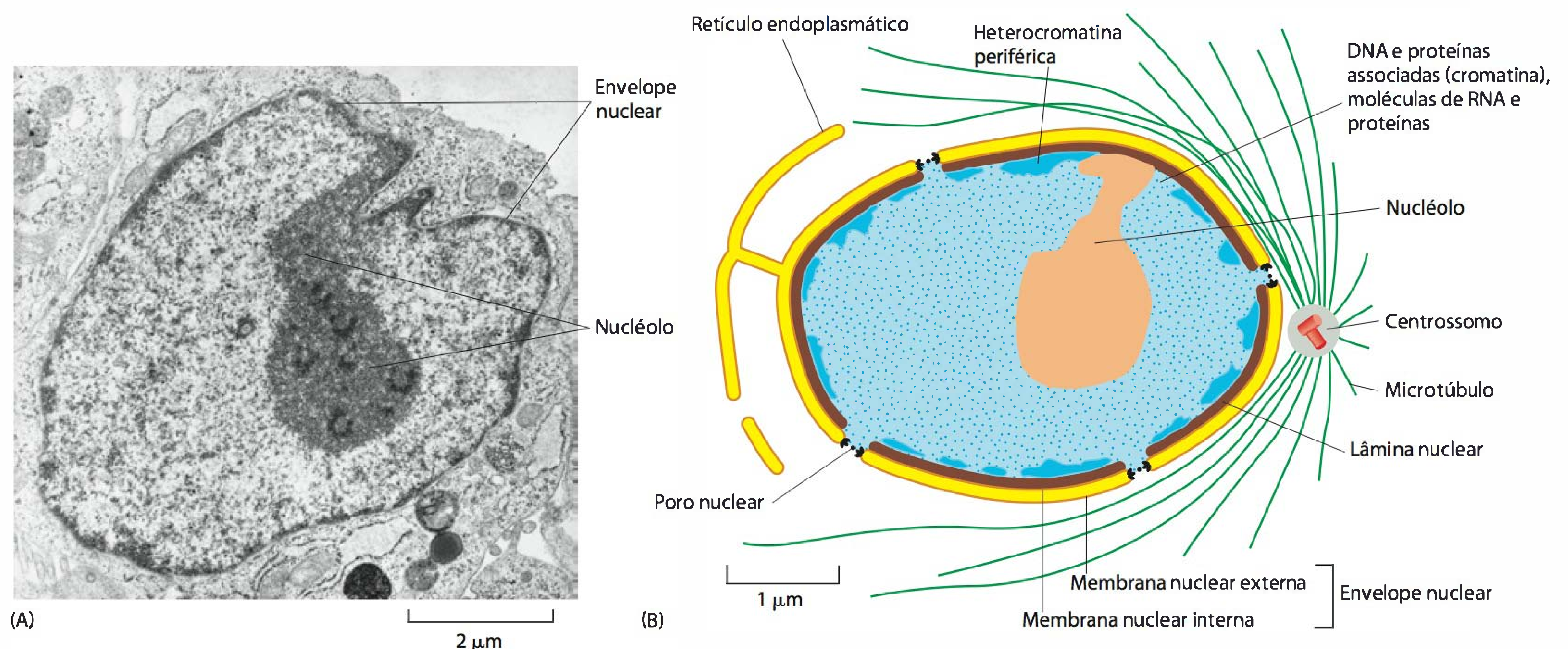


Figura 4-9 Secção transversal de um núcleo celular característico. (A) Micrografia eletrônica de uma fina secção do núcleo de um fibroblasto humano. (B) Diagrama esquemático mostrando que o envelope nuclear consiste em duas membranas, sendo a externa contínua à membrana do retículo endoplasmático (ver também Figura 12-8). O espaço interno do retículo endoplasmático (o lúmen do RE) está colorido em *amarelo*, sendo contínuo com o espaço entre as duas membranas nucleares. As bicamadas lipídicas das membranas nucleares interna e externa estão conectadas a cada poro nuclear. Uma rede em forma de folha de filamentos intermediários (em *marrom*) dentro do núcleo dá suporte mecânico ao envelope nuclear, formando uma estrutura especial de suporte chamada de lâmina nuclear (para detalhes, ver Capítulo 12). A heterocromatina próxima à lâmina contém regiões de DNA especialmente condensadas, discutidas mais adiante.

DNA CROMOSSÔMICO E SEU EMPACOTAMENTO NA FIBRA DE CROMATINA

A função mais importante do DNA é carregar os genes, a informação que especifica todas as proteínas e moléculas de RNA que constituem um organismo – incluindo a informação sobre quando, em que tipo de células, e em qual quantidade cada proteína deverá ser produzida. O genoma dos eucariotos é dividido em cromossomos e, nesta seção, veremos como os genes estão organizados em cada cromossomo. Além disso, descreveremos as sequências especializadas de DNA que permitem que os cromossomos sejam precisamente duplicados e passados de uma geração para outra.

Também confrontaremos o desafio do empacotamento do DNA. Se as duplas-hélices que compõem todos os 46 cromossomos em uma célula humana fossem colocadas uma ligada à extremidade da outra, atingiriam cerca de 2 metros; no entanto, o núcleo que contém o DNA tem somente cerca de 6 μm de diâmetro. Isso é geometricamente equivalente a acomodar 40 km de uma linha extremamente fina em uma bola de tênis. A difícil tarefa de empacotar o DNA é realizada por proteínas especializadas que se ligam ao DNA e o dobram, produzindo uma série de alças e espirais que conferem níveis elevados de organização, evitando que o DNA torne-se emaranhado. Embora o DNA seja extremamente compactado, essa compactação é feita de forma a permitir que ele esteja prontamente disponível às muitas enzimas nas células que irão replicá-lo, repará-lo e usar seus genes para produzir moléculas de RNA e proteínas.

O DNA eucariótico é compactado em uma série de cromossomos

Nos eucariotos, o DNA nuclear é dividido em uma série de diferentes **cromossomos**. Por exemplo, o genoma humano – com aproximadamente $3{,}2 \times 10^9$ nucleotídeos – está distribuído entre 24 diferentes cromossomos. Cada cromossomo consiste em uma única e enorme molécula de DNA linear com proteínas associadas que dobram e empacotam a fina fita de DNA em uma estrutura mais compacta. O complexo DNA e proteínas é chamado de *cromatina* (do grego *chroma*, cor, devido a suas propriedades de se corar). Além das proteínas envolvidas no empacotamento do DNA, os cromossomos também estão associados a muitas proteínas e moléculas de RNA necessárias aos processos de expressão gênica, replicação e reparo do DNA.

As bactérias carregam seus genes em uma única molécula de DNA, normalmente circular (ver Figura 1-29). Esse DNA está associado a proteínas que o empacotam e o condensam, mas elas são diferentes das proteínas que desempenham essas funções em eucariotos. Embora frequentemente chamado de "cromossomo" bacteriano, ele não tem a mesma estrutura dos cromossomos eucarióticos, e pouco é conhecido sobre seu processo de empacotamento. Portanto, nossa discussão sobre a estrutura dos cromossomos será quase inteiramente sobre os cromossomos de eucariotos.

Com exceção das células da linhagem germinativa e de alguns poucos tipos celulares muito especializados que não podem replicar ou não possuem DNA (p. ex., as hemácias), cada célula humana contém duas cópias de cada cromossomo, uma herdada da mãe e a outra do pai. Os cromossomos maternos e paternos de um par são chamados de **cromossomos homólogos**. O único par de cromossomos não-homólogos é o dos cromossomos sexuais do macho, onde um *cromossomo Y* é herdado do pai e um *cromossomo X* é herdado da mãe. Assim, cada célula humana contém um total de 46 cromossomos – 22 pares comuns, tanto para indivíduos masculinos quanto femininos – mais os dois cromossomos sexuais (X e Y nos indivíduos do sexo masculino e dois X nos indivíduos do sexo feminino). No Capítulo 8, descreveremos em detalhes a *hibridização de DNA,* uma técnica em que uma fita de ácidos nucleicos marcada é usada como uma sonda para localizar uma fita complementar. Essa técnica pode ser usada para distinguir os cromossomos humanos "pintando" cada um com uma cor diferente (**Figura 4-10**). Essa coloração dos cromossomos normalmente é realizada na mitose, a fase M do ciclo celular, quando os cromossomos estão especialmente compactados e são de fácil visualização (ver a seguir).

Uma outra forma mais tradicional de distinguir os cromossomos é utilizar corantes que produzem um padrão de listras características ao longo de cada cromossomo mitótico (**Figura 4-11**). Os princípios desse padrão de bandeamento não estão definidos. No entanto, o padrão de bandas de cada cromossomo é único, e permitiu a identificação e a numeração inicial de cada cromossomo.

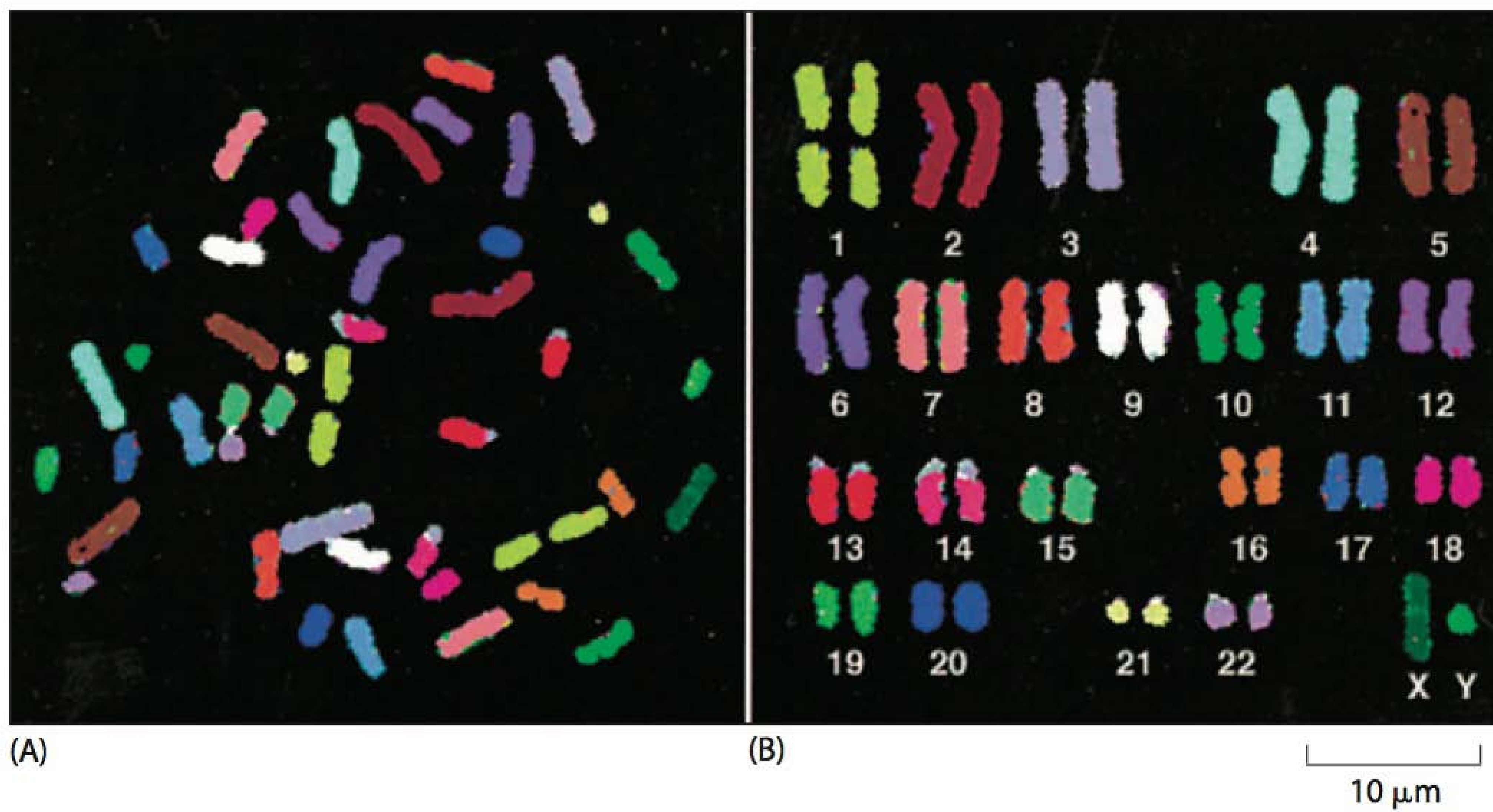


Figura 4-10 O conjunto completo de cromossomos humanos. Os cromossomos de um indivíduo do sexo masculino foram isolados de uma célula em divisão nuclear (mitose) e estão, portanto, em um estado altamente compactado. Cada cromossomo foi "colorido" com uma cor diferente para permitir uma identificação inequívoca ao microscópio óptico. A coloração dos cromossomos é realizada pela exposição dos cromossomos a uma coleção de moléculas de DNA humano acopladas a uma combinação de corantes fluorescentes. Por exemplo, moléculas de DNA derivadas do cromossomo 1 foram marcadas com uma combinação específica de corantes, as do cromossomo 2 com outra, e assim por diante. Como o DNA marcado pode formar pares de bases, ou hibridizar, somente com seus cromossomos de origem (ver Capítulo 8), cada cromossomo é diferentemente marcado. Para tais experimentos, os cromossomos são submetidos a tratamentos que separam a fita dupla de DNA em fitas individuais, para permitir o pareamento de bases com a fita simples de DNA marcado, mantendo a estrutura cromossômica relativamente intacta. (A) Cromossomos visualizados na forma como foram expulsos da célula lisada. (B) Os mesmos cromossomos ordenados artificialmente de acordo com sua numeração. Esse arranjo do conjunto total dos cromossomos é chamado de cariótipo. (De E. Schröck et al., *Science* 273:494-497, 1996. Com permissão de AAAS.)

A representação dos 46 cromossomos mitóticos é chamada de **cariótipo** humano. Caso uma parte de um cromossomo for perdida ou trocada entre cromossomos, essas alterações podem ser detectadas por diferenças no padrão de bandas ou no padrão de coloração dos cromossomos (**Figura 4-12**). Os citogeneticistas usam essas alterações para detectar anormalidades cromossômicas associadas a defeitos herdáveis, ou para caracterizar certos tipos de câncer que surgem pelo rearranjo dos cromossomos específicos nas células somáticas (discutido no Capítulo 20).

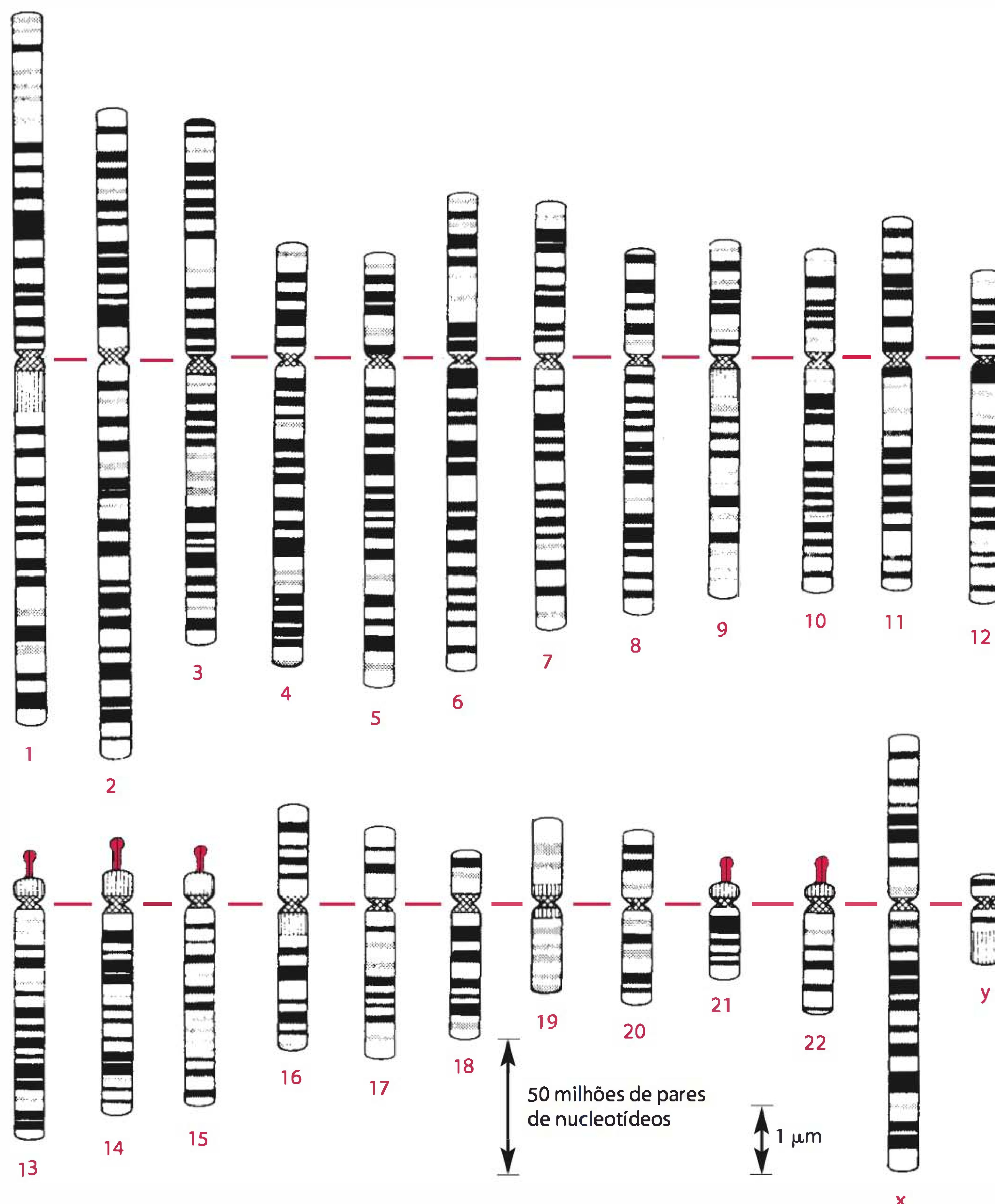


Figura 4-11 Padrão de bandas dos cromossomos humanos. Os cromossomos de 1 a 22 estão numerados em ordem aproximada de tamanho. Uma célula humana somática típica (isto é, célula não-germinativa) contém dois de cada desses cromossomos, mais dois cromossomos sexuais – dois cromossomos X na fêmea; um cromossomo X e um Y no macho. Os cromossomos usados para fazer esses mapas foram corados em um estágio inicial da mitose, quando os cromossomos estão um pouco menos compactados. A linha horizontal (em *vermelho*) representa a posição do centrômero (ver Figura 4-21), que aparece como uma constrição nos cromossomos mitóticos. As protuberâncias nos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 indicam as posições dos genes que codificam os RNAs ribossômicos maiores (discutidos no Capítulo 6). Esses padrões são obtidos pela coloração dos cromossomos com Giemsa, e são observados ao microscópio óptico. (Para micrografias, ver Figura 21-18; adaptada de U. Franke, *Cytogenet. Cell Genet*. 31: 24-32, 1981. Com permissão de Karger.)

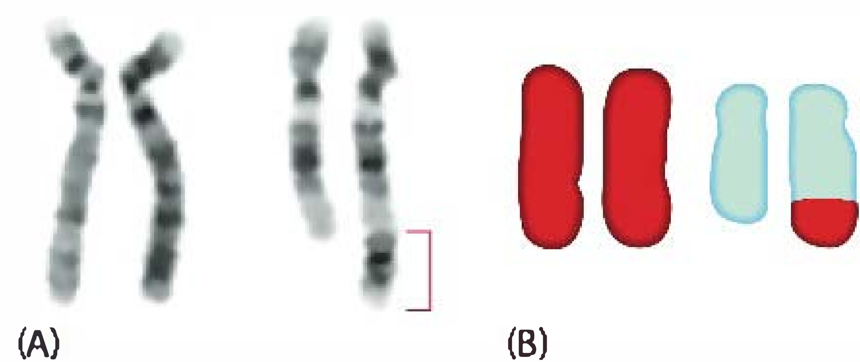


Figura 4-12 Um cromossomo humano aberrante. (A) Dois pares de cromossomos corados com Giemsa (ver Figura 4-11) de um paciente com ataxia, uma doença caracterizada por deterioração progressiva da capacidade motora. O paciente tem um par de cromossomos 4 normal (*par à esquerda*), e um cromossomo 12 normal e um aberrante, como visto pelo seu maior comprimento (*par à direita*). O material adicional contido no cromossomo 12 aberrante (*colchete em vermelho*) foi deduzido pelo seu padrão de bandas como sendo uma parte do cromossomo 4, que se ligou ao cromossomo 12 normal em um evento de recombinação anormal, denominado translocação cromossômica. (B) Diagrama dos mesmos pares de cromossomos, em *vermelho* para o cromossomo 4 e em *azul* para o cromossomo 12. As duas técnicas permitem a mesma conclusão quanto à natureza do cromossomo aberrante 12, mas a coloração dos cromossomos permite uma melhor resolução e a clara identificação, mesmo de pequenos segmentos de cromossomos que foram translocados. Entretanto, a coloração por Giemsa é mais fácil de ser realizada. (De E. Schröck et al., Science 273:494-497, 1996. Com permissão de AAAS.)

Os cromossomos contêm longas sequências de genes

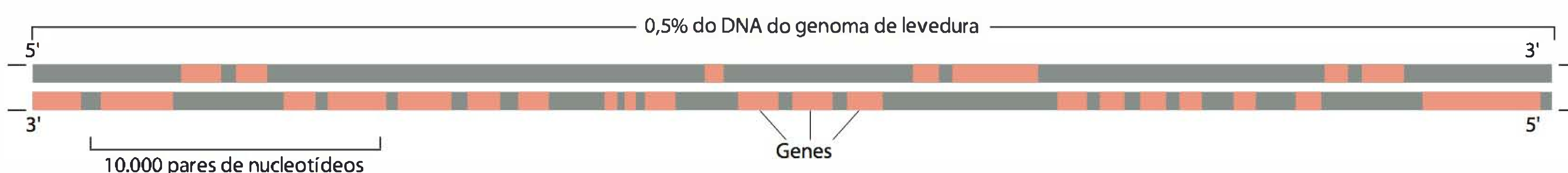
Os cromossomos carregam os genes – as unidades funcionais da hereditariedade. Um gene normalmente é definido como um segmento de DNA que contém as instruções para produzir uma determinada proteína (ou uma série de proteínas relacionadas). Embora essa definição sirva para a maioria dos genes, vários deles produzem moléculas de RNA ao invés de proteínas como produto final. Como as proteínas, essas moléculas de RNA executam uma diversidade de funções estruturais e catalíticas nas células, que serão discutidas em detalhes nos próximos capítulos.

Como esperado, existe uma correlação entre a complexidade de um organismo e o número de genes em seu genoma (ver Tabela 1-1, p. 18). Por exemplo, algumas bactérias simples possuem apenas 500 genes, em comparação aos cerca de 25 mil genes em humanos. As bactérias e alguns eucariotos unicelulares, como as leveduras, têm um genoma especialmente sucinto; a sequência nucleotídica completa de seu genoma mostra que as moléculas de DNA que constituem seu cromossomo são quase como um cordão, cheio de genes muito próximos (**Figura 4-13**). Por outro lado, os cromossomos de muitos eucariotos (incluindo o homem) contêm ainda, além dos genes, um excesso enorme de DNA intercalante que parece não conter informação relevante. Algumas vezes essas sequências são chamadas de "lixo de DNA", indicando que sua utilidade para a célula ainda não foi comprovada e que a sequência específica desse DNA pode não ter mesmo importância. Porém, parte desse DNA é essencial para a expressão gênica correta de determinados genes, como veremos em outros capítulos.

Devido às diferenças na quantidade de DNA intercalante entre os genes, os tamanhos dos genomas variam bastante (ver Figura 1-37). Por exemplo, o genoma humano é 200 vezes maior do que o da levedura *S. cerevisiae*, mas 30 vezes menor do que o de algumas plantas e anfíbios, e 200 vezes menor do que o de uma espécie de ameba. Também, devido a diferenças nesse DNA em excesso, o conteúdo de DNA no genoma de organismos similares (p. ex., peixes ósseos) pode variar centenas de vezes em tamanho, mesmo contendo praticamente o mesmo número de genes. Independentemente da função desse DNA em excesso, parece claro que ele não é um grande problema para a célula eucariótica.

A forma como o genoma é dividido nos cromossomos também difere de uma espécie de eucarioto para outra. Por exemplo, em comparação com os 46 cromossomos humanos, as células somáticas de uma espécie de cervo pequeno contêm somente seis cromossomos, enquanto uma espécie de carpa contém mais de cem. Mesmo espécies muito relacionadas com genomas de tamanho similar podem apresentar números e tamanhos de cromossomos muito distintos (**Figura 4-14**). Não há uma regra simples para o número cromossômico, a complexidade da espécie e o tamanho total do genoma. Ao contrário, o genoma e os cromossomos das espécies atuais foram moldados por uma história particular de eventos genéticos aparentemente ao acaso, nos quais a pressão seletiva atuou durante longos períodos da evolução.

Figura 4-13 Organização dos genes no genoma de *S. cerevisiae*. A levedura por brotamento *S. cerevisiae* é bastante utilizada na produção de cervejas e pães. O genoma da célula dessa levedura está distribuído em 16 cromossomos. Uma pequena região de um cromossomo foi selecionada arbitrariamente para mostrar a densidade de genes característicos dessa espécie. Como indicado pelo *sombreamento em vermelho*, alguns genes são transcritos a partir da fita inferior, enquanto outros são transcritos da fita superior. Existem cerca de 6.300 genes no genoma completo, que contém mais de 12 milhões de pares de nucleotídeos. (Para ver os genes de bactérias, dispostos muito próximos, em um genoma com 4,6 milhões de nucleotídeos de comprimento, ver Figura 1-29.)



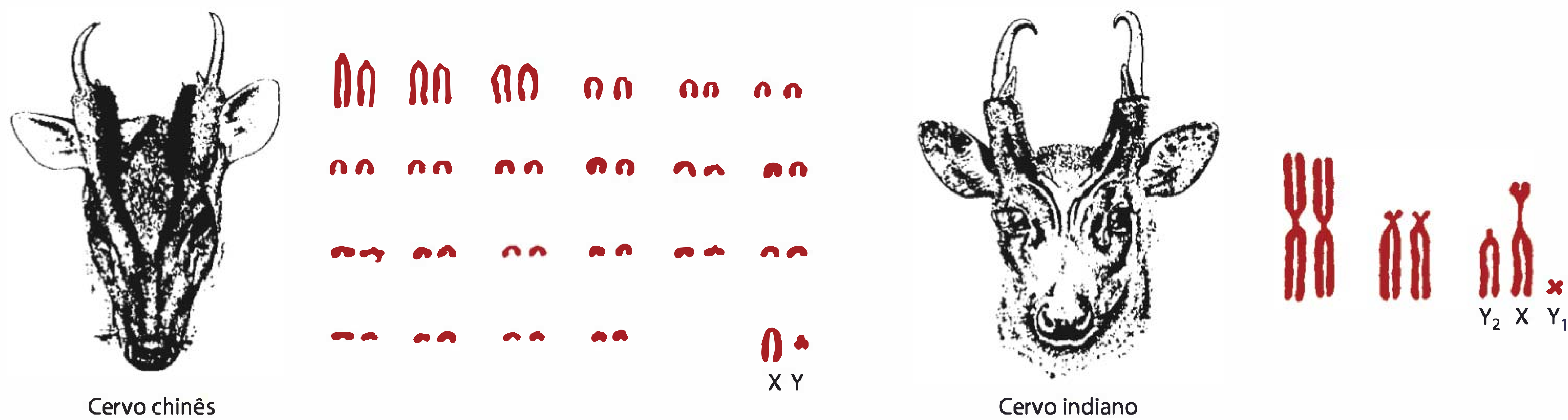


Figura 4-14 Duas espécies de cervos muito relacionadas, mas com diferentes números cromossômicos. Durante a evolução do cervo indiano, os cromossomos que eram inicialmente separados se fundiram, sem causar efeitos graves nos animais. Essas duas espécies possuem aproximadamente o mesmo número de genes. (Adaptada de M. W. Strickberger, Evolution, 3rd ed., Sudbury, MA: Jones & Bartlett Publishers, 2000.)

A sequência de nucleotídeos do genoma humano mostra como os genes estão organizados

No Capítulo 1 discutimos, em termos gerais, como a informação no DNA é lida e utilizada por intermediários de RNA para produzir proteínas (ver Figura 1-4). Em 1999, pela primeira vez foi possível saber exatamente como os genes estão dispostos em um cromossomo inteiro de vertebrados (**Figura 4-15**). Atualmente, com a publicação do "primeiro rascunho" de todo o genoma humano em 2001 e a "sequência de DNA finalizada" em 2004, a informação genética em todos os cromossomos humanos está disponível. A quantidade absoluta de informação fornecida pelo Projeto Genoma Humano é gigantesca (**Figura 4-16** e **Tabela 4-1**). Em seu ápice, o Projeto Genoma Humano fornecia sequências cruas de nucleotídeos a uma taxa de mil nucleotídeos por segundo. Levará algumas décadas para que toda a informação seja completamente analisada, mas já estimulou a realização de novos experimentos e afetou o conteúdo de todos os capítulos deste livro.

A primeira característica marcante do genoma humano é que apenas uma parte muito pequena (somente um pequeno percentual) codifica proteínas (**Figura 4-17**). Muito do

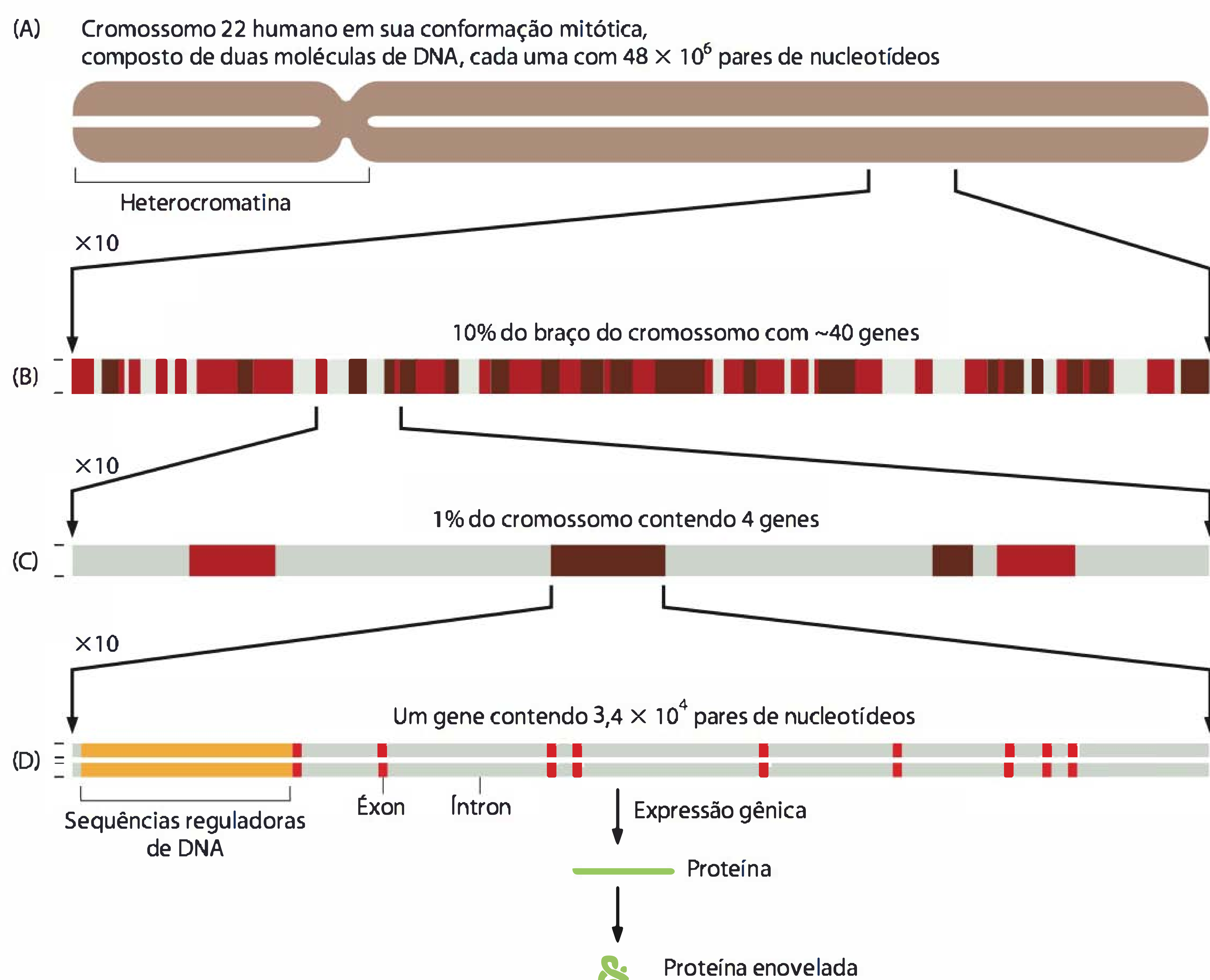


Figura 4-15 Organização dos genes em um cromossomo humano. (A) O cromossomo 22, um dos menores cromossomos humanos, contém 48 × 10^6 pares de nucleotídeos e corresponde aproximadamente a 1,5 % de todo o genoma humano. Grande parte do braço esquerdo do cromossomo 22 consiste em pequenas sequências de DNA repetidas que são compactadas em uma forma especial de cromatina (heterocromatina), discutida posteriormente neste capítulo. (B) Um segmento do cromossomo 22 ampliado 10 vezes, contendo cerca de 40 genes. Os genes indicados em *marrom-escuro* são conhecidos, e os genes em *marrom-claro* são suposições. (C) Um segmento ampliado de (B) mostrando o tamanho total de vários genes. (D) O arranjo de éxons e íntrons de um gene típico é mostrado após uma ampliação de 10 vezes. Cada éxon (em *vermelho*) codifica para uma porção da proteína, enquanto a sequência de DNA dos íntrons (em *cinza*) tem pouca importância, como discutido em detalhes no Capítulo 6.

O genoma humano (13,2 × 10^9 pares de nucleotídeos) é a totalidade da informação genética que pertence a nossa espécie. Quase todo esse genoma está distribuído pelos 22 autossomos e 2 cromossomos sexuais (ver Figuras 4-10 e 4-11) encontrados dentro do núcleo. Uma fração mínima do genoma humano (16.569 pares de nucleotídeos – em cópias múltiplas por célula) é encontrada na mitocôndria (introduzida no Capítulo 1 e discutida com detalhes no Capítulo 14). O termo *sequência genômica humana* se refere à sequência nucleotídica completa do DNA nos 24 cromossomos nucleares e na mitocôndria. Sendo diploide, o núcleo de uma célula somática humana contém aproximadamente duas vezes a quantidade haploide de DNA, ou 6,4 × 10^9 pares de nucleotídeos quando não estiver duplicando seus cromossomos no preparo para a divisão. (Adaptado a partir de International Human Genome Sequencing Consortion, *Nature* 409:860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

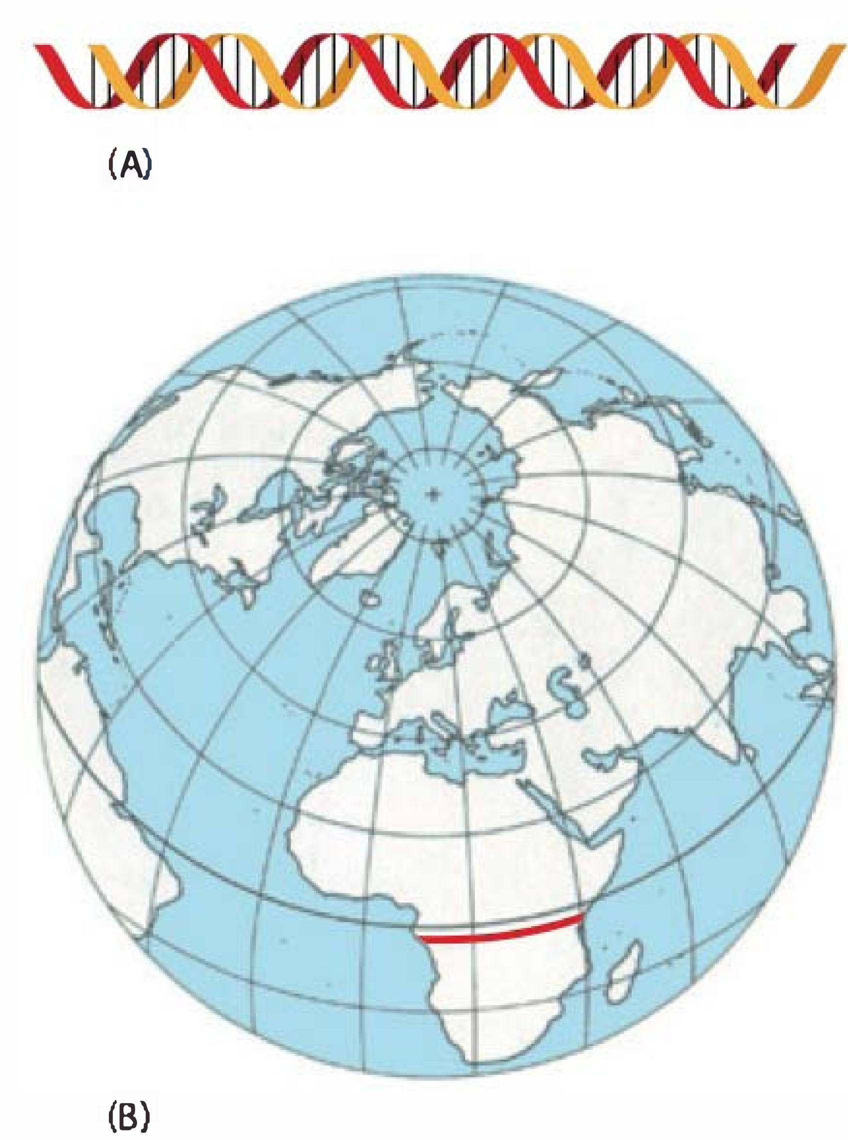


Figura 4-16 Escala do genoma humano. Se, em um desenho, cada par de nucleotídeos tivesse 1 mm, como em (A), todo o genoma humano teria 3.200 km de extensão (aproximadamente 2 mil milhas), o suficiente para desenhar uma linha através do centro da África, o local da origem do homem (*linha vermelha* em B). Nesta escala, teríamos um gene que codifica uma proteína a cada 130 m. Em média, um gene teria 30 m de extensão, mas as sequências codificantes deste gene teriam apenas um pouco mais de 1 m.

restante do DNA cromossômico é constituído por pequenos segmentos móveis de DNA que gradualmente foram inseridos nos cromossomos com o passar do tempo. Discutiremos esses *elementos transponíveis* em detalhes em capítulos seguintes.

Uma segunda característica marcante do genoma humano é o grande tamanho médio dos genes, cerca de 27.000 mil pares de nucleotídeos. Como discutido anteriormente, um gene típico carrega a informação da sequência linear de aminoácidos de uma proteína na sua sequência linear de nucleotídeos. Para codificar uma proteína de tamanho médio (com cerca de 430 aminoácidos em humanos), são necessários apenas cerca de 1.300 pares de nucleotídeos. A maior parte do DNA restante no gene consiste em inúmeros segmentos de DNA não-codificante que interrompem uma sequência relativamente curta de pequenos segmentos de DNA codificante para a proteína. Como discutido em detalhes no Capítulo 6, as sequências codificantes são chamadas de **éxons**; as sequências intercalantes, não-codificantes são denominadas **íntrons** (ver Figura 4-15 e Tabela 4-1). A maioria dos genes humanos, portanto, é formada por uma longa sequência alternada de éxons e íntrons, sendo que a maior parte é formada por íntrons. Em contraste, a maioria dos genes de organismos com genoma compactos não possui íntrons. Isso explica o tamanho muito menor desses genes (cerca de um vigésimo comparado a genes humanos) e também a proporção muito mais alta de DNA codificante em seus cromossomos.

Além dos éxons e íntrons, cada gene está associado a *sequências de DNA reguladoras*, as quais são responsáveis por assegurar que cada gene será ativado e desativado no devido tempo, expresso no nível adequado e apenas em determinados tipos celulares. Em humanos, as sequências reguladoras para um gene típico estão distribuídas por milhares de pares de nucleotídeos. Como seria esperado, essas sequências reguladoras são mais comprimidas em organismos com genomas compactos. Discutiremos o funcionamento dessas sequências reguladoras no Capítulo 7.

Finalmente, a sequência nucleotídica do genoma humano revelou que as informações cruciais necessárias para produzir um ser humano parecem estar em um estado alarmante de desorganização. Como foi comentado a respeito do nosso genoma: "De certo modo, ele se parece com sua garagem/quarto/refrigerador/vida: altamente individualista, porém desarrumado; pouca evidência de organização; cheio de coisas acumuladas (que os iniciantes chamam de "lixo"); praticamente nada é descartado; e os poucos itens valiosos estão desordenados e aparentemente dispostos de qualquer jeito por todo lugar".

Tabela 4-1 Algumas estatísticas vitais do genoma humano

	Genoma humano
Comprimento do DNA	$3{,}2 \times 10^9$ pares de nucleotídeos*
Número de genes	Aproximadamente 25 mil
Maior gene	$2{,}4 \times 10^6$ pares de nucleotídeos
Tamanho médio dos genes	27 mil pares de nucleotídeos
Menor número de éxons por gene	1
Maior número de éxons por gene	178
Número médio de éxons por gene	10,4
Tamanho do maior éxon	17.106 pares de nucleotídeos
Tamanho médio dos éxons	145 pares de nucleotídeos
Número de pseudogenes**	Mais de 20 mil
Porcentagem de sequências de DNA nos éxons (sequências codificantes de proteínas)	1,5%
Porcentagem de DNA em outras sequências altamente conservadas***	3,5%
Porcentagem de DNA nos elementos repetitivos com várias cópias	Aproximadamente 50%

*A sequência dos 2,85 bilhões de nucleotídeos é conhecida com precisão (taxa de erro de apenas um a cada 100 mil nucleotídeos). O restante do DNA consiste, principalmente, em pequenas sequências altamente repetidas uma após a outra, com variações no número de repetições entre indivíduos.

**Um pseudogene é uma sequência de nucleotídeos de DNA que se assemelha a um gene funcional, mas contém muitas mutações prejudiciais que impedem sua expressão adequada. A maioria dos pseudogenes surgiu da duplicação de um gene funcional seguido do acúmulo de mutações prejudiciais em uma das cópias.

***Regiões funcionais preservadas; incluem o DNA que codifica regiões não-traduzidas de 5' e 3' (UTRs, *untranslated regions*), RNAs estruturais e funcionais, e sítios de ligação a proteínas conservados no DNA.

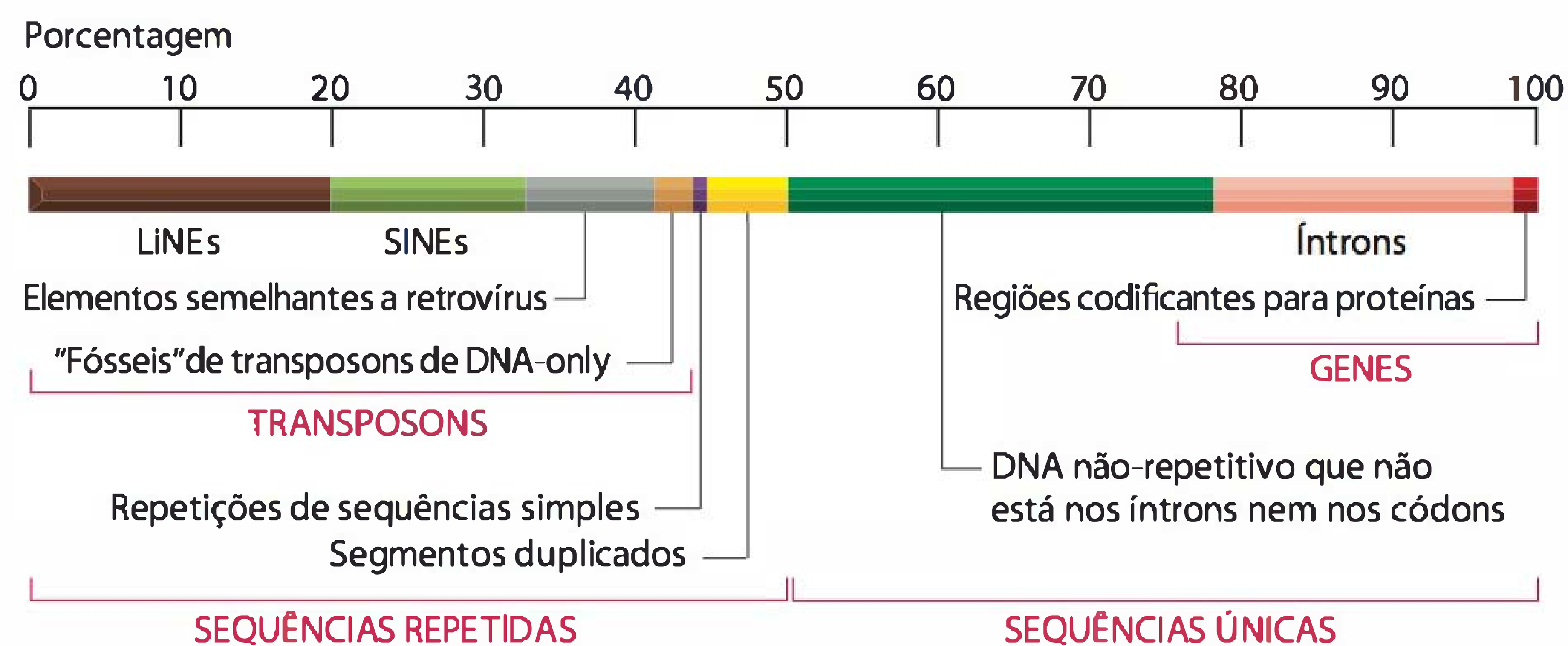


Figura 4-17 Representação do conteúdo da sequência nucleotídica do genoma humano completo. Os elementos LINEs, SINEs, semelhantes a retrovírus e transposons de DNA-only são elementos genéticos móveis que se multiplicaram em nosso genoma pela replicação e inserção de novas cópias em locais distintos. Os elementos genéticos móveis são discutidos no Capítulo 5 (ver Tabela 5-3 e p. 318). As repetições de sequências simples são pequenas sequências de nucleotídeos (menos de 14 pares de nucleotídeos) que são repetidas várias vezes por longos segmentos. A duplicação de segmentos envolve grandes blocos do genoma (1 a 200 mil pares de nucleotídeos) que estão presentes em dois ou mais locais no genoma. Os blocos de DNA mais repetidos na heterocromatina não foram ainda completamente sequenciados; portanto, cerca de 10% das sequências do DNA humano não estão representados neste diagrama. (Dados cortesia de E. Margulies.)

Comparações entre genomas revelam sequências conservadas de DNA na evolução

Um grande obstáculo na interpretação de sequências nucleotídicas do cromossomo humano é a quantidade de sequências aparentemente sem importância. Além disso, as regiões codificantes do genoma (os éxons) normalmente são encontradas em pequenos segmentos (com tamanho médio de 145 pares de nucleotídeos) flutuando em um mar de DNA, cuja sequência exata não tem relevância. Essa organização dificulta a identificação dos éxons em um segmento de DNA. Mais difícil ainda é determinar onde um gene inicia e termina e quantos éxons exatamente ele contém.

A identificação precisa dos genes requer abordagens para extrair informações do genoma humano com uma baixa proporção sinal:ruído. Veremos alguns desses detalhes no Capítulo 8. Aqui discutiremos apenas uma abordagem geral, com base na observação de que sequências com uma função foram relativamente conservadas durante a evolução, enquanto sequências sem função são livres para sofrer mutações aleatórias. A estratégia é, portanto, comparar as sequências humanas às regiões correspondentes em um genoma relacionado, como o de camundongos. Humanos e camundongos divergiram de um mamífero ancestral comum há cerca de 80×10^6 anos, tempo longo o suficiente para a maioria dos nucleotídeos desses genomas sofrerem eventos de mutações ao acaso. Como consequência, as únicas regiões que permaneceram muito similares nos dois genomas são aquelas em que as mutações prejudicaram funções importantes e colocaram os indivíduos que as carregam em desvantagem, resultando na sua eliminação da população por seleção natural. Tais regiões com estreita similaridade são conhecidas como *regiões conservadas*. As regiões conservadas incluem éxons funcionais importantes e sequências reguladoras de DNA. Por outro lado, as *regiões não-conservadas* representam DNAs cujas sequências geralmente não são críticas.

Esse método pode ser ainda mais poderoso pela comparação do nosso genoma com os genomas de outros animais com sequenciamento finalizado, incluindo ratos, galinhas, chimpanzés e cães. Expondo os resultados desses longos "experimentos" naturais, que duraram centenas de milhares de anos, essas análises comparativas do sequenciamento de DNA revelaram as regiões mais interessantes nesses genomas. As comparações revelaram que apenas cerca de 5% do genoma humano consistem em sequências conservadas multiespécies, discutidas em detalhes mais ao final deste capítulo. Surpreendentemente, apenas um terço dessas sequências codificam proteínas. Algumas regiões conservadas não-codificantes correspondem a blocos de sítios de ligação a proteínas envolvidas na regulação gênica, enquanto outras produzem moléculas de RNA não-traduzido em proteínas. Porém, a função da maioria dessas sequências permanece desconhecida. Essa descoberta inesperada levou os cientistas a concluírem que entendemos muito menos sobre a biologia celular de vertebrados do que imaginávamos. Certamente, existem enormes oportunidades para novas descobertas, e podemos esperar surpresas à frente.

Estudos comparativos têm revelado não somente que os camundongos e o homem compartilham muitos genes, mas também que os blocos dos genomas de camundongos e do homem contêm esses genes na mesma ordem, uma característica denominada *harmonia conservada*. Como resultado, grandes blocos dos nossos cromossomos podem ser reconhecidos em outras espécies. Isso permite a utilização da técnica de coloração dos cromossomos para reconstituir a história evolutiva recente de nossos cromossomos (**Figura 4-18**).

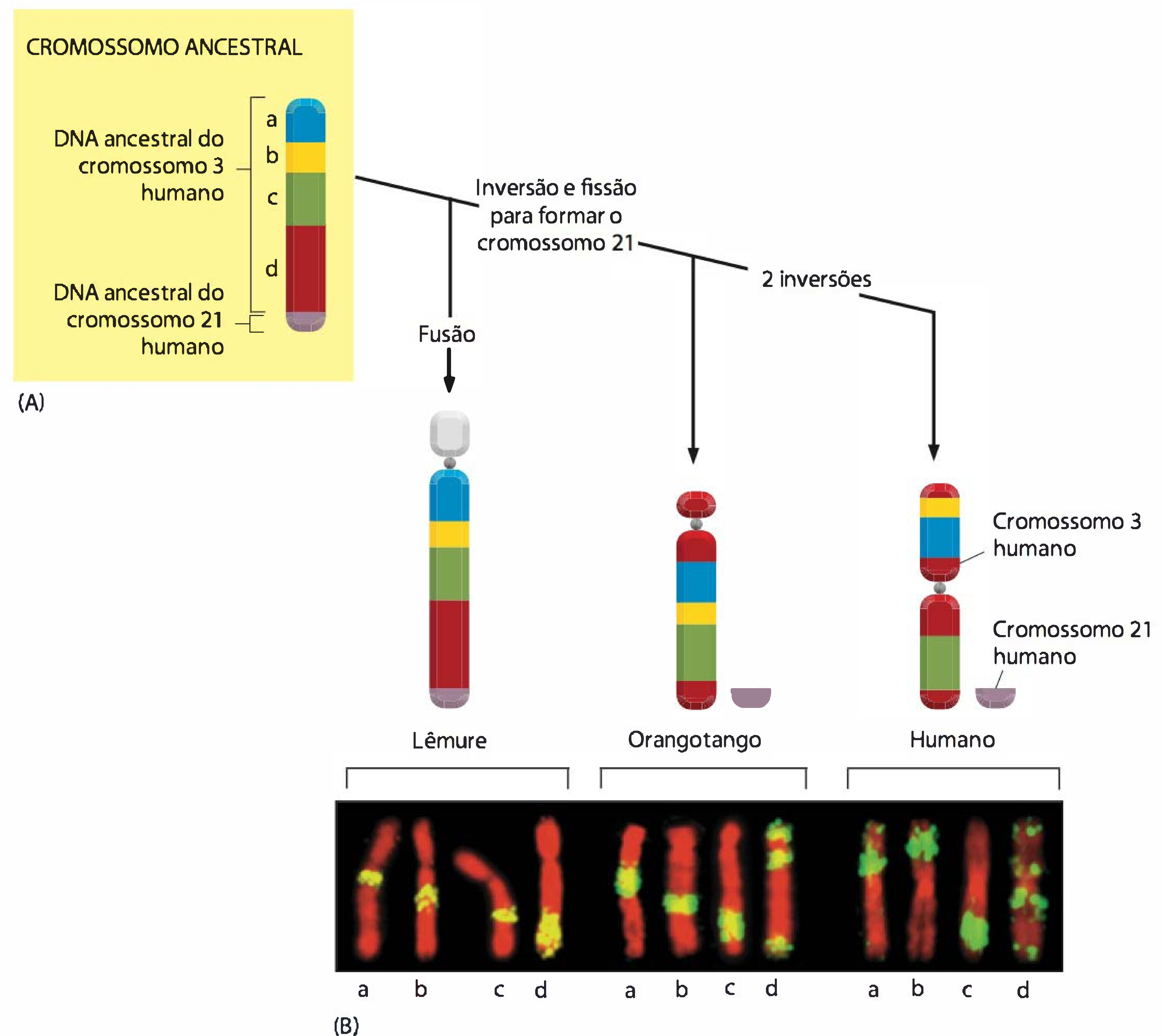


Figura 4-18 História evolutiva proposta para o cromossomo 3 humano e seus cromossomos relacionados em outros mamíferos. (A) A ordem dos segmentos do cromossomo 3 que provavelmente estavam presentes no cromossomo de um mamífero ancestral é mostrada (*quadro amarelo*). As alterações mínimas neste ancestral, necessárias para o aparecimento dos três cromossomos atuais, estão indicadas. (Os cromossomos atuais de humanos e macacos da África são idênticos nesta resolução.) Os *pequenos círculos* salientados nos cromossomos modernos representam as posições do centrômero. Uma fissão ou inversão que causa uma alteração na organização do cromossomo parece ocorrer uma vez a cada 5 a 10 $\times$ 10^6 anos em mamíferos. (B) Alguns experimentos de coloração cromossômica que levaram a estabelecer o diagrama em (A). Cada imagem mostra os cromossomos mais relacionados ao cromossomo 3 humano, corado em *verde* pela hibridização com diferentes segmentos de DNA, identificados pelas letras a, b, c e d na *porção inferior* da figura. Essas letras correspondem aos segmentos corados do diagrama em (A), como indicado no cromossomo ancestral. (De S. Muller et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:206-211, 2000. Com permissão da National Academy of Sciences.)

Os cromossomos existem em estados diferentes durante a vida da célula

Vimos como os genes estão organizados nos cromossomos, mas para formar um cromossomo funcional, uma molécula de DNA deve fazer mais que simplesmente portar os genes. Ela deve ser capaz de replicar, e as cópias replicadas devem ser separadas e fielmente divididas entre as duas células-filhas a cada divisão celular. Esse processo ocorre por meio de

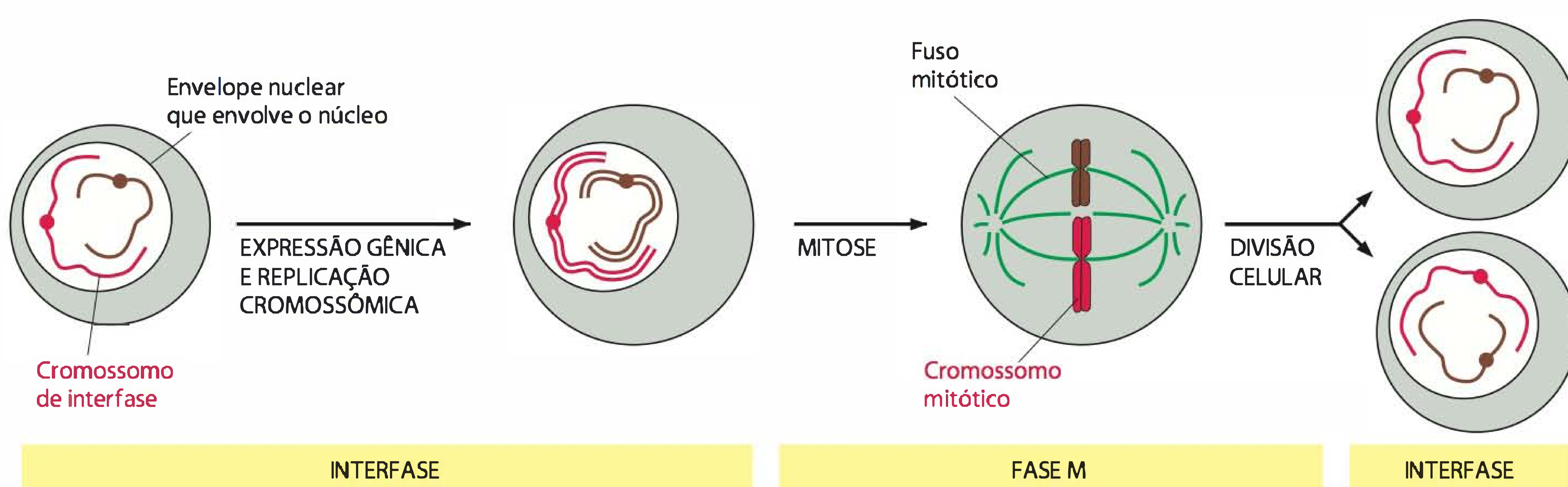


Figura 4-19 Visão simplificada do ciclo celular eucariótico. Durante a interfase, a célula está transcrevendo ativamente seus genes e sintetizando proteínas. Ainda durante a interfase e antes da divisão celular, o DNA é replicado e os cromossomos são duplicados, produzindo dois pares de cromossomos-filhos (uma célula com apenas dois cromossomos é ilustrada aqui). Uma vez completada a replicação do DNA, a célula pode entrar na *fase M*, quando ocorre a mitose e o núcleo é dividido em dois núcleos-filhos. Durante essa etapa, os cromossomos se condensam, o envelope nuclear se fragmenta e o fuso mitótico é formado a partir de microtúbulos e outras proteínas. Os cromossomos mitóticos condensados são capturados pelo fuso mitótico, e um conjunto completo de cromossomos é então puxado para cada extremidade da célula separando cada par de cromossomos-filho. Um envelope nuclear se forma em volta de cada conjunto de cromossomos e, na etapa final da fase M, a célula se divide para produzir duas células-filhas. A célula passa a maior parte do tempo do ciclo celular na interfase; a fase M é breve em comparação à interfase, ocupando apenas uma hora em diversas células de mamíferos.

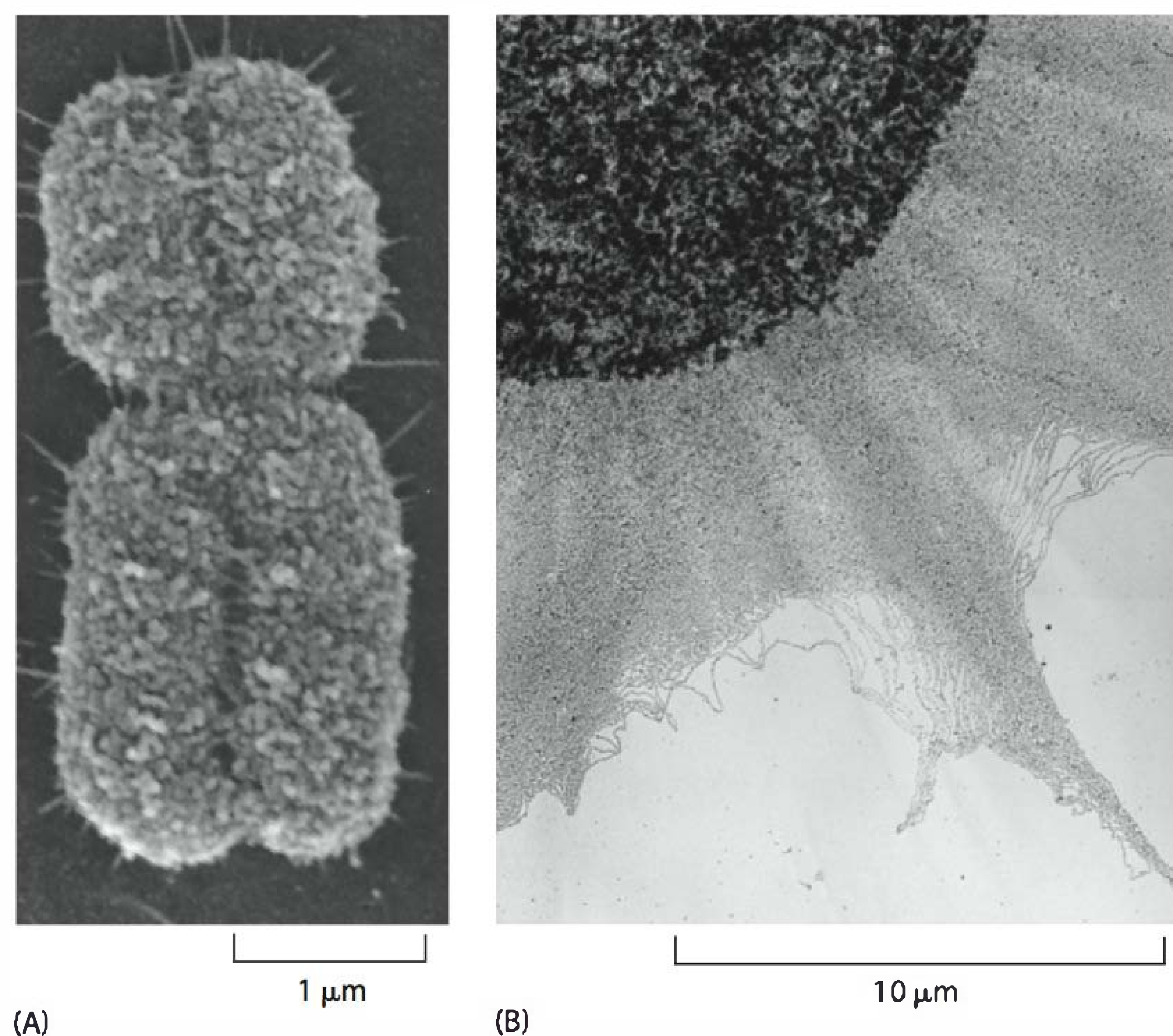


Figura 4-20 Comparação da cromatina interfásica estendida com a cromatina em um cromossomo mitótico. (A) Micrografia eletrônica de varredura de um cromossomo mitótico: um cromossomo duplicado e condensado no qual os dois novos cromossomos ainda estão juntos (ver Figura 4-21). A região de constrição indica a posição do centrômero descrito na Figura 4-21. (B) Micrografia eletrônica mostrando um enorme emaranhado de cromatina que se espalha de um núcleo de interfase lisado. Observe a diferença entre as escalas. (A, cortesia de Terry D. Allen; B, cortesia de Victoria Foe.)

uma série de estágios ordenados conhecidos coletivamente como **ciclo celular**, que fornece uma separação temporal entre a duplicação dos cromossomos e sua separação entre as duas células-filhas. O ciclo celular está resumido na **Figura 4-19**, sendo discutido em detalhes no Capítulo 17. Apenas algumas partes do ciclo celular são relevantes nesse capítulo. Durante a *interfase* os cromossomos são replicados, e durante a *mitose* eles tornam-se altamente condensados e são separados e distribuídos nos dois núcleos-filhos. Os cromossomos altamente condensados nas células em divisão são denominados *cromossomos mitóticos* (**Figura 4-20**A). Essa é a forma na qual os cromossomos são mais facilmente visualizados. Na verdade, todas as imagens de cromossomos mostradas até agora neste capítulo são de cromossomos mitóticos. Durante a divisão celular, esse estado condensado é importante para permitir a separação correta dos cromossomos duplicados pelo fuso mitótico, como discutido no Capítulo 17.

Nos períodos do ciclo celular em que as células não estão em divisão, os cromossomos estão estendidos, e muito de sua cromatina apresenta-se como cordões finos, alongados e emaranhados no núcleo, de forma que os cromossomos individuais não são facilmente distinguidos (Figura 4-20B). Iremos considerar os cromossomos nesse estado distendido como *cromossomos interfásicos*. Como as células passam a maior parte do tempo na interfase, e é nesta fase que a informação genética é lida, os cromossomos despertam um maior interesse dos pesquisadores quando estão menos visíveis.

Cada molécula de DNA que forma um cromossomo linear deve conter um centrômero, dois telômeros e origens de replicação

O cromossomo atua como uma unidade estrutural distinta: para que uma cópia possa ser transmitida a cada célula-filha durante a divisão, cada cromossomo deve ser capaz de se replicar, e a nova cópia replicada deve, subsequentemente, ser separada e dividida corretamente entre as duas células-filhas. Essas funções básicas são controladas por três tipos de sequências nucleotídicas especializadas no DNA, às quais se ligam proteínas específicas que direcionam a maquinaria que replica e segrega os cromossomos (**Figura 4-21**).

Experimentos com leveduras, cujos cromossomos são relativamente pequenos e fáceis de manipular, identificaram as sequências mínimas de DNA dos elementos responsáveis por cada uma dessas funções. Um tipo de sequência nucleotídica atua como **origem de replicação** do DNA, o local em que a duplicação do DNA é iniciada. Os cromossomos eucarióticos contêm muitas origens de replicação para assegurar que todo o cromossomo seja replicado rapidamente, como discutido em detalhes no Capítulo 5.

Após a replicação, os dois cromossomos-filhos permanecem ligados um ao outro e são condensados na continuação do ciclo, formando os cromossomos mitóticos. A presença de uma segunda sequência especializada de DNA, chamada de **centrômero**, permite que uma cópia de cada cromossomo duplicado e condensado seja levada para cada célula-filha no

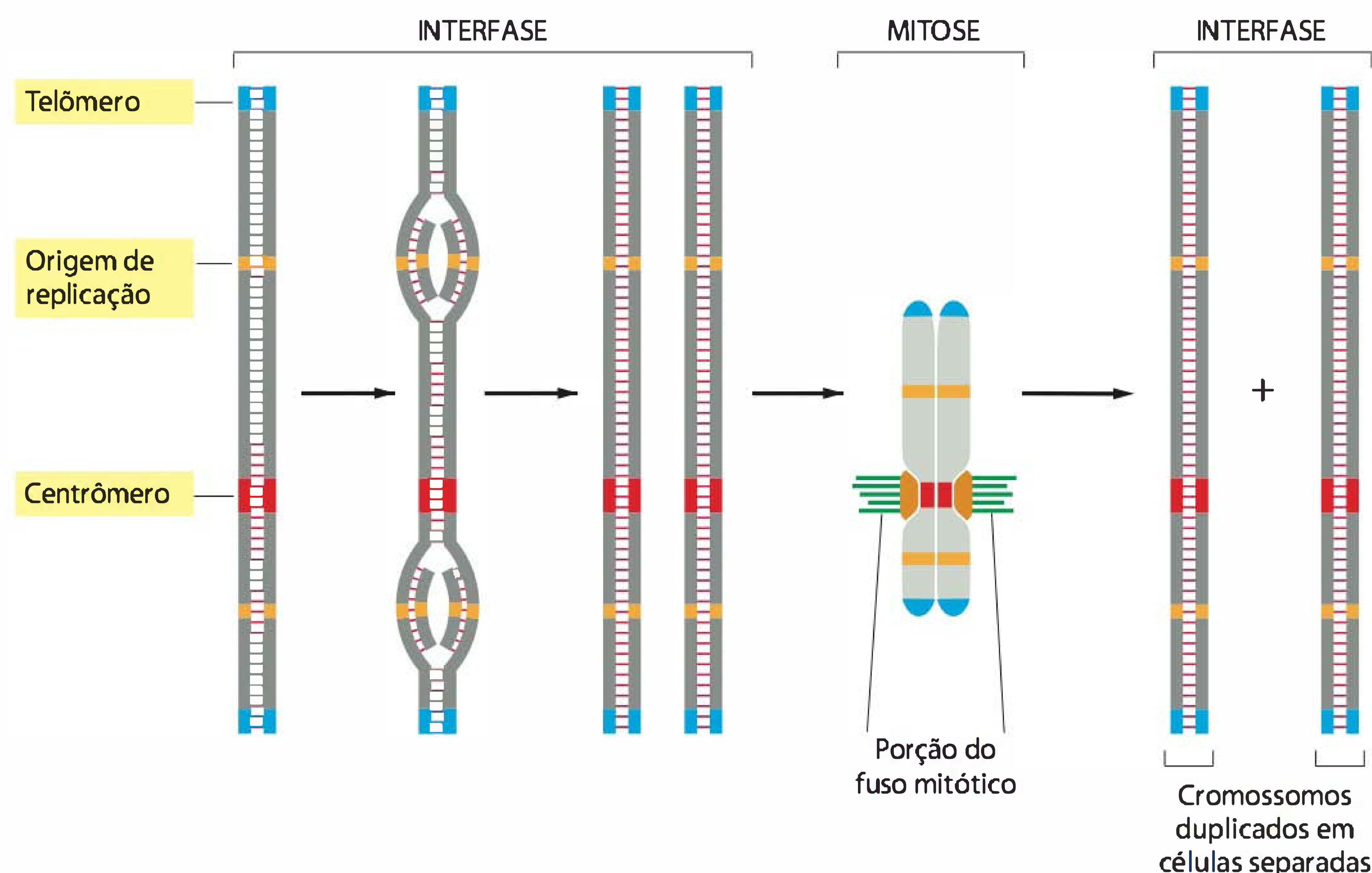


Figura 4-21 As três sequências de DNA necessárias para produzir um cromossomo eucariótico que pode ser replicado e, então, segregado na mitose. Cada cromossomo tem diversas origens de replicação, um centrômero e dois telômeros. A sequência de eventos que um cromossomo típico segue durante o ciclo celular é mostrada aqui. O DNA é replicado na interfase, a partir das origens de replicação, e procede bidirecionalmente pelo cromossomo. Na fase M, o centrômero liga os cromossomos duplicados ao fuso mitótico, de forma que uma cópia é distribuída para cada célula-filha durante a mitose. O centrômero também ajuda a manter os cromossomos duplicados unidos até que estejam prontos para a segregação. Os telômeros formam uma proteção especial nas extremidades de cada cromossomo.

momento da divisão celular. Um complexo proteico chamado de *cinetocoro* é formado no centrômero e liga o fuso mitótico aos cromossomos duplicados, permitindo que eles sejam separados (discutido no Capítulo 17).

Uma terceira sequência especializada de DNA forma os **telômeros**, as extremidades dos cromossomos. Os telômeros contêm sequências nucleotídicas repetidas que permitem que as extremidades dos cromossomos sejam eficientemente replicadas. Os telômeros também desempenham uma outra função: as sequências de DNA repetidas, juntamente com as regiões adjacentes a elas, formam estruturas que evitam que as extremidades cromossômicas sejam confundidas com uma molécula de DNA quebrada que necessita de reparo pela célula. Discutiremos esse tipo de reparo e a estrutura e função dos telômeros no Capítulo 5.

Em células de levedura, os três tipos de sequências necessárias para propagar os cromossomos são relativamente curtos (geralmente menores que cem pares de bases) e, portanto, usam apenas uma pequena fração da capacidade do cromossomo de carregar informações. Embora as sequências teloméricas sejam simples e pequenas em todos os eucariotos, as sequências de DNA que formam os centrômeros e as origens de replicação em organismos mais complexos são muito mais longas que suas correspondentes em leveduras. Por exemplo, alguns experimentos sugerem que os centrômeros humanos contêm até cem mil pares de nucleotídeos, e talvez nem necessitem de um segmento de DNA com uma sequência nucleotídica definida. Ao invés disso, como veremos mais adiante nesse capítulo, eles parecem ser formados por uma grande estrutura repetida de ácidos nucleicos e proteínas, que pode ser herdada na replicação do cromossomo.

As moléculas de DNA estão extremamente compactadas nos cromossomos

Todos os organismos eucarióticos apresentam formas elaboradas de compactar seu DNA nos cromossomos. Por exemplo, se os 48 milhões de pares de nucleotídeos no DNA do cromossomo 22 pudessem ser estendidos como uma dupla-hélice perfeita, a molécula teria cerca de 1,5 cm de comprimento de uma ponta à outra. Mas o cromossomo 22 mede apenas cerca de 2 μm de comprimento na mitose (ver Figuras 4-10 e 4-11), apresentando um grau de compactação de cerca de 10 mil vezes. Esse impressionante feito de compressão é realizado por proteínas que enrolam e dobram o DNA sucessivamente em níveis cada vez mais altos de organização. Embora muito menos condensado que os cromossomos mitóticos, o DNA dos cromossomos interfásicos ainda é muito compactado, com um grau de compactação total de aproximadamente 500 vezes (o comprimento da hélice de DNA do cromossomo dividido pelo comprimento do cromossomo de ponta a ponta).

É importante lembrar, durante a leitura das próximas seções, que a estrutura cromossômica é dinâmica. Vimos que cada cromossomo sofre um grau de condensação incomum

na fase M do ciclo celular. Muito menos visível, mas de enorme interesse e importância, regiões específicas dos cromossomos de interfase sofrem uma descondensação à medida que as células têm acesso a sequências de DNA específicas para a expressão gênica, o reparo e a replicação de DNA – e então se recondensam após o término desses processos. O empacotamento dos cromossomos deve, portanto, ser feito de forma que permita o acesso rápido e localizado no momento requerido ao DNA. Nas seções seguintes, discutiremos as proteínas especializadas que tornam essa compactação possível.

Os nucleossomos são as unidades básicas da estrutura dos cromossomos eucarióticos

As proteínas que se ligam ao DNA para formar o cromossomo eucariótico são, tradicionalmente, divididas em duas classes gerais: as **histonas** e as *proteínas cromossômicas não-histonas*. O complexo dessas duas classes de proteínas com o DNA nuclear eucariótico é conhecido como **cromatina**. As histonas estão presentes em enormes quantidades nas células (cerca de 60 milhões de moléculas de cada tipo por célula humana), de forma que a sua massa total na cromatina é praticamente igual à do DNA.

As histonas são responsáveis pelo primeiro e mais básico nível de organização cromossômica, o **nucleossomo**, um complexo de DNA-proteína descoberto em 1974. Quando o núcleo interfásico é delicadamente rompido, e seu conteúdo examinado sob microscópio eletrônico, a maior parte da cromatina está na forma de uma fibra com 30 nm de diâmetro (**Figura 4-22**A). Se essa cromatina for submetida a um tratamento que a desenrole parcialmente, observa-se, ao microscópio eletrônico, uma série de "contas em um colar" (Figura 4-22B). O colar é DNA e cada conta é uma "partícula do cerne do nucleossomo", que consiste em DNA enrolado em um núcleo de proteínas formado de histonas.

A organização estrutural dos nucleossomos foi determinada após seu isolamento da cromatina compactada pela digestão com enzimas específicas (chamadas de nucleases) que degrada o DNA clivando-o entre os cernes dos nucleossomos. Após digestão por um curto período, o DNA exposto entre as partículas dos nucleossomos, chamado de *DNA de ligação*, é degradado. Cada partícula do cerne nucleossômico individual consiste de um complexo de oito proteínas histonas – duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 – e a fita dupla de DNA, com 147 nucleotídeos de comprimento. O *octâmero de histonas* forma um cerne proteico ao redor do qual a fita dupla de DNA é enrolada (**Figura 4-23**).

Cada partícula do cerne do nucleossomo é separada da outra por um segmento de DNA de ligação, o qual pode variar de alguns até cerca de 80 pares de nucleotídeos. (O termo *nucleossomo* tecnicamente refere-se à partícula do cerne do nucleossomo junto com um de seus DNAs de ligação adjacente, mas frequentemente é usado como sinônimo para a partícula do cerne do nucleossomo.) Em média, portanto, os nucleossomos se repetem aproximadamente a cada 200 pares de nucleotídeos. Por exemplo, uma célula humana diploide com $6{,}4 \times 10^9$ pares de nucleotídeos contém cerca de 30 milhões de nucleossomos. A formação do nucleossomo converte uma molécula de DNA em uma fita de cromatina com aproximadamente um terço de seu comprimento inicial.

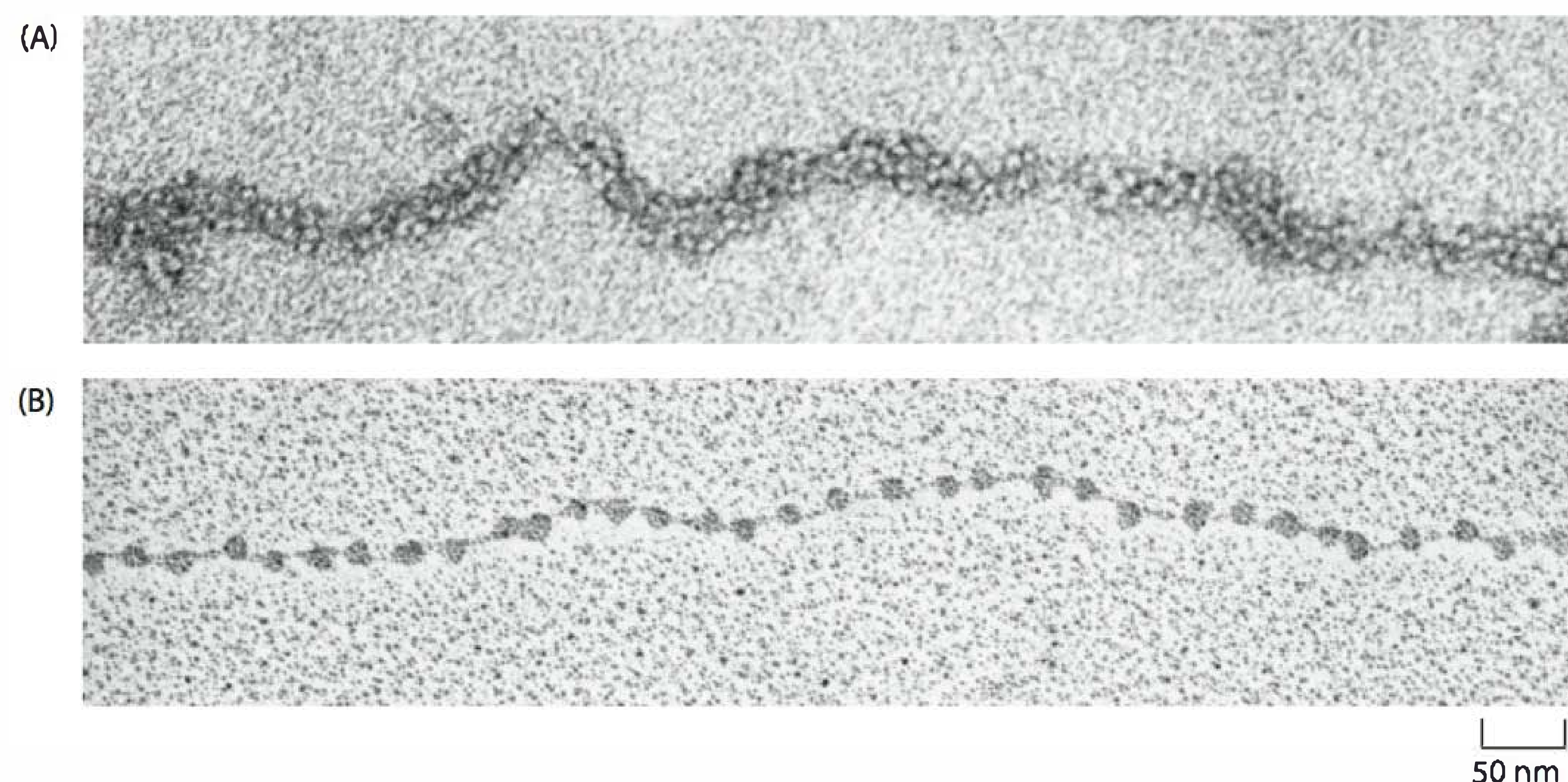


Figura 4-22 Nucleossomos vistos ao microscópio eletrônico. (A) A cromatina isolada diretamente de um núcleo interfásico aparece no microscópio eletrônico como uma fibra de 30 nm de espessura. (B) Esta micrografia eletrônica mostra um segmento da cromatina que foi experimentalmente descompactado, ou "descondensado", após o isolamento para mostrar os nucleossomos. (A, cortesia de Barbara Hamkalo; B, cortesia de Victoria Foe.)

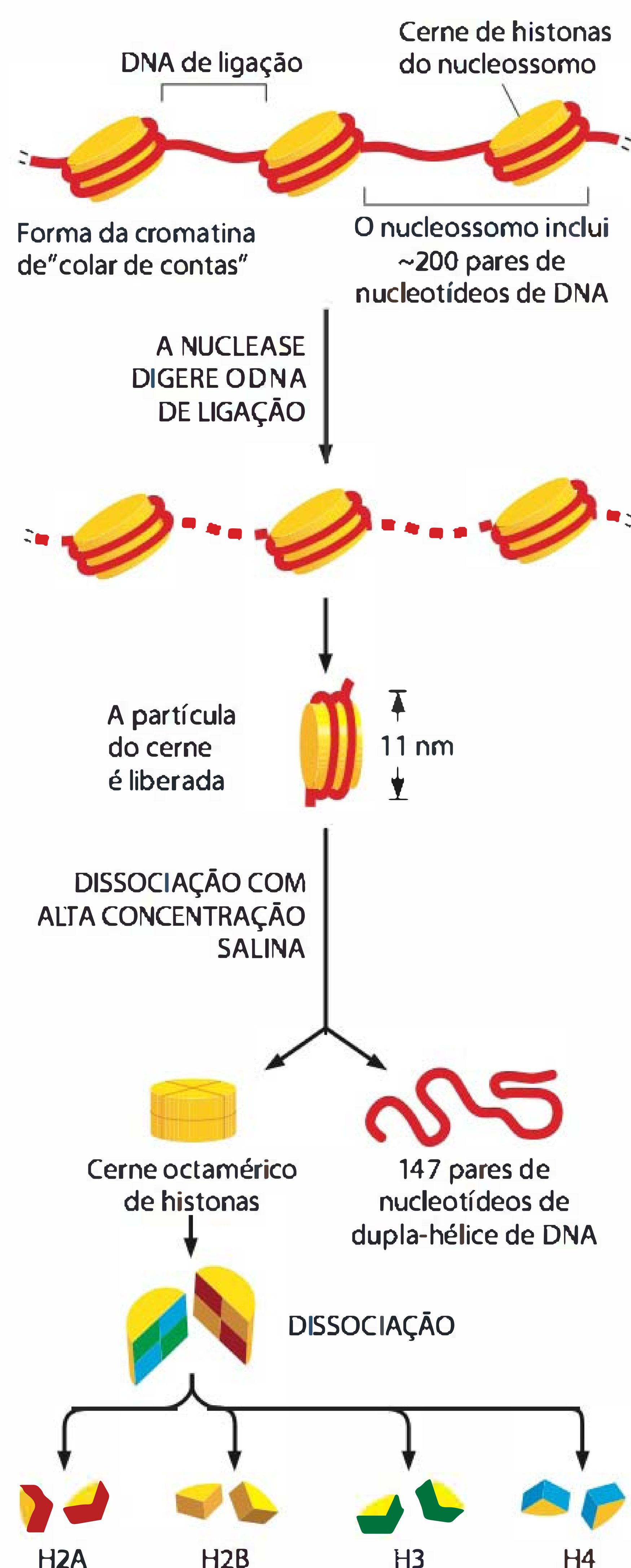


Figura 4-23 Organização estrutural de um nucleossomo. Um nucleossomo contém um cerne de proteínas constituído de oito moléculas de histona. Em experimentos bioquímicos, a partícula do cerne pode ser liberada da cromatina isolada pela digestão do DNA de ligação pela ação de uma nuclease, uma enzima que degrada o DNA. (A nuclease pode degradar o DNA exposto, mas não pode atacar o DNA enrolado em volta do nucleossomo.) Depois da dissociação dos nucleossomos isolados no cerne de proteínas e DNA, o comprimento do DNA que estava enrolado em volta do cerne pode ser determinado. Seu comprimento, de 147 pares de nucleotídeos, é suficiente para se enrolar 1,7 vez ao redor do cerne de histonas.

A estrutura da partícula do cerne do nucleossomo revela como o DNA é compactado

A estrutura em alta resolução da partícula do cerne do nucleossomo, resolvida em 1997, apresenta um cerne de histonas em forma de disco ao redor do qual o DNA se encontra fortemente enrolado com 1,7 volta para a esquerda (**Figura 4-24**). As quatro histonas que formam o cerne são relativamente pequenas (contendo de 102 a 135 aminoácidos) e apresentam um motivo estrutural comum, conhecido como *dobra de histonas*, formado por três hélices α ligadas por duas alças (**Figura 4-25**). Na formação do nucleossomo, primeiro as histonas ligam-se umas às outras para formar os dímeros H3-H4 e H2A-H2B, e os dímeros H3-H4 combinam-se para formar tetrâmeros. Um tetrâmero H3-H4 então se combina a dois dímeros H2A-H2B para formar o octâmero compacto do cerne, ao redor do qual o DNA é enrolado (**Figura 4-26**).

A interface entre o DNA e a histona é extensa. Em cada nucleossomo, 142 ligações de hidrogênio são formadas entre o DNA e o cerne de histonas. Quase metade dessas ligações forma-se entre os aminoácidos da estrutura das histonas e o esqueleto fosfodiéster do DNA. Numerosas interações hidrofóbicas e pontes salinas também mantêm o DNA ligado às proteínas no nucleossomo. Por exemplo, mais de um quinto dos aminoácidos em cada cerne de

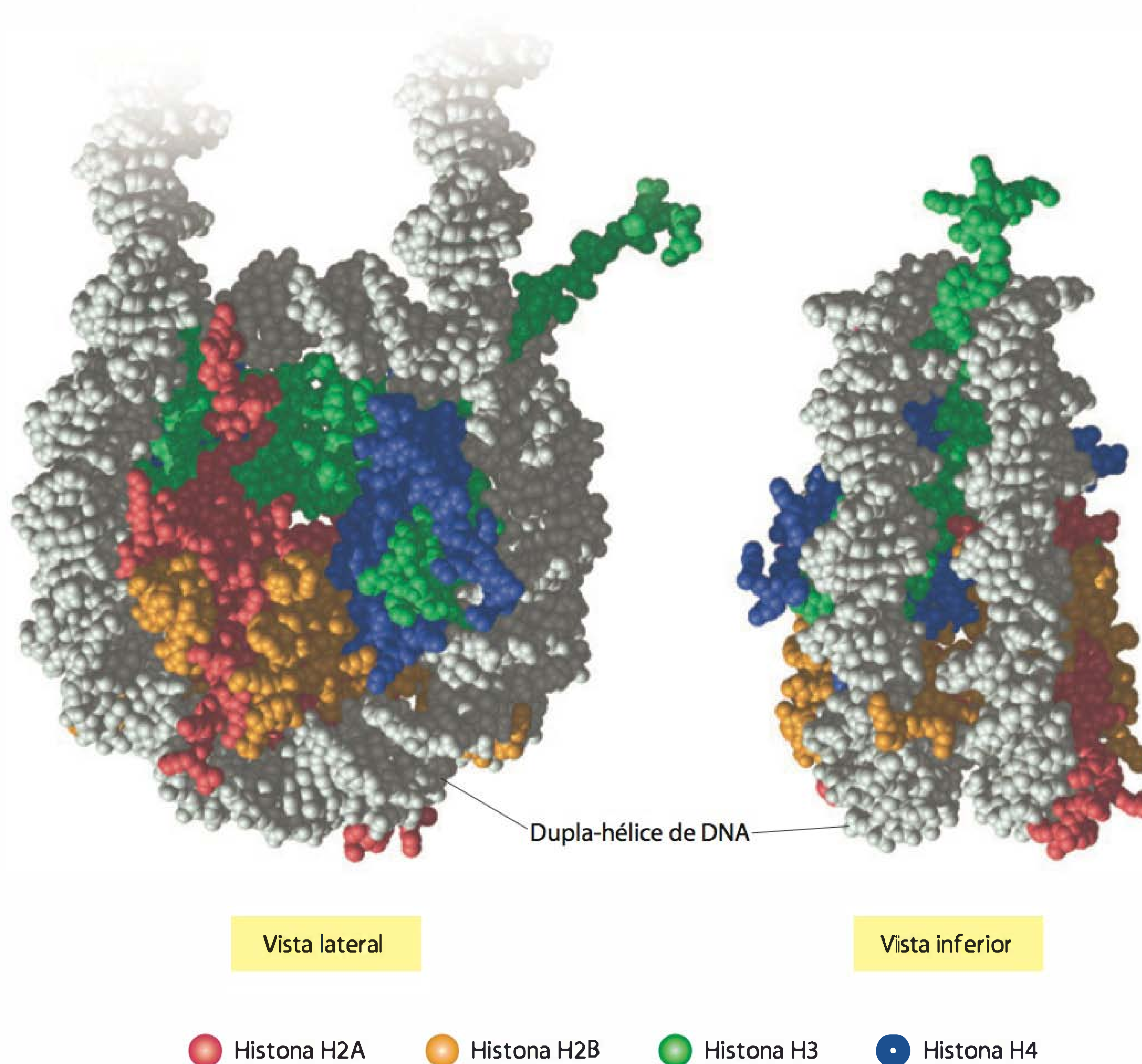


Figura 4-24 Estrutura de uma partícula do cerne do nucleossomo determinada por difração de raios X e pela análise de cristais. Cada histona está colorida de acordo com o esquema mostrado na Figura 4-23, com a dupla-hélice de DNA em *cinza-claro*. (De K. Luger et al., *Nature* 389:251-260, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

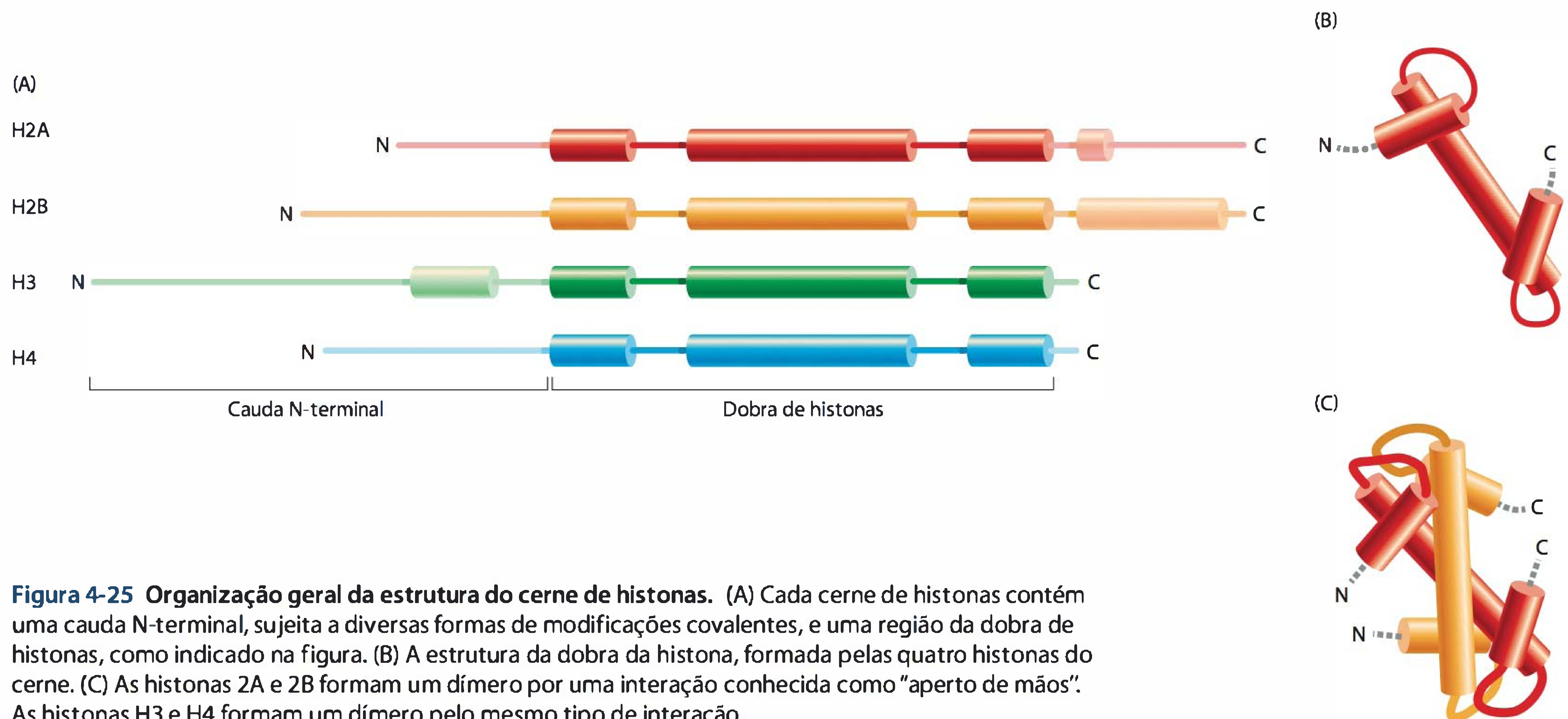


Figura 4-25 Organização geral da estrutura do cerne de histonas. (A) Cada cerne de histonas contém uma cauda N-terminal, sujeita a diversas formas de modificações covalentes, e uma região da dobra de histonas, como indicado na figura. (B) A estrutura da dobra da histona, formada pelas quatro histonas do cerne. (C) As histonas 2A e 2B formam um dímero por uma interação conhecida como "aperto de mãos". As histonas H3 e H4 formam um dímero pelo mesmo tipo de interação.

histonas são lisina ou arginina (dois aminoácidos com cadeias laterais básicas), e suas cargas positivas neutralizam a carga negativa do esqueleto fosfodiéster do DNA. Essas múltiplas interações explicam, em parte, por que praticamente qualquer sequência de DNA pode ser ligada a um octâmero de histonas. O caminho do DNA em torno do cerne de histonas não é regular; na verdade, várias dobras são vistas no DNA, como seria de esperar devido à superfície irregular do cerne. O dobramento requer uma substancial compressão da cavidade menor da hélice de DNA. Alguns dinucleotídeos na cavidade menor são mais fáceis de comprimir, e algumas sequências de nucleotídeos ligam-se aos nucleossomos mais fortemente que outras (**Figura 4-27**). Isso provavelmente explica alguns casos notáveis, mas raros de um posicionamento muito preciso ao longo do DNA. Na maioria das sequências de DNA encontradas nos cromossomos, porém, a sequência preferida pelos nucleossomos deve ser pequena o suficiente para permitir que outros fatores dominem, uma vez que os nucleossomos podem ocupar qualquer posição relativa à sequência de DNA na maioria das regiões cromossômicas.

Além do dobramento das histonas, cada uma das histonas do cerne possui uma "cauda" N-terminal de aminoácidos que se projeta para fora do cerne histona-DNA (ver Figura 4-26). Essas caudas de histonas estão sujeitas a diferentes tipos de modificações covalentes, que por sua vez controlam aspectos críticos da estrutura e função da cromatina, como veremos.

Devido ao seu papel fundamental na função do DNA pelo controle da estrutura da cromatina, as histonas estão entre as proteínas eucarióticas mais conservadas. Por exemplo, a sequência de aminoácidos das histonas H4 de ervilha e de gado diferem em apenas duas das 102 posições de aminoácidos. Essa forte conservação evolutiva sugere que a função das histonas envolve quase todos os seus aminoácidos, de modo que uma alteração em qualquer posição seria prejudicial para a célula. Essa sugestão foi testada diretamente em células de levedura, em que é possível alterar um determinado gene de histona *in vitro* e introduzi-lo no genoma da célula no lugar do gene normal. Como esperado, a maioria das mutações nas sequências das histonas é letal; as poucas que não são letais causam alterações no padrão normal de expressão gênica, bem como outras anormalidades.

Apesar do alto grau de conservação do cerne de histonas, muitos organismos eucarióticos também produzem pequenas quantidades de variantes de histonas especializadas que diferem das histonas principais na sequência de aminoácidos. Como veremos, essas variantes, junto com uma grande variedade de modificações que podem ocorrer nas histonas nucleossômicas, tornam possíveis as diversas formas diferentes de estrutura da cromatina necessárias à função do DNA em eucariotos superiores.

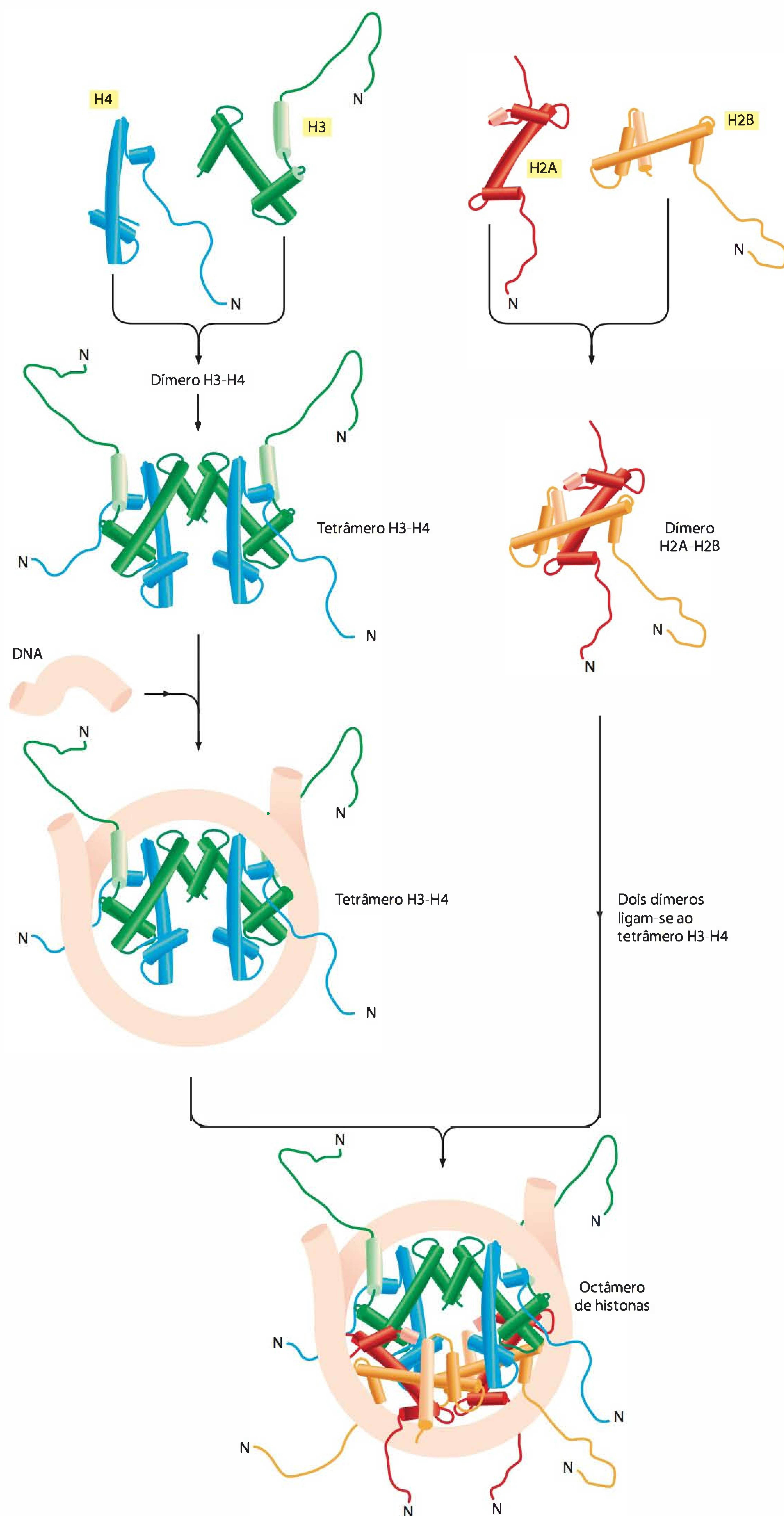


Figura 4-26 Montagem de um octâmero de histonas. O dímero de histonas H3-H4 e o dímero H2A-H2B são formados pela interação de "aperto de mãos". Um tetrâmero H3-H4 é formado e se liga ao DNA. Dois dímeros H2A-H2B são adicionados então para completar o nucleossomo. As histonas estão coloridas como nas Figuras 4-24 e 4-25. Note que as oito caudas N-terminais das histonas projetam-se para fora da estrutura do cerne em forma de disco. Suas conformações são bastante flexíveis.

Dentro da célula, as reações de montagem do nucleossomo mostradas aqui são promovidas pelas proteínas chaperonas de histonas, algumas específicas para H3-H4 e outras específicas para H2A-H2B. (Adaptado de figuras de J. Waterborg.)

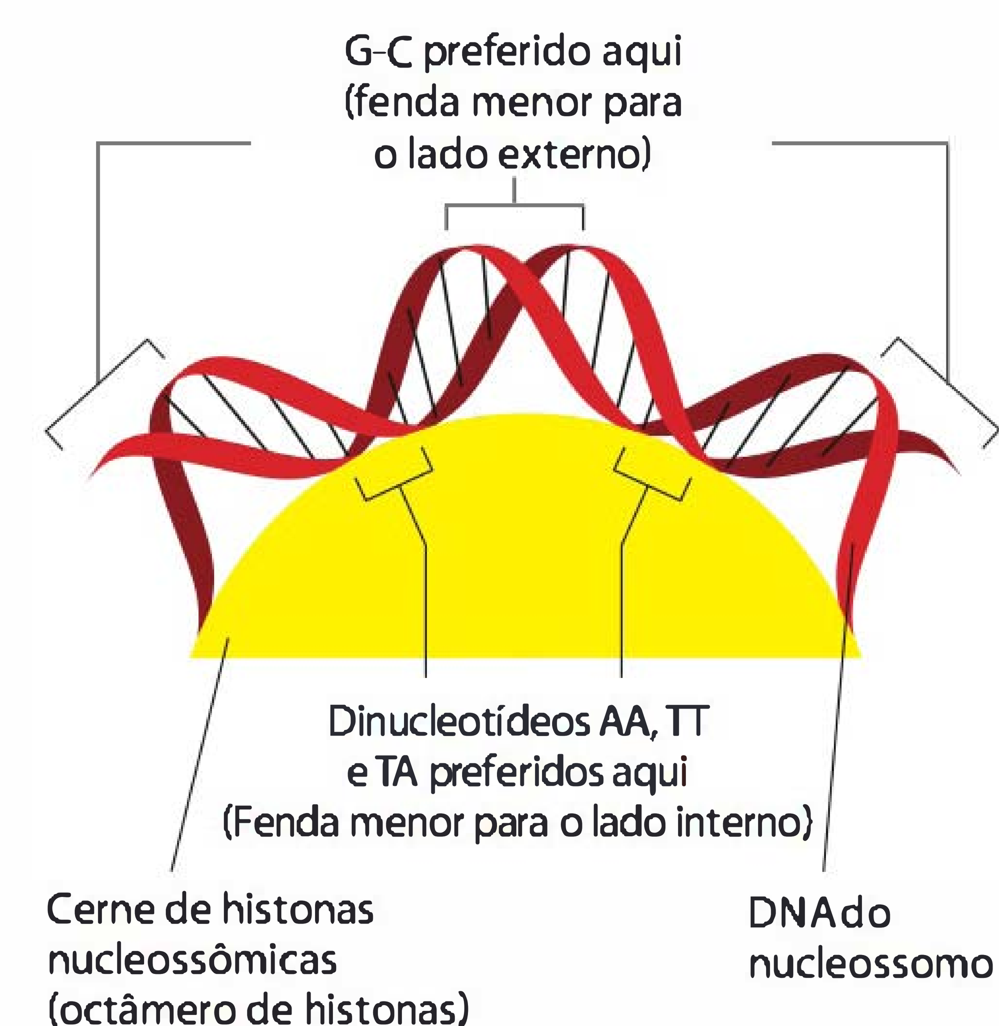


Figura 4-27 Dobramento do DNA em um nucleossomo. A hélice de DNA dá 1,7 volta ao redor do octâmero de histonas. Este diagrama ilustra como a fenda menor é comprimida no lado interno da dobra. Devido a certas características estruturais da molécula de DNA, os dinucleotídeos indicados são acomodados preferencialmente na fenda menor, mais estreita, o que ajuda a explicar por que certas sequências de DNA se ligam mais fortemente ao cerne do que outras.

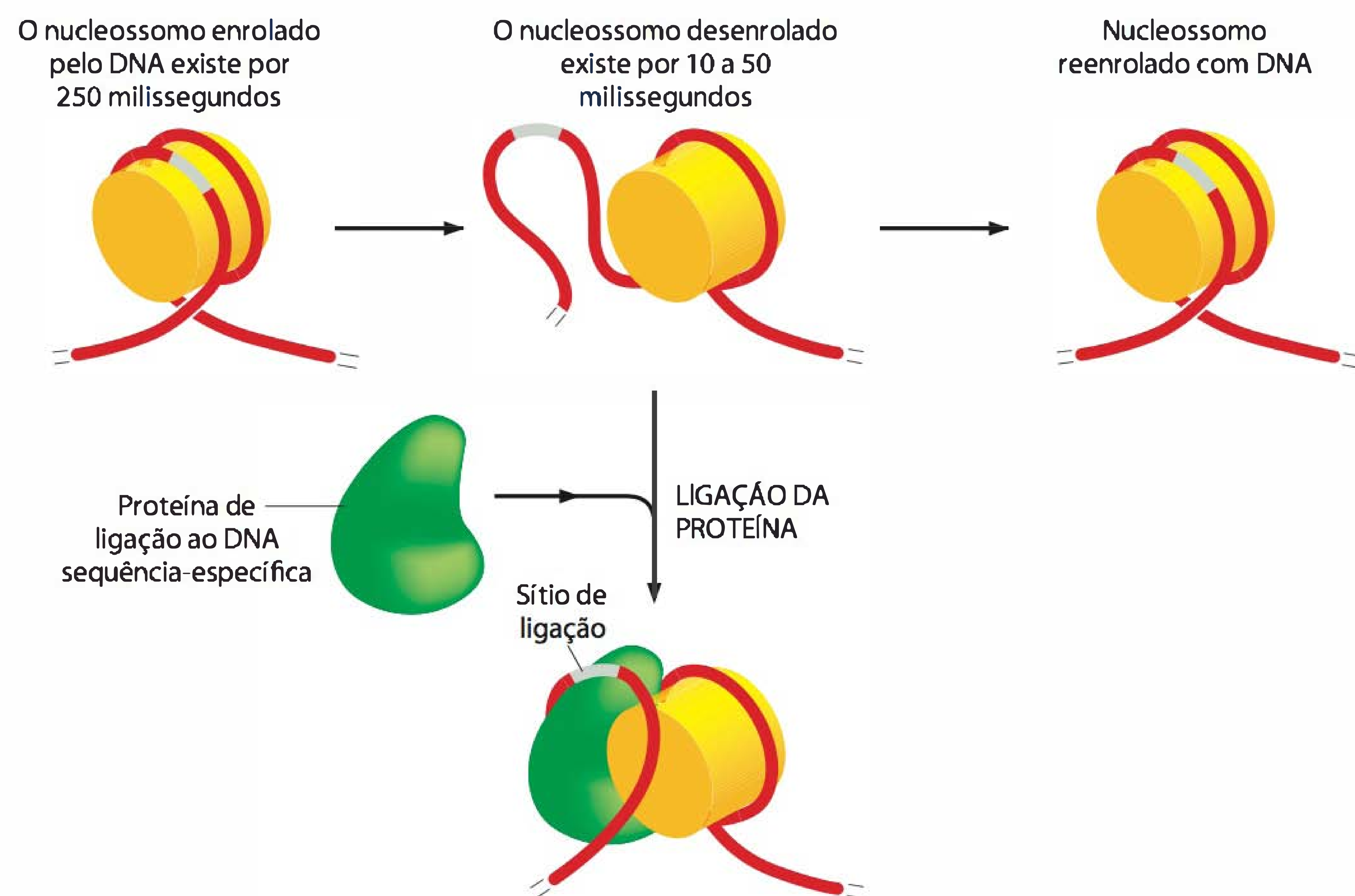


Figura 4-28 Nucleossomos dinâmicos. Estudos de cinética mostraram que o DNA em um nucleossomo isolado é surpreendentemente dinâmico, sendo rapidamente desenrolado e reenrolado novamente em volta do cerne do nucleossomo. Como ilustrado, isso permite o acesso de proteínas ligadoras de DNA à sequência de DNA ligada ao nucleossomo. (Dados de G. Li e J. Widom, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:763-769, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os nucleossomos possuem uma estrutura dinâmica e frequentemente são sujeitos a alterações catalisadas pelos complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP

Por muitos anos os biólogos acreditaram que, uma vez formado em uma determinada posição no DNA, o nucleossomo permaneceria fixo naquele lugar devido à forte associação entre o cerne de histonas e o DNA. Se isso fosse verdade, seria um problema para o mecanismo genético de leitura, que requer um acesso rápido a diversas sequências específicas de DNA, e também para a rápida passagem das maquinarias de transcrição e replicação através da cromatina. Porém, experimentos de cinética mostraram que o DNA em um nucleossomo isolado é desenrolado a partir de cada extremidade a uma taxa de cerca de 4 vezes por segundo, permanecendo exposto por 10 a 50 milissegundos antes que a estrutura parcialmente desenrolada se feche novamente. Portanto, a maioria do DNA em um nucleossomo isolado está, em princípio, disponível para ligação com outras proteínas (**Figura 4-28**).

Um "afrouxamento" adicional dos contatos entre DNA e histonas na cromatina é obviamente necessário, pois as células eucarióticas contêm uma grande variedade de *complexos de remodelamento da cromatina* dependentes de trifosfato de adenosina (ATP, de *Adenosine Triphosphate*). As subunidades nesses complexos que hidrolisam ATP são relacionadas às DNA-helicases (discutidas no Capítulo 5) na escala evolutiva, e ligam-se ao cerne de histonas do nucleossomo e à fita dupla de DNA que está enrolada ao redor do cerne. Usando a energia da hidrólise do ATP para deslocar o DNA do cerne, essa subunidade altera, temporariamente, a estrutura do nucleossomo, tornando a ligação do DNA ao cerne mais livre. Por meio de ciclos repetidos de hidrólise de ATP, os complexos de remodelamento catalisam o *deslizamento do nucleossomo*, e à medida que puxam o cerne do nucleossomo ao longo da

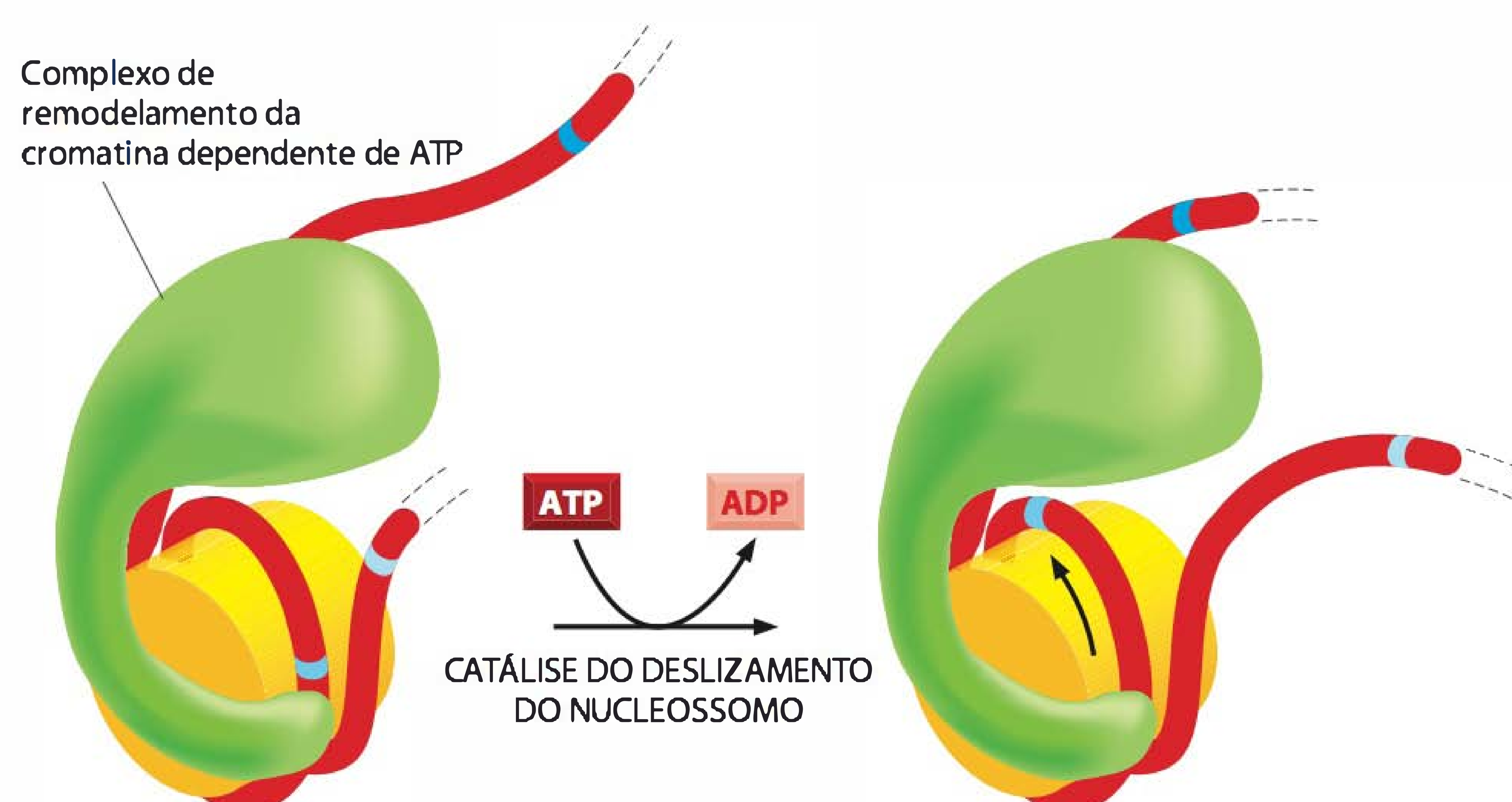


Figura 4-29 Deslizamento do nucleossomo catalisado pelos complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP. Utilizando a energia de hidrólise de ATP, o complexo de remodelamento parece deslocar o DNA de seu nucleossomo e afrouxar sua ligação ao cerne do nucleossomo. Assim, cada ciclo de ligação do ATP, hidrólise e liberação dos produtos ADP e P_i desloca o DNA em relação ao octâmero de histonas na direção mostrada pela seta no diagrama. Vários desses ciclos são necessários para produzir o deslizamento do nucleossomo ilustrado. (Ver também Figura 4-46B.)

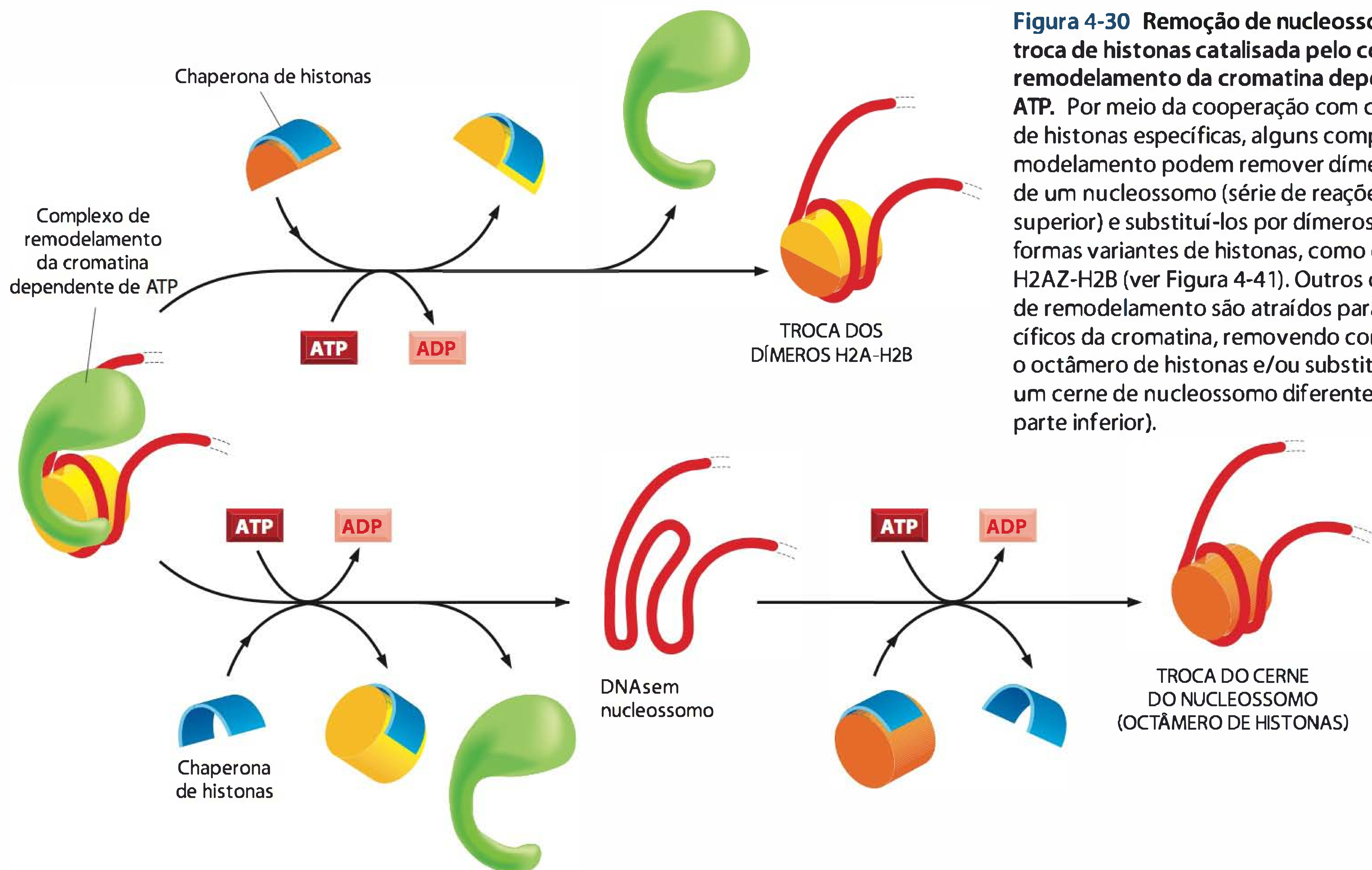


Figura 4-30 Remoção de nucleossomos e troca de histonas catalisada pelo complexo de remodelamento da cromatina dependente de ATP. Por meio da cooperação com chaperonas de histonas específicas, alguns complexos de remodelamento podem remover dímeros H2A-H2B de um nucleossomo (série de reações na parte superior) e substituí-los por dímeros contendo formas variantes de histonas, como os dímeros H2AZ-H2B (ver Figura 4-41). Outros complexos de remodelamento são atraídos para sítios específicos da cromatina, removendo completamente o octâmero de histonas e/ou substituindo-o por um cerne de nucleossomo diferente (reações na parte inferior).

dupla-hélice, elas disponibilizam o DNA nucleossômico para outras proteínas na célula (**Figura 4-29**). Além disso, pela cooperação com proteínas com carga negativa que atuam como chaperonas de histonas, alguns complexos de remodelamento são capazes de remover todo ou partes do cerne do nucleossomo, catalisando a troca das histonas H2A-H2B, ou a remoção total do octâmero do cerne do DNA (**Figura 4-30**).

As células possuem dezenas de complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP, especializados em diferentes funções. A maioria são grandes complexos proteicos que contêm 10 ou mais subunidades. A atividade desses complexos é cuidadosamente controlada pela célula. À medida que genes são ativados ou desativados, esses complexos são direcionados para regiões específicas do DNA, onde atuarão localmente, influenciando a estrutura da cromatina (discutido no Capítulo 7; ver também Figura 4-46 a seguir).

Como mencionado anteriormente, experimentos mostram que, para a maioria das sequências de DNA de um cromossomo, um nucleossomo pode ocupar qualquer posição relativa à sequência. A influência mais importante no posicionamento do nucleossomo parece ser a presença de outras proteínas fortemente ligadas ao DNA. Algumas proteínas ligadas favorecem a formação de um nucleossomo adjacente. Outras criam obstáculos que forçam o nucleossomo a mover-se para outras posições. Portanto, a posição exata de um nucleossomo ao longo de um segmento de DNA depende principalmente da presença e da natureza de outras proteínas ligadas ao DNA. Devido à presença desses complexos de remodelamento dependentes de ATP, o arranjo dos nucleossomos no DNA pode ser muito dinâmico, alterando rapidamente de acordo com as necessidades da célula.

Normalmente os nucleossomos são condensados para formar uma fibra de cromatina compacta

Embora cordões de nucleossomos extremamente longos sejam formados no DNA cromossômico, a cromatina de uma célula viva raramente apresenta a forma de colar de contas. Na verdade, os nucleossomos são compactados uns em cima dos outros, produzindo arranjos regulares nos quais o DNA encontra-se altamente condensado. Assim, quando o núcleo é delicadamente lisado e colocado na tela de microscopia eletrônica, a maior parte da cromatina é vista na forma de uma fibra com cerca de 30 nm de diâmetro, consideravelmente mais espessa do que a cromatina na forma de "colar de contas" (ver Figura 4-22).

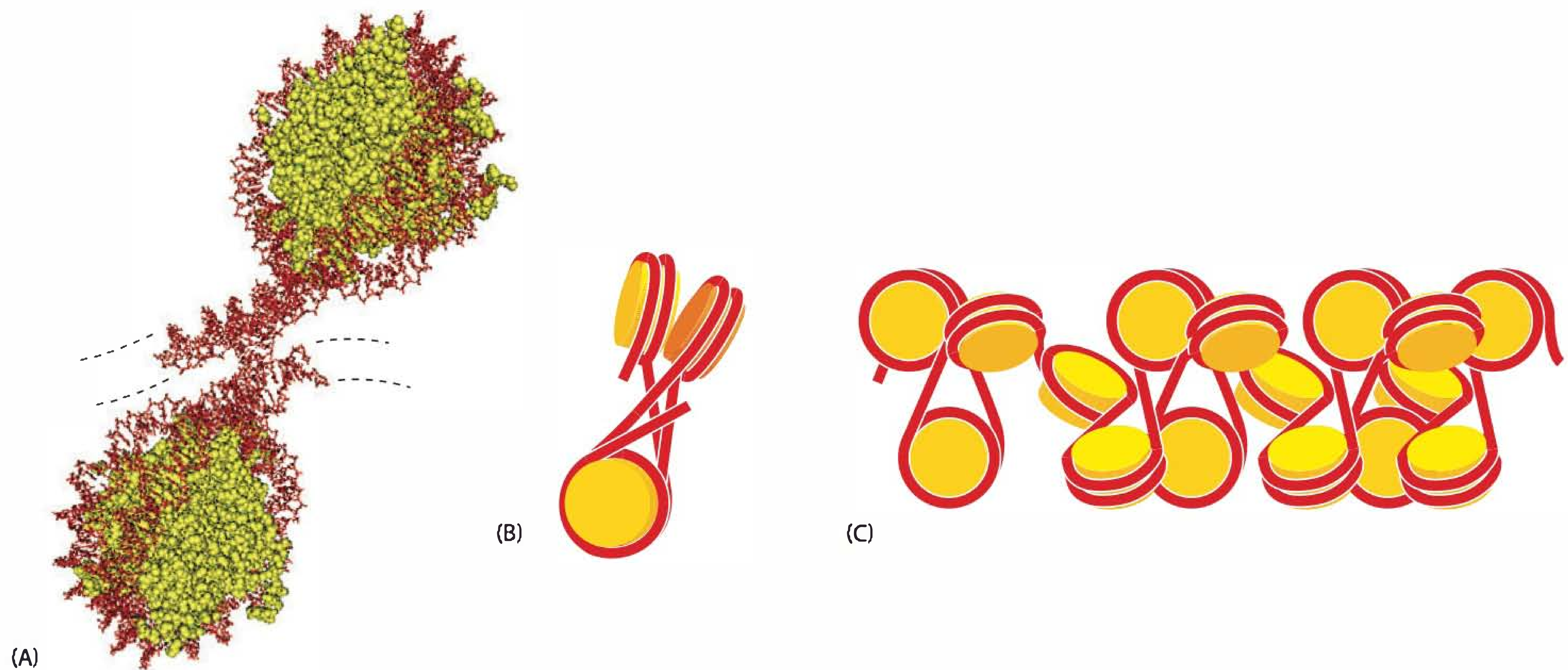


Figura 4-31 **Modelo de zigue-zague para a fibra de cromatina de 30 nm.** (A) Conformação de dois dos quatro nucleossomos em um tetranucleossomo, derivado de uma estrutura determinada por cristalografia de raios X. (B) Representação esquemática de um tetranucleossomo inteiro; o quarto nucleossomo não é visível, porque está empilhado no fundo do nucleossomo e atrás do diagrama. (C) Ilustração esquemática de uma possível estrutura de zigue-zague que pode ser responsável pela formação da fibra de cromatina de 30 nm. (Adaptada de C. L. Woodcock, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:639-640, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Como os nucleossomos são compactados em uma fibra de cromatina de 30 nm? Essa questão ainda não foi completamente respondida, mas informações importantes sobre sua estrutura já foram obtidas. Em especial, análises estruturais de alta resolução têm sido realizadas em pequenos segmentos homogêneos de nucleossomos, preparados a partir de histonas purificadas e moléculas de DNA purificadas. A estrutura de um tetranucleossomo, obtida por cristalografia de raios X, tem sido utilizada para reforçar o modelo de ziguezague para o empilhamento de nucleossomos na fibra de 30 nm (**Figura 4-31**). A microscopia crio-eletrônica de segmentos mais longos sugere uma estrutura solenoide muito diferente, com nucleossomos intercalados (**Figura 4-32**).

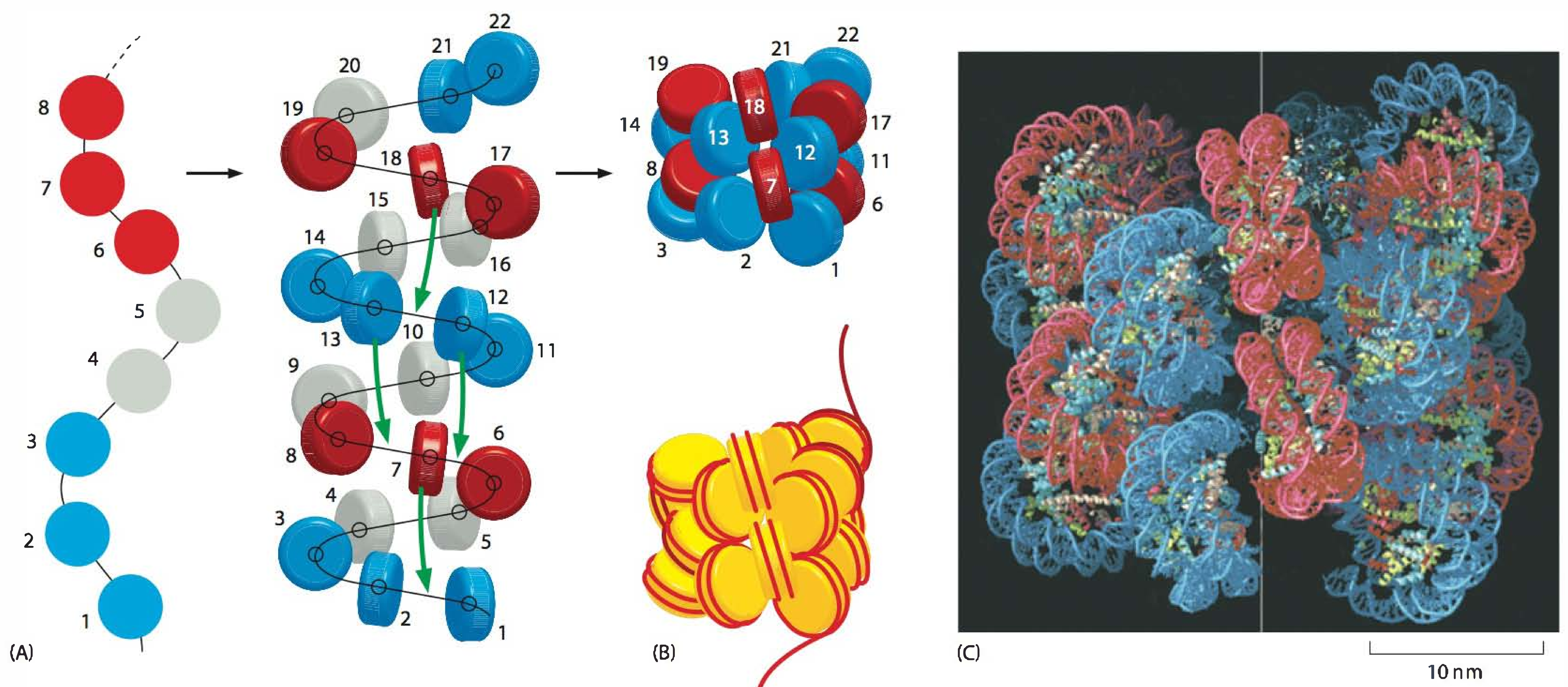


Figura 4-32 **Modelo de solenoide interdigital para a fibra de cromatina de 30 nm.** (A) Desenhos nos quais cordões de nucleossomos com cores diferentes são utilizados para ilustrar como a solenoide é gerada. (B) Diagrama esquemático da estrutura final de (A). (C) Modelo estrutural. O desenho é derivado de imagens de alta resolução obtidas por microscopia crio-eletrônica de arranjos de nucleossomos reconstituídos a partir de histonas purificadas e moléculas de DNA com tamanho e sequência específicos. Ambos os octâmeros dos nucleossomos e uma histona de ligação (discutida a seguir) foram usados para produzir os arranjos regularmente repetidos contendo até 72 nucleossomos. (Adaptada de P. Robinson, L. Fairall, V. Huynh e D. Rhodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:6506-6511, 2006. Com permissão da National Academy of Sciences.)

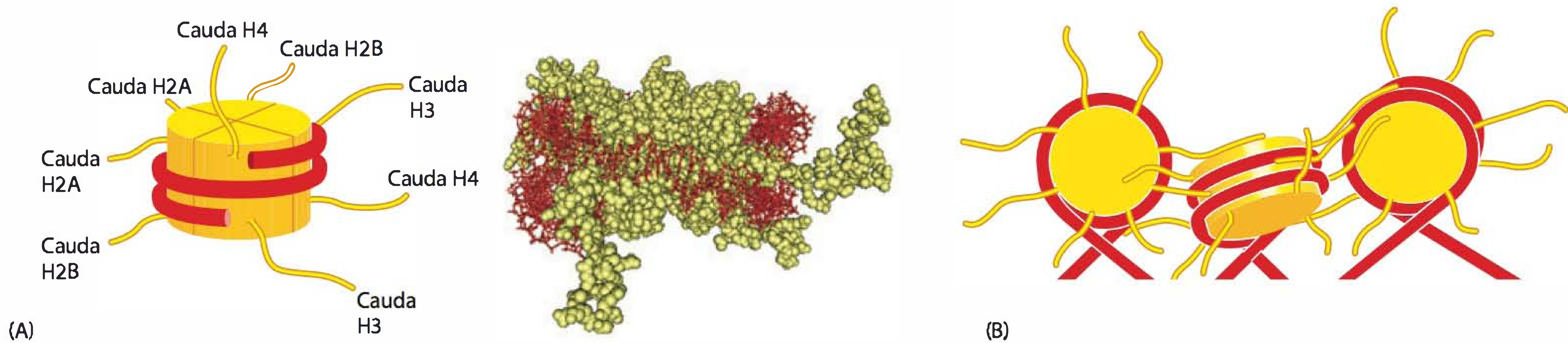


Figura 4-33 Modelo especulativo para a função das caudas das histonas na formação da fibra de 30 nm. (A) Este diagrama mostra os locais aproximados da saída das caudas das oito histonas, cada cauda oriunda de uma proteína que se projeta para fora de cada nucleossomo. A estrutura real é mostrada à direita. Na estrutura em alta resolução do nucleossomo, as caudas estão desestruturadas, sugerindo que são altamente flexíveis. (B) Um modelo especulativo mostrando como as caudas de histonas podem auxiliar no empacotamento dos nucleossomos na fibra de 30 nm. Esse modelo tem como base (1) evidências experimentais de que as caudas de histonas auxiliam na formação da fibra de 30 nm (2) na estrutura cristalina por raios X do nucleossomo, na qual as caudas de um nucleossomo contatam as histonas do cerne de um nucleossomo adjacente nos cristais.

O que causa o empilhamento forte entre os nucleossomos na fibra de 30 nm? As ligações entre nucleossomos formadas pelas caudas de histonas, especialmente a cauda de H4 (**Figura 4-33**), é um fator importante. Um outro fator importante é uma histona adicional normalmente presente na proporção 1:10 em relação aos cernes, conhecida como **histona H1**. Essa histona de ligação é maior do que as histonas do cerne, sendo consideravelmente menos conservada na evolução. Uma única molécula de histona H1 liga-se a cada nucleossomo, fazendo contato com o DNA e com a proteína, e alterando a direção do DNA quando ele sai do nucleossomo. Embora não se saiba em detalhes como a H1 mantém os nucleossomos unidos na fibra de 30 nm, a alteração na direção do DNA parece crucial para a compactação do DNA nucleossômico, intercalando-o para formar a fibra de 30 nm (**Figura 4-34**). A maioria dos organismos eucarióticos produz várias histonas H1 com sequências de aminoácidos distintas, porém relacionadas.

É possível que a fibra de 30 nm encontrada nos cromossomos seja um mosaico fluido de diversas variações diferentes. Por exemplo, a histona de ligação da família H1 estava presente em arranjos nucleossômicos estudados na Figura 4-32, mas ausente no tetranucleossomo da Figura 4-31. Além disso, vimos anteriormente que o DNA de ligação que conecta nucleossomos adjacentes pode variar em comprimento; essas diferenças no comprimento do DNA de ligação provavelmente introduzem perturbações locais na estrutura. Além disso, a presença de várias outras proteínas de ligação ao DNA, bem como as proteínas que se ligam diretamente às histonas, certamente irão adicionar características adicionais a qualquer arranjo nucleossômico.

Resumo

Um gene é uma sequência de nucleotídeos em uma molécula de DNA que atua como uma unidade funcional para a produção de uma proteína, de um RNA estrutural, ou de uma molécula de RNA catalítica ou reguladora. Em eucariotos, os genes que codificam proteínas normalmente são compostos de uma sequência alternada de íntrons e éxons, associados a regiões reguladoras de DNA. Um cromossomo é formado por uma única molécula de DNA, extremamente longa, que contém inúmeros genes organizados linearmente. O genoma humano contém 3,2 × 10^9 pares de nucleotídeos, divididos entre 22 cromossomos autossômicos diferentes e dois cromossomos sexuais. Somente uma pequena porcentagem desse DNA codifica proteínas ou moléculas funcionais de RNA. A molécula de DNA cromossômico também contém três outros tipos de sequências nucleotídicas funcio-

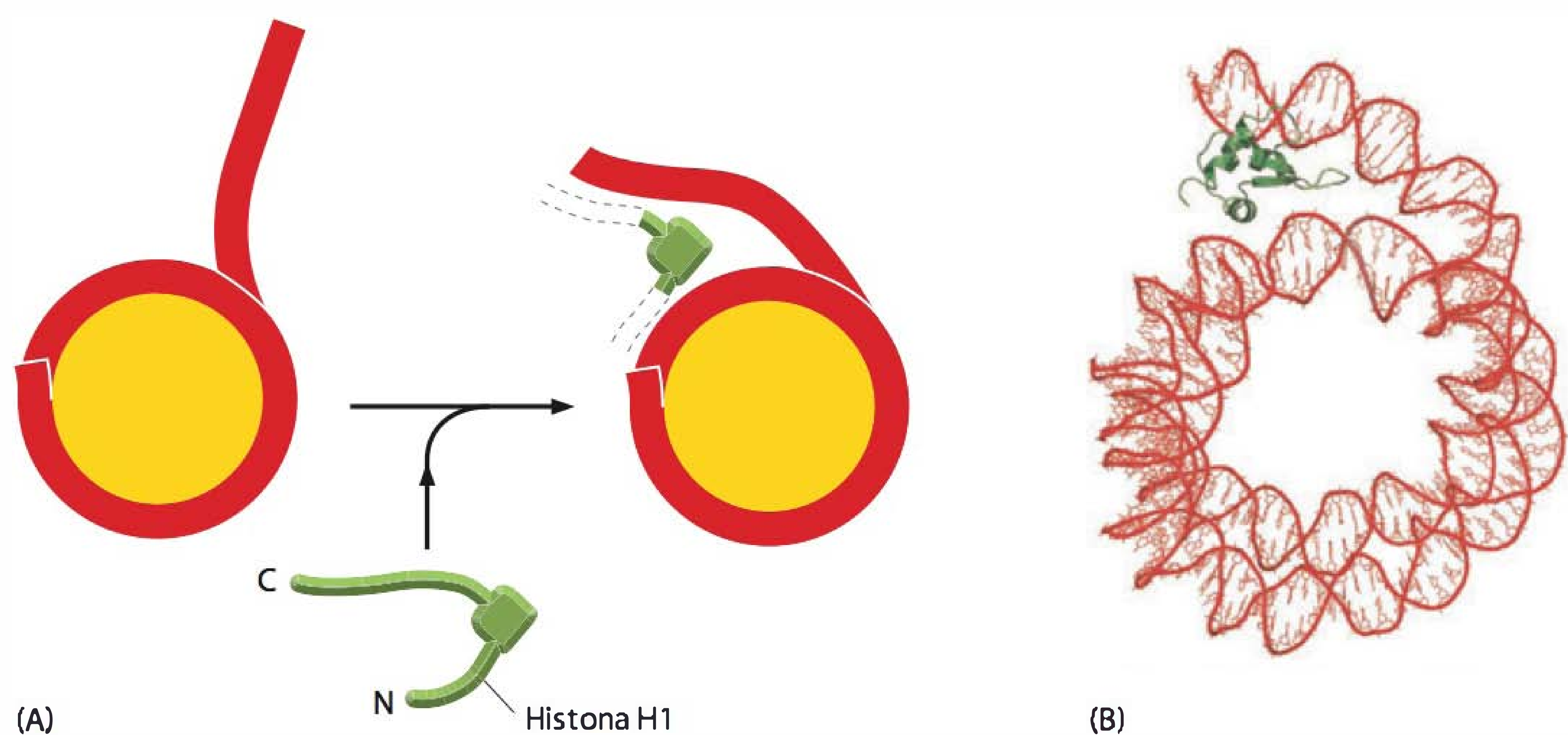


Figura 4-34 Como a histona de ligação liga-se ao nucleossomo. A posição e a estrutura da região globular da histona H1 são mostradas. Como indicado, essa região imobiliza mais 20 pares de nucleotídeos de DNA onde ele sai do cerne do nucleossomo. Esse tipo de ligação pela H1 parece ser importante na formação da fibra de 30 nm. A longa cauda C-terminal da histona H1 também é necessária para a alta afinidade de ligação de H1 à cromatina, mas nem sua posição nem a da cauda N-terminal são conhecidas. (A) Diagrama esquemático, (B) Estrutura. (B, de D. Brown, T. Izard e T. Misteli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:250-255, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

nalmente importantes: as origens de replicação e os telômeros, que permitem que a molécula de DNA seja eficientemente replicada, enquanto o centrômero liga as moléculas-filhas de DNA ao fuso mitótico, assegurando sua segregação precisa às células-filhas durante a fase M do ciclo celular.

O DNA dos eucariotos é fortemente ligado a uma massa igual de histonas, as quais formam unidades repetidas de proteína-DNA chamadas de nucleossomos. O nucleossomo é composto de um cerne octamérico de proteínas histonas ao redor das quais se enrola a dupla-hélice de DNA. Os nucleossomos estão dispostos em intervalos de cerca de 200 pares de nucleotídeos, e normalmente são compactados (com o auxílio de moléculas da histona H1) em arranjos quase regulares, formando uma fibra de cromatina de 30 nm. Apesar do alto grau de compactação na cromatina, sua estrutura precisa ser muito dinâmica para permitir o acesso ao DNA. Alguns enrolamentos e desenrolamentos do DNA ao nucleossomo são espontâneos; porém, a estratégia geral para as alterações reversíveis locais na estrutura da cromatina são os complexos de remodelamento da cromatina dependentes de ATP. As células contêm um grande número desses complexos, que são direcionados a regiões específicas da cromatina em períodos específicos. Os complexos de remodelamento colaboram com as chaperonas de histonas e permitem que os cernes nucleossômicos sejam reposicionados, reconstituídos a partir de diferentes histonas, ou completamente removidos para expor o DNA a eles enrolado.

REGULAÇÃO DA ESTRUTURA DA CROMATINA

Após descrevermos como o DNA é empacotado nos nucleossomos criando a fibra de cromatina, discutiremos agora os mecanismos que produzem as diferentes estruturas da cromatina em diferentes regiões do genoma celular. Tais mecanismos são utilizados no controle de vários genes eucarióticos. Mais importante, alguns tipos de estrutura da cromatina podem ser herdados; isto é, a estrutura pode ser transmitida diretamente de uma célula a suas descendentes. Como a memória celular resultante é fundamentada em uma estrutura proteica herdada e não em alterações da sequência de DNA, essa é uma forma de **herança epigenética**. O prefixo *epi*, do grego para "por cima", é apropriado porque a epigenética representa uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética com base no DNA (**Figura 4-35**).

No Capítulo 7, as diferentes formas de regulação da expressão gênica serão introduzidas, incluindo os detalhes da herança epigenética e os mecanismos distintos que a produzem. Aqui, nos deteremos em apenas um, que se baseia na estrutura da cromatina. Iniciaremos esta seção com uma introdução das estruturas herdadas da cromatina e depois descreveremos as suas bases – as modificações covalentes das histonas nos nucleossomos. Veremos que essas modificações atuam como sítios de reconhecimento para módulos de proteínas que trazem complexos proteicos específicos para expressão gênica ou induzem outras funções biológicas. Através desses mecanismos, a estrutura da cromatina desempenha uma função central no desenvolvimento, no crescimento e na manutenção dos organismos eucarióticos, incluindo humanos.

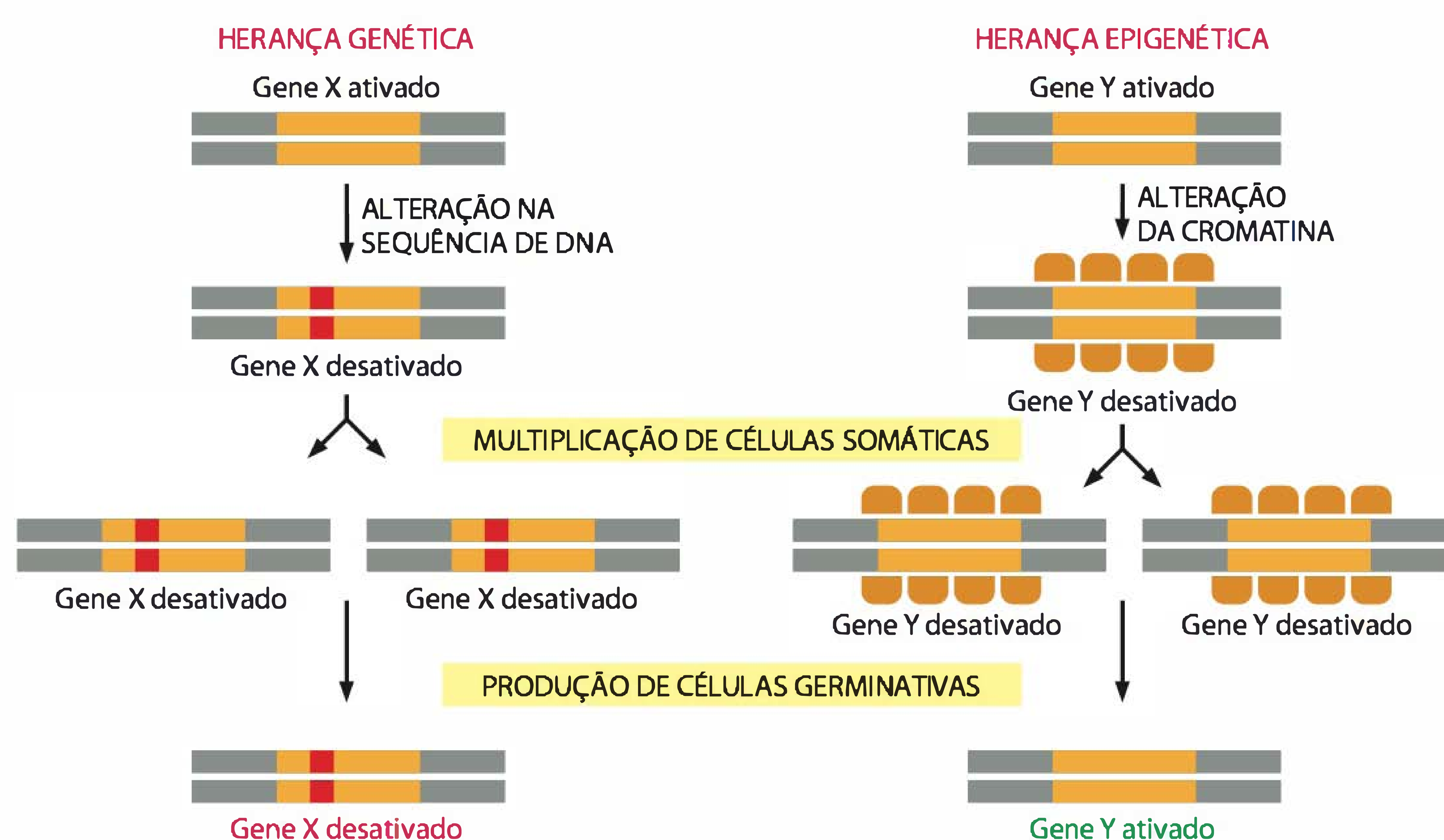


Figura 4-35 Uma comparação de herança genética com herança epigenética com base na estrutura da cromatina. A herança genética baseia-se na herança direta de sequências nucleotídicas de DNA durante a replicação de DNA. Alterações na sequência de DNA são transmitidas fielmente não apenas de uma célula somática a todas as suas descendentes, mas também às células germinativas de uma geração à outra. O campo da genética, revisado no Capítulo 8, tem como base a herança dessas alterações em diferentes gerações. O tipo de herança epigenética mostrado aqui tem como base outras moléculas ligadas ao DNA, sendo, portanto, menos permanente do que uma alteração na sequência de DNA; especificamente, a informação epigenética normalmente (mas não sempre) é apagada durante a formação dos óvulos e espermatozoides.

Somente um mecanismo epigenético, baseado em uma herança de estruturas de cromatina, é discutido neste capítulo. Outros mecanismos epigenéticos são apresentados no Capítulo 7, o qual foca no controle da expressão gênica (ver Figura 7-86).

Alguns mistérios iniciais sobre a estrutura da cromatina

Há trinta anos, as histonas eram vistam como proteínas relativamente desinteressantes. Os nucleossomos cobriam todo o DNA nos cromossomos, e pareciam existir para permitir que as enormes quantidades de DNA nas diversas células eucarióticas pudessem ser compactadas nos cromossomos. Extrapolando-se o que já era conhecido em bactérias, vários cientistas acreditavam que a regulação gênica nos eucariotos simplesmente deixaria os nucleossomos de lado, sem envolvimento algum no processo.

Porém, havia razões para desafiar essa ideia. Assim, por exemplo, foi determinado que a cromatina de mamíferos consiste de uma massa aproximadamente igual de proteínas histonas e não-histonas. Isso significa que, *em média*, cada 200 pares de nucleotídeos em nossas células estão associados a mais de 1.000 aminoácidos de proteínas não-histonas (isto é, a massa de proteína equivalente ao total da massa do octâmero de histonas somado à histona H1). Sabe-se hoje que muitas dessas proteínas ligam-se aos nucleossomos, e sua abundância sugere que as histonas sejam mais do que simplesmente proteínas de empacotamento.

Uma segunda razão que desafia a ideia de que as histonas não participariam da regulação gênica foi baseada na taxa marcadamente lenta de alteração evolutiva nas sequências das quatro histonas. O fato já mencionado de que existem apenas dois aminoácidos diferentes na sequência da histona H4 de mamíferos e ervilhas implica que uma alteração em qualquer um dos 102 aminoácidos de H4 pode ser prejudicial a esses organismos. Que tipo de processo faria a existência de um organismo ser tão sensível à estrutura exata do cerne do nucleossomo em que ocorreram apenas duas alterações em mais de 500 milhões de anos de variações aleatórias seguidas de seleção natural?

Finalmente, uma combinação de genética e citologia revelou que uma forma particular de cromatina silencia os genes compactados a despeito de sua sequência nucleotídica – e o faz de modo que seja diretamente herdada por ambas as células-filhas na divisão celular. Este é o tema descrito a seguir.

A heterocromatina é altamente organizada e atipicamente resistente à expressão gênica

Estudos de microscopia ótica, na década de 1930, mostraram dois tipos diferentes de cromatina do núcleo em interfase de várias células de eucariotos superiores: uma forma altamente condensada, chamada de **heterocromatina**, e todo o resto, uma forma menos condensada, chamada de **eucromatina**. A heterocromatina representa uma forma compacta especial (ver Figura 4-9), e ainda há muito a entender sobre importantes aspectos de suas propriedades moleculares. Embora esteja presente em vários locais ao longo dos cromossomos, a heterocromatina é especialmente concentrada em regiões específicas, particularmente nos centrômeros e telômeros introduzidos anteriormente (ver Figura 4-21). Em uma célula mamífera típica, mais de dez por cento do genoma estão empacotados nesta forma.

O DNA na heterocromatina contém poucos genes, e os genes compactados nesta região são desligados por esse tipo de compactação. Entretanto, o termo *heterocromatina* abriga diversos tipos diferentes de estruturas de cromatina que têm como característica comum um alto grau de compactação. Assim, a heterocromatina não deve ser vista como uma forma de confinar DNA "morto", mas sim como geradora de tipos diferentes de compactação com características distintas, que, para a grande maioria dos genes, a torna altamente resistente à expressão gênica.

Quando um gene que é normalmente expresso na eucromatina é reposicionado experimentalmente em uma região de heterocromatina, sua expressão é suspensa, e dizemos que o gene foi *silenciado*. Essas diferenças na expressão gênica são **efeitos posicionais**, nos quais a atividade do gene depende da sua posição relativa à proximidade de uma região de heterocromatina no cromossomo. Os efeitos posicionais, primeiramente reconhecidos em *Drosophila*, foram observados em vários eucariotos, incluindo leveduras, plantas e humanos.

Os efeitos posicionais associados à heterocromatina exibem uma característica denominada *efeito posicional variegado*, que forneceu pistas retrospectivas essenciais sobre a função da cromatina. Em *Drosophila*, os eventos de quebra cromossômica que ligam diretamente uma região de heterocromatina a uma região de eucromatina tendem a inativar genes eucarióticos localizados nas proximidades. A zona de inativação varia, em distância,

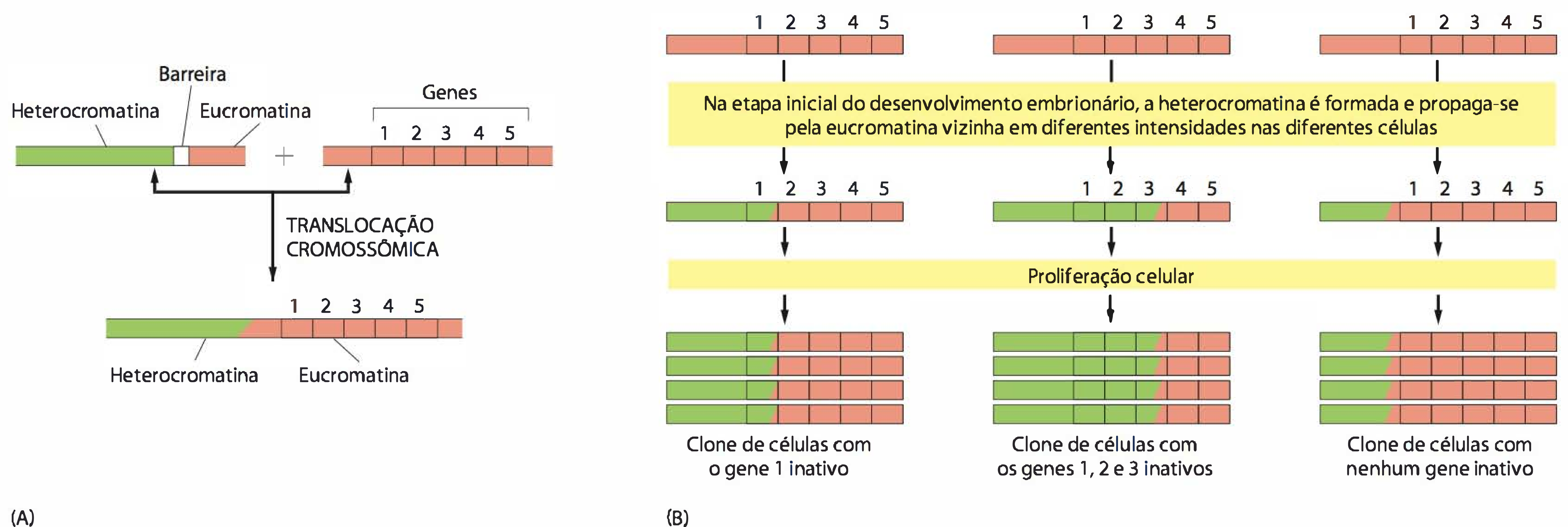


Figura 4-36 **A causa do efeito posicional variegado na *Drosophila*.** (A) A heterocromatina (*verde*) normalmente é impedida de se espalhar por regiões adjacentes da eucromatina (*vermelho*) por sequências de *barreira* de DNA, que discutiremos adiante. Nas moscas que herdam certos rearranjos cromossômicos, essa barreira não está mais presente. (B) Durante o início do desenvolvimento de tais moscas, a heterocromatina pode se espalhar no DNA cromossômico vizinho, avançando por distâncias variadas em células diferentes. A propagação logo para, mas o padrão de heterocromatina estabelecido é herdado, de modo que são produzidos grandes clones de células da progênie, possuindo os mesmos genes vizinhos condensados em heterocromatina e, portanto, inativados (por isso a aparência variegada de algumas dessas moscas; ver Figura 4-37). Embora o termo "propagação" seja usado para descrever a formação de nova heterocromatina próxima à heterocromatina preexistente, o termo pode não ser tão adequado. Há evidências de que, durante a expansão, a heterocromatina pode "pular" algumas regiões de cromatina, evitando efeitos repressores nos genes ali localizados.

em diferentes células de embrião precoce de moscas, mas uma vez que a condição de heterocromatina é estabelecida para um gene, ela tende a ser herdada de modo estável por toda a progênie da célula (**Figura 4-36**). Esse fenômeno impressionante foi primeiramente reconhecido em uma detalhada análise genética da aparência variegada do pigmento vermelho do olho da mosca (**Figura 4-37**), e compartilha várias características com a extensa distribuição da heterocromatina que inativa um dos dois cromossomos X em fêmeas de mamíferos (ver p. 473).

Estudos genéticos extensos foram realizados em *Drosophila* e em fungos, na busca por produtos gênicos que aumentassem ou diminuíssem a distribuição da heterocromatina e sua herança estável – isto é, genes que, quando mutados, atuam tanto como *promotores* quanto como *supressores* de efeito posicional variegado. Dessa forma, mais de 50 genes foram identificados e possuem funções críticas nesse processo. Recentemente, a caracterização detalhada das proteínas produzidas por esses genes revelou que muitas proteínas cromossômicas não-histonas participam desse mecanismo de controle gênico eucariótico, um que requer sequências precisas de aminoácidos das histonas do cerne. Esse mecanismo de controle gênico, portanto, ajuda a explicar as lentas alterações nas histonas ao longo do tempo.

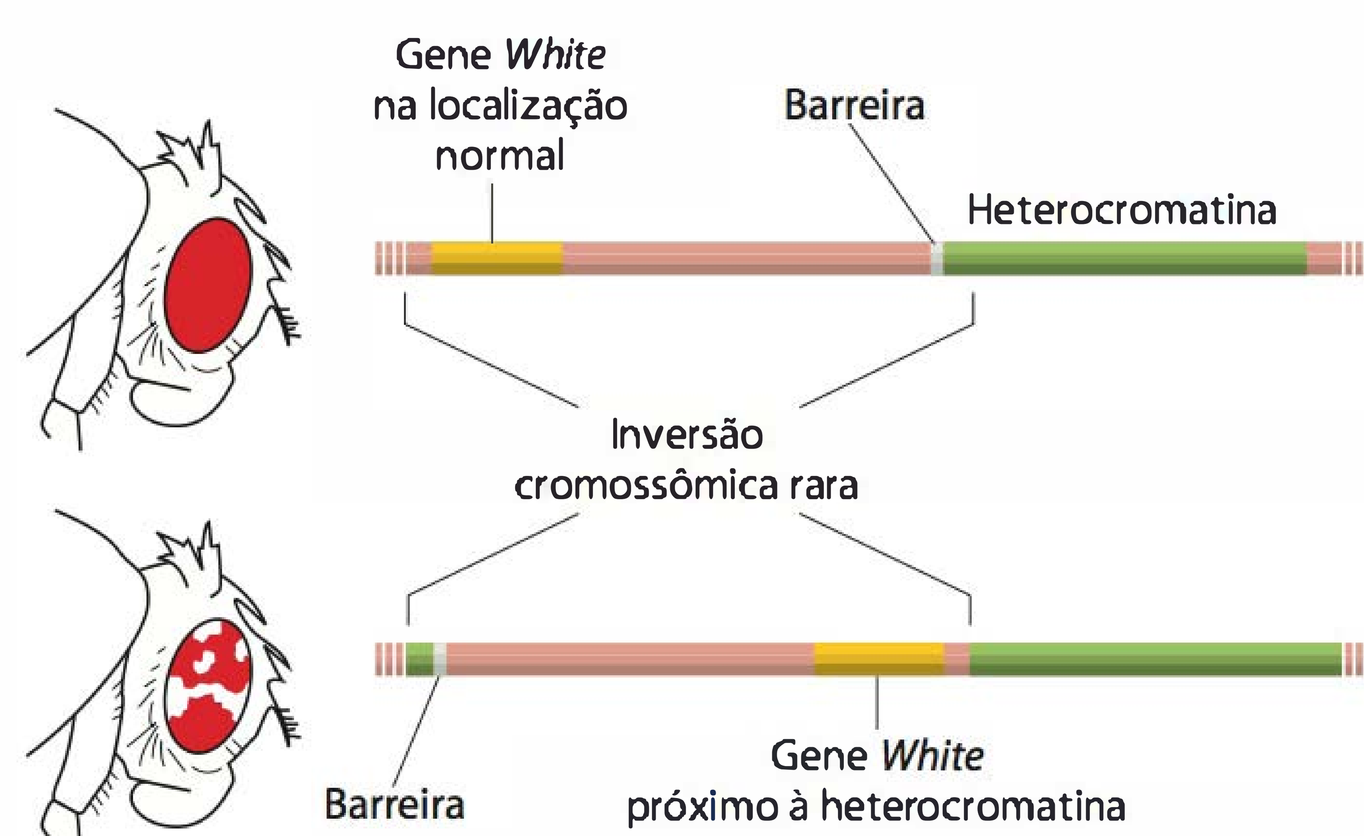
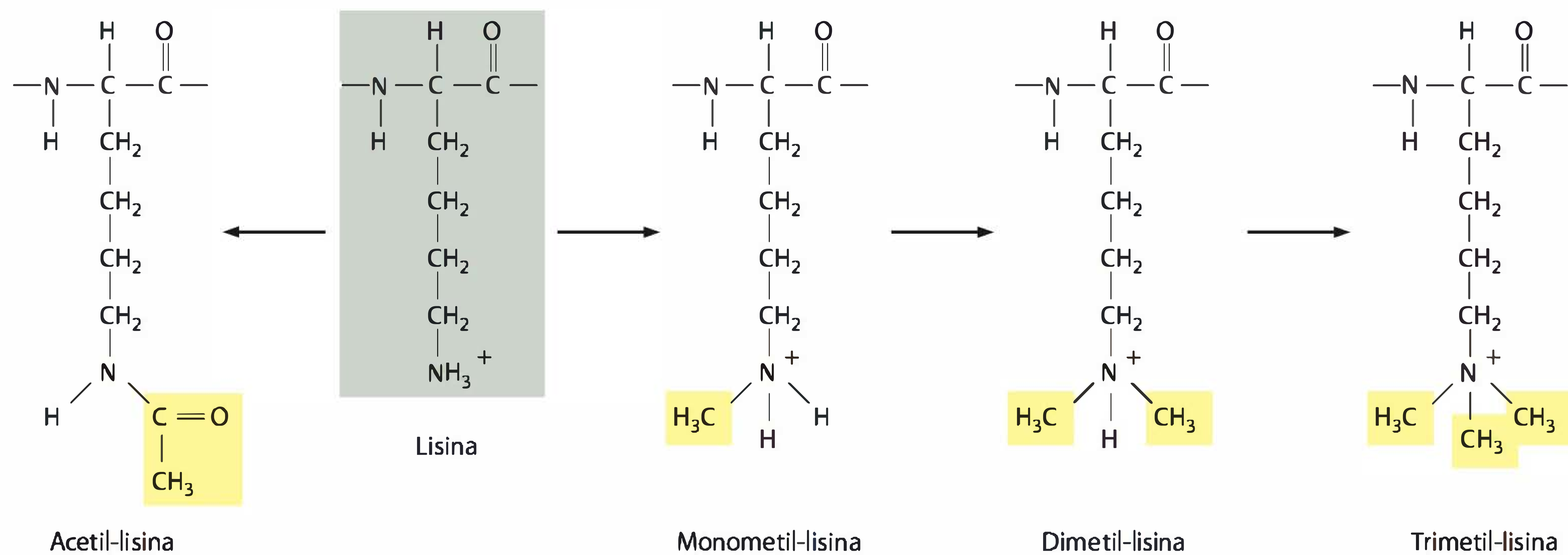


Figura 4-37 **Descoberta dos efeitos de posição na expressão gênica.** O gene *White* da mosca *Drosophila* controla a produção de pigmentos do olho, recebendo essa denominação devido à mutação que permitiu sua identificação. Moscas com o tipo selvagem do gene, isto é, com um gene *White* normal (*White*$^+$), possuem pigmentação normal nos olhos, que confere olhos *vermelhos*, mas se o gene *White* estiver mutado e inativado, as moscas mutantes (*White*$^-$) não produzem pigmentos e possuem olhos *brancos*. Nas moscas nas quais um gene *White*$^+$ normal foi colocado próximo a uma região de heterocromatina, foram produzidos olhos manchados, com partes *vermelhas* e *brancas*. As partes *brancas* representam as linhagens celulares em que o gene *White*$^+$ foi silenciado pelos efeitos da heterocromatina. Em contraste, as manchas vermelhas representam as linhagens celulares onde o gene *White*$^+$ é expresso. Em estágios iniciais do desenvolvimento, quando a heterocromatina é formada pela primeira vez, ela se propaga pela eucromatina adjacente em distâncias diferentes nas diferentes células embrionárias (ver Figura 4-36). A presença de manchas de células *vermelhas* e *brancas* revela que o estado de ativação transcricional, determinado pela compactação do gene na cromatina naquelas células ancestrais, é herdado por todas as células-filhas.



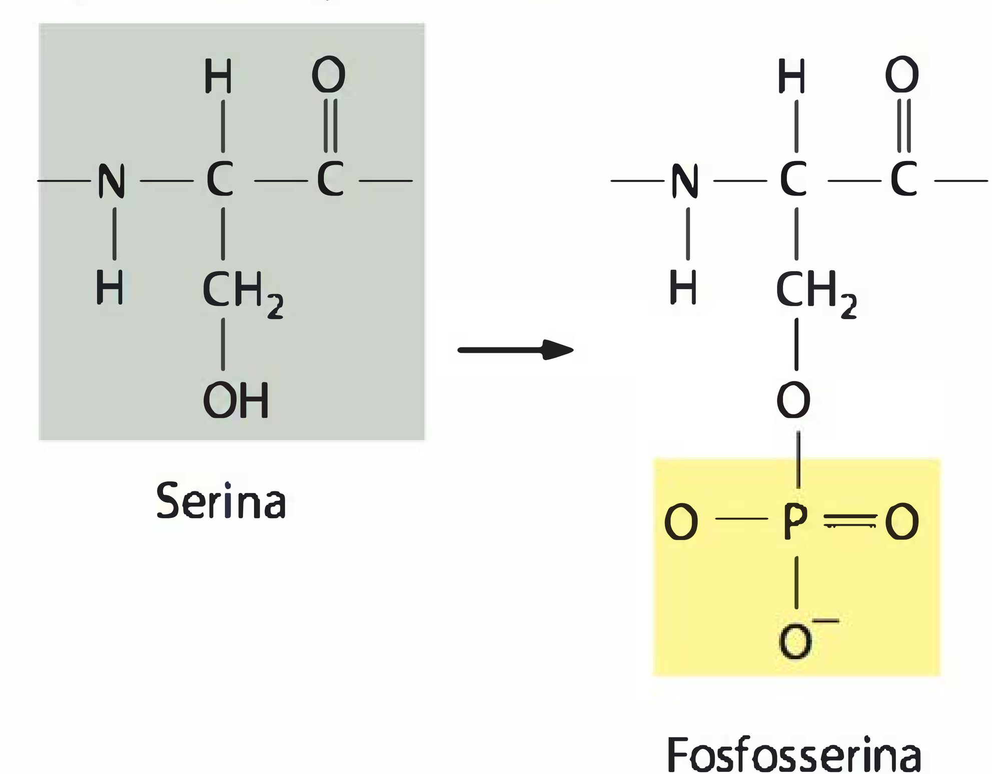


Figura 4-38 Alguns tipos de ligações covalentes importantes nas modificações das cadeias laterais de aminoácidos encontradas nas histonas de nucleossomos. (A) Três níveis diferentes de metilação de lisina são mostrados, cada um reconhecido por uma proteína de ligação diferente e, portanto, um significado diferente para a célula. Observe que a acetilação remove a carga positiva da lisina, e que, muito importante, uma lisina acetilada não pode ser metilada, e *vice-versa*. (B) A fosforilação da serina adiciona uma carga negativa a uma histona. Modificações não mostradas aqui incluem a mono e a dimetilação da arginina, a fosforilação da treonina, a adição de uma ADP-ribose a um ácido glutâmico e a adição de um grupo ubuquitil, sumoil ou biotil a uma lisina.

As histonas do cerne são modificadas covalentemente em vários sítios diferentes

As cadeias laterais dos aminoácidos das quatro histonas no cerne do nucleossomo estão sujeitas a uma grande variedade de modificações covalentes, incluindo a acetilação de lisinas, a mono, di e trimetilação de lisinas e a fosforilação de serinas (**Figura 4-38**). Um grande número de modificações de cadeias laterais ocorre nas "caudas" N-terminais de histonas, relativamente sem estrutura, que se projetam para fora do nucleossomo (**Figura 4-39**). Entretanto, modificações específicas também ocorrem em cadeias laterais do cerne globular do nucleossomo (**Figura 4-40**).

Todos os tipos de modificações mencionadas são reversíveis. A modificação de uma cadeia lateral de um aminoácido específico em um nucleossomo é produzida por uma enzima específica, e cada uma dessas enzimas atuam apenas em um ou poucos sítios. Uma enzima diferente é responsável pela remoção de cada modificação na cadeia lateral. Portanto, por exemplo, os grupos acetil adicionados a lisinas específicas por um conjunto de diferentes acetil-transferases de histonas (HATs, *histone acetyltransferases*) são removidos por um conjunto de complexos de desacetilases de histonas (HDACs, *histone deacetylase complexes*). Da mesma forma, os grupos metil adicionados às cadeias laterais de lisinas por um grupo de diferentes metil-transferases de histonas são removidos por um conjunto de demetilases de histonas. Cada enzima é recrutada a sítios específicos na cromatina em períodos determinados durante a vida da célula. Para a maior parte, o recrutamento inicial dessas enzimas depende de *proteínas de regulação gênica* que se ligam a sequências específicas de DNA nos cromossomos e são produzidas em diferentes períodos na vida do organismo, como descrito no Capítulo 7. Mas, pelo menos em alguns casos, as modificações covalentes dos nucleossomos persistem por muito tempo, muito após o desaparecimento das proteínas reguladoras que causaram sua indução, e, assim, carregam uma memória da história do desenvolvimento celular. Diversos padrões de modificações covalentes são, portanto, encontrados em grupos diferentes de nucleossomos, de acordo com a sua posição exata no cromossomo e do *status* da célula.

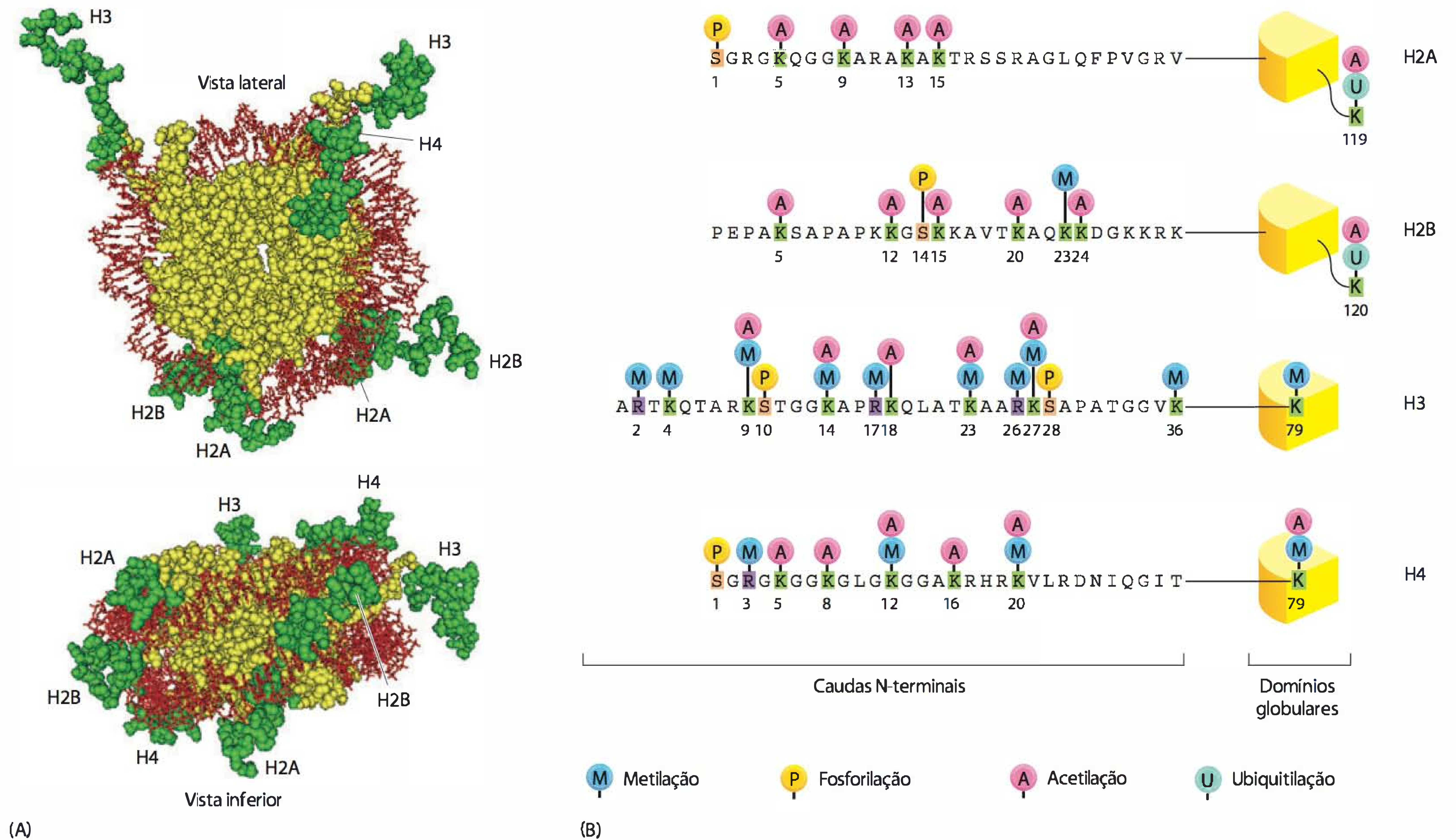


Figura 4-39 **Modificações covalentes nas caudas das histonas do cerne.** (A) Estrutura do nucleossomo ressaltando a localização dos primeiros 30 aminoácidos em cada uma das oito caudas N-terminais das histonas (*verde*). (B) As modificações mais bem-conhecidas das quatro histonas do cerne estão indicadas. Embora apenas um único símbolo seja utilizado para a metilação (*M*), cada lisina (*K*) ou arginina (*R*) pode ser metilada de várias maneiras. Note que algumas posições (p. ex., lisina 9 de H3) podem ser modificadas tanto pela metilação como pela acetilação, mas não por ambas. A maioria das modificações mostradas adiciona uma molécula relativamente pequena nas caudas das histonas, exceto a ubiquitina, uma proteína com 76 aminoácidos também usada em outros processos celulares (ver Figura 6-92). (Adaptada de H. Santos-Rosa e C. Caldas, *Eur. J. Cancer* 41:2381-2402, 2005. Com permissão de Elsevier.)

As modificações das histonas são cuidadosamente controladas e apresentam consequências importantes. A acetilação de lisinas nas caudas N-terminais tende a afrouxar a estrutura da cromatina, em parte porque a adição de um grupo acetil à lisina remove sua

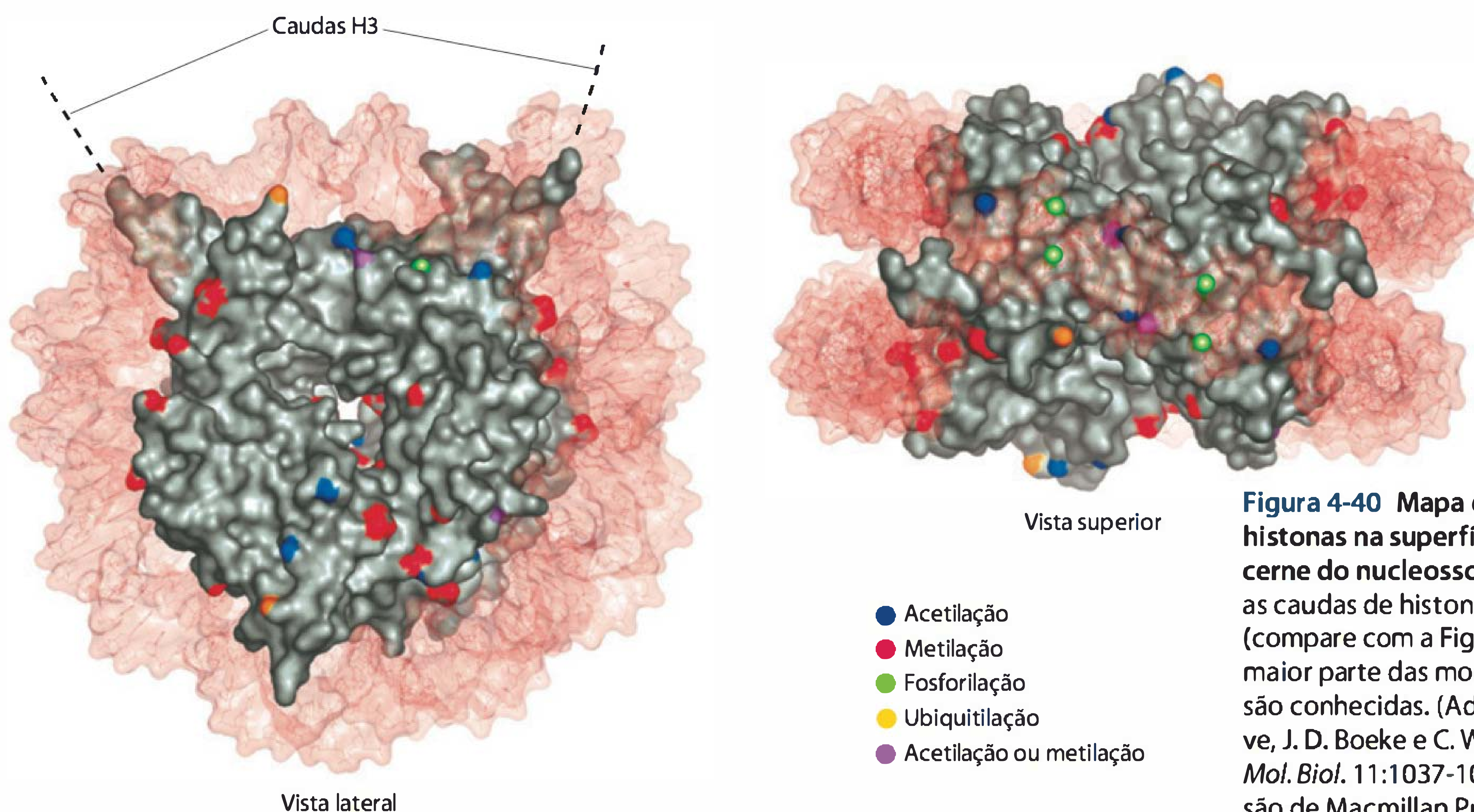


Figura 4-40 **Mapa das modificações de histonas na superfície da partícula do cerne do nucleossomo.** Como observado, as caudas de histonas foram omitidas aqui (compare com a Figura 4-39). As funções da maior parte das modificações do cerne não são conhecidas. (Adaptada de M. S. Cosgrove, J. D. Boeke e C. Wolberger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1037-1043, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

carga positiva, reduzindo a afinidade das caudas aos nucleossomos adjacentes (ver Figura 4-33). Porém, o efeito mais profundo das modificações das histonas é sua capacidade de atrair proteínas específicas para um segmento de cromatina que foi modificado. Essas novas proteínas determinam como e quando os genes serão expressos, além de outras funções biológicas. Dessa forma, a estrutura precisa de um domínio de cromatina determina a expressão dos genes nela empacotados, e, por sua vez, a estrutura e a função de uma célula eucariótica.

A cromatina adquire uma variedade adicional pela inserção sítio-específica de um conjunto de variantes de histonas

Apesar da forte conservação das sequências de aminoácidos das quatro histonas do cerne, durante milhões de anos, os eucariotos contêm algumas poucas histonas variantes que participam dos nucleossomos. Essas histonas estão presentes em quantidades muito pequenas comparadas às histonas principais e foram bem menos conservadas durante a evolução. Exceto pela histona H4, todas as outras apresentam variantes; alguns exemplos são apresentados na **Figura 4-41**.

As histonas principais são sintetizadas especialmente durante a fase S do ciclo celular (ver Figura 17-4) e montadas nos nucleossomos das duplas-hélices de DNA das células-filhas logo atrás da forquilha de replicação (ver Figura 5-38). Em contraste, a maior parte das variantes de histonas é sintetizada durante a interfase. Elas normalmente são inseridas na cromatina quase formada, que requer um processo de alteração de histonas catalisado pelos complexos de remodelamento dependentes de ATP, discutidos anteriormente. Esses complexos de remodelamento contêm subunidades que promovem sua ligação a sítios específicos na cromatina e também a chaperonas de histonas que carregam uma determinada variante. Assim, cada variante de histona é inserida na cromatina de forma altamente seletiva (ver Figura 4-30).

As modificações covalentes e as variantes de histonas atuam em conjunto para produzir um "código de histonas" que auxilia a determinar a função biológica

O número de marcações diferentes possíveis em um nucleossomo individual é enorme. Mesmo reconhecendo-se que algumas modificações covalentes são mutuamente exclusivas (p. ex., não é possível uma lisina ser acetilada e metilada ao mesmo tempo), e que essas modificações são produzidas em conjunto, está claro que milhares de combinações podem ser obtidas. Além disso, existe uma diversidade adicional criada pelos nucleossomos que contêm variantes de histonas.

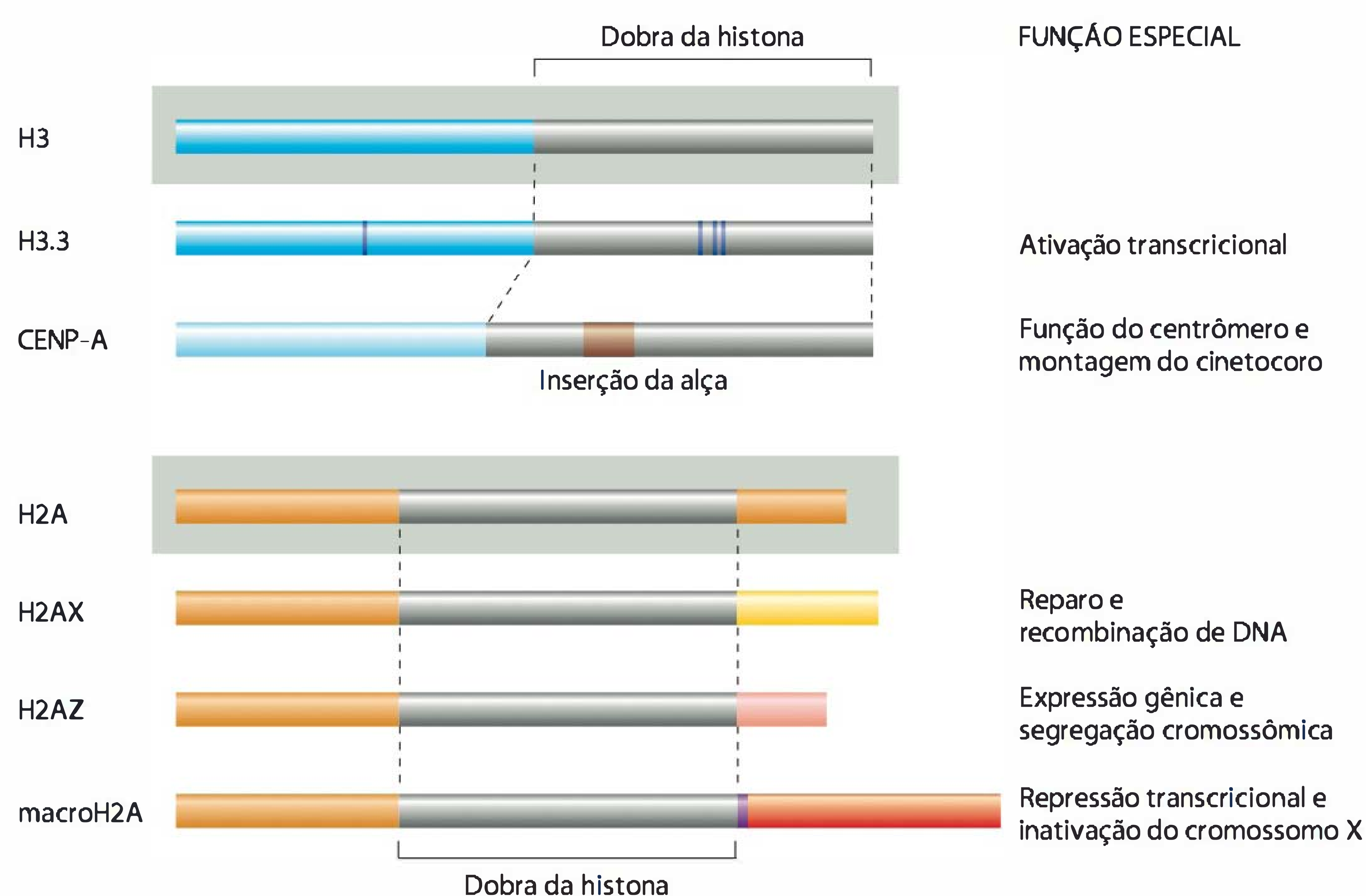


Figura 4-41 Estrutura de algumas formas variantes de histonas em comparação às histonas principais que elas substituem. Essas histonas são inseridas nos nucleossomos em sítios cromossômicos específicos por enzimas de remodelamento da cromatina dependentes de ATP, que atuam juntamente às chaperonas de histonas (ver Figura 4-30). A variante CENP-A da histona H3 é discutida mais adiante neste capítulo (ver Figuras 4-48 a 4-51); outras variantes são discutidas no Capítulo 7. As sequências coloridas em diferentes cores em cada variante representam as porções diferentes nas histonas principais correspondentes. (Adaptada de K. Sarma e D. Reinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:139-149, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

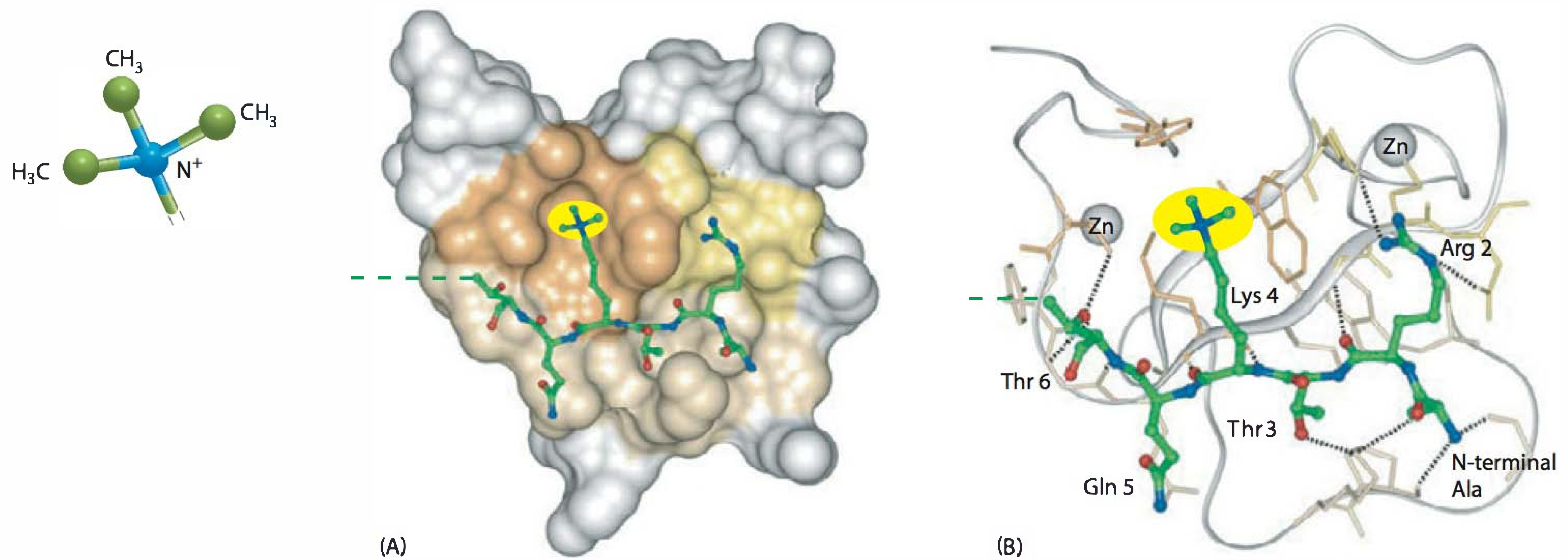


Figura 4-42 Como cada marca no nucleossomo é lida. A estrutura de um módulo da proteína que reconhece especificamente a histona H3 trimetilada na lisina 4 está ilustrada. (A) Modelo de preenchimento de um domínio ING PHD ligado à cauda de histona (*verde*, com o grupo trimetil salientado em *amarelo*). (B) Modelo de fitas mostrando como os 6 aminoácidos N-terminais da cauda de H3 são reconhecidos. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio. Este é um dos muitos domínios PHD que reconhecem lisinas metiladas nas histonas; domínios diferentes ligam-se fortemente a lisinas em diferentes posições e podem diferenciar entre uma lisina mono, di ou trimetilada. Da mesma forma, outros pequenos módulos proteicos reconhecem cadeias laterais específicas que foram marcadas com grupos acetil, fosfato e assim por diante. (Adaptada de P. V. Pena et al., *Nature* 442:100-103, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Muitas das combinações parecem ter um significado específico para a célula, pois determinam como e quando o DNA empacotado nos nucleossomos será acessado, levando à hipótese do **código de histonas**. Por exemplo, um tipo de marca indica que um segmento da cromatina foi replicado recentemente, outro indica que o DNA na cromatina foi danificado e necessita ser reparado, enquanto outros sinalizam quando e como a expressão gênica deve ocorrer. Pequenos módulos de proteínas ligam-se a marcas específicas, reconhecendo, por exemplo, uma lisina 4 tetrametilada na histona H3 (**Figura 4-42**). Esses módulos parecem atuar em conjunto com outros módulos como parte do *complexo de leitura do código* para permitir que determinadas combinações de marcações na cromatina atraiam complexos proteicos adicionais que realizam uma função biológica apropriada e no momento certo (**Figura 4-43**).

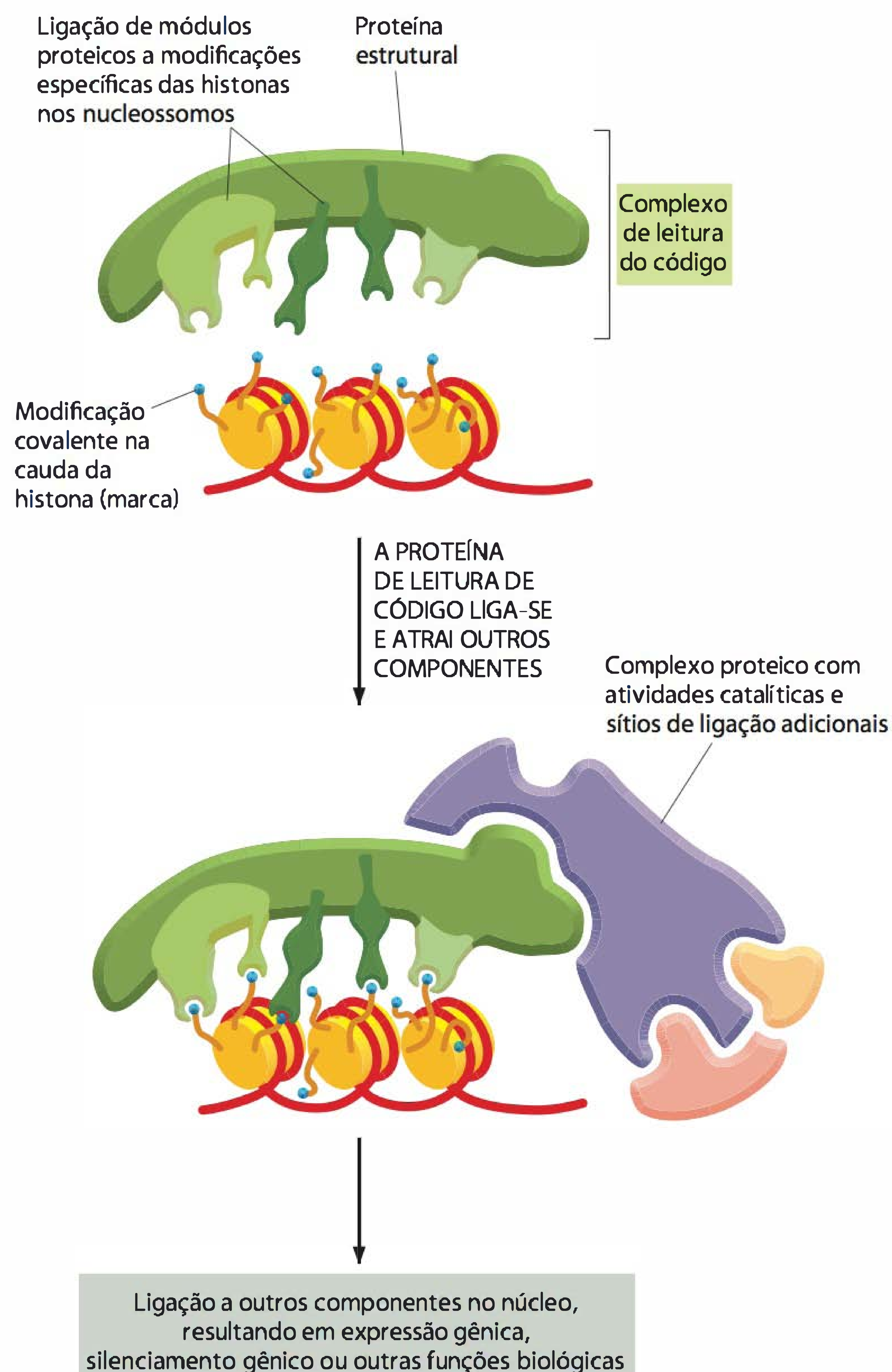


Figura 4-43 Diagrama esquemático mostrando como o código de histonas pode ser lido pelo complexo de leitura do código. Um grande complexo proteico, com vários módulos pequenos, cada um reconhecendo uma marca específica nas histonas, está ilustrado esquematicamente (em *verde*). Esse "complexo de leitura do código" só irá se ligar fortemente a uma região da cromatina que contenha várias marcas nas histonas que são reconhecidas pelo complexo. Portanto, apenas uma combinação específica de marcas provocará a ligação do complexo à cromatina e atrairá complexos proteicos adicionais (em *roxo*) que catalisam funções biológicas.

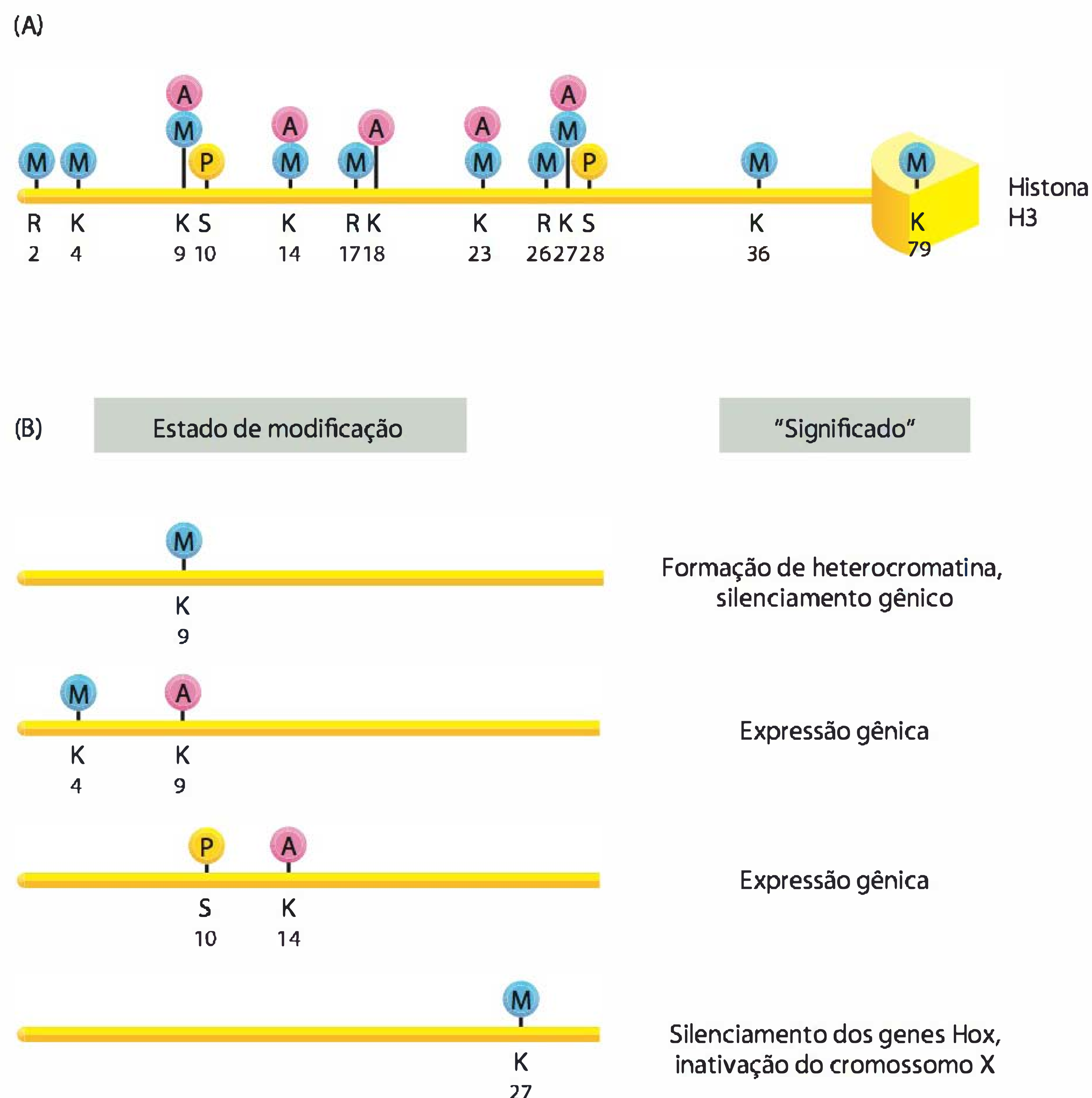


Figura 4-44 Alguns significados específicos do código de histonas. (A) A figura mostra as modificações na cauda N-terminal da histona H3, repetidas da Figura 4-39. (B) A cauda de H3 pode ser marcada com várias combinações de modificações diferentes que resultam em um significado específico na região de cromatina em que a combinação ocorre. Apenas uns poucos significados são conhecidos, incluindo os quatro exemplos apresentados. Para focar apenas um exemplo, a trimetilação da lisina 9 atrai a proteína HP1 específica da heterocromatina, que induz uma onda de propagação de trimetilações adicionais da lisina 9, seguidas por mais ligações de HP1, de acordo com o diagrama geral ilustrado adiante (ver Figura 4-46). Não está mostrado o fato de que, como apresentado (ver Figura 4-43), a leitura do código geralmente envolve o reconhecimento conjunto de marcas em outros sítios do nucleossomo junto com ao reconhecimento indicado da cauda de H3. Além disso, níveis específicos de metilação (grupos mono, di ou trimetil) são necessários, como na Figura 4-42.

As marcas nos nucleossomos resultantes das adições covalentes às histonas são dinâmicas, sendo constantemente removidas e adicionadas a velocidades que dependem da localização cromossômica. Como as caudas das histonas projetam-se para fora do cerne nucleossômico e provavelmente estejam acessíveis mesmo quando a cromatina está condensada, elas parecem propiciar um formato adequado para criar marcações que podem ser prontamente alteradas de acordo com a mudança das necessidades da célula. Embora ainda haja muito a se aprender sobre o significado das várias combinações do código de histonas, alguns exemplos bem estudados sobre as informações codificadas pela cauda da histona H3 estão listados na **Figura 4-44**.

Um complexo de proteínas de leitura e escrita de código pode propagar modificações específicas na cromatina a longas distâncias em um cromossomo

O fenômeno de efeito posicional variegado descrito anteriormente requer que pelo menos algumas formas modificadas da cromatina tenham a capacidade de disseminar-se por distâncias substanciais ao longo da molécula de DNA cromossômico (ver Figura 4-36). Como isso é possível?

As enzimas que modificam as histonas nos nucleossomos (ou removem suas modificações) são partes de complexos de multissubunidades. Eles podem, inicialmente, ser trazidos a uma determinada região da cromatina por uma das proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas (proteínas de regulação gênica) discutidas nos Capítulos 6 e 7 (para um exemplo específico, ver Figura 7-87). Mas após uma enzima de modificação "escrever" sua marca em um ou em alguns nucleossomos adjacentes, seguem-se eventos que se assemelham a uma reação em cadeia. Nesse caso, a enzima que "escreve o código" trabalha juntamente com uma proteína de leitura de código localizada no mesmo complexo proteico. Essa segunda proteína contém um módulo de leitura que reconhece a marca e liga-se fortemente ao nucleossomo recém-modificado (ver Figura 4-42), posicionando a enzima de escrita próximo ao nucleossomo adjacente. Por meio de vários ciclos de escrita e leitura, a proteína de leitura pode carregar a enzima de leitura ao longo do DNA – distribuindo a marca de "mão-em-mão" pelo cromossomo (**Figura 4-45**).

Na realidade, o processo é mais complicado que o esquema descrito. Tanto as proteínas de leitura como de escrita são parte de um complexo proteico que provavelmente contenha

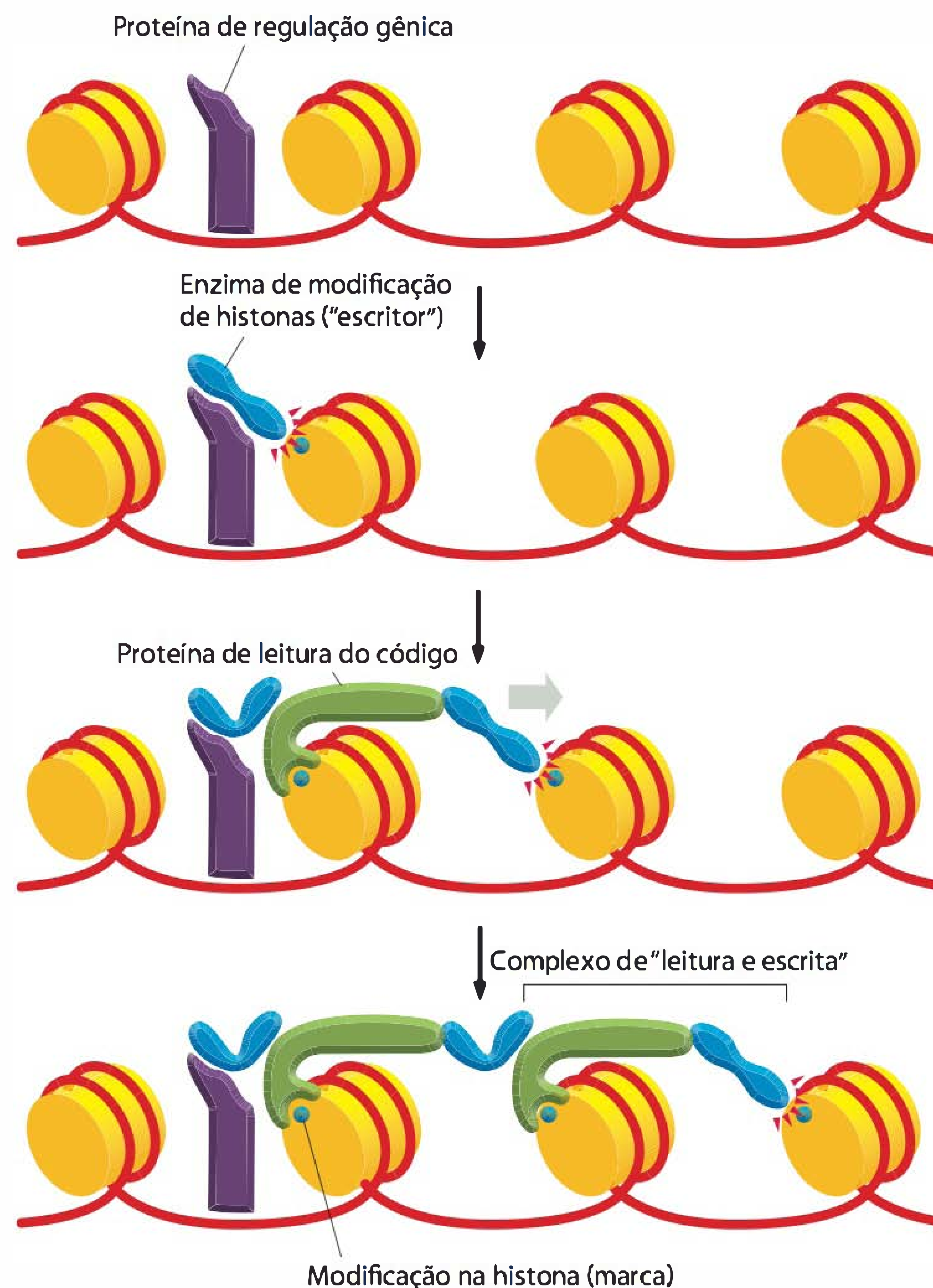


Figura 4-45 Como o recrutamento de um complexo de leitura e escrita pode espalhar alterações da cromatina ao longo do cromossomo. O código de escrita é uma enzima que produz uma modificação específica em uma ou mais das quatro histonas do nucleossomo. Após seu recrutamento a um sítio específico em um cromossomo por proteínas de regulação gênica, a proteína de escrita colabora com a proteína de leitura para propagar a marca de nucleossomo em nucleossomo através do complexo de leitura e escrita. Para que o mecanismo funcione, a proteína de leitura deve reconhecer a mesma modificação que a proteína de escrita produz nas histonas (ver também Figura 4-43).

diversas proteínas de leitura e escrita, e necessitam de diversas marcas nos nucleossomos para sua propagação. Além disso, muitos desses complexos de leitura e escrita também contêm uma proteína de remodelamento da cromatina dependente de ATP, e todos atuam em conjunto para condensar ou descondensar longos segmentos de cromatina à medida que a proteína de leitura se desloca progressivamente ao longo do DNA empacotado no nucleossomo (**Figura 4-46**).

Uma ideia da complexidade do processo descrito pode ser derivada dos resultados de triagem genética para genes mutantes que aumentam ou suprimem a propagação e a estabilidade da heterocromatina em testes de efeito posicional variegado em *Drosophila* (ver Figura 4-37). Como mencionado anteriormente, mais de 50 genes são conhecidos, e a maioria deles parece atuar como subunidades em um ou mais complexos de proteínas de remodelamento-escrita-leitura.

Sequências de DNA de "barreira" bloqueiam a propagação dos complexos de escrita e leitura e, portanto, separam domínios de cromatina vizinhos

O mecanismo mencionado para a propagação da estrutura da cromatina levanta um problema. Mesmo que cada cromossomo seja formado por uma molécula contínua e extremamente longa de DNA, o que evita a cacofonia de conversas cruzadas entre domínios de cromatina adjacentes com diferentes estruturas e funções? Estudos iniciais de efeito posicional variegado sugeriram a resposta: a existência de sequências de DNA específicas que separam um domínio de cromatina de outro (ver Figura 4-37). Várias dessas sequências de *barreira* foram identificadas e caracterizadas por técnicas de engenharia genética que permitem a remoção ou a adição de regiões específicas de sequências de DNA nos cromossomos.

Por exemplo, uma sequência chamada de HS4 normalmente separa o domínio de cromatina ativa que contém o lócus da β-globina de uma região de cromatina condensada silenciada adjacente nos eritrócitos (ver Figura 7-61). Se essa sequência for removida, o lócus da β-globina é invadido pela cromatina condensada. Essa cromatina silencia os genes nela contidos, e se propaga em diferentes extensões nas diferentes células, provocando um pa-

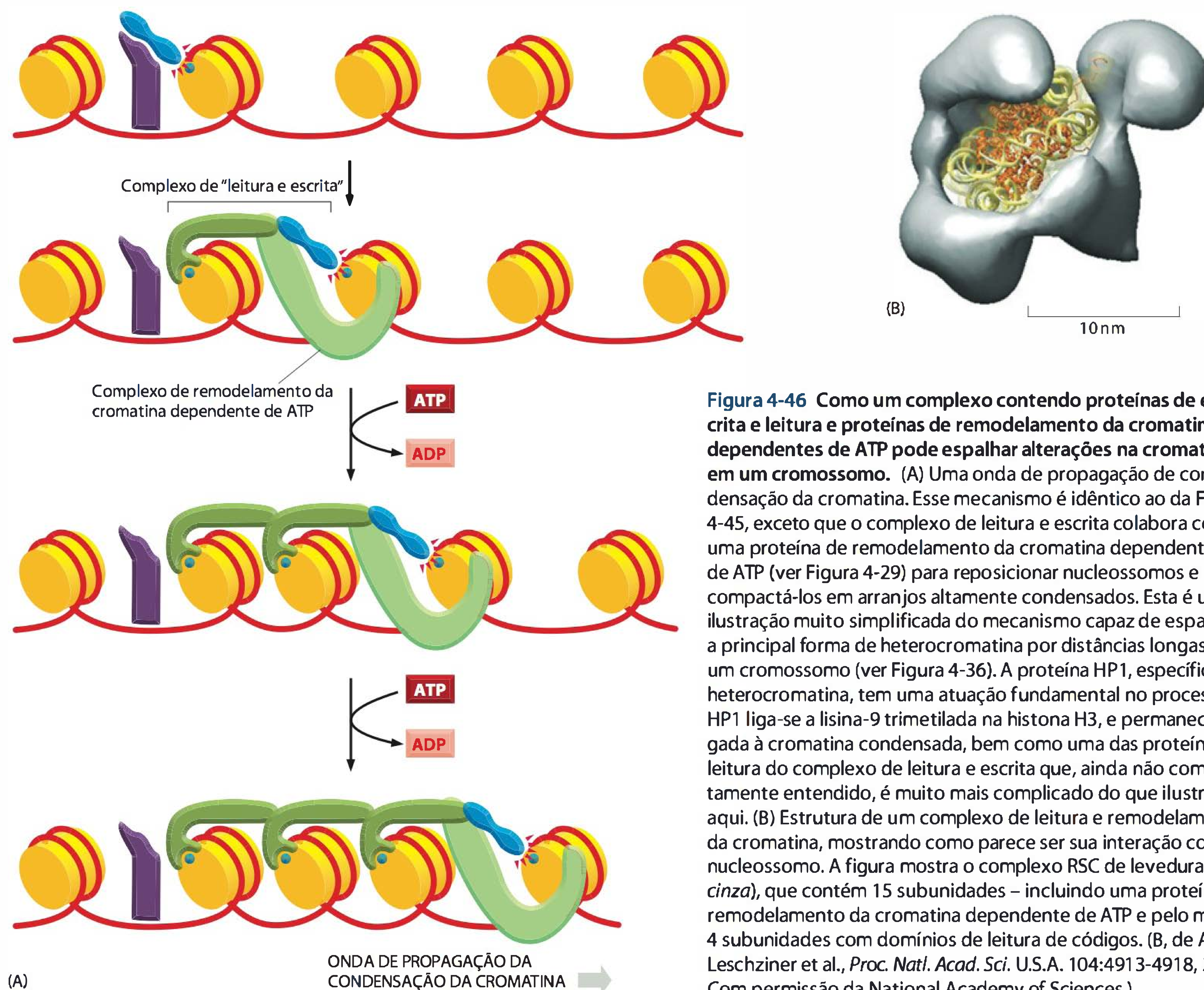


Figura 4-46 Como um complexo contendo proteínas de escrita e leitura e proteínas de remodelamento da cromatina dependentes de ATP pode espalhar alterações na cromatina em um cromossomo. (A) Uma onda de propagação de condensação da cromatina. Esse mecanismo é idêntico ao da Figura 4-45, exceto que o complexo de leitura e escrita colabora com uma proteína de remodelamento da cromatina dependente de ATP (ver Figura 4-29) para reposicionar nucleossomos e compactá-los em arranjos altamente condensados. Esta é uma ilustração muito simplificada do mecanismo capaz de espalhar a principal forma de heterocromatina por distâncias longas em um cromossomo (ver Figura 4-36). A proteína HP1, específica da heterocromatina, tem uma atuação fundamental no processo. HP1 liga-se a lisina-9 trimetilada na histona H3, e permanece ligada à cromatina condensada, bem como uma das proteínas de leitura do complexo de leitura e escrita que, ainda não completamente entendido, é muito mais complicado do que ilustrado aqui. (B) Estrutura de um complexo de leitura e remodelamento da cromatina, mostrando como parece ser sua interação com o nucleossomo. A figura mostra o complexo RSC de leveduras (em *cinza*), que contém 15 subunidades – incluindo uma proteína de remodelamento da cromatina dependente de ATP e pelo menos 4 subunidades com domínios de leitura de códigos. (B, de A. E. Leschziner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 104:4913-4918, 2007. Com permissão da National Academy of Sciences.)

drão de efeito posicional variegado semelhante ao observado em *Drosophila*. Como descrito no Capítulo 7, essa invasão tem sérias consequências: os genes da globina são pouco expressos, e indivíduos que possuem essa deleção apresentam uma forma grave de anemia.

Experimentalmente, a sequência de HS4 geralmente é adicionada às duas extremidades de um gene inserido no genoma de mamíferos, para proteger o gene do silenciamento provocado pela propagação da heterocromatina. A análise da sequência de barreira revela que ela contém uma série de sítios de ligação para as enzimas acetilases de histonas. Como a acetilação da cadeia lateral da lisina é incompatível com a metilação da mesma cadeia lateral, as acetilases e as desacetilases de histonas são candidatas lógicas para a formação de barreiras no DNA que bloqueiam a disseminação das diferentes formas de cromatina (**Figura 4-47**). Contudo, vários outros tipos de modificações da cromatina são conhecidos e também protegem genes do silenciamento.

A cromatina nos centrômeros revela como as variantes de histonas podem criar estruturas especiais

A presença de nucleossomos com variantes de histonas parece produzir marcas de longa duração na cromatina. Considere, por exemplo, a formação da herança da cromatina que forma os centrômeros, a região de DNA de cada cromossomo necessária para a segregação ordenada dos cromossomos entre as células-filhas cada vez que a célula se divide (ver Figura 4-21). Em vários organismos complexos, incluindo humanos, cada centrômero está inserido em um segmento especial de *heterocromatina cêntrica* que persiste por toda a interfase, mesmo que o movimento de DNA promovido pelo centrômero ocorra apenas durante a mitose. Essa cromatina contém uma variante da histona H3 específica de centrômeros,

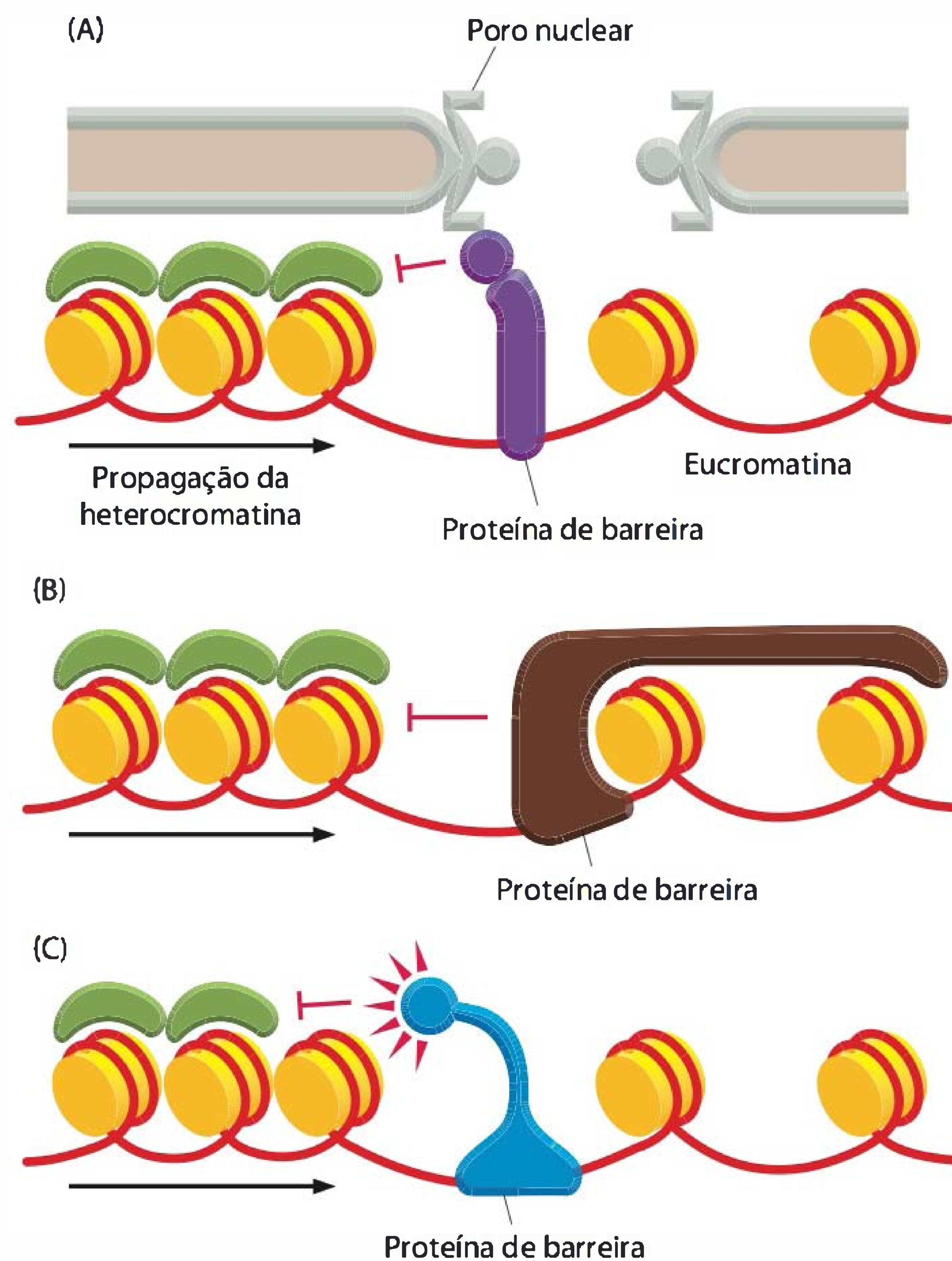


Figura 4-47 Alguns mecanismos da ação das barreiras. Esses modelos derivam de diferentes análises da ação das barreiras, e uma combinação de vários deles pode atuar em um mesmo sítio. (A) A união de uma região da cromatina a um grande sítio fixo, como um poro nuclear, ilustrado aqui, pode formar uma barreira que para a propagação da heterocromatina. (B) A forte ligação das proteínas de barreira a um grupo de nucleossomos pode competir com a propagação da heterocromatina. (C) Por meio do recrutamento de um grupo de enzimas de modificação de histonas altamente ativas, as barreiras podem apagar as marcas nas histonas, necessárias para o espalhamento da heterocromatina. Por exemplo, a potente acetilação da lisina 9 na histona H3 compete com a metilação da mesma lisina, impedindo a ligação da proteína HP1 necessária à formação de algumas formas de heterocromatina (ver Figura 4-46). (Com base em A. G. West e P. Fraser, *Hum. Mol. Genet*. 14:R101-R111, 2005. Com permissão da Oxford University Press.)

conhecida como CENP-A (ver Figura 4-41), além de proteínas adicionais que empacotam os nucleossomos em arranjos especialmente densos e formam o cinetocoro, a estrutura especial necessária para a ligação ao fuso mitótico.

Uma sequência específica de DNA com aproximadamente 125 pares de nucleotídeos é suficiente para atuar como um centrômero na levedura *S. cerevisiae*. Apesar do tamanho reduzido, mais de uma dúzia de proteínas diferentes se associam a essa sequência de DNA; as proteínas incluem a variante CENP-A da histona H3, a qual, junto com outras três proteínas do cerne de histonas, forma o nucleossomo específico do centrômero. As proteínas adicionais no centrômero de leveduras ligam esse nucleossomo a um único microtúbulo a partir do fuso mitótico (**Figura 4-48**).

Centrômeros de organismos mais complexos são consideravelmente maiores comparados a leveduras. Por exemplo, centrômeros de moscas e de humanos possuem centenas de milhares de pares de nucleotídeos e não parecem conter uma sequência de DNA específica de centrômeros. Esses centrômeros consistem, em grande parte, em pequenas sequências repetidas de DNA, conhecidas como *DNA de satélites alfa* em humanos. Porém essas mes-

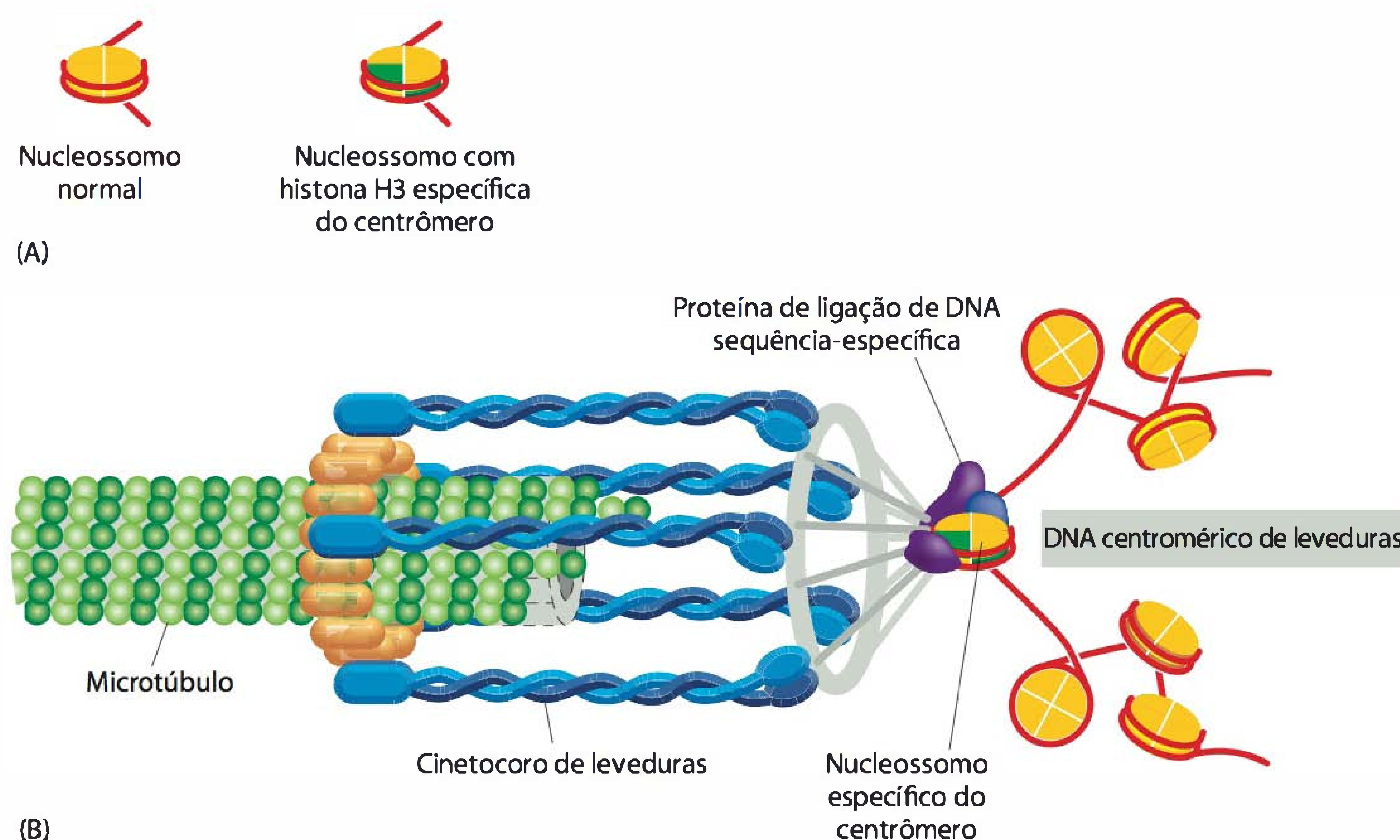


Figura 4-48 Modelo para a estrutura de um centrômero simples. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma sequência centromérica especial é montada em um único nucleossomo, no qual duas cópias de uma forma variante da histona H3 (denominada CENP-A na maioria dos organismos) substituem a H3 normal. Sequências peptídicas exclusivas a esta variante (ver Figura 4-41) auxiliam a montagem de proteínas adicionais, entre elas as proteínas que formam o cinetocoro. Este cinetócoro é atípico na captura de apenas um único microtúbulo; os humanos possuem centrômeros muito maiores e formam cinetocoros capazes de capturar 20 ou mais microtúbulos (ver Figura 4-50). O cinetocoro é discutido em detalhes no Capítulo 17. (Adaptada de A. Joglekar et al., *Nat. Cell Biol*. 8:381-383, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

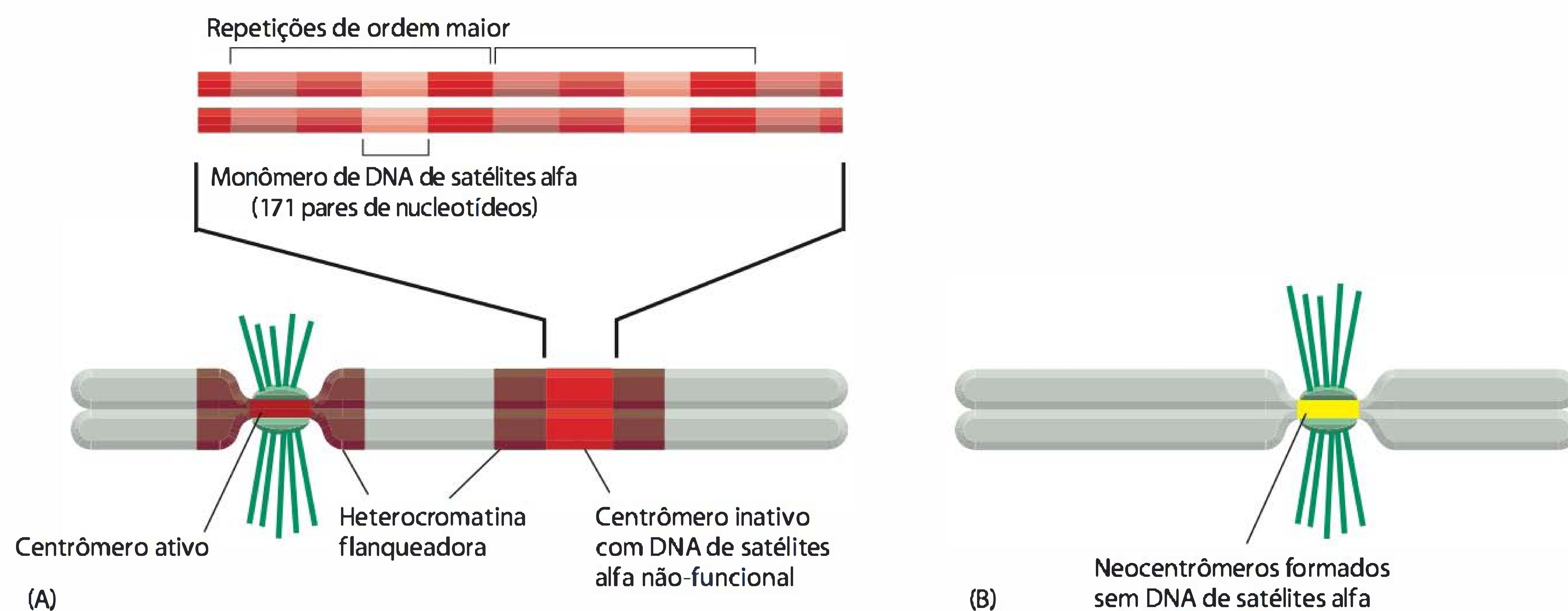


Figura 4-49 Evidências para a plasticidade de formação de um centrômero humano. (A) Diversas sequências ricas em A-T de DNA de satélites alfa são repetidas milhares de vezes em cada centrômero humano (em *vermelho*), envolvidos por heterocromatina pericêntrica (em *marrom*). Porém, devido a um evento de quebra e religação ancestral, alguns cromossomos humanos contêm dois blocos de DNA de satélites alfa, cada um provavelmente atuando como um centrômero no seu cromossomo original. Normalmente, esses cromossomos dicêntricos não são propagados de modo estável porque se ligam de modo incorreto ao fuso, sendo quebrados durante a mitose. Nos cromossomos que sobrevivem, porém, um dos centrômeros foi inativado de algum modo, mesmo que contenha todas as sequências de DNA necessárias. Isso permite que o cromossomo seja propagado de modo estável. (B) Em uma pequena parcela dos nascimentos humanos (1/2.000), cromossomos extras são observados nas células dos descendentes. Alguns desses cromossomos extras, que foram formados por eventos de quebra, não possuem DNA de satélites alfa, mas mesmo assim novos centrômeros (neocentrômeros) foram formados a partir de DNA originalmente da eucromatina.

mas sequências repetidas também são encontradas em outras posições (não-centroméricas) nos cromossomos, indicando que não são suficientes para promover a formação do centrômero. É notável que, em alguns casos raros, foi observado que centrômeros humanos novos (chamados de neocentrômeros) formam-se espontaneamente em cromossomos fragmentados. Algumas dessas novas posições eram originalmente eucromatina e não possuíam DNA de satélites alfa (**Figura 4-49**).

Parece, portanto, que os centrômeros de organismos complexos são definidos por um conjunto de proteínas, ao invés de uma sequência específica de DNA. Quando anticorpos que coram nucleossomos especificamente modificados são usados para examinar segmentos de fibras cromossômicas de centrômeros, observa-se uma marcada alternância entre duas formas modificadas de cromatina (**Figura 4-50**). Parece que esse arranjo permite que a heterocromatina cêntrica se dobre, de modo a posicionar os nucleossomos contendo CENP-A na parte externa do cromossomo mitótico, onde serão ligados a um conjunto de proteínas que formam as placas do cinetocoro. Essas placas, por sua vez, capturam um grupo de microtúbulos do fuso mitótico para a partição precisa dos cromossomos, como descrito no Capítulo 17.

Estruturas de cromatina podem ser diretamente herdadas

Para explicar as observações anteriores, foi proposto que a formação *de novo* do centrômero requer um evento inicial de semeadura, que envolve a formação de uma estrutura especializada de DNA e proteína, e que contenha nucleossomos formados com a variante CENP-A da histona H3. Em humanos, esse evento de semeadura ocorre mais prontamente em arranjos de DNA de satélite alfa em comparação a outras sequências. Os tetrâmeros H3-H4 de cada nucleossomo na hélice de DNA original são diretamente herdados pelas hélices-filhas de DNA na forquilha de replicação (ver Figura 5-38). Portanto, uma vez que um conjunto de nucleossomos contendo CENP-A tenha sido formado em um segmento de DNA, é fácil entender como um novo centrômero é produzido no mesmo lugar em ambos os cromossomos-filhos após cada ciclo de divisão celular (**Figura 4-51**).

A plasticidade dos centrômeros fornece uma importante vantagem evolutiva. Vimos que os cromossomos evoluem, em parte, pela quebra e religação de fragmentos cromossômicos (ver Figura 4-18). Muitos desses eventos produzem cromossomos com dois centrô-

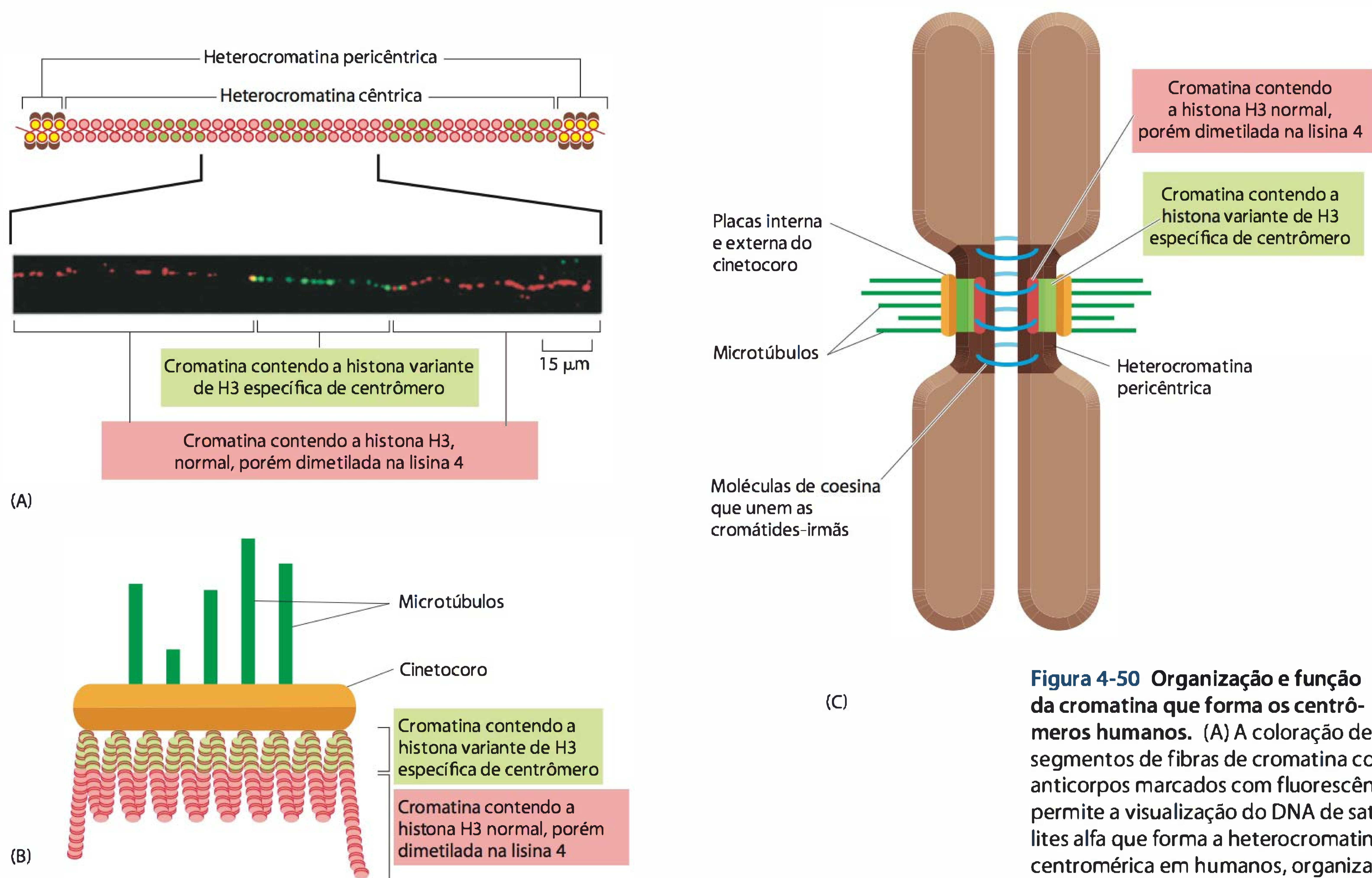


Figura 4-50 Organização e função da cromatina que forma os centrômeros humanos. (A) A coloração de segmentos de fibras de cromatina com anticorpos marcados com fluorescência permite a visualização do DNA de satélites alfa que forma a heterocromatina centromérica em humanos, organizada em blocos alternados de cromatina. Um bloco é formado por uma longa cadeia de nucleossomos contendo a histona variante CENP-A H3 (em *verde*); e o outro bloco contém nucleossomos especialmente marcados com uma dimetl lisina 4 (em *vermelho*). Cada bloco possui mais de mil nucleossomos. (B) Modelo para a organização dos dois tipos de heterocromatina centromérica. Como em leveduras, os nucleossomos que contêm a variante de H3 formam o cinetocoro. (C) Organização da heterocromatina centromérica e pericêntrica em um cromossomo na metáfase, determinada por microscopia de fluorescência usando os mesmos anticorpos de (A). (Adaptada de B. A. Sullivan e G. H. Karpen. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1076-1083, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

meros, ou fragmentos cromossômicos sem centrômero. Embora raros, tanto a inativação de centrômeros como a capacidade de ser ativado *de novo* pode ocasionalmente permitir que cromossomos recém-formados sejam mantidos de modo estável, facilitando assim o processo de evolução cromossômica.

Existem algumas semelhanças notáveis entre a formação e a manutenção dos centrômeros e a formação e a manutenção de outras regiões da heterocromatina. Em especial, o centrômero inteiro é formado como uma entidade tudo-ou-nada, sugerindo uma adição altamente cooperativa de proteínas após a semeadura. Além disso, uma vez formada, a estrutura parece ser herdada diretamente no DNA, como parte de cada ciclo de replicação cromossômica.

Estruturas da cromatina fornecem características únicas à função dos cromossomos eucarióticos

Embora existam ainda várias lacunas no entendimento das funções das diferentes estruturas de cromatina, é provável que o empacotamento do DNA nos nucleossomos tenha sido crucial para a evolução de eucariotos. Parece que organismos multicelulares complexos são viáveis apenas se as células de diferentes linhagens puderem se especializar pela modificação do acesso e da capacidade de resposta de várias centenas de genes a leituras genéticas. Como descrito no Capítulo 22, cada célula possui uma memória da história de seu desenvolvimento, armazenada nos circuitos reguladores que controlam seus inúmeros genes.

Embora as bactérias também necessitem do mecanismo de memória celular, a complexidade dos circuitos de memória exigidos pelos eucariotos é sem precedentes. A compactação de regiões selecionadas do genoma de eucariotos em diferentes formas de cromatina possibilita um tipo de mecanismo de memória celular não disponível em bactérias. A característica essencial dessa forma exclusivamente eucariótica da regulação gênica é o armazenamento da memória do estado do gene de modo gene-a-gene, na forma das estru-

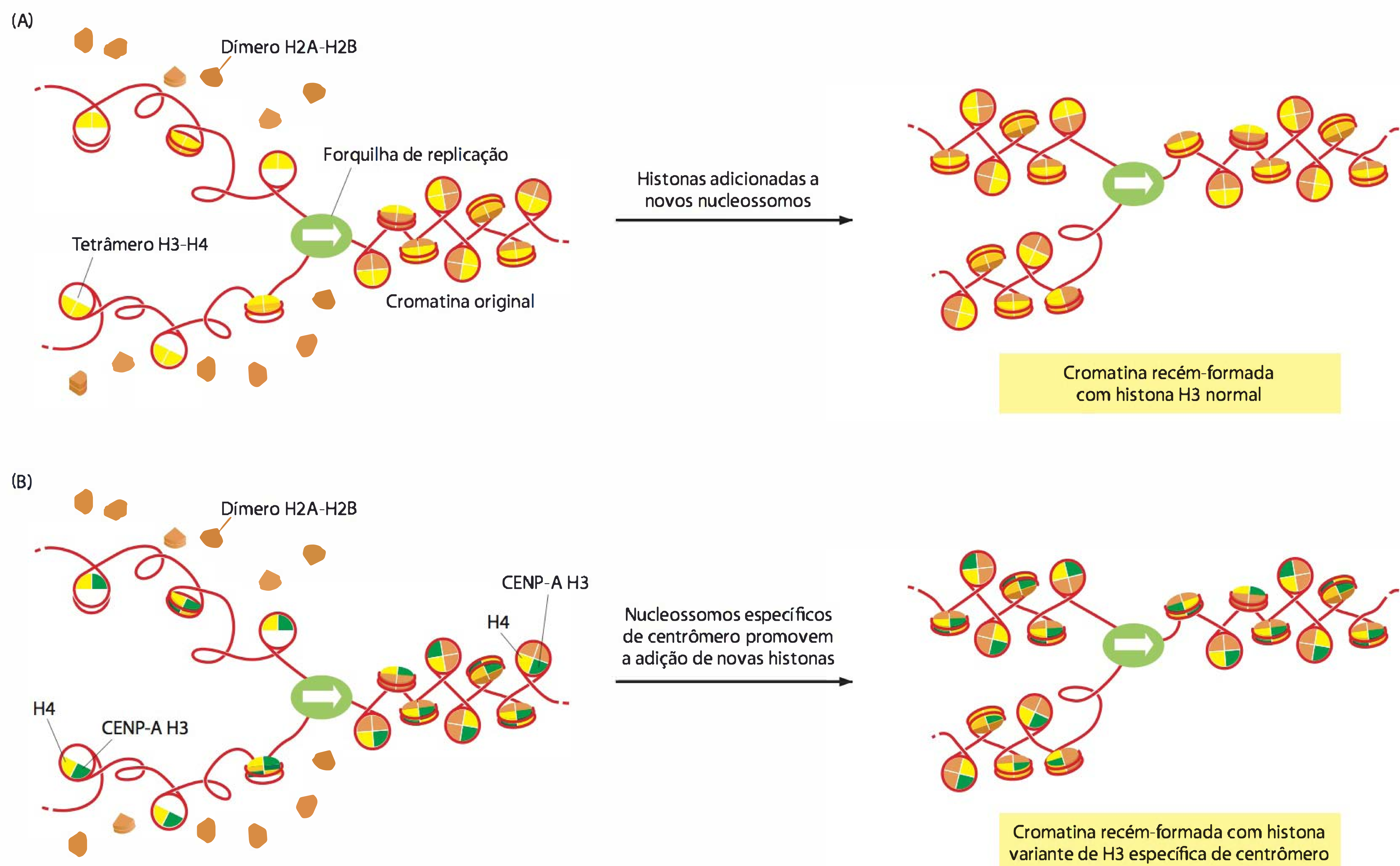


Figura 4-51 Modelo para a herança direta da heterocromatina centromérica. (A) A montagem normal da cromatina nas duas duplas-hélices de DNA filhas na forquilha de replicação requer a remoção dos dímeros H2A-H2B dos tetrâmeros H3-H4, os quais são diretamente herdados, bem como a montagem de novos octâmeros de histonas (ver Figura 5-38 para detalhes). (B) No centrômero, a herança dos tetrâmeros contendo a variante de H3-H4 inicia a formação de novos octâmeros de histonas que também possuem a histona variante de H3. Um processo de formação inicial semelhante pode provocar a herança dos blocos adjacentes de heterocromatina centromérica (contendo a H3 modificada com dimetil na lisina 4; ver Figura 4-50). Embora os detalhes ainda sejam desconhecidos, o processo de formação inicial parece envolver outras proteínas centroméricas que também são herdadas juntamente com os nucleossomos (ver Figura 4-52).

turas locais da cromatina que podem persistir por longos períodos de tempo. Em um extremo estão as estruturas como a heterocromatina cêntrica, a qual, uma vez estabelecida, é herdade de forma estável de uma geração celular à outra (ver Figura 4-51). Mecanismos

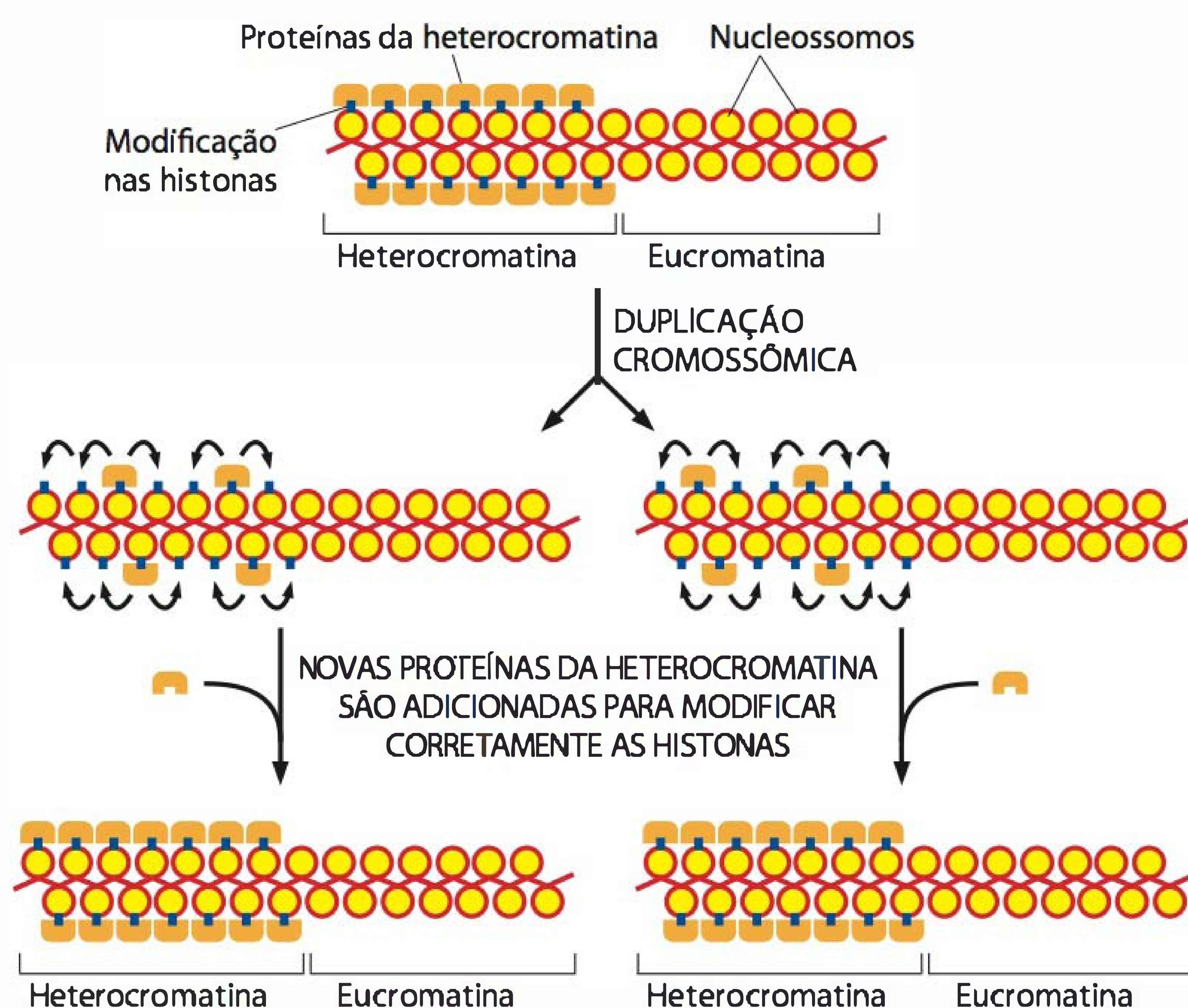


Figura 4-52 Como a compactação de DNA na cromatina pode ser herdada durante a replicação cromossômica. Neste modelo, alguns dos componentes especializados da cromatina são distribuídos para cada cromossomo-filho, após a duplicação do DNA, juntamente com os nucleossomos especialmente marcados a eles ligados. Após a replicação de DNA, os nucleossomos modificados herdados atuam em concerto com os componentes da cromatina, alterando o padrão de modificação de histonas nos nucleossomos-filhos recém-formados nas proximidades. Isso gera sítios de ligação para os mesmos componentes da cromatina, que se ligam e completam a estrutura. Esse último processo parece envolver complexos de leitura e escrita e remodelamento que operam de modo similar ao previamente ilustrado na Figura 4-46.

relacionados, com base na herança direta das formas originais da cromatina pelas hélices de DNA das células-filhas logo atrás da forquilha de replicação, parecem ser responsáveis por outros tipos de cromatina condensada (**Figura 4-52**). Por exemplo, o tipo clássico de heterocromatina, permanentemente silenciada, contém a proteína HP1, enquanto a cromatina condensada que recobre importantes genes reguladores do desenvolvimento é mantida pela família de proteínas Policomb. Este último tipo de cromatina silencia um grande número de genes que codificam para proteínas de regulação gênica nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, comprimindo um total de cerca de 2% do genoma humano, sendo removida apenas quando cada gene individual é necessário para o desenvolvimento do organismo (discutido no Capítulo 22). Embora existam outros tipos de herança de estruturas de cromatina, ainda não está claro quantos tipos diferentes existem: certamente, esse número pode exceder 10 (ver p. 238). A importância fundamental desse mecanismo na distinção de diferentes genes está representada esquematicamente na **Figura 4-53**.

Outras formas de cromatina podem ter uma vida mais curta, muito menor que o período de divisão celular; entretanto, várias possuem uma persistência intrínseca que auxilia na mediação da função biológica.



Figura 4-53 Ilustração esquemática da memória celular armazenada como informação epigenética com base na cromatina nos genes de eucariotos. Os genes de células eucarióticas podem ser compactados em uma grande variedade de estruturas de cromatina, indicadas nesta figura por cores diferentes. Pelo menos algumas dessas estruturas de cromatina têm efeitos importantes sobre a expressão gênica que é diretamente herdada como informação epigenética quando a célula se divide. Isso permite que certas proteínas de regulação gênica, que promovem diferentes estados de genes, atuem apenas uma vez, de modo que o estado possa ser relembrado mesmo após a remoção da proteína. A informação epigenética também pode ser armazenada em redes de moléculas sinalizadoras que controlam a expressão gênica (ver Figura 7-86).

Resumo

Apesar da formação uniforme do DNA cromossômico nos nucleossomos, existe uma grande variedade de diferentes estruturas de cromatina possíveis nos organismos eucarióticos. Essa variedade baseia-se em um grande conjunto de modificações covalentes reversíveis das quatro histonas no cerne do nucleossomo. Essas modificações incluem mono, di e trimetilação de várias cadeias laterais da lisina, uma reação importante, que é incompatível com a acetilação dessas mesmas lisinas. Combinações específicas das modificações marcam cada nucleossomo com um código. O código de histonas é lido quando módulos de uma proteína, que é parte de um complexo proteico maior, ligam-se aos nucleossomos modificados em uma região da cromatina. As proteínas de leitura do código, então, atraem proteínas adicionais que catalisam funções biológicas relevantes.

Alguns complexos de proteínas de leitura do código contêm uma enzima de modificação de histonas, como a metilase de histonas, que "escreve" a mesma marca que a proteína de leitura reconhece. Um complexo de escrita-leitura e remodelamento desse tipo pode propagar uma forma específica de cromatina por longas distâncias em um cromossomo. Em particular, grandes regiões de heterocromatina parecem ser formadas desse modo. A heterocromatina é comumente encontrada ao redor dos centrômeros e próxima aos telômeros, mas também está presente em diversos outros locais dos cromossomos. O forte empacotamento do DNA em heterocromatina normalmente provoca o silenciamento dos genes nessa região.

O fenômeno de efeito posicional variegado fornece boas evidências para a herança direta de formas condensadas de cromatina pelas hélices-filhas de DNA produzidas na forquilha de replicação, e um mecanismo semelhante parece ser responsável pela manutenção da cromatina especializada ao redor dos centrômeros. Em geral, a capacidade de transmitir estruturas de cromatina específicas de uma geração celular à outra fornece as bases para o processo de memória celular epigenética, que provavelmente seja essencial para a manutenção do complexo conjunto de estados celulares exigidos pelos organismos multicelulares complexos.

ESTRUTURA GERAL DOS CROMOSSOMOS

Após discutirmos as moléculas de DNA e as proteínas que constituem a fibra de 30 nm, discutiremos a organização dos cromossomos em uma escala mais geral. Na forma de fibra de 30 nm, o cromossomo típico humano tem 0,1 cm de comprimento e é capaz de se expandir no núcleo mais de cem vezes. Obviamente, deve haver um nível superior de compactação, mesmo nos cromossomos interfásicos. Embora sua base molecular ainda seja um mistério, esse nível de compactação provavelmente envolva dobramentos da fibra de 30 nm em várias alças e espirais. A estrutura da cromatina interfásica é fluida, e frequentemente sofre alterações em resposta às necessidades da célula.

Primeiro descreveremos alguns cromossomos interfásicos incomuns que podem ser facilmente visualizados, visto que certas características desses casos excepcionais podem representar a estrutura de todos os cromossomos interfásicos. Além disso, eles fornecem uma maneira única para investigar alguns aspectos fundamentais da estrutura da cromatina

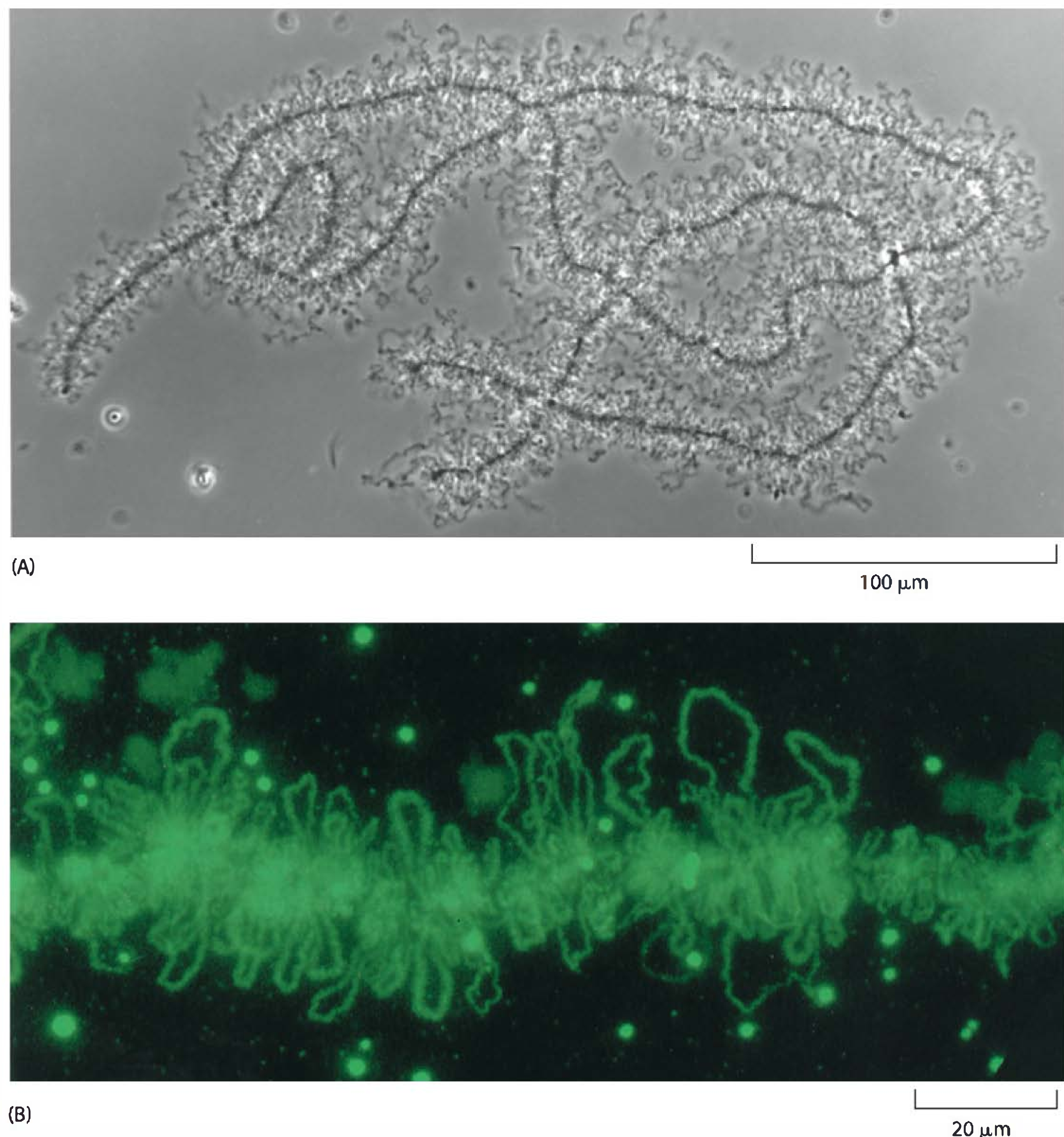


Figura 4-54 Cromossomos plumosos. (A) Micrografia dos cromossomos plumosos de um oócito de anfíbio. No início da diferenciação do oócito, cada cromossomo é replicado para iniciar a meiose, e os cromossomos homólogos replicados formam pares resultando em uma estrutura extremamente alongada contendo quatro moléculas de DNA replicadas, ou cromátides, no total. O estágio de cromossomo plumoso persiste por meses ou anos, enquanto o oócito vai acumulando as reservas necessárias para seu desenvolvimento em um novo indivíduo. (B) Região aumentada de um cromossomo semelhante, corado com reagente fluorescente, que possibilita a visualização da síntese ativa de RNA na alça de DNA. (Cortesia de Joseph G. Gall.)

mencionados na seção anterior. A seguir, descreveremos como um cromossomo interfásico típico é organizado dentro do núcleo celular, com ênfase nas células humanas. Finalmente, concluímos com uma discussão a respeito da compactação adicional de dez vezes que os cromossomos interfásicos sofrem durante o processo de mitose.

Os cromossomos são dobrados em grandes alças de cromatina

Evidências sobre a estrutura dos cromossomos das células em interfase foram obtidas a partir de estudos de cromossomos de oócitos de anfíbios (ovos imaturos) pareados na meiose nas formas estendida e rígida. Esses cromossomos incomuns, chamados de **cromossomos plumosos** (os maiores cromossomos conhecidos), são claramente visíveis mesmo ao microscópio óptico, onde parecem ser organizados em uma série de grandes alças de cromatina que emanam de um eixo linear do cromossomo (**Figura 4-54**).

A organização de um cromossomo plumoso é ilustrada na **Figura 4-55**. Uma determinada alça sempre contém uma mesma sequência de DNA e permanece distendida da mesma maneira durante o crescimento do oócito. Esses cromossomos estão produzindo grandes quantidades de RNA para o oócito, e a maioria dos genes presentes nas alças de DNA está sendo expressa. Entretanto, a maior parte do DNA não está nas alças, e permanece altamente condensada nos *cromômeros* do eixo, onde os genes normalmente não são expressos.

Parece que os cromossomos de interfase de todos os eucariotos estão organizados em alças de maneira semelhante. Embora essas alças em geral sejam muito pequenas e frágeis para serem observadas ao microscópio óptico, outros métodos podem ser usados para inferir sua presença. Por exemplo, é possível estimar a frequência com que quaisquer dois *loci*, ao longo de um cromossomo de interfase, são pareados entre si, revelando possíveis candidatos para os sítios que formam as bases justapostas das alças na cromatina (**Figura 4-56**). Estes e outros experimentos sugerem que o DNA nos cromossomos humanos está organiza-

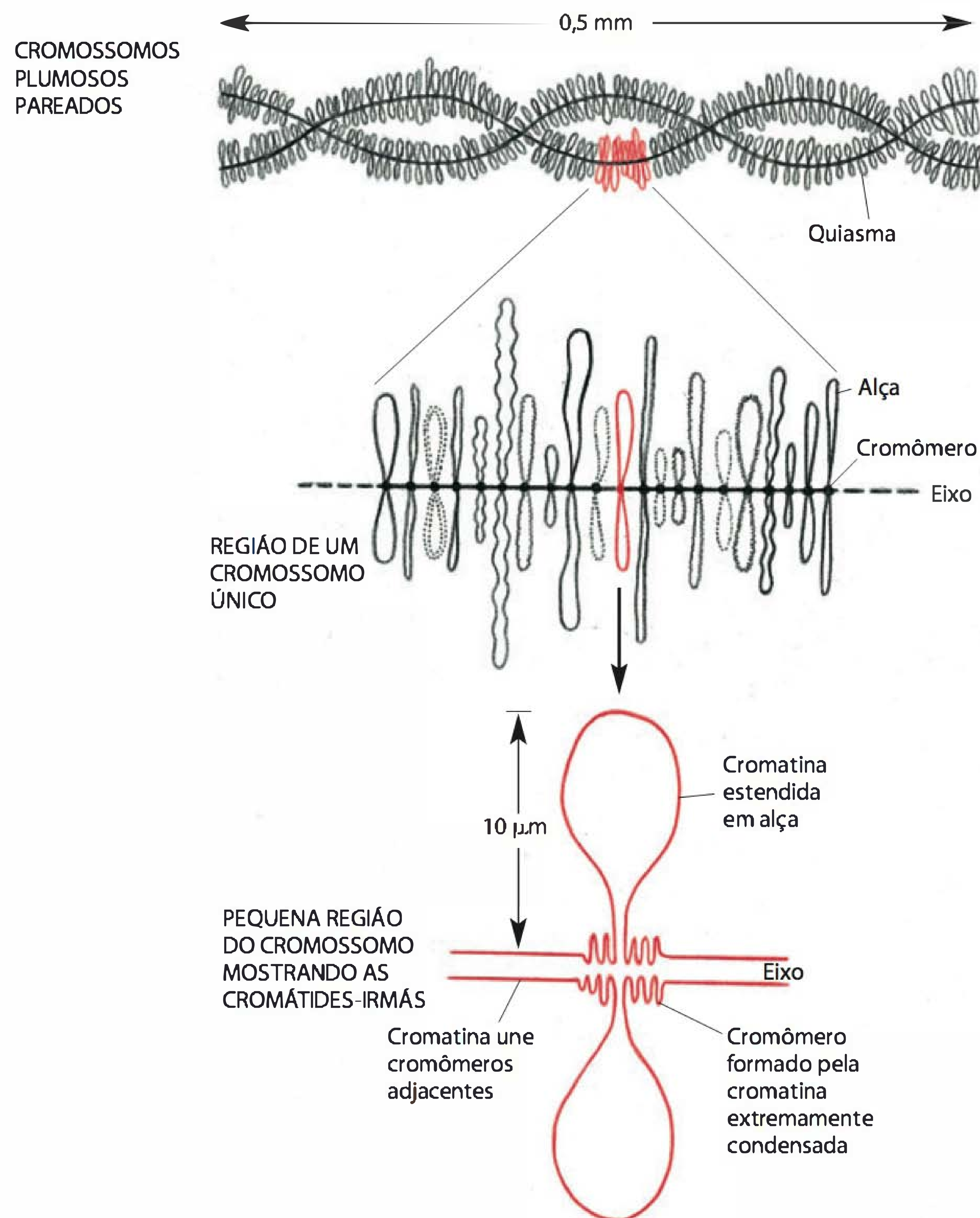


Figura 4-55 Modelo para a estrutura de um cromossomo plumoso. O conjunto de cromossomos plumosos de uma célula contém, em muitos anfíbios, um total de aproximadamente 10 mil alças de cromatina, embora a maior parte do DNA de cada cromossomo permaneça altamente condensada nos cromômeros. Cada alça corresponde a uma sequência de DNA específica. Quatro cópias de cada alça estão presentes em cada célula, uma vez que cada um dos cromossomos mostrados na parte superior da figura consiste em dois cromossomos recém-replicados justapostos. Essa estrutura de quatro fitas é característica desse estágio do desenvolvimento do oócito, o estágio de diploteno da meiose; ver Figura 21-9.

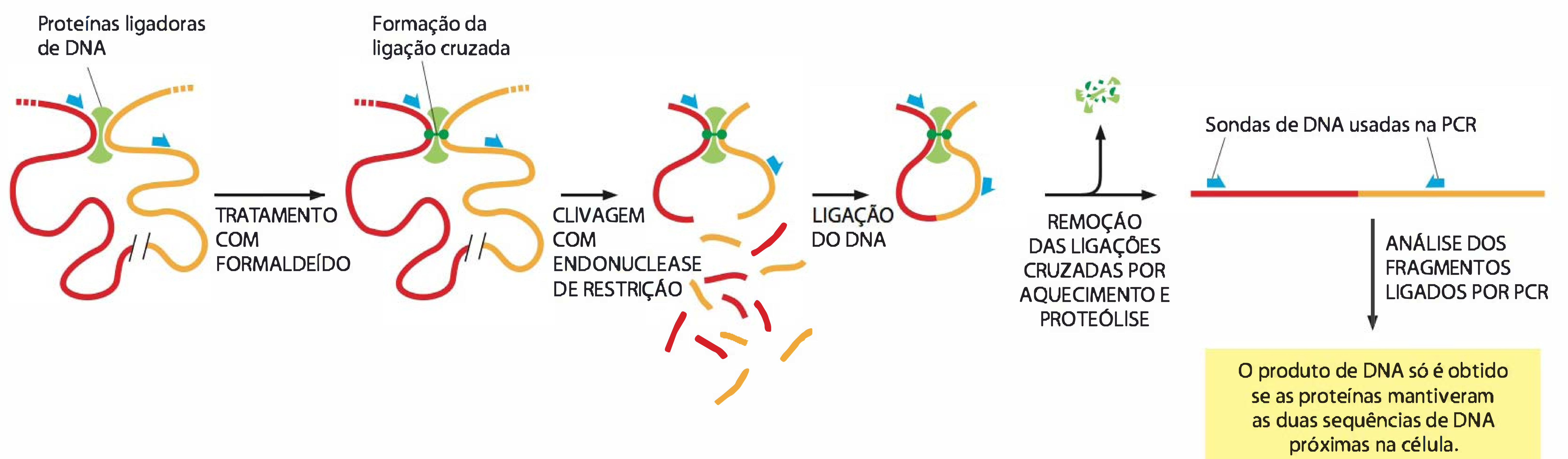


Figura 4-56 Método para determinação da posição das alças em cromossomos de interfase. Nessa técnica, conhecida como método de captura de conformação cromossômica (3C), as células são tratadas com formaldeído para criar ligações cruzadas covalentes DNA-proteína e DNA-DNA. O DNA é, então, tratado com uma endonuclease de restrição que cliva o DNA em vários segmentos, em sequências bem-definidas e formando conjuntos de "extremidades coesivas" idênticas (ver Figura 8-34). As extremidades coesivas podem ser unidas pelo pareamento entre bases complementares. Antes da etapa de ligação mostrada, o DNA é diluído de modo que os fragmentos mantidos nas proximidades (pela ligação cruzada) são os preferenciais para o pareamento. Finalmente, as ligações cruzadas são revertidas e os fragmentos recém-ligados de DNA são identificados e quantificados por reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerasechain reaction*, descrita no Capítulo 8). A combinação da informação da frequência de associação gerada pela técnica de 3C com a informação da sequência de DNA permite a produção de modelos estruturais para os cromossomos interfásicos.

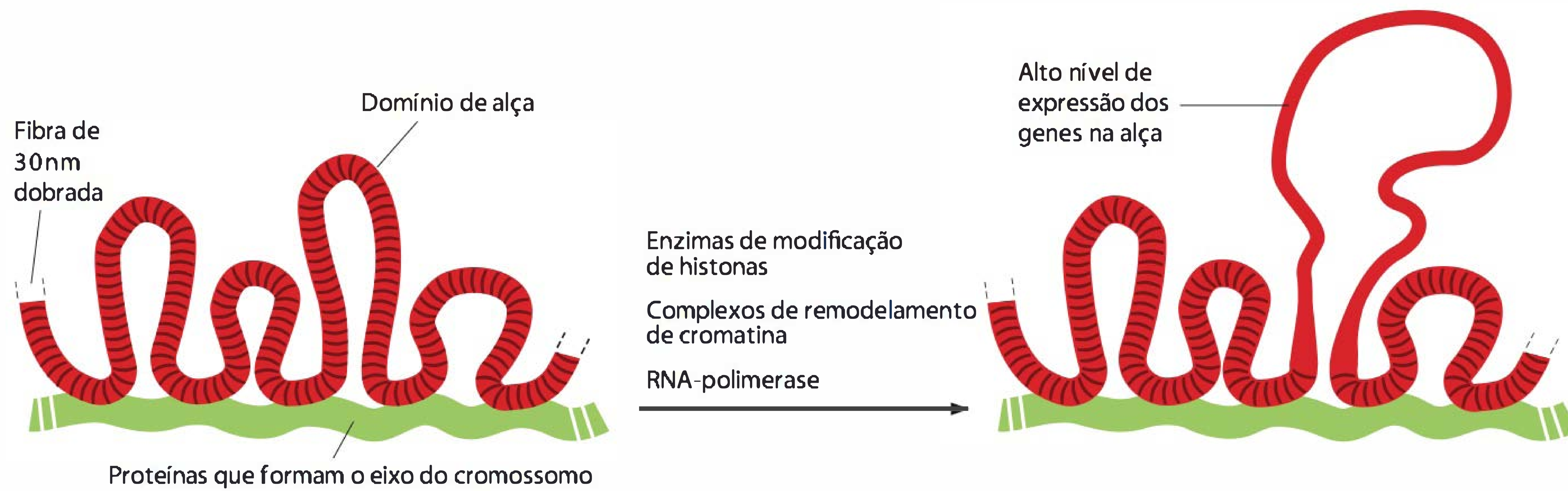


Figura 4-57 Modelo para a organização de um cromossomo na interfase. Uma secção de um cromossomo interfásico é mostrada, dobrada em uma série de domínios de alças, cada uma contendo cerca de 50 a 200 mil pares de nucleotídeos na dupla-hélice de DNA condensada na fibra de 30 nm. A cromatina em cada alça individual é condensada ainda mais por processos de compactação pouco entendidos, os quais são revertidos quando a célula necessita de acesso direto ao DNA empacotado na alça. Nem a composição do possível eixo, nem a possível ancoragem da fibra dobrada de 30 nm neste eixo estão claras. Porém, nos cromossomos mitóticos as bases das alças cromossômicas são enriquecidas tanto em condensinas como em enzimas DNA-topoisomerases II, duas proteínas que podem formar uma boa parte do eixo na metáfase (ver Figura 4-74).

do em alças com comprimentos diferentes. Uma alça típica pode conter de 50 mil a 200 mil pares de nucleotídeos de DNA, embora também tenham sido sugeridas alças com cerca de um milhão de pares de nucleotídeos (**Figura 4-57**).

Os cromossomos politênicos são únicos na capacidade de permitir a visualização de estruturas de cromatina

Certas células gigantes de insetos atingiram um tamanho enorme por meio de múltiplos ciclos de síntese de DNA sem divisão celular. Tais células com uma quantidade de DNA muito maior que a de complemento de DNA normal são chamadas de *poliploides* quando contêm um número-padrão de cromossomos aumentado. Em vários tipos de células secretoras das larvas de moscas, todas as cópias de cromossomos homólogos são mantidas lado a lado, como vários canudos em uma caixa, criando um único **cromossomo politênico**. Como os cromossomos politênicos podem se dispersar para formar uma célula poliploide convencional, esses dois estados cromossômicos são estreitamente relacionados. A estrutura básica de um cromossomo politênico deve, portanto, ser semelhante à estrutura de um cromossomo normal.

A politenia tem sido mais estudada em células de glândulas salivares de larvas de *Drosophila*. Quando esses cromossomos politênicos são vistos ao microscópio óptico, um padrão alternado e distinto de *bandas* escuras e *interbandas* claras é visível (**Figura 4-58**), cada uma formada por 1.000 sequências idênticas de DNA dispostas lado a lado. Cerca de 95% do DNA do cromossomo politênico estão dispostos nas bandas, e 5%, nas interbandas. Uma banda muito fina contém cerca de 3.000 pares de nucleotídeos, enquanto uma banda espessa pode conter 200 mil pares de nucleotídeos em cada uma de suas fitas de cromatina. A cromatina de cada banda aparece escura porque o DNA é muito mais condensado que o DNA na interbanda, podendo também conter uma maior proporção de proteínas (**Figura 4-59**).

Existem aproximadamente 3.700 bandas e 3.700 interbandas no conjunto completo de cromossomos politênicos de *Drosophila*. As bandas podem ser reconhecidas pelas suas diferentes espessuras e espaçamentos, e cada uma recebe um número que a identifica, gerando um “mapa” cromossômico, indexado à sequência do genoma finalizado deste inseto.

Os cromossomos politênicos de *Drosophila* fornecem um bom ponto de partida para a análise de como a cromatina é organizada em larga escala. Na seção anterior, vimos que existem várias formas de cromatina, cada uma contendo nucleossomos com diferentes combinações de histonas modificadas. Pela leitura desse código de histonas, grupos específicos

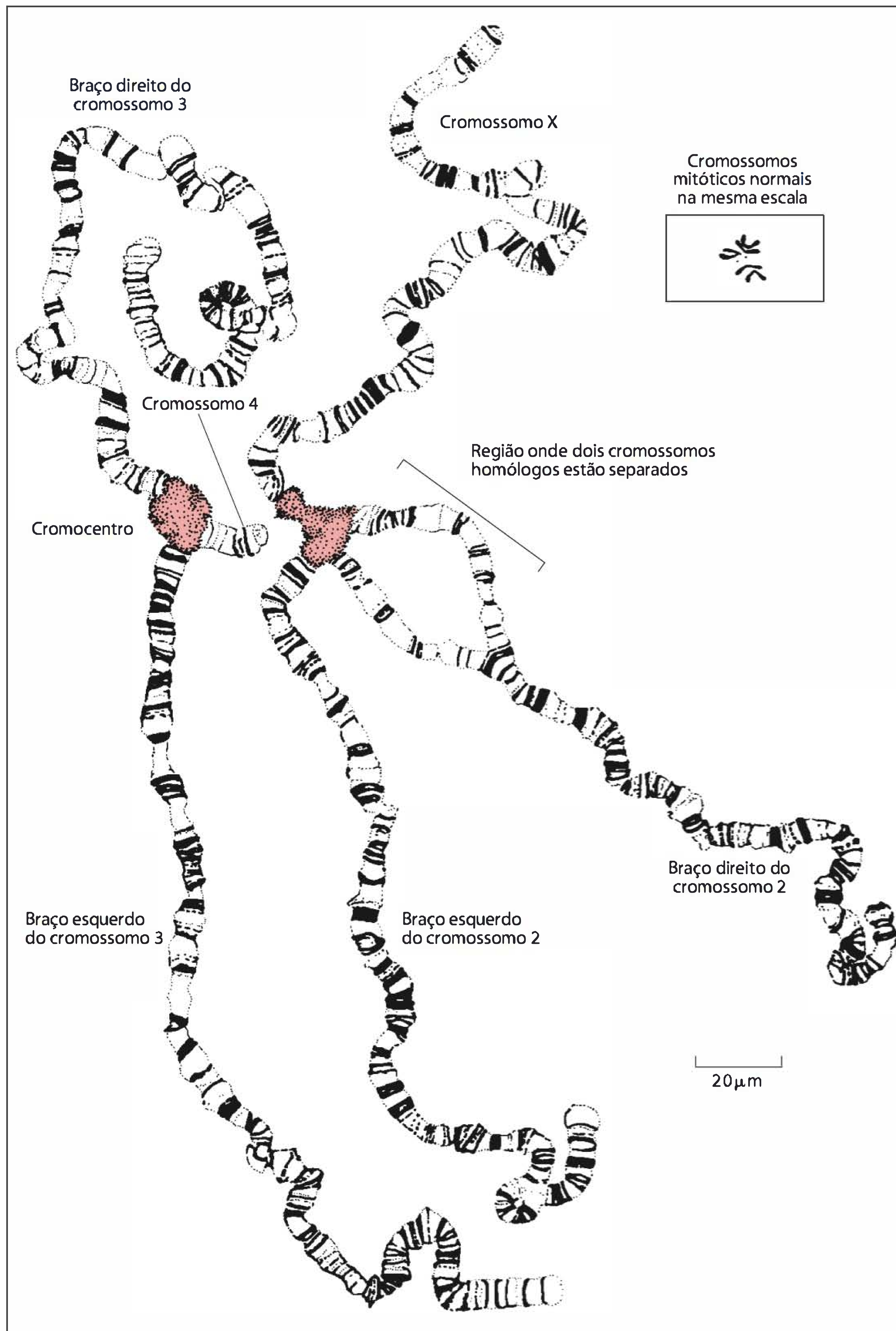


Figura 4-58 Conjunto completo de cromossomos politênicos de uma célula de glândula salivar de *Drosophila*. Neste desenho, de uma micrografia óptica, os cromossomos gigantes foram espalhados para visualização por compressão contra uma lâmina de microscópio. A *Drosophila* possui quatro cromossomos, e quatro pares de cromossomos distintos estão presentes. Porém, cada cromossomo está fortemente pareado ao seu homólogo (de modo que cada par aparece como uma estrutura única), o que não acontece na maioria dos núcleos (exceto na meiose). Cada cromossomo sofreu diversas etapas de replicação, e os homólogos e todos os seus duplicados permaneceram ligados entre si, resultando em enormes cabos de cromatina espessos devido as muitas fitas de DNA.

Os quatro cromossomos politênicos estão normalmente ligados por regiões heterocromáticas próximas dos seus centrômeros que se agregam para criar um grande e único"cromocentro" (*região em rosa*). Nesta preparação, entretanto, o cromocentro foi repartido em duas metades pelo procedimento de compressão. (Adaptada de T.S. Painter, *J. Hered*. 25:465-476, 1934. Com permissão da Oxford University Press.)

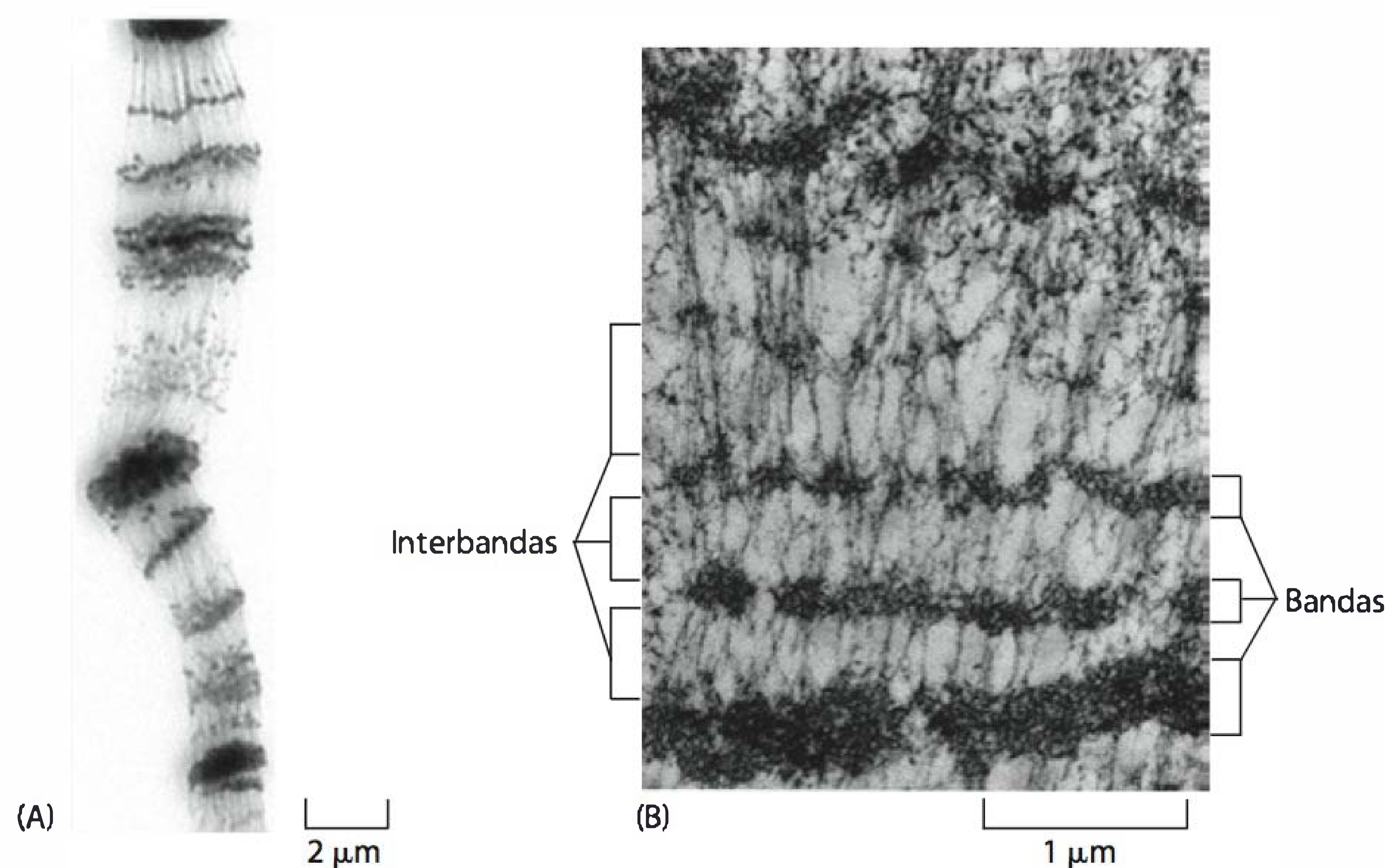


Figura 4-59 Micrografias de cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Drosophila*. (A) Micrografia de uma porção de um cromossomo. O DNA foi corado com um corante fluorescente, mas a imagem reversa apresentada aqui torna o DNA *preto* ao invés de *branco*; as bandas são facilmente visualizadas como regiões de concentração aumentada de DNA. Esse cromossomo foi processado por um tratamento de alta pressão, de modo a mostrar um padrão distinto de bandas e interbandas mais claro. (B) Micrografia eletrônica de uma pequena secção de um cromossomo politênico de *Drosophila*, vista em corte fino. Bandas de diferentes espessuras podem ser facilmente distinguidas, separadas por interbandas, que contêm cromatina menos condensada. (A, adaptada de D. V. Novikov, I. Kireev e A. S. Belmont, *Nat. Methods* 4:483-485, 2007. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd. B, cortesia de Veikko Sorsa.)

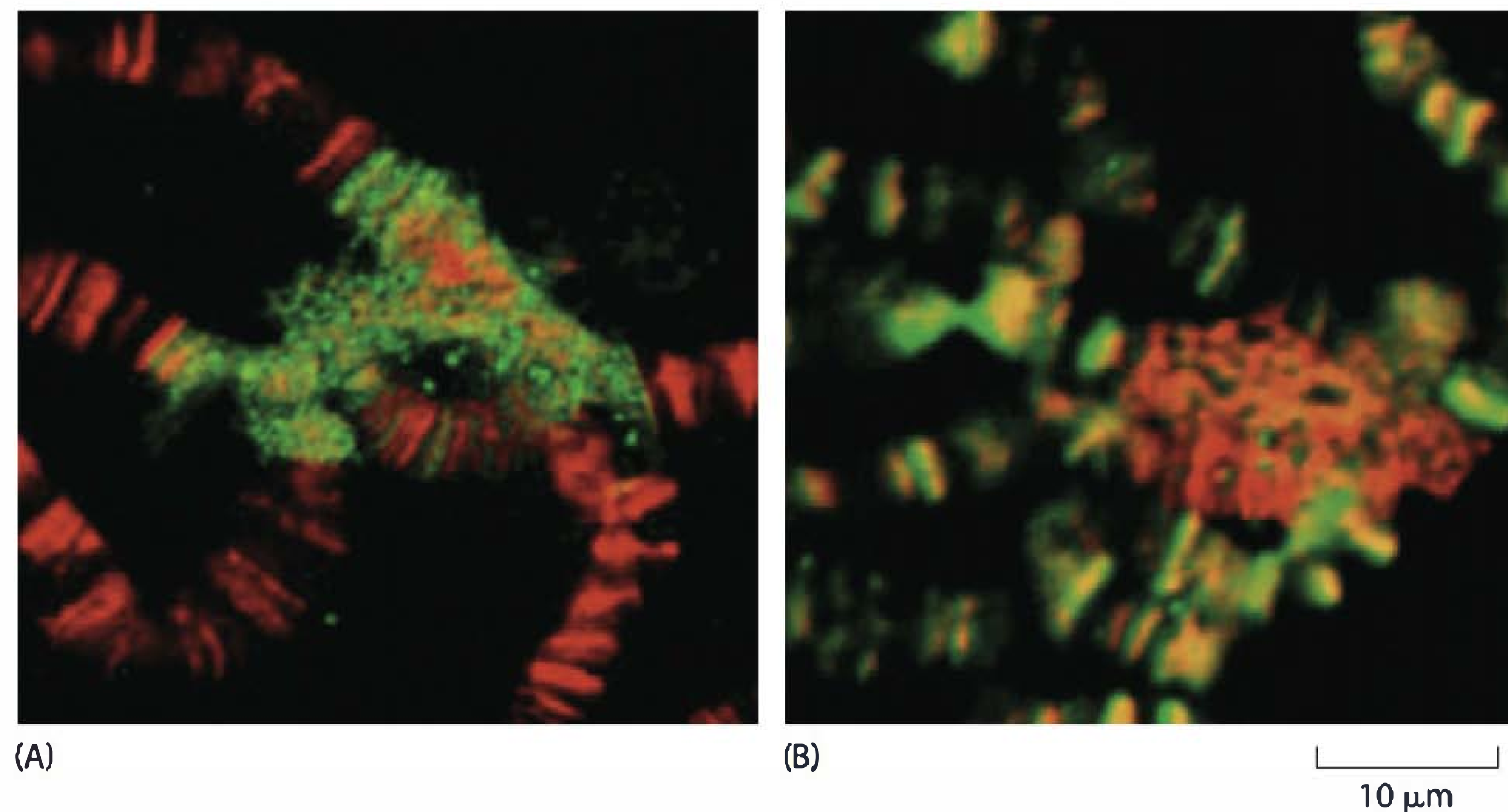


Figura 4-60 Padrão de modificação de histonas em cromossomos politênicos de *Drosophila*. Anticorpos que reconhecem especificamente diferentes modificações nas histonas podem revelar onde cada modificação é encontrada entre as muitas bandas e interbandas nesses cromossomos. Nas duas preparações mostradas aqui, as posições de duas diferentes marcações nas caudas da histona H3 são comparadas. Em ambos os casos, a marcação da histona modificada é *verde*, e o DNA é corado em *vermelho*. Apenas uma pequena região em torno de cada cromocentro é mostrada. (A) Lisina 9 dimetilada (*verde*) é a modificação de histona associada à heterocromatina pericêntrica. Ela é vista associada ao cromocentro. (B) Lisina 9 acetilada (*verde*) é a modificação que está concentrada nas histonas associadas a genes ativos. Ela parece estar presente em inúmeras bandas nos braços do cromossomo, mas não no cromocentro heterocromático. Experimentos similares podem ser realizados para posicionar outras histonas modificadas, e também proteínas não-histonas (ver, p. ex., Figura 22-45 para cromossomos corados para Policomb). (Adaptada de A. Ebert, S. Lein, G. Schotta e G. Reuter, *Chromosome Res*. 14:377-392, 2006. Com permissão de Springer.)

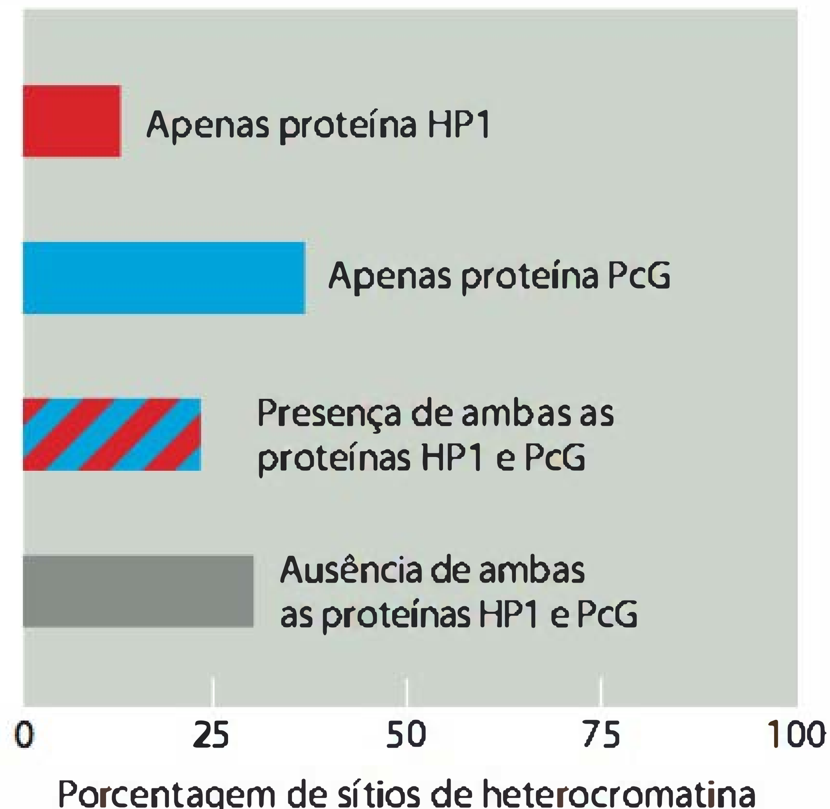


Figura 4-61 Evidências para as múltiplas formas da heterocromatina. Neste estudo, 240 sítios de replicação tardia nos braços do cromossomo politênico de *Drosophila* foram examinados para a presença de duas proteínas não-histonas. Essas proteínas auxiliam a compactação de duas formas diferentes da heterocromatina (ver texto). Como indicado, a reação com anticorpos sugere que aproximadamente metade dos sítios estão compactados em formas de heterocromatina diferentes dessas duas. Experimentos como esse demonstram que ainda há muito a aprender sobre a compactação de DNA em eucariotos. (Dados de I. F. Zhimulev e E. S. Belyaeva, *Bioessays* 25:1040-1051, 2003. Com permissão de John Wiley & Sons.)

de proteínas não-histonas se associam aos nucleossomos e afetam a função biológica de várias maneiras. Algumas dessas proteínas não-histonas podem se distribuir por longas distâncias no DNA, conferindo uma estrutura semelhante à cromatina de regiões contíguas do genoma (ver Figura 4-46). Assim, em algumas regiões, toda a cromatina possui uma estrutura similar e é separada do domínio adjacente por proteínas de barreira (ver Figura 4-47). Em baixa resolução, os cromossomos de interfase podem ser considerados como um mosaico de estruturas de cromatina, cada uma contendo modificações específicas nos nucleossomos e associadas a um conjunto específico de proteínas não-histonas. (Em altos níveis de resolução, diversas proteínas de ligação sequência-específica ao DNA podem ser vistas, e serão descritas no Capítulo 7.)

Esta visão de um cromossomo de interfase auxilia na interpretação dos resultados obtidos a partir de estudos dos cromossomos politênicos. A coloração com anticorpos altamente específicos revela que histonas modificadas de modo diferente (**Figura 4-60**), bem como o conjunto de proteínas não-histonas, estão localizadas em bandas diferentes nos cromossomos politênicos. Isso sugere uma importante estratégia geral. Utilizando combinações de anticorpos que se ligam fortemente a cada uma das várias modificações das histonas que geram o código de histonas (ver Figura 4-39), pode ser possível determinar quais as combinações de modificações que determinam certos tipos de domínios de cromatina. Além disso, por meio da realização de experimentos similares, utilizando anticorpos que reconhecem cada uma das centenas de proteínas não-histonas na cromatina, pode-se tentar decifrar os muitos significados codificados pelo código de histonas.

Existem múltiplas formas de heterocromatina

Estudos moleculares levaram à reavaliação do nosso entendimento sobre heterocromatina. Por várias décadas, a heterocromatina parecia ser uma entidade única definida pela sua estrutura altamente condensada e sua capacidade de silenciar genes permanentemente. Mas, se definirmos a heterocromatina como uma forma compacta de cromatina capaz de silenciar genes, ser herdada de forma epigenética e propagar-se nos cromossomos provocando efeito posicional variegado (ver Figura 4-36), é obvio que existem diferentes tipos de heterocromatina. Na verdade, já consideramos três tipos na discussão do centrômero humano (ver Figura 4-50).

Cada domínio de heterocromatina parece ser formado pela formação cooperativa de um conjunto de proteínas não-histonas. Por exemplo, a heterocromatina pericentromérica clássica contém mais de seis dessas proteínas, incluindo a proteína de heterocromatina 1 (HP1), enquanto a chamada forma Policomb de heterocromatina contém um número semelhante de proteínas em um grupo sem sobreposição (proteínas PcG). Existem centenas de pequenos blocos de heterocromatina distribuídos pelos cromossomos politênicos de *Drosophila* identificados pela sua replicação tardia (discutida no Capítulo 5). O uso de anticorpos para corar essas regiões de heterocromatina sugere que as formas conhecidas de heterocromatina são responsáveis por, no máximo, metade das bandas politênicas heterocromáticas (**Figura 4-61**). Assim, devem existir outros tipos de heterocromatina cuja composição de

proteínas não é conhecida. É provável que cada um desses tipos de heterocromatina seja regulado diferentemente e apresente funções diferentes na célula.

A estrutura da cromatina em cada domínio depende, em última análise, das proteínas que se ligam às sequências específicas de DNA, e em um organismo multicelular elas variam de acordo com o tipo celular e o estágio de desenvolvimento.

Dessa forma, tanto o padrão dos domínios de cromatina, como sua composição individual (modificações nucleossômicas e proteínas não-histonas) variam entre os tecidos. Essas diferenças tornam diferentes genes acessíveis à leitura genética, e auxiliam na compreensão da diversificação celular que acompanha o desenvolvimento embrionário (descrito no Capítulo 22). Comparações entre cromossomos politênicos de dois tecidos diferentes de uma mosca confirmam essa ideia geral: embora os padrões de bandas e interbandas sejam praticamente os mesmos, existem diferenças reprodutíveis entre eles.

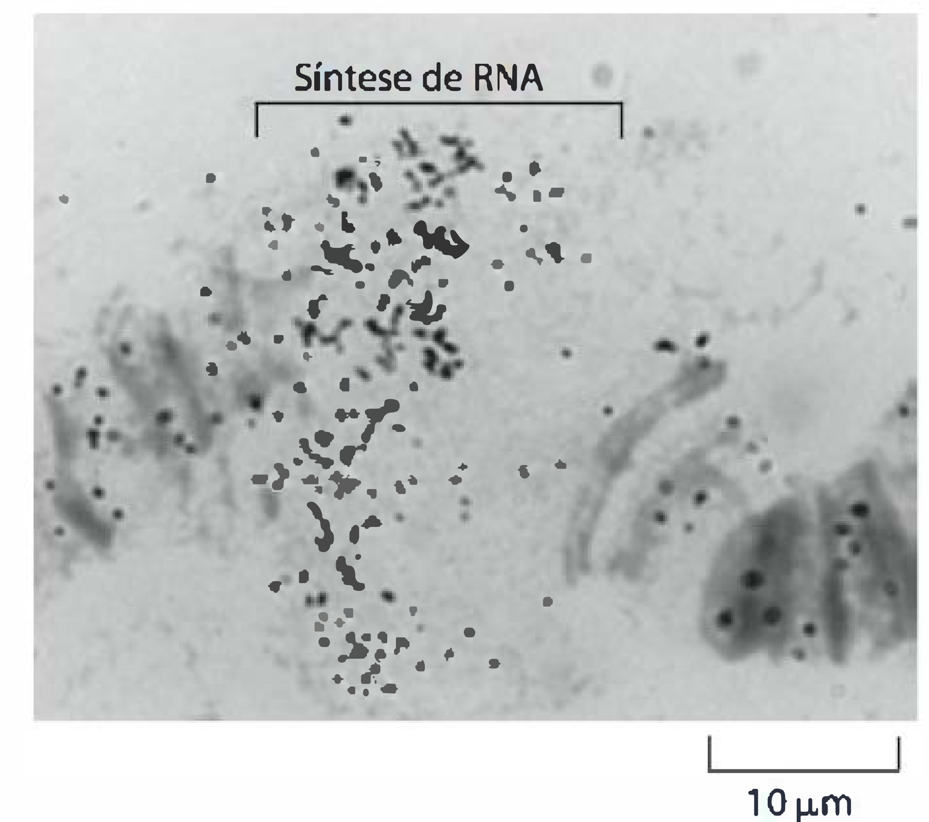


Figura 4-62 Síntese de RNA nos *puffs* dos cromossomos politênicos. Autorradiografia de um único *puff* no cromossomo politênico de glândula salivar do inseto *C. tentans*. Como mencionado no Capítulo 1 e descrito em detalhes no Capítulo 6, a primeira etapa da expressão gênica é a síntese de uma molécula de RNA usando o DNA como molde. A porção descondensada do cromossomo está sintetizando RNA e foi marcada com ^{3}H-uridina (ver p. 603), uma molécula precursora de RNA que é incorporada nas cadeias crescentes de RNA. (Cortesia de José Bonner.)

As alças de cromatina são descondensadas quando os genes nelas contidos são expressos

Quando um inseto passa de um estágio de desenvolvimento para outro, surgem padrões distintos de *puffs cromossômicos*, e os antigos *puffs* desaparecem nos cromossomos politênicos à medida que novos genes são expressos e outros são desativados (**Figura 4-62**). Em uma análise de cada *puff*, quando ainda é pequeno e o padrão de bandas ainda é discernível, parece que a maioria dos *puffs* surge da descondensação de uma única banda cromossômica.

As fibras individuais de cromatina que formam o *puff* podem ser vistas ao microscópio eletrônico. Por alguns casos favoráveis, as alças podem ser vistas como aquelas observadas nos cromossomos plumosos de anfíbios discutidos anteriormente. Quando não é expressa, a alça de DNA assume uma estrutura espessa, possivelmente um fibra de 30 nm dobrada, mas quando há expressão gênica, a alça torna-se mais estendida. Na micrografia eletrônica, a cromatina localizada em ambos os lados da alça descondensada aparece consideravelmente mais compacta, sugerindo que uma alça é um domínio funcional distinto da estrutura da cromatina.

Observações em células humanas também sugerem que as alças de cromatina bastante dobradas se expandem e ocupam um volume maior quando um gene contido nelas é expresso. Por exemplo, regiões cromossômicas quiescentes com 0,4 a 2 milhões de pares de nucleotídeos aparecem como pontos compactos em um núcleo de interfase, quando visualizadas por microscopia de fluorescência usando FISH ou outras técnicas. Contudo, o mesmo DNA é visto ocupando um território muito maior quando seus genes são expressos, aparecendo como estruturas alongadas perfuradas no lugar dos pontos originais.

A cromatina pode mover-se a sítios específicos dentro do núcleo para alterar a expressão gênica

Novas maneiras de visualizar cromossomos individuais mostraram que cada um dos cromossomos interfásicos de uma célula humana tende a ocupar seu próprio e discreto território no núcleo (**Figura 4-63**). Porém, imagens como esta apresentam apenas uma visão mediana do DNA em cada cromossomo. Experimentos que localizam, especificamente, regiões heterocromáticas de um cromossomo revelam que elas estão intimamente associadas à lâmina nuclear em qualquer cromossomo examinado. Sondas de DNA, que revelam preferencialmente regiões ricas em genes em cromossomos humanos, produzem uma imagem

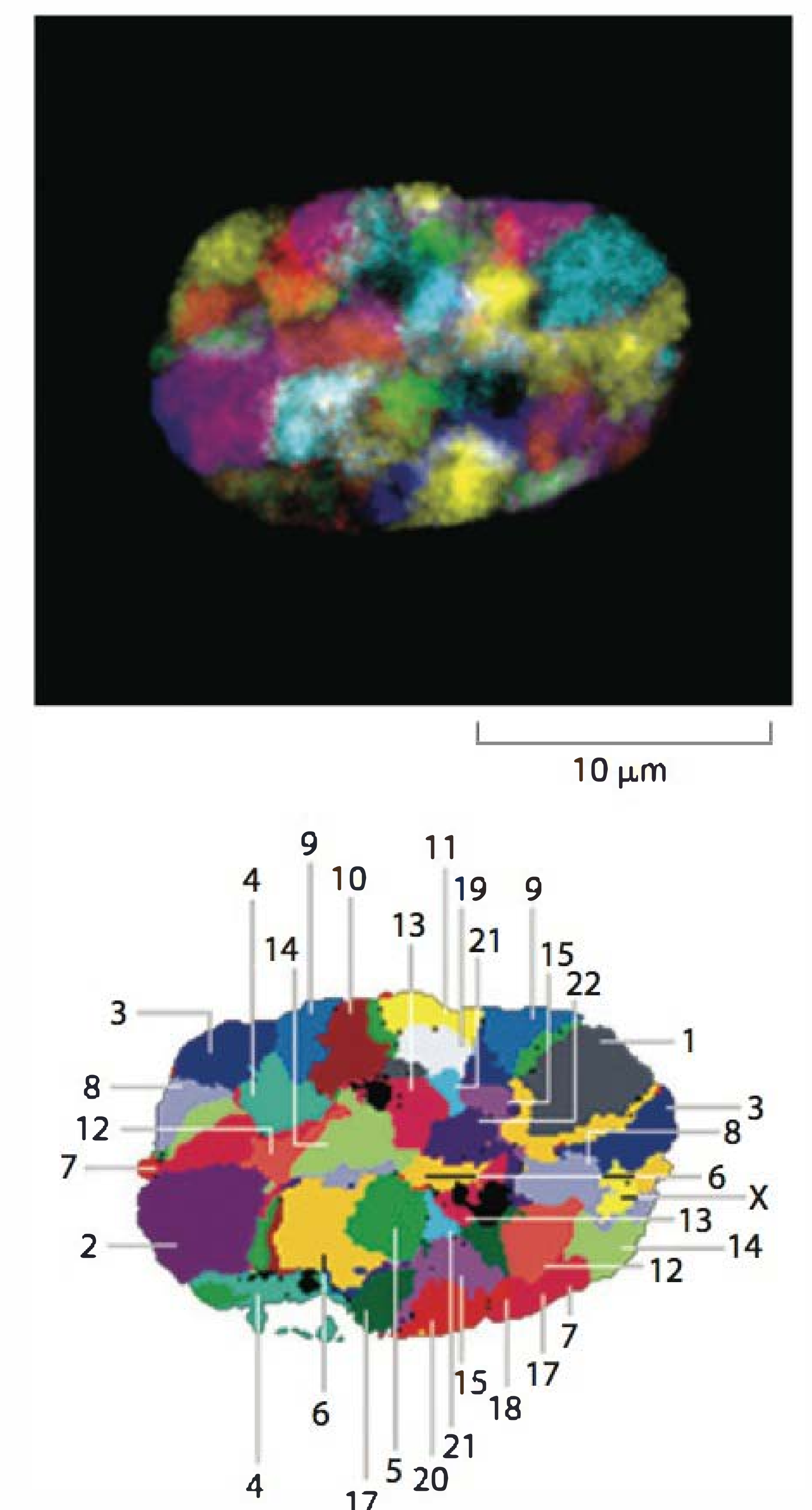


Figura 4-63 Visualização simultânea do território cromossômico para todos os cromossomos humanos em um único núcleo na interfase. Uma análise por FISH usando uma mistura de fluorocromos diferentes para marcar o DNA de cada cromossomo, detectada com sete canais de cores em um microscópio de fluorescência, permitiu que cada cromossomo fosse distinguido em reconstruções tridimensionais. Abaixo da micrografia, cada cromossomo é identificado em um diagrama feito a partir da imagem real. Observe que os dois cromossomos homólogos (p. ex., as duas cópias do cromossomo 9) normalmente não estão colocalizados. (De M. R. Speicher e N. P. Carter, *Nat. Rev. Genet*. 6:782-792, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

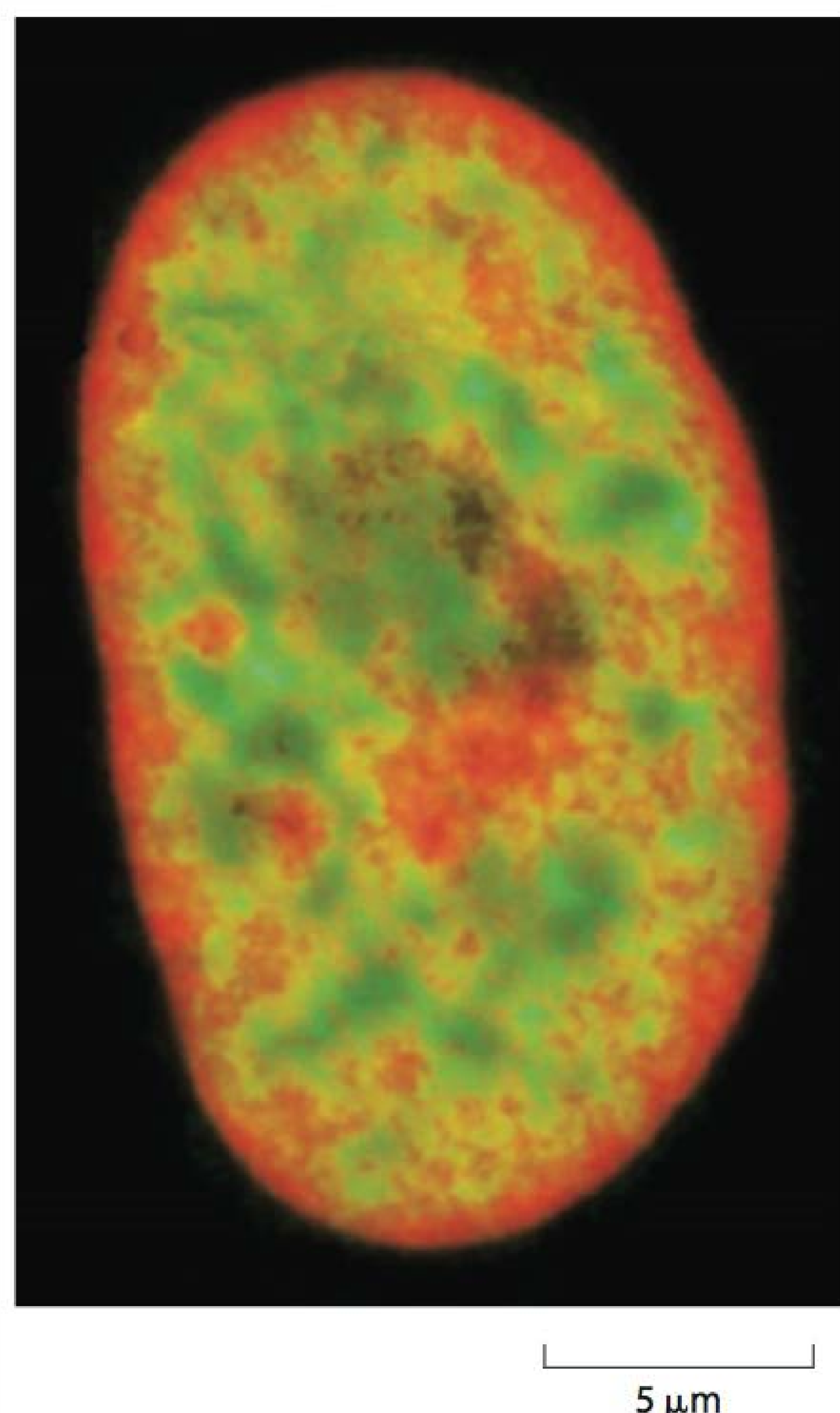


Figura 4-64 Distribuição de regiões ricas em genes do genoma humano em um núcleo na interfase. As regiões ricas em genes foram visualizadas com uma sonda fluorescente que se hibridiza à repetição Alu, presente em mais de um milhão de cópias no genoma humano (ver Figura 5-75). Por razões desconhecidas, essas sequências se agrupam em regiões cromossômicas ricas em genes. Nesta representação, regiões enriquecidas para sequência a Alu estão em *verde*, regiões com esta sequência reduzida estão em *vermelho* e regiões com um número médio estão em *amarelo*. As regiões ricas em genes são vistas com um número reduzido dessas sequências no DNA próximo ao envelope nuclear. (De A. Bolzer et al., *PLoS Biol.* 3:826-B42, 2005. Com permissão da Public Library of Science.)

surpreendente do núcleo de interfase, que possivelmente reflete as posições médias diferentes para genes ativos e inativos (**Figura 4-64**).

Uma variedade de diferentes tipos de experimentos concluiu que a posição de um gene no interior do núcleo é alterada quando este é muito expresso. Assim, uma região que torna-se ativamente transcrita em geral é encontrada fora de seu território cromossômico, como se fosse uma alça distendida (**Figura 4-65**). Veremos no Capítulo 6 que o início da transcrição – a primeira etapa de expressão gênica – requer a presença de mais de 100 proteínas, e obviamente isso ocorre de forma mais rápida em regiões do núcleo especialmente ricas nessas proteínas.

Está claro que o núcleo é muito heterogêneo, com regiões funcionais distintas para as quais determinados segmentos de cromossomos podem se mover, caso sejam sujeitos a diferentes processos bioquímicos – como quando há alteração da expressão gênica (**Figura 4-66**). Há evidências de que algumas dessas regiões nucleares são marcadas com diferentes fosfolipídeos inositol, remanescentes do modo como os mesmos lipídeos são usados para distinguir diferentes membranas no citoplasma (ver Figura 13-11). Mas, como esses lipídeos são ligados ao interior do núcleo é um mistério, visto que os únicos ambientes ricos em lipídeos são as bicamadas lipídicas do envelope nuclear.

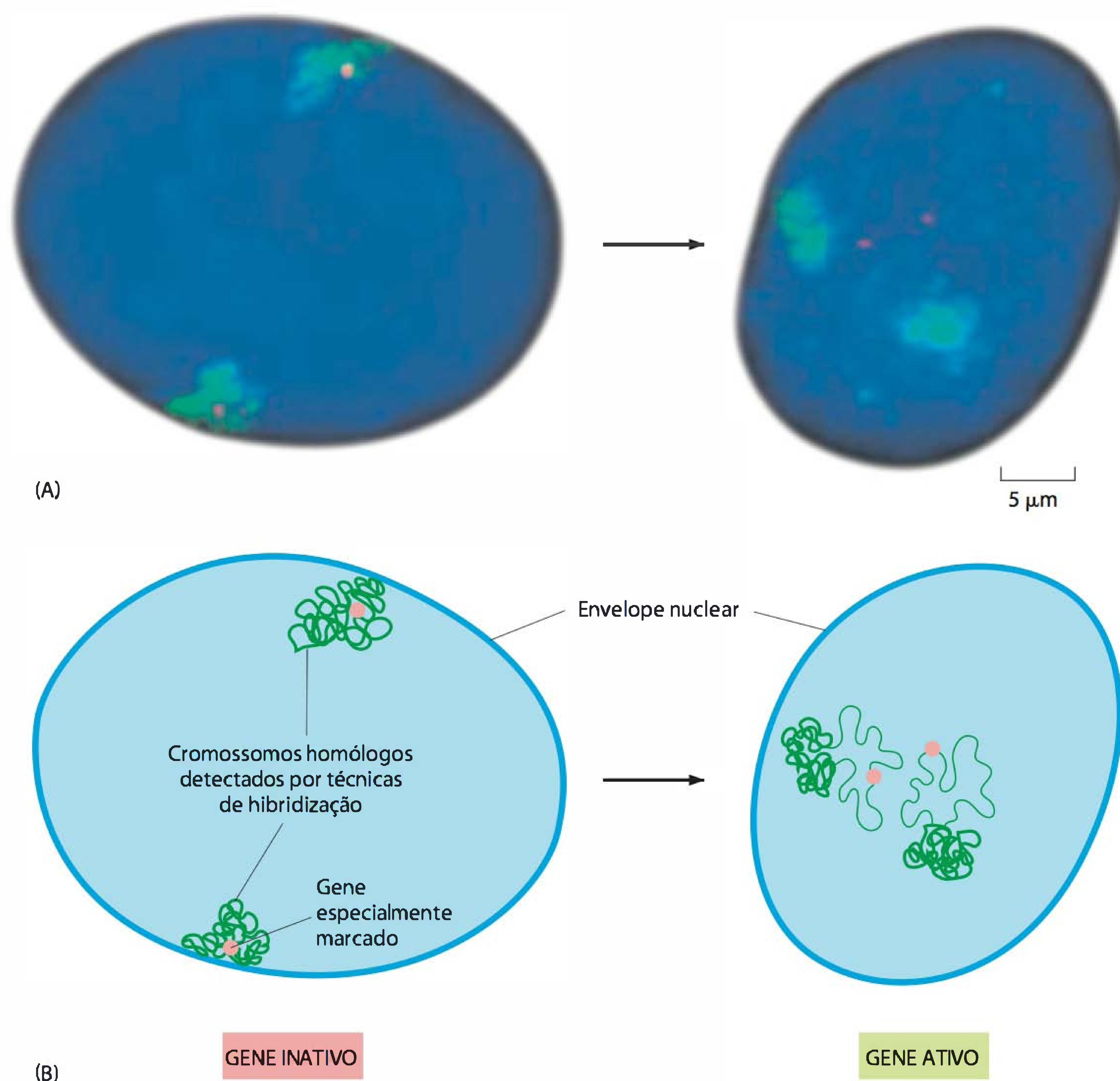


Figura 4-65 Um efeito do alto nível de expressão gênica na localização intranuclear da cromatina. (A) Micrografias de fluorescência de núcleos humanos mostrando como a posição dos genes é alterada quando há alta transcrição. A região do cromossomo adjacente ao gene (*vermelho*) pode ser vista saindo do seu território (*verde*) apenas quando está muito ativa. (B) Representação esquemática de uma grande alça de cromatina que se expande quando o gene é ativado e se contrai quando o gene é desativado. Outros genes, com expressão menos ativa, podem ser vistos pelo mesmo método e permanecem dentro de seu território cromossômico quando transcritos. (De J. R. Chubb e W. A. Bickmore, *Cell* 112:403-406, 2003. Com permissão de Elsevier.)

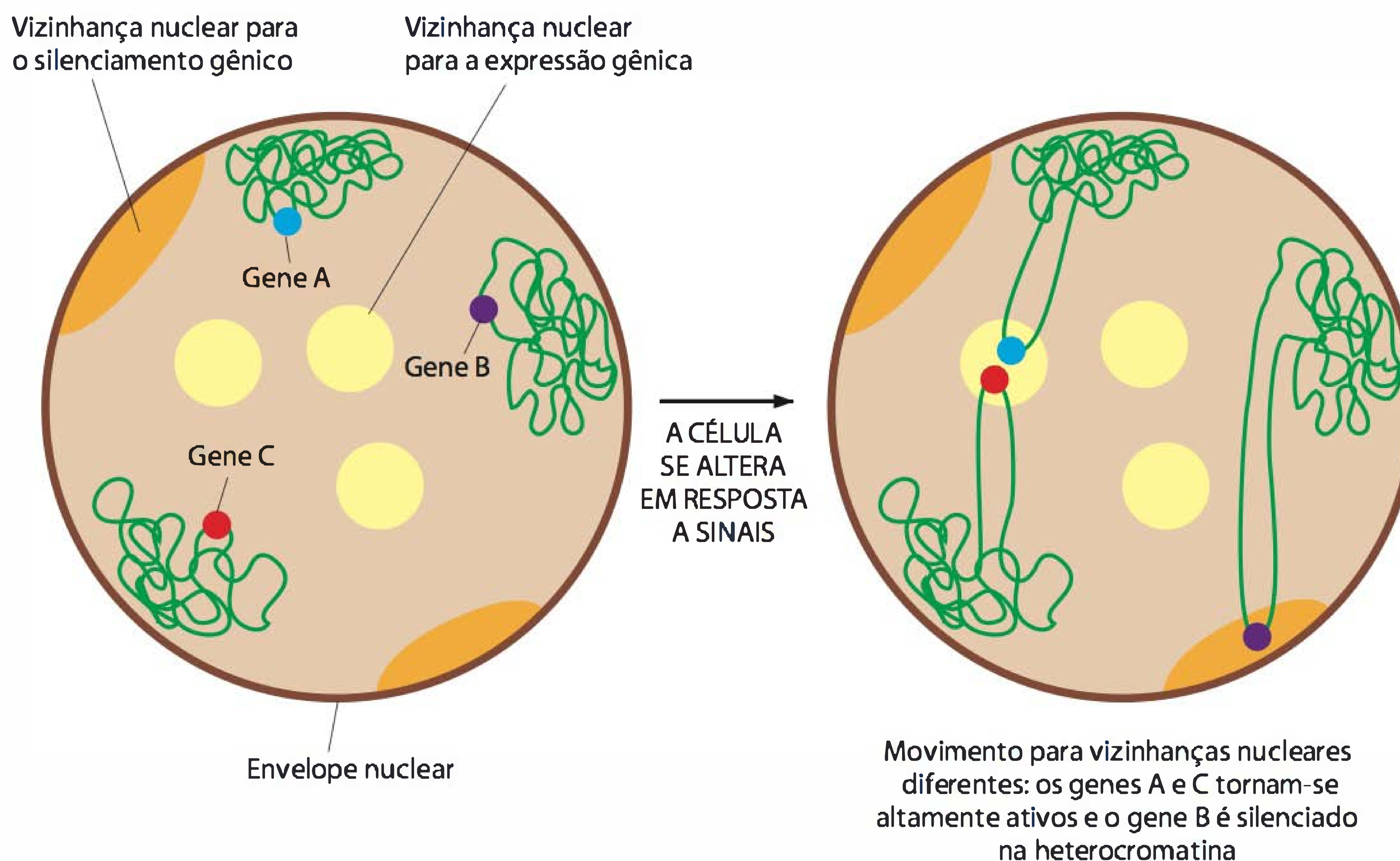


Figura 4-66 Movimento dos genes para diferentes regiões do núcleo quando sua expressão é alterada. O interior do núcleo é muito heterogêneo, e regiões nucleares vizinhas distintas possuem efeitos distintos na expressão gênica. Movimentos como os indicados no diagrama provavelmente refletem alterações nas afinidades de ligação da cromatina e de moléculas de RNA que envolvem um gene para diferentes regiões nucleares vizinhas. Parece que o movimento é promovido por difusão e não requer um processo de deslocamento, de forma que cada região de um cromossomo pode sofrer um deslocamento aleatório constante quando marcada de algum modo que permita que sua posição seja seguida em uma célula viva.

Redes de macromoléculas formam um conjunto de ambientes bioquímicos distintos dentro do núcleo

No Capítulo 6 descrevemos a função de vários subcompartimentos presentes no núcleo. O maior e mais óbvio é o nucléolo, uma estrutura já bem conhecida por microscopistas mesmo no século XIX (ver Figura 4-9). A região nucleolar consiste em redes de RNAs e proteínas em torno dos genes de RNA ribossômico em transcrição, geralmente existindo como múltiplos nucléolos. O nucléolo é o sítio de montagem e maturação do ribossomo, sendo também o local em que ocorrem diversas reações especializadas.

Uma diversidade de organelas menos óbvias também está localizada no núcleo. Por exemplo, estruturas esféricas chamadas de corpos de Cajal e aglomerados de grânulos de intercromatina são encontrados na maior parte de células de plantas e animais (**Figura 4-67**). Da mesma forma que o núcleo, essas organelas são compostas de proteínas selecionadas e moléculas de RNA que ligam-se entre si formando redes altamente permeáveis a outras proteínas e moléculas de RNA no nucleoplasma das proximidades (**Figura 4-68**).

Tais estruturas podem originar ambientes bioquímicos distintos pela imobilização de determinados tipos de macromoléculas, assim como fazem as proteínas e moléculas de RNA associadas aos poros nucleares e ao envelope nuclear. Em princípio, isso permite que moléculas entrem nesses espaços para serem processadas com grande eficiência por meio de reações complexas. Redes fibrosas desse tipo, altamente permeáveis, podem propiciar muitas vantagens cinéticas pela compartimentalização (ver p. 186) a reações que ocorrem no núcleo (**Figura 4-69**A). Contudo, ao contrário dos compartimentos limitados por membranas do citoplasma (discutido no Capítulo 12), esses subcompartimentos nucleares – que não possuem membrana com bicamada lipídica – não podem concentrar nem excluir pequenas moléculas específicas.

A célula possui uma capacidade notável de construir ambientes bioquímicos distintos dentro do núcleo. Os já mencionados aqui facilitam vários aspectos da expressão gênica, discutidos no Capítulo 6 (ver Figura 6-49). Como o nucléolo, esses subcompartimentos parecem ser formados apenas quando necessários, e criam uma alta concentração local de diversas enzimas e moléculas de RNA para um determinado processo. De forma análoga, quando o DNA é danificado por irradiação, o conjunto de enzimas necessário para efetuar o reparo forma agregados em pontos discretos dentro do núcleo, gerando "fábricas de reparo" (ver Figura 5-60). Com frequência, os núcleos contêm centenas de pontos discretos representando fábricas para a síntese de DNA ou RNA.

Parece que todas essas entidades utilizam o mesmo tipo de conexões ilustradas na Figura 4-69B, em que longos segmentos flexíveis de cadeias polipeptídicas (ou algum outro polímero) são intercalados por sítios de ligação que concentram as diversas proteínas ou moléculas de RNA necessárias à catálise de um determinado processo. Não é de surpreender que as conexões também sejam usadas para auxiliar no aumento da velocidade de processos

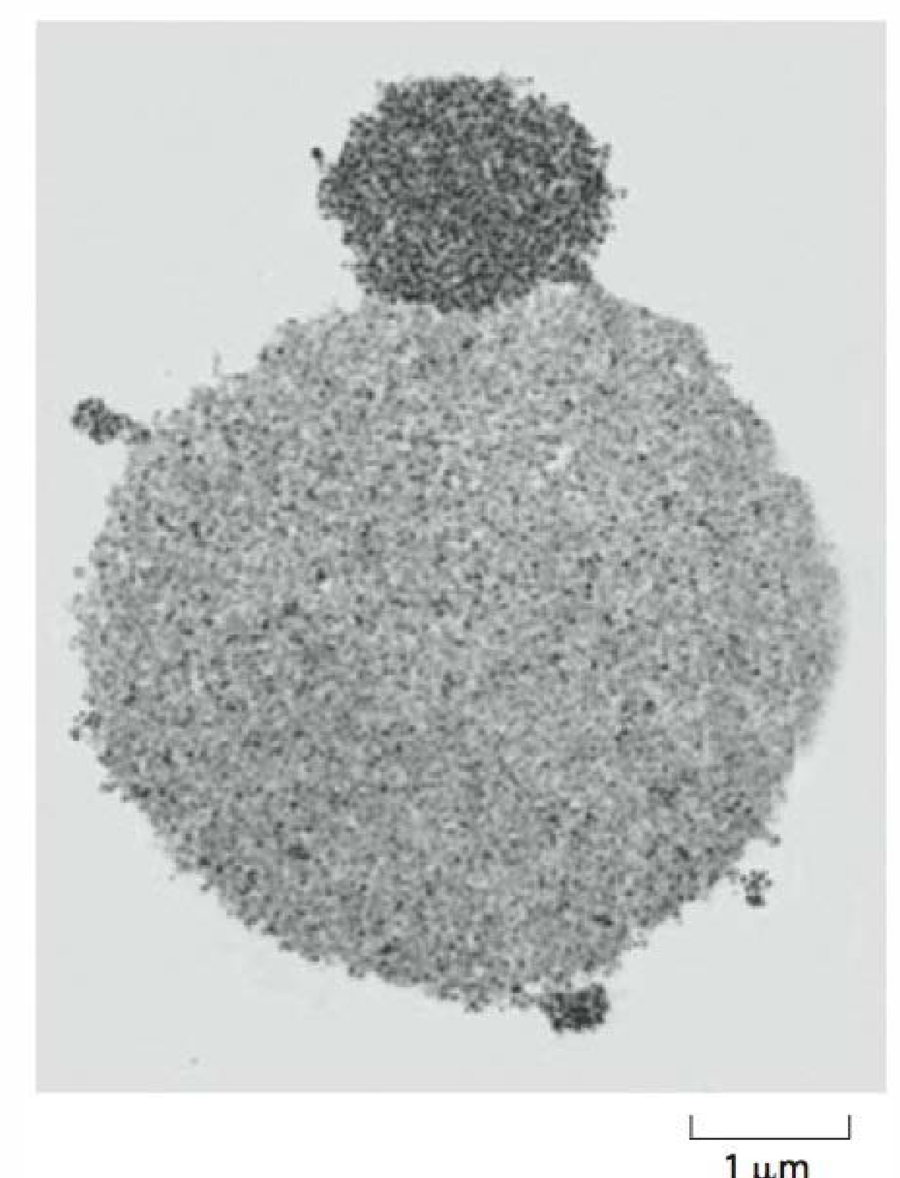


Figura 4-67 Micrografia eletrônica mostrando dois subcompartimentos nucleares fibrosos comuns. A grande esfera aqui é o corpo de Cajal. A pequena esfera escura é um bloco de grãos de intercromatina, conhecido como *spreckle* (ver também Figura 6-49). Essas "organelas subnucleares" são do núcleo de um oócito de *Xenopus*. (De K. E. Handwerger e J. G. Gall, *Trends Cell Biol.* 16:19-26, 2006. Com permissão de Elsevier.)

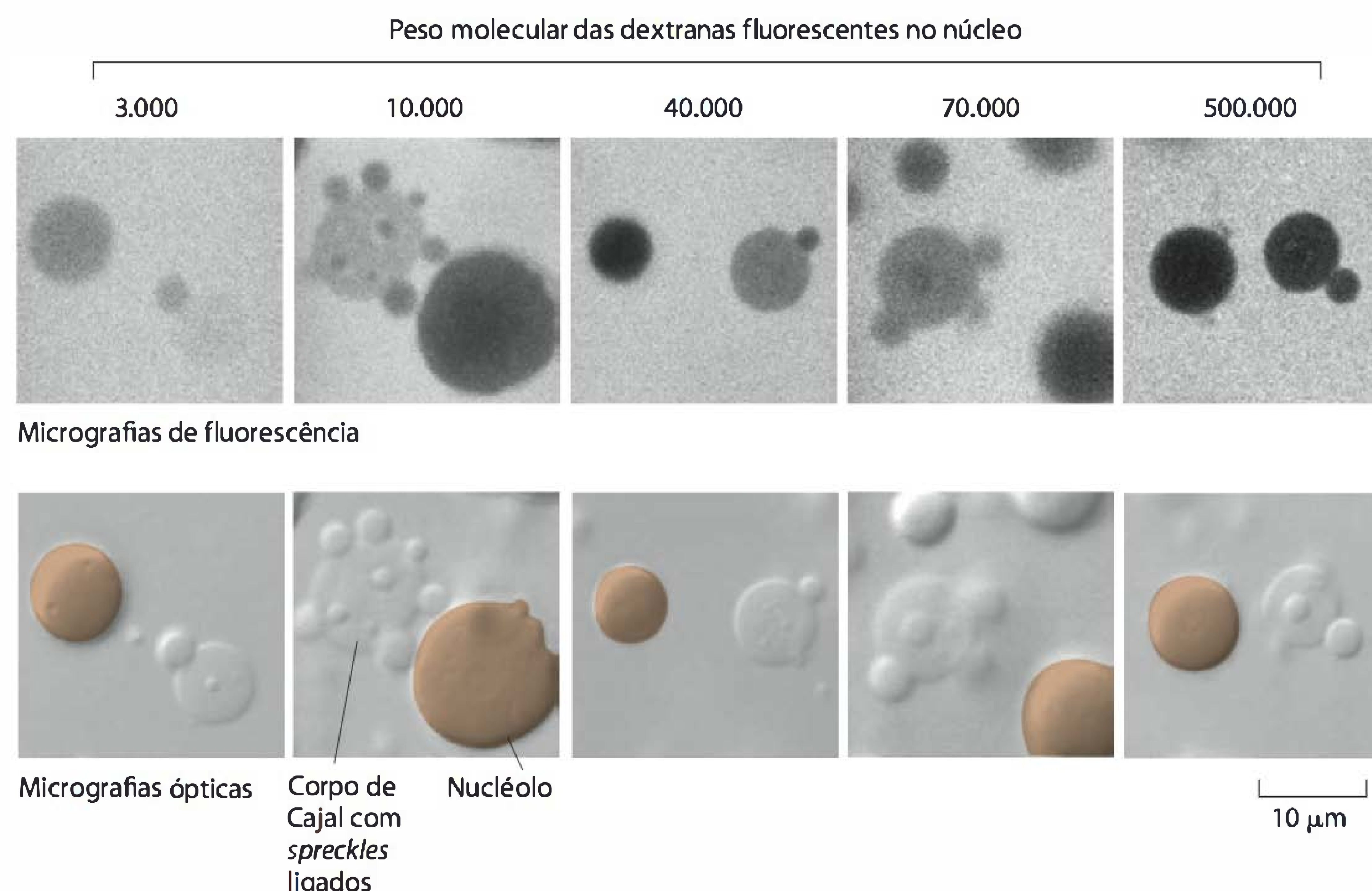


Figura 4-68 Experimento mostrando que as organelas subnucleares são muito permeáveis a macromoléculas. Nestas micrografias de um núcleo de oócito vivo, a coluna superior compara a fluorescência no interior de nucléolos, corpos de Cajal e *spreckles* à fluorescência do nucleoplasma das proximidades, 12 horas após as dextranas fluorescentes com o peso molecular indicado serem injetadas no nucleoplasma. O brilho de cada organela reflete sua permeabilidade, sendo que a mais permeável é a mais brilhante. Para comparação, a coluna inferior apresenta micrografias ópticas normais dos mesmos campos microscópicos, com os nucléolos de cada campo marcados em *marrom* para distinção. Os corpos de Cajal são mais permeáveis que os nucléolos. Porém, a quantificação mostra que uma grande parte de dextranas entra em cada organela, mesmo as maiores dextranas verificadas. (De K. E. Handwerger, J. A. Cordero e J. G. Gall, *Mol. Biol. Cell* 16:202-211, 2005. Com permissão da American Society of Cell Biology.)

biológicos no citoplasma, aumentando a velocidade específica da reação (para exemplos, ver Figura 16-38).

Existe também uma estrutura de sustentação intranuclear, análoga ao citoesqueleto, na qual os cromossomos e outros componentes do núcleo estão organizados? A *matriz nuclear* é definida como o material insolúvel que permanece no núcleo após uma série de etapas de extração bioquímica. Muitas das proteínas e moléculas de RNA que formam esse material insolúvel provavelmente sejam derivadas dos subcompartimentos nucleares fibrosos, discutidos anteriormente, enquanto outras parecem ser proteínas que auxiliam a formar a base das alças cromossômicas ou que ligam os cromossomos a outras estruturas no núcleo. Ainda

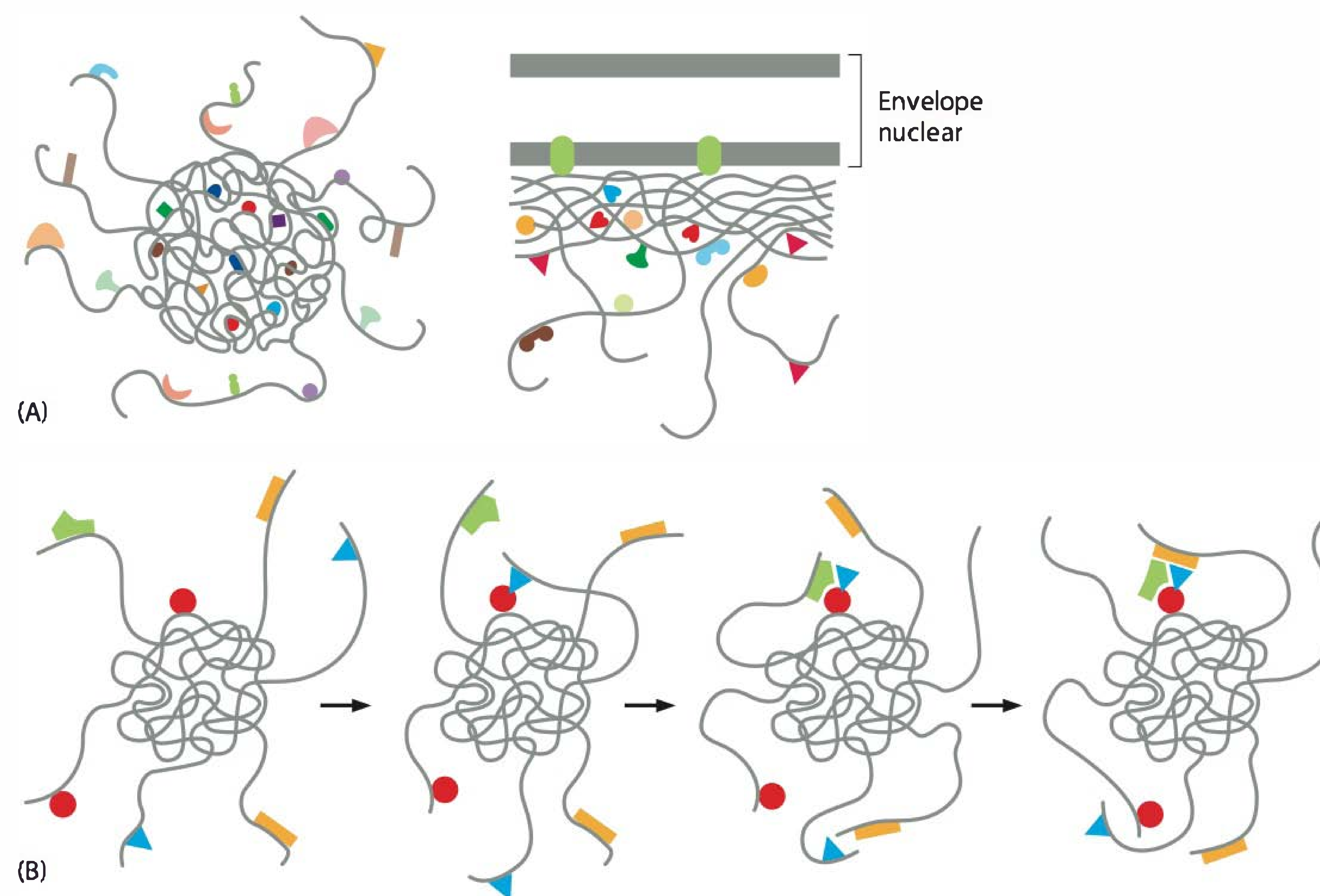


Figura 4-69 Compartimentalização efetiva sem a membrana bicamada. (A) Ilustração esquemática da organização de uma organela subnuclear esférica (*à esquerda*) e um subcompartimento possivelmente organizado de modo semelhante, logo abaixo do envelope nuclear (*à direita*). Em ambos os casos, os RNAs e/ou as proteínas (em *cinza*) se associam, formando estruturas altamente porosas, como um gel, que contêm os sítios de ligação para outras proteínas e moléculas de RNA específicas (*objetos coloridos*). (B) Forma pela qual a união de um grupo determinado de proteínas e moléculas de RNA a longas cadeias flexíveis de polímero, como em A, pode criar áreas organizadas que aceleram bastante a velocidade de reação em subcompartimentos do núcleo. As reações catalisadas dependem das macromoléculas localizadas na união. O mesmo tipo de aceleração da velocidade é, obviamente, esperado para subcompartimentos similares estabelecidos em outros locais da célula (ver também Figura 3-80C).

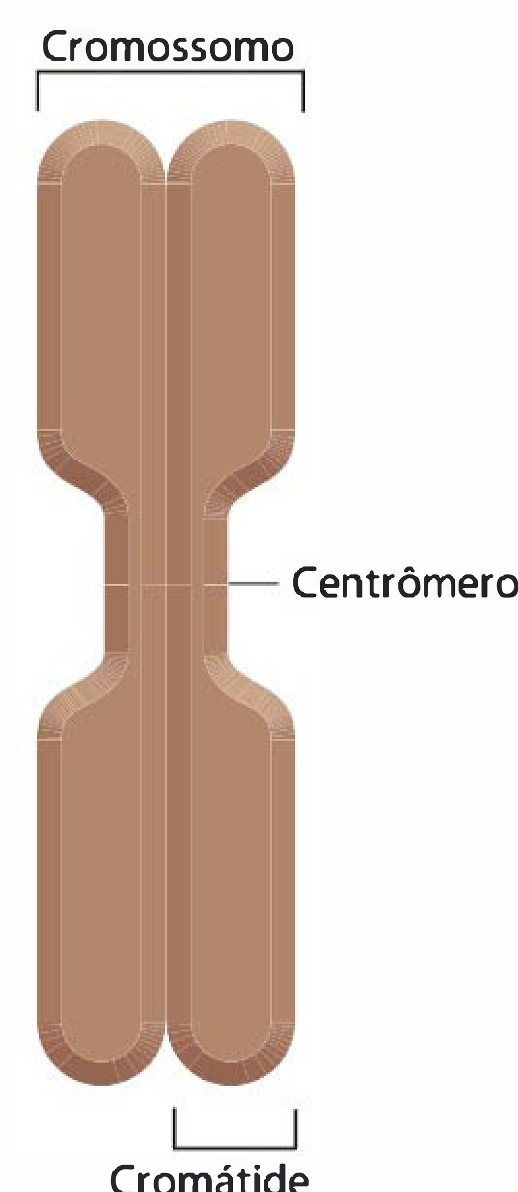


Figura 4-70 Cromossomo mitótico típico de metáfase. Cada cromátide-irmã contém uma das duas moléculas-filhas de DNA idênticas, produzidas previamente no ciclo celular pela replicação de DNA (ver também Figura 17-26).

está sendo investigado se o núcleo contém ou não longos filamentos que formam caminhos organizados, nos quais os componentes nucleares poder se mover, como acontece com os filamentos do citoplasma.

Cromossomos mitóticos são formados pela cromatina no seu estado mais condensado

Após discutirmos a estrutura dinâmica dos cromossomos interfásicos, veremos agora os cromossomos mitóticos. Os cromossomos de quase todas as células eucarióticas tornam-se prontamente visíveis ao microscópio óptico durante a mitose, quando formam espirais e produzem estruturas altamente condensadas. Essa condensação reduz o comprimento de um cromossomo interfásico típico em apenas cerca de dez vezes, mas produz uma alteração drástica na aparência dos cromossomos.

A **Figura 4-70** representa um **cromossomo mitótico** típico no estágio da metáfase (para estágios da mitose, ver Figura 17-3). As duas moléculas-filhas de DNA produzidas na replicação, durante a interfase do ciclo de divisão celular, são dobradas separadamente, produzindo dois cromossomos-irmãos, ou *cromátides-irmãs*, unidas pelos centrômeros (ver também Figura 4-50). Esses cromossomos normalmente são recobertos por várias moléculas, incluindo grandes quantidades de complexos de proteína-RNA. Uma vez removido o complexo, cada cromátide pode ser vista, em microscopia eletrônica, como alças organizadas de cromatina que emanam de uma estrutura central (**Figura 4-71**). Experimentos de hibridização de DNA para detectar sequências específicas de DNA demonstraram que a ordem das características visíveis ao longo de um cromossomo mitótico reflete, grosseiramente, a ordem dos genes dispostos nessa molécula de DNA. A condensação dos cromossomos mitóticos pode, portanto, ser vista como o nível final da hierarquia de compactação cromossômica (**Figura 4-72**).

A compactação dos cromossomos na mitose é um processo extremamente organizado e dinâmico, que serve a pelo menos dois propósitos. Primeiro, quando a condensação é completada (na metáfase), as cromátides-irmãs estão desemaranhadas umas das outras e dispostas lado a lado. Assim, as cromátides-irmãs podem ser facilmente separadas quando a maquinaria mitótica puxa uma para cada lado. Segundo, a compactação dos cromossomos protege as moléculas de DNA, relativamente frágeis, de quebras no momento da separação entre as células-filhas.

A condensação dos cromossomos da interfase em cromossomos mitóticos começa no início da fase M e está intimamente relacionada à progressão do ciclo celular, como discutido em detalhes no Capítulo 17. Durante a fase M, a expressão gênica é suspensa, e ocorrem modificações específicas nas histonas que auxiliam na reorganização da cromatina, à medida que esta é compactada. A compactação é auxiliada por uma classe de proteínas denominadas *condensinas*, as quais usam a energia da hidrólise do ATP para promover a formação de espirais nas duas moléculas de DNA de um cromossomo interfásico, produzindo dois cromossomos mitóticos. As condensinas são grandes complexos proteicos formados por dímeros de proteínas SMC: esses dímeros são formados quando dois monômeros rígidos e alongados da proteína juntam-se pelas caudas e formam uma dobradiça com dois domínios de cabeça globulares nas extremidades, os quais ligam-se ao DNA e hidrolisam ATP (**Figura 4-73**). Quando adicionadas a um DNA purificado, as condensinas produzem alças voltadas para a direita nas moléculas de DNA, em uma reação que requer ATP. Embora ainda não se saiba como elas atuam na cromatina, o modelo de compactação mostrado na Figura 4-73C tem como base o fato de que as condensinas são os principais componentes estruturais dos cromossomos da metáfase, com aproximadamente uma molécula de condensina para cada

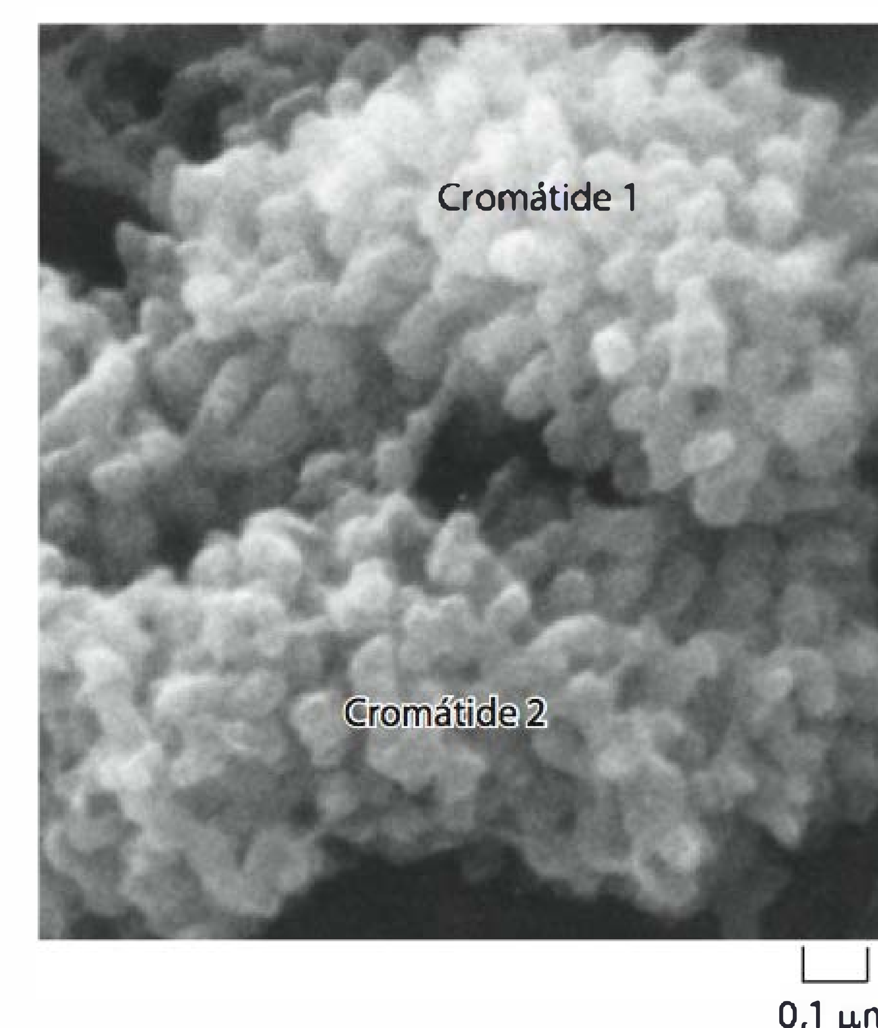


Figura 4-71 Micrografia eletrônica de varredura de uma região próxima de uma das extremidades de um cromossomo mitótico típico. Acredita-se que cada projeção nodular represente a extremidade de um domínio em alça. Note que as duas cromátides idênticas pareadas (representadas na Figura 4-70) podem ser claramente distinguidas. (De M. P. Marsden e U. K. Laemmli, *Cell* 17:849-858, 1979. Com permissão de Elsevier.)

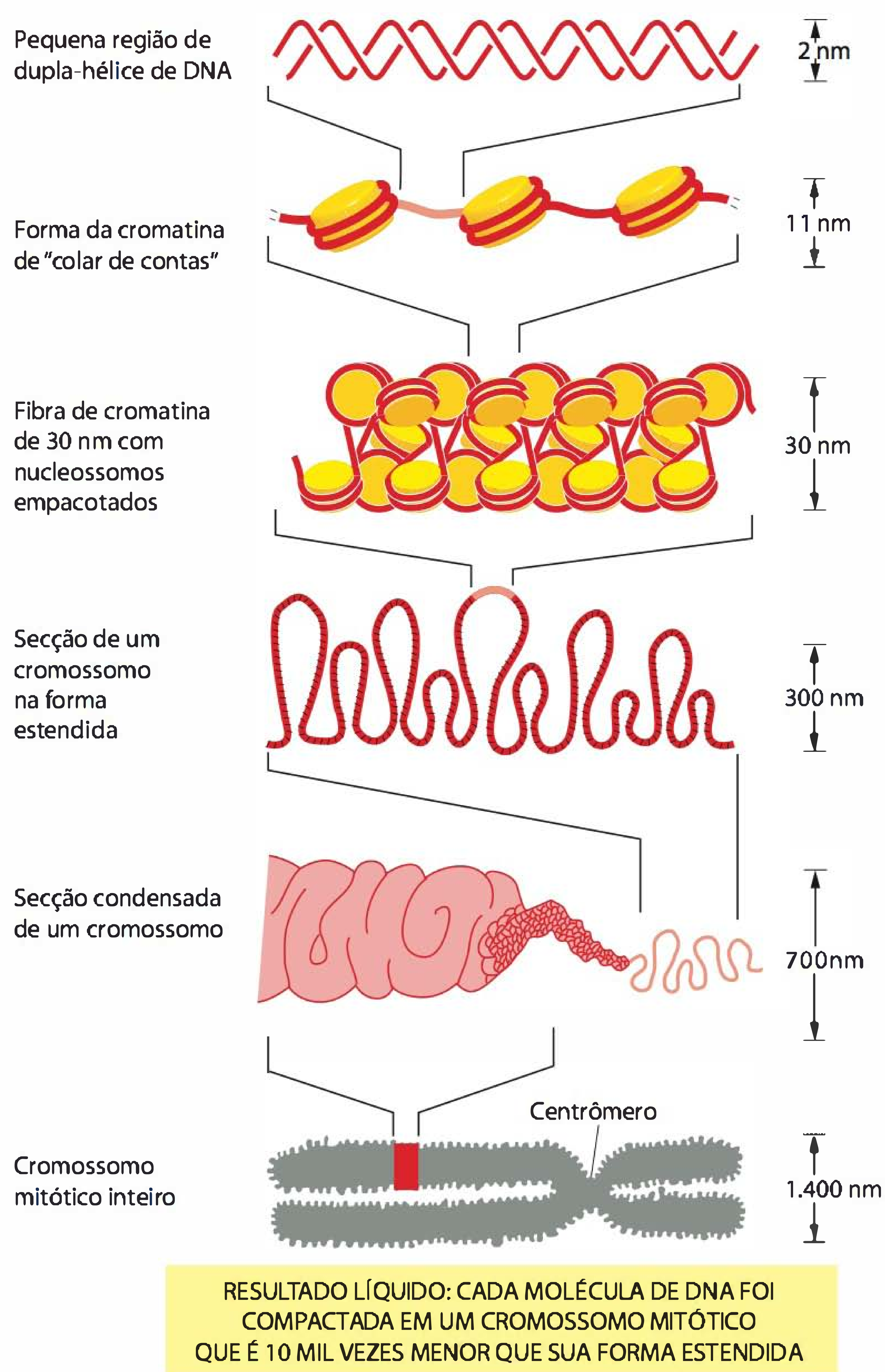
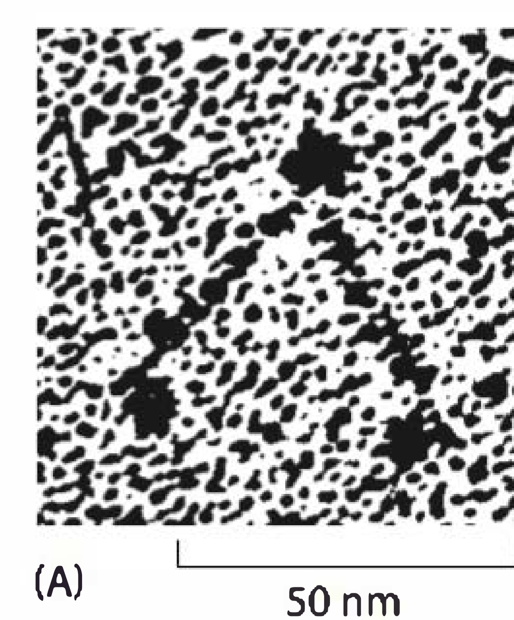


Figura 4-72 Compactação da cromatina. Este modelo mostra alguns dos muitos níveis de compactação da cromatina, postulados para explicar a estrutura altamente condensada do cromossomo mitótico.



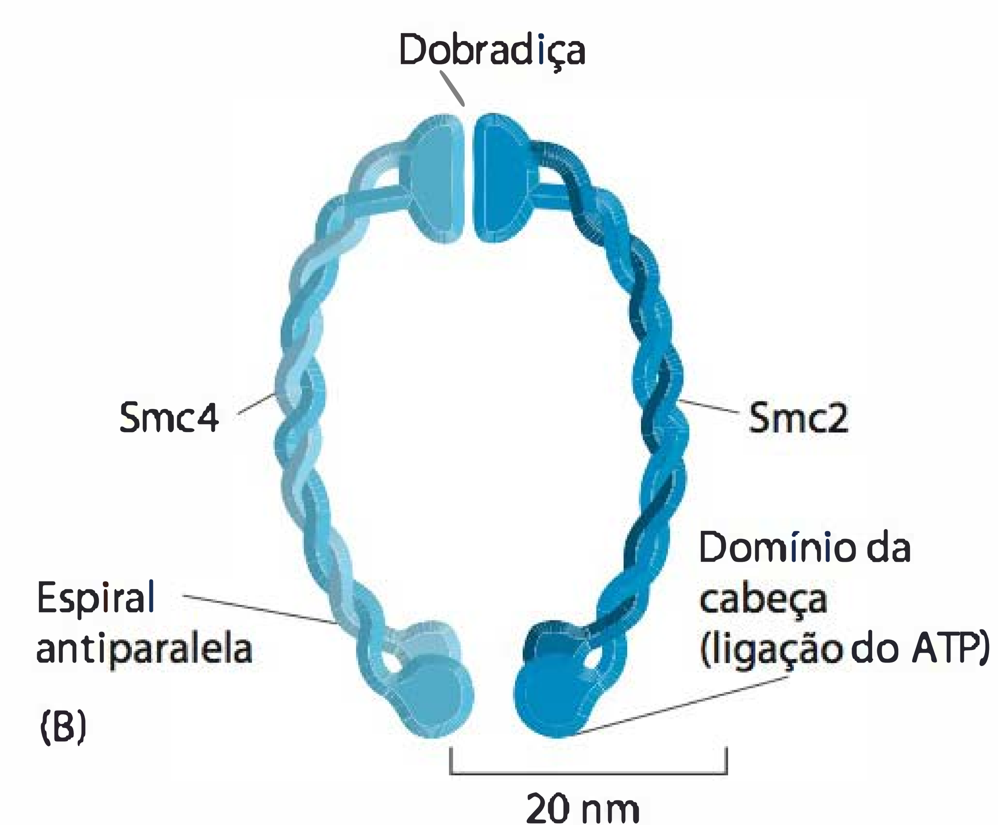
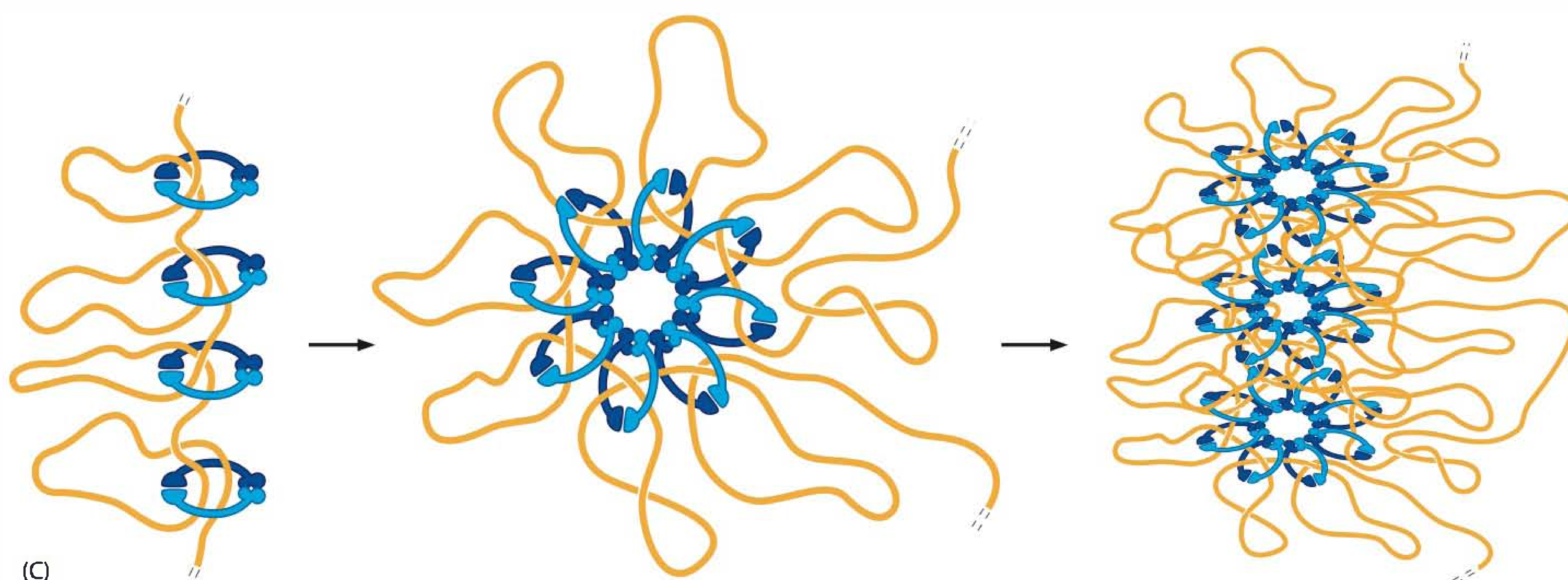


Figura 4-73 Proteínas SMC nas condensinas. (A) Micrografia eletrônica de um dímero de SMC purificado. (B) Estrutura de um dímero de SMC. A longa região central dessa proteína é uma espiral antiparalela (ver Figura 3-9) com uma região de dobradiça flexível no centro. (C) Um modelo para o modo em que as proteínas SMC nas condensinas podem compactar a cromatina. Na realidade, as proteínas SMC são componentes de um complexo maior de condensinas. Foi proposto que, na célula, as condensinas enrolam grandes segmentos de domínios de cromatina em alças (ver Figura 4-57). Dessa forma, as condensinas formam o arcabouço estrutural que mantém o DNA precisamente organizado durante a metáfase do ciclo celular. (A, cortesia de H. P. Erickson; B e C, adaptadas de T. Hirano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 7:311-322, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



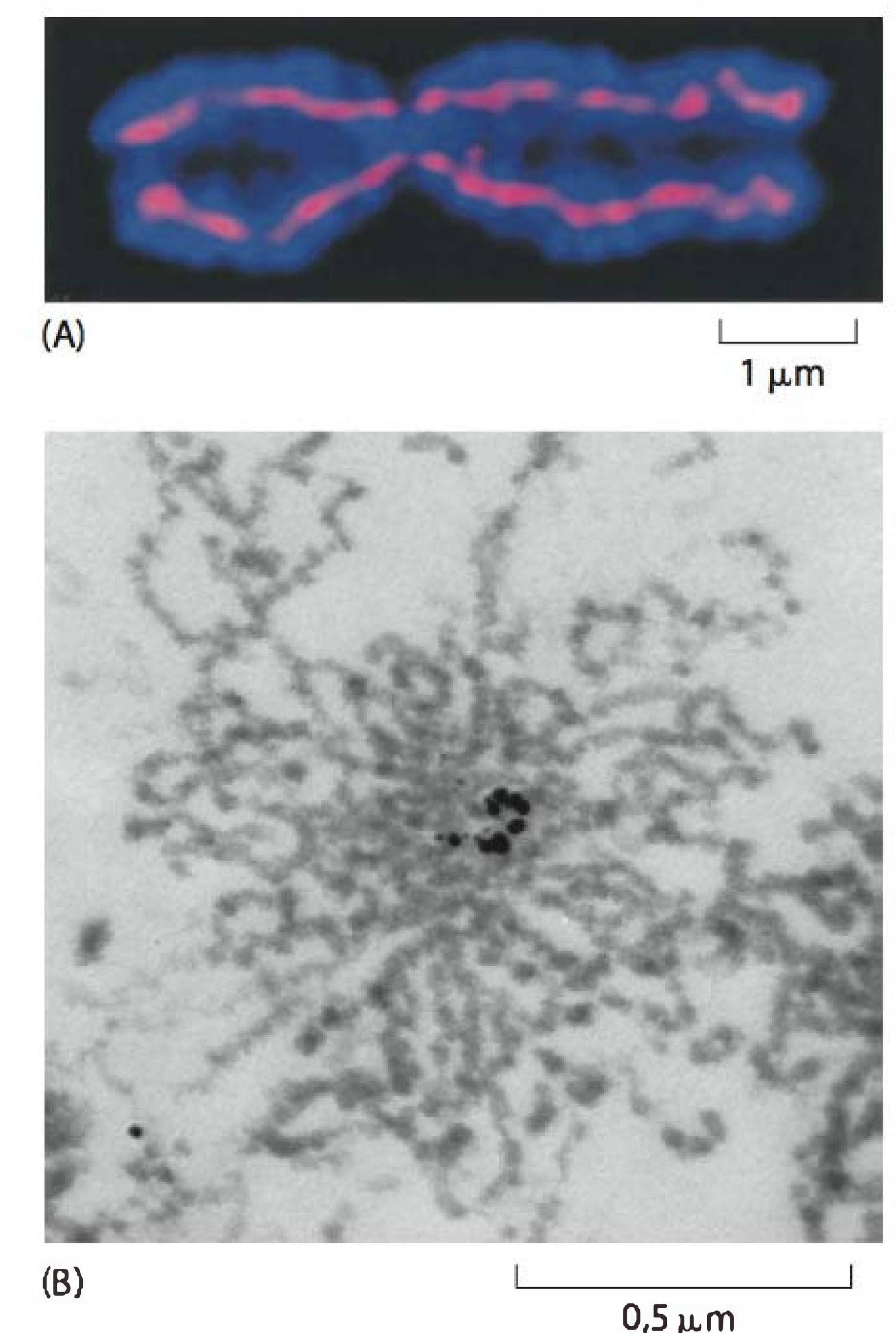


Figura 4-74 Localização da condensina nos cromossomos mitóticos condensados. (A) Micrografia de fluorescência de um cromossomo humano em mitose, corado com um anticorpo que localiza a condensina. Em cromossomos altamente condensados, a condensina é vista concentrada em estruturas puntiformes ao longo do eixo do cromossomo. Experimentos semelhantes mostraram uma localização similar para a DNA-topoisomerase II, uma enzima que provoca quebras de fita dupla reversíveis no DNA, permitindo que uma dupla-hélice passe pela outra (ver Figura 5-23). (B) A microscopia eletrônica *immunogold* revela a localização da condensina (*pontos pretos*). Aqui, a cromátide é vista em corte transversal, com o eixo do cromossomo perpendicular ao plano do papel. (A, de K. Maeshima e U. K. Laemmli, *Dev. Cell* 4:467-480, 2003. Com permissão de Elsevier. B, cortesia de U. K. Laemmli, de K. Maeshima, M. Eltsov e U. K. Laemmli, *Chromosoma* 114: 365-375, 2005. Com permissão de Springer.)

10 mil nucleotídeos de DNA (**Figura 4-74**). Quando as condensinas são experimentalmente removidas de uma célula, a condensação cromossômica ainda acontece, mas o processo é anormal.

Resumo

Geralmente os cromossomos estão descondensados durante a interfase, de forma que os detalhes em sua estrutura são difíceis de visualizar. Exceções notáveis são os cromossomos plumosos especializados dos oócitos de vertebrados e os cromossomos politênicos das células secretoras gigantes de insetos. Estudos desses dois tipos de cromossomos interfásicos sugerem que cada molécula de DNA em um cromossomo está dividida em um grande número de domínios discretos e organizados como alças de cromatina, e que cada alça provavelmente consista em uma fibra de cromatina de 30 nm que é adicionalmente compactada por dobramento. Quando os genes contidos em uma alça são expressos, a alça é desdobrada e per ite que a maquinaria celular tenha fácil acesso ao DNA.

Os cromossomos interfásicos ocupam territórios discretos no núcleo celular; isto é, eles não estão extensivamente entrelaçados. A eucromatina constitui a maior parte do cromossomo interfásico, sendo provável que, quando não está sendo transcrita, apresente a forma de fibras de 30 nm fortemente dobradas. Entretanto, ela é interrompida por segmentos de heterocromatina, em que as fibras de 30 nm estão sujeitas a níveis adicionais de empacotamento, o que normalmente as torna resistentes à expressão gênica. A heterocromatina apresenta-se de várias formas, algumas encontradas em grandes blocos nos centrômeros e ao redor deles, assim como próximas aos telômeros. Porém, a heterocromatina também está presente em outras posições nos cromossomos, onde atua na regulação de genes importantes do desenvolvimento.

O interior do núcleo é altamente dinâmico, com a heterocromatina normalmente posicionada próxima ao envelope nuclear e as alças de cromatina movendo-se para fora de seu território cromossômico durante a alta expressão de seus genes. Isso reflete a existência de subcompartimentos nucleares, em que diferentes grupos de reações bioquímicas são facilitados por um aumento na concentração de proteínas e RNAs selecionados. Os componentes envolvidos na formação dos subcompartimentos podem formar organelas discretas como os nucléolos e os corpos de Cajal, podendo também ser presos a estruturas fixas como o envelope nuclear.

Durante a mitose, a expressão gênica é desligada e todos os cromossomos adotam uma conformação extremamente condensada, em um processo que começa no início da fase M e empacota as duas moléculas de DNA de cada cromossomo replicado como duas cromátides dobradas separadamente. Esse processo é acompanhado por modificações nas histonas que facilitam o empacotamento da cromatina. Esse processo ordenado, que reduz o comprimento de cada molécula de DNA na interfase em cerca de dez vezes de ponta a ponta, requer proteínas chamadas de condensinas.

COMO OS GENOMAS EVOLUEM

Neste capítulo, discutimos a estrutura dos genes e as maneiras como são empacotados e organizados nos cromossomos. Nesta seção final, apresentaremos uma visão geral de como os genes e os genomas evoluíram ao longo do tempo, produzindo a grande diversidade de formas de vida atuais no nosso planeta. O sequenciamento de genomas revolucionou nosso

entendimento a respeito do processo de evolução molecular, revelando uma riqueza impressionante de informações sobre interações de famílias específicas entre organismos, bem como um esclarecimento dos mecanismos evolutivos.

Talvez não seja de surpreender que genes com funções semelhantes possam ser encontrados em uma variedade de coisas vivas. Contudo, a grande revelação dos últimos 25 anos foi a descoberta de que sequências nucleotídicas atuais de vários genes são suficientemente conservadas em genes **homólogos** – isto é, genes semelhantes na sua sequência nucleotídica e na sua função devido a um ancestral comum – que frequentemente podem ser reconhecidos mesmo através de vastas distâncias filogenéticas. Por exemplo, homólogos de vários genes humanos podem ser facilmente detectados em organismos como vermes nematódeos, mosca-das-frutas, leveduras, e até mesmo bactérias. Em muitos casos, a semelhança é tão próxima que a porção que codifica a proteína de um gene de leveduras pode ser substituída por seu homólogo humano – mesmo que humanos e leveduras estejam separados por mais de um bilhão de anos de história evolutiva.

Como enfatizado no Capítulo 3, o reconhecimento de similaridades de sequência tornou-se uma ferramenta importante para associar um gene a uma função proteica. Embora encontrar uma sequência similar não garanta similaridade de função, está provado que fornece indicações excelentes. Assim, é possível predizer a função de genes em humanos sobre os quais não há informações bioquímicas ou genéticas disponíveis simplesmente pela comparação de suas sequências com as sequências de genes em outros organismos.

Em geral, as sequências dos genes são mais fortemente conservadas do que a estrutura total do genoma. Como vimos anteriormente, outras características da organização dos genomas, como tamanho, número de cromossomos, ordem dos genes ao longo do cromossomo, abundância e tamanho dos íntrons, e quantidade de DNA repetitivo, variam bastante entre organismos, bem como o número de genes que um organismo contém.

O número de genes é apenas aproximadamente correlacionado à complexidade fenotípica de um organismo (Ver Tabela 1-1). Muito do aumento do número de genes observado de acordo com o aumento da complexidade biológica envolve a expansão de famílias de genes intimamente relacionadas, uma observação que estabelece a duplicação gênica e a divergência como processos evolutivos fundamentais. Na verdade, parece que todos os genes dos organismos atuais são descendentes – por meio de processos de duplicação, divergência e rearranjo de segmentos gênicos – de alguns poucos genes ancestrais que existiram nas formas de vida primordiais.

Alterações no genoma são causadas por falhas dos mecanismos normais de cópia e manutenção do DNA

As células germinativas não possuem mecanismos especializados para produzir alterações na estrutura de seus genomas; ao invés disso, a evolução depende de acidentes e erros seguidos por sobrevivência não-aleatória. A maioria das alterações genéticas que ocorrem resulta, simplesmente, de falhas nos mecanismos normais pelos quais os genomas são copiados e corrigidos quando danificados, embora o movimento dos elementos transponíveis de DNA também desempenhe função importante. Como discutiremos no Capítulo 5, os mecanismos que mantêm as sequências de DNA são extremamente precisos – mas não são perfeitos. Por exemplo, como os elaborados mecanismos de replicação e reparo de DNA permitem que as sequências de DNA sejam herdadas com extraordinária fidelidade ao longo de uma linha de descendentes, somente um par de nucleotídeos em mil é alterado aleatoriamente na linhagem germinativa a cada milhão de anos. Mesmo assim, em uma população de 10 mil indivíduos diploides, cada substituição nucleotídica possível será "testada" cerca de 20 vezes durante um milhão de anos – um período pequeno em relação à evolução das espécies.

Erros na duplicação, na recombinação ou no reparo de DNA podem resultar em alterações simples na sequência de DNA – como a substituição de um par de bases por outro – ou em rearranjos de larga escala no genoma, como deleções, duplicações, inversões e translocações no DNA de um cromossomo para outro. Além dessas falhas na maquinaria genética, os diversos elementos móveis de DNA, que serão descritos no Capítulo 5, são uma fonte importante de alterações genômicas (ver Tabela 5-3, p. 318). Esses elementos transponíveis de DNA (*transposons*) são sequências de DNA parasitas que colonizam e se distribuem nos

genomas. No processo, eles frequentemente interrompem a função ou alteram a regulação dos genes existentes. Às vezes, podem até criar genes novos através de fusões entre as sequências do transposon e segmentos dos genes existentes. Durante longos períodos evolutivos, os transposons afetaram profundamente a estrutura dos genomas. Na verdade, quase metade do DNA no genoma humano possui uma similaridade de sequência reconhecível com sequências de transposons conhecidos, indicando que essas sequências são remanescentes de eventos de transposição ocorridos no passado (ver Figura 4-17). Sem dúvida, uma parcela maior ainda do nosso genoma deriva de eventos de transposição que ocorreram há muito tempo (> 10^8 anos), de modo que algumas sequências nem podem mais ser correlacionadas a transposons.

As sequências genômicas de duas espécies diferem na mesma proporção do período que ocorreu sua separação evolutiva

As diferenças entre os genomas de espécies vivas atualmente acumularam mais de três bilhões de anos. Na ausência de um registro direto das alterações durante esse período, é possível reconstruir o processo de evolução do genoma a partir de comparações detalhadas dos genomas de organismos contemporâneos.

A ferramenta básica da genômica comparada é a árvore filogenética. Um simples exemplo é a árvore que descreve a divergência entre os humanos e os grandes macacos (**Figura 4-75**). O primeiro suporte para essa árvore deriva de comparações entre sequências de genes e proteínas. Por exemplo, comparações entre as sequências de genes e proteínas humanas e de macacos normalmente revelam as pouquíssimas diferenças entre humanos e chimpanzés e as maiores entre humanos e orangotangos.

Para organismos intimamente relacionados como humanos e chimpanzés, é relativamente fácil reconstruir as sequências gênicas extintas do último ancestral comum entre as duas espécies (**Figura 4-76**). A grande similaridade entre os genes humanos e de chimpanzés resulta, principalmente, do reduzido período disponível para o acúmulo de mutações nas duas linhagens divergentes, e não de limitações funcionais que mantiveram as mesmas sequências. Evidências para essa proposta surgiram da observação de que mesmo as sequências de DNA cuja ordem nucleotídica é funcionalmente restrita – como as sequências que codificam para fibrinopeptídeos (ver p. 264) ou a terceira posição dos códons "sinônimos" (códons que especificam o mesmo aminoácido – ver Figura 4-76) – são quase idênticas em humanos e chimpanzés.

Para organismos menos relacionados, como humanos e galinhas (cuja distância de separação evolutiva é de aproximadamente 300 milhões de anos), a conservação entre as sequências encontradas nos genes é em grande parte devida à **seleção de purificação** (isto é, a seleção que elimina indivíduos com mutações que interferem em funções genéticas importantes), e não a um período inadequado para a ocorrência de mutações. Como resultado, frequentemente as sequências de DNA que codificam para proteínas, para RNAs e sequências reguladoras são visivelmente conservadas. Em contraste, a maior parte das sequências de DNA nos genomas de humanos e galinhas divergiu devido a múltiplas mutações, de forma que é praticamente impossível alinhá-las.

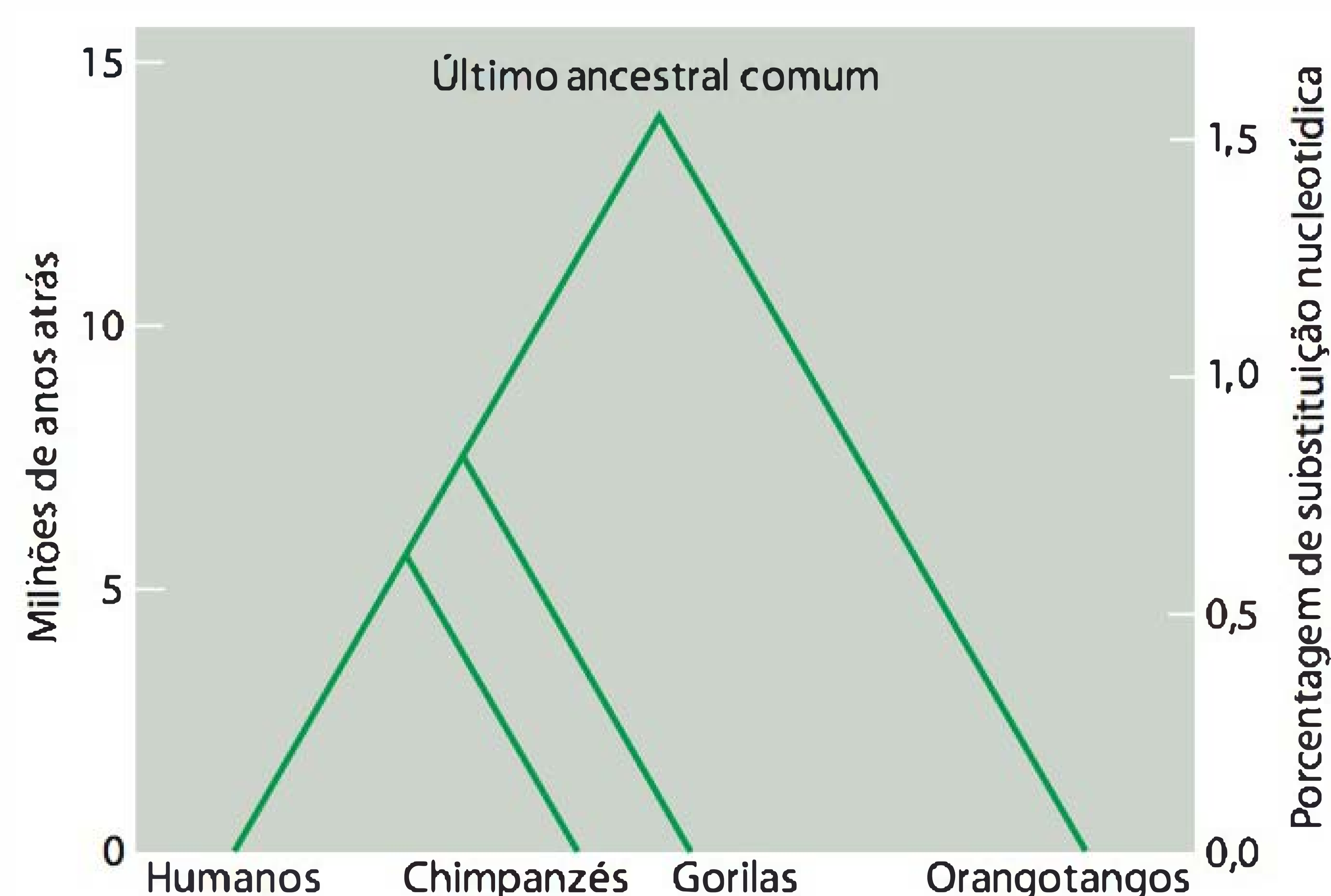


Figura 4-75 Árvore filogenética mostrando a correlação entre humanos e os grandes macacos com base nos dados de sequência nucleotídica. Como indicado, estima-se que a diferença entre as sequências dos genomas das quatro espécies e a sequência genômica de um último ancestral comum seja de pouco mais de 1,5%. Como as alterações ocorrem independentemente nas duas linhagens divergentes, comparações entre os pares revelam o dobro da divergência de sequência do último ancestral comum. Por exemplo, comparações humanos-orangotangos normalmente apresentam divergências de sequência de pouco mais de 3%, enquanto humanos-chimpanzés mostram divergências de aproximadamente 1,2%. (Modificada de F. C. Chen e W. H. Li, *Am. J. Hum. Genet.* 68:444-456, 2001. Com permissão da University of Chicago Press.)

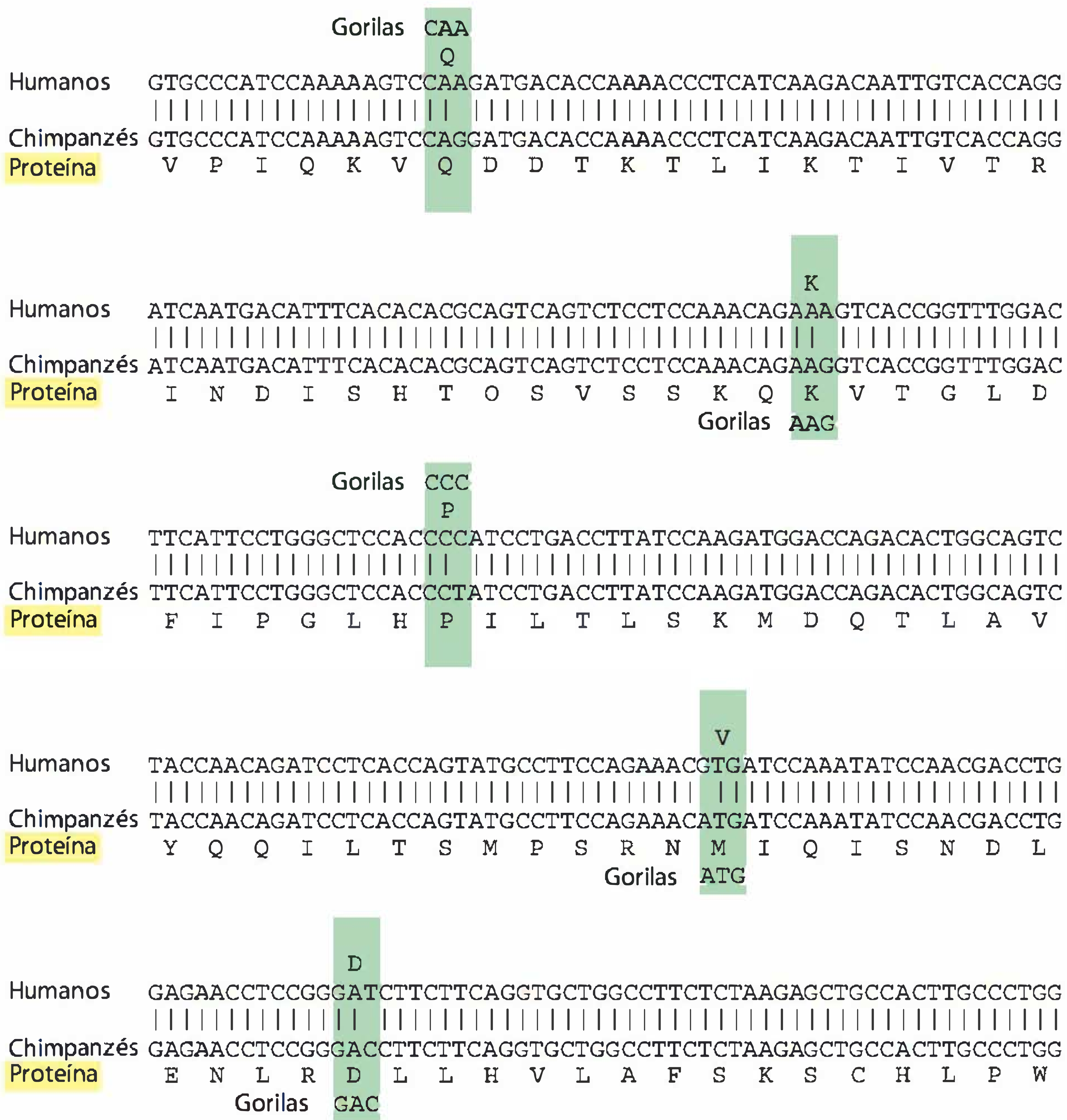


Figura 4-76 Dedução de uma sequência ancestral a partir da comparação de sequências de regiões codificantes do gene da leptina em humanos e chimpanzés. A leptina é um hormônio que regula a ingestão de alimentos e a utilização de energia em resposta à adequação de reservas de gordura. Como indicado pelos códons nos retângulos em verde, apenas 5 nucleotídeos (em um total de 441) diferem entre essas duas sequências. Além disso, quando os aminoácidos codificados por ambas as sequências são examinados, em apenas uma das cinco sequências há diferença do aminoácido. Para cada uma das 5 posições variáveis dos nucleotídeos, a sequência correspondente no gorila também é indicada. Em dois casos, a sequência do gorila concorda com a sequência de humanos, e em três casos ela concorda com a sequência do chimpanzé.

Qual seria a sequência do gene da leptina no último ancestral comum? Um modelo evolutivo que busca minimizar o número de mutações possíveis de terem ocorrido durante a evolução dos genes humanos e de chimpanzés assumiria que a sequência do gene da leptina do último ancestral comum é a mesma sequência de humanos e chimpanzés quando elas concordam; quando elas discordam, a sequência do gorila serviria para desempatar. Por conveniência, apenas os primeiros 300 nucleotídeos da sequência codificante do gene da leptina são mostrados. Os 141 restantes são idênticos em humanos e chimpanzés.

Árvores filogenéticas construídas a partir de comparações de sequências de DNA indicam as relações entre todos os organismos

A integração das árvores filogenéticas com base nas comparações de sequências e nos registros fósseis apresenta a melhor proposta disponível para a evolução das formas de vida modernas. O registro fóssil continua sendo uma importante fonte de dados absolutos com base no decaimento de radioisótopos nas formações rochosas em que os fósseis foram encontrados. Porém, períodos de divergência precisos entre espécies são difíceis de ser estabelecidos a partir de registros fósseis, mesmo para espécies que deixam fósseis satisfatórios com morfologia característica.

As árvores filogenéticas integradas sugerem que alterações nas sequências de determinados genes ou proteínas tendem a ocorrer em taxas praticamente constantes, muito embora taxas que diferem do normal em até duas vezes sejam observadas em algumas linhagens. Como discutido anteriormente e no Capítulo 5, esse "relógio molecular" anda mais rápido e regularmente nas sequências que não estão sujeitas à seleção de purificação – como regiões intergênicas, porções de íntrons que não possuem sinais de *splicing* ou regulação, e genes que tenham sido inativados de modo irreversível por mutações (chamados de pseudogenes). O relógio anda mais lentamente nas sequências sujeitas a forte restrição – por exemplo, sequências de aminoácidos de proteínas como a actina, envolvida em interações específicas com um grande número de outras proteínas e cuja estrutura é, portanto, restrita (para exemplo, ver Figura 16-18).

Ocasionalmente, uma alteração rápida ocorre em uma sequência previamente conservada. Como discutido mais adiante, tais episódios são especialmente interessantes porque parecem refletir períodos de uma forte seleção positiva para mutações que conferiram uma vantagem seletiva à linhagem particular na qual essa alteração rápida ocorreu.

A velocidade do relógio molecular é determinada pelas mutações e pelo grau de seleção de purificação em sequências determinadas. Portanto, uma calibração completamente diferente é necessária para os genes replicados e reparados por diferentes sistemas celulares. Em animais, embora não ocorra em plantas, os relógios com base nas sequências de DNA mitocondriais sem limitações funcionais andam muito mais rápido do que os relógios com

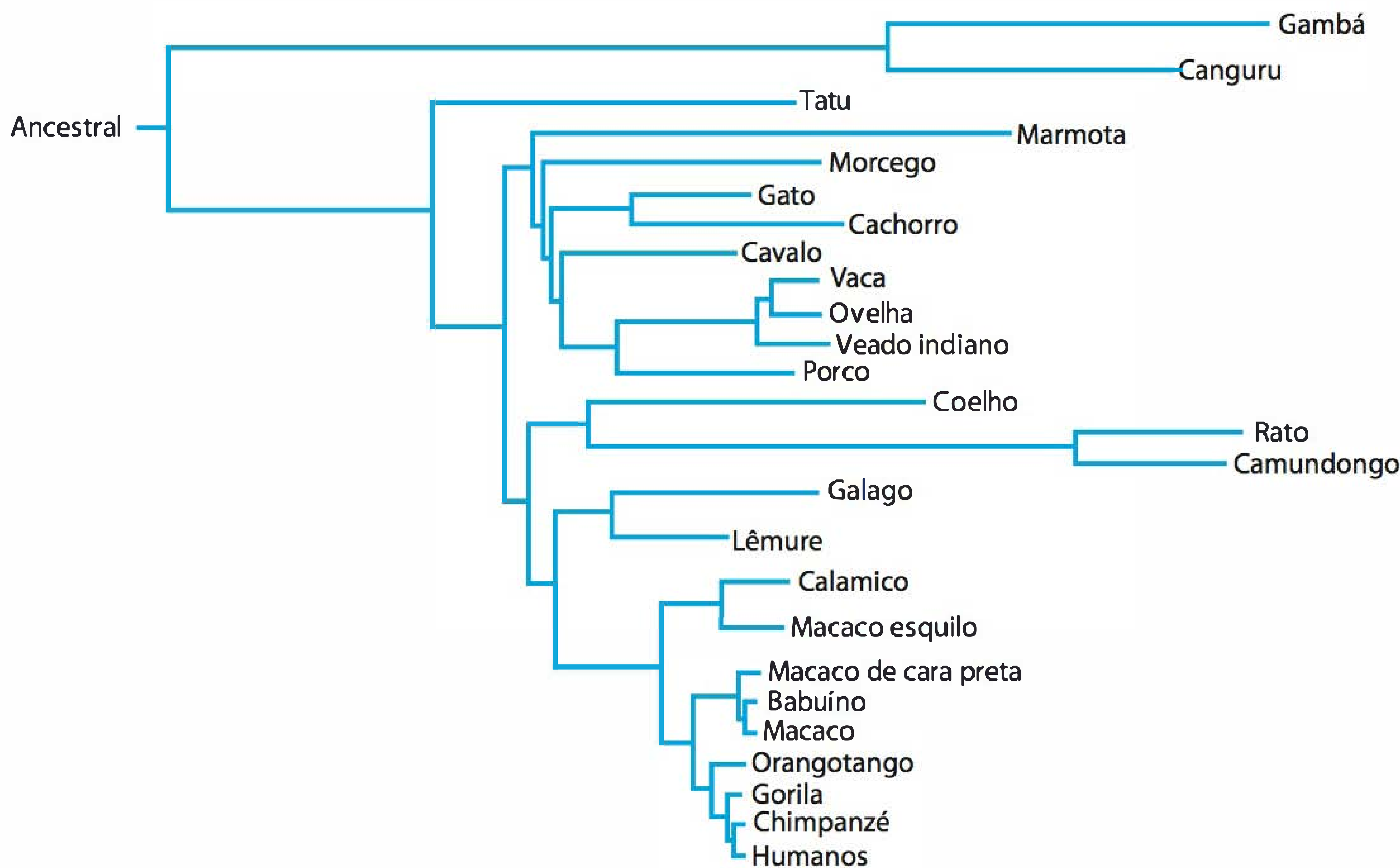


Figura 4-77 Árvore filogenética ressaltando alguns dos mamíferos cujos genomas estão sendo extensivamente estudados. O comprimento de cada linha é proporcional ao número de "substituições neutras" – representando as alterações nucleotídicas observadas na ausência de seleção de purificação. (Adaptada de G. M. Cooper et al., *Genome Res.* 15:901-903, 2005. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

base nas sequências nucleares com restrições funcionais, devido a uma taxa de mutação especialmente alta nas mitocôndrias animais.

Os relógios moleculares apresentam uma resolução de tempo mais precisa que os registros fósseis e são um guia mais confiável à estrutura detalhada das árvores filogenéticas quando comparados aos métodos clássicos, com base em comparações morfológicas e de desenvolvimento de diferentes espécies. Por exemplo, a correlação precisa entre as linhagens dos grandes macacos e dos humanos não foi estabelecida até que dados moleculares suficientes tivessem sido coletados na década de 1980, para permitir a construção da árvore mostrada na Figura 4-75. Além disso, com as enormes quantidades de sequências de DNA determinadas atualmente para uma diversidade de mamíferos, estimativas muito melhores dessas correlações estão sendo obtidas (**Figura 4-77**).

Uma comparação entre cromossomos humanos e de camundongos mostra como a estrutura dos genomas diverge

Como seria esperado, os genomas de humanos e de chimpanzés são muito mais parecidos do que os genomas de humanos e de camundongos. Embora o tamanho dos dois genomas, de humanos e de camundongos, seja aproximadamente o mesmo, e ambos contenham conjuntos quase idênticos de genes, há um período muito maior no qual mutações tiveram a oportunidade de se acumular – aproximadamente 80 milhões de anos *versus* 6 milhões de anos). Além disso, como indicado na Figura 4-77, as linhagens de roedores (representadas pelo rato e pelo camundongo) possuem relógios moleculares anormalmente rápidos. Portanto, essas linhagens divergiram da linhagem humana mais rapidamente do que o esperado.

Como indicado pela comparação de sequências de DNA na **Figura 4-78**, mutações levaram a uma extensa divergência entre homens e camundongos em todos os sítios que não estão sob seleção – como a maioria das sequências nos íntrons. Em contraste, nas comparações entre humanos e chimpanzés, quase todas as posições de sequência são as mesmas, simplesmente porque não houve tempo suficiente para que um número maior de alterações ocorresse desde o último ancestral comum.

Ao contrário da situação entre humanos e chimpanzés, a ordem local dos genes e a organização geral dos cromossomos sofreram enorme divergência entre humanos e ca-



Figura 4-78 Comparação de um segmento dos genes de leptina de humanos e camundongos. As posições em que as sequências diferem pela substituição de um único nucleotídeo estão sombreadas em *verde*, e as posições que diferem pela adição ou perda de nucleotídeos estão sombreadas em *amarelo*. Observe que a sequência codificante do éxon é muito mais conservada do que a sequência do íntron adjacente.

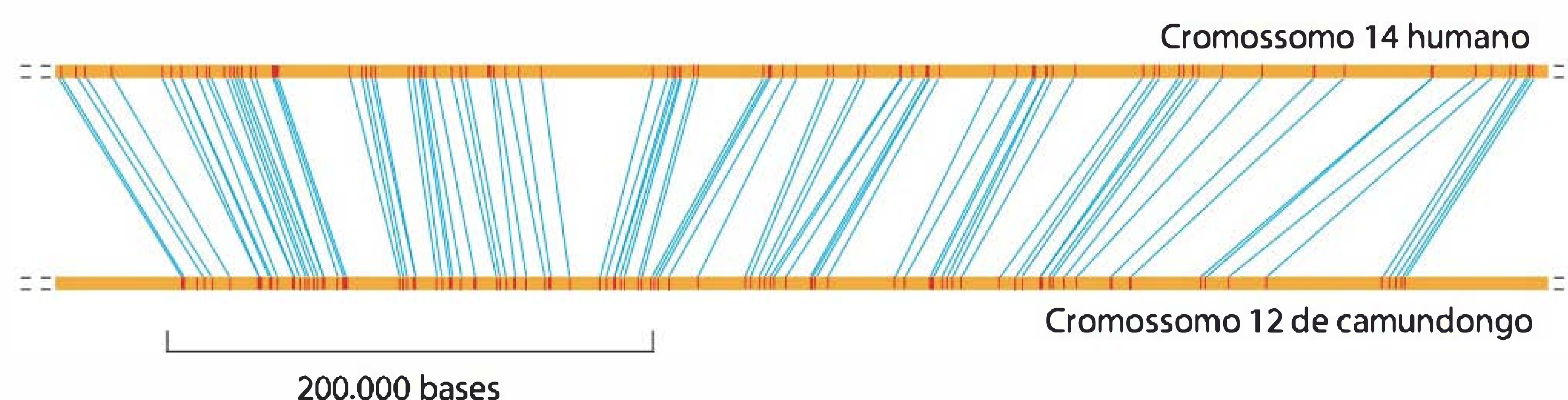


Figura 4-79 Comparação de um segmento de harmonia nos genomas de camundongos e humanos. Cerca de 90% dos dois genomas podem ser alinhados desta forma. Note que enquanto há uma ordem idêntica das sequências correspondentes (*marcas em vermelho*), há também uma perda líquida de DNA na linhagem do camundongo, espalhada por toda a região. Esse tipo de perda líquida é típico para todas as regiões como esta, sendo responsável pelo fato de o genoma de camundongos ter 14% menos DNA do que o genoma humano. (Adaptada de Mouse Sequencing Consortium, *Nature* 420:520-573, 2002. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

mundongos. De acordo com estimativas grosseiras, um total de 180 eventos de quebra e religação ocorreu nas duas linhagens desde que as duas espécies compartilharam um ancestral comum. Nesse processo, embora o número de cromossomos seja semelhante (23 por genoma haploide no homem *versus* 20 no camundongo), sua estrutura geral é bastante diferente. No entanto, mesmo após um extenso embaralhamento genômico, eles possuem grandes blocos de DNA nos quais a ordem dos genes é a mesmo em humanos e camundongos. Esses segmentos com a ordem dos genes conservada são chamados de regiões de *harmonia*.

Uma conclusão inesperada derivada da comparação dos genomas completos de humanos e de camundongos, e confirmada pela comparação com outros vertebrados, é que pequenos blocos de sequências estão sendo removidos e adicionados a genomas a uma velocidade surpreendentemente rápida. Assim, se assumirmos que nosso ancestral comum tinha o genoma do tamanho do humano (cerca de 3 bilhões de pares de nucleotídeos), os camundongos tiveram uma perda de cerca de 45% desse genoma, por deleções que foram acumuladas durante os 80 milhões de anos, enquanto os humanos tiveram uma perda de 25%. Contudo, sequências substanciais foram adquiridas por várias duplicações pequenas e pela multiplicação de transposons que compensaram essa perda. Como resultado, o tamanho do genoma humano ficou inalterado em comparação ao do ancestral comum, enquanto o genoma de camundongos foi reduzido em apenas 0,3 bilhão de nucleotídeos.

Evidências que confirmam a perda de sequências de DNA em pequenos blocos durante a evolução podem ser obtidas pela comparação detalhada da maioria das regiões de harmonia nos genomas de humanos e de camundongos. O encolhimento comparativo do genoma de camundongos pode ser claramente visto nessas comparações, com as sequências perdidas espalhadas através de longos segmentos de DNA, que se não fossem as perdas, seriam homólogos (**Figura 4-79**).

DNA pode ser adicionado aos genomas tanto pela duplicação espontânea de segmentos cromossômicos que contêm dezenas de milhares de pares de nucleotídeos (como será discutido logo) quanto pela transposição ativa (a maioria dos eventos de transposição é duplicativa, porque a cópia original do transposon permanece no local original e uma nova cópia é inserida em um novo sítio; para exemplos, ver Figura 5-74). Comparações das sequências de DNA derivadas de transposons entre humanos e camundongos prontamente revelam algumas dessas adições de sequências (**Figura 4-80**).

Por razões desconhecidas, todos os mamíferos possuem tamanhos de genomas com cerca de 3 bilhões de pares de nucleotídeos, e grupos de genes quase idênticos, mesmo que apenas uma ordem de 150 milhões de pares de nucleotídeos apresente restrições funcionais sequência-específicas.

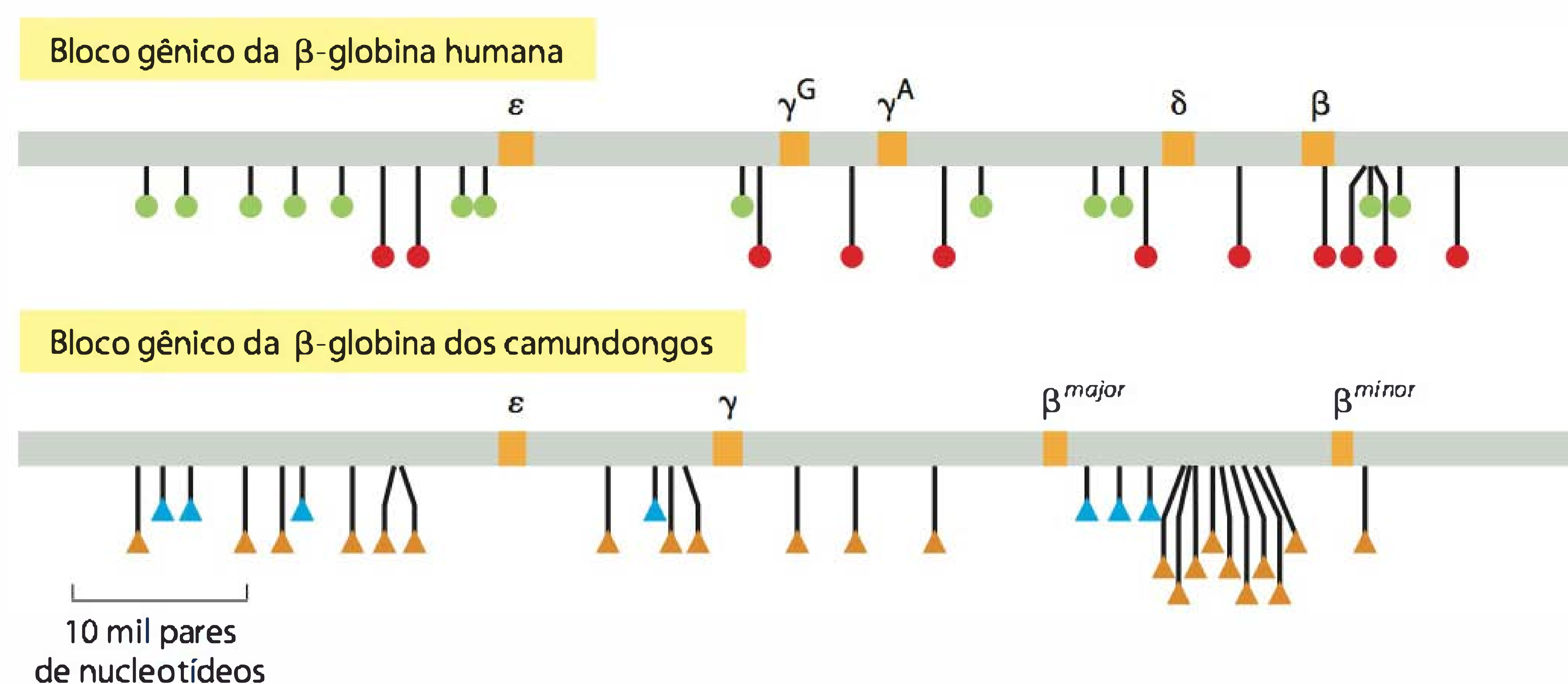


Figura 4-80 Comparação do bloco de genes da β-globina nos genomas de humanos e camundongos, mostrando a localização dos elementos transponíveis. Esse segmento do genoma humano contém cinco genes funcionais semelhantes à β-globina (em *laranja*); a região correspondente do genoma de camundongos possui apenas quatro. As posições das sequências Alu humanas estão indicadas por *círculos verdes*, e as sequências humanas L1, por *círculos vermelhos*. O genoma de camundongos contém elementos transponíveis diferentes, porém relacionados: as posições dos elementos B1 (relacionados às sequências Alu em humanos) estão indicadas por *triângulos azuis*, e as posições dos elementos L1 de camundongos (relacionados às sequências L1 em humanos) são indicadas por *triângulos em laranja*. A ausência de elementos transponíveis nos genes estruturais da globina pode ser atribuída à seleção de purificação, que teria eliminado qualquer inserção que comprometesse a função de gene. (Cortesia de Ross Hardison e Webb Miller.)

O tamanho do genoma de um vertebrado reflete a taxa relativa de adição de DNA e perda de DNA em uma linhagem

Agora que conhecemos a sequência completa de inúmeros genomas de vertebrados, vemos que o tamanho do genoma pode variar consideravelmente, aparentemente sem um efeito drástico no organismo ou no número de genes. Assim, enquanto os genomas de camundongos e de cães estão ambos dentro da faixa de tamanho típica para mamíferos, a galinha possui um genoma com aproximadamente um terço do tamanho do genoma humano (um bilhão de pares de nucleotídeos). Um exemplo especialmente notável de um organismo com genoma de tamanho anormal é o peixe baiacu *Fugu rubripes* (**Figura 4-81**), que possui um genoma muito pequeno para vertebrados (0,4 bilhão de pares de nucleotídeos em comparação ao 1 bilhão encontrado em outros peixes). O tamanho reduzido do genoma do *Fugu* é principalmente devido ao pequeno tamanho de seus íntrons. Especificamente, os íntrons de *Fugu,* bem como outros segmentos não-codificantes, não possuem o DNA repetitivo responsável por uma grande porção dos genomas nos vertebrados mais bem estudados. Por outro lado, as posições dos íntrons do *Fugu* são quase perfeitamente conservadas em relação às posições nos genomas de mamíferos (**Figura 4-82**).

Inicialmente era um mistério, mas hoje temos uma explicação para as enormes diferenças entre os tamanhos dos genomas de organismos similares: como todos os vertebrados sofrem um processo contínuo de perdas e adições de DNA, o tamanho do genoma simplesmente depende do balanço entre esses dois processos opostos que atuam há milhares de anos. Suponhamos, por exemplo, que na linhagem que gera o *Fugu*, a taxa de adição de DNA foi muito reduzida. Após longos períodos, o resultado seria uma "limpeza" do genoma desse peixe daquelas sequências de DNA cuja perda poderia ser tolerada. Retrospectivamente, o processo de seleção de purificação na linhagem do *Fugu* dividiu as sequências de DNA provavelmente funcionais de vertebrados em apenas 400 milhões de pares de nucleotídeos de DNA, fornecendo um recurso valioso para os cientistas.

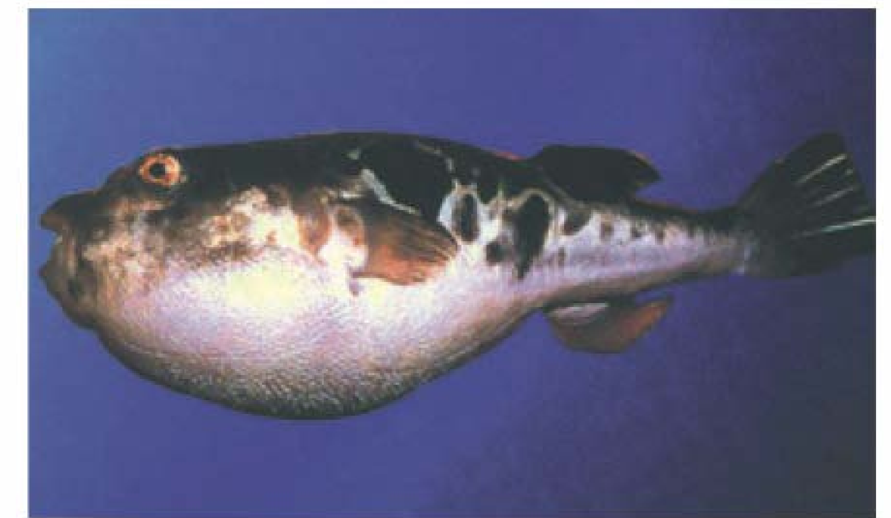


Figura 4-81 O peixe baiacu, *Fugu rubripes*. (Cortesia de Byrappa Venkatesh.)

É possível reconstruir a sequência de alguns genomas antigos

Os genomas de organismos ancestrais podem ser inferidos, mas nunca observados diretamente: não há nenhum organismo antigo vivo atualmente. Embora os organismos modernos, como o caranguejo-ferradura, sejam muito semelhantes aos ancestrais fósseis que viveram há 200 milhões de anos, não existe dúvida de que seu genoma tenha sido alterado durante todo o tempo, a uma taxa similar a que ocorre em outras linhagens evolutivas. As limitações da seleção devem ter mantido propriedades funcionais chave no genoma do caranguejo-ferradura para assegurar a estabilidade morfológica da linhagem. Entretanto, as sequências genômicas revelam que a fração do genoma sujeita à seleção de purificação é pequena; portanto, o genoma do caranguejo-ferradura moderno deve ser muito diferente do genoma de seus ancestrais extintos, conhecidos apenas pelos registros fósseis.

Existe um modo de contornar esse problema? Podemos ter esperança de decifrar grandes porções da sequência genômica de ancestrais extintos dos organismos vivos atualmente? Para organismos intimamente relacionados como humanos e chimpanzés, pode-

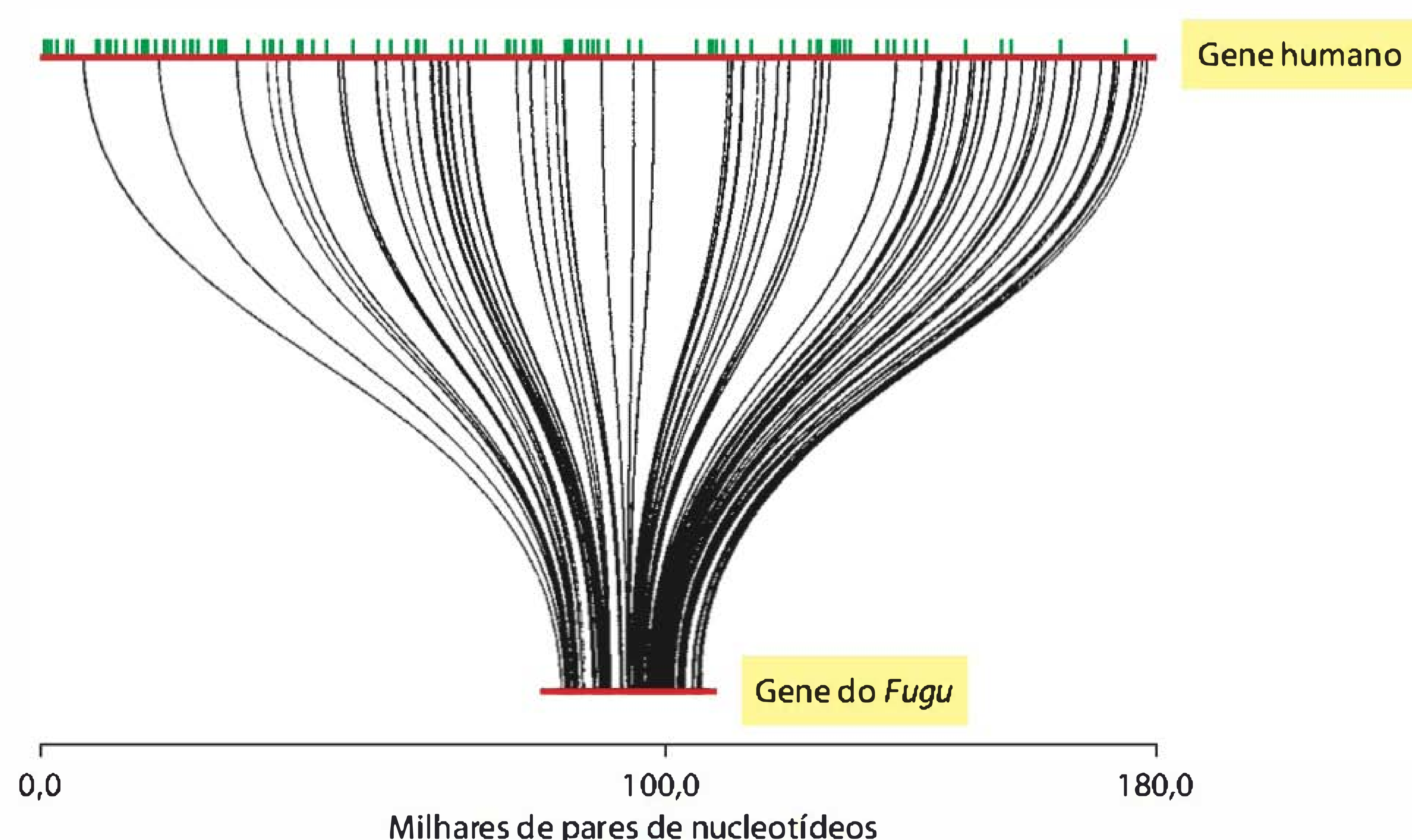


Figura 4-82 Comparação das sequências genômicas dos genes que codificam a proteína huntingtina de humanos e do *Fugu*. Ambos os genes (indicados em *vermelho*) contêm 67 pequenos éxons que se alinham com correspondência de 1:1 entre si; esses éxons são conectados por linhas curvas. O gene humano é 7,5 vezes maior que o gene do *Fugu* (180 mil *versus* 27 mil pares de nucleotídeos). A diferença no tamanho é devida exclusivamente aos íntrons, muito maiores no gene humano. O tamanho maior dos íntrons humanos é devido, em parte, à presença de retrotransposons, cujas posições são representadas por linhas verticais em *verde*; os íntrons do *Fugu* não possuem retrotransposons. Em humanos, mutações no gene da huntingtina causam a doença de Huntington, uma doença neurodegenerativa herdável. (Adaptada de S. Baxendale et al., *Nat. Genet.* 10:67-76, 1995. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

mos ver que isso não deve ser difícil. Nesse caso, a sequência do gorila pode ser usada como uma referência para resolver as pequenas diferenças entre as sequências de DNA de humanos e de chimpanzés que foram herdadas de nosso ancestral comum há cerca de 6 milhões de anos (ver Figura 4-76). Para um ancestral que tenha produzido um grande número de organismos diferentes vivos hoje, sequências de DNA de diversas espécies podem ser comparadas simultaneamente para organizar a sequência ancestral, permitindo acompanhar sequências de DNA de muito tempo atrás. Por exemplo, a partir da comparação de sequências de genomas completos de 20 mamíferos modernos, que logo estará disponível, deve ser possível decifrar a maior parte da sequência do mamífero Boreoeutério de 100 milhões de anos, que originou espécies tão distintas como cães, camundongos, coelhos, tatus e humanos (ver Figura 4-77).

Comparações múltiplas de sequência identificam sequências de DNA importantes com função desconhecida

A enorme quantidade de sequências de DNA disponíveis hoje em bancos de dados (mais de cem bilhões de pares de nucleotídeos) fornece um recurso valioso que pode ser utilizado de várias formas. Já discutimos como essa informação pode ser usada para organizar as vias evolutivas que resultaram nos organismos modernos. Porém, as comparações de sequências também fornecem indicações de como as células e os organismos funcionam. A descoberta mais importante nessa área talvez tenha sido a observação de que, embora apenas cerca de 1,5% do genoma humano codifique proteínas, cerca de três vezes essa quantidade (uns 5% do genoma no total – ver Tabela 4-1, p. 206) foram fortemente conservadas durante a evolução dos mamíferos. Essa quantidade de sequências conservadas é mais claramente observada quando os blocos de harmonia de DNA de várias espécies são alinhados e comparados. Dessa forma, as chamadas *sequências conservadas multiespécies* podem ser pronta-

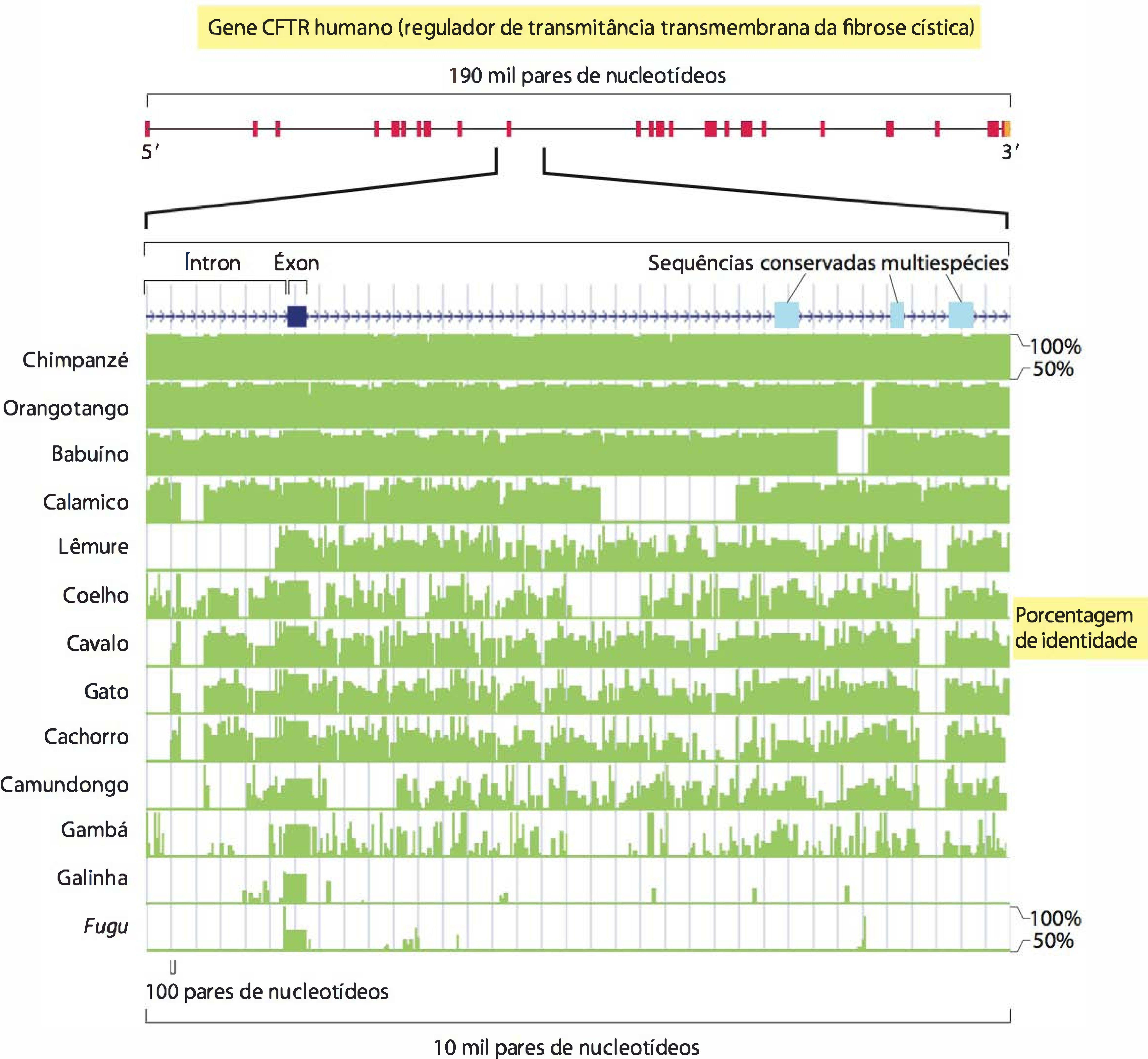


Figura 4-83 Detecção de sequências conservadas multiespécies. Neste exemplo, as sequências genômicas de cada um dos organismos mostrados foram comparadas à região indicada do gene CFTR humano, esquadrinhando 25 blocos de nucleotídeos. Para cada organismo, a porcentagem de identidade, obtida pelas sequências harmônicas, está mostrada em *verde*. Além disso, um algoritmo computacional foi usado para detectar as sequências dentro desta região que são mais conservadas quando as sequências de todos os organismos são consideradas. Além do éxon, três outros blocos de sequências conservadas multiespécies são mostrados. A função da maioria dessas sequências no genoma humano não é conhecida. (Cortesia de Eric D. Green.)

mente identificadas (**Figura 4-83**). A maioria das sequências conservadas não-codificantes descobertas assim são relativamente curtas, contendo de 50 a 200 pares de nucleotídeos. A estrita conservação implica que elas tiveram funções importantes mantidas pela seleção de purificação. O enigma é decifrar quais eram essas funções. Algumas das sequências conservadas que não codificam para proteínas codificam para moléculas de RNA não-traduzidas que têm funções importantes, como veremos em outros capítulos. Uma outra fração do DNA conservado não-codificante certamente está envolvida na regulação da transcrição de genes adjacentes, como discutido no Capítulo 7. Não sabemos ainda quanto desse DNA está envolvido nesses processos, e a maioria ainda é um mistério. A solução desse mistério certamente terá profundas consequências na medicina, e revela o quanto ainda temos a aprender sobre a biologia dos organismos vertebrados.

Como um biólogo celular pode resolver esses problemas? A primeira etapa é distinguir as regiões conservadas que codificam proteínas das não-codificantes, e daí focar naquelas que ainda não possuem função identificada, como na codificação de RNAs estruturais. A próxima tarefa é descobrir quais proteínas ou moléculas de RNA se ligam a essas sequências misteriosas de DNA, como elas são empacotadas na cromatina, e se atuaram como moldes para a síntese de RNA. A maioria dessas tarefas ainda paira sobre nós, mas um bom início já foi feito, e algumas valiosas indicações foram obtidas. Uma das questões mais intrigantes envolve as alterações evolutivas que fizeram os seres humanos diferentes dos outros animais – alterações, ou seja, sequências que foram conservadas em nossos parentes próximos, mas sofreram mudanças rápidas na sublinhagem humana.

Alterações aceleradas em sequências previamente conservadas podem auxiliar a decifrar etapas críticas na evolução humana

Tão logo as sequências genômicas de chimpanzés e de humanos foram disponibilizadas, cientistas iniciaram a busca por alterações nas sequências de DNA que poderiam responder pelas diferenças marcantes entre as duas espécies. Com 3 bilhões de pares de nucleotídeos para comparar entre duas espécies, pode parecer uma tarefa impossível. Porém, o trabalho foi facilitado limitando-se a busca a 35 mil sequências conservadas multiespécies claramente definidas (cerca de 5 milhões de pares de nucleotídeos no total), que representam partes do genoma com maior probabilidade de serem funcionalmente importantes. Apesar de muito conservadas, essas sequências não são perfeitamente conservadas, e quando a versão em uma espécie é comparada a outra, elas geralmente refletem pequenos desvios que correspondem simplesmente ao tempo decorrido desde o ancestral comum. Em uma pequena proporção dos casos, porém, um repentino pulo evolutivo pode ser visto. Por exemplo, foi visto que algumas sequências de DNA que foram altamente conservadas em outras espécies de mamíferos sofreram alterações excepcionalmente rápidas durante os 6 milhões de anos de evolução humana desde a divergência dos chimpanzés. Tais *regiões aceleradas humanas* (HARs, *human accelerated regions*) parecem refletir funções especialmente importantes para nos tornar diferentes de algum modo vantajoso.

Cerca de 50 sítios foram identificados em um estudo, um quarto sendo localizado próximo a genes associados ao desenvolvimento neural. A sequência exibindo a alteração mais rápida (18 alterações entre humanos e chimpanzés, em comparação a apenas duas entre chimpanzés e galinhas) foi examinada mais a fundo e codifica para uma molécula de RNA não-traduzida, com 118 nucleotídeos, produzida no córtex cerebral humano em um período crítico do desenvolvimento do cérebro (**Figura 4-84**). Embora a função desse RNA HAR1F ainda não seja conhecida, essa descoberta excitante estimula estudos adicionais e poderá auxiliar no entendimento de características essenciais a respeito do cérebro humano.

A duplicação gênica fornece uma fonte importante de novidades genéticas durante a evolução

A evolução depende da criação de novos genes e de modificações daqueles já existentes. Como isso ocorre? Quando comparamos organismos que parecem diferentes – um primata com um roedor, por exemplo, ou um camundongo com um peixe – raramente encontramos

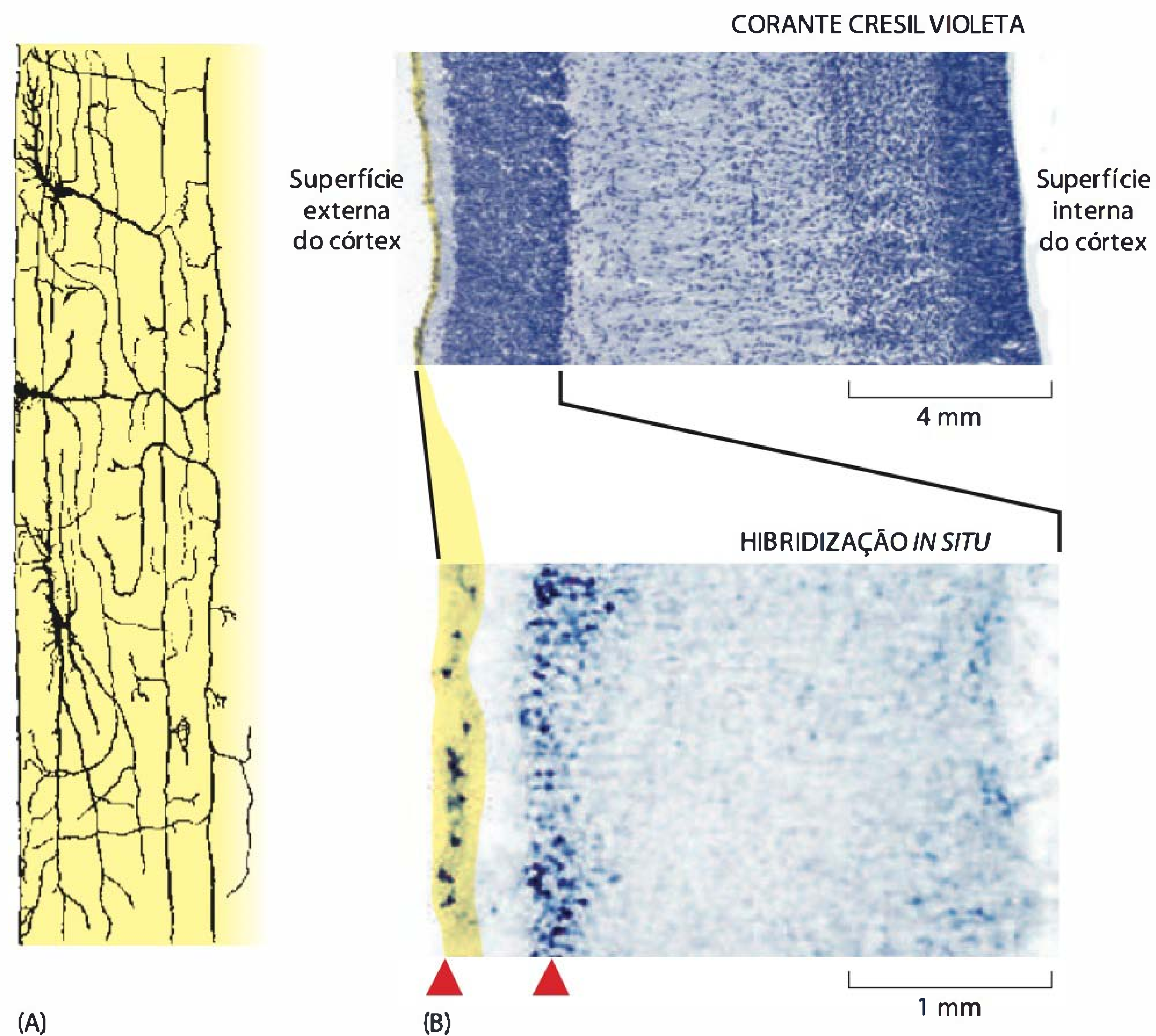


Figura 4-84 Caracterização inicial de um novo gene detectado anteriormente como uma sequência conservada de DNA que evoluiu rapidamente em humanos. (A) Desenho de Ramon e Cajal da superfície externa do neocórtex humano, ressaltando os neurônios de Cajal-Retzius. (B) Cortes de tecido de um cérebro humano embrionário, mostrando parte do córtex, com a região contendo os neurônios de Cajal-Retzius em *amarelo*. Fotografia superior: corante cresil violeta. Fotografia inferior: hibridização *in situ*. As *setas vermelhas* indicam as células que produzem HAR1F RNA detectado por hibridização *in situ* (em *azul*). HAR1F é um RNA não-codificante novo que evoluiu rapidamente na linhagem humana a partir dos grandes macacos. Os neurônios de Cajal-Retzius produzem esse RNA durante o desenvolvimento do neocórtex. Os resultados são intrigantes, porque um neocórtex grande é exclusivamente humano; para ver o comportamento dessas células na formação do córtex, ver Figura 22-99. (Adaptada de K. S. Pollard et al., *Nature* 443:167-172, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

um gene em uma espécie que não tenha um homólogo na outra. Os genes sem correspondentes homólogos são raros mesmo quando comparamos animais tão divergentes como um mamífero e um verme. Por outro lado, frequentemente famílias de genes com diferentes números de membros são encontradas nas diferentes espécies. Para criar essas famílias, os genes foram repetidamente duplicados, e as cópias, então, divergiram para atuar em novas funções que geralmente variam de uma espécie a outra.

Os genes que codificam receptores de hormônios nucleares em humanos, em vermes nematódeos e em moscas-das-frutas ilustram esse ponto (**Figura 4-85**). Muitos dos subtipos desses receptores nucleares (também chamados de receptores intracelulares) possuem homólogos próximos em todos os três organismos e são mais similares entre si do que a outros subtipos da família presentes nas mesmas espécies. Portanto, muito da divergência funcional dessa grande família de genes deve ter precedido a divergência dessas três linhagens evolutivas. Subsequentemente, um ramo principal da família de genes sofreu uma enorme expansão apenas na linhagem do verme. Da mesma forma, mas em escala menor, expansões específicas de linhagens de determinados subtipos são evidentes por toda a árvore dessa família de genes.

A duplicação gênica ocorre em altas taxas em todas as linhagens evolutivas, contribuindo para o vigoroso processo de adição de DNA discutido anteriormente. Um estudo detalhado em duplicações espontâneas em leveduras mostrou que duplicações de 50 mil a 200 mil pares de nucleotídeos podiam ser comumente observadas, a maioria sendo repetições consecutivas. Elas parecem resultar de erros na replicação do DNA pelo reparo inexato de quebras cromossômicas de fita dupla. Uma comparação entre os genomas de humanos e de chimpanzés revelou que, desde o período que esses organismos sofreram divergência, duplicações de segmentos adicionaram cerca de 5 milhões de pares de nucleotídeos em cada genoma a cada milhão de anos, com uma média de 50 mil pares de nucleotídeos a cada duplicação (contudo, existem duplicações 5 vezes maiores, como em leveduras). Na verdade, em números de nucleotídeos, os eventos de duplicação criaram mais diferenças entre as duas espécies do que as substituições de apenas um nucleotídeo.

Genes duplicados sofrem divergência

Uma questão principal sobre a evolução dos genomas é o destino dos genes recém-duplicados. Na maioria dos casos, parece haver pouca ou nenhuma seleção – pelo menos inicial-

mente – para manter o estado duplicado desde que uma cópia possa fornecer uma função equivalente. Portanto, vários eventos de duplicação provavelmente foram seguidos por mutações de perda de função em um ou em outro gene. Esse ciclo restauraria funcionalmente o estado de um gene que precedeu a duplicação. Existem vários exemplos nos genomas contemporâneos em que uma cópia de um gene duplicado foi inativada de forma irreversível por múltiplas mutações. Com o passar do tempo, a similaridade de sequência entre um **pseudogene** e o gene funcional cuja duplicação o produziu vai sendo desgastada pelo acúmulo das diversas mutações no pseudogene – até que a correlação de homologia não seja mais detectável.

Um outro destino para as duplicações cromossômicas é as duas cópias permanecerem funcionais, mesmo divergindo na sequência e no padrão de expressão, assumindo assim funções diferentes. Esse processo de "duplicação e divergência" explica a presença de grandes famílias de genes com funções relacionadas em organismos biologicamente complexos, e parece ter um papel importante na evolução do aumento da complexidade biológica. Uma análise dos genomas de diferentes eucariotos sugere que a probabilidade de um determinado gene sofrer um evento de duplicação que seja distruibuído a quase todos os indivíduos em uma espécie é de aproximadamente 1% a cada milhão de anos.

A duplicação de genomas inteiros oferece um exemplo especialmente crítico do ciclo de duplicação e divergência. Uma duplicação de todo o genoma pode acontecer de modo bem simples: necessita apenas que ocorra uma rodada de replicação genômica na linhagem de uma célula germinativa, sem que ocorra a divisão celular correspondente. Inicialmente, o número de cromossomos simplesmente dobra. Aumentos repentinos assim, que aumentam a ploidia de um organismo, são comuns em fungos e plantas. Após a duplicação de um genoma inteiro, todos os genes estão duplicados. Porém, a menos que os eventos de duplicação tenham ocorrido recentemente, para que não haja tempo suficiente para alterações subsequentes na estrutura genômica, os resultados de uma série de segmentos duplicados – que ocorreram em períodos diferentes – são difíceis de distinguir do produto final da duplicação de todo o genoma. Em mamíferos, por exemplo, a duplicação total do genoma *versus* uma série de segmentos de DNA duplicados é incerta. No entanto, está claro que uma grande parcela de duplicações gênicas ocorreu em um passado distante.

As análises do genoma do peixe-zebra, no qual ocorreu a duplicação de todo o genoma ou várias duplicações locais há centenas de milhões de anos, revelaram alguns aspectos da duplicação e da divergência. Embora muitas cópias duplicadas dos genes do peixe-zebra pareçam ter sido perdidas por mutações, uma proporção significante – uns 30 a 50% – divergiu funcionalmente, porém ambas as cópias continuaram ativas. Em vários casos, a diferença funcional mais óbvia entre os genes duplicados é que são expressos em tecidos diferentes ou em diferentes estágios do desenvolvimento (ver Figura 22-46). Uma teoria interessante para explicar esse resultado propõe que mutações diferentes e levemente deletérias ocorreram rapidamente em ambas as cópias de um conjunto de genes duplicados. Por exemplo, uma cópia perderia a expressão em um determinado tecido como resultado de uma mutação reguladora, enquanto a outra cópia perderia a expressão em um segundo tecido. Logo após essas ocorrências, ambas as cópias seriam necessárias para perfazer o total de funções antes providas por apenas um gene; portanto, ambas as cópias estão agora protegidas de perda por mutações inativadoras. Após um longo período, cada cópia sofreria alterações adicionais através das quais poderia adquirir características novas e especializadas.

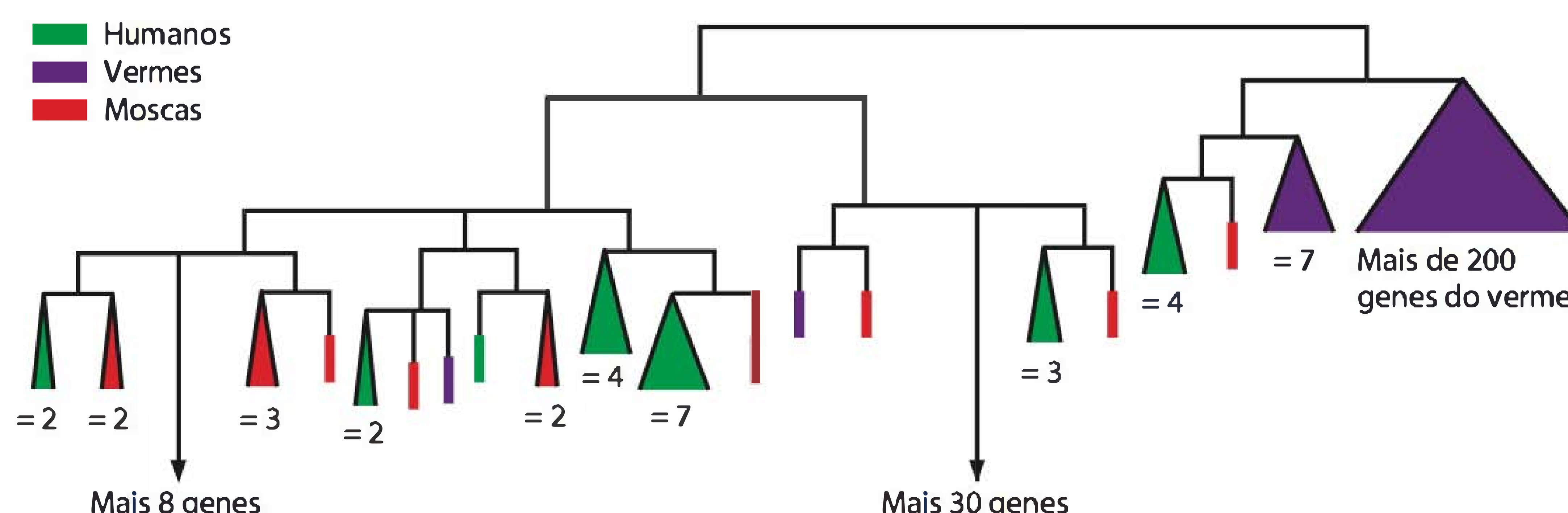


Figura 4-85 Árvore filogenética com base nas sequências proteicas deduzidas para todos os receptores de hormônios nucleares codificados nos genomas de humanos (*H. sapiens*), do verme nematódeo (*C. elegans*) e da mosca-das-frutas (*D. melanogaster*). Os triângulos representam subfamílias de proteínas que foram expandidas dentro de linhagens evolutivas individuais; a largura dos triângulos indica o número de genes que codificam os membros dessas subfamílias. As barras verticais coloridas representam um único gene. Não há um padrão simples para as duplicações e divergências históricas que criaram as famílias de genes que codificam os receptores nucleares nesses três organismos modernos. A família dos receptores de hormônios nucleares está descrita na Figura 15-14. Essas proteínas atuam na sinalização celular e na regulação gênica. (Adaptada de International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

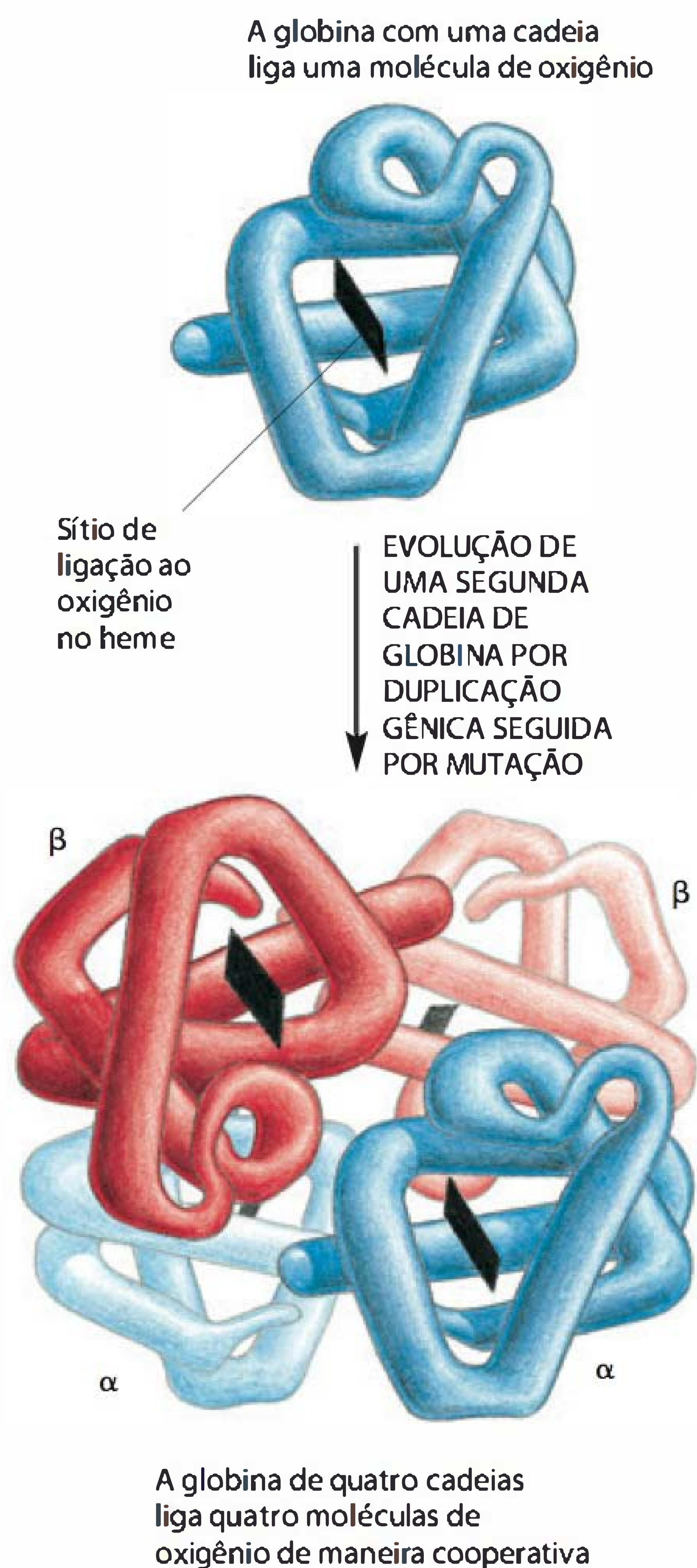


Figura 4-86 Comparação da estrutura da globina com uma e com quatro cadeias. A globina de quatro cadeias mostrada é a hemoglobina, um complexo de duas cadeias de α-globina e duas de β-globina. A globina com uma cadeia, presente em alguns vertebrados primitivos, forma um dímero que se dissocia quando liga o oxigênio, representando um intermediário na evolução da globina de quatro cadeias.

A evolução da família de genes da globina mostra como as duplicações de DNA contribuem para a evolução dos organismos

A família de genes da globina é um ótimo exemplo de como a duplicação produz proteínas novas, uma vez que sua história evolutiva se desenvolveu muito bem. As semelhanças óbvias nas sequências de aminoácidos e na estrutura das globinas atuais indicam que elas são derivadas de um gene ancestral comum, mesmo que algumas sejam hoje codificadas por genes bastante separados no genoma de mamíferos.

É possível reconstruir alguns dos eventos passados que produziram os vários tipos de moléculas de hemoglobina carreadoras de oxigênio, considerando as diferentes formas da proteína em organismos localizados em posições diferentes da árvore filogenética. Uma molécula como a hemoglobina era necessária para permitir o crescimento de animais multicelulares a tamanhos consideráveis, uma vez que animais de grande porte não podem depender apenas de difusão simples do oxigênio por toda sua superfície corporal para oxigenar adequadamente seus tecidos. Como consequência, moléculas semelhantes à hemoglobina são encontradas em todos os vertebrados e em muitos invertebrados. A molécula carreadora de oxigênio mais primitiva em animais é uma cadeia polipeptídica da globina com 150 aminoácidos, encontrada em diversos vermes marinhos, em insetos e em peixes primitivos. A hemoglobina em vertebrados mais complexos, porém, é composta de dois tipos de cadeia de globina. Parece que há 500 milhões de anos, durante a evolução continuada dos peixes, ocorreu uma série de mutações e duplicações de genes. Esses eventos estabeleceram dois genes de globina levemente diferentes, que codificam para as cadeias α e β no genoma de cada indivíduo. Nos vertebrados modernos, cada molécula de hemoglobina é um complexo de duas cadeias α e duas β (**Figura 4-86**). Os quatro sítios de ligação ao oxigênio na molécula $\alpha_2\beta_2$ interagem, permitindo uma alteração alostérica cooperativa na molécula, à medida que esta se liga e libera o oxigênio, permitindo à hemoglobina pegar e soltar o oxigênio de modo mais eficiente comparado à versão de globina única.

Mais tarde, durante a evolução dos mamíferos, o gene da cadeia β aparentemente sofreu duplicação e mutações, originando uma segunda cadeia β, sintetizada especificamente no feto. A molécula de hemoglobina resultante possui uma maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina de adultos, portanto auxilia no transporte de oxigênio da mãe para o feto. O gene para a nova cadeia de β-globina foi subsequentemente duplicado e mutado novamente, produzindo dois novos genes, ε e γ, sendo que a cadeia ε é produzida em uma etapa mais precoce do desenvolvimento (formando $\alpha_2\varepsilon_2$) do que a cadeia fetal γ, que forma $\alpha_2\gamma_2$. Uma duplicação do gene da cadeia β adulta ocorreu ainda mais tarde, durante a evolução dos primatas, produzindo o gene da δ-globina e a menor forma de hemoglobina $\alpha_2\delta_2$, encontrada apenas em primatas adultos (**Figura 4-87**).

Cada um desses genes duplicados foi modificado por mutações de ponto que afetam propriedades da molécula final de hemoglobina, e também por alterações nas regiões reguladoras que determinam o período e o nível de expressão do gene. Como resultado, cada globina é produzida em diferentes quantidades nas diferentes etapas do desenvolvimento humano (ver Figura 7-64B).

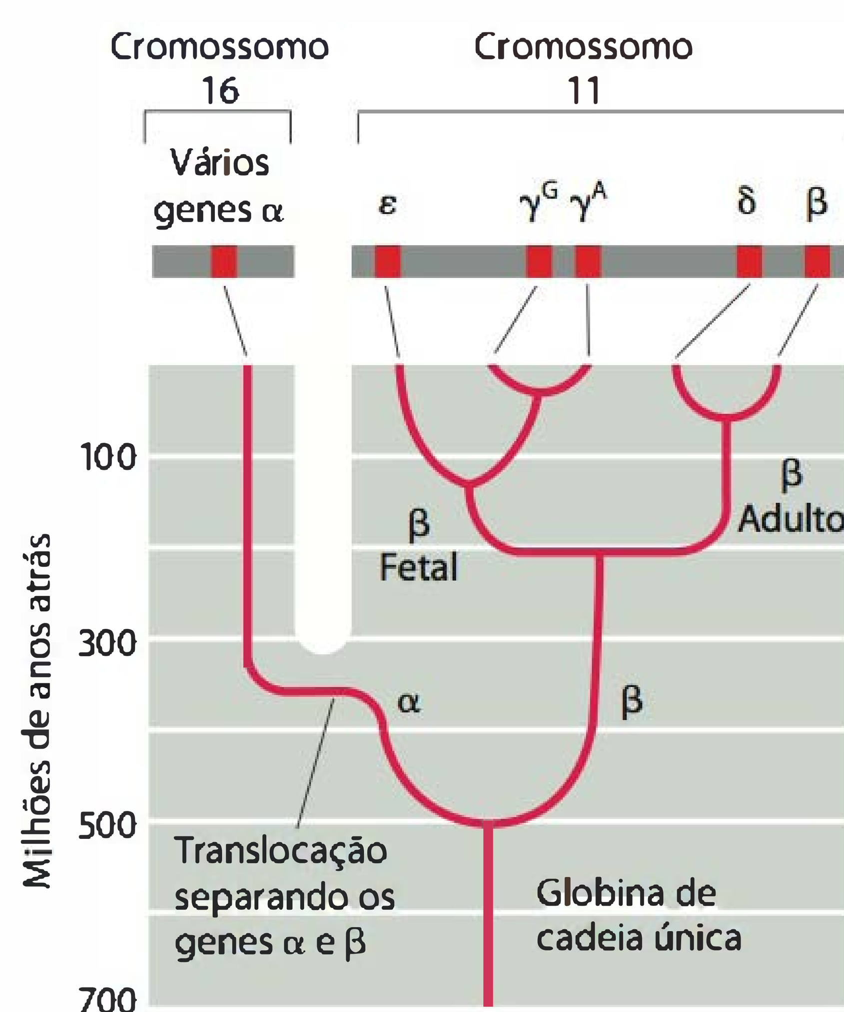


Figura 4-87 Esquema evolutivo para as cadeias da globina que transportam oxigênio no sangue de animais. O esquema ressalta a família de genes do tipo β-globina. Uma duplicação gênica relativamente recente no gene γ-cadeia produziu γ^G e γ^A, as cadeias tipo β fetais com funções idênticas. A localização dos genes da globina no genoma humano é mostrada da parte superior da figura (ver também Figura 7-64).

O produto final dos processos de duplicação gênica que geraram a diversidade das cadeias de globina é visto claramente nos genes humanos que surgiram a partir do gene original β, que estão organizados como uma série de sequências homólogas de DNA localizadas a cerca de 50 mil pares de nucleotídeos umas das outras. Um bloco semelhante dos genes de globina α está localizado em um cromossomo humano separado. Como os blocos de genes das globinas α e β estão em cromossomos separados em pássaros e mamíferos, mas no mesmo cromossomo no sapo *Xenopus*, acredita-se que um evento de translocação cromossômica separou os dois blocos há uns 300 milhões de anos (ver Figura 4-87).

Existem várias sequências de DNA da globina duplicadas nos blocos dos genes das globinas α e β que são pseudogenes e não genes funcionais. Esses pseudogenes são similares aos genes funcionais, mas foram inativados por mutações que impedem sua expressão. A existência desses pseudogenes deixa claro que, como esperado, nem toda duplicação de DNA gera um gene funcional. Também sabemos que sequências não-funcionais não são descartadas rapidamente, como indica o grande excesso de DNA não-codificante encontrado nos genomas de mamíferos.

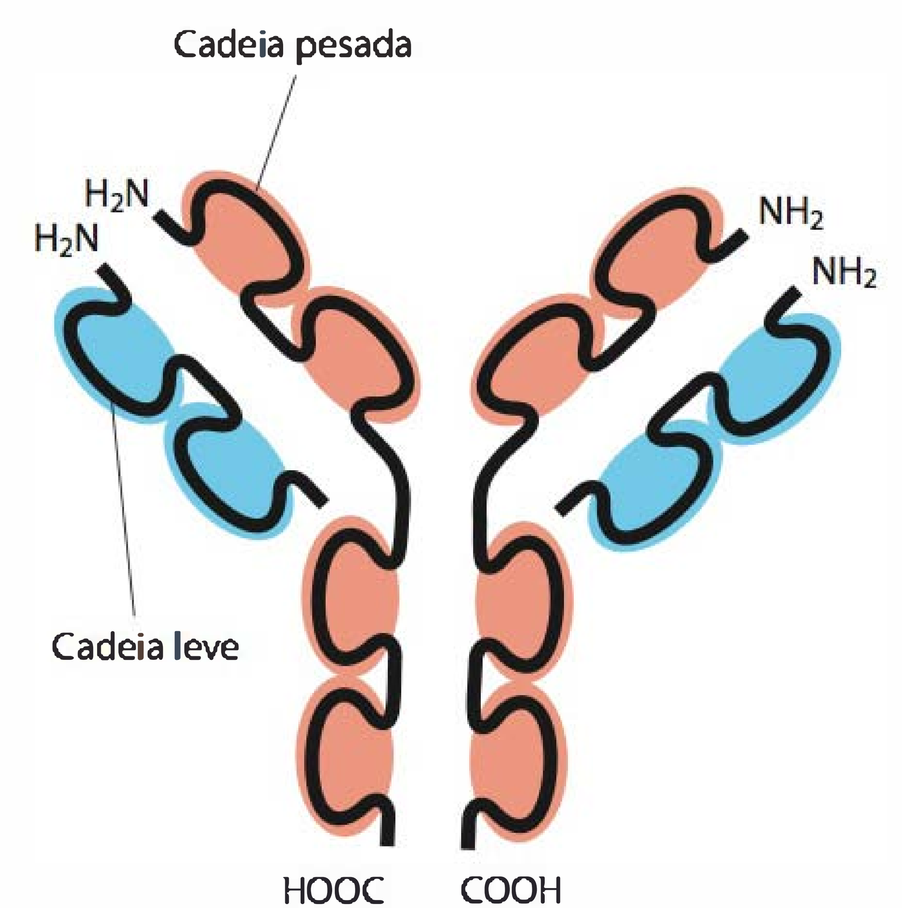


Figura 4-88 Visão esquemática de uma molécula de anticorpo (imunoglobulina). Esta molécula é um complexo de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Cada cadeia pesada contém quatro domínios similares, ligados covalentemente, enquanto cada cadeia leve contém apenas dois domínios. Cada domínio é codificado por um éxon individual separado, e todos os éxons parecem ter se desenvolvido pela duplicação seriada de um único éxon ancestral.

Genes que codificam novas proteínas podem ser criados pela recombinação de éxons

A importância da duplicação na evolução não está limitada à expansão de famílias gênicas. Ela também pode ocorrer em escala menor, criando genes pela ligação de pequenos segmentos duplicados de DNA. As proteínas codificadas por genes produzidos dessa forma podem ser reconhecidas pela presença de domínios proteicos similares e repetidos, unidos em série por ligação covalente. As imunoglobulinas (**Figura 4-88**) e as albuminas, por exemplo, bem com a maioria das proteínas fibrosas (como o colágeno), são codificadas por genes que evoluíram pela duplicação repetida de uma sequência de DNA primordial.

Nos genes que evoluíram dessa forma, e em vários outros genes, cada éxon geralmente codifica uma unidade de enovelamento individual da proteína, ou um domínio. Acredita-se que a organização das sequências codificantes do DNA como uma série de éxons separados por longos íntrons facilitou bastante a evolução de novas proteínas. As duplicações necessárias para formar um único gene que codifica uma proteína com domínios repetidos, por exemplo, pode ocorrer pela quebra e religação de DNA em qualquer sítio dos longos íntrons dos dois lados do éxon; sem íntrons, apenas alguns sítios do gene original da troca recombinatória entre as moléculas de DNA poderiam duplicar o domínio. A capacidade de duplicação por recombinação em vários sítios potenciais em vez de em uns poucos sítios aumenta a probabilidade de um evento de duplicação favorável.

Pelas sequências genômicas, sabemos que várias partes dos genes – tanto éxons como elementos de regulação – atuaram como elementos modulares, os quais foram duplicados e se moveram pelo genoma criando a vasta diversidade de coisas vivas. Assim, por exemplo, diversas proteínas atuais são formadas por porções de domínios de origens diferentes, refletindo sua longa história evolutiva (ver Figura 3-19).

Mutações neutras geralmente se distribuem e tornam-se fixas em uma população, com probabilidade dependente do tamanho da população

Na comparação entre duas espécies que divergiram por um milhão de anos entre si, os indivíduos de cada espécie que foram comparados não afetam muito as análises. Por exemplo, as sequências de DNA típicas de humanos e de chimpanzés diferem cerca de 1%. Em contraste, quando a mesma região do genoma é analisada em dois seres humanos diferentes, normalmente as diferenças são menores que 0,1%. Em organismos mais distantes, as diferenças interespécies mascaram as variações intra-espécie mais severamente. Contudo, cada "sequência fixada" entre um humano e um chimpanzé (em outras palavras, cada diferença que é agora característica de todos ou quase todos os indivíduos de cada espécie) teve início a partir de uma mutação em um único indivíduo. Se o tamanho da população na qual a mutação ocorreu é N, a frequência do alelo inicial com a nova mutação seria 1/

(2*N*) para um organismo diploide. Como uma mutação tão rara é fixada na população, tornando-se uma característica da espécie e não apenas uma característica particular do genoma de um indivíduo?

A resposta depende das consequências funcionais da mutação. Se a mutação possui um efeito prejudicial importante, será simplesmente eliminada pela seleção de purificação e não será fixada. (Em casos mais extremos, o indivíduo que possui a mutação morrerá sem deixar descendentes.) Por outro lado, as raras mutações que conferem uma vantagem reprodutiva aos indivíduos que as herdam serão difundidas rapidamente na população. Como a reprodução é sexuada no homem, e a recombinação genética ocorre cada vez que um gameta é formado (discutido no Capítulo 5), o genoma de cada indivíduo que herda a mutação será um mosaico único de recombinação herdado de vários ancestrais. A mutação selecionada, juntamente com uma pequena quantidade de sequências vizinhas – herdadas a partir daquele indivíduo no qual a mutação ocorreu – será simplesmente uma peça de um enorrne mosaico.

A grande maioria das mutações não é prejudicial nem benéfica. Essas mutações neutras também são distribuídas e tornam-se fixadas na população, contribuindo muito para as alterações evolutivas dos genomas. Sua difusão na população não é tão rápida como uma mutação rara de efeito vantajoso. O processo pelo qual as variações genéticas neutras são transmitidas em uma população idealizada pode ser descrito matematicamente por equações relativamente simples. O modelo mais satisfatório para a análise das variações genéticas no homem assume um tamanho de população constante e cruzamentos ao acaso, além da neutralidade seletiva da mutação. Embora nenhuma dessas considerações seja uma boa descrição da história da população humana, o modelo fornece um bom início para essas análises intra-espécie.

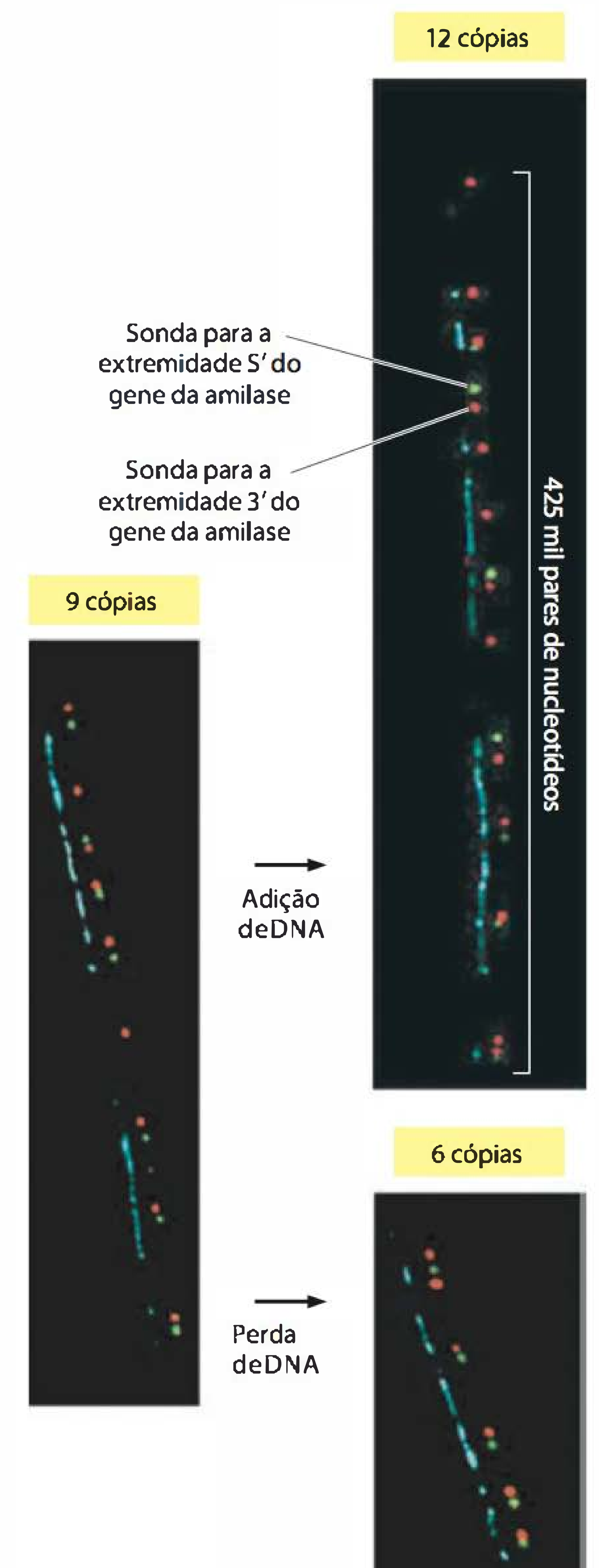
Quando uma nova mutação neutra ocorre na população constante de tamanho N, que cruza aleatoriamente entre si, a probabilidade de fixação da mutação é de aproximadamente 1/(2*N*). Para as mutações que foram fixadas, o período médio para fixação é de aproximadamente 4*N* gerações. Uma análise detalhada dos dados em variação genética sugere um tamanho de população ancestral de cerca de 10 mil, durante o qual o padrão atual de variação genética foi estabelecido. Com uma população desse tamanho, a probabilidade que uma nova mutação neutra seja fixada é pequena (5×10^{-5}), enquanto o tempo médio para fixação é da ordem de 800 mil anos (considerando um tempo de geração de 20 anos). Assim, embora a população tenha crescido bastante desde o desenvolvimento da agricultura, há cerca de 15 mil anos, a maioria das variantes genéticas vistas hoje reflete variações já existentes muito tempo antes disso, quando a população humana ainda era bastante pequena para permitir essa vasta disseminação.

Muito pode ser aprendido pelas análises de variação em humanos

Mesmo que a maioria das variações entre homens modernos tenha sido originada em um grupo pequeno de ancestrais, o número de variações encontradas é enorme. Uma fonte importante dessas variações, esquecida por muitos anos, é a presença de diversas duplicações e deleções de grandes segmentos de DNA. De acordo com estimativas, quando qualquer indivíduo humano é comparado a um genoma padrão de referência no banco de dados, espera-se encontrar cerca de 100 diferenças envolvendo longos blocos de sequências. Algumas dessas "variações no número de cópias" são muito comuns (**Figura 4-89**), enquanto outras estão presentes apenas em uma minoria de indivíduos (**Figura 4-90**). Quase metade de uma amostra inicial irá conter genes conhecidos. Em retrospectiva, esse tipo de variação não causa surpresa, devido à extensa história de adições e perdas de DNA nos genomas de vertebrados (para exemplos, ver Figura 4-79).

As variações intra-espécie mais estudadas são os **polimorfismos de um único nucleotídeo** (**SNPs**, *single-nucleotide polymorphisms*). Eles são simples mutações de ponto na sequência genômica em que uma grande proporção da população humana possui um nucleotídeo, enquanto outra parte substancial da população possui outro. Dois genomas humanos, escolhidos aleatoriamente da população moderna mundial, apresentarão diferenças em aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$ desses sítios (1 a cada 1.300 pares de nucleotídeos). Como será descrito em uma apresentação de genética no Capítulo 8, sítios mapeados no genoma humano que são **polimórficos** – isto é, que apresentam uma chance razoável (normalmente

Figura 4-89 Visualização de um tipo frequente de variação entre seres humanos. Aproximadamente metade dos indivíduos examinados possui nove cópias do gene da amilase (*à esquerda*), que produz uma importante enzima capaz de digerir o amido. Em outros indivíduos, ocorreu uma perda ou uma adição de DNA, produzindo um cromossomo alterado pela perda (remoção de DNA) ou pela duplicação (adição de DNA) de uma parte dessa região. Para obter essas imagens, fibras de cromatina estendidas foram hibridizadas a sondas, com cores diferentes, para as duas extremidades do gene da amilase, como indicado. As linhas em *azul* marcam as vias gerais da cromatina. Elas foram determinadas por um segundo corante e deslocadas para um lado para maior clareza. (Adaptada de A. J. Iafrate et al., *Nat. Genet.* 36:949-951, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



mais de 1%) de que os genomas de dois indivíduos tenham diferenças nesse sítio – são extremamente úteis para análises genéticas, para tentar associar traços específicos (fenótipos) a sequências específicas de DNA com objetivos médicos ou científicos (ver p. 560).

Algumas sequências raras com uma taxa de mutação excepcionalmente alta se destacam entre os SNPs comuns herdados de nossos ancestrais pré-históricos. Um exemplo crítico são as repetições CA, presentes por todo o genoma humano e nos genomas de outros eucariotos. Sequências com o domínio $(CA)_n$ são replicadas com fidelidade muito baixa, devido ao deslizamento que ocorre entre a fita-molde e a fita recém-sintetizada durante a replicação, de forma que o valor de *n* varia muito de um genoma para o próximo. Essas repetições formam marcadores genéticos de DNA ideais, uma vez que quase todos humanos são heterozigotos – e carregam diferentes valores de *n* das repetições CA, pois herdaram um comprimento de repetições (*n*) da mãe e outro do pai. Enquanto os valores de *n* são raramente alterados na maioria das transmissões pai-filho, que propagam as repetições CA com fidelidade, essas alterações são suficientes para manter um alto nível de heterozigose na população. Estas e outras repetições simples que apresentam uma variabilidade muito alta fornecem as bases para a identificação de indivíduos pela análise de DNA em investigações criminais, testes de paternidade e outras aplicações forenses (ver Figura 8-47).

Enquanto a maioria dos SNPs e as variações no número de cópias na sequência do genoma humano parecem não afetar o fenótipo, um subconjunto delas deve ser responsável por quase todos as aspectos hereditários da individualidade humana. Sabemos que mesmo a alteração de um único nucleotídeo pode alterar um aminoácido de uma proteína, o qual, por sua vez, pode causar uma grave doença, como a anemia falciforme, causada por uma

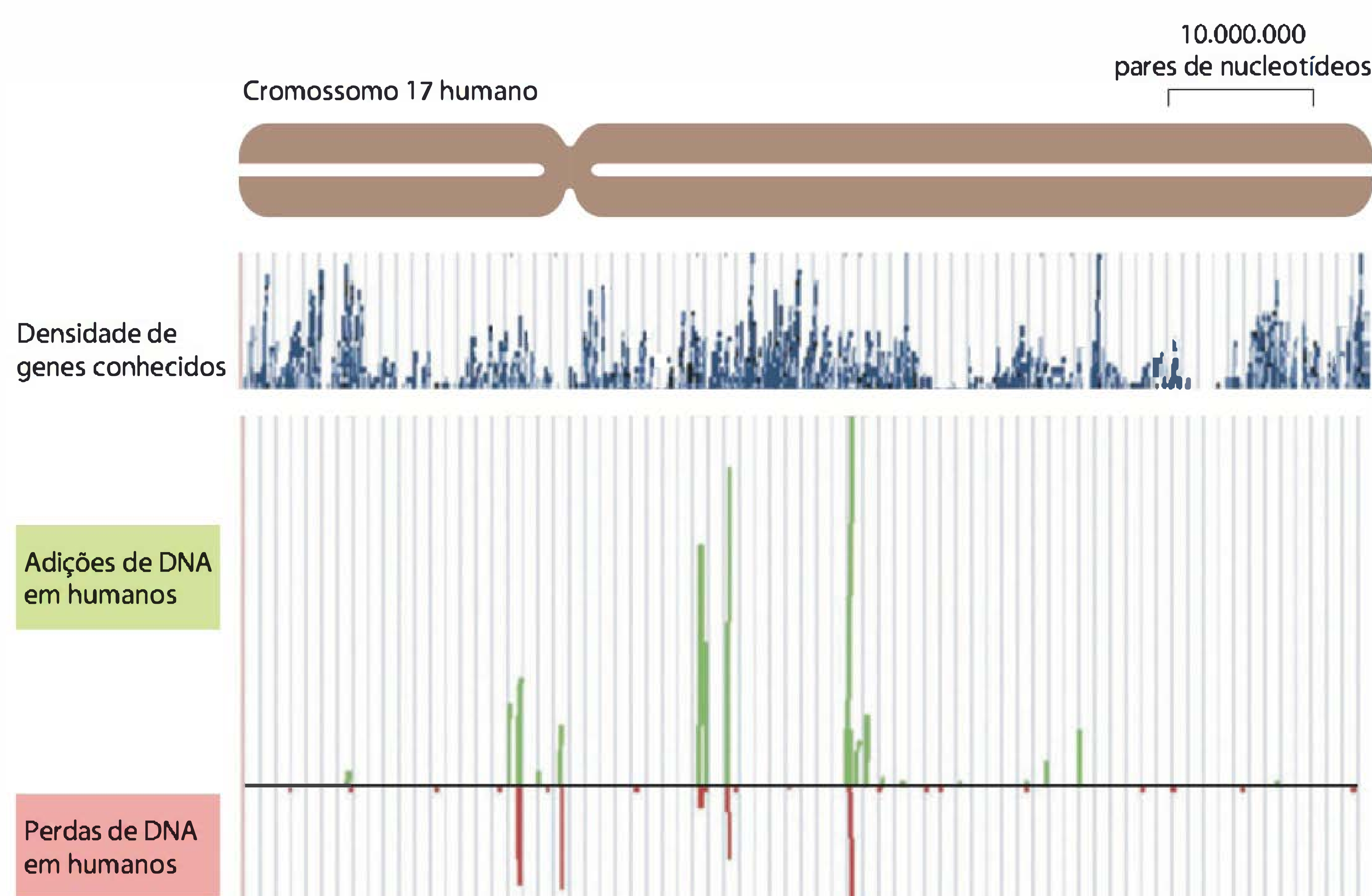


Figura 4-90 Detecção de variantes do número de cópias no cromossomo 17 humano. Quando 100 indivíduos foram analisados por microarranjos de DNA, capazes de detectar o número de cópias de sequências de DNA por todo o cromossomo, as distribuições indicadas para adições de DNA (*barras verdes*) e perdas de DNA (*barras vermelhas*) foram observadas em comparação a uma sequência arbitrária humana. As *barras verde* e *vermelha* mais curtas representam uma ocorrência única em todos os 200 cromossomos examinados, enquanto as barras mais longas representam as adições e perdas mais frequentes. Os resultados mostram regiões preferenciais nas quais as variações ocorrem, ocorrendo em regiões ou próximas a regiões que já contêm blocos de duplicação de segmentos. Muitas das trocas incluem genes conhecidos. (Adaptada de J. L. Freeman et al., *Genome Res.* 16:949-961, 2006. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

mutação na hemoglobina. Também sabemos que a dosagem gênica – isto é, a duplicação ou a redução do número de cópias de um gene – pode ter um efeito profundo no desenvolvimento humano pela alteração do produto gênico. Existem, portanto, diversas razões para supor que as muitas diferenças entre dois indivíduos humanos terão um efeito substancial na saúde, na fisiologia e no comportamento humano, sejam elas SNPs ou variações no número de cópias. O principal desafio da genética humana é aprender a reconhecer essas pequenas diferenças funcionalmente importantes diante de um enorme grupo de variações neutras nos genomas de indivíduos diferentes.

Resumo

Comparações entre sequências nucleotídicas de genomas atuais revolucionaram nosso entendimento sobre a evolução de genes e genomas. Devido à fidelidade extremamente alta dos processos de replicação e reparo de DNA, erros aleatórios na manutenção das sequências nucleotídicas ocorrem tão raramente que apenas cerca de um nucleotídeo em mil é alterado a cada milhão de anos em uma descendência específica. Não é de surpreender, portanto, que uma comparação entre os cromossomos de humanos e de chimpanzés – separados há cerca de 6 milhões de anos de evolução – revelou poucas alterações. Não só temos essencialmente os mesmos genes, como a ordem que eles estão dispostos em cada cromossomo é quase idêntica. Embora um número substancial de duplicações e deleções de segmentos tenha ocorrido nesses 6 milhões de anos, até mesmo posições de elementos transponíveis, que constituem a maior parte do nosso DNA não-codificante, são praticamente as mesmas.

Quando comparamos os genomas de organismos com distâncias evolutivas maiores – como humanos e camundongos, separados por cerca de 80 milhões de anos – encontramos muito mais alterações. Nesse caso, os efeitos da seleção natural podem ser claramente vistos: pela seleção de purificação, sequências nucleotídicas essenciais – tanto reguladoras como codificantes (éxons) – foram conservadas. Em contraste, sequências não-essenciais (p. ex., a maioria do DNA nos íntrons) foram alteradas de tal forma que frequentemente é impossível obter um alinhamento preciso de ancestralidade.

Devido à seleção de purificação, a comparação das sequências genômicas de diversas espécies relacionadas é uma maneira importante para encontrar sequências de DNA com funções relevantes. Embora apenas cerca de 5% do genoma humano sejam conservados como resultado da seleção de purificação, a função da maioria desse DNA (milhares de sequências multiespécies conservadas) permanece um mistério. Experimentos futuros de caracterização das suas funções devem elucidar aspectos da biologia de vertebrados.

Outras comparações de sequências mostram que um grande grau de complexidade em organismos modernos é devido à expansão de famílias gênicas ancestrais. A duplicação de DNA seguida pela divergência dessas sequências tem sido, claramente, a principal fonte de novidades genéticas durante a evolução. Os genomas de dois indivíduos humanos quaisquer apresentam diferenças entre si devido a substituições nucleotídicas (SNPs) e devido à herança de adições e perdas de DNA que resultam em variantes de número de cópias gênicas. A compreensão dessas diferenças irá melhorar a medicina e o nosso entendimento da biologia humana.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

4-1 As mulheres possuem 23 cromossomos diferentes, enquanto os homens possuem 24.

4-2 Em uma comparação entre DNAs de organismos relacionados, como humanos e camundongos, a identificação de sequências conservadas de DNA facilita a busca por regiões funcionalmente importantes.

4-3 As quatro histonas do cerne são proteínas relativamente pequenas com uma alta proporção de aminoácidos com carga positiva; essa carga positiva auxilia na forte ligação ao DNA, não importando sua sequência nucleotídica.

4-4 Os nucleossomos ligam o DNA tão fortemente que eles não podem alterar a posição em que foram inicialmente estabelecidos.

4-5 A duplicação gênica e a divergência parecem ter tido um papel fundamental no aumento da complexidade biológica durante a evolução.

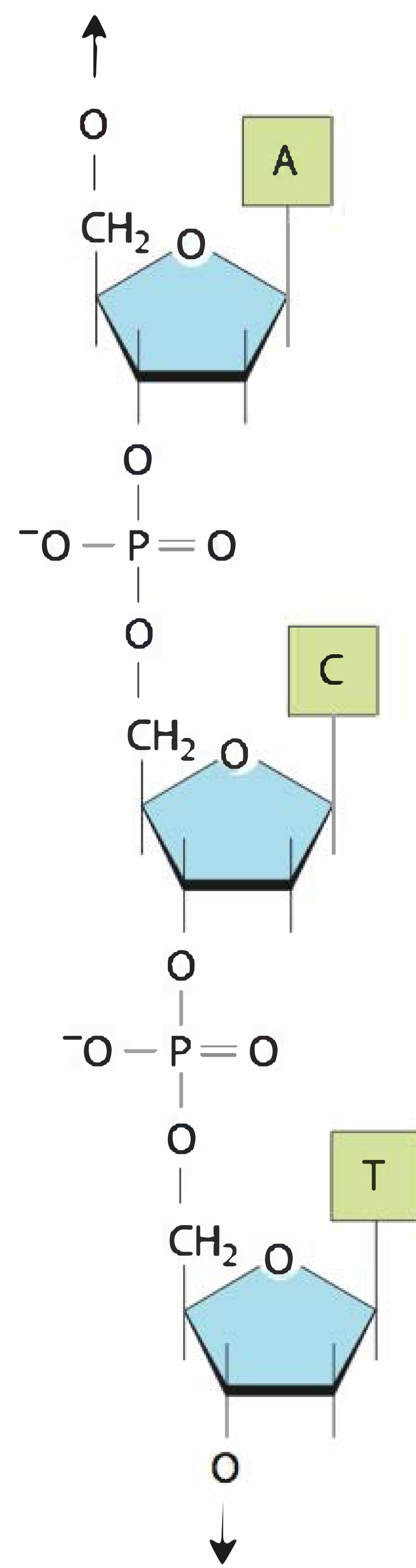


Figura Q4-1 Três nucleotídeos do interior de uma fita simples de DNA (Questão 4-7). As *setas* nas extremidades da fita de DNA indicam que a estrutura continua em ambas as direções.

Discuta as seguintes questões.

4-6 O DNA isolado de um vírus bacteriano, o M13, contém 25% de A, 33% de T, 22% de C e 20% de G. Esses resultados lhe surpreendem de algum modo? Justifique. Como você poderia explicar esses valores?

4-7 Um segmento de DNA do interior de uma fita simples é mostrado na **Figura Q4-1**. Qual a polaridade desse DNA de cima para baixo?

4-8 O DNA humano contém 20% de C em base molar. Quais as porcentagens molares de A, G e T?

4-9 O cromossomo 3 de orangotangos difere do cromossomo 3 de humanos por dois eventos de inversão (**Figura Q4-2**). Desenhe o cromossomo intermediário que resulta da primeira inversão e indique claramente os segmentos incluídos em cada inversão.

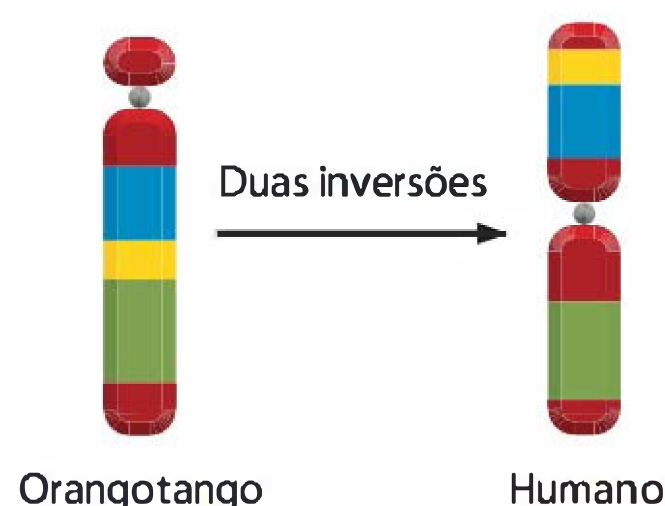


Figura Q4-2 Cromossomos 3 de orangotangos e humanos (Questão 4-9). Blocos em cores diferentes indicam segmentos cromossômicos derivados de fusões prévias.

4-10 Considerando que uma fibra de cromatina de 30 nm contém cerca de 20 nucleossomos (200 pares de base por nucleossomos) por 50 nm de comprimento, calcule o grau de compactação do DNA associado a esse tipo de nível de estrutura de cromatina. Que fração da condensação de 10 mil vezes que ocorre na mitose esse nível de empacotamento representa?

4-11 Em contraste à acetilação de histonas, que sempre está correlacionada à ativação gênica, a metilação de histonas pode resultar na ativação transcricional ou na repressão. Como você supõe que a mesma modificação – metilação – possa promover diferentes efeitos biológicos?

4-12 Por que um cromossomo com dois centrômeros (um cromossomo dicêntrico) é instável? Um centrômero reserva não seria bom para o cromossomo, dando a ele duas chances de formar o cinetócoro e se ligar aos microtúbulos na mitose? Isso não poderia ajudar a garantir que nenhum cromossomo fosse deixado para trás na mitose?

4-13 As proteínas HP1, uma família de proteínas encontrada na heterocromatina, estão envolvidas no silenciamento de genes e na estrutura da cromatina. As três proteínas em humanos – HP1α, HP1β e HP1γ – apresentam um cromodomínio altamente conservado, que parece direcionar a localização da cromatina. Para determinar se essas proteínas podem se ligar à extremidade N-terminal da histona H3, você ligou covalentemente uma resina a várias versões do peptídeo N-terminal de H3 – não-modificado, dimetilado na lisina 9 (K9-Me) e fosforilado na serina 10 (S10-P) – juntamente com uma cauda não-modificada da histona H4. Isso permite que você incube as resinas com várias proteínas, lave o excesso de proteínas não-ligadas e depois faça a eluição das proteínas ligadas por *Western blotting*. Os resultados de seu experimento para proteínas HP1 são mostrados na **Figura Q4-3**, junto com os resultados para várias proteínas-controle, incluindo Pax5, uma proteína de regulação gênica, Pc1, conhecida por ligar-se a histonas, e Suv39h1, uma metiltransferase de histonas.

Com base nos resultados, qual das proteínas testadas liga-se às caudas de histonas não-modificadas? Alguma das proteínas HP1 ou controle ligam-se seletivamente à histona com modificações no peptídeo N-terminal? Que modificação de histonas você esperaria encontrar na heterocromatina?

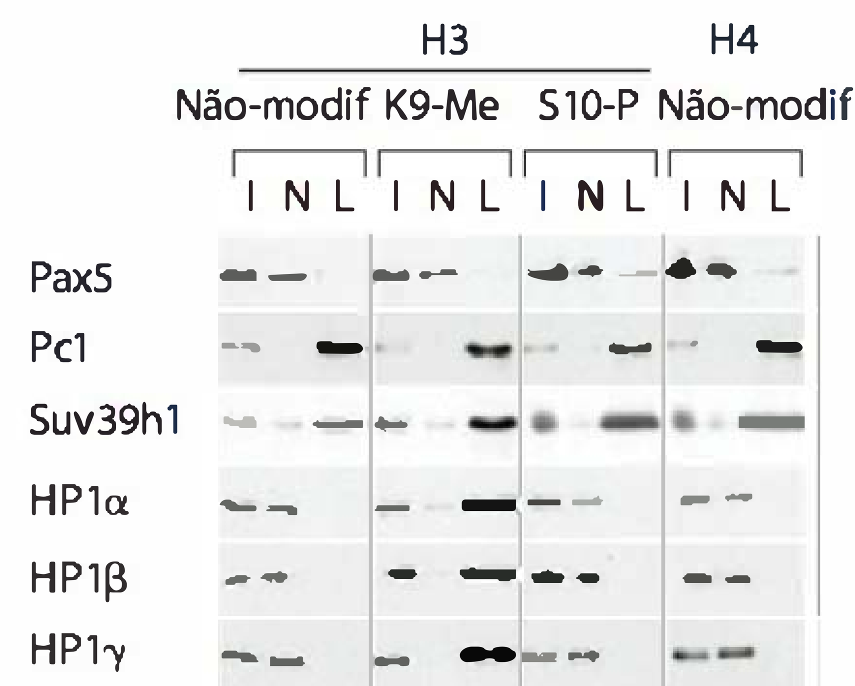


Figura Q4-3 Experimentos para determinar a especificidade de ligação de proteínas HP1 (Questão 4-13). Cada proteína à esquerda foi detectada por *imunoblotting* usando um anticorpo específico após separação por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Para cada peptídeo N-terminal da histona, a quantidade total de proteína (I), a proteína não-ligada (N) e a proteína ligada (L) estão indicadas. (Adaptada de M. Lachner et al.; *Nature* 410:116-120, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

4-14 Segmentos móveis de DNA – os elementos transponíveis inserem-se nos cromossomos e se acumulam durante a evolução, somando mais de 40% do genoma humano. Os elementos transponíveis são de quatro tipos – elementos nucleares intercalados longos (LINEs, *long interspersed elements*), elementos nucleares intercalados curtos (SINEs, *short interspersed elements*), retrotransposons LTR e transposons de DNA-only – e são inseridos mais ou menos aleatoriamente pelo genoma humano. Esses elementos são visivelmente raros nos quatro blocos gênicos de homeobox (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC* e *HoxD*), como ilustrado para *HoxD* na **Figura Q4-4**, com uma região de cromossomo 22 equivalente, que não possui um bloco *Hox*. Cada bloco *Hox* tem um comprimento de cerca de 100 kb e contém de 9 a 11 genes, cuja expressão diferencial ao longo do eixo ântero-posterior do embrião em desenvolvimento estabelece o plano corporal básico para humanos (e outros animais). Por que você acha que os elementos transponíveis são tão raros nos blocos de genes *Hox*?

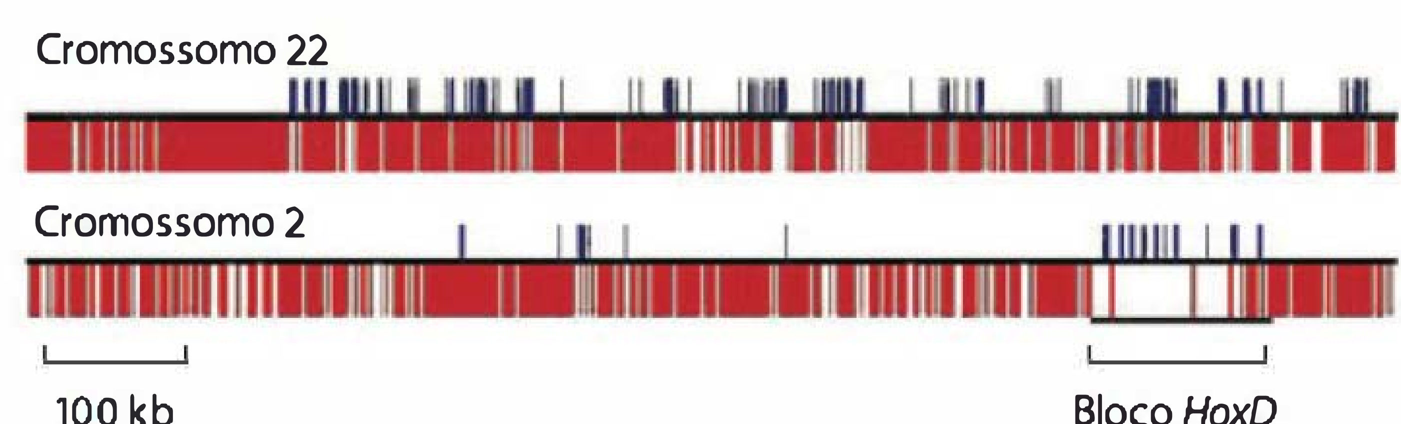


Figura Q4-4 Elementos transponíveis e genes em uma região de 1 Mb dos cromossomos 2 e 22 (Questão 4-14). As linhas que se projetam *para cima* indicam éxons de genes conhecidos. Linhas que se projetam *para baixo* indicam elementos transponíveis; eles são tão numerosos (constituindo mais de 40% do genoma humano) que quase formam um bloco sólido no lado externo dos blocos *Hox*. (Adaptada de E. Lander et al., *Nature* 409:860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Referências

Gerais

Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.
Olson MV (2002) The Human Genome Project: a player's perspective. *J Mol Biol* 319:931–942.
Strachan T & Read AP (2004) Human Molecular Genetics. New York: Garland Science.
Wolffe A (1999) Chromatin: Structure and Function, 3rd ed. New York: Academic Press.

Estrutura e função do DNA

Avery OT, MacLeod CM & McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types. *J Exp Med* 79:137–158.
Meselson M & Stahl FW (1958) The replication of DNA in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:671–682.
Watson JD & Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171:737–738.

DNA cromossômico e seu empacotamento na fibra de cromatina

Jin J, Cai Y, Li B et al (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30:680–687.
Kornberg RD & Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285–294.
Li G, Levitus M, Bustamante C & Widom J (2005) Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature Struct Mol Biol* 12:46–53.
Lorch Y, Maier-Davis B & Kornberg RD (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3090–3093.
Luger K, Mader AW, Richmond RK et al (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
Luger K & Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *CurrOpin Genet Dev* 8:140–146.
Malik H S & Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome *Nature Struct Biol* 10:882-891.
Ried T, Schrock E, Ning Y & Wienberg J (1998) Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet* 7:1619–1626.
Robinson PJ & Rhodes R (2006) Structure of the 30 nm chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 16:1–8.
Saha A, Wittmeyer J & Cairns BR (2006) Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:437–446.
Woodcock CL (2006) Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol* 16:213–220.

Regulação da estrutura da cromatina

Egger G, Liang, G, Aparicio A & Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457–463.
Henikoff S (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6:422–426.
Henikoff S & Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatiin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:133–153.
Gaszner M & Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Rev Genet* 7:703–713.
Hake SB & Allis CD (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6428–6435.
Jenuwein T (2006) The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J* 273:3121–3135.
Martin C & Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:838–849.
Mellone B, Erhardt S & Karpen GH (2006) The ABCs of centromeres. *Nature Cell Biol* 8:427–429.
Peterson CL & Laniel MA (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14:R546–R551.
Ruthenburg AJ, Allis CD & Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25:15–30.
Shahbazian MD & Grunstein M (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75–100.

Estrutura geral dos cromossomos

Akhtar A & Gasser SM (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature Rev Genet* 8:507–517.
Callan HG (1982) Lampbrush chromosomes. *Proc Roy Soc Lond Ser B* 21:417–448.
Chakalova L, Debrand E, Mitchel JA et al (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nature RevGenet* 6:669–678.
Cremer T, Cremer M, Dietzel S et al (2006) Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18:307–316.
Ebert A, Lein S, Schotta G & Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* 14:377–392.
Fraser P & Bickmore W (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447:413–417.
Handwerger KE & Gall JG (2006) Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16:19–26.
Hirano T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:311–322.
Lamond AI & Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:605–612.
Maeshima K & Laemmli UK (2003) A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* 4:467–480.
Sims JK, Houston SI, Magazinnik T & Rice JC (2006) A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* 281:12760–12766.
Speicher MR & Carter NP (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Rev Genet* 6:782–792.
Zhimulev IF (1998) Morphology and structure of polytene chromosomes. *AdvGenet* 37:1–566.

Como os genomas evoluem

Batzer MA & Deininger PL (2002) ALU repeats and human genomic diversity. *Nature RevGenet* 3:370–379.
Blanchette M, Green ED, Miller W, & Haussler D (2004) Reconstructing large regions of an ancestral mammalian genome in silico. *Genome Res* 14:2412–2423.
Cheng Z, Ventura M, She X et al (2005) A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* 437:88–93.
Feuk L, Carson AR & Scherer S (2006) Structural variation in the human genome. *Nature Rev Genet* 7:85–97.
International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
International Human Genome Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931–945.
Koszul R, Caburet S, Dujon B & Fischer G (2004) Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *EMBO J* 23:234–243.
Margulies EH, NISC Comparative Sequencing Program & Green ED (2003) Detecting highly conserved regions of the human genome by multispecies sequence comparisons. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 68:255–263.
Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562.
Pollard KS, Salama SR, Lambert N et al (2006) An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443:167–172.
Sharp AJ, Cheng Z & Eichler EE (2007) Structural variation of the human genome. *Annu RevGenomics Hum Genet* 7:407–442.
Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS et al (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15:1034–1050.
The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–1320.
The ENCODE Project Consortium (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799–816.

Replicação, Reparo e Recombinação do DNA

5

Neste capítulo

MANUTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA 263

MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO DNA 266

INÍCIO E TÉRMINO DA REPLICAÇÃO DO DNA NOS CROMOSSOMOS 281

REPARO DO DNA 295

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA 304

TRANSPOSIÇÃO E RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA CONSERVATIVA 316

A capacidade das células manterem um alto grau de organização em um ambiente caótico depende da duplicação exata de grandes quantidades de informação genética armazenadas na forma química de DNA. Esse processo, denominado *replicação do DNA*, deve ocorrer antes de a célula produzir duas células-filhas geneticamente iguais. A manutenção da ordem também requer a vigilância contínua e o reparo dessa informação genética, uma vez que o DNA contido na célula é repetidamente danificado por compostos químicos e radiação oriundos do ambiente, por acidentes térmicos e por moléculas reativas. Neste capítulo, descrevemos as maquinarias proteicas responsáveis pela replicação e pelo reparo do DNA nas células. Essas maquinarias catalisam alguns dos processos mais rápidos e precisos que ocorrem na célula, e seus mecanismos demonstram claramente a elegância e a eficiência da química celular.

Enquanto a sobrevivência imediata de uma célula depende da capacidade de evitar alterações no seu DNA, a longo prazo a sobrevivência de uma espécie requer que as sequências do DNA sofram alterações ao longo de várias gerações. Apesar do grande esforço da célula para proteger seu DNA, alterações ocasionais na sequência acontecem. Com o passar do tempo, essas alterações produzem variações genéticas sujeitas à pressão seletiva durante a evolução dos organismos.

Começaremos este capítulo com uma breve discussão sobre as alterações que ocorrem no DNA à medida que ele vai sendo passado de geração em geração. A seguir, discutiremos os mecanismos celulares – replicação e reparo do DNA – responsáveis por manter essas alterações a um nível mínimo. Finalmente, consideraremos algumas das maneiras mais intrigantes pelas quais as sequências de DNA são alteradas – a recombinação do DNA, incluindo o movimento de sequências de DNA especiais nos cromossomos, denominados elementos de transposição.

MANUTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

Embora alterações genéticas ocasionais aumentem a sobrevivência a longo prazo de uma espécie, a sobrevivência de um organismo requer alta estabilidade genética. Raramente os processos de manutenção do DNA celular falham, resultando em uma alteração permanente no DNA. Tal alteração é chamada de **mutação**, podendo destruir um organismo, se ocorrer em uma posição vital na sequência de DNA.

As taxas de mutação são extremamente baixas

A **taxa de mutação**, isto é, a proporção na qual alterações visíveis acontecem nas sequências de DNA, pode ser determinada diretamente a partir de experimentos realizados em uma bactéria como *Escherichia coli* – um componente da nossa flora intestinal e um organismo comumente utilizado em laboratórios. Em condições de laboratório, a *E. coli* divide-se aproximadamente a cada 40 minutos, e uma única célula produz uma população bastante grande – vários bilhões – em menos de um dia. Em uma população assim, é possível detectar uma pequena proporção de bactérias que tenham sofrido uma mutação prejudicial em um deter-

minado gene, se este gene não for necessário à sobrevivência dessas bactérias. Por exemplo, a taxa de mutação de um gene específico, necessário à utilização do açúcar lactose como fonte de energia, pode ser determinada se as células forem cultivadas na presença de um açúcar diferente, como a glicose. A fração de genes danificados é subestimada em relação à taxa de mutação real, uma vez que várias mutações são *silenciosas* (p. ex., as mutações que alteram um códon, mas não o aminoácido codificado, ou aquelas que alteram o aminoácido, sem afetar a atividade da proteína codificada pelo gene). Estima-se que um único gene que codifica uma proteína de tamanho médio (~10^3 pares de nucleotídeos codificantes), após o ajuste para alterações silenciosas, sofra uma mutação (não necessariamente uma mutação que inative a proteína) a cada 10^6 gerações de células bacterianas aproximadamente. Em outras palavras, as bactérias apresentam uma taxa de mutação de um nucleotídeo alterado a cada 10^9 nucleotídeos por geração.

Recentemente, tornou-se possível medir diretamente a taxa de mutação em células germinais de organismos mais complexos com reprodução sexual como o nematódeo *C. elegans*. Esses vermes, que possuem tempo de geração de 4 dias, foram cultivados por várias gerações usando seu modo de reprodução de autofertilização (discutido no Capítulo 22). A sequência de DNA de uma grande região do genoma foi então determinada para diversos organismos descendentes e comparada à sequência do organismo progenitor. A análise mostrou que, em média, duas novas mutações (principalmente pequenas inserções e deleções) ocorriam no genoma haploide a cada geração. Se o número de divisões celulares necessárias para produzir gametas for considerado, a taxa de mutação é de aproximadamente 1 mutação a cada 10^9 nucleotídeos por divisão celular, o que representa uma taxa muito similar à taxa para a reprodução assexuada da *E. coli* apresentada anteriormente.

A determinação direta da taxa de mutação em células germinais de mamíferos é mais difícil, mas estimativas podem ser obtidas de modo indireto. Uma das maneiras é comparar as sequências de aminoácidos da mesma proteína em várias espécies. A fração de aminoácidos que difere entre duas espécies quaisquer pode então ser comparada ao número estimado de anos desde que este par de espécies divergiu a partir de um ancestral comum, como registrado em um fóssil. Esse método permite calcular o número de anos, em média, decorridos até que uma alteração herdada na sequência de aminoácidos de uma proteína tenha se tornado permanente no organismo. Como cada alteração normalmente reflete a alteração de um único nucleotídeo na sequência de DNA do gene que codifica tal proteína, esse valor pode ser utilizado para estimar o número médio de anos necessários para produzir uma única mutação estável nesse gene.

Esses cálculos normalmente subestimam bastante a taxa real de mutação, porque muitas mutações inutilizam a função da proteína e desaparecem da população, devido à seleção natural – isto é, pela eliminação preferencial dos organismos que as possuem. Há, porém, uma família de fragmentos de proteínas cujas sequências parecem não importar, permitindo que os genes que as codificam acumulem mutações sem sofrerem seleção negativa. Eles são os *fibrinopeptídeos*, fragmentos de 20 aminoácidos que são removidos do *fibrinogênio* quando este é ativado para formar a *fibrina* na coagulação sanguínea. Como a função dos fibrinopeptídeos aparentemente não depende da sua sequência de aminoácidos, eles suportam praticamente qualquer alteração de aminoácidos. Comparações entre sequências de fibrinopeptídeos podem, portanto, estimar as taxas de mutação nas células germinais. Estudos determinaram que uma proteína típica de 400 aminoácidos sofre uma alteração de aminoácidos uma vez a cada 200 mil anos, aproximadamente.

Um outro modo de estimar taxas de mutação em humanos é utilizar o sequenciamento de DNA para comparar sequências nucleotídicas correspondentes de espécies relacionadas em porções do genoma que provavelmente não contenham informações críticas. Como esperado, tais comparações produziram estimativas de taxas de mutação que concordam com aquelas obtidas pelos estudos com fibrinopeptídeos.

A bactéria *E. coli*, os vermes e os humanos diferem muito em seus modos de reprodução e em seus tempos de geração. Mesmo assim, quando as taxas de mutação de cada um são ajustadas para uma única rodada de replicação de DNA, eles são similares: cerca de uma alteração nucleotídica por 10^9 nucleotídeos cada vez que o DNA é replicado.

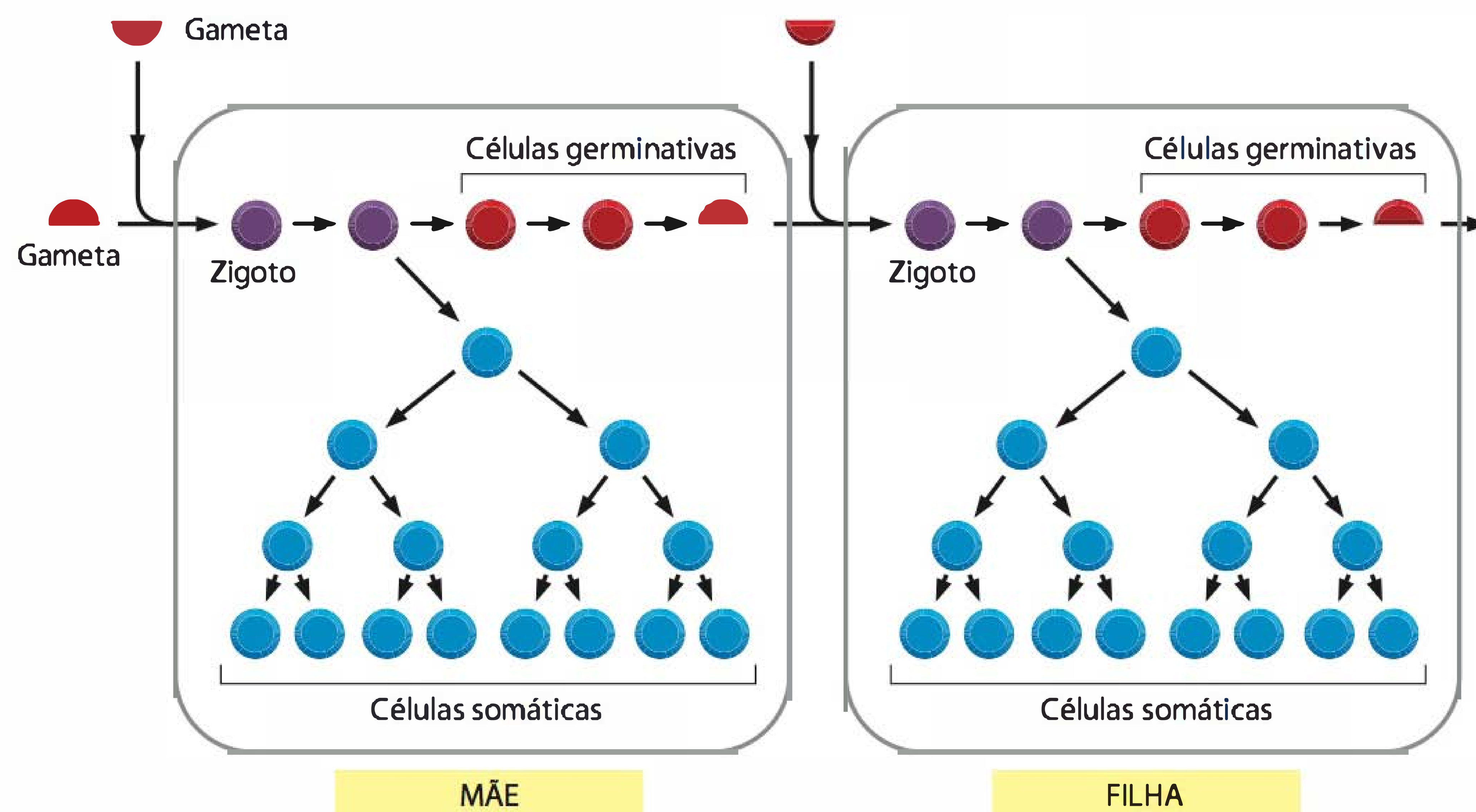


Figura 5-1 Células da linhagem germinativa e células somáticas realizam funções fundamentalmente diferentes. Em organismos de reprodução sexuada, as células germinativas (em *vermelho*) transmitem a informação genética à próxima geração. As células somáticas (em *azul*), que formam o corpo do organismo, são necessárias à sobrevivência das células germinativas, porém não deixam nenhuma progênie.

Baixas taxas de mutação são necessárias à vida que conhecemos

Como a maioria das mutações é prejudicial, nenhuma espécie pode permitir seu acúmulo em altas taxas nas células germinativas. Apesar da baixa frequência observada de mutações, acredita-se que o número de proteínas essenciais codificado por qualquer organismo seja limitado a aproximadamente 50 mil. Por este mesmo argumento, uma frequência de mutação 10 vezes maior limitaria um organismo a cerca de 5 mil genes essenciais. Nesse caso, a evolução estaria limitada a organismos bem menos complexos que a mosca-das-frutas.

As células de um organismo com reprodução sexual são de dois tipos: **células germinativas** e **células somáticas**. As células germinativas transmitem a informação genética do progenitor aos seus descendentes; as células somáticas formam o corpo do organismo (**Figura 5-1**). Vimos que as células germinativas devem ser protegidas contra as altas taxas de mutação para a manutenção da espécie. Entretanto, as células somáticas de organismos multicelulares também devem ser protegidas das alterações genéticas para preservar cada indivíduo. As alterações nucleotídicas em células somáticas podem gerar células variantes, algumas das quais, pela seleção natural, proliferam-se rapidamente às custas do resto do organismo. Em um caso extremo, o resultado é uma proliferação celular descontrolada, conhecida como câncer, uma doença que causa mais de 20% das mortes a cada ano na Europa e na América do Norte. Essas mortes são, em grande parte, provocadas pelo acúmulo de alterações na sequência de DNA das células somáticas (discutidas no Capítulo 23). É provável que um aumento significativo da frequência de mutação cause um desastroso aumento na incidência de câncer pela aceleração da taxa de surgimento dessas células variantes. Assim, tanto para a perpetuação de espécies com um grande número de genes (estabilidade das células germinais) quanto para evitar o câncer resultante de mutações nas células somáticas (estabilidade das células somáticas), os organismos multicelulares, incluindo os humanos, dependem da admirável fidelidade pela qual as sequências de DNA são replicadas e mantidas.

Resumo

Em todas as células, as sequências de DNA são mantidas e replicadas com alta fidelidade. A taxa de mutação, de aproximadamente um nucleotídeo alterado por 10^9 nucleotídeos cada vez que o DNA é replicado, é praticamente a mesma em organismos tão diferentes como bactérias e seres humanos. Devido a essa incrível precisão, a sequência do genoma humano (cerca de 3×10^9 pares de nucleotídeos) é alterada em apenas três nucleotídeos a cada divisão celular. Isso permite que a maioria dos seres humanos transmita instruções genéticas precisas de uma geração a outra e, também, evita que as alterações nas células somáticas originem um câncer.

MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO DNA

Todos os organismos devem duplicar seu DNA com extrema precisão antes de cada divisão celular. Nesta seção, exploramos como uma "maquinaria de replicação" tão elaborada atinge essa precisão ao mesmo tempo em que duplica o DNA a taxas altíssimas de até mil nucleotídeos por segundo.

A base para a replicação e o reparo do DNA é o pareamento das bases

Como discutido brevemente no Capítulo 1, o uso de um *DNA-molde* é o processo pelo qual a sequência de nucleotídeos de uma fita é copiada em uma sequência complementar de DNA (**Figura 5-2**). Esse processo requer o reconhecimento de cada nucleotídeo na *fita-molde de DNA* por um nucleotídeo complementar livre (não-polimerizado) e a separação das duas fitas da hélice de DNA. Essa separação expõe os grupos doador e aceptor das ligações de hidrogênio em cada base do DNA, permitindo o pareamento com o nucleotídeo livre a ser incorporado e alinhando-o para a polimerização catalisada pela enzima na nova cadeia de DNA.

A primeira enzima que polimeriza DNA, a **DNA-polimerase**, foi descoberta em 1957. Os nucleotídeos livres que servem como substratos para essa enzima são trifosfatos de desoxirribonucleosídeo, e sua polimerização requer um molde de DNA de fita simples. As **Figuras 5-3** e **5-4** ilustram os detalhes dessa reação.

A forquilha de replicação de DNA é assimétrica

Durante a replicação do DNA na célula, cada uma das duas fitas originais atua como um molde para a formação de uma fita inteiramente nova. Como cada uma das duas células-filhas resultantes da divisão celular herda uma nova dupla-hélice de DNA formada por uma fita original e uma fita nova (**Figura 5-5**), diz-se que a replicação da dupla-hélice de DNA produzida pela DNA-polimerase é "semiconservativa". Como isso acontece?

Análises realizadas no início da década de 1960 usando cromossomos em replicação revelaram uma região de replicação localizada que se deslocava progressivamente pela dupla-hélice de DNA original. Devido a sua estrutura com forma de "Y", essa região de replicação ativa é chamada de **forquilha de replicação** (**Figura 5-6**). Na forquilha de replicação, um complexo multienzimático que contém a DNA-polimerase sintetiza o DNA das duas fitas novas.

Inicialmente, o mecanismo mais simples para a replicação do DNA parecia ser o crescimento contínuo das duas fitas, nucleotídeo a nucleotídeo, na forquilha de replicação, à me-

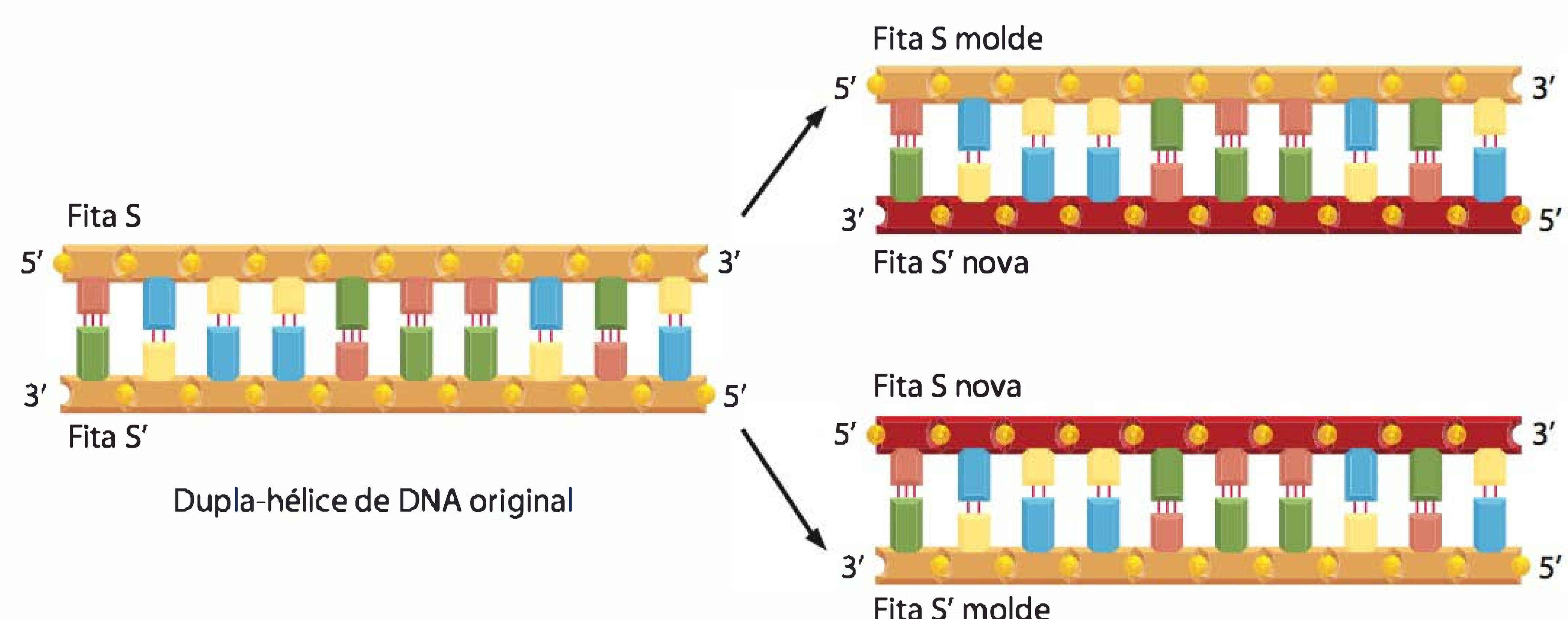


Figura 5-2 A dupla-hélice de DNA atua como um molde para sua própria duplicação. Como o nucleotídeo A forma um par apenas com T, e G apenas com C, cada fita do DNA pode atuar como molde para determinar a sequência de nucleotídeos da sua fita complementar pelo pareamento das bases do DNA. Desse modo, a molécula de DNA de fita dupla é precisamente copiada.

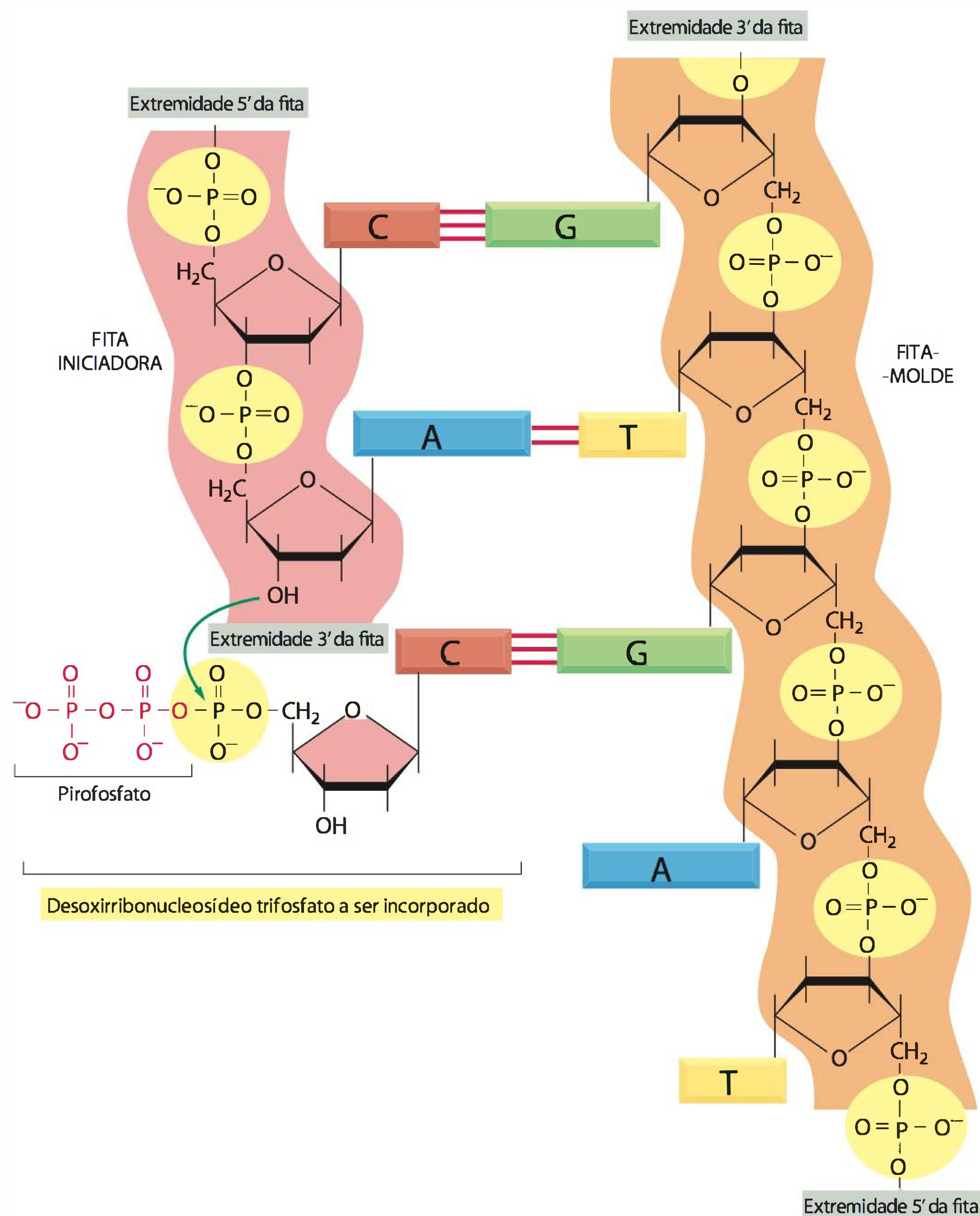


Figura 5-3 **Química da síntese de DNA.** A adição de um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3′ de uma cadeia polinucleotídica (*fita iniciadora*) é a reação fundamental da síntese do DNA. Como mostrado, o pareamento das bases entre o desoxirribonucleosídeo trifosfato a ser incorporado e uma fita de DNA existente (*fita-molde*) determina a formação da nova fita de DNA, resultando na sequência de nucleotídeos complementares.

dida que esta se desloca de uma extremidade à outra de uma molécula de DNA. No entanto, devido à orientação antiparalela das duas fitas de DNA na dupla-hélice (ver Figura 5-2), esse mecanismo necessitaria que uma das fitas fosse polimerizada na direção 5′-3′ e a outra na direção 3′-5′. Uma forquilha desse tipo requer duas enzimas DNA-polimerase diferentes. Todas as diversas DNA-polimerases descobertas, entretanto, polimerizam DNA apenas na direção 5′-3′.

Como, então, o crescimento 3′-5′ da cadeia de DNA acontece? A resposta foi primeiramente sugerida por resultados de experimentos realizados no final da década de 1960. Os pesquisadores adicionaram ^{3}H-timidina, altamente radiativa, a bactérias em divisão por alguns segundos, de maneira que apenas o DNA replicado mais recentemente – aquele logo atrás da forquilha de replicação – fosse marcado radiativamente. Esse experimento revelou a existência de segmentos transitórios com 1.000 a 2.000 nucleotídeos de comprimento, agora

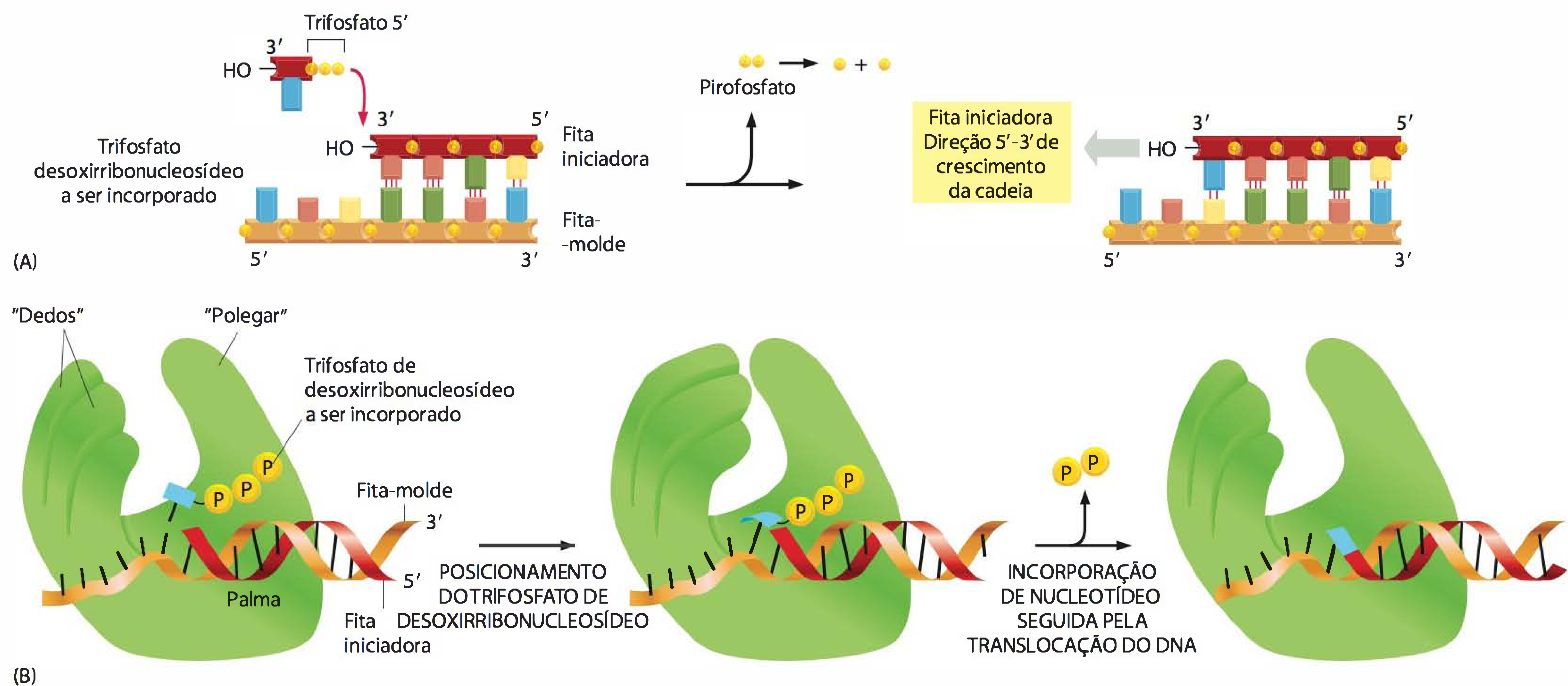


Figura 5-4 Síntese de DNA catalisada pela DNA-polimerase. (A) Como indicado, a DNA-polimerase catalisa a adição sequencial de um desoxirribonucleotídeo à extremidade 3′-OH da cadeia polinucleotídica, a *fita do oligonucleotídeo iniciador* que forma par com uma segunda *fita-molde*. A fita de DNA recém-sintetizada é então polimerizada na direção 5′-3′, como mostrado na figura anterior. Como cada trifosfato de desoxirribonucleosídeo deve formar o par com a fita-molde para ser reconhecido pela DNA-polimerase, essa fita determina qual dos quatro nucleotídeos possíveis (A, C, G ou T) será adicionado. A reação é promovida por uma grande alteração favorável da energia livre causada pela liberação do pirofosfato e sua subsequente hidrólise em duas moléculas de fosfato inorgânico. (B) Estrutura molecular de uma DNA-polimerase determinada por cristalografia de raios X. A estrutura assemelha-se a uma mão direita, na qual a palma, os dedos e o polegar seguram o DNA e formam o sítio ativo. Na sequência mostrada, o posicionamento correto de um trifosfato de desoxirribonucleosídeo provoca um aperto dos dedos da polimerase, iniciando assim a reação de adição do nucleotídeo. A dissociação do pirofosfato provoca a liberação dos dedos e a translocação do DNA em um nucleotídeo, de modo que o sítio ativo da polimerase está pronto para receber o próximo trifosfato desoxirribonucleosídeo.

comumente conhecidos como *fragmentos de Okasaki*, presentes na forquilha de replicação crescente. (Segmentos intermediários similares foram mais tarde encontrados na replicação de eucariotos, porém com apenas 100 a 200 nucleotídeos de comprimento.) Foi demonstrado que os fragmentos de Okasaki são polimerizados apenas na cadeia de direção 5′-3′ e são unidos após sua síntese, formando longas cadeias de DNA.

Assim, a forquilha de replicação possui uma estrutura assimétrica (**Figura 5-7**). A fita-filha de DNA sintetizada continuamente é denominada **fita-líder**, ou fita contínua. Sua síntese precede levemente a síntese da fita-filha sintetizada de modo descontínuo, conhecida como **fita retardada**, ou descontínua. Na fita descontínua, a direção da polimerização dos nucleotídeos é oposta à direção do crescimento da cadeia de DNA. A síntese dessa fita pelo mecanismo descontínuo e "ao contrário" significa que apenas o tipo de DNA-polimerase 5′-3′ é utilizado na replicação de DNA.

A alta fidelidade da replicação do DNA requer vários mecanismos de correção

Como discutido no início deste capítulo, a fidelidade da cópia do DNA durante a replicação é tal que apenas cerca de um erro é cometido para cada 10^9 nucleotídeos copiados. Essa fidelidade é muito maior do que se poderia esperar com base na precisão do pareamento complementar entre as bases. O pareamento complementar-padrão (ver Figura 4-4) não é o único possível. Por exemplo, com pequenas alterações na geometria da hélice, duas ligações

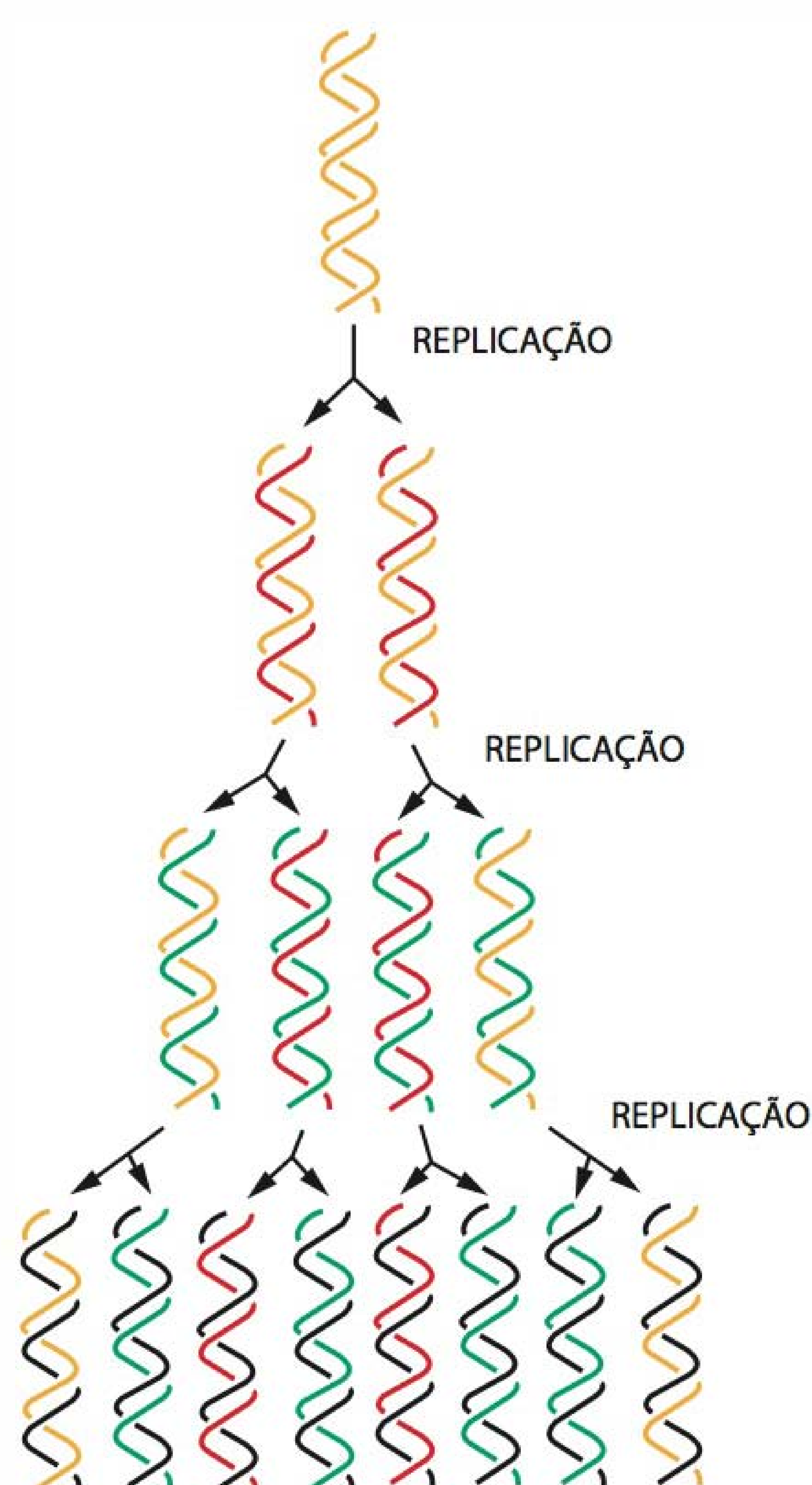


Figura 5-5 Natureza semiconservativa da replicação do DNA. Em um evento de replicação, cada uma das duas fitas de DNA é usada como molde para a formação de uma fita complementar de DNA. As fitas originais permanecem intactas por várias gerações celulares.

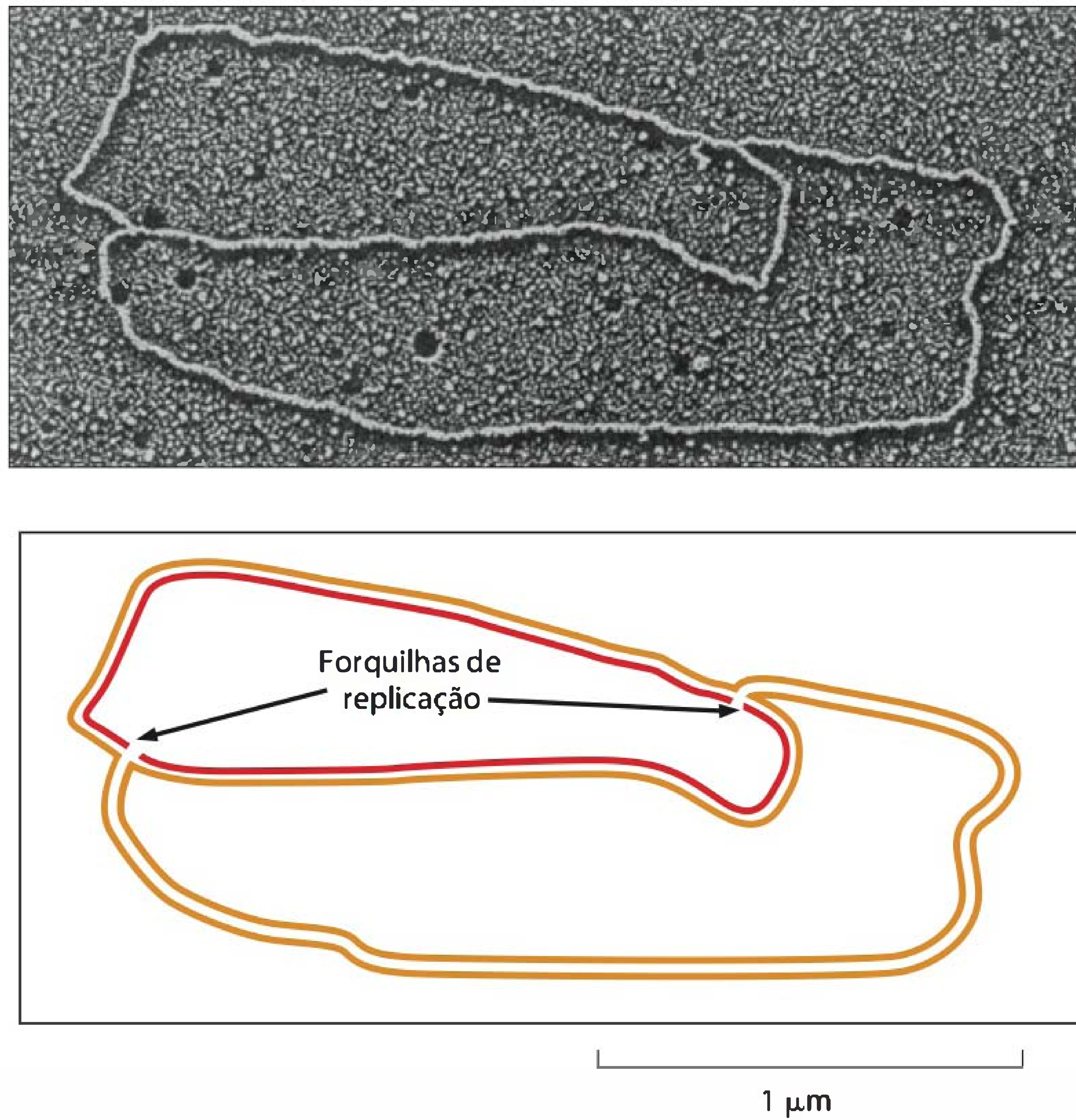


Figura 5-6 Duas forquilhas de replicação movem-se em direções opostas em um cromossomo circular. Uma zona de replicação ativa move-se progressivamente sobre a molécula de DNA em replicação, criando uma estrutura em forma de "Y", conhecida como forquilha de replicação: os dois braços do Y são as duas moléculas-filhas de DNA, e o tronco do Y é a hélice de DNA original. Neste diagrama, as fitas originais estão em *laranja*, e as fitas recém-sintetizadas estão em *vermelho*. (Micrografia cortesia de Jerome Vinograd.)

de hidrogênio podem ser formadas entre G e T no DNA. Além disso, formas tautoméricas raras das quatro bases do DNA ocorrem temporariamente em proporções de uma parte para 10^4 ou 10^5. Essas formas podem parear erroneamente sem alteração na geometria da hélice: a forma tautomérica rara de C forma par com A em vez de G, por exemplo.

Se a DNA-polimerase não fizesse nada quando um pareamento errado ocorresse entre o DNA-molde e o desoxirribonucleotídeo recém-polimerizado, o nucleotídeo errado seria incorporado à cadeia nascente de DNA, produzindo mutações frequentes. A alta fidelidade da replicação do DNA depende, dessa forma, não apenas do pareamento entre as bases complementares, mas também de vários mecanismos de correção que atuam sequencialmente para corrigir qualquer pareamento incorreto que possa ter ocorrido.

A DNA-polimerase realiza a primeira etapa da correção e ocorre imediatamente antes da adição do novo nucleotídeo à cadeia crescente. Nosso conhecimento sobre esse mecanismo veio de estudos em diferentes DNA-polimerases, incluindo uma produzida por um vírus de bactéria, chamado de T7, que se replica dentro da bactéria *E. coli*. O nucleotídeo correto tem uma maior afinidade pela polimerase em movimento em comparação ao incorreto, porque o pareamento correto é mais favorável energeticamente. Ainda, após a união por ligações de hidrogênio do nucleotídeo, mas antes de ser ligada covalentemente à cadeia crescente, a enzima deve sofrer uma alteração conformacional. Nessa alteração, os "dedos" da enzima apertam a região do sítio ativo (ver Figura 5-4). Como essa alteração ocorre mais prontamente com o pareamento correto do que com o incorreto, a polimerase pode verificar novamente a geometria exata do pareamento de bases antes de catalisar a adição do novo nucleotídeo.

A próxima reação de correção de erro, conhecida como *correção exonucleolítica*, ocorre imediatamente após os raros casos em que um nucleotídeo incorreto é covalentemente adicionado à cadeia crescente. As DNA-polimerases são altamente específicas para os tipos de cadeias de DNA que alongam: elas necessitam, absolutamente, de um pareamento de

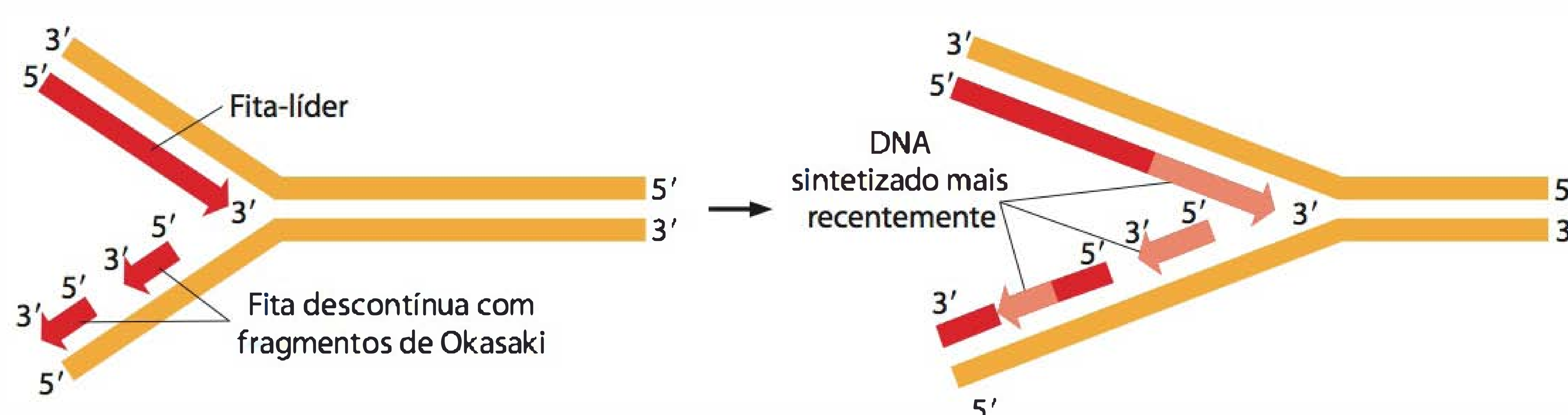


Figura 5-7 Estrutura de uma forquilha de replicação de DNA. Como as duas fitas de DNA são polimerizadas na direção 5′-3′, o DNA sintetizado na fita descontínua deve ser produzido inicialmente como uma série de pequenas moléculas de DNA, chamadas de *fragmentos de Okazaki*. Na fita descontínua, os fragmentos de Okazaki são sintetizados em sequência, sendo os mais próximos à forquilha os de síntese mais recente.

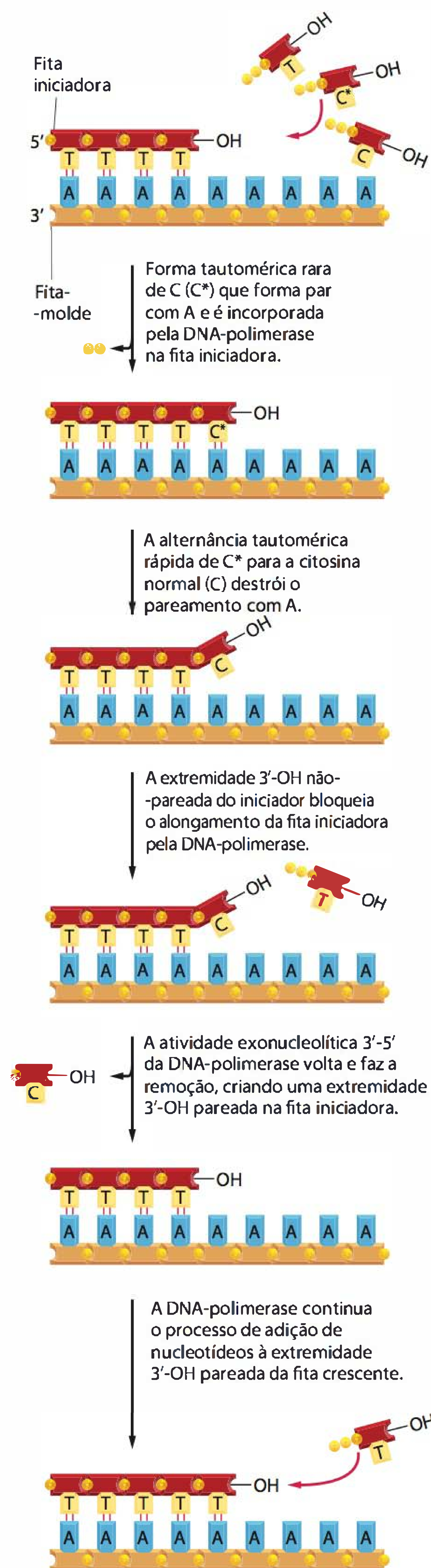


Figura 5-8 Correção exonucleolítica pela DNA-polimerase durante a replicação do DNA. Neste exemplo, o pareamento incorreto se deve à incorporação de uma forma tautomérica rara e temporária da base C, indicada por um asterisco. O mesmo mecanismo de correção aplica-se a qualquer incorporação incorreta na extremidade 3′-OH da cadeia crescente. A porção da DNA-polimerase que remove o nucleotídeo incorreto é um membro especializado de uma grande classe de enzimas, conhecidas como *exonucleases*, que clivam nucleotídeos, um por um, a partir de uma das extremidades de polinucleotídeos.

bases previamente formado, com extremidade 3′-OH, de uma *fita iniciadora* (*iniciador*) (ver Figura 5-4). Essas moléculas de DNA com um mal pareamento (pareamento impróprio) de nucleotídeos na extremidade 3′-OH da fita iniciadora não servem como molde eficiente porque a polimerase não pode alongar a fita. As moléculas de DNA-polimerase corrigem essas fitas iniciadoras com pareamentos incorretos por um sítio catalítico separado (em uma subunidade separada ou em um domínio separado da molécula, dependendo da polimerase). Essa atividade de *exonuclease de correção 3′-5′* cliva qualquer nucleotídeo não-pareado na extremidade do iniciador, continuando até que um número suficiente de nucleotídeos tenha sido removido para regenerar uma extremidade 3′-OH corretamente pareada, e então iniciar a síntese de DNA. Dessa forma, a DNA-polimerase atua como uma enzima de "autocorreção", que remove seus próprios erros de polimerização à medida que se desloca pelo DNA (**Figuras 5-8** e **5-9**).

As propriedades de autocorreção das DNA-polimerases dependem da necessidade de uma extremidade iniciadora perfeitamente pareada, e aparentemente não é possível que tais enzimas iniciem a síntese *de novo*. Por outro lado, as enzimas RNA-polimerases envolvidas na transcrição gênica não necessitam de uma atividade de correção exonucleolítica eficiente: os erros na síntese de RNA não são passados para a próxima geração, e as moléculas de RNA com defeitos ocasionais não têm maior relevância. As RNA-polimerases são capazes de iniciar novas cadeias polinucleotídicas sem um iniciador.

Uma taxa de erros de aproximadamente um em cada 10^4 é encontrada tanto na síntese de RNA como em um processo separado de tradução de sequências de RNA mensageiro (mRNA) em sequências proteicas. Essa proporção de erros é 100 mil vezes maior comparada à replicação de DNA, em que uma série de mecanismos de correção torna o processo extraordinariamente preciso (**Tabela 5-1**).

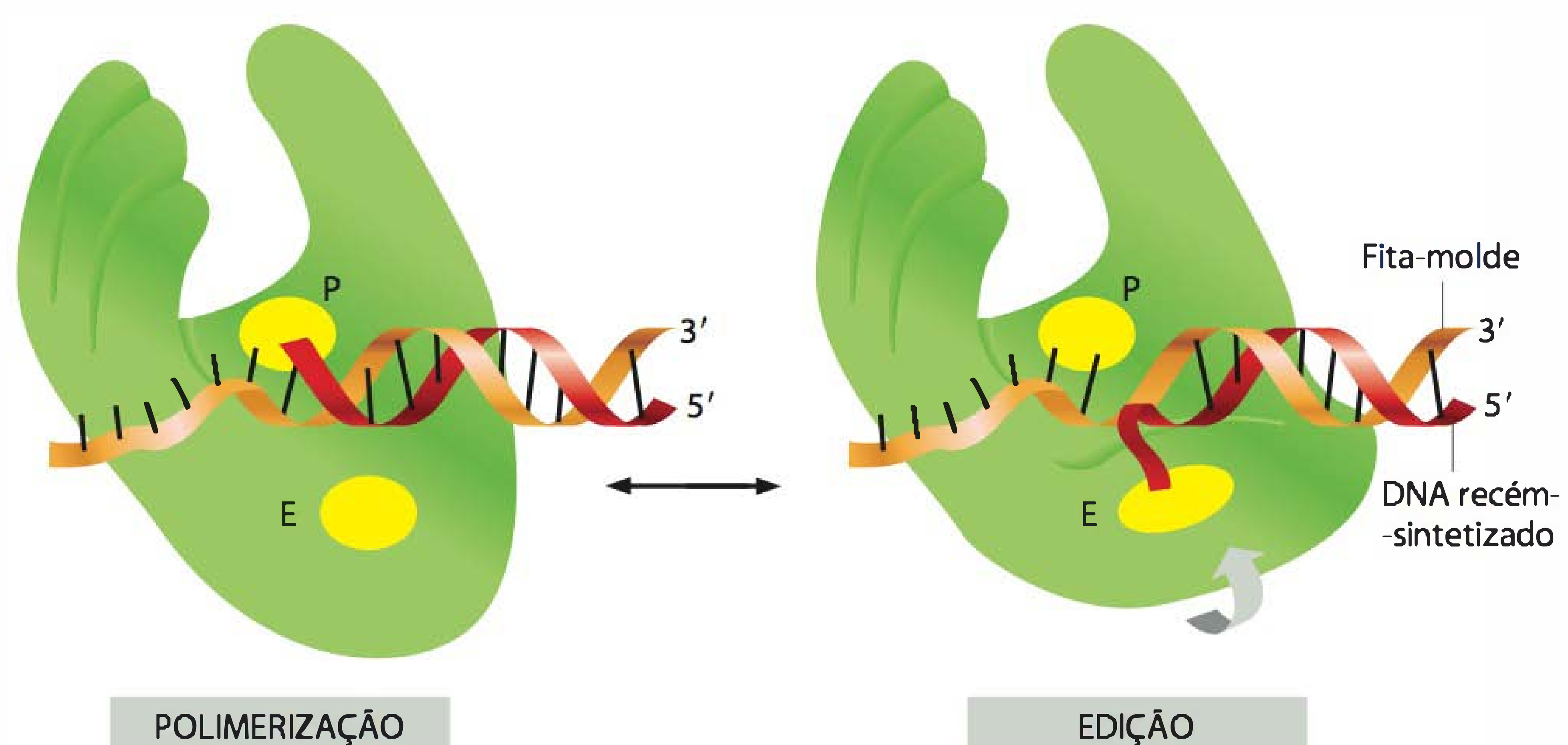


Figura 5-9 Edição pela DNA-polimerase. Esquema das estruturas da DNA-polimerase complexadas com o DNA-molde no modo de polimerização (*esquerda*) e no modo de edição (*direita*). Os sítios catalíticos para as reações de exonuclease (E) e polimerização (P) estão indicados. No modo de edição, o DNA recém-sintetizado temporariamente se libera do molde e a polimerase sofre uma alteração conformacional, posicionando o sítio catalítico de edição para remover o nucleotídeo mais recentemente adicionado.

Tabela 5-1 As três etapas que originam a síntese de DNA de alta fidelidade

Etapa de replicação	Erros por nucleotídeo
Polimerização 5′→3′	1 a cada 10^5
Correção exonucleolítica 3′→5′	1 a cada 10^2
Reparo de pareamento incorreto	1 a cada 10^2
Total	1 a cada 10^9

A terceira etapa, reparo de pareamento incorreto, será discutida mais adiante neste capítulo.

Apenas a replicação do DNA na direção 5′-3′ permite correção eficiente de erros

A necessidade da alta precisão provavelmente explica por que a replicação do DNA ocorre apenas na direção 5′-3′. Se houvesse uma DNA-polimerase capaz de adicionar trifosfatos de desoxirribonucleosídeo na direção 3′-5′, a extremidade crescente 5′, e não os mononucleotídeos a serem incorporados, conteria o trifosfato ativado. Nesse caso, os erros na polimerização não poderiam ser simplesmente hidrolisados, pois a extremidade 5′ assim formada

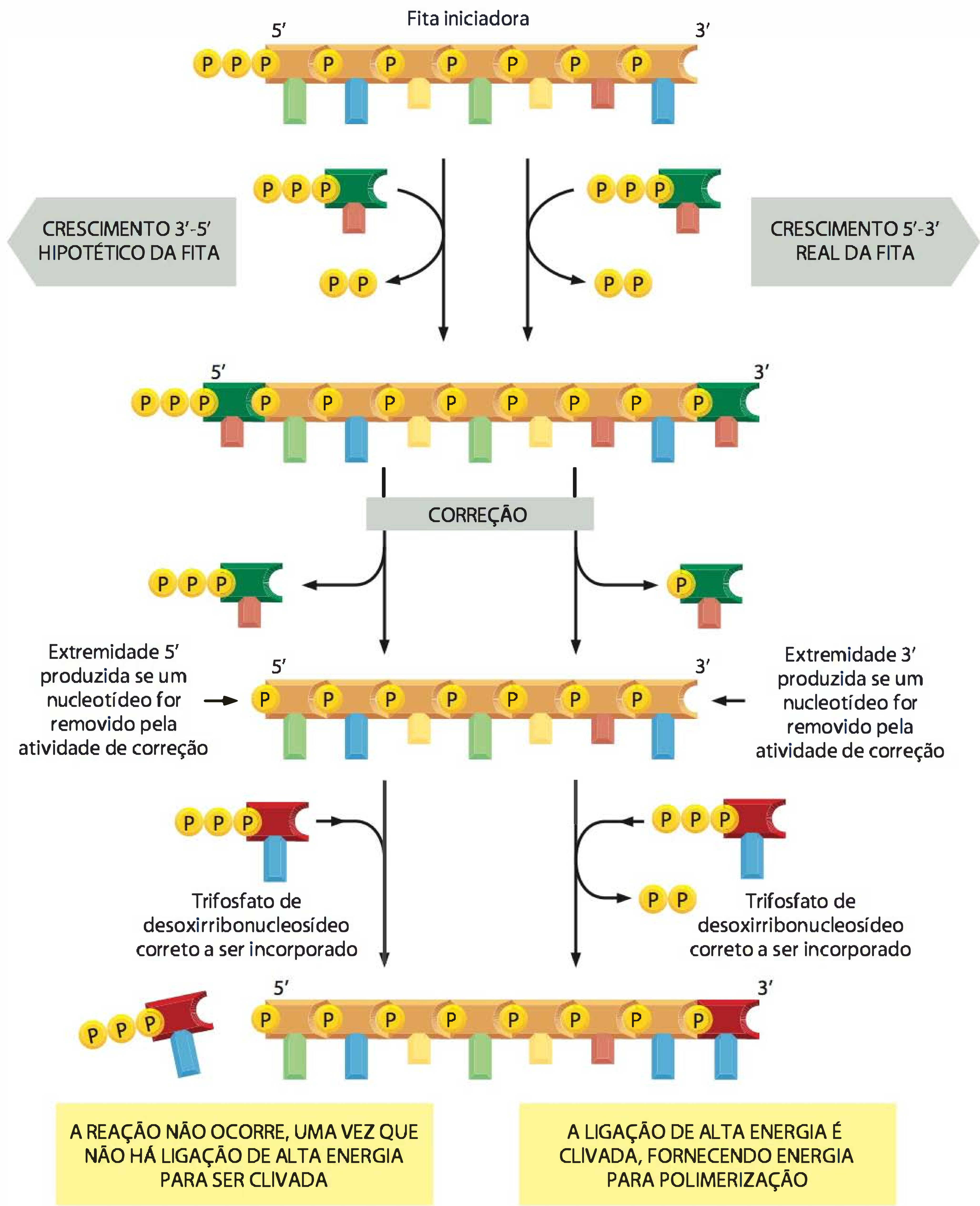


Figura 5-10 Uma explicação para a direção 5′-3′ da cadeia de DNA em crescimento. O crescimento na direção 5′-3′, mostrado à direita, permite que a cadeia continue a ser estendida quando um erro de polimerização é removido por correção exonucleolítica (ver Figura 5-8). Em contraste, a correção exonucleolítica no esquema de polimerização hipotético 3′-5′, mostrado à esquerda, bloqueia a continuação da extensão. Por conveniência, apenas a fita do oligonucleotídeo iniciador da dupla-hélice de DNA é mostrada.

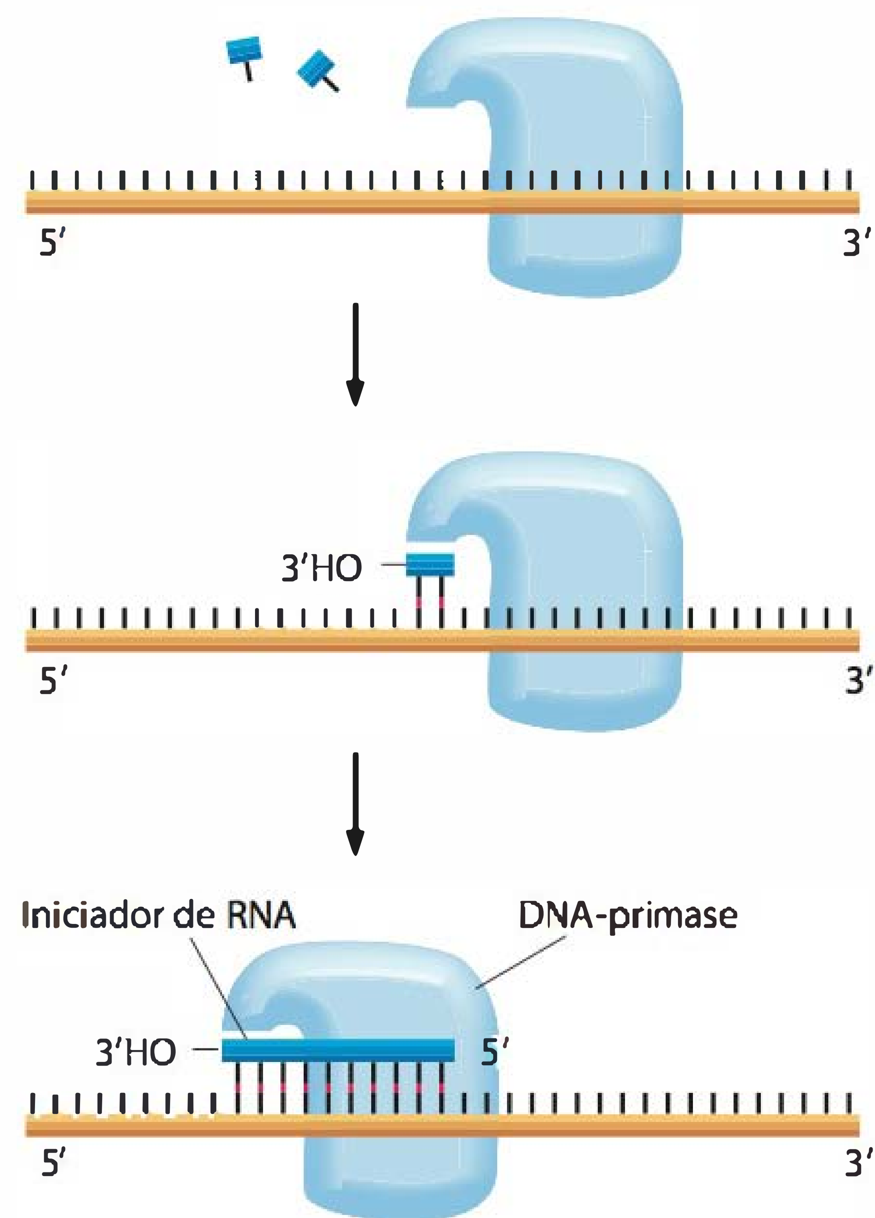


Figura 5-11 Síntese do RNA iniciador. Ilustração esquemática da reação catalisada pela *DNA-primase*, a enzima que sintetiza os pequenos iniciadores de RNA produzidos na fita descontínua, usando DNA como molde. Ao contrário da DNA-polimerase, essa enzima pode iniciar uma nova cadeia polinucleotídica pela ligação de dois trifosfatos de nucleosídeo. A primase sintetiza uma pequena cadeia polinucleotídica na direção 5′-3′ e para, deixando a extremidade 3′ do iniciador disponível para a DNA-polimerase.

imediatamente terminaria a síntese de DNA (**Figura 5-10**). Portanto, a correção de uma base mal pareada é possível apenas se esta for adicionada à extremidade 3′ da cadeia de DNA. Embora o mecanismo de replicação da fita descontínua (ver Figura 5-7) pareça complexo, ele preserva a direção de polimerização 5′-3′ necessária à atividade de correção exonucleolítica.

Apesar dos mecanismos para preservar o DNA contra erros de replicação, as DNA-polimerases eventualmente cometem erros. Entretanto, como veremos mais adiante, as células têm uma outra oportunidade de corrigir esses erros por um processo chamado de *reparo de erros de pareamento incorreto*. Antes de discutirmos esse mecanismo, descreveremos os outros tipos de proteínas que atuam na forquilha de replicação.

Uma enzima especial de polimerização de nucleotídeos sintetiza pequenas moléculas de iniciadores de RNA na fita descontínua

Na fita-líder, apenas um iniciador especial é necessário para o início da replicação: uma vez que a forquilha de replicação esteja estabelecida, a DNA-polimerase é continuamente apresentada à extremidade da cadeia com o pareamento ao qual irá adicionar novos nucleotídeos. No lado descontínuo da forquilha, por outro lado, cada vez que a DNA-polimerase completa um pequeno fragmento de Okasaki (o que leva alguns segundos), ela deve novamente iniciar a síntese de um fragmento completamente novo em um sítio mais adiante na fita-molde (ver Figura 5-7). Um mecanismo especial produz uma fita iniciadora complementar necessária à DNA-polimerase. Esse mecanismo envolve uma enzima chamada de **DNA-primase**, que utiliza trifosfatos de ribonucleosídeos para sintetizar pequenos **iniciadores de RNA** na fita descontínua (**Figura 5-11**). Nos eucariotos, esses iniciadores possuem cerca de 10 nucleotídeos e são produzidos em intervalos de 100 a 200 nucleotídeos na fita descontínua.

A estrutura química do RNA foi apresentada no Capítulo 1, sendo descrita em detalhes no Capítulo 6. Aqui, salientamos apenas que o RNA, em estrutura, é muito semelhante ao DNA. Uma fita de RNA pode formar pares de bases com uma fita de DNA, produzindo uma dupla-hélice híbrida DNA/RNA, se as duas sequências forem complementares entre si. Assim, a síntese dos iniciadores de RNA é regida pelo mesmo princípio de moldes usado para sintetizar DNA. Como o iniciador de RNA contém um nucleotídeo corretamente pareado com um grupo 3′-OH em uma extremidade, ele pode ser estendido pela DNA-polimerase a partir dessa extremidade, iniciando um fragmento de Okasaki. A síntese de cada fragmento de Okasaki termina quando a DNA-polimerase encontra o iniciador de RNA ligado à extremidade 5′ do fragmento anterior. Para produzir uma cadeia contínua de DNA a partir de vários fragmentos na fita descontínua, um sistema especial de reparo atua rapidamente para retirar o iniciador de RNA e substituí-lo por DNA. Uma enzima chamada de **DNA-ligase**, então, liga a extremidade 3′ do novo fragmento de DNA à extremidade 5′ do fragmento anterior, completando o processo (**Figuras 5-12** e **5-13**).

Por que um iniciador de RNA, que necessita ser removido, é preferível no lugar de um iniciador de DNA, que não teria a necessidade de remoção? O argumento de que uma polimerase autocorretiva não seria capaz de iniciar cadeias *de novo* também implica o contrário: uma enzima que inicia cadeias de modos diferentes não pode ser eficiente em autocorreção. Então, qualquer enzima que inicie a síntese de um fragmento de Okasaki necessariamente produz uma cópia relativamente imprecisa (no mínimo, 1 erro a cada 10^5). Mesmo que as cópias mantidas no produto final somassem apenas cerca de 5% do genoma total (p. ex., 10 nucleotídeos por fragmento de DNA com 200 nucleotídeos), haveria um enorme aumento na taxa de mutação. Dessa forma, parece que a utilização do RNA e não do DNA como iniciador traz uma grande vantagem para a célula: os ribonucleotídeos do iniciador automaticamente marcam essas sequências como "cópias suspeitas" para que sejam eficientemente removidas e substituídas.

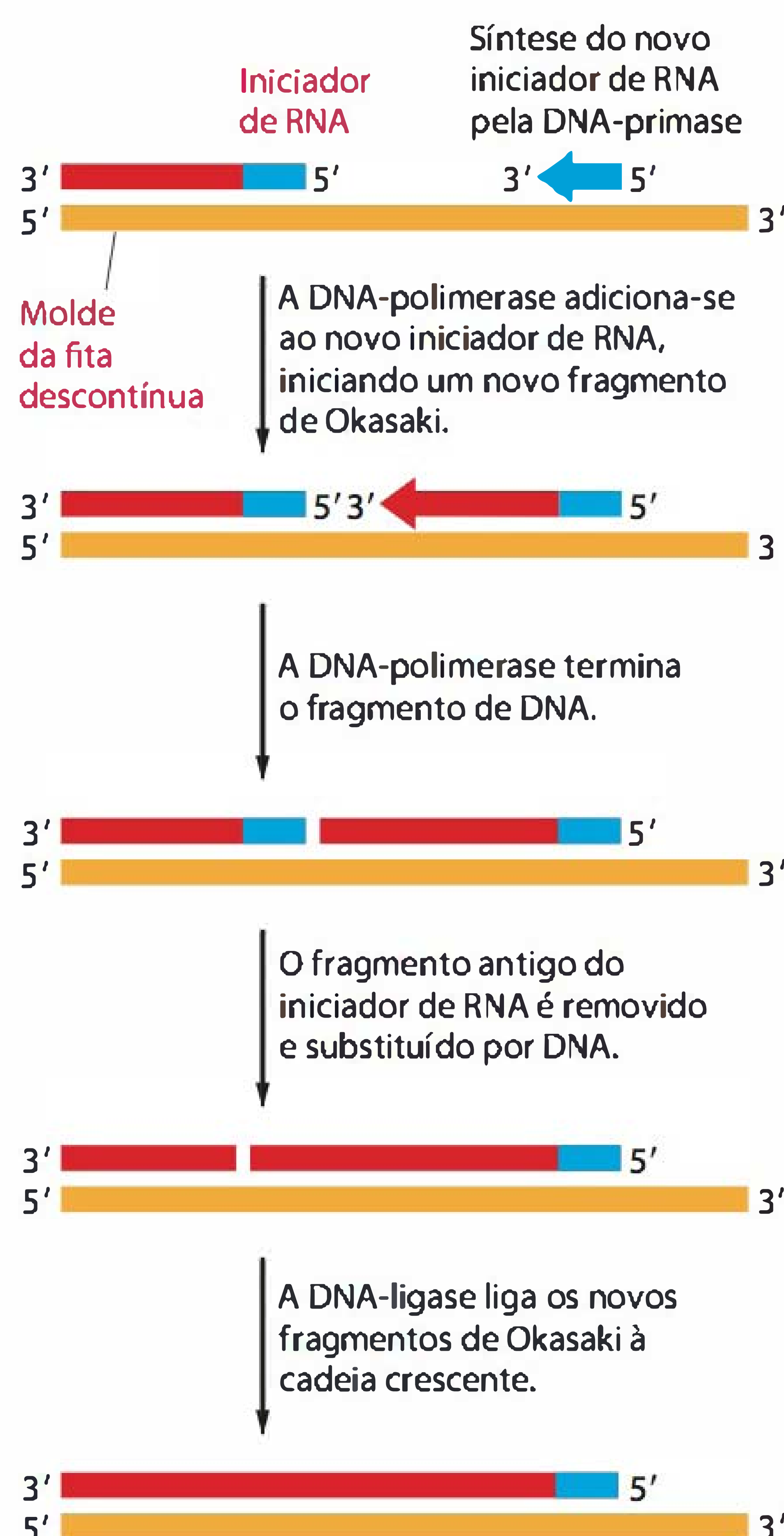


Figura 5-12 Síntese de um dos vários fragmentos de DNA da fita retardada (descontínua). Em eucariotos, os iniciadores de RNA são produzidos em intervalos de cerca de 200 nucleotídeos na fita descontínua, e cada iniciador possui aproximadamente 10 nucleotídeos. Esse iniciador é removido por uma enzima de reparo especial (uma RNAse H), que reconhece uma fita de RNA em uma hélice híbrida RNA/DNA, fragmentando-a e deixando um espaço que é preenchido pela DNA-polimerase e pela DNA-ligase.

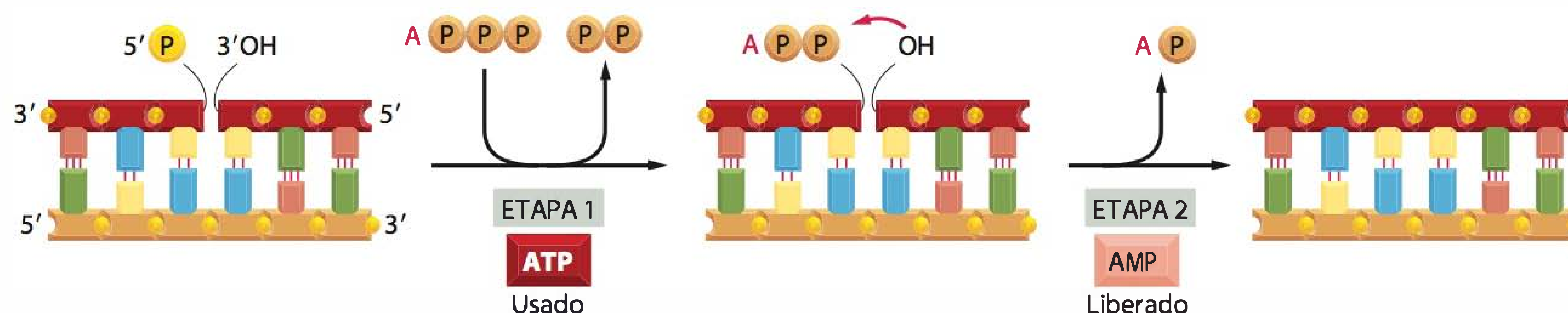


Figura 5-13 Reação catalisada pela DNA-ligase. Esta enzima religa uma ligação fosfodiéster "clivada". Como mostrado, a DNA-ligase utiliza uma molécula de ATP para ativar a extremidade 5′ na quebra (etapa 1) antes da formação da nova ligação (etapa 2). Desse modo, a reação de ligação, energeticamente desfavorável, é promovida pelo acoplamento do processo de hidrólise do ATP, energeticamente favorável.

Proteínas especiais auxiliam na abertura da dupla-hélice de DNA à frente da forquilha de replicação

Para que a síntese de DNA ocorra, a dupla-hélice deve ser aberta logo à frente da forquilha de replicação, para que os trifosfatos de desoxirribonucleosídeo a serem incorporados possam parear com a fita-molde. Entretanto, a dupla-hélice de DNA é bastante estável sob condições normais; as bases pareadas são unidas tão fortemente que são necessárias temperaturas altas, quase a temperatura de ebulição da água, para separá-las em tubos de ensaio. Por essa razão, duas proteínas de replicação adicionais – as DNA-helicases e as proteínas ligadoras de DNA de fita simples – são necessárias para promover a abertura da dupla-hélice e fornecer o molde de DNA de fita simples para que a polimerase possa atuar.

As **DNA-helicases** foram primeiramente isoladas como proteínas que hidrolisam trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*) quando ligadas a cadeias simples de DNA. Como descrito no Capítulo 3, a hidrólise do ATP pode alterar a conformação de uma molécula proteica de maneira cíclica, permitindo o trabalho mecânico executado pela proteína. As DNA-helicases utilizam esse princípio para impulsionarem-se rapidamente sobre a fita simples de DNA. Quando encontram uma região de dupla-hélice, continuam o deslocamento sobre essa fita, interferindo e separando a hélice em até mil pares de nucleotídeos por segundo (**Figuras 5-14** e **5-15**).

As duas fitas possuem polaridades opostas, e, em princípio, as helicases poderiam desenrolar a dupla-hélice de DNA movendo-se na direção 5′-3′ sobre uma fita, e na direção 3′-5′ sobre a outra. Ambos os tipos de helicases existem. No sistema de replicação mais bem compreendido, em bactérias, a helicase que desloca-se de 5′-3′ na fita-molde descontínua parece ter uma função predominante, por razões que logo ficarão claras.

As **proteínas ligadoras de fita simples de DNA** (**SSB, *single strand DNA-binding***), também denominadas *proteínas desestabilizadoras de hélices*, ligam-se fortemente e de maneira cooperativa para expor fitas simples de DNA sem encobrir suas bases, que permanecem disponíveis para o pareamento. Essas proteínas são incapazes de abrir diretamente uma longa hélice de DNA, mas auxiliam as helicases, estabilizando a conformação distorcida e de fita simples. Ainda, a ligação cooperativa cobre e estende as regiões de DNA de fita simples no molde da fita descontínua, dessa forma evitando a formação de pequenos grampos de hélices que seriam formados prontamente na fita simples (**Figuras 5-16** e **5-17**). Esses grampos de hélices podem impedir a síntese de DNA catalisada pela DNA-polimerase.

Uma cinta deslizante mantém a DNA-polimerase deslocando-se sobre o DNA

Em sua maioria as DNA-polimerases por si só sintetizam apenas um pequeno segmento de nucleotídeos e logo se dissociam do DNA-molde. A tendência à rápida dissociação da molécula de DNA permite que a DNA-polimerase que recém terminou a síntese de um fragmento

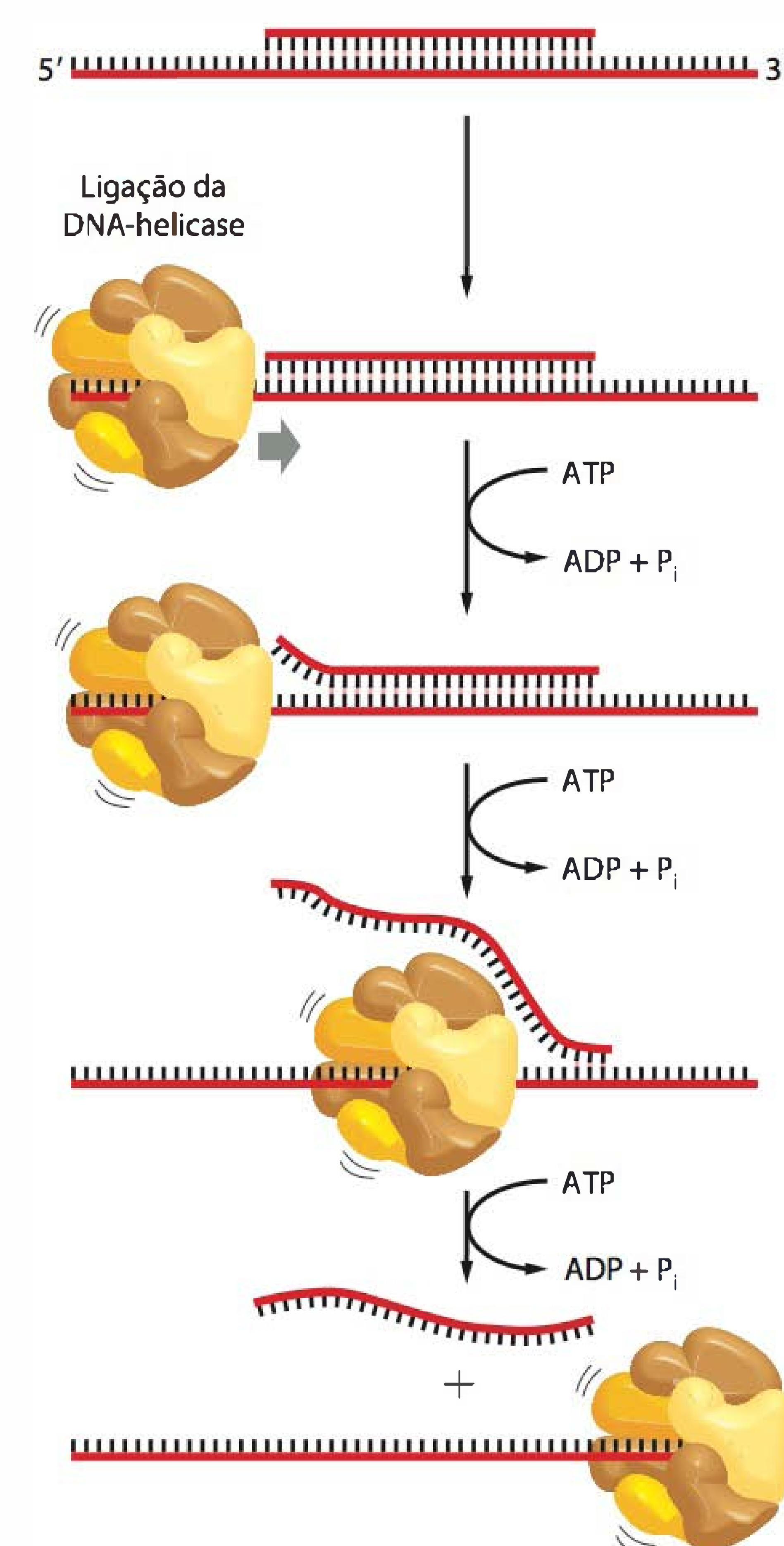


Figura 5-14 Ensaio utilizado para testar as enzimas DNA-helicases. Um pequeno fragmento de DNA é anelado a uma longa molécula de DNA de fita simples, formando uma região de DNA de fita dupla. A dupla-hélice é desfeita à medida que a helicase passa pelo DNA de fita simples, liberando o pequeno fragmento de DNA em uma reação que requer a presença da proteína helicase e de ATP. O movimento rápido da helicase é promovido pela hidrólise do ATP (ver Figura 3-77). Como indicado, várias DNA-helicases são compostas por seis subunidades.

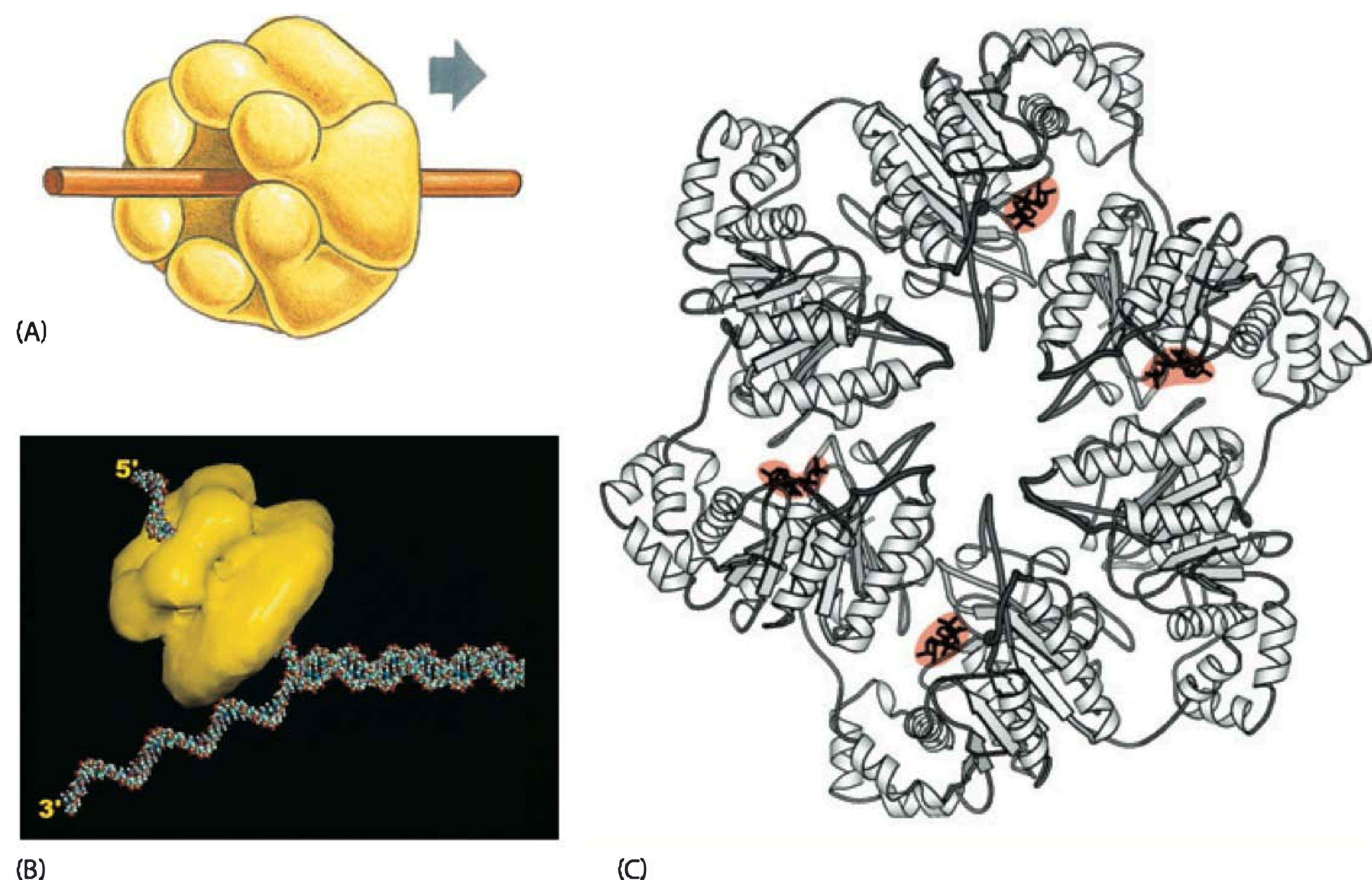


Figura 5-15 Estrutura de uma DNA-helicase. (A) Diagrama esquemático da proteína como um hexâmero em forma de anel. (B) Diagrama esquemático mostrando a forquilha de replicação e a helicase na mesma escala. (C) Estrutura detalhada da helicase replicativa do bacteriófago T7, determinada por difração de raios X. Seis subunidades idênticas ligam-se e hidrolisam ATP de um modo ordenado para impulsionar a molécula pela fita simples de DNA que é passada pela cavidade central do anel. Em *vermelho*, as moléculas de ATP ligadas à estrutura. (B, cortesia de Edward H. Egelman; C, de M. R. Singleton et al., *Cell* 101:589-600, 2000. Com permissão de Elsevier.)

de Okasaki na fita descontínua seja reciclada rapidamente e possa iniciar a síntese do próximo fragmento de Okasaki na mesma fita. Essa rápida dissociação, entretanto, dificultaria a síntese, pela DNA-polimerase, de longas fitas produzidas na forquilha de replicação caso não houvesse uma proteína acessória que atuasse como uma **cinta reguladora**. Essa cinta mantém a polimerase firmemente associada ao DNA enquanto está em movimento, mas a libera tão logo a polimerase encontre uma região de DNA de fita dupla.

Como pode uma cinta evitar a dissociação da polimerase sem, ao mesmo tempo, impedir seu rápido deslocamento sobre a molécula de DNA? A estrutura tridimensional da proteína da cinta, determinada por difração de raios X, mostra que ela forma um grande anel ao redor da hélice de DNA. Um lado do anel liga-se por trás da DNA-polimerase, e toda a cinta desliza livremente ao longo da molécula de DNA à medida que a DNA-polimerase se desloca. A montagem da cinta ao redor do DNA requer hidrólise de ATP por meio de um complexo proteico especial, o **montador da cinta**, que hidrolisa ATP enquanto monta a cinta em uma junção molde-iniciador (**Figura 5-18**).

No molde da fita-líder, a DNA-polimerase em movimento está fortemente ligada à cinta, e as duas permanecem associadas por um longo tempo. A DNA-polimerase sobre o molde da fita descontínua também utiliza a cinta, porém cada vez que a polimerase alcança a extremidade 5′ do fragmento de Okasaki anterior, a polimerase libera-se da cinta e dissocia-se do molde. Essa molécula de polimerase então se associa a uma nova cinta montada sobre o iniciador de RNA do próximo fragmento de Okasaki.

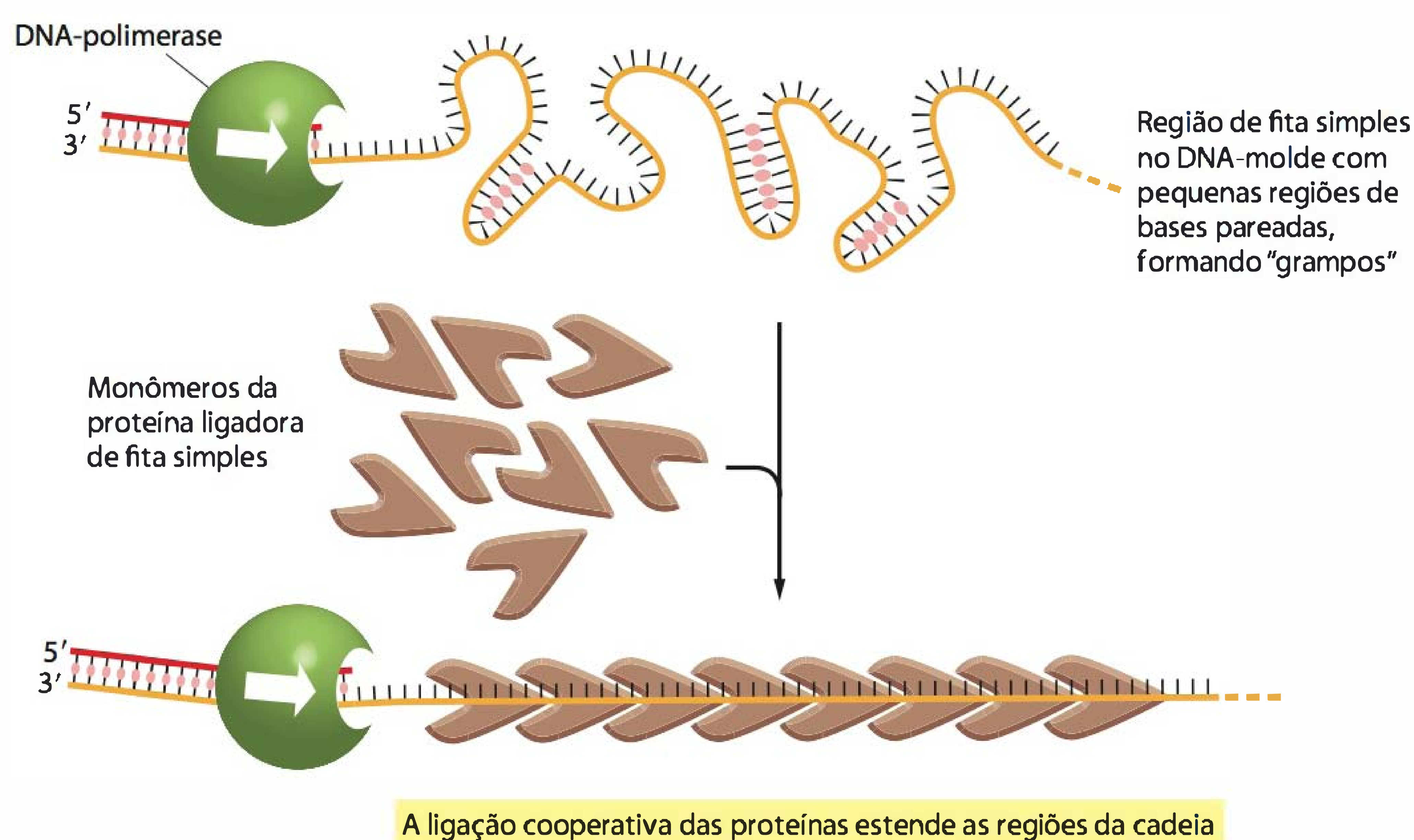


Figura 5-16 Efeito das proteínas ligadoras de fita simples de DNA (proteínas SSB) na estrutura de DNA de fita simples. Como cada molécula proteica prefere ligar-se próxima a uma molécula previamente ligada, extensas fileiras dessa proteína são formadas sobre a fita simples de DNA. Essa *ligação cooperativa* estende o DNA-molde e facilita o processo de polimerização. As hélices em "forma de grampo" mostradas na fita simples de DNA desprotegida resultam do pareamento ao acaso de pequenas regiões com sequências complementares semelhantes às pequenas hélices formadas normalmente nas moléculas de RNA (ver Figura 1-6).

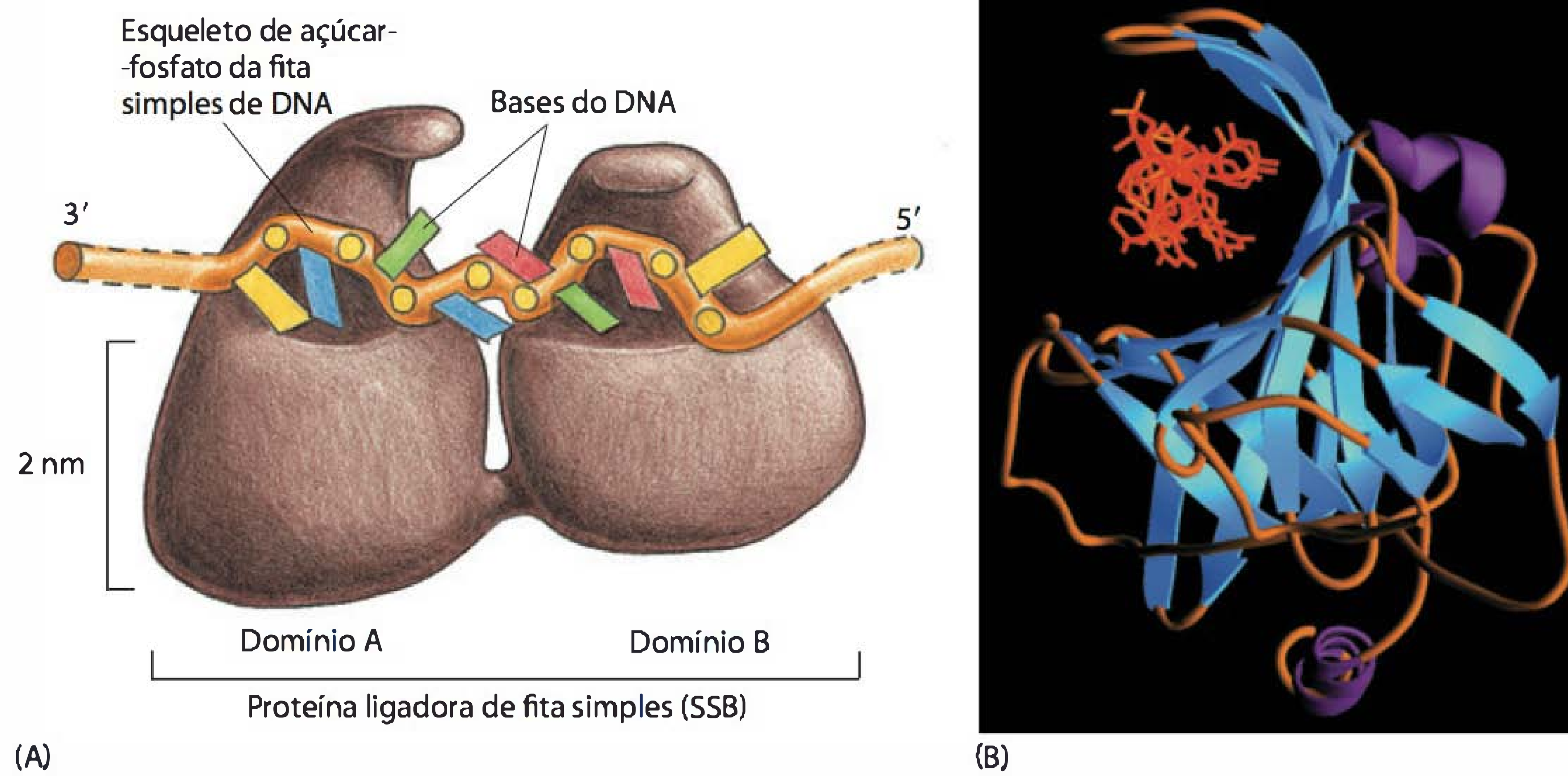


Figura 5-17 Estrutura da proteína ligadora de fita simples dos humanos ligada ao DNA. (A) Vista frontal dos dois domínios de ligação do DNA da proteína RPA, que cobre oito nucleotídeos no total. Observe que as bases do DNA permanecem expostas no complexo proteína-DNA. (B) Diagrama mostrando a estrutura tridimensional, com a fita de DNA (em *vermelho*) vista pela extremidade. (B, de A. Bochkarev et al., *Nature* 385:176-181, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Na forquilha de replicação, as proteínas cooperam para formar uma maquinaria de replicação

Apesar de termos discutido a replicação do DNA realizada por uma série de proteínas que atuam independentemente, na realidade a maior parte das proteínas é mantida unida em um grande complexo multienzimático que sintetiza DNA rapidamente. Esse complexo

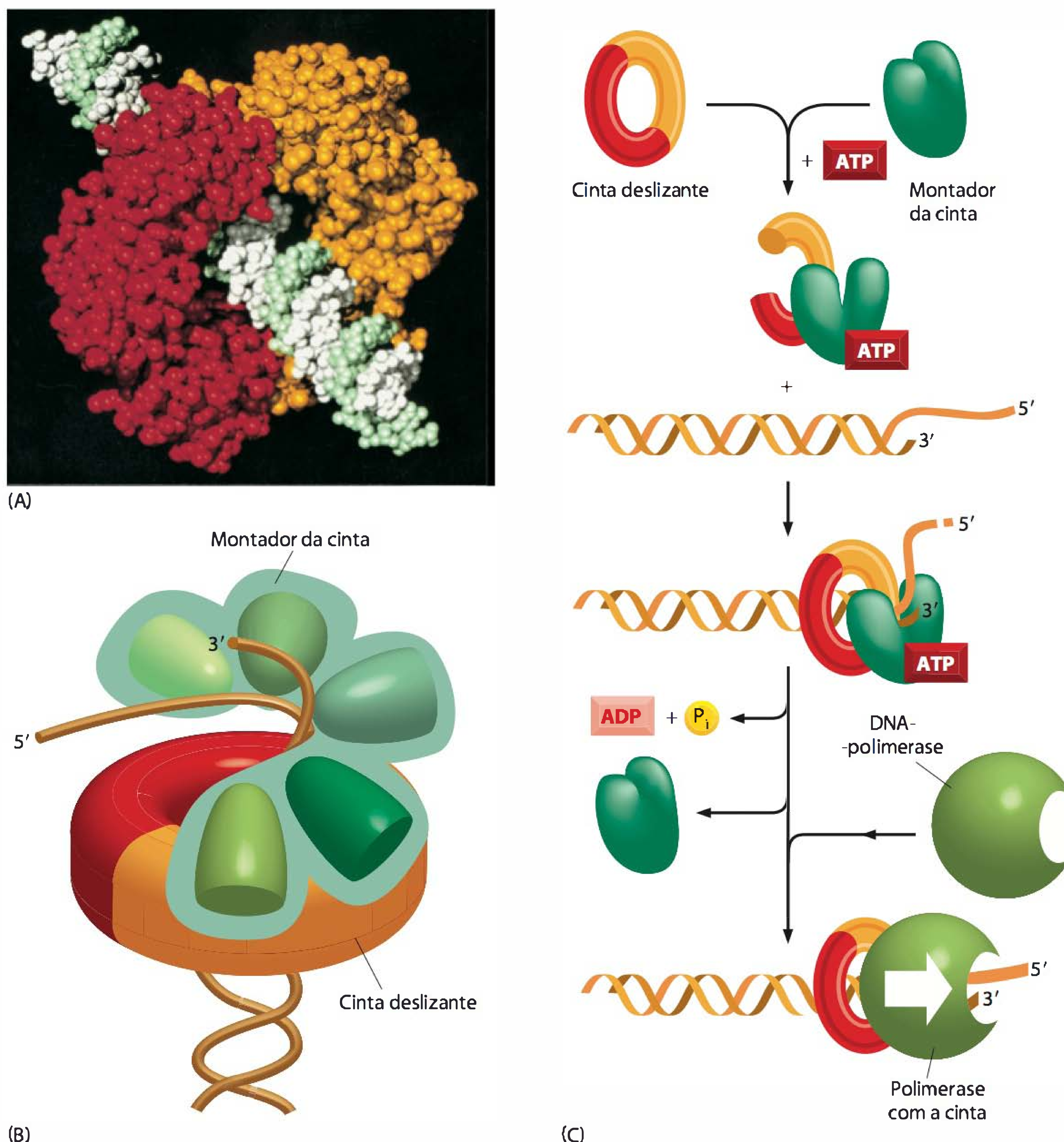


Figura 5-18 A cinta deslizante regulada que prende a DNA-polimerase ao DNA. (A) Estrutura da cinta deslizante de *E. coli*, determinada por cristalografia de raios X, com uma hélice de DNA adicionada para indicar como a proteína é ajustada ao redor do DNA. (B) A estrutura do montador da cinta, com 5 subunidades, lembra um parafuso, em que o corpo interage com os sulcos do DNA. Ele parece apertar em torno da junção com o iniciador até que seu progresso é bloqueado pela extremidade 3′ do iniciador, ponto em que o montador hidrolisa ATP e libera a cinta. (C) Ilustração esquemática mostrando como a cinta é montada para prender uma molécula de DNA-polimerase que se movimenta pelo DNA. Na reação simplificada mostrada aqui, o montador da cinta dissocia-se na solução uma vez que a cinta tenha sido formada. Em uma forquilha de replicação verdadeira, o montador da cinta permanece próximo à polimerase da fita descontínua, pronto para montar uma nova cinta no início da cada fragmento de Okasaki (ver Figura 5-19). (A de X. P. Kong et al., *Cell* 69:425-437, 1992. Com permissão de Elsevier; C, de G. D. Bowman, M. O'Donnell e J. Kuriyan, *Nature* 429:708-709, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

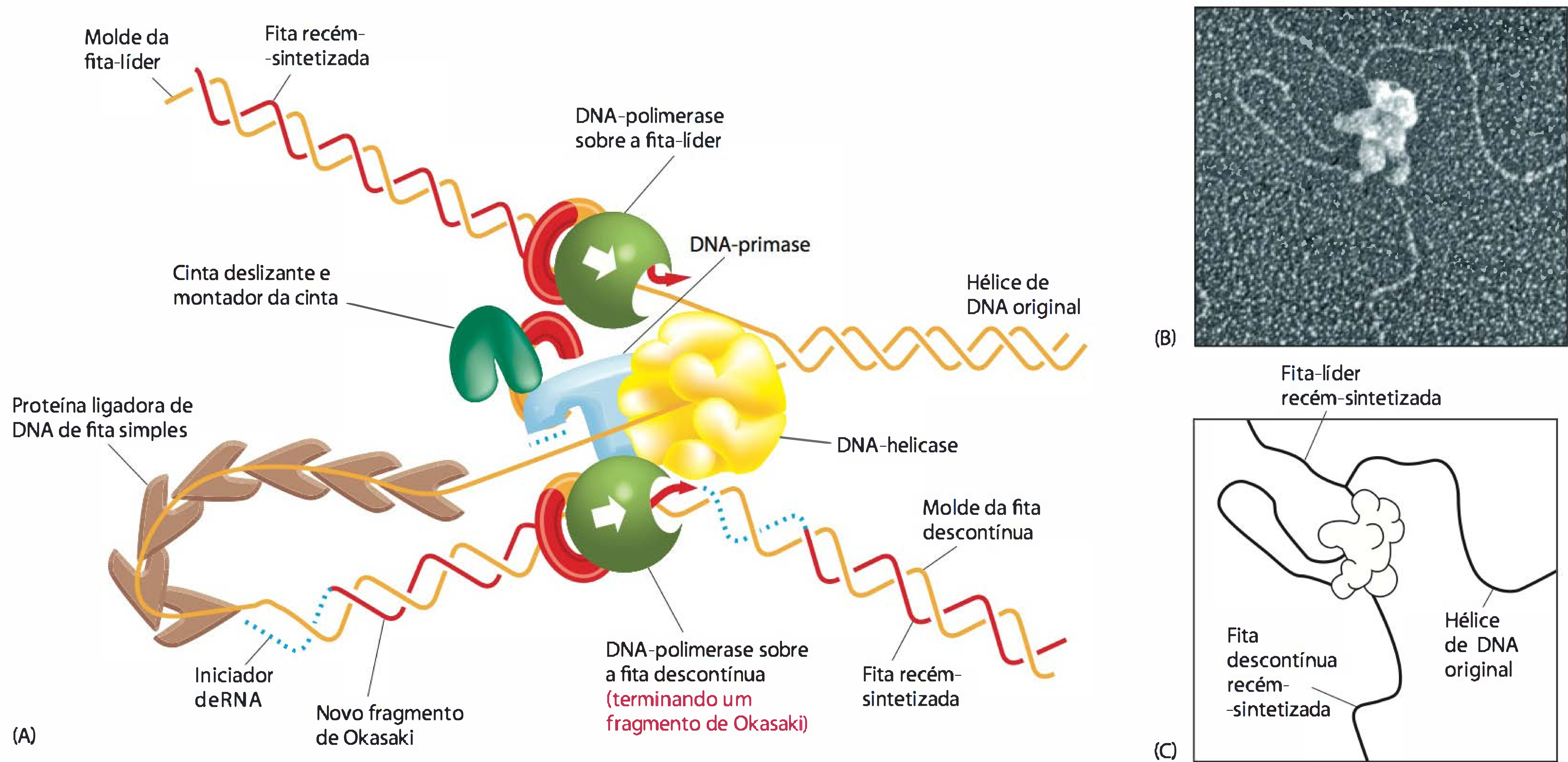


Figura 5-19 Forquilha de replicação em atividade. (A) Diagrama mostrando uma visão atual da disposição das proteínas de replicação em uma forquilha de replicação durante a síntese de DNA. A fita descontínua foi dobrada para aproximar-se da molécula de DNA-polimerase da fita descontínua e formar um complexo com a DNA-polimerase da fita-líder. Esse dobramento também aproxima a extremidade 3′ de cada fragmento de Okasaki completado do ponto de início do próximo fragmento de Okasaki. Como a DNA-polimerase da fita descontínua permanece ligada ao resto das proteínas de replicação, ela pode ser reutilizada na síntese dos sucessivos fragmentos de Okasaki. Neste diagrama, a polimerase está quase deixando o fragmento terminado de DNA e irá mover-se para o iniciador de RNA que será sintetizado bem perto, permitindo a síntese do próximo fragmento de DNA. Proteínas adicionais (não mostradas) que auxiliam na manutenção dos diferentes componentes proteicos junto à forquilha permitem que o complexo funcione como uma maquinaria proteica coordenada. (B) Micrografia eletrônica mostrando a maquinaria de replicação do bacteriófago T4 deslocando-se sobre um molde e sintetizando DNA atrás do complexo. (C) Desenho interpretativo da micrografia: observe especialmente a alça de DNA na fita descontínua. Aparentemente, as proteínas da replicação foram parcialmente removidas da frente da forquilha durante a preparação da amostra para a microscopia eletrônica. (B, cortesia de Jack Griffith; ver P. D. Chastain et al., *J. Biol. Chem.* 278:21276-21285, 2003.)

pode ser comparado a uma diminuta máquina de costura composta por peças proteicas e impulsionada pela hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo. Como na máquina de costura, o complexo de replicação provavelmente permanece estacionário; o DNA pode ser comparado a uma longa faixa de tecido sendo rapidamente costurada enquanto passa pela máquina. Embora o complexo de replicação tenha sido mais bem-estudado em *E. coli* e em vários de seus vírus, um complexo muito semelhante também ocorre em eucariotos, como visto a seguir.

As funções das subunidades da maquinaria de replicação estão resumidas na **Figura 5-19**A. Na frente da forquilha de replicação, a DNA-helicase abre a dupla-hélice de DNA. Duas moléculas de DNA-polimerase trabalham na forquilha, uma na fita-líder, e outra na fita descontínua. Enquanto a molécula de DNA-polimerase na fita-líder pode operar de modo contínuo, a molécula de DNA-polimerase na fita descontínua deve reiniciar em intervalos curtos, utilizando os pequenos iniciadores de RNA produzidos pela DNA-primase. A íntima associação de todos esses componentes proteicos aumenta bastante a eficiência da replicação, sendo possível graças à conformação da fita descontínua que parece dobrar-se para trás como mostra a Figura 5-19A. Esse arranjo também facilita a formação da cinta da polimerase cada vez que um fragmento de Okasaki é sintetizado: o montador da cinta e a molécula de polimerase da fita descontínua são mantidos unidos como parte da maquinaria proteica mesmo quando dissociados do DNA-molde. As proteínas da replicação são, portanto, mantidas unidas formando uma única unidade de grande tamanho (peso molecular total > 10^6 dáltons), permitindo que o DNA seja sintetizado dos dois lados da forquilha de modo eficiente e coordenado.

Na fita descontínua, a maquinaria de replicação de DNA deixa para trás uma série de fragmentos de Okasaki não-ligados, que ainda contêm segmentos de RNA que iniciaram a síntese a partir das extremidades 5′. Esse RNA é removido, e o intervalo resultante é preenchido por enzimas de reparo de DNA que atuam atrás da forquilha de replicação (ver Figura 5-12).

Um sistema de reparo de pareamento incorreto remove erros de replicação que escapam da maquinaria de replicação

Como mencionado anteriormente, bactérias como *E. coli* são capazes de se dividirem a cada 40 minutos, sendo relativamente fácil a verificação de grandes populações para encontrar uma célula mutante rara, com alterações em um processo específico. Uma classe interessante de mutantes contém alterações nos chamados *genes mutadores*, que aumen-

tam bastante a taxa de mutações espontâneas. Não é de surpreender que um desses mutantes produza uma forma defeituosa da exonuclease de correção 3′-5′, que é uma parte da enzima DNA-polimerase (ver Figuras 5-8 e 5-9). Essa forma mutante de DNA-polimerase não é mais capaz de fazer a correção eficiente do DNA, resultando no acúmulo de erros de replicação que teriam sido removidos se a enzima atuasse corretamente.

O estudo de outros mutantes de *E. coli* que exibem taxas anormalmente altas de mutação revelou um outro sistema de correção que remove erros de replicação produzidos pela polimerase e que escaparam à exonuclease de correção. Esse **sistema de reparo de pareamento incorreto** detecta o potencial de distorção na hélice de DNA que resulta da interação incorreta entre bases não-complementares.

Se o sistema de correção simplesmente reconhecesse um malpareamento no DNA recém-sintetizado e corrigisse aleatoriamente qualquer um dos dois nucleotídeos, o sistema corrigiria erroneamente o molde original da metade dos casos e, portanto, não reduziria a taxa total de erros. Para ser eficiente, esse sistema deve ser capaz de diferenciar e remover o nucleotídeo incorreto apenas na fita recém-sintetizada, onde o erro ocorreu.

Na *E. coli*, o mecanismo de diferenciação das fitas usado pelo sistema de reparo de pareamento incorreto depende da metilação de determinados resíduos A no DNA. Os grupos metil são adicionados a todos os resíduos A na sequência GATC, mas somente um tempo após a incorporação deste A na cadeia de DNA recém-sintetizada. Como resultado, as únicas sequências GATC que não foram ainda metiladas são as fitas recém-sintetizadas atrás da forquilha de replicação. O reconhecimento desses GATCs não-metilados permite que as fitas novas sejam temporariamente diferenciadas das sequências originais, possibilitando a remoção seletiva do erro. O processo de três etapas envolve o reconhecimento do erro, a remoção do segmento de DNA contendo o pareamento incorreto na fita recém-sintetizada e a ressíntese do segmento removido, tendo a fita original como molde. Esse sistema de reparo de pareamento incorreto reduz o número de erros produzidos durante a replicação por um fator adicional de 100 (ver Tabela 5-1, p. 271).

Um sistema semelhante para o reparo de pareamento incorreto atua em células humanas (**Figura 5-20**). A importância desse sistema é vista em indivíduos que herdam uma cópia defeituosa de um gene de reparo de pareamento incorreto (com uma cópia do gene funcional no outro cromossomo). Esses indivíduos apresentam uma predisposição significativa para certos tipos de câncer. Por exemplo, em um tipo de câncer de cólon, chamado de *câncer de cólon hereditário não-polipomatoso* (HNPCC, *Hereditary nonpolyposis colon cancer*), mutações espontâneas no gene funcional produzem clones de células somáticas que, devido à deficiência no sistema de reparo de pareamento incorreto, acumulam mutações rapidamente. A maioria dos cânceres surge a partir de células que acumularam múltiplas mutações (ver Figura 20-11), e as células deficientes para esse sistema de reparo apresentam uma chance muito aumentada de tornarem-se cancerosas. Felizmente, a maioria dos humanos herda

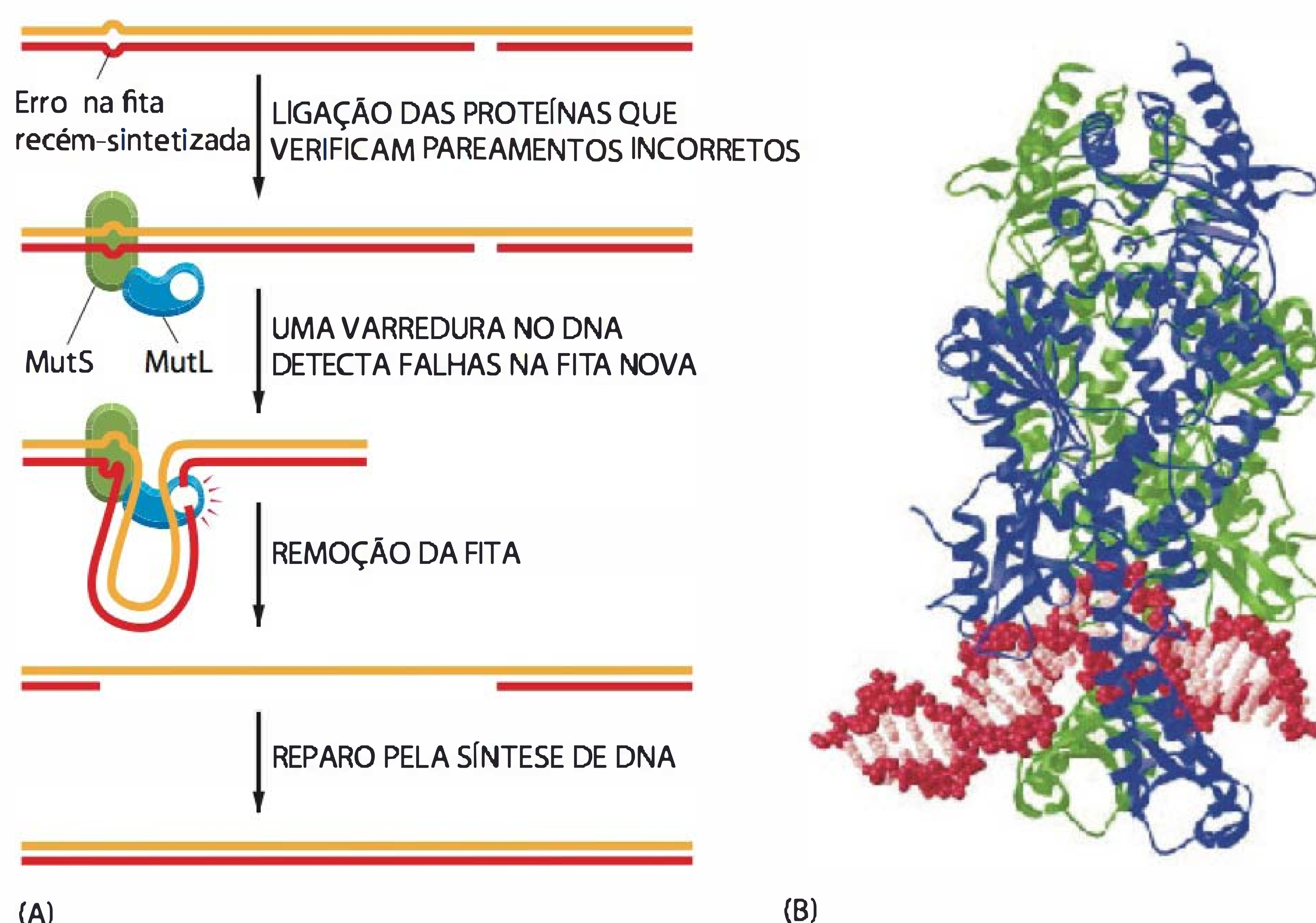


Figura 5-20 Modelo para o reparo de pareamento incorreto em eucariotos. (A) As duas proteínas mostradas estão presentes tanto em células bacterianas quanto em eucarióticas: a proteína MutS liga-se especificamente a um par de bases malpareadas, enquanto a MutL verifica o DNA das proximidades, procurando quebras. Uma vez encontrada uma quebra, a MutL promove a degradação da fita com a quebra até o pareamento incorreto. Como as falhas são quase exclusivamente confinadas às fitas recém-sintetizadas em eucariotos, os erros de replicação são removidos seletivamente. Em bactérias, o mecanismo é o mesmo, exceto por uma proteína adicional no complexo (MutH) que degrada sequências GATC não-metiladas (portanto, recém-sintetizadas), iniciando o processo aqui ilustrado. (B) Estrutura da proteína MutS ligada a um pareamento incorreto. A proteína é um dímero que se prende à hélice de DNA, como mostrado, torcendo o DNA no local do pareamento incorreto. Parece que a proteína MutS verifica pareamentos incorretos no DNA testando os sítios que podem ser prontamente curvados, isto é, aqueles sem um pareamento complementar correto. (B, de G. Obmolova et al., *Nature* 407:703-710, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

duas cópias corretas de cada gene que codifica uma proteína de reparo de pareamento incorreto; isso nos protege, pois é muito improvável que, na mesma célula, as duas cópias de um mesmo gene sofram uma mutação.

Nos eucariotos, o mecanismo para distinguir a fita recém-sintetizada da fita-molde original no local do pareamento incorreto não depende da metilação do DNA. Na verdade, alguns eucariotos – incluindo leveduras e *Drosophila* – não metilam seu DNA. As fitas de DNA recém-sintetizadas sofrem *clivagens* transitórias (antes de serem ligadas pela DNA-ligase), e experimentos bioquímicos demonstram que os sítios de clivagem (também chamados de *quebras de fita simples*) fornecem o sinal que direciona o sistema de correção de pareamento incorreto para a fita apropriada na célula eucariótica (ver Figura 5-20). Esse processo requer que as fitas de DNA recém-sintetizadas na fita contínua também sejam transitoriamente clivadas; ainda não está claro como isso ocorre.

As DNA-topoisomerases evitam o emaranhamento do DNA durante a replicação

O deslocamento da forquilha de replicação ao longo da fita dupla de DNA cria o chamado "problema do enrolamento". Cada 10 pares de bases replicados na forquilha correspondem a uma volta completa sobre o eixo da dupla-hélice original. Portanto, para permitir o movimento da forquilha, normalmente todo o cromossomo à frente da forquilha teria que girar rapidamente (**Figura 5-21**). Isso exigiria grandes quantidades de energia no caso de cromossomos longos; então, uma estratégia alternativa é utilizada: um suporte giratório é formado na hélice de DNA por proteínas conhecidas como **DNA-topoisomerases**.

Uma DNA-topoisomerase pode ser entendida como uma nuclease reversível que se liga covalentemente a um fosfato, clivando uma ligação fosfodiéster na cadeia de DNA. Essa reação é reversível, e a ligação fosfodiéster é regenerada quando a proteína é liberada.

Um tipo de topoisomerase, chamado de *topoisomerase I*, produz uma clivagem (ou quebra) temporária na fita simples; essa quebra na cadeia permite que as duas porções da hélice de DNA, formadas dos dois lados da quebra, girem livremente uma em relação à outra, usando a ligação fosfodiéster na fita oposta à quebra como ponto de suporte para a rotação (**Figura 5-22**). Qualquer tensão na hélice de DNA irá ditar a rotação na direção que alivia essa tensão. Como resultado, a replicação pode ocorrer com a rotação de pequenos segmentos da hélice – a porção logo à frente da forquilha. Como a ligação covalente que une a proteína DNA-topoisomerase ao fosfato do DNA mantém a energia da clivagem da ligação fosfodiéster, a religação é rápida e não requer fornecimento adicional de energia. A esse respeito, o mecanismo de religação difere daquele catalisado pela enzima DNA-ligase, discutido anteriormente (ver Figura 5-13).

Um segundo tipo de DNA-topoisomerase, a *topoisomerase II*, forma uma ligação covalente com ambas as fitas da hélice de DNA ao mesmo tempo, formando uma *quebra de fita dupla* temporária na hélice. Essas enzimas são ativadas por sítios nos cromossomos em que duas duplas-hélices se entrelaçam. Uma vez que a molécula de topoisomerase II liga-se a um desses sítios de cruzamento, a proteína utiliza a hidrólise do ATP para executar, eficientemente, um conjunto de reações: (1) clivagem reversível de uma dupla-hélice, criando uma "abertura" no DNA; (2) passagem da segunda dupla-hélice, que está próxima, pela abertura; e (3) religação da quebra e dissociação do DNA (**Figura 5-23**). Dessa forma, as topoisomerases do tipo II podem separar eficientemente dois círculos de DNA entrelaçados (**Figura 5-24**).

A mesma reação também evita sérios problemas de emaranhamento do DNA que poderiam surgir durante sua replicação. Essa função é bem demonstrada em células mutantes de leveduras que produzem uma versão da topoisomerase II que é inativada a 37°C, no lugar da versão original. Quando as células mutantes são incubadas a essa temperatura, os cromossomos-filhos permanecem entrelaçados após a replicação e são incapazes de se se-

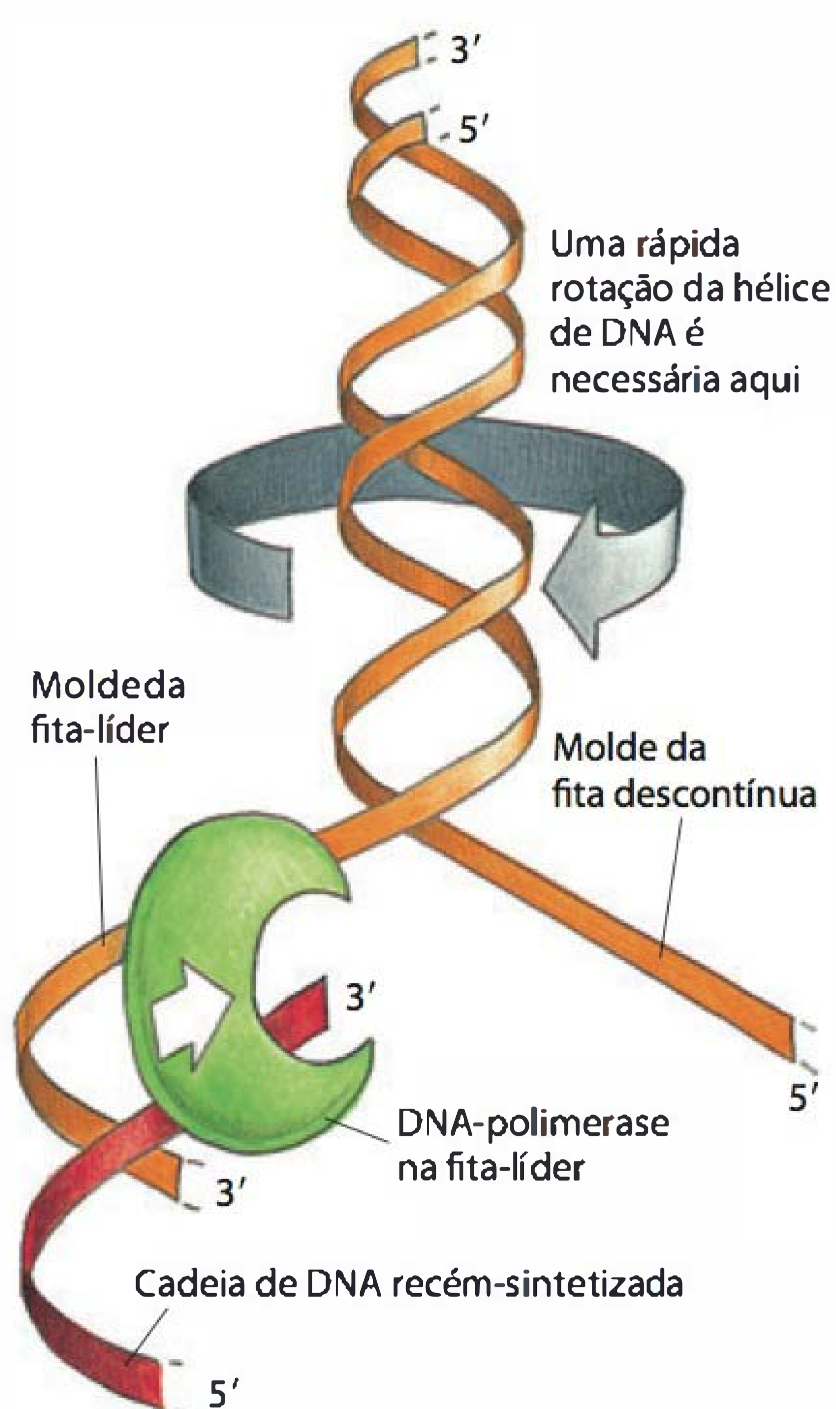


Figura 5-21 O "problema do enrolamento" que surge durante a replicação do DNA. No caso de uma forquilha de replicação bacteriana, que se desloca a uma velocidade de 500 nucleotídeos por segundo, a hélice de DNA original à frente da forquilha deve girar a 50 revoluções por segundo.

parar. A magnitude da utilidade da topoisomerase II para evitar o emaranhamento dos cromossomos pode ser comparada a um indivíduo com dificuldades em desenrolar uma linha de pescar emanharada sem o auxílio de tesoura.

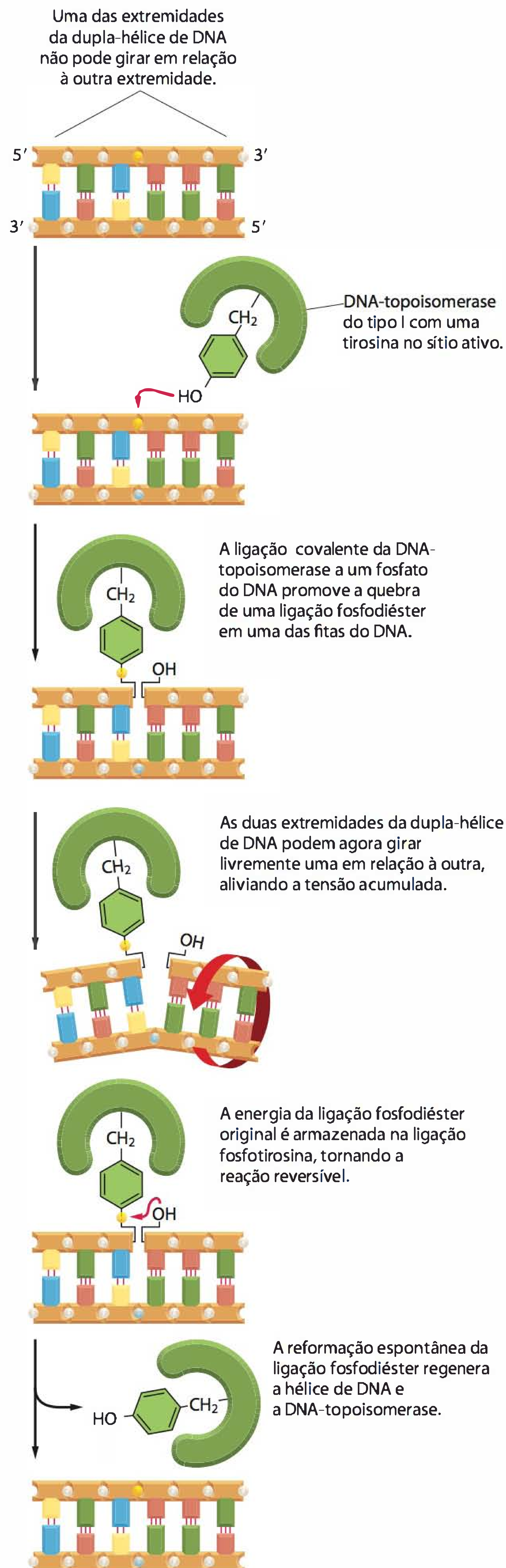


Figura 5-22 Reação reversível de quebra de DNA catalisada pela enzima DNA-topoisomerase I eucariótica. Como indicado, essas enzimas formam uma ligação covalente transitória com o DNA, permitindo a rotação livre do DNA em torno das ligações covalentes ligadas pelo fosfato em *azul*.

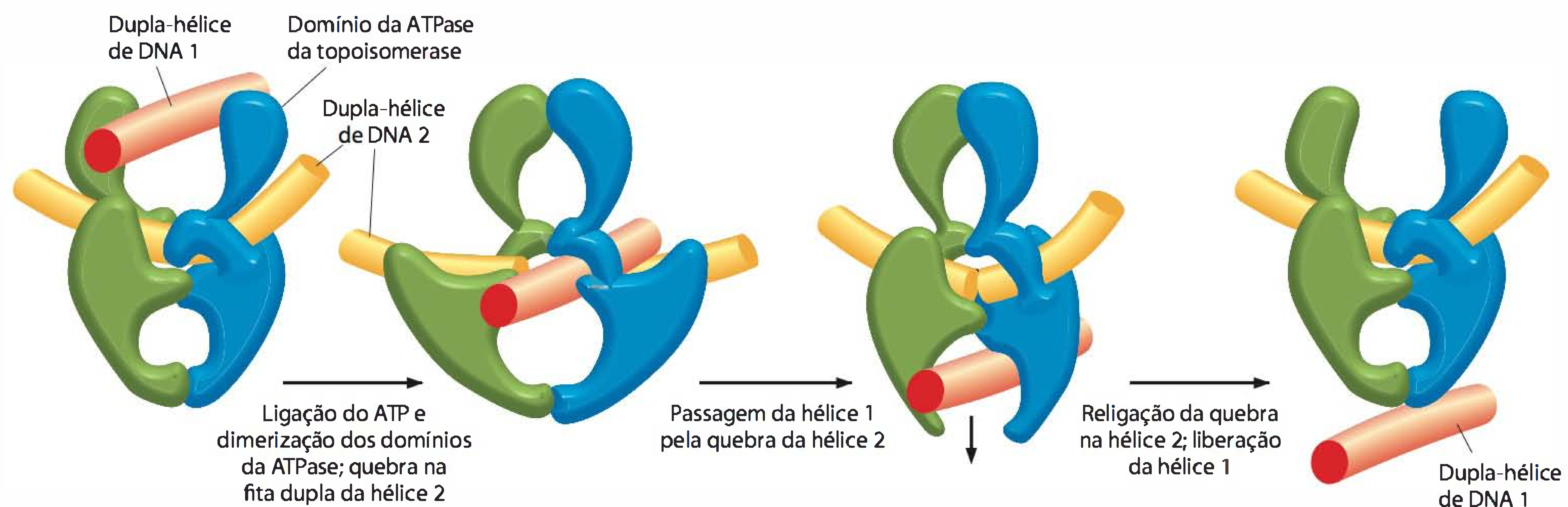


Figura 5-23 Modelo para a ação da topoisomerase II. Como indicado, a ligação do ATP aos dois domínios de ATPase provoca a sua dimerização e promove as reações mostradas. Como um único ciclo dessa reação pode ocorrer na presença de um análogo não-hidrolisável do ATP, a hidrólise do ATP parece ser necessária apenas para "zerar" a enzima a cada novo ciclo de reação. Esse modelo tem como base a estrutura da enzima e experimentos bioquímicos. (Modificada de J. M. Berger, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:26-32, 1998. Com permissão de Elsevier.)

A replicação do DNA é essencialmente semelhante em eucariotos e bactérias

Muito do que se sabe sobre a replicação do DNA foi descoberto a partir de estudos em sistemas multienzimáticos purificados de bactérias e bacteriófagos capazes de realizar replicação de DNA *in vitro*. O desenvolvimento desses sistemas, na década de 1970, foi bastante facilitado pelo isolamento prévio de mutantes em vários genes envolvidos na replicação; esses mutantes foram utilizados para identificar e purificar as proteínas de replicação correspondentes. O primeiro sistema de replicação em mamíferos capaz de replicar DNA *in vitro* foi descrito em meados da década de 1980, e as mutações nos genes que codificam quase todos os componentes da replicação já foram isoladas e analisadas na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como resultado, muito é conhecido sobre a enzimologia detalhada da replicação de DNA em eucariotos, e está claro que as características fundamentais da replicação – incluindo a geometria da forquilha de replicação e o uso de uma maquinaria multiproteica de replicação – foram conservadas durante o longo processo evolutivo que separa bactérias e eucariotos.

Existem mais componentes proteicos na maquinaria de replicação eucariótica em comparação aos seus análogos em bactérias, apesar de as funções básicas serem as mesmas. Assim, por exemplo, a proteína SSB eucariótica é formada por três subunidades, enquanto apenas uma única subunidade é encontrada em bactérias. Da mesma forma, a DNA-primase eucariótica é incorporada em uma enzima com múltiplas subunidades que também contém a DNA-polimerase, chamada de DNA-polimerase α-primase. Esse complexo proteico inicia cada fragmento de Okasaki na fita descontínua com o RNA e então estende o iniciador de RNA com um pequeno segmento de DNA. Nesse ponto, as duas principais polimerases eucarióticas de replicação, δ e ε, atuam completando cada fragmento de Okasaki ao mesmo tempo em que estendem a fita contínua. Ainda não está claro como ocorre a distribuição da síntese das fitas líder e descontínua entre as duas polimerases.

Como veremos na próxima seção, a maquinaria de replicação eucariótica possui um fator complicador adicional, pois precisa replicar passando pelos nucleossomos, as unidades estruturais repetidas dos cromossomos, discutidas no Capítulo 4. Os nucleossomos estão dispostos em intervalos de cerca de 200 pares de nucleotídeos ao longo do DNA, o que pode explicar por que os novos fragmentos de Okasaki na fita descontínua são sintetizados em intervalos de 100 a 200 nucleotídeos nos eucariotos, em vez de 1.000 a 2.000 nucleotídeos, como nas bactérias. Os nucleossomos podem, também, atuar como barreiras que reduzem o movimento das moléculas de DNA-polimerase, justificando por que a forquilha de replicação dos eucariotos possui um décimo da velocidade da forquilha bacteriana.

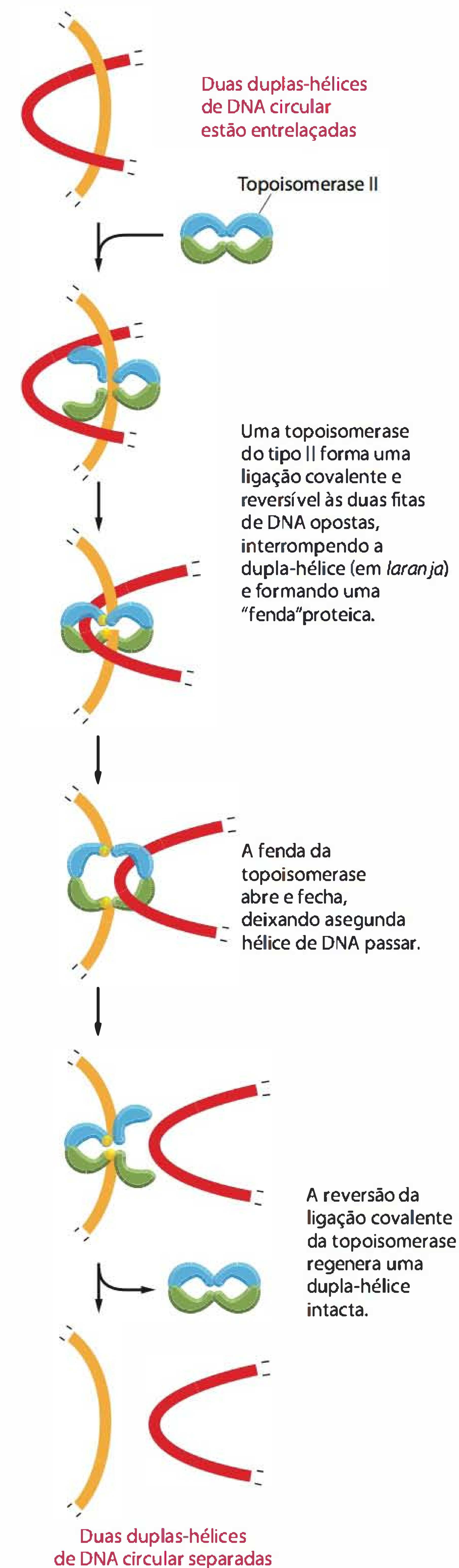


Figura 5-24 Reação de passagem da hélice de DNA catalisada pela topoisomerase II. Reações idênticas são utilizadas para evitar entrelaçamentos de DNA dentro da célula. Ao contrário das topoisomerases do tipo I, as enzimas do tipo II dependem da hidrólise do ATP; algumas das versões bacterianas podem introduzir uma tensão super-helicoidal no DNA. As topoisomerases do tipo II são limitadas quase exclusivamente a células proliferativas em eucariotos; parcialmente por isso, as topoisomerases são alvos comuns para fármacos anticâncer.

Resumo

A replicação do DNA ocorre em uma estrutura em forma de Y, chamada de forquilha de replicação. Uma enzima DNA-polimerase autocorretiva catalisa a polimerização de nucleotídeos na direção 5′-3′, copiando uma fita-molde de DNA com extraordinária fidelidade. Como as duas fitas da dupla-hélice de DNA são antiparalelas, essa síntese de DNA 5′-3′ só pode ser realizada continuamente em uma das fitas da forquilha de replicação (fita-líder). Na fita descontínua, pequenos fragmentos de DNA são sintetizados de trás para frente. Uma vez que a DNA-polimerase autocorretiva não pode iniciar uma nova cadeia, esses fragmentos da fita descontínua são iniciados por pequenas moléculas de RNA, que são, subsequentemente, removidas e substituídas por DNA.

A replicação do DNA necessita da cooperação de várias proteínas, incluindo (1) a DNA-polimerase e a DNA-primase, que catalisam a polimerização dos trifosfatos de nucleosídeo; (2) as DNA-helicases e as proteínas ligadoras de DNA de fita simples (SSBs), que auxiliam na abertura da dupla-hélice para permitir que as fitas sejam copiadas; (3) a DNA-ligase e uma enzima que degrada os iniciadores de RNA, para ligar os fragmentos descontínuos de DNA formados na fita descontínua, e (4) as DNA-topoisomerases, que aliviam a tensão causada pelo enrolamento helicoidal e os problemas de emaranhamento do DNA. Muitas dessas proteínas associam-se entre si na forquilha de replicação, formando uma "maquinaria de replicação" altamente eficiente, em que as atividades e os movimentos espaciais dos componentes individuais são coordenados.

INÍCIO E TÉRMINO DA REPLICAÇÃO DO DNA NOS CROMOSSOMOS

Vimos como um conjunto de proteínas de replicação gera duas duplas-hélices de DNA com rapidez e precisão atrás de uma forquilha de replicação móvel. Mas como essa maquinaria de replicação é formada no início do processo e como a forquilha é formada na molécula de DNA de fita dupla? Nesta seção, discutiremos como a replicação é iniciada e como as células regulam cuidadosamente esse processo, para assegurar que ele ocorra não apenas no local adequado do cromossomo, mas também no momento adequado da vida da célula. Também são discutidos alguns problemas especiais que a maquinaria de replicação eucariótica deve vencer. Esses problemas incluem a necessidade de replicar moléculas de DNA extremamente longas, e a dificuldade de copiar moléculas de DNA que estão fortemente complexadas com as histonas nos nucleossomos.

A síntese de DNA inicia na origem de replicação

Como discutido anteriormente, a dupla-hélice de DNA normalmente é muito estável: as duas fitas são unidas firmemente por várias ligações de hidrogênio formadas entre as bases presentes em cada fita. Para ser utilizada como molde, a dupla-hélice deve ser aberta, e as duas fitas precisam ser separadas para expor as bases não-pareadas. Como veremos, o processo de replicação de DNA é iniciado por *proteínas iniciadoras* especiais que se ligam à fita dupla de DNA e separam as duas ligações, rompendo as ligações de hidrogênio entre as bases.

As posições onde a hélice inicialmente é aberta são chamadas de **origens de replicação** (**Figura 5-25**). Em células simples, como bactérias e leveduras, as origens são determinadas por sequências de DNA formadas por várias centenas de pares de nucleotídeos. Esse DNA contém pequenas sequências de DNA que atraem as proteínas iniciadoras e segmentos de DNA especialmente fáceis de separar. Vimos, na Figura 4-4, que um par de bases A-T é man-

tido unido por menos ligações de hidrogênio que o par G-C. Portanto, as regiões do DNA ricas em pares A-T relativamente são mais fáceis de serem separadas e normalmente são encontradas nas origens de replicação.

Apesar de o processo básico de replicação, apresentado na Figura 5-25, ser o mesmo para bactérias e eucariotos, a maneira detalhada de como ele é executado e regulado difere entre esses dois grupos de organismos. Primeiramente, iremos considerar o caso das bactérias, mais simples e melhor entendido, e a seguir situações mais complexas que ocorrem em leveduras, em mamíferos e em outros eucariotos.

Os cromossomos bacterianos têm uma única origem de replicação do DNA

O genoma de *E. coli* está contido em uma única molécula de DNA circular com $4{,}6 \times 10^6$ pares de nucleotídeos. A replicação do DNA inicia em uma única origem de replicação, e as duas forquilhas formadas seguem (a cerca de 500 a 1.000 nucleotídeos por segundo) em direções opostas, até se encontrarem aproximadamente no meio do caminho ao redor do cromossomo (**Figura 5-26**). O único ponto no qual a *E. coli* pode controlar a replicação do DNA é o seu início: uma vez formadas na origem, as forquilhas deslocam-se a uma velocidade relativamente constante até o término da replicação. Portanto, não é de surpreender que o início da replicação seja um processo altamente controlado. Ele inicia quando múltiplas cópias de proteínas iniciadoras ligam-se a sítios específicos na origem de replicação, envolvendo o DNA ao redor das proteínas e formando um grande complexo proteína-DNA. Esse complexo, então, atrai a DNA-helicase ligada a um inibidor da helicase, e a helicase é colocada adjacente a uma fita simples de DNA, exposta pela formação do complexo proteínas iniciadoras-DNA. O inibidor da helicase é análogo ao montador da cinta visto anteriormente, mas possui a tarefa adicional de manter a helicase na forma inativa até que ela esteja corretamente colocada na forquilha de replicação nascente. Uma vez colocada, a helicase inicia o desenrolamento do DNA, expondo um segmento de DNA de fita simples suficiente para que a primase sintetize o iniciador de RNA que irá iniciar a fita contínua (**Figura 5-27**). Isso rapidamente leva ao agrupamento das demais proteínas, criando duas forquilhas de replicação com complexos de proteínas que se distanciam da origem em direções opostas. Essas maquinarias proteicas continuam a sintetizar DNA, até que todo o DNA-molde *downstream* de cada forquilha tenha sido replicado.

Em *E. coli*, a interação da proteína iniciadora com a origem de replicação é cuidadosamente regulada, e o início ocorre apenas quando há nutrientes suficientes disponíveis para a bactéria completar todo o processo de replicação. Não só a atividade da proteína iniciadora é controlada, mas também a origem de replicação que foi utilizada passa por um "período refratário", causado por um atraso na metilação dos nucleotídeos A recém-sintetizados. Um novo início de replicação é assim bloqueado até que os nucleotídeos A sejam metilados (**Figura 5-28**).

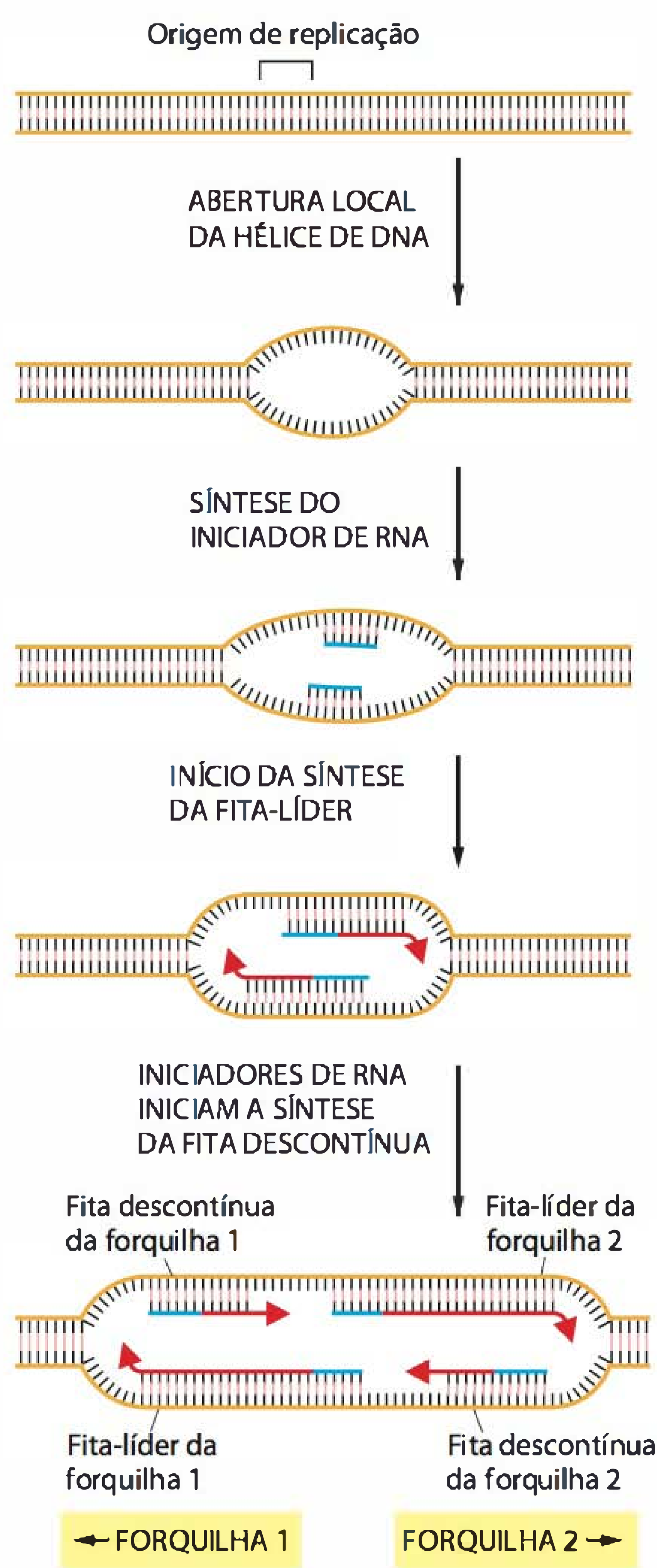


Figura 5-25 Bolha de replicação formada no início da forquilha de replicação. O diagrama mostra as etapas principais envolvidas no início das forquilhas na origem de replicação. A estrutura formada na última etapa, na qual as duas fitas da hélice de DNA original foram separadas uma da outra e atuam como moldes para a síntese de DNA, é chamada de *bolha de replicação*.

Os cromossomos eucarióticos contêm múltiplas origens de replicação

Vimos como, nas bactérias, duas forquilhas de replicação são formadas em uma única origem de replicação. Essas forquilhas procedem em direções opostas, distanciando-se da origem até que todo o DNA contido em um único cromossomo circular seja replicado. O genoma bacteriano é relativamente pequeno, levando cerca de 40 minutos para ser totalmente duplicado a partir das duas forquilhas. Como os cromossomos eucarióticos são muito maiores, uma estratégia diferente é utilizada para permitir sua replicação em um tempo hábil.

Um método para determinar o padrão geral da replicação de cromossomos eucarióticos foi desenvolvido no início da década de 1960. Células humanas em cultura são marcadas com ^{3}H-timidina por um breve período, de modo que o DNA sintetizado durante esse período é altamente radiativo. As células são então gentilmente lisadas, e o DNA é disperso sobre uma lâmina de vidro, coberta com uma emulsão fotográfica. A revelação da emulsão mostra o padrão do DNA marcado pela técnica de *autorradiografia*. O tempo para a marcação é determinado de modo a permitir o deslocamento de vários micro-

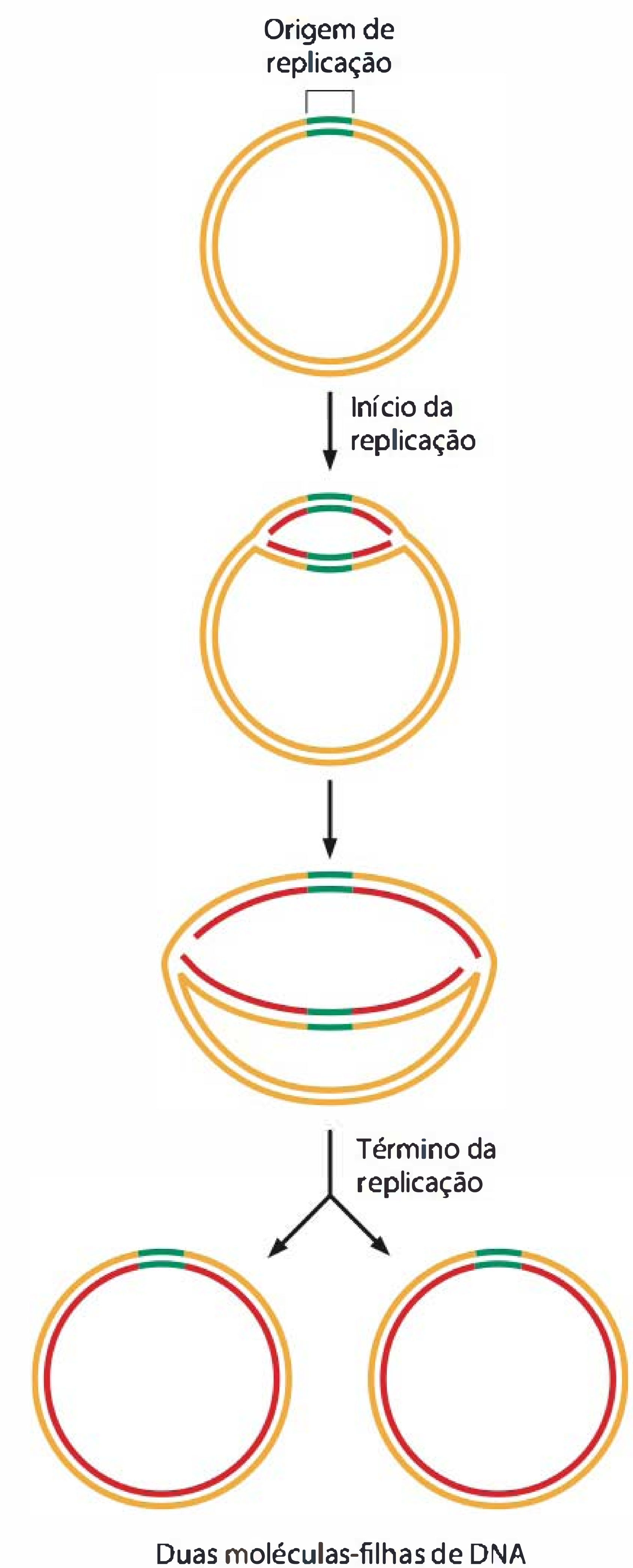


Figura 5-26 Replicação do DNA de um genoma bacteriano. A duplicação do genoma de *E. coli*, composto por 4,6 x 10^6 pares de nucleotídeos, dura cerca de 40 minutos. Para simplificação, os fragmentos de Okasaki da fita descontínua foram omitidos. O que ocorre à medida que as duas forquilhas se aproximam entre si e colidem ao final do ciclo de replicação não está totalmente entendido, porém as maquinarias de replicação são dissociadas como parte do processo.

metros de cada forquilha ao longo do DNA, e o DNA replicado pode ser detectado no microscópio óptico como uma linha com pontos prateados, embora a molécula de DNA por si só seja muito fina para ser visualizada. Assim, tanto a velocidade como a direção do movimento da forquilha podem ser determinadas (**Figura 5-29**). A partir do aumento no comprimento dos pontos obtidos em relação ao aumento do tempo de marcação foi estimado que as forquilhas de replicação deslocam-se cerca de 50 nucleotídeos por segundo. Isso é aproximadamente um décimo da velocidade de deslocamento da forquilha bacteriana, possivelmente refletindo uma maior dificuldade em replicar o DNA fortemente compactado na cromatina.

Um cromossomo humano de tamanho médio contém uma molécula de DNA linear com cerca de 150 milhões de pares de nucleotídeos. A replicação dessa molécula de uma extremidade à outra, a partir de uma única forquilha, a uma velocidade de 50 nucleotídeos por segundo, necessitaria de 0,02 segundos/nucleotídeo $\times$ 150 $\times$ 10^6 nucleotídeos = 3,0 $\times$ 10^6 segundos (cerca de 800 horas). Como esperado, portanto, os experimentos autorradiográficos descritos anteriormente mostraram que existem várias forquilhas deslocando-se simultaneamente em cada cromossomo eucariótico.

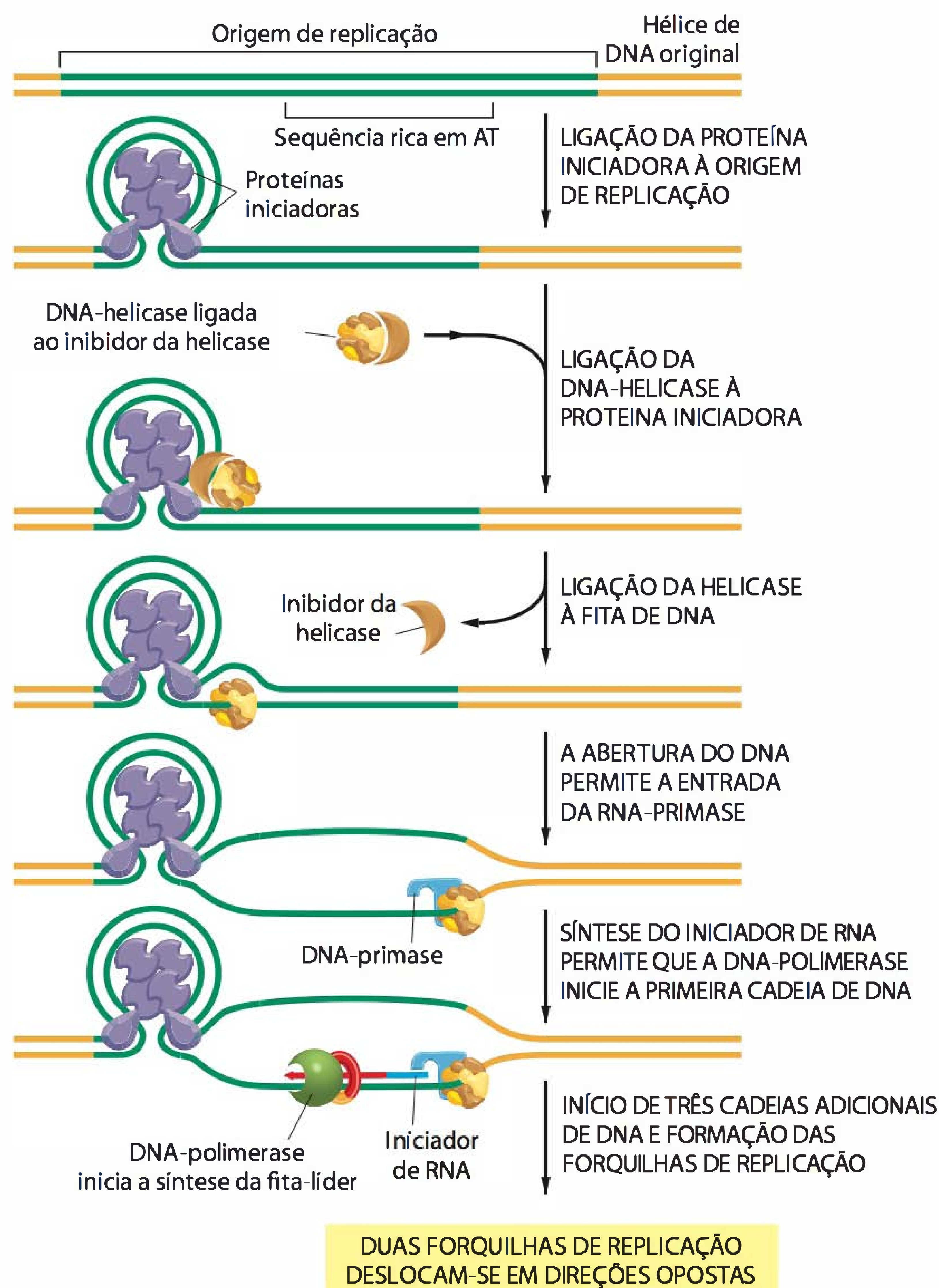


Figura 5-27 Proteínas que iniciam a replicação do DNA em bactérias. O mecanismo mostrado foi estabelecido a partir de estudos *in vitro* com uma mistura de proteínas altamente purificadas. Para a replicação do DNA de *E. coli*, a principal proteína iniciadora, a helicase e a primase são as proteínas DnaA, DnaB e DnaG, respectivamente. Na primeira etapa, várias moléculas da proteína iniciadora ligam-se a sequências específicas de DNA na origem de replicação, formando uma estrutura compacta na qual o DNA é enrolado em torno da proteína. A seguir, a helicase é trazida pelo inibidor da helicase (a proteína DnaC), que inibe a ação da helicase até que ela esteja corretamente colocada na origem de replicação. O inibidor da helicase, assim, evita que a helicase se insira em outros segmentos de DNA de fita simples no genoma bacteriano. Auxiliada pela proteína ligadora de fita simples (não mostrada), a helicase abre o DNA permitindo a entrada da primase e a síntese do iniciador para a primeira cadeia de DNA. As etapas subsequentes (não mostradas) resultam no início de três cadeias adicionais de DNA e na montagem final de duas forquilhas de replicação completas.

Figura 5-28 A metilação da origem de replicação da *E. coli* produz um período refratário para o início da replicação. A metilação do DNA ocorre em sequências GATC; 11 delas são encontradas na origem de replicação (distribuídas em cerca de 250 pares de nucleotídeos). No estado semimetilado, a origem de replicação está ligada a uma proteína inibidora (SeqA, não mostrada), que bloqueia o acesso das proteínas iniciadoras à origem de replicação. Cerca de 20 minutos após o início da replicação, a origem semimetilada torna-se completamente metilada por uma enzima DNA-metilase, e ocorre a dissociação da SeqA.

Uma única enzima, a *Dam*-metilase, é responsável pela metilação de todas as sequências GATC da *E. coli*. Um intervalo na metilação após a replicação da sequência GATC também é usado pelo sistema de reparo de pareamento incorreto para diferenciar a fita recém-sintetizada da fita original; nesse caso, as sequências GATC relevantes são distribuídas pelo cromossomo e não estão ligadas pela SeqA.

Experimentos adicionais demonstraram o seguinte: (1) As origens de replicação tendem a ser ativadas em grupos, chamados de *unidades de replicação*, com 20 a 80 origens. (2) Novas unidades de replicação parecem ser ativadas em diferentes períodos durante o ciclo celular, até que todo o DNA seja replicado, ponto que retomaremos adiante. (3) Na unidade de replicação, as origens individuais são separadas entre si por 30 mil a 250 mil pares de nucleotídeos. (4) Como nas bactérias, as forquilhas de replicação são formadas em pares e criam uma bolha de replicação à medida que se deslocam em direções opostas, distanciando-se do ponto de origem comum, parando apenas quando se encontram cabeça-a-cabeça (ou quando chegam à extremidade do cromossomo). Dessa forma, várias forquilhas podem operar independentemente em cada cromossomo, formando duas hélices de DNA filhas completas.

A replicação de DNA em eucariotos só ocorre durante uma etapa do ciclo celular

Quando em crescimento acelerado, as bactérias replicam seu DNA continuamente e podem iniciar uma nova replicação mesmo antes do término da replicação prévia. Em contraste, a replicação do DNA na maioria das células eucarióticas ocorre apenas durante uma parte do ciclo de divisão celular, chamada de *fase de síntese de DNA*, ou **fase S** (**Figura 5-30**). Nas células de mamíferos, a fase S normalmente dura cerca de oito horas; em eucariotos mais simples, como as leveduras, a fase S pode durar cerca de 40 minutos apenas. Ao término dessa fase, cada cromossomo foi replicado produzindo duas cópias completas, que permanecem unidas pelo centrômero até a *fase M* (M de *mitose*), na sequência do ciclo. No Capítulo 17, descrevemos o sistema de controle que comanda o ciclo celular e explicamos o porquê da necessidade de completar cada fase com sucesso antes de passar à próxima.

Nas seções seguintes, exploramos como a replicação cromossômica é coordenada na fase S do ciclo celular.

Figura 5-29 Experimentos que demonstraram o padrão de formação e de deslocamento das forquilhas de replicação nos cromossomos eucarióticos. O novo DNA, sintetizado em células humanas em cultura, foi marcado brevemente com um pulso de timidina altamente radiativa (^{3}H-timidina). (A) Neste experimento, as células foram lisadas, e o DNA foi distribuído em uma lâmina e coberto com emulsão fotográfica. Após vários meses, a emulsão foi revelada, mostrando uma linha de depósitos de prata sobre o DNA radiativo. O DNA (em *marrom*) nesta figura é mostrado apenas para auxiliar a interpretação da autorradiografia; o DNA não-marcado é invisível neste experimento. (B) O experimento é o mesmo acima, exceto pela realização de uma incubação adicional em meio não-marcado, que permitiu a replicação de mais DNA com níveis menores de radiação. O par de segmentos escuros em (B) contém depósitos de prata que apresentam uma redução na intensidade e em direções opostas, demonstrando o deslocamento bidirecional da forquilha a partir da origem de replicação central onde a bolha é formada (ver Figura 5-25). Acredita-se que uma forquilha de replicação pare apenas quando encontre a forquilha que move-se em direção oposta, ou quando encontre a extremidade do cromossomo; dessa forma, todo o DNA é replicado.

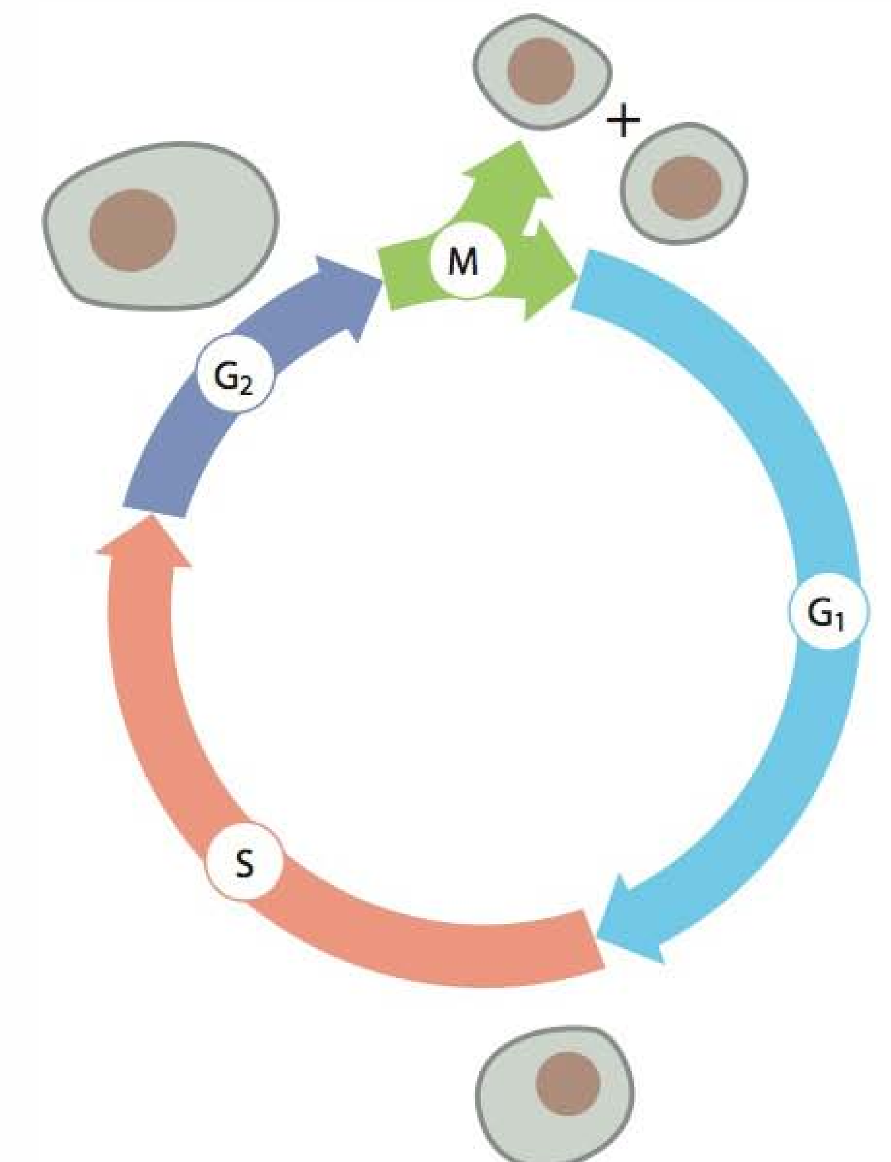


Figura 5-30 As quatro fases sucessivas de um ciclo celular-padrão em eucariotos. Durante as fases G_1, S e G_2, a célula cresce continuamente. Na fase M o crescimento para, ocorre a divisão nuclear e a célula se divide em duas. A replicação do DNA é limitada à parte do ciclo celular conhecida como fase S. G_1 é o período entre as fases M e S; G_2 é o período entre as fases S e M.

Regiões diferentes no mesmo cromossomo replicam em tempos distintos na fase S

Nas células de mamíferos, a replicação do DNA na região entre duas origens de replicação normalmente necessitaria de apenas uma hora para ser replicada, dada a velocidade de deslocamento das forquilhas e as grandes distâncias medidas entre as origens em uma unidade de replicação. Porém, a fase S normalmente dura cerca de oito horas nessas células. Portanto, as origens de replicação não são todas ativadas simultaneamente, e o DNA em cada unidade de replicação (o qual, como mencionado anteriormente, possui um conjunto de 20 a 80 origens de replicação) é replicado durante uma pequena parte do período total da fase S.

As diferentes unidades de replicação são ativadas aleatoriamente ou diferentes regiões do genoma são replicadas em uma ordem específica? Uma maneira de responder a essa questão consiste em adicionar, por períodos curtos e distintos, bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, para marcar o DNA recém-sintetizado em populações de células sincronizadas durante a fase S. Mais tarde, na fase M, as regiões dos cromossomos mitóticos que incorporaram BrdU no seu DNA podem ser identificadas por técnicas de coloração ou utilizando anticorpos anti-BrdU. Os resultados mostram que regiões diferentes de cada cromossomo são replicadas em uma ordem reprodutível durante a fase S (**Figura 5-31**). Ainda, como seria esperado pelos grupos de forquilhas de replicação vistos nas autorradiografias do DNA (ver Figura 5-29), o momento da replicação é coordenado em grandes regiões do cromossomo.

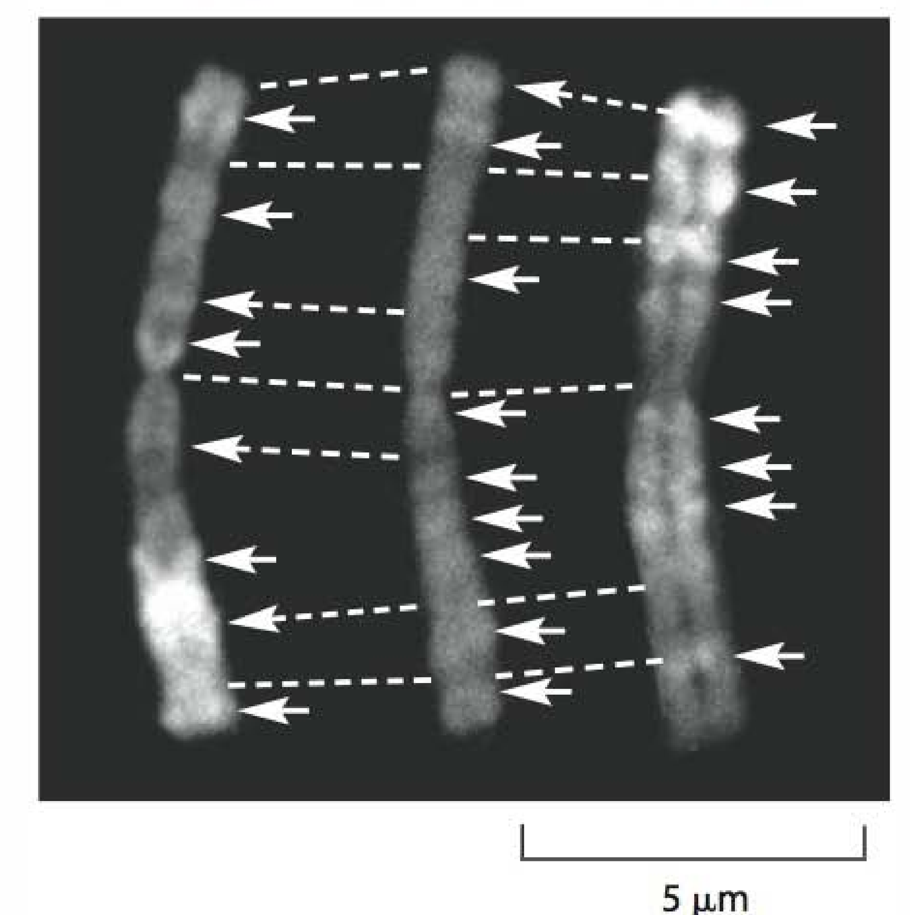


Figura 5-31 Regiões diferentes de um cromossomo são replicadas em diferentes momentos na fase 5. Estas micrografias mostram cromossomos mitóticos corados, nos quais o DNA replicado foi marcado diferentemente em intervalos distintos, porém definidos, da fase S anterior. Nestes experimentos, as células foram inicialmente cultivadas na presença de BrdU (um análogo da timidina) e na ausência de timidina para marcação uniforme do DNA. As células, então, foram submetidas a um pulso breve com timidina na ausência de BrdU durante a fase S, nos períodos inicial, médio e tardio. Como o DNA produzido durante o pulso com timidina é uma dupla-hélice formada por uma fita com timidina e outra com BrdU, ele é corado mais fortemente, comparado ao restante do DNA (que contém BrdU nas duas fitas) e mostra uma banda mais clara (*setas*) nestes negativos. As linhas pontilhadas ligam as posições correspondentes nas três cópias idênticas do cromossomo mostrado. (Cortesia de Elton Stubblefield.)

Atualmente existem vários outros métodos mais sofisticados para monitorar o início da replicação do DNA e acompanhar o movimento das forquilhas de replicação nas células. Essas estratégias utilizam microarranjos de DNA – uma grade do tamanho de um selo de carta, à qual estão fixados dezenas de milhares de fragmentos com sequências de DNA conhecidas. Como veremos em detalhes no Capítulo 8, cada fragmento de DNA diferente é colocado em uma posição única no microarranjo, e todo o genoma pode ser representado em uma maneira ordenada. Se uma amostra de DNA de um grupo de células na fase S é lisada e hibridizada a um microarranjo representando todo o genoma de um organismo, a quantidade de cada sequência de DNA pode ser determinada. Como um segmento de um genoma que foi replicado contém o dobro de DNA comparado a um segmento não-replicado, o início da forquilha de replicação e o seu deslocamento podem ser monitorados com precisão (**Figura 5-32**). Apesar de esse método fornecer grande precisão, os resultados levam às mesmas conclusões obtidas com os estudos anteriores.

A cromatina altamente condensada é replicada mais tarde, enquanto os genes na cromatina menos condensada tendem a replicar mais precocemente

Parece que a ordem de ativação das origens de replicação depende, em parte, da estrutura da cromatina em que a origem está localizada. Vimos, no Capítulo 4, que a heterocromatina é um estado extremamente condensado da cromatina, enquanto a eucromatina apresenta uma conformação menos condensada, aparentemente necessária para permitir a transcrição. A heterocromatina tende a ser replicada em um estágio bastante tardio da fase S, sugerindo que o momento da replicação está relacionado à compactação do DNA na cromatina. Essa sugestão é confirmada pela análise dos dois cromossomos X em uma célula mamífera feminina. Os dois cromossomos contêm essencialmente as mesmas sequências de DNA, porém apenas um é ativo para a transcrição do DNA (discutido no Capítulo 7). Quase todo o cromossomo X inativo está condensado como heterocromatina, e seu DNA é replicado ao final da fase S. O homólogo ativo é menos condensado, sendo replicado por toda a fase S.

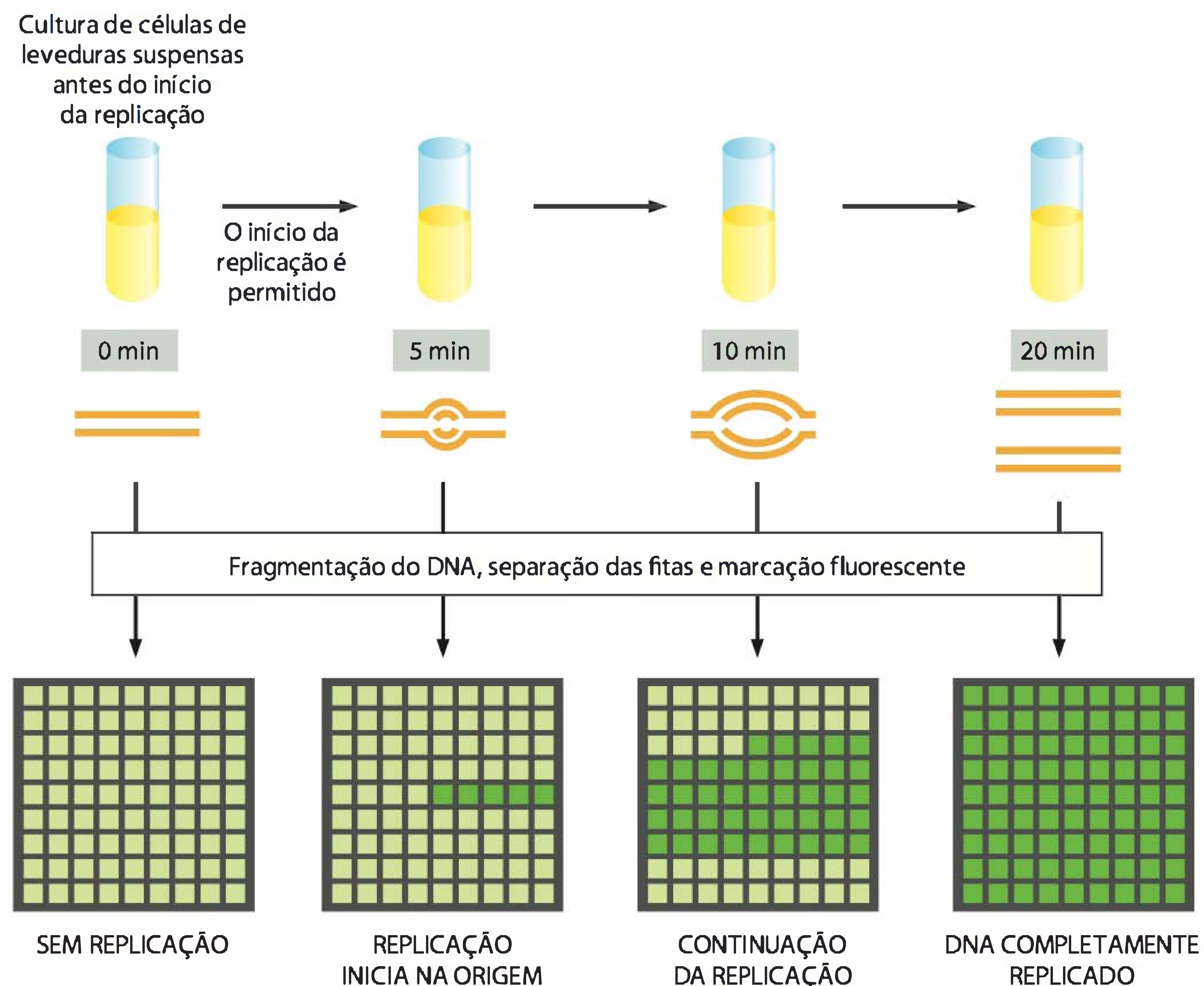


Figura 5-32 Uso de um microarranjo de DNA para monitorar a formação e a progressão das forquilhas de replicação no genoma de levedura em brotamento. Para este experimento, uma população de células foi sincronizada, de modo que todas iniciam a replicação ao mesmo tempo. O DNA é coletado e hibridizado ao microarranjo; o DNA que foi replicado apenas uma vez apresenta um sinal (*quadrados em verde-escuro*) com o dobro da intensidade do DNA-não-replicado (*quadrados em verde-claro*). Os pontos no microarranjo representam as sequências consecutivas de um segmento do cromossomo da levedura dispostas da esquerda para a direita e de cima para baixo. Apenas 81 pontos são mostrados, mas o microarranjo real contém dezenas de milhares de sequências distribuídas em todo o genoma da levedura. Como pode ser visto, a replicação inicia na origem e procede bidirecionalmente. Por simplicidade apenas uma origem é mostrada. Nas células de leveduras, a replicação inicia em centenas de origens localizadas pelo genoma.

Esses achados sugerem que as regiões do genoma cuja cromatina é menos condensada estão, portanto, mais acessíveis à maquinaria da replicação, sendo replicadas primeiramente. As forquilhas de replicação parecem mover-se a velocidades comparáveis por toda a fase S, de modo que o grau de condensação do cromossomo parece influenciar o momento no qual as forquilhas são iniciadas, e não sua velocidade após o início.

Sequências de DNA bem-definidas atuam como origens de replicação em um eucarioto simples, a levedura *S. cerevisiae*

Vimos que os cromossomos eucarióticos são replicados a partir de várias origens de replicação, cada uma "ativada" em um momento característico na fase S do ciclo celular. Abordaremos agora a natureza dessas origens de replicação. Vimos anteriormente neste capítulo que as origens de replicação foram bem-definidas em bactérias como sequências específicas de DNA que atraem as proteínas iniciadoras, que por sua vez formam a maquinaria de replicação do DNA. Por analogia, seria esperado que as origens em cromossomos eucariotos também fossem constituídas por sequências específicas de DNA.

A pesquisa por origens de replicação nos cromossomos de células eucarióticas foi mais produtiva na levedura de brotamento *S. cerevisiae*. Foram desenvolvidos métodos de seleção poderosos que utilizam células de leveduras mutantes com alteração em um gene essencial. Essas células só podem sobreviver em um meio seletivo, se for fornecido DNA que contenha uma cópia funcional do gene defeituoso. Se um plasmídeo circular bacteriano com esse gene for introduzido diretamente nas células mutantes, ele será incapaz de replicar, pois não apresenta uma origem funcional. Entretanto, se segmentos aleatórios de DNA de levedura forem inseridos nesse plasmídeo, apenas aquelas poucas moléculas de DNA plasmidial que contiverem uma origem de replicação de levedura poderão replicar. As células de leveduras que contêm tais plasmídeos são capazes de proliferar porque o gene essencial foi fornecido em uma forma que pode ser replicada e passada adiante para a progênie dessas células (**Figura 5-33**). Uma sequência de DNA identificada pela sua presença em um plasmídeo isolado a partir das células sobreviventes é denominada *sequência de replicação autônoma* (*ARS, autonomously replicating sequence*). Foi demonstrado que a maior parte das ARSs é uma origem de replicação autêntica, validando a estratégia empregada para obtê-las.

A localização de cada origem de replicação em cada cromossomo foi determinada para a *S. cerevisiae*. O cromossomo em particular mostrado na **Figura 5-34** – cromossomo III da

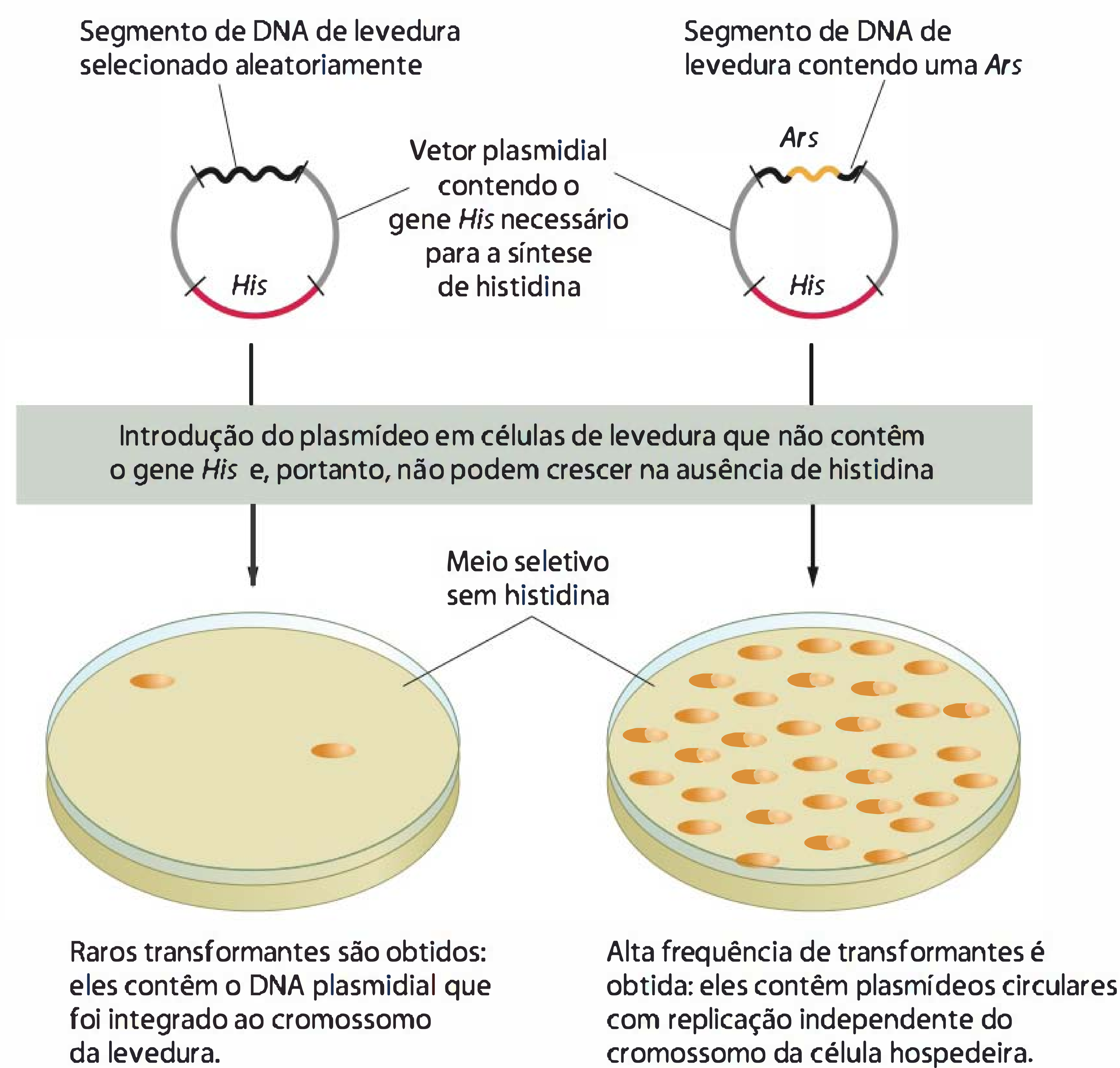


Figura 5-33 Estratégia utilizada para identificação de sequências de DNA capazes de iniciar a replicação de DNA. Cada uma das sequências de DNA de leveduras identificadas desta forma foi denominada sequência de replicação autônoma (*Ars*, *autonomously replicating sequence*), uma vez que, quando inserida em um plasmídeo, permite sua replicação na célula hospedeira sem que seja incorporada ao cromossomo desta célula.

levedura *S. cerevisiae* – é um dos menores cromossomos conhecidos, com um comprimento de menos de 1/100 do comprimento de um cromossomo humano típico. Suas principais origens estão afastadas em aproximadamente 30 mil nucleotídeos; essa densidade de origens deve permitir a replicação desse cromossomo em cerca de dez minutos. Como discutido anteriormente, as origens de mamíferos estão mais distantes, normalmente a cada 100 mil a 250 mil pares de nucleotídeos.

Experimentos genéticos em *S. cerevisiae* avaliaram o efeito da remoção de várias origens de replicação no cromossomo III. A remoção de poucas origens de replicação tem pouco efeito, pois as forquilhas iniciadas em origens vizinhas podem continuar sobre as regiões que perderam suas próprias origens. Porém, quando mais origens de replicação foram removidas, houve perda do cromossomo ao longo da divisão celular, pois sua replicação era muito lenta. Diversos eucariotos têm um excesso de origens de replicação, provavelmente para assegurar que o genoma inteiro ainda possa ser replicado em tempo hábil caso algumas origens falhem.

Um grande complexo de múltiplas subunidades liga-se às origens de replicação de eucariotos

A sequência de DNA mínima necessária para promover o início da replicação do DNA na levedura *S. cerevisiae* foi determinada pelo experimento ilustrado na Figura 5-33, utilizando fragmentos de DNA cada vez menores. Cada sequência de DNA que atua como uma origem de replicação contém (1) um sítio para a ligação de uma enorme proteína iniciadora com múltiplas subunidades, chamada de **complexo de reconhecimento de origem** (OCR, *origin recognition complex*), (2) uma sequência de DNA rica em As e Ts, portanto mais fácil de ser desenrolada, e (3) pelo menos um sítio de ligação para proteínas que auxiliam a atrair a ORC à origem de replicação (**Figura 5-35**). Em bactérias, uma vez que a proteína iniciadora está corretamente ligada à única origem de replicação, as forquilhas de replicação se-

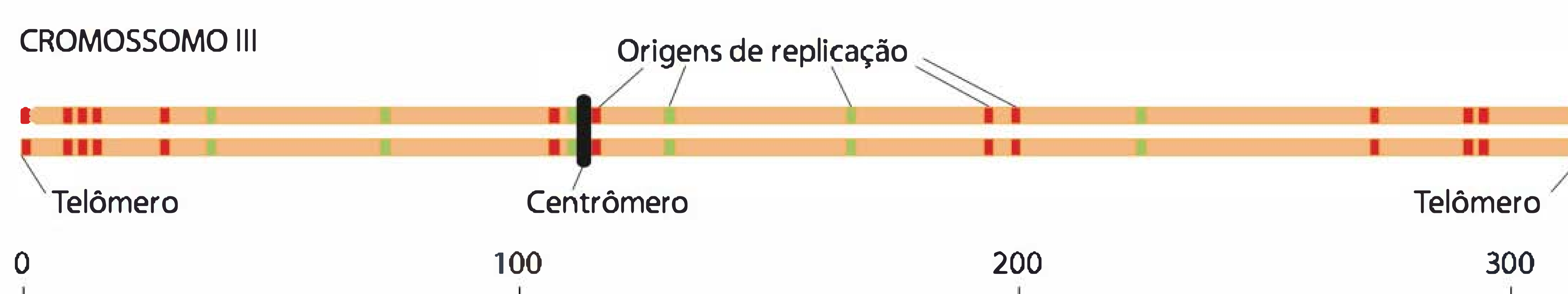


Figura 5-34 As origens de replicação do DNA no cromossomo III da levedura *S. cerevisiae*. Este cromossomo, um dos menores cromossomos eucarióticos conhecidos, contém 180 genes no total. Como indicado, ele contém 19 origens de replicação, que são utilizadas com diferentes eficiências. Aquelas em *vermelho* normalmente são usadas menos de 10% do tempo, enquanto as mostradas em *verde* são utilizadas em 90% das fases S.



Figura 5-35 Origem de replicação de leveduras. Esta origem de levedura, contendo cerca de 150 pares de nucleotídeos (identificada pelo método mostrado na Figura 5-33), possui um sítio de ligação a ORC e um para Abf1, uma proteína auxiliar que promove a ligação de ORC. Todas as origens contêm sítios de ligação a ORC, mas as proteínas auxiliares são diferentes de uma origem para a próxima. A maioria das origens, como a representada, também contém um segmento de DNA fácil de ser desenrolado.

guem de modo quase automático. Em eucariotos, a situação é bastante diferente porque há um problema sério na replicação de cromossomos com tantas origens de replicação (p. ex., estima-se cerca de 400 em leveduras e 10.000 em humanos). Com tantos sítios para iniciar a replicação, como esse processo é regulado para assegurar que todo o DNA seja copiado apenas uma vez?

A resposta está no modo pelo qual o complexo ORC, uma vez ligado a uma origem de replicação, é sequencialmente ativado e desativado. Essa questão é discutida em detalhes no Capítulo 17, em que consideramos o mecanismo celular que controla o ciclo de divisão celular. A interação ORC-origem continua durante todo o ciclo celular, dissociando-se apenas por um breve período, imediatamente após a replicação da origem de DNA, e com outras proteínas que se ligam ao complexo para regular a atividade da origem. Elas incluem a DNA-helicase e duas proteínas inibidoras de helicases, a Cdc6 e a Cdt1, que são adicionadas ao complexo ORC-DNA formando um *complexo pré-replicativo* em cada origem durante a fase G_1 (**Figura 5-36**). A passagem de uma célula de G_1 para a fase S é desencadeada pela ativação de proteína-cinases (Cdks) que promovem a dissociação das proteínas inibidoras da helicase, desenrolando o DNA da origem e agrupando as outras proteínas de replicação incluindo as DNA-polimerases (ver Figura 5-36).

As proteína-cinases que promovem a replicação do DNA simultaneamente impedem a formação de novos complexos pré-replicativos até a próxima fase M quando todo o ciclo é reiniciado (detalhes nas p. 1067-1069). Essa estratégia fornece uma única janela de oportunidade para a formação de novos complexos pré-replicativos (fase G_1, quando a atividade da Cdk está baixa) e uma segunda janela para sua ativação e subsequente dissociação (fase S, quando a atividade da Cdk está alta). Como essas duas fases do ciclo celular são mutuamente excludentes e ocorrem em uma ordem determinada, cada origem de replicação é ativada apenas uma vez a cada ciclo celular.

As sequências de DNA de mamíferos que determinam o início da replicação são difíceis de identificar

Comparando-se a situação em leveduras, as sequências de DNA que determinam as origens de replicação em outros eucariotos têm sido mais difíceis de definir. Recentemente, porém, foi possível identificar sequências de DNA humano específicas, cada uma contendo vários milhares de pares de nucleotídeos de comprimento, que atuam como origens de replicação. Essas origens continuam a atuar quando movidas para diferentes regiões do cromossomo por meio de métodos de DNA recombinante, desde que colocadas em uma região em que a cromatina é pouco condensada. Uma dessas origens é a sequência do grupo de genes da β-globina. Na posição normal no genoma, o funcionamento dessa origem depende essencialmente de sequências de DNA distantes (**Figura 5-37**). Como discutido no Capítulo 7, esse DNA distante é necessário para a expressão de todos os genes no bloco da β-globina, e seu efeito, tanto na transcrição como na sua função como origem, aparentemente reflete-se na longa descondensação na estrutura da sua cromatina.

Um complexo ORC humano, homólogo ao presente em leveduras, é requerido para o início da replicação. Diversas proteínas que atuam no início da replicação em leveduras, da mesma forma, têm função fundamental também em humanos. Parece que os mecanismos de início nas leveduras e nos humanos são muito semelhantes. Entretanto, os sítios de ligação para a proteína ORC parecem ser menos específicos nos humanos do que nas leveduras, o que pode explicar por que as origens de replicação dos humanos são menos definidas. Na verdade, a estrutura da cromatina, e não as sequências de DNA, parece ter um papel essencial na definição das origens de replicação em mamíferos. Portanto, como em várias outras áreas da biologia celular, o mecanismo de iníco da replicação do DNA em leveduras ilustra o processo geral, enquanto a situação em humanos representa uma variação mais elaborada do mesmo processo.

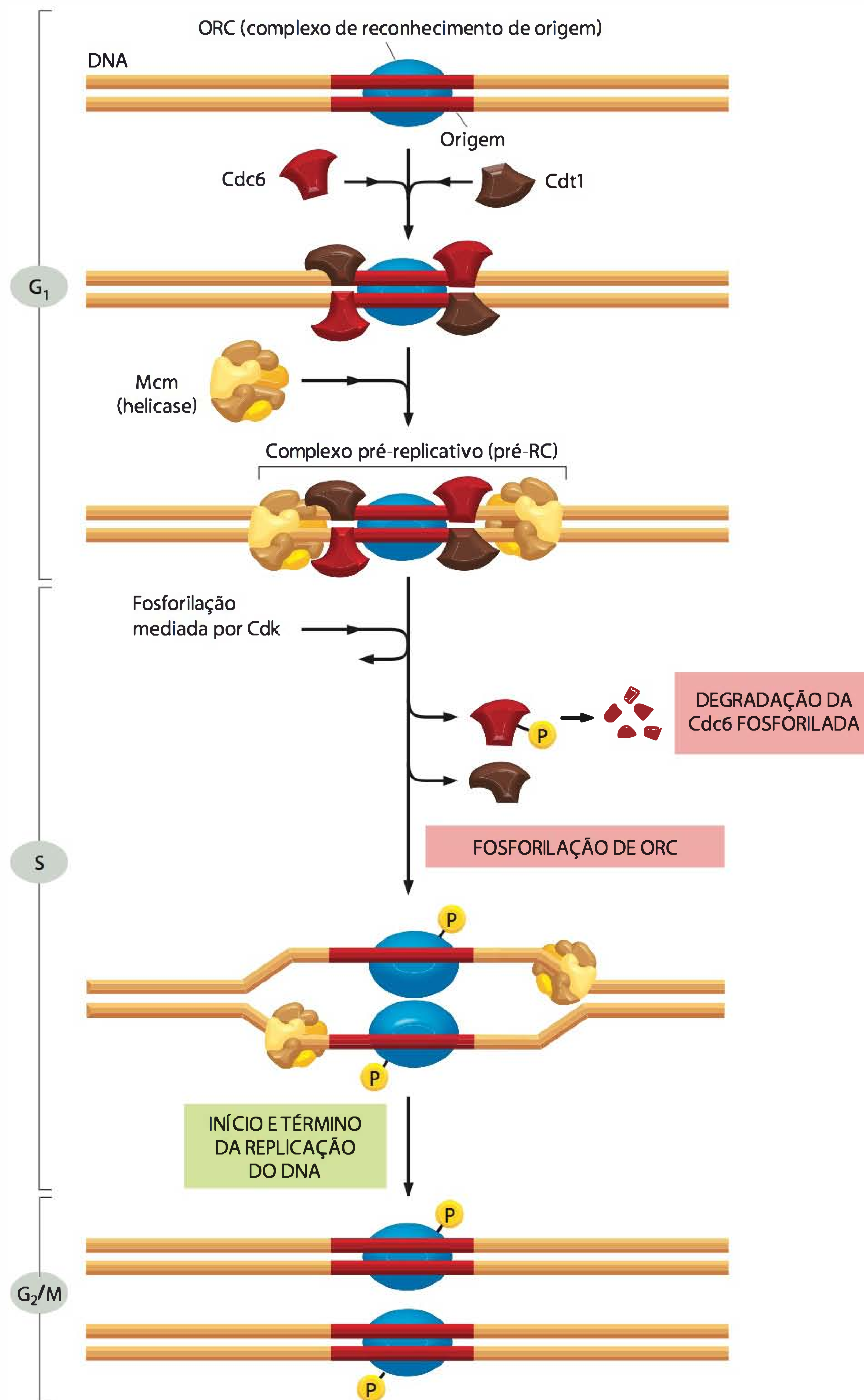


Figura 5-36 Mecanismo para o início da replicação em eucariotos. Este mecanismo assegura que cada origem de replicação seja ativada apenas uma vez por ciclo celular. Uma origem de replicação pode ser utilizada apenas se um complexo pré-replicativo é formado na fase G_1. No início da fase S, cinases dependentes de ciclina (Cdks, *cyclin-dependent kinases*) fosforilam várias proteínas de replicação, provocando a dissociação do complexo pré-replicativo e também o início da replicação. Um novo complexo pré-replicativo não pode ser formado na origem até que a célula tenha progredido à próxima fase G_1.

Novos nucleossomos são formados atrás da forquilha de replicação

Existem vários aspectos adicionais da replicação do DNA que são específicos de eucariotos. Como discutido no Capítulo 4, os cromossomos eucarióticos são compostos por uma mistura de partes relativamente iguais de DNA e proteínas. A duplicação cromossômica, portanto, necessita não apenas da replicação do DNA, mas também da síntese de novas proteínas cromossomais e sua associação ao DNA atrás de cada forquilha de replicação. Apesar de estarmos longe de compreender os detalhes desse processo, começamos a entender como a unidade fundamental de compactação da cromatina, o nucleossomo, é duplicada. A célula necessita de uma enorme quantidade de novas proteínas histonas, aproximadamente equivalente em massa ao DNA recém-sintetizado, para formar os novos nucleossomos a cada ciclo celular. Por isso, a maioria dos organismos eucariotos possui múltiplas cópias dos genes para cada histona. As células de vertebrados, por exemplo, possuem cerca de 20 conjuntos de genes repetidos, a maior parte contendo os genes que codificam todas as cinco histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4).

Diferentemente da maior parte das proteínas, que são produzidas continuamente durante a interfase, as histonas são sintetizadas principalmente na fase S, quando o nível de mRNA das histonas aumenta em cerca de 50 vezes, como resultado do aumento da transcri-

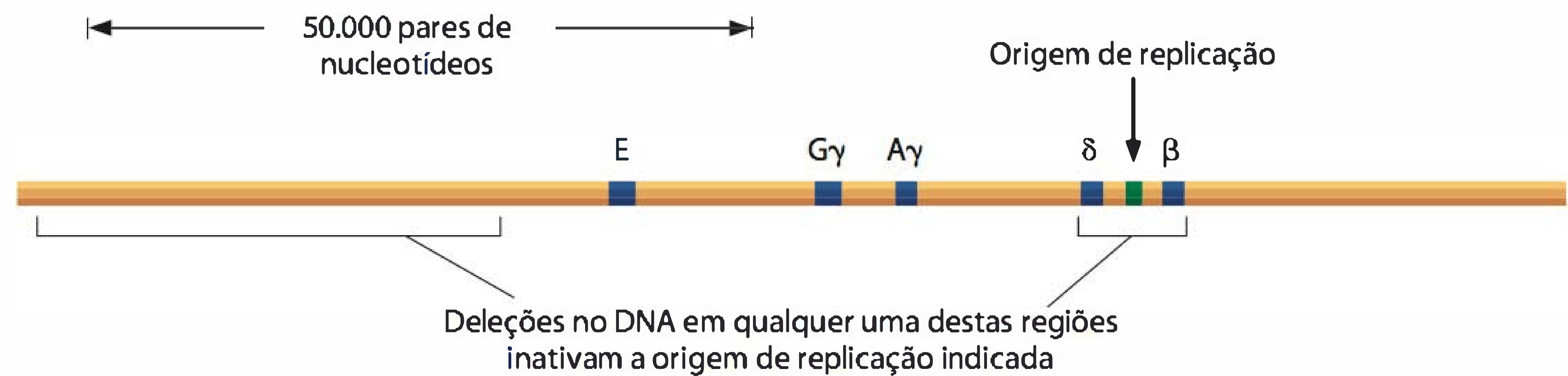


Figura 5-37 Deleções que inativam uma origem de replicação em humanos. Estas duas deleções são encontradas separadamente em indivíduos com *talassemia*, uma doença causada pela falha na expressão de um ou mais genes no bloco gênico da β-globina mostrado. Em ambos os mutantes da deleção, a região do DNA é replicada pelas forquilhas que iniciam nas origens externas ao bloco da β-globina.

ção e da redução da degradação do mRNA. Os mRNAs das principais histonas são degradados em minutos quando a síntese de DNA cessa ao final da fase S. O mecanismo depende de propriedades especiais na extremidade 3′ desses mRNAs, como discutido no Capítulo 7. Em contraste, as proteínas histonas são extremamente estáveis e podem sobreviver por toda a vida da célula. A forte relação entre a síntese de DNA e a síntese de histonas provavelmente está sujeita a um mecanismo de retroalimentação que monitora o nível de histonas livres, assegurando que a quantidade de histonas produzidas se ajuste perfeitamente à quantidade de DNA sintetizado.

À medida que a forquilha de replicação avança, ela deve, de alguma maneira, passar sobre os nucleossomos originais. Estudos *in vitro* mostram que o aparato de replicação tem uma capacidade intrínseca, ainda não compreendida, de passar pelos nucleossomos originais sem retirá-los do DNA. Para replicar os cromossomos de modo eficiente na célula, são necessárias proteínas que remodelam a cromatina (discutidas no Capítulo 4), desestabilizando a interface DNA-histona. Com o auxílio desses complexos, as forquilhas de replicação podem transitar, de maneira eficiente, mesmo a heterocromatina altamente condensada.

À medida que as forquilhas passam pela cromatina, a maior parte das histonas originais permanece ligada ao DNA, sendo distribuída às hélices-filhas de DNA atrás da forquilha de replicação. Mas, como a quantidade de DNA foi dobrada, uma quantidade igual de novas histonas também é necessária para completar a compactação do DNA na cromatina. Histonas originais e recém-sintetizadas são combinadas de uma maneira intrigante. Quando a forquilha transita por um nucleossomo, o octâmero de histonas parece se dissociar em um tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B (ver Figura 4-26). O tetrâmero H3-H4 permanece associado ao DNA, sendo distribuído aleatoriamente a uma das duas duplexes-filhas, enquanto os dímeros H2A-H2B são dissociados do DNA. Os tetrâmeros H3-H4 recém-formados são adicionados ao DNA recém-sintetizado preenchendo os "espaços" vazios, e os dímeros H2AB – metade novos e metade originais – são então adicionados aleatoriamente para completar os nucleossomos (**Figura 5-38**).

A adição ordenada e rápida dos novos tetrâmeros H3-H4 e dímeros H2A-H2B atrás da forquilha de replicação requer **chaperonas de histonas** (também chamadas de *fatores de montagem de cromatina*). Esses complexos com várias subunidades ligam-se às histonas altamente básicas e as liberam apenas no contexto apropriado. As chaperonas de histonas, junto com suas cargas, são conduzidas ao DNA recém-replicado pela interação específica com a *cinta deslizante eucariótica* (ver Figura 5-38B). As cintas são deixadas atrás da forquilha em movimento e permanecem no DNA por um período suficiente para que as chaperonas de histonas completem sua função.

Os mecanismos da duplicação cromossômica de eucariotos asseguram que o padrão da modificação das histonas possa ser herdado

Vimos no Capítulo 4 que as histonas estão sujeitas a diversos tipos de modificações covalentes e que os padrões dessas modificações podem conter informações importantes sobre o destino do DNA associado. A remoção desses padrões, a cada divisão celular, parece não fazer muito sentido, mas como essa informação é codificada nas proteínas histonas e não no DNA, mecanismos especiais são necessários para conservar e duplicar esses padrões. Vimos que os tetrâmeros H3-H4 são distribuídos aleatoriamente aos dois cromossomos-filhos formados atrás da forquilha de replicação. As caudas, bem como outras regiões de H3 e H4, podem ser extensivamente modificadas (ver Figura 4-39); portanto, cada cromossomo-filho carrega a memória do padrão original da modificação de H3 e H4. Uma vez

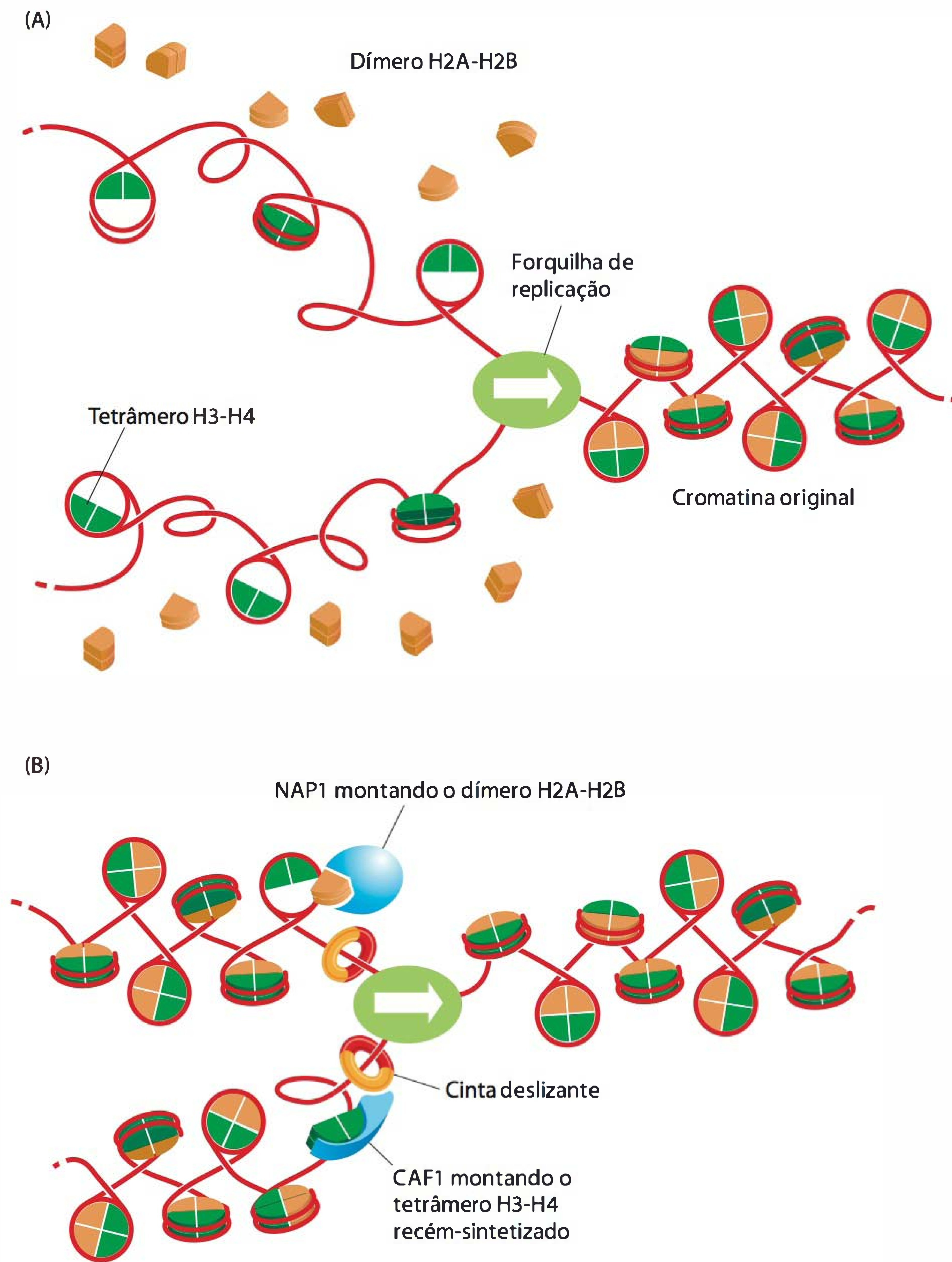


Figura 5-38 Distribuição de histonas originais e recém-sintetizadas atrás da forquilha de replicação eucariótica. (A) A distribuição dos tetrâmeros H3-H4 originais às moléculas-filhas de DNA parece ser aleatória, com um número aproximadamente igual herdado em cada filha. Em contraste, os dímeros H2A-H2B são liberados do DNA na passagem da forquilha de replicação. (B) Chaperonas de histonas (NAP1 e CAF1) restauram o complemento total de histonas nas moléculas-filhas. Embora alguns nucleossomos-filhos possam conter apenas histonas originais ou apenas histonas novas, a maioria é híbrida formada por histonas originais e novas. (Adaptada de J. D. Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 5ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.)

que a formação do nucleossomo atrás da forquilha foi completada, os padrões originais da modificação de H3 e H4 podem ser reforçados por enzimas modificadoras de histonas em complexos de leitura-escrita que reconhecem o mesmo tipo de modificação que geraram (**Figura 5-39**).

A duplicação fiel do padrão de modificação das histonas pode ser responsável por vários exemplos de *herança epigenética*, na qual uma alteração herdável no fenótipo da célula ocorre sem uma alteração nucleotídica na sequência de DNA. Iremos discutir o tema epigenética no Capítulo 7, em que será apresentado como certas "decisões" tomadas pela célula são "lembradas" pela progênie celular após muitas gerações.

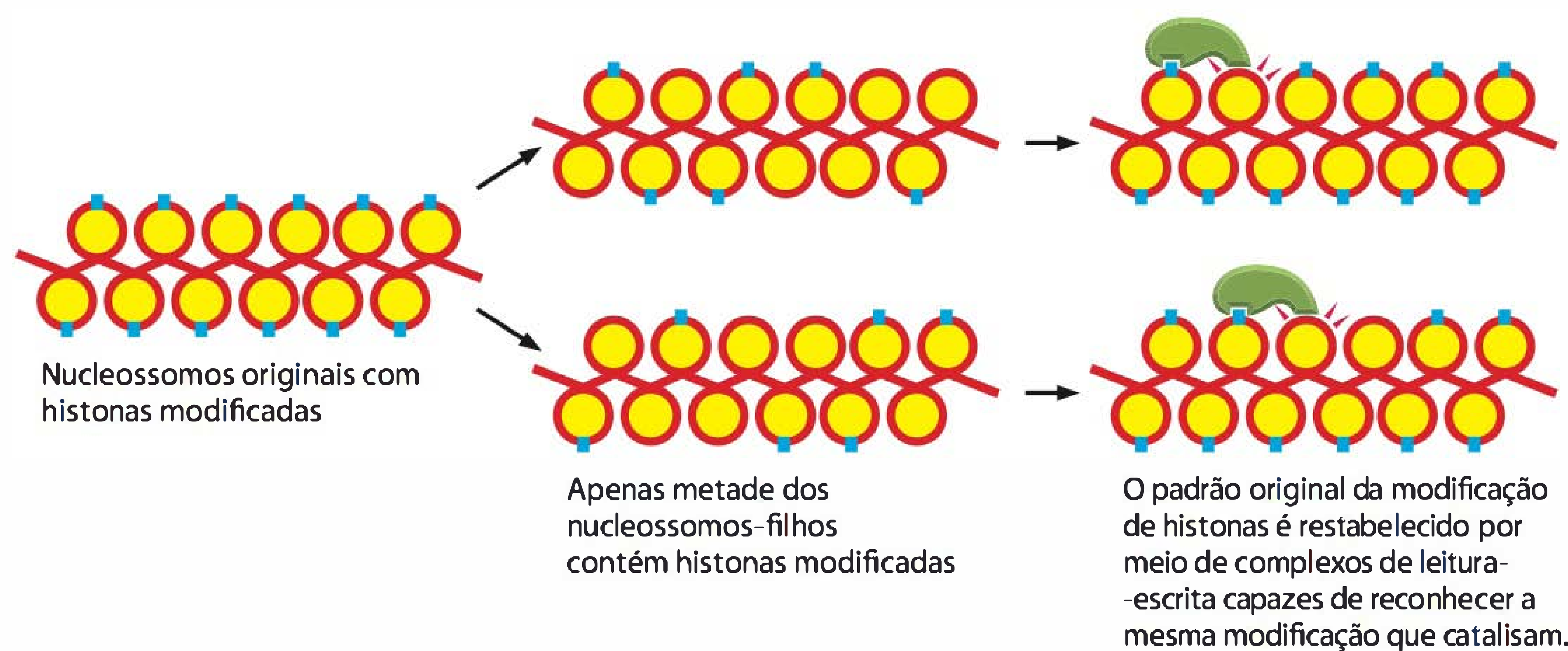


Figura 3-39 Estratégia pela qual o padrão de modificação original de histonas H3 e H4 pode ser herdado pelos cromossomos-filhos. Embora seja pouco provável que este mecanismo se aplique a todas as modificações de histonas, ele ocorre em algumas (ver Figura 4-51). Por exemplo, vários complexos da metilase de histonas reconhecem, especificamente, as caudas N-terminais de histonas previamente metiladas no mesmo sítio no qual a metilase as modifica.

A telomerase replica as extremidades dos cromossomos

Foi visto anteriormente que a síntese da fita descontínua na forquilha de replicação ocorre de modo descontínuo, por um mecanismo de "voltar para trás", produzindo pequenos fragmentos de DNA. Esse mecanismo enfrenta um problema especial quando a forquilha de replicação chega à extremidade de um cromossomo linear: não há lugar para se produzir o iniciador de RNA necessário para iniciar o último fragmento de Okasaki no final de uma molécula de DNA linear.

As bactérias resolveram esse problema do "final da replicação" possuindo cromossomos formados por moléculas circulares de DNA (ver Figura 5-27). Os eucariotos resolvem esse problema de um modo engenhoso: por meio de sequências nucleotídicas especiais nas extremidades dos cromossomos, incorporadas em estruturas denominadas telômeros (ver Capítulo 4). Os telômeros contêm várias repetições consecutivas de sequências curtas semelhantes em organismos tão diversos, como protozoários, fungos, plantas e mamíferos. Em humanos, a sequência da unidade de repetição é GGGTTA, sendo repetida aproximadamente mil vezes em cada telômero.

As sequências de DNA telomérico são reconhecidas por proteínas ligadoras de DNA que reconhecem uma sequência específica de DNA e atraem uma enzima, chamada de **telomerase**, que repõe estas sequências cada vez que a célula se divide. A telomerase reconhece a extremidade de uma sequência telomérica existente e a estende na direção 5′-3′, utilizando um molde de RNA que compõe a própria enzima para sintetizar novas cópias da repetição (**Figura 5-40**). A porção enzimática da telomerase assemelha-se a outras *transcriptases reversas*, enzimas que sintetizam DNA utilizando um molde de RNA (ver Figura 5-72). Após a extensão da fita de DNA original pela telomerase, a replicação da fita descontínua na extremidade cromossômica pode ser completada pelas enzimas DNA-polimerases convencionais usando essas extensões como molde para a síntese da fita complementar (**Figura 5-41**).

O mecanismo descrito anteriormente, auxiliado por uma nuclease que degrada extremidades 5′, assegura que a extremidade 3′ do DNA de cada telômero seja sempre um pouco mais longa que a extremidade 5′ a qual está pareada, deixando uma porção terminal de fita simples exposta (ver Figura 5-41). Foi demonstrado que esta extremidade exposta inclina-se para trás, inserindo sua extremidade de fita simples na dupla-hélice de DNA da sequência telomérica repetida, formando uma *alça t* (**Figura 5-42**). Em linhas gerais, essa reação assemelha-se à invasão durante a recombinação homóloga discutida anteriormente, podendo ter evoluído a partir desses sistemas de recombinação primitivos. As alças t geram uma estrutura característica nas extremidades cromossômicas normais que as protege de enzimas de degradação e claramente as distingue das extremidades de moléculas de DNA quebradas, que devem ser rapidamente reparadas pela célula (ver Figura 5-51).

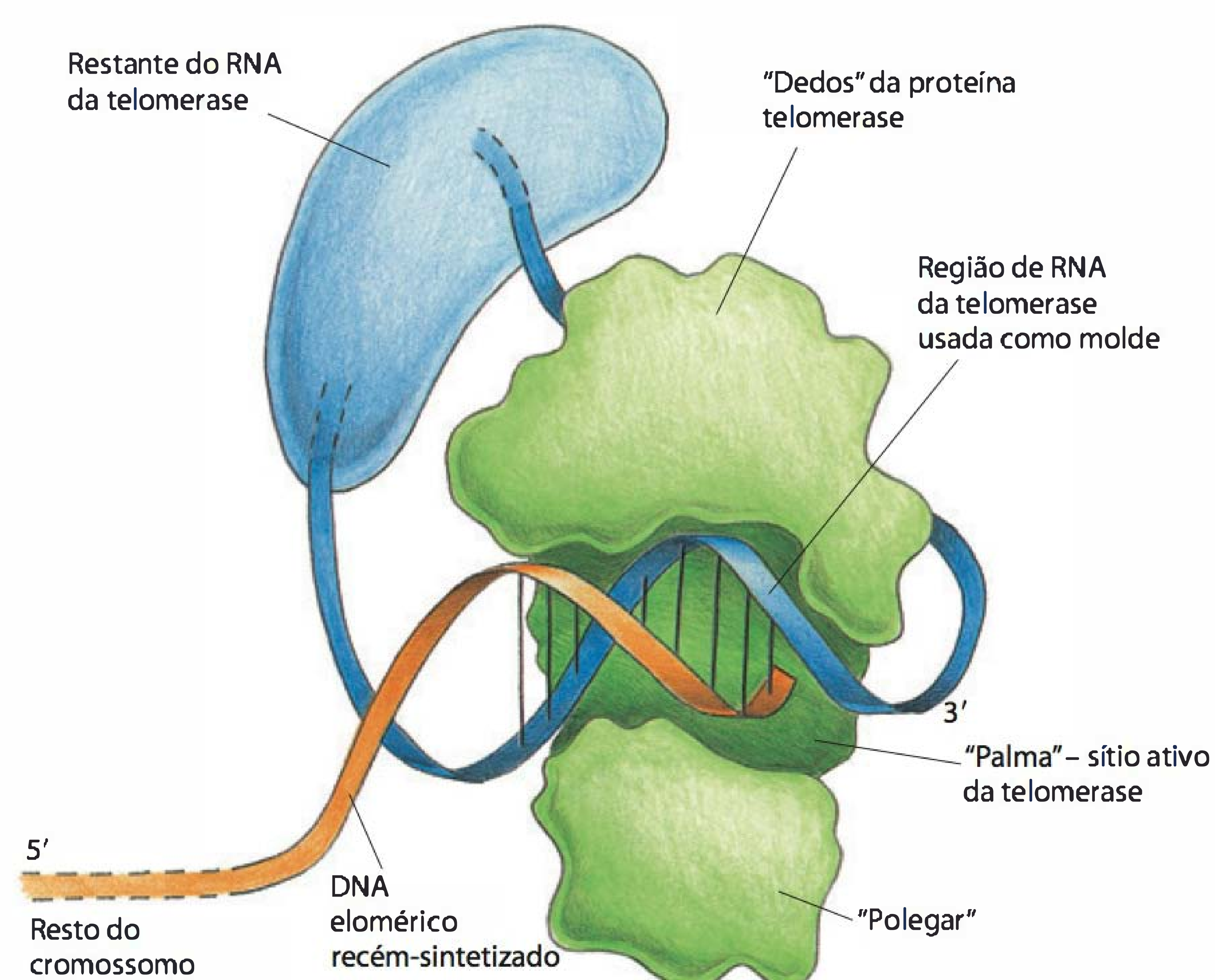


Figura 5-40 Estrutura de uma porção da telomerase. A telomerase é um grande complexo proteína-RNA. O RNA (em *azul*) contém a sequência-molde para a síntese das novas repetições de DNA telomérico. A reação de síntese propriamente dita é realizada pelo domínio da transcriptase reversa da proteína, mostrado em *verde*. Uma transcriptase reversa é uma forma especial de polimerase que utiliza um molde de RNA para produzir uma fita de DNA; uma característica exclusiva da telomerase é que ela carrega seu próprio molde de RNA todo o tempo. A telomerase também possui vários outros domínios proteicos (não mostrados) necessários à ligação correta da enzima às extremidades dos cromossomos. (Modificada de J. Lingner e T. R. Cech, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:226-232, 1998. Com permissão de Elsevier.)

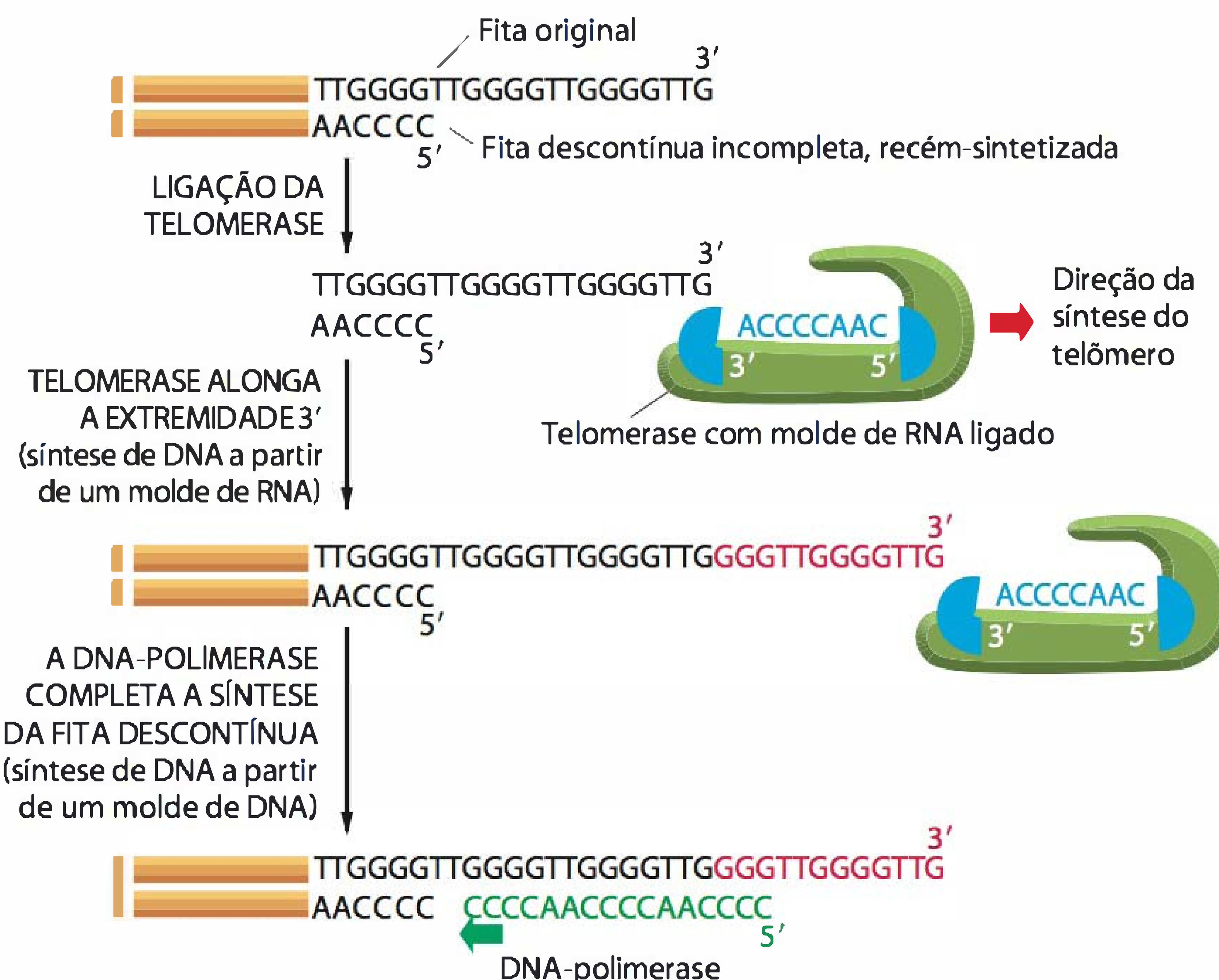


Figura 5-41 Replicação do telômero. A figura mostra as reações envolvidas na síntese das sequências repetidas ricas em G formadas nas extremidades dos cromossomos (telômeros) de vários eucariotos. A extremidade 3′ da fita de DNA original é alongada pela síntese de DNA a partir de um molde de RNA; isso permite que a fita-filha de DNA incompleta pareada a ela seja alongada na direção 5′. Essa fita descontínua incompleta é, provavelmente, completada pela DNA-polimerase α, que contém uma subunidade de DNA-primase. A sequência telomérica ilustrada é do ciliado *Tetrahymena*, no qual essas reações foram primeiramente descobertas.

O comprimento dos telômeros é regulado pelas células e pelos organismos

Como os processos de crescimento e encurtamento de cada sequência do telômero são aproximadamente ajustados em cada célula, uma extremidade cromossômica contém um número variável de repetições teloméricas. Não é de surpreender que os experimentos demonstrem que as células que se proliferam indefinidamente (como as células de leveduras) possuem mecanismos homeostáticos que mantêm o número dessas repetições dentro de uma faixa limitada (**Figura 5-43**).

Foi proposto que, nas células somáticas humanas, as repetições teloméricas fornecem a cada célula um mecanismo de "relógio" que evita a proliferação ilimitada de células aberrantes em tecidos adultos. De acordo com esse conceito, nossas células somáticas nascem com um suprimento completo de repetições teloméricas. Algumas células-tronco, especialmente aquelas que formam os tecidos que devem ser repostos durante a vida, como medula e pele, mantêm a atividade total da telomerase. Contudo, em vários outros tipos celulares, o nível da telomerase é reduzido de tal modo que a enzima não pode mais acompanhar a duplicação cromossômica. Tais células perdem de 100 a 200 nucleotídeos em cada telômero por divisão celular. Após várias gerações celulares, as células descendentes herdarão cromossomos defeituosos (pois suas extremidades não podem ser replicadas completamente) e, como consequência, serão retiradas permanentemente do ciclo celular e não mais sofrerão divisão – um processo denominado *senescência celular replicativa* (discutida no Capítulo 17). Em teoria, tal mecanismo poderia oferecer alguma segurança contra a proliferação celular descontrolada de células anormais em tecidos somáticos e, assim, auxiliar na proteção contra o câncer.

A ideia do comprimento dos telômeros atuar como uma "vareta de medição" para contar as divisões celulares e regular o tempo de vida da célula tem sido analisada de várias formas. Em determinados tipos de células humanas cultivadas em cultura, os resultados experimentais concordam com essa teoria. Os fibroblastos humanos normalmente sofrem cerca de 60 divisões celulares em cultura antes de sofrer senescência replicativa. Como a maioria das outras células somáticas em humanos, os fibroblastos produzem níveis muito baixos de telomerase, e seus telômeros são gradativamente encurtados a cada divisão. Quando a telomerase é oferecida aos fibroblastos pela inserção de um gene de telomerase ativo, o comprimento do telômero é mantido, e muitas das células continuam a proliferar-se indefinidamente. Parece claro, portanto, que o encurtamento do telômero pode "contar" as divisões celulares e promover a senescência celular replicativa em algumas células humanas.

Foi proposto que esse tipo de controle da proliferação celular é importante para a manutenção da arquitetura tecidual, sendo também, de algum modo, responsável pelo envelhecimento dos animais, incluindo os humanos. Essas ideias têm sido avaliadas pela produção de camundongos transgênicos sem nenhuma telomerase. Os telômeros dos

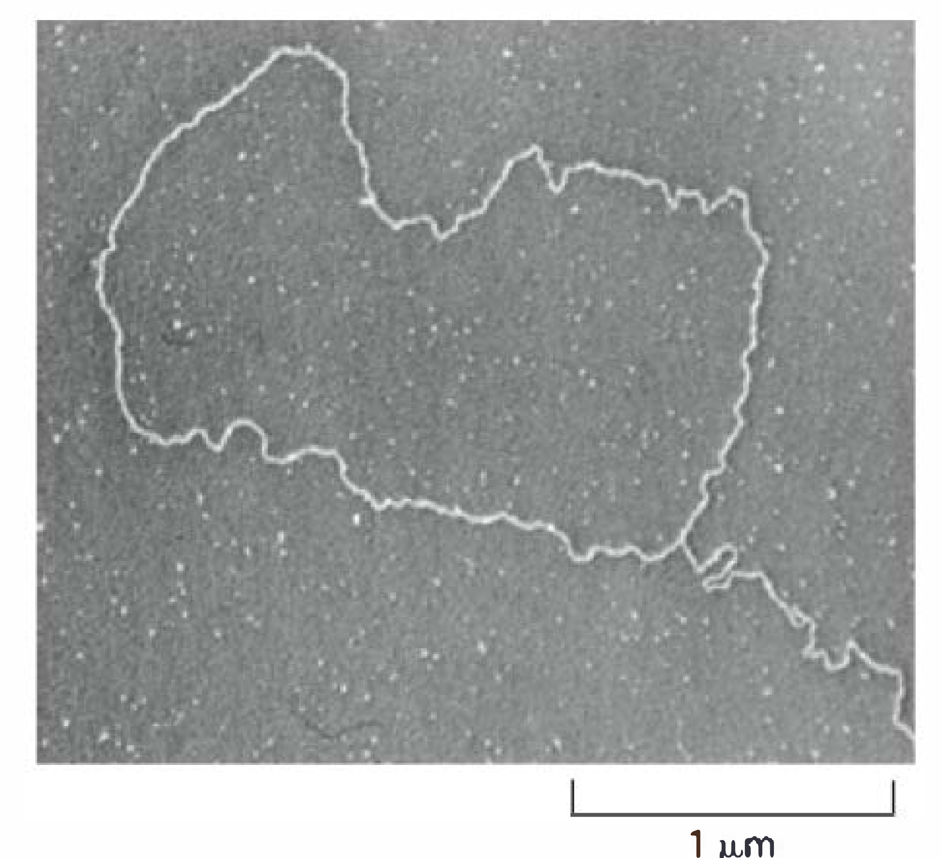


Figura 5-42 Alça t na extremidade de um cromossomo de mamífero. Micrografia eletrônica do DNA na extremidade de um cromossomo humano na interfase. O cromossomo foi fixado, desproteinado e artificialmente espessado antes da análise. A alça mostrada possui aproximadamente 15 mil pares de nucleotídeos. A inserção da extremidade 3′ de fita simples na região da dúplex com as repetições, formando a alça t, parece ser promovida e mantida por proteínas especializadas. (De J. D. Griffith et al., *Cell* 97:503-514, 1999. Com permissão de Elsevier.)

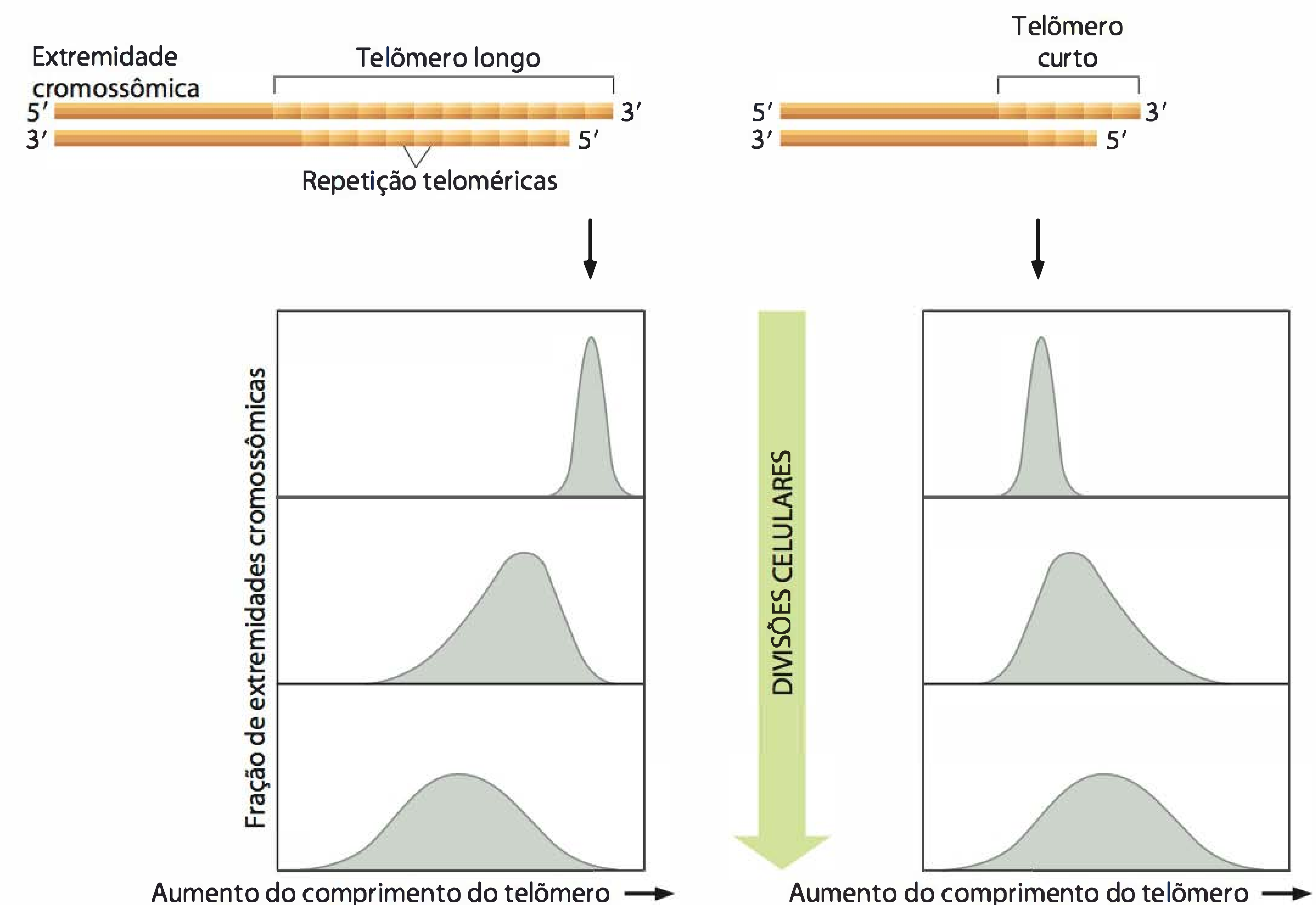


Figura 5-43 Demonstração de que as células de leveduras controlam o comprimento de seus telômeros. Neste experimento, o telômero em uma das extremidades de um determinado cromossomo foi artificialmente produzido mais longo (à *esquerda*) ou mais curto (à *direita*) que a média. Após diversas divisões celulares, o cromossomo recupera-se, mostrando um comprimento telomérico médio e uma distribuição de comprimento característica dos outros cromossomos na célula. A existência de um mecanismo de retroalimentação semelhante para controlar o comprimento dos telômeros nas células germinativas de animais foi proposto.

cromossomos dos camundongos são cerca de cinco vezes mais longos que os telômeros humanos, e os camundongos devem, portanto, reproduzir-se no mínimo três gerações até que seus telômeros tenham encurtado ao tamanho normal dos humanos. Não foi surpresa, então, que as primeiras gerações de camundongos se desenvolvessem normalmente. Porém, camundongos de gerações posteriores desenvolveram progressivamente mais defeitos em alguns tecidos de alta proliferação. Além disso, esses camundongos apresentaram sinais de envelhecimento prematuro e uma tendência pronunciada ao desenvolvimento de tumores. Nesses e em outros aspectos, esses camundongos lembram humanos com a doença genética *disceratose congênita*. Indivíduos afetados por essa doença possuem uma cópia funcional e outra cópia não-funcional do gene da enzima RNA-telomerase; eles apresentam um encurtamento prematuro dos telômeros e normalmente morrem por destruição progressiva da medula óssea. Eles também desenvolvem problemas pulmonares e cirrose hepática, e apresentam anormalidades em várias estruturas epidérmicas, incluindo pele, folículos pilosos e unhas.

As observações anteriores demonstram claramente que o controle da proliferação celular pelo encurtamento dos telômeros impõe um risco aos organismos, pois nem todas as células que começam a perder as extremidades dos cromossomos irão parar de se dividir. Algumas aparentemente tornam-se geneticamente instáveis, mas continuam a se dividir e geram variantes celulares que podem levar ao câncer. Assim, é questionável se a ausência de telomerase observada na maioria das células somáticas humanas fornece uma vantagem evolutiva ou não, como sugerido por aqueles que postularam que o encurtamento dos telômeros tende a nos proteger do câncer e de outras doenças proliferativas.

Resumo

As proteínas que iniciam a replicação do DNA ligam-se a sequências de DNA na origem de replicação e catalisam a formação de uma bolha de replicação com duas forquilhas de replicação que se deslocam em sentidos opostos. O processo inicia quando um complexo DNA-proteína iniciadora é formado e, subsequentemente, acopla uma DNA-helicase ao DNA-molde. Outras proteínas são então adicionadas, formando uma "maquinaria de replicação" multienzimática que catalisa a síntese de DNA em cada forquilha de replicação.

Nas bactérias e em alguns eucariotos simples, as origens de replicação são determinadas por sequências de DNA específicas com apenas algumas centenas de pares de nucleotídeos. Em outros eucariotos, como os humanos, as sequências necessárias para determinar uma origem de replicação de DNA parecem ser bem menos definidas, e a origem pode estender-se por vários milhares de pares de nucleotídeos.

Em geral, as bactérias possuem uma única origem de replicação em um cromossomo circular. Com uma velocidade de mil nucleotídeos por segundo, as forquilhas completam a replicação do

genoma em menos de uma hora. A replicação do DNA eucariótico ocorre em apenas uma parte do ciclo celular, a fase S. Em eucariotos, a forquilha de replicação desloca-se cerca de 10 vezes mais lentamente, quando comparada à forquilha bacteriana, e os cromossomos eucarióticos, muito mais longos, necessitam, cada um, de várias origens para completar a replicação na fase S que normalmente dura cerca de oito horas. As diferentes origens de replicação nos cromossomos eucarióticos são ativadas em uma sequência determinada, em parte, pela estrutura da cromatina, em que as regiões mais condensadas da cromatina iniciam sua replicação mais tardiamente. Após a passagem da forquilha, a estrutura da cromatina é regenerada pela adição de novas histonas às histonas originais que são diretamente herdadas em cada molécula-filha de DNA. O mecanismo de duplicação cromossômica permite que os padrões originais de modificação das histonas sejam passados aos cromossomos-filhos, fornecendo um modo de herança epigenética.

Os eucariotos resolvem o problema da replicação das extremidades dos seus cromossomos lineares por meio de uma estrutura especializada na porção terminal, o telômero, mantido por uma enzima especial de polimerização de nucleotídeos chamada de telomerase. A telomerase estende uma das fitas de DNA na extremidade do cromossomo utilizando um molde de RNA que é parte integral da enzima, produzindo uma sequência altamente repetida de DNA que caracteristicamente estende-se por milhares de pares de nucleotídeos em cada extremidade cromossômica.

REPARO DO DNA

A manutenção da estabilidade genética de um organismo necessária à sobrevivência requer não apenas um mecanismo extremamente preciso para replicar o DNA, mas também mecanismos para corrigir as diversas lesões acidentais que ocorrem continuamente no DNA. Grande parte das alterações espontâneas é temporária, pois são imediatamente corrigidas por um conjunto de processos chamados coletivamente de **reparo do DNA**. Dos milhares de alterações aleatórias gerados a cada dia no DNA de uma célula humana por calor, acidentes metabólicos, radiações de vários tipos e exposição a substâncias ambientais, apenas algumas alterações acumulam-se como mutações na sequência de DNA. Sabemos, por exemplo, que menos de uma em mil alterações acidentais de bases no DNA resultam em uma mutação permanente; o restante é eliminado com extrema eficiência pelo sistema de reparo do DNA.

A importância do reparo do DNA é evidente, visto o enorme investimento feito pelas células em enzimas de reparo. Por exemplo, a análise dos genomas das bactérias e leveduras revelou que uma porcentagem alta da capacidade codificante desses organismos é dedicada somente às funções de reparo do DNA. A importância do reparo do DNA também pode ser demonstrada pelo aumento da taxa de mutação que ocorre após a inativação de um gene de reparo. Muitas proteínas de reparo do DNA e os genes que as codificam – que operam em uma grande variedade de organismos, incluindo os humanos – foram originalmente identificados em bactérias por isolamento e caracterização dos mutantes que apresentavam uma taxa de mutação aumentada, ou uma sensibilidade aumentada a agentes que danificam o DNA.

Tabela 5-2 Algumas síndromes hereditárias causadas por defeitos no reparo do DNA

Nome	Fenótipo	Enzima ou processo afetado
MSH2, 3, 6, MLH 1, PMS2	Câncer de cólon	Reparo de pareamento incorreto
Xeroderma pigmentosa (XP) grupos A-G	Câncer de pele, sensibilidade a UV, anormalidades neurológicas	Reparo por excisão de nucleotídeos
Variante de XP	Câncer de pele, sensibilidade a UV	Síntese translesão pela DNA-polimerase η
Ataxia telangiectasia (AT)	Leucemia, linfoma, sensibilidade a raios γ, instabilidade genômica	Proteína ATM, uma proteína-cinase ativada por quebras na fita dupla
BRCA-2	Câncer de mama, ovário e próstata	Reparo por recombinação homóloga
Síndrome de Werner	Envelhecimento prematuro, câncer em vários sítios, instabilidade genômica	DNA-helicase e uma 3′-exonuclease acessória
Síndrome de Bloom	Câncer em vários sítios, suspensão do crescimento, instabilidade genômica	DNA-helicase acessória à replicação
Anemia de Fanconi grupos A-G	Anormalidades congênitas, leucemia, instabilidade genômica	Reparo de cruzamento interfitas do DNA
Paciente 46 BR	Hipersensibilidade a agentes que danificam DNA, instabilidade genômica	DNA-ligase I

Estudos recentes das consequências da capacidade reduzida de reparo do DNA nos humanos demonstraram a associação de diversas doenças com capacidade reduzida de reparo (**Tabela 5-2**). Então, vimos que defeitos em um gene humano que normalmente atua na correção de pares de bases pareados de forma incorreta no DNA, resultantes de erros na replicação, podem causar uma predisposição herdada a determinados tipos de câncer, refletindo uma taxa de mutações aumentada. Em outra doença humana, a *xeroderma pigmentosa* (XP), os indivíduos afetados apresentam uma sensibilidade extrema à radiação ultravioleta, pois são incapazes de reparar determinados fotoprodutos no DNA. Esse defeito no reparo resulta em um aumento na taxa de mutação que provoca lesões severas na pele e uma suscetibilidade aumentada a determinados tipos de câncer.

Sem o reparo do DNA, as lesões espontâneas alterariam rapidamente as sequências de DNA

Apesar de ser um material altamente estável, característica necessária ao armazenamento da informação genética, o DNA é uma molécula orgânica complexa, suscetível a alterações espontâneas, mesmo sob condições celulares normais que provocam mutações caso não sejam corrigidas (**Figura 5-44**). Por exemplo, o DNA de cada célula humana perde cerca de 5 mil bases púricas (adenina e guanina) por dia pela hidrólise das ligações N-glicosil à desoxirribose, em uma reação espontânea chamada de *depurinação*. Similarmente, uma *desaminação* espontânea da citosina para uracila no DNA ocorre a uma proporção de cerca de cem bases por célula por dia (**Figura 5-45**). As bases do DNA também são danificadas, ocasionalmente por metabólicos reativos produzidos pela célula (incluindo formas reativas do oxigênio) ou pela exposição a produtos químicos ambientais. Da mesma forma, a radiação ultravioleta do sol pode produzir uma ligação covalente entre duas pirimidinas adjacentes no DNA, formando, por exemplo, dímeros de timina (**Figura 5-46**). Caso não fossem corrigidas, quando o DNA foi replicado, grande parte dessas alterações resultaria na deleção de um ou de mais pares de bases, ou na substituição de um par de bases na cadeia-filha de DNA (**Figura 5-47**). As mutações seriam propagadas em todas as gerações celulares subsequentes. Uma proporção tão alta de alterações aleatórias na sequência de DNA fatalmente teria consequências desastrosas para um organismo.

A dupla-hélice de DNA é corrigida imediatamente

A estrutura de dupla-hélice do DNA é perfeitamente adequada para o reparo, pois possui duas cópias separadas de toda a informação genética – uma em cada fita. Portanto, quando uma das fitas é danificada, a fita complementar possui uma cópia intacta da mesma informação, sendo normalmente usada para restaurar a sequência nucleotídica correta na fita danificada.

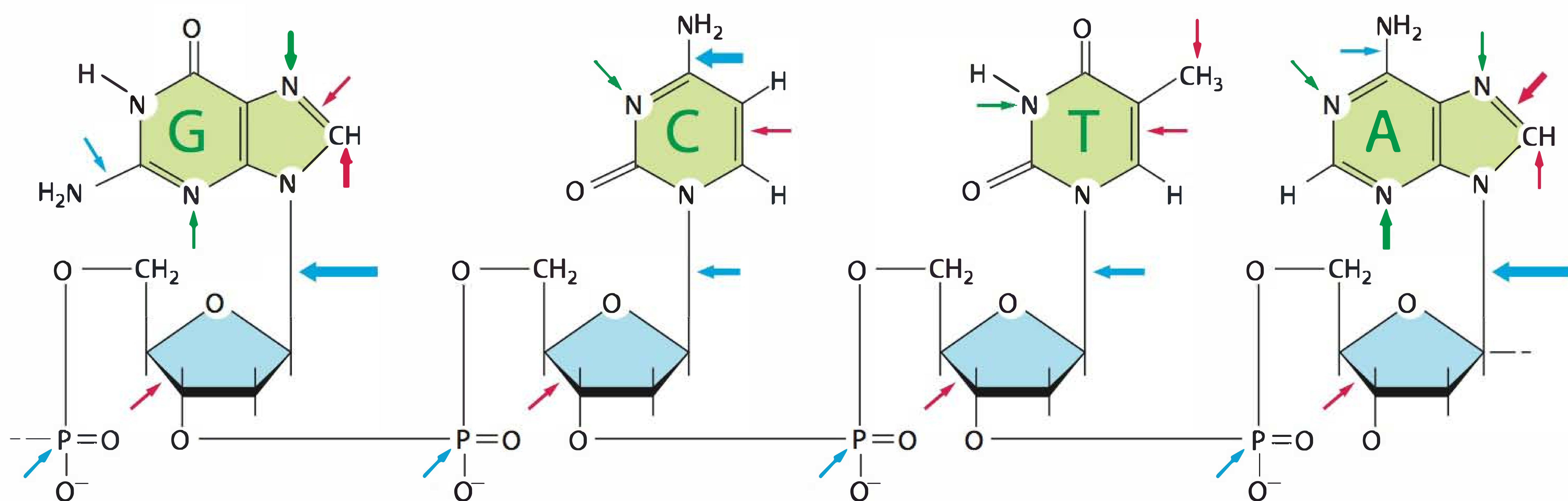


Figura 5-44 Resumo das alterações espontâneas que provavelmente necessitam de reparo do DNA. Os sítios em cada nucleotídeo conhecidos por sofrerem modificações espontâneas por dano oxidativo (*setas vermelhas*), ataque hidrolítico (*setas azuis*) e metilação descontrolada pela *S*-adenosilmetionina, um doador de grupos metil (*setas verdes*), são apresentados; a largura de cada seta indica a frequência relativa de cada evento. (De T. Lindahl, *Nature* 362:709-715, 1993. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

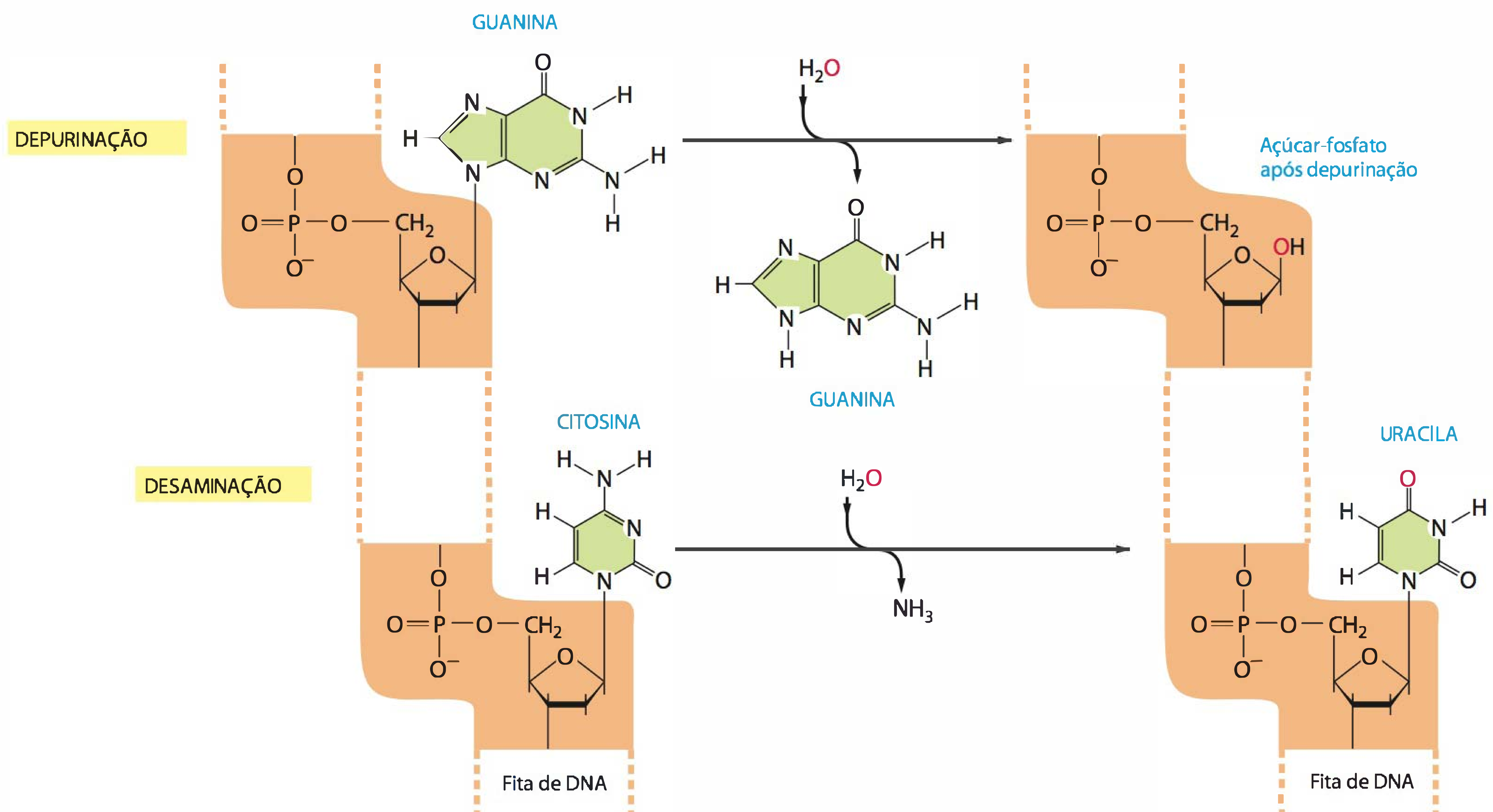


Figura 5-45 Depurinação e desaminação. Estas duas reações são as reações químicas espontâneas mais frequentes e produzem lesões sérias no DNA da célula. A depurinação pode remover a guanina (como mostrado) e a adenina do DNA. O principal tipo de reação de desaminação converte a citosina a uma base alterada, a uracila (ilustrada aqui), mas a desaminação também pode ocorrer em outras bases. Essas reações ocorrem na dupla-hélice de DNA; por conveniência, apenas uma fita é mostrada.

Uma indicação da importância de uma hélice de fita dupla para o armazenamento seguro da informação genética é que todas as células a utilizam; apenas uns poucos vírus utilizam uma fita simples de DNA ou de RNA como material genético. Os tipos de processos de reparo descritos nesta seção não atuam nestes ácidos nucleicos, e uma vez danificados, a chance de ocorrer uma alteração nucleotídica permanente nesses genomas de fita simples é muito alta. Parece que apenas organismos com genomas muito pequenos (e, portanto, alvos diminutos para lesões no DNA) podem codificar sua informação genética em uma outra molécula que não uma dupla-hélice de DNA.

Uma lesão no DNA pode ser removida por mais de uma via

As células possuem múltiplas vias para o reparo do DNA, usando diferentes enzimas que atuam em diferentes tipos de lesões. A **Figura 5-48** apresenta duas das vias mais comuns. Em ambas, a lesão é removida, a sequência de DNA original é restaurada por uma DNA-polimerase que utiliza a fita não-danificada como molde, e a quebra resultante na dupla-hélice é ligada pela DNA-ligase (ver Figura 5-13).

As duas vias diferem na maneira pela qual a lesão é removida do DNA. A primeira via, chamada de **reparo por excisão de bases**, envolve uma bateria de enzimas denominadas *DNA-glicosilases*, cada uma capaz de reconhecer um tipo específico de base alterada no DNA e de catalisar sua remoção hidrolítica. Existem pelo menos seis tipos dessas enzimas, incluindo as que removem Cs desaminados, As desaminados, diferentes tipos de bases alquiladas ou oxidadas, bases com anéis rompidos e bases nas quais a ligação dupla carbono-carbono foi acidentalmente convertida em uma ligação simples entre os carbonos. Como a base alterada é detectada no contexto da dupla-hélice? Uma etapa-chave é a pro-

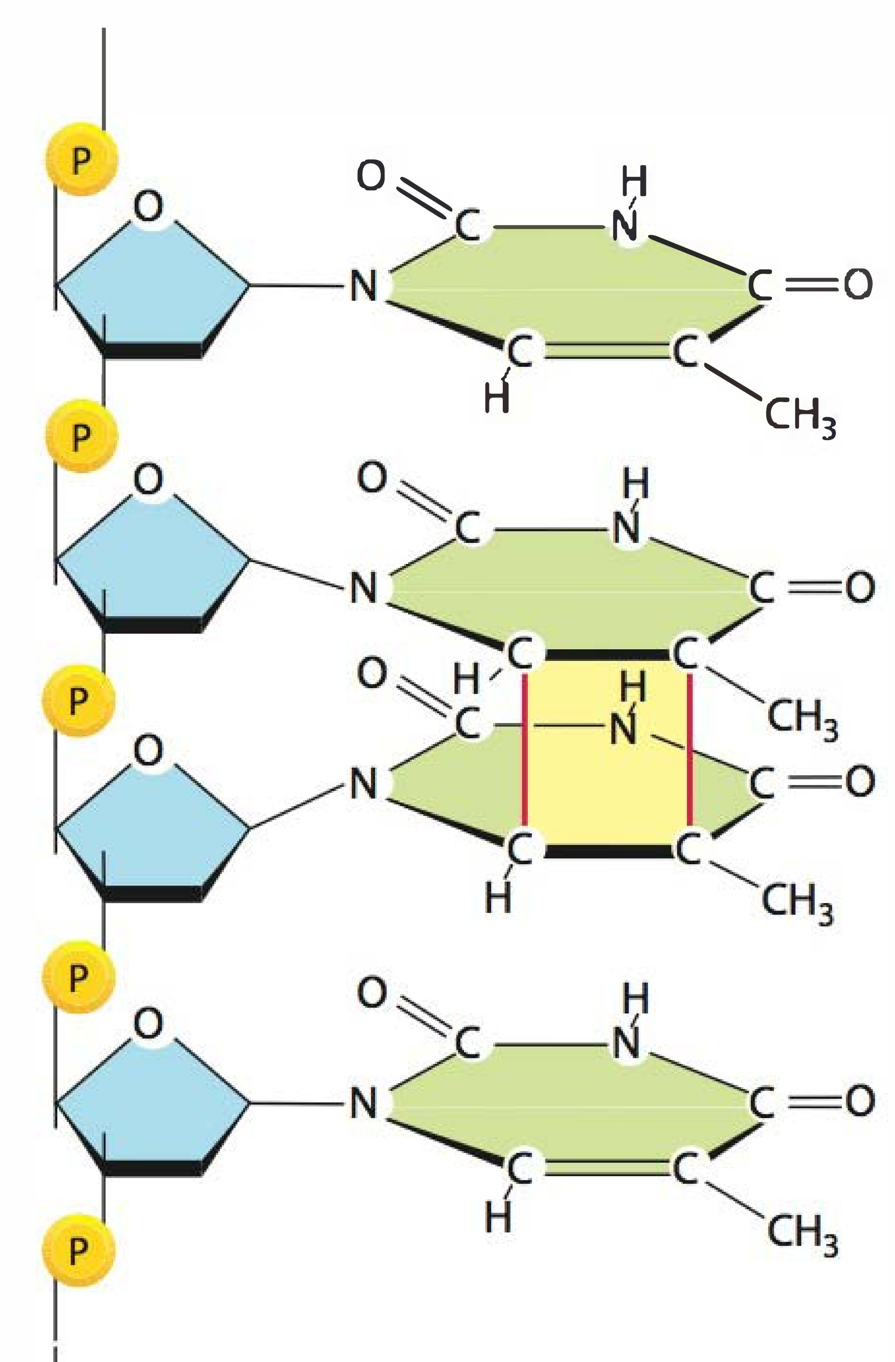


Figura 5-46 Tipo mais comum de dímero de timina. Este tipo de lesão ocorre no DNA de células expostas à radiação ultravioleta (como a luz do sol). Um dímero semelhante também pode ser formado entre duas bases pirimídicas quaisquer (C ou T) presentes no DNA.

jeção do nucleotídeo alterado para fora da hélice, em um processo mediado por enzimas que permite que a DNA-glicosilase procure uma lesão em todas as faces da base (**Figura 5-49**). Acredita-se que essas enzimas deslocam-se pelo DNA usando a projeção das bases para avaliar a situação de cada par de bases. Uma vez reconhecida a lesão, a enzima remove a base do açúcar.

A "ausência da base" produzida pela ação da DNA-glicosilase é reconhecida por uma enzima chamada de *AP endonuclease* (AP de *apurínica* ou *apirimidíca*, *endo* porque a nuclease cliva internamente à cadeia polinucleotídica), que cliva a ligação fosfodiéster, removendo e corrigindo a lesão (ver Figura 5-48A). A depurinação, o tipo de lesão mais frequente sofrido pelo DNA, também gera uma desoxirribose sem uma base. As depurinações são diretamente corrigidas começando pela AP nuclease, seguida pela metade inferior da via mostrada na Figura 5-48A.

A segunda principal via de reparo é chamada de **reparo por excisão de nucleotídeos**. Esse mecanismo pode corrigir uma lesão causada por praticamente qualquer alteração volumosa na estrutura da dupla-hélice de DNA. Essas alterações volumosas incluem aquelas produzidas pela reação covalente de bases do DNA com grandes hidrocarbonetos (como o carcinógeno benzopireno), bem como os vários dímeros de pirimidinas (T-T, T-C e C-C) causados pela luz solar. Nessa via, um enorme complexo multienzimático verifica o DNA à procura de distorções na dupla-hélice, em vez de uma alteração específica de bases. Uma vez encontrada uma lesão volumosa, a ligação fosfodiéster da fita anormal é clivada nos dois lados da distorção, e a DNA-helicase remove o oligonucleotídeo de fita simples contendo a lesão. O intervalo produzido na hélice de DNA é, então, corrigido pela DNA-polimerase e pela DNA-ligase (Figura 5-48B).

Uma alternativa aos processos de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos é usar a química reversa da lesão de DNA, e essa estratégia é utilizada para a remoção rápida de determinadas lesões altamente mutagênicas ou tóxicas. Por exemplo, a lesão de alquilação O^6-metilguanina tem o grupo metil removido pela transferência direta a um resíduo de cisteína na própria proteína de reparo, que é destruída na reação. Em outro exemplo, grupos metil nas lesões de alquilação 1-metiladenina e 3-metilcitosina são removidos por uma demetilase dependente de ferro, que libera formaldeído a partir do DNA metilado e regenera a base nativa.

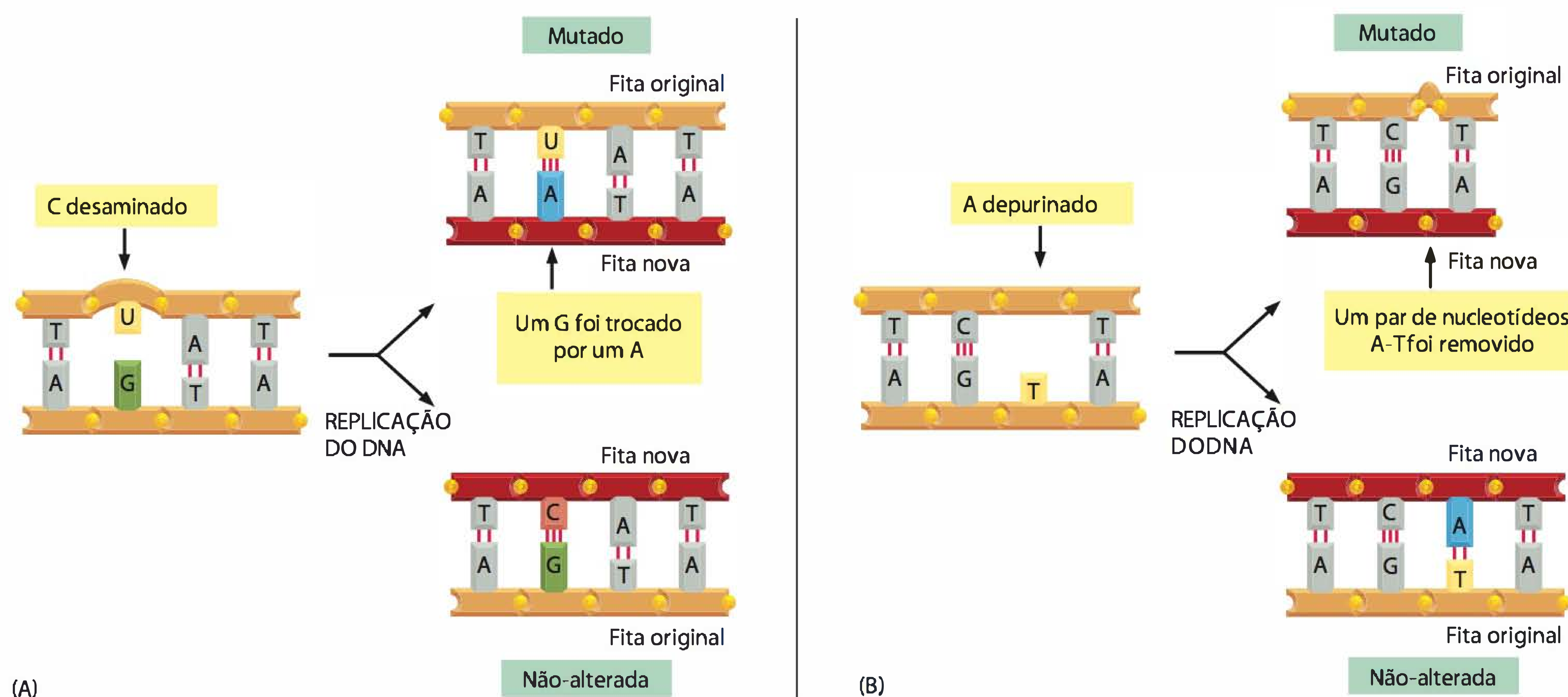


Figura 5-47 Modo pelo qual as modificações químicas dos nucleotídeos produzem mutações. (A) A desaminação da citosina, se não for corrigida, resulta na substituição de uma base por outra na replicação do DNA. Como mostrado na Figura 5-45, a desaminação da citosina produz uracila. A base uracila diferencia-se da citosina nas propriedades de pareamento, formando par preferencialmente com a adenina. A maquinaria de replicação do DNA, portanto, irá adicionar uma adenina quando encontrar uma uracila na fita-molde. (B) A depurinação pode resultar na perda de um par de nucleotídeos. Quando a maquinaria da replicação encontra uma purina ausente na fita-molde, ela pode passar para o próximo nucleotídeo completo, como ilustrado aqui, produzindo uma deleção nucleotídica na fita recém-sintetizada. Muitos outros tipos de lesões no DNA (ver Figura 5-44), se não forem corrigidas, produzem mutações no momento da replicação do DNA.

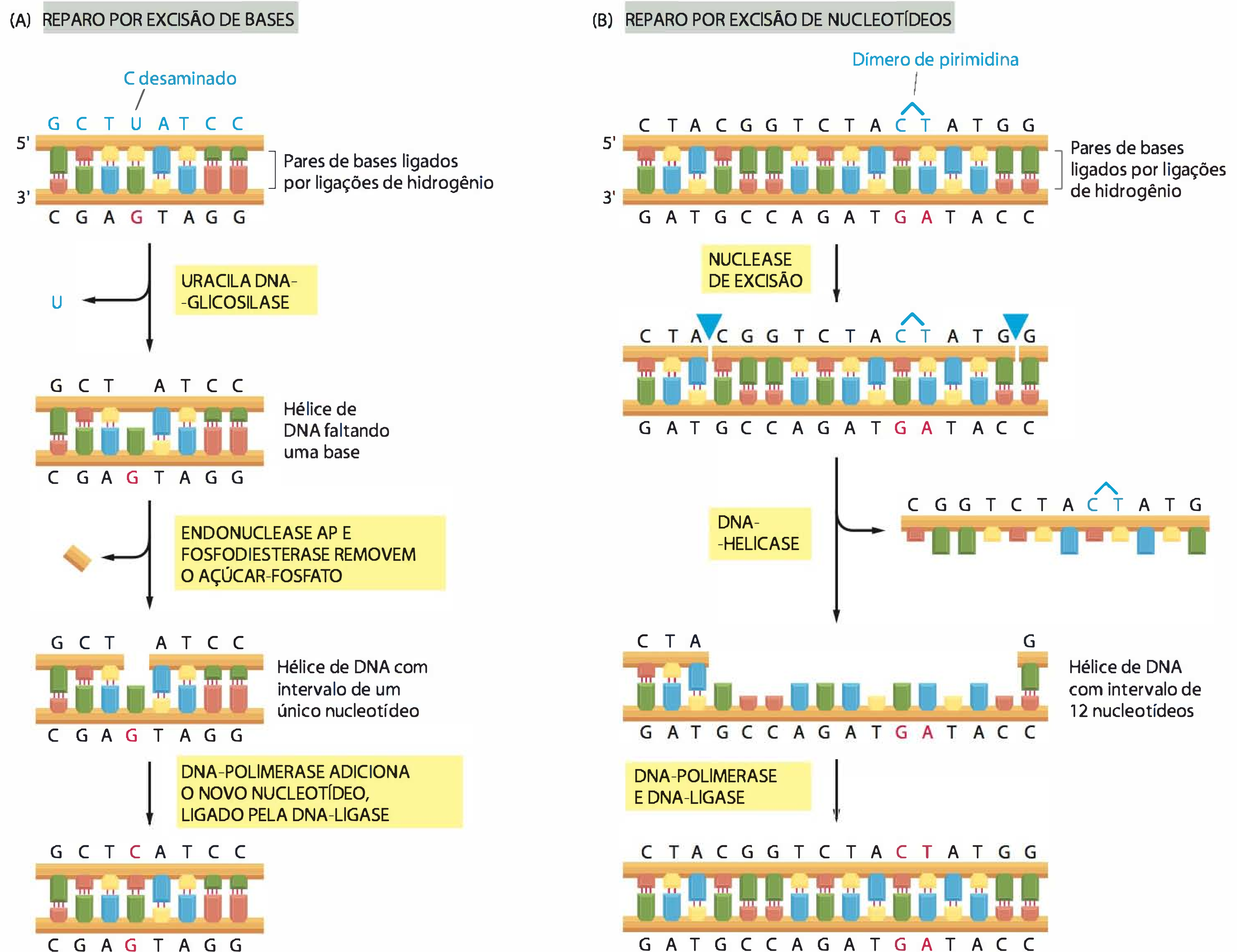


Figura 5-48 Comparação entre as duas principais vias de reparo do DNA. (A) *Reparo por excisão de bases*. Essa via inicia com uma DNA-glicosilase. A enzima uracila DNA-glicosilase remove uma citosina acidentalmente desaminada no DNA. Após a atuação dessa glicosilase (ou outra glicosilase que reconheça um tipo diferente de lesão), a porção de açúcar-fosfato do resíduo que sofreu perda da base é clivada do DNA pela ação sequencial da endonuclease AP e de uma fosfodiesterase. (Estas mesmas enzimas iniciam diretamente o reparo de sítios depurinados). O intervalo de um único nucleotídeo é, por sua vez, preenchido pela DNA-polimerase e DNA-ligase. O resultado final é que a base U acidentalmente criada por desaminação foi restaurada a C. A endonuclease AP é assim chamada porque reconhece qualquer sítio na hélice de DNA que contenha um açúcar desoxirribose com ausência da base; esses sítios podem surgir pela perda de uma purina (sítios *a*púricos) ou pela perda de uma pirimidina (sítios *a*pirimídicos). (B) *Reparo por excisão de nucleotídeos*. Em bactérias, após a detecção de uma lesão como um dímero de pirimidina (ver Figura 5-46), por um complexo multienzimático, ocorre uma clivagem em cada lado da lesão, e uma DNA-helicase associada remove todo o segmento de fita danificada. A maquinaria de reparo por excisão produz um intervalo de 12 nucleotídeos em bactérias, como mostrado. Em humanos, uma vez reconhecida a lesão, uma helicase é recrutada para desenrolar a dúplex de DNA localmente. A seguir, a nuclease de excisão entra e cliva nos dois lados da lesão, produzindo um intervalo de cerca de 30 nucleotídeos. A maquinaria de reparo por excisão de nucleotídeos, tanto de bactérias como de humanos, pode reconhecer e corrigir diversos tipos de lesões no DNA.

O acoplamento do reparo do DNA à transcrição assegura que o DNA celular mais importante seja reparado de modo eficiente

Todo o DNA celular é constantemente vigiado para verificação de lesões, e os mecanismos de reparo descritos atuam em todas as partes do genoma. Contudo, as células têm uma maneira de direcionar o reparo às sequências de DNA em que ele é mais urgentemente necessário. Isso ocorre pelo acoplamento do reparo de uma lesão de DNA à RNA-polimerase, a enzima que transcreve o DNA em RNA, a primeira etapa da expressão gênica. A RNA-polimerase "para" nas lesões de DNA e, por meio de proteínas acopladoras, direciona a maquinaria de reparo a esses sítios. Nas bactérias, onde os genes são relativamente pequenos, a RNA-polimerase parada pode ser dissociada do DNA, o reparo no DNA ocorre, e o gene é transcrito novamente a partir do início. Nos eucariotos, onde os genes podem ser imensos, uma reação mais complexa é usada para "dar suporte" à RNA-polimerase, reparar a lesão e reiniciar a polimerase.

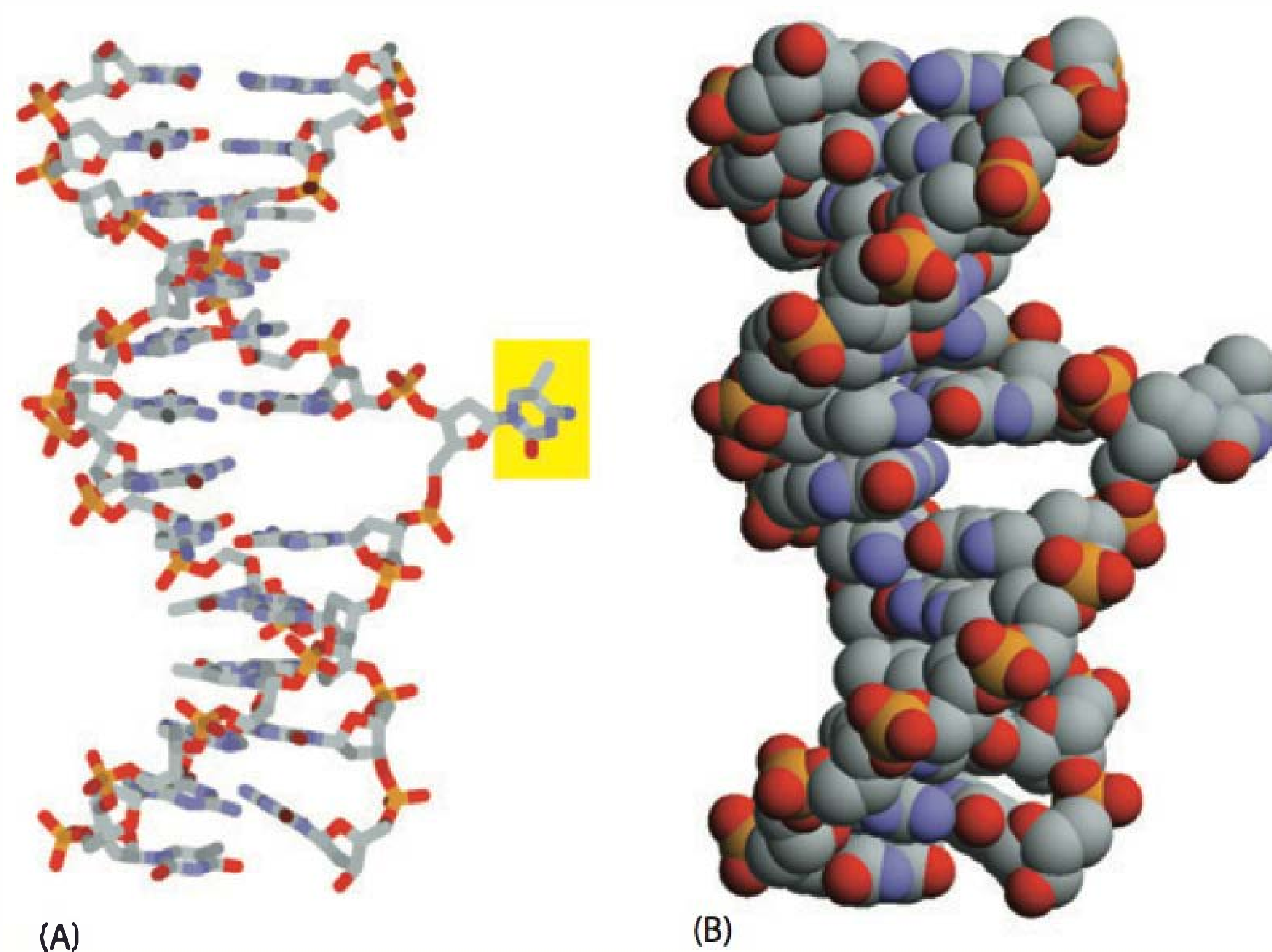


Figura 5-49 Reconhecimento de um nucleotídeo incomum no DNA pela torção da base. A família de enzimas DNA-glicosilases reconhece bases específicas na conformação mostrada. Cada uma dessas enzimas cliva a ligação glicosídica que une uma base determinada (*amarelo*) ao esqueleto de açúcar-fosfato, removendo-a do DNA. (A) Modelo de varetas; (B) modelo de preenchimento espacial.

O *reparo acoplado à transcrição* atua com a excisão de bases, excisão de nucleotídeos e outros mecanismos para dirigir o reparo imediato às sequências de DNA mais importantes, àquelas que estão sendo expressas no momento em que ocorre a lesão. Esse tipo de reparo é específico para a fita-molde do DNA sendo transcrito; a outra fita é corrigida com a mesma velocidade e eficiência do DNA que não está sendo transcrito. O reparo acoplado à transcrição representa uma vantagem especialmente em humanos, pois apenas uma pequena fração do nosso genoma é transcrita em um determinado momento. Sua importância pode ser vista em indivíduos com a síndrome de Cockayne, causada por um defeito no reparo acoplado à transcrição. Esses indivíduos apresentam retardo de crescimento, anormalidades esqueléticas, retardo neural progressivo e uma severa sensibilidade à luz solar. A maioria desses problemas parece surgir das moléculas de RNA-polimerase que ficaram estacionárias, permanentemente, nos sítios de lesões no DNA onde se localizam genes importantes.

A química das bases do DNA facilita a detecção de lesões

A dupla-hélice de DNA parece ter sido construída para o reparo. Como visto anteriormente, ela contém uma cópia extra de toda informação genética. Igualmente importante, a natureza das bases do DNA também facilita a diferenciação entre bases normais e danificadas. Por exemplo, todo evento de desaminação possível no DNA produz uma base "não-natural", que pode ser prontamente reconhecida e removida por uma DNA-glicosilase específica. A hipoxantina, por exemplo, é a purina mais simples capaz de pareamento específico com C, porém a hipoxantina é o produto de desaminação de A (**Figura 5-50**A). A adição de um segundo grupo amino à hipoxantina produz G, que não pode ser formado a partir de A por desaminação espontânea e cujo produto de desaminação também é único.

Como discutido no Capítulo 6, acredita-se que o RNA, em termos evolutivos, tenha sido o material genético anterior ao DNA, e parece provável que o código genético tenha sido inicialmente formado pelos quatro nucleotídeos A, C, G e U. Isso suscita a questão de por que o U no RNA foi substituído no DNA por T (que é 5-metiluracila). Vimos que a desaminação espontânea de C o converte em U, e que esse evento gera um produto relativamente inofensivo para a uracila DNA-glicosilase. Porém, se o DNA contivesse U como base natural, o sistema de reparo seria incapaz de distinguir um C desaminado de uma base U de ocorrência natural.

Uma situação especial ocorre no DNA de vertebrados, em que determinados nucleotídeos C são metilados em sequências C-G específicas e associadas a genes inativos (discutidos no Capítulo 7). A desaminação acidental desses nucleotídeos C metilados produz o nucleotídeo natural T (Figura 5-50B) em um pareamento incorreto com um G na fita de DNA oposta. Para auxiliar no reparo de nucleotídeos C desaminados, uma DNA-glicosilase especial reconhece o par de bases pareado de forma incorreta envolvendo T na sequência T-G e o remove. Contudo, este mecanismo de reparo de DNA é relativamente ineficiente,

pois os nucleotídeos C metilados são sítios comuns de mutação no DNA de vertebrados. É interessante observar que, apesar de apenas cerca de 3% dos nucleotídeos C serem metilados no DNA de humanos, as mutações nesses nucleotídeos metilados respondem por cerca de um terço das mutações de ponto (envolvendo uma única base) observadas nas doenças hereditárias humanas.

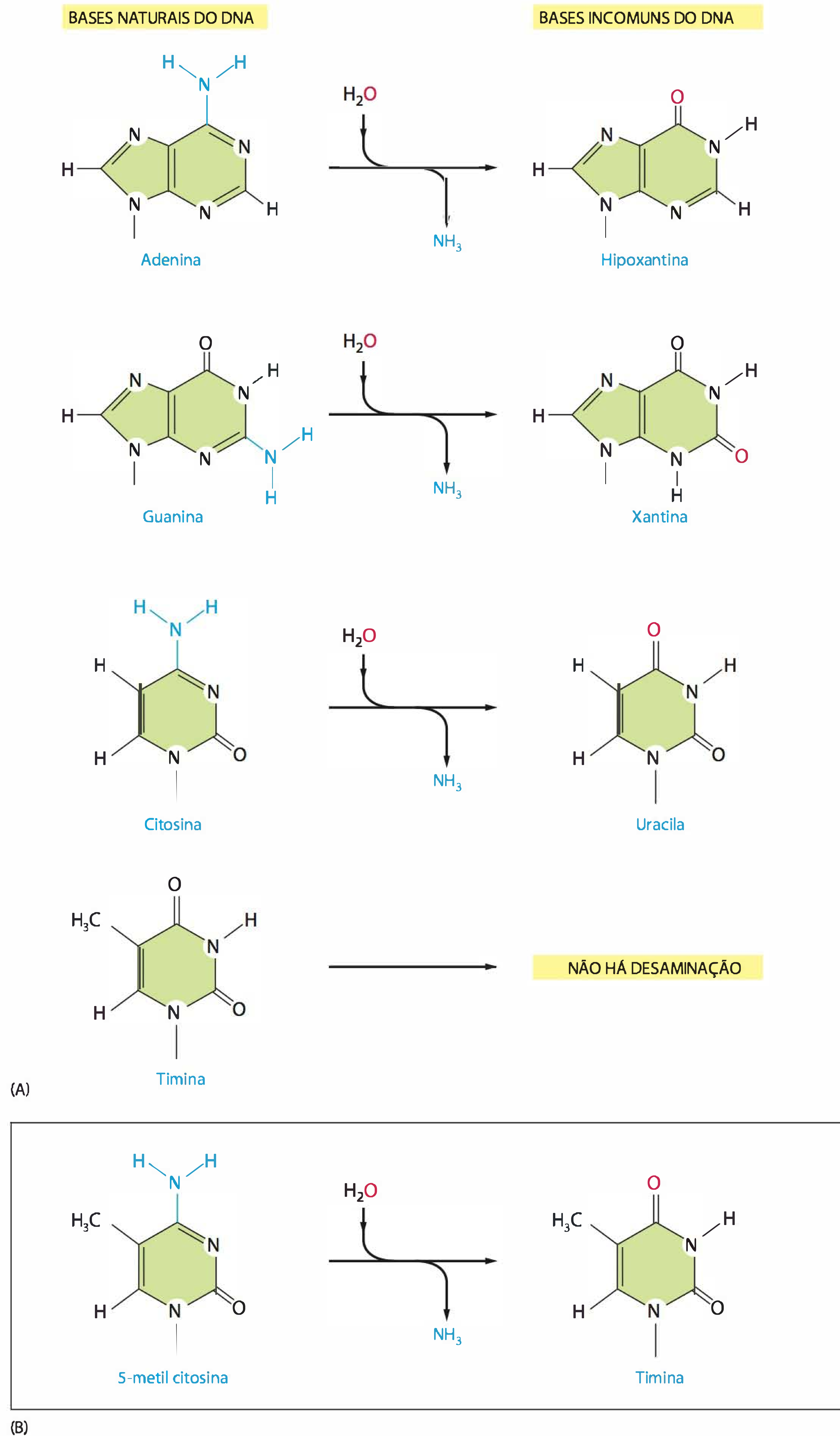


Figura 5-50 Desaminação dos nucleotídeos do DNA. Em cada caso, o átomo de oxigênio adicionado a esta reação com a água é mostrado em *vermelho*. (A) Os produtos da desaminação espontânea de A e G são reconhecidos como incomuns no DNA, sendo prontamente reconhecidos e corrigidos. A desaminação de C para U também foi ilustrada na Figura 5-45; T não possui um grupo amino para ser removido. (B) Cerca de 3% dos nucleotídeos C no DNA de vertebrados são metilados para auxiliar no controle da expressão gênica (discutida no Capítulo 7). Quando estes nucleotídeos 5-metil C são acidentalmente desaminados, eles formam o nucleotídeo natural T. Porém, este T forma par com um G na fita oposta, produzindo um pareamento incorreto.

DNA-polimerases especiais são usadas em emergências para reparar o DNA

Se o DNA celular estiver fortemente danificado, os mecanismos de reparo discutidos anteriormente em geral não são suficientes para corrigi-lo. Nesses casos, uma estratégia diferente, que implica em risco à célula, é utilizada. As DNA-polimerases replicativas, altamente precisas, param quando encontram DNA danificado, e, em emergências, as células utilizam polimerases de apoio versáteis, porém menos precisas para replicar o DNA pela lesão.

As células humanas contêm mais de 10 DNA-polimerases desse tipo, algumas das quais são capazes de reconhecer um tipo particular de lesão e especificamente adicionar o nucleotídeo necessário para restaurar a sequência inicial. Outras fazem "boas adivinhações" especialmente quando a base do molde foi muito danificada. Essas enzimas não são tão precisas como as polimerases replicativas normais quando copiam uma sequência normal de DNA. Por um lado, as polimerases de apoio não possuem a atividade exonucleolítica de correção; além disso, várias delas são menos seletivas que as polimerases replicativas na escolha do nucleotídeo a ser incorporado. Possivelmente por essa razão, cada molécula dessas polimerases de apoio só pode adicionar alguns poucos nucleotídeos. Embora os detalhes dessas reações fascinantes ainda não estejam claros, eles fornecem um testemunho elegante dos cuidados que cada organismo tem com a manutenção da integridade do seu DNA.

Quebras na fita dupla são eficientemente corrigidas

Um tipo de lesão no DNA potencialmente perigosa ocorre quando as duas fitas da dupla-hélice são quebradas, não havendo uma fita-molde intacta para o reparo. As quebras desse tipo são causadas por radiação ionizante, erros na replicação, agentes oxidantes e alguns outros metabólicos produzidos pela célula. Se essas lesões não forem corrigidas, rapidamente resultarão na degradação dos cromossomos em fragmentos menores e na perda de genes na divisão celular. Todavia, dois mecanismos distintos surgiram para amenizar esse tipo de dano (**Figura 5-51**). O mais fácil de entender é a **ligação de extremidades não-homólogas**, em que as extremidades da quebra são simplesmente justapostas e religadas, geralmente com a perda de um ou de mais nucleotídeos no sítio da junção (**Figura 5-52**). Esse mecanismo de ligação de extremidades, que pode ser visto como uma solução "rápida e suja" para o reparo de quebras nas duas fitas, é uma resposta comum nas células somáticas de mamíferos. Apesar de causar uma alteração na sequência de DNA (uma mutação) no local

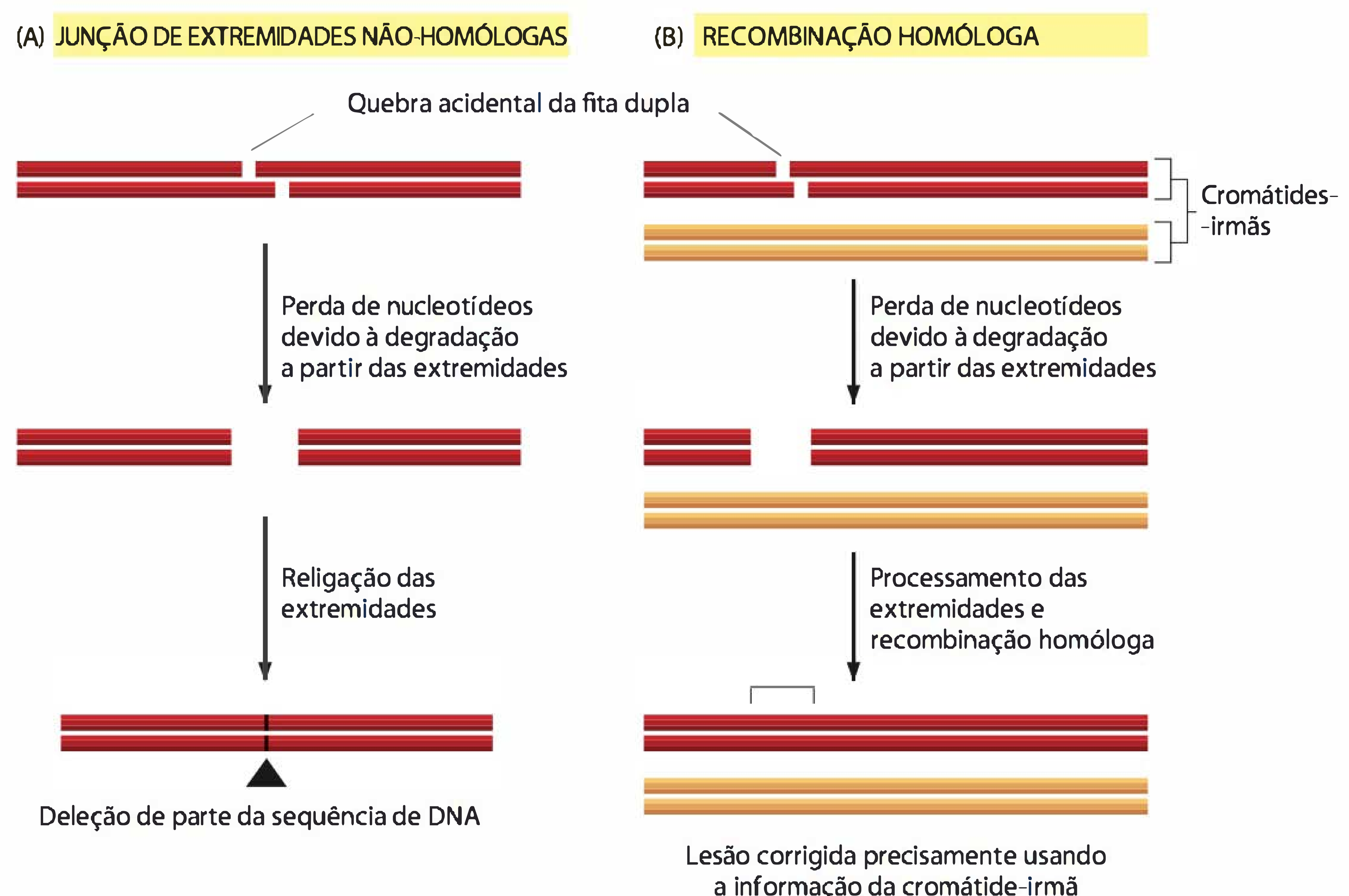


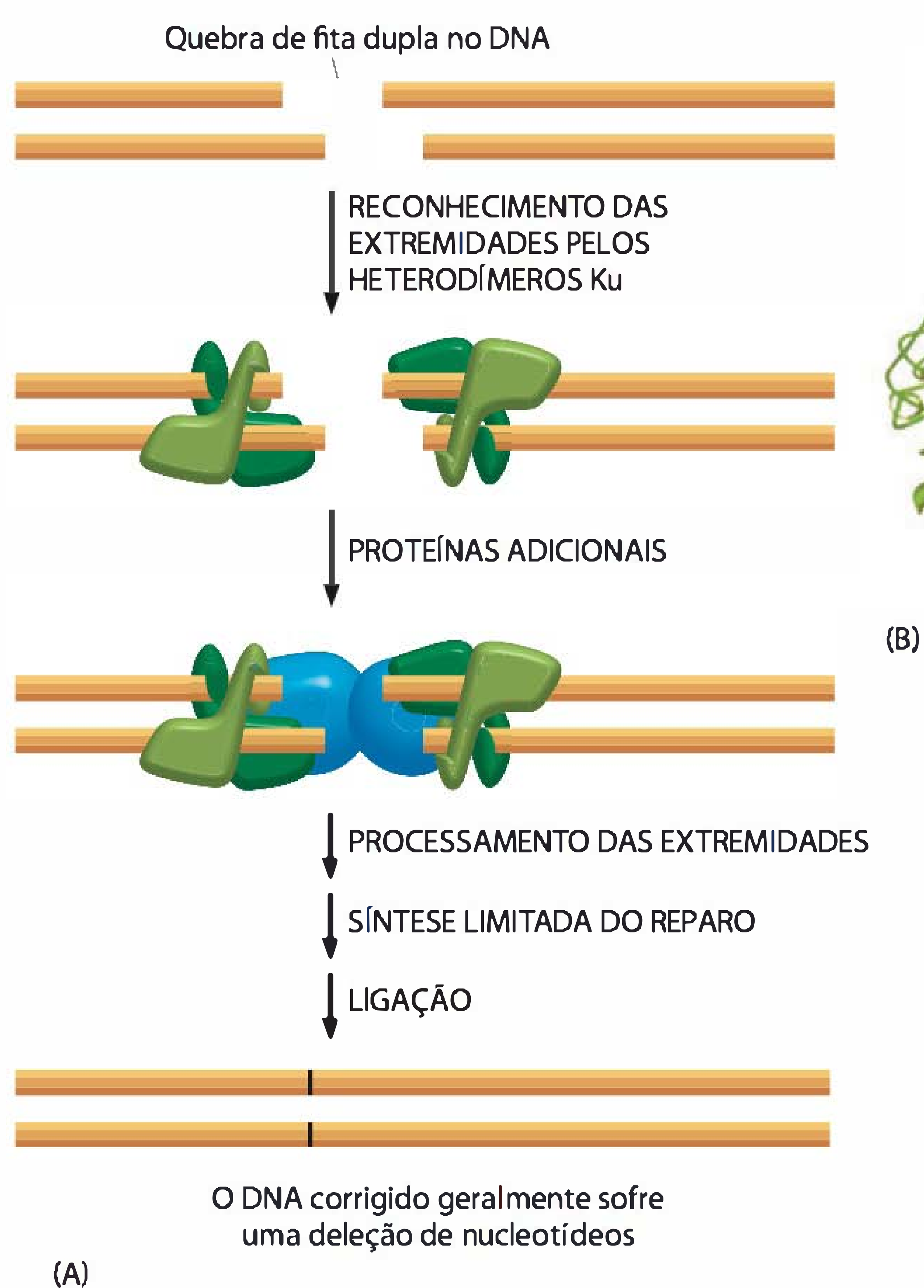
Figura 5-51 Dois modos diferentes de corrigir quebras de fita dupla do DNA. (A) A ligação de extremidades não-homólogas altera a sequência original do DNA quando um cromossomo quebrado é reparado. Essas alterações podem ser deleções (como mostrado) ou pequenas inserções. (B) O reparo de quebras de fita dupla por recombinação homóloga é mais difícil de ser realizado, porém esse tipo de reparo regenera a sequência original de DNA. Geralmente, ocorre após a duplicação do DNA, mas antes da divisão celular. Detalhes da recombinação homóloga serão apresentados mais adiante (ver Figura 5-61).

da quebra, pouco do genoma de mamíferos codifica proteínas, e esse mecanismo parece ser uma solução aceitável para o problema de religar cromossomos "quebrados". Quando um indivíduo atinge 70 anos, uma célula somática típica contém mais de 200 dessas "cicatrizes" distribuídas pelo genoma, representando sítios em que o DNA foi reparado de modo impreciso pela ligação de extremidades não-homólogas. Como discutido anteriormente, a estrutura especializada dos telômeros preserva as extremidades naturais dos cromossomos e evita que sejam confundidas com quebras no DNA e reparadas.

Um tipo mais preciso de reparo de quebras na fita dupla ocorre no DNA recém-sintetizado (Figura 5-51B). Nesse caso, o DNA é reparado usando a cromátide-irmã como molde. A reação é um exemplo de *recombinação homóloga*, considerada mais adiante neste capítulo. A maior parte dos organismos emprega tanto a ligação de extremidades não-homólogas como a recombinação homóloga para reparar quebras de fita dupla no DNA. A ligação não-homóloga predomina em humanos; a recombinação homóloga somente é usada durante e logo após a replicação de DNA (nas fases S e G_2), quando as cromátides-irmãs estão disponíveis para servirem como moldes.

Lesões no DNA retardam a progressão do ciclo celular

Vimos anteriormente que as células possuem vários sistemas de enzimas capazes de reconhecer e reparar vários tipos de lesões no DNA. Devido à importância de manter o DNA intacto, não-danificado de geração a geração, as células eucarióticas possuem um mecanismo adicional que maximiza a eficiência das enzimas de reparo do DNA: ele promove a suspensão da progressão do ciclo celular até que o reparo seja completado. Como discutido em detalhes no Capítulo 17, a progressão ordenada do ciclo celular é mantida por meio de *pontos de verificação* que asseguram o término de uma etapa antes de iniciar a próxima. Em vários desses pontos de verificação do ciclo celular, o ciclo é suspenso caso o DNA danificado seja detectado. Dessa forma, nas células de mamíferos, a presença de DNA danificado pode bloquear a progressão da fase G_1 para a fase S, retardar a fase S uma vez que já tenha sido iniciada, e bloquear a transição da fase S para a fase M. Esses atrasos auxiliam o reparo do DNA, fornecendo o tempo necessário para que a correção seja completada.



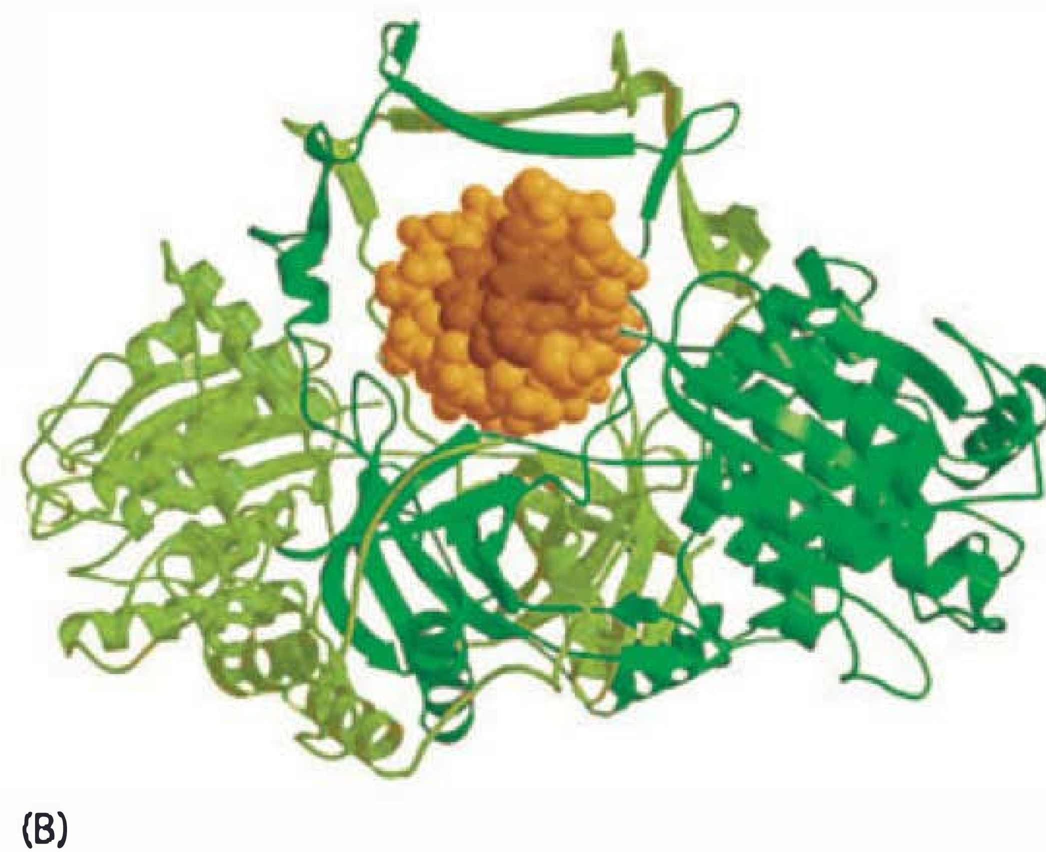


Figura 5-52 Junção de extremidades não-homólogas. (A) A função principal é realizada pela proteína Ku, um heterodímero que segura as extremidades dos cromossomos quebrados. As proteínas adicionais mostradas são necessárias para manter as extremidades unidas enquanto são processadas e finalmente ligadas covalentemente. (B) Estrutura tridimensional do heterodímero Ku ligado à extremidade de um fragmento de uma dúplex de DNA. A proteína Ku também é essencial para a junção V(D)J, um processo de recombinação específico para a geração da diversidade de anticorpos e receptores de células T durante o desenvolvimento das células B e T (discutido no Capítulo 25). A junção V(D)J e a junção de extremidades não-homólogas apresentam diversas semelhanças no mecanismo, mas a primeira fundamenta-se em quebras específicas na fita dupla produzidas deliberadamente pela célula. (B, de J. R. Walker, R. A. Corpina e J. Goldberg, *Nature* 412:607-614, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Danos no DNA também resultam em um aumento da síntese de algumas enzimas de reparo do DNA. A importância dos mecanismos especiais de sinalização que respondem a lesões no DNA é indicada pelo fenótipo de humanos que nascem com defeitos no gene que codifica a *proteína ATM*. Esses indivíduos possuem a doença *ataxia telangiectasia* (*AT*), cujos sintomas incluem neurodegeneração, predisposição ao câncer e instabilidade genômica. A proteína ATM é uma cinase grande necessária para gerar os sinais intracelulares produzidos em resposta a diversos tipos de lesões espontâneas no DNA, e indivíduos com defeitos nessa proteína, portanto, sofrem dos efeitos causados pelas lesões não-corrigidas.

Resumo

A informação genética só pode ser armazenada de modo estável nas sequências de DNA devido a um grande grupo de enzimas de reparo do DNA que, continuamente, verificam o DNA e substituem qualquer nucleotídeo danificado. A maioria dos tipos de reparo do DNA depende da presença de uma cópia separada da informação genética em cada uma das duas fitas da dupla-hélice de DNA. Uma lesão acidental em uma fita pode, portanto, ser removida por uma enzima de reparo, e uma fita correta é ressintetizada, tendo como referência a informação contida na fita não-danificada.

A maior parte das lesões nas bases de DNA é removida por uma das duas principais vias de reparo. No reparo por excisão de bases, a base alterada é removida pela enzima DNA-glicosilase, seguida pela excisão do açúcar-fosfato resultante. No reparo por excisão de nucleotídeos, uma pequena porção da fita de DNA que flanqueia a lesão é removida da dupla-hélice como um oligonucleotídeo. Em ambos os casos, o intervalo deixado na hélice de DNA é preenchido pela ação sequencial de DNA-polimerase e DNA-ligase, utilizando a fita de DNA não-danificada como molde. Alguns tipos de lesão no DNA podem ser reparados por uma estratégia diferente – a reversão química direta da lesão – realizada por proteínas de reparo especializadas.

Outros sistemas críticos de reparo – com base nos mecanismos de junção de extremidades não-homólogas e recombinação homóloga – unem quebras acidentais nas duas fitas que ocorrem na hélice de DNA. Na maioria das células, um nível elevado de lesões no DNA provoca um retardo no ciclo celular pelos pontos de verificação, que asseguram que o DNA danificado seja corrigido antes da divisão celular.

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Nas duas seções anteriores, abordamos os mecanismos que permitem que as sequências de DNA das células sejam mantidas de geração a geração com pouquíssimas alterações. Nesta parte do capítulo, discutiremos um desses mecanismos, a *recombinação homóloga*. Embora seja essencial para o reparo preciso de quebras na fita dupla (ver Figura 5-51B) e outros tipos de lesões no DNA, a recombinação homóloga, como veremos, também pode rearranjar sequências de DNA. Esses rearranjos normalmente alteram as versões específicas de genes presentes no genoma de um indivíduo, assim como o momento e o nível de sua expressão. Em uma população, o tipo de variação genética produzida por esse e por outros tipos de recombinação genética é fundamental para promover a evolução dos organismos em resposta a alterações ambientais.

A recombinação homóloga tem muitas aplicações na célula

Na **recombinação homóloga** (também conhecida como *recombinação geral*), a permuta genética ocorre entre um par de sequências de DNA homólogas, isto é, sequências de DNA com sequências de nucleotídeos iguais ou similares. A recombinação homóloga tem muitas aplicações na célula, mas três são de fundamental importância. A aplicação mais amplamente empregada é no reparo preciso de quebras na fita dupla, como mencionado na seção anterior (Figura 5-51B). Embora as quebras na fita dupla resultem da ação da radiação e de agentes químicos reativos, diversas têm origem nas forquilhas de replicação de DNA que são estacionárias ou quebradas. A aplicação da recombinação homóloga é essencial para cada célula proliferativa, uma vez que quase toda rodada de replicação de DNA produz acidentes.

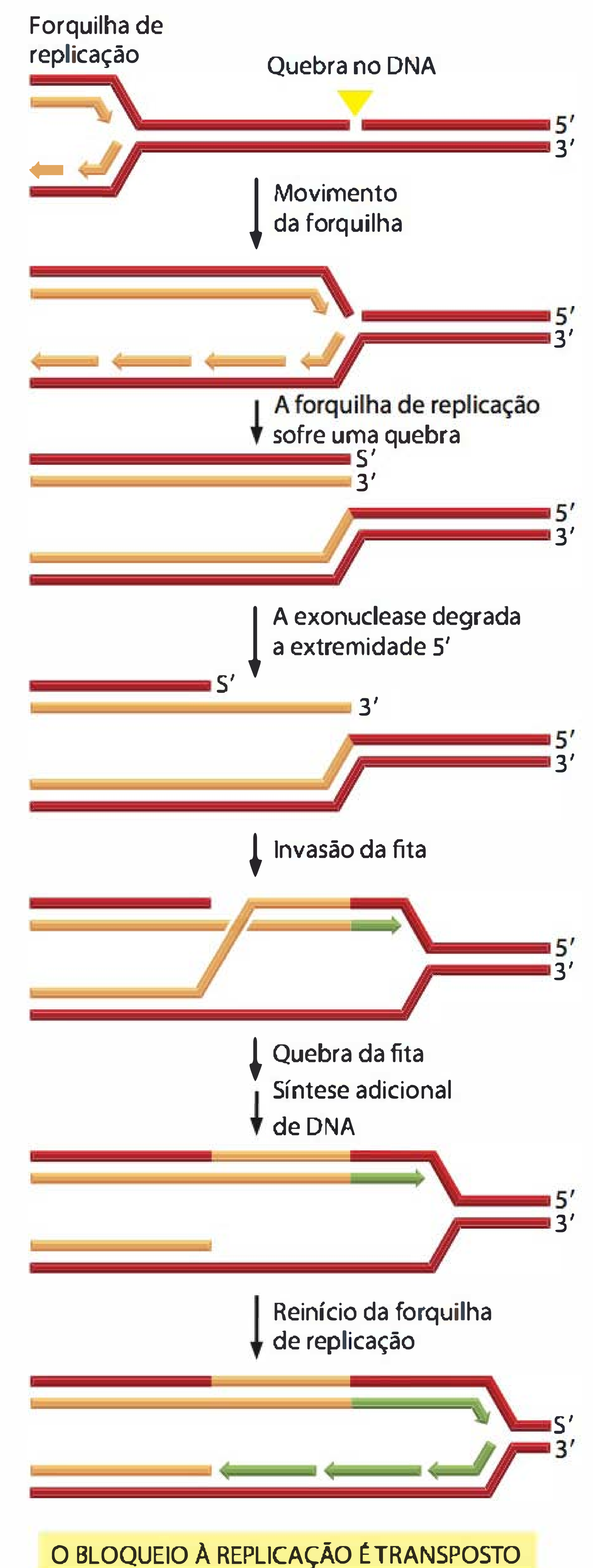


Figura 5-53 Reparo por recombinação homóloga de uma forquilha de replicação quebrada. Quando uma forquilha de replicação em movimento encontra uma quebra de fita simples, ela irá parar, mas pode ser corrigida por recombinação homóloga. Como mostrado, a invasão inicial de fitas requer uma extremidade 3′ livre gerada por uma nuclease que degrada a extremidade 5′ da fita complementar. A recombinação então inicia com a invasão de fitas, como descrito em detalhes nas figuras subsequentes. As setas representam as extremidades 3′ das fitas. Fitas em verde representam a síntese de DNA novo que ocorre após a quebra da forquilha de replicação. Observe que, neste mecanismo, a forquilha passa sobre o sítio que foi clivado no molde original, usando uma cópia não-danificada do sítio como molde. (Adaptada de M. M. Cox. *Proc. Natl Acad. Sci.* U.S.A., 98:8173-8180, 2001. Com permissão da Nacional Academy of Sciences.)

Vários tipos de eventos podem provocar a quebra da forquilha durante o processo de replicação. Consideremos apenas um exemplo: uma quebra de fita simples ou um espaço na hélice original de DNA logo à frente da forquilha de replicação. Quando a forquilha encontra essa lesão, ela se quebra – resultando em um cromossomo-filho intacto e um quebrado. Contudo, uma série de reações de recombinação, que podem ser iniciadas por um processo de *invasão de fitas* que promove a síntese de DNA pela DNA-polimerase, pode corrigir corretamente o cromossomo quebrado (**Figura 5-53**).

Além disso, a recombinação homóloga é utilizada para a troca de segmentos de informação genética entre dois cromossomos diferentes, criando novas combinações de sequências de DNA em cada cromossomo. O benefício evolutivo potencial desse tipo de rearranjo de genes é que gera uma diversidade de combinações de genes nova, talvez benéfica. A recombinação homóloga também desempenha um papel mecânico importante, assegurando a correta segregação cromossômica durante a meiose de fungos, plantas e animais. Nesta seção, consideraremos apenas as aplicações universais da recombinação homóloga, aquelas em reparo de lesões no DNA e na mediação da troca genética. Sua aplicação mecânica especializada na segregação cromossômica durante a meiose será discutida no Capítulo 21.

A recombinação homóloga possui características comuns a todas as células

A compreensão atual da recombinação homóloga como um mecanismo crítico no reparo do DNA em todas as células evoluiu lentamente desde sua descoberta inicial como componente-chave no processo especializado da meiose de plantas e animais. O reconhecimento subsequente de que a recombinação homóloga também ocorre em organismos unicelulares menos complexos tornou-a muito mais amena à análise molecular. Assim, muito do que se sabe sobre a bioquímica da recombinação genética foi originalmente derivado de estudos realizados em bactérias, especialmente *E. coli* e seus vírus, bem como de experimentos em eucariotos simples como as leveduras. No caso desses organismos com tempos de geração curtos e genomas relativamente pequenos, foi possível isolar um grande número de mutantes com defeitos nos processos de recombinação. A proteína alterada em cada mutante foi identificada e sua bioquímica foi estudada. Mais recentemente, proteínas homólogas a essas proteínas foram descobertas e extensivamente caracterizadas em *Drosophila*, camundongos e humanos.

A recombinação homóloga é dirigida pelas interações de pareamento de bases do DNA

O princípio da recombinação homóloga é que ela ocorre apenas entre duas duplexes de DNA com extensas regiões de sequências similares (homologia). Não é de surpreender, portanto, que o pareamento de bases seja responsável por esse requerimento, e as duas duplexes de DNA que sofrem a recombinação homóloga "provam" da sequência uma da outra pelo extensivo pareamento de bases entre a fita simples de uma hélice de DNA e a fita simples

complementar da outra. O pareamento não precisa ser perfeito, mas deve ser muito próximo para que a recombinação homóloga ocorra.

Na sua forma mais simples, esse tipo de interação de pareamento de bases pode ser mimetizado em tubo de ensaio, permitindo-se que uma dupla-hélice de DNA possa ser formada novamente a partir de suas fitas simples. Esse processo, chamado de *renaturação do DNA*, ou **hibridização**, ocorre quando uma colisão rara e ao acaso justapõe sequências de nucleotídeos complementares em duas fitas simples complementares, possibilitando a formação de um pequeno segmento de dupla-hélice entre eles. Essa etapa de nucleação da hélice relativamente lenta é seguida de uma etapa rápida de pareamento (como o fechamento de um zíper), à medida que a região de fita dupla é estendida para maximizar o número de interações de pareamento entre as bases (**Figura 5-54**).

A formação de uma dupla-hélice nova desse tipo requer que as fitas participantes do anelamento tenham uma conformação aberta e não-dobrada. Por essa razão, as reações de hibridização *in vitro* são realizadas a altas temperaturas, ou na presença de um solvente orgânico, como a formamida; essas condições "rompem" as pequenas hélices em forma de grampo resultantes das interações de pareamento que ocorrem em uma fita simples que se dobra sobre si mesma. A maioria das células não pode sobreviver nessas condições severas e utiliza uma proteína SSB (ver p. 273) para romper as pequenas hélices (grampos) e auxiliar o anelamento das duas fitas simples complementares. As proteínas SSB essenciais para a replicação do DNA (como descrito anteriormente) e para a recombinação homóloga; elas ligam-se fortemente e de modo cooperativo à cadeia de açúcar-fosfato de todas as regiões de DNA de fita simples, mantendo-as na conformação estendida e com as bases expostas (ver Figuras 5-16 e 5-17). Nessa conformação estendida, uma fita de DNA pode formar par de maneira eficiente tanto com uma molécula de trifosfato de nucleosídeo (na replicação do DNA), como com um segmento complementar de outra fita simples de DNA (como no processo de recombinação geral).

A hibridização do DNA produz uma região de hélice de DNA formada por duas fitas originalmente oriundas de duas moléculas de DNA diferentes. A formação de uma região assim é chamada de *heterodúplex*, sendo uma etapa essencial em qualquer processo de recombinação homóloga. Como a grande maioria do DNA dentro da célula está na forma de fita dupla, o modelo do "tubo de ensaio" para a hibridização de DNA não explica claramente como esse processo ocorre na célula. De fato, mecanismos especiais são necessários para iniciar a recombinação homóloga entre duas moléculas de DNA de fita dupla com sequências nucleotídicas semelhantes. Centrais a esses mecanismos estão as proteínas que permitem que a hibridização do DNA ocorra dentro da célula pela *invasão de fitas* – o pareamento de uma região de fita simples de DNA com uma fita complementar em uma dupla-hélice de DNA diferente – como descreveremos a seguir.

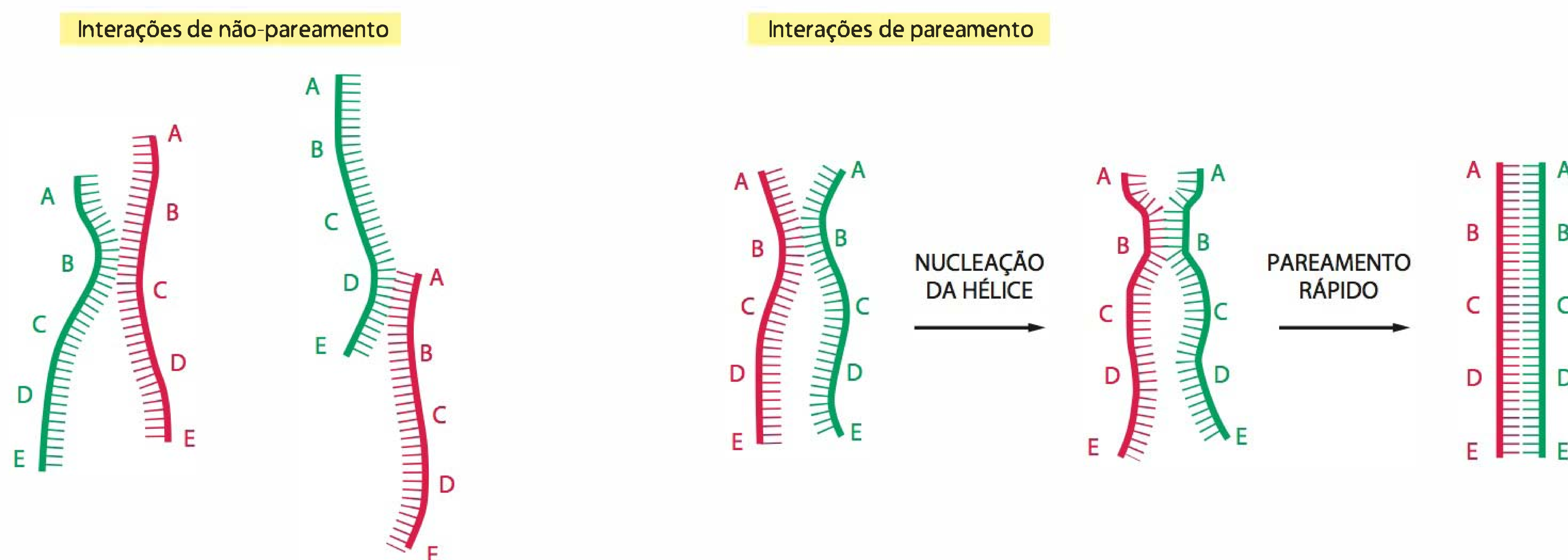


Figura 5-54 Hibridização do DNA. As duplas-hélices de DNA se refazem a partir das fitas separadas em uma reação que depende da colisão aleatória entre duas fitas complementares. A maioria dessas colisões não é produtiva, como mostrado à esquerda, mas algumas poucas resultam em uma pequena região em que os pares de bases complementares são formados (nucleação da hélice). Um rápido pareamento leva, então, à formação de uma dupla-hélice completa. Pelo processo de tentativa e erro, uma fita de DNA encontra sua parceira complementar mesmo entre milhões de fitas não-complementares.

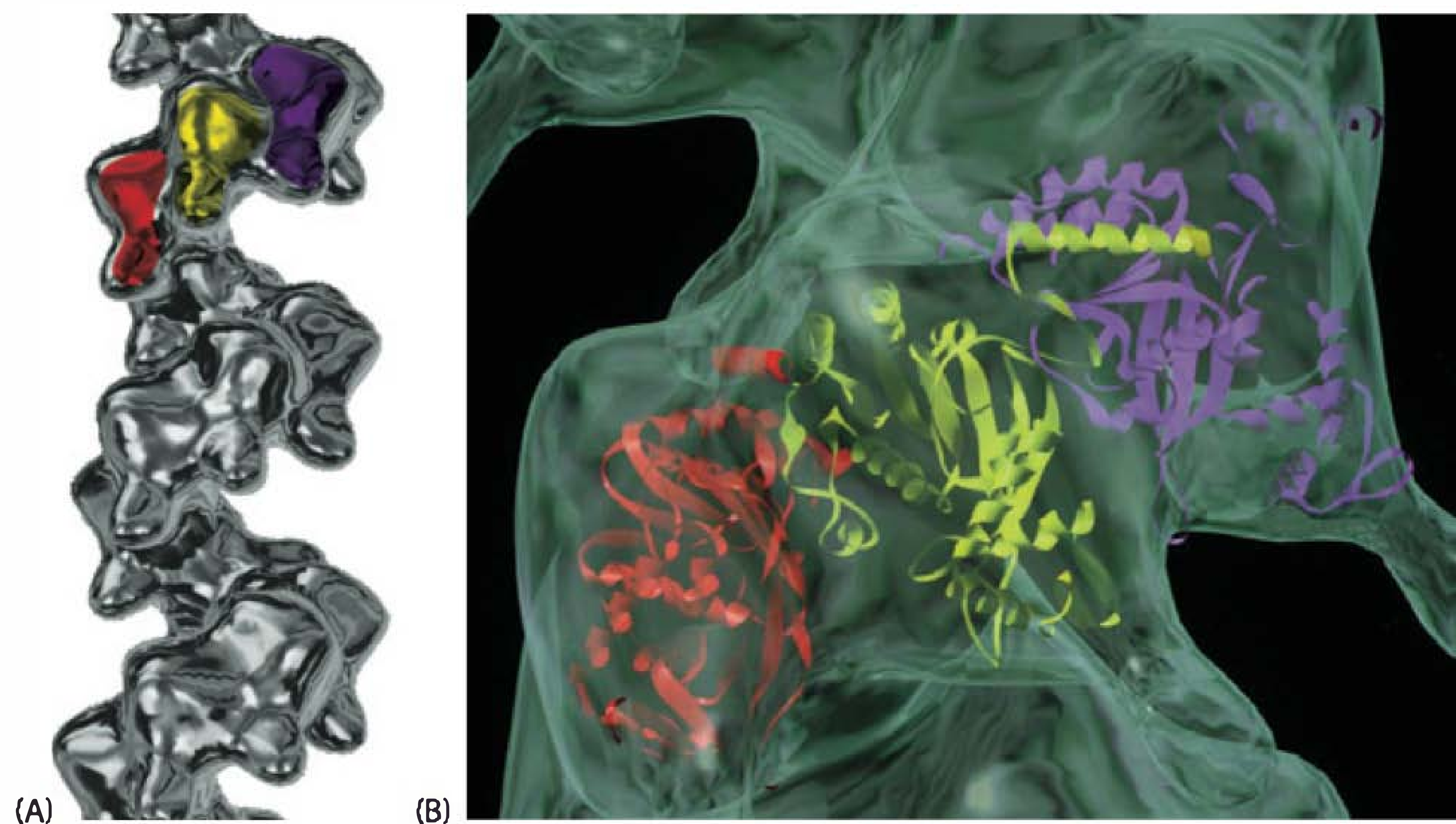


Figura 5-55 Estrutura das proteínas RecA e Rad51 formando filamentos DNA-proteína. (A) Proteína Rad51, homóloga humana da RecA bacteriana, é ligada a uma fita simples de DNA. Três monômeros consecutivos desse filamento helicoidal estão coloridos. (B) Uma pequena porção do filamento de RecA, com a estrutura tridimensional da proteína ajustada à imagem do filamento, determinada por microscopia eletrônica. Existem cerca de seis monômeros de RecA por volta da hélice, em um total de 18 nucleotídeos de fita simples que são distendidos pela proteína. O caminho exato do DNA dessa estrutura não é conhecido. (A, cortesia de Edward Egelman; B, de X. Yu et al., *J. Mol. Biol.* 283:985-992, 1988. Com permissão da Academic Press.)

A proteína RecA e suas homólogas permitem que uma fita simples de DNA faça par com uma região homóloga de uma dupla-hélice de DNA

Como extensas interações de pareamento de bases não podem ocorrer entre duas duplas-hélices de DNA intactas, a hibridização de DNA, essencial à recombinação homóloga, só pode ser iniciada depois que uma fita de DNA da dupla-hélice é liberada do pareamento à sua fita complementar, deixando os seus nucleotídeos disponíveis para formar pares com uma segunda hélice de DNA. No exemplo ilustrado na Figura 5-53, essa fita simples livre é formada quando a forquilha de replicação encontra uma quebra no DNA, dissocia-se (criando uma nova extremidade de fita dupla) e uma exonuclease degrada a extremidade 5′ na quebra, produzindo uma fita simples sem pareamento na extremidade 3′. Em outras aplicações da recombinação homóloga, as regiões de fita simples são formadas de modo semelhante, discutidas mais adiante.

Várias proteínas especializadas atuam sobre a fita simples na extremidade 3′ do DNA, direcionando sua invasão a uma dúplex homóloga de DNA. Em especial, a **proteína RecA**, sua denominação em *E. coli,* e sua homóloga **Rad51**, sua denominação em praticamente todos os organismos eucarióticos (**Figura 5-55**), têm função central na recombinação. Da mesma forma que uma proteína SSB, as proteínas do tipo da RecA ligam-se fortemente e em extensos grupos cooperativos a segmentos de DNA de fita simples, formando um filamento nucleoproteico. Como cada monômero de RecA possui mais de um sítio de ligação ao DNA, um filamento de RecA pode interagir com uma fita simples e com uma dupla-hélice, mantendo-as juntas (**Figura 5-56**). Esse arranjo permite que a RecA catalise a reação de *sinapse de DNA* de várias etapas entre uma dupla-hélice e uma região de fita simples de DNA homóloga. Na primeira etapa, a proteína RecA entrelaça a fita simples de DNA e a dúplex de DNA de maneira independente da sequência. Na próxima etapa, a fita simples de DNA "busca" sequências homólogas na dúplex. Ainda não está claro como essa busca e o reconhecimento ocorrem, mas parece envolver um pareamento transitório formado entre a fita simples e as bases que se projetam para fora da dúplex de DNA (ver Figura 5-49). Uma vez que a sequência homóloga tenha sido localizada, ocorre uma invasão de fitas: a fita simples

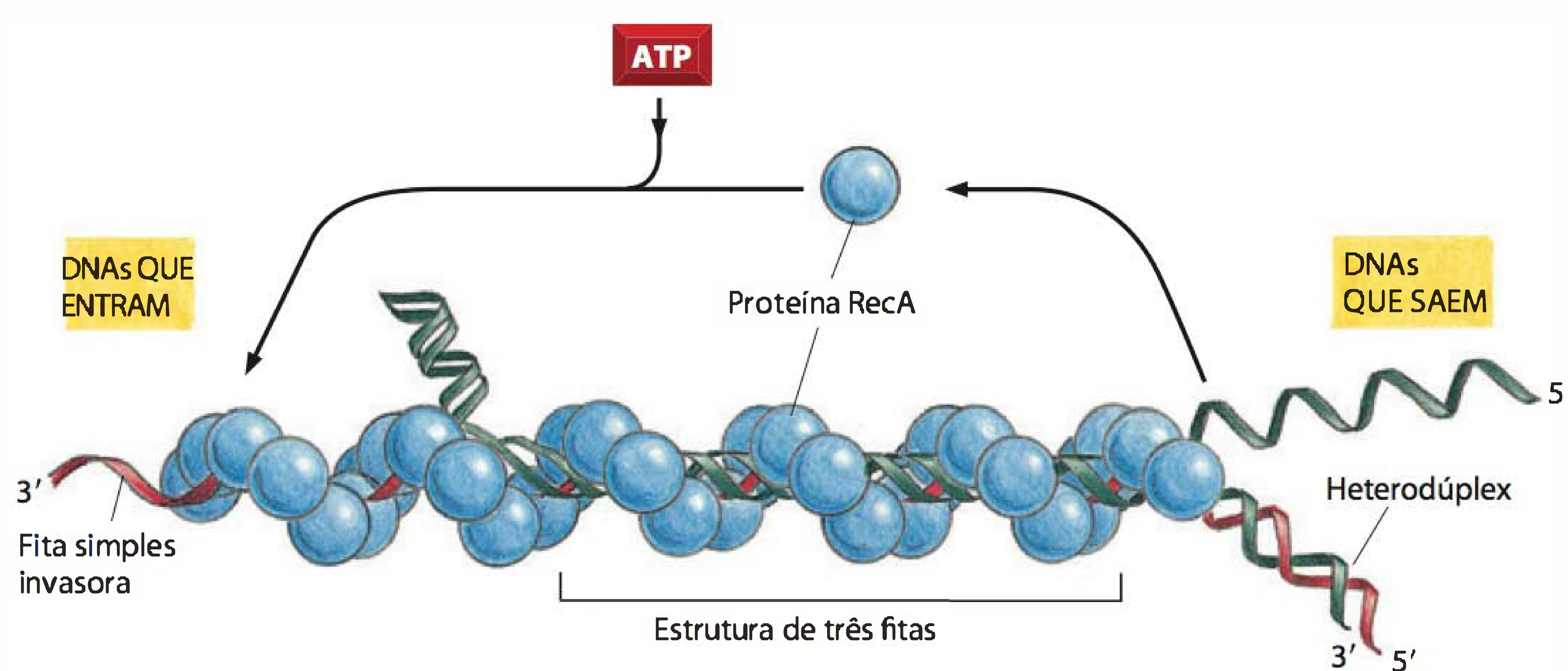


Figura 5-56 Sinapse de DNA catalisada pela proteína RecA. Experimentos *in vitro* mostram que diversos tipos de complexos são formados entre uma fita simples de DNA (em *vermelho*) envolta pela proteína RecA (em *azul*) e uma dupla-hélice de DNA (em *verde*). Primeiramente, há a formação de um complexo não-pareado, que é convertido a uma "molécula combinada" tão logo a sequência de homologia seja encontrada. Esse complexo é dinâmico e projeta uma heterodúplex de DNA (uma fita em *verde*, outra em *vermelho*) e uma fita simples deslocada da hélice original (em *verde*). Assim, a estrutura representada neste diagrama migra para a esquerda, "rebobinando" os "DNAs que entram" enquanto produz os "DNAs que saem". (Adaptada de S. C. West, *Annu. Rev. Biochem.* 61:603-640, 1992. Com permissão da Annual Reviews.)

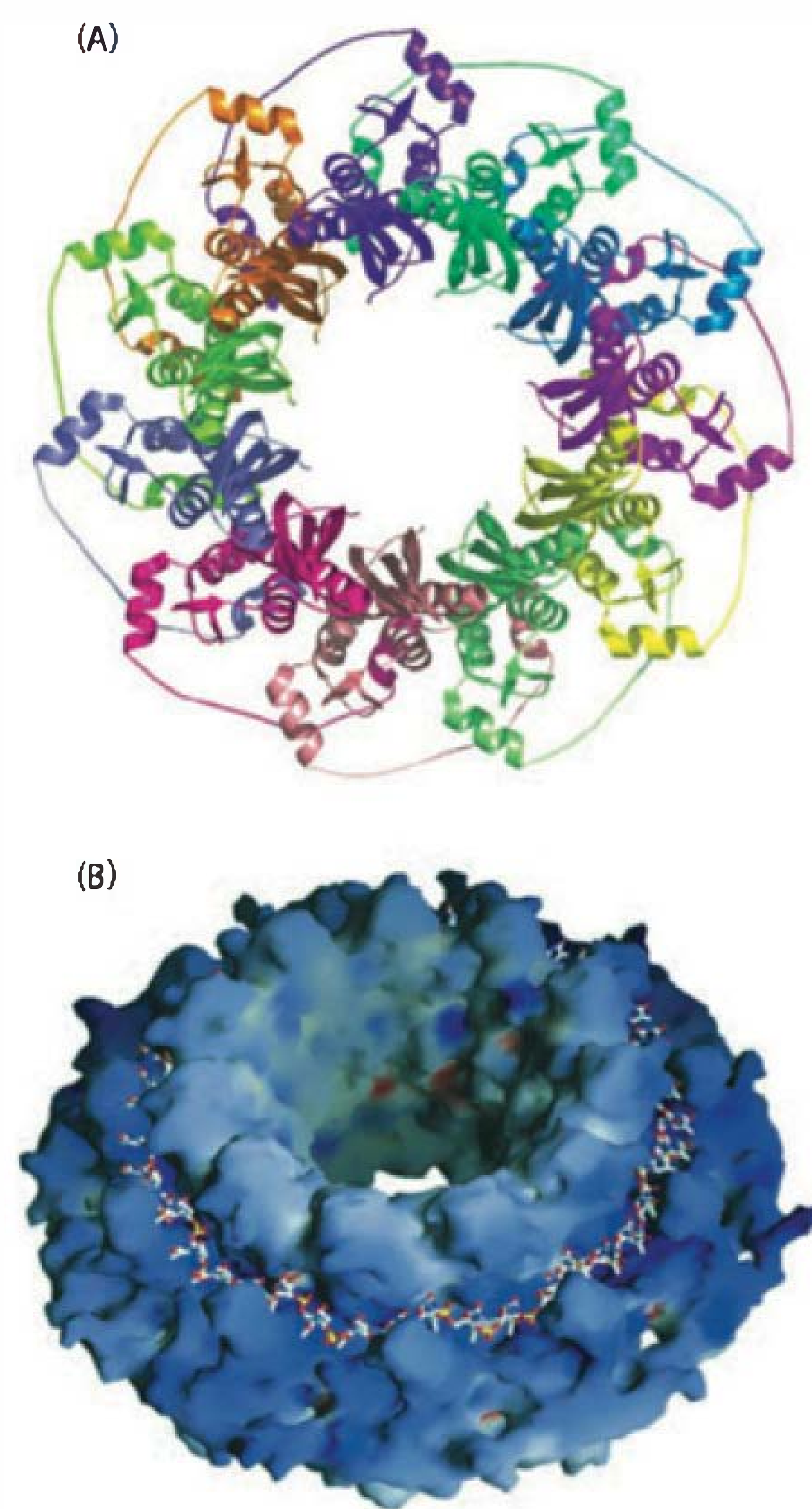


Figura 5-57 Estrutura de uma porção da proteína Rad52. (A) Esta molécula com forma de rosca é composta por 11 subunidades. (B) O DNA de fita simples foi modelado dentro do sulco ao longo da superfície da proteína. As bases do DNA estão expostas em uma configuração que parece promover o anelamento das duas fitas simples complementares. (De M. R. Singleton et al., *Proc. NatlAcad. Sci.* U.S.A. 99:13492-13497, 2002. Com permissão da National Academy of Sciences.)

desloca uma das fitas da dúplex à medida que forma um pareamento de bases convencional com a outra fita. O resultado é uma **heterodúplex** – uma região de DNA de dupla-hélice formada pelo pareamento de duas fitas de DNA inicialmente pertencentes a duas moléculas de DNA diferentes (ver Figura 5-56).

A procura pela homologia e a invasão da fita simples na dúplex de DNA são as reações críticas que iniciam a recombinação homóloga. Elas necessitam, além de proteínas tipo RecA e proteínas de SSB, de diversas proteínas com funções especializadas. Por exemplo, a Rad52 desloca as proteínas de fitas simples permitindo a ligação das moléculas de Rad51, promovendo também o anelamento das fitas simples complementares (**Figura 5-57**).

A pequena região de heterodúplexformada, onde a fita simples invadiu e formou par de bases com sua fita complementar na dúplex de DNA, em geral bastante aumentada por um processo chamado de migração da ramificação, discutido a seguir.

A migração da ramificação pode aumentar as regiões de heterodúplex ou liberar o DNA recém-sintetizado na forma de fita simples

Uma vez que a invasão de fitas ocorreu, o ponto de troca de fitas ("ponto de ramificação") pode deslocar-se pelo processo denominado *migração da ramificação* (**Figura 5-58**). Nessa reação, uma região não-pareada de uma fita simples desloca uma região pareada da outra fita simples, movendo o ponto de ramificação sem alterar o número total de pares de bases de DNA. Embora a migração possa ocorrer espontaneamente, ela ocorre igualmente nas duas direções, de modo que resulta em pouca progressão da ramificação (Figura 5-58A). DNA-helicases especializadas, no entanto, catalisam a migração unidirecional, produzindo prontamente uma região de heterodúplex de DNA com milhares de pares de bases (Figura 5-58B).

Em uma reação relacionada, a síntese de DNA catalisada pela DNA-polimerase pode promover um processo de migração da ramificação unidirecional, no qual o DNA recém-sintetizado é deslocado como uma fita simples, semelhante ao modo como uma cadeia de RNA recém-sintetizada é liberada pela RNA-polimerase. Essa forma de síntese de DNA parece ser utilizada em vários processos de recombinação homóloga, incluindo os processos de reparo de quebra da fita dupla, descrito a seguir.

A recombinação homóloga pode reparar corretamente quebras na fita dupla de DNA

Discutimos anteriormente neste capítulo os graves problemas criados por quebras na fita dupla de DNA, e vimos que as células podem corrigir essas quebras de duas maneiras. A junção de extremidades não-homólogas (ver Figura 5-51) ocorre sem um molde e produz

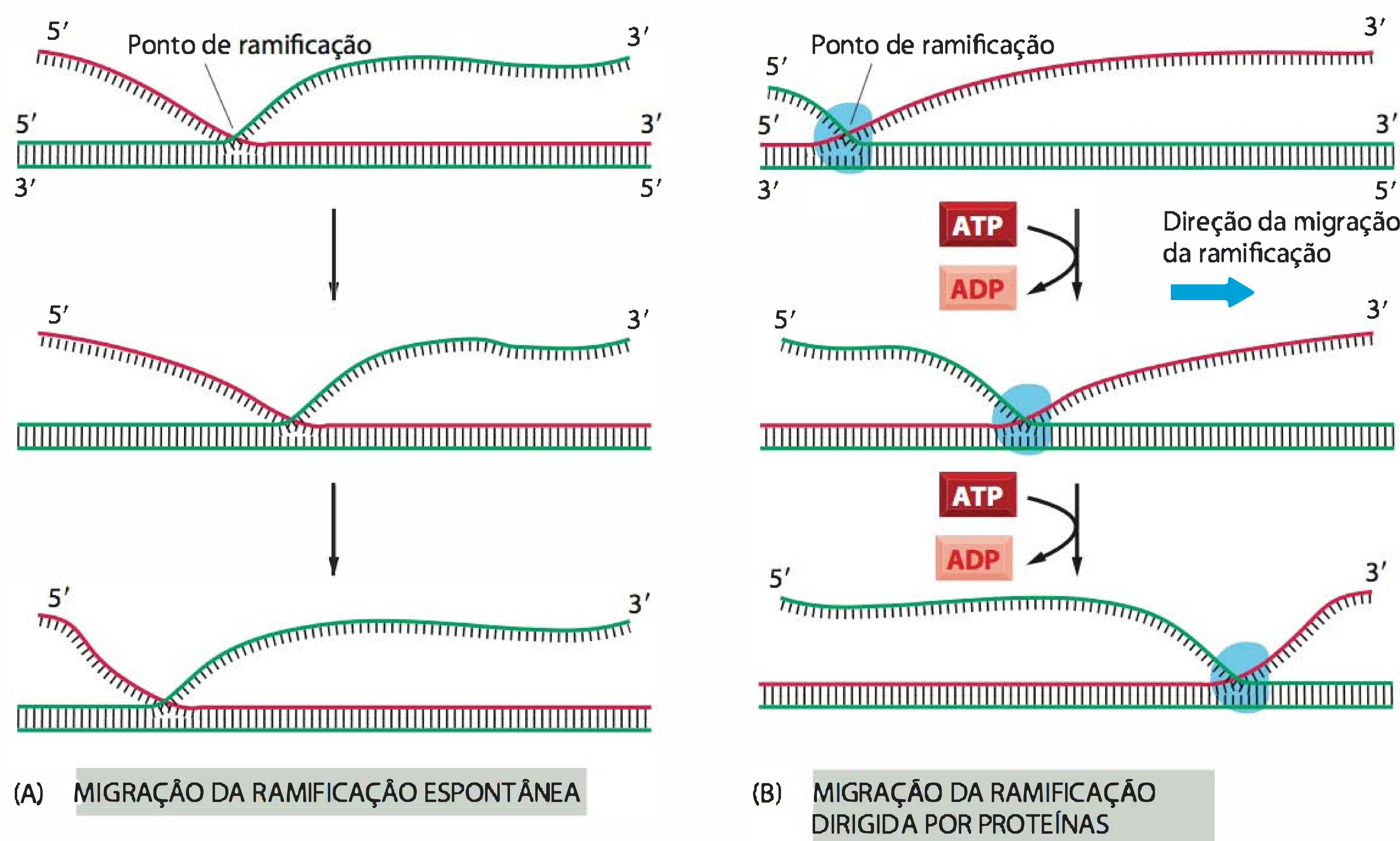


Figura 5-58 Dois tipos de migração de ramificação de DNA observados *in vitro*. (A) A migração por ramificação espontânea é um tipo de processo aleatório, em ambos os sentidos, portanto resulta em um progresso muito pequeno para longas distâncias. (B) A migração da ramificação direcionada por proteínas necessita de energia, e desloca o ponto de ramificação a uma velocidade uniforme e em apenas uma direção.

uma mutação no local da junção das duplexes de DNA. Esse processo pode, acidentalmente, unir dois segmentos de dois cromossomos diferentes, gerando translocações cromossômicas, muitas das quais apresentam sérias consequências à célula. Em contraste à junção de extremidades não-homólogas, a recombinação homóloga repara as quebras na fita dupla de DNA de modo preciso, sem qualquer perda ou alteração nucleotídica no local do reparo (**Figura 5-59**). Na maioria das células, o reparo de quebra de fita dupla mediado pela recombinação somente ocorre após a replicação do DNA da célula, quando uma dúplex-filha pode servir de molde para o reparo da outra.

A recombinação homóloga também pode ser utilizada no reparo de vários outros tipos de lesões no DNA, sendo talvez o mecanismo de reparo do DNA mais versátil disponível na célula; a natureza "universal" do reparo por recombinação provavelmente explica por que esses mecanismos e as proteínas que o realizam foram conservados em praticamente todas as células na Terra.

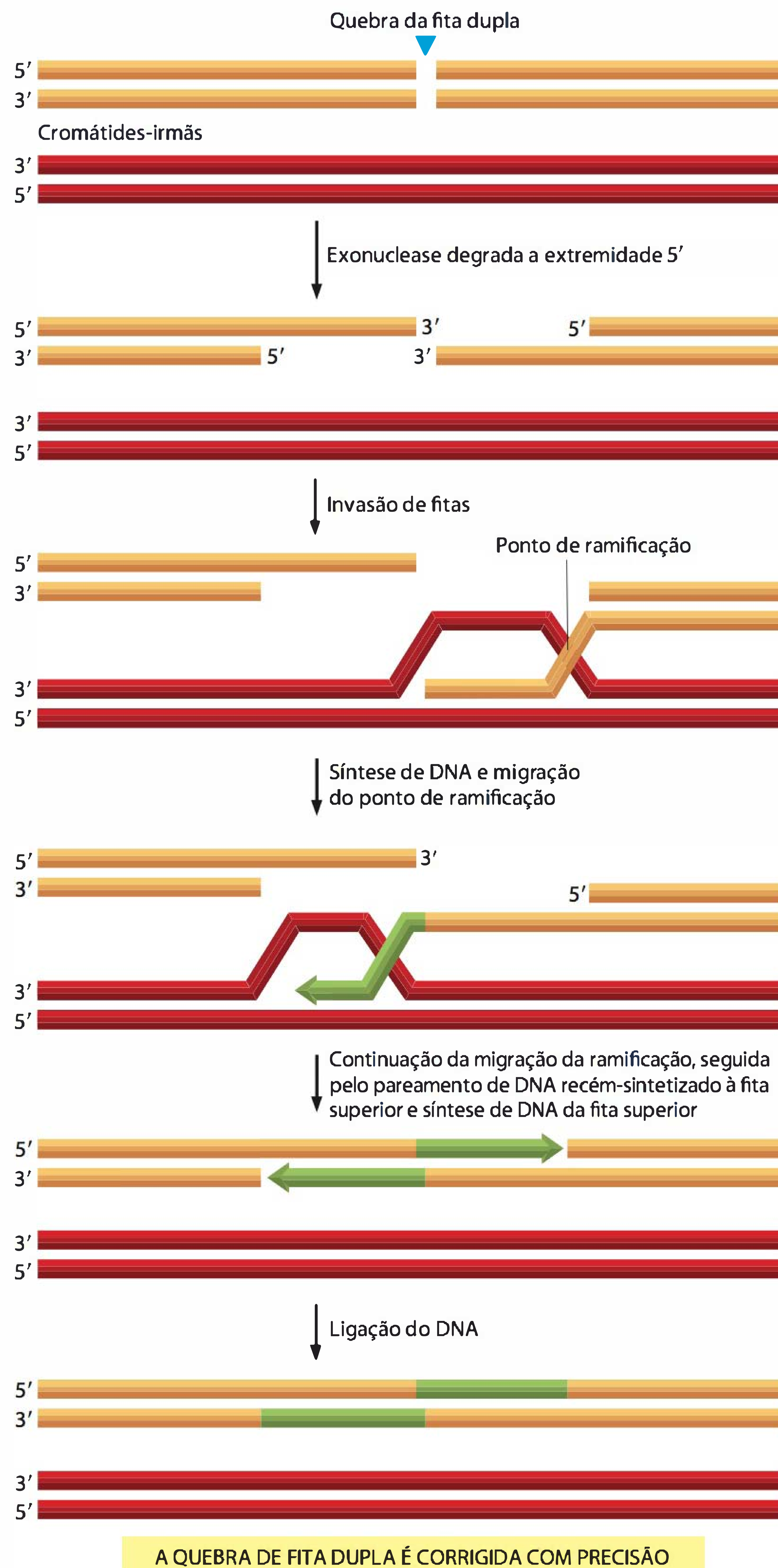


Figura 5-59 Mecanismo de reparo de quebras de fita dupla por recombinação homóloga. Este é o método preferido para o reparo de quebras na fita dupla de DNA que ocorre logo após a replicação do DNA enquanto as duas cromátides-irmãs ainda estão unidas. Esta reação utiliza muitas das mesmas proteínas mostradas na Figura 5-53, ocorrendo pelas mesmas etapas intermediárias. Geralmente, a recombinação homóloga pode ser vista como uma série flexível de reações, com a via exata diferindo de um caso para outro. Por exemplo, o comprimento da "correção" varia bastante dependendo da extensão do processamento da extremidade 5′, da migração da ramificação e da síntese de DNA novo. (Ver M. McVey, J. LaRocque, M. D. Adams e J. Sekelsky, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:15694-15699, 2004.)

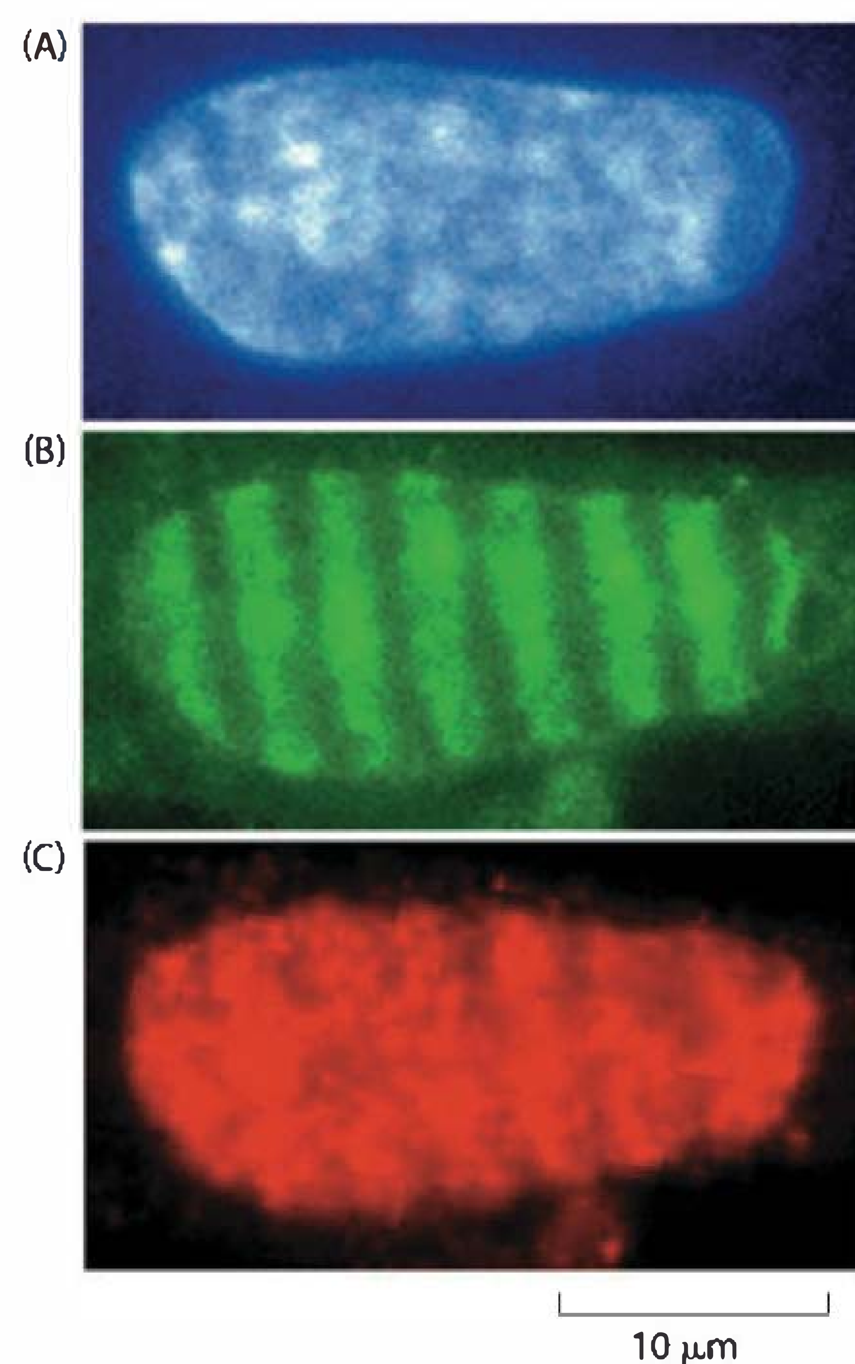


Figura 5-60 Experimento que demonstra a rápida localização das proteínas de reparo às quebras na fita dupla de DNA. Fibroblastos humanos foram irradiados por raios X para produzir as quebras. Antes de o raio X atingir as células, elas foram passadas por uma grade de microscópio com "barras" que absorvem raios X, espaçadas em 1 μm. Isso produziu um padrão de listras de lesões no DNA, permitindo a comparação entre DNA danificado e não-danificado no mesmo núcleo. (A) DNA total em um núcleo de fibroblasto corado com DAPI. (B) Sítios de síntese de DNA novo indicados pela incorporação de BudR (um análogo da timina) e subsequentemente corados com anticorpos para BudR acoplados a FITC. (C) Localização do complexo Mre11 ao DNA danificado visualizado por vermelho-Texas, complexado a anticorpos contra a subunidade Mre11. Foi proposto que o complexo Mre11 inicialmente reconhece quebras da fita dupla na célula e então mobiliza proteínas adicionais para corrigir as quebras pela recombinação homóloga (ver Figura 5-59). (A), (B) e (C) foram processados 30 minutos após irradiação. (De B. E. Nelms et al., *Science* 280:590-592, 1998. Com permissão de AAAS.)

As células controlam cuidadosamente o uso da recombinação homóloga no reparo do DNA

Embora a recombinação homóloga resolva corretamente o problema do reparo preciso de quebras na fita dupla de DNA e outros tipos de danos no DNA, ela apresenta alguns perigos à célula e deve, portanto, ser fortemente regulada. Por exemplo, a sequência de DNA em um cromossomo homólogo pode tornar-se não-funcional pelo "reparo" pelo uso do outro cromossomo homólogo como molde. A *perda da heterozigose*, nesse caso, frequentemente é uma etapa crítica no desenvolvimento de cânceres (discutido no Capítulo 20), e as células possuem mecanismos não muito conhecidos para minimizá-la. Embora seja relativamente rara em células normais, a perda da heterozigose pode ser entendida como um efeito colateral indesejável da versatilidade da recombinação homóloga.

Um outro tipo de controle no reparo por recombinação, encontrado em quase todas as células eucarióticas, evita que o "reparo" ocorra na ausência de uma lesão no DNA. As enzimas que catalisam o reparo por recombinação normalmente são sintetizadas em altos níveis nos eucariotos e estão dispersas pelo núcleo. Em resposta a danos no DNA, essas enzimas rapidamente convergem aos sítios danificados e formam "fábricas de reparo", nas quais parece ocorrer o reparo de várias lesões (**Figura 5-60**). Essa rápida mobilização das proteínas de reparo à lesão é fortemente controlada pela célula e requer uma série de proteínas adicionais. Duas delas, as proteínas *Brca1* e *Brca2*, foram inicialmente descobertas porque mutações nos seus genes causavam um aumento na frequência de câncer de mama. Enquanto a remoção de uma proteína essencial à recombinação homóloga (como a proteína Rad51 humana) provoca a morte da célula, uma alteração em uma proteína acessória pode levar ao reparo ineficiente. O subsequente acúmulo de DNA danificado pode originar o câncer em uma pequena proporção de células. A proteína Brca2 liga-se à Rad51 evitando sua polimerização no DNA e mantendo-a, assim, na forma inativa. A Brca2 parece auxiliar na condução rápida da proteína Rad51 aos sítios da lesão e, uma vez no local, a libera em sua forma ativa.

No Capítulo 20, veremos que tanto a ocorrência de muitos como a de poucos eventos de recombinação homóloga podem causar câncer em humanos, o primeiro pelo aumento da perda de heterozigose e o último por um aumento da taxa de mutações causadas pelo reparo ineficiente do DNA. Claramente, um equilíbrio delicado foi desenvolvido durante a evolução, mantendo esse processo sob vigilância no DNA não-danificado e, ao mesmo tempo, permitindo que ele ocorra de forma eficiente e rápida nas lesões de DNA tão logo elas apareçam.

As bactérias também controlam cuidadosamente sua recombinação e outras enzimas de reparo, mas isso ocorre principalmente pelo controle dos níveis intracelulares. Em resposta a uma lesão severa, a *E. coli* aumenta a transcrição de diversas enzimas do reparo do DNA participantes da chamada *resposta SOS*. Elas incluem enzimas de reparo por excisão de nucleotídeos, DNA-polimerases menos específicas (com tendência a erros), que podem usar DNA danificado como molde, e proteínas que promovem a recombinação homóloga.

Estudos em bactérias mutantes deficientes em diferentes componentes da resposta SOS demonstram que as proteínas recém-sintetizadas possuem dois efeitos. Primeiro, como seria esperado, a indução das enzimas adicionais de reparo do DNA aumenta a sobrevivência celular após uma lesão no DNA. Segundo, várias das proteínas induzidas aumentam temporariamente a taxa de mutação pelo aumento do número de erros incorporados durante a cópia das sequências de DNA. Os erros são causados pela produção de DNA-polimerases de baixa fidelidade que podem utilizar um DNA-danificado como molde eficiente para a síntese de DNA. Enquanto esse reparo do DNA com tendência a erros pode ser prejudicial às células bacterianas individuais, provavelmente seja vantajoso no longo prazo por produzir uma enorme variabilidade genética na população bacteriana, o que aumenta a chance do surgimento de uma célula mais capacitada a sobreviver no ambiente alterado.

Junções de Holliday normalmente são formadas durante os eventos de recombinação homóloga

A recombinação homóloga pode ser vista como um grupo de reações relacionadas que usam a invasão de fita simples, a migração da ramificação e a síntese limitada de DNA para trocar DNA entre duas duplas-hélices com sequências nucleotídicas similares. Após discutir sua importância no reparo correto do DNA danificado, apresentamos agora a recombinação homóloga como um modo de originar moléculas de DNA com sequências novas. Durante esse processo, um intermediário de DNA especial normalmente é formado contendo quatro fitas de DNA compartilhadas pelas duas hélices. Nesse intermediário-chave, conhecido como **junção de Holliday**, ou *permuta de fitas cruzadas*, duas fitas de DNA alternam as complementares entre as duas duplas-hélices. A junção de Holliday pode adotar múltiplas conformações, e um conjunto de proteínas de recombinação especiais liga-se a ela, estabilizando o isômero simétrico aberto (**Figura 5-61**). Utilizando a energia da hidrólise do ATP para coordenar as duas reações de migração da ramificação, essas proteínas podem deslocar rapidamente o ponto de entrecruzamento no qual as duas hélices de DNA estão unidas ao longo das duas hélices (**Figura 5-62**).

A estrutura com quatro fitas de DNA produzida pela recombinação homóloga está apenas temporariamente presente nas células. Então, para regenerar as duas hélices de DNA separadas e finalizar a recombinação, as fitas ligadas às duas hélices na junção de Holliday devem ser clivadas, processo denominado *resolução*. Em bactérias, onde esse processo é mais bem compreendido, uma endonuclease especializada (chamada de RuvC) cliva a junção de Holliday deixando quebras no DNA que são facilmente ligadas pela DNA-ligase. Contudo, durante os processos meióticos que originam as células germinativas em eucariotos (esperma e óvulo em animais), os mecanismos de resolução parecem ser bem mais complexos.

Como discutiremos no Capítulo 21, ocorre uma recombinação homóloga extensa como parte do processo que divide os cromossomos para as células germinativas durante a meiose. Os dois processos, *crossing over* (entrecruzamento) e *conversão gênica* dos cromossomos, resultam desses eventos de recombinação, e produzem cromossomos híbridos que contêm informação genética dos homólogos materno e paterno (**Figura 5-63**A).

Veremos a seguir que, na meiose, o entrecruzamento e a conversão gênica são gerados pelos mecanismos de recombinação homóloga que lembram, na sua essência, os usados no reparo de quebras acidentais de fita dupla.

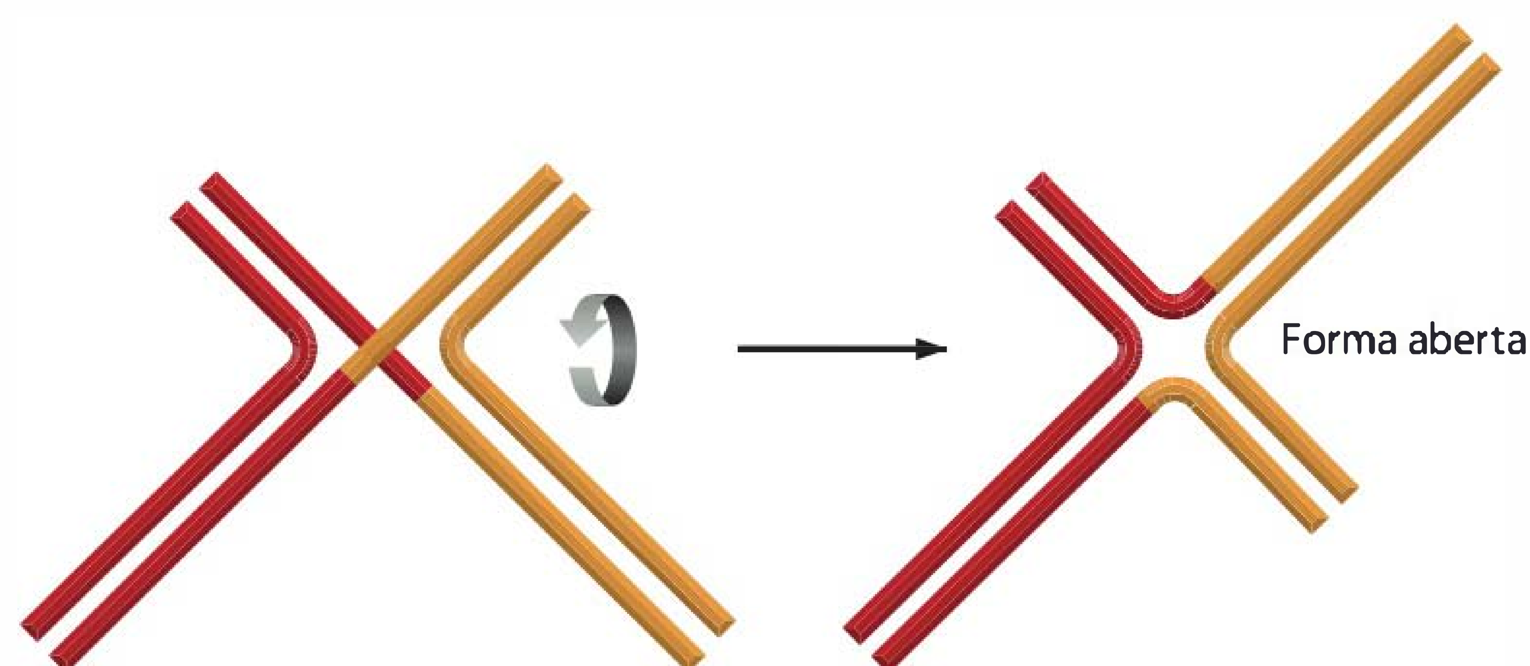


Figura 5-61 Junção de Holliday. A estrutura inicialmente formada é desenhada, normalmente, como duas fitas cruzadas (internas) e duas fitas não-cruzadas (externas). Uma isomerização da junção de Holliday produz uma estrutura aberta e simétrica. Esta é a forma ligada pelas proteínas RuvA e RuvB (ver Figura 5-62). A junção de Holliday recebeu este nome em função do cientista que primeiramente propôs sua formação.

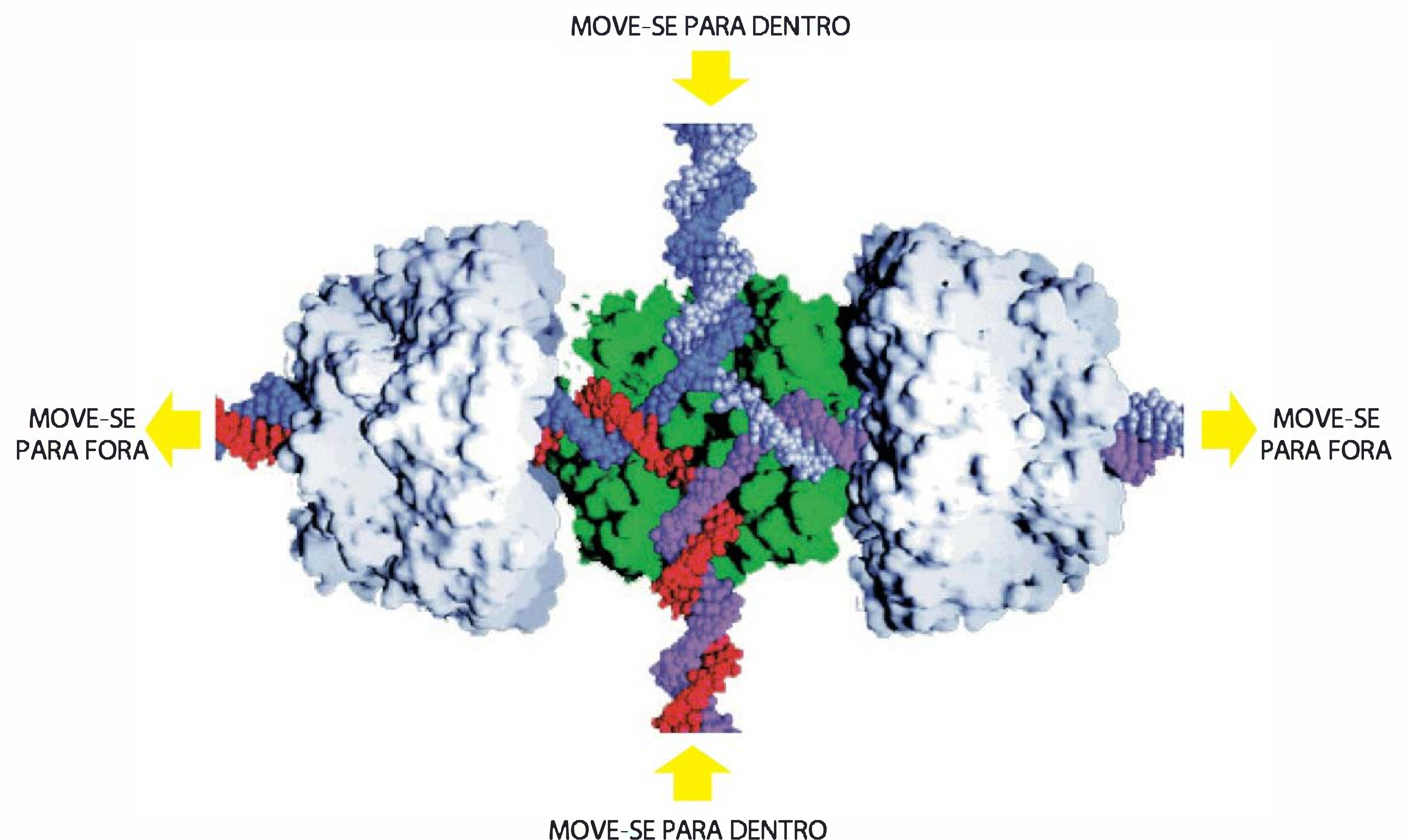


Figura 5-62 Dupla migração da ramificação catalisada por enzimas em uma junção de Holliday. Na *E. coli*, um tetrâmero da proteína RuvA (*verde*) e dois hexâmeros da proteína RuvB (*cinza-claro*) ligam-se à estrutura aberta da junção. A proteína RuvB, que assemelha-se às helicases hexaméricas usadas na replicação do DNA (Figura 5-15), utiliza a energia da hidrólise do ATP para deslocar o ponto de *entrecruzamento* rapidamente pelas hélices pareadas, estendendo a região de heterodúplex, como mostrado. (Imagem cortesia de P. Artymiuk; modificada de S. C. West, *Cell* 94:699-701, 1998. Com permissão de Elsevier.)

A recombinação meiótica é iniciada por quebras programadas na fita dupla

A recombinação homóloga na meiose inicia com um golpe ousado: uma proteína especializada (chamada de Spo11 em leveduras) quebra as duas fitas de uma dupla-hélice de DNA em um dos cromossomos recombinantes. Assim como a isomerase, a reação da Spo11 com o DNA resulta na ligação covalente da proteína ao DNA quebrado (ver Figura 5-22). Uma nuclease especializada processa rapidamente as extremidades ligadas pela Spo11, removendo a proteína e deixando extremidades 3′ não-pareadas. Nesse ponto, uma série de invasões de fitas e migrações da ramificação ocorre e, com frequência, produz um intermediário que consiste de duas junções de Holliday próximas, geralmente chamado de junção de Holliday dupla (**Figura 5-64**).

Embora algumas dessas proteínas que atuam no reparo da quebra de fita dupla sejam usadas na meiose, elas são dirigidas por diversas proteínas específicas da meiose para realizar suas funções de modo diferente, resultando na formação de diferentes intermediários de DNA (compare as Figuras 5-59 e 5-64). Outra diferença importante é que, na meiose, a recombinação ocorre preferencialmente entre os cromossomos homólogos maternos e paternos ao invés de entre duas duplexes idênticas recém-duplicadas que formam par no reparo da quebra de fita dupla.

Existem duas maneiras diferentes de resolver o intermediário da junção de Holliday dupla, ilustradas na Figura 5-64. Na resolução conceitualmente mais simples (sem o entrecruzamento), os pares originais das fitas entrecruzadas são clivados em ambas as junções de Holliday da mesma forma que são regeneradas as hélices originais que se separam entre si da forma inalterada exceto pela região entre as duas junções (ver Figura 5-64, à esquerda;

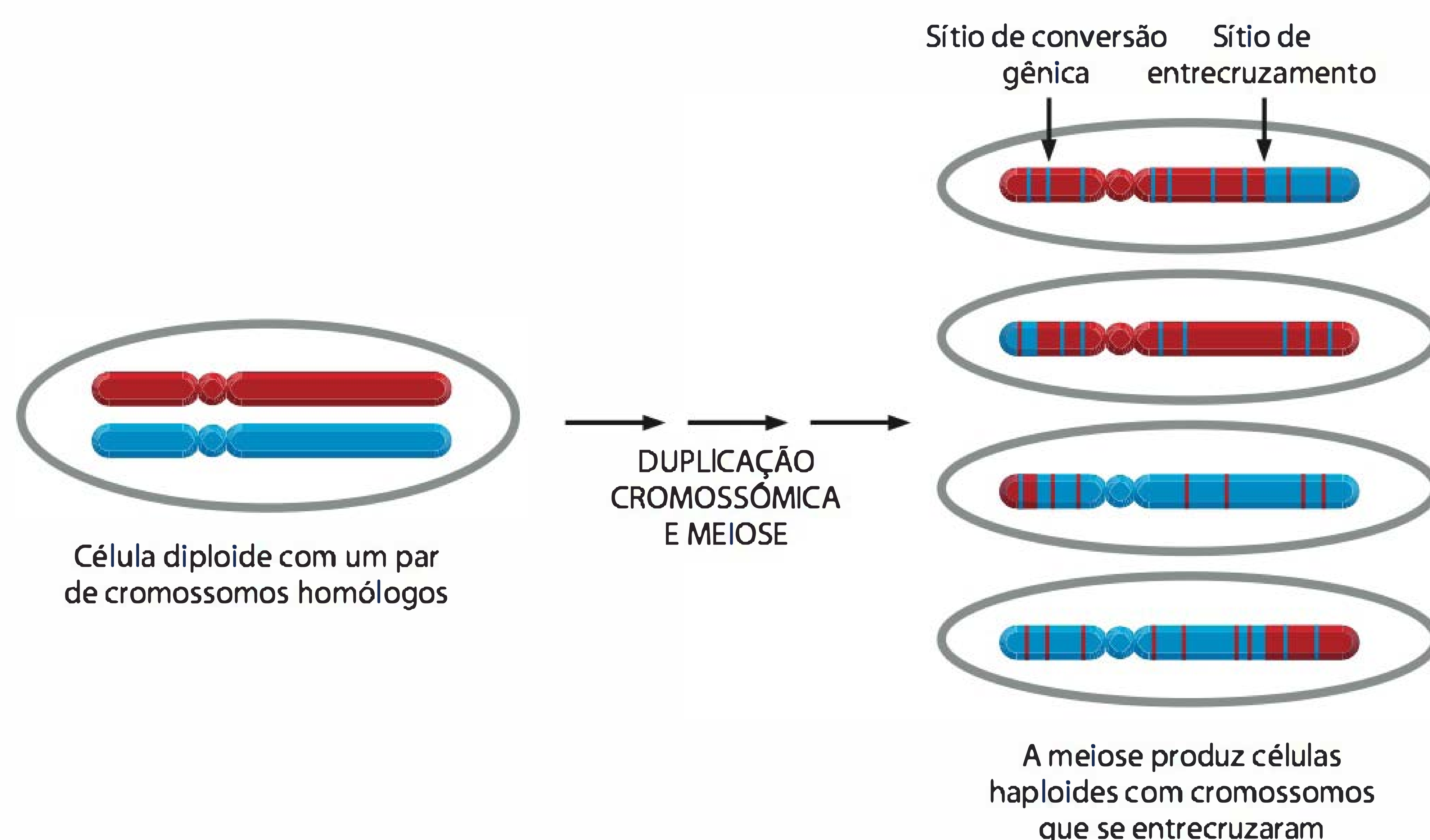


Figura 5-63 O entrecruzamento cromossômico ocorre na meiose. A meiose é o processo pelo qual uma célula diploide origina quatro células germinativas haploides, como descrito em detalhes no Capítulo 21. A meiose produz células germinativas nas quais a informação genética materna e a paterna (em *azul* e *vermelho*) foram rearranjadas por entrecruzamentos cromossômicos. Além disso, ocorrem diversas pequenas regiões de conversão gênica, como indicado.

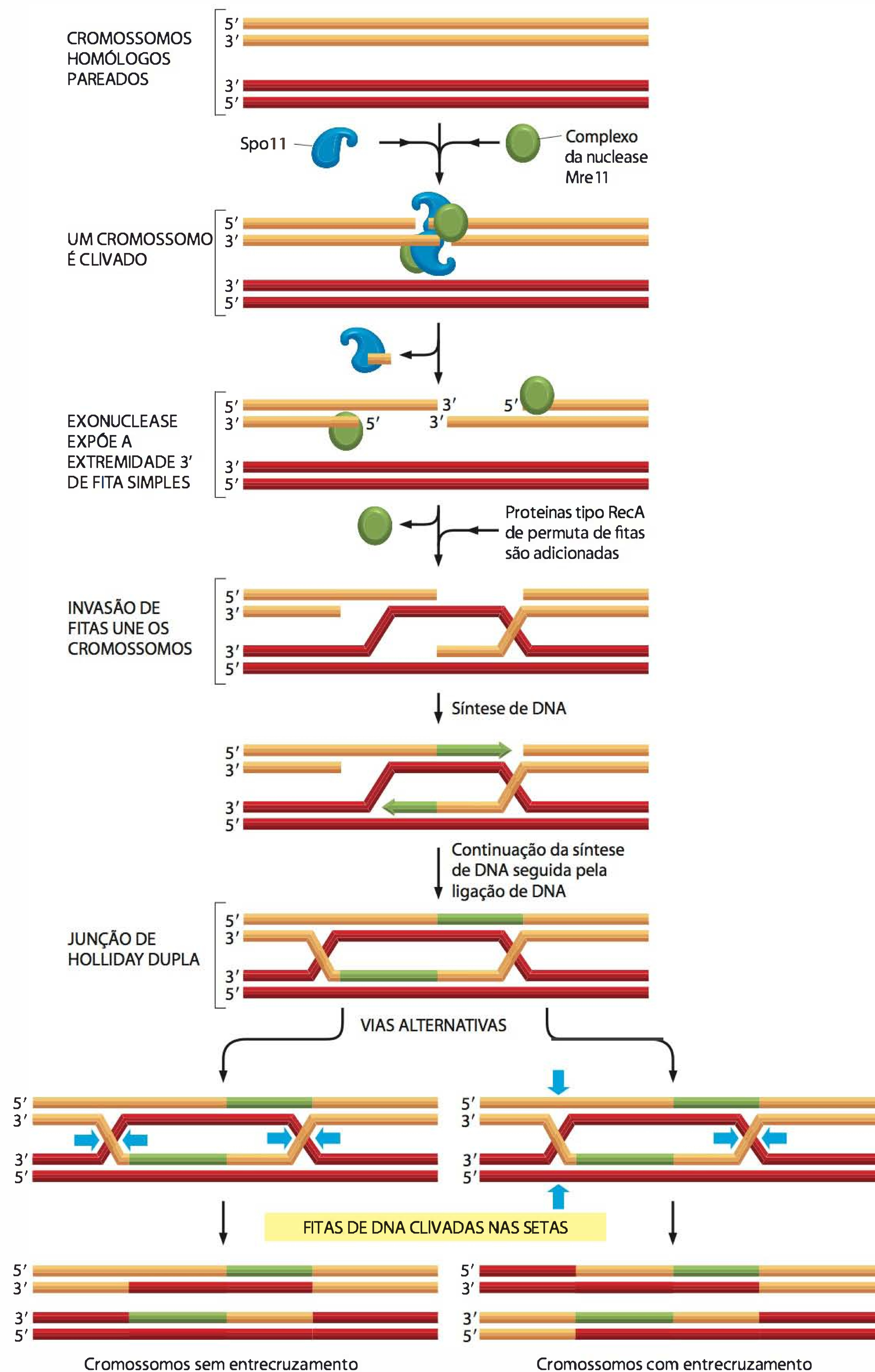


Figura 5-64 A recombinação homóloga na meiose pode produzir entrecruzamentos. Uma vez que a proteína específica da meiose, Spo11, e o complexo Mre11 clivam a dúplex de DNA e processam suas extremidades, a recombinação homóloga ocorre pela junção de Holliday. Muitas das etapas que produzem os entrecruzamentos cromossômicos na meiose assemelham-se às usadas no reparo de quebras de fita dupla (Figura 5-59). Contudo, na meiose, o processo é fortemente acoplado a outros eventos meióticos e promovido por proteínas, como a Spo11, produzidas exclusivamente pelas células meióticas.

deixadas nesta região, cada hélice contém uma pequena região de heterodúplex adjacente à região de homodúplex produzida pela síntese de DNA). Se, por outro lado, as duas junções de Holliday são resolvidas de modo oposto (uma clivada no par original de fitas entrecruzadas e outra nas fitas não-entrecruzadas), o resultado é muito mais profundo. Nesse tipo de resolução (*crossover* ou entrecruzamento), as porções de cada cromossomo *upstream* e *downstream* das duas junções de Holliday são trocadas, criando dois cromossomos que se entrecruzaram (ver Figura 5-64, à direita).

Relativamente poucas quebras de fita dupla mediada por Spo11 geram *entrecruzamentos*; a maioria (p. ex., 90% em humanos,) é resolvida como não-entrecruzamento. Não está claro como essa escolha é feita, mas ela aparentemente ocorre em uma etapa precoce do processo de recombinação, antes da formação da junção de Holliday. Os poucos entrecruzamentos que ocorrem são distribuídos ao longo dos cromossomos de forma que a presença

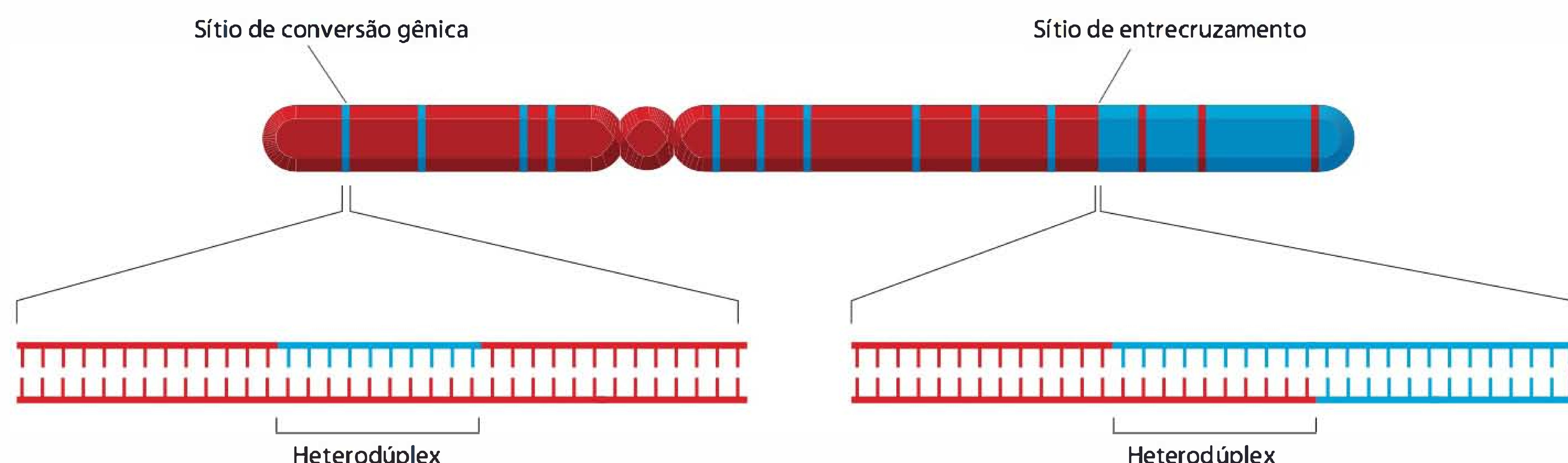


Figura 5-65 Heteroduplexes formadas durante a meiose. A heterodúplex de DNA está presente nos sítios de recombinação que foram resolvidos tanto como entrecruzamentos como não-entrecruzamentos.

de um entrecruzamento em uma posição de algum modo inibe o entrecruzamento em regiões adjacentes. Esse mecanismo fascinante, mas ainda não entendido, chamado de *controle de entrecruzamento*, possivelmente assegura uma distribuição mais ou menos equilibrada de pontos de entrecruzamento nos cromossomos. Em muitos organismos ocorrem cerca de dois entrecruzamentos por cromossomo durante cada meiose, um em cada braço. No Capítulo 20 discutiremos, em detalhes, a importância mecânica desses entrecruzamentos na segregação correta dos cromossomos durante a meiose.

A resolução do evento de recombinação meiótica, tanto no entrecruzamento como no não-entrecruzamento, deixa para trás uma *região de heterodúplex* em que uma fita do homólogo parental forma par de bases com uma fita do homólogo materno (**Figura 5-65**). Essas regiões de heterodúplex toleram uma pequena porcentagem de pareamentos incorretos entre as bases, que normalmente se estendem por milhares de pares de nucleotídeos. Devido ao grande número de eventos de não-entrecruzamento na meiose, eles produzem sítios espalhados nas células germinativas em que pequenas sequências de DNA de um homólogo foram sobrepostas no outro homólogo. Em todos os casos, eles marcam esses sítios potenciais para *conversão gênica* – isto é, sítios onde os quatro cromossomos haploides produzidos pela meiose contêm três cópias de uma pequena sequência de DNA de um homólogo e apenas uma cópia dessa sequência do outro homólogo (ver Figura 5-63), como será explicado a seguir.

A recombinação homóloga normalmente resulta em conversão gênica

Em organismos com reprodução sexuada, de acordo com uma lei fundamental da genética, cada progenitor transmite uma contribuição genética igual à sua prole, que herda um conjunto completo de genes do pai e outro conjunto completo da mãe. Por trás dessa lei está a divisão altamente precisa dos cromossomos nas células germinativas (óvulos e esperma) que ocorre durante a meiose. Assim, quando uma célula diploide sofre meiose para produzir quatro células haploides (discutido no Capítulo 20), exatamente metade dos genes distribuídos nessas células será materna (genes que a célula diploide herda da mãe) e a outra metade paterna (genes que a célula diploide herda do pai). Em alguns organismos (p. ex., fungos), é possível recuperar e analisar os quatro gametas haploides produzidos a partir de uma única célula na meiose. Os estudos nesses organismos revelaram casos raros nos quais a divisão dos genes violou as regras-padrão da genética. Ocasionalmente, por exemplo, a meiose produz três cópias da versão materna do gene e apenas uma cópia do alelo paterno (ver Figura 5-63). Versões alternativas do mesmo gene são chamadas de **alelos**, e a divergência da sua distribuição esperada durante a meiose é conhecida como **conversão gênica.** Estudos genéticos mostram que somente pequenas porções de DNA sofrem conversão gênica e, em muitos casos, apenas uma parte de um gene é alterada.

Vários processos celulares podem promover a conversão gênica. Primeiro, a síntese de DNA que acompanha as primeiras etapas da recombinação homóloga produz regiões da junção de Holliday dupla em que três cópias da sequência de um homólogo estão presentes (ver fitas em *verde* na parte inferior da Figura 5-64); elas irão gerar sítios de conversão gênica uma vez resolvida a junção de Holliday. Além disso, se as duas fitas que compõem a região de heterodúplex não possuírem sequências idênticas, vão ocorrer pareamentos incorretos entre as bases. Eles podem ser corrigidos pelo sistema de reparo de pareamento incorreto da célula, descrito anteriormente (ver Figura 5-20). Quando usado durante a recombinação, porém, o sistema de reparo de pareamento incorreto não faz distinção entre as fitas materna

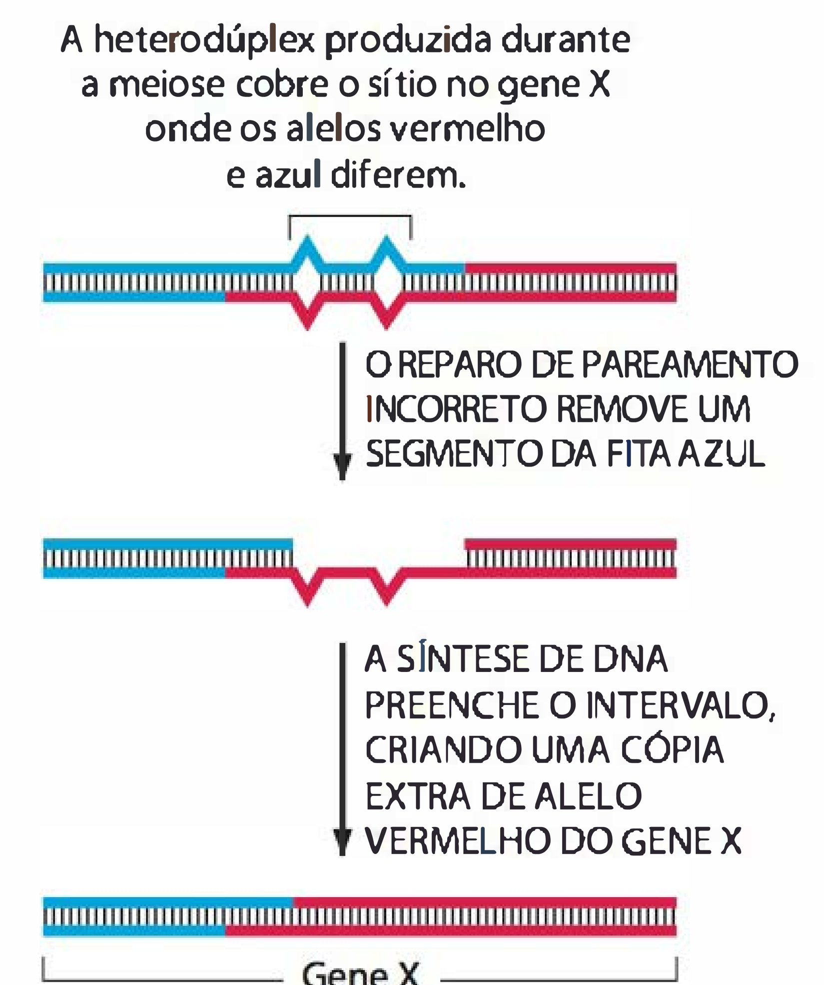


Figura 5-66 Conversão gênica provocada pelo reparo de pareamento incorreto. Neste processo, a heterodúplex de DNA é formada nos sítios de recombinação homóloga entre os cromossomos materno e paterno. Se as sequências materna e paterna forem levemente diferentes, a região de heterodúplex incluirá alguns pareamentos incorretos, que podem ser corrigidos pela maquinaria de reparo de pareamentos incorretos (ver Figura 5-20). Tal reparo pode "apagar" nucleotídeos tanto na fita materna como paterna. A consequência desse reparo de pareamento incorreto é a conversão gênica, detectada como um desvio da segregação de cópias iguais, dos alelos maternos e paternos que normalmente ocorre na meiose.

e paterna e escolhe ao acaso qual fita será corrigida. Como consequência desse reparo, um alelo será "perdido" e o outro duplicado (**Figura 5-66**), resultando na "conversão" de um alelo em outro. Assim, a conversão gênica, originalmente vista como um desvio misterioso das regras da genética, pode ser vista como uma consequência direta dos mecanismos de recombinação homóloga e reparo do DNA.

A correção de pareamento incorreto evita a recombinação promíscua entre duas sequências de DNA com pareamento imperfeito

Vimos que a recombinação homóloga depende do pareamento de fitas de DNA complementares (ou quase complementares) inicialmente presentes em duas duplexes separadas. Contudo, como o grau de precisão do pareamento é controlado? Isto é especialmente crucial para os eventos de recombinação que criam os entrecruzamentos. Por exemplo, o genoma humano contém vários conjuntos de sequências de DNA muito relacionadas, e se o entrecruzamento fosse permitido entre todas elas, seria um desastre para a célula.

Embora não se saiba completamente como as células evitam entrecruzamentos inadequados, sabemos que componentes do mesmo sistema de correção de pareamento incorreto que remove erros da replicação (ver Figura 5-20) e é responsável por alguns tipos de conversão gênica (ver Figura 5-66) possuem uma função adicional na interrupção da recombinação genética entre sequências de DNA com pareamento imperfeito. Parece que o sistema de correção de pareamento incorreto normalmente reconhece as bases pareadas de forma incorreta em uma troca inicial das fitas, e – se existirem malpareamentos significantes – ele evita as etapas subsequentes (particularmente a migração da ramificação) necessárias para que o entrecruzamento ocorra. Esse tipo de correção da recombinação parece impedir os eventos de recombinação promíscuos que misturariam o genoma humano (**Figura 5-67**). Apesar de controverso, tem sido proposto que a correção da recombinação auxilie a preservar a especiação, especialmente entre bactérias, pelo bloqueio da permuta genética entre

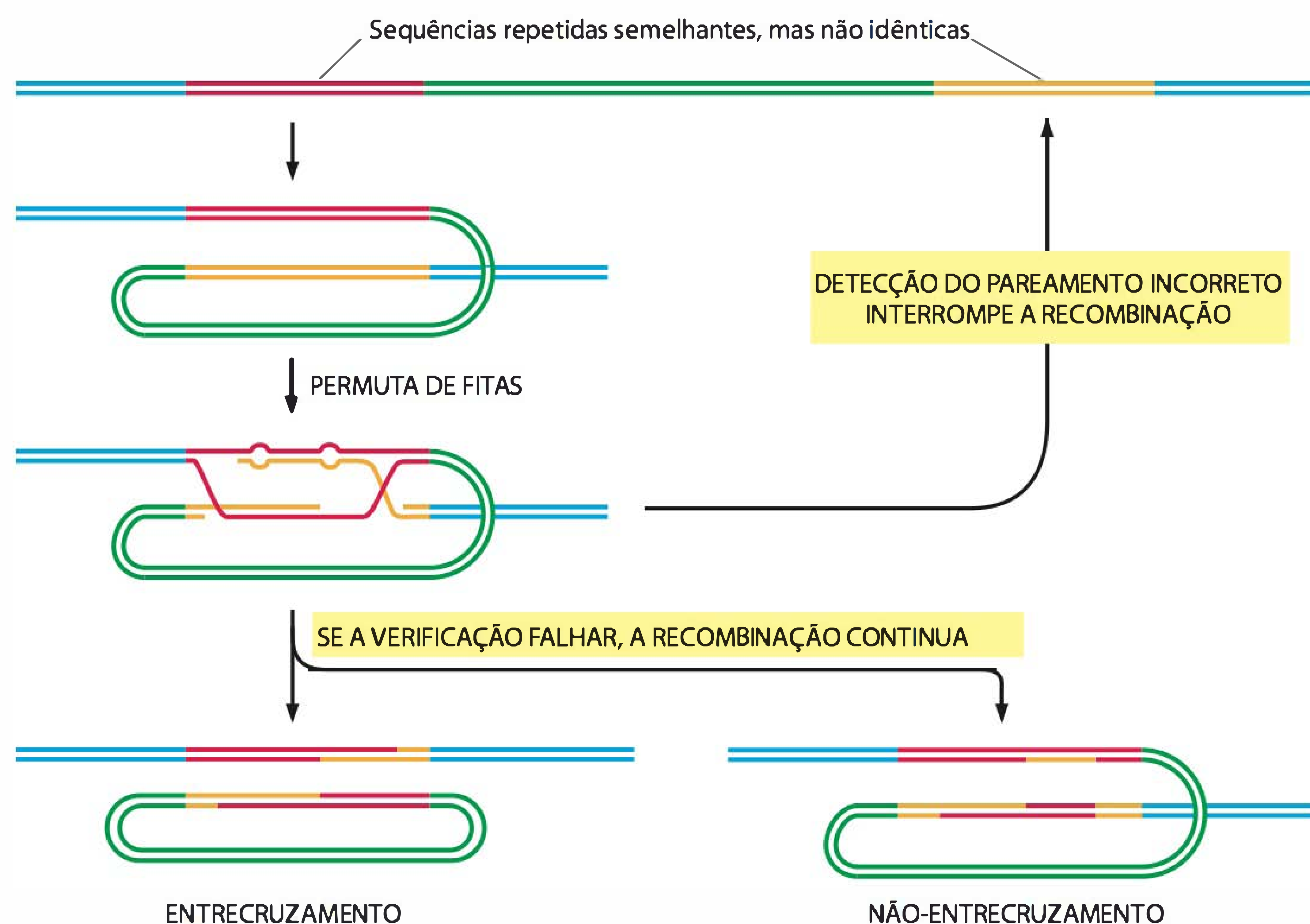


Figura 5-67 Mecanismo que evita que a recombinação homóloga desestabilize um genoma que contém sequências repetidas. Componentes do sistema de verificação de pareamento incorreto, ilustrado na Figura 5-20, têm a função adicional de reconhecer os pareamentos incorretos e evitar uma recombinação inadequada. Se houvesse permissão, essa recombinação produziria deleções (*à esquerda*) ou conversões gênicas (*à direita*) em que a informação de uma das sequências repetidas originais seria perdida.

espécies muito relacionadas. Por exemplo, os genomas de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* são 80% idênticos em suas sequências nucleotídicas e, mesmo assim, a etapa de correção impede a recombinação entre esses dois genomas.

Resumo

A recombinação homóloga (também chamada de recombinação geral) resulta na transferência de informação genética entre dois segmentos de DNA de dupla-hélice com sequências nucleotídicas semelhantes. Esse processo é essencial para o reparo correto, livre de erros, de cromossomos danificados em todas as células, sendo também responsável pelo entrecruzamento de cromossomos que ocorre durante a meiose. O evento de recombinação é guiado por um conjunto de proteínas especializadas. Embora possa ocorrer em qualquer sítio em uma molécula de DNA, uma extensa interação de pareamento de bases entre fitas complementares é sempre necessária entre as duas duplexes participantes.

Na meiose, a recombinação homóloga é iniciada por quebras na fita dupla produzidas intencionalmente ao longo de cada cromossomo. Essas quebras são processadas e geram extremidades de fita simples em 3', as quais, em uma reação catalisada pela família de proteínas RecA, invadem a outra dúplex de DNA homóloga. A seguir, a migração da ramificação e a síntese limitada de DNA promovem a formação de estruturas com quatro fitas conhecidas como junções de Holliday. Cada reação de recombinação termina quando ocorre a resolução desses intermediários de recombinação pela clivagem do DNA. O resultado pode ser tanto dois cromossomos que sofreram entrecruzamento (isto é, cromossomos nos quais o DNA nos dois lados do sítio do pareamento provém de dois homólogos diferentes) quanto dois cromossomos que não sofreram entrecruzamento. No último caso, os dois cromossomos resultantes são idênticos aos homólogos originais, exceto por mínimas alterações na sequência de DNA no sítio de recombinação. Ao contrário da situação na meiose, as reações da recombinação homóloga que reparam as quebras das fitas duplas de DNA sem erros raramente produzem produtos de entrecruzamentos.

TRANSPOSIÇÃO E RECOMBINAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA CONSERVATIVA

Vimos que, na recombinação homóloga, os rearranjos que ocorrem entre segmentos de DNA podem resultar na troca de sequências de DNA entre cromossomos. Porém, a ordem dos genes nos cromossomos envolvidos permanece basicamente a mesma após a recombinação homóloga, tanto que as sequências recombinantes devem ser muito semelhantes para que o processo ocorra. Nesta seção, descreveremos dois tipos diferentes de recombinação – a **transposição** (também chamada de *recombinação transposicional*) e a **recombinação sítio-específica conservativa** – que não necessitam de uma grande homologia entre as regiões de DNA. Esses dois tipos de eventos de recombinação podem alterar a ordem dos genes ao longo do cromossomo e provocar tipos incomuns de mutações que adicionam novas informações aos genomas.

A transposição e a recombinação sítio-específica conservativa são especialmente responsáveis pelo deslocamento de uma variedade de segmentos especializados de DNA, denominados coletivamente *elementos genéticos móveis*, de uma posição a outra em um genoma. Veremos que os elementos genéticos móveis podem variar em tamanho de algumas poucas centenas até dezenas de milhares de pares de nucleotídeos, e cada um geralmente carrega um conjunto determinado de genes. Frequentemente, um dos genes codifica uma enzima especializada que catalisa o deslocamento apenas desse elemento, possibilitando esse tipo de recombinação.

Praticamente todas as células contêm elementos genéticos móveis (conhecidos informalmente como "genes saltadores"). Como explicado no Capítulo 4, na escala evolutiva, estes elementos tiveram um efeito profundo na formação dos genomas modernos. Por exemplo, quase metade do genoma humano pode ser associada a esses elementos (ver Figura 4-17). Com o passar do tempo, suas sequências nucleotídicas foram alteradas por mutações aleatórias, de modo que apenas algumas poucas das muitas cópias desses elementos no nosso DNA ainda estão ativas e são capazes de mobilidade. O restante são fósseis moleculares cuja existência fornece indicações impressionantes sobre nossa própria história evolutiva.

Os elementos genéticos móveis geralmente são considerados como parasitas moleculares (também são chamados de "DNA egoísta") que persistem porque as células não podem livrar-se deles; eles quase chegaram a ultrapassar nosso próprio genoma. Contudo, os elementos genéticos móveis podem proporcionar benefícios à célula. Por exemplo, os genes que eles transportam algumas vezes podem ser vantajosos, como no caso de resistência a antibióticos nas células bacterianas discutido a seguir. O deslocamento dos elementos genéticos móveis também produz muitas das variantes genéticas necessárias à evolução, pois além de se deslocarem, provocam rearranjos ocasionais nas sequências adjacentes no genoma do hospedeiro. Assim, mutações espontâneas, observadas na *Drosophila*, em humanos e em outros organismos, normalmente ocorrem devido aos elementos genéticos móveis. Enquanto a grande maioria dessas mutações será prejudicial ao organismo, algumas resultarão em uma capacidade aumentada e tendem a se espalhar na população. É quase certo que muito da variedade observada no mundo surgiu originalmente do deslocamento dos elementos genéticos móveis.

Nesta seção, introduziremos os elementos genéticos móveis e discutiremos os mecanismos que permitem seu movimento no genoma. Veremos mais adiante que alguns desses elementos se movem por mecanismos de transposição e outros por recombinação sítio-específica conservativa. Iniciaremos com transposição, uma vez que conhecemos muito mais exemplos desse tipo de deslocamento.

Pela transposição, os elementos genéticos móveis podem se inserir em qualquer sequência de DNA

Os elementos que se movem por transposição são chamados de **transposons**, ou **elementos transponíveis**. Na transposição, uma enzima específica, normalmente codificada pelo próprio transposon e chamada de *transposase*, atua em uma sequência específica de DNA presente em cada extremidade do transposon, causando sua inserção em um novo sítio-alvo de DNA. A maioria dos transposons é pouco seletiva na escolha dos sítios-alvo e, portanto, pode se inserir em diversos locais no genoma. Em particular, não há necessidade de homologia entre as extremidades do elemento e o local de inserção. A maior parte dos transposons move-se muito raramente. Em bactéria, em que é possível medir a frequência com precisão, os transposons tipicamente movem-se uma vez a cada 10^5 divisões celulares. Em grande parte dos casos, a transposição parece ser um processo estocástico raro, embora com frequência associado à passagem da forquilha de replicação.

Com base em sua estrutura e seu mecanismo de transposição, os transposons podem ser divididos em três grandes classes: *transposons de DNA-only*, *retrotransposons semelhantes a vírus* e *retrotransposons não-retrovirais*. Cada classe será discutida em detalhes a seguir. Para efeitos de referência, as diferenças entre eles são resumidas na **Tabela 5-3**.

Os transposons de DNA-only movem-se por corte-e-colagem e por mecanismos replicativos

Os transposons de DNA- apenas predominam em bactérias, sendo os grandes responsáveis pela disseminação da resistência a antibióticos nas cepas bacterianas. Quando antibióticos como a penicilina e a estreptomicina tornaram-se inicialmente disponíveis na década de 1950, a maior parte das bactérias causadoras de doenças humanas era suscetível a eles. Cinquenta anos mais tarde, a situação foi consideravelmente alterada – os antibióticos como a penicilina (e seus derivados modernos) não são mais eficazes contra diversas cepas bacterianas modernas, incluindo as causadoras de gonorreia e de pneumonia bacteriana. A disseminação da resistência aos antibióticos é em grande parte devida aos genes presentes nos transposons que codificam enzimas que inativam os antibióticos (**Figura 5-68**). Embora esses elementos móveis possam se mover apenas em células que já os contêm, eles podem ser movidos de uma célula a outra por outros mecanismos conhecidos coletivamente como transferência gênica horizontal (Figura 1-23). Uma vez introduzido na nova célula, um transposon pode se inserir no genoma e ser transmitido a toda progênie da célula pelos processos de replicação e divisão celular normalmente.

Tabela 5-3 As três principais classes de elementos transponíveis

Descrição da classe e estrutura	Enzima especializada necessária ao movimento	Modo de movimento	Exemplos
Transposons de DNA-only			
Pequenas repetições invertidas em cada extremidade	Transposase	Move-se como DNA, através de corte-e-colagem ou por vias replicativas	Elemento P (*Drosophila*) Ac-Ds (trigo) Tn3 e Tn10 (*E. coli*) Tam3 (boca-de-leão)
Retrotransposons semelhantes a retrovírus			
Repetições terminais longas (LTRs, *long terminal repeats*) e diretas em cada extremidade	Transcriptase reversa e integrase	Move-se através de um intermediário de RNA produzido por um promotor na LTR	Copia (*Drosophila*) Ty1 (leveduras) THE1 (humanos) Bs1 (trigo)
Retrotransposons não-retrovirais			
AAAA TTTT Poli-A na extremidade 3′ do transcrito de RNA; a extremidade 5′ normalmente é truncada	Transcriptase reversa e endonuclease	Move-se através de um intermediário de RNA normalmente produzido por um promotor adjacente	Elemento F (*Drosophila*) L1 (humanos) Cin4 (trigo)

Estes elementos variam de mil a aproximadamente 12 mil pares de nucleotídeos de comprimento. Cada família contém diversos membros, apenas alguns sendo listados aqui. Além dos elementos transponíveis, alguns vírus podem mover-se para dentro ou para fora de cromossomos da célula hospedeira por mecanismos de transposição. Esses vírus estão relacionados às duas primeiras classes de transposons.

Os **transposons de DNA-only** são assim chamados porque existem apenas como DNA durante seu movimento, podendo se realocar de um sítio doador a um sítio-alvo tanto por *transposição corte-e-colagem* (*clivagem-e-ligação*) como por *transposição replicativa*. Por ser conceitualmente mais simples, discutiremos inicialmente o mecanismo de corte-e-colagem. O processo tem início quando cada uma das pequenas sequências especiais de DNA que determinam as duas extremidades do elemento liga-se a uma molécula de transposase. As duas moléculas de transposase juntam-se formando um "transpotossomo" multimérico que cria uma alça de DNA justapondo as duas extremidades do elemento (**Figura 5-69**). A seguir, a transposase insere quebras na base da alça e remove o elemento completamente do cromossomo original, formando o principal intermediário do processo de transposição (**Figura 5-70**). Para completar o movimento de DNA, a transposase catalisa um ataque direto das duas extremidades do elemento à molécula de DNA-alvo, quebrando duas ligações fosfodiéster nessa molécula e criando duas novas ligações à medida que aproxima o elemento e a molécula-alvo de DNA. Como essa reação de ligação de DNA inicia e termina com o mesmo número de ligações fosfodiéster, ela ocorre sem a necessidade de energia adicional. Veremos no próximo capítulo que esse mesmo tipo de rearranjo de ligações fosfodiéster (chamado de *transesterificação*) possibilita um outro processo fundamental na biologia molecular, o *splicing* de RNA.

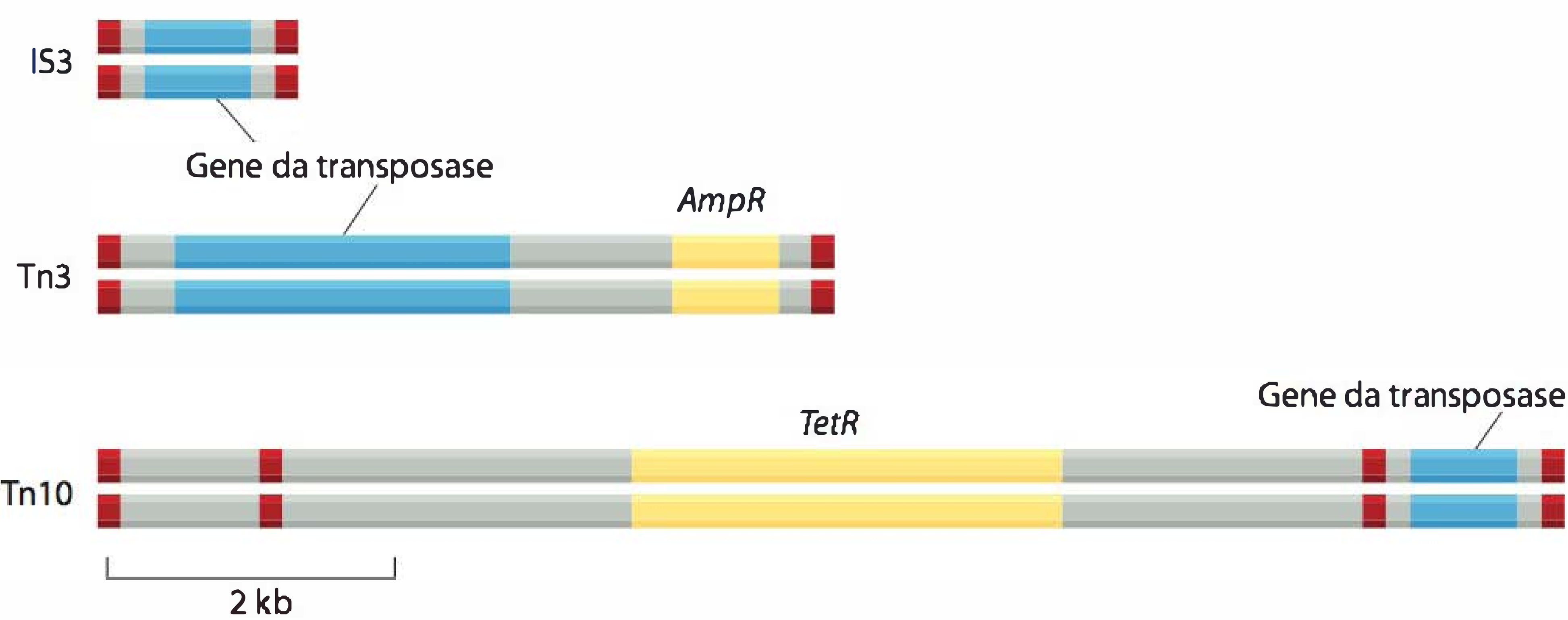


Figura 5-68 Três dos muitos tipos de transposons de DNA-only encontrados em bactérias. Cada um destes elementos móveis de DNA contém um gene que codifica uma *transposase*, enzima que realiza pelo menos parte das reações de clivagem e de ligação do DNA necessárias ao seu movimento. Cada transposon também possui pequenas sequências de DNA (indicadas em *vermelho*) que são reconhecidas apenas pela transposase codificada pelo elemento, sendo também necessárias para que o elemento se movimente. Dois dos três elementos mostrados possuem genes que codificam enzimas de resistência a antibióticos, ampicilina (*AmpR*) e tetraciclina (*TetR*). Acredita-se que o elemento transponível Tn10, mostrado no diagrama inferior, tenha evoluído pela integração ao acaso de dois elementos móveis muito menores, um de cada lado do gene de resistência à tetraciclina; o uso disseminado da tetraciclina como antibiótico auxiliou na propagação desse transposon nas populações bacterianas.

Como as clivagens produzidas na fita dupla de DNA-alvo são espaçadas (*setas vermelhas* na Figura 5-69), a molécula de DNA resultante inicialmente contém dois pequenos intervalos de fita simples, um em cada extremidade do transposon inserido. A DNA-polimerase do hospedeiro e a DNA-ligase preenchem esse intervalo e promovem a ligação, completando o processo de recombinação. Esse processo produz uma pequena duplicação na sequência de DNA-alvo no sítio da inserção; estas sequências diretas repetidas flanqueadoras, cujo comprimento varia nos diversos transposons, atuam como marcadores de um evento de transposição anterior.

Quando um transposon de DNA-only inserido por clivagem e ligação sofre excisão do sítio original, ele deixa um "buraco" no cromossomo. Essa lesão pode ser perfeitamente "consertada" pelo reparo de quebras de fita dupla recombinatório (ver Figura 5-59), desde que o cromossomo tenha duplicado recentemente e que uma cópia idêntica da sequência do hospedeiro danificado esteja disponível. Nesse caso, o processo de reparo irá restaurar o transposon à sua posição original. Alternativamente, em organismos diploides, o cromossomo danificado pode ser reparado por recombinação usando o cromossomo homólogo, e nesse caso o transposon não será regenerado e em seu lugar pode ocorrer perda de heterozigose no sítio de reparo. Uma terceira possibilidade, uma reação de junção de extremidades não-homólogas pode religar a quebra; nesse caso, a sequência de DNA originalmente adjacente ao transposon é alterada, produzindo uma mutação no sítio cromossômico do qual o transposon foi removido (ver Figura 5-52).

Surpreendentemente, foi descoberto que o mesmo mecanismo usado para clivar e ligar transposons de DNA também é empregado no desenvolvimento do sistema imune de vertebrados, catalisando os rearranjos de DNA que produzem a diversidade de anticorpos e receptores de células T. Esse processo, conhecido como *recombinação V(D)J*, será discutido no Capítulo 25. A recombinação V(D)J é encontrada apenas em vertebrados, sendo uma novidade evolutiva relativamente recente, mas que parece ter evoluído a partir dos transposons de corte-e-colagem muito mais antigos.

Alguns transposons de DNA-only movem-se por meio de um mecanismo chamado de *transposição replicativa*. Nesse caso, o DNA do transposon é replicado durante a transposição: uma cópia permanece no sítio original, enquanto a outra é inserida no novo sítio cromossômico. Apesar de mais complexo, esse mecanismo é bastante relacionado ao mecanismo de corte-e-colagem recém-descrito; de fato, alguns transposons podem mover-se pelos dois processos.

Alguns vírus utilizam o mecanismo de transposição para moverem-se para dentro dos cromossomos das células hospedeiras

Certos vírus são considerados elementos genéticos móveis porque utilizam o mecanismo de transposição para integrar o seu genoma no genoma da célula hospedeira. Porém, ao contrário dos transposons, esses vírus codificam proteínas que acondicionam sua informação genética em partículas virais capazes de infectar outras células. Muitos dos vírus que se inserem em um cromossomo do hospedeiro o fazem utilizando um dos dois pri-

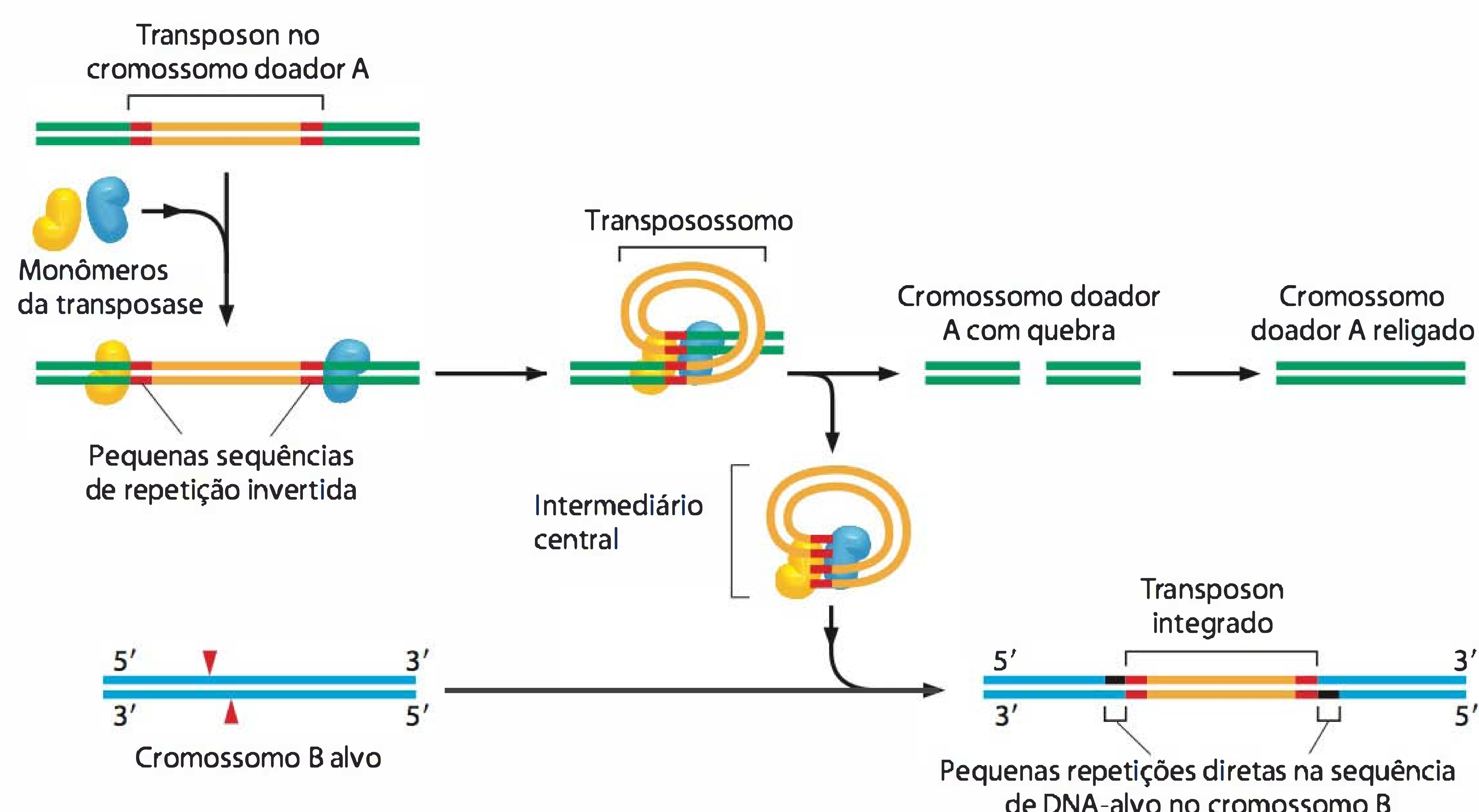


Figura 5-69 Transposição por corte-e--colagem. Os transposons de DNA-only podem ser reconhecidos nos cromossomos pelas "sequências de repetição invertidas" (em *vermelho*) nas suas extremidades. Essas sequências, que podem ter apenas 20 nucleotídeos, são suficientes para que o DNA entre elas seja transposto pela transposase específica associada ao elemento. O movimento de corte-e-colagem de um elemento transponível de DNA-only de um sítio cromossômico a outro inicia quando a transposase aproxima as duas sequências invertidas, formando uma alça de DNA. A inserção no cromossomo-alvo, catalisado pela transposase, ocorre em um sítio aleatório pela criação de quebras alternadas no cromossomo-alvo (*setas vermelhas*). Após a reação de transposição, os intervalos de fita simples, criados pelas quebras alternadas, são corrigidos pela DNA-polimerase e ligase (*roxo*). Como resultado, o local de inserção é marcado por uma pequena repetição direta da sequência de DNA-alvo. Apesar de a quebra no cromossomo doador (*verde*) ser religada, o processo de clivagem e de reparo normalmente altera a sequência de DNA, provocando uma mutação no sítio original do elemento transponível removido (não-mostrada).

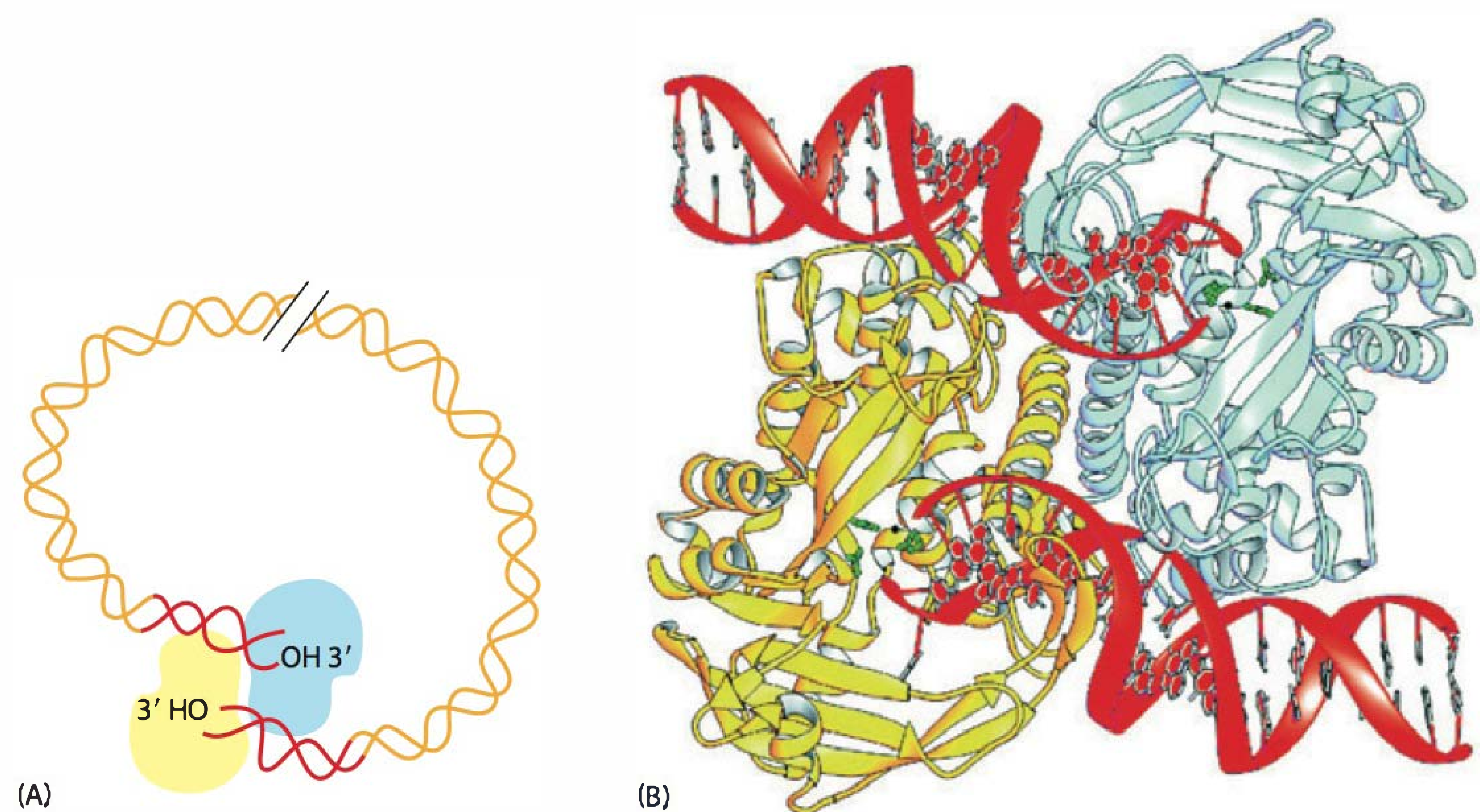


Figura 5-70 Estrutura de um intermediário central formado por uma transposase de corte-e-colagem. (A) Vista esquemática da estrutura total. (B) Estrutura detalhada de uma transposase ligada às duas extremidades de DNA, cujos grupos 3′-OH estão aguardando para atacar um cromossomo-alvo. Um domínio da transposase reconhece a sequência de DNA na extremidade do transposon enquanto um domínio diferente realiza a química de quebra e união do DNA. (B, de D. R. Davies et al., *Science* 289:77-85, 2000. Com permissão de AAAS.)

meiros mecanismos listados na Tabela 5-3. Na verdade, muito do conhecimento desses mecanismos foi elucidado a partir do estudo de determinados vírus que empregam tais mecanismos.

Um vírus que infecta uma bactéria é conhecido como **bacteriófago**. O *bacteriófago Mu*, além de utilizar a transposição de DNA para integrar seu genoma no cromossomo da célula hospedeira, também usa a transposição replicativa para replicar seu genoma. A transposição também tem uma função-chave no ciclo vital de diversos outros vírus, especialmente os **retrovírus**, que incluem o vírus da AIDS, o HIV. Fora da célula, um retrovírus existe como um genoma de RNA de fita simples compactado em um capsídeo proteico juntamente com a enzima **transcriptase reversa**. Durante o processo de infecção, o RNA viral penetra a célula, sendo convertido em uma molécula de DNA-fita dupla pela ação dessa enzima essencial, capaz de polimerizar o DNA usando RNA ou DNA como molde (**Figuras 5-71** e **5-72**). O termo *retrovírus* refere-se à capacidade desses vírus de reverter o fluxo normal da informação genética, que é do DNA para o RNA (ver Figura 1-5).

Uma vez que a transcriptase reversa tenha produzido uma molécula de DNA de fita dupla, sequências específicas próximas às extremidades são mantidas unidas por uma transposase codificada pelo vírus chamada de *integrase*. A integrase produz extremidades 3′-OH ativadas no DNA viral que atacam diretamente uma molécula-alvo de DNA por um mecanismo muito semelhante ao de corte-e-colagem utilizado pelos transposons de DNA-only (**Figura 5-73**). Na verdade, análises detalhadas das estruturas tridimensionais de transposases bacterianas e da integrase do HIV revelaram uma similaridade notável nessas enzimas, apesar da divergência considerável entre suas sequências de aminoácidos.

Os retrotransposons semelhantes a retrovírus assemelham-se aos retrovírus, porém não possuem a capa proteica

Uma grande família de transposons chamada de **retrotransposons semelhantes a retrovírus** (ver Tabela 5-3) realiza seus movimentos nos cromossomos por um mecanismo idêntico ao utilizado pelos retrovírus. Esses elementos estão presentes em organismos bastante diversos, como leveduras, moscas e mamíferos; ao contrário dos vírus, eles não possuem capacidade intrínseca de sair da célula em que residem, mas podem ser transmitidos a todos os descendentes da célula pelos processos normais de replicação e divisão celular. A primeira etapa da sua transposição é a transcrição de todo o transposon, produzindo uma cópia de RNA do elemento normalmente com vários milhares de nucleotídeos. Esse transcrito, que é traduzido como um mRNA pela célula hospedeira, codifica uma enzima transcriptase reversa. Essa enzima sintetiza uma cópia de DNA de fita dupla a partir da molécula de RNA através de um intermediário híbrido de RNA/DNA, mimetizando os estágios iniciais de uma infecção por retrovírus (ver Figura 5-71). Como os retrovírus, a molécula de fita dupla de DNA linear é integrada em um sítio do cromossomo pela ação da enzima integrase, também codificada pelo elemento (ver Figura 5-73).

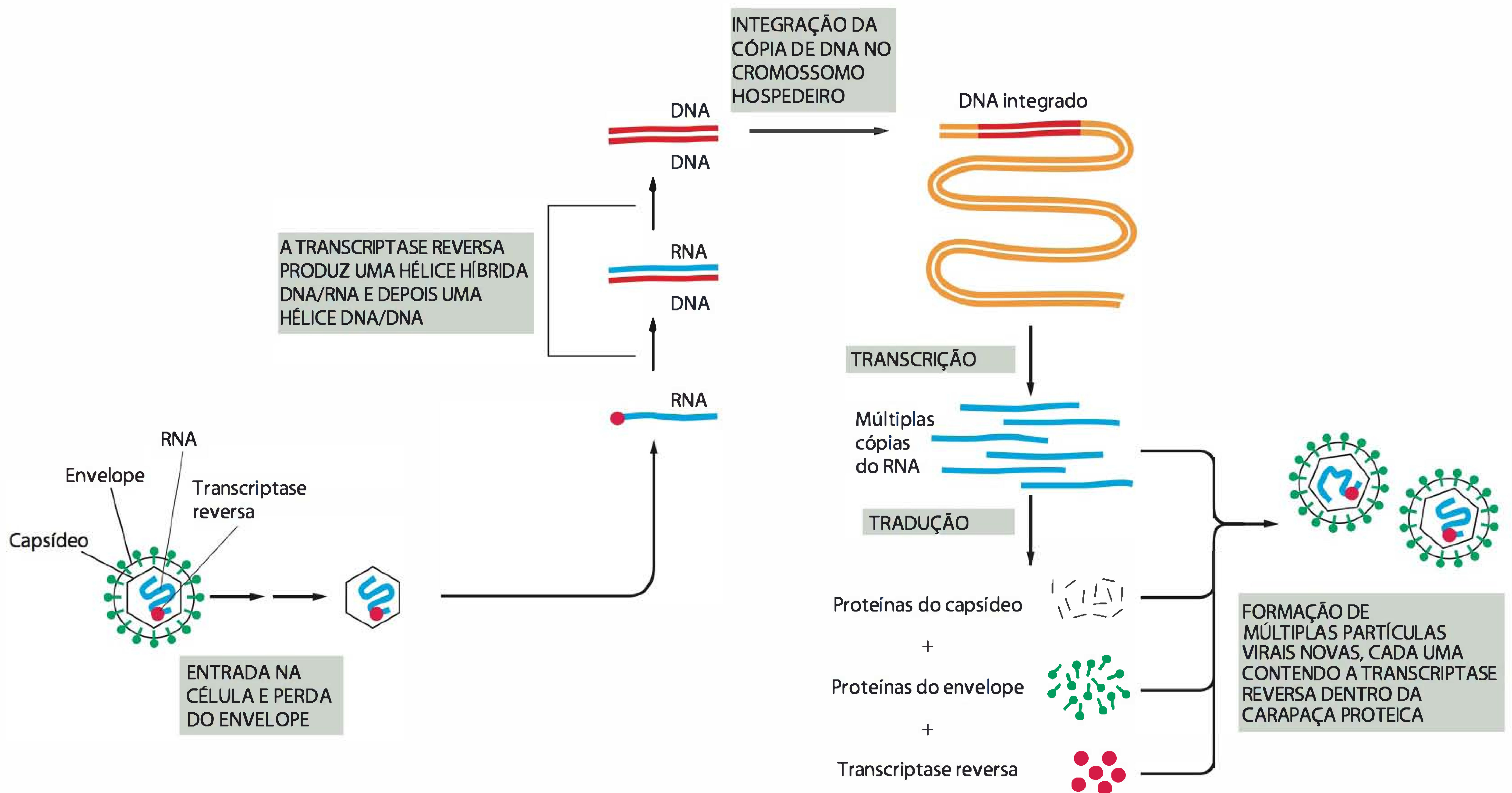


Figura 5-71 Ciclo vital de um retrovírus. O genoma do retrovírus consiste em uma molécula de RNA com cerca de 8.500 nucleotídeos; duas dessas moléculas são empacotadas em cada partícula viral. A enzima transcriptase reversa inicialmente produz uma cópia de DNA da molécula de RNA viral e, depois, uma segunda fita de DNA, produzindo uma cópia de fita dupla de DNA do genoma de RNA. A integração dessa dupla-hélice de DNA no cromossomo da célula hospedeira é catalisada por uma enzima integrase, codificada pelo vírus (ver Figura 5-73). Essa integração é essencial para a síntese de novas moléculas de RNA viral pela RNA-polimerase celular, a enzima que transcreve o DNA em RNA (discutido no Capítulo 6).

Uma grande parte do genoma humano é composta de retrotransposons não-retrovirais

Uma porção importante de diversos cromossomos de vertebrados é formada por sequências repetidas. Nos cromossomos humanos, essas repetições são, na sua maioria, versões mutadas e truncadas de um **retrotransposon não-retroviral,** o terceiro tipo principal de transposons (ver Tabela 5-3). Apesar de a maior parte desses transposons ser imóvel, alguns poucos são capazes de movimento. Movimentos relativamente recentes do *elemento L1* (algumas vezes chamado de LINE, de *long intersperced nuclear element,* elemento nuclear incarlado longo) foram identificados, alguns dos quais resultam em doenças humanas; por exemplo, um tipo especial de hemofilia resulta da inserção do elemento *L1* no gene que codifica o Fator VIII de coagulação sanguínea (ver Figura 6-25).

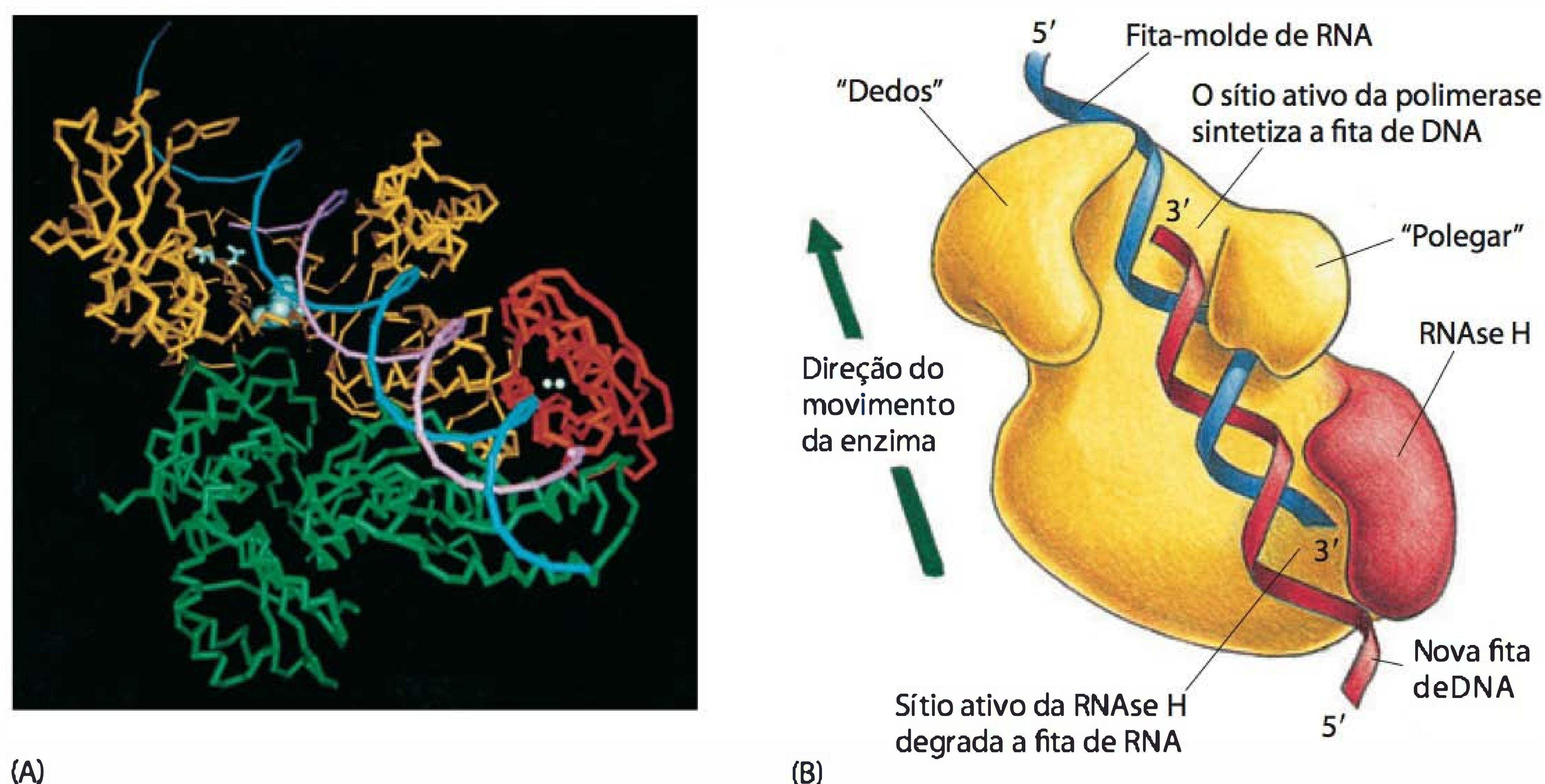


Figura 5-72 Transcriptase reversa. (A) Estrutura tridimensional da enzima do HIV (o vírus da AIDS humana) determinada por cristalografia de raios X. (B) Modelo apresentando a atividade enzimática em um molde de RNA. Observe que o domínio da polimerase (*amarelo* em B) possui um domínio de RNAse H ligado covalentemente (H de "híbrido", em *vermelho*) que degrada a fita de RNA em uma hélice DNA/RNA. Essa atividade auxilia a polimerase na conversão da hélice híbrida inicial na dupla-hélice de DNA. (A, cortesia de Tom Steitz; B, adaptada de L. A. Kohlstaedt et al., *Science* 256:1783-1790, 1992. Com permissão de AAAS.)

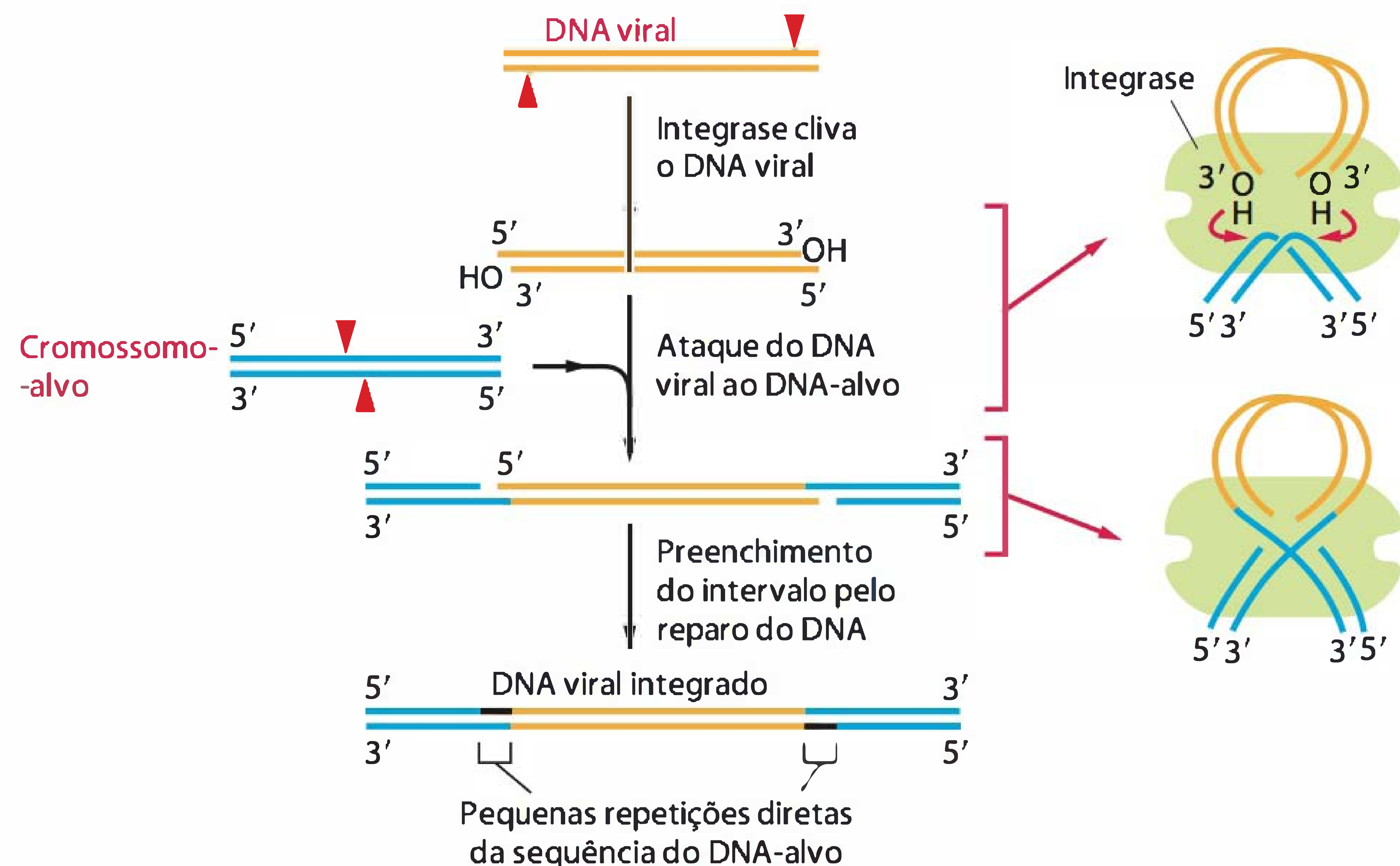


Figura 5-73 Transposição por um retrovírus (como o HIV) ou por um retrotransposon semelhante a retrovírus. O processo inicia com a molécula de DNA de fita dupla (em *laranja*) produzida pela transcriptase reversa (ver Figura 5-71). Na etapa inicial, a enzima integrase forma uma alça de DNA e cliva uma fita em cada uma das extremidades da sequência de DNA viral, expondo novos grupos 3′-OH. Cada uma dessas extremidades 3′-OH ataca diretamente uma ligação fosfodiéster em fitas opostas de um sítio selecionado aleatoriamente no cromossomo-alvo (*setas vermelhas* no DNA em *azul*). Essa reação resulta na inserção da sequência de DNA viral no cromossomo-alvo, deixando pequenos intervalos em cada lado. Esses intervalos são preenchidos pelos sistemas de reparo de DNA. Devido ao preenchimento, esse tipo de mecanismo (como o de corte-e-colagem dos transposons) gera pequenas repetições da sequência de DNA-alvo (em *preto*) em cada lado do segmento de DNA integrado.

Os *retrotransposons não-retrovirais* são encontrados em diversos organismos e movem-se por meio de um mecanismo distinto que requer um complexo formado por uma endonuclease e uma transcriptase reversa. Como ilustrado na **Figura 5-74**, o RNA e a transcriptase reversa têm uma função muito mais direta no evento de recombinação do que nos elementos móveis descritos anteriormente.

A inspeção da sequência do genoma humano revelou que uma grande porção de retrotransposons não-retrovirais – por exemplo, as várias cópias do elemento *Alu*, um membro da família SINE (de *short interspersed nuclear element,* elemento nuclear intercalado curto) – não contém seus próprios genes para a endonuclease transcriptase reversa. No entanto, este foi amplificado a ponto de tornar-se o principal componente do nosso genoma, possivelmente pelo uso "pirata" de enzimas codificadas por outros transposons.

Os elementos *L1* e *Alu* parecem ter se multiplicado no genoma humano recentemente (**Figura 5-75**). Assim, por exemplo, o camundongo contém sequências muito semelhantes a *L1* e a *Alu*, mas sua posição nos cromossomos de camundongos é muito diferente daquela nos cromossomos humanos (ver Figura 4-17).

Diferentes elementos transponíveis predominam em diferentes organismos

Vários tipos de elementos transponíveis foram descritos: (1) transposons de DNA-only, cuja mobilidade tem como base reações de clivagem-e-ligação de DNA; (2) retrotransposons semelhantes a retrovírus, que também se movem por meio de clivagem-e-ligação de DNA, mas tendo o RNA com função-chave, atuando como molde para originar o substrato para a recombinação do DNA, e (3) retrotransposons não-retrovirais, nos quais uma cópia de RNA do elemento é fundamental para sua incorporação no DNA-alvo, atuando como um molde direto para o evento de transcrição reversa dirigido pelo DNA-alvo.

Curiosamente, tipos diferentes de transposons predominam em diferentes organismos. A grande maioria de transposons bacterianos, por exemplo, é do tipo DNA-only, estando presentes uns poucos relacionados aos retrotransposons não-virais. Em leveduras, os prin-

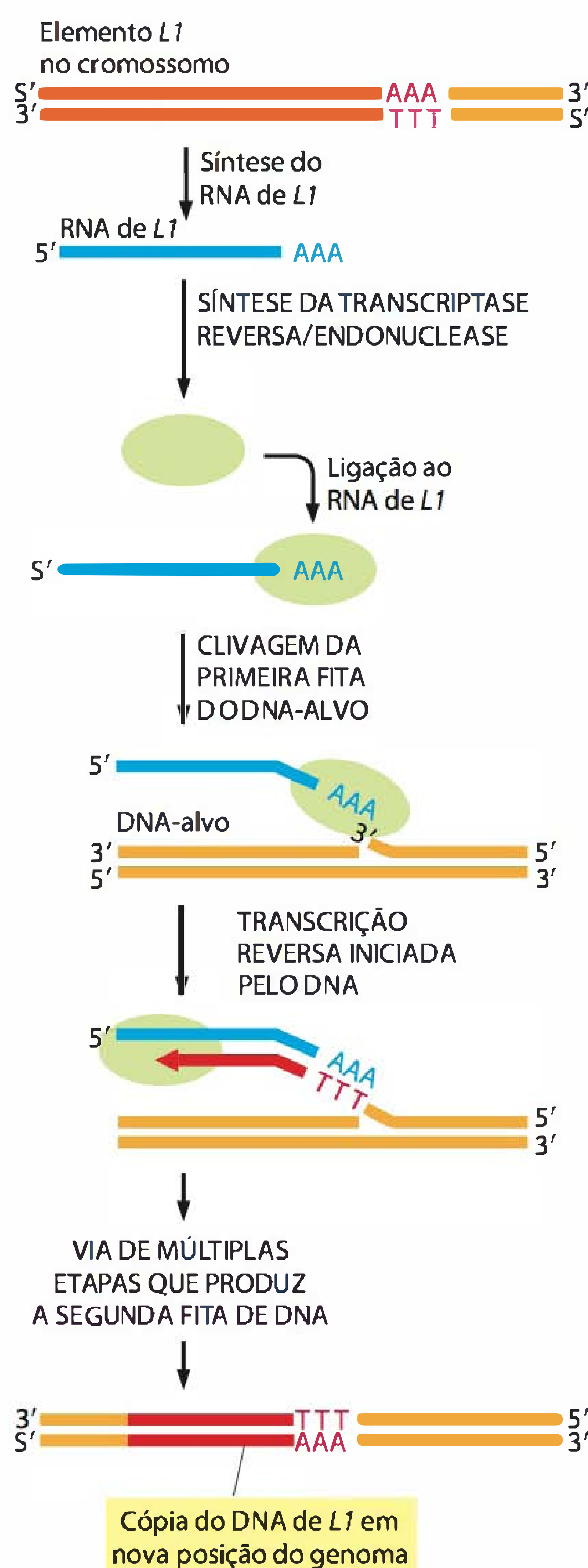


Figura 5-74 Transposição por um retrotransposon não-retroviral. A transposição pelo elemento *L1* (em *vermelho*) inicia quando uma endonuclease ligada à transcriptase reversa de *L1* (em *verde*) e o RNA de *L1* (em *azul*) produzem uma clivagem no DNA-alvo no local onde ocorrerá a inserção. Essa clivagem libera uma extremidade 3′-OH no DNA-alvo, que é utilizada como iniciador para a etapa de transcrição reversa mostrada. Isso produz uma cópia de DNA de fita simples do elemento diretamente ligada ao DNA-alvo. Em reações subsequentes, o processamento adicional da cópia de DNA de fita simples resulta na formação de uma nova cópia de DNA de fita dupla do elemento *L1*, que é inserida no sítio inicial de clivagem.

cipais elementos móveis observados são os retrotransposons semelhantes a retrovírus. Na *Drosophila* são encontrados transposons de DNA-only, retrovirais e não-retrovirais. Finalmente, o genoma humano contém os três tipos de transposons, mas, como apresentado a seguir, suas histórias evolutivas são bastante diferentes.

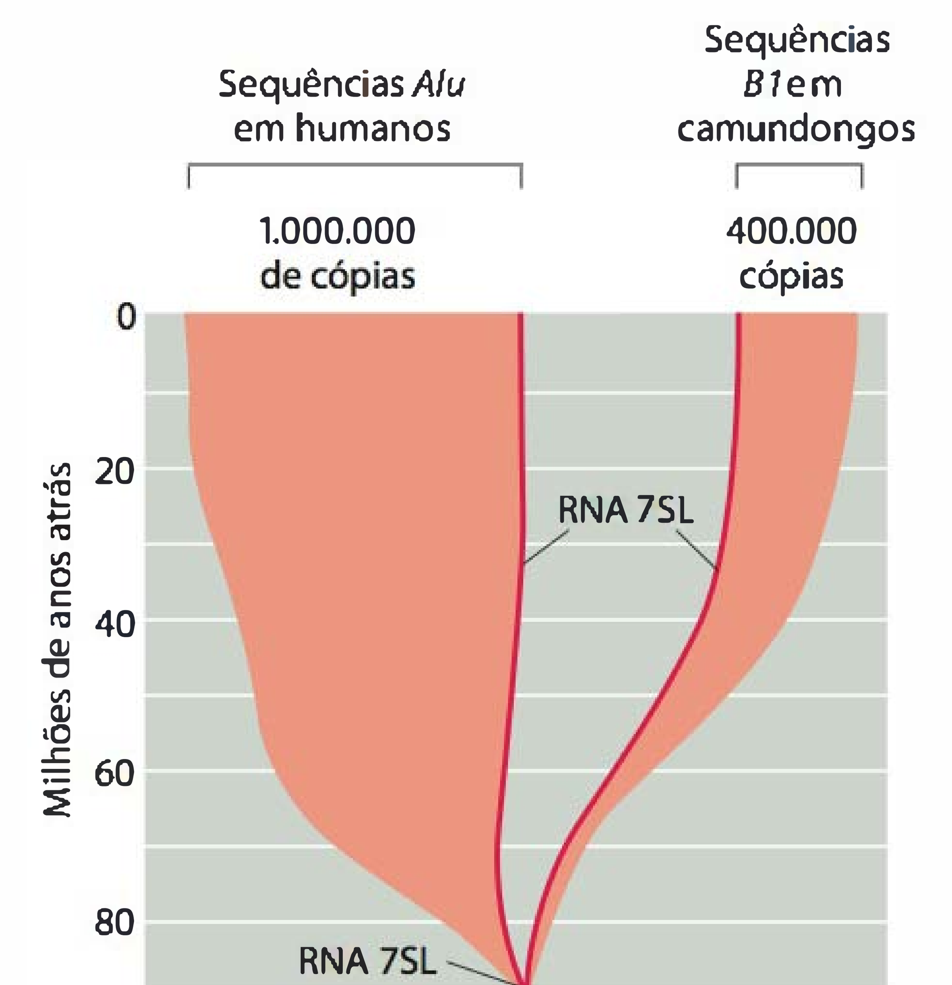


Figura 5-75 **Expansão das sequências *Alu* e *B1* encontradas em abundância nos genomas de humanos e camundongos, respectivamente.** Ambas as sequências de DNA transponível parecem ter se desenvolvido a partir do gene de RNA 7SL que codifica o RNA SRP (ver Figura 12-39). Com base na posição nos dois genomas e na similaridade de sequências desses elementos altamente repetidos, as principais expansões no número de cópias parecem ter ocorrido de forma independente em camundongos e humanos (ver Figura 4-80). (Adaptada de P. L. Deininger e G. R. Daniels *Trends Genet.* 2:76-80, 1986, com permissão de Elsevier e International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As sequências genômicas revelam o número aproximado de vezes que os elementos transponíveis foram movidos

A sequência nucleotídica do genoma humano nos fornece um precioso "registro fóssil" da atividade dos transposons na escala evolutiva. A comparação cuidadosa da sequência nucleotídica de aproximadamente 3 milhões de elementos transponíveis remanescentes presentes no genoma humano possibilitou a reconstrução aproximada dos movimentos dos transposons no genoma de nossos ancestrais, durante centenas de milhares de anos. Por exemplo, os transposons de DNA-only parecem ter sido ativos muito antes da divergência entre humanos e macacos do Velho Mundo (de 25 a 35 milhões de anos atrás); mas, como foram gradualmente acumulando mutações que os inativaram, eles têm estado dormentes na linhagem humana desde então. Da mesma forma, apesar de o nosso genoma estar repleto de vestígios de transposons semelhantes a retrovírus, nenhum parece estar ativo atualmente. Uma única família de retrotransposons semelhantes a retrovírus parece ter sofrido transposição no genoma humano desde a divergência entre humanos e chimpanzés, há aproximadamente seis milhões de anos. Os retrotransposons não-retrovirais também são bastante antigos, mas, ao contrário dos outros tipos, alguns ainda estão em movimento no nosso genoma, como mencionado anteriormente. Por exemplo, estima-se que o movimento *de novo* de um elemento *Alu* ocorra uma vez a cada 100 a 200 nascimentos humanos. O movimento de retrotransposons não-retrovirais é responsável por uma pequena proporção de novas mutações humanas – talvez duas mutações em cada mil.

A situação em camundongos é muito diferente. Apesar de os genomas de camundongos e humanos conterem aproximadamente a mesma densidade dos três tipos de transposons, ambos os tipos de retrotransposons ainda estão em transposição ativa no genoma de camundongos, sendo responsáveis por cerca de 10% das novas mutações.

Embora estejamos apenas começando a compreender como o movimento dos transposons contribuiu para a formação dos genomas dos mamíferos atuais, foi proposto que grandes incrementos da atividade de transposição poderiam ser responsáveis pelos eventos decisivos da especiação durante a radiação das linhagens de mamíferos a partir de um ancestral comum, um processo que teve início há aproximadamente 170 milhões de anos. Nesse ponto, podemos apenas imaginar quantas das características exclusivamente humanas resultaram da atividade dos muitos elementos genéticos móveis cujos resquícios são encontrados hoje espalhados nos nossos cromossomos.

A recombinação sítio-específica conservativa pode rearranjar o DNA de modo reversível

Um tipo diferente de mecanismo de recombinação, conhecido como *recombinação sítio-específica conservativa*, promove rearranjos de outros tipos de elementos móveis de DNA. Nessa via, a clivagem e a ligação ocorrem em dois sítios específicos, um em cada molécula de DNA participante do evento. Dependendo da posição e da orientação dos dois sítios de recombinação, pode ocorrer integração, excisão ou inversão do DNA (**Figura 5-76**). A recombinação sítio-específica conservativa é realizada por enzimas especializadas que clivam e religam as duas hélices de DNA em sequências específicas em cada molécula. O mesmo sistema de enzimas que liga as duas moléculas também pode separá-las, regenerando com precisão a sequência das duas moléculas originais de DNA (ver Figura 5-76A).

Diversas características diferenciam a recombinação sítio-específica conservativa da transposição. Primeiro, a recombinação sítio-específica conservativa requer sequências de DNA especializadas no DNA doador e no receptor (daí o termo sítio-específica). Essas sequências possuem sítios de reconhecimento para a recombinase específica que catalisa o rearranjo. Em contraste, a transposição necessita apenas que o transposon possua uma sequência especializada; para a maioria dos transposons, o DNA receptor pode ter qual-

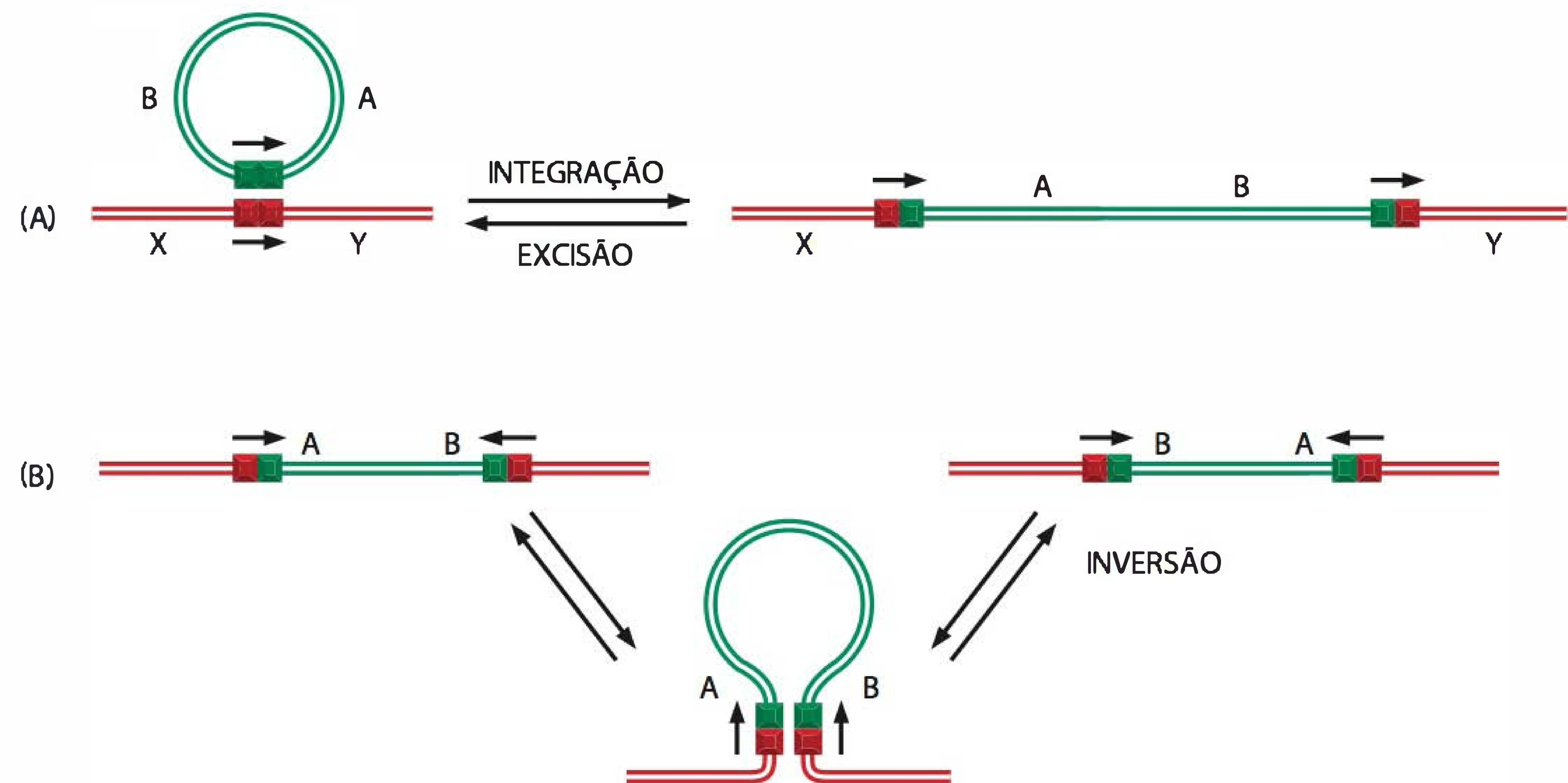


Figura 5-76 Dois tipos de rearranjos no DNA produzidos por recombinação sítio-específica conservativa. A única diferença entre as reações em (A) e (B) é a orientação relativa dos dois sítios de DNA (indicados por *setas*) em que ocorreu o evento de recombinação sítio-específica. (A) Por meio da reação de integração, uma molécula de DNA circular é incorporada em uma segunda molécula de DNA; pela ação reversa (excisão), ela pode ser liberada e regenerar o DNA circular original. Diversos vírus bacterianos movem-se para dentro e para fora do cromossomo hospedeiro exatamente assim (ver Figura 5-77). (B) A recombinação sítio-específica conservativa também pode inverter um segmento específico de DNA no cromossomo. Um exemplo bem-estudado de inversão de DNA por essa recombinação ocorre na bactéria *Salmonella typhimurium*, principal agente envolvido na intoxicação alimentar dos humanos; a inversão de um segmento de DNA altera o tipo de flagelo produzido pela bactéria (ver Figura 7-64).

quer sequência. Segundo, os mecanismos da reação são fundamentalmente diferentes. As recombinases que catalisam a recombinação sítio-específica conservativa assemelham-se às topoisomerases no sentido de formarem ligações covalentes de alta energia transitórias com o DNA e utilizarem essa energia para completar o rearranjo de DNA. Dessa forma, todas as ligações de fosfato clivadas durante o evento de recombinação são regeneradas após o término (daí o termo conservativa). A transposição, ao contrário, utiliza uma reação de transesterificação que não ocorre por meio de um intermediário DNA-proteína covalentemente ligado. Esse processo produz intervalos no DNA que devem ser religados pela DNA-polimerase e pela DNA-ligase, e ambas requerem energia gerada pela hidrólise de nucleotídeos.

A recombinação sítio-específica conservativa foi descoberta no bacteriófago λ

Um vírus bacteriano, o *bacteriófago lambda*, foi o primeiro elemento de DNA móvel de qualquer tipo compreendido em detalhes. Quando o vírus penetra a célula, ele promove a síntese de uma enzima codificada pelo vírus, chamada de *integrase de lambda*. Essa enzima promove a ligação covalente do DNA viral ao cromossomo bacteriano, e o vírus é replicado automaticamente – como parte do DNA da bactéria hospedeira. O processo de recombinação inicia quando uma série de moléculas da proteína integrase liga-se fortemente a uma sequência de DNA específica no cromossomo circular do bacteriófago, juntamente com diversas proteínas hospedeiras. Esse complexo proteína-DNA é capaz de ligar-se a um sítio de ligação (*attachment site*), uma sequência de DNA no cromossomo bacteriano, aproximando os cromossomos bacteriano e viral. A integrase, então, catalisa as reações de clivagem e religação que resultam na recombinação. Devido à pequena região de homologia de sequência entre as duas sequências, forma-se uma junção de heterodúplex mínima nesse ponto de troca (**Figura 5-77**).

O mesmo tipo de mecanismo de recombinação sítio-específica permite a remoção do bacteriófago lambda do sítio de integração no cromossomo de *E. coli* em resposta a sinais específicos e a multiplicação rápida dentro da célula bacteriana (**Figura 5-78**). A excisão é catalisada por um complexo de integrase e por fatores do hospedeiro com uma segunda proteína do bacteriófago, a excisionase, produzida pelo vírus apenas em situações de estresse celular – nesse caso, é interessante para o vírus abandonar a célula hospedeira e replicar-se novamente como uma partícula viral.

A recombinação sítio-específica conservativa pode ser utilizada para ativar ou desativar genes

Quando os sítios especiais reconhecidos por uma enzima de recombinação sítio-específica conservativa têm sua orientação invertida, a sequência de DNA entre eles é invertida, ao invés de ser excisada (ver Figura 5-76). Muitas bactérias usam a inversão de uma sequência de DNA para controlar a expressão gênica de determinados genes – por exemplo, aproximando genes ativos a partir de segmentos codificantes separados. Esse tipo de controle gênico pos-

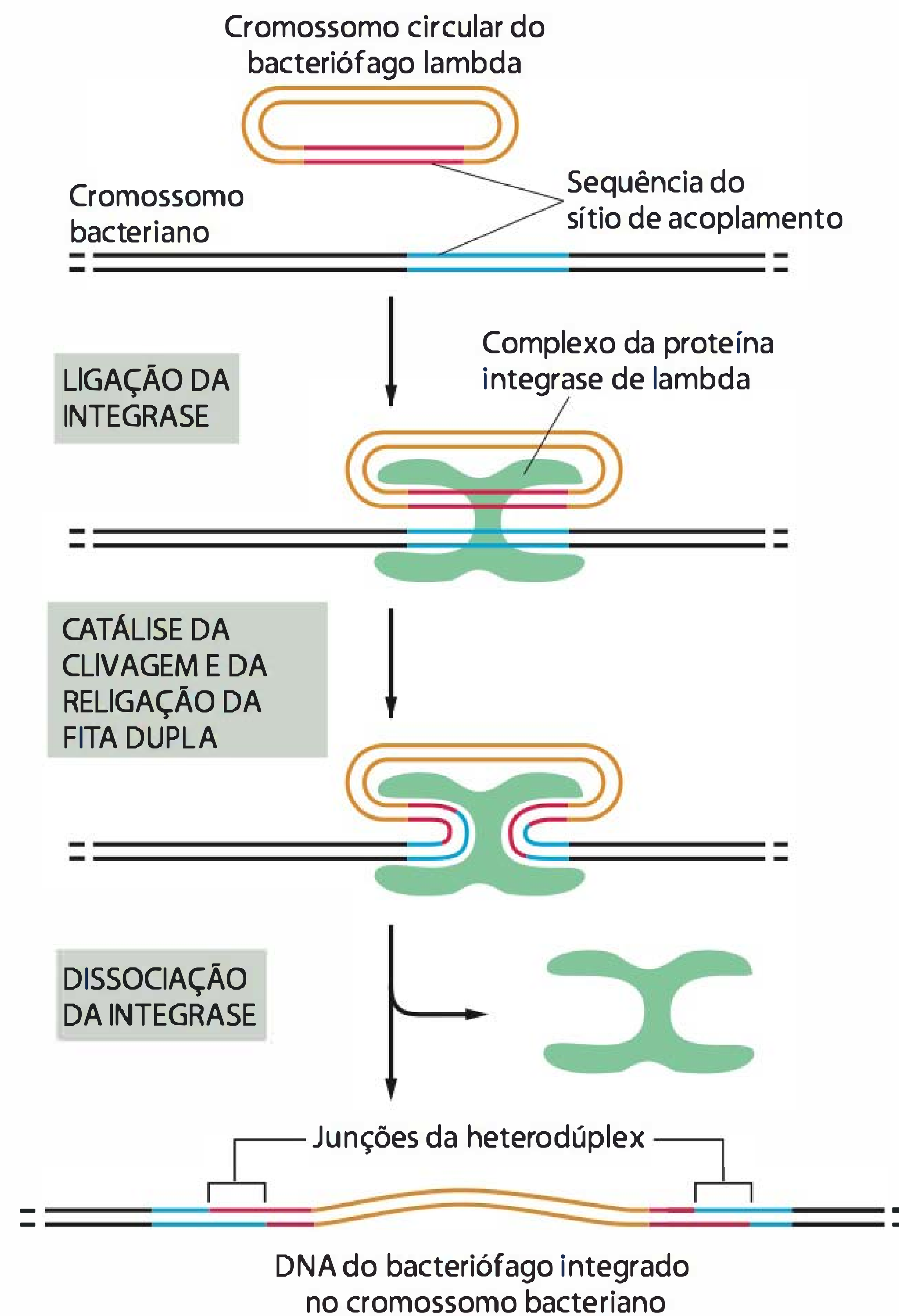


Figura 5-77 Inserção de um cromossomo de DNA circular de bacteriófago lambda no cromossomo bacteriano. Neste exemplo de recombinação sítio-específica conservativa, a integrase de lambda liga-se a um "sítio de acoplamento", uma sequência de DNA específica em cada cromossomo, onde ela cliva o DNA e insere pequenas sequências homólogas de DNA. A integrase então altera as fitas envolvidas no evento e catalisa sua religação, formando uma junção de heterodúplex com sete nucleotídeos. Um total de quatro reações de clivagem e de religação de fitas é necessário, e a energia liberada pela quebra da ligação fosfodiéster é armazenada temporariamente na ligação covalente do DNA com a enzima. Dessa forma, a religação da fita de DNA ocorre sem a necessidade de ATP ou DNA-ligase.

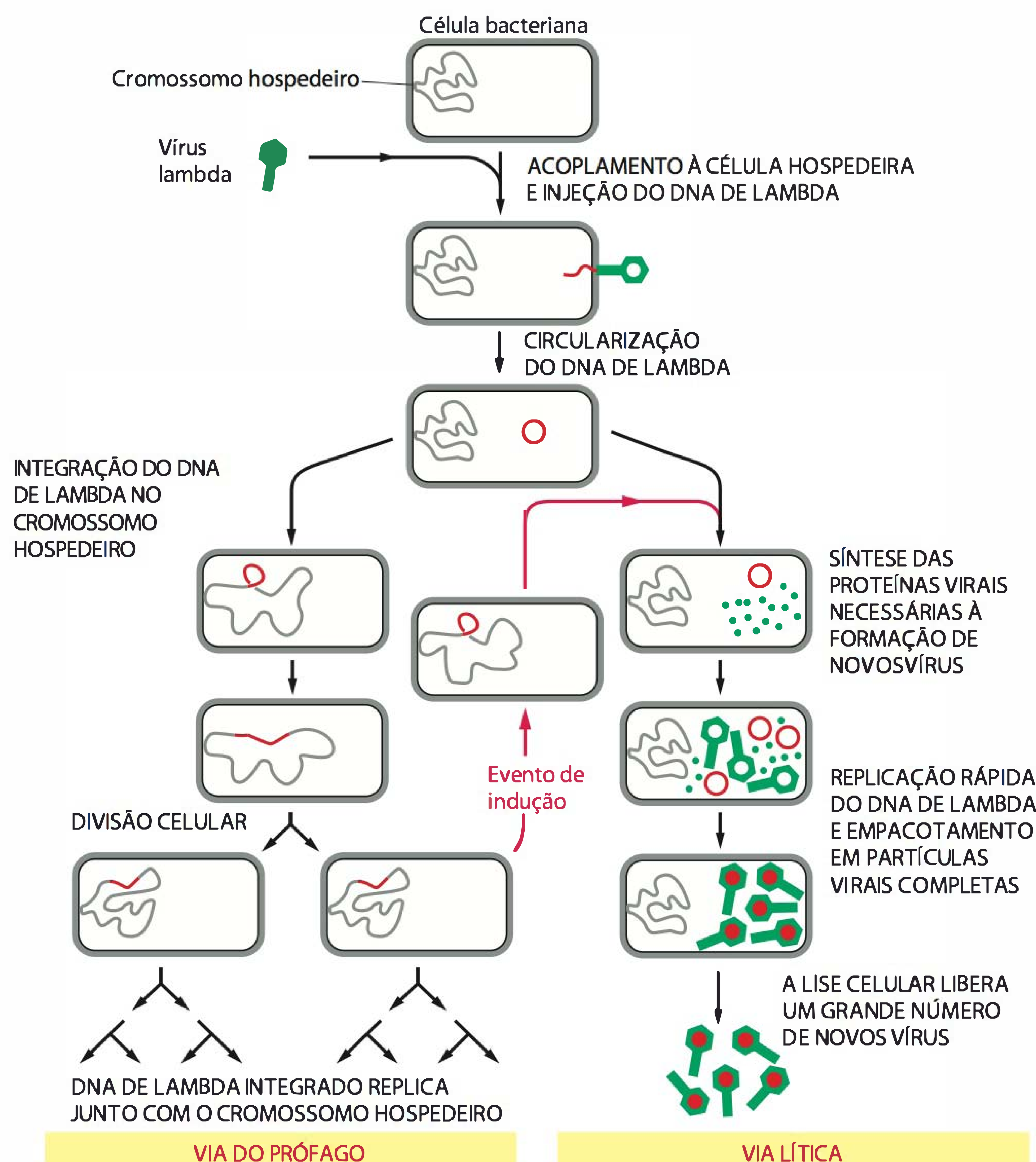


Figura 5-78 Ciclo vital do bacteriófago lambda. O genoma de fita dupla do lambda contém 50 mil pares de nucleotídeos e codifica de 50 a 60 proteínas diferentes. Quando o DNA de lambda entra na célula, suas extremidades são unidas formando uma molécula de DNA circular. Esse bacteriófago pode se multiplicar em *E. coli* pela via lítica, que destrói a célula, ou entrar em um estado de latência, como prófago. Danos a uma célula que contenha o prófago lambda induz sua excisão do cromossomo e a alternância para o ciclo lítico (*setas vermelhas*). Tanto a integração como a excisão do DNA de lambda no cromossomo bacteriano são realizadas por um evento de recombinação sítio-específica conservativa catalisado pela enzima integrase de lambda (ver Figura 5-77).

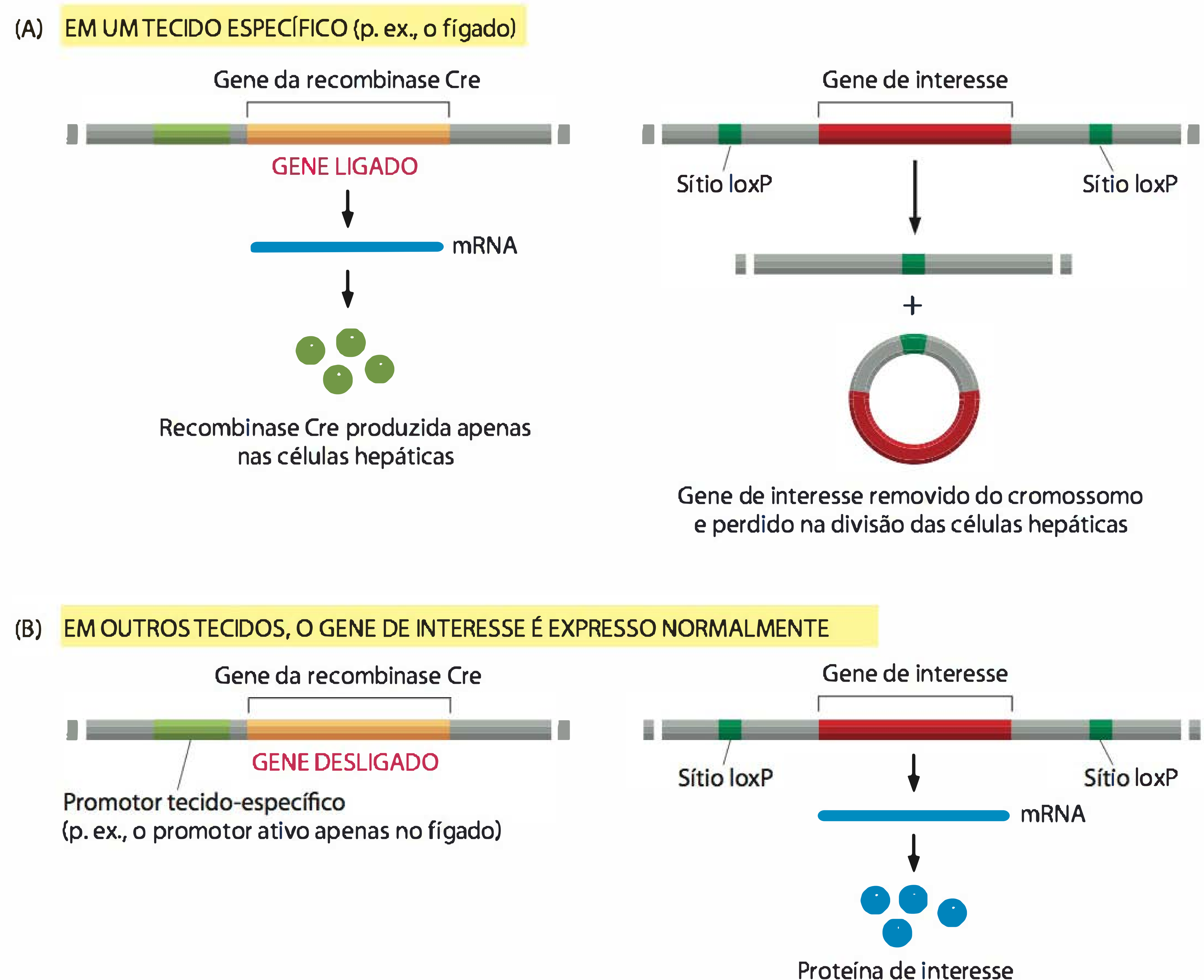


Figura 5-79 Como uma enzima de recombinação sítio-específica conservativa pode ser utilizada para remover genes específicos de determinados tecidos de camundongos. Essa técnica requer a inserção de duas moléculas de DNA especialmente modificadas na linhagem germinativa do animal. A primeira contém o gene para recombinase (neste caso, a recombinase Cre do bacteriófago P1) controlada por um promotor tecido-específico, que assegura que a recombinase será expressa apenas naquele tecido. A segunda molécula de DNA contém o gene de interesse flanqueado pelos sítios de reconhecimento para a recombinase (neste caso, os sítios loxP). O camundongo é modificado de modo que esta seja a única cópia deste gene. Portanto, se a recombinase for expressa apenas no fígado, o gene de interesse será ausente neste, e somente neste tecido.

Como descrito no Capítulo 7, diversos promotores tecido-específicos são conhecidos; além disso, muitos desses promotores são ativados apenas em determinados períodos do desenvolvimento. Assim, é possível estudar o efeito da remoção de genes específicos em vários períodos diferentes do desenvolvimento de cada tecido.

sui a vantagem de ser herdado diretamente, uma vez que o novo rearranjo de DNA é transferido aos cromossomos-filhos automaticamente no momento da divisão celular. Veremos um exemplo específico dessa aplicação da recombinação sítio-específica conservativa no Capítulo 7 (ver Figura 7-64).

As recombinases sítio-específicas conservativas de bactérias tornaram-se importantes ferramentas aplicadas à biologia celular e de desenvolvimento. Para decifrar as funções de genes e de proteínas específicos em organismos multicelulares complexos, são empregadas técnicas de engenharia genética para produzir camundongos contendo um gene que codifica uma enzima de recombinação sítio-específica e um alvo de DNA criteriosamente construído, que contenha os sítios reconhecidos pela enzima em questão. No período apropriado, o gene codificando a enzima pode ser ativado para rearranjar a sequência de DNA-alvo. Esse rearranjo é muito utilizado para remover um gene específico em um tecido determinado do camundongo (**Figura 5-79**). Essas técnicas são especialmente úteis quando o gene de interesse possui função importante nos estágios iniciais do desenvolvimento de vários tecidos, e sua remoção completa da linhagem germinal causaria a morte precoce durante a embriogênese. A mesma estratégia pode ser empregada para expressar inadequadamente qualquer gene específico no tecido de interesse; aqui, a remoção provoca a junção de um promotor transcricional forte ao gene de interesse. Com essas técnicas, é possível, em princípio, determinar a influência de qualquer proteína em qualquer tecido de um animal intacto.

Resumo

Os genomas de praticamente todos os organismos contêm elementos genéticos móveis que são capazes de moverem-se de uma posição do genoma para outra, tanto por um processo de recombinação sítio-específica transposicional como conservativa. Na maior parte dos casos, esse movimento é aleatório e ocorre em uma frequência muito baixa. Os elementos genéticos móveis incluem os transposons, que podem movimentar-se apenas dentro de uma única célula (e suas descendentes), e os vírus, cujos genomas podem ser integrados ao genoma das suas células hospedeiras.

Existem três classes de transposons: os transposons de DNA-only, os retrotransposons semelhantes a retrovírus e os retrotransposons não-retrovirais. Todas, exceto a última, são relacionadas aos vírus. Apesar de os vírus e os elementos de transposição serem vistos como parasitas, muitos dos novos arranjos das sequências de DNA produzidas por esses eventos de recombinação sítio-específica criaram a diversidade genética fundamental para a evolução de células e organismos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

5-1 Não existem duas células no seu corpo com sequência nucleotídica idêntica.

5-2 Na *E.coli*, em que a forquilha de replicação desloca-se a 500 pares de nucleotídeos por segundo, o DNA à frente da forquilha deve sofrer rotação de quase 3.000 revoluções por minuto.

5-3 Quando as forquilhas de replicação bidirecionais oriundas de origens adjacentes se encontram, uma fita-líder sempre encontra uma fita descontínua.

5-4 Todos os mecanismos de reparo do DNA dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada um dos cromossomos homólogos.

Discuta as seguintes questões.

5-5 Para determinar a reprodutibilidade da medida da frequência de mutações, você faz o seguinte experimento. Você inocula cada uma de 10 culturas com uma única bactéria *E. coli*, permite que a cultura cresça até que contenha 10^6 células, e daí verifica o número de células que contêm a mutação no gene de interesse em cada cultura. Você ficou tão surpreso com os resultados iniciais que repetiu os experimentos para confirmá-los. Ambos os grupos de resultados apresentam grande variabilidade, como mostrado na **Tabela Q5-1**. Assumindo que a taxa de mutação é constante, como você explica essa grande variação nas frequências de células mutantes em culturas diferentes?

Tabela Q5-1 Frequências de células mutantes em múltiplas culturas (Questão 5-5).

	Cultura (células mutantes/10^6 células)									
Experimento	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	4	0	257	1	2	32	0	0	2	1
2	128	0	1	4	0	0	66	5	0	2

5-6 As enzimas de reparo do DNA corrigem, preferencialmente, bases pareadas incorretamente na fita de DNA recém-sintetizada, utilizando a fita original como molde. Se os pareamentos incorretos fossem corrigidos sem levar em conta qual fita atua como molde, o reparo de pareamento incorreto reduziria os erros da replicação? Um sistema de reparo indiscriminado como este resultaria em um número de mutações menor, maior ou igual ao que existiria sem a presença de um sistema de reparo? Explique sua resposta.

5-7 Se a DNA-polimerase requer um iniciador perfeitamente pareado para adicionar o próximo nucleotídeo, como um nucleotídeo pareado incorretamente "escapa" da polimerase e torna-se um substrato para as enzimas de reparo de pareamento incorreto?

5-8 O laboratório no qual você trabalha está pesquisando o ciclo vital de um vírus animal com genoma de DNA de fita dupla circular. Seu projeto é definir a localização da(s) origem(ns) de replicação e determinar de a replicação ocorre em ambas as direções a partir da origem (replicação unidirecional ou bidirecional). Para chegar ao objetivo, você isolou moléculas em replicação, clivou-as com uma endonuclease de restrição que corta o genoma viral em um sítio produzindo uma molécula linear, e analisou as moléculas resultantes em um microscópio eletrônico. Algumas das moléculas observadas estão ilustradas esquematicamente na **Figura Q5-1**. (Observe que é impossível distinguir a orientação de uma molécula de DNA em relação à outra ao microscópio eletrônico.)

Você deve apresentar suas conclusões ao resto do pessoal do laboratório amanhã. Como você responderá as duas questões solicitadas? Há uma única origem de replicação ou são várias? A replicação é unidirecional ou bidirecional?

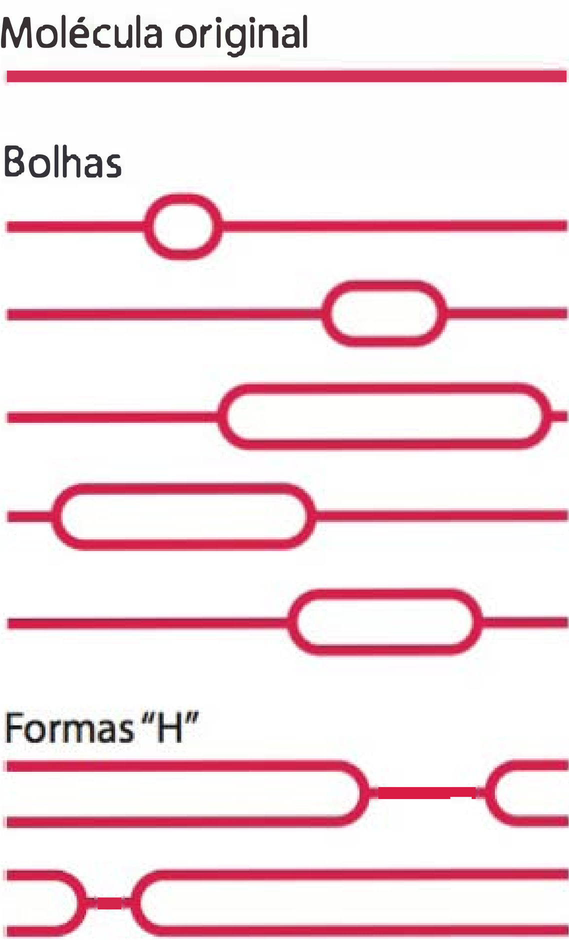


Figura Q5-1 Formas originais e replicantes de um vírus animal (Questão 5-8).

5-9 Se você comparar a frequência das dezesseis sequências de dinucleotídeos possíveis em *E. coli* e em humanos, não existe uma diferença notável, exceto por um dinucleotídeo, 5′-CG-3′. A frequência de dinucleotídeos CG no genoma humano é significativamente menor do que em *E. coli* e significativamente menor do que seria esperado por ocorrência aleatória. Por que, em sua opinião, o dinucleotídeo CG estaria subrepresentado no genoma humano?

5-10 Com o passar do tempo, as células somáticas parecem acumular "cicatrizes" genômicas que resultam do reparo impreciso de quebras na fita dupla pela junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, *nonhomologous end-joining*). Estimativas com base na frequência das quebras em fibroblastos primários sugerem que, aos 70 anos, cada célula somática humana possui mais de 2.000 mutações induzidas pela NHEJ devido ao reparo incorreto. Se essas mutações estivessem distribuídas aleatoriamente no genoma, quantos genes você esperaria que estivessem alterados? Como isso afetaria a função celular? Justifique. (Considere que 2% do genoma – 1,5% codificante e 0,5% regulador – é informação essencial.)

5-11 Desenhe a estrutura da junção de Holliday dupla que resulta da invasão de fitas pelas duas extremidades de uma dúplex quebrada a uma dúplex homóloga intacta, mostrada na **Figura Q5-2**. Marque a extremidade esquerda em cada fita da junção de Holliday 5′ ou 3′ para deixar claro as relações entre as fitas originais e as recombinantes. Indique como a síntese de DNA pode ser usada para preencher em cada fita simples os intervalos da junção de Holliday dupla.



Figura Q5-2 Uma dúplex clivada, com caudas de fita simples, pronta para invadir uma dúplex homóloga intacta (Questão 5-11).

5-12 Por que a recombinação entre sequências repetidas semelhantes porém não-idênticas representa um problema para as células humanas? Como o sistema de reparo de pareamento incorreto protege a célula contra tais eventos de recombinação?

REFERÊNCIAS

Gerais

Biological Response to DNA Damage (2000) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65.

Brown TA (2002) Genomes 2, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W et al (2005) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC: ASM Press.

Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes. Boston: McGraw Hill.

Stent GS (1971) Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco: WH Freeman.

Watson J, Baker T, Bell S et al (2004) Molecular Biology of the Gene, 5th ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Manutenção das sequências de DNA

Cooper GM, Brudno M, Stone ES et al (2004) Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. *Genome Res* 14:539–548.

Crow JF (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature RevGenet* 1:40–47.

Hedges SB (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nature Rev Genet* 3:838–849.

King MC, Wilson AC (1965) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188:107–16.

Mecanismos de replicação do DNA

Alberts B (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92:291–294.

Dillingham MS (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. *Curr Biol* 16:R844–R847.

Indiani C & O'Donnell M (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:751–761.

Kornberg A (1960) Biological synthesis of DNA. *Science* 131:1503–1508.

Li JJ & Kelly TJ (1984) SV40 DNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6973.

Meselson M & Stahl FW (1958)The replication ofDNA in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:671–682.

Modrich P & Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65:101–133.

Mott ML & Berger JM (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nature Rev Microbiol* 5:343–354.

O'Donnell M (2006) Replisome architecture and dynamics in *E. coli*. *J Biol Chem* 281:10653–10656.

Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K et al. (1968) Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:598–605.

Raghuraman MK, Winzeler EA, Collingwood D et al (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294:115–121.

Rao PN & Johnson RT (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225:159.

Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:430–440.

Início e término da replicação do DNA nos cromossomos

Chan SR & Blackburn EH (2004) Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* 359:109–121.

Costa S & Blow JJ (2007) The elusive determinants of replication origins. *EMBO Rep* 8:332–334.

Groth A, Rocha W & Almouzni G (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721–733.

Machida YJ, Hamlin JL & Dutta A (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123:13–24.

O'Donnell M & Kuriyan J (2005) Clamp loaders and replication initiation. *Curr Opin Struct Biol* 16:35–41.

Robinson NP & Bell SD (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J* 272:3757–3766.

Smogorzewska A & de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73:177–208.

Reparo do DNA

Barnes DE, & Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu RevGenet* 38:445–476.

Harrison JC & Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40:209–235.

Heller RC & Marians KJ (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:932–43.

Lieber M, Ma Y et al (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:712–720.

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.

Prakash S & Prakash L (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev*16:1872–1883.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA et al. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39–85.

Svejstrup JQ (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:21–29.

Wyman C & Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363–383.

Recombinação homóloga

Adams MD, McVey M & Sekelsky JJ (2003) *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 299:265–267.

Cox MM (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8173–8180.

Holliday R (1990) The history of the DNA heteroduplex. *BioEssays* 12:133–142.

Lisby M, Bartow JH et al (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118:699–713.

McEachern MJ & Haber JE (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem* 75:111–135.

Michel B, Grompone G et al (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12783–12788.

Szostak JW, Orr-Weaver TK, Rothstein RJ et al (1983) The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33:25–35.

West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:435–445.

Transposição e recombinação sítio-específica conservativa

Campbell AM (1993) Thirty years ago in genetics: prophage insertion into bacterial chromosomes. *Genetics* 133:433–438.

Comfort NC (2001) From controlling elements to transposons: Barbara McClintock and the Nobel Prize. *Trends Biochem Sci* 26:454–457.

Craig NL (1996) Transposition, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp 2339–2362. Washington, DC: ASM Press.

Gottesman M (1999) Bacteriophage lambda: the untold story. *J Mol Biol* 293:177–180.

Grindley ND, Whiteson KL & Rice PA (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 75:567–605.

Varmus H (1988) Retroviruses. *Science* 240:1427–1435.

Zickler D & Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33:603–754.

Como as Células Leem o Genoma: Do DNA à Proteína



Neste capítulo

DO DNA AO RNA 331

DO RNA À PROTEÍNA 366

O MUNDO DE RNA E A ORIGEM DA VIDA 400

Somente ao ser descoberta a estrutura do DNA, no início dos anos de 1950, tornou-se claro como a informação hereditária nas células é codificada nas sequências de nucleotídeos de DNA. Desde então, o progresso tem sido estarrecedor. Cinquenta anos após, dispomos de sequências completas do genoma de muitos organismos, inclusive de seres humanos, e, portanto, conhecemos a quantidade necessária de informação para produzir um organismo complexo como nós mesmos. Os limites da informação hereditária necessária para que exista vida restringem as características bioquímicas e estruturais das células e tornam claro que a biologia não é infinitamente complexa.

Neste capítulo, explicaremos como as células decodificam e usam a informação contida em seus genomas. Veremos que muito tem sido aprendido sobre como as instruções genéticas escritas em um alfabeto de apenas quatro "letras" – os quatro diferentes nucleotídeos do DNA – direcionam a formação de uma bactéria, uma mosca-da-fruta ou um ser humano. No entanto, se ainda temos muito a descobrir sobre como a informação armazenada no genoma de um organismo é capaz de produzir mesmo o mais simples organismo unicelular bacteriano, o qual contém 500 genes, o que não dizer do desenvolvimento de um ser humano com aproximadamente 25.000 genes. Ainda desconhecemos uma enorme quantidade de informações; portanto, muitos desafios fascinantes aguardam as próximas gerações de biólogos celulares.

Os problemas que as células enfrentam na decodificação dos genomas podem ser apreciados ao se considerar uma pequena porção do genoma da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (**Figura 6-1**). Grande parte da informação codificada no DNA presente nesse e em outros genomas é usada para especificar a ordem linear – a sequência – de aminoácidos de cada proteína que o organismo sintetiza. Como foi descrito no Capítulo 3, a sequência de aminoácidos, por sua vez, dita como cada proteína será dobrada para produzir uma molécula com forma e estrutura química características. Quando uma proteína específica é sintetizada pela célula, a região correspondente do genoma deve ser adequadamente decodificada. Informações adicionais codificadas no genoma de DNA determinam exatamente quando na vida de um organismo e em quais tipos celulares cada gene será expresso sob a forma de proteína. Considerando que as proteínas são os principais constituintes das células, a decodificação do genoma determina não somente o tamanho, a forma, as propriedades bioquímicas e o comportamento das células, mas também as características típicas de cada espécie na Terra.

Poderíamos ter predito que a informação presente nos genomas estaria organizada de forma ordenada, semelhante a um dicionário ou uma lista telefônica. Embora os genomas de algumas bactérias pareçam ser relativamente bem-organizados, os genomas da maioria dos organismos multicelulares, como o da *Drosophila* anteriormente citada, apresentam-se surpreendentemente desordenados. Pequenas porções de DNA codificante (isto é, DNA que codifica para uma proteína) estão separadas por grandes blocos de DNA aparentemente sem sentido. Algumas regiões do genoma contêm muitos genes, e outras carecem inteiramente de genes. Mesmo proteínas que funcionam intimamente unidas na célula frequentemente têm seus genes localizados em diferentes cromossomos, e genes adjacentes codificam proteínas que apresentam pouca relação na célula. Portanto, decodificar genomas não é uma tarefa simples. Mesmo com a ajuda de bons computadores, ainda é bastante difícil para os pesquisadores definir com exatidão o início e o final dos genes na sequência de DNA de genomas complexos, sendo muito mais difícil ainda prever quando cada gene será expresso durante a vida de um organismo. Embora a sequência de DNA do genoma humano seja conhecida, ainda será necessário pelo menos uma década para que possamos identificar todos os genes e determinar a sequência exata de aminoácidos das proteínas que esses genes produzem. Interessantemente, as células no nosso organismo fazem essas definições milhares de vezes a cada segundo.



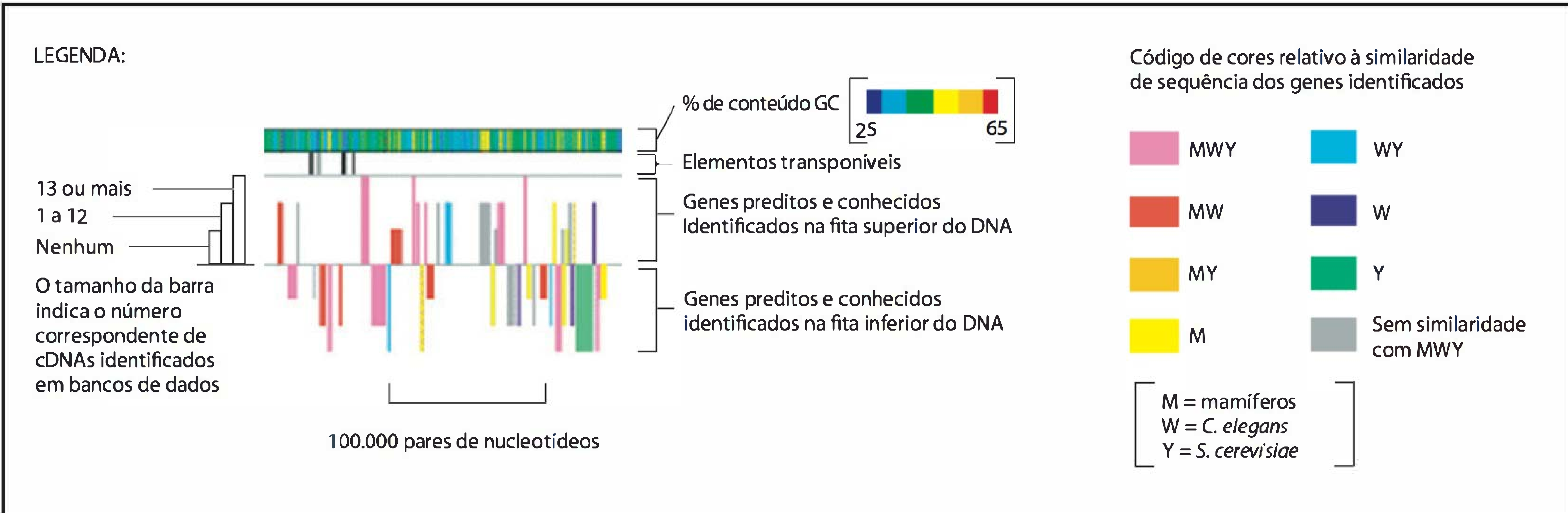

LEGENDA:
% de conteúdo GC
25
65
Elementos transponíveis
13 ou mais
1 a 12
Nenhum
O tamanho da barra indica o número correspondente de cDNAs identificados em bancos de dados
Genes preditos e conhecidos identificados na fita superior do DNA
Genes preditos e conhecidos identificados na fita inferior do DNA
100.000 pares de nucleotídeos
Código de cores relativo à similaridade de sequência dos genes identificados
MWY
WY
MW
W
MY
Y
M
Sem similaridade com MWY
M = mamíferos
W = C. elegans
Y = S. cerevisiae

Figura 6-1 (*página anterior*) **Representação esquemática de uma porção do cromossomo 2 do genoma da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*.** Esta figura representa aproximadamente 3% do genoma total de *Drosophila*, organizado em seis segmentos contínuos. Como resumido na legenda, os símbolos representados são: *linhas verticais pretas* de espessuras variadas: posição de elementos transponíveis, com barras mais grossas indicando grupos de elementos; *quadros coloridos*: genes (tanto genes conhecidos como genes propostos) codificados em uma fita de DNA (quadros *acima* da linha central) e genes codificados na outra fita (quadros *abaixo* da linha central). O comprimento de cada gene proposto inclui tanto os seus éxons (DNA que codifica para proteína) quanto seus íntrons (DNA não-codificante) (ver Figura 4-15); a altura de cada quadro do gene é proporcional ao número de cDNAs encontrados em diferentes bases de dados que apresentam similaridade com o gene. (Como descrito no Capítulo 8, os cDNAs são DNAs copiados a partir de moléculas de mRNA, e grandes coleções de sequências nucleotídicas de cDNAs têm sido depositadas em diversas bases de dados. Quanto maior o número de pareamentos previstos entre as sequências de nucleotídeos de cDNAs e o gene proposto em particular, maior é a possibilidade de que este gene proposto seja transcrito em RNA, constituindo-se, assim, em um gene de fato.) A cor de cada quadro gênico indica se um gene intimamente relacionado está descrito em outros organismos. Por exemplo, MWY significa que o gene possui homólogos em mamíferos, no nematódeo *Caenorhabditis elegans* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. MW indica que o gene tem homólogos em mamíferos e no verme, mas não em levedura. A *barra em arco-íris* indica o percentual G-C; entre diversos genomas diferentes, este percentual apresenta grande diversidade regional, sendo que sua origem e seu significado ainda não estão determinados (De M. D. Adams et al., *Science* 287: 2185-2195, 2000. Com permissão de AAAS.)

O DNA genômico não direciona a síntese proteica diretamente, mas utiliza o RNA como uma molécula intermediária. Quando a célula necessita de uma proteína específica, a sequência de nucleotídeos da região apropriada de uma molécula de DNA imensamente longa em um cromossomo é inicialmente copiada sob a forma de RNA (por meio de um processo denominado *transcrição*). São estas cópias de RNA de segmentos de DNA que são usadas diretamente como moldes para direcionar a síntese da proteína (em um processo denominado *tradução*). O fluxo de informação genética nas células é, portanto, de DNA para RNA para proteína (**Figura 6-2**). Todas as células, desde a bactéria até seres humanos, expressam sua informação genética dessa maneira – um princípio tão fundamental que é denominado o *dogma central* da biologia molecular.

Apesar da universalidade do dogma central, existem variações importantes de como a informação flui do DNA para a proteína. A principal delas é que os transcritos de RNA em células eucarióticas são submetidos a uma série de etapas de processamento no núcleo, incluindo o *splicing* do RNA, antes que se permita sua saída do núcleo e sua tradução em proteína. Tais etapas de processamento podem modificar substancialmente o "significado" de uma molécula de RNA e são, portanto, cruciais para a compreensão de como as células eucarióticas leem o genoma. Finalmente, embora nosso enfoque neste capítulo seja a produção das proteínas codificadas pelo genoma, veremos que, no caso de diversos genes, o RNA é o produto final. Assim como as proteínas, muitos desses RNAs se dobram de acordo com estruturas tridimensionais precisas e apresentam funções estruturais, catalíticas e reguladoras na célula.

Começamos este capítulo com o primeiro passo da decodificação de um genoma: o processo de transcrição por meio do qual uma molécula de RNA é produzida a partir do DNA de um gene. Seguiremos então o destino dessa molécula de RNA através da célula, finalizando quando uma molécula proteica corretamente dobrada tiver sido formada. No final do capítulo, consideraremos como esse esquema atual bastante complexo de armazenamento, transcrição e tradução da informação pode ter se originado a partir de sistemas mais simples nos estágios iniciais da evolução celular.

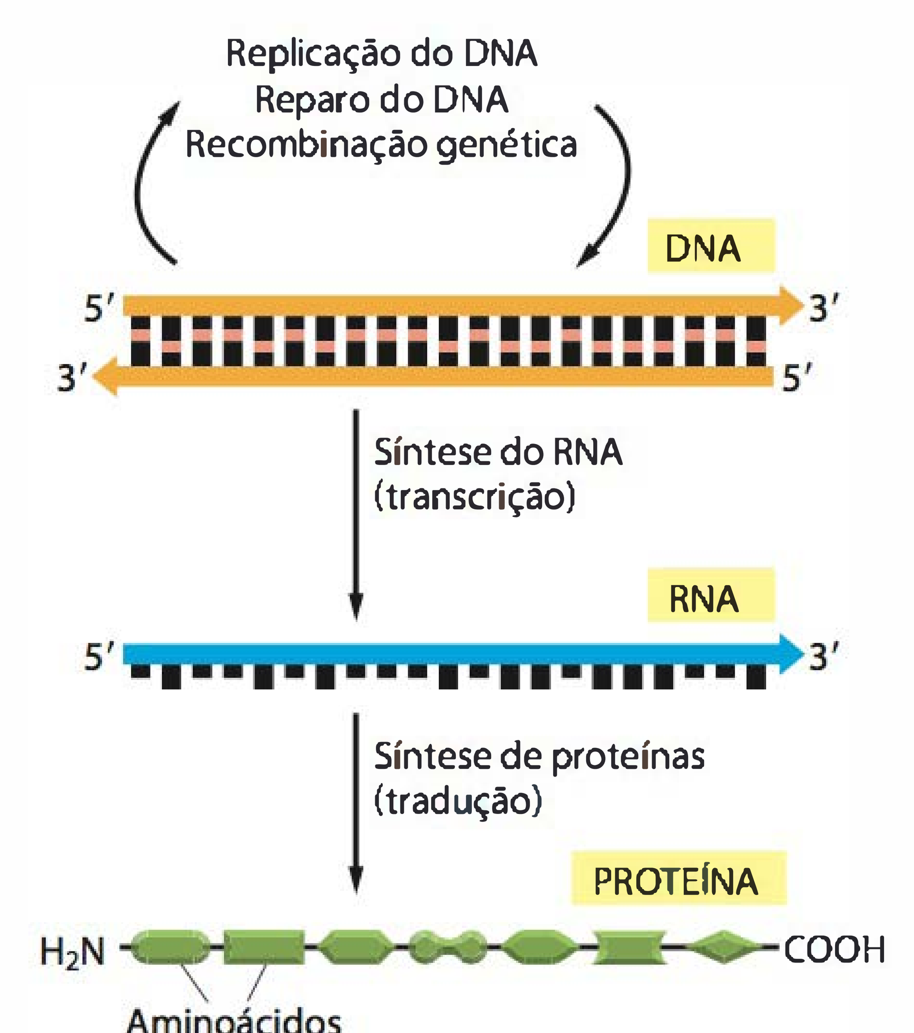


Figura 6-2 **A via do DNA à proteína.** O fluxo de informação genética do DNA ao RNA (transcrição) e do RNA à proteína (tradução) ocorre em todas as células vivas.

DO DNA AO RNA

A transcrição e a tradução são os meios pelos quais as células leem, ou expressam, as instruções genéticas de seus genes. Como muitas cópias idênticas de RNA podem ser produzidas a partir do mesmo gene, e como cada molécula de RNA pode direcionar a síntese de várias moléculas idênticas de proteína, as células podem, quando necessário, sintetizar rapidamente uma grande quantidade de proteína. Porém, cada gene também pode ser transcrito e traduzido sob taxas diferentes, permitindo que a célula faça enormes quantidades de certas proteínas e mínimas quantidades de outras (**Figura 6-3**). Além disso, como veremos no próximo capítulo, uma célula pode alterar (ou regular) a expressão de cada um de seus genes de acordo com as necessidades do momento – na maioria das vezes, pelo controle da produção de seus RNAs.

O RNA é transcrito a partir de porções de sequências de DNA

O primeiro passo executado pela célula para ler a informação necessária a partir de suas instruções genéticas é a cópia de uma parcela específica da sequência de nucleotídeos do

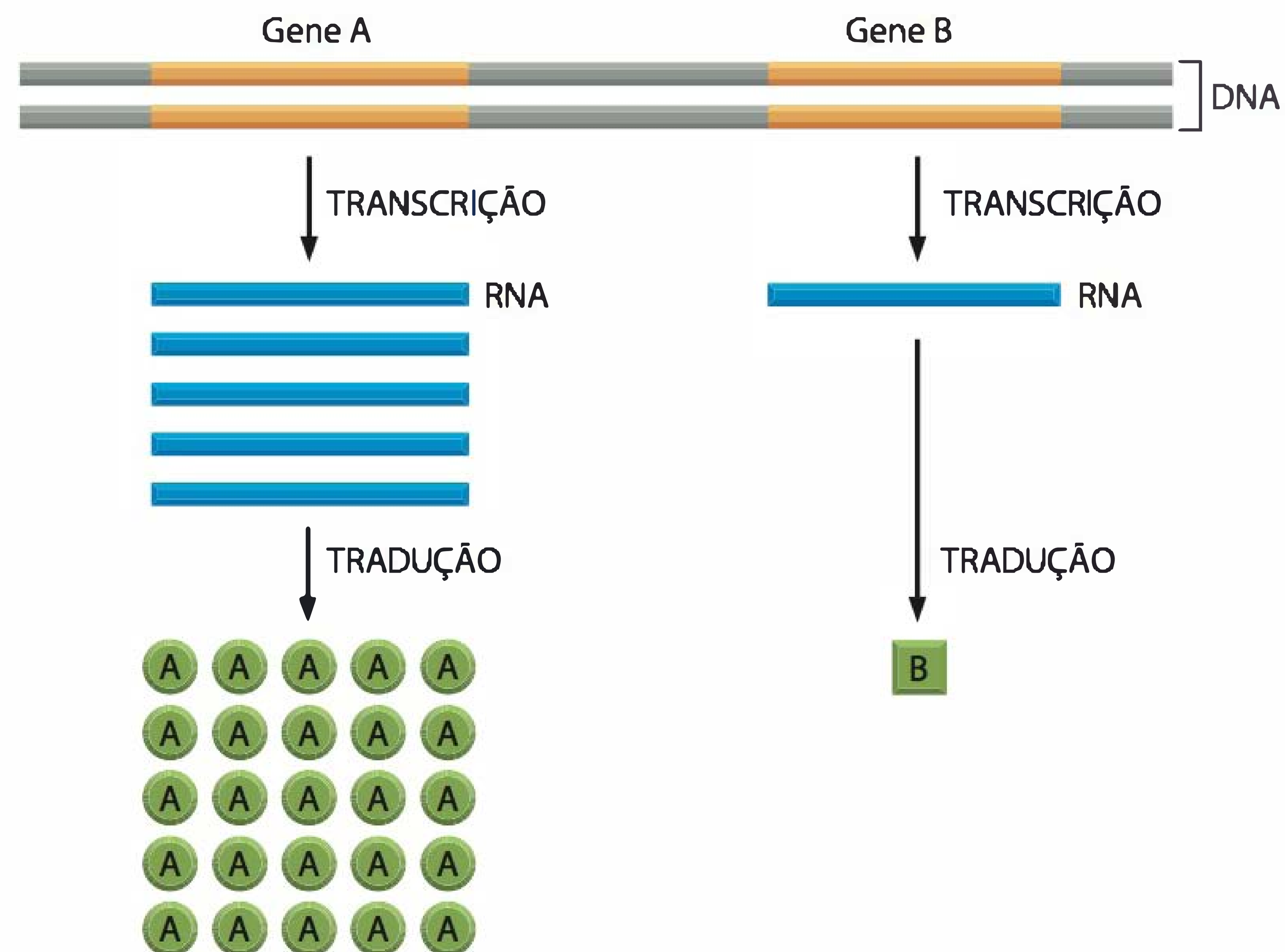


Figura 6-3 Os genes podem ser expressos com diferentes eficiências. Neste exemplo, o gene A é transcrito e traduzido de forma muito mais eficiente do que o gene B. Isso permite que a quantidade de proteína A na célula seja muito maior do que a quantidade de proteína B.

DNA – um gene – sob a forma de uma sequência de nucleotídeos de RNA. A informação na forma de RNA, embora copiada em uma forma química distinta, ainda é escrita essencialmente na mesma linguagem do DNA – a linguagem de uma sequência de nucleotídeos, por isso o nome de **transcrição**.

Assim como o DNA, o RNA é um polímero linear composto de quatro tipos diferentes de subunidades nucleotídicas unidas entre si por ligações fosfodiéster (**Figura 6-4**). O RNA difere quimicamente do DNA em dois aspectos: (1) os nucleotídeos do RNA são *ribonucleotídeos* – isto é, eles contêm o açúcar ribose (de onde vem o nome ácido *ribo*nucleico) em vez de desoxirribose; (2) embora, assim como o DNA, o RNA contenha as bases adenina (A), guanina (G) e citosina (C), ele contém a base uracila (U), em vez da timina (T), que ocorre no DNA. Uma vez que U, assim como T, pode formar pares pelo estabelecimento de ligações

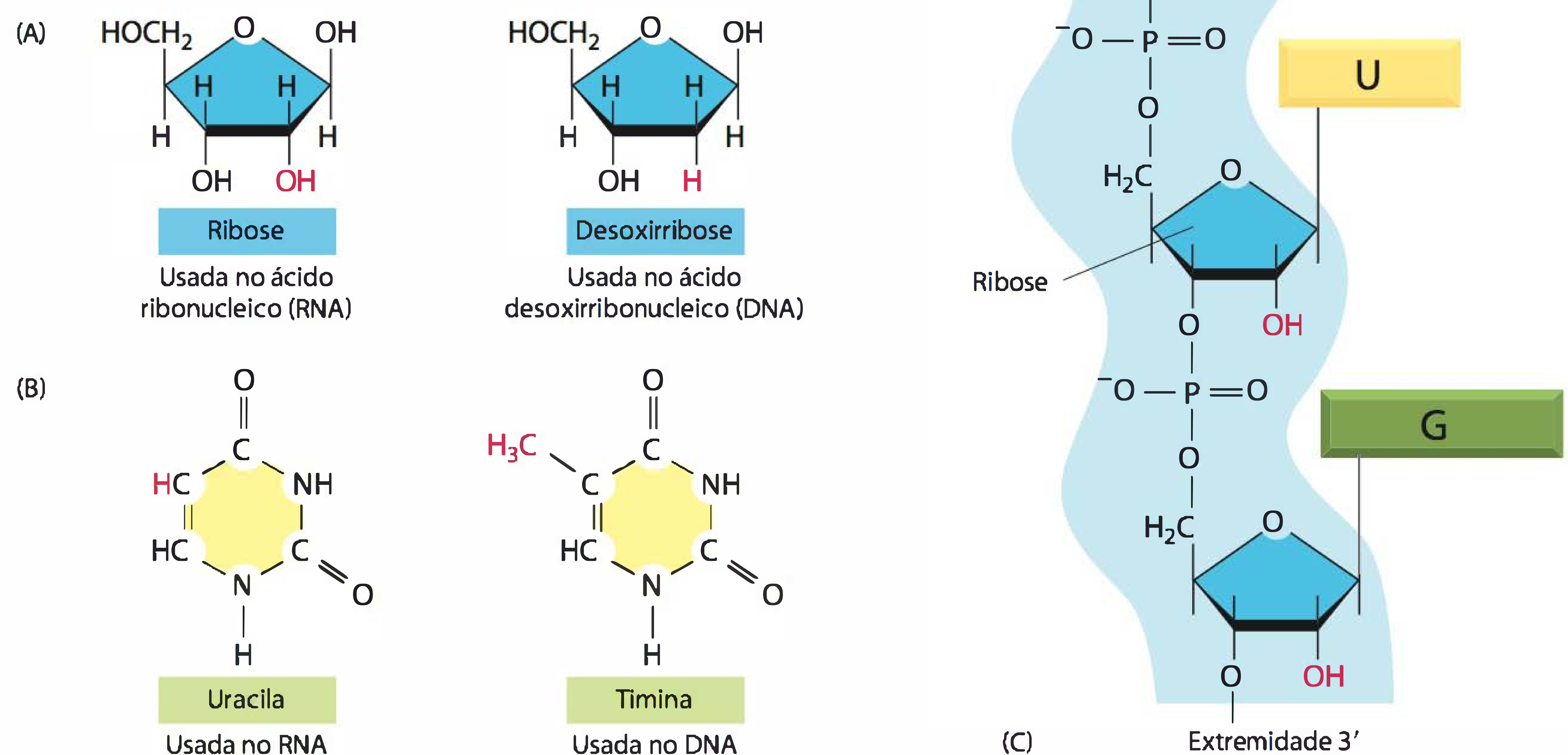


Figura 6-4 Estrutura química do RNA. (A) O RNA contém o açúcar ribose, o qual difere da desoxirribose, o açúcar utilizado no DNA, pela presença de um agrupamento –OH adicional. (B) O RNA contém a base uracila, a qual difere da timina, a base equivalente no DNA, pela ausência de um grupo $-CH_3$. (C) Um pequeno fragmento de RNA. A ligação química fosfodiéster entre nucleotídeos no RNA é a mesma que ocorre no DNA.

de hidrogênio com A (**Figura 6-5**), as propriedades de complementaridade por pareamento de bases descritas para o DNA nos Capítulos 4 e 5 também se aplicam ao RNA (no RNA, G forma pares com C, e A forma pares com U). No entanto, é possível encontrar outros tipos de pareamento de bases no RNA: por exemplo, G ocasionalmente forma pares com U.

Apesar dessas diferenças químicas serem pequenas, o DNA e o RNA diferem drasticamente em termos de estrutura geral. Enquanto o DNA sempre ocorre nas células sob a forma de uma hélice de fita dupla, o RNA se apresenta como fita simples. Assim, as cadeias de RNA podem dobrar-se sob diversas formas, similarmente ao que ocorre com uma cadeia de polipeptídeos que estrutura a conformação final de uma proteína (**Figura 6-6**). Como veremos posteriormente neste capítulo, a capacidade de dobrar-se em formas tridimensionais complexas permite que algumas moléculas de RNA desempenhem funções estruturais e catalíticas.

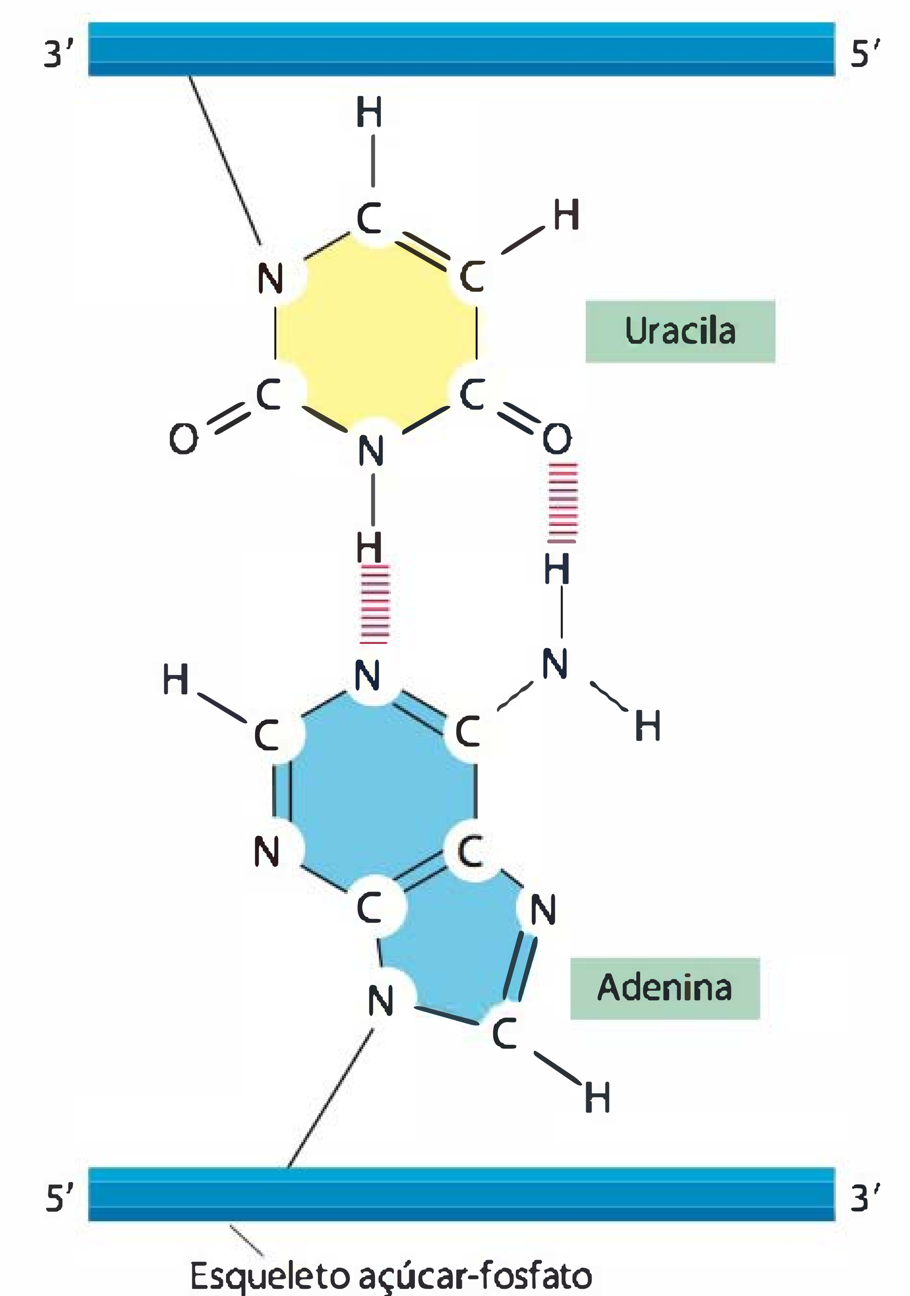


Figura 6-5 A uracila forma pares de bases com a adenina. A ausência de um grupo metil em U não tem efeito no pareamento de bases; assim, os pares de bases U-A assemelham-se muito aos pares de bases T-A (ver Figura 4-4).

A transcrição produz um RNA complementar a uma das fitas do DNA

Todo o RNA de uma célula é produzido a partir da transcrição de DNA, em um processo que apresenta certas similaridades em relação ao processo de replicação do DNA, discutido no Capítulo 5. A transcrição começa com a abertura e a desespiralização de uma pequena porção da dupla-hélice de DNA, o que expõe as bases em cada fita de DNA. Uma das duas fitas da dupla-hélice de DNA, então, age como um molde para a síntese de uma molécula de RNA. Assim como na replicação de DNA, a sequência de nucleotídeos da cadeia de RNA é determinada pela complementaridade do pareamento de bases entre os nucleotídeos a serem incorporados e o DNA-molde. Quando um pareamento adequado é estabelecido, o ribonucleotídeo a ser incorporado é covalentemente ligado à cadeia de RNA em formação, por meio de uma reação catalisada enzimaticamente. A cadeia de RNA produzida por transcrição – o *transcrito* – é, a seguir, aumentada um nucleotídeo por vez e possui uma sequência de nucleotídeos exatamente complementar à fita de DNA utilizada como molde (**Figura 6-7**).

No entanto, a transcrição difere da replicação de DNA em vários aspectos importantes. Diferentemente de uma fita de DNA recém-formada, a fita de RNA não permanece ligada por ligações de hidrogênio à fita de DNA-molde. Em um ponto situado imediatamente após a região onde os ribonucleotídeos foram adicionados, a cadeia de RNA é deslocada, e a héli-

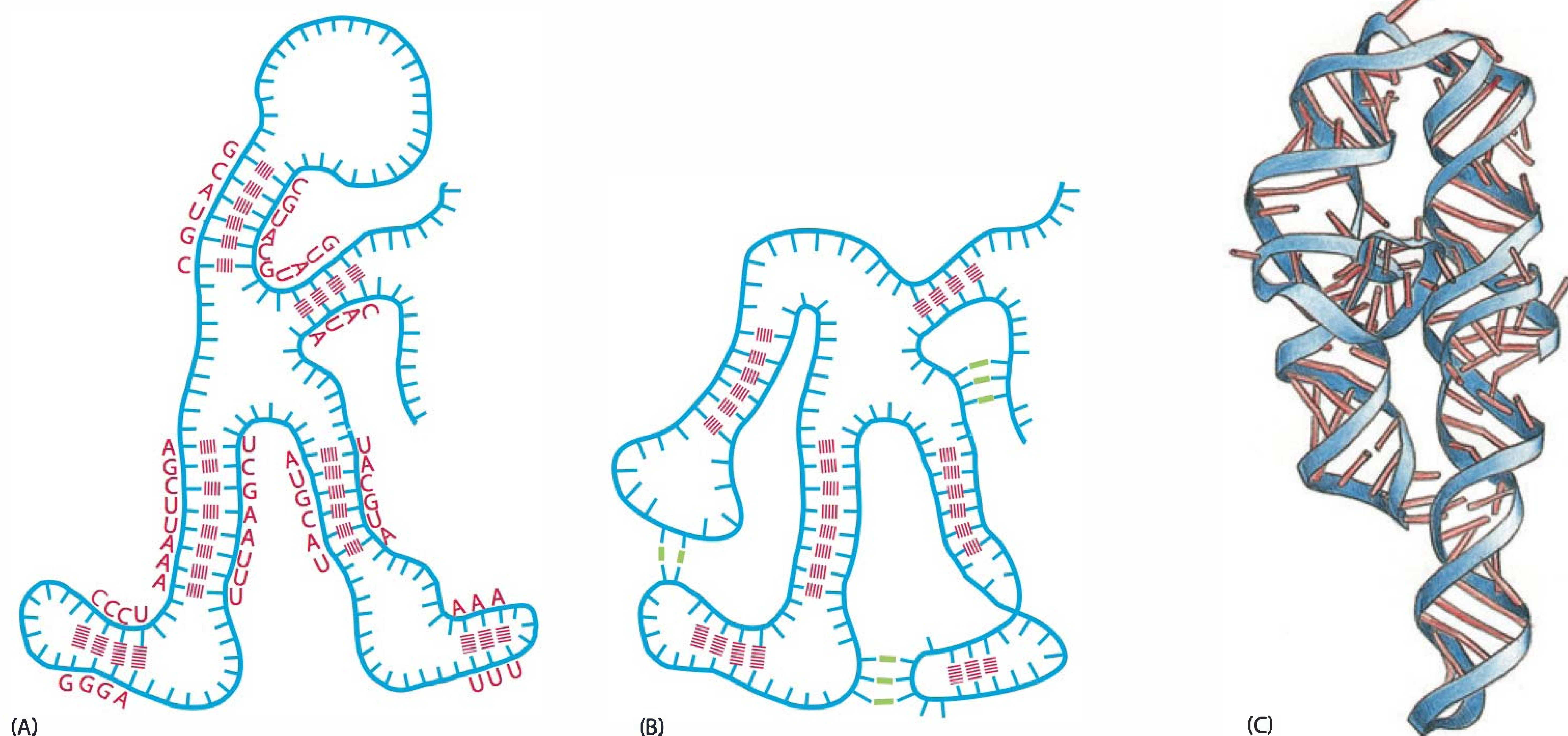


Figura 6-6 O RNA pode dobrar-se, formando estruturas específicas. O RNA é principalmente de fita simples, mas com frequência contém pequenos segmentos de nucleotídeos que podem formar pareamento convencional com sequências complementares encontradas em outras regiões da mesma molécula. Tais interações, juntamente a pareamentos "não-convencionais" adicionais, permitem a uma molécula de RNA dobrar-se sobre si mesma, formando uma estrutura tridimensional determinada por sua sequência de nucleotídeos. (A) Diagrama de uma estrutura de RNA dobrada, ilustrando somente interações convencionais entre pares de bases; (B) estrutura com ambos os tipos de pareamento, convencionais (*vermelho*) e não-convencionais (*verde*); (C) estrutura de um RNA real, um segmento de um íntron do grupo I (ver Figura 6-36). Cada pareamento convencional é indicado por um "traço" na dupla-hélice. As bases em outras configurações estão indicadas por traços quebrados.

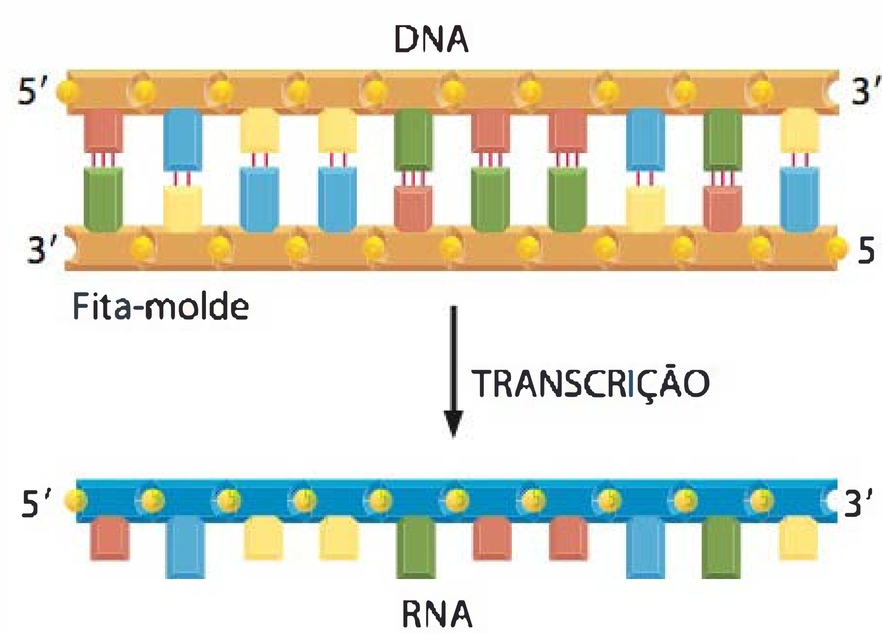


Figura 6-7 A transcrição do DNA produz uma molécula de RNA de fita simples que é complementar a uma das fitas do DNA.

ce de DNA se reassocia. Assim, as moléculas de RNA produzidas pela transcrição são liberadas do DNA-molde sob a forma de fita simples. Além disso, como esses RNAs são copiados unicamente de uma região definida do DNA, as moléculas de RNA são muito menores que as moléculas de DNA. Uma molécula de DNA em um cromossomo humano pode chegar a 250 milhões de pares de nucleotídeos de comprimento, enquanto que a maioria dos RNAs não tem comprimento superior a alguns milhares de nucleotídeos, e muitos RNAs são mesmo consideravelmente menores.

As enzimas que realizam a transcrição são denominadas **RNA-polimerases**. Assim como a DNA-polimerase catalisa a replicação do DNA (discutido no Capítulo 5), as RNA-polimerases catalisam a formação de ligações fosfodiéster que conectam os nucleotídeos entre si formando uma cadeia linear. A RNA-polimerase move-se paulatinamente sobre o DNA, desespiralizando a dupla-hélice à frente do sítio ativo de polimerização e, assim, expondo uma nova região da fita-molde para o pareamento de bases por complementaridade. Dessa maneira, a cadeia de RNA em formação é estendida em um nucleotídeo por vez na direção de 5′ para 3′ (**Figura 6-8**). Os substratos são trifosfatos de nucleosídeo (ATP, CTP, UTP e GTP); assim como acontece na replicação do DNA, a hidrólise de ligações altamente energéticas fornece a energia necessária para impulsionar a reação (ver Figura 5-4).

A liberação quase imediata da fita de RNA do DNA, à medida que a primeira está sendo sintetizada, significa que muitas cópias de RNA podem ser produzidas a partir do mesmo gene em um período de tempo relativamente pequeno; a síntese de moléculas de RNA adicionais pode ser iniciada antes que a primeira fita de RNA tenha sido finalizada (**Figura 6-9**). Quando várias moléculas de RNA-polimerase usam a mesma região como molde, deixando um pequeno intervalo entre si, cada uma sintetizando aproximadamente 20 nucleotídeos/segundo (a velocidade em eucariotos), mais de mil transcritos podem ser sintetizados em uma hora a partir de um único gene.

Apesar de a RNA-polimerase catalisar essencialmente a mesma reação química que a DNA-polimerase, existem algumas diferenças importantes entre essas duas enzimas. Primeiro, e mais óbvio, a RNA-polimerase catalisa a ligação de ribonucleotídeos, e não de desoxirribonucleotídeos. Segundo, ao contrário das DNA polimerases envolvidas na replicação de DNA, as RNA-polimerases podem começar a síntese de uma cadeia de RNA sem um iniciador. Essa diferença pode acontecer porque a transcrição não necessita ser tão exata quanto a replicação de DNA (ver Tabela 5-1, p. 271). O RNA, diferentemente do DNA, não estoca a informação genética permanentemente nas células. As RNA-polimerases incorrem em aproximadamente um erro a cada 10^4 nucleotídeos copiados no RNA (comparado com

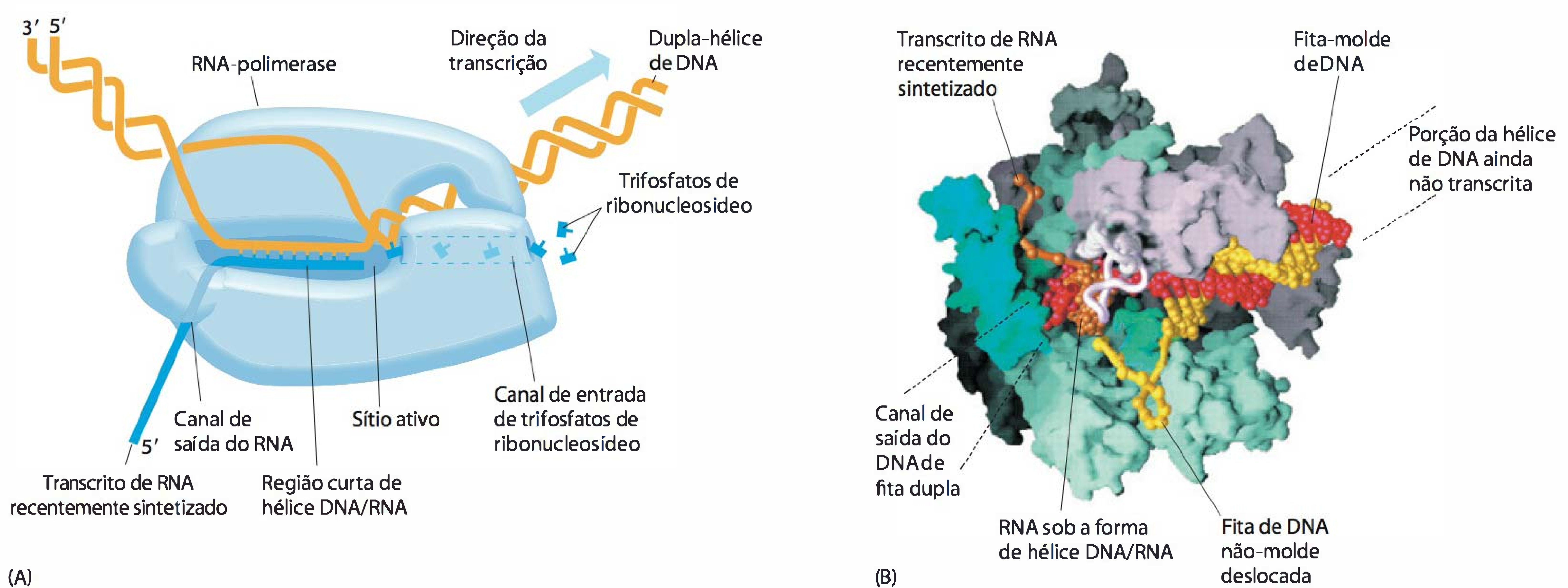


Figura 6-8 O DNA é transcrito pela enzima RNA-polimerase. (A) A RNA-polimerase (*azul-claro*) move-se paulatinamente ao longo do DNA, desespiralizando, em seu sítio ativo, a hélice de DNA. Conforme avança, a polimerase adiciona nucleotídeos (aqui, *pequenos objetos na forma de "T"*), um a um, à cadeia de RNA, no sítio de polimerização, usando uma fita de DNA exposta como molde. O RNA transcrito é, consequentemente, uma cópia complementar de fita simples de uma das duas fitas do DNA. Uma região curta de hélice DNA/RNA (de aproximadamente nove nucleotídeos) é, portanto, formada temporariamente, e uma "janela" da hélice DNA/RNA move-se ao longo do DNA com a polimerase. Os nucleotídeos a serem incorporados estão na forma de trifosfatos de ribonucleosídeo (ATP, UTP, CTP e GTP), e a energia estocada em suas ligações fosfato-fosfato fornece a força necessária para a reação de polimerização (ver Figura 5-4). (B) A estrutura de uma RNA-polimerase bacteriana, determinada por cristalografia de raios X. Quatro subunidades diferentes, indicadas por cores distintas, formam esta RNA-polimerase. A fita de DNA usada como molde está indicada em *vermelho* e a fita que não atua como molde, em *amarelo*. (A, Adaptada da figura gentilmente fornecida por Robert Landick; B, cortesia de Seth Darst.)

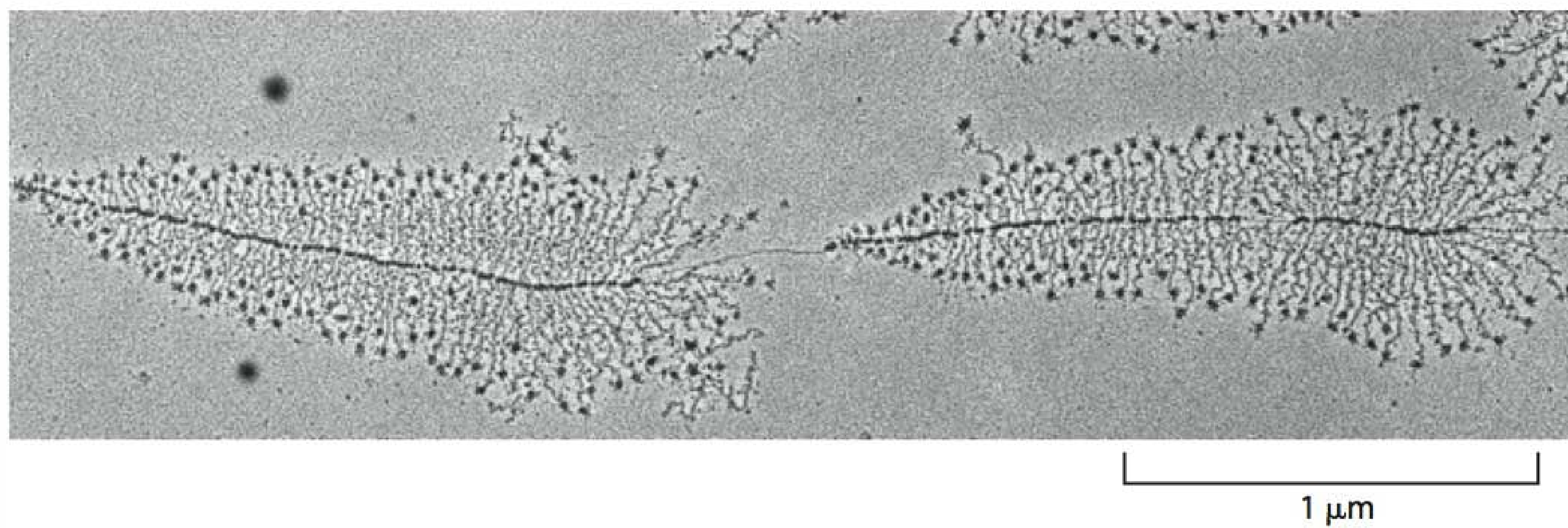


Figura 6-9 Transcrição de dois genes como visualizada sob microscópio eletrônico. A microfotografia mostra diversas moléculas de RNA-polimerase transcrevendo simultaneamente dois genes adjacentes. As moléculas de RNA-polimerase são visíveis como uma série de pontos ao longo do DNA, com os transcritos recentemente sintetizados (filamentos finos) ligados a elas. As moléculas de RNA (RNAs ribossomais) mostradas nesse exemplo não são traduzidas em proteína, sendo utilizadas diretamente como componentes dos ribossomos, as máquinas em que a tradução ocorre. Acredita-se que as partículas na extremidade 5′ (a extremidade livre) de cada rRNA transcrito representem o início da associação de ribossomos. A partir do comprimento dos transcritos recentemente sintetizados, pode-se deduzir que as moléculas de RNA-polimerase estão transcrevendo da esquerda para a direita. (Cortesia de Ulrich Scheer.)

uma taxa de erro de cópia direta da DNA-polimerase de aproximadamente um em cada 10^7 nucleotídeos), e as consequências de um erro na transcrição do RNA são muito menos significativas do que aquelas na replicação do DNA.

Embora as RNA-polimerases não sejam tão exatas quanto as DNA-polimerases que replicam DNA, elas têm um pequeno mecanismo de correção. Se um ribonucleotídeo incorreto for adicionado à cadeia de RNA em formação, a polimerase pode retornar, e o sítio ativo da enzima pode realizar uma reação de excisão semelhante ao procedimento reverso da reação de polimerização, exceto que será utilizada água em vez de pirofosfato e um monofosfato de nucleosídeo é liberado.

Considerando-se que tanto as DNA-polimerases quanto as RNA-polimerases realizam polimerização dependente de molde, seria esperado que esses dois tipos de enzimas fossem estruturalmente relacionados. No entanto, estudos de cristalografia por raios X em ambos os tipos de enzimas revelaram que, com exceção do fato de possuírem um íon Mg^{2+} essencial no sítio catalítico, elas são praticamente não-relacionadas; na verdade, foi sugerido que as enzimas polimerizadoras de nucleotídeos, dependentes de molde, tenham surgido de forma independente duas vezes ao longo da evolução das células. Uma linhagem deu origem às DNA-polimerases modernas e às transcriptases reversas discutidas no Capítulo 5, bem como umas poucas RNA-polimerases virais de uma única subunidade. A outra linhagem resultou em todas as RNA-polimerases celulares atuais (**Figura 6-10**), as quais serão discutidas neste capítulo.

As células produzem diversos tipos de RNA

A maioria dos genes carreados no DNA das células especifica a sequência de aminoácidos de proteínas; as moléculas de RNA que são copiadas a partir desses genes (e que definem a síntese de proteínas) são chamadas de moléculas de **RNA mensageiro** (**mRNA**). O produto

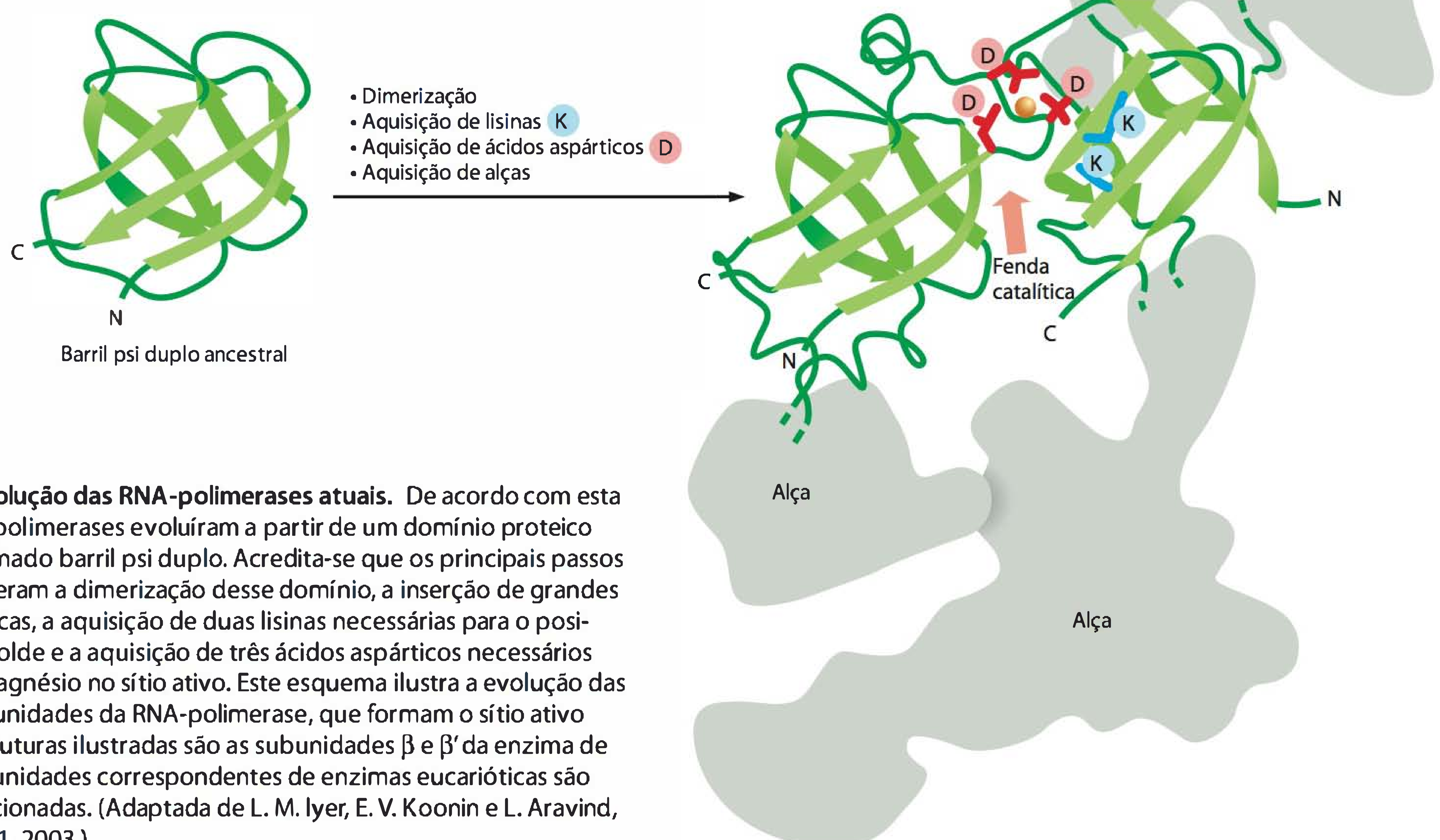


Figura 6-10 A evolução das RNA-polimerases atuais. De acordo com esta hipótese, as RNA-polimerases evoluíram a partir de um domínio proteico ancestral, denominado barril psi duplo. Acredita-se que os principais passos evolutivos envolveram a dimerização desse domínio, a inserção de grandes "alças" polipeptídicas, a aquisição de duas lisinas necessárias para o posicionamento do molde e a aquisição de três ácidos aspárticos necessários para quelar um magnésio no sítio ativo. Este esquema ilustra a evolução das duas maiores subunidades da RNA-polimerase, que formam o sítio ativo da enzima. As estruturas ilustradas são as subunidades β e β′ da enzima de *E. coli*, mas as subunidades correspondentes de enzimas eucarióticas são intimamente relacionadas. (Adaptada de L. M. Iyer, E. V. Koonin e L. Aravind, *BMC Struct. Biol.* 3:1, 2003.)

final de uma minoria de genes, entretanto, é o próprio RNA. As análises minuciosas da sequência completa de DNA do genoma da levedura *S. cerevisiae* identificaram mais de 750 genes (pouco mais do que 10% do número total de genes de levedura) que produzem RNA como produto final. Tais RNAs, assim como as proteínas, servem como componentes estruturais e enzimáticos para uma ampla gama de processos na célula. No Capítulo 5 abordamos um desses RNAs, o molde carregado pela enzima telomerase. Apesar de vários desses RNAs não-codificantes ainda estarem cobertos por um certo mistério, veremos neste capítulo que algumas moléculas de *pequenos RNAs nucleares* (*snRNA, small nuclear RNA*) direcionam o *splicing* (excisão de íntrons) do pré-RNA para formar o mRNA, que moléculas de *RNA ribossomal* (*rRNA*) formam o cerne dos ribossomos e que moléculas de *RNA transportador* (*tRNA*) formam os adaptadores que selecionam aminoácidos e os colocam no local adequado nos ribossomos para serem incorporados em proteínas. Finalmente, veremos no Capítulo 7 que moléculas de *microRNAs* (*miRNAs*) e moléculas de *pequenos RNAs de interferência* (*siRNA, small interfering RNA*) atuam como reguladores-chave na expressão de genes eucarióticos (**Tabela 6-1**).

Cada segmento transcrito de DNA é chamado de *unidade de transcrição*. Nos eucariotos, uma unidade de transcrição tipicamente carrega a informação de apenas um gene e, portanto, codifica ou para uma única molécula de RNA, ou para uma única proteína (ou grupo de proteínas relacionadas, se o transcrito de RNA inicial for processado de diferentes maneiras para produzir diferentes mRNA). Em bactérias, um conjunto de genes adjacentes frequentemente é transcrito como uma unidade e a molécula de mRNA resultante carrega, assim, a informação para várias proteínas distintas.

No total, o RNA representa uma pequena porcentagem do peso seco de uma célula. A maioria do RNA nas células é rRNA; o mRNA representa somente de 3 a 5% do RNA total em uma célula típica de mamíferos. A população de mRNA é composta por dezenas de milhares de diferentes tipos, existindo em média apenas 10 a 15 moléculas de cada tipo de mRNA em cada célula.

Os sinais codificados no DNA indicam à RNA-polimerase onde iniciar e onde terminar

Para transcrever um gene com precisão, a RNA-polimerase deve reconhecer onde ele inicia e termina no genoma. A maneira pela qual as RNA-polimerases desempenham essa tarefa difere entre bactérias e eucariotos. Como o processo em bactérias é mais simples, será visto primeiro.

A iniciação da transcrição é um passo extremamente importante na expressão de um gene, pois este é o ponto principal onde a célula regula quais as proteínas que devem ser produzidas, e em qual frequência. A RNA-polimerase bacteriana é um complexo de múltiplas subunidades que sintetiza RNA a partir de um molde de DNA. Uma subunidade destacável, denominada *fator sigma* (σ), se associa ao cerne da enzima e auxilia na leitura dos

Tabela 6-1 Principais tipos de RNA produzidos nas células

Tipo de RNA	Função
mRNAs	RNAs mensageiros, codificam proteínas.
rRNAs	RNAs ribossomais, formam a estrutura básica do ribossomo e catalisam a síntese proteica.
tRNAs	RNAs transportadores, elementos essenciais para a síntese proteica, funcionando como adaptadores entre o mRNA e os aminoácidos.
snRNAs	pequenos RNAs nucleares, atuam em uma série de processos nucleares, incluindo o *splicing* do pré-mRNA.
snoRNAs	Pequenos RNAs nucleolares, utilizados para processar e modificar quimicamente os rRNAs.
scaRNAs	Pequenos RNAs de Cajal, usados para modificar snoRNAs e snRNAs.
miRNAs	microRNAs, regulam a expressão gênica tipicamente pelo bloqueio da tradução de mRNAs selecionados.
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência, desligam a expressão de genes pela degradação direta de mRNAs selecionados e pelo estabelecimento de estruturas de cromatina compacta.
Outros RNAs não-codificantes	Atuam em diversos processos celulares, incluindo a síntese de telômeros, a inativação do cromossomo X e o transporte de proteínas para o retículo endoplasmático.

sinais no DNA que indicam onde iniciar a transcrição (**Figura 6-11**). Em conjunto, a enzima base e o fator σ são denominados **holoenzima RNA-polimerase**; esse complexo adere apenas fracamente ao DNA bacteriano quando colide com ele, e uma holoenzima desliza rapidamente ao longo da molécula de DNA até dissociar-se novamente. Entretanto, quando a holoenzima polimerase desliza em uma região de dupla-hélice de DNA denominada **promotor**, uma sequência especial de nucleotídeos indicando o ponto inicial para a síntese de RNA, a polimerase se liga firmemente ao DNA. A holoenzima polimerase, através de seu fator σ, reconhece a sequência de DNA promotor pelo estabelecimento de contatos específicos com porções de bases que estão expostas na face externa da hélice (passo 1 na Figura 6-11).

Após a RNA-polimerase se ligar fortemente ao DNA promotor, conforme descrito, ela abre a dupla-hélice para expor uma pequena extensão de nucleotídeos em cada fita (passo 2 na Figura 6-11). Diferentemente da reação de uma DNA-helicase (ver Figura 5-14), esta abertura limitada da hélice não necessita de energia de hidrólise de ATP. Em vez disso, tanto a polimerase quanto o DNA sofrem modificações estruturais reversíveis, que resultam em um estado energeticamente mais favorável em comparação ao estado de ligação inicial. Com o DNA desespiralizado, uma das duas fitas de DNA expostas age como um molde para a complementaridade por pareamento de bases com ribonucleotídeos que são incorporados, dois dos quais são unidos pela polimerase para dar início a uma cadeia de RNA (passo 3 na Figura 6-11). Após cerca de 10 nucleotídeos de RNA serem sintetizados (em um processo relativamente ineficiente durante o qual a polimerase sintetiza e descarta pequenos oligômeros de RNA), a enzima quebra suas interações com o DNA promotor, relaxa suas interações com o fator σ e começa a se mover sobre o DNA, sintetizando RNA (passos 4 e 5 na Figura 6-11). A extensão da cadeia continua (a uma velocidade de aproximadamente 50 nucleotídeos/segundo para RNA-polimerases bacterianas) até que a enzima encontre um segundo sinal no DNA, o **terminador** (descrito a seguir), quando a polimerase para e libera tanto a cadeia-molde de DNA, quanto a cadeia de RNA recentemente sintetizada (passo 7 na Figura 6-11). Após a enzima polimerase ter sido liberada no terminador, ela reassocia-se com um fator σ livre para formar uma holoenzima que poderá começar novamente o processo de transcrição.

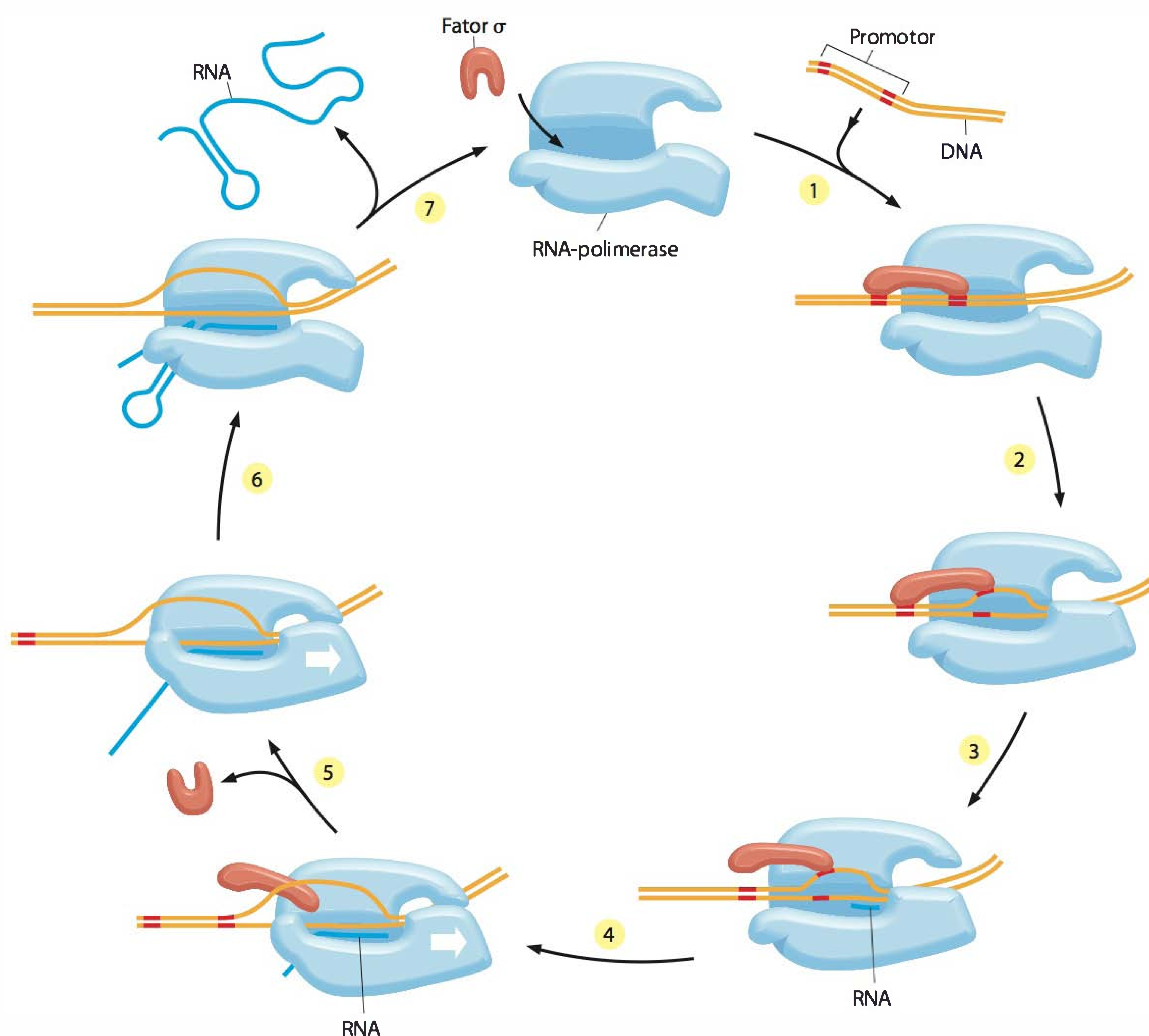


Figura 6-11 Ciclo de transcrição da RNA-polimerase bacteriana. No passo 1, a holoenzima RNA-polimerase (cerne da polimerase mais o fator σ) forma-se e, então, localiza um promotor (ver Figura 6-12). A polimerase desespiraliza o DNA na posição em que a transcrição está para começar (passo 2) e começa a transcrever (passo 3). Essa síntese inicial de RNA (algumas vezes denominada "iniciação abortiva") é relativamente ineficiente. Entretanto, uma vez que a RNA-polimerase tenha conseguido sintetizar aproximadamente 10 nucleotídeos de RNA, ela rompe suas interações com o promotor no DNA e enfraquece, finalmente terminando sua interação com σ. A polimerase agora troca para o modo de extensão da síntese de RNA (passo 4), movendo-se para a direita sobre o DNA neste diagrama. Durante o modo de extensão (passo 5), a transcrição é altamente eficiente, com a polimerase deixando o DNA-molde e liberando o RNA recentemente transcrito somente quando encontra um sinal de terminação (passos 6 e 7). Os sinais de terminação estão codificados no DNA e muitos funcionam por meio da formação de estruturas de RNA que desestabilizam o contato da polimerase com o RNA (passo 7). Em bactérias, todas as moléculas de RNA são sintetizadas por um único tipo de RNA-polimerase, e o ciclo apresentado na figura tanto se aplica à produção de mRNAs quanto à produção de RNAs estruturais e catalíticos. (Adaptada de uma figura gentilmente cedida por Robert Landick.)

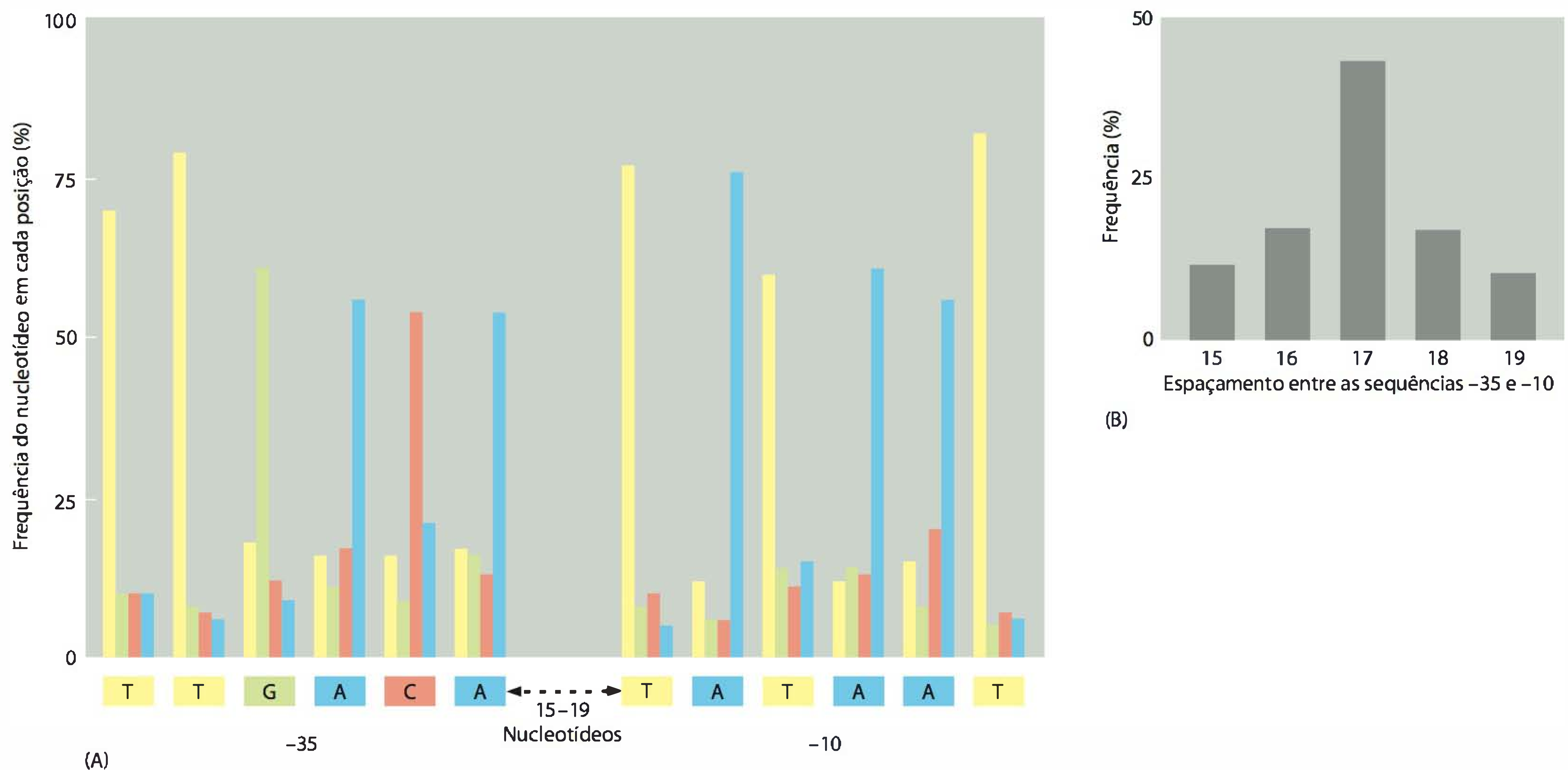


Figura 6-12 Sequência consenso para a classe principal de promotores de *E. coli*. (A) Os promotores são caracterizados por duas sequências hexaméricas de DNA, a sequência −35 e a sequência −10, assim denominadas por sua localização aproximada relativa ao ponto de início da transcrição (designado como +1). Por conveniência, é mostrada a sequência nucleotídica de um DNA de fita simples; na realidade, a RNA-polimerase reconhece o promotor como DNA de fita dupla. Com base em uma comparação de 300 promotores, são dadas as frequências dos quatro nucleotídeos de cada posição nos hexâmeros −35 e −10. A sequência consenso, ilustrada *abaixo* do gráfico, reflete os nucleotídeos mais comuns encontrados em cada posição na coleção de promotores. A sequência de nucleotídeos entre os hexâmeros −35 e −10 não mostra similaridades significativas entre os promotores. (B) A distribuição de espaçamento entre os hexâmeros −35 e −10, encontrados nos promotores de *E. coli*.

A informação dada nestes dois gráficos aplica-se aos promotores de *E. coli* que são reconhecidos pela RNA-polimerase e pelo principal fator σ (designado como σ^{70}). Como veremos no próximo capítulo, as bactérias também contêm fatores σ secundários, cada um dos quais reconhece uma sequência promotora diferente. Alguns promotores particularmente fortes, reconhecidos pela RNA-polimerase e pelo σ^{70}, apresentam uma sequência adicional localizada acima (*à esquerda*, na figura) do hexâmero −35, a qual é reconhecida por outra subunidade da RNA-polimerase.

O processo de iniciação da transcrição é complexo e requer que tanto a holoenzima RNA-polimerase quanto o DNA sofram uma série de alterações conformacionais. Podemos visualizar essas alterações como a abertura e o posicionamento do DNA no sítio ativo seguido por uma pressão sucessiva da enzima ao redor do DNA e do RNA para assegurar que eles não se dissociem antes do final da transcrição de um gene. Se uma RNA-polimerase se dissociar prematuramente, ela não poderá terminar a síntese e deverá começar novamente sobre o promotor.

Como os sinais de terminação no DNA encerram a extensão da polimerase? No caso da maioria dos genes bacterianos, o sinal de terminação consiste de uma fita de pares de nucleotídeos A-T, precedida por uma sequência de DNA duplamente simétrica, a qual, quando transcrita em RNA, dobra-se em uma estrutura em "grampo de cabelo" pelo pareamento de bases Watson-Crick (ver Figura 6-11). Conforme a polimerase transcreve um terminador, a formação de um grampo pode ajudar a "empurrar" o transcrito de RNA para longe do sítio ativo. O híbrido DNA-RNA no sítio ativo, que está preso ao terminador predominantemente por interações entre pares de bases U-A (os quais são menos estáveis do que pares de bases G-C, pois formam duas ligações de hidrogênio por par de bases em vez de três), não é suficientemente forte para manter essa união e dissocia-se, causando a liberação da polimerase do DNA (passo 7 na Figura 6-11). Assim, em alguns aspectos, a terminação da transcrição parece envolver a reversão das transições estruturais que ocorreram durante a iniciação. O processo de terminação também é um exemplo de um tema comum desse capítulo: a capacidade do RNA de dobrar-se em estruturas específicas afeta diferentes pontos da decodificação do genoma.

A sequência de nucleotídeos dos sinais de início e de término da transcrição apresenta heterogenidade

Como acabamos de ver, os processos de iniciação e de terminação da transcrição envolvem uma complicada série de transições estruturais nas moléculas de proteínas, de DNA e de RNA. Os sinais codificados no DNA que especificam essas transições frequentemente são difíceis de serem reconhecidos pelos pesquisadores. De fato, uma comparação de vários promotores bacterianos diferentes revela um extraordinário nível de diversidade. No entanto, todos contêm sequências relacionadas, refletindo, em parte, aspectos do DNA que são reconhecidos diretamente pelo fator σ. Essas características comuns frequentemente são resumidas sob a forma de uma *sequência consenso* (**Figura 6-12**). Uma **sequência nucleotídica consenso** é derivada da comparação de muitas sequências que apresentam a mesma

função básica e do alinhamento do nucleotídeo mais comum encontrado em cada posição. Isso serve, portanto, como um resumo ou uma “média” de um grande número de sequências nucleotídicas individuais.

As sequências de DNA de promotores bacterianos individuais diferem em pontos que determinam sua força (ou o número de eventos de iniciação por unidade de tempo para cada promotor). Portanto, processos evolutivos ajustaram finamente cada promotor para iniciar tão frequentemente quanto necessário e criaram um amplo espectro de promotores. Os promotores de genes que codificam proteínas abundantes são muito mais fortes do que aqueles associados a genes que codificam proteínas raras, e são suas sequências nucleotídicas as responsáveis por estas diferenças.

Assim como os promotores bacterianos, os terminadores de transcrição também apresentam um amplo leque de sequências, sendo o potencial de formar uma estrutura de RNA em grampo a característica comum mais importante. Uma vez que um número quase ilimitado de sequências nucleotídicas tem esse potencial, as sequências de terminadores são muito mais heterogêneas do que as dos promotores.

Discutimos os promotores e terminadores bacterianos com alguns detalhes, para ilustrar um ponto importante no que diz respeito à análise das sequências genômicas. Apesar de conhecermos muito sobre promotores e terminadores bacterianos e podermos estabelecer sequências consenso que resumem suas características mais óbvias, sua diversidade em termos de sequência de nucleotídeos torna difícil sua identificação exata e definitiva pela análise da sequência nucleotídica de um genoma. É ainda mais difícil posicionar sequências análogas em genomas de eucariotos, parcialmente devido ao excesso de DNA presente nesses genomas. Frequentemente são necessárias informações adicionais, muitas vezes obtidas por experimentação direta, para posicionar e interpretar com exatidão os curtos sinais de DNA contidos nos genomas.

Sendo o DNA de fita dupla, duas diferentes moléculas de RNA podem, em princípio, ser transcritas a partir de qualquer gene, usando-se cada uma das duas fitas do DNA como molde. Entretanto, um gene apresenta, tipicamente, apenas um único promotor e, pelo fato de as sequências nucleotídicas dos promotores serem assimétricas (ver Figura 6-12), a polimerase pode se ligar apenas sob uma orientação. A polimerase sintetiza RNA na direção 5′ para 3′ e, portanto, só pode transcrever uma das fitas de DNA por gene (**Figura 6-13**). As sequências genômicas revelam que a fita de DNA utilizada como molde para a síntese de RNA varia de gene para gene, dependendo da localização e da orientação do promotor (**Figura 6-14**).

Tendo considerado a transcrição em bactérias, veremos agora a situação nos eucariotos, nos quais a síntese de moléculas de RNA é uma tarefa muito mais elaborada.

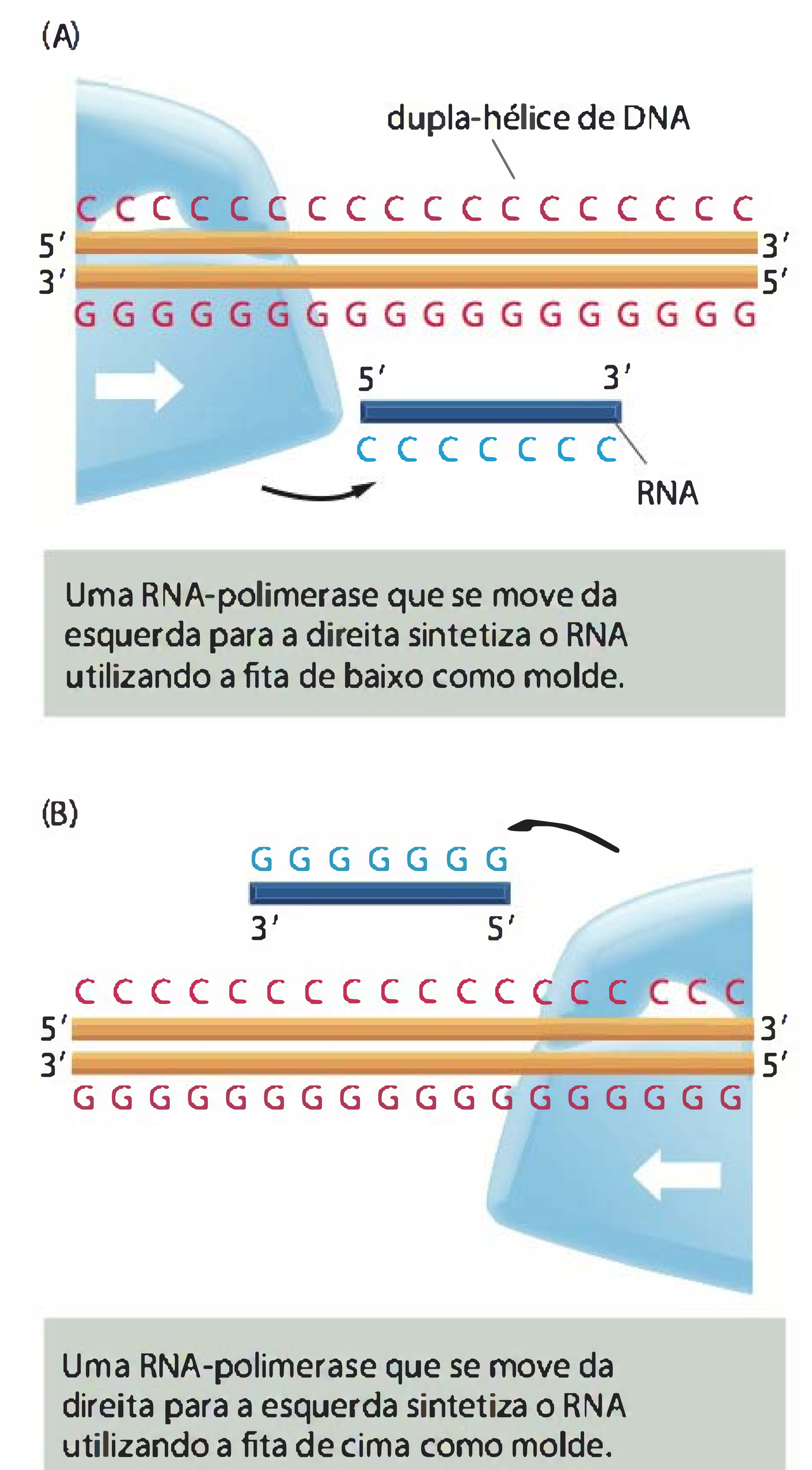


Figura 6-13 Importância da orientação da RNA-polimerase. A fita de DNA utilizada como molde deve ser percorrida no sentido 3′ para 5′. Consequentemente, a direção do movimento da RNA-polimerase determina qual das duas fitas de DNA será utilizada como molde para a síntese de RNA, como ilustrado em (A) e (B). A direção da polimerase é, por sua vez, determinada pela orientação da sequência promotora, o sítio no qual a RNA-polimerase inicia a transcrição.

A iniciação da transcrição nos eucariotos necessita de várias proteínas

Em contraste com as bactérias, as quais contêm um único tipo de RNA-polimerase, os núcleos eucarióticos têm três: *RNA-polimerase I*, *RNA-polimerase II* e *RNA-polimerase III*. As três polimerases são estruturalmente similares entre si (e à enzima bacteriana) e compartilham algumas subunidades, mas transcrevem diferentes tipos de genes (**Tabela 6-2**). As RNA-polimerases I e III transcrevem os genes que codificam o tRNA, o rRNA e vários pequenos RNAs. A RNA-polimerase II transcreve a grande maioria dos genes, inclusive todos aqueles que codificam proteínas; assim, nossa discussão subsequente será focada nesta enzima.

Apesar de a RNA-polimerase II eucariótica apresentar muitas similaridades estruturais em relação à RNA-polimerase bacteriana (**Figura 6-15**), existem várias diferenças importantes na maneira como as enzimas bacterianas e eucarióticas atuam. Duas diferenças serão discutidas imediatamente.

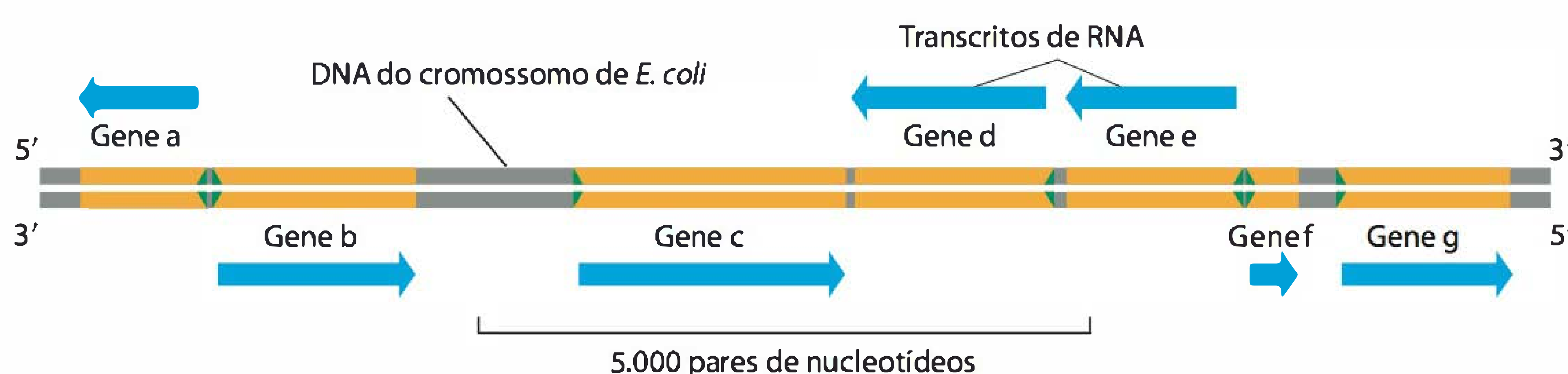


Figura 6-14 Sentidos de transcrição sobre uma pequena porção de um cromossomo bacteriano. Alguns genes são transcritos utilizando uma das fitas de DNA como molde, enquanto outros são transcritos utilizando a outra fita de DNA. A direção de transcrição é determinada pelo promotor no início de cada gene (*flechas verdes*). Aproximadamente 0,2% (9 mil pares de bases) do cromossomo de *E. coli* está ilustrado aqui. Os genes transcritos da *esquerda* para a *direita* usam a fita inferior de DNA como molde; aqueles transcritos da *direita* para a *esquerda* usam a fita superior como molde.

Tabela 6-2 As três RNA-polimerases de células eucarióticas

Tipo de polimerase	Genes transcritos
RNA-polimerase I	Genes do rRNA 5,8S, 18S e 28S.
RNA-polimerase II	Todos os genes que codificam proteínas, além de genes que codificam snoRNA, miRNA, siRNA e a maioria dos genes de snRNA.
RNA-polimerase III	Genes de tRNA, rRNA 5S, alguns snRNA e genes de outros pequenos RNAs.

Os rRNAs são nomeados de acordo com seus valores "S", que se referem à taxa de sedimentação em ultracentrífuga. Quanto maior o valor S, maior o rRNA.

1. Enquanto a RNA-polimerase bacteriana requer uma única proteína adicional (o fator σ) para que ocorra iniciação da transcrição *in vitro*, as RNA-polimerases eucarióticas necessitam de diversas proteínas adicionais, coletivamente denominadas *fatores gerais de transcrição*.
2. A iniciação da transcrição eucariótica precisa lidar com o DNA empacotado em nucleossomos e sob outras formas de estruturação de cromatina, características ausentes nos cromossomos bacterianos.

A RNA-polimerase II necessita de fatores gerais de transcrição

Os **fatores gerais de transcrição** ajudam a posicionar a RNA-polimerase eucariótica corretamente sobre o promotor, auxiliam na separação das duas fitas de DNA para permitir que a transcrição inicie e liberam a RNA-polimerase do promotor no modo de extensão, uma vez que a transcrição tenha iniciado. As proteínas são "gerais" porque são necessárias em praticamente todos os promotores utilizados pela RNA-polimerase II; consistindo em um grupo de proteínas interativas, elas são designadas como *TFII* (fator de transcrição para a polimerase II, *transcription factor for polimerase II*) e receberam os nomes arbitrários de TFIIB, TFIID, e assim por diante. Em um sentido amplo, os fatores gerais de transcrição eucarióticos desempenham funções equivalentes àquelas do fator σ em bactérias; na verdade, determinadas regiões de TFIIF apresentam a mesma estrutura tridimensional que as regiões equivalentes do fator σ.

A **Figura 6-16** ilustra como os fatores gerais de transcrição se associam aos promotores utilizados pela RNA-polimerase II, e a **Tabela 6-3** resume suas atividades. O processo de associação tem início com a ligação do fator geral de transcrição TFIID a uma pequena sequência de DNA de dupla-hélice fundamentalmente composta por nucleotídeos T e A. Por esse motivo, essa sequência é conhecida como sequência TATA, ou **TATA box**, e a subunidade de TFIID que a reconhece é denominada proteína de ligação a TATA (TBP, *TATA-binding protein*). A sequência TATA box normalmente está localizada 25 nucleotídeos antes do sítio de início da transcrição. Esta não é a única sequência de DNA que sinaliza

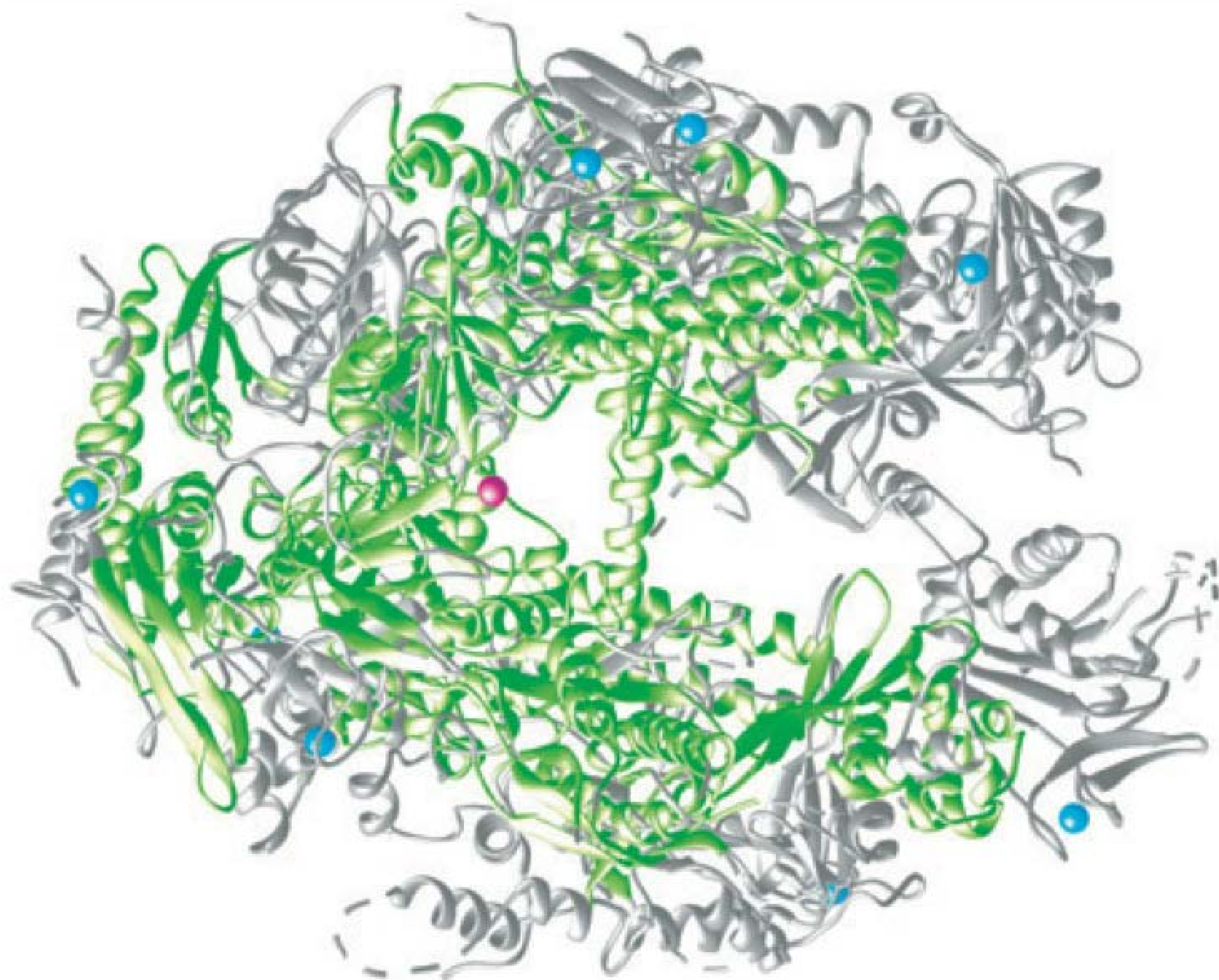


Figura 6-15 Similaridade estrutural entre uma RNA-polimerase bacteriana e uma RNA-polimerase II eucariótica. As regiões das duas RNA-polimerases que têm similaridade estrutural estão indicadas em *verde*. A polimerase eucariótica é maior do que a enzima bacteriana (12 subunidades em vez de 5), e algumas das regiões adicionais estão ilustradas em *cinza*. As esferas *azuis* representam átomos de Zn que atuam como componentes estruturais das polimerases, e a esfera *vermelha* representa o átomo de Mg presente no sítio ativo, onde a polimerização ocorre. As RNA-polimerases de todas as células atuais (bactérias, arquebactérias e eucariotos) são intimamente relacionadas, indicando que as características básicas da enzima existiam anteriormente à divergência dos três principais ramos da vida. (Cortesia de P. Cramer e R. Kornberg.)

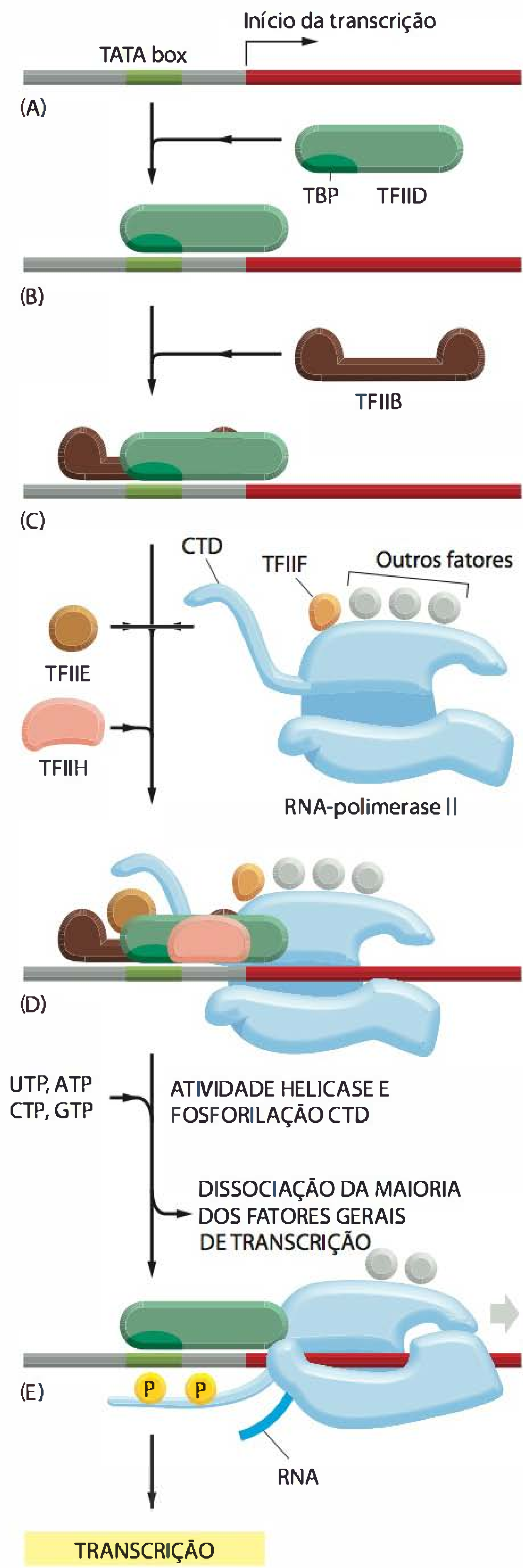


Figura 6-16 Iniciação da transcrição de um gene eucariótico pela RNA-polimerase II. Para iniciar a transcrição, a RNA-polimerase necessita de vários fatores gerais de transcrição. (A) O promotor contém uma sequência de DNA denominada TATA box, a qual está localizada a 25 nucleotídeos do sítio no qual a transcrição é iniciada. (B) Por meio de sua subunidade TBP, o TFIID reconhece e se liga ao TATA box, o que permite a ligação adjacente de TFIIB. (C) Para simplificar, a distorção do DNA produzida pela ligação de TFIID (ver Figura 6-18) não está ilustrada. (D) Os demais fatores gerais de transcrição, assim como a própria RNA-polimerase, associam-se no promotor. (E) A seguir, o TFIIH usa ATP para separar a dupla-hélice de DNA no ponto inicial de transcrição, expondo localmente a fita-molde. O TFIIH também fosforila a RNA-polimerase II, modificando sua conformação de tal modo que a polimerase é liberada dos fatores gerais e pode iniciar a fase de extensão da transcrição. Como ilustrado, o sítio de fosforilação é uma longa cauda polipeptídica C--terminal, também denominada domínio C-terminal (CTD), que se estende a partir da molécula de polimerase. O esquema de associação mostrado nesta figura foi deduzido a partir de experimentos realizados *in vitro*, e a ordem exata na qual os fatores gerais de transcrição se associam nos promotores pode variar de acordo com o gene *in vivo*. Os fatores gerais de transcrição foram altamente conservados ao longo da evolução; alguns dos fatores de células humanas podem ser substituídos em experimentos bioquímicos pelos fatores correspondentes de simples leveduras.

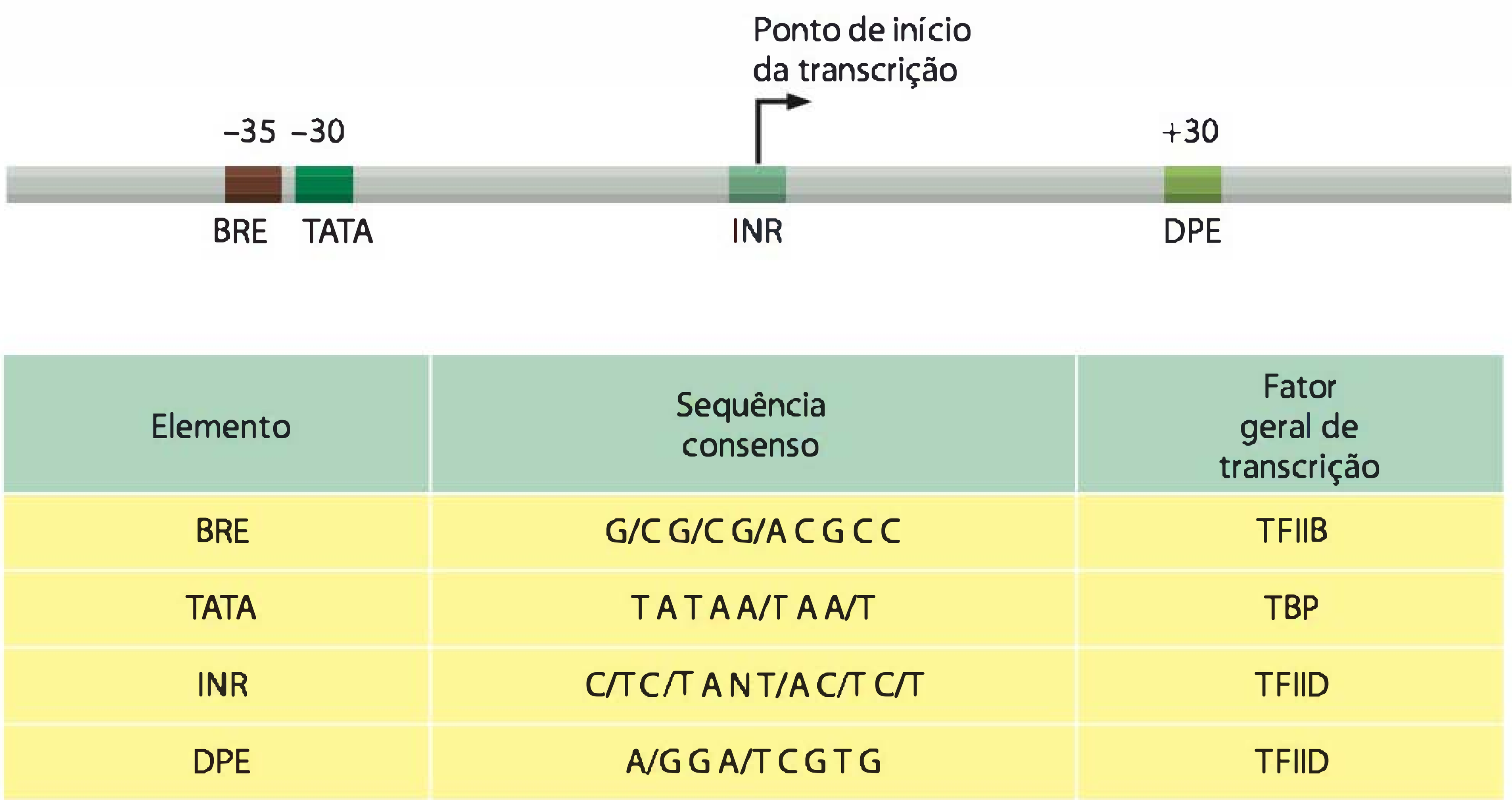
o início da transcrição (**Figura 6-17**), mas, para a maioria dos promotores de polimerase II, ela é a mais importante. A ligação de TFIID provoca uma grande distorção no DNA do TATA box (**Figura 6-18**). Acredita-se que essa distorção sirva como um marco físico para a localização de um promotor ativo no interior de um genoma extremamente grande e que mantenha as sequências de DNA de ambos os lados da distorção unidas para permitir os passos subsequentes de montagem da proteína. Outros fatores são então reunidos, junto à RNA-polimerase II, para formar um *complexo de iniciação de transcrição* completo (ver Figura 6-16). O mais complexo dos fatores gerais de transcrição é TFIIH. Composto por 9 subunidades, ele é praticamente tão grande quanto a própria RNA-polimerase, sendo, como veremos em breve, responsável pela realização de diferentes passos necessários à iniciação da transcrição.

Após a formação de um complexo de iniciação de transcrição sobre o DNA, a RNA-polimerase II deverá ter acesso à fita-molde no ponto inicial da transcrição. O TFIIH, o qual contém uma DNA-helicase como uma de suas subunidades, torna possível esse passo por hidrólise de ATP, desespiralização do DNA e consequente exposição da fita-molde. A seguir, a RNA-polimerase II, da mesma forma que a polimerase bacteriana, se mantém no promotor, sintetizando pequenos fragmentos de RNA até sofrer uma série de alterações estruturais que permitem sua saída do promotor e entrada na fase de extensão da transcrição. Um passo-chave para essa transição é a adição de grupos fosfato à "cauda" da RNA-polimerase (conhecida como CTD, ou domínio C-terminal, *C-terminal domain*). Em seres humanos, a CTD consiste em 52 repetições em *tandem* de uma sequência de sete aminoácidos, que se estende a partir da estrutura central da RNA-polimerase. Durante a iniciação da transcrição,

Tabela 6-3 Os fatores gerais de transcrição necessários à iniciação da transcrição pela RNA-polimerase II eucariótica

Nome	Número de subunidades	Funções na iniciação da transcrição
TFIID		
Subunidade TBP	1	Reconhece o TATA box.
Subunidades TAF	~11	Reconhece outras sequências de DNA próximas ao ponto de início da transcrição; regula a ligação ao DNA pela TBP.
TFIIB	1	Reconhece o elemento BRE nos promotores; posiciona com exatidão a RNA-polimerase no sítio de início da transcrição.
TFIIF	3	Estabiliza a interação da RNA-polimerase com TBP e TFIIB; auxilia a atrair TFIIE e TFIIH.
TFIIE	2	Atrai e regula TFIIH.
TFIIH	9	Desespiraliza o DNA no sítio de início da transcrição, fosforila a Ser5 do CTD da RNA-polimerase; libera a RNA-polimerase do promotor.

TFIID é composto por TBP e ~11 subunidades adicionais denominadas TAFs (fatores associados à TBP); CTD, domínio C-terminal.



Elemento	Sequência consenso	Fator geral de transcrição
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

Figura 6-17 Sequências consenso encontradas na vizinhança dos pontos iniciais da RNA-polimerase II eucariótica. Estão indicados o nome dado a cada sequência consenso (*primeira coluna*) e o fator geral de transcrição que a reconhece (*última coluna*). N indica qualquer nucleotídeo, e dois nucleotídeos separados por uma barra indicam uma probabilidade igual de que qualquer um deles ocorra na posição indicada. Na realidade, cada sequência consenso é uma representação resumida de um histograma similar ao da Figura 6-12.

Na maioria dos pontos iniciais de transcrição da RNA-polimerase II, apenas duas ou três das quatro sequências estão presentes. Por exemplo, a maioria dos promotores da polimerase II tem uma sequência TATA box, e aqueles que não a possuem tipicamente apresentam uma sequência INR "forte". Embora a maioria das sequências de DNA que influenciam o início da transcrição esteja localizada acima do ponto inicial de transcrição, algumas poucas, como o elemento DPE mostrado na figura, estão localizadas na região transcrita.

a serina localizada na quinta posição da sequência repetida (Ser5) é fosforilada por TFIIH, o qual contém uma proteína-cinase como uma de suas subunidades (ver Figura 6-16D e E). A polimerase pode então se separar do agrupamento de fatores gerais de transcrição. Durante esse processo, ela sofre uma série de modificações conformacionais que fortalecem a sua interação com o DNA e adquire novas proteínas que lhe permitem transcrever por longas distâncias, e em muitos casos por várias horas, sem se dissociar do DNA.

Uma vez que a polimerase II tenha iniciado a extensão do transcrito de RNA, a maioria dos fatores gerais de transcrição é liberada do DNA de forma que eles estarão disponíveis para iniciar outro ciclo de transcrição, com uma nova molécula de RNA-polimerase. Como vimos resumidamente, a fosforilação da cauda da RNA-polimerase II também faz com que componentes da maquinaria do processamento do RNA se acumulem sobre a polimerase e, assim, estejam em posição para modificar o RNA recém-transcrito assim que ele emergir da polimerase.

A polimerase II também necessita de proteínas modificadoras de cromatina, ativadoras e mediadoras

O modelo de iniciação da transcrição recém-descrito foi estabelecido por meio do estudo da ação da RNA-polimerase II e de seus fatores gerais de transcrição sobre DNA-molde purificados *in vitro*. Entretanto, como discutido no Capítulo 4, o DNA das células eucarióticas está empacotado em nucleossomos, os quais são posteriormente organizados em estruturas de

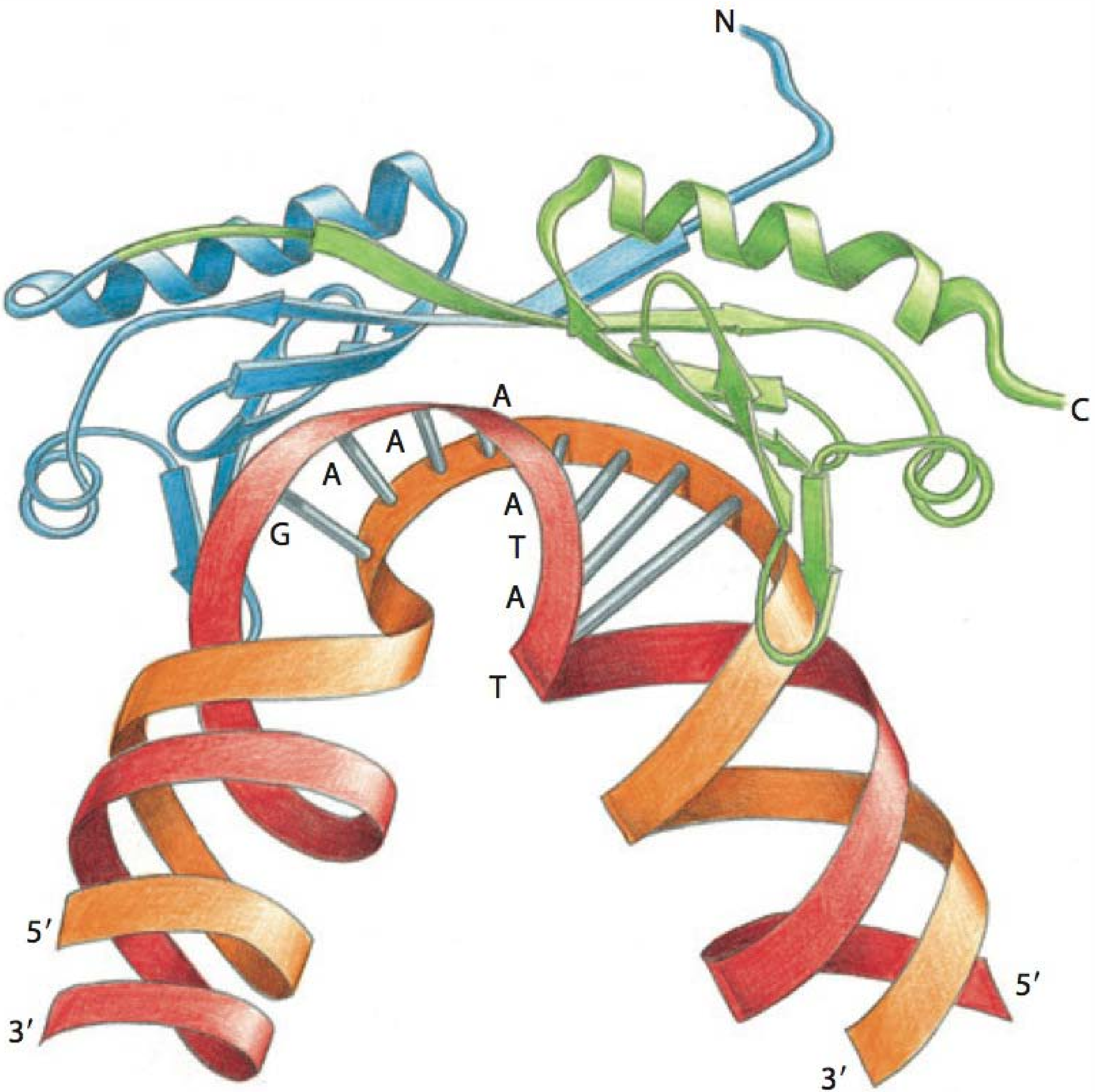


Figura 6-18 Estrutura tridimensional de TBP (proteína de ligação ao TATA) ligada ao DNA. A TBP é a subunidade do fator geral de transcrição TFIID responsável pelo reconhecimento e pela ligação à sequência TATA box no DNA (*vermelho*). A curvatura característica causada no DNA pela TBP – duas quebras na dupla-hélice separadas por DNA parcialmente desespiralizado – pode servir como um marcador que ajuda a atrair os outros fatores gerais de transcrição. A TBP é uma cadeia polipeptídica simples dobrada em dois domínios muito semelhantes (*azul* e *verde*). (Adaptada de J. L. Kim et al., *Nature* 365:520-527, 1993. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

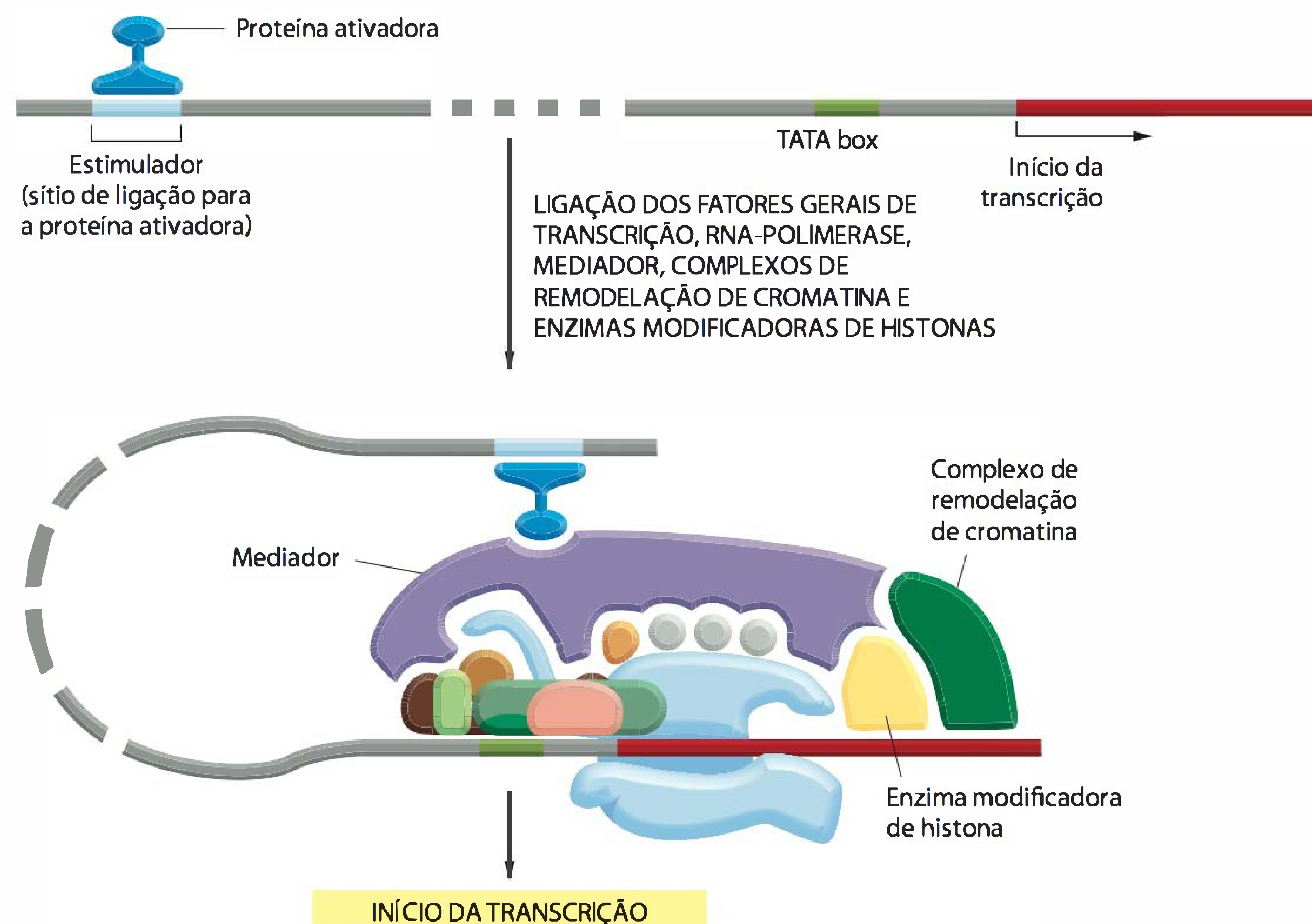


Figura 6-19 Iniciação da transcrição pela RNA-polimerase II em uma célula eucariótica. O início da transcrição *in vivo* necessita da presença de proteínas ativadoras transcricionais. Como descrito no Capítulo 7, essas proteínas se ligam a pequenas sequências específicas no DNA. Embora somente uma seja apresentada aqui, um gene eucariótico típico tem muitas proteínas ativadoras que, juntas, determinam sua taxa e seu padrão de transcrição. Às vezes agindo a uma distância de vários milhares de pares de nucleotídeos (indicado pela molécula de DNA segmentada), essas proteínas reguladoras de genes auxiliam a RNA-polimerase, os fatores gerais e o mediador a associarem-se no promotor. Além disso, os ativadores atraem complexos remodeladores de cromatina dependentes de ATP e acetilases de histonas.

Como discutido no Capítulo 4, o estado-padrão da cromatina provavelmente seja o filamento de 30 nm (ver Figura 4-22), o que parece ser a forma do DNA na qual a transcrição é iniciada. Para simplificar, isso não foi ilustrado na figura.

cromatina de alta magnitude. Como resultado, a iniciação da transcrição nas células eucarióticas é mais complexa e necessita de mais proteínas do que a iniciação da transcrição no DNA purificado. Primeiramente, as proteínas reguladoras de genes, conhecidas como *ativadores transcricionais*, devem ligar-se a sequências específicas no DNA e ajudam a atrair a RNA-polimerase II para o ponto de início da transcrição (**Figura 6-19**). Discutiremos o papel dos ativadores no Capítulo 7, pois representam uma das principais maneiras pelas quais as células regulam a expressão dos seus genes. Aqui simplesmente chamamos a atenção para o fato de que sua presença no DNA é necessária para a iniciação da transcrição em uma célula eucariótica. Segundo, a iniciação da transcrição eucariótica *in vivo* necessita da presença de um complexo proteico conhecido como *Mediador*, o qual permite que as proteínas ativadoras se comuniquem adequadamente com a polimerase II e com os fatores gerais de transcrição. Finalmente, a iniciação da transcrição nas células eucarióticas tipicamente requer o recrutamento local de enzimas modificadoras de cromatina, como complexos remodeladores de cromatina e enzimas modificadoras de histonas. Como discutimos no Capítulo 4, ambos os tipos de enzimas possibilitam maior acesso ao DNA presente sob a forma de cromatina e, assim, facilitam a montagem da maquinaria de iniciação da transcrição sobre o DNA. Retornaremos ao papel dessas enzimas na iniciação da transcrição no Capítulo 7.

Como ilustrado na Figura 6-19, muitas proteínas (bem mais de uma centena de subunidades individuais) devem reunir-se no ponto de início da transcrição para promover a iniciação da transcrição em uma célula eucariótica. A ordem de associação dessas proteínas não parece seguir uma rota preestabelecida; de fato, ela varia entre diferentes genes. Na verdade, alguns desses diferentes complexos proteicos podem interagir entre si longe do DNA, sendo transportados para o DNA como subcomplexos pré-formados. Para começar a transcrever, a RNA-polimerase II deve ser liberada desse grande complexo de proteína e, além dos passos descritos na Figura 6-16, essa etapa frequentemente requer proteólise *in situ* da proteína ativadora. Voltaremos a alguns desses pontos no Capítulo 7, onde discutiremos os muitos caminhos pelos quais uma célula eucariótica pode regular o processo de iniciação da transcrição.

A extensão da transcrição produz tensões de super-hélice no DNA

Uma vez iniciada a transcrição, a RNA-polimerase não se desloca suavemente ao longo da molécula de DNA; em vez disso, ela se move aos saltos, fazendo pausas em algumas sequências e transcrevendo outras rapidamente. As RNA-polimerases em funcionamento, tanto em bactérias quanto em eucariotos, estão associadas a uma série de *fatores de extensão*, proteínas que diminuem a probabilidade de dissociação da RNA-polimerase antes que chegue ao término de um gene. Esses fatores caracteristicamente associam-se à RNA-polimerase logo

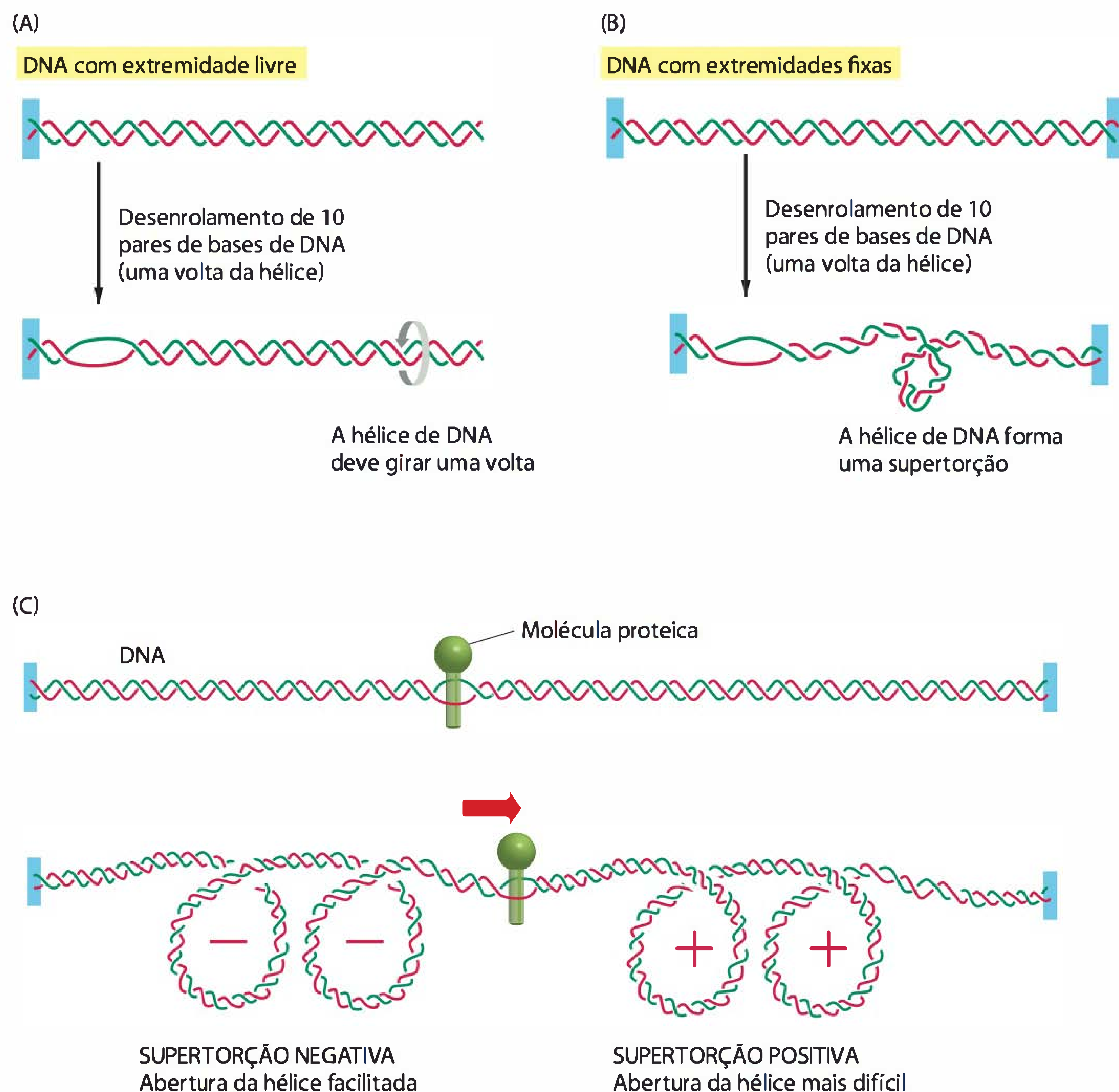
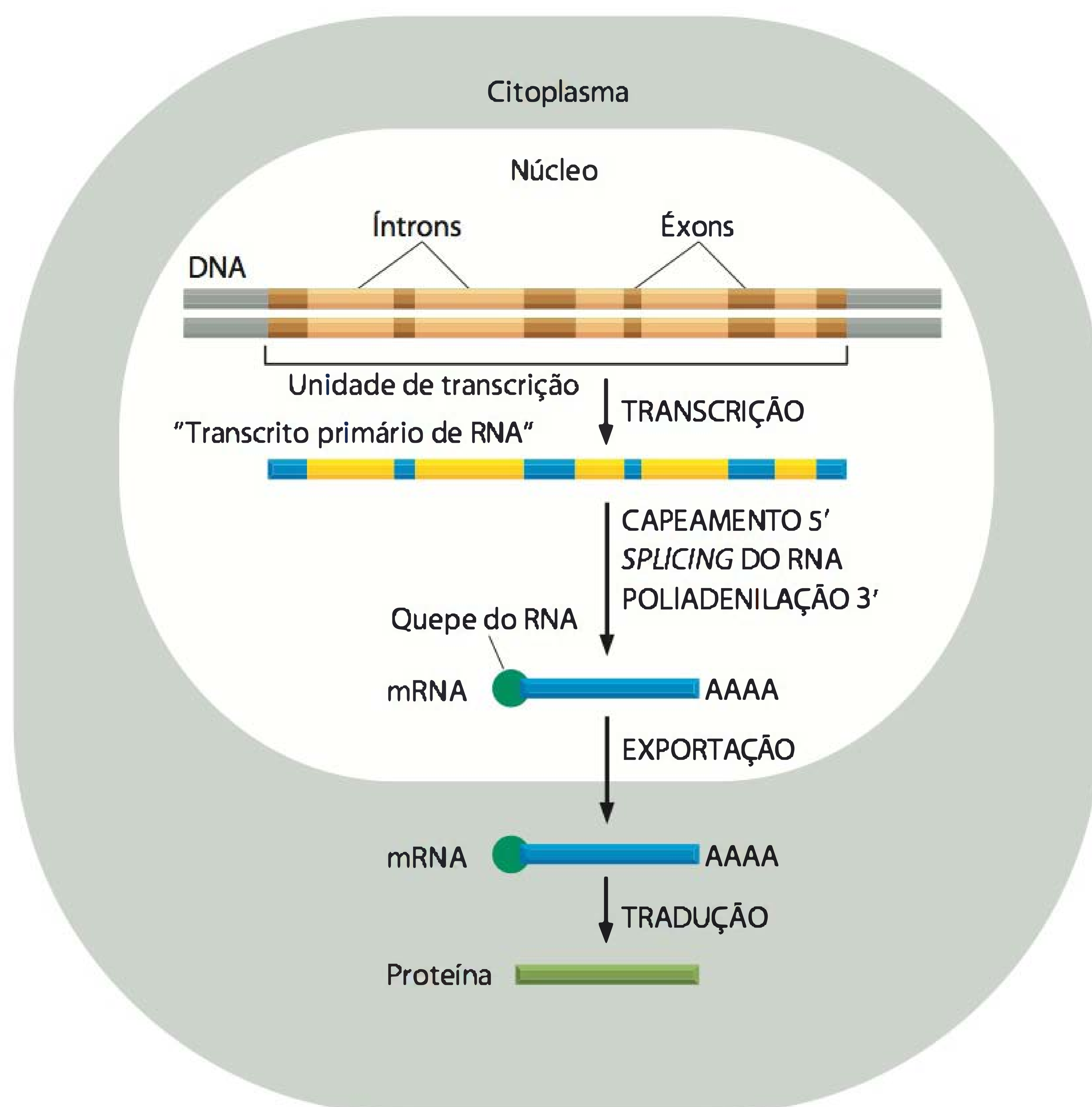


Figura 6-20 A tensão super-helical no DNA causa supertorção do DNA. (A) Para uma molécula de DNA com uma extremidade livre (ou com uma quebra em uma das fitas que serve como ponto de torção), a dupla-hélice de DNA rota uma volta a cada 10 pares de nucleotídeos que são abertos. (B) Se a rotação é impedida, ocorre introdução de tensão super-hélice no DNA quando a hélice é aberta. Uma maneira de acomodar essa tensão poderia ser o aumento de 10 para 11 pares de nucleotídeos por giro na dupla-hélice restante; a hélice de DNA, entretanto, resiste a essa deformação, preferindo atenuar a tensão super-hélice curvando-se e formando alças supertorcidas. Como resultado, uma supertorção de DNA forma-se na dupla-hélice do DNA a cada 10 pares de nucleotídeos abertos. A supertorção formada nesse caso é uma supertorção positiva. (C) A supertorção do DNA é induzida por uma proteína que trafega sobre a dupla-hélice de DNA. As duas extremidades do DNA ilustradas aqui não são capazes de girar livremente uma em relação à outra, e acredita-se que a molécula proteica também seja impedida de rotação livre conforme se move. Sob essas condições, o movimento da proteína provoca um excesso de giros que se acumulam na hélice de DNA à sua frente e um déficit de giros no DNA atrás da proteína, conforme ilustrado.

após a iniciação ter ocorrido, e ajudam as polimerases a se moverem sobre a ampla variedade de sequências de DNA encontrada nos genes. As RNA-polimerases eucarióticas devem também competir com a estrutura de cromatina, conforme se movem ao longo de um DNA-molde, sendo caracteristicamente auxiliadas por complexos remodeladores de cromatina dependentes de ATP (ver p. 215-216). Esses complexos podem se movimentar com a polimerase, ou simplesmente identificar e resgatar uma polimerase que eventualmente se encontre bloqueada. Além disso, alguns fatores de extensão associados à RNA-polimerase eucariótica facilitam a transcrição através dos nucleossomos sem a necessidade de energia adicional. Ainda não está compreendido como isso ocorre, mas essas proteínas podem ajudar a deslocar transientemente os dímeros H2A-H2B do centro do nucleossomo, reposicionando-os assim que a polimerase atravessa o nucleossomo.

Existe ainda outra barreira à extensão mediada pelas polimerases, tanto em bactérias quanto em eucariotos. Para discutir esse assunto, devemos primeiro considerar uma propriedade sutil inerente ao DNA de dupla-hélice denominada **supertorção do DNA**. A supertorção do DNA representa uma conformação que o DNA adota em resposta à tensão da super-hélice; reciprocamente, a criação de várias alças ou de enrolamentos na hélice pode criar tal tensão. A **Figura 6-20** ilustra as limitações topológicas que geram a supertorção do DNA. Existem aproximadamente 10 pares de nucleotídeos para cada giro da hélice em uma dupla-hélice de DNA. Imagine uma hélice em que as duas extremidades estão fixas uma em relação à outra (como ocorre no DNA circular, como, por exemplo, um cromossomo bacteriano, ou em alças extremamente fixas, como se acredita que ocorra em cromossomos eucarióticos). Nesse caso, uma grande supertorção do DNA vai se formar para compensar cada 10 pares de nucleotídeos abertos (desenrolados). A formação dessa supertorção é energeticamente favorável, pois restaura o enrolamento helicoidal normal das regiões que permanecem pareadas, as quais, do contrário, deveriam sofrer uma superespiralização devido às suas extremidades fixas.

A tensão super-hélice é igualmente criada conforme a RNA-polimerase se move ao longo da fita de DNA que possui extremidades ancoradas (ver Figura 6-20C). Considerando que a polimerase não é livre para rotar rapidamente (e que tal rotação é difícil de



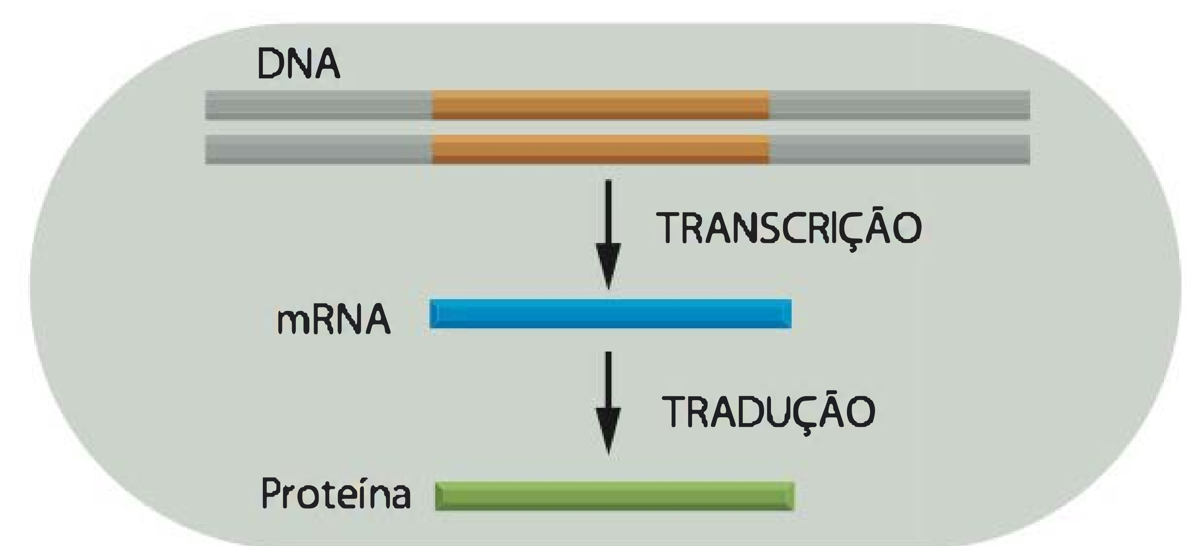


Figura 6-21 Resumo dos passos que levam do gene à proteína em eucariotos e em bactérias. O nível final de uma proteína em uma célula depende da eficiência de cada passo e das taxas de degradação das moléculas de RNA e de proteína. (A) Nas células eucarióticas, a molécula de RNA produzida por transcrição contém tanto sequências codificantes (éxon) como não-codificantes (íntron). Antes de a molécula de RNA ser traduzida em proteína, as duas extremidades do RNA são modificadas, os íntrons são removidos por uma reação de RNA *splicing* catalisada enzimaticamente, e o mRNA resultante é transportado do núcleo para o citoplasma. Embora esses passos estejam ilustrados como se ocorressem em uma sequência, na verdade eles podem ocorrer simultaneamente. Por exemplo, o quepe de RNA é adicionado, e o *splicing* caracteristicamente inicia antes que a transcrição tenha sido completada. Devido ao acoplamento entre transcrição e processamento de RNA, os transcritos primários – os RNAs que seriam, em teoria, produzidos antes de o processamento ocorrer – raramente são encontrados. (B) Nos procariotos, a produção de moléculas de mRNA é muito mais simples. A extremidade 5′ de uma molécula de mRNA é produzida por meio da iniciação da transcrição, e a extremidade 3′ é produzida pela terminação da transcrição. Como as células procarióticas não possuem núcleo, a transcrição e a tradução ocorrem em um compartimento comum. De fato, a tradução de um mRNA bacteriano frequentemente inicia antes de sua síntese ter sido completada.

ocorrer devido ao tamanho de cada RNA-polimerase e de seu transcrito acoplado), uma polimerase em movimento gera tensão positiva da super-hélice no DNA a sua frente e tensão helicoidal negativa atrás de si. Nos eucariotos, acredita-se que essa situação resulte em um bônus: a tensão positiva da super-hélice à frente da polimerase dificulta a abertura da hélice de DNA, mas essa tensão pode facilitar o desenvelopamento do DNA dos nucleossomos, visto que a liberação do DNA no conjunto de histonas auxilia a relaxar a tensão positiva da super-hélice.

Qualquer proteína que se impulsiona ao longo de uma fita de DNA de uma dupla-hélice tende a gerar uma tensão de super-hélice. Nos eucariotos, as enzimas DNA-topoisomerases removem rapidamente essa tensão da super-hélice (ver p. 278). Nas bactérias, porém, uma topoisomerase especializada, denominada *DNA-girase*, usa a energia de hidrólise de ATP para forçar supertorções continuamente no DNA, mantendo assim o DNA sob tensão constante. Elas são *supertorções negativas*, possuindo um direcionamento oposto ao das *supertorções positivas* que se formam quando uma região da hélice de DNA se abre (ver Figura 6-20B). Essas supertorções negativas são removidas do DNA bacteriano toda vez que uma região da hélice se abre, reduzindo a tensão da super-hélice. A DNA-girase, portanto, torna a abertura da hélice de DNA das bactérias energeticamente favorável comparada à abertura da hélice no DNA que não está supertorcido. Por essa razão, a supertorção normalmente facilita os processos genéticos em bactérias, que necessitam de abertura da hélice, como a iniciação da transcrição pela RNA-polimerase bacteriana (ver Figura 6-11).

A extensão da transcrição em eucariotos está fortemente associada ao processamento de RNA

Vimos que os mRNAs bacterianos são sintetizados somente pela RNA-polimerase, começando e finalizando em regiões específicas do genoma. A situação em eucariotos é consideravelmente diferente. Em particular, a transcrição é apenas o primeiro passo de diferentes etapas necessárias para a produção de um mRNA. Outras etapas essenciais incluem a modificação covalente de ambas as extremidades do RNA e a remoção de *sequências de íntrons* que são retiradas do meio do transcrito de RNA pelo processo de *splicing do RNA* (**Figura 6-21**).

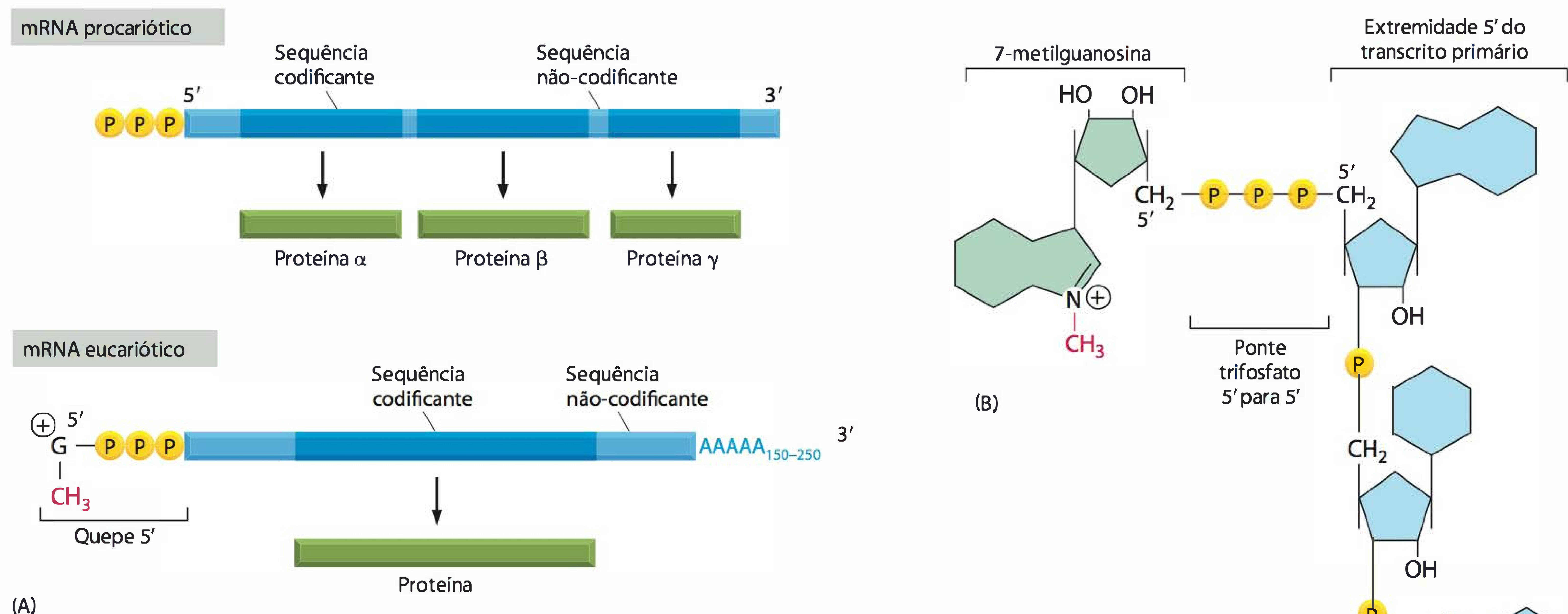


Figura 6-22 Uma comparação das estruturas de moléculas de mRNA procariótico e eucariótico. (A) As extremidades 5′ e 3′ de um mRNA bacteriano são as extremidades não-modificadas da cadeia sintetizada pela RNA-polimerase, a qual inicia e termina a transcrição naqueles pontos, respectivamente. As extremidades correspondentes de um mRNA eucariótico são formadas pela adição de um quepe na extremidade 5′ e pela clivagem do transcrito pré-mRNA e adição de um quepe poli-A, respectivamente. A figura também ilustra outra diferença entre os mRNAs procarióticos e eucarióticos: os mRNAs bacterianos podem conter as instruções para várias proteínas diferentes, enquanto que os mRNAs eucarióticos praticamente sempre contêm a informação para uma única proteína. (B) A estrutura do quepe na extremidade 5′ de moléculas de mRNA eucariótico. Observe a ligação incomum 5′ para 5′ da 7-metil G ao restante do RNA. Muitos mRNAs eucarióticos apresentam uma modificação adicional: um grupo 2′-hidroxila do segundo açúcar ribose no mRNA é metilado (não ilustrado).

Ambas as extremidades do mRNA eucariótico são modificadas: pelo *capeamento* na extremidade 5′ e pela *poliadenilação* na extremidade 3′ (**Figura 6-22**). Essas extremidades especiais permitem que a célula verifique se ambas as extremidades de uma molécula de mRNA estão presentes (e, consequentemente, se a mensagem está intacta), antes de exportar a sequência de RNA do núcleo para ser traduzida em proteína. A retirada de íntrons do RNA une as diferentes porções de uma sequência codificadora de proteínas e permite que os eucariotos superiores tenham a capacidade de sintetizar várias proteínas diferentes a partir do mesmo gene.

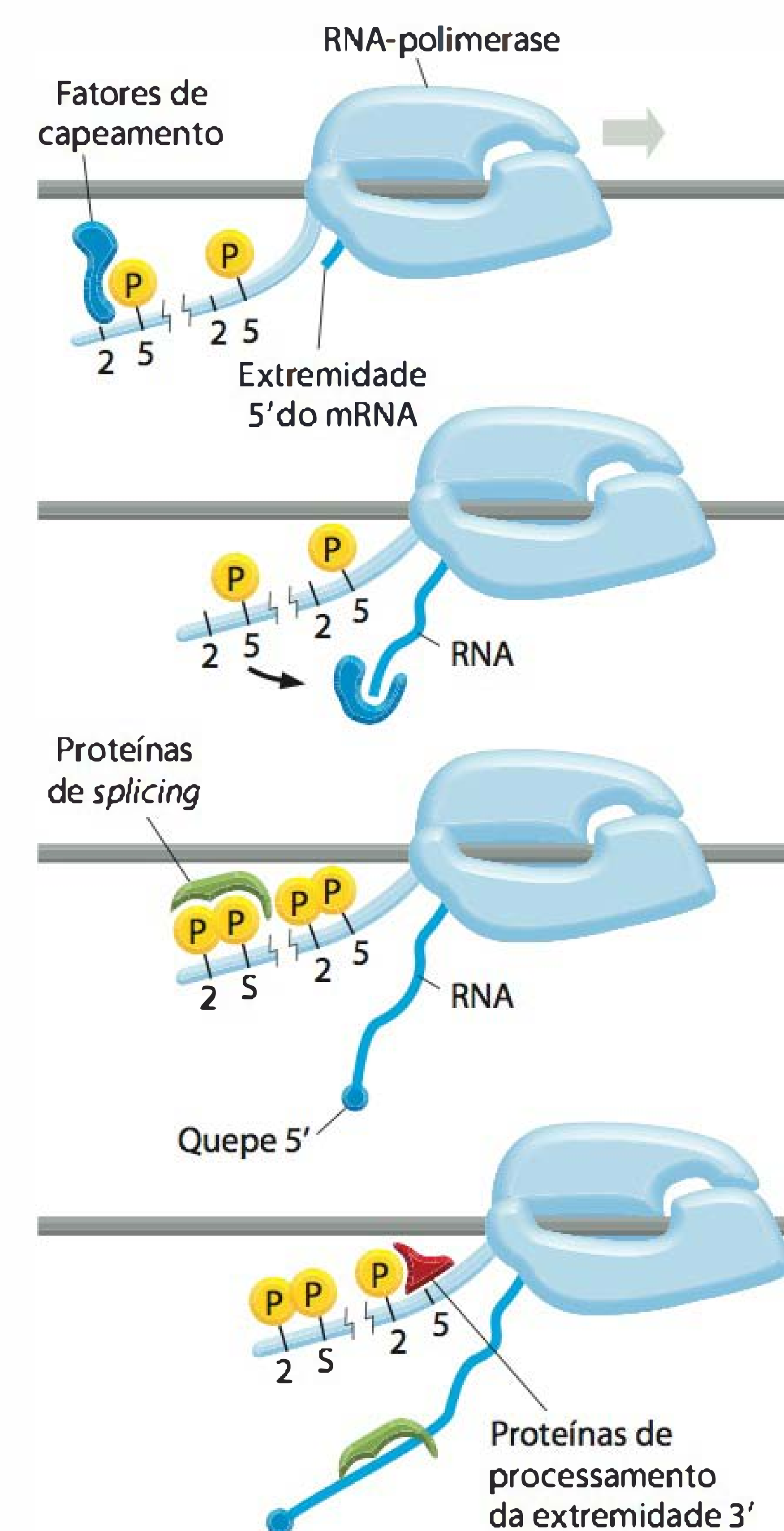
Esses passos do processamento de RNA estão fortemente associados à extensão do transcrito por meio de um engenhoso mecanismo. Como discutido anteriormente, um passo-chave da iniciação da transcrição pela RNA-polimerase II é a fosforilação da cauda da RNA-polimerase II, denominada CTD (domínio C-terminal). Essa fosforilação ocorre gradativamente à medida que a RNA-polimerase inicia a transcrição e se move sobre o DNA. Ela não somente auxilia a dissociação RNA-polimerase II de outras proteínas presentes no ponto inicial do transcrito, como também permite que um novo conjunto de proteínas se associe à cauda da RNA-polimerase que funciona na extensão da transcrição e no processamento do RNA. Como será discutido a seguir, algumas dessas proteínas de processamento parecem "saltar" da cauda da polimerase sobre a molécula de RNA em formação para começar seu processamento, conforme ela emerge da RNA-polimerase. Desse modo, a RNA-polimerase II no seu modo de extensão pode ser vista como uma fábrica de RNA que tanto transcreve DNA em RNA, quanto processa o RNA que ela produz (**Figura 6-23**). Completamente estendido, o CTD é aproximadamente 10 vezes mais longo do que a RNA-polimerase restante e, de fato, ele atua como um suporte, carregando uma ampla variedade de proteínas e deixando-as disponíveis para serem usadas quando necessário. Essa estratégia, que aumenta a velocidade das reações subsequentes, frequentemente é observada na célula (ver Figuras 4-69 e 16-38).

O capeamento do RNA é a primeira modificação dos pré-mRNAs eucarióticos

Assim que a RNA-polimerase II tenha produzido aproximadamente 25 nucleotídeos de RNA, a extremidade 5′ da nova molécula de RNA é modificada pela adição de um "quepe" que consiste em um nucleotídeo guanina modificado (ver Figura 6-22B). A reação de capeamento é realizada por três enzimas agindo sucessivamente: uma (uma fosfatase) remove um fosfato da extremidade 5′ do RNA nascente, outra (uma guanil-transferase) adiciona um GMP em uma ligação reversa (5′ para 5′ em vez de 5′ para 3′), e uma terceira (uma metil-transferase) adiciona um grupo metil à guanosina (**Figura 6-24**). Como todas as três enzimas se ligam à serina-5 da cauda fosforilada da RNA-polimerase, a modificação adicionada pelo TFIIH durante a iniciação da transcrição, elas estão direcionadas para modificar a extremidade 5′ do transcrito que está sendo formado no exato momento que ela emerge da polimerase.

Figura 6-23 **O conceito de "fábrica de RNA" para a RNA-polimerase II eucariótica.** A polimerase não somente transcreve DNA em RNA, mas também transporta proteínas processadoras do pré-mRNA em sua cauda, as quais são transferidas para o RNA em formação no momento adequado. A cauda, conhecida como CTD, contém 52 repetições em *tandem* de uma sequência de sete aminoácidos contendo duas serinas em cada repetição. As proteínas de capeamento se ligam à cauda da RNA-polimerase quando esta é fosforilada na Ser5 do heptâmero repetido, no final do processo de iniciação da transcrição (ver Figura 6-16). Essa estratégia assegura que a molécula de RNA seja eficientemente capeada assim que sua extremidade 5′ emergir da RNA-polimerase. Conforme a polimerase segue a tradução, sua cauda é extensivamente fosforilada nas posições de Ser2 por uma cinase associada à polimerase de extensão, sendo eventualmente defosforilada nas posições de Ser5. Essas alterações subsequentes atraem proteínas de *splicing* e de processamento 3′ para a polimerase em movimento, posicionando-as para agir sobre o RNA recém-sintetizado assim que ele venha a emergir da RNA-polimerase. Existem muitas enzimas de processamento do RNA e nem todas viajam junto à polimerase. No caso do *splicing* do RNA, por exemplo, a cauda carrega apenas uns poucos componentes essenciais; uma vez transferidos para a molécula de RNA, eles atuam como nucleadores para os demais componentes do processo.

Uma vez que a RNA-polimerase II termina de transcrever, ela é liberada do DNA, os fosfatos da sua cauda são removidos por fosfatases solúveis, e ela pode reiniciar a transcrição. Apenas essa forma defosforilada da RNA-polimerase II é capaz de iniciar a síntese de RNA em um promotor.



O quepe metil 5′ identifica a extremidade 5′ de mRNAs eucarióticos, e esta marca ajuda a célula a distinguir os mRNAs dos outros tipos de moléculas de RNA presentes na célula. Por exemplo, as RNA-polimerases I e III produzem RNAs não-capeados durante a transcrição, em parte porque essas polimerases carecem de um CTD. No núcleo, o quepe se liga a um complexo proteico denominado complexo de ligação ao quepe (CBC, *cap-binding complex*), o qual, como discutiremos em seções subsequentes, ajuda o RNA a ser adequadamente processado e exportado. O quepe metil 5′ também desempenha um importante papel na tradução dos mRNAs no citosol, como discutiremos mais tarde neste capítulo.

O *splicing* (processamento) do RNA remove as sequências de íntrons de pré-mRNAs recentemente transcritos

Como discutido no Capítulo 4, as sequências codificantes de genes eucarióticos são caracteristicamente interrompidas por sequências intervenientes não-codificantes (íntrons). Descoberta em 1977, essa característica dos genes eucarióticos foi uma surpresa para os cientistas, que estavam familiarizados, até aquele momento, apenas com genes bacterianos, os quais, caracteristicamente, consistem em uma porção contínua de DNA codificante diretamente transcrita em mRNA. Em contraste extremo, os genes eucarióticos são encontrados sob a forma de pequenos pedaços de sequências codificantes (***sequências expressas*** ou **éxons**) intercaladas por sequências muito mais longas, as ***sequências intervenientes*** ou **íntrons**; assim, a porção codificante de um gene eucariótico é, em geral, apenas uma pequena fração do comprimento do gene (**Figura 6-25**).

Tanto as sequências de íntrons quanto de éxons são transcritas em RNA. As sequências dos íntrons são removidas do RNA recentemente sintetizado por meio de um processo denominado ***splicing* de RNA**. Grande parte do *splicing* de RNA que ocorre nas células atua na produção de mRNA, e nossa discussão sobre o *splicing* focaliza-se nesse tipo, denominado *splicing* do precursor de mRNA (ou pré-mRNA). Somente após ter ocorrido o *splicing* e o processamento das extremidades 5′ e 3′ esse RNA será denominado mRNA.

Cada evento de *splicing* remove um íntron, por meio de duas reações sequenciais de transferência de fosforil, conhecidas como transesterificações, as quais unem dois éxons, enquanto removem o íntron sob a forma de um "laço" (**Figura 6-26**). Uma vez que o nú-

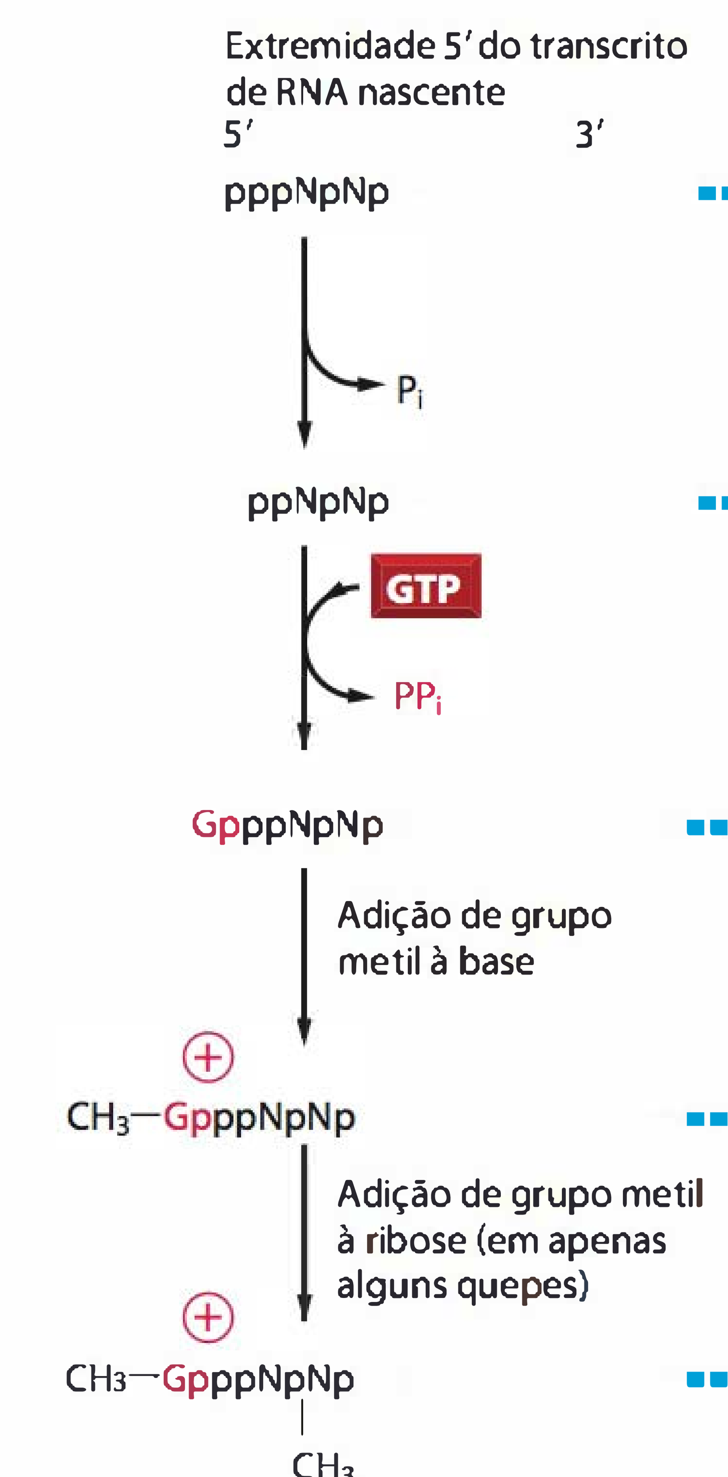


Figura 6-24 **Reações que adicionam o quepe na extremidade 5′ de cada molécula de RNA sintetizada pela RNA-polimerase II.** O quepe final contém uma nova ligação 5′ para 5′ entre o resíduo 7-metil G positivamente carregado e a extremidade 5′ do transcrito de RNA (ver Figura 6-22B). A letra N representa qualquer um dos quatro ribonucleotídeos, embora o nucleotídeo que comece uma cadeia de RNA geralmente seja uma purina (um A ou um G). (Com base em A. J. Shatkin, *BioEssays* 7:275-277, 1987. Com permissão da ICSU Press.)

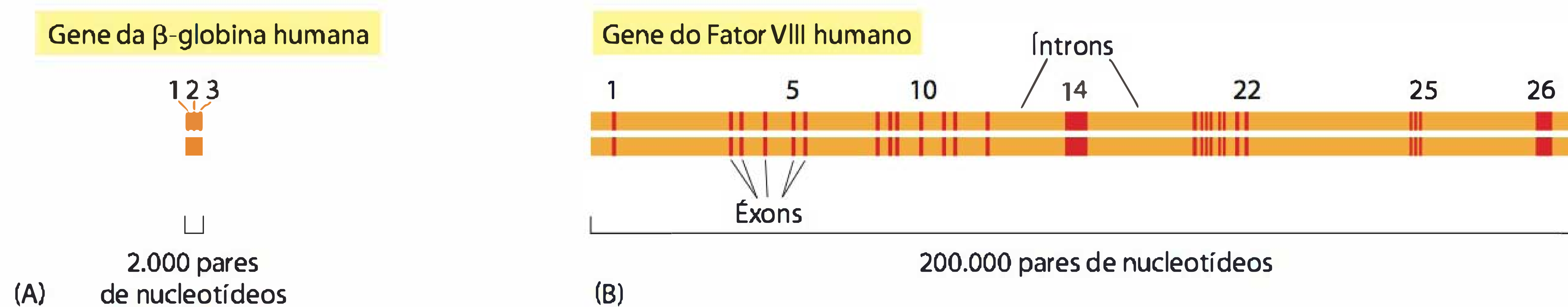


Figura 6-25 Estrutura de dois genes humanos mostrando a organização de éxons e de íntrons. (A) O gene relativamente pequeno da β-globina, que codifica uma das subunidades da proteína carreadora de oxigênio hemoglobina, contém três éxons (ver também Figura 4-7). (B) O gene do Fator VIII, bem maior, contém 26 éxons; esse gene codifica uma proteína (Fator VIII) que atua na via de coagulação do sangue. A forma mais prevalente de hemofilia é resultado de mutações nesse gene.

mero de ligações fosfato de alta energia permanece o mesmo, tais reações podem ocorrer, em princípio, sem hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo. Entretanto, a maquinaria que catalisa o *splicing* do pré-mRNA é complexa, consistindo em cinco moléculas adicionais de RNA e até 200 proteínas, e hidrolisa muitas moléculas de ATP por evento de *splicing*. Essa complexidade é presumivelmente necessária para assegurar que o *splicing* seja exato, sendo ao mesmo tempo suficientemente flexível para lidar com a enorme diversidade de íntrons encontrada em uma célula eucariótica típica.

Pode parecer uma perda de tempo e energia remover um grande número de íntrons por *splicing* de RNA. Na tentativa de explicar por que isso ocorre, os cientistas descobriram que o arranjo éxon-íntron parece facilitar o aparecimento de proteínas novas e úteis em uma escala de tempo evolutiva. Assim, a presença de numerosos íntrons no DNA permite que a recombinação genética facilmente combine éxons de diferentes genes (ver p. 140), possibilitando que genes para novas proteínas evoluam mais facilmente por intermédio da combinação de partes de genes preexistentes. Essa ideia é apoiada pela observação, descrita no Capítulo 3, de que muitas proteínas nas células atuais assemelham-se a uma "colcha de retalhos" composta a partir de um conjunto comum de *domínios* proteicos.

Atualmente, o *splicing* de RNA também apresenta uma vantagem. Os transcritos de muitos genes eucarióticos (estimados em 75% dos genes em humanos) sofrem *splicing* de diferentes maneiras, permitindo que um mesmo gene produza um grupo correspondente de diferentes proteínas (**Figura 6-27**). Assim, em vez de ser um processo desnecessário e de

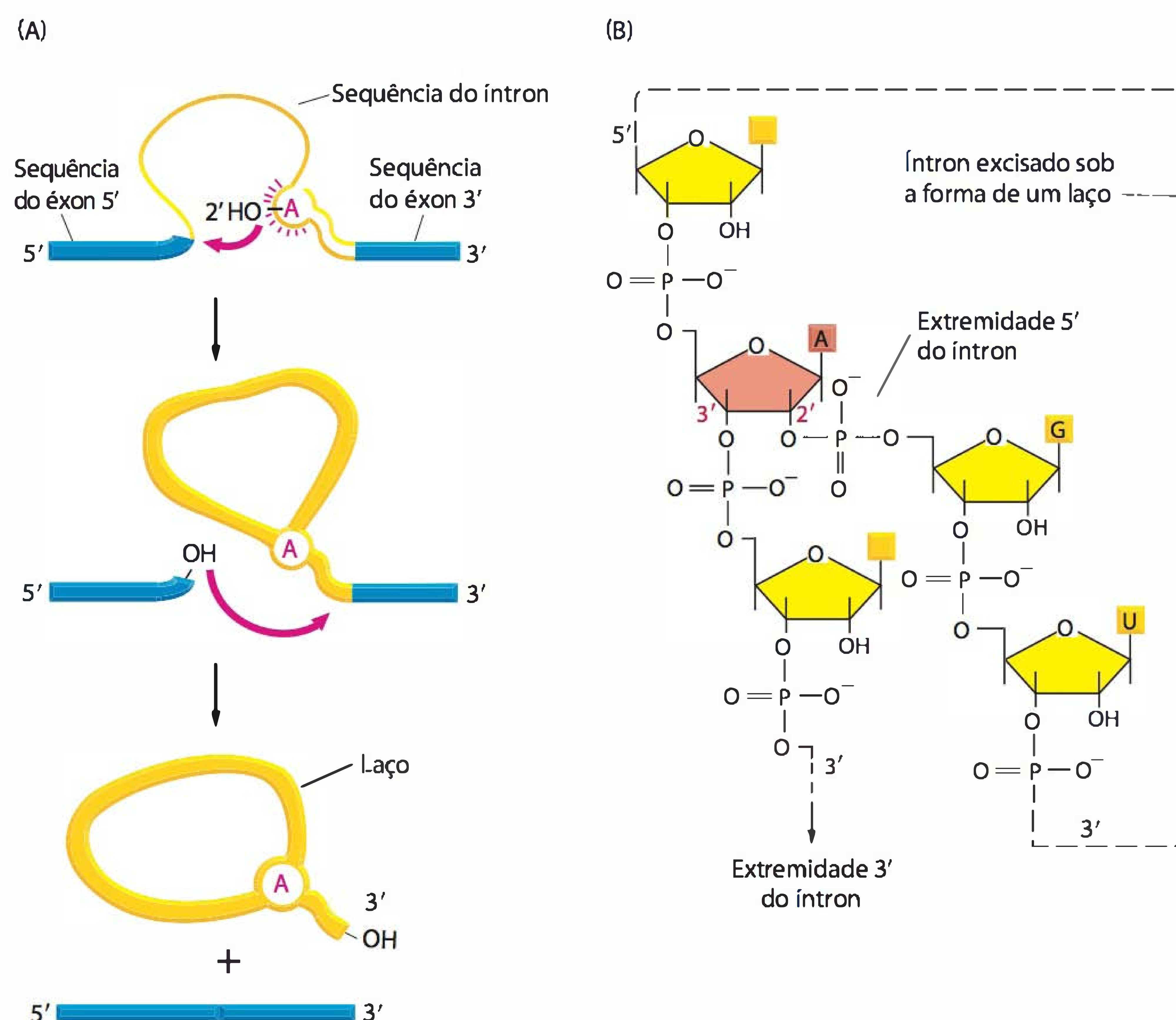


Figura 6-26 Reação de *splicing* do pré-mRNA. (A) No primeiro passo, um nucleotídeo de adenina específico na sequência do íntron (indicado em *vermelho*) ataca a região 5′ de *splicing* e corta a estrutura de açúcar-fosfato do RNA neste ponto. A extremidade 5′ cortada do íntron torna-se covalentemente ligada ao nucleotídeo de adenina, como mostrado no detalhe em (B), criando assim uma alça na molécula de RNA. A extremidade 3′-OH livre liberada da sequência do éxon reage com o início da sequência do éxon seguinte, unindo os dois éxons e liberando a sequência do íntron na forma de um *laço*. Consequentemente, as sequências dos dois éxons se unem, formando uma sequência codificante contínua; a sequência do íntron liberado é degradada no momento adequado.

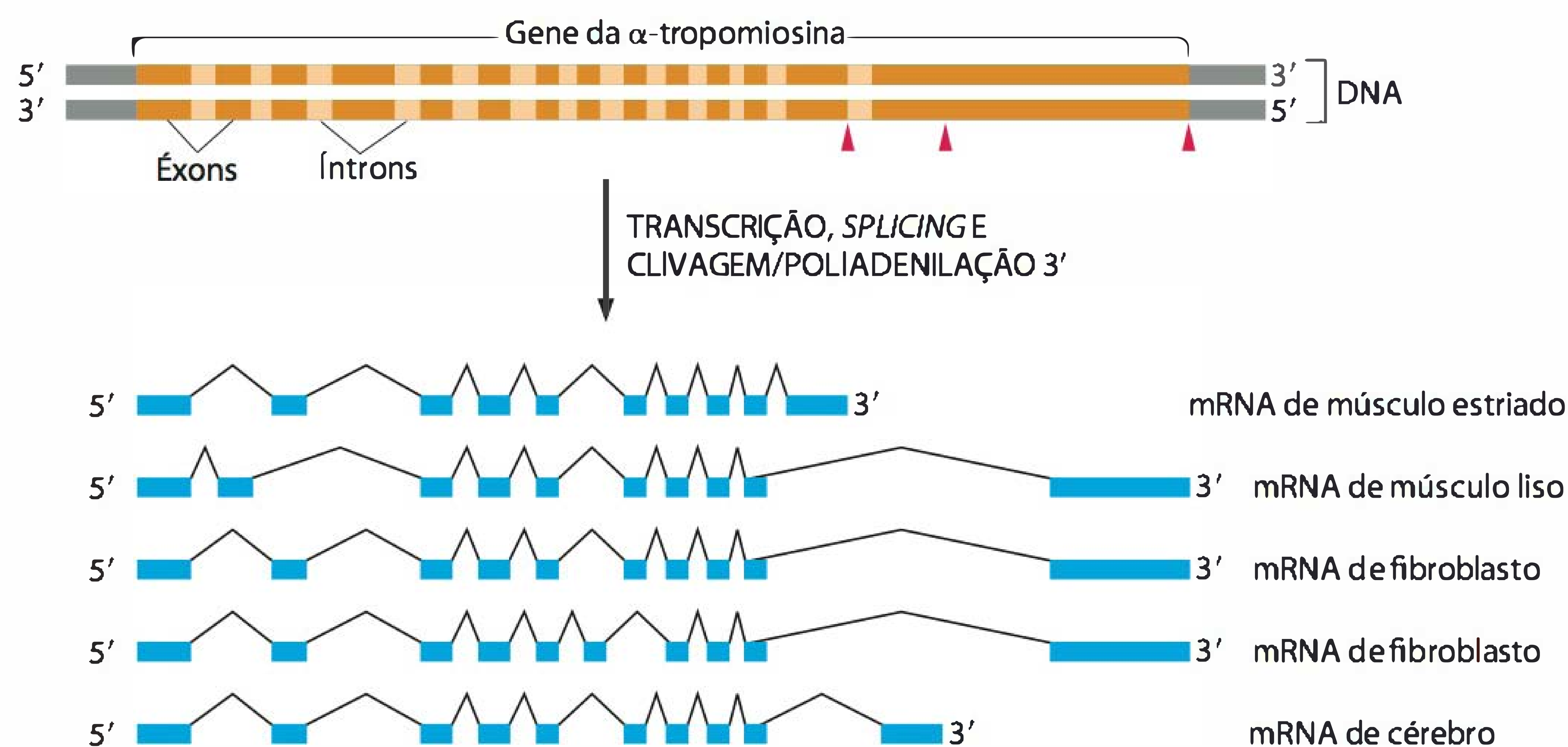


Figura 6-27 ***Splicing*** **alternativo do gene de α-tropomiosina de rato.** A α-tropomiosina é uma proteína superorcida (ver Figura 3-9) que regula a contração em células musculares. O transcrito primário pode ter seus íntrons retirados de diferentes maneiras, como indicado na figura, para produzir mRNAs distintos que dão origem a variantes proteicas. Alguns desses padrões de *splicing* são específicos de certos tipos de células. Por exemplo, a α-tropomiosina produzida no músculo estriado é diferente daquela produzida pelo mesmo gene em um músculo liso. As pontas de flecha na parte superior da figura marcam os sítios onde a clivagem e a adição de poli-A formam as extremidades 3′ dos mRNAs maduros.

gasto excessivo, como aparentava à primeira vista, o *splicing* de RNA permite aos eucariotos incrementar o já enorme potencial codificante de seus genomas. Retornaremos a essa ideia várias vezes neste capítulo e no próximo, mas primeiro precisamos descrever a maquinaria celular que realiza essa fascinante tarefa.

As sequências nucleotídicas sinalizam onde ocorre o *splicing*

O mecanismo de *splicing* de pré-mRNA ilustrado na Figura 6-26 implica que a maquinaria de *splicing* deve reconhecer três regiões na molécula RNA precursora: a região de *splicing* 5′, a região de *splicing* 3′ e o ponto da forquilha na sequência do íntron que forma a base do fragmento em laço a ser excisado. Como esperado, cada um desses três sítios tem uma sequência nucleotídica consenso, que é similar entre os íntrons e que fornece para a célula dicas a respeito do local onde deve ocorrer o *splicing* (**Figura 6-28**). Entretanto, essas sequências consenso são relativamente curtas e podem aceitar um alto grau de variabilidade; como veremos em breve, a célula incorpora outros tipos de informação para definir exatamente onde, sobre cada molécula de RNA, deverá ocorrer o *splicing*.

A alta variabilidade das sequências consenso de *splicing* é um desafio adicional para os cientistas determinados a decifrar as sequências do genoma. O tamanho dos íntrons varia de aproximadamente 10 a mais de 100 mil nucleotídeos e a determinação dos limites exatos de cada íntron é uma árdua tarefa, mesmo com a ajuda de computadores de alto desempenho. A possibilidade da existência de *splicing* alternativo aumenta o problema de previsão de sequências proteicas unicamente a partir de uma sequência genômica. Essa dificuldade é um dos principais obstáculos para a identificação de todos os genes em um genoma completo, sendo uma das principais razões de conhecermos somente o número aproximado de genes no genoma humano.

O *splicing* do RNA é realizado pelo spliceossomo

Diferentemente das outras etapas de produção de mRNA já discutidas, as etapas-chave do *splicing* do RNA são realizadas por moléculas de RNA e não por proteínas. Moléculas especializadas de RNA reconhecem as sequências nucleotídicas que especificam onde o *splicing* deve ocorrer e também participam na química do *splicing*. Essas moléculas de RNA são re-

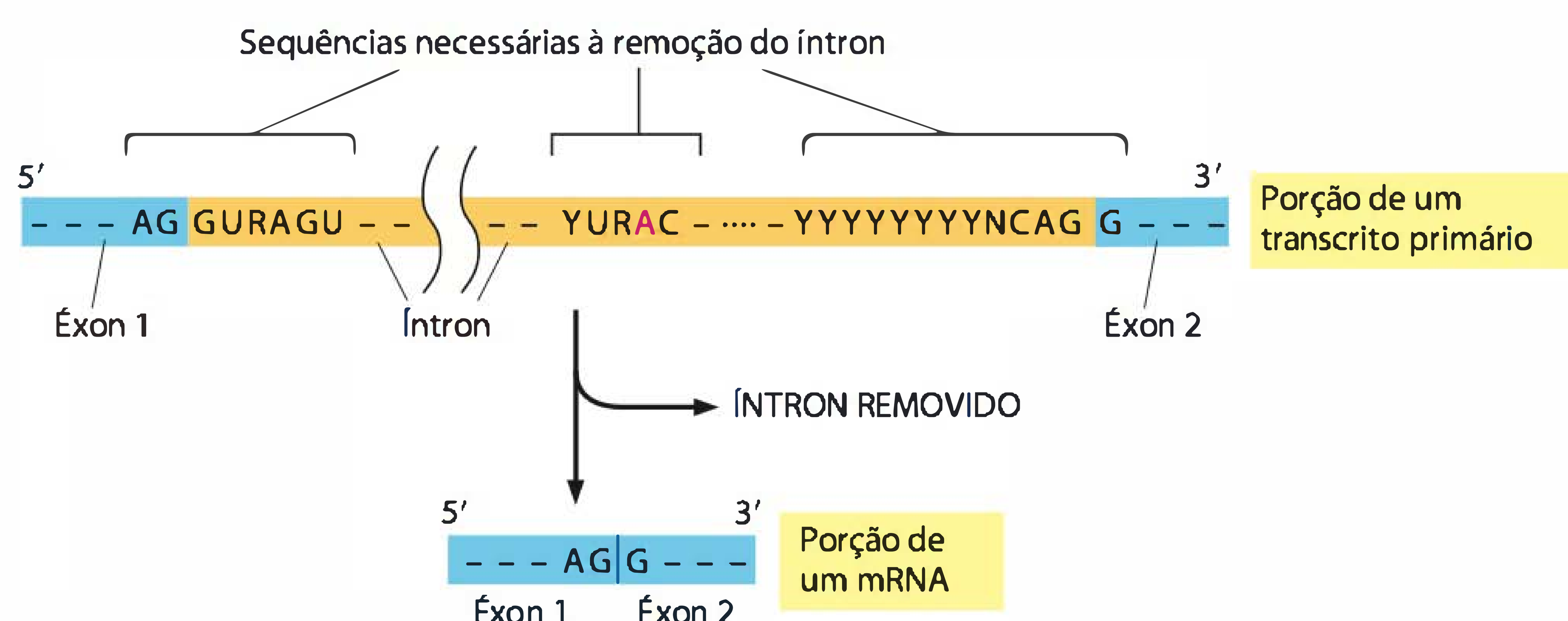
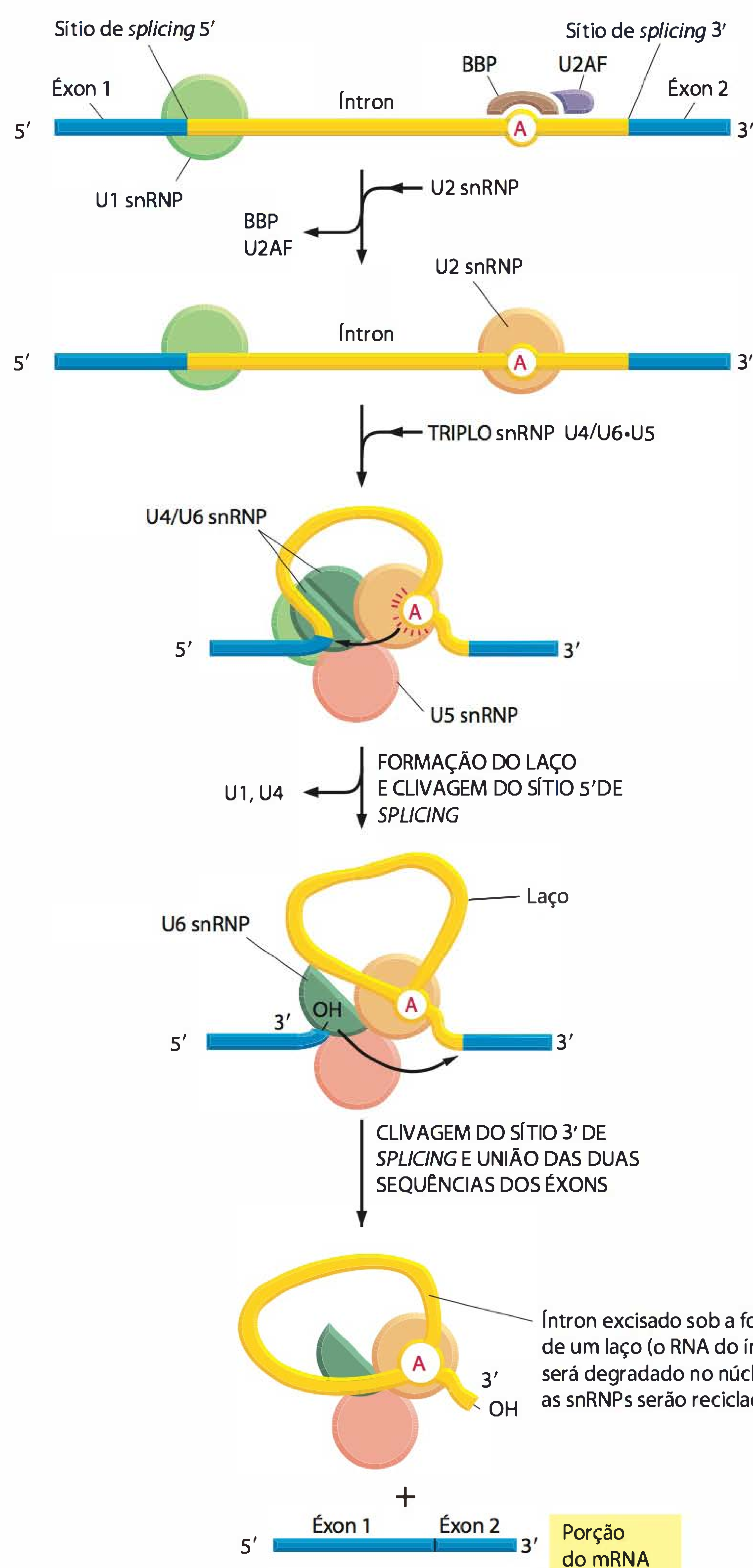


Figura 6-28 **Sequências consenso de nucleotídeos em uma molécula de RNA que sinalizam o início e o final da maioria dos íntrons humanos.** Apenas os três blocos de sequências nucleotídicas mostrados são suficientes para a remoção de um íntron; o restante do íntron pode ser ocupado por qualquer nucleotídeo. Aqui A, G, U e C são os nucleotídeos-padrão do RNA; R representa uma purina (A ou G); Y representa uma pirimidina (C ou U). O A salientado em *vermelho* forma o ponto de forquilha do laço produzido pelo *splicing*. Somente o GU do início do íntron e o AG do seu final são nucleotídeos invariantes nas sequências consenso do *splicing*. As posições restantes (mesmo o ponto A da forquilha) podem ser ocupadas por uma gama de nucleotídeos, embora os nucleotídeos indicados sejam preferenciais. As distâncias no RNA entre as três sequências consenso de *splicing* são altamente variáveis; entretanto, a distância entre o ponto de forquilha e a junção 3′ do *splicing* é caracteristicamente muito menor do que a distância entre a junção 5′ do *splicing* e o ponto de forquilha.

lativamente pequenas (menos de 200 nucleotídeos cada), e existem cinco delas (U1, U2, U4, U5 e U6) envolvidas na principal forma de *splicing* do pré-mRNA. Conhecidas como **snRNAs** (**pequenos RNAs nucleares**, *small nuclear RNAs*), cada uma é complexada com pelo menos sete subunidades proteicas para formar uma snRNP (pequena ribonucleoproteína nuclear, de *small nuclear ribonucleoprotein*). As snRNPs formam o cerne do **spliceossomo**, o grande complexo de moléculas de RNA e de proteínas que realiza o *splicing* do pré-mRNA na célula.

O spliceossomo é uma máquina complexa e dinâmica. Quando estudado *in vitro*, alguns poucos componentes do spliceossomo se organizam sobre o pré-mRNA e, conforme a reação de *splicing* ocorre, novos componentes são incorporados e substituem aqueles que já desempenharam suas funções e foram ejetados (**Figura 6-29**). No entanto, muitos cientistas acreditam que, no interior da célula, o spliceossomo já se encontre como um agrupamento contendo todos seus componentes interagindo por conexões fracas – capturando, realizando o *splicing* e liberando o RNA, sob a forma de uma unidade coordenada que sofre

Figura 6-29 Mecanismo de *splicing* do pré-mRNA. O *splicing* de RNA é catalisado por um conjunto de snRNPs (mostradas como *círculos coloridos*) e de outras proteínas (a maioria das quais não é mostrada) que, juntas, constituem o spliceossomo. O spliceossomo reconhece os sinais de *splicing* em uma molécula de pré-mRNA, aproxima as duas extremidades dos íntrons e fornece a atividade enzimática para os dois passos da reação (ver Figura 6-26).



Porção de um transcrito pré-mRNA

A snRNP U1 pareia com a junção 5′ do *splicing* (ver Figura 6-30A) e a BBP (proteína de ligação ao ponto de forquilha) e o U2AF (fator auxiliar de U2) reconhecem o sítio do ponto de forquilha.

A snRNP U2 desloca BBP e U2AF e forma pares de base com a sequência consenso da região do ponto de forquilha (ver Figura 6-30B).

A tripla snRNP U4/U6•U5 entra na reação. Na tripla snRNP, os snRNAs U4 e U6 são mantidos firmemente em união pelas interações de pares de bases. Os rearranjos subsequentes criam o sítio ativo do spliceossomo e posicionam as porções apropriadas do substrato pré-mRNA para que ocorra a primeira reação fosforil-transferase.

Vários outros rearranjos RNA-RNA ocorrem e separam as bases pareadas de U4/U6, permitindo que a snRNP U6 desloque U1 na junção 5′ do *splicing* (ver Figura 6-30A) para a formação do sítio ativo da segunda reação fosforil-transferase, a qual completa o *splicing*.

extensos rearranjos a cada momento em que realiza o *splicing*. Durante a reação de *splicing*, o reconhecimento da junção de *splice* 5′, do ponto da forquilha e da junção de *splice* 3′ é realizado principalmente por meio do pareamento de bases entre os snRNAs e as sequências consenso de RNA no substrato pré-mRNA (**Figura 6-30**). Durante o *splicing*, o spliceossomo sofre vários deslocamentos nos quais um grupo de interações de pares de bases é quebrado e outro é formado em seu lugar. Por exemplo, U1 é substituído por U6 na junção do *splice* 5′ (ver Figura 6-30A). Esse tipo de arranjo RNA-RNA (no qual a formação de uma interação RNA-RNA requer a ruptura de outra) ocorre várias vezes durante a reação de *splicing*. Isso permite que as sequências de RNA sejam verificadas mais de uma vez antes que a reação química prossiga, aumentando assim a precisão do *splicing*.

O spliceossomo usa hidrólise de ATP para produzir uma série complexa de rearranjos RNA-RNA

Embora a hidrólise de ATP não seja necessária para a química do *splicing* de RNA *per se*, ela é necessária para a correta montagem e para os rearranjos do spliceossomo. Algumas das proteínas adicionais que fazem parte do spliceossomo utilizam a energia da hidrólise de ATP para quebrar interações RNA-RNA já existentes e permitir a formação de outras. Na verdade, todas as etapas ilustradas previamente na Figura 6-29 – exceto a associação da proteína de ligação ao ponto de ramificação (BBP, *branch-point binding protein*) com o sítio da forquilha e de snRNP U1 com o sítio 5′ do *splice* – necessitam de hidrólise de ATP e de proteínas adicionais. Ao todo, em torno de 200 proteínas, incluindo aquelas que formam as snRNPs, são necessárias para cada evento de *splicing*.

Rearranjos RNA-RNA que necessitam de ATP no spliceossomo ocorrem entre as snRNPs e entre as snRNPs e o substrato pré-mRNA. Uma das funções mais importantes desses rearranjos é a criação do sítio catalítico ativo do spliceossomo. A estratégia de criação do sítio ativo somente após a montagem e o rearranjo dos componentes do *splicing* no substrato pré-mRNA é uma maneira particularmente eficiente de evitar o *splicing* indesejado.

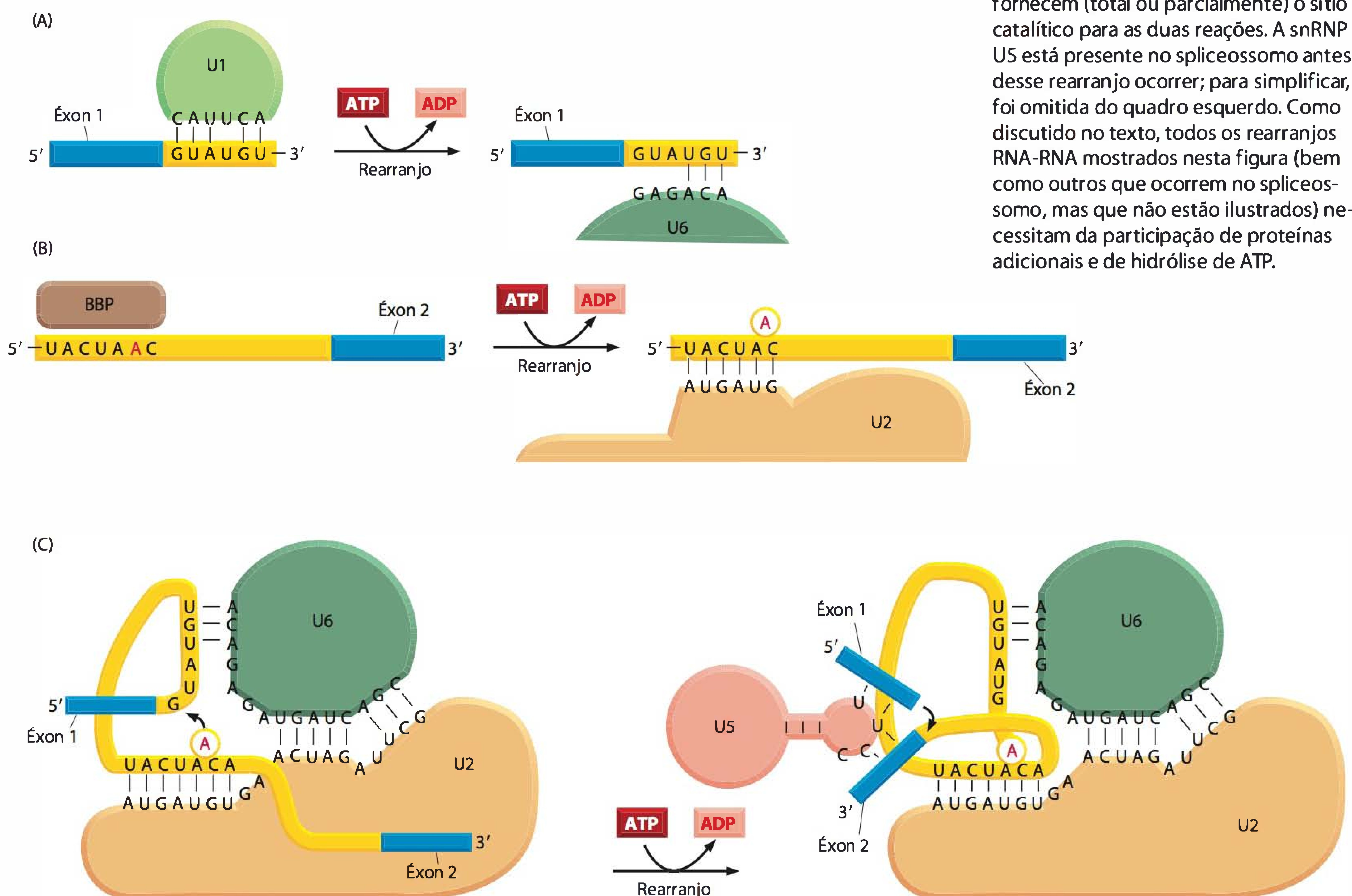


Figura 6-30 Vários rearranjos que ocorrem no spliceossomo durante o *splicing* do pré-mRNA. São mostrados os pontos específicos para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos quais as sequências nucleotídicas envolvidas são ligeiramente diferentes daquelas em células humanas. (A) A troca de snRNP U1 porsnRNP U6 ocorre antes da primeira reação de transferência de fosforil (ver Figura 6-29). Essa troca faz com que o sítio de *splicing* 5′ seja lido por duas snRNPs diferentes, o que aumenta a exatidão da seleção do sítio de *splicing* 5′ pelo spliceossomo. (B) O ponto de forquilha é inicialmente reconhecido pela BBP e, após, pela snRNP U2; como em (A), essa estratégia de "checagem e rechecagem" aumenta a exatidão de seleção do sítio. A ligação de U2 ao ponto de forquilha força a adenina apropriada (em *vermelho*) a permanecer não-pareada e, dessa maneira, a ativa para o ataque no sítio de *splicing* 5′ (ver Figura 6-29). Dessa forma, em combinação com o reconhecimento pela BBP, o spliceossomo escolhe acertadamente a adenina que formará o ponto de forquilha. (C) Após ter ocorrido a primeira reação de transferência de fosforil (*esquerda*), a snRNP U5 sofre um rearranjo que aproxima os dois éxons intimamente para uma segunda reação de transferência de fosforil (*direita*). Os snRNAs posicionam os reagentes e fornecem (total ou parcialmente) o sítio catalítico para as duas reações. A snRNP U5 está presente no spliceossomo antes desse rearranjo ocorrer; para simplificar, foi omitida do quadro esquerdo. Como discutido no texto, todos os rearranjos RNA-RNA mostrados nesta figura (bem como outros que ocorrem no spliceossomo, mas que não estão ilustrados) necessitam da participação de proteínas adicionais e de hidrólise de ATP.

Talvez a característica mais surpreendente do spliceossomo seja a natureza do sítio catalítico em si: ele é em grande parte (se não exclusivamente) formado por moléculas de RNA e não de proteínas. Na última seção deste capítulo discutiremos em termos gerais as propriedades químicas e estruturais do RNA que permitem que ele realize catálise; aqui precisamos apenas considerar que os snRNAs U2 e U6 no spliceossomo formam uma estrutura tridimensional de RNA exata que justapõe o sítio 5′ de *splice* do pré-mRNA ao ponto de forquilha e provavelmente realize a primeira reação de transesterificação (ver Figura 6-30C). De maneira similar, as junções 5′ e 3′ do *splice* são unidas (em um evento que requer o snRNA U5) para facilitar a segunda transesterificação.

Uma vez que a reação química do *splicing* foi completada, as snRNPs permanecem ligadas à alça em laço. A dissociação das snRNPs do laço (e umas das outras) requer outra série de rearranjos RNA-RNA que necessita de hidrólise de ATP. Dessa forma, os snRNAs retornarão à sua configuração original, podendo ser reutilizados em uma nova reação. Ao final de um *splice*, o spliceossomo direciona um conjunto de proteínas a ligar-se sobre o mRNA próximo à região anteriormente ocupada pelo íntron. Denominadas *complexo de junção do éxon* (*EJC, exon junction complex*), essas proteínas marcam o sítio de um evento de *splicing* que ocorreu com sucesso e, como veremos adiante neste capítulo, influenciam o destino subsequente do mRNA.

Outras propriedades do pré-mRNA e a sua síntese auxiliam a explicar a escolha dos sítios adequados de *splicing*

Como vimos, os íntrons variam bastante em tamanho, alguns excedendo os cem mil nucleotídeos. Se a seleção do sítio do *splice* fosse determinada unicamente pela ação de snRNPs em uma molécula de RNA pré-formada livre de proteínas, poderíamos esperar que erros de *splicing* – como a eliminação de éxons e o uso de regiões "crípticas" de *splice* – fossem bastante comuns (**Figura 6-31**). Os mecanismos de fidelidade construídos em torno do spliceossomo são suplementados por dois fatores adicionais que aumentam a chance que o *splicing* ocorra de forma exata. O primeiro é simplesmente consequência dos estágios iniciais de *splicing* ocorrerem à medida que as moléculas de pré-mRNA estão sendo sintetizadas por uma RNA-polimerase II. Enquanto a transcrição ocorre, a cauda fosforilada da RNA-polimerase carreia vários componentes do spliceossomo (ver Figura 6-23), e esses componentes são diretamente transferidos da polimerase para o RNA, à medida que esse RNA é sintetizado. Essa estratégia ajuda a célula a identificar íntrons e éxons: por exemplo, as snRNPs da região 5′ do *splicing* são inicialmente apresentadas a apenas uma região 3′ do *splicing*, visto que as regiões seguintes ainda não foram sintetizadas. Essa coordenação entre transcrição e *splicing* é extremamente importante para evitar a retirada inadequada de éxons.

Uma estratégia denominada "definição de éxon" é outra forma por meio da qual as células escolhem as regiões adequadas para *splicing*. O tamanho dos éxons tende a ser muito mais uniforme que o tamanho dos íntrons, compreendendo, em uma ampla variedade de organismos eucarióticos, em média 150 pares de nucleotídeos (**Figura 6-32**). De acordo com o proposto pela definição do éxon, a maquinaria de *splicing* inicialmente busca identificar sequências de éxons relativamente homogêneas em tamanho. Acredita-se que, à medida que ocorre a síntese de RNA, um grupo de componentes adicionais (mais notavelmente as proteínas SR, assim chamadas por conter um domínio rico em serinas e em argininas) se reúne sobre os éxons e marca cada sítio 3′ e 5′ do *splicing*, iniciando na extremidade 5′ do RNA (**Figura 6-33**). Essas proteínas, por sua vez, recrutam o snRNA U1, que marca o limite 3′ do éxon, e o U2AF, que ajuda a identificar o outro limite. Marcando os éxons especificamente dessa maneira, e assim aproveitando-se da relativa uniformidade de tamanho

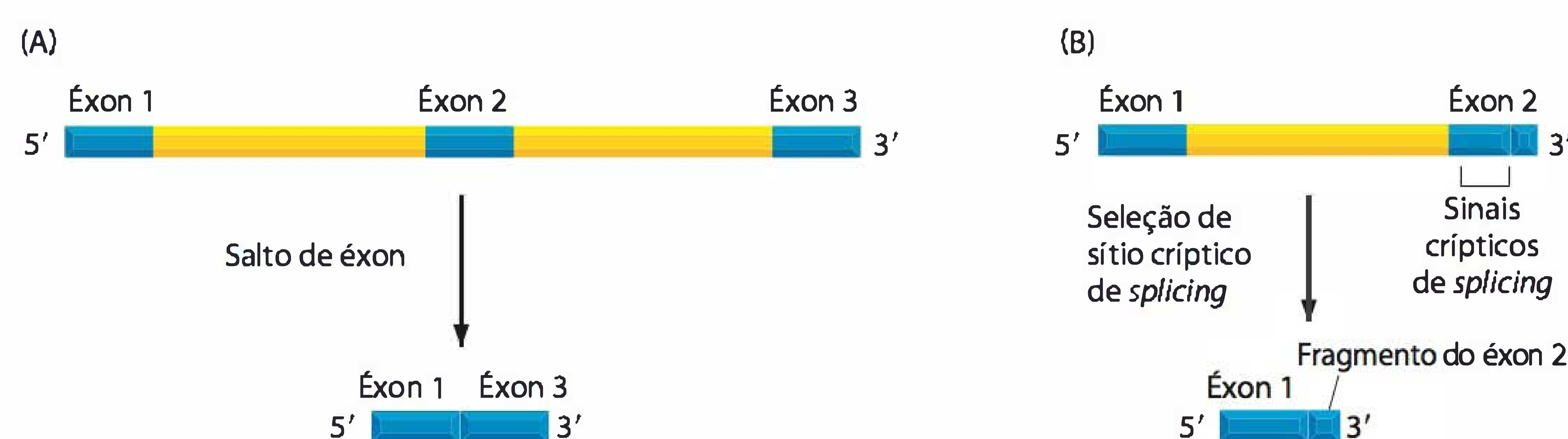


Figura 6-31 Dois tipos de erros de *splicing*. (A) Salto (ou abandono) de éxon. (B) Seleção de sítio críptico de *splicing*. Os sinais crípticos de *splicing* são sequências nucleotídicas no RNA muito semelhantes aos sinais de *splicing* verdadeiros.

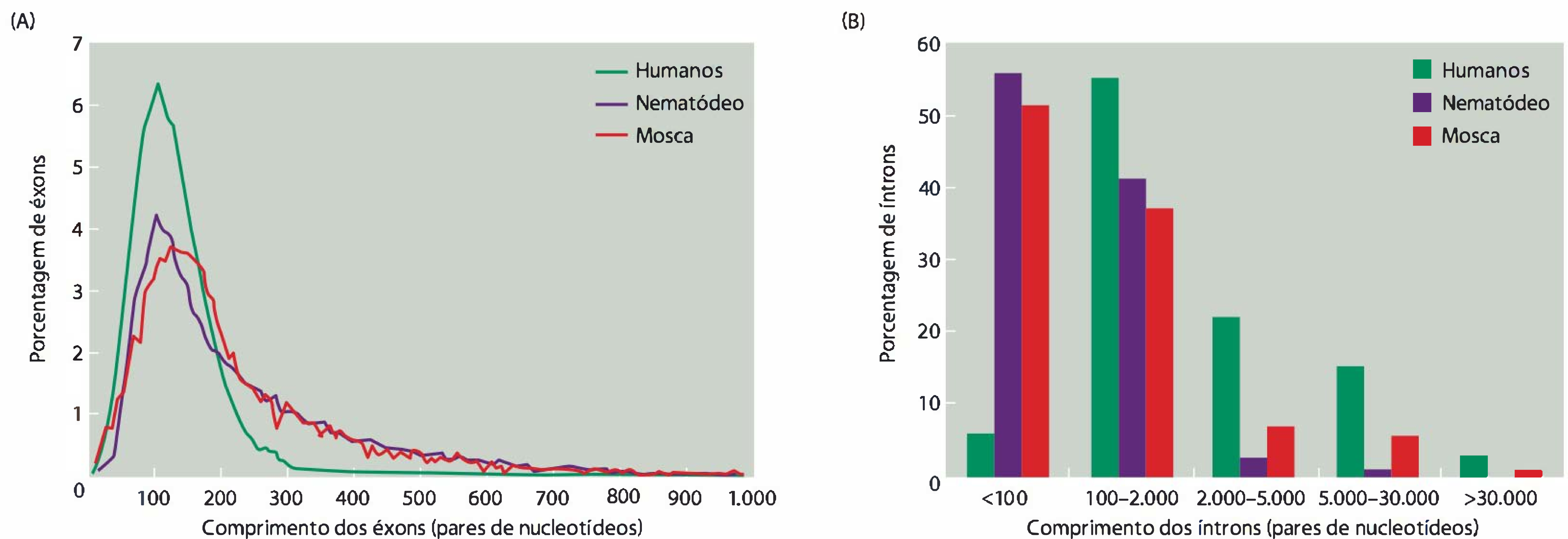


Figura 6-32 Diversidade no tamanho de íntrons e de éxons nos genomas humano, de nematódeo e da mosca. (A) Distribuição do tamanho de éxons. (B) Distribuição do tamanho de íntrons. Observe que o comprimento dos éxons é muito mais uniforme do que o comprimento dos íntrons. (Adaptada de International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409: 860-921, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

dos éxons, a célula aumenta a exatidão pela qual os componentes iniciais de *splicing* são depositados sobre o RNA nascente e, consequentemente, ajuda a evitar os sítios de *splicing* crípticos. Como as proteínas SR discriminam as sequências de éxons daquelas de íntrons ainda não está entendido; entretanto, sabe-se que algumas das proteínas SR ligam-se preferencialmente a sequências específicas de RNA em éxons, denominadas *estimuladores de splicing*. Em princípio, considerando-se a redundância do código genético, existe liberdade para ajustar a sequência nucleotídica dos éxons de modo a formar um sítio de ligação para uma proteína SR, sem que a sequência de aminoácidos que o éxon codifica seja necessariamente afetada.

Tanto a marcação dos limites entre éxons e íntrons quanto a reunião do spliceossomo têm início na molécula de RNA enquanto ela ainda está na fase de extensão pela RNA-polimerase em sua extremidade 3. Entretanto, o verdadeiro processo do *splicing* pode ocorrer muito mais tarde. Esse atraso significa que os íntrons não são necessariamente removidos da molécula de pré-mRNA na ordem em que eles ocorrem ao longo da cadeia de RNA. Isso também significa que, embora a reunião do spliceossomo seja cotranscricional, as reações de *splicing* ocorrem algumas vezes pós-transcricionalmente – ou seja, após a produção de uma molécula completa de pré-mRNA.

Um segundo grupo de snRNPs realiza o *splicing* de uma pequena parcela de íntrons nos animais e nas plantas

Os seres eucariotos simples, como as leveduras, têm somente um conjunto de snRNPs que realiza todos os *splicing* de pré-mRNA. Entretanto, os eucariotos mais complexos, como as moscas, os mamíferos e as plantas, apresentam um segundo grupo de snRNPs que direciona o *splicing* de uma pequena parcela de seus íntrons. Essa forma secundária de spliceossomo reconhece um conjunto diferente de sequências de RNA nas junções 5′ e 3′ do *splicing* e no ponto de forquilha; ela é chamada de *spliceossomo tipo U12* devido ao envolvimento da

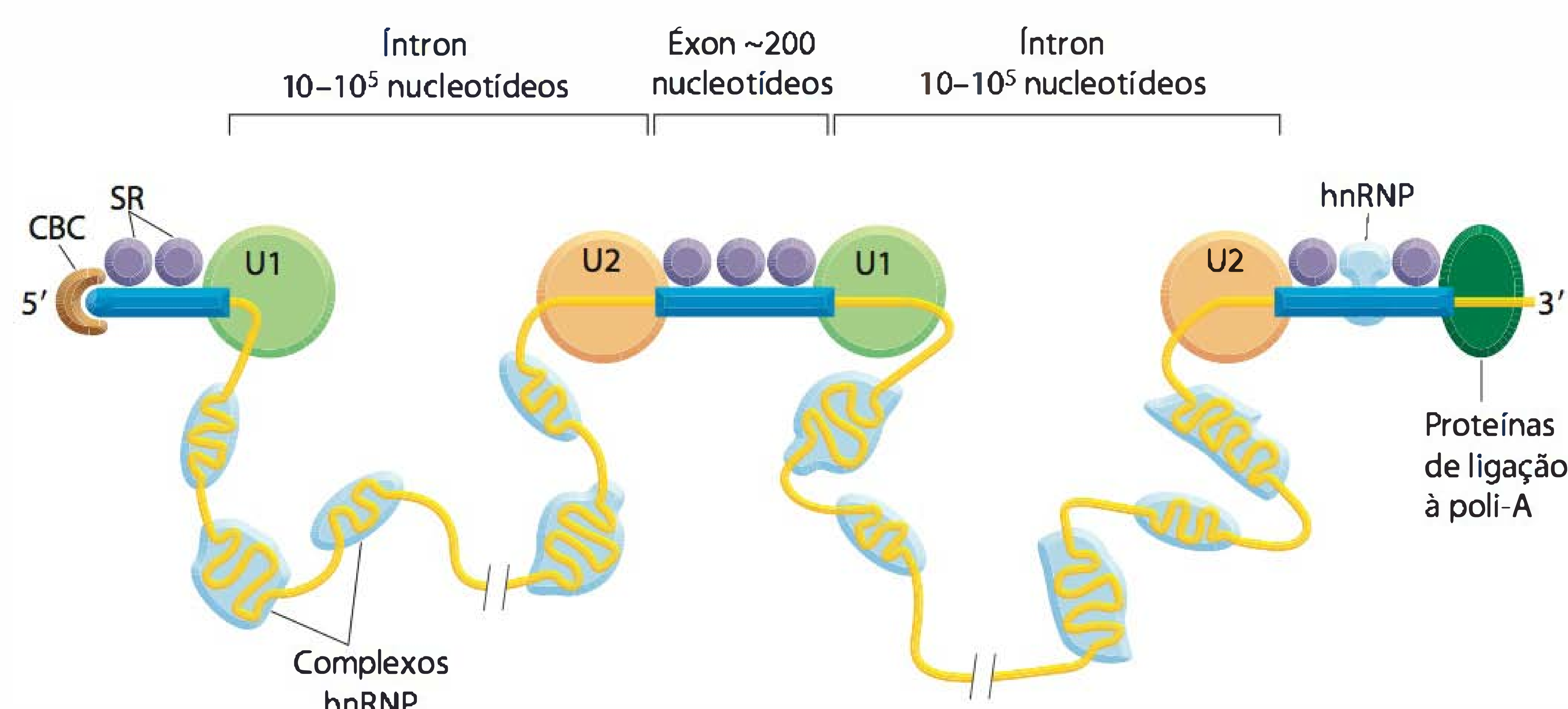


Figura 6-33 Ideia de definição de éxon. De acordo com uma proposta, as proteínas SR ligam-se a cada sequência de éxon no pré-mRNA e, dessa forma, ajudam a guiar as snRNPs para os limites adequados entre íntron/éxon. Essa demarcação de éxons pelas proteínas SR ocorre cotranscricionalmente, iniciando no CBC (complexo de ligação ao quepe) na extremidade 5′. Como indicado, as sequências de íntrons no pré-mRNA, que podem ser extremamente longas, são empacotadas nos complexos hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogênea) que as compactam em estruturas mais manejáveis e talvez mascarem os sítios de *splicing* crípticos. Foi proposto que as proteínas hnRNP se associam preferencialmente com sequências de íntrons e que esta preferência também ajuda o spliceossomo a distinguir íntrons de éxons. Entretanto, como ilustrado, pelo menos algumas proteínas hnRNP podem se ligar a sequências de éxons. (Adaptada de R. Reed, *Curr. Opin. Cell Biol*. 12:340-345, 2000. Com permissão de Elsevier.)

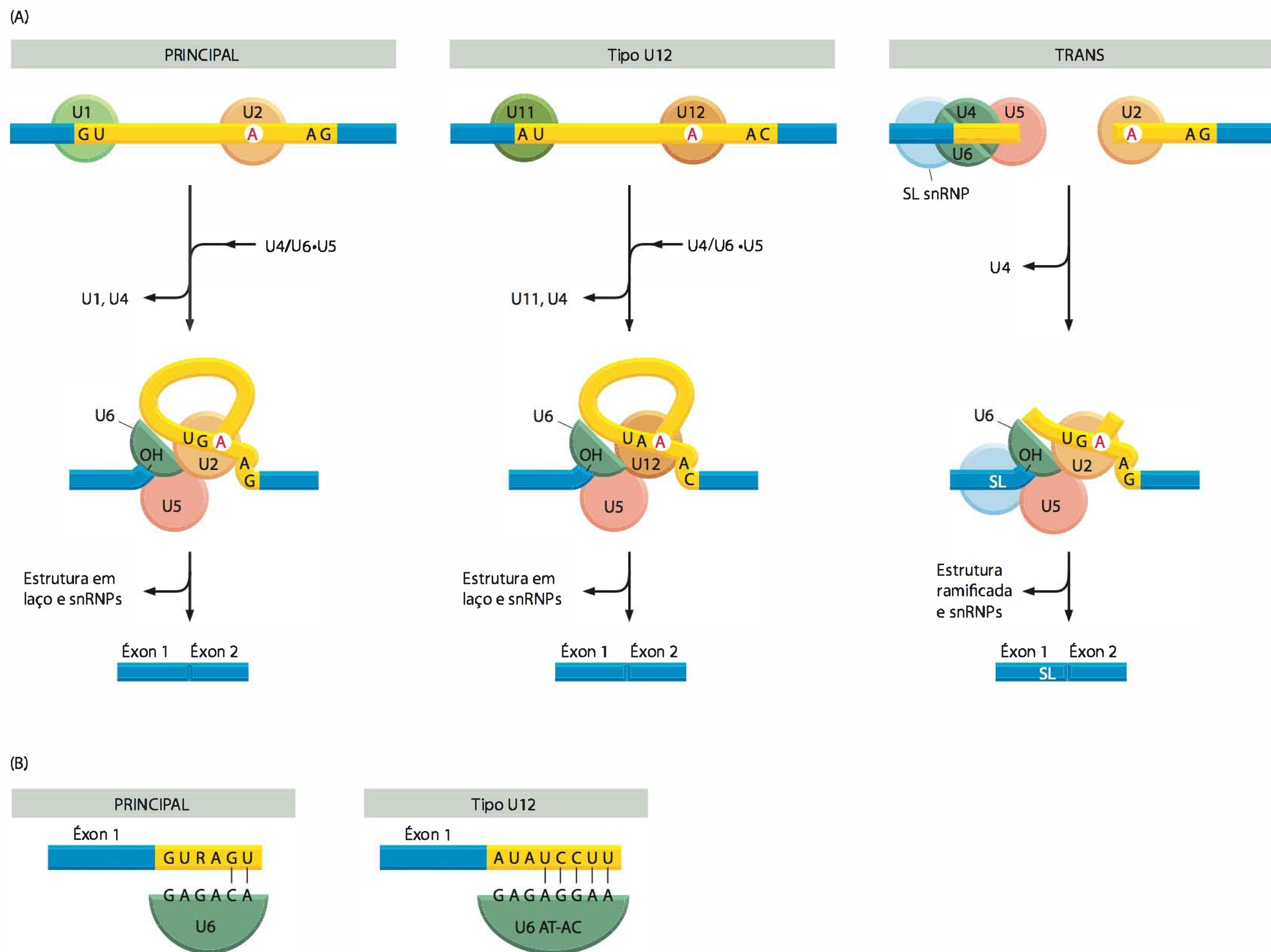


Figura 6-34 Resumo dos mecanismos utilizados por três tipos de *splicing* de RNA. (A) Três tipos de spliceossomos. O spliceossomo principal (à *esquerda*), o spliceossomo tipo U12 (*meio*) e o trans-spliceossomo (à *direita*) são mostrados nos dois estágios de agrupamento. Os íntrons removidos pelo spliceossomo tipo U12 apresentam um grupo diferente de sequências nucleotídicas consenso daqueles que são removidos pelo spliceossomo principal. Em humanos, estima-se que 0,1% dos íntrons é removido pelo spliceossomo tipo U12. No trans-*splicing*, que não ocorre em humanos, a snRNP SL é consumida na reação, pois uma porção da snRNP SL torna-se o primeiro éxon do mRNA maduro. (B) Ambas, snRNP U6 principal e snRNP U6 específica do spliceossomo tipo U12, reconhecem a junção do *splicing* 5′, mas o fazem por um grupo diferente de interações de bases. As sequências ilustradas são de humanos. (Adaptada de Y. T. Yu et al., The RNA World, p. 487-524. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.)

SnRNP U12 (**Figura 6-34**A). Apesar de reconhecer sequências nucleotídicas diferentes, as snRNPs neste spliceossomo realizam os mesmos tipos de interações RNA-RNA, com o pré--mRNA e com as próprias snRNPS, que as snRNPs principais (Figura 6-34B). Apesar de, como vimos anteriormente, os componentes dos spliceossomos principais serem transportados junto à RNA-polimerase II enquanto ela transcreve os genes, isso parece não ocorrer no caso do spliceossomo U12. É possível que o *splicing* mediado por U12 seja, portanto, tardio e represente para a célula uma forma de corregular o *splicing* das muitas centenas de genes cuja expressão requer esse spliceossomo. Diversos mRNAs de mamíferos contêm uma mistura de íntrons, alguns removidos pelo spliceossomo principal e outros pelo spliceossomo secundário, o que levou à sugestão de que esse arranjo permite a ocorrência de padrões particularmente complexos de *splicing* alternativo.

Uma variação específica no *splicing*, denominada **trans-*splicing***, está presente em uns poucos organismos eucarióticos. Entre esses organismos encontram-se os tripanossomos unicelulares – protozoários que causam a doença do sono em humanos, na África – e o organismo multicelular-modelo, um nematódeo. No trans-*splicing*, os éxons de dois transcritos de RNA separados são unidos por *splicing* para formar uma molécula de mRNA madura (ver Figura 6-34A). Os tripanossomos produzem todos os seus mRNAs dessa maneira, enquanto que somente cerca de 1% dos mRNAs de nematódeos é produzido por trans-*splicing*. Em ambos os casos, um único éxon é unido por *splicing* à extremidade 5′ de vários transcritos diferentes de RNA produzidos pela célula; assim, a totalidade dos produtos de trans-*splicing* apresentam o mesmo éxon 5′ e éxons 3′ diferentes. Muitas das mesmas snRNPs que atuam em *splicing* convencional são utilizadas nessa reação,

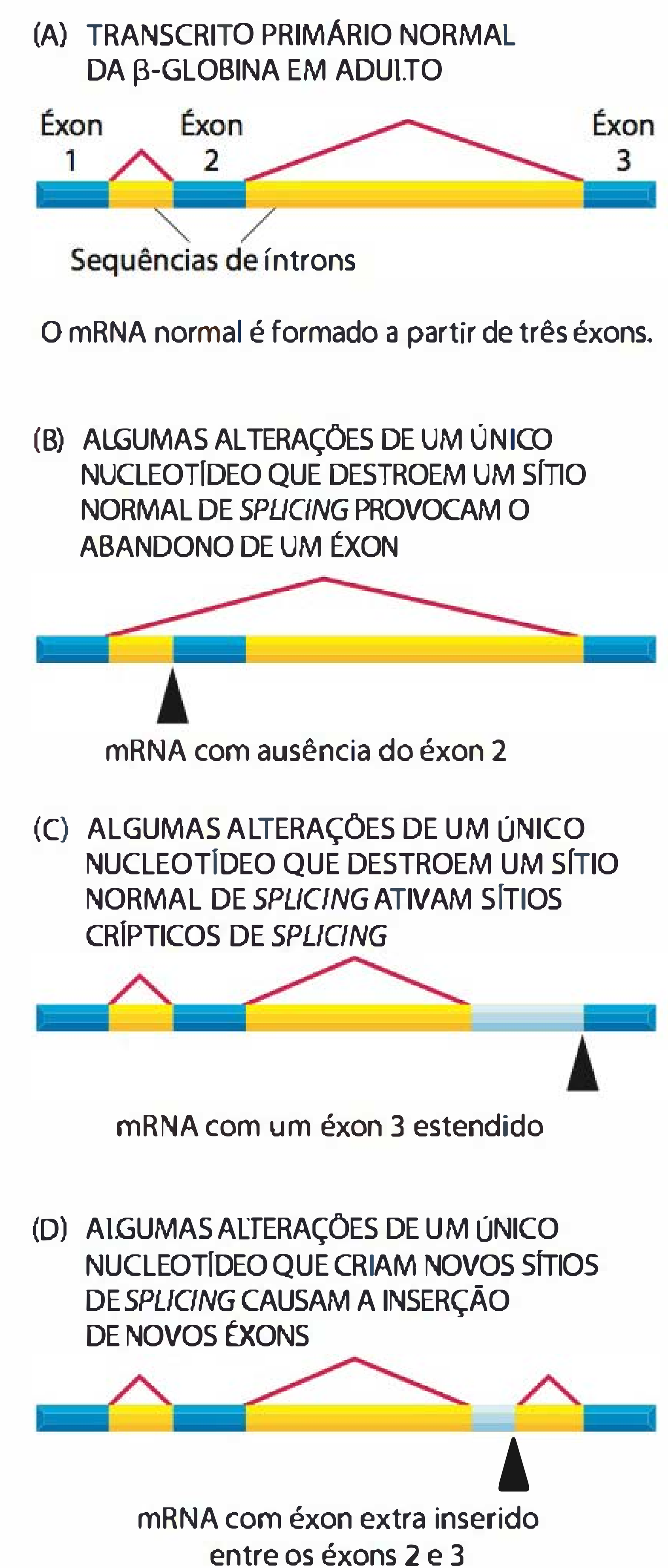


Figura 6-35 Processamento anormal do transcrito primário de RNA da β-globina em humanos com a doença β-talassemia. Nos exemplos ilustrados, a doença é causada por mutações no sítio de *splicing* (*setas pretas*) encontradas em pacientes afetados. Os *quadros azul-escuros* representam as três sequências normais de éxons; as *linhas vermelhas* são utilizadas para indicar os sítios de *splicing* 5′ e 3′. Os *quadros azul-claros* representam novas sequências de nucleotídeos incluídas na molécula de mRNA final como resultado da mutação. Observe que, quando uma mutação deixa um sítio normal de *splicing* sozinha, um éxon é pulado, ou um ou mais sítios de *splicing* crípticos anormais adjacentes são usados, como em (C) e em (D). (Parcialmente adaptada de S. H. Orkin, em *The Molecular Basis of Blood Diseases* [G. Stamatoyannopoulos et al., eds.], p. 106-126. Philadelphia: Saunders, 1987.)

embora o trans-*splicing* utilize uma snRNP característica (denominada SL RNP) que traz o éxon comum (ver Figura 6-34).

A razão pela qual esses poucos organismos usam trans-*splicing* não está estabelecida; no entanto, acredita-se que o éxon 5′ comum possa ajudar na tradução do mRNA. Consequentemente, os produtos de trans-*splicing* nos nematódeos parecem ser traduzidos com uma eficiência especialmente alta.

O *splicing* de RNA apresenta uma extraordinária plasticidade

Vimos que a escolha dos sítios de *splicing* depende de características do transcrito pré-mRNA como a afinidade dos três sinais no RNA (as junções 5′ e 3′ do *splicing* e o ponto de forquilha) pela maquinaria de *splicing*, a montagem cotranscricional do spliceossomo e a eficiência da "escrituração e da cópia" que definem o éxon. Desconhecemos quão exato é o processo normal de *splicing*, pois, como veremos mais tarde, existem vários sistemas de controle de qualidade que rapidamente destroem mRNAS cujo *splicing* ocorreu de forma inadequada. No entanto, sabemos que, comparado a outras etapas da expressão gênica, o *splicing* geralmente é bastante flexível. Por exemplo, quando uma mutação ocorre em uma sequência nucleotídica crítica para o *splicing* de um íntron determinado, isso por si só não impedirá necessariamente o *splicing* deste íntron. Em vez disso, a mutação normalmente criará um novo padrão de *splicing* (**Figura 6-35**). Com frequência, um éxon é simplesmente pulado (ver Figura 6-35B). Em outros casos, a mutação leva ao uso eficiente de uma junção críptica (Figura 6-35C). Presumivelmente, a maquinaria de *splicing* evoluiu para identificar o melhor padrão possível das junções de *splicing* e, se este é danificado por uma mutação, ela procura o próximo melhor padrão, e assim por diante. Essa flexibilidade no processo de *splicing* do RNA sugere que as modificações nos padrões de *splicing* provocadas por mutações ao acaso são uma via importante na evolução dos genes e dos organismos.

A plasticidade do *splicing* de RNA também significa que a célula pode regular o padrão de *splicing* do RNA. Anteriormente, nesta seção, vimos que um *splicing* alternativo pode dar origem a proteínas diferentes a partir de um mesmo gene. Alguns exemplos de *splicing* alternativos são constitutivos; isto é, os mRNAs que sofreram *splicing* alternativo são produzidos continuamente pelas células de um organismo. Entretanto, em muitos casos, os padrões de *splicing* são regulados pela célula de tal forma que diferentes proteínas são produzidas em diferentes momentos e em diferentes tecidos (ver Figura 6-27). No Capítulo 7, retornaremos a esse assunto para discutir alguns exemplos específicos da regulação de *splicing* do RNA.

O *splicing* do RNA catalisado pelo spliceossomo provavelmente evoluiu a partir de mecanismos de auto-*splicing*

A descoberta do spliceossomo confundiu bastante os biólogos moleculares. Por que moléculas de RNA, em vez de proteínas, desempenham funções importantes no reconhecimento do sítio de *splicing* e nas reações químicas do *splicing*? Por que é utilizado um laço intermediário em vez de se utilizar uma alternativa aparentemente mais simples, que consistiria na aproximação dos sítios 5′ e 3′ do *splicing* em um único passo, seguida pela clivagem direta e por reunião? As respostas a essas questões refletem o que se acredita que tenha sido a evolução do spliceossomo.

Como discutido brevemente no Capítulo 1 (e retomado em mais detalhes na seção final deste capítulo), presume-se que as células primordiais utilizaram moléculas de RNA, em vez de proteínas, como seus principais catalisadores e que estocavam sua informação genética sob a forma de sequências de RNA, em vez de DNA. As reações de *splicing* catalisadas por RNA possivelmente tiveram funções importantes nessas células primordiais. Como evidência, alguns íntrons de *RNA de auto-splicing* (ou seja, íntrons no RNA que sofrem *splicing* na ausência de proteínas ou de quaisquer outras moléculas de RNA) ainda existem atualmente – por exemplo, nos genes do rRNA nuclear do ciliado *Tetrahymena*, em uns poucos genes do bacteriófago T4 e em alguns genes mitocondriais e plastidiais.

Uma sequência de íntron que sofre auto-*splicing* pode ser identificada *in vitro* por meio da incubação de uma molécula de RNA pura que contém a sequência do íntron e a observação da reação de *splicing*. Duas classes principais de íntrons de auto-*splicing* podem ser distinguidas dessa maneira. As *sequências de íntrons do grupo I* começam a reação de *splicing* ligando um nucleotídeo G à sequência do íntron; esse G é então ativado para formar o grupo de ataque que quebrará a primeira ligação fosfodiéster a ser clivada durante o *splicing* (a ligação do sítio 5′ do *splicing*). Nas *sequências de íntrons do grupo II*, um resíduo A especialmente reativo, na sequência do íntron, constitui o grupo de ataque, e uma alça (ou laço) intermediária é gerada. Além disso, os passos da reação dos dois tipos de íntrons de auto-*splicing* são os mesmos. Acredita-se que ambos representem vestígios de mecanismos muito antigos (**Figura 6-36**).

Em ambos os tipos de reações de auto-*splicing*, a sequência nucleotídica do íntron é crítica; o RNA do íntron se dobra em uma estrutura tridimensional específica, unindo as regiões de junção 5′ e 3′ do *splicing* e posicionando exatamente os grupos reativos responsáveis pela reação química (ver Figura 6-6C). Uma vez que as reações químicas de reações de *splicing* são tão similares, foi proposto que o mecanismo de *splicing* de pré-mRNA do spliceossomo evoluiu a partir de íntrons do grupo II de auto-*splicing*. De acordo com essa ideia, quando as snRNPs spliceossomais desenvolveram as funções estruturais e químicas

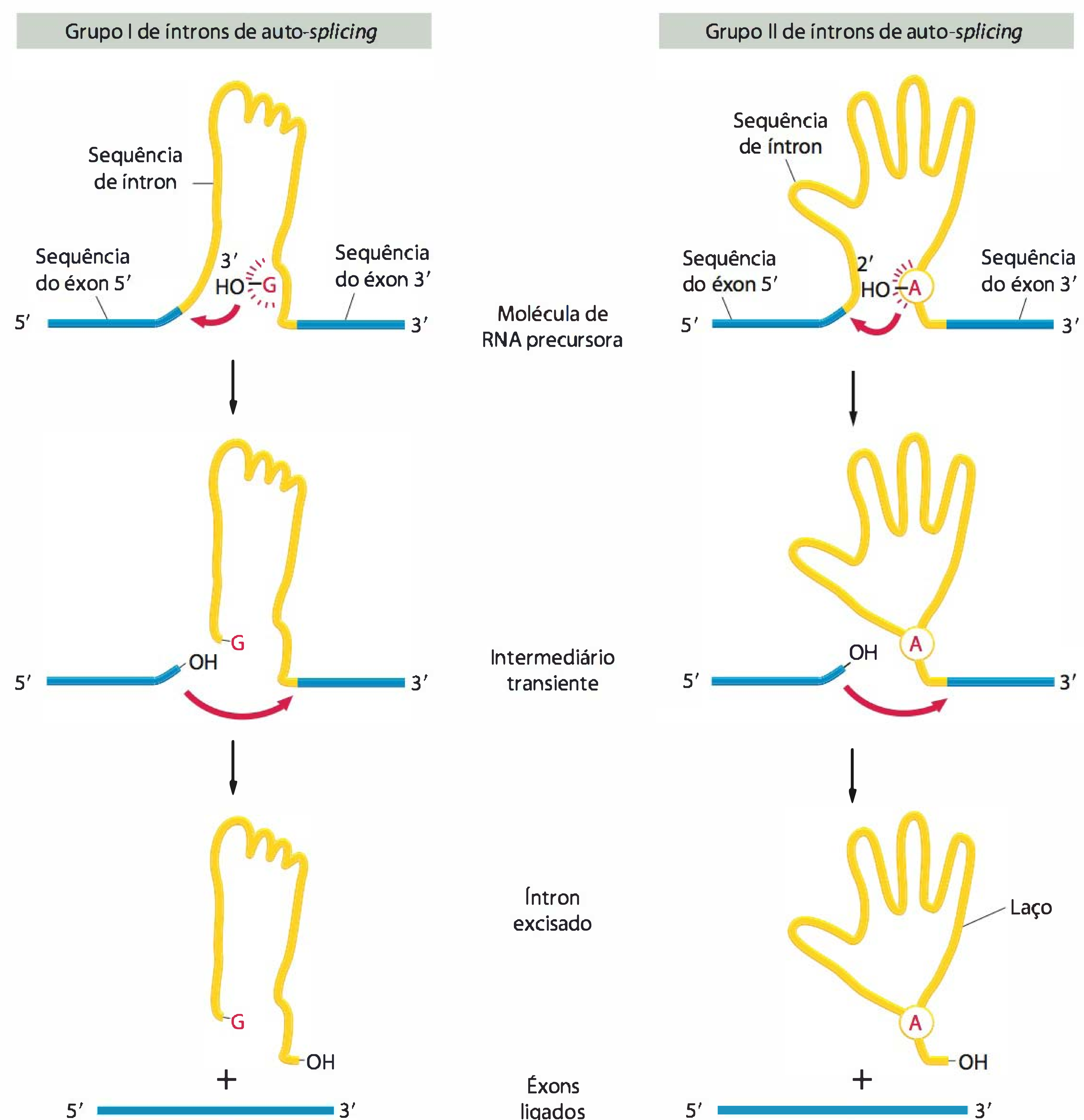


Figura 6-36 As duas classes conhecidas de sequências de íntrons de auto-*splicing*. A figura enfatiza as similaridades entre os dois mecanismos. Ambos normalmente possuem o auxílio de proteínas nas células que aumentam a velocidade da reação, no entanto a catálise é mediada pelo RNA na sequência de íntron. Os íntrons do grupo I ligam um nucleotídeo G livre a um sítio específico no RNA para iniciar o *splicing*, enquanto os íntrons do grupo II usam um nucleotídeo A especialmente reativo, no próprio íntron, para a mesma função. Ambos os tipos de reações de auto-*splicing* requerem que o íntron seja dobrado em uma estrutura tridimensional altamente específica que fornece a atividade catalítica para a reação (ver Figura 6-6). O mecanismo usado pelos íntrons do grupo II libera o íntron como uma estrutura em laço e assemelha-se muito à via de *splicing* de pré-mRNA catalisada pelo spliceossomo (comparar com a Figura 6-29). A grande maioria do *splicing* de RNA em células eucarióticas é realizada pelo spliceossomo, e os RNAs de auto-*splicing* representam casos incomuns. (Adaptada de T. R. Cech, *Cell* 44:207-210, 1986. Com permissão de Elsevier)

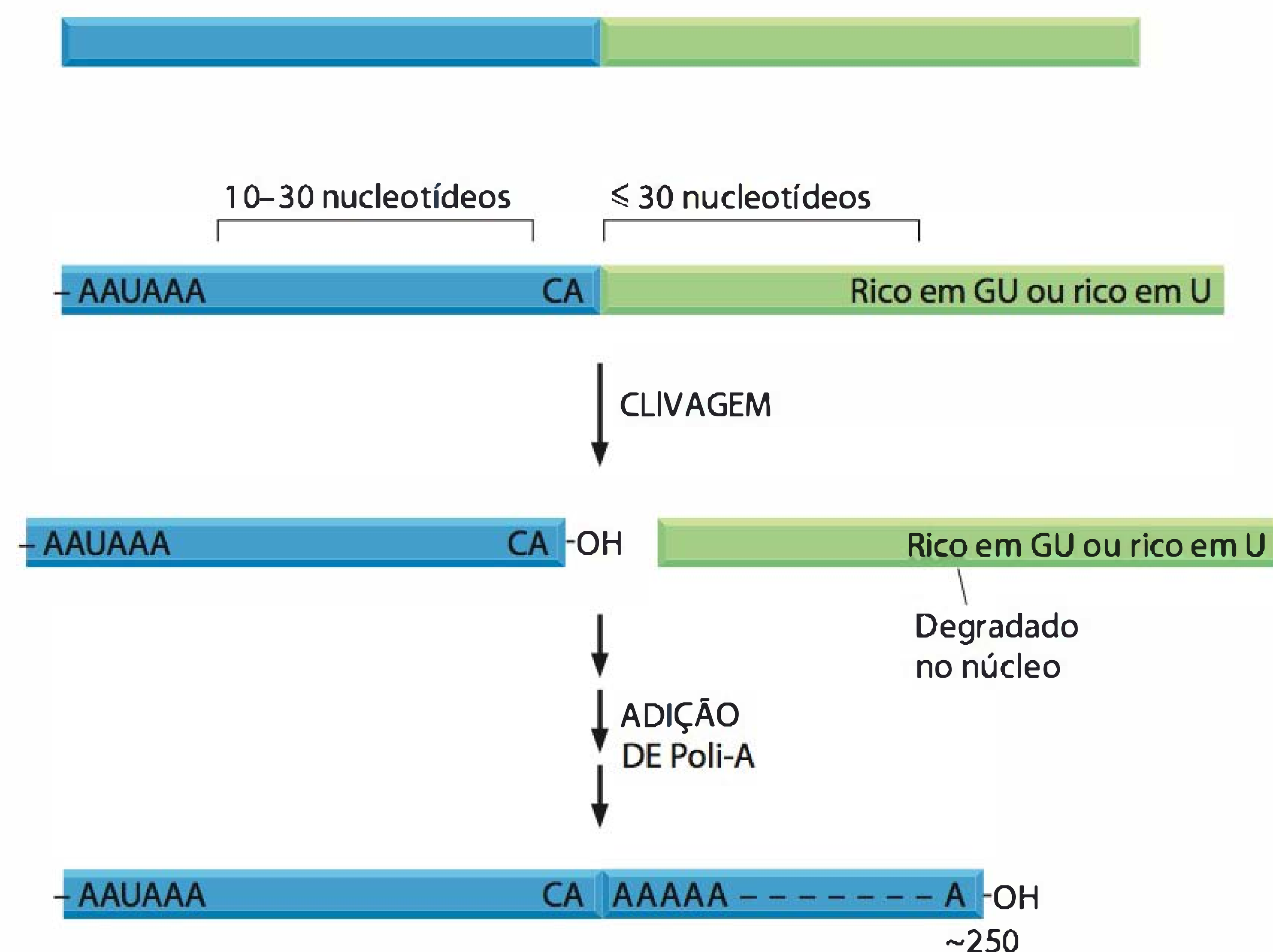


Figura 6-37 Sequências consenso de nucleotídeos que direcionam a clivagem e a poliadenilação para formar a extremidade 3′ de um mRNA eucariótico. Essas sequências são codificadas no genoma e reconhecidas por proteínas específicas após serem transcritas em RNA. O hexâmero AAUAAA é ligado pelo CPSF, o elemento rico em GU à direita do sítio de clivagem pelo CstF (ver Figura 6-38), e a sequência CA é ligada por um terceiro fator necessário para a clivagem. Como outras sequências consenso de nucleotídeos discutidas neste capítulo (ver Figura 6-12), as sequências ilustradas na figura representam uma gama de sinais de poliadenilação e de clivagens individuais.

de íntrons do grupo II, as limitações estritas da sequência de íntrons devem ter desaparecido, permitindo, dessa forma, uma ampla expansão no número de RNAs diferentes que podem sofrer *splicing*.

As enzimas de processamento do RNA geram a extremidade 3′ dos mRNAs de eucariotos

Como anteriormente explicado, a extremidade 5′ de um pré-mRNA produzido pela RNA-polimerase II é capeada quase que imediatamente à sua saída da RNA-polimerase. A seguir, à medida que a polimerase continua seu movimento ao longo de um gene, os componentes do spliceossomo reúnem-se sobre o RNA e determinam os limites entre os éxons e os íntrons. A longa cauda C-terminal da RNA-polimerase coordena esses processos pela transferência de componentes do capeamento e do *splicing* diretamente para o RNA, conforme ele emerge da enzima. Como veremos nesta seção, à medida que a RNA-polimerase II se aproxima do final de um gene, um mecanismo similar assegura que a extremidade 3′ do pré-mRNA seja corretamente processada.

Como esperado, a posição da extremidade 3′ de cada molécula de mRNA é, em última análise, especificada por um sinal codificado no genoma (**Figura 6-37**). Esses sinais são transcritos em RNA, conforme a RNA-polimerase II se move ao longo deles, sendo então reconhecidos (como RNA) por uma série de proteínas de ligação ao RNA e por enzimas de processamento de RNA (**Figura 6-38**). Duas proteínas de subunidades múltiplas, denominadas fator de estimulação à clivagem (CstF, *cleavage stimulation factor*) e fator de especificidade de clivagem e poliadelinação (CPSF, *cleavage and polyadenylation specificity factor*), são de especial importância. Ambas movimentam-se com a cauda da RNA-polimerase e são transferidas à extremidade 3′ da sequência em processamento sobre uma molécula de RNA, logo que ela emerge da RNA-polimerase.

Uma vez que CstF e CPSF se ligam a sequências nucleotídicas específicas sobre a molécula de RNA que está em formação, as proteínas adicionais associam-se a elas para criar a extremidade 3′ do mRNA. Inicialmente, o RNA é clivado (ver Figura 6-38). Após, uma enzima denominada poli-A-polimerase (PAP) adiciona, um a um, aproximadamente 200 nucleotídeos A à extremidade 3′ produzida pela clivagem. O nucleotídeo precursor dessas adições é o ATP, e o mesmo tipo de ligações 5′ a 3′ utilizado na síntese convencional de RNA é formado nessa situação (ver Figura 6-4). Diferentemente das RNA-polimerases comuns, a poli-A-polimerase não necessita de um molde, portanto a cauda de poli-A dos mRNAs eucarióticos não

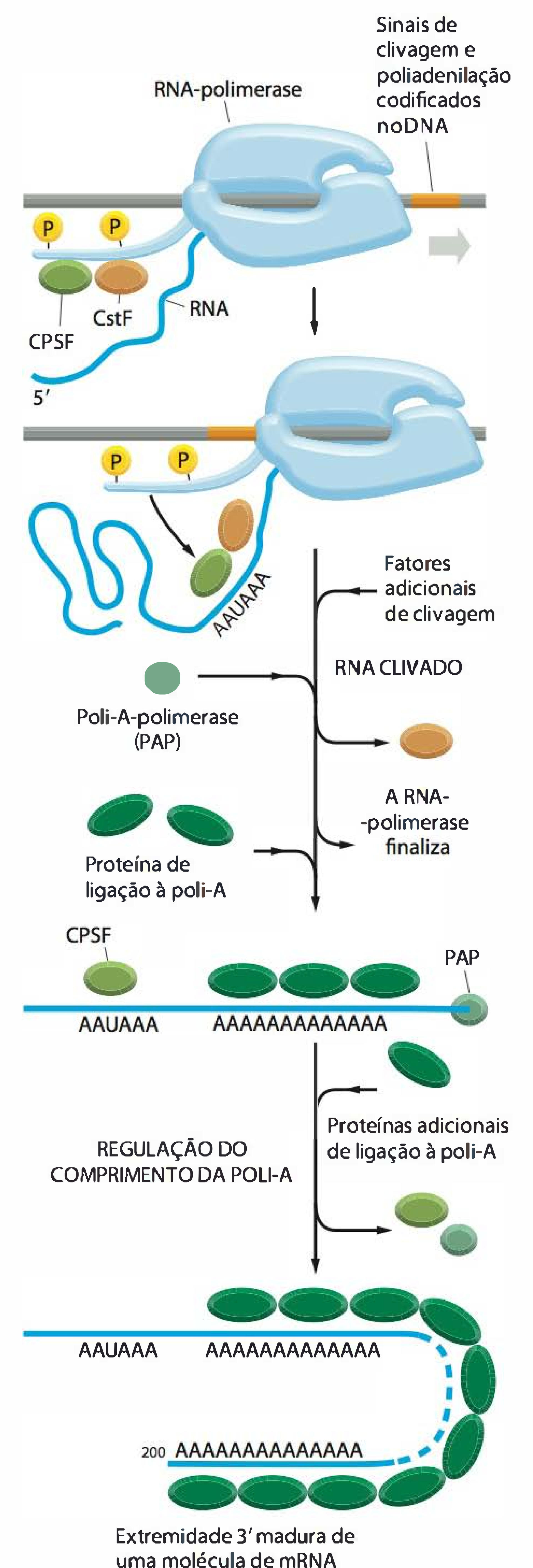


Figura 6-38 Alguns dos principais passos na geração da extremidade 3′ de um mRNA eucariótico. Esse processo é muito mais complicado do que o processo análogo em bactérias, onde a RNA-polimerase simplesmente para no sinal de terminação e libera tanto a extremidade 3′ do seu transcrito, quanto o DNA-molde (ver Figura 6-11).

está diretamente codificada no genoma. Conforme a cauda de poli-A é sintetizada, proteínas denominadas proteínas de ligação à poli-A reúnem-se sobre ela e, por meio de um mecanismo ainda pouco conhecido, determinam o tamanho final da cauda. Algumas proteínas de ligação à poli-A permanecem ligadas à cauda de poli-A enquanto o mRNA é transportado do núcleo ao citosol, e auxiliam a direcionar a síntese de uma proteína no ribossomo, como veremos adiante neste capítulo.

Após a clivagem da extremidade 3′ de uma molécula de pré-mRNA eucariótica, a RNA-polimerase II continua a transcrever, em alguns casos transcrevendo até várias centenas de nucleotídeos. Mas a polimerase logo libera a sua pressão sobre a fita-molde, e a transcrição termina. Após a clivagem da extremidade 3′, o RNA recentemente sintetizado que emerge das polimerases ainda não possui um quepe 5′; esse RNA não-protegido é rapidamente degradado por uma exonuclease 5′ -→ 3′, que também é transportada na cauda da polimerase. Aparentemente, é essa degradação de RNA que provoca a dissociação da RNA-polimerase do DNA.

Os mRNAs eucarióticos maduros são seletivamente exportados do núcleo

Vimos como a síntese e o processamento de pré-mRNA eucariótico ocorrem de forma ordenada no interior do núcleo celular. Entretanto, esses eventos criam um problema adicional para as células eucarióticas, especialmente aquelas de organismos complexos em que os íntrons são muito maiores do que os éxons. De todo pré-mRNA que é sintetizado, somente uma pequena fração – o mRNA maduro – será utilizada posteriormente pela célula. O restante – íntrons excisados, RNAs quebrados e formas de pré-mRNAs que sofrem *splicing* anormal – não somente não são utilizados como são potencialmente perigosos. Como então a célula consegue distinguir entre as moléculas de mRNA maduras relativamente raras, que ela deseja manter, e a quantidade esmagadora de detritos gerados pelo processamento de RNA?

A resposta é que, conforme a molécula de RNA é processada, ela perde determinadas proteínas e adquire outras, indicando dessa forma a realização com sucesso de cada uma das diferentes etapas. Por exemplo, vimos que a aquisição dos complexos de ligação ao quepe, dos complexos de junção do éxon e das proteínas de ligação à poli-A marca a finalização respectiva do capeamento, do *splicing* e da adição da poli-A. Uma molécula de mRNA adequadamente finalizada também é distinguida pelas proteínas perdidas. Por exemplo, a presença de uma snRNP significará um *splicing* incompleto ou aberrante. Apenas quando as proteínas presentes sobre uma molécula de mRNA coletivamente indicarem que o processamento foi adequadamente finalizado é que o mRNA será exportado do núcleo rumo ao citosol, onde poderá ser traduzido em proteína. Os mRNAs erroneamente processados e outros fragmentos de RNAs são retidos no núcleo, onde serão eventualmente degradados pelo **exossomo** nuclear, um grande complexo proteico cujo interior é rico em RNA-exonucleases que atuam de 3´ para 5´. Assim, as células eucarióticas exportam apenas moléculas úteis de RNA para o citoplasma, enquanto fragmentos de RNA são eliminados no núcleo.

Dentre todas as proteínas que se agregam às moléculas de pré-mRNA conforme elas emergem das RNA-polimerases que estão transcrevendo, as mais abundantes são as proteínas ribonucleares nucleares heterogêneas (hnRNPs, *heterogeneous nuclear ribonuclear proteins*) (ver Figura 6-33). Algumas dessas proteínas (existem aproximadamente 30 delas em humanos) desenrolam as hélices em grampo do RNA de tal forma que sinais de *splicing* e outros sinais sobre o RNA podem ser lidos mais facilmente. Outras preferencialmente empacotam o RNA contido nas sequências intrônicas tipicamente longas encontradas nos genes de organismos complexos. Dessa forma, elas podem desempenhar funções importantes na distinção entre os mRNAs maduros e os fragmentos de RNA derivados do processamento.

Os mRNAs adequadamente processados são guiados através dos canais aquosos dos **complexos do poro nuclear** (NPCs, *nuclear pore complexes*) da membrana nuclear, os quais conectam diretamente o nucleoplasma e o citosol (**Figura 6-39**). Pequenas moléculas (com menos de 50.000 dáltons) podem difundir livremente através desses canais. No entanto, a maioria das macromoléculas celulares, inclusive mRNAs complexados a proteínas, apresenta tamanho excessivo, o que as impossibilita de atravessar os canais sem o uso de processos especiais. A célula usa energia para o transporte ativo dessas macromoléculas em ambos os sentidos através dos complexos do poro nuclear.

Como explicado em detalhes no Capítulo 12, macromoléculas são transportadas através dos complexos do poro nuclear via *receptores de transporte nuclear*, os quais, dependendo da identidade da macromolécula, as escoltam do núcleo para o citoplasma ou vice-versa.

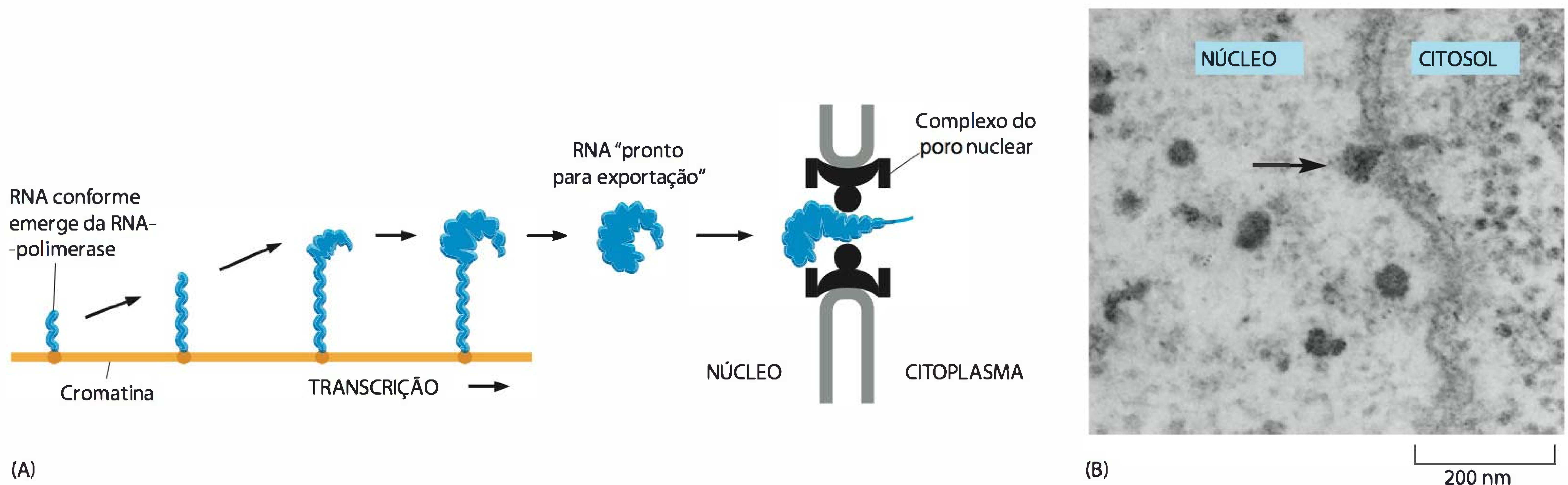


Figura 6-39 Transporte de uma grande molécula de mRNA através do complexo do poro nuclear. (A) A maturação de uma molécula de mRNA conforme ela é sintetizada pela RNA-polimerase e empacotada por várias proteínas nucleares. Esta representação de um RNA incomumente abundante, denominado mRNA Anel de Balbiani, tem como base microfotografias EM como a ilustrada em (B). Os Anéis de Balbiani são encontrados em células de alguns tipos de insetos. (A, adaptada de B. Daneholt, *Cell* 88:585-588, 1997. Com permissão de Elsevier; B, de B.J. Stevens e H. Swift, *J. Cell Biol*. 31:55-77, 1966. Com permissão de The Rockefeller Univesity Press.)

Para que ocorra a exportação do mRNA, um receptor de transporte nuclear específico deve ser carregado sobre o mRNA, uma etapa que, pelo menos em alguns organismos, ocorre em concerto à clivagem e poliadenilação 3′. Uma vez que tenha auxiliado a transportar uma molécula de RNA através do complexo do poro nuclear, o receptor de transporte se dissocia do mRNA, penetra novamente o núcleo e exporta uma nova molécula de mRNA (**Figura 6-40**).

A exportação dos complexos mRNA-proteínas a partir do núcleo pode ser observada ao microscópio eletrônico para os incomumente abundantes mRNAs dos genes Anel de Balbiani de insetos. Conforme esses genes são transcritos, o RNA recém-formado pode ser observado sendo empacotado por proteínas, como hnRNPs, proteínas SR e componentes do spliceossomo. Esse complexo proteína-RNA sofre uma série de transições estruturais, provavelmente refletindo eventos de processamento do RNA, culminando em uma fibra curva (Figura 6-39). Essa fibra curva, então, move-se através do nucleoplasma, penetra o complexo do poro nuclear (sendo seu quepe 5′ a primeira porção a penetrar) e sofre outra série de

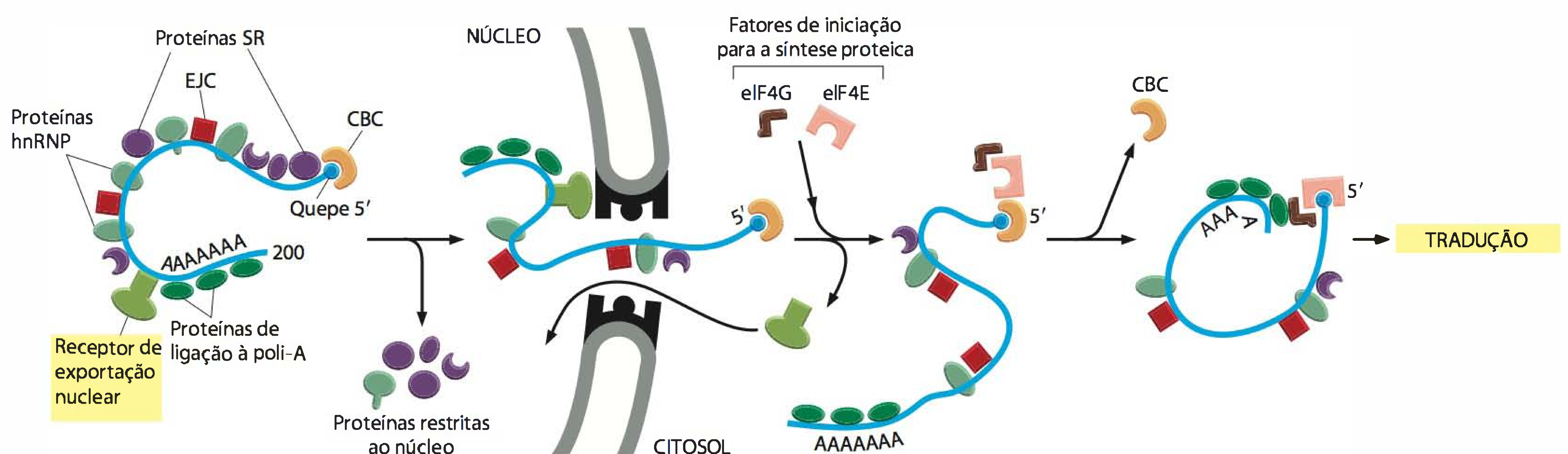


Figura 6-40 Ilustração esquemática de uma molécula de mRNA "pronta para exportação" e seu transporte através do poro nuclear. Como indicado, algumas proteínas acompanham o mRNA à medida que ele atravessa o poro, enquanto outras permanecem no núcleo. O receptor de exportação nuclear para mRNAs é um complexo de proteínas que são depositadas quando o mRNA sofreu *splicing* e poliadenilação corretos. Quando o mRNA é exportado para o citosol, o receptor de exportação se dissocia do mRNA e é re-importado para o núcleo, onde pode ser novamente utilizado. Assim que sai do núcleo, e antes de perder o complexo de ligação ao quepe (CBC), o mRNA é submetido à checagem final, denominada *degradação mediada por ausência de sentido*, a qual é descrita mais tarde no presente capítulo. Sendo aprovado neste teste, o mRNA continua contendo as proteínas anteriormente ligadas e adquire novas proteínas antes de ser eficientemente traduzido em proteína. EJC significa complexo de junção do éxon.

transições estruturais, enquanto se move através do poro. Essas e outras observações revelaram que os complexos pré-mRNA-proteína e mRNA-proteína são estruturas dinâmicas que podem adquirir e perder numerosas proteínas específicas durante a síntese, o processamento e a exportação do RNA (ver Figura 6-40).

Como vimos, algumas dessas proteínas marcam os diferentes estágios de maturação do mRNA; outras proteínas depositadas sobre o mRNA enquanto ele ainda se encontra no núcleo podem afetar o destino do RNA após ele ter sido transportado para o citosol. Assim, a estabilidade de um mRNA no citosol, a eficiência sob a qual ele será traduzido em proteína e seu destino definitivo no citosol podem ser determinados pelas proteínas adquiridas no núcleo e que permanecem ligadas ao RNA após ele deixar o compartimento nuclear. Discutiremos estas situações no Capítulo 7 ao ser abordado o controle pós-transcricional da expressão gênica.

Vimos anteriormente que a síntese e o processamento do RNA estão intimamente acoplados nas células, sendo esperado que a exportação do núcleo esteja, de alguma forma, integrada a esses dois processos. Apesar de podermos observar o transporte dos RNAs dos Anéis de Balbiani através do nucleoplasma e rumo ao exterior via poros nucleares, outros mRNAs parecem ser sintetizados e processados em íntima proximidade aos complexos do poro nuclear. Nesses casos, que devem representar a maioria dos genes eucarióticos, a síntese de mRNA, o processamento e o transporte parecem estar fortemente acoplados; o mRNA pode então ser visualizado emergindo do poro nuclear da mesma forma que um automóvel recém-construído sai de uma linha de montagem. Mais tarde, no presente capítulo, veremos que a célula realiza controles de qualidade adicionais sobre todos os mRNAs antes de permitir que eles sejam eficientemente traduzidos em proteína.

Antes de discutirmos o que acontece após a saída dos mRNAs do núcleo, consideraremos brevemente como ocorre a síntese e o processamento de moléculas de RNA não-codificadoras. Embora existam muitos outros exemplos, focalizaremos nossa discussão nos rRNAs que são de extrema importância para a tradução dos mRNAs em proteínas.

Muitos RNAs não-codificadores também são sintetizados e processados no núcleo

Apenas uma pequena porcentagem do peso seco de uma célula de mamífero é RNA, sendo que apenas cerca de 3 a 5% dessa porcentagem constituem-se de mRNA. Uma fração do material restante é representada por íntrons que ainda não foram degradados, mas a maioria do RNA nas células desempenha funções estruturais e catalíticas (ver Tabela 6-1, p. 336). Os RNAs mais abundantes nas células são os RNAs ribossomais (rRNAs), que constituem aproximadamente 80% do RNA em uma célula que se encontra em rápida divisão. Como discutido a seguir neste capítulo, esses RNAs formam o cerne do ribossomo. Diferentemente das bactérias – nas quais todos os RNAs na célula são sintetizados por uma única RNA-polimerase – os eucariotos têm uma polimerase especializada separada, a RNA-polimerase I, que se dedica à produção dos rRNAs. A RNA-polimerase I é semelhante estruturalmente à RNA-polimerase II discutida anteriormente; entretanto, a ausência de uma cauda C-terminal na polimerase I ajuda a explicar por que seus transcritos não são nem capeados, nem poliadenilados. Como discutido anteriormente, essa diferença ajuda a célula a distinguir entre RNAs não-codificadores e mRNAs.

Visto que múltiplos ciclos de tradução de cada molécula de mRNA podem proporcionar uma amplificação enorme na produção de moléculas proteicas, muitas das proteínas abundantes na célula podem ser sintetizadas a partir de genes que apresentam uma única cópia por genoma haploide. Em contraste, os componentes RNA do ribossomo constituem produtos gênicos finais, e uma célula de mamífero em crescimento deve sintetizar cerca de 10 milhões de cópias de cada tipo de rRNA em cada geração da célula para construir seus 10 milhões de ribossomos. Quantidades adequadas de rRNAs só podem ser produzidas porque a célula contém múltiplas cópias de **genes de rRNA** que codificam para rRNAs. Mesmo a *E. coli* necessita de sete cópias de seus genes de rRNA para suprir as necessidades da célula para a formação dos ribossomos. As células humanas contêm aproximadamente 200 cópias dos genes de rRNA por genoma haploide, dispersas em pequenos grupos em cinco cromossomos diferentes (ver Figura 4-11), enquanto as células do sapo *Xenopus* contêm cerca de 600 cópias de genes de rRNA por genoma haploide, em um único agrupamento, em um cromossomo (**Figura 6-41**).

Existem quatro tipos de rRNAs eucarióticos, cada um representado no ribossomo por uma cópia. Três desses quatro rRNAs (18S, 5,8S e 28S) são sintetizados por meio de modificações químicas e clivagem de um único grande precursor rRNA (**Figura 6-42**); o quarto (5S RNA) é sintetizado a partir de um grupo separado de genes por uma polimerase diferente, a RNA-polimerase III, e não necessita de modificações químicas.



Figura 6-41 Transcrição de genes de rRNA organizados em *tandem*, como observado em microscopia eletrônica. O padrão de genes transcritos alternados a espaçadores não-transcritos é facilmente observável. Uma visão de maior magnitude dos genes de rRNA é mostrada na Figura 6-9. (De V. E. Foe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:723-740, 1978. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

Ocorrem grandes modificações químicas no rRNA precursor de 13 mil nucleotídeos de comprimento antes que os rRNAs sejam clivados a partir dele e montados sob a forma de ribossomos. Essas modificações incluem aproximadamente cem metilações das posições 2′-OH nos açúcares nucleotídicos e cem isomerizações de nucleotídeos uridina para pseudouridina (**Figura 6-43**A). As funções dessas modificações não são compreendidas em detalhe, mas provavelmente auxiliam no dobramento e na união dos rRNAs finais e podem também alterar sensivelmente a função dos ribossomos. Cada modificação é realizada em uma posição específica no rRNA precursor. Essas posições são determinadas por aproximadamente 150 "RNAs-guia", que se posicionam pelo pareamento de bases com o rRNA precursor e assim trazem uma enzima modificadora de RNA à posição apropriada (Figura 6-43B). Outros RNAs-guia promovem a clivagem dos rRNAs precursores em rRNAs maduros, provavelmente por causarem modificações conformacionais no rRNA precursor que expõem esses sítios para as nucleases. Todos esses RNAs-guia são membros de uma grande classe de RNAs denominada **pequenos RNAs nucleolares** (**snoRNAs**, *small nucleolar RNAs*), assim denominados por desempenharem suas funções em um subcompartimento do núcleo, denominado nucléolo. Muitos snoRNAs são codificados nos íntrons de outros genes, especialmente aqueles que codificam proteínas ribossomais. Consequentemente, eles são sintetizados pela RNA-polimerase II e processados a partir de sequências de íntrons excisados.

Recentemente, vários RNAs semelhantes a snoRNAs foram identificados como especificamente sintetizados em células do cérebro. Acredita-se que eles direcionem a modificação de mRNAs, em vez de rRNAs, e provavelmente representem um novo tipo, ainda pouco compreendido, de mecanismo regulador de genes.

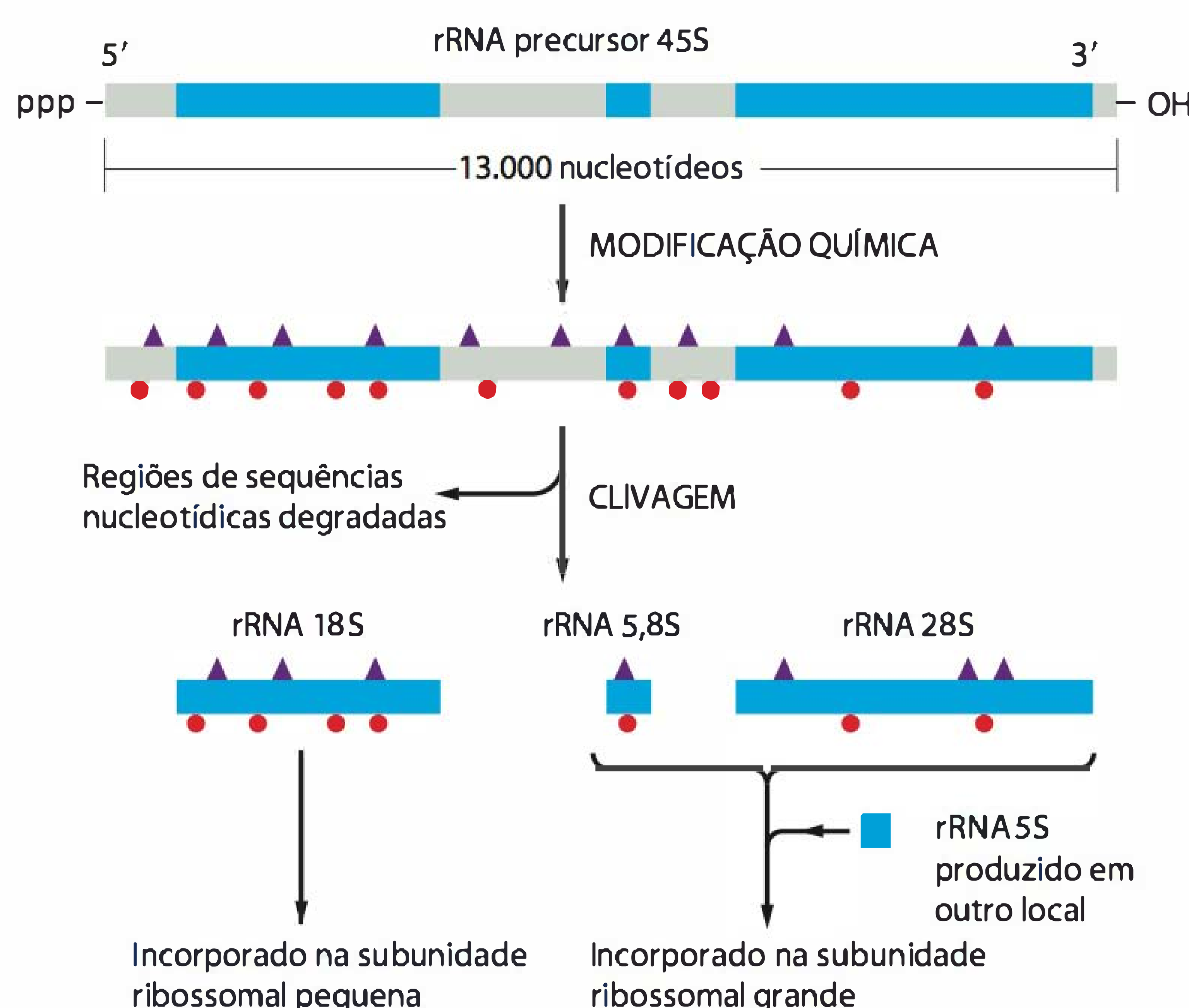


Figura 6-42 Modificações químicas e o processamento nucleolítico de uma molécula precursora de rRNA 45S eucariótica em três rRNAs separados. Dois tipos de modificações químicas (código de cores de acordo com a Figura 6-43) são realizados no rRNA precursor antes que ele seja clivado. Aproximadamente metade das sequências nucleotídicas deste rRNA precursor é descartada e degradada no núcleo. Os rRNAs são denominados de acordo com seus valores "S", os quais se referem às suas taxas de sedimentação em ultracentrifugação. Quanto maior o valor de S, maior é o rRNA.

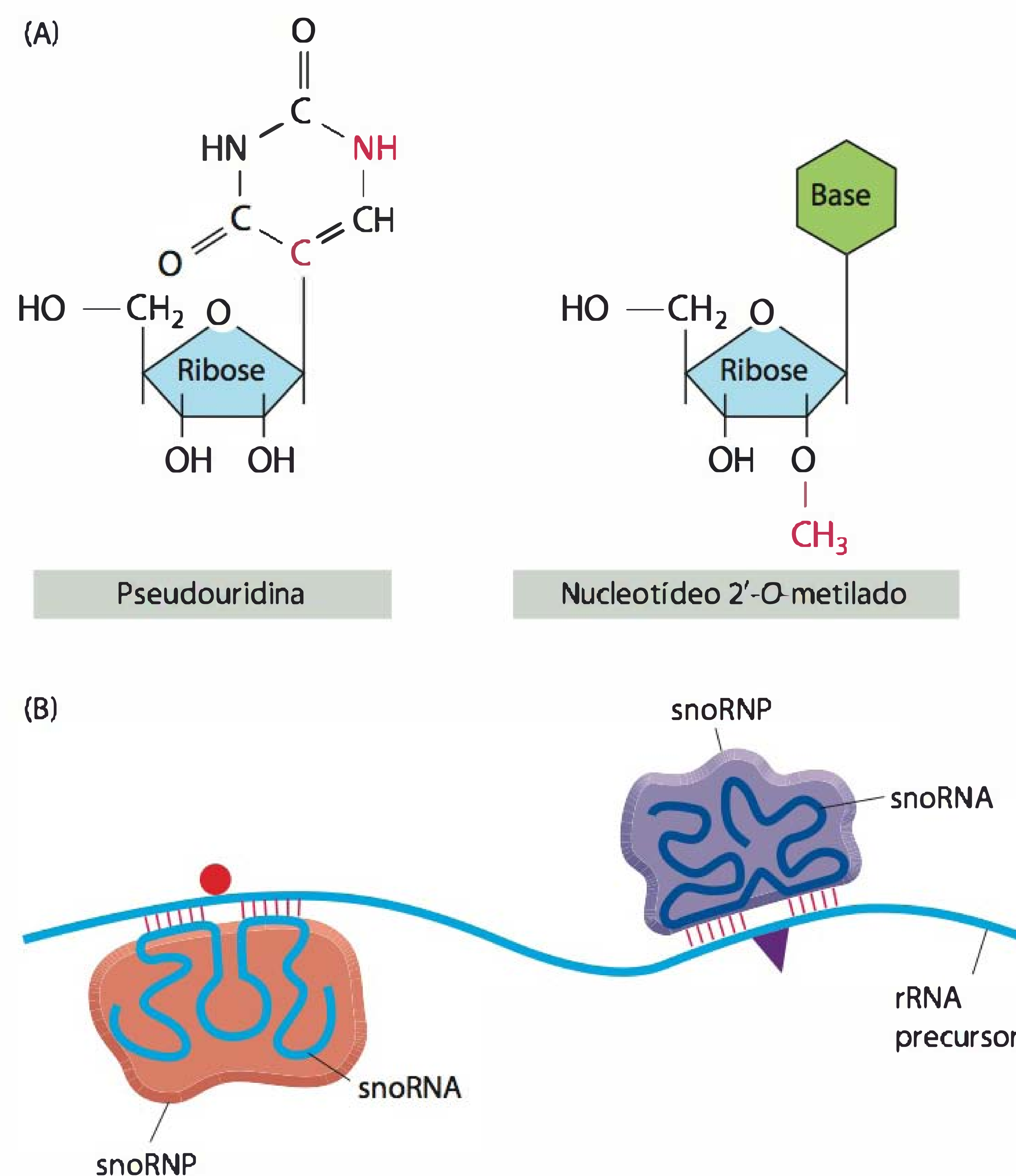


Figura 6-43 Modificações do rRNA precursor por RNAs-guia. (A) Duas importantes modificações covalentes ocorrem após a síntese do rRNA; as diferenças dos nucleotídeos inicialmente incorporados estão indicadas por átomos *vermelhos*. Pseudouridina é um isômero de uridina; a base foi "girada" em relação ao açúcar. (B) Conforme indicado, os snoRNAs localizam os sítios de modificação por meio de pareamento com sequências complementares sobre o rRNA precursor. Os snoRNAs estão ligados a proteínas, e os complexos são denominados snoRNPs. As snoRNPs contêm tanto as sequências-guia quanto as enzimas que modificam o rRNA.

O nucléolo é uma fábrica produtora de ribossomos

O nucléolo é a estrutura mais facilmente identificada no núcleo de uma célula eucariótica quando observada em microscopia óptica. Consequentemente, essa estrutura foi tão analisada pelos primeiros citologistas que uma revisão de 1898 chegou a listar aproximadamente 700 referências. Sabemos atualmente que o nucléolo é a região onde acontece o processamento de rRNAs e a sua montagem sob a forma de subunidades ribossomais. Diferentemente de muitas das principais organelas da célula, o nucléolo não se encontra delimitado por uma membrana (**Figura 6-44**); em vez disso, é um grande agregado de macromoléculas, incluindo-se os próprios genes de rRNA, rRNAs precursores, rRNAs maduros, enzimas processadoras de rRNAs, snoRNPs, proteínas ribossomais e ribossomos parcialmente montados. Presume-se que a íntima associação de todos esses componentes permite que a montagem dos ribossomos ocorra rapidamente e sem erros.

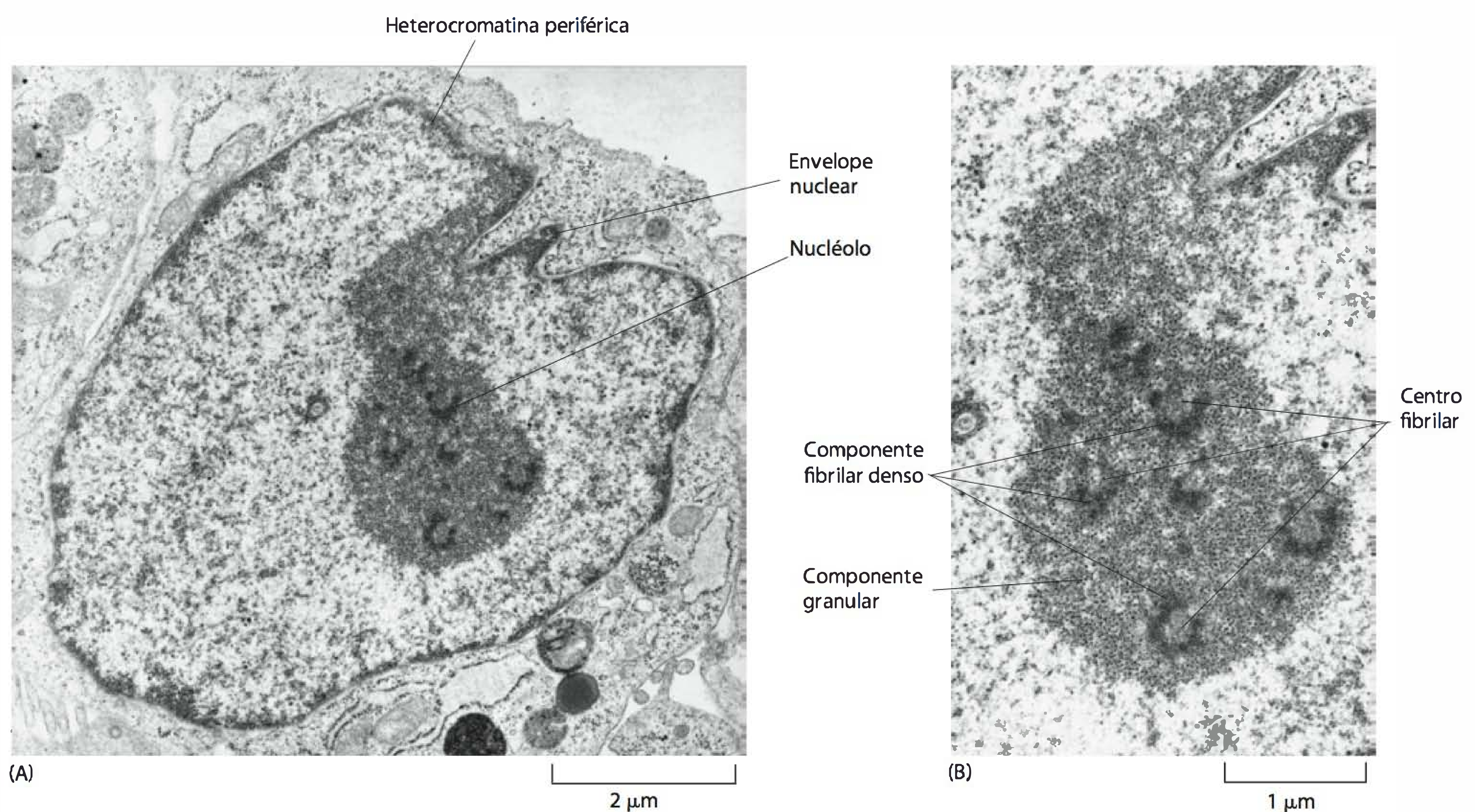
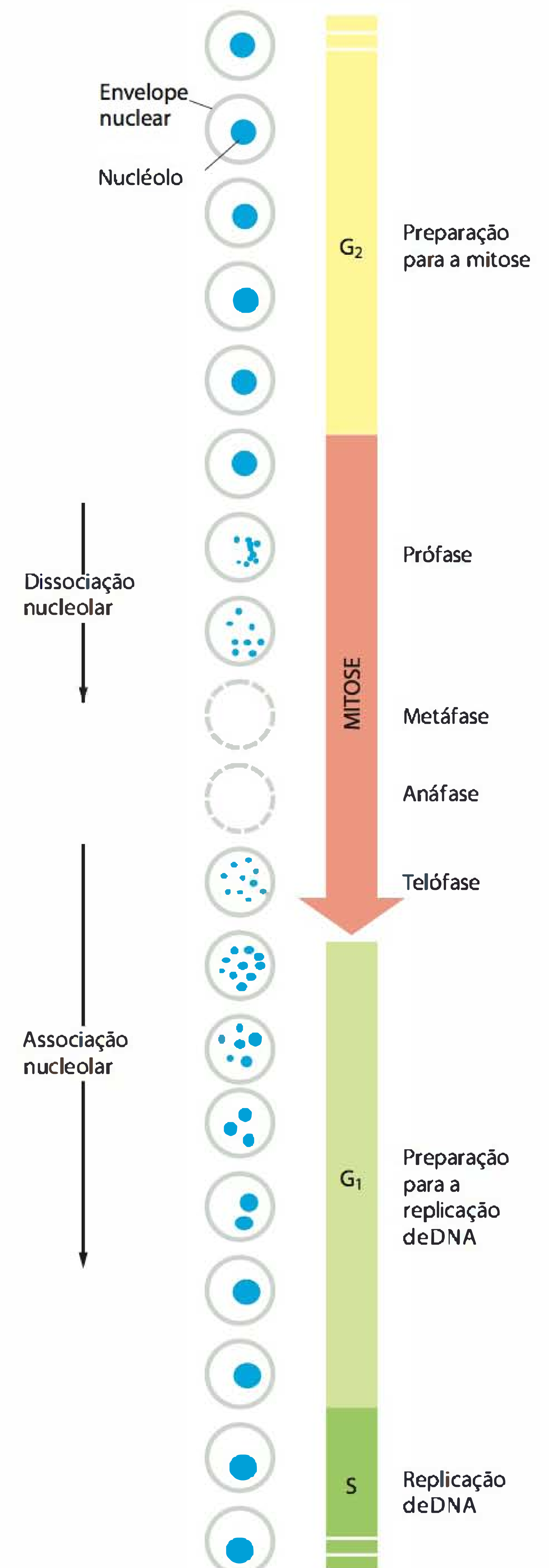


Figura 6-44 Microfotografia eletrônica de uma fina secção do nucléolo de um fibroblasto humano, mostrando suas três zonas distintas. (A) Vista de um núcleo inteiro. (B) Aumento do nucléolo. Acredita-se que a transcrição dos genes de rRNA ocorra entre o centro fibrilar e o componente denso fibrilar, e que o processamento dos rRNAs e sua organização nas duas subunidades do ribossomo ocorra fora do componente denso fibrilar, nos componentes granulares adjacentes. (Cortesia de E. G. Jordan e J. McGovern.)

Figura 6-45 Alterações na aparência de um nucléolo em uma célula humana durante o ciclo celular. Apenas o núcleo da célula está representado nesse diagrama. Na maioria das células eucarióticas, a membrana nuclear se quebra durante a mitose, como indicado pelos círculos pontilhados.



Vários tipos de moléculas de RNA desempenham um importante papel na química e na estruturação do nucléolo, sugerindo que ele possa ter evoluído a partir de uma estrutura ancestral presente em células dominadas pela catálise de RNA. Nas células atuais, os genes de rRNA também desempenham uma função importante na formação dos nucléolos. Em uma célula humana diploide, os genes de rRNA estão distribuídos em 10 grupos, localizados próximo à extremidade de uma das duas cópias de cinco cromossomos diferentes (ver Figura 4-11). Durante a interfase, esses 10 cromossomos contribuem com alças de DNA (contendo os genes rRNA) para o nucléolo; na fase M, quando os cromossomos condensam, os nucléolos desaparecem. Finalmente, na telófase da mitose, à medida que os cromossomos retornam a seu estado semidisperso, as extremidades dos 10 cromossomos coalescem e o nucléolo se reorganiza (**Figuras 6-45** e **6-46**). A transcrição dos genes de rRNA pela RNA-polimerase I é necessária para esse processo. Como deveria ser esperado, o tamanho dos nucléolos reflete o número de ribossomos que a célula está produzindo. Consequentemente, seu tamanho varia muito entre as diferentes células e pode ser alterado em uma determinada célula, ocupando 25% do volume nuclear total em células que estão produzindo quantidades anormalmente grandes de proteína.

A montagem dos ribossomos é um processo complexo, e as principais características desse processo estão ilustradas na **Figura 6-47**. Além de sua importante função na biogênese dos ribossomos, o nucléolo também é a região onde outros RNAs são produzidos e outros complexos RNA-proteína são montados. Por exemplo, a snRNP U6, a qual atua no *splicing* do pré-mRNA (ver Figura 6-29), é composta de uma molécula de RNA e de, no mínimo, sete proteínas. O snRNA U6 é modificado quimicamente pelos snoRNAs no nucléolo antes de sua associação final em snRNP U6. Acredita-se que outros importantes complexos RNA-proteína, inclusive a telomerase (encontrada no Capítulo 5) e a partícula de reconhecimento de sinal (a qual discutiremos no Capítulo 12), também sejam montados no nucléolo. Finalmente, os tRNAs que transportam os aminoácidos para a síntese proteica são processados no nucléolo; da mesma forma que os genes de rRNA, os genes que codificam para tRNAs estão agrupados no nucléolo. Assim, o nucléolo pode ser visto como uma grande fábrica, na qual diferentes RNAs não-codificadores são transcritos, processados e reunidos a proteínas para formar uma ampla gama de complexos ribonucleoproteicos.

O núcleo contém uma variedade de estruturas subnucleares

Apesar de o nucléolo ser a estrutura mais proeminente no núcleo, outros corpos nucleares foram visualizados e estudados (**Figura 6-48**). Esses corpos incluem os corpos de Cajal (assim nomeados em homenagem ao cientista que primeiro os descreveu em 1906), GEMS (*Gemini of Cajal bodies*) e grupos de grânulos de intercromatina (também denominados *speckles*, ou manchas). Assim como o nucléolo, essas outras estruturas nucleares não apresentam

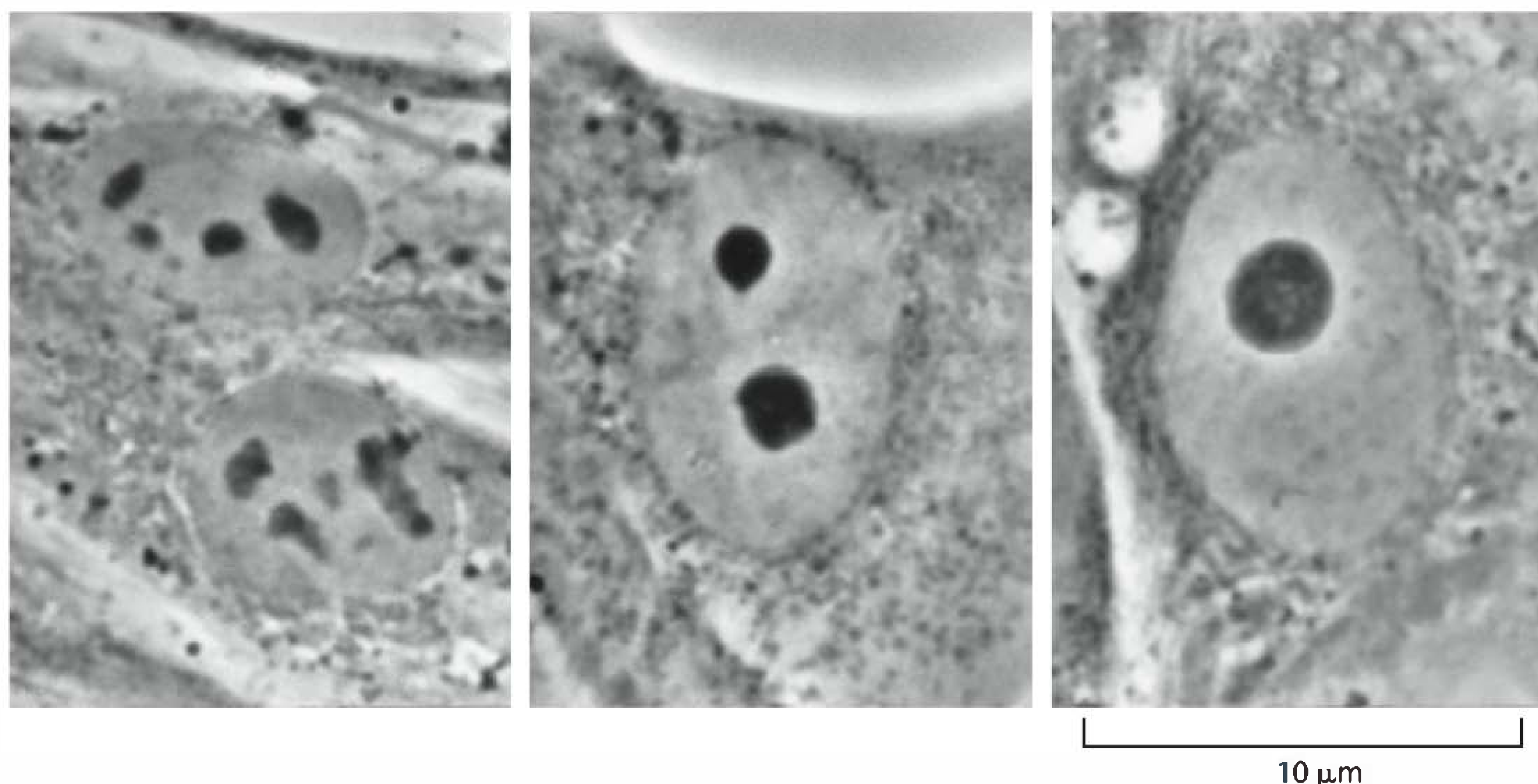


Figura 6-46 Fusão nucleolar. Estas fotografias de microscopia óptica de fibroblastos humanos crescidos em cultura mostram vários estágios de fusão nucleolar. Após a mitose, cada um dos 10 cromossomos humanos que carregam um *cluster* de genes de rRNA começa a formar pequenos nucléolos, os quais rapidamente coalescem, à medida que crescem para formar um único grande nucléolo característico de muitas células interfásicas. (Cortesia de E. G. Jordan e J. McGovern.)

membranas e são extremamente dinâmicas; seu aparecimento provavelmente é resultado da forte associação de proteínas e de componentes de RNA envolvidos na síntese, montagem e estocagem de macromoléculas envolvidas na expressão gênica. Os corpos de Cajal e os GEMS assemelham-se e frequentemente estão pareados no núcleo; se eles são realmente estruturas distintas ainda é uma questão em estudo. Eles podem ser sítios onde os snoRNAs e os snRNAs sofrem alterações covalentes e são finalmente associados a proteínas. Um grupo de RNAs-guia, denominado *pequenos RNAs de Cajal* (*scaRNAs*, *small cajal RNAs*), seleciona os sítios para essas alterações por pareamento de bases. Foi proposto que os corpos de Cajal/GEMS também sejam regiões onde as snRNPs são recicladas e seus RNAs são "reiniciados" após os rearranjos que ocorreram durante o *splicing* (ver p. 352). Em contraste, foi sugerido que os grupos de grânulos de intercromatina sejam acúmulos de reserva de snRNPs totalmente maduras e de outros componentes do processamento de RNA, que estão prontos para ser utilizados na produção dos mRNAs (**Figura 6-49**).

Os cientistas têm tido dificuldade na determinação da função das pequenas estruturas subnucleares descritas anteriormente, em parte devido a suas aparências diferirem entre organismos e ao fato delas sofrerem alterações drásticas à medida que as células progridem no ciclo celular ou respondem a alterações no ambiente. Grande parte do progresso depende de ferramentas genéticas – o exame dos efeitos de mutações direcionadas em organismos-modelo ou de mutações espontâneas em humanos. Como exemplo, os GEMS contêm a proteína SMN (*survival of motor neurons*, sobrevivência de neurônios motores).

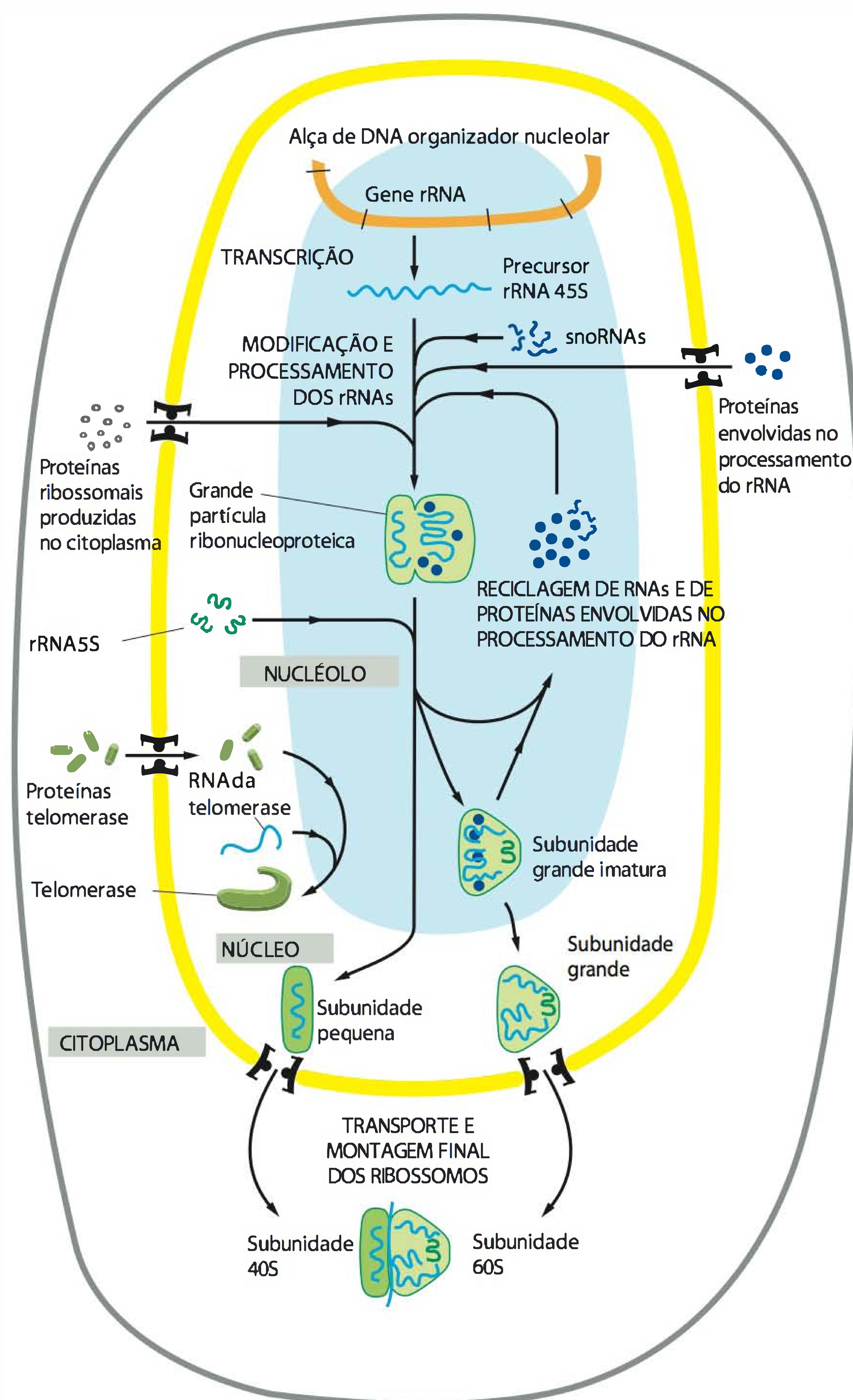


Figura 6-47 Função do nucléolo na síntese do ribossomo e de outras ribonucleoproteínas. O precursor rRNA 45S é empacotado em uma grande partícula ribonucleoproteica contendo várias proteínas ribossomais importadas do citoplasma. Enquanto essa partícula permanece no nucléolo, peças selecionadas são adicionadas e outras descartadas, conforme ele é processado em subunidades ribossomais imaturas grandes e pequenas. Acredita-se que as duas subunidades ribossomais atinjam sua forma funcional final apenas quando são transportadas individualmente através dos poros nucleares para o citoplasma. Outros complexos ribonucleoproteicos, incluindo a telomerase aqui mostrada, também são montados no nucléolo.

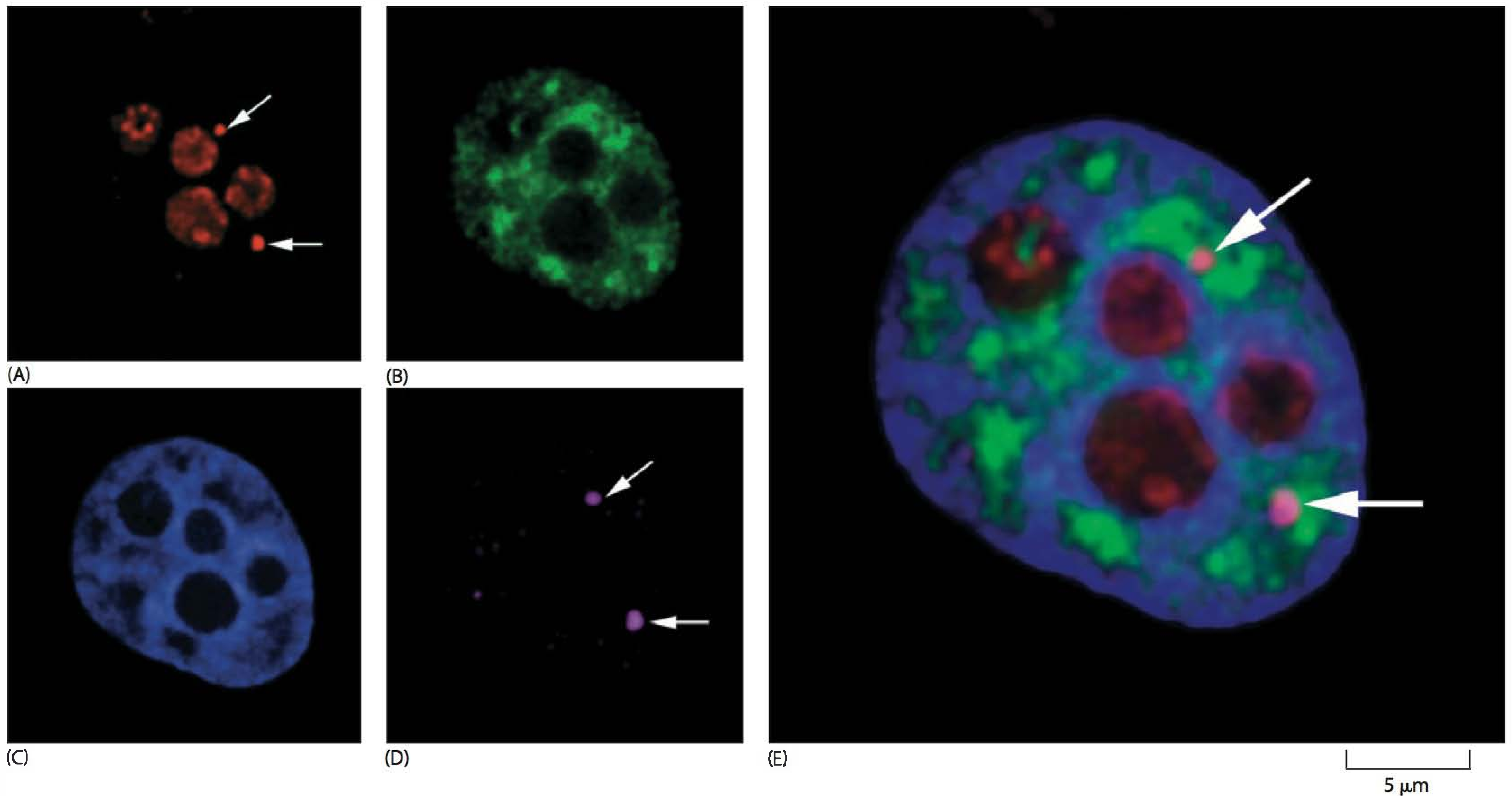


Figura 6-48 Visualização de alguns corpos nucleares proeminentes. (A)-(D) Microfotografias do núcleo de uma mesma célula humana, processadas diferentemente para mostrar um grupo específico de estruturas nucleares. (E) mostra um aumento em sobreposição das quatro imagens individuais. (A) mostra a localização da proteína fibrilarina (um componente de diversas snoRNPs), a qual está presente tanto em nucléolos quanto em corpos de Cajal, sendo estes últimos indicados por setas. (B) mostra grupos de intercromatina granular ou "manchas" (*speckles*) detectadas com o uso de anticorpos contra uma proteína envolvida em *splicing* do pré-mRNA. (C) está corado para mostrar cromatina total. (D) mostra a localização da proteína coilina, a qual está presente em corpos de Cajal (*setas*; ver também Figura 4-67). (De J. R. Swedlow e A. I. Lamond, *Gen. Biol.* 2:1-7, 2001. Com permissão de BioMed Central. Microfotografias cortesia de Judith Sleeman.)

Certas mutações do gene que codifica essa proteína são a causa da atrofia muscular espinhal hereditária, uma doença humana caracterizada por uma grande destruição dos músculos. A doença parece ser causada por um defeito na produção de snRNPs. Acredita-se que uma perda importante de snRNPs seja letal.

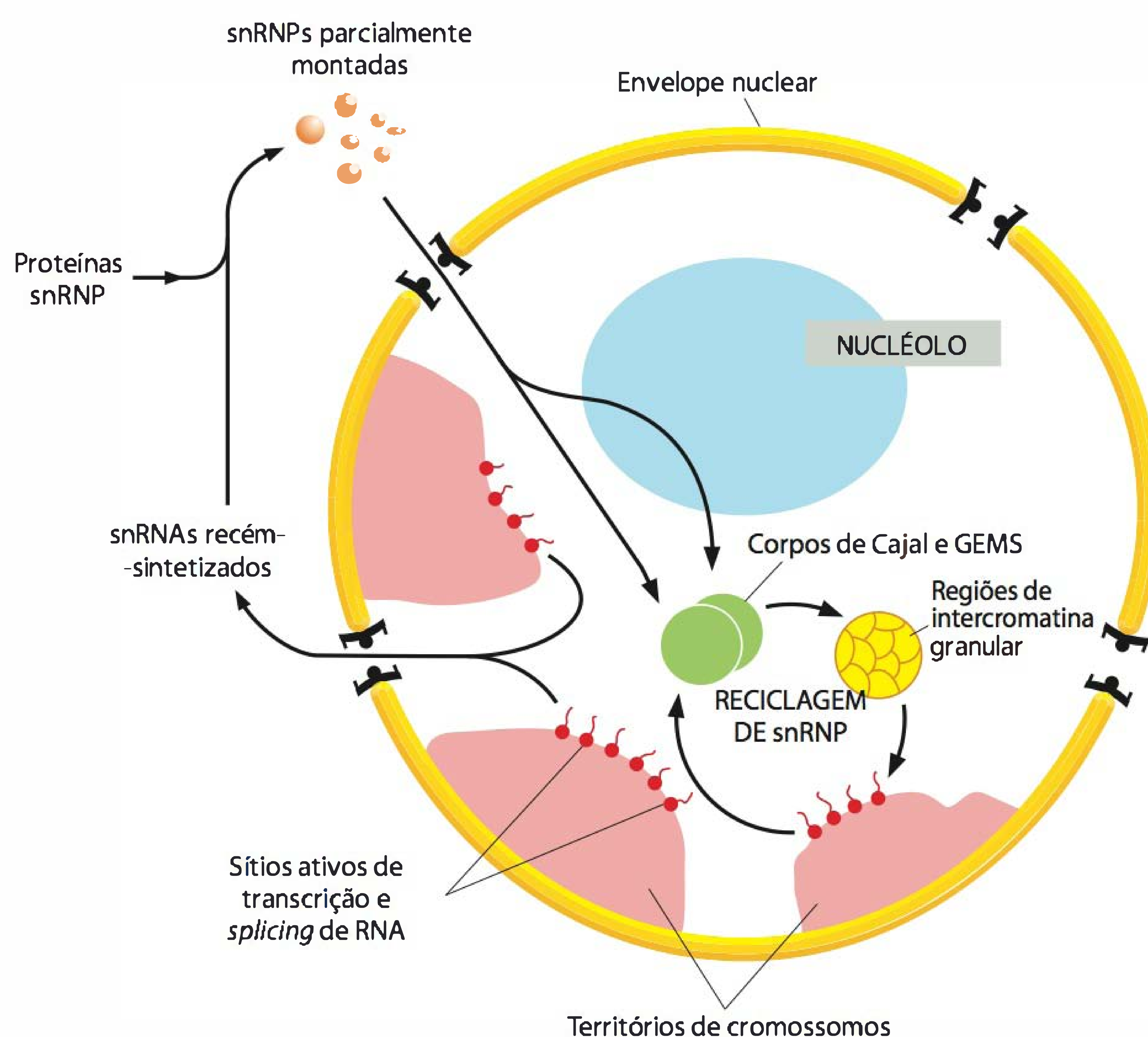


Figura 6-49 Visão esquemática de estruturas subnucleares. Um núcleo vertebrado característico tem vários corpos de Cajal, que foram propostos como sendo os sítios nos quais as snRNPs e as snoRNPs sofrem suas modificações finais. Propõe-se que as regiões de intercromatina granular sejam regiões de estoque de snRNPs totalmente maduras. Um típico núcleo vertebrado tem de 20 a 50 regiões de intercromatina granular.

Após sua síntese inicial, os snRNAs são exportados do núcleo para processamento de suas extremidades 5′ e 3′ e montagem com as sete proteínas snRNP comuns (denominadas proteínas Sm). Esses complexos são reimportados para o núcleo e as snRNPs sofrem sua modificação final pelos scaRNAs nos corpos de Cajal. Além disso, a snRNP U6 é modificada quimicamente pelos snoRNAs no nucléolo. Os sítios de transcrição ativa e *splicing* (aproximadamente 2 a 3 mil sítios por núcleo em vertebrados) correspondem às "fibras de pericromatina" vistas com microscopia eletrônica. (Adaptada de J. D. Lewis e D. Tollervey, *Science* 288:1385-1389, 2000. Com permissão de AAAS.)

Devido à importância dos subdomínios nucleares no processamento de RNA, seria esperado que o *splicing* do pré-mRNA ocorresse em uma posição determinada do núcleo, visto que ele necessita de numerosos RNAs e de componentes proteicos. Entretanto, vimos que a associação dos componentes do *splicing* no pré-mRNA é cotranscricional; consequentemente, o *splicing* deve ocorrer em muitas regiões sobre os cromossomos. Apesar de uma célula de mamífero típica poder expressar em torno de 15.000 genes simultaneamente, a transcrição e o *splicing* do RNA podem estar restritos a apenas alguns milhares de regiões do núcleo. Essas regiões por si só são extremamente dinâmicas e, provavelmente, são o resultado da associação da transcrição e dos componentes do *splicing* que criam pequenas "linhas de montagem", onde a concentração desses componentes é muito alta. Os grupos de grânulos de intercromatina – que contém estoques de componentes envolvidos no processamento do RNA – frequentemente são observados nas proximidades das regiões de transcrição, e acredita-se que estejam envolvidos na reposição dos suprimentos usados. Como resultado, o núcleo parece estar extremamente organizado em subdomínios, com snRNPs, snoRNPs e outros componentes nucleares movendo-se entre eles de maneira ordenada e de acordo com as necessidades da célula (ver a Figura 6-48; ver também Figura 4-69).

Resumo

Antes de a síntese de uma determinada proteína poder ocorrer, a molécula de mRNA correspondente deve ser produzida por transcrição. As bactérias contêm um único tipo de RNA-polimerase (a enzima que realiza a transcrição de DNA em RNA). Uma molécula de mRNA é produzida quando esta enzima inicia a transcrição em um promotor, sintetiza o RNA pela extensão da cadeia, finaliza a transcrição em um terminador e libera tanto o DNA-molde quanto a molécula de mRNA finalizada. Nas células eucarióticas, o processo de transcrição é muito mais complexo, e existem três RNA-polimerases – designadas como polimerase I, II e III – evolutivamente relacionadas umas às outras e à polimerase bacteriana.

O mRNA dos eucariotos é sintetizado pela RNA-polimerase II. Essa enzima necessita de uma série de proteínas adicionais, denominadas fatores gerais de transcrição, para iniciar a transcrição sobre um DNA-molde purificado, e ainda de mais proteínas (como complexos remodeladores de cromatina e enzimas modificadoras de histonas) para iniciar a transcrição sobre a cromatina-molde dentro da célula.

Durante a fase de extensão da transcrição, o RNA em formação sofre três tipos de eventos de processamento: um nucleotídeo especial é adicionado à sua extremidade 5′ (capeamento), os íntrons são removidos do meio da molécula de RNA (splicing) e a extremidade 3′ do RNA é gerada (por clivagem e poliadenilação). Cada um desses processos é iniciado por proteínas que acompanham a RNA-polimerase II por interação com sítios sobre sua longa cauda estendida C-terminal. O splicing difere dos demais pelo fato de muitas de suas etapas-chave serem mediadas por moléculas especializadas de RNA e não por proteínas. Os mRNAs adequadamente processados são transportados através de complexos do poro nuclear para o citosol, onde serão traduzidos em proteína.

No caso de alguns genes, o RNA é o produto final. Nos eucariotos, esses genes são normalmente transcritos pela RNA-polimerase I ou pela RNA-polimerase III. A RNA-polimerase I produz os rRNAs. Após sua síntese, sob a forma de um grande precursor, os rRNAs são modificados quimicamente, clivados e associados sob a forma das duas subunidades ribossomais no nucléolo – uma estrutura subnuclear distinta, que também ajuda a processar alguns complexos menores RNA-proteína na célula. As estruturas subnucleares adicionais (como os corpos de Cajal e os grupos de grânulos de intercromatina) são regiões onde os componentes envolvidos no processamento de RNA são associados, estocados e reciclados.

DO RNA À PROTEÍNA

Na seção precedente, vimos que o produto final de alguns genes é a própria molécula de RNA, como aquelas presentes nas snRNPs e nos ribossomos. Entretanto, a maioria dos genes de uma célula produz moléculas de mRNA que são utilizadas como intermediárias na via para as proteínas. Nesta seção, examinaremos como a célula converte a informação contida em uma molécula de mRNA em uma proteína. Essa façanha da tradução atraiu a atenção dos biólogos primeiramente no fim dos anos de 1950, quando foi abordado o "problema da codificação": como a informação em uma sequência linear de nucleotídeos no RNA é traduzida para uma sequência linear de um conjunto de subunidades quimicamente tão diferentes – os aminoácidos – em proteínas? Essa questão fascinante gerou grande excitação

entre os cientistas naquele momento. Havia um criptograma montado pela natureza que, após mais de três bilhões de anos de evolução, poderia finalmente ser resolvido por um dos produtos da evolução – os seres humanos. De fato, não somente o código foi finalmente decifrado passo por passo, como, no ano 2000, a elaborada maquinaria pela qual as células leem esse código – o ribossomo – foi finalmente revelada em seus detalhes atômicos.

Uma sequência de mRNA é decodificada em conjuntos de três nucleotídeos

Uma vez que o mRNA tenha sido produzido por meio da transcrição e do processamento, a informação presente em sua sequência de nucleotídeos é usada para sintetizar uma proteína. A transcrição como forma de transferência de informação é de fácil compreensão: uma vez que o DNA e o RNA são química e estruturalmente semelhantes, o DNA pode agir como um molde direto para a síntese de RNA pelo pareamento por complementaridade de bases. Como indica o termo *transcrição*, é como se uma mensagem manuscrita fosse convertida para um texto datilografado. A própria linguagem e a forma da mensagem não mudam, e os símbolos utilizados são muito similares.

Em contraste, a conversão da informação de RNA para proteína representa uma **tradução** da informação para uma outra linguagem que usa símbolos bastante diferentes. Além disso, uma vez que existem somente quatro diferentes nucleotídeos no mRNA e 20 tipos distintos de aminoácidos em uma proteína, não se pode atribuir nessa tradução uma correspondência direta entre um nucleotídeo no RNA e um aminoácido na proteína. A sequência de nucleotídeos de um gene, por intermédio do mRNA, é traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma proteína, por meio da aplicação de regras que são conhecidas como **código genético**. Esee código foi decifrado no início dos anos de 1960.

A sequência de nucleotídeos em uma molécula de mRNA é lida em grupos consecutivos de três. O RNA é um polímero linear de quatro diferentes nucleotídeos, de tal forma que existem $4 \times 4 \times 4 = 64$ combinações possíveis de três nucleotídeos: os tripletes AAA, AUA, AUG, e assim por diante. Entretanto, somente 20 aminoácidos diferentes normalmente são encontrados nas proteínas. Ou alguns tripletes de nucleotídeos nunca são usados, ou o código é redundante e alguns aminoácidos são determinados por mais de um triplete. A segunda possibilidade é, de fato, a possibilidade correta, conforme demonstrado pelo código genético completamente decifrado, na **Figura 6-50**. Cada grupo de três nucleotídeos consecutivos no RNA é denominado **códon**, e cada códon especifica ou um aminoácido, ou a finalização do processo de tradução.

Esse código genético é utilizado universalmente em todos os organismos da atualidade. Embora algumas pequenas diferenças no código tenham sido encontradas, elas localizam-se principalmente no DNA das mitocôndrias. As mitocôndrias possuem seus próprios sistemas de transcrição e de síntese de proteínas, os quais operam com bastante independência dos sistemas equivalentes do restante da célula, sendo compreensível que seus pequenos genomas tenham sido capazes de acomodar pequenas alterações do código (discutido no Capítulo 14).

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Término
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Figura 6-50 O código genético. A abreviação-padrão de uma letra para cada aminoácido está apresentada abaixo da abreviação de sua sigla de três letras (ver Painel 3-1, p. 128-129, para o nome completo de cada aminoácido e de sua estrutura). Por convenção, os códons são sempre escritos com o nucleotídeo 5′-terminal à esquerda. Observe que a maioria dos aminoácidos está representada por mais de um códon e que existem algumas regularidades no conjunto de códons que especificam cada aminoácido. Os códons para o mesmo aminoácido contêm, em geral, os mesmos nucleotídeos na primeira e na segunda posição e variam na terceira posição. Três códons não especificam qualquer aminoácido, mas atuam como sítios de terminação (códons de terminação), sinalizando o final da sequência codificadora de proteína. Um códon – AUG – age tanto como códon de iniciação, sinalizando o início de uma mensagem que codifica para uma proteína, quanto como códon que especifica metionina.

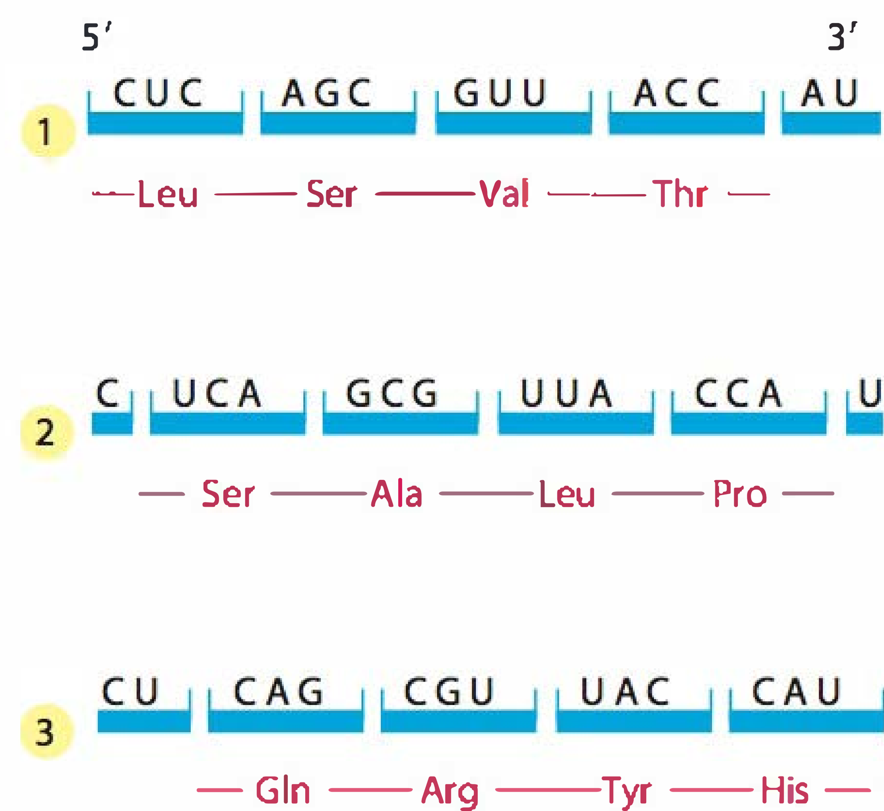


Figura 6-51 As três fases de leitura possíveis na síntese de proteínas. No processo de tradução de uma sequência nucleotídica (*azul*) em uma sequência de aminoácido (*vermelho*), a sequência de nucleotídeos na molécula de mRNA é lida da extremidade 5′ para a 3′ em grupos sequenciais de três nucleotídeos. Em princípio, portanto, a mesma sequência de RNA pode determinar três sequências completamente diferentes de aminoácidos, dependendo da fase de leitura. Na verdade, entretanto, apenas uma das três fases de leitura contém a mensagem real.

Em princípio, uma sequência de RNA pode ser traduzida em qualquer uma de três **fases de leitura** diferentes, dependendo de onde inicia o processo de decodificação (**Figura 6-51**). Entretanto, somente uma das três possíveis fases de leitura em um mRNA codifica a proteína necessária. Veremos posteriormente como um sinal de alerta especial no início de cada mensagem do RNA posiciona a fase de leitura correta no início da síntese da proteína.

As moléculas de tRNA transportam aminoácidos para os códons no mRNA

Em uma molécula de mRNA os códons não reconhecem diretamente os aminoácidos que determinam: o grupo de três nucleotídeos, por exemplo, não se liga diretamente ao aminoácido. Mais exatamente, a tradução do mRNA em proteína depende de moléculas adaptadoras que podem reconhecer e se ligar ao códon e, em outra região de sua superfície, ao aminoácido. Esses adaptadores consistem em um conjunto de pequenas moléculas de RNA conhecido como **RNAs transportadores (tRNAs)**, cada um com tamanho de aproximadamente 80 nucleotídeos.

Vimos anteriormente neste capítulo que as moléculas de RNA podem dobrar-se em estruturas tridimensionais estabelecidas com alta precisão, e as moléculas de tRNA fornecem um extraordinário exemplo disso. Quatro pequenos segmentos do tRNA dobrado formam duplas-hélices, produzindo uma molécula que se assemelha a uma folha de trevo quando desenhada esquematicamente (**Figura 6-52**). Por exemplo, uma sequência 5′-GCUC-3′ em uma região da cadeia polinucleotídica pode formar uma associação relativamente forte com uma sequência 5′-GAGC-3′ em outra região da mesma molécula. A folha de trevo é submetida a dobramentos adicionais para formar uma estrutura compacta em forma de L que é mantida por meio de ligações de hidrogênio adicionais entre diferentes regiões da molécula.

Duas regiões de nucleotídeos não-pareados situadas em cada uma das extremidades da molécula em forma de L são cruciais para a função do tRNA na síntese de proteínas. Uma

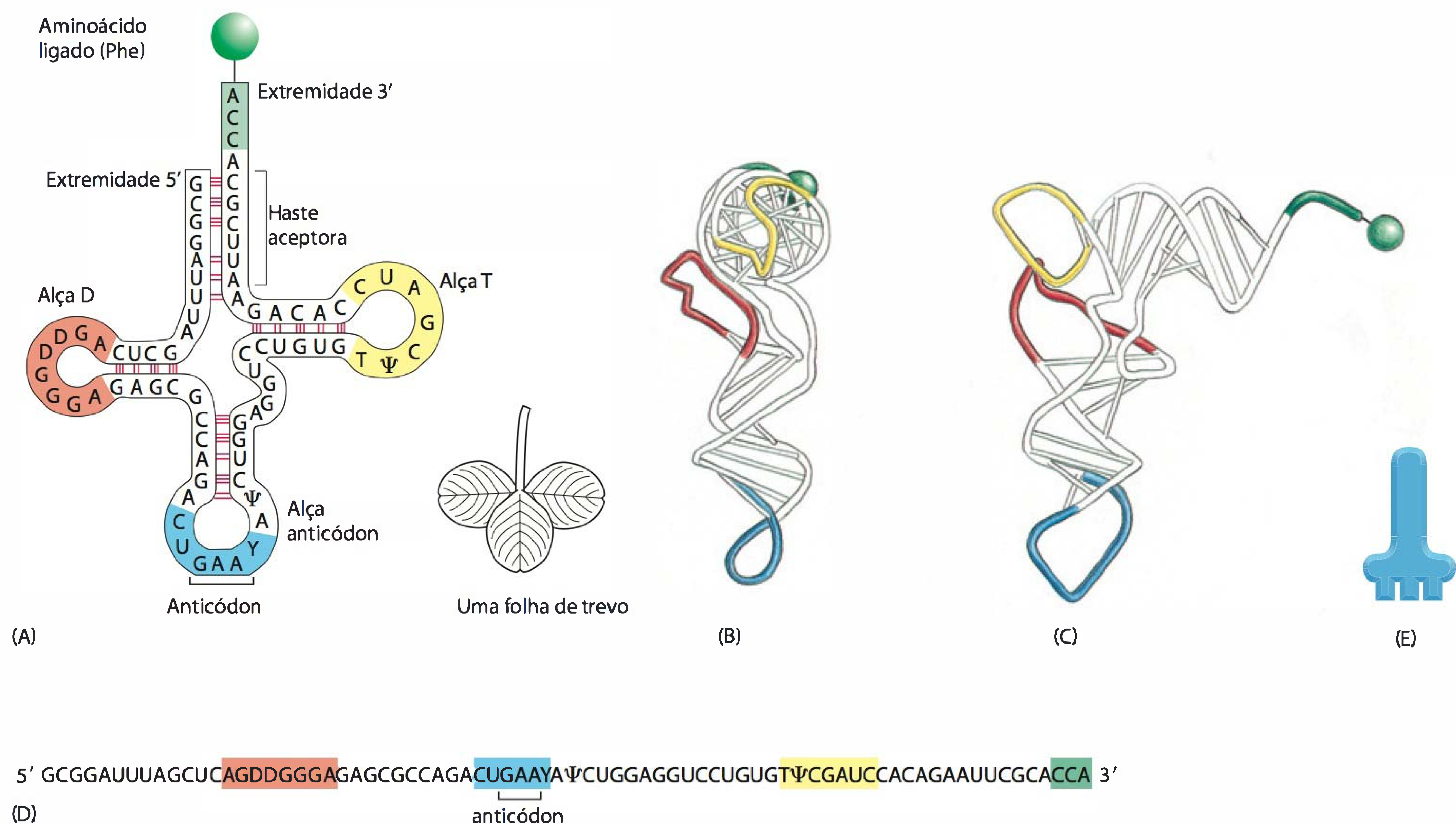


Figura 6-52 Uma molécula de tRNA. Um tRNA específico para o aminoácido fenilalanina (Phe) é ilustrado de várias maneiras. (A) A estrutura na forma de folha de trevo mostrando a complementaridade do pareamento de bases (*linhas vermelhas*) que cria as regiões de dupla-hélice na molécula. O anticódon é a sequência de três nucleotídeos que forma pares de bases com o códon no mRNA. O aminoácido correspondente ao par códon-anticódon é ligado na extremidade 3′ do tRNA. Os tRNAs contêm algumas bases incomuns, as quais são produzidas por modificação química após a síntese do tRNA. Por exemplo, as bases identificadas como ψ (pseudouridina – ver Figura 6-43) e D (diidrouridina – ver Figura 6-55) são derivadas de uracila. (B e C) Vistas da molécula em forma de L, com base em análise de difração de raios X. Embora este diagrama ilustre um tRNA para o aminoácido fenilalanina, todos os outros tRNAs têm estruturas semelhantes. (D) A sequência nucleotídica linear da molécula, colorida de acordo com (A), (B) e (C). (E) A representação do tRNA usada neste livro.

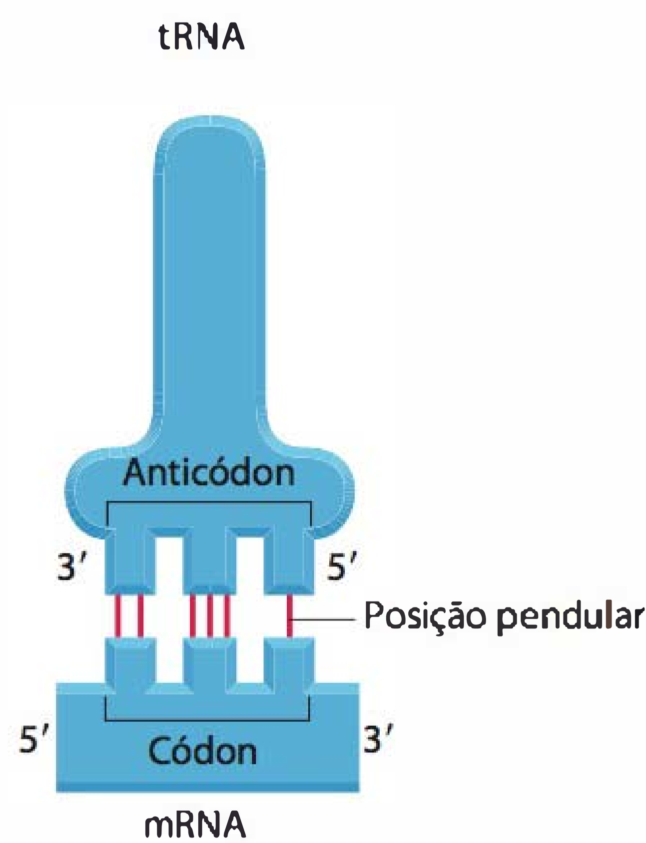
dessas regiões forma o **anticódon**, um conjunto de três nucleotídeos consecutivos que pareiam com o códon complementar em uma molécula de mRNA. A outra é uma pequena região de fita simples na extremidade 3′ da molécula: este é o sítio onde o aminoácido que corresponde ao códon é ligado ao tRNA.

Na seção anterior, vimos que o código genético é redundante; ou seja, diversos códons podem determinar um único aminoácido (ver Figura 6-50). Essa redundância implica ou a existência de mais de um tRNA para vários dos aminoácidos ou o pareamento de algumas moléculas de tRNA com mais do que um códon. De fato, ambas as situações ocorrem. Alguns aminoácidos possuem mais do que um tRNA, e alguns tRNAs são construídos de tal forma que necessitam de exatidão apenas no pareamento de bases nas duas primeiras posições do códon, podendo tolerar um pareamento imperfeito (ou oscilação) na terceira posição (**Figura 6-53**). Esse pareamento de bases oscilante explica por que tantos códons alternativos para um aminoácido diferem apenas em seu terceiro nucleotídeo (ver Figura 6-50). Em bactérias, o pareamento de bases oscilante torna possível encaixar os 20 aminoácidos a seus 61 códons com apenas 31 tipos de moléculas de tRNA. O número exato de tipos diferentes de tRNAs, no entanto, difere de uma espécie a outra. Por exemplo, os humanos têm aproximadamente 500 genes de tRNAs, mas, entre eles, somente 48 anticódons diferentes estão representados.

Os tRNAs são covalentemente modificados antes de saírem do núcleo

Assim como a maioria dos RNAs eucarióticos, os tRNAs são alterados covalentemente antes que seja permitida a sua saída do núcleo. Os tRNAs eucarióticos são sintetizados pela RNA-polimerase III. Tanto os tRNAs bacterianos quanto os eucarióticos são caracteristicamente sintetizados sob a forma de grandes tRNAs precursores, e estes são cortados para produzir o tRNA maduro. Além disso, alguns precursores tRNAs (tanto bacterianos quanto eucarióticos) contêm íntrons que devem ser retirados por *splicing*. Essa reação de *splicing* é quimicamente distinta daquela do *splicing* do pré-mRNA; em vez de gerar uma alça intermediária, o *splicing* do tRNA ocorre por meio de um mecanismo de recorte e colagem que é catalisado por proteínas (**Figura 6-54**). Tanto o corte quanto o *splicing* necessitam que o tRNA precursor esteja corretamente dobrado em sua configuração de folha de trevo. Considerando que os tRNAs precursores com dobramentos errados não são adequadamente processados, acredita-se que as reações de corte e de *splicing* atuem como passos de controle de qualidade na geração de tRNAs.

Todos os tRNAs também são alvo de modificações químicas – aproximadamente um em cada 10 nucleotídeos de uma molécula de tRNA madura é uma versão alterada dos ribonucleotídeos G, U, C ou A padrão. Mais de 50 tipos diferentes de modificações de tRNA são conhecidos; alguns estão ilustrados na **Figura 6-55**. Alguns dos nucleotídeos modificados – mais notadamente a inosina, produzida pela desaminação da adenosina – afetam a conformação e o pareamento de bases do anticódon e, assim, facilitam o reconhecimento do códon apropriado no mRNA pela molécula de tRNA (ver Figura 6-53). Outros afetam a exatidão com a qual o tRNA é ligado ao aminoácido correto.



Bactérias

Base pendular do códon	Possíveis bases no anticódon
U	A, G, ou I
C	G ou I
A	U ou I
G	C ou U

Eucariotos

Base pendular do códon	Possíveis bases no anticódon
U	A, G, ou I
C	G ou I
A	U
G	C

Figura 6-53 Pareamento de bases em pêndulo (oscilantes) entre códons e anticódons. Se o nucleotídeo listado na primeira coluna está presente na terceira coluna do códon (posição pendular), ele pode parear com qualquer um dos nucleotídeos listados na segunda coluna. Assim, por exemplo, quando a inosina (I) está presente na posição pendular do anticódon do tRNA, o tRNA pode reconhecer qualquer um dos três diferentes códons em bactérias e qualquer um dos dois códons em eucariotos. A inosina nos tRNAs é formada a partir da desaminação da guanina (ver Figura 6-55), uma modificação química que ocorre após o tRNA ter sido sintetizado. Os pareamentos de bases incomuns, incluindo aqueles feitos com inosina, geralmente são mais fracos do que os pareamentos de bases convencionais. Observe que o pareamento de base códon-anticódon é mais rigoroso nas posições 1 e 2 do códon: nessas posições, apenas os pareamentos convencionais são permitidos. As diferenças nas interações por pareamento pendular entre bactérias e eucariotos presumivelmente resultam de diferenças estruturais sutis entre ribossomos bacterianos e eucarióticos, as máquinas moleculares que realizam a síntese de proteína. (Adaptada de C. Guthrie e J. Abelson, in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, p. 487-528. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.)



Figura 6-54 Estrutura de uma endonuclease de *splicing* de tRNA ancorada a um precursor de tRNA. A endonuclease (uma enzima de quatro subunidades) remove o íntron do tRNA (*azul*). Uma segunda enzima, uma tRNA-ligase multifuncional (não ilustrada), reúne as duas metades do tRNA. (Cortesia de Hong Li, Christopher Trotta e John Abelson.)

As enzimas específicas acoplam cada aminoácido a sua molécula de tRNA apropriada

Vimos que, para ler o código genético no DNA, as células produzem uma série de tRNAs diferentes. Consideraremos agora como cada molécula de tRNA liga-se a um dentre os 20 aminoácidos, o qual é seu parceiro apropriado. O reconhecimento e a ligação ao aminoácido correto dependem de enzimas denominadas **aminoacil-tRNA-sintetases**, as quais acoplam covalentemente cada aminoácido ao seu conjunto apropriado de moléculas de tRNA (**Figuras 6-56** e **6-57**). Na maioria das células existe uma enzima sintetase diferente para cada aminoácido (ou seja, 20 sintetases ao todo); uma liga glicina a todos os tRNAs que reconhecem códons para glicina, outra liga alanina a todos os tRNAs que reconhecem códons para alanina, e assim por diante. Diversas bactérias, no entanto, têm menos do que 20 sintetases, e uma mesma enzima sintetase é responsável pelo acoplamento de mais de um aminoácido aos seus tRNAs apropriados. Nesses casos, uma única sintetase posiciona o aminoácido idêntico em dois tipos diferentes de tRNAs, mas apenas um deles tem o anticódon que combina com o aminoácido. Uma segunda enzima, então, modifica quimicamente cada aminoácido ligado "incorretamente" de tal forma que este agora corresponda ao anticódon exibido pelo tRNA ao qual ele se encontra covalentemente ligado.

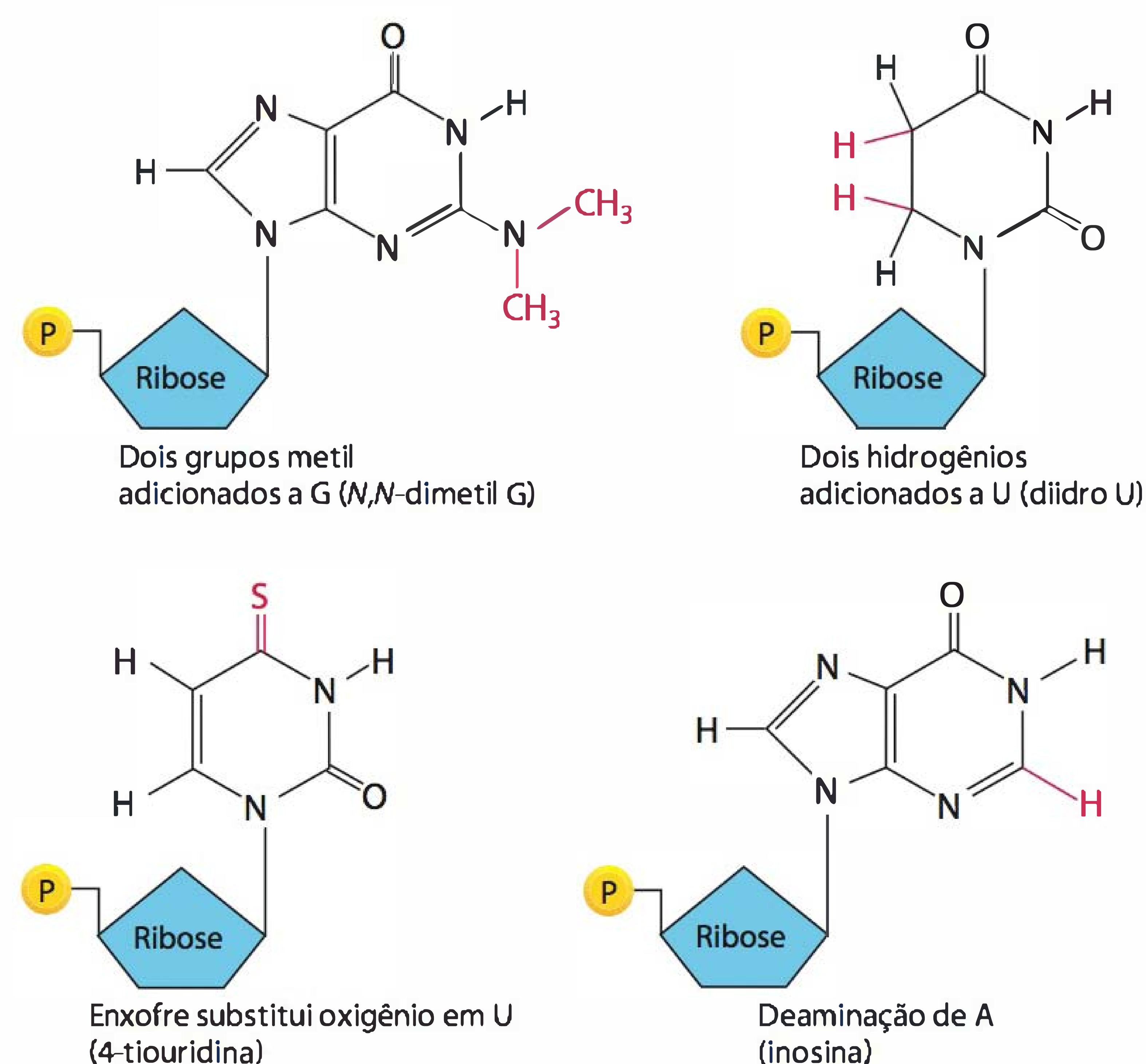


Figura 6-55 Alguns dos nucleotídeos incomuns encontrados nas moléculas de tRNA. Estes nucleotídeos são produzidos por modificação covalente de um nucleotídeo normal, após a incorporação deste em uma cadeia de RNA. Dois outros tipos de nucleotídeos modificados estão ilustrados na Figura 6-43. Na maioria das moléculas de tRNA, aproximadamente 10% dos nucleotídeos são modificados (ver Figura 6-52).

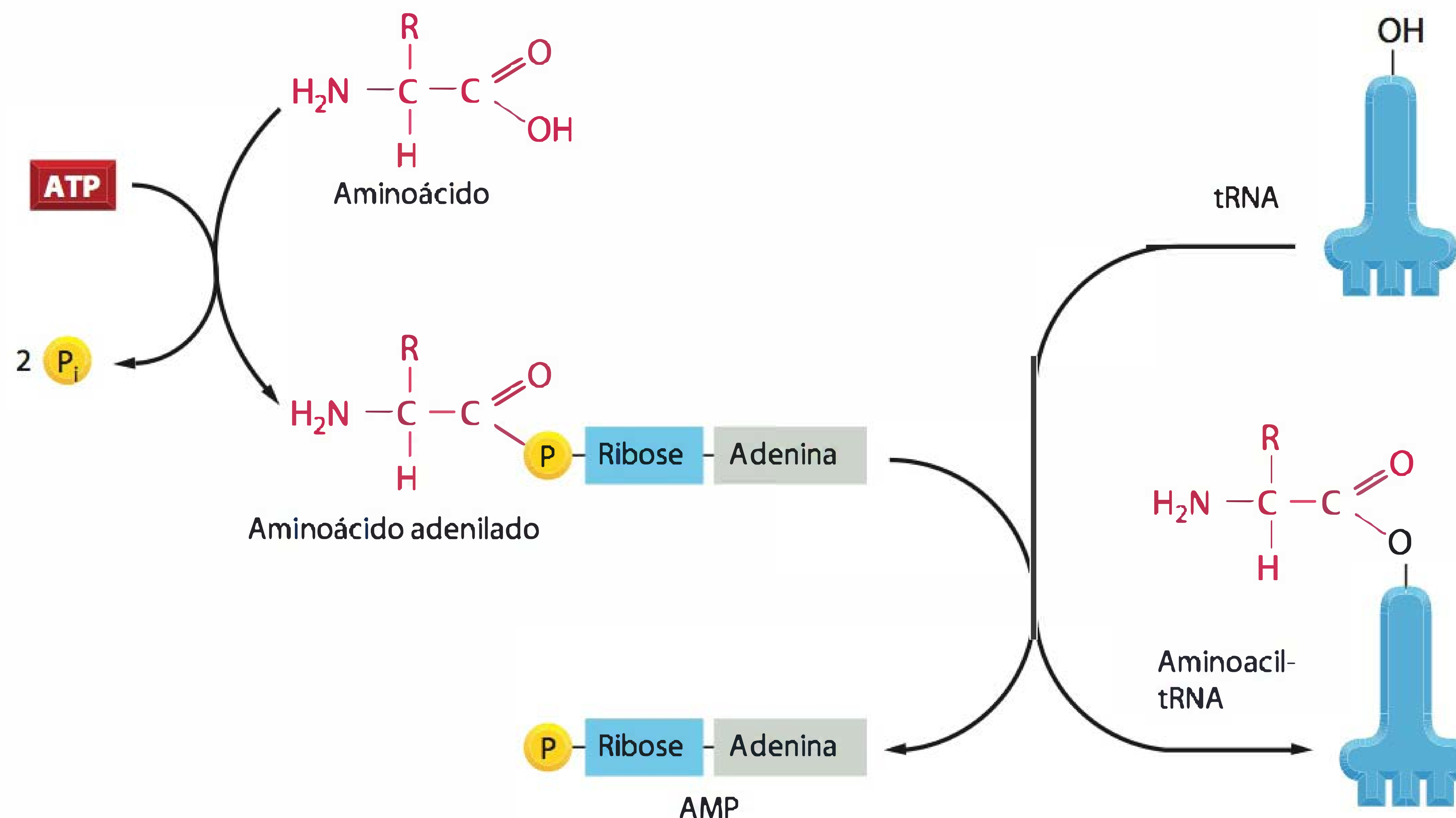


Figura 6-56 Ativação do aminoácido. Um aminoácido é ativado para a síntese proteica por uma enzima aminoacil-tRNA-sintetase em duas etapas. Como indicado, a energia da hidrólise de ATP é usada para ligar cada aminoácido a sua molécula de tRNA em uma ligação altamente energética. O aminoácido é inicialmente ativado por meio da ligação de seu grupo carboxila diretamente a um AMP, formando um *aminoácido adenilado*; a ligação do AMP, normalmente uma reação desfavorável, é dirigida pela hidrólise da molécula de ATP que doa o AMP. Sem deixar a enzima sintetase, o grupo carboxila ligado ao AMP no aminoácido é, então, transferido para um grupo hidroxila no açúcar, na extremidade 3′ da molécula de tRNA. Essa transferência liga o aminoácido por meio de uma ligação éster ativada ao tRNA, formando a molécula final de aminoacil-tRNA. A enzima sintetase não é mostrada neste diagrama.

A reação catalisada pela sintetase que liga o aminoácido à extremidade 3′ do tRNA é uma das muitas reações celulares associadas à hidrólise de ATP com liberação de energia (ver p. 79-81), produzindo uma ligação altamente energética entre o tRNA e o aminoácido. A energia dessa ligação é usada em um estágio posterior, na síntese de proteínas, para ligar covalentemente o aminoácido à cadeia polipeptídica em formação.

As enzimas aminoacil-tRNAs sintetases e os tRNAs são adaptadores de igual importância no processo de decodificação (**Figura 6-58**). Isso foi estabelecido por um experimento no qual um aminoácido (cisteína) foi convertido quimicamente em um aminoácido diferente (alanina) após este já ter sido ligado ao seu tRNA específico. Quando tais moléculas amino-acil-tRNA "híbridas" foram usadas para a síntese de proteínas em um sistema *in vitro*, sem células, o aminoácido errado foi inserido em todos os pontos da cadeia proteica onde aquele tRNA foi utilizado. Embora, como veremos, as células apresentem vários mecanismos de controle de qualidade para evitar esse tipo de erro, o experimento mostra claramente que o código genético é traduzido por dois conjuntos de adaptadores que agem em sequência. Cada um se associa à superfície molecular do outro com grande especificidade, sendo esta ação combinada que associa cada sequência de três nucleotídeos na molécula de mRNA – ou seja, cada códon – com seu aminoácido específico.

A edição por tRNA-sintetases assegura a exatidão

Vários mecanismos trabalhando em conjunto asseguram que a tRNA-sintetase ligue o aminoácido correto a cada tRNA. A sintetase deve inicialmente selecionar o aminoácido correto e o faz, principalmente, por meio de um mecanismo composto de duas etapas. Primeiro, o aminoácido correto apresenta uma maior afinidade pela fenda do sítio ativo de sua sintetase, sendo assim favorecido sobre os outros 19. Em particular, os aminoácidos maiores do que o correto são efetivamente excluídos do sítio ativo. No entanto, a discriminação exata entre

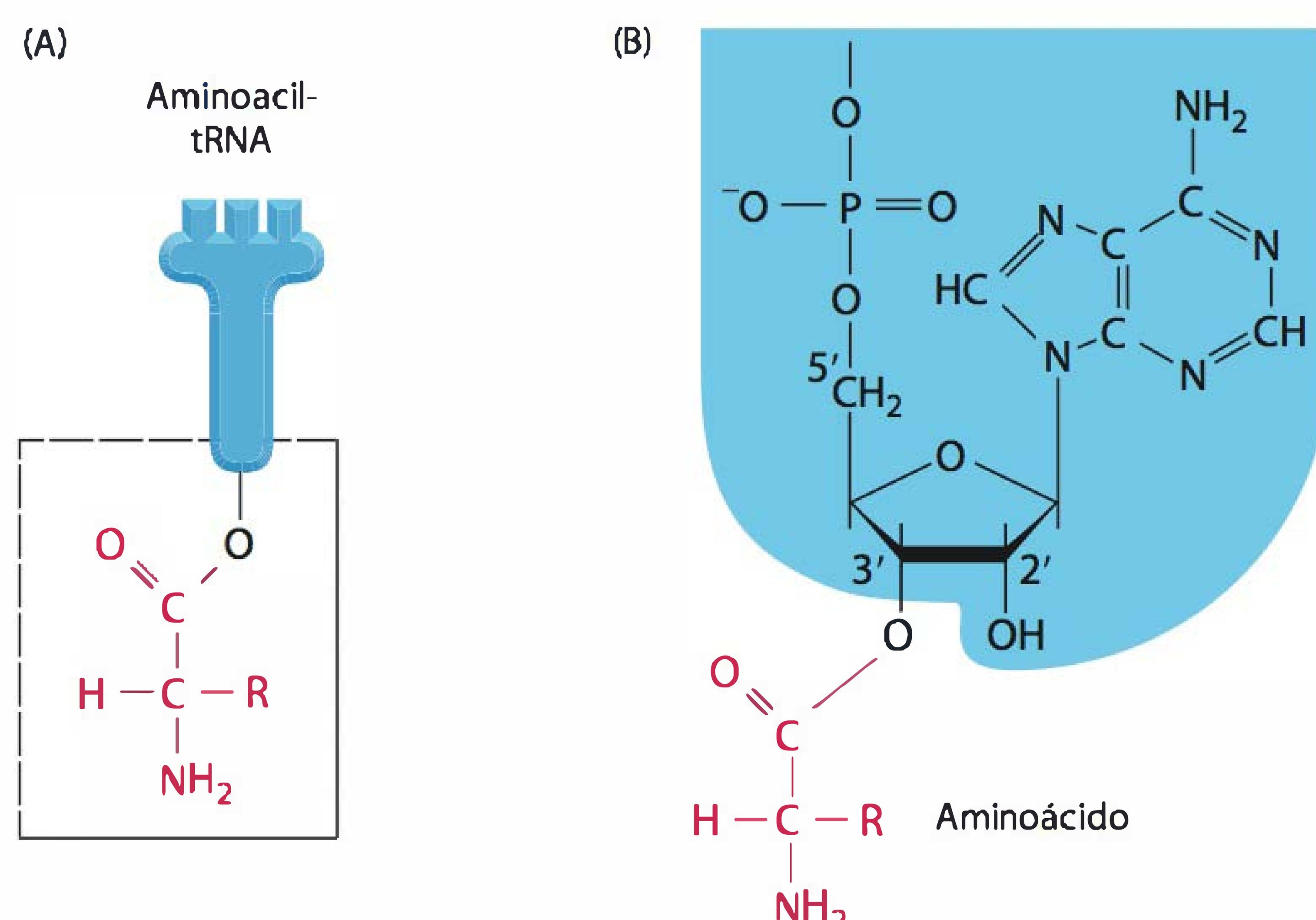


Figura 6-57 Estrutura da ligação aminoacil-tRNA. A extremidade carboxila do aminoácido forma uma ligação éster com a ribose. Visto que a hidrólise dessa ligação éster está associada a uma alteração altamente favorável na energia livre, um aminoácido mantido assim é denominado ativado. (A) Desenho esquemático da estrutura. O aminoácido está ligado ao nucleotídeo na extremidade 3′ do tRNA (ver Figura 6-52). (B) Estrutura real correspondendo à região enquadrada em (A). Existem duas classes principais de enzimas sintetases: uma liga o aminoácido diretamente ao grupo 3′-OH da ribose, e a outra o liga inicialmente ao grupo 2′-OH. No segundo caso, uma reação de transesterificação subsequente desloca o aminoácido para a posição 3′. Como na Figura 6-56, o "grupo R" indica a cadeia lateral do aminoácido.

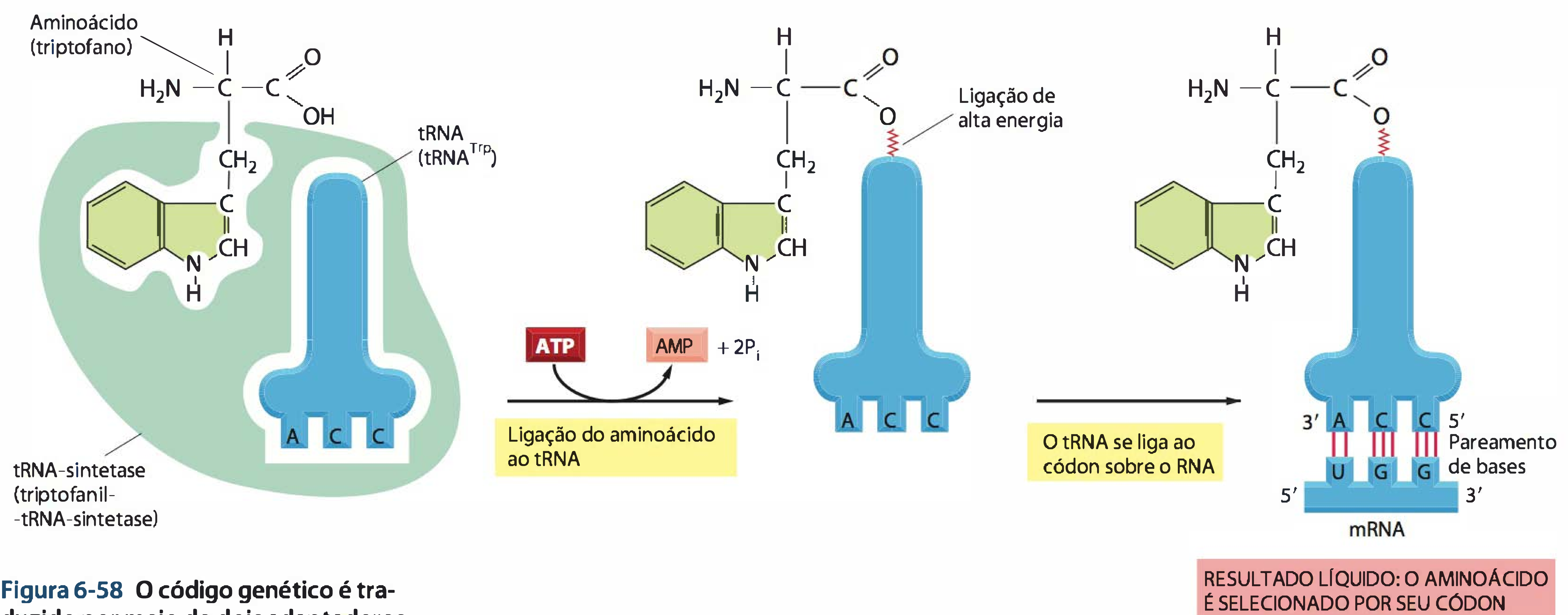


Figura 6-58 O código genético é traduzido por meio de dois adaptadores que agem um após o outro. O primeiro adaptador é a aminoacil-tRNA--sintetase, que acopla um aminoácido específico ao seu tRNA correspondente; o segundo adaptador é a própria molécula de tRNA, cujo *anticódon* forma pares de bases com o *códon* apropriado no mRNA. Um erro em qualquer um desses passos pode causar a incorporação de um aminoácido errado na cadeia de proteína. Na sequência de eventos ilustrada, o aminoácido triptofano (Trp) é selecionado pelo códon UGG no mRNA.

dois aminoácidos semelhantes, como a isoleucina e a valina (os quais diferem apenas por um grupo metil), é muito difícil de ser alcançada por um mecanismo de reconhecimento de etapa única. Uma segunda etapa de discriminação ocorre após o aminoácido ter sido ligado covalentemente ao AMP (ver Figura 6-56). Quando o tRNA liga-se à sintetase, ele empurra o aminoácido para uma segunda fenda na sintetase, cujas dimensões precisas excluem o aminoácido correto, mas permitem o acesso de aminoácidos intimamente relacionados. Uma vez que um aminoácido entre nessa fenda de edição, ele será hidrolisado do AMP (ou do próprio tRNA, caso a ligação aminoacil-tRNA já tenha sido formada) e será liberado da enzima. Essa edição hidrolítica, a qual é análoga à correção exonucleotídica mediada pelas DNA-polimerases (**Figura 6-59**), eleva a exatidão média da taxa de carregamento de tRNA para aproximadamente um erro a cada 40 mil acoplamentos.

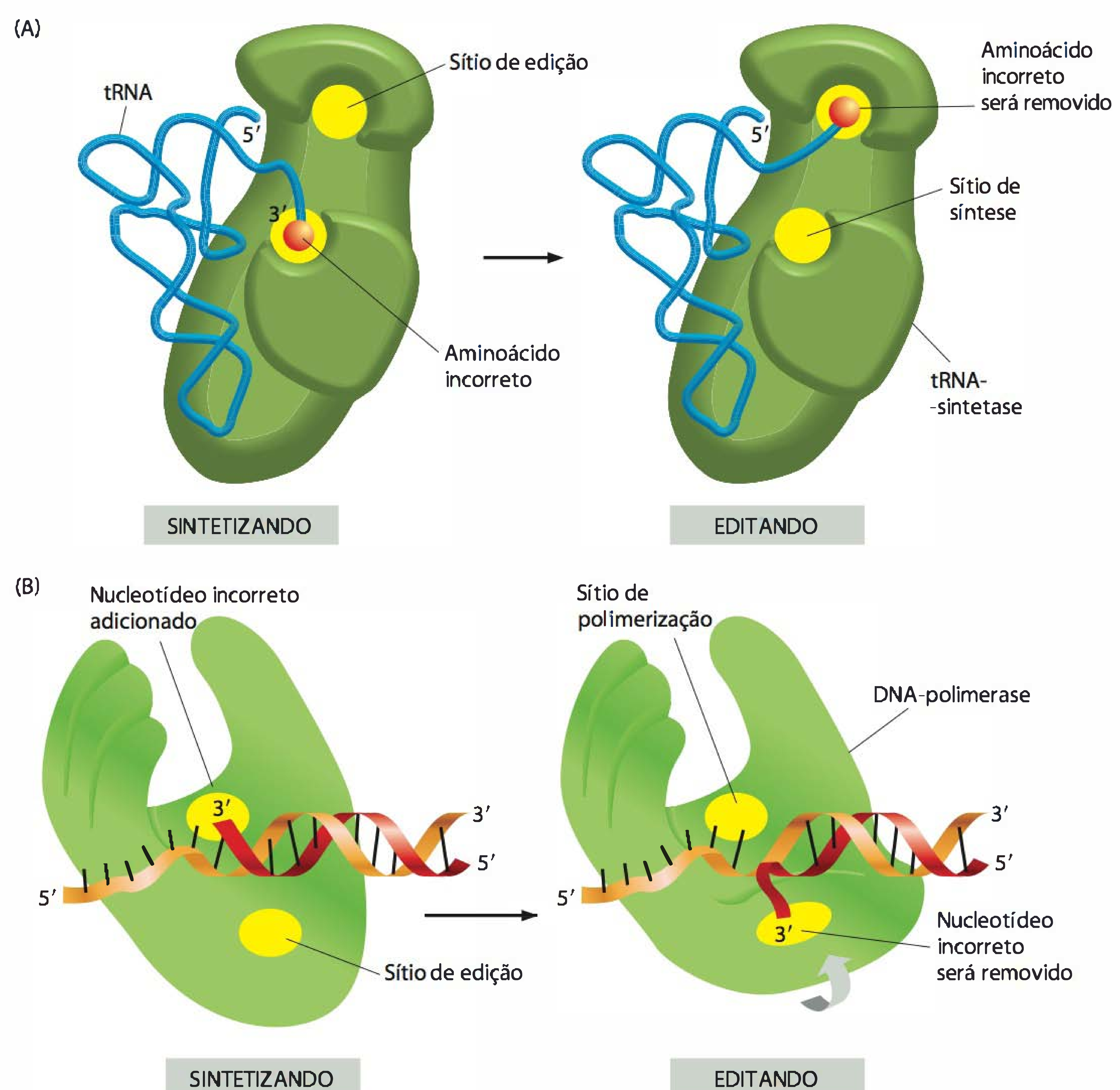


Figura 6-59 Edição hidrolítica. (A) A tRNA-sintetase remove seus próprios erros de pareamento por meio da edição hidrolítica de aminoácidos incorporados incorretamente. Como descrito no texto, o aminoácido correto é rejeitado pelo sítio de edição. (B) O processo de erro-correção realizado pela DNA-polimerase apresenta algumas similaridades; entretanto, difere no que diz respeito ao processo de remoção, o qual depende fortemente de um erro de pareamento com o molde (ver Figura 5-8).

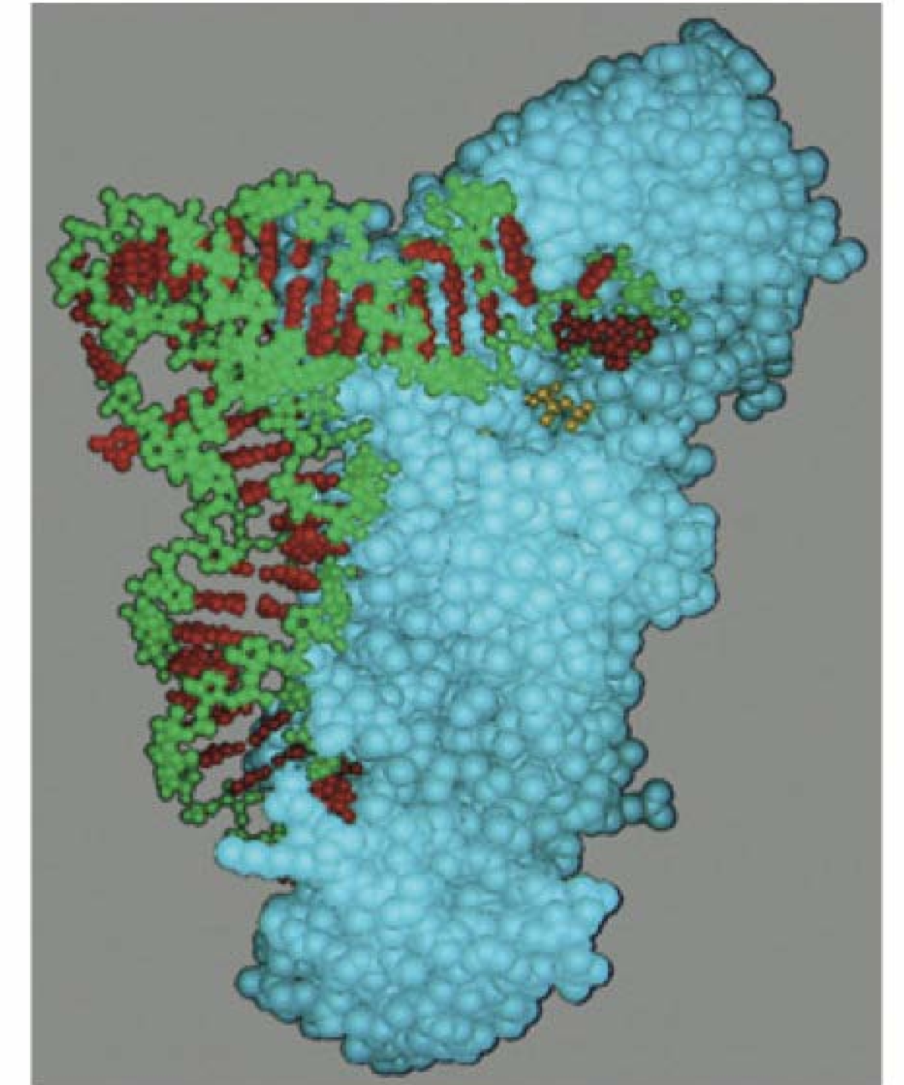


Figura 6-60 Reconhecimento de uma molécula de tRNA por sua amino-acil-tRNA-sintetase. Para este tRNA ($tRNA^{Gln}$), os nucleotídeos específicos tanto no anticódon (*abaixo*) quanto no braço de ligação do aminoácido permitem que o tRNA correto seja reconhecido pela enzima sintetase (*azul*). Uma molécula de ATP ligada está em *amarelo*. (Cortesia de Tom Steitz.)

A tRNA-sintetase também deve reconhecer o conjunto correto de tRNAs, e a extensiva complementaridade estrutural e química entre a sintetase e o tRNA permite que várias características do tRNA sejam percebidas (**Figura 6-60**). A maioria das tRNAs sintetases reconhece diretamente o anticódon de combinação do tRNA; essas sintetases contêm três fendas de ligação nucleotídica adjacentes, cada uma das quais é complementar em forma e em carga ao nucleotídeo no anticódon. Para outras sintetases, a sequência nucleotídica do braço aceptor é a chave determinante de reconhecimento. Na maioria dos casos, no entanto, os nucleotídeos de várias posições no tRNA são "lidos" pela sintetase.

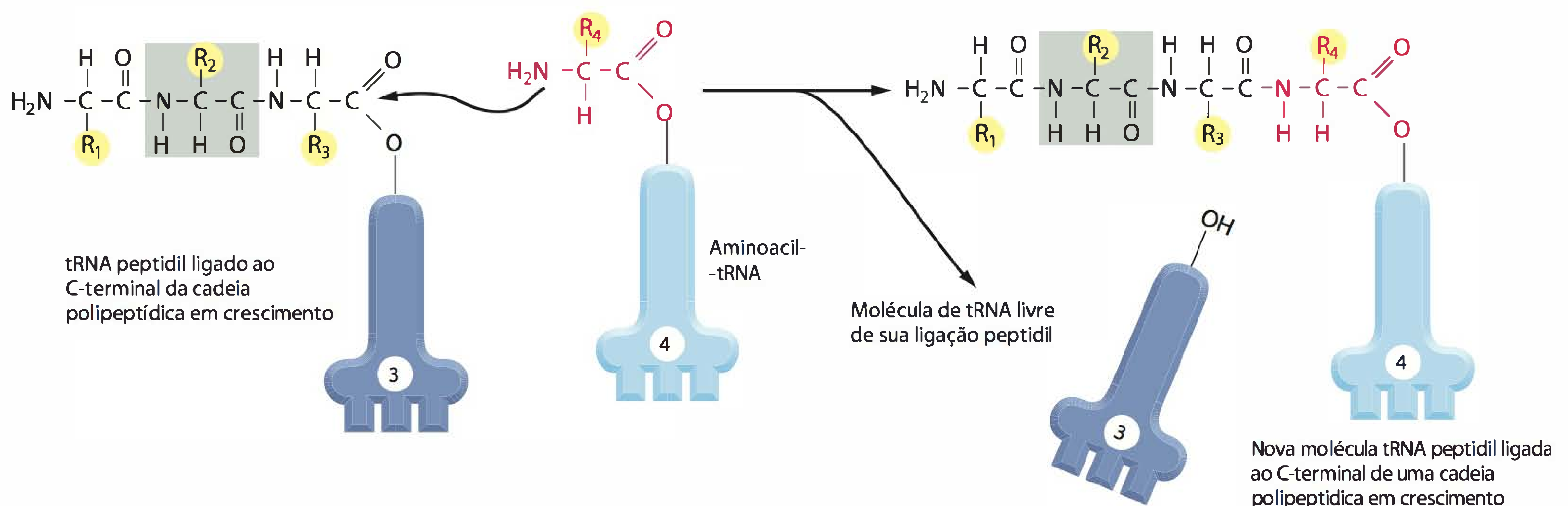
Os aminoácidos são adicionados à extremidade C-terminal de uma cadeia polipeptídica em crescimento

Tendo visto que os aminoácidos são inicialmente acoplados a moléculas de tRNA, veremos agora os mecanismos pelos quais eles são unidos para formar as proteínas. A reação fundamental para a síntese de proteína é a formação de uma ligação peptídica entre o grupo carboxila na extremidade de uma cadeia polipeptídica em crescimento e um grupo amino livre do novo aminoácido. Consequentemente, uma proteína é sintetizada sempre a partir de sua extremidade N-terminal para sua extremidade C-terminal. Durante todo o processo, a extremidade carboxila em crescimento da cadeia polipeptídica permanece ativada por meio de ligação covalente a uma molécula de tRNA (formando um peptidil-tRNA). Essa ligação covalente altamente energética é interrompida durante cada adição, mas é imediatamente refeita por uma ligação idêntica no último aminoácido adicionado (**Figura 6-61**). Dessa maneira, cada aminoácido adicionado carrega com ele a energia de ativação para a adição do próximo aminoácido, em vez de energia para a sua própria adição – um exemplo de polimerização do tipo "cabeça de crescimento" descrita na Figura 2-68.

A mensagem de RNA é decodificada nos ribossomos

Como vimos, a síntese de proteínas é guiada pela informação presente nas moléculas de mRNA. Para manter a fase de leitura correta e para assegurar a exatidão (aproximadamente 1 erro a cada 10 mil aminoácidos), a síntese proteica é realizada no **ribossomo**, uma maquinaria catalítica complexa feita a partir de mais de 50 proteínas diferentes (as *proteínas ribossomais*) e diversas moléculas de RNA, os **RNAs ribossomais (rRNAs)**. Uma célula eucariótica típica contém milhões de ribossomos em seu citoplasma (**Figura 6-62**). As subunidades ribossomais eucarióticas são montadas nos nucléolos pela associação de rRNAs recém-transcritos e modificados com proteínas ribossomais, as quais foram transportadas para o interior do núcleo

Figura 6-61 Incorporação de um aminoácido em uma proteína. Uma cadeia polipeptídica cresce pela adição sucessiva de aminoácidos à sua extremidade C-terminal. A formação de cada ligação peptídica é energeticamente favorável, pois a extremidade C-terminal em crescimento foi ativada pela ligação covalente de uma molécula de tRNA. A ligação peptidil-tRNA que ativa a extremidade em crescimento é regenerada a cada adição. As cadeias laterais dos aminoácidos são indicadas como R_1, R_2, R_3 e R_4; como ponto de referência, todos os átomos no segundo aminoácido na cadeia polipeptídica estão em *cinza*. A figura mostra a adição do quarto aminoácido (*vermelho*) à cadeia em crescimento.



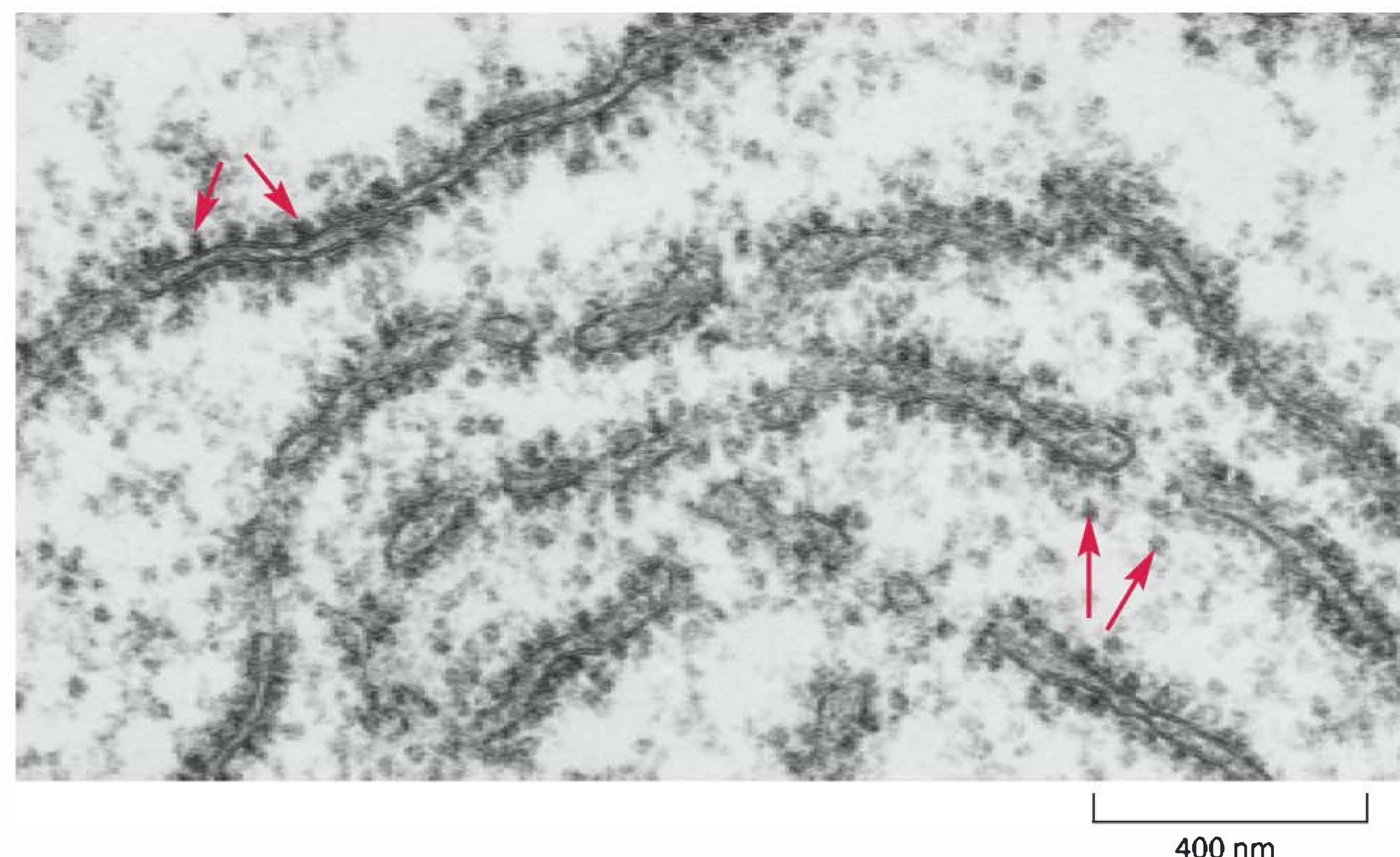


Figura 6-62 Ribossomos no citoplasma de uma célula eucariótica. Esta microfotografia eletrônica mostra uma fina secção de uma pequena região do citoplasma. Os ribossomos aparecem como pontos pretos (*setas vermelhas*). Alguns estão livres no citosol; outros estão ligados a membranas do retículo endoplasmático. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

após sua síntese no citoplasma. As duas subunidades ribossomais são então exportadas para o citoplasma, onde serão unidas para realizar a síntese de proteínas.

Os ribossomos eucarióticos e procarióticos são muito similares tanto em forma quanto em função. Ambos são compostos de uma subunidade grande e de uma subunidade pequena que se encaixam para formar um ribossomo completo, com uma massa de vários milhões

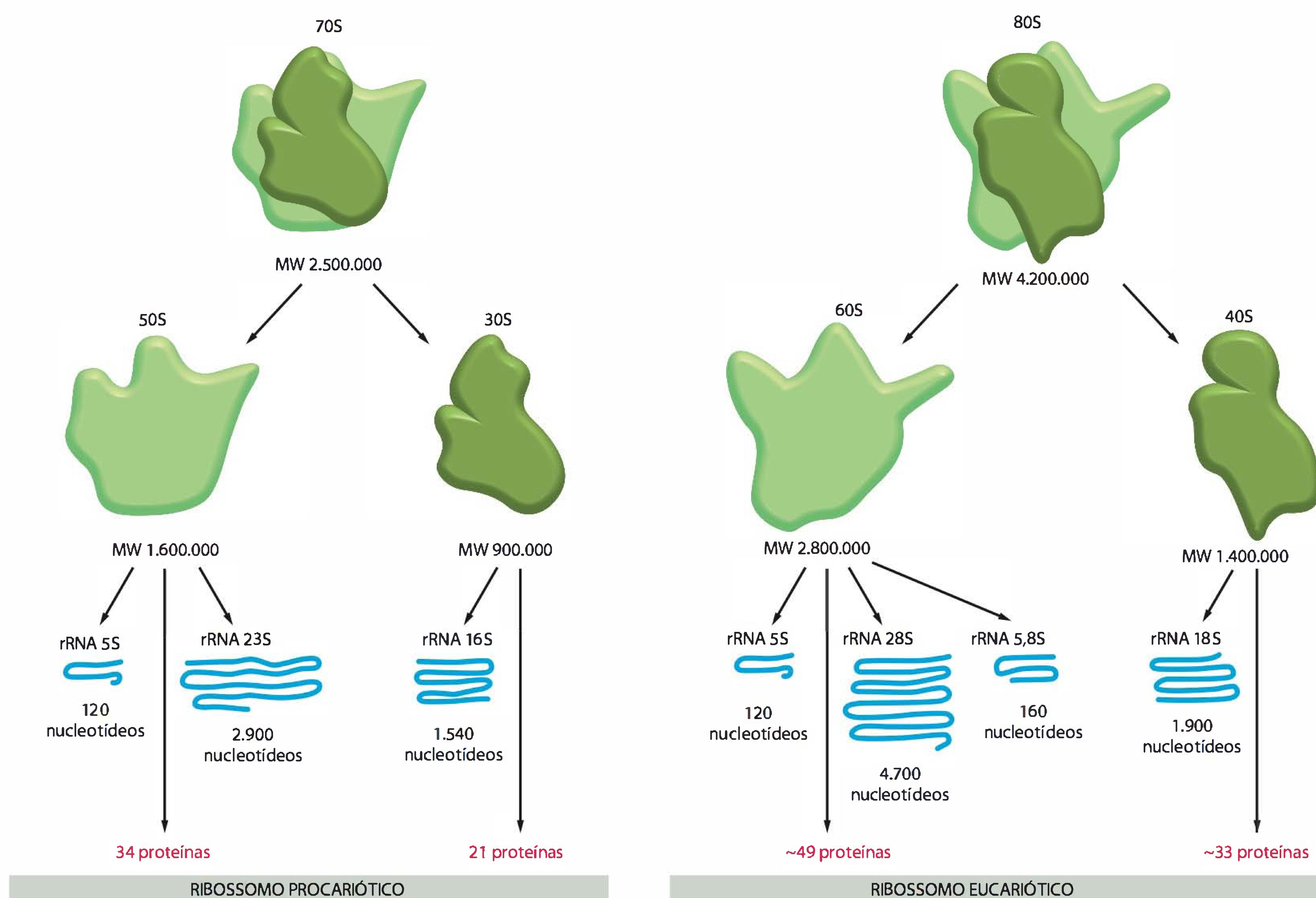


Figura 6-63 Comparação entre ribossomos procarióticos e eucarióticos. Apesar de diferenças no número e no tamanho de seus rRNAs e componentes proteicos, ambos os ribossomos procarióticos e eucarióticos apresentam aproximadamente a mesma estrutura e funcionam de modo semelhante. Embora os rRNAs 18S e 28S dos ribossomos eucarióticos contenham muitos nucleotídeos extras que não ocorrem nos equivalentes bacterianos, esses nucleotídeos estão presentes como inserções múltiplas que formam domínios extras, não alterando muito a estrutura básica de cada rRNA.

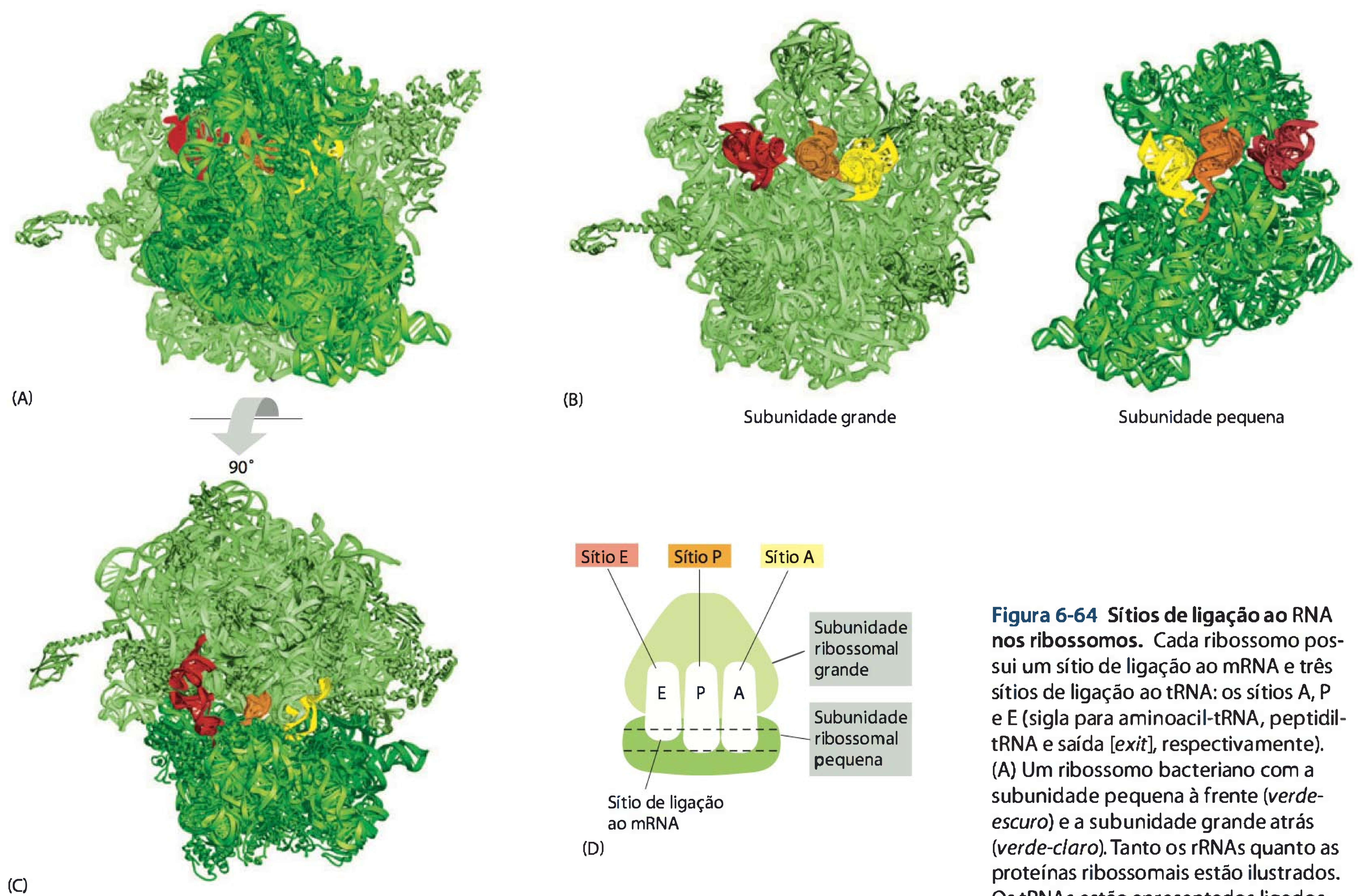


Figura 6-64 Sítios de ligação ao RNA nos ribossomos. Cada ribossomo possui um sítio de ligação ao mRNA e três sítios de ligação ao tRNA: os sítios A, P e E (sigla para aminoacil-tRNA, peptidil-tRNA e saída [*exit*], respectivamente). (A) Um ribossomo bacteriano com a subunidade pequena à frente (*verde-escuro*) e a subunidade grande atrás (*verde-claro*). Tanto os rRNAs quanto as proteínas ribossomais estão ilustrados. Os tRNAs estão apresentados ligados aos sítios E (*vermelho*), P (*laranja*) e A (*amarelo*). Embora os três sítios de ligação de tRNA estejam ocupados, acredita-se que, durante o processo de síntese proteica, não mais do que dois desses sítios contenham moléculas de tRNA simultaneamente (ver Figura 6-66). (B) As subunidades ribossomais grande e pequena organizadas como deve ocorrer no ribossomo em (A) foram abertas como um livro. (C) O ribossomo em (A) foi girado 90°, sendo visto com a subunidade grande para cima e a subunidade pequena para baixo. (D) Representação esquemática de um ribossomo (na mesma orientação que em C), que será utilizada nas figuras subsequentes. (A, B e C adaptadas de M. M. Yusupov et al., *Science* 292:883-896, 2001. Com permissão de AAAS; cortesia de Albion Baucom e Harry Noller.)

de dáltons (**Figura 6-63**). A subunidade pequena fornece uma região sobre a qual os tRNAs podem ser eficientemente pareados sobre os códons do mRNA (ver Figura 6-58), enquanto que a subunidade grande catalisa a formação das ligações peptídicas que unem os aminoácidos, formando uma cadeia polipeptídica (ver Figura 6-61).

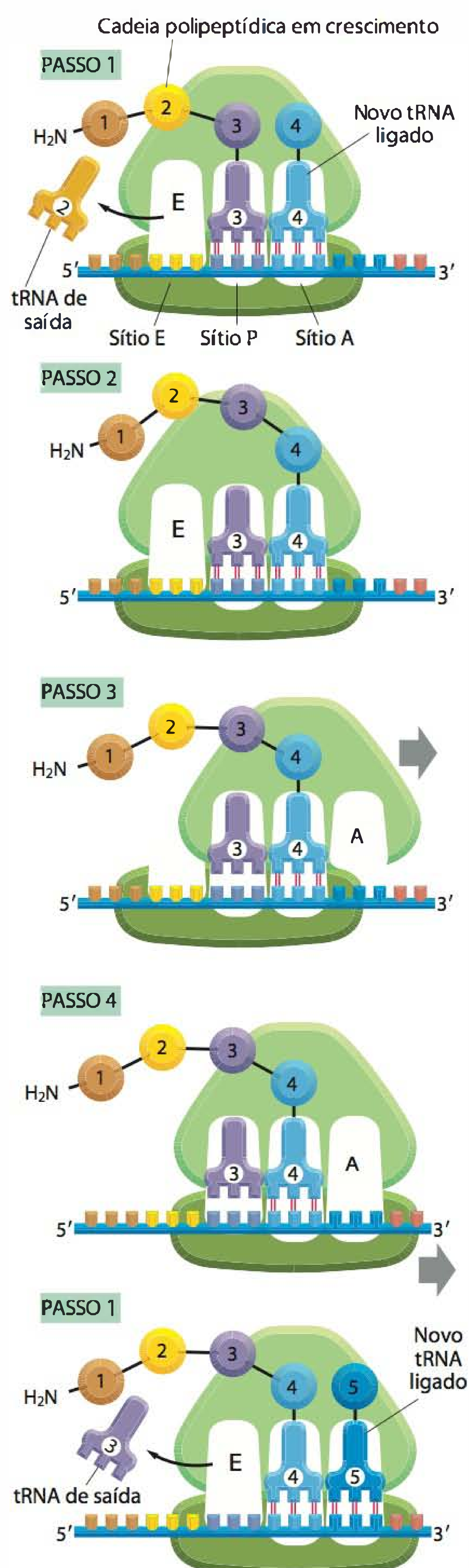
Quando a síntese de proteínas não está ativa, as duas subunidades do ribossomo estão separadas. Elas se unem sobre uma molécula de mRNA, normalmente próxima à sua extremidade 5′, para iniciar a síntese de uma proteína. O mRNA é então puxado através do ribossomo; conforme seus códons encontram os sítios ativos dos ribossomos, a sequência nucleotídica do mRNA é traduzida em uma sequência de aminoácidos, usando os tRNAs como adaptadores para adicionar cada aminoácido na sequência correta à extremidade da cadeia polipeptídica em formação. Quando um códon de terminação é encontrado, o ribossomo libera a proteína finalizada, e suas duas subunidades separam-se novamente. Essas subunidades podem então ser utilizadas para iniciar a síntese de outra proteína sobre outra molécula de mRNA.

Os ribossomos operam com uma eficiência notável: em um segundo, um único ribossomo de uma célula eucariótica adiciona aproximadamente dois aminoácidos à cadeia polipeptídica; os ribossomos das células bacterianas operam ainda mais rapidamente, a taxas de cerca de 20 aminoácidos por segundo. Como o ribossomo organiza os muitos movimentos coordenados necessários para uma tradução eficiente? Um ribossomo contém quatro sítios de ligação para moléculas de RNA: um é para o mRNA e três (denominados sítio A, sítio P e sítio E) são para tRNAs (**Figura 6-64**). Uma molécula de tRNA adere fortemente aos sítios A e P apenas se seus anticódons formam pares de bases com o códon complementar (permitindo-se oscilamento) na molécula de mRNA que está ligada ao ribossomo (**Figura 6-65**). Os sítios A e P estão suficientemente próximos para que suas duas moléculas de tRNA sejam forçadas a formarem pares de bases com códons adjacentes na molécula de mRNA. Essa característica do ribossomo mantém a fase de leitura correta no mRNA.

Uma vez que a síntese de proteína tenha sido iniciada, cada novo aminoácido é adicionado à cadeia em extensão em um ciclo de reações contendo quatro passos principais: ligação do tRNA, formação da ligação peptídica, translocação das subunidades grande e pequena. Como resultado dos dois passos de translocação, o ribossomo completo move-se três nucleo-

Figura 6-65 O caminho do mRNA (*azul*) através da subunidade ribossomal pequena. A orientação é a mesma do painel direito da Figura 6-64B. (Cortesia de Harry F. Noller, com base em dados de G. Z. Yusopova et al., *Cell* 106:233-241, 2001. Com permissão de Elsevier.)





tídeos sobre o mRNA e é posicionado para dar início ao próximo ciclo (**Figura 6-66**). Nossa descrição do processo de extensão da cadeia inicia no ponto em que alguns aminoácidos já foram ligados entre si e que já existe uma molécula de tRNA no sítio P no ribossomo ligada covalentemente à extremidade da cadeia polipeptídica em crescimento. No passo 1, um tRNA carregando o próximo aminoácido da cadeia liga-se ao sítio A ribossomal, formando pares de bases com o códon do mRNA lá posicionado. Dessa forma, o sítio P e o sítio A contêm tRNAs adjacentes ligados. No passo 2, a extremidade carboxila da cadeia polipeptídica é liberada do tRNA no sítio P (pelo rompimento da ligação altamente energética entre o tRNA e seu aminoácido) e ligada ao grupo amino livre do aminoácido ligado ao tRNA no sítio A, formando uma nova ligação peptídica. Essa reação central da síntese de proteínas é catalisada por uma *peptidil-transferase* contida na subunidade ribossomal grande. No passo 3, a subunidade grande se move em relação ao mRNA que está preso à subunidade pequena, o que interfere nas hastes aceptoras dos dois tRNAs que se encontram nos sítios E e P da subunidade grande. No passo 4, outra série de modificações conformacionais move a subunidade pequena e o mRNA a ela conectado exatamente três nucleotídeos, reposicionando o ribossomo de tal forma que ele está pronto para receber o próximo aminoacil-tRNA. O passo 1 é então repetido, com a chegada de um novo aminoacil-tRNA, e assim por diante.

Esse ciclo de quatro passos é repetido cada vez que um aminoácido é adicionado à cadeia polipeptídica, e a cadeia cresce a partir de sua extremidade amino em direção à extremidade carboxila.

Figura 6-66 Traduzindo uma molécula de mRNA. Cada aminoácido adicionado à extremidade em crescimento de uma cadeia polipeptídica é selecionado por complementaridade de bases entre o anticódon da molécula de tRNA onde está ligado e o próximo códon da cadeia de mRNA. Visto que somente um dos muitos tipos de moléculas de tRNA em uma célula pode formar pares de bases com um dado códon, o códon determina o aminoácido específico a ser adicionado na cadeia polipeptídica em formação. O ciclo de quatro passos ilustrado é repetido muitas e muitas vezes durante a síntese de uma proteína. No passo 1, um aminoacil-tRNA liga-se a um sítio A livre no ribossomo e uma molécula de tRNA já usada dissocia-se do sítio E. No passo 2, uma nova ligação peptídica é formada. No passo 3, a subunidade ribossomal grande sofre translocação em relação à subunidade pequena, deixando os dois tRNAs em sítios híbridos: P na subunidade grande e A na pequena para um deles; E na subunidade grande e P na pequena para o outro. No passo 4, a subunidade pequena sofre translocação carregando seu mRNA uma distância de três nucleotídeos através do ribossomo. Isso "reinicializa" o ribossomo com um sítio A completamente livre, pronto para que a próxima molécula de aminoacil-tRNA possa se ligar. Como indicado, o mRNA é traduzido no sentido 5′ para 3′, e a extremidade N-terminal de uma proteína é sintetizada primeiro, cada ciclo adicionando um novo aminoácido à extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica.

Os fatores de extensão direcionam a tradução e aumentam a exatidão do processo

O ciclo básico de extensão polipeptídica ilustrado resumidamente na Figura 6-66 tem uma característica adicional que faz com que a tradução seja especialmente eficiente e exata. Dois *fatores de extensão* entram e saem do ribossomo a cada ciclo, cada um hidrolisando GTP em GDP e levando a modificações conformacionais no processo. Esses fatores são denominados EF-Tu e EF-G em bactérias, e EF1 e EF2 em eucariotos. Sob determinadas condições *in vitro*, os ribossomos podem ser induzidos a realizar a síntese proteica sem a ajuda desses fatores de extensão e da hidrólise de GTP, mas essa síntese é muito lenta, ineficiente e inexata. O acoplamento de alterações mediadas pela hidrólise de GTP nos fatores de extensão às transições entre os diferentes estados do ribossomo aumenta bastante a velocidade do processo. Embora essas mudanças de conformação no ribossomo ainda não estejam entendidas em detalhe, é quase certo que envolvam rearranjos estruturais de RNAs no cerne do ribossomo. Os ciclos de associação dos fatores de extensão, hidrólise de GTP e dissociação asseguram que as mudanças conformacionais ocorram em um sentido "para a frente" e, dessa forma, a tradução pode proceder eficientemente (**Figura 6-67**).

Como mostrado anteriormente, o EF-Tu liga-se simultaneamente ao GTP e ao aminoacil-tRNA (ver Figura 3-74). Além de auxiliar a manter a tradução no sentido correto, o EF-Tu (e o EF1 em eucariotos) aumenta a exatidão da tradução por meio de diferentes mecanismos. Primeiro, como ele escolta o novo aminoacil-tRNA até o ribossomo, o EF-Tu controla se o aminoácido-tRNA a ser encaixado é o correto. O mecanismo exato por meio do qual ele desempenha essa função ainda não foi estabelecido. Uma proposta é que o encaixe do aminoácido-tRNA correto apresente uma afinidade fina pelo EF-Tu, o que permitiria ao EF-Tu a sua discriminação, mesmo que de uma forma relativamente grosseira, entre as várias combinações diferentes aminoácido-tRNA e a entrada seletiva das moléculas corretas no ribossomo. Segundo, o EF-Tu monitora a interação inicial entre o anticódon de um aminoacil-tRNA que chega e o códon do mRNA no sítio A. Os aminoacil-tRNAs são "flexionados" quando ligados à forma GTP do EF-Tu; essa conformação flexionada permite o pareamento com o códon, mas impede que o aminoácido seja incorporado na cadeia polipeptídica em crescimento. No entanto, se o par códon-anticódon está correto, o ribossomo rapidamente induz a hidrólise da molécula de GTP, fazendo com que o EF-Tu perca seu contato com o tRNA e dissocie-se do ribossomo, permitindo que o tRNA forneça seu aminoácido para a síntese proteica. No entanto, como a "correção" do pareamento entre códon e anticódon é verificada? Essa tarefa é desempenhada pelo próprio ribossomo, por um mecanismo com base em RNA. O rRNA da subunidade pequena do ribossomo forma uma série de ligações de hidrogênio com os pares códon-anticódon que permitem a determinação de sua correção (**Figura 6-68**). De forma geral, o rRNA se dobra em torno do par códon-anticódon e sua aproximação final – que ocorre apenas quando um anticódon correto está posicionado ali – induz a hidrólise de GTP. Incrivelmente, esse sistema de encaixe induzido pode distinguir interações corretas entre códons-anticódons de interações incorretas apesar da existência dos pareamentos oscilantes apresentados na Figura 6-53. A partir desse exemplo, e também do *splicing* do RNA, podemos perceber um pouco a respeito dos mecanismos altamente sofisticados de reconhecimento molecular que podem ser atingidos pelo RNA.

As interações de EF-Tu, tRNA e ribossomo que acabamos de descrever introduzem os passos essenciais de controle da síntese proteica que ocorrem na etapa inicial de seleção do tRNA. No entanto, após a hidrólise do GTP e dissociação do EF-Tu do ribossomo, existe uma oportunidade adicional para que o ribossomo evite a adição de um aminoácido incorreto na cadeia em formação. Após a hidrólise do GTP, existe um pequeno intervalo de tempo durante o qual o aminoácido carregado pelo tRNA é movido para sua posição no ribossomo. Esse intervalo de tempo é menor para pareamentos códon-anticódon corretos quando comparado a pareamentos incorretos. Além disso, tRNAs incorretamente pareados dissociam-se

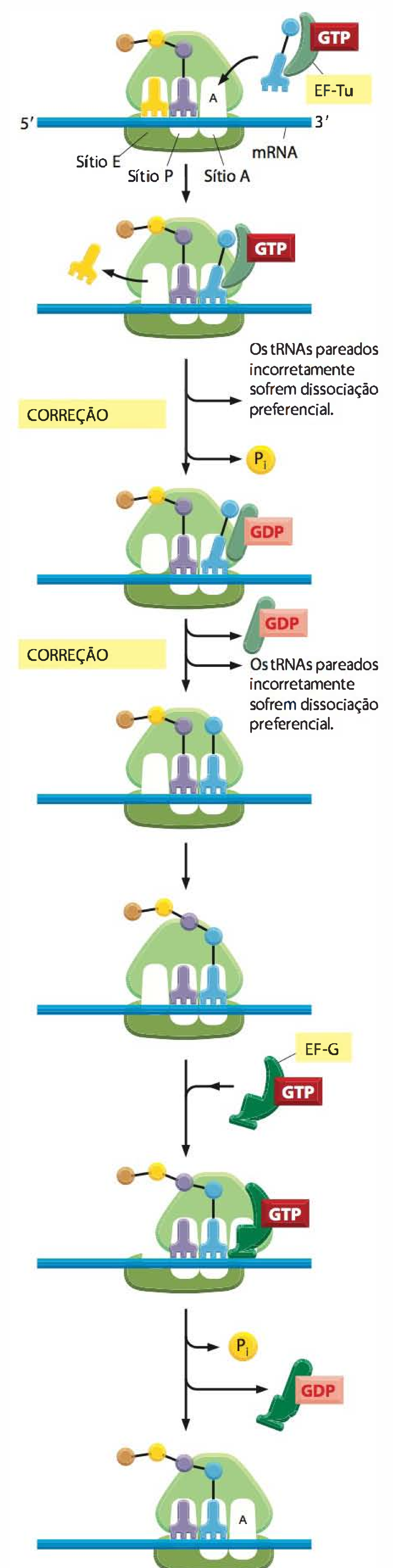


Figura 6-67 Vista detalhada do ciclo de tradução. O resumo da tradução apresentado na Figura 6-66 foi expandido para mostrar a atuação dos dois fatores de extensão EF-Tu e EF-G, os quais direcionam a tradução no sentido correto. Como explicado no texto, EF-Tu também fornece duas oportunidades para a correção do pareamento códon-anticódon. Dessa forma, tRNAs pareados incorretamente são seletivamente rejeitados, e a exatidão da tradução é aumentada.

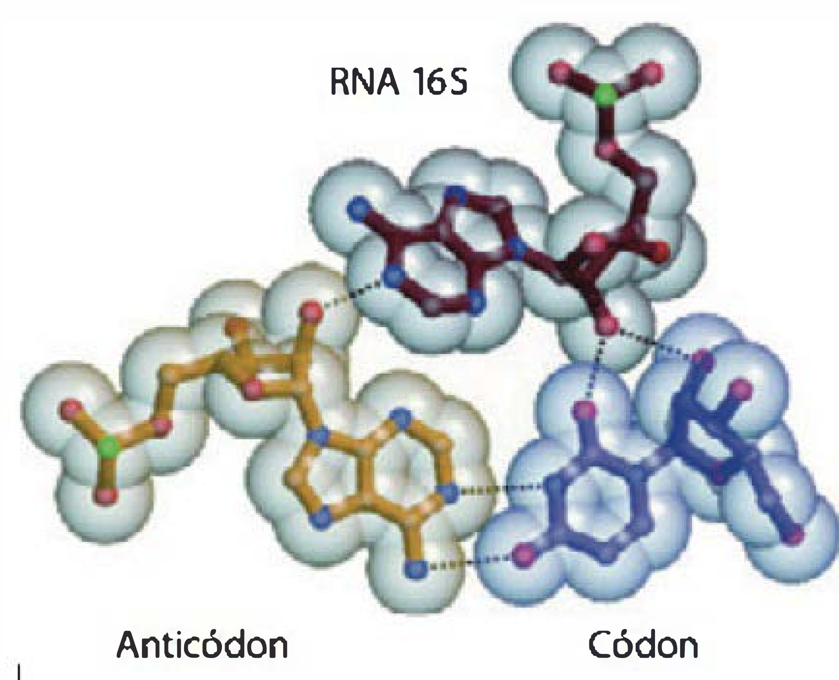


Figura 6-68 Reconhecimento do pareamento códon-anticódon correto pela subunidade rRNA pequena do ribossomo. Está ilustrada a interação entre um nucleotídeo da subunidade rRNA pequena e o primeiro par de nucleotídeos de um códon-anticódon pareado corretamente; interações similares ocorrem entre outros nucleotídeos do rRNA e a segunda e a terceira posição do par códon-anticódon. A subunidade rRNA pequena pode formar esta rede de ligações de hidrogênio apenas em pares códon-anticódon pareados corretamente. Como explicado no texto, esse monitoramento códon-anticódon pela subunidade rRNA pequena aumenta a exatidão da síntese proteica. (De J. M. Ogle et al., *Science* 292:897-902, 2001. Com permissão de AAAS.)

mais rapidamente do que tRNAs corretamente pareados, pois suas interações com os códons são mais fracas. Assim, a maior parte das moléculas de tRNA ligadas incorretamente (e também um número significativo de moléculas ligadas corretamente) deixará o ribossomo sem que tenha sido utilizada na síntese de proteínas. Em conjunto, essas etapas de controle são responsáveis pelos 99,99% de exatidão da tradução do RNA em proteínas no ribossomo.

O ribossomo é uma ribozima

O ribossomo é um grande complexo composto de dois terços de RNA e de um terço de proteína. A determinação, no ano 2000, da estrutura tridimensional inteira de suas subunidades grande e pequena é um dos principais triunfos da biologia estrutural moderna. A estrutura confirma evidências anteriores de que os rRNAs – e não as proteínas – são os responsáveis pela estrutura geral do ribossomo, por sua capacidade de posicionar tRNAs sobre o mRNA e por sua atividade catalítica na formação de ligações peptídicas covalentes. Os rRNAs são dobrados em estruturas tridimensionais precisas altamente densas que formam o cerne compacto do ribossomo e determinam sua forma geral (**Figura 6-69**).

Contrastando com o posicionamento central dos rRNAs, as proteínas ribossomais geralmente estão localizadas na superfície e preenchem frestas e enrugamentos da estrutura dobrada do RNA (**Figura 6-70**). Algumas dessas proteínas estendem projeções de cadeia polipeptídica, as quais penetram, mesmo que superficialmente, em buracos da estrutura do cerne de RNA (**Figura 6-71**). A função principal das proteínas ribossomais parece ser a de estabilizar o cerne de RNA, ao mesmo tempo permitindo as mudanças na conformação no rRNA necessárias para que ele catalise uma síntese proteica eficiente. É provável que as proteínas também auxiliem a montagem inicial dos rRNAs que constituirão o cerne do ribossomo.

Não somente os sítios de ligação A, P e E do ribossomo são formados principalmente por rRNAs, como o sítio catalítico para a formação da ligação peptídica é formado por RNA, estando o aminoácido mais próximo a mais de 1,8 nm de distância. Essa descoberta trouxe muita surpresa aos biólogos, pois, diferentemente das proteínas, o RNA não contém gru-

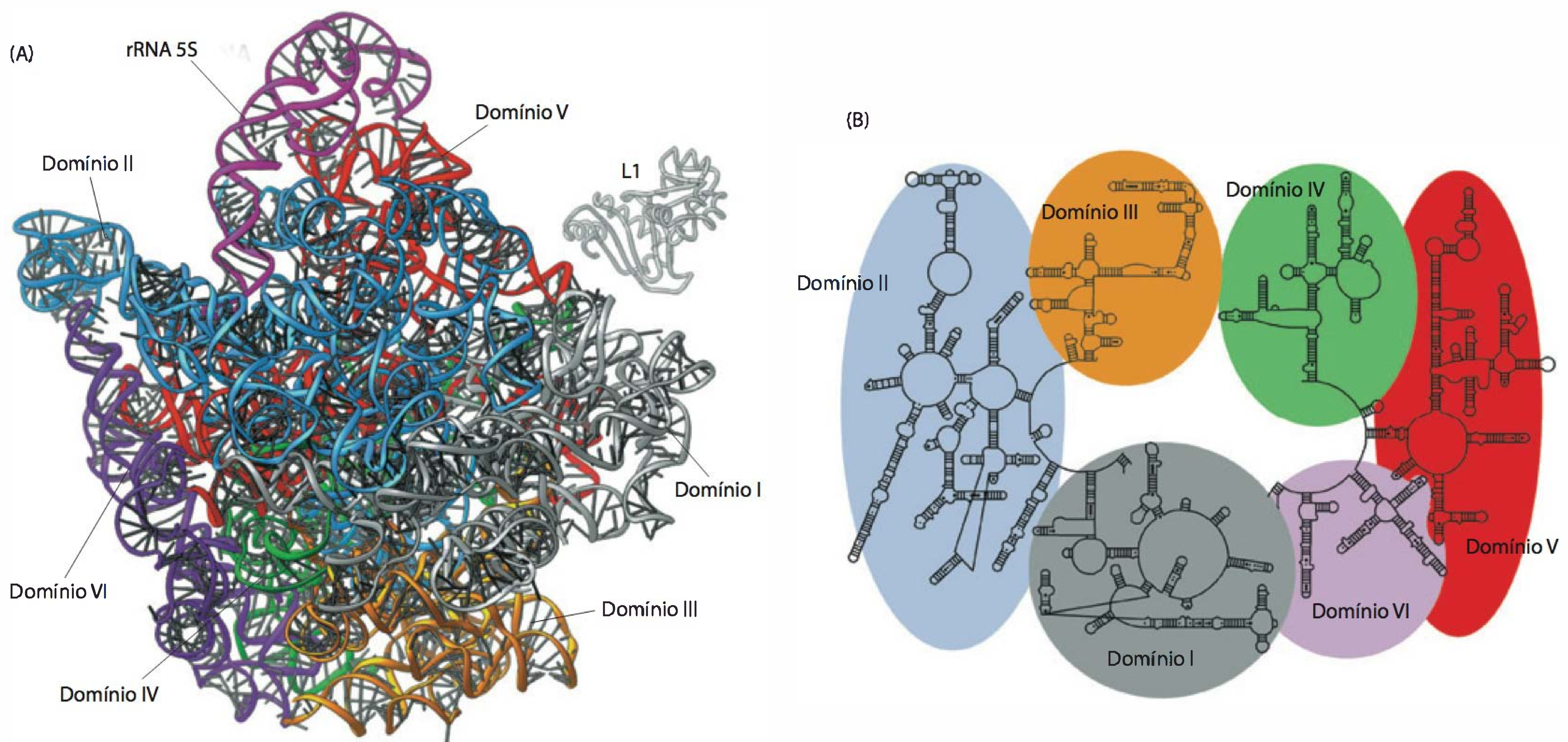


Figura 6-69 Estrutura dos rRNAs na subunidade grande de um ribossomo bacteriano, como determinado por cristalografia por raios X. (A) As estruturas tridimensionais da subunidade grande dos rRNAs (5S e 23S), conforme ocorrem no ribossomo. Uma das subunidades proteicas do ribossomo (L1) também é mostrada como um ponto de referência, visto que forma uma projeção característica no ribossomo. (B) Diagrama esquemático da estrutura secundária do rRNA 23S, mostrando a extensiva rede de pareamento de bases. A estrutura foi dividida em seis "domínios" estruturais cujas cores correspondem àquelas da estrutura tridimensional em (A). O diagrama da estrutura secundária está bastante esquematizado para representar o máximo possível da estrutura em duas dimensões. Para fazer isso, várias descontinuidades foram introduzidas na cadeia do RNA, embora na realidade o RNA 23S seja uma molécula única de RNA. Por exemplo, a base do Domínio III é contígua à base do Domínio IV, mesmo que no diagrama exista um espaçamento entre elas. (Adaptada de N. Ban et al., *Science* 289:905-920, 2000. Com permissão de AAAS.)

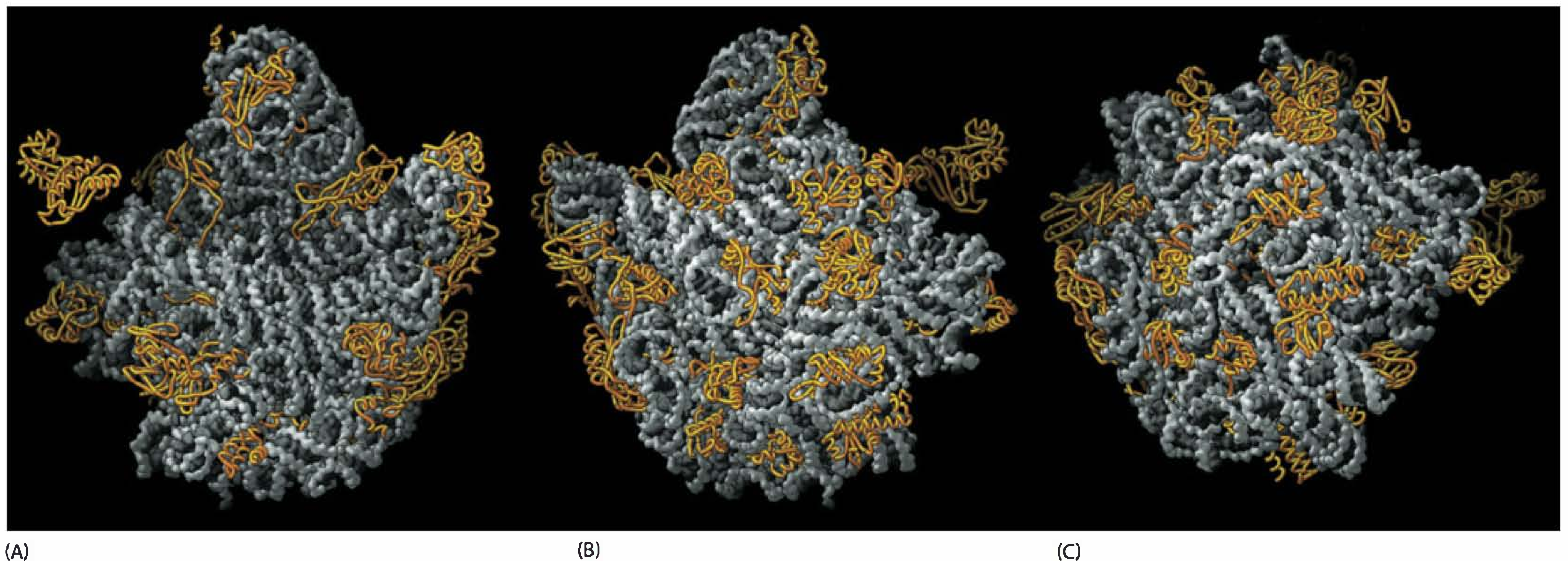


Figura 6-70 Localização dos componentes proteicos da subunidade ribossomal grande bacteriana. Os rRNAs (5S e 23S) estão representados em *cinza*, e as proteínas da subunidade grande (27 do total de 31) em *dourado*. Por conveniência, estão representadas apenas as estruturas proteicas mostradas como ligações polipeptídicas. (A) Interface com a subunidade pequena, a mesma vista apresentada na Figura 6-64B. (B) Vista posterior da subunidade grande obtida pela rotação de (A) 180° sobre seu eixo vertical. (C) Outra pequena rotação de (B) em seu eixo diagonal, permitindo a visualização do canal de saída do peptídeo, no centro da estrutura. (De N. Ban et al., *Science* 289:905-920, 2000. Com permissão de AAAS.)

pos funcionais facilmente ionizáveis que possam ser utilizados em reações sofisticadas de catálise como a formação de uma ligação peptídica. Além disso, íons metálicos, que com frequência são utilizados por moléculas de RNA para catalisar reações químicas (como será posteriormente discutido neste capítulo), não são observados nos sítios ativos do ribossomo. Em contraste, acredita-se que o rRNA 23S forme uma fenda extremamente estruturada que, através de uma rede de ligações de hidrogênio, seja capaz de orientar de forma precisa os dois reagentes (a cadeia peptídica em formação e o aminoacil-tRNA) e dessa forma acelerar bastante sua união covalente. Além disso, o tRNA no sítio P contribui para o sítio ativo, provavelmente fornecendo um grupo OH funcional que participa diretamente na catálise. Esse mecanismo é capaz de assegurar que a catálise ocorra apenas quando o tRNA está adequadamente posicionado no ribossomo.

As moléculas de RNA que possuem atividade catalítica são conhecidas como **ribozimas**. Vimos anteriormente neste capítulo como outras ribozimas atuam nas reações de auto-*splicing* do RNA (p. ex., ver Figura 6-36). Na seção final deste capítulo, consideraremos o que a capacidade das moléculas de RNA de funcionarem como catalisadores em uma ampla gama de reações diferentes pode ter significado para a evolução inicial das células vivas. Aqui vamos apenas salientar que existem boas razões para suspeitar que moléculas de RNA, em vez de proteínas, tenham servido como os primeiros catalisadores em células vivas. Se assim for, o ribossomo, com seu cerne de RNA, pode ser considerado uma relíquia de um tempo ancestral na história da vida – quando a síntese de proteína evoluiu em células que eram mantidas quase que inteiramente por ribozimas.



Figura 6-71 Estrutura da proteína L15 na subunidade grande do ribossomo bacteriano. O domínio globular da proteína repousa na superfície do ribossomo, e uma extensão penetra profundamente a região central de RNA do ribossomo. A proteína L15 é mostrada em *amarelo*, e uma porção da região central de rRNA está apresentada em *vermelho*. (De D. Klein, P. B. Moore e T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* 340:141-147, 2004. Com permissão de Academic Press.)

As sequências nucleotídicas no mRNA sinalizam onde inicia a síntese proteica

A iniciação e a terminação da tradução compartilham características com o ciclo de extensão da tradução, descrito anteriormente. O sítio em que a síntese de proteína começa no mRNA é especialmente importante, uma vez que ele indica a fase de leitura para todo o comprimento da mensagem. Um erro de um nucleotídeo para mais ou para menos, nesse estágio, fará com que todos os códons subsequentes na mensagem sejam lidos de maneira errada, de tal forma que uma proteína não-funcional, com uma sequência distorcida de aminoácidos, será produzida. A etapa de iniciação também é importante, uma vez que, para a maioria dos genes, é o último ponto no qual a célula pode decidir se o mRNA será traduzido e a proteína será sintetizada; assim, a taxa de iniciação determina a taxa em que a proteína é sintetizada. Veremos, no Capítulo 7, que as células utilizam vários mecanismos para regular a iniciação da tradução.

A tradução de um mRNA inicia com um códon AUG, e um tRNA especial é necessário para iniciar a tradução. Esse **tRNA iniciador** sempre carrega o aminoácido metionina (nas bactérias, uma forma modificada de metionina é utilizada: a formilmetionina), portanto todas as proteínas recém-formadas possuem metionina como seu primeiro aminoácido em suas extremidades N-terminal, a extremidade de uma proteína que é sintetizada primeiro. Após, essa metionina geralmente é removida por uma protease específica. O tRNA iniciador pode ser especialmente reconhecido pelos fatores de iniciação, pois tem uma sequência nucleotídica distinta do tRNA que normalmente carrega a metionina.

Nos eucariotos, o complexo tRNA iniciador-metionina (Met-tRNAi) é inicialmente depositado sobre a subunidade ribossomal pequena, juntamente com proteínas adicionais denominadas **fatores de iniciação eucarióticos**, ou **eIFs** (*eucaryotic initiation factors*) (**Figura 6-72**). De todos os aminoacil-tRNAs na célula, apenas o tRNA iniciador carregado com metionina é capaz de se ligar firmemente à subunidade ribossomal pequena, sem a presença do ribossomo completo, sendo capaz de se ligar diretamente ao sítio P. A seguir, a subunidade ribossomal pequena liga-se à extremidade 5′ de uma molécula de mRNA, a qual é reconhecida em virtude de seu quepe 5′ e de seus dois fatores de iniciação ligados, o eIF4E (o qual se liga diretamente ao quepe) e o eIF4G (ver Figura 6-40). A subunidade ribossomal pequena então se move para a frente (5′ para 3′) sobre o mRNA, fazendo uma varredura e procurando pelo primeiro AUG. Esse movimento é facilitado pelos fatores de iniciação adicionais, que agem como helicases, impulsionados por ATP. Em 90% dos mRNAs, a tradução inicia no primeiro AUG encontrado pela subunidade pequena. Nesse ponto, os fatores de iniciação dissociam-se, permitindo que a subunidade ribossomal grande se associe ao complexo e complete o ribossomo. O tRNA iniciador encontra-se, nesse momento, ligado ao sítio P, deixando o sítio A livre. A síntese de proteína está, portanto, pronta para iniciar (ver Figura 6-72).

Os nucleotídeos que se encontram ao redor do sítio de iniciação dos mRNAs eucarióticos influenciam a eficiência do reconhecimento de AUG durante o processo de varredura descrito anteriormente. Se esse sítio de reconhecimento é muito diferente da sequência de reconhecimento consenso (5′-ACCAUGG-3′), as subunidades ribossomais de varredura irão, algumas vezes, ignorar o primeiro códon AUG no mRNA e saltarão para o segundo ou o terceiro códon AUG. As células frequentemente utilizam esse fenômeno, conhecido como "escape de verificação", para produzir duas ou mais proteínas que se diferenciam em suas extremidades N-terminais a partir de uma única molécula de mRNA. Isso permite que alguns genes produzam a mesma proteína com e sem uma sequência-sinal ligada ao seu N-terminal, por exemplo, de tal modo que a proteína é direcionada para dois compartimentos diferentes na célula.

O mecanismo para selecionar o códon de iniciação nas bactérias é diferente. Os mRNAs das bactérias não possuem quepe 5′ para indicar ao ribossomo onde iniciar a procura pelo início da tradução. Em vez disso, cada mRNA bacteriano contém um sítio de ligação ao ribossomo específico (denominado sequência Shine-Dalgarno, em homenagem a seus descobridores), o qual está localizado uns poucos nucleotídeos acima do AUG em que a tradução deve iniciar. Essa sequência nucleotídica, com o consenso 5′-AGGAGGU-3′, forma pares de bases com o rRNA 16S da subunidade ribossomal pequena para posicionar o códon de iniciação AUG no ribossomo. Um grupo de fatores de iniciação da tradução orquestra essa interação e a subsequente montagem da subunidade ribossomal grande para completar o ribossomo.

Diferentemente de um ribossomo eucariótico, um ribossomo bacteriano pode, assim, facilmente ligar-se de modo direto a um códon de iniciação que esteja no interior de uma molécula de mRNA, desde que um sítio de ligação ribossomal o preceda por diversos nucleotídeos. Como resultado, os mRNAs bacterianos com frequência são *policistrônicos* – ou seja, codificam várias proteínas diferentes, todas traduzidas a partir da mesma molécula de mRNA (**Figura 6-73**). Em contraste, um mRNA eucariótico geralmente codifica uma única proteína.

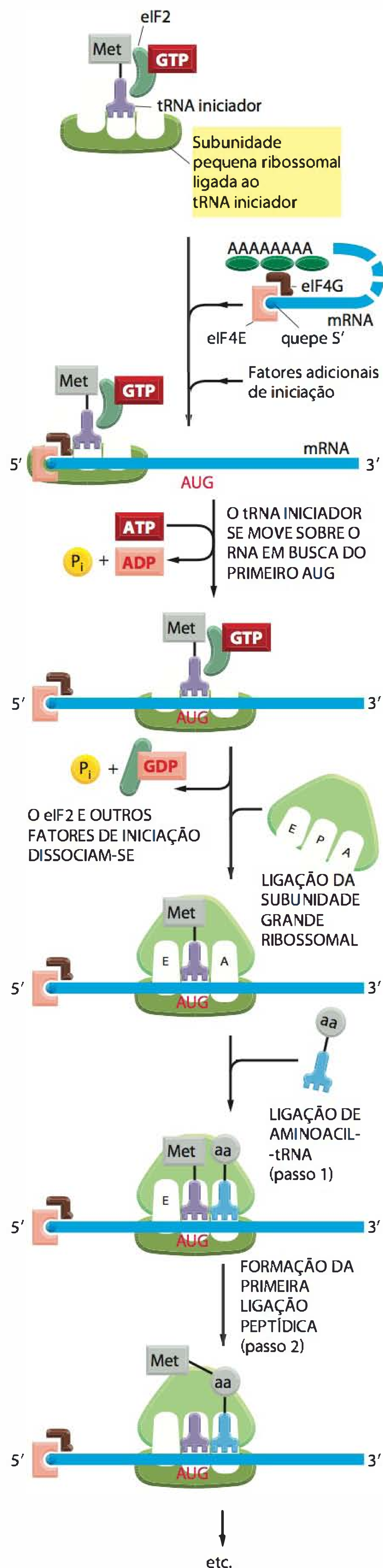


Figura 6-72 Iniciação da síntese de proteínas em eucariotos. Somente três dos muitos fatores de iniciação de tradução necessários para esse processo estão ilustrados. Uma iniciação de tradução eficiente necessita também que a cauda poli-A do mRNA esteja ligada a proteínas de ligação à poli-A, as quais, por sua vez, interagem com o eIF4G. Dessa maneira, o aparato de tradução se certifica de que ambas as extremidades do mRNA estão intactas antes da iniciação da síntese proteica (ver Figura 6-40). Embora somente um evento de hidrólise de GTP esteja mostrado na figura, sabe-se que um segundo evento ocorre exatamente antes da junção das subunidades ribossomais grande e pequena.

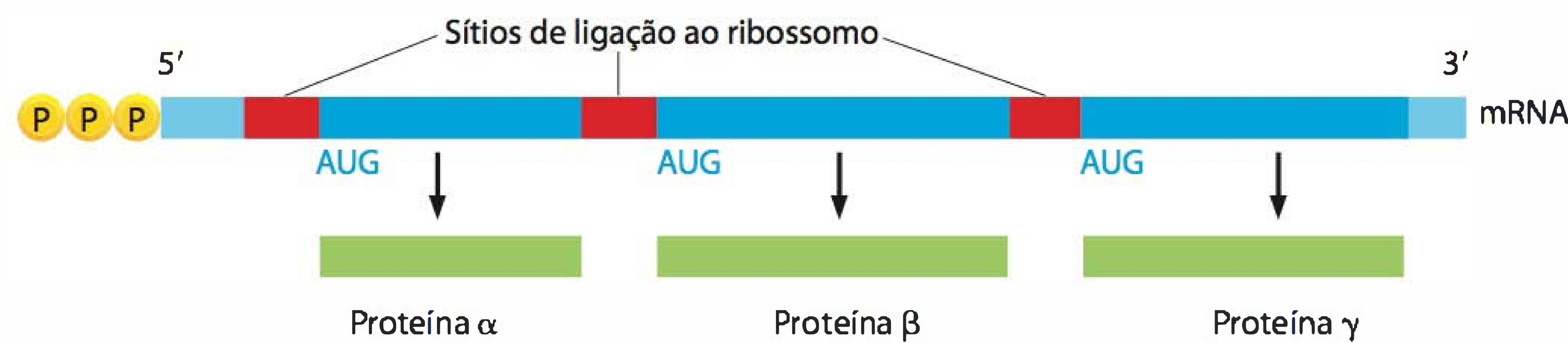


Figura 6-73 Estrutura de uma molécula típica de mRNA bacteriano. Diferentemente dos ribossomos eucarióticos, os quais necessitam de um quepe na extremidade 5′, os ribossomos procarióticos iniciam a transcrição nos sítios de ligação ao ribossomo (sequências Shine-Dalgarno), os quais podem estar localizados em qualquer ponto ao longo de uma molécula de mRNA. Essa propriedade dos ribossomos permite que as bactérias sintetizem mais de um tipo de proteína a partir de uma única molécula de mRNA.

Os códons de terminação marcam o final da tradução

O final da mensagem codificadora de uma proteína é sinalizado pela presença de um de três *códons de terminação* (UAA, UAG ou UGA) (ver Figura 6-50). Eles não são reconhecidos por um tRNA e não determinam um aminoácido; em vez disso, sinalizam para o ribossomo o final da tradução. As proteínas conhecidas como *fatores de liberação* ligam-se a qualquer ribossomo que possua um códon de terminação posicionado no sítio A, e esta ligação força a peptidil-transferase no ribossomo a catalisar a adição de uma molécula de água em vez de um aminoácido no peptidil-tRNA (**Figura 6-74**). Essa reação libera a extremidade carboxila da cadeia polipeptídica em crescimento de sua conexão a uma molécula de tRNA. Tendo em vista que apenas essa conexão normalmente mantém unido o polipeptídeo em crescimento ao ribossomo, a cadeia de proteína finalizada é imediatamente liberada no citoplasma. O ribossomo, então, libera o mRNA e separa-se nas duas subunidades grande e pequena, as quais podem associar-se sobre essa mesma ou outra molécula de mRNA para iniciar um novo ciclo de síntese de proteínas.

Os fatores de liberação fornecem um exemplo de *mimetismo molecular*, em que um tipo de macromolécula assemelha-se em forma a uma molécula quimicamente não-relacionada. Nesse caso, a estrutura tridimensional dos fatores de liberação (compostos inteiramente de proteína) assemelha-se à forma e à distribuição da carga de uma molécula de tRNA (**Figura 6-75**). Esse mimetismo de forma e de carga permite que um fator de liberação entre no sítio A de um ribossomo e provoque o término da tradução.

Durante a tradução, o polipeptídeo em formação se move através de um grande túnel preenchido com água (aproximadamente 10 nm × 1,5 nm) na subunidade grande do ribossomo (ver Figura 6-70C). As paredes desse túnel, compostas principalmente de rRNA 23S, são um mosaico de minúsculas superfícies hidrofóbicas embebidas em uma superfície hidrofílica mais extensiva. Essa estrutura, por não ser complementar a qualquer estrutura peptídica, fornece uma camada em "teflon" pela qual uma cadeia polipeptídica pode deslizar facilmente. As dimensões desse túnel sugerem que as proteínas em formação estão amplamente desestruturadas enquanto atravessam o ribossomo, apesar de algumas regiões hélice-α de proteína poderem se formar antes da saída do túnel ribossômico. Conforme sai do ribossomo, uma proteína recém-sintetizada deve dobrar-se na estrutura tridimensional adequada para ser útil à célula; ainda neste capítulo discutiremos como ocorre esse dobramento. Antes, no entanto, descreveremos diversos aspectos adicionais do processo de tradução *per se*.

As proteínas são produzidas nos polirribossomos

A síntese da maioria das moléculas de proteína leva entre 20 segundos e alguns minutos. Porém, mesmo durante esse período bastante curto, é comum ocorrerem iniciações múltiplas sobre cada molécula de mRNA que está sendo traduzida. Assim que o ribossomo precedente tenha traduzido o suficiente da sequência nucleotídica para mover-se, a extremidade 5′ da molécula de mRNA é capturada por um novo ribossomo. As moléculas de mRNA que estão sendo traduzidas são, consequentemente, de modo geral encontradas sob a forma de *polirribossomos*

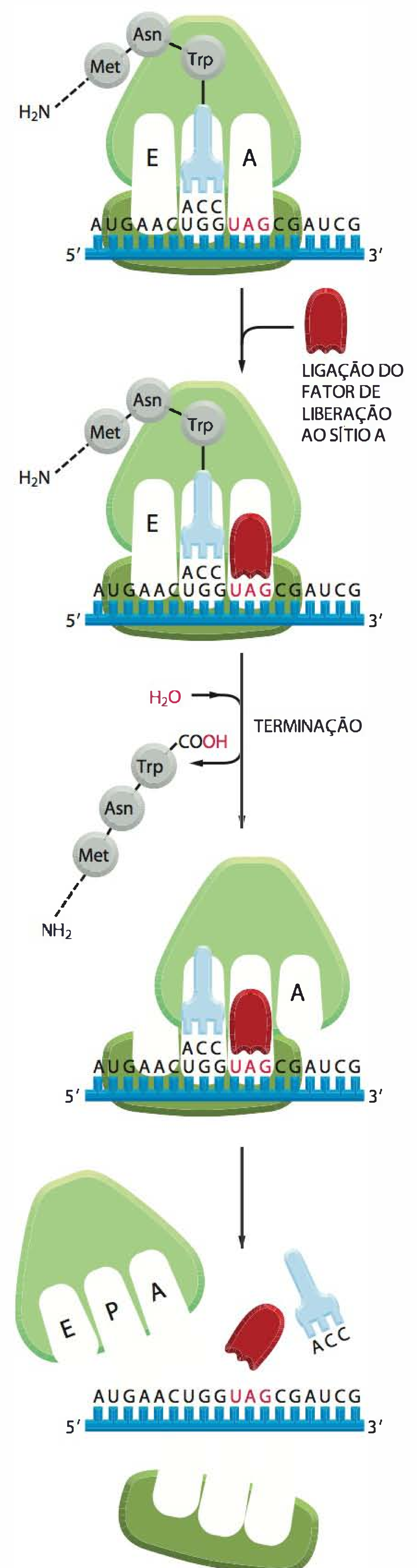


Figura 6-74 Fase final da síntese de proteínas. A ligação de um fator de liberação a um sítio A sobre um códon de terminação finaliza a tradução. O polipeptídeo completo é liberado e, após uma série de reações que necessitam de proteínas adicionais e hidrólise de GTP (não-apresentado), o ribossomo se dissocia em suas duas subunidades.



Figura 6-75 Estrutura de um fator de liberação de tradução humano (eRF1) e sua semelhança a uma molécula de tRNA. A proteína está à *esquerda*, e o tRNA, à *direita*. (De H. Song et al., *Cell* 100:311-321, 2000. Com permissão de Elsevier.)

(também conhecidos como *polissomos*), grandes arranjos citoplasmáticos compostos de vários ribossomos separados por cerca de 80 nucleotídeos sobre uma única molécula de mRNA (**Figura 6-76**). Essas iniciações múltiplas permitem que a célula produza muito mais moléculas de proteína em um espaço de tempo determinado do que seria possível se cada ribossomo tivesse que completar o processo antes que o próximo ribossomo o iniciasse.

Tanto as bactérias quanto os eucariotos utilizam polissomos, e ambos empregam estratégias adicionais para acelerar ainda mais a taxa de síntese proteica. Tendo em vista que o mRNA bacteriano não necessita de processamento e que ele está acessível aos ribossomos ao mesmo tempo em que está sendo produzido, os ribossomos podem ligar-se à extremidade livre de uma molécula de mRNA bacteriano e iniciar sua tradução, mesmo antes que a transcrição deste RNA esteja finalizada, seguindo bastante próximos da RNA-polimerase, à medida que ela se move sobre o DNA. Em eucariotos, como vimos, as extremidades 5′ e 3′ do mRNA interagem (ver Figuras 6-40 e 6-76A); portanto, assim que um ribossomo se dissocia, suas duas subunidades estão em uma posição ótima para reiniciar a tradução sobre a mesma molécula de mRNA.

Existem pequenas variações no código genético padrão

Como discutimos no Capítulo 1, o código genético (apresentado na Figura 6-50) aplica-se a todos os três principais ramos da vida, proporcionando uma evidência importante quanto à

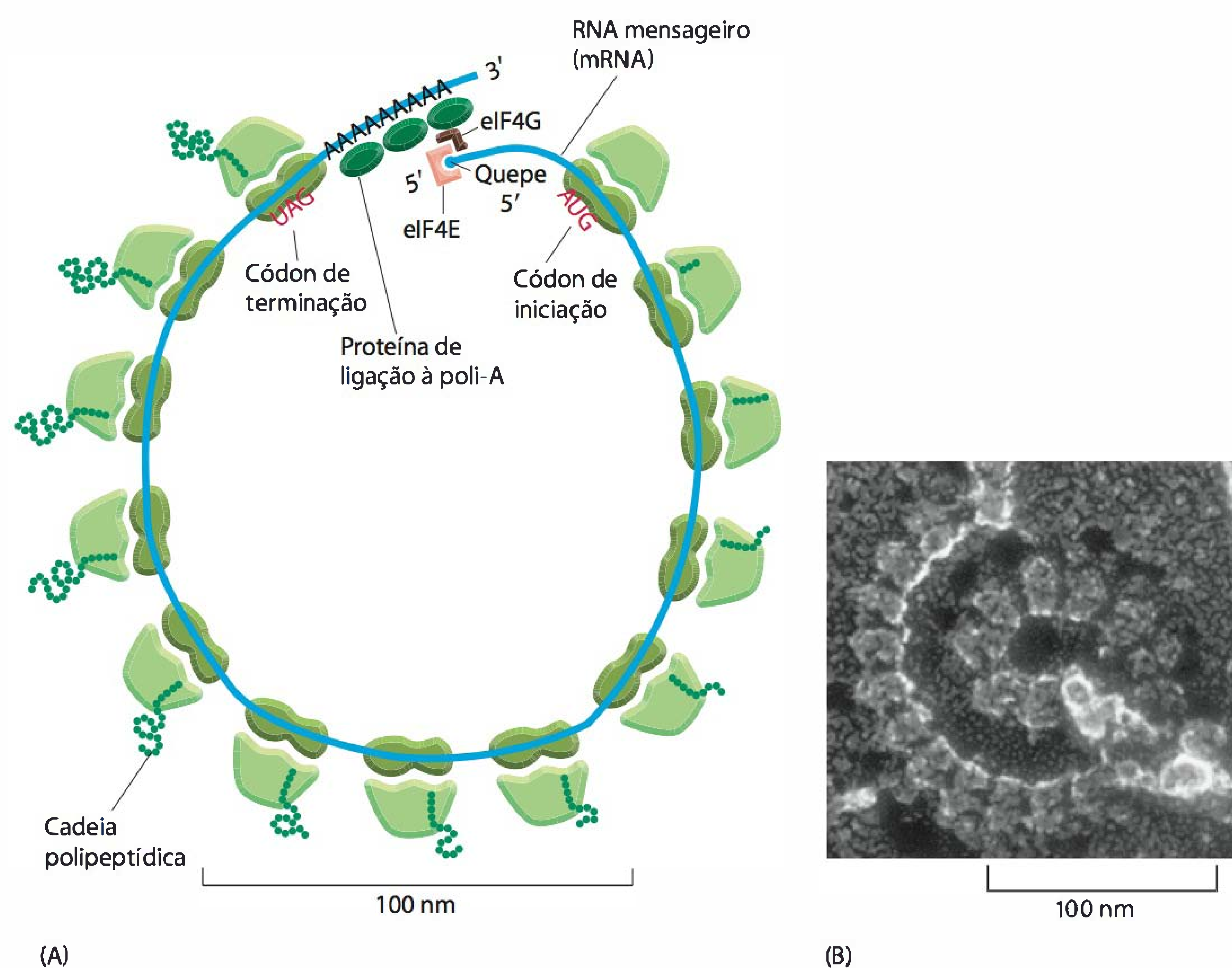


Figura 6-76 Um polirribossomo. (A) Desenho esquemático mostrando como uma série de ribossomos pode traduzir simultaneamente a mesma molécula de mRNA eucariótico. (B) Microfotografia eletrônica de um polirribossomo de uma célula eucariótica. (B, cortesia de John Heuser.)

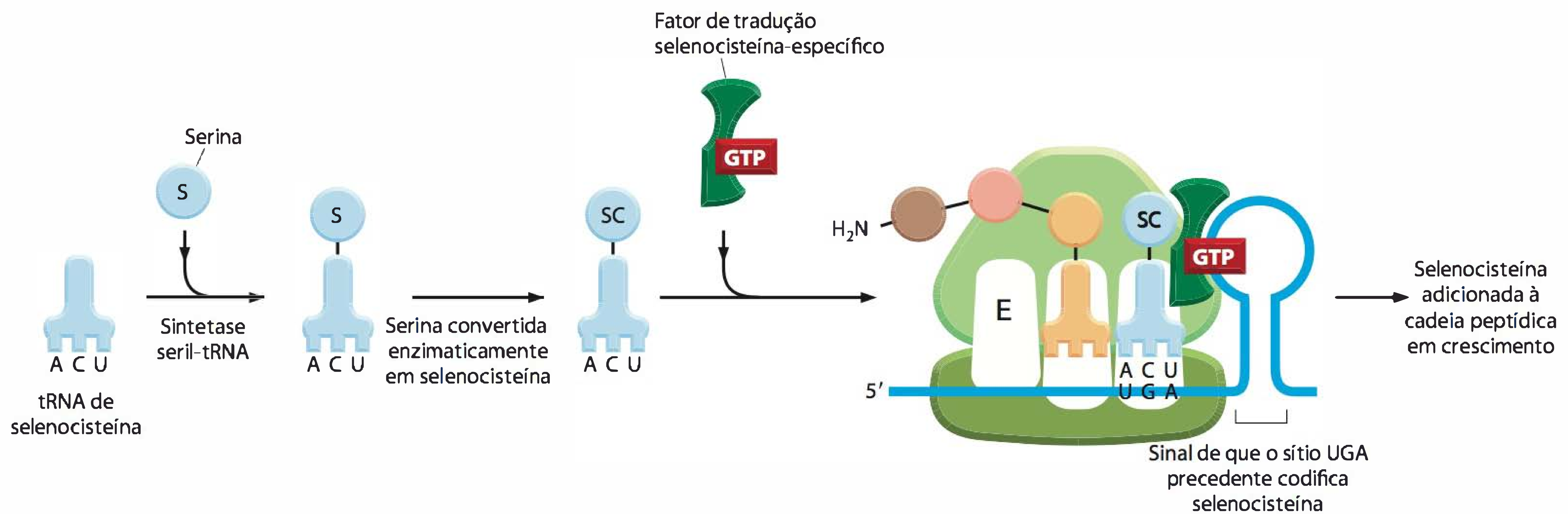


Figura 6-77 Incorporação de selenocisteína em uma cadeia polipeptídica em crescimento. Um tRNA especializado é carregado com serina pela seril-tRNA-sintetase normal, e a serina é então enzimaticamente convertida em selenocisteína. Uma estrutura específica de RNA no mRNA (estrutura de um braço em alça com uma sequência nucleotídica específica) sinaliza que a selenocisteína deve ser inserida no códon UGA adjacente. Como indicado, esse evento requer a participação de um fator de tradução específico para a selenocisteína.

ancestralidade comum de todos os seres vivos na Terra. Embora sejam raras, existem exceções a esse código. Por exemplo, *Candida albicans*, o fungo patogênico mais frequente em humanos, traduz o código CUG como serina, enquanto que praticamente todos os outros organismos o traduzem como leucina. As mitocôndrias (que possuem seu próprio genoma e codificam a maior parte de seu aparato de tradução) também apresentam várias diferenças quando comparadas ao código-padrão. Por exemplo, em mitocôndrias de mamíferos, AUA é traduzido como metionina, enquanto que no citosol da célula é traduzido como isoleucina (ver Tabela 14-3, p. 862). Esse tipo de diferença no código genético é "fixado no programa" dos organismos ou das organelas em que ocorre.

Um tipo diferente de variação, às vezes denominada *recodificação de tradução*, ocorre em muitas células. Nesse caso, outras informações nas sequências nucleotídicas presentes em um mRNA podem modificar o significado do código genético em uma região determinada de uma molécula de mRNA. O código-padrão permite que as células produzam proteínas usando apenas 20 aminoácidos. Entretanto, as bactérias, as arquebactérias e os eucariotos têm um vigésimo primeiro aminoácido disponível para ser usado, o qual pode ser incorporado diretamente em uma cadeia polipeptídica em formação, por meio de recodificação de tradução. A selenocisteína, essencial para o funcionamento eficiente de diversas enzimas, contém um átomo de selênio no lugar do átomo de enxofre da cisteína. A selenocisteína é produzida enzimaticamente a partir de uma serina ligada a uma molécula de tRNA especial que forma pares de bases com o códon UGA, um códon normalmente utilizado para sinalizar o final da tradução. Os mRNAs para proteínas nos quais a selenocisteína deve ser inserida no códon UGA carregam uma sequência nucleotídica adicional no mRNA adjacente que provoca esse evento de recodificação (**Figura 6-77**).

Outra forma de recodificação, a *mudança da fase de leitura de tradução*, permite que mais de uma proteína seja sintetizada a partir de um único mRNA. Os retrovírus, membros de um grupo de patógenos que infectam eucariotos, normalmente usam a mudança da fase de leitura de tradução para produzir tanto proteínas do capsídeo (*proteínas Gag*) quanto a transcriptase reversa viral e a integrase (*proteínas Pol*) a partir do mesmo transcrito de RNA (ver Figura 5-73). Tais vírus necessitam de muito mais cópias das proteínas Gag do que das proteínas Pol. Este ajuste quantitativo é alcançado codificando os genes *Pol* logo após os genes *Gag*, mas em uma fase de leitura diferente. São feitas pequenas quantidades do produto do gene Pol, pois, quando necessário, uma mudança da fase de leitura de tradução permite que o códon de terminação da proteína Gag seja ignorado. Essa mudança da fase de leitura ocorre em um códon determinado do mRNA e necessita de um *sinal de recodificação* específico, o qual parece ser uma característica estrutural da sequência de RNA posterior a este sítio (**Figura 6-78**).

Inibidores da síntese de proteína procariótica são úteis como antibióticos

Muitos dos mais eficientes antibióticos utilizados na medicina moderna são compostos produzidos por fungos que inibem a síntese de proteína bacteriana. Os fungos e as bacté-

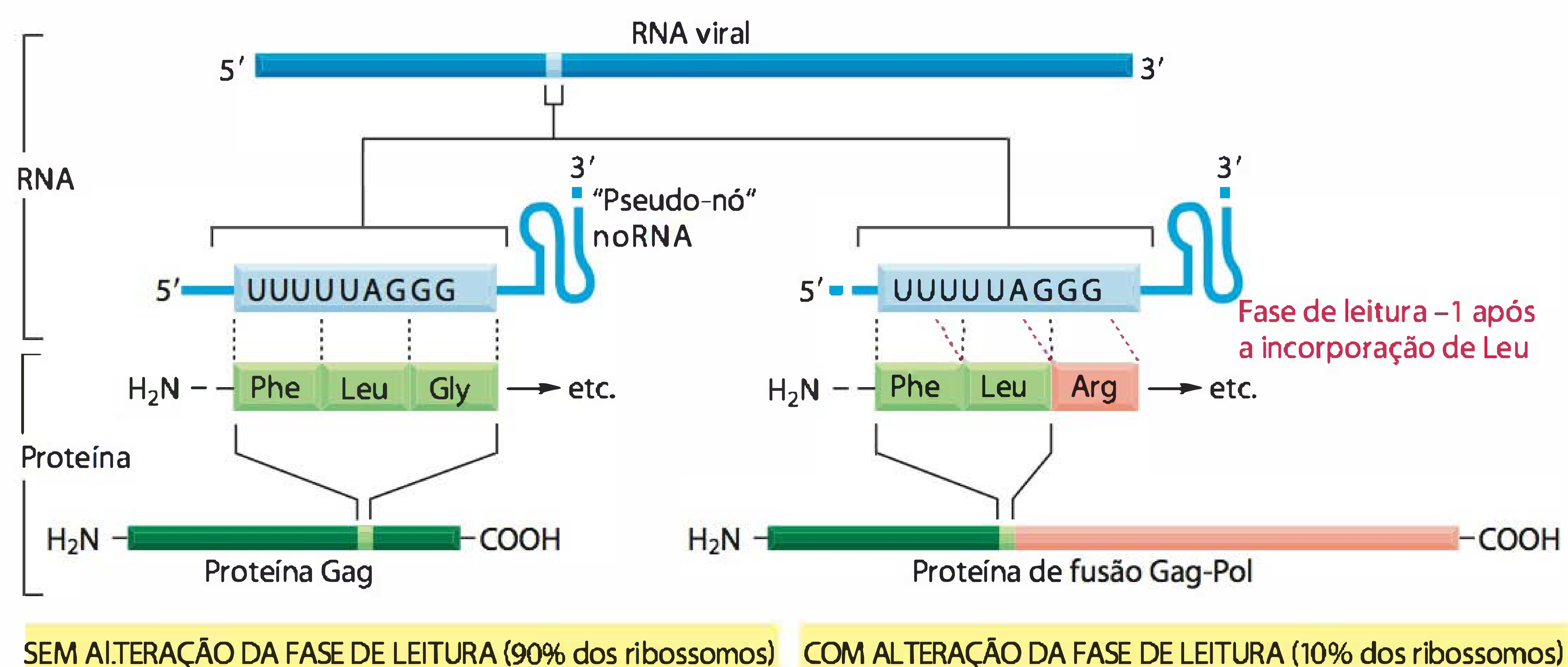


Figura 6-78 A alteração na fase de leitura traducional que produz a transcriptase reversa e a integrase de um retrovírus. A transcriptase reversa e a integrase virais são produzidas por processamento proteolítico de uma grande proteína (a proteína de fusão Gag-Pol), a qual contém as sequências de aminoácidos para Gag e para Pol. As proteínas do capsídeo viral são produzidas por processamento proteolítico da proteína Gag, que é mais abundante. Ambas as proteínas Gag e Gag-Pol de fusão iniciam de forma idêntica sobre o mRNA, no entanto, enquanto a proteína Gag termina em um códon de terminação adiante da sequência ilustrada, a tradução da proteína de fusão Gag-Pol salta este códon de terminação, permitindo a síntese da longa proteína de fusão Gag-Pol. O salto do códon de terminação é possível devido a uma alteração controlada da fase de leitura traducional, como ilustrado. As características na estrutura local de RNA (incluindo a alça de RNA ilustrada) fazem com que o $tRNA^{Leu}$ ligado à extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica em crescimento deslize um nucleotídeo para trás sobre o ribossomo, de tal forma que ele irá parear com o códon UUU, em vez de parear com o códon UUA que, inicialmente, determinava sua incorporação; o próximo códon (AGG) na nova fase de leitura determina uma arginina, e não uma glicina. Este deslize controlado é devido, em parte, à estrutura de haste em alça (um *pseudo-nó*) que se forma no mRNA viral (ver Figura 6-102). A sequência apresentada corresponde ao HIV, vírus causador da AIDS em humanos. (Adaptada de T. Jacks et al., *Nature* 331:280-283, 1988. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

rias competem por vários nichos ambientais semelhantes, e milhões de anos de coevolução resultaram nos potentes inibidores bacterianos desenvolvidos pelos fungos. Alguns desses fármacos exploram as diferenças estruturais e funcionais entre os ribossomos bacterianos e eucarióticos de forma a interferir preferencialmente com o funcionamento dos ribossomos bacterianos. Consequentemente, alguns desses compostos podem ser ingeridos em altas doses por seres humanos sem que ocorra uma toxidade indesejada. Diversos antibióticos se alojam nas fendas dos rRNAs e simplesmente interferem na operação de deslizamento do ribossomo (**Figura 6-79**). A **Tabela 6-4** lista alguns dos antibióticos mais comuns desse tipo, junto a vários outros inibidores da síntese proteica, alguns dos quais atuam em células eucarióticas e, portanto, não podem ser utilizados como antibióticos.

Tendo em vista que bloqueiam etapas específicas nos processos que levam do DNA à proteína, muitos dos compostos listados na Tabela 6-4 são utilizados para estudos de biologia celular. Entre os fármacos mais comumente utilizados em tais investigações estão o *cloranfenicol*, a *cicloexamida* e a *puromicina*, todos inibindo especificamente a síntese proteica. Em uma célula eucariótica, por exemplo, o cloranfenicol inibe a síntese de proteína nos ribossomos somente na mitocôndria (e nas plantas, nos cloroplastos), provavelmente refletindo as origens procarióticas dessas organelas (discutido no Capítulo 14). A cicloexamida, ao contrário, afeta somente ribossomos no citosol. A puromicina apresenta um detalhe interessante, pois é estruturalmente análoga a uma molécula de tRNA ligada a um aminoácido, sendo, consequentemente, outro exemplo de mimetismo molecular; o ribossomo reconhece erroneamente esse composto como se fosse um aminoácido autêntico e incorpora-o covalentemente na extremidade C-terminal de uma cadeia peptídica em crescimento, provocando, dessa forma, terminação prematura e liberação do polipeptídeo. Como seria de esperar, a puromicina inibe a síntese proteica tanto em procariotos, quanto em eucariotos.

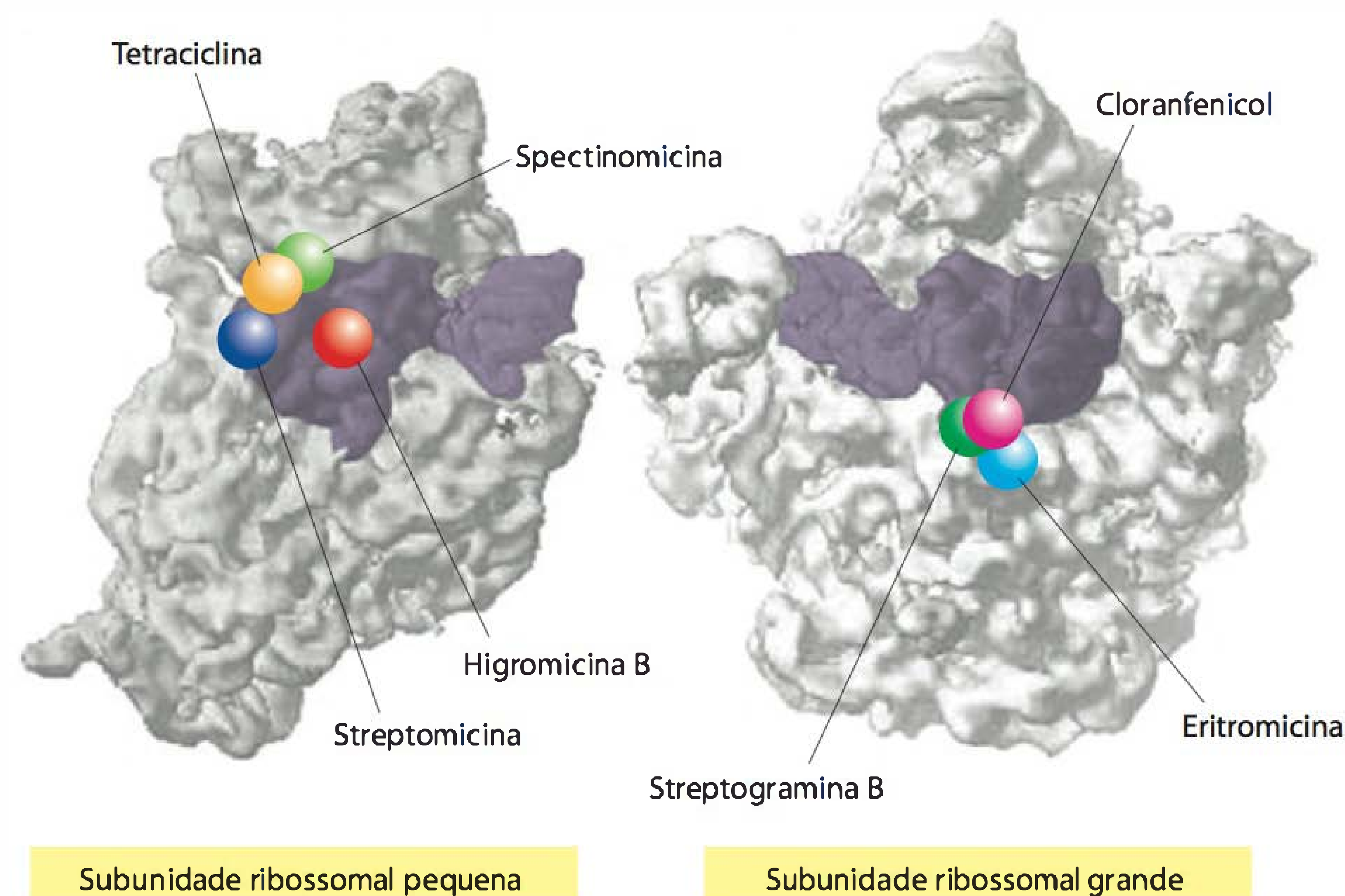


Figura 6-79 Sítios de ligação para antibióticos em ribossomos bacterianos. As subunidades pequena (à *esquerda*) e grande (à *direita*) do ribossomo estão organizadas como se o ribossomo estivesse aberto feito um livro; as moléculas de tRNA ligadas estão ilustradas em *roxo* (ver Figura 6-64). A maioria dos antibióticos mostrados liga-se diretamente a fendas formadas por moléculas do rRNA. A higromicina B induz erros de tradução, a spectinomicina bloqueia a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P, e a streptogramina B evita a extensão de peptídeos nascentes. A Tabela 6-4 lista os mecanismos de inibição dos outros antibióticos mostrados na figura. (Adaptada de J. Poehlsgaard e S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* 3:870-881, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Tabela 6-4 Inibidores de síntese proteica ou de RNA

Inibidor	Efeito específico
Com ação somente em bactérias	
Tetraciclina	Bloqueia a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo.
Streptomicina	Evita a transição da iniciação da tradução para a extensão de cadeia, podendo também causar erros de decodificação.
Cloranfenicol	Bloqueia a reação da peptidil-transferase nos ribossomos (etapa 2 na Figura 6-66).
Eritromicina	Liga-se no canal de saída do ribossomo e, dessa forma, inibe a extensão da cadeia peptídica.
Rifamicina	Bloqueia a iniciação das cadeias de RNA por meio da ligação à RNA-polimerase (evita a síntese de RNA).
Com ação em bactérias e em eucariotos	
Puromicina	Causa a liberação prematura das cadeias polipeptídicas em formação por meio de sua adição à extremidade da cadeia em crescimento.
Actinomicina D	Liga-se ao DNA e bloqueia o movimento da RNA-polimerase (evita a síntese de RNA).
Com ação em eucariotos, mas não em bactérias	
Cicloexamida	Bloqueia a reação de translocação nos ribossomos (etapa 2 na Figura 6-66).
Anisomicina	Bloqueia a reação da peptidil-transferase nos ribossomos (etapa 2 na Figura 6-66).
α-Amanitina	Bloqueia a síntese de mRNA por meio de sua ligação preferencial à RNA-polimerase II.

Os ribossomos de mitocôndrias (e de cloroplastos) de eucariotos com frequência assemelham-se aos ribossomos de bactérias no que concerne à sua sensibilidade a inibidores. Portanto, alguns desses antibióticos podem ter um efeito deletério sobre as mitocôndrias de humanos.

A exatidão na tradução requer gasto de energia livre

A tradução pelo ribossomo deve chegar a um balanço entre os limites que opõem exatidão e velocidade. Vimos, por exemplo, que a exatidão da tradução (1 erro a cada 10^4 aminoácidos sintetizados) requer um intervalo de tempo cada vez que um novo aminoácido é adicionado à cadeia polipeptídica em crescimento, produzindo uma velocidade geral de tradução de 20 aminoácidos incorporados por segundo em bactérias. Os mutantes bacterianos com uma alteração específica em suas subunidades ribossomais pequenas apresentam intervalos maiores e traduzem o mRNA em proteína com uma exatidão consideravelmente mais alta do que esta; entretanto, a síntese de proteína é tão lenta nesses mutantes que as bactérias sobrevivem com dificuldade.

Vimos também que, para atingir a exatidão observada da síntese de proteínas, é necessário um gasto de grande quantidade de energia livre; isto é esperado, visto que, como discutido no Capítulo 2, um preço deve ser pago para qualquer incremento da organização de uma célula. Na maioria das células, a síntese de proteína consome mais energia do que qualquer outro processo de biossíntese. Pelo menos quatro ligações fosfato altamente energéticas são rompidas para produzir cada ligação peptídica nova: duas são consumidas ao se carregar uma molécula de tRNA com um aminoácido (ver Figura 6-56), e outras duas direcionam passos no ciclo de reações que ocorrem no ribossomo, durante a síntese propriamente dita (ver Figura 6-67). Além disso, é consumida energia extra cada vez que uma ligação incorreta de aminoácido é hidrolisada por uma tRNA-sintetase (ver Figura 6-59), e cada vez que um tRNA incorreto entra no ribossomo provoca hidrólise de GTP e é rejeitado (ver Figura 6-67). Para serem eficientes, esses mecanismos de controle também devem remover uma fração considerável de interações corretas; por essa razão, têm um custo energético ainda maior do que pareceria inicialmente.

Mecanismos de controle de qualidade impedem a tradução de mRNAs com danos

Nos eucariotos, a produção de mRNA não envolve somente a transcrição, mas também uma série de etapas elaboradas de processamento de RNA; essas etapas ocorrem no núcleo, segregadas dos ribossomos, e somente quando o processamento está completo os mRNAs são transportados para o citoplasma para serem traduzidos (ver Figura 6-40). No entanto, esse esquema não é à prova de erros e alguns mRNAs processados de forma incorreta são inadvertidamente enviados para o citoplasma. Além disso, uma molécula de mRNA que estava intacta ao deixar o núcleo pode ser quebrada ou sofrer alguma outra alteração no citosol. O perigo da tradução de um mRNA lesado ou processado de forma incompleta (que levaria à produção de proteínas truncadas ou aberrantes) é aparentemente tão grande que a célula possui várias medidas de controle para evitar esse tipo de acontecimento.

Para evitar a tradução de moléculas quebradas de mRNA, tanto o quepe 5′ quanto a cauda de poli-A são reconhecidos pelo aparato de iniciação da tradução antes que esta inicie (ver Figura 6-72). Para auxiliar a garantir que os mRNAs sejam adequadamente processados antes de serem traduzidos, o complexo de junção do éxon (EJC, *exon junction complex*), que é depositado sobre o mRNA após o *splicing* (ver Figura 6-40), estimula a tradução subsequente do mRNA.

Contudo, o mais poderoso sistema de vigilância e controle do mRNA, denominado **degradação do mRNA mediada por ausência de sentido** (de *nonsense-mediated mRNA decay*), elimina mRNAs defectivos antes que eles possam ser eficientemente transcritos em proteínas. Esse mecanismo é acionado quando a célula determina que uma molécula de mRNA apresenta um códon sem sentido (de terminação) (UAA, UAG ou UGA) em um local "errado" – uma situação que poderá ocorrer em uma molécula de mRNA que tenha sofrido um *splicing* inadequado. Os *splicings* anormais geralmente levam à introdução aleatória de códons de terminação na fase de leitura do mRNA, especialmente em organismos que, assim como os seres humanos, possuem íntrons de tamanho relativamente grande (ver Figura 6-32B).

Esse mecanismo de vigilância tem início quando a molécula de mRNA está sendo transportada do núcleo para o citosol. Conforme sua extremidade 5′ emerge do poro nuclear, há o encontro do mRNA com um ribossomo e o início da tradução. À medida que a tradução ocorre, os EJCs ligados ao mRNA em cada sítio de *splicing* são, aparentemente, deslocados pelo ribossomo em movimento. O códon de terminação normal deverá estar no último éxon, de tal forma que, quando o ribossomo o alcançar e nele ficar bloqueado, não deverão existir mais EJCs ligados ao mRNA. Se tudo estiver certo, o mRNA terá "passado a inspeção" e será liberado no citosol onde poderá ser traduzido em quantidade (**Figura 6-80**). No entanto, se o ribossomo alcançar um códon de terminação prematuro e ficar bloqueado, ele reconhecerá a presença de EJCs sobre a molécula de mRNA, e esta será rapidamente degradada. Assim, o primeiro ciclo de tradução permite que a célula teste a adequação de cada molécula de mRNA conforme ela sai do núcleo.

A degradação mediada pela ausência de sentido pode ter sido especialmente importante na evolução, permitindo que células eucarióticas explorassem mais facilmente novos genes formados por rearranjo de DNA, mutações ou padrões alternativos de *splicing*, e selecionasse para a tradução apenas aqueles mRNAs que produzissem uma proteína completa. A degradação mediada pela ausência de sentido também é importante nas células em desenvolvimento do sistema imune, onde os extensivos rearranjos de DNA que ocorrem (ver Figura 25-36) com frequência geram códons de terminação precoce. O sistema de vigilância degrada os mRNAs produzidos a partir de tais rearranjos gênicos e, dessa forma, evita os potenciais efeitos tóxicos de proteínas truncadas.

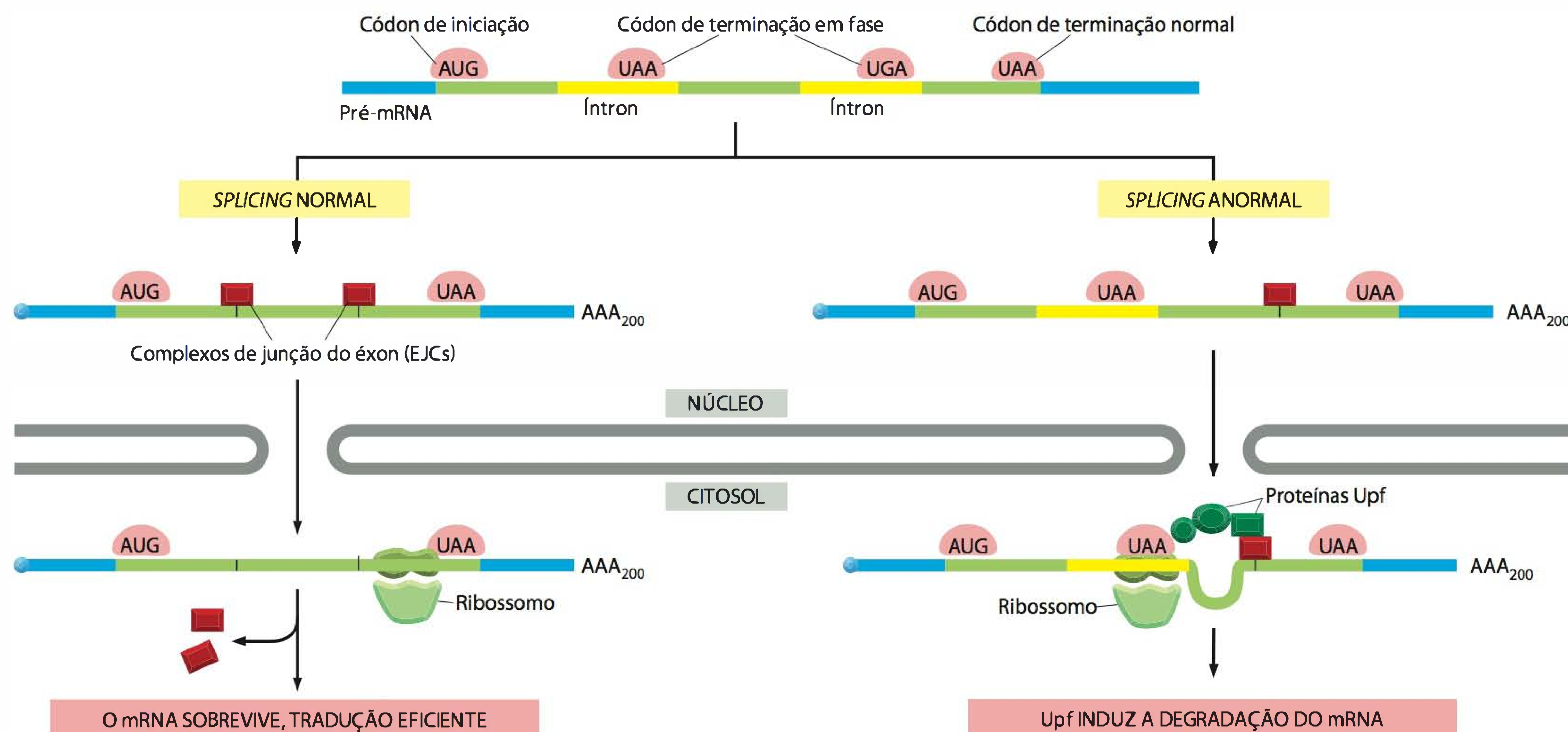


Figura 6-80 Degradação de mRNA mediada por ausência de sentido. Como ilustrado à direita, uma falha no *splicing* adequado de um pré-mRNA frequentemente introduz um códon de terminação precoce em fase de leitura para a proteína. A introdução de tal códon de terminação "em fase" ocorre facilmente em mamíferos, onde há uma tendência a existência de íntrons muito grandes. Quando traduzidos, esses mRNAs anormais produzem proteínas aberrantes, as quais podem lesar a célula. No entanto, como ilustrado na parte inferior direita desta figura, esses RNAs anormais são destruídos por um mecanismo de degradação mediada por ausência de sentido. De acordo com um modelo, uma molécula de mRNA, contendo complexos de junção do éxon (EJCs) para marcar *splices* adequadamente completos, é encontrada inicialmente por um ribossomo que realiza um ciclo de "teste" de tradução. Conforme o mRNA passa através do estreito canal do ribossomo, os EJCs são desconectados e mRNAs que conseguem realizar toda a passagem são liberados para múltiplos ciclos de tradução (*lado esquerdo*). No entanto, se um códon de terminação em fase é encontrado antes que o último EJC seja alcançado (*lado direito*), o mRNA sofre degradação mediada por ausência de sentido, a qual é induzida por proteínas Upf (*verde*) que se ligam a cada EJC. Observe que para que seja induzida a degradação mediada por ausência de sentido, o códon de terminação prematuro deve estar sobre a mesma fase de leitura que a proteína normal. (Adaptada de J. Lykke-Andersen et al., *Cell* 103:1121-1131, 2000. Com permissão de Elsevier.)

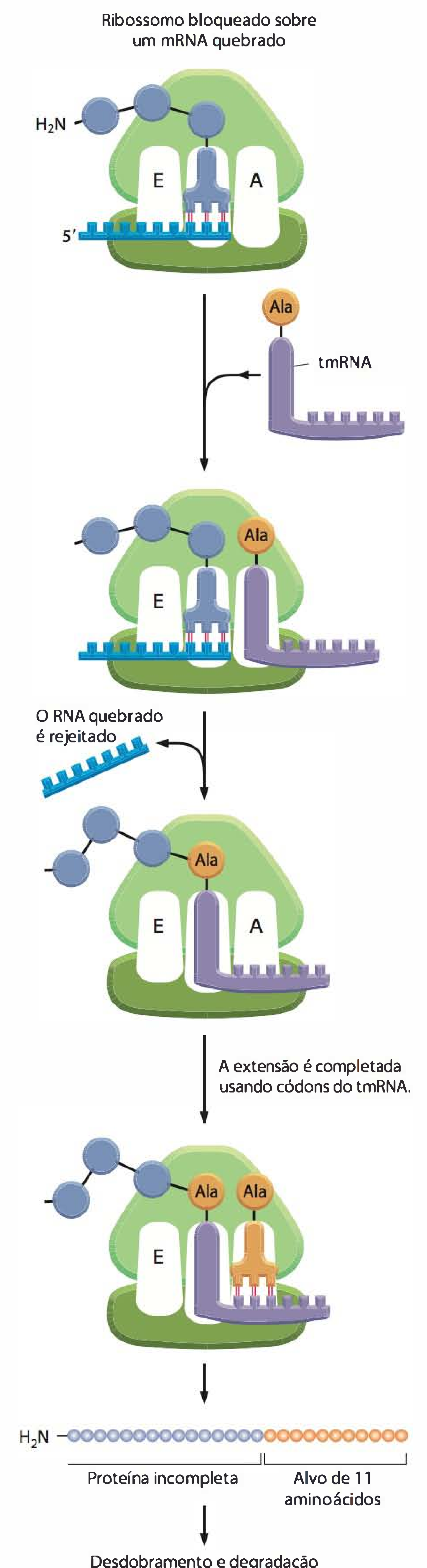


Figura 6-81 Resgate de um ribossomo bacteriano bloqueado em uma molécula de mRNA incompleta. O tmRNA ilustrado é um RNA de 363 nucleotídeos com função tanto de tRNA quanto de mRNA, de onde vem seu nome. Ele carrega uma alanina e pode entrar no sítio A livre de um ribossomo bloqueado para adicionar esta alanina à cadeia polipeptídica, mimetizando um tRNA apesar de não existir um códon para guiá-lo. O ribossomo então traduz 10 códons a partir do tmRNA, completando um segmento-alvo de 11 aminoácidos na proteína. Esse segmento-alvo é reconhecido por proteases que degradarão por completo esta proteína. Apesar de o exemplo ilustrado na figura provir de bactérias, eucariotos podem utilizar uma estratégia semelhante.

Finalmente, a via de vigilância mediada pela ausência de sentido desempenha um importante papel na diminuição dos sintomas de várias doenças genéticas humanas. Como vimos, doenças hereditárias geralmente são causadas por mutações que interferem negativamente no funcionamento de uma proteína-chave, como a hemoglobina ou um dos fatores de coagulação sanguínea. Aproximadamente um terço das doenças genéticas em humanos é resultante de mutações sem sentido ou de mutações (como as mutações de troca de fase de leitura ou mutações em sítios de *splicing*) que incorporam mutações sem sentido na fase de leitura do gene. Em indivíduos portadores de um gene mutante e um gene funcional, a degradação mediada pela ausência de sentido elimina o mRNA anormal e, dessa forma, evita que uma proteína potencialmente tóxica seja formada. Sem esse sistema de segurança, indivíduos com um gene funcional e um gene mutante "da doença" provavelmente apresentariam os mesmos sintomas severos.

Vimos anteriormente neste capítulo que as bactérias não possuem o elaborado processamento de mRNA encontrado nos eucariotos e que a tradução frequentemente tem início antes que a síntese da molécula de RNA esteja completa. Mas as bactérias também possuem mecanismos de controle de qualidade para lidar com mRNAs incompletos ou quebrados. Quando o ribossomo bacteriano traduz até o final um RNA incompleto, ele fica bloqueado e não libera o RNA. O resgate vem sob a forma de um RNA especial (denominado tmRNA), que entra no sítio A do ribossomo e é traduzido. Uma marca especial de 11 aminoácidos adicionados à região C-terminal da proteína truncada sinaliza para as proteases que a proteína como um todo deverá ser degradada (**Figura 6-81**).

Algumas proteínas iniciam o seu dobramento ainda durante a síntese

O processo de expressão de genes não termina quando o código genético foi utilizado para criar uma sequência de aminoácidos que constitui a proteína. Para ser útil à célula, essa nova cadeia polipeptídica deve dobrar-se, adquirindo a sua conformação tridimensional característica, ligar-se a alguma pequena molécula cofator necessária para a sua atividade, ser apropriadamente modificada por proteína-cinases ou outras enzimas modificadoras de proteínas e associar-se corretamente a outras subunidades proteicas com as quais ela funcione (**Figura 6-82**).

A informação necessária para todas as etapas listadas anteriormente está contida, em última instância, na sequência de aminoácidos ligados que o ribossomo produz quando traduz uma molécula de mRNA em uma cadeia polipeptídica. Como discutido no Capítulo 3, quando uma proteína se dobra, formando uma estrutura compacta, ela esconde a maioria de seus resíduos hidrofóbicos na região central. Além disso, muitas interações não-covalentes se formam entre várias partes da molécula. É a soma de todos esses arranjos energeticamente favoráveis que determina o padrão de dobramento final da cadeia polipeptídica – como a conformação de menor energia livre (ver p. 130).

Ao longo de muitos milhões de anos de evolução, a sequência de aminoácidos de cada proteína foi selecionada não somente pela conformação que ela adota, mas também por sua capacidade de se dobrar rapidamente. No caso de algumas proteínas, esse dobramento tem um início imediato, conforme a proteína emerge do ribossomo, e inicia na extremidade N-terminal. Nesses casos, conforme cada domínio proteico emerge do ribossomo, em um intervalo de poucos segundos, o ribossomo forma uma estrutura compacta, a qual contém a maior parte das características secundárias finais (hélices α e lâminas β) alinhadas de uma maneira aproximadamente correta (**Figura 6-83**). Em muitos domínios proteicos, essa estrutura flexível e aberta, denominada *glóbulo maleável*, é o ponto inicial para um processo relativamente lento em que ocorrem muitos ajustes nas cadeias laterais, os quais, finalmen-

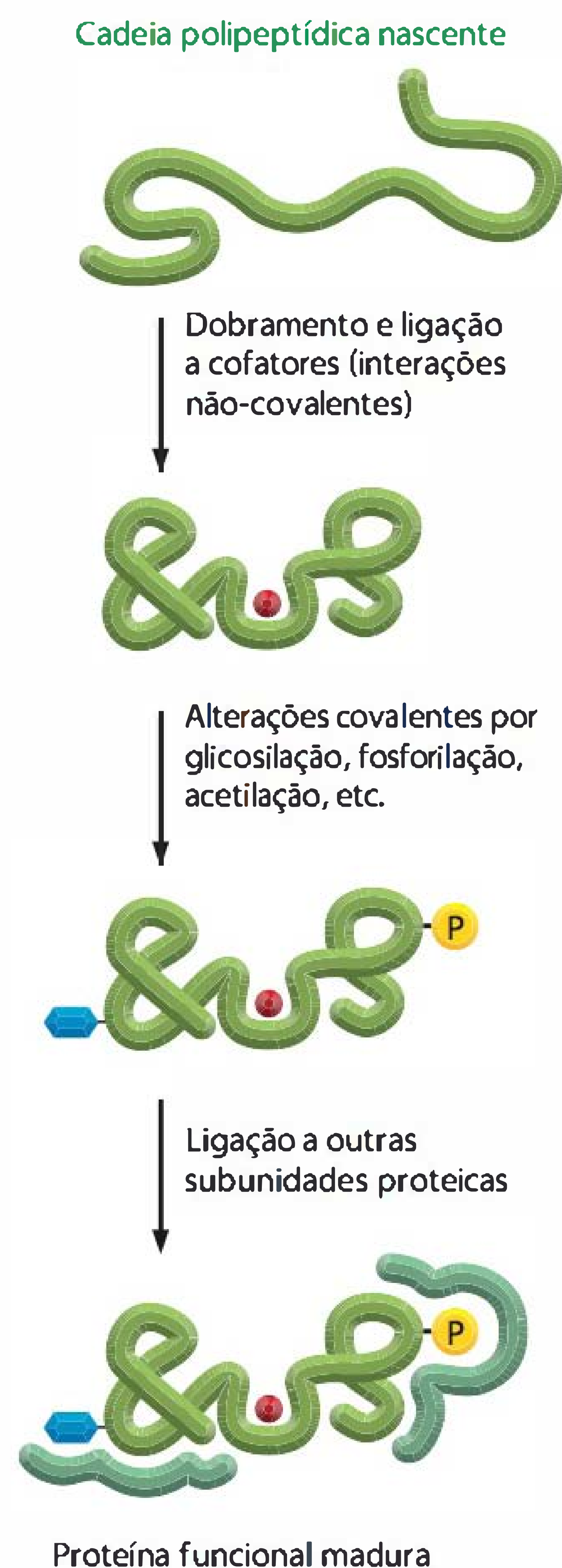


Figura 6-82 Passos da criação de uma proteína funcional. Como indicado, a tradução de uma sequência de um mRNA em uma sequência de aminoácidos no ribossomo não é o final do processo de formação de uma proteína. Para funcionar, a cadeia polipeptídica completa deve se dobrar, adquirindo uma conformação tridimensional correta, ligar-se aos cofatores necessários, e unir-se com as cadeias proteicas associadas (se necessário). Essas alterações são direcionadas pela formação de ligações não-covalentes. Como indicado, muitas proteínas também necessitam de modificações covalentes em aminoácidos determinados. Embora as mais frequentes dessas alterações sejam a glicosilação e a fosforilação proteica, mais de cem tipos diferentes de alterações covalentes são conhecidos (ver, p. ex., a Figura 3-81).

te, levam à formação correta da estrutura terciária. São necessários vários minutos para sintetizar uma proteína de tamanho médio e, no caso de muitas proteínas, grande parte do processo de dobramento está completa no momento em que o ribossomo libera a extremidade C-terminal da proteína (**Figura 6-84**).

As chaperonas moleculares auxiliam no dobramento da maioria das proteínas

O dobramento da maioria das proteínas provavelmente seja realizado durante a própria síntese. Quando isso não ocorre, elas encontram no ribossomo uma classe especial de proteínas denominada **chaperonas moleculares**. Essas proteínas são úteis para as células, pois existem muitos caminhos diferentes que podem ser seguidos para converter uma proteína parcialmente dobrada, ou ainda não dobrada, em uma proteína com a conformação compacta final. Para muitas proteínas, algumas das formas intermediárias nesses caminhos se agregariam, e esses agregados seriam abandonados à margem do processo sem a intervenção de uma chaperona (**Figura 6-85**).

As chaperonas moleculares são denominadas *proteínas de choque térmico* (*Hsp, heat shock proteins*), pois são sintetizadas em quantidades significativamente aumentadas após uma breve exposição das células a uma temperatura elevada (p. ex., 42°C para células que normalmente vivem a 37°C). Isso reflete a operação de um sistema de retroalimentação que responde a um aumento de proteínas erroneamente dobradas (tais como aquelas produzidas por temperaturas elevadas), induzindo a síntese das chaperonas, as quais auxiliam essas proteínas a se redobrarem.

Existem diversas famílias importantes de chaperonas moleculares eucarióticas, como as proteínas Hsp60 e Hsp70. Diferentes membros dessas famílias atuam em diferentes organelas. Assim, como discutido no Capítulo 12, as mitocôndrias contêm suas próprias moléculas de Hsp60 e Hsp70, que são diferentes daquelas que atuam no citosol; e uma Hsp70 especial (denominada *BIP*) ajuda as proteínas a se dobrarem no retículo endoplasmático.

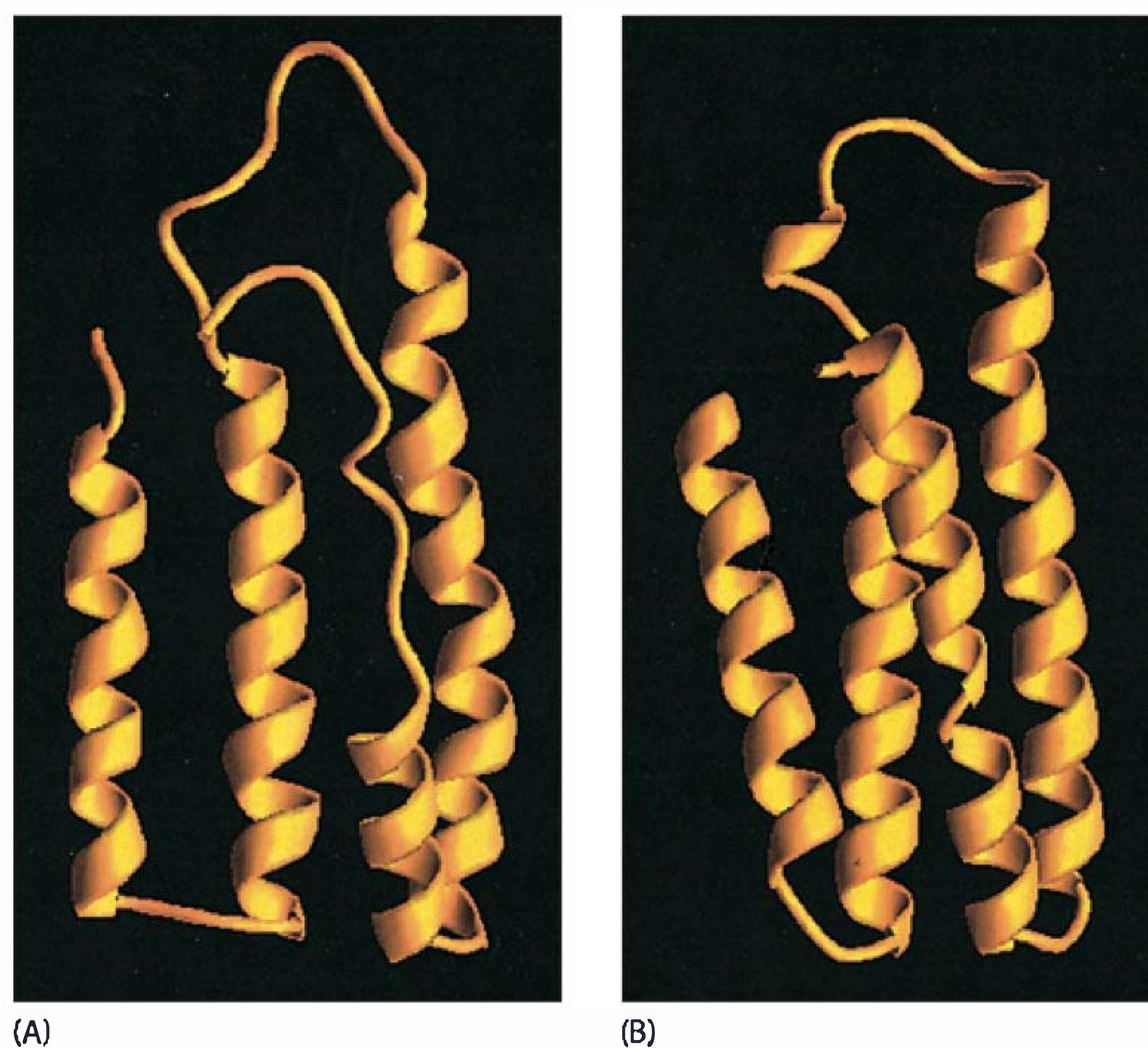


Figura 6-83 Estrutura de um glóbulo maleável. (A) A forma de um glóbulo maleável do citocromo b_{562} é mais aberta e menos organizada do que a forma final dobrada da proteína, ilustrada em (B). Observe que o glóbulo maleável já apresenta quase toda a estrutura secundária da forma final, embora as extremidades das hélices-α estejam desordenadas e uma das hélices esteja somente parcialmente formada. (Cortesia de Joshua Wand, de Y. Feng et al., *Nat. Struct. Biol.* 1:30-35, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

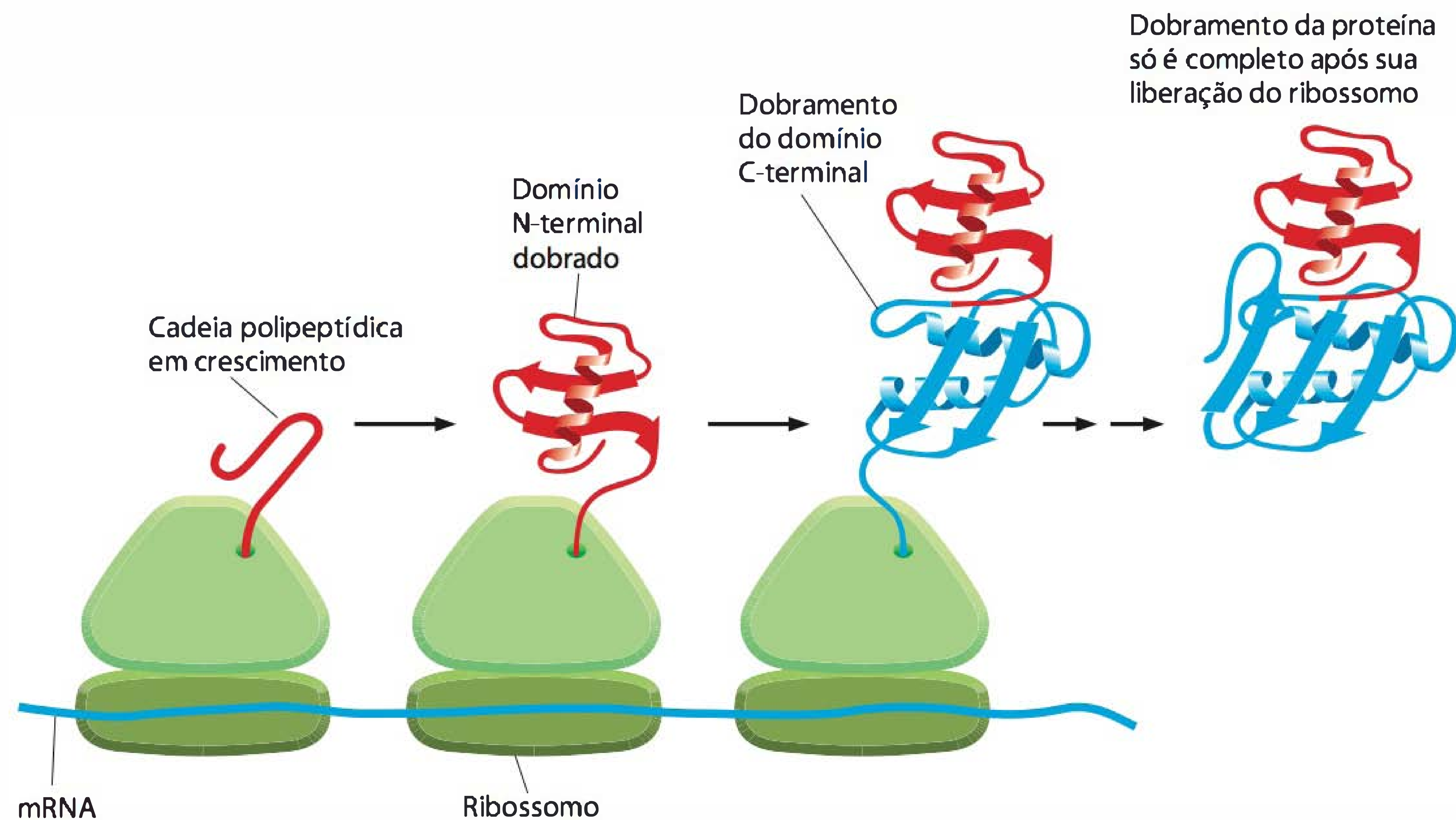


Figura 6-84 Dobramento co-traducional de uma proteína. Uma cadeia polipeptídica em crescimento é ilustrada adquirindo suas estruturas secundária e terciária conforme emerge do ribossomo. O domínio N-terminal dobra-se primeiro, enquanto o domínio C-terminal ainda está sendo sintetizado. Essa proteína ainda não adquiriu sua conformação final no momento em que é liberada do ribossomo. (Modificada de A. N. Federov e T. O. Baldwin, *J. Biol. Chem.* 272:32715-32718, 1997.)

As proteínas Hsp60 e Hsp70 trabalham com seus próprios pequenos grupos de proteínas associadas quando auxiliam o dobramento de outras proteínas. Elas compartilham uma afinidade por pequenas áreas hidrofóbicas expostas nas proteínas dobradas de forma incompleta e hidrolisam ATP, geralmente ligando e liberando seus substratos proteicos a cada ciclo de hidrólise de ATP. Em outros aspectos, os dois tipos de proteínas Hsp funcionam de forma diferente. A maquinaria Hsp70 age precocemente na vida de muitas proteínas, ligando-se a uma fita de aproximadamente sete aminoácidos hidrofóbicos antes de as proteínas deixarem os ribossomos (**Figura 6-86**). Em contraste, as proteínas semelhantes a Hsp60 formam uma grande estrutura em forma de barril que age após a proteína ter sido totalmente sintetizada. Esse tipo de chaperona, algumas vezes denominada *chaperonina*, forma uma "câmara de isolamento" no interior da qual as proteínas com dobramentos errados são mantidas, evitando sua agregação e fornecendo a elas um ambiente favorável no qual possam tentar um novo dobramento (**Figura 6-87**).

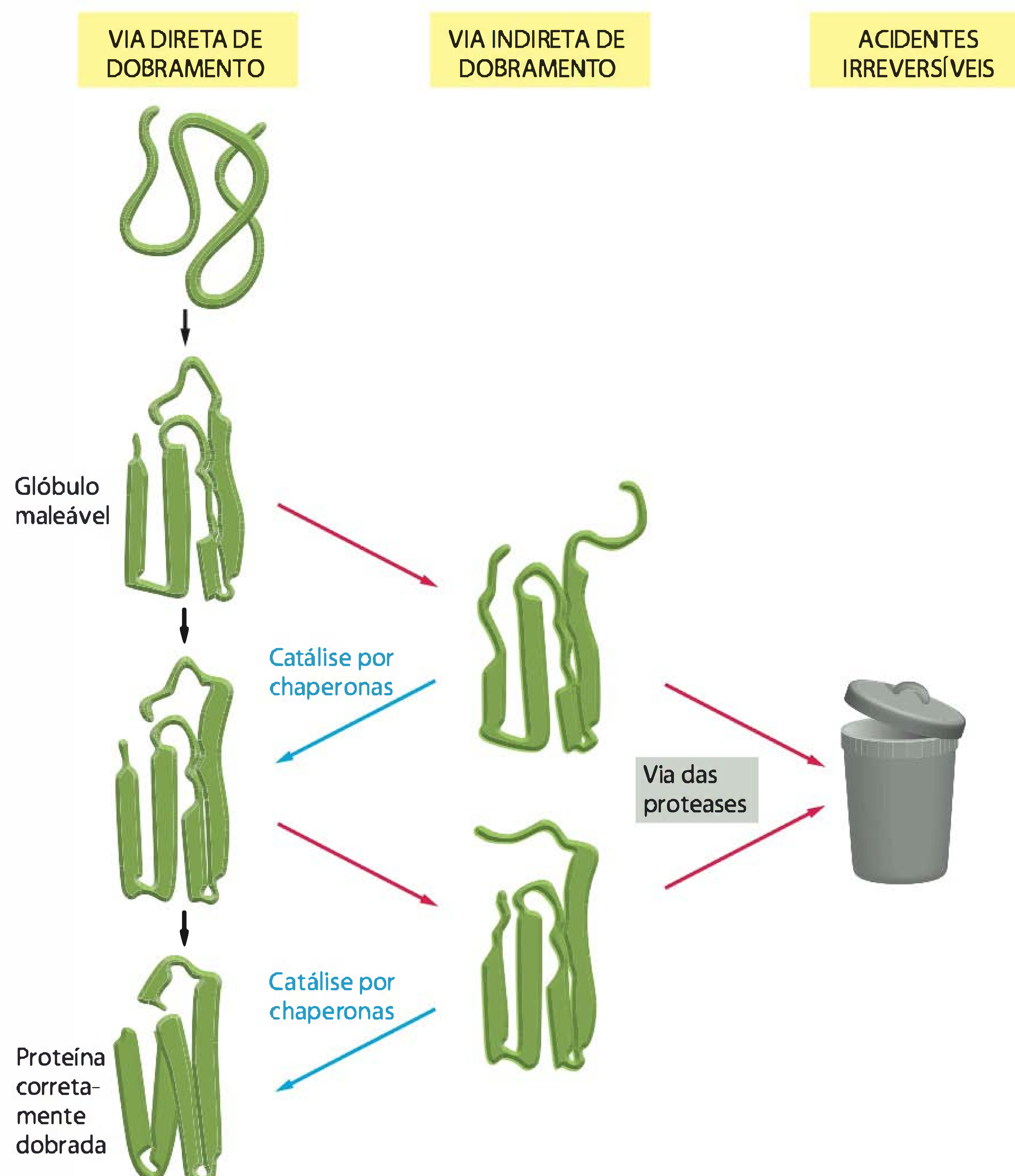


Figura 6-85 Visão moderna do dobramento de uma proteína. Cada domínio de uma proteína recentemente sintetizada adquire rapidamente o estado de "glóbulo maleável". O dobramento subsequente ocorre de forma mais lenta e por múltiplas vias, envolvendo, com frequência, a ajuda de uma chaperona molecular. Algumas moléculas podem ainda falhar, não adquirindo a conformação correta; como explicado no texto, essas proteínas são reconhecidas e degradadas por proteases específicas.

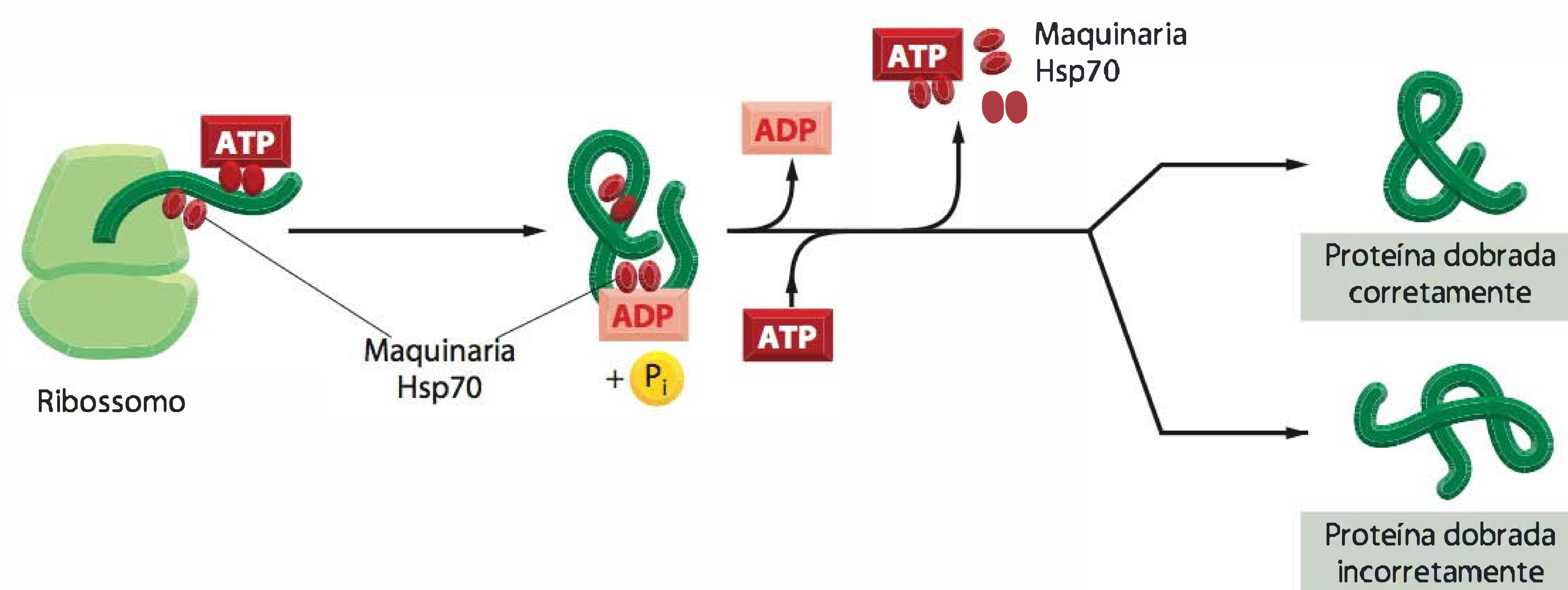


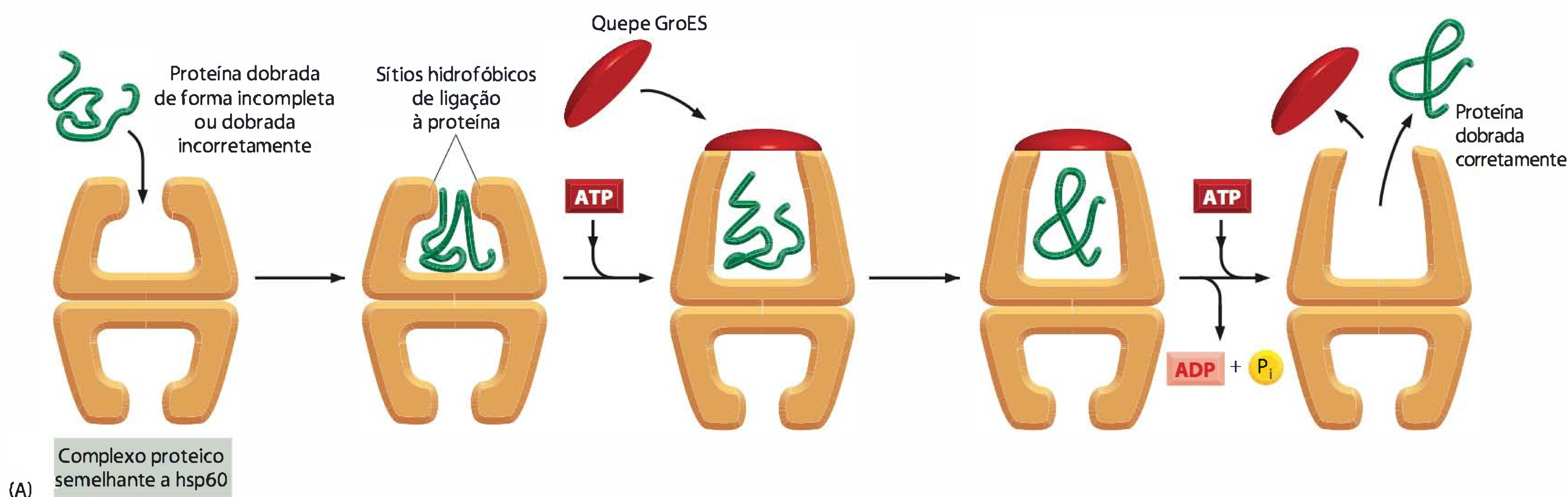
Figura 6-86 Família Hsp70 de chaperonas moleculares. Estas proteínas agem na fase inicial, reconhecendo uma pequena região de aminoácidos hidrofóbicos na superfície da proteína. Ajudadas por um grupo de proteínas Hsp40 menores (não-ilustradas), moléculas Hsp70 ligadas ao ATP ligam-se à proteína-alvo e hidrolisam ATP em ADP, sofrendo uma alteração conformacional que faz com que as moléculas Hsp70 se prendam ainda mais fortemente ao seu alvo. A seguir, ocorre dissociação da Hsp40, e a rápida religação de ATP induz a dissociação da proteína Hsp70 por meio da liberação de ADP. Na verdade, ciclos repetidos de ligação e de liberação das proteínas Hsp auxiliam o redobramento correto da proteína-alvo, como ilustrado esquematicamente na Figura 6-85.

As chaperonas ilustradas nas Figuras 6-86 e 6-87 geralmente usam vários ciclos de hidrólise de ATP para promover o redobramento correto de uma única cadeia polipeptídica. Apesar de parte desse gasto de energia ser usado para a realização de trabalho mecânico, provavelmente muita energia seja gasta para assegurar a exatidão do dobramento da proteína. Da mesma forma que vimos para a transcrição, para o *splicing* e para a tradução, o gasto de energia pode ser usado pelas células para aumentar a exatidão de processos biológicos. No caso do dobramento de proteínas, a hidrólise de ATP permite que as chaperonas reconheçam uma ampla variedade de estruturas erroneamente dobradas, impeçam novos dobramentos inadequados e recomecem o dobramento da proteína sob uma forma correta.

Apesar de nossa discussão estar centrada em apenas dois tipos de chaperonas, a célula possui uma ampla variedade dessas moléculas. A enorme diversidade de proteínas nas células provavelmente requer um amplo espectro de chaperonas, com capacidades de correção e versatilidade de vigilância.

As regiões hidrofóbicas expostas fornecem sinais essenciais para o controle de qualidade da proteína

Se aminoácidos radiativos forem adicionados às células, por um curto período, as novas proteínas sintetizadas poderão ser acompanhadas à medida que elas amadurecerem até a sua



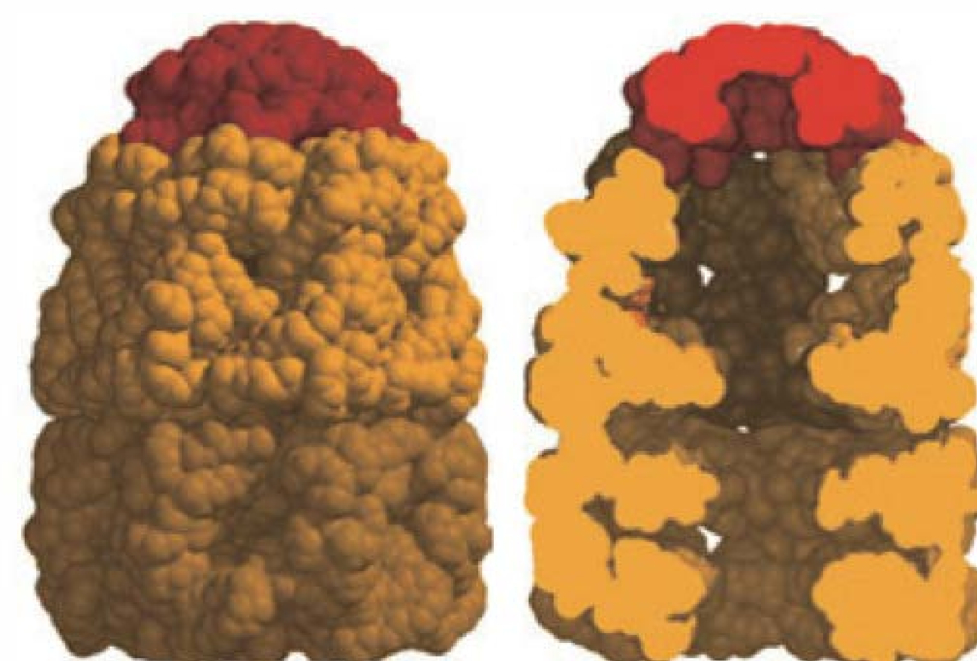


Figura 6-87 Estrutura e função da família Hsp60 de chaperonas moleculares. (A) A catálise do redobramento de proteínas. Uma proteína dobrada incorretamente é capturada inicialmente por interações hidrofóbicas em uma das margens do cilindro (ou barril). A ligação subsequente de ATP, mais uma proteína de quepe, aumenta o diâmetro do compartimento do cilindro, que pode esticar temporariamente (desdobrando parcialmente) a proteína que está em seu interior. Isso também confina a proteína em um espaço fechado, onde ela tem uma nova oportunidade para se dobrar. Após aproximadamente 15 segundos, ocorre hidrólise de ATP, enfraquecendo o complexo. A ligação subsequente a outra molécula de ATP ejeta a proteína, esteja ela dobrada ou não, e o ciclo se repete. Esse tipo de chaperona molecular também é conhecido como uma chaperonina; sendo designada como Hsp60 na mitocôndria, TCP1 no citosol das células de vertebrados e GroEL em bactérias. Conforme indicado, somente uma metade do cilindro simétrico opera sobre uma determinada proteína de cada vez. (B) A estrutura de GroEL ligada a seu quepe GroES, determinada por cristalografia de raios X. À *esquerda* é mostrada a estrutura externa, semelhante a um barril, e à *direita*, uma secção transversal, mostrando seu interior. (B, adaptada de B. Bukau e A. L. Horwich, *Cell* 92:351.366, 1998. Com permissão de Elsevier.)

forma funcional final. Esse tipo de experimento demonstra que as proteínas Hsp70 agem antes, iniciando quando uma proteína ainda está sendo sintetizada em um ribossomo, e que as proteínas semelhantes a Hsp60 atuam apenas mais tarde, para auxiliar a dobrar proteínas completas. Mas como a célula distingue as proteínas erroneamente dobradas que necessitam de ciclos adicionais de dobramento catalisado por ATP de proteínas que já apresentam uma estrutura correta?

Antes de responder, precisamos fazer uma pausa para considerar melhor o destino pós-tradução das proteínas. Uma proteína que tem uma área considerável de aminoácidos hidrofóbicos exposta na sua superfície geralmente é anormal: ou ela falhou no dobramento correto após ter deixado o ribossomo, ou sofreu um acidente, em um dado momento, que a desdobrou parcialmente, ou falhou no encontro de outra subunidade normal para a formação de um complexo proteico maior. Tal proteína não é apenas inútil para a célula, como pode também ser perigosa. Muitas proteínas contendo uma região hidrofóbica anormalmente exposta podem formar grandes agregados. Veremos que, em casos raros, tais agregados são formados e provocam doenças humanas graves. Mas, normalmente, os eficazes mecanismos de controle de qualidade de proteínas evitam que tais desastres ocorram.

Considerando esses dados, não é surpreendente que a célula tenha desenvolvido mecanismos elaborados que reconhecem as regiões hidrofóbicas das proteínas e minimizam o dano por elas causado. Dois desses mecanismos dependem das chaperonas moleculares recém-apresentadas, as quais se ligam a essas regiões e tentam reparar a proteína defeituosa, fornecendo outra chance de dobramento. Simultaneamente, cobrindo as regiões hidrofóbicas, as chaperonas evitam provisoriamente a agregação da proteína. As proteínas que adquirem por si próprias rapidamente um dobramento correto não apresentam tais regiões; consequentemente, não são alvo das chaperonas.

A **Figura 6-88** salienta todas as escolhas de controle de qualidade que uma célula apresenta para uma proteína recém-sintetizada difícil de dobrar. Como indicado, quando a tentativa de redobramento de uma proteína falha, um terceiro mecanismo é acionado, o qual destrói completamente a proteína por proteólise. A via proteolítica inicia com o reconhecimento de uma região hidrofóbica anormal na superfície de uma proteína e finaliza com a entrega da proteína para uma máquina de destruição proteica, um complexo de protease conhecido como *proteossomo*. Como descrito a seguir, esse processo depende de um sistema elaborado de marcação da proteína que também tem outras funções centrais na célula, envolvendo a destruição de proteínas normais selecionadas.

O proteossomo é uma protease compartimentalizada com sítios ativos sequestrados

A maquinaria proteolítica e as chaperonas competem para reorganizar as proteínas erroneamente dobradas. Se uma proteína recém-sintetizada sofrer um rápido dobramento, no máximo uma pequena fração de proteína será degradada. Em contraste, uma proteína de dobramento lento fica vulnerável para a atuação da maquinaria proteolítica por mais tempo e muito mais moléculas serão destruídas antes que ela possa atingir seu estado de dobramento adequado. Devido a erros de transcrição ou a mutações, erros de *splicing* do RNA ou na tradução, algumas proteínas jamais conseguirão dobrar-se adequadamente. É extremamente importante que a célula destrua essas proteínas potencialmente perigosas.

O aparato que deliberadamente destrói proteínas anormais é o **proteossomo**, uma abundante protease dependente de ATP que constitui cerca de 1% das proteínas celulares. Presente em muitas cópias dispersas no citosol e no núcleo, o proteossomo também destrói

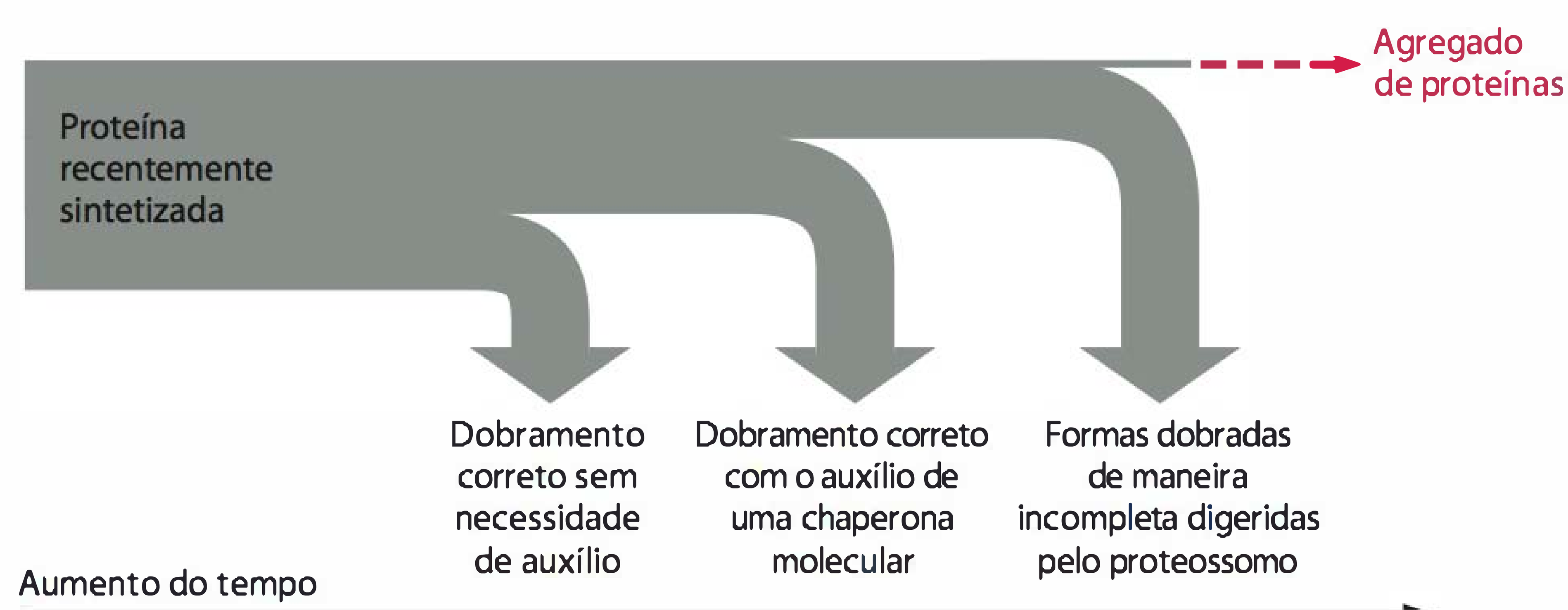


Figura 6-88 Processos que monitoram a qualidade da proteína após a síntese proteica. Uma proteína recentemente sintetizada algumas vezes dobra-se corretamente e associa-se a outras proteínas semelhantes, sem a necessidade de auxílio; nesse caso, os mecanismos de controle de qualidade não processam a proteína. As proteínas dobradas incorretamente são auxiliadas pelas chaperonas moleculares, visando ao seu dobramento correto: inicialmente pela família de proteínas Hsp70 e, em alguns casos, pelas proteínas semelhantes Hsp60. Em ambos os tipos de chaperonas, as proteínas auxiliadas são reconhecidas pela exposição anormal de uma região de aminoácidos hidrofóbicos em suas superfícies. Esse "processo de resgate" compete com um sistema diferente que reconhece uma região anormal exposta e transfere a proteína que a contém para um proteossomo, visando a sua completa destruição. A atividade combinada de todos esses processos é necessária para evitar a agregação massiva de proteínas em uma célula, o que pode ocorrer quando muitas regiões hidrofóbicas das proteínas se agrupam inespecificamente.

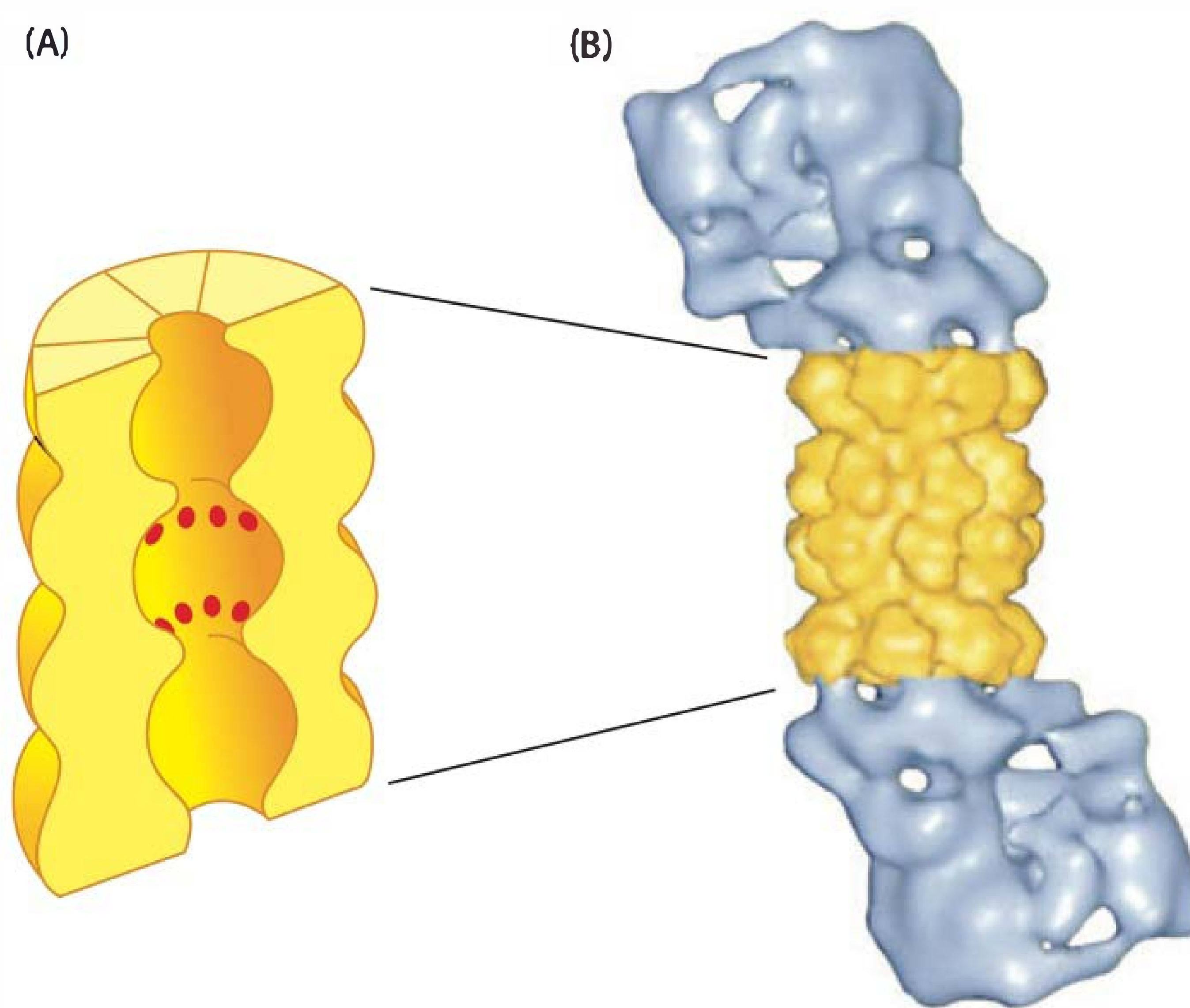


Figura 6-89 O proteossomo. (A) Uma visão em corte da estrutura do cilindro central 20S, conforme determinada por cristalografia de raios X, com os sítios ativos das proteases indicados por *pontos vermelhos*. (B) A estrutura completa do proteossomo, na qual o cilindro central (*amarelo*) é suplementado por um quepe 19S (*azul*) em cada extremidade. A estrutura do quepe foi determinada por processamento computacional de imagens de microscopia eletrônica. O complexo do quepe (também denominado partícula reguladora) se liga seletivamente às proteínas que foram marcadas com ubiquitina para a destruição; a seguir, usa a hidrólise de ATP para desdobrar suas cadeias polipeptídicas e as coloca através de um estreito canal (veja a Figura 6-91) na câmara interna do cilindro 20S para sua digestão em peptídeos pequenos. (B, de W. Baumeister et al., *Cell* 92:367-380, 1998. Com permissão de Elsevier.)

proteínas anormais do retículo endoplasmático (RE). Um sistema de vigilância com base no RE detecta proteínas que não se dobram ou que não se organizam corretamente após entrar no RE e as *retrotransloca* para o citosol para degradação (discutido no Capítulo 12).

Cada proteossomo consiste em um cilindro central oco (o proteossomo central 20S) formado a partir de múltiplas subunidades proteicas que se associam sob a forma de um tubo praticamente cilíndrico de quatro anéis heptaméricos (**Figura 6-89**). Algumas dessas subunidades são proteases diferentes, cujos sítios ativos estão direcionados à parte interna da câmara do cilindro. Essa organização evita que essas proteases eficientes atuem desordenadamente na célula. Cada extremidade do cilindro normalmente está associada a um grande complexo proteico (a capa 19S), que contém um anel proteico com seis subunidades, através do qual as proteínas-alvo são introduzidas no centro do proteossomo onde serão degradadas (**Figura 6-90**). A reação de desespiralização, direcionada por hidrólise de ATP, desenrola (ou desestrutura) as proteínas-alvo conforme elas se movem através da capa, expondo-as para as proteases que revestem a região central do proteossomo (**Figura 6-91**). As proteínas que compõem a estrutura em anel da capa do proteossomo pertencem a uma grande classe de proteínas de "desespiralização" conhecidas como *proteínas AAA*. Muitas dessas proteínas atuam sob a forma de hexâmeros, sendo possível que compartilhem características de ação com o desenrolamento do DNA-dependente de ATP realizado pelas DNA helicases (ver Figura 5-15).

Uma propriedade crucial do proteossomo, e uma razão de seu *design* complexo, é a *processividade* do seu mecanismo: em contraste com uma protease "simples" que cliva o substrato da cadeia polipeptídica apenas uma vez antes da dissociação, o proteossomo mantém o substrato ligado até que todo ele tenha sido convertido em pequenos peptídeos.

As capas 19S também atuam como "portões" regulados na entrada da câmara proteolítica interna, sendo responsáveis pela ligação do substrato proteico-alvo ao proteossomo. Com raras exceções, os proteossomos agem sobre proteínas que foram marcadas especificamente para a destruição por ligação covalente a um alvo de reconhecimento formado por uma pequena proteína denominada *ubiquitina* (**Figura 6-92**A). As ubiquitinas existem

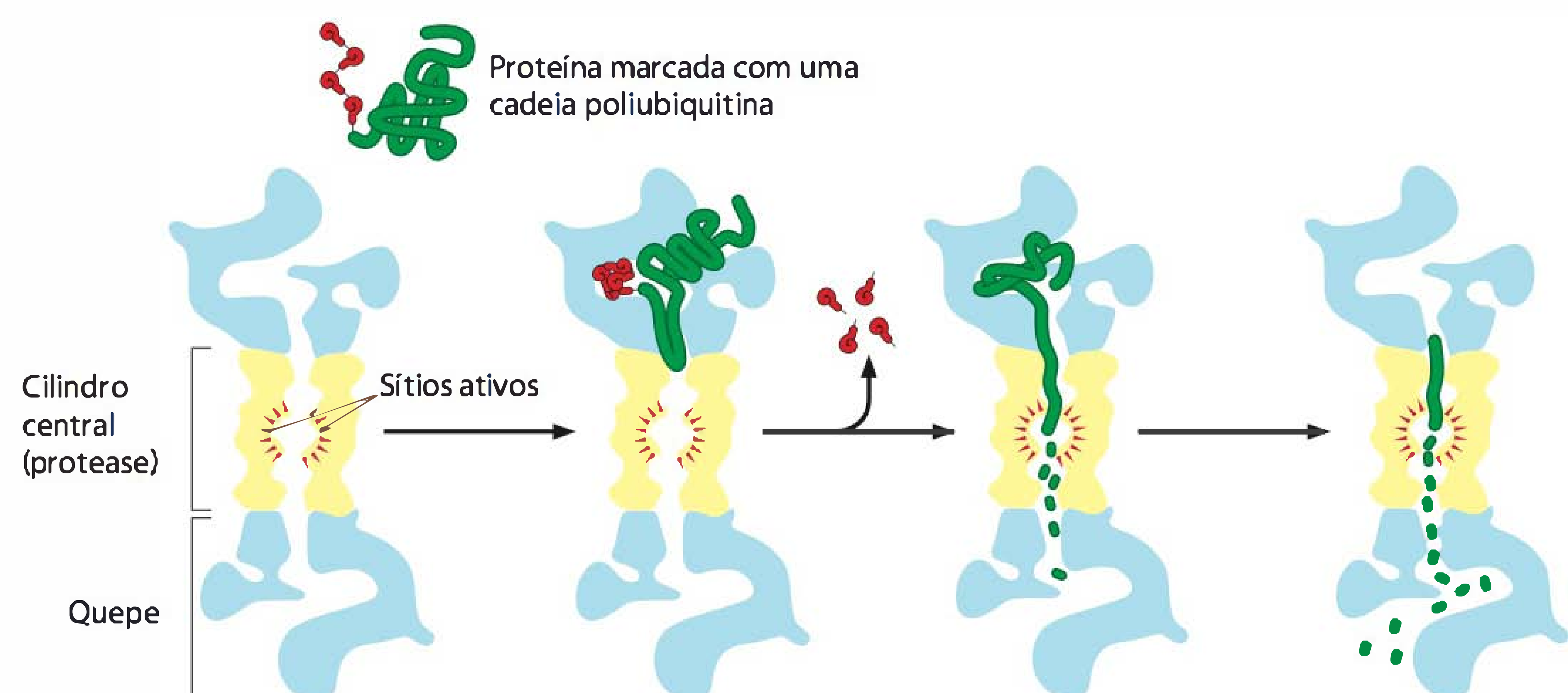


Figura 6-90 Digestão progressiva de proteínas pelo proteossomo. O quepe do proteossomo reconhece um substrato proteico, neste caso marcado por uma cadeia poliubiquitina (ver Figura 6-92), e transloca-o subsequentemente para o centro do proteossomo, onde será digerido. Em uma etapa inicial, a ubiquitina é clivada do substrato proteico e é reciclada. A translocação para o centro do proteossomo é mediada por um anel de proteínas dependentes de ATP que desdobra o substrato proteico conforme este atravessa o anel rumo ao centro do proteossomo (ver Figura 6-91). (De S. Prakash e A. Matouschek, *Trends Biochem. Sci.* 29:593-600, 2004. Com permissão de Elsevier.)

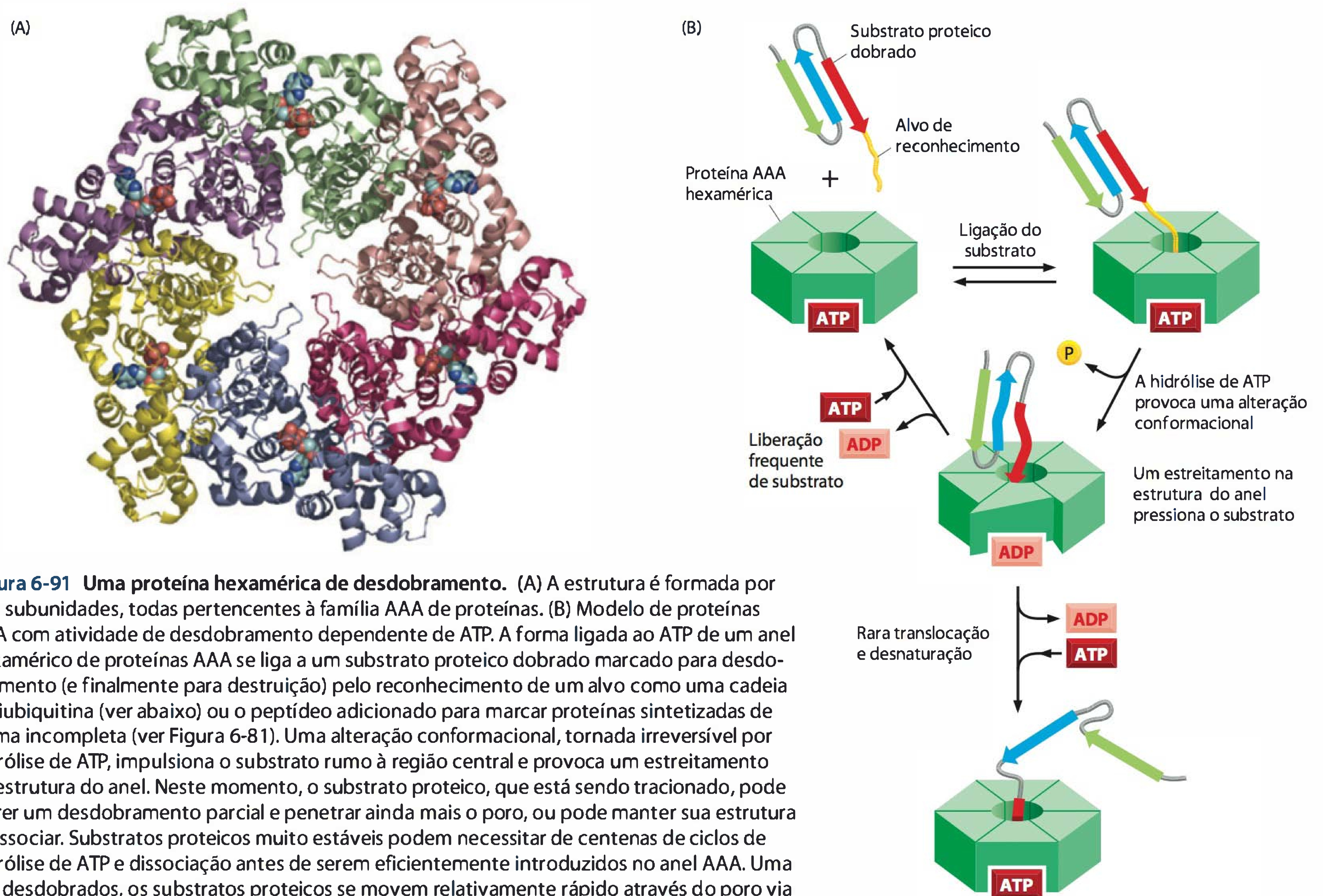


Figura 6-91 Uma proteína hexamérica de desdobramento. (A) A estrutura é formada por seis subunidades, todas pertencentes à família AAA de proteínas. (B) Modelo de proteínas AAA com atividade de desdobramento dependente de ATP. A forma ligada ao ATP de um anel hexamérico de proteínas AAA se liga a um substrato proteico dobrado marcado para desdobramento (e finalmente para destruição) pelo reconhecimento de um alvo como uma cadeia poliubiquitina (ver abaixo) ou o peptídeo adicionado para marcar proteínas sintetizadas de forma incompleta (ver Figura 6-81). Uma alteração conformacional, tornada irreversível por hidrólise de ATP, impulsiona o substrato rumo à região central e provoca um estreitamento na estrutura do anel. Neste momento, o substrato proteico, que está sendo tracionado, pode sofrer um desdobramento parcial e penetrar ainda mais o poro, ou pode manter sua estrutura e dissociar. Substratos proteicos muito estáveis podem necessitar de centenas de ciclos de hidrólise de ATP e dissociação antes de serem eficientemente introduzidos no anel AAA. Uma vez desdobrados, os substratos proteicos se movem relativamente rápido através do poro via ciclos sucessivos de hidrólise de ATP. (A, de X. Zhang et al., *Mol. Cell* 6:1473-1484, 2000, e A. N. Lupas e J. Martin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:746-753, 2002; B, de R. T. Sauer et al., *Cell* 119:9-18, 2004. Todos com permissão de Elsevier.)

livres nas células ou covalentemente ligadas a uma ampla gama de proteínas intracelulares. No caso de muitas dessas proteínas, a marcação pelas ubiquitinas resulta em sua destruição pelo proteossomo. No entanto, em outros casos, a marcação por ubiquitina possui um significado completamente distinto. Na verdade, é o número de moléculas adicionadas de ubiquitina e a forma como estão unidas que determinam como a célula irá interpretar a mensagem da ubiquitinação (**Figura 6-93**). Nas próximas seções enfatizaremos o papel da ubiquitinação no sentido de direcionamento da degradação proteica.

Um elaborado sistema de conjugação de ubiquitina marca as proteínas para destruição

A ubiquitina é preparada para a conjugação a outras proteínas por uma *enzima ativadora de ubiquitina* (E1) dependente de ATP, a qual cria uma ubiquitina ativada, ligada a E1, que é subsequentemente transferida para uma enzima de um grupo de *enzimas conjugadoras de ubiquitina* (E2) (Figura 6-92B). As enzimas E2 agem em conjunto com proteínas acessórias (E3). No complexo E2-E3, denominado *ubiquitina-ligase*, o componente E3 se liga a sinais específicos de degradação, denominados degrons, em substratos proteicos, auxiliando E2 a formar uma cadeia *poliubiquitina* ligada a uma lisina da proteína substrato. Nessa cadeia, o resíduo C-terminal de cada ubiquitina é ligado a uma lisina específica da molécula de ubiquitina precedente (ver Figura 6-93), produzindo uma série linear de conjugados ubiquitina-ubiquitina (Figura 6-92C). É essa cadeia poliubiquitina em uma proteína-alvo que é reconhecida por um receptor específico no proteossomo.

Existem aproximadamente 30 enzimas E2 distintas, mas estruturalmente similares, nos mamíferos, e centenas de proteínas E3 diferentes que formam complexos com enzimas E2 específicas. O sistema ubiquitina-proteossomo, consequentemente, consiste em muitas vias

proteolíticas distintas, mas com organização semelhante, as quais têm em comum tanto a enzima E1 no "topo" quanto o proteossomo "abaixo" e diferem pela composição de suas ubiquitina-ligases E2-E3 e seus fatores acessórios. Ubiquitina-ligases distintas reconhecem sinais de degradação diferentes e, portanto, marcam para degradação subgrupos diferentes de proteínas intracelulares.

As proteínas desnaturadas ou inadequadamente dobradas, assim como as proteínas contendo aminoácidos oxidados ou anormais, são reconhecidas e degradadas, pois tendem a apresentar em sua superfície sequências de aminoácidos ou motivos conformacionais reconhecidos como sinais de degradação por um grupo de moléculas E3 no sistema ubiquitina-proteossomo; essas sequências devem, evidentemente, estar escondidas e, assim, inacessíveis na cópia normal dessas proteínas. Entretanto, uma via proteolítica que reconhece e destrói proteínas anormais deve ser capaz de distinguir entre proteínas *completas* que apresentam conformações "erradas" e os muitos polipeptídeos em crescimento nos ribossomos (bem como os polipeptídeos recém-liberados dos ribossomos) que ainda não conseguiram finalizar seu dobramento normal. Essa não é uma tarefa fácil; acredita-se que o sistema ubiquitina-proteossomo destrua muitas das moléculas proteicas recém-formadas ou nascentes não porque essas proteínas sejam anormais, mas porque elas expõem temporariamente sinais de degradação escondidos em seu estágio maduro (dobrado).



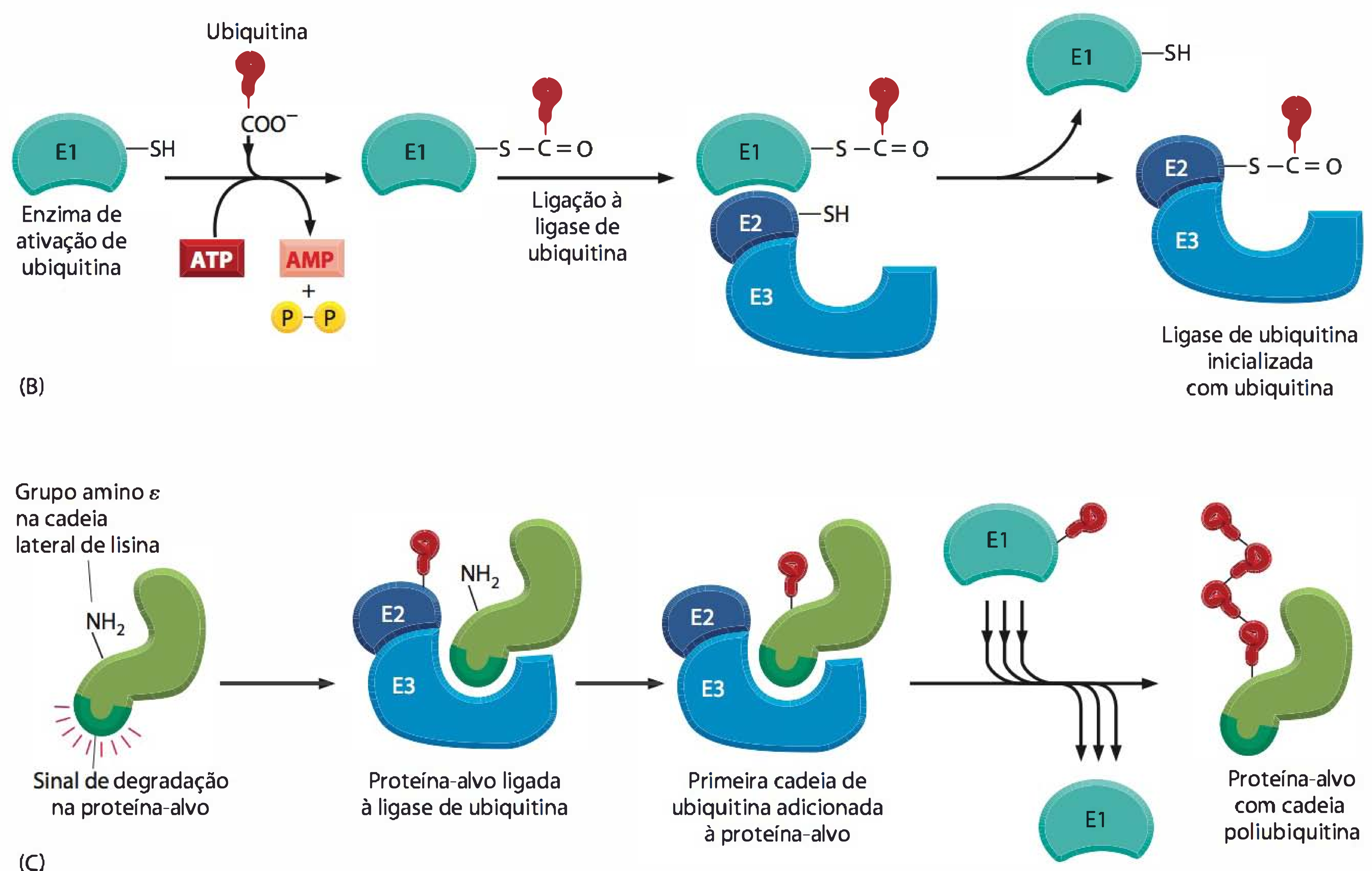


Figura 6-92 Ubiquitina e marcação de proteínas com cadeias de poliubiquitina. (A) A estrutura tridimensional da ubiquitina; esta proteína relativamente pequena contém 76 aminoácidos. (B) O C-terminal da ubiquitina é inicialmente ativado por ligação tioéster altamente energética a uma cadeia lateral de cisteína na proteína E1. Essa reação necessita de ATP e se desenvolve com um intermediário covalente AMP-ubiquitina. A ubiquitina ativada em E1, também conhecida como enzima de ativação de ubiquitina, é então transferida para as cisteínas em um grupo de moléculas E2. Essas moléculas E2 existem sob a forma de complexos com uma família ainda maior de moléculas E3. (C) A adição de uma cadeia poliubiquitina em uma proteína-alvo. Em uma célula de mamífero existem várias centenas de complexos distintos E2-E3, muitos dos quais reconhecem um sinal de degradação específico nas proteínas-alvo por meio de seus componentes E3. As E2 são denominadas enzimas de conjugação de ubiquitina. As E3 são tradicionalmente relatadas como sendo ligases de ubiquitinas, mas é mais prudente reservar esse nome para o complexo funcional E2-E3. A estrutura detalhada desse complexo está apresentada na Figura 3-79.

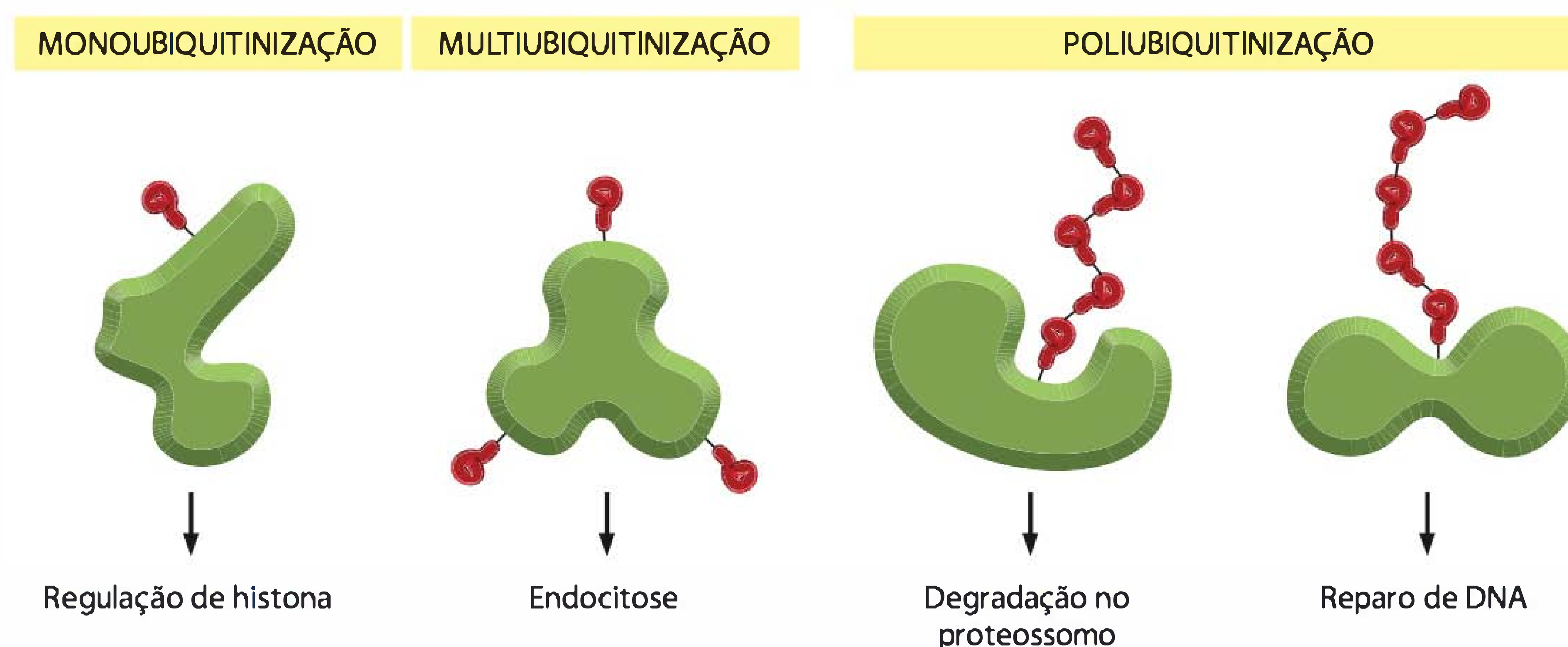


Figura 6-93 Marcação de proteínas pela ubiquitina. Cada padrão de modificação ilustrado pode ter um significado específico para a célula. Os dois tipos de poliubiquitinização diferem na forma na qual as moléculas de ubiquitina estão unidas. A ligação através da Lys48 direciona para a degradação pelo proteossomo, ao passo que através da Lys63 apresenta outros significados. As marcações com ubiquitina são"lidas" por proteínas que reconhecem especificamente cada tipo de modificação.

Muitas proteínas são controladas por destruição regulada

Uma função dos mecanismos proteolíticos intracelulares é o reconhecimento e a eliminação de proteínas erroneamente dobradas ou que tenham qualquer outra anormalidade, como descrito anteriormente. Outra função dessas vias proteolíticas é conferir meia-vida curta a proteínas normais específicas cujas concentrações devem mudar rapidamente em resposta a alterações no estado de uma célula. Algumas dessas proteínas de vida curta são sempre degradadas rapidamente, ao passo que muitas outras apresentam vida curta *condicional*, ou seja, são metabolicamente estáveis sob determinadas condições, mas tornam-se instáveis quando ocorre mudança no estado da célula. Por exemplo, as ciclinas mitóticas têm vida longa durante o ciclo celular até sua súbita degradação no final da mitose, como exposto no Capítulo 17.

Como é controlada a destruição regulada de uma proteína? Vários mecanismos são ilustrados por exemplos específicos que aparecerão mais tarde neste livro. Em uma classe geral de mecanismo (**Figura 6-94**A), a atividade de uma ubiquitina-ligase é ligada ou pela fosforilação de E3 ou por uma transição alostérica em uma proteína E3 causada por sua ligação a uma molécula específica grande ou pequena. Por exemplo, o complexo promotor de anáfase (APC, *anaphase-promoting complex*) é uma ubiquitina-ligase de múltiplas subunidades ativada por uma adição de subunidade temporizadora de ciclo celular na mitose. A APC ativada provoca então a degradação de ciclinas mitóticas e de vários outros reguladores da transição metáfase-anáfase (ver Figura 17-44).

Alternativamente, em resposta a sinais intracelulares ou a sinais ambientais, pode ser criado um sinal de degradação em uma proteína, causando sua rápida ubiquitinação e destruição pelo proteossomo. Uma maneira comum de criar tal sinal é fosforilar um sítio específico em uma proteína que desmascara um sinal de degradação normalmente oculto. Outra maneira de desmascarar tal sinal é por meio da dissociação regulada de uma subunidade proteica. Finalmente, podem ser criados fortes sinais de degradação por uma única clivagem de uma ligação peptídica, desde que essa clivagem crie uma nova extremidade N-terminal que será reconhecida por uma E3 específica como um resíduo N-terminal "desestabilizador" (Figura 6-94B).

O sinal de degradação tipo N-terminal surge devido à "regra da extremidade N-terminal", a qual relaciona a meia-vida de uma proteína *in vivo* à identidade desse resíduo N-terminal. Existem 12 resíduos desestabilizadores na regra da extremidade N da levedura *S. cerevisiae* (Arg, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Trp, Ile, Asp, Glu, Asn, e Gln) entre os 20 aminoácidos-padrão. Os resíduos N-terminal desestabilizadores são reconhecidos por uma ubiquitina-ligase especial que é conservada desde a levedura até os seres humanos.

Como vimos, todas as proteínas são inicialmente sintetizadas carregando uma metionina (ou formilmetionina em bactérias) como seu resíduo N-terminal, o qual é um resíduo estabilizador na regra da extremidade N. As proteases especiais, denominadas metionina-aminopeptidases, geralmente removerão a primeira metionina de uma proteína em formação, mas o farão somente se o segundo resíduo também for estabilizador na regra N-terminal. Assim, inicialmente não estava claro como os substratos para a regra N-terminal formavam-se *in vivo*. No entanto, atualmente sabe-se que esses substratos são formados por proteases sítio-específicas. Por exemplo uma subunidade de coesina, um complexo proteico que mantém as cromátides-irmãs unidas, é clivada por uma protease altamente específica na transição metáfase-anáfase. Essa clivagem regulada pelo ciclo celular permite a separação das cromátides-irmãs e permite a finalização da mitose (ver Figura 17-44). O fragmento C-terminal da subunidade clivada carrega uma arginina N-terminal, um resíduo desestabilizador de acordo com a regra N-terminal. As células mutantes deficientes na via da regra N-terminal

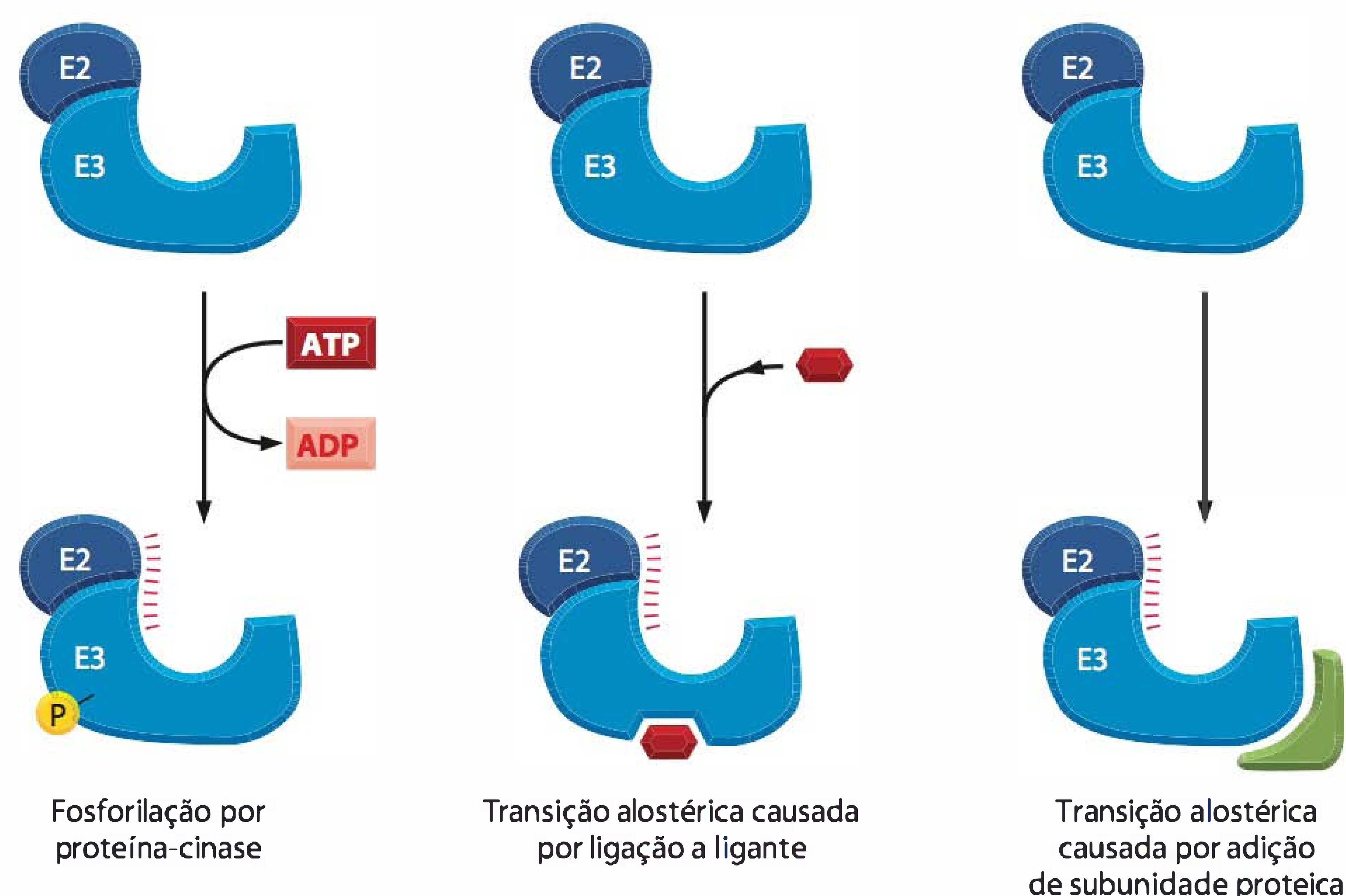
exibem um aumento muito grande na frequência de perda de cromossomos, provavelmente porque uma falha na degradação desse fragmento da subunidade coesina interfere na formação de novos complexos coesina associados à cromatina no próximo ciclo celular.

As proteínas dobradas anormalmente podem se agregar e causar doenças humanas destrutivas

Diversas doenças humanas hereditárias (por ex., a anemia falciforme [ver p. 1495] e a deficiência de α-1-antitripsina, uma condição que geralmente leva ao desenvolvimento de doença hepática e enfisema) são resultado de proteínas mutantes que escapam do controle de qualidade das células, dobram-se de forma inadequada e formam agregados. Pela absorção de macromoléculas essenciais, esses agregados podem danificar severamente as células e até mesmo provocar sua morte. Frequentemente, a herança de um único alelo mutante de um gene pode provocar a doença, pois a cópia normal do gene não pode proteger a célula das propriedades destrutivas do agregado.

Em seres humanos normais, o declínio gradual dos controles de qualidade celular também podem provocar doenças permitindo que proteínas normais formem agregados (**Figura 6-95**). Em alguns casos, os agregados de proteína são liberados de células mortas e se acumulam na matriz extracelular que envolve as células no tecido e, em casos extremos, podem também danificar os tecidos. O cérebro é especialmente vulnerável, por ser composto de um conjunto altamente organizado de células nervosas. Não é surpreendente, portanto, que agregados proteicos causem principalmente doenças neurodegenerativas. As mais conhecidas entre elas são a doença de Huntington e o mal de Alzheimer – sendo este último o causador de demência relacionada à idade em mais de 20 milhões de pessoas no mundo atualmente.

(A) ATIVAÇÃO DE UMA LIGASE DE UBIQUITINA



(B) ATIVAÇÃO DE UM SINAL DE DEGRADAÇÃO

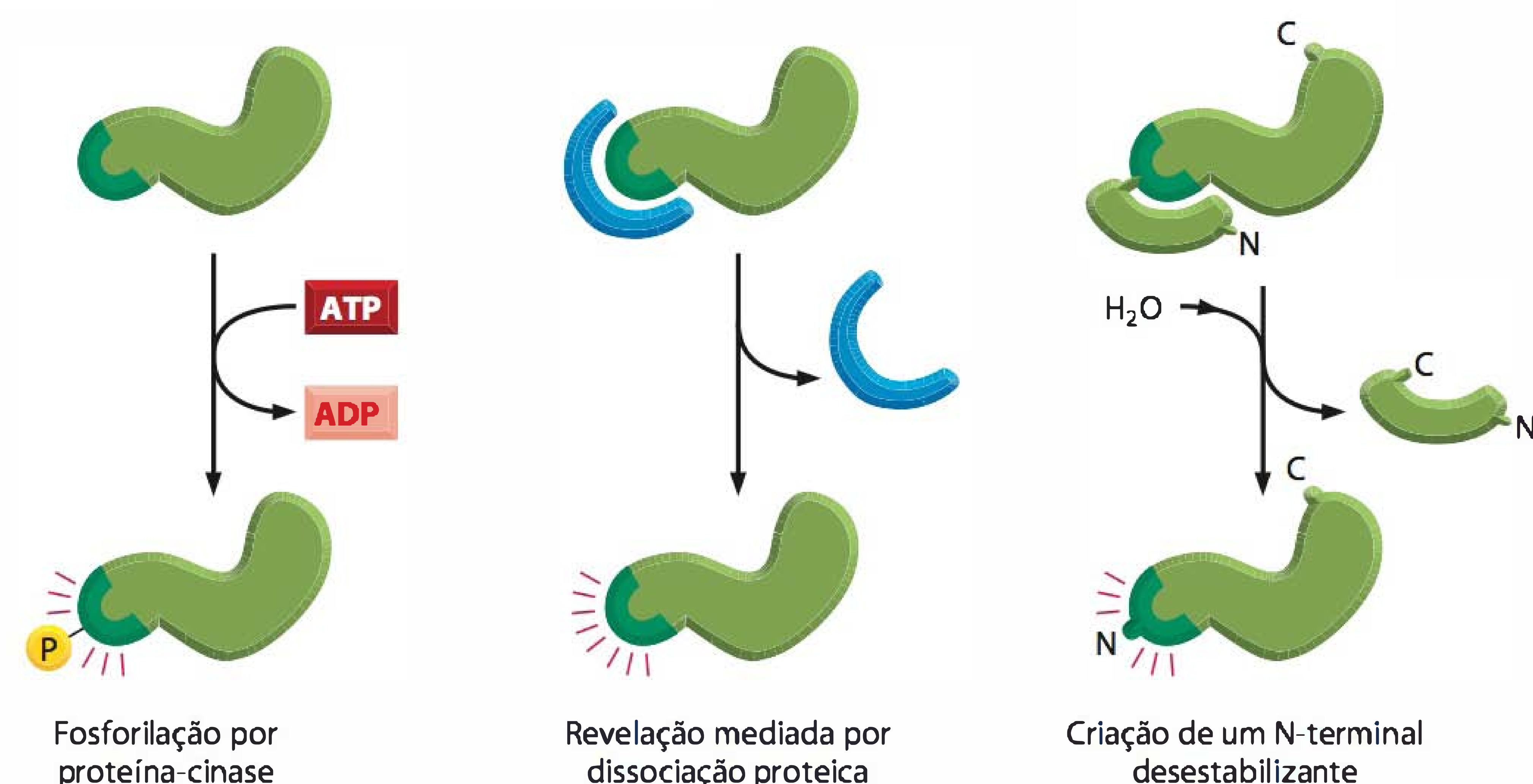


Figura 6-94 Duas maneiras gerais de induzir a degradação de uma proteína específica. (A) A ativação de uma molécula E3 específica cria uma nova ligase de ubiquitina. (B) Criação de um sinal de degradação exposto na proteína a ser degradada. Este sinal provoca a ligação de uma ligase de ubiquitina, provocando a adição de uma cadeia poliubiquitina à lisina adjacente sobre a proteína-alvo. Sabe-se que todas as seis vias aqui ilustradas são utilizadas por células para induzir e direcionar o movimento de proteínas selecionadas para o proteossomo.

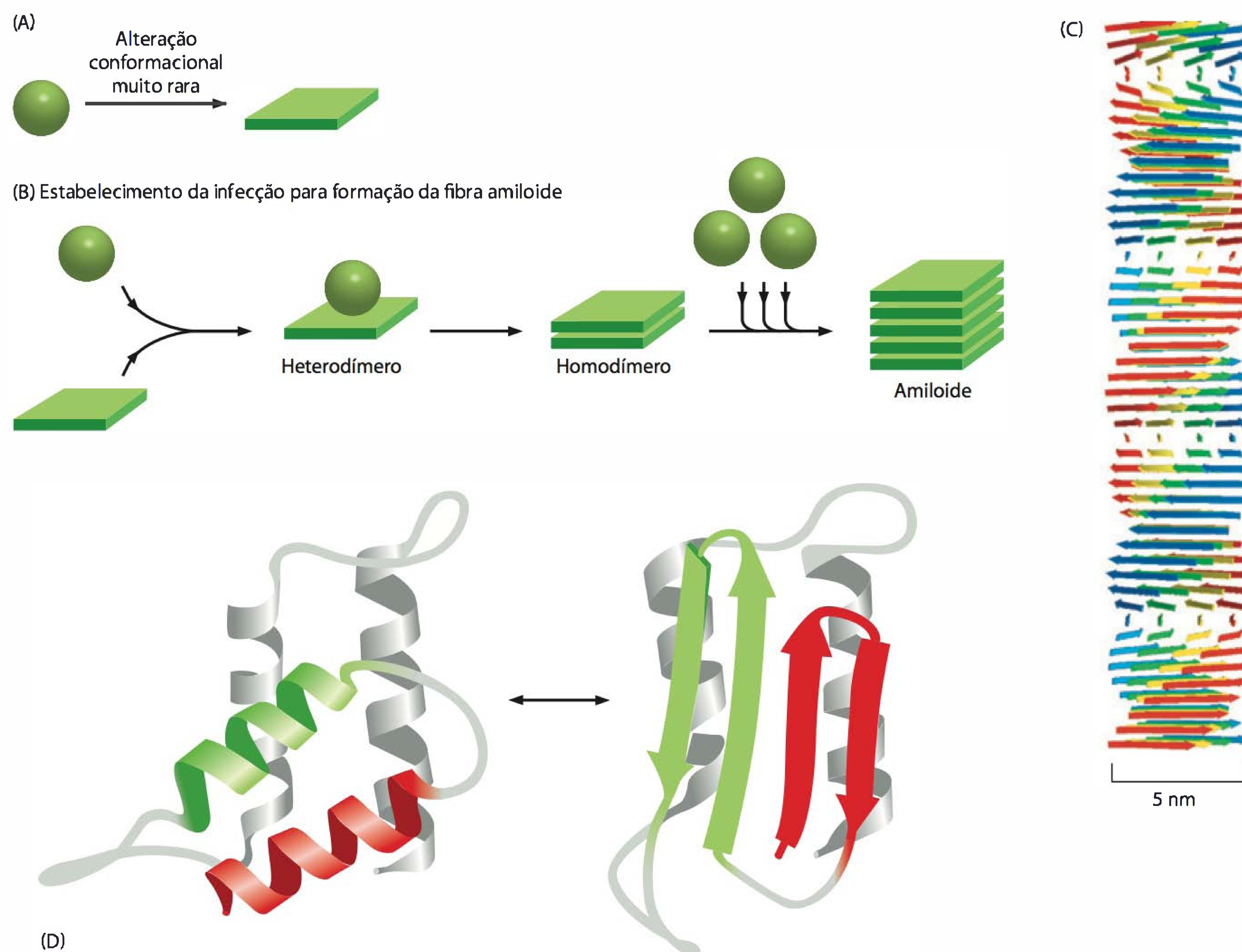


Figura 6-95 Agregados proteicos que causam doenças em humanos. (A) Ilustração esquemática do tipo de alteração conformacional em uma proteína que produz material para um filamento beta cruzado. (B) Diagrama ilustrando a natureza autoinfecciosa do agregado de proteínas determinante nas doenças priônicas. A PrP (proteína priônica) é bastante incomum, pois sua versão dobrada de forma inadequada, denominada PrP*, induz, por meio de contato, uma alteração conformacional na proteína PrP normal, como ilustrado. A maioria das doenças humanas causadas por agregação de proteínas é provocada pela superprodução de uma variante proteica especialmente propensa à agregação, mas os agregados não podem disseminar de um animal para outro. (C) Esquema de um filamento beta cruzado, um tipo comum de agregado de proteína resistente à protease encontrado em várias doenças neurológicas humanas. Uma vez que se formam interações por ligação de hidrogênio em folhas β entre átomos do esqueleto polipeptídico (ver Figura 3-9), essas estruturas podem ser produzidas por diversas proteínas com dobramento anormal. (D) Um dos vários modelos possíveis para a conversão de PrP em PrP*, ilustrando a possível transformação de duas hélices α em quatro folhas β. Embora a estrutura da proteína normal tenha sido determinada com exatidão, a estrutura da forma infecciosa ainda não é conhecida com absoluta certeza, pois a agregação impossibilita o uso de técnicas-padrão de análise estrutural. (C, cortesia de Louise Serpell, adaptada de M. Sunde et al., *J. Mol. Biol.* 273:729-739, 1997. Com permissão de Academic Press; D, adaptada de S. B. Prusiner, *Trends Biochem. Sci.* 21:482-487, 1996. Com permissão de Elsevier.)

Para que um determinado tipo de agregado proteico sobreviva, cresça e provoque um dano no organismo, ele deve ser altamente resistente à proteólise tanto interna quanto externamente à célula. Muitos dos agregados proteicos que causam problemas formam fibrilas construídas a partir de uma série de cadeias polipeptídicas justapostas como pilhas contínuas de lâminas β. Esses assim denominados *filamentos* β *cruzados* (Figura 6-95C), uma estrutura altamente resistente à proteólise, são observados em diferentes doenças neurológicas causadas por agregados proteicos, nas quais produzem depósitos anormalmente corados conhecidos como *amiloides*.

Uma variedade particular dessas doenças atingiu especial notoriedade. São as **doenças priônicas**. Diferentemente das doenças de Huntington e de Alzheimer, uma doença priônica pode passar de um organismo a outro, desde que o segundo organismo coma um tecido contendo o agregado proteico. Um grupo de doenças – chamadas *scrapie* em ovinos, doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD, *Creutzfeldt-Jacob disease*) em seres humanos e encefalopatia espongiforme bovina (BSE, *bovine spongiform encephalopathy*) no gado – é causado por agregados de uma forma erroneamente dobrada de uma proteína chamada de PrP (de proteína priônica). A PrP normalmente é encontrada na superfície externa da membrana plasmática, principalmente em neurônios. Sua função normal não é conhecida. Entretanto, a PrP tem a indesejável propriedade de ser convertida para uma conformação anormal bastante especial (Figura 6-95A). Essa conformação não apenas forma filamentos β cruzados resistentes

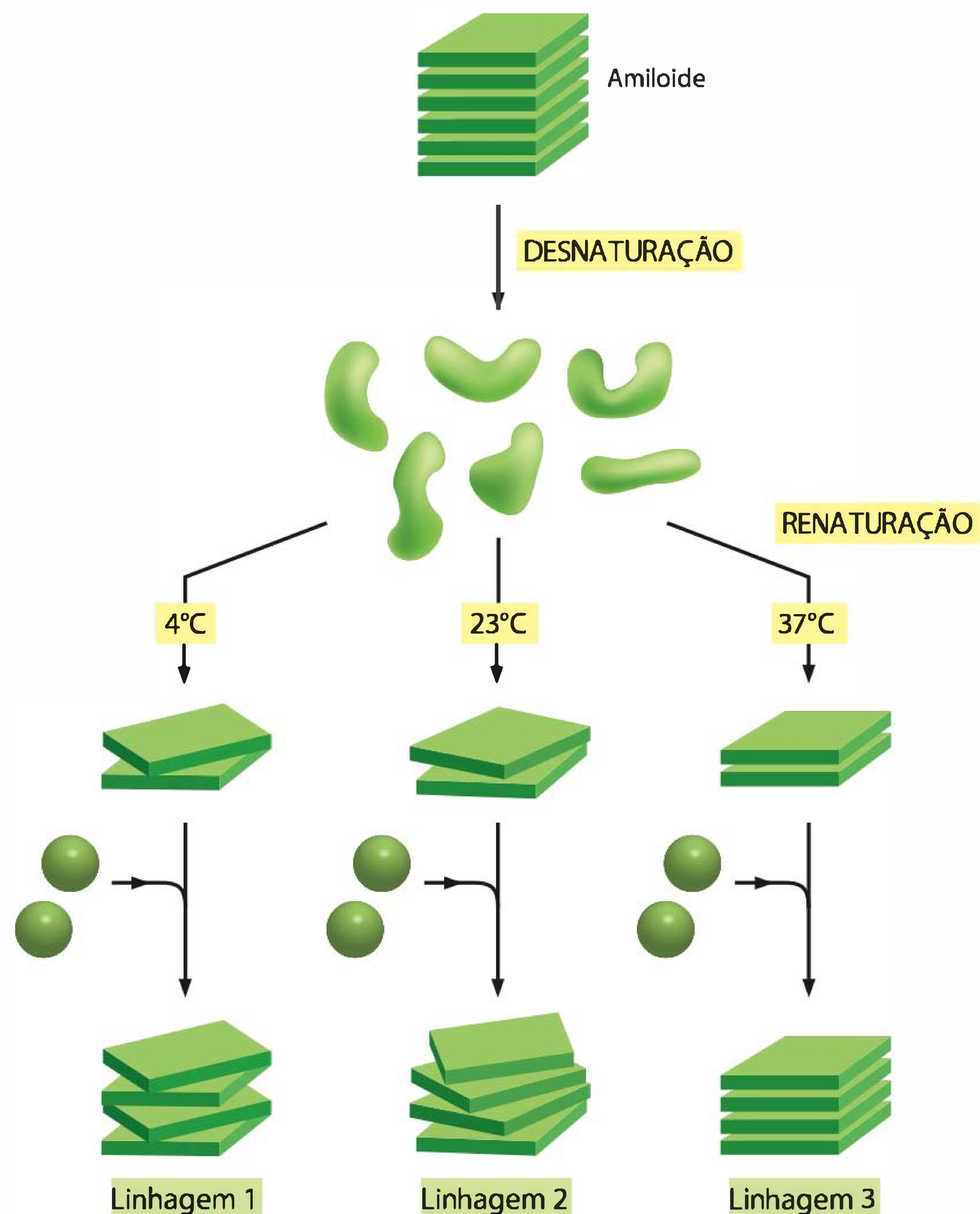


Figura 6-96 Criação de diferentes linhagens de príons *in vitro*. Neste experimento, fibras amiloides foram desnaturadas e os componentes foram renaturados a diferentes temperaturas. Esse tratamento produziu três diferentes tipos de amiloide, cada um dos quais apresentando autopropagação quando novas subunidades eram adicionadas.

à protease, mas também é "infecciosa", pois converte moléculas adequadamente dobradas de PrP para a forma patológica. Essa propriedade gera um ciclo de retroalimentação positiva que propaga a forma anormal de PrP, chamada de PrP* (ver Figura 6-95B), e assim permite que a conformação patológica se espalhe rapidamente de uma célula a outra no cérebro, provocando a morte tanto de animais quanto de seres humanos. Pode ser perigoso comer os tecidos de animais que contêm PrP*, como foi testemunhado recentemente pela disseminação da BSE (geralmente chamada de "doença da vaca louca") do gado para seres humanos, na Grã-Bretanha. Felizmente, na ausência de PrP*, é extraordinariamente difícil converter PrP em sua forma anormal.

Embora pouquíssimas proteínas tenham o potencial de dobrarem-se erroneamente, gerando uma conformação infecciosa, outro exemplo foi identificado como causa de uma misteriosa "herança unicamente proteica" observada em células de levedura. A possibilidade de estudar infecções proteicas em levedura permitiu a compreensão de outra característica impressionante dos príons. Essas moléculas proteicas podem formar vários tipos distintos de agregados a partir de uma mesma cadeia polipeptídica. Além disso, cada tipo de agregado pode ser infeccioso, forçando as moléculas proteicas normais a adotarem o mesmo tipo de estrutura anormal. Assim, várias "linhagens" diferentes de partículas infecciosas podem surgir a partir de uma mesma cadeia polipeptídica (**Figura 6-96**). Como uma única sequência polipeptídica pode adotar múltiplas formas de agregado ainda é uma questão a ser resolvida; é possível que todos os agregados de príons se assemelhem a filamentos β cruzados (ver Figura 6-95C) onde a estrutura é mantida predominantemente por interações com a cadeia de peptídeos principal. Isso deixaria as cadeias laterais dos aminoácidos livres para adotar diferentes conformações e, se as estruturas possuem autopropagação, a existência de diferentes linhagens poderia ser explicada.

Finalmente, apesar de os príons terem sido descobertos devido ao seu potencial de provocar doenças, eles também parecer desempenhar papéis positivos nas células. Por exemplo, algumas espécies de fungos utilizam transformações priônicas para estabelecer diferentes tipos de células. Apesar de a ideia ser controversa, já foi proposto que os príons desempenhem um papel na consolidação de memórias em organismos pluricelulares complexos, como é o nosso caso.

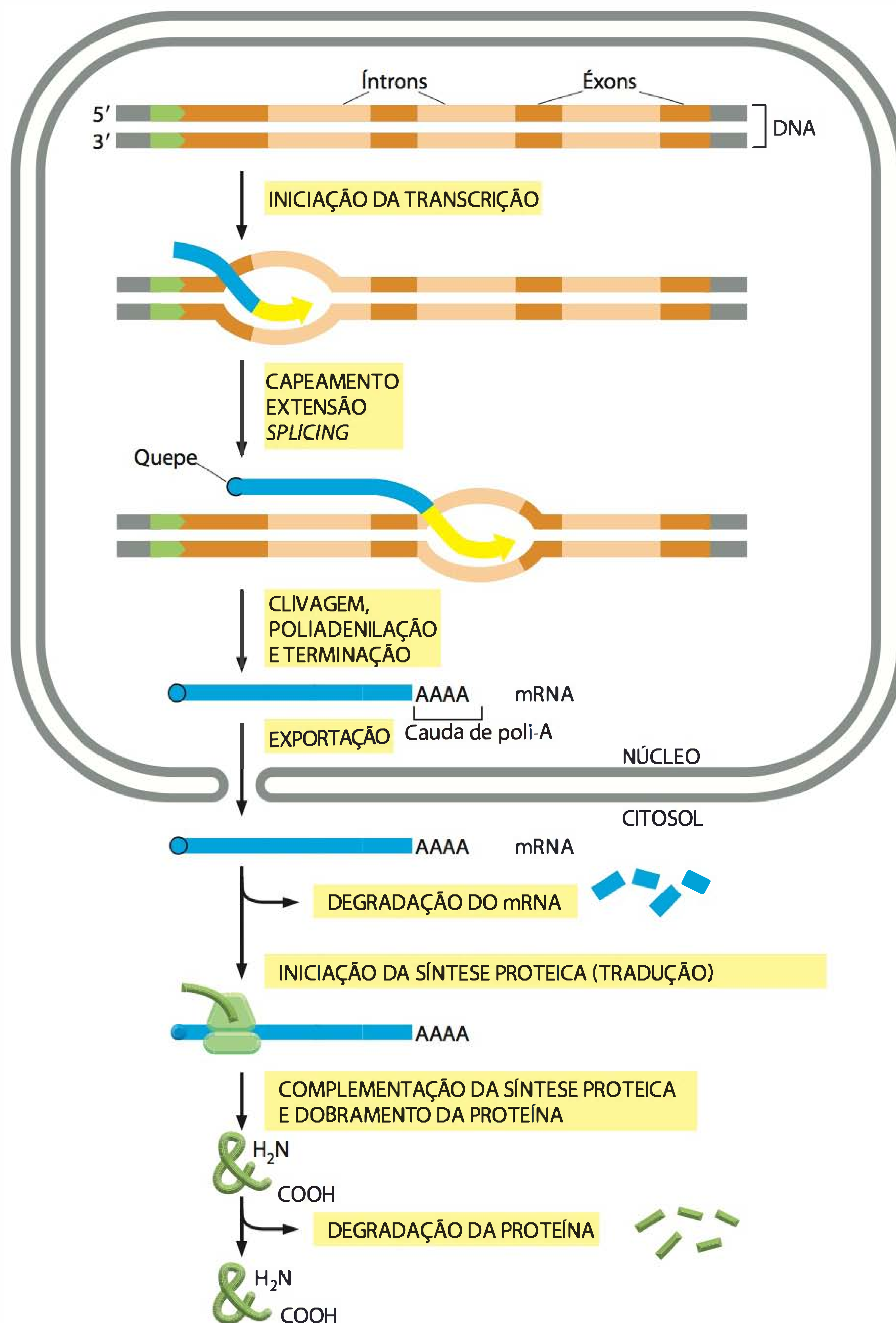


Figura 6-97 Produção de uma proteína por uma célula eucariótica. A quantidade final de cada proteína em uma célula eucariótica é dependente da eficiência de cada etapa ilustrada.

Existem muitas etapas do DNA à proteína

Vimos até o momento, neste capítulo, que muitos tipos diferentes de reações químicas são necessários para produzir uma proteína corretamente dobrada a partir da informação contida em um gene (**Figura 6-97**). O nível, ou a concentração, final correspondente a uma proteína corretamente dobrada na célula depende, assim, da eficiência na realização de cada um dos muitos passos.

No próximo capítulo, veremos que as células possuem a capacidade de alterar os níveis de suas proteínas de acordo com suas necessidades. Em princípio, todo e qualquer dos passos da Figura 6-97 pode ser regulado para cada proteína individual. Como veremos no Capítulo 7, existem exemplos de regulação em cada uma das etapas do gene à proteína. No entanto, a iniciação da transcrição é o ponto mais comum de regulação de expressão de cada um dos genes na célula. Isso faz sentido, considerando que a maneira mais eficiente de evitar a expressão de um gene é o bloqueio do primeiro passo – a transcrição de sua sequência de DNA em uma molécula de RNA.

Resumo

A tradução da sequência nucleotídica de uma molécula de mRNA em proteína ocorre no citoplasma em um grande arranjo ribonucleoproteico denominado ribossomo. Os aminoácidos utilizados para a síntese proteica são primeiramente ligados a uma família de moléculas de tRNA, cada uma das quais reconhece, por interações de complementaridade de bases, sequências determinadas de

três nucleotídeos no mRNA (códons). A sequência de nucleotídeos no mRNA é então lida de uma extremidade à outra de três em três nucleotídeos, de acordo com o código genético.

Para iniciar a tradução, uma subunidade ribossomal pequena se liga a uma molécula de mRNA em um códon de iniciação (AUG) que é reconhecido por uma molécula de tRNA iniciadora característica. Uma subunidade ribossomal grande se liga para completar o ribossomo e iniciar a síntese proteica. Durante essa fase, os aminoacil-tRNAs – cada um carregando um aminoácido específico – ligam-se sequencialmente ao códon apropriado no mRNA, por meio de complementaridade de bases entre o anticódon do tRNA e os códons do mRNA. Cada aminoácido é adicionado à extremidade C-terminal do polipeptídeo em crescimento por quatro passos sequenciais: ligação do aminoacil-tRNA seguida da formação da ligação peptídica e de dois passos de translocação do ribossomo. Os fatores de extensão usam hidrólise de GTP para direcionar essas reações e melhorar a exatidão da seleção dos aminoácidos. A molécula de mRNA progride códon a códon ao longo do ribossomo da direção 5′ para 3′ até alcançar um dos três códons de terminação. Então, um fator de liberação se liga ao ribossomo, finalizando a tradução e liberando o polipeptídeo completo.

Os ribossomos eucarióticos e bacterianos são intimamente relacionados, apesar das diferenças em número e em tamanho de seus rRNAs e de seus componentes proteicos. O rRNA tem a função dominante na tradução, determinando a estrutura geral do ribossomo, formando os sítios de ligação para os tRNAs, juntando os tRNAs aos códons no mRNA e criando o sítio da enzima peptidiltransferase que liga os aminoácidos durante a tradução.

Nos passos finais da síntese de proteína, dois tipos distintos de chaperonas moleculares guiam o dobramento das cadeias polipeptídicas. Essas chaperonas, conhecidas como Hsp60 e Hsp70, reconhecem regiões hidrofóbicas expostas nas proteínas e servem para evitar a agregação da proteína que poderia competir com o dobramento das proteínas recentemente sintetizadas em suas conformações tridimensionais corretas. Esse processo de dobramento da proteína deve também competir com um mecanismo de controle de qualidade altamente elaborado que destrói proteínas que contenham regiões hidrofóbicas anormalmente expostas. Nesse caso, a ubiquitina é covalentemente ligada a uma proteína erroneamente dobrada por uma ubiquitina-ligase, e a cadeia poliubiquitina resultante é reconhecida pela capa em um proteossomo que move a proteína como um todo para o interior do proteossomo onde sofrerá degradação proteolítica. Um mecanismo proteolítico intimamente relacionado, com base em sinais de degradação especiais reconhecidos pelas ubiquitina-ligases, é utilizado para determinar o tempo de vida de muitas proteínas corretamente dobradas. Através desse método, as proteínas normais selecionadas são removidas da célula em resposta a sinais específicos.

O MUNDO DE RNA E A ORIGEM DA VIDA

Vimos que a expressão da informação hereditária requer uma maquinaria extraordinariamente complexa que vai do DNA à proteína, por intermédio do RNA. Essa maquinaria apresenta um paradoxo central: se são necessários ácidos nucleicos para a síntese de proteínas e, por sua vez, são necessárias proteínas para a síntese de ácidos nucleicos, como esse sistema de componentes interdependentes surgiu? Uma hipótese para isso é que um *mundo de RNA* tenha existido na Terra antes do aparecimento das células modernas (**Figura 6-98**). De acordo com essa hipótese, o RNA tanto estocava a informação genética quanto catalisava as reações químicas nas células primitivas. Somente evolutivamente mais tarde o DNA se sobrepôs como o material genético, e as proteínas tornaram-se as principais catalisadoras e os principais componentes estruturais das células. Se essa ideia está correta, a transição do mundo de RNA nunca foi completa; como vimos neste capítulo, o RNA ainda catalisa várias reações fundamentais nas células atuais, as quais podem ser vistas como fósseis moleculares de um mundo antigo.

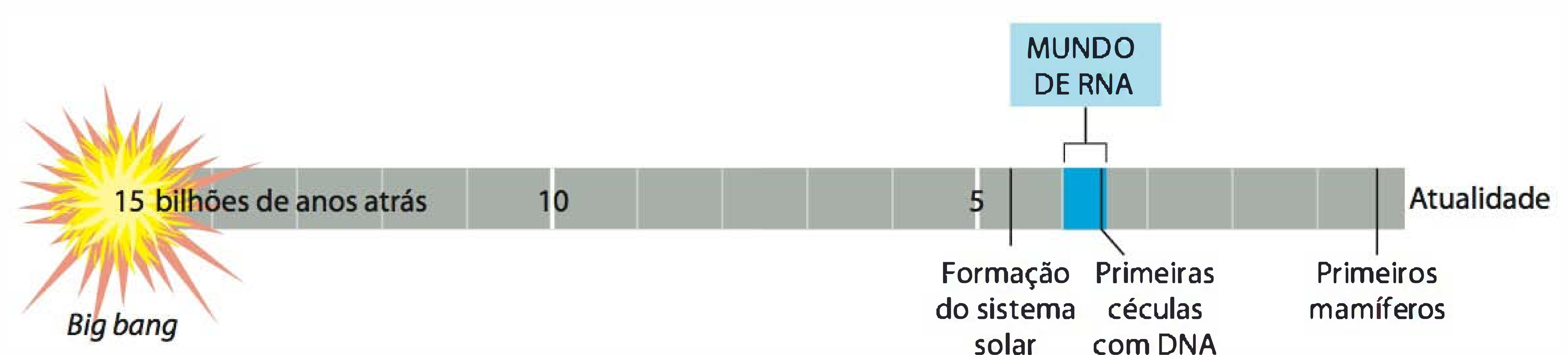


Figura 6-98 Linha de tempo para o universo, sugerindo a existência inicial de um mundo de RNA para os sistemas vivos.

Nesta seção apresentaremos alguns dos argumentos em defesa da hipótese do mundo de RNA. Veremos que várias das mais surpreendentes características das células atuais, como o ribossomo e a maquinaria do *splicing* do pré-mRNA, são mais facilmente explicadas quando vistas como descendentes de uma rede complexa de interações mediadas por RNA que dominaram o metabolismo celular no mundo de RNA. Discutiremos também como o DNA pode ter dominado como material genético, como o código genético pode ter se originado e como as proteínas podem ter eclipsado o RNA, realizando a maioria da catálise bioquímica nas células atuais.

A vida necessita de informação estocada

Foi proposto que as primeiras moléculas "biológicas" na Terra foram formadas por meio de catálise com base em metais sobre as superfícies cristalinas de minerais. Em princípio, um sistema elaborado de síntese molecular e quebra (metabolismo) pode ter existido nessas superfícies muito antes das primeiras células terem aparecido. Apesar de controversa, muitos cientistas acreditam na ocorrência de uma longa fase de "evolução química" na Terra pré-biótica, durante a qual pequenas moléculas que catalisavam sua própria síntese competiam umas com as outras por matéria-prima.

Mas a vida necessita muito mais do que isso. Como descrito no Capítulo 1, a *herdabilidade* talvez seja a característica central da vida. Uma célula não deve apenas ser capaz de utilizar matérias-primas para criar uma rede de reações catalisadas, mas deve ser capaz de fazê-lo pela aplicação de um elaborado conjunto de instruções codificadas em sua informação hereditária. A replicação dessa informação assegura que o complexo metabolismo das células possa ser autorreproduzido com exatidão. Outra característica essencial para a vida é a variabilidade resultante de alterações na informação hereditária. Essa variabilidade, salientada por pressões seletivas, é responsável pela grande diversidade de vida em nosso planeta.

Assim, a emergência de vida requer uma forma de estoque de informação, uma forma de duplicação dessa informação, capacidade de alterá-la e uma forma de converter essa informação por catálise em reações químicas favoráveis. Mas como um sistema assim pode ter começado a existir? Nas células atuais os catalisadores mais versáteis são polipeptídeos, compostos de vários aminoácidos distintos, com cadeias laterais quimicamente diversas e, consequentemente, capazes de adotar estruturas tridimensionais diversas recobertas por grupos químicos reativos. Os polipeptídeos também podem carregar informação sob a forma da sequência de suas subunidades de aminoácidos. No entanto, não existe forma conhecida pela qual um polipeptídeo possa reproduzir-se pela especificação direta da formação de outra cópia exatamente idêntica em sequência.

Os polinucleotídeos podem tanto estocar a informação quanto catalisar reações químicas

Os polinucleotídeos têm uma propriedade que contrasta com a dos polipeptídeos: eles podem guiar diretamente a formação de cópias exatas de suas próprias sequências. Essa capacidade depende do pareamento por complementaridade de bases das subunidades nucleotídicas, o que possibilita que um polinucleotídeo atue como um molde para a formação de outro. Como vimos neste capítulo e no anterior, tais mecanismos de complementaridade de um molde são a base da replicação e da transcrição do DNA nas células atuais.

No entanto, a síntese eficiente de polinucleotídeos por meio de tais mecanismos de complementaridade de um molde necessita de catalisadores que promovam a reação de polimerização: sem catalisadores, a formação do polímero é lenta, sujeita a erros e ineficiente. Hoje, a polimerização nucleotídica com base em um molde é rapidamente catalisada por enzimas proteicas, como a DNA-polimerase e a RNA-polimerase. Como esse mecanismo poderia ser catalisado antes da existência de proteínas com a especificidade enzimática adequada? O começo de uma resposta a essa questão foi obtido em 1982, quando descobriu-se que as próprias moléculas de RNA podiam agir como catalisadores. Já vimos neste capítulo, por exemplo, que uma molécula de RNA catalisa uma das reações centrais da célula, a união covalente de aminoácidos para a formação de proteínas. A capacidade *sui generis* das moléculas de RNA de atuarem tanto como carreadores de informação quanto como catalisadores é a base da hipótese do mundo de RNA.

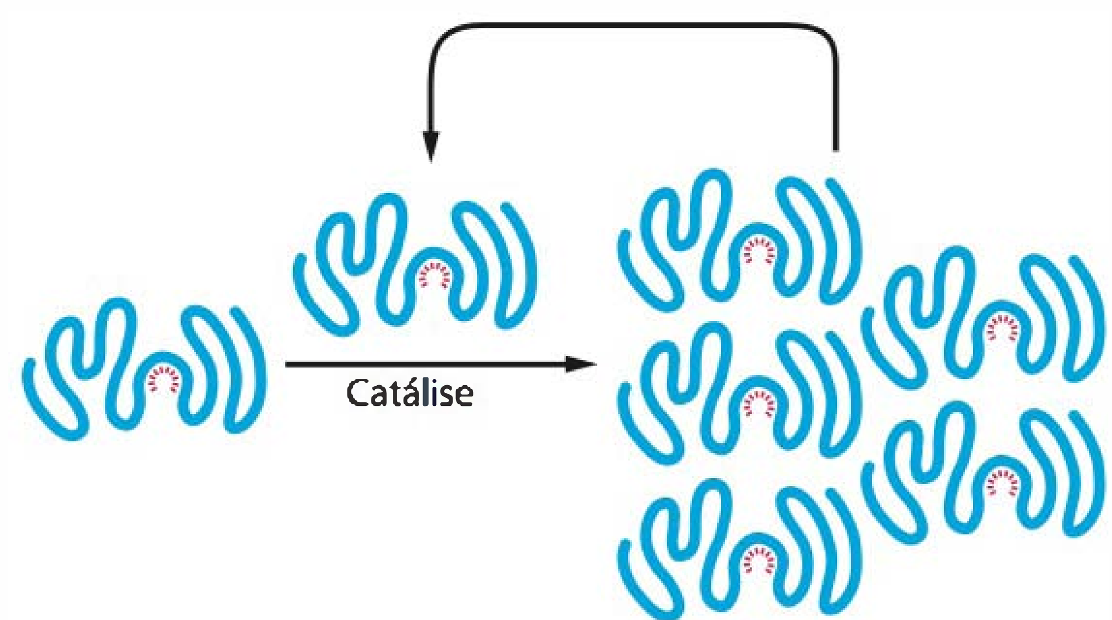


Figura 6-99 Molécula de RNA que pode catalisar sua própria síntese. Este processo hipotético necessitaria da catálise da produção tanto de uma segunda fita de RNA com sequência de nucleotídeos complementar, como do uso desta segunda molécula de RNA como molde para a formação de muitas moléculas de RNA com a sequência original. Os raios *vermelhos* representam o sítio ativo desta enzima de RNA hipotética.

O RNA, portanto, tem todas as propriedades necessárias para ser uma molécula que pode catalisar um amplo espectro de reações, inclusive aquelas que levam à sua própria síntese (**Figura 6-99**). Embora sistemas de autorreplicação de moléculas de RNA não tenham sido encontrados na natureza, os cientistas acreditam que possam ser montados em laboratório. Apesar de essa demonstração não provar que as moléculas de RNA autorreplicadoras tenham sido essenciais na origem da vida na Terra, ela certamente sugerirá que esse cenário é possível.

Um mundo de pré-RNA provavelmente precedeu o mundo de RNA

Embora pareça que o RNA é suficiente para formar a base de um grupo de catalisadores bioquímicos autorreplicantes, não é provável que o RNA tenha sido a primeira molécula a fazer isso. De um ponto de vista puramente químico, é difícil imaginar como longas moléculas de RNA possam ter sido formadas inicialmente por sistemas completamente não-enzimáticos. Em primeiro lugar, os precursores de RNA, os ribonucleotídeos, são difíceis de ser formados não-enzimaticamente. Além disso, a formação de RNA necessita que uma longa série de ligações fosfodiéster de 3′ para 5′ se forme em face de um conjunto de reações competitivas, como hidrólise, ligações 2′ para 5′ e ligações 5′ para 5′. Considerando esses problemas, foi sugerido que as primeiras moléculas a possuirem tanto a atividade catalítica quanto a capacidade de armazenar informações tenham sido polímeros semelhantes ao RNA, mas quimicamente mais simples (**Figura 6-100**). Não temos qualquer remanescente desses compostos nas células atuais, nem esses compostos deixaram marcas fósseis. No entanto, a relativa simplicidade desses "polímeros semelhantes ao RNA" os faz melhores candidatos do que o próprio RNA a terem sido os primeiros biopolímeros na Terra, com capacidade tanto de armazenamento de informação quanto de atividade catalítica.

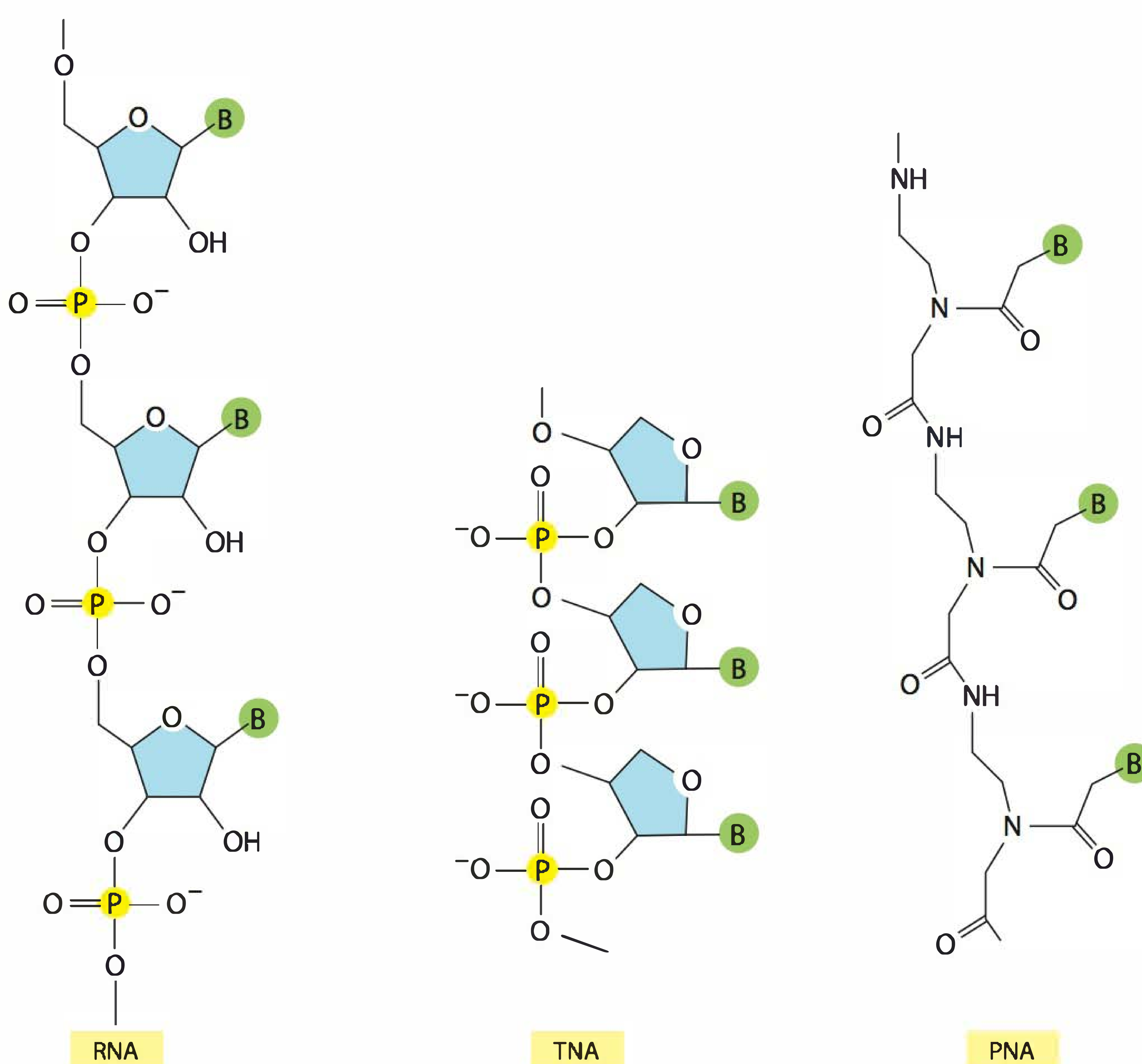


Figura 6-100 Estrutura de RNA e de dois polímeros relacionados carreadores de informação. Em cada caso, B indica uma base purina ou pirimidina. O polímero TNA (ácido nucleico treose, de *threose nucleic acid*) possui uma unidade de açúcar com 4 carbonos, em contraste com os 5 carbonos da ribose do RNA. No PNA (ácido nucleico peptídico, de *peptide nucleic acid*), a estrutura de fosfato ribose do RNA foi substituída pela estrutura peptídica encontrada em proteínas. Assim como o RNA, tanto o TNA quanto o PNA podem formar duplas-hélices por meio do pareamento de bases complementares, e cada um pode, em princípio, servir de molde para a sua própria síntese.

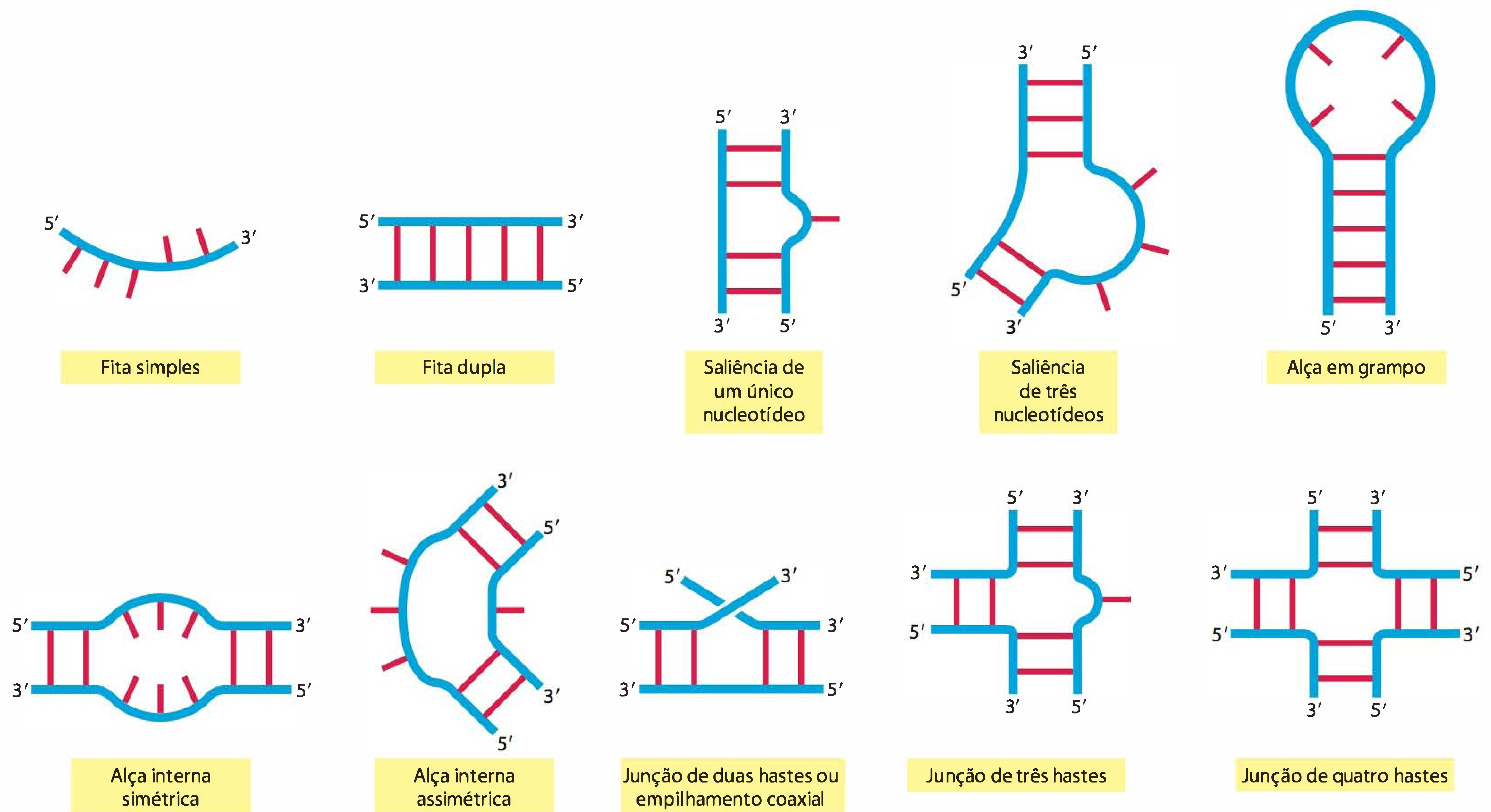


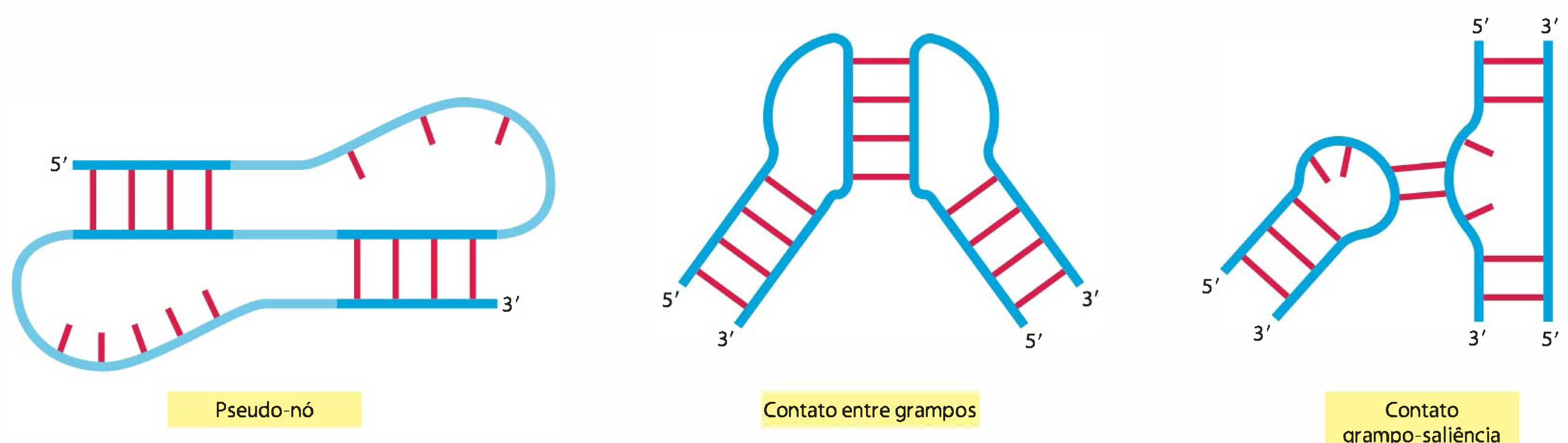
Figura 6-101 Elementos comuns de estrutura secundária em RNA. As interações de pareamento de bases complementares convencionais estão indicadas por "degraus" *vermelhos* nas porções de dupla-hélice do RNA.

Se a hipótese do mundo de pré-RNA está correta, então a transição entre o mundo de pré-RNA e o mundo de RNA pode ter ocorrido com o uso, na síntese de RNA, de um desses compostos mais simples como molde e como catalisador. Enquanto os detalhes dos mundos de pré-RNA e de RNA permanecem desconhecidos, temos certeza de que as moléculas de RNA podem catalisar uma ampla gama de reações químicas, e agora indicaremos as propriedades do RNA que tornam isso possível.

As moléculas de RNA de fita simples podem dobrar-se em estruturas altamente elaboradas

Vimos que o pareamento por complementaridade de bases e outros tipos de ligações de hidrogênio podem ocorrer entre nucleotídeos na mesma cadeia, fazendo com que uma molécula de RNA se dobre de um modo característico determinado por sua sequência de nucleotídeos (p. ex., ver Figuras 6-6, 6-52 e 6-69). A comparação de muitas estruturas de RNA tem revelado motivos conservados, pequenos elementos estruturais utilizados várias e várias vezes como parte de estruturas maiores. A **Figura 6-101** ilustra alguns desses motivos de estrutura secundária de RNA e a **Figura 6-102** mostra alguns exemplos comuns de interações mais complexas e frequentemente de maior amplitude, conhecidas como interações terciárias de RNA.

Figura 6-102 Exemplos de interações terciárias de RNA. Algumas dessas interações podem aproximar partes distantes de uma mesma molécula de RNA, ou unir duas moléculas diferentes de RNA.



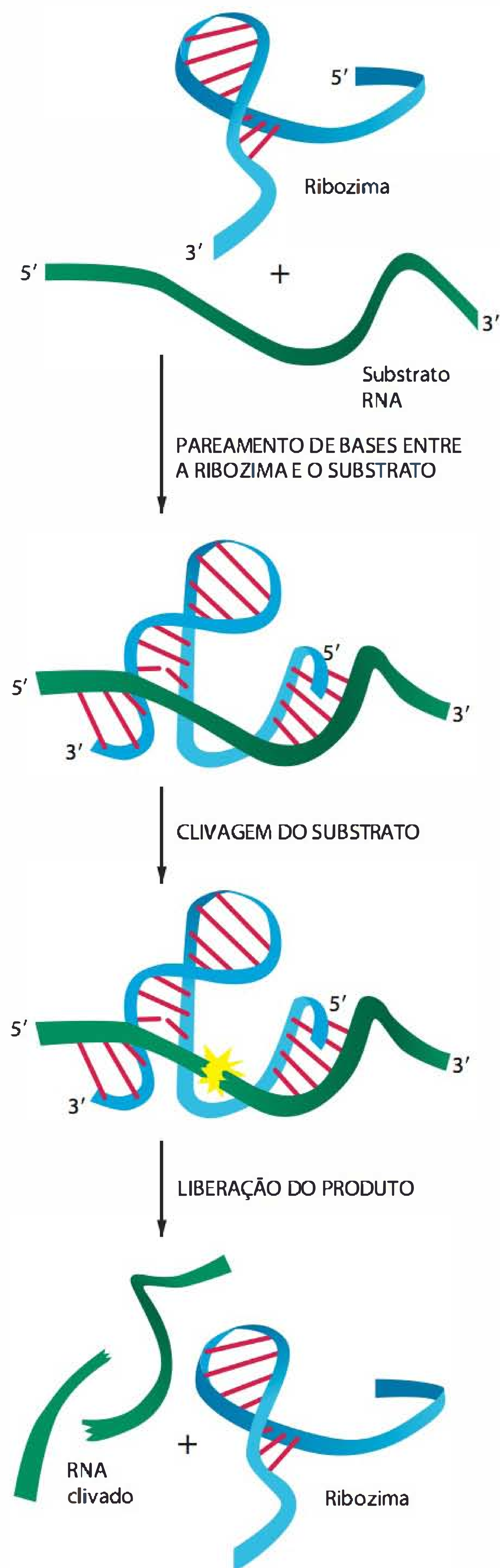


Figura 6-103 Uma ribozima. Esta molécula simples de RNA catalisa a clivagem de uma segunda molécula de RNA em um sítio específico. Essa ribozima encontra-se inserida em genomas maiores de RNA – denominados viroides – os quais infectam plantas. A clivagem, que ocorre na natureza em uma posição distante sobre a mesma molécula de RNA que contém a ribozima, é uma das etapas da replicação do genoma viroide. Embora não tenha sido ilustrada na figura, a reação necessita de uma molécula de Mg posicionada no sítio ativo. (Adaptada de T. R. Cech e O. C. Uhlenbeck, *Nature* 372:39-40, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As proteínas catalisadoras necessitam de uma superfície com contornos característicos e propriedades químicas sobre os quais um grupo determinado de substratos possa reagir (discutido no Capítulo 3). Exatamente da mesma maneira, uma molécula de RNA, adequadamente dobrada, pode funcionar como uma enzima (**Figura 6-103**). Assim como algumas proteínas, muitas dessas ribozimas agem posicionando íons metálicos em seus sítios ativos. Essa característica lhes fornece uma maior amplitude de atividades catalíticas do que poderia ser obtida unicamente por meio dos grupos químicos limitados de uma cadeia polinucleotídica.

Entretanto, conhecemos relativamente poucos RNAs catalisadores nas células atuais, e muito de nossa inferência a respeito do mundo de RNA vem de experimentos nos quais grandes conjuntos de moléculas de RNA de sequências nucleotídicas aleatórias são gerados em laboratório. Aquelas raras moléculas de RNA com uma propriedade definida pelo experimentador são então selecionadas e estudadas (**Figura 6-104**). Experimentos desse tipo têm produzido RNAs capazes de catalisar uma ampla variedade de reações bioquímicas (**Tabela 6-5**), com velocidades de reação semelhantes às de proteínas. Considerando-se esses achados, não ficam claras as razões que levaram os catalisadores proteicos a suplantar as ribozimas nas células atuais. No entanto, experimentos mostraram que as moléculas de RNA têm maior dificuldade do que as proteínas de ligar-se a substratos hidrofóbicos flexíveis; além disso, a disponibilidade de 20 tipos de aminoácidos, em relação aos quatro tipos de bases, pode ter fornecido às proteínas um maior número de estratégias catalíticas.

Assim como as proteínas, os RNAs podem sofrer alterações conformacionais em resposta tanto a pequenas moléculas quanto a outros RNAs. Vimos vários exemplos disso no ribossomo e no spliceossomo, e veremos outros no Capítulo 7 quando abordaremos os *riboswitches*. Uma das mais drásticas alterações conformacionais do RNA foi observada em uma ribozima artificial que pode existir em duas conformações totalmente diferentes, cada uma com uma atividade catalítica diferente (**Figura 6-105**). Desde a descoberta da catálise mediada por RNA, ficou evidente que o RNA é uma molécula altamente versátil e, portanto, não é difícil imaginar que um mundo de RNA possa ter alcançado um alto nível de sofisticação bioquímica.

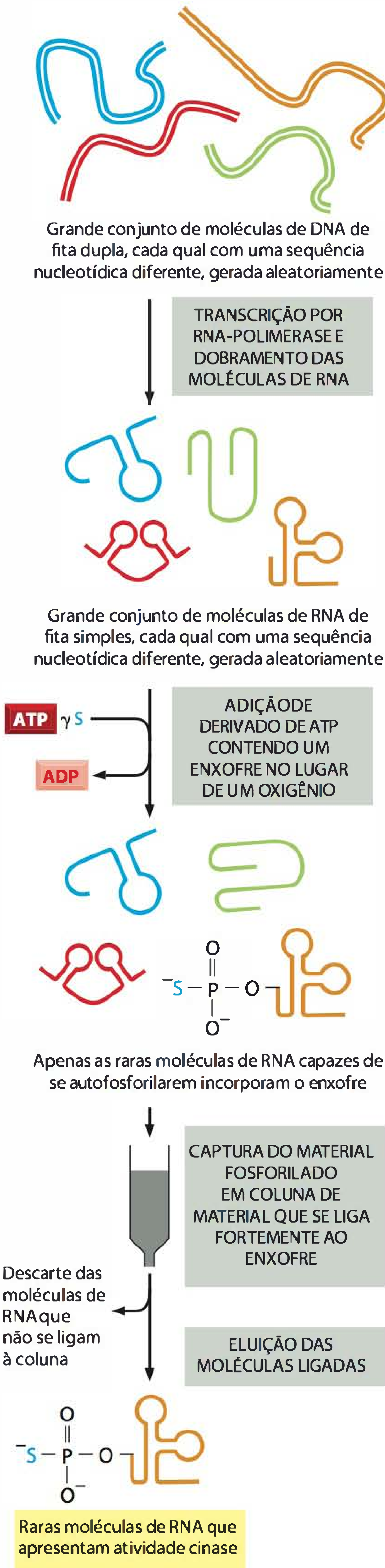
As moléculas autorreplicadoras sofrem seleção natural

A estrutura tridimensional de um polinucleotídeo afeta sua estabilidade, sua ação sobre outras moléculas e sua capacidade de replicação. Consequentemente, determinados polinucleotídeos terão mais sucesso em qualquer mistura autorreplicante do que outros. Considerando que, inevitavelmente, ocorrem erros em qualquer processo de cópia, novas sequências variantes desses polinucleotídeos serão geradas continuamente.

Determinadas atividades catalíticas podem ter tido uma importância ímpar no início da evolução da vida. Considere especificamente uma molécula de RNA que auxilia a catalisar o processo de polimerização por molde, utilizando qualquer molécula de RNA como molde (**Figura 6-106**). Tal molécula, atuando sobre cópias de si mesma, pode replicar. Ao mesmo tempo, ela pode promover a replicação de outros tipos de moléculas de RNA na sua vizinhança (**Figura 6-107**). Se algum desses RNAs vizinhos tem atividades catalíticas que auxiliam a sobrevivência do RNA de qualquer outra forma (p. ex., catalisando a produção de ribonucleotídeos), um grupo de diferentes tipos de moléculas de RNA, cada uma especializada em uma atividade diferente, pode evoluir em um sistema cooperativo que replica com uma alta e incomum eficiência.

No entanto para que esses sistemas cooperativos evoluam, eles devem estar presentes juntos em um compartimento delimitado. Por exemplo, um grupo de RNAs mutuamente

Figura 6-104 Seleção *in vitro* de uma ribozima sintética. A partir de um grande conjunto de moléculas de ácido nucleico sintetizadas no laboratório, as raras moléculas de RNA que possuem uma atividade catalítica específica podem ser isoladas e estudadas. Embora seja um exemplo específico (o caso de uma ribozima capaz de autofosforilação) que está sendo ilustrado, foram utilizadas variações desse procedimento para a obtenção de muitas das ribozimas listadas na Tabela 6-5. Durante a etapa de autofosforilação, as moléculas de RNA estão suficientemente diluídas para prevenir a fosforilação "cruzada" de moléculas de RNA adicionais. Na verdade, várias repetições desse procedimento são necessárias para a seleção das raras moléculas de RNA com atividade catalítica. Após, o material inicialmente eluído da coluna é reconvertido em DNA, amplificado muitas vezes (por meio do uso de transcriptase reversa e de PCR, conforme explicado no Capítulo 8), transcrito novamente em RNA e submetido a repetidos ciclos de seleção. (Adaptada de J. R. Lorsch e J. W. Szostak, *Nature* 371:31-36, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



benéficos (como aqueles da Figura 6-107) pode se replicar somente se todos os RNAs permanecerem na vizinhança do RNA que é especializado em polimerização a partir do molde. Além disso, a compartimentalização impedirá que moléculas de RNA parasita penetrem o sistema. A seleção de um conjunto de moléculas de RNA de acordo com a qualidade dos sistemas de autorreplicação que elas geram só ocorrerá de maneira eficiente se alguma forma de compartimentalização se desenvolver para contê-las.

Uma forma primordial, crua, de compartimentalização pode ter sido a simples adsorção a superfícies ou a partículas. A necessidade de tipos de contenção mais sofisticados é facilmente suprida por uma classe de pequenas moléculas que possui a propriedade físico-química simples de ser *anfipática*, isto é, consiste de uma parte hidrofóbica (insolúvel em água) e outra hidrofílica (solúvel em água). Quando tais moléculas são colocadas em água elas se agregam, organizando suas porções hidrofóbicas o mais em contato possível umas com as outras, e suas porções hidrofílicas em contato com a água. As moléculas anfipáticas de tamanho apropriado se agregam espontaneamente, formando uma *bicamada* e criando pequenas vesículas fechadas, cujo conteúdo aquoso está isolado do meio externo (**Figura 6-108**). Esse fenômeno pode ser demonstrado em um tubo de ensaio simplesmente pela mistura de fosfolipídeos e de água: sob condições adequadas, pequenas vesículas se formarão. Todas as células atuais são envolvidas por uma *membrana plasmática*, consistindo em moléculas anfipáticas – principalmente fosfolipídeos – sob essa configuração; discutiremos essas moléculas em detalhe no Capítulo 10.

Provavelmente, as primeiras células delimitadas por membrana foram formadas a partir de um agrupamento espontâneo de um grupo de moléculas anfipáticas, envolvendo uma

Tabela 6-5 Algumas reações bioquímicas que podem ser catalisadas por ribozimas

Atividade	Ribozimas
Formação de ligação peptídica na síntese de proteínas	RNA ribossomal
Clivagem de RNA, ligação de RNA	RNAs auto-*splicing*; RNase P; incluindo RNA selecionado *in vitro*
Clivagem de DNA	RNAs auto-*splicing*
Splicing de RNA	RNAs auto-*splicing*, talvez RNAs do spliceossomo
Polimerização de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Fosforilação de RNA e de DNA	RNA selecionado *in vitro*
Aminoacilação de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Alquilação de RNA	RNA selecionado *in vitro*
Formação de ligação amida	RNA selecionado *in vitro*
Formação de ligação glicosídica	RNA selecionado *in vitro*
Reações de oxidação-redução	RNA selecionado *in vitro*
Formação de ligação carbono-carbono	RNA selecionado *in vitro*
Formação de ligação fosfoamida	RNA selecionado *in vitro*
Troca dissulfeto	RNA selecionado *in vitro*

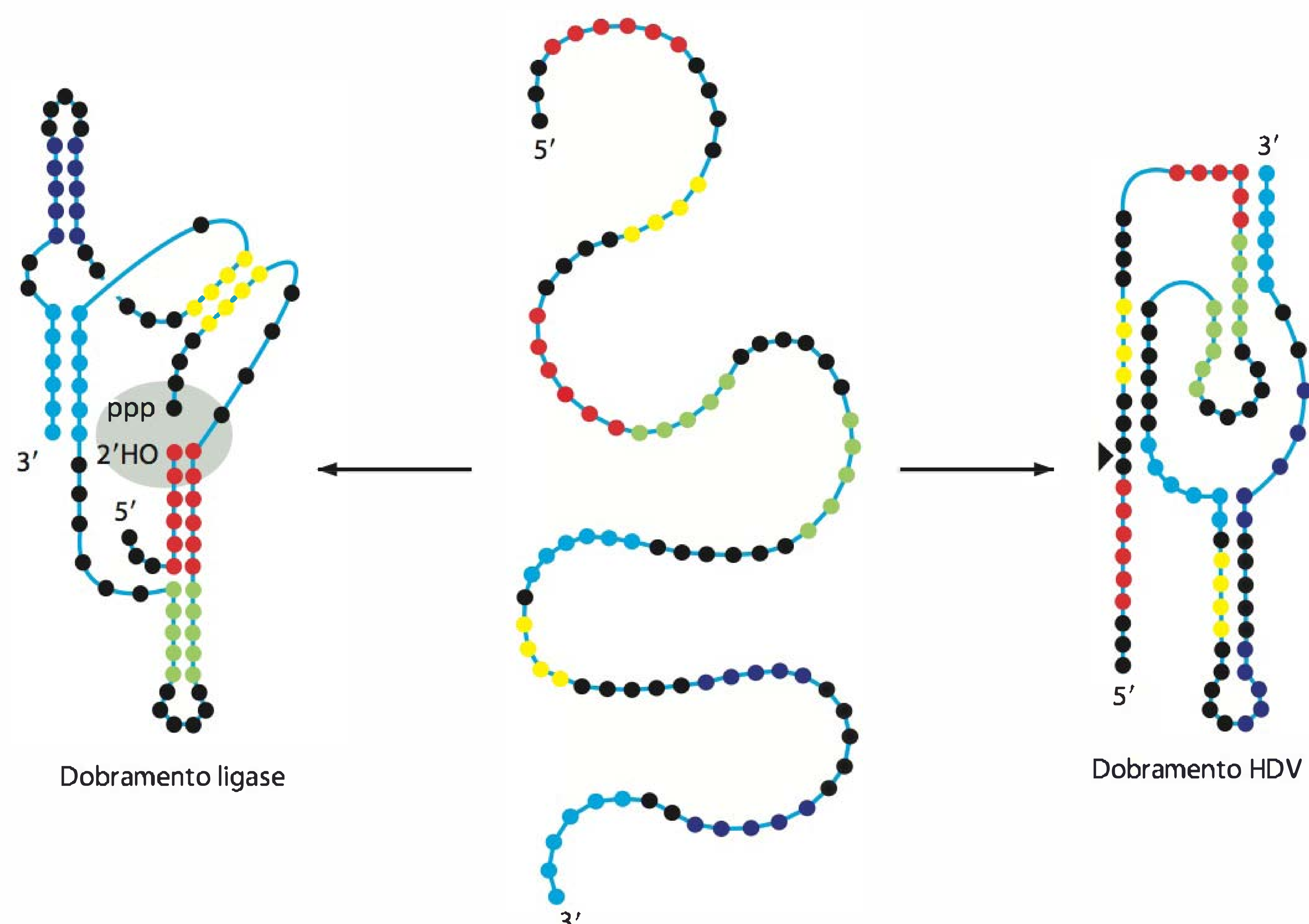


Figura 6-105 Molécula de RNA que se dobra em duas diferentes ribozimas. Esse RNA de 88 nucleotídeos, produzido em laboratório, pode dobrar-se em uma ribozima que perfaz uma reação de autoligação (à *esquerda*) ou uma reação de autoclivagem (à *direita*). A reação de ligação forma uma ligação fosfodiéster 2',5' com liberação de pirofosfato. Essa reação fecha o intervalo (em *cinza*), o qual foi experimentalmente introduzido na molécula de RNA. Na reação carreada pelo dobramento da HDV, o RNA é clivado nesta mesma posição, indicada pelas *flechas*. Essa clivagem se assemelha àquela usada no ciclo de vida do HDV, um vírus satélite da hepatite B, de onde vem seu nome. Cada nucleotídeo é representado por um *ponto colorido*, sendo as cores usadas simplesmente para melhor diferenciar os dois padrões de dobramento. As estruturas dobradas ilustram a estrutura secundária das duas ribozimas, com regiões de pareamento de bases sendo indicadas pela aproximação de *pontos coloridos*. Observe que as duas ribozimas não apresentam estrutura secundária em comum. (Adaptada de E. A. Schultes e D. P. Bartel, *Science* 289:448-452, 2000. Com permissão de AAAS.)

mistura autorreplicadora de RNA (ou pré-RNA) e de outras moléculas (**Figura 6-109**). Não está claro em que ponto da evolução dos catalisadores biológicos isso ocorreu. Em todo o caso, uma vez que as moléculas de RNA foram envolvidas dentro de uma membrana fechada, elas puderam começar a evoluir seriamente como carreadoras de instruções genéticas: puderam ser selecionadas não somente com base em sua própria estrutura, mas também de acordo com o seu efeito sobre as outras moléculas dentro desse compartimento. As sequências nucleotídicas das moléculas de RNA podem agora ser expressas sob a forma de uma célula viva individual.

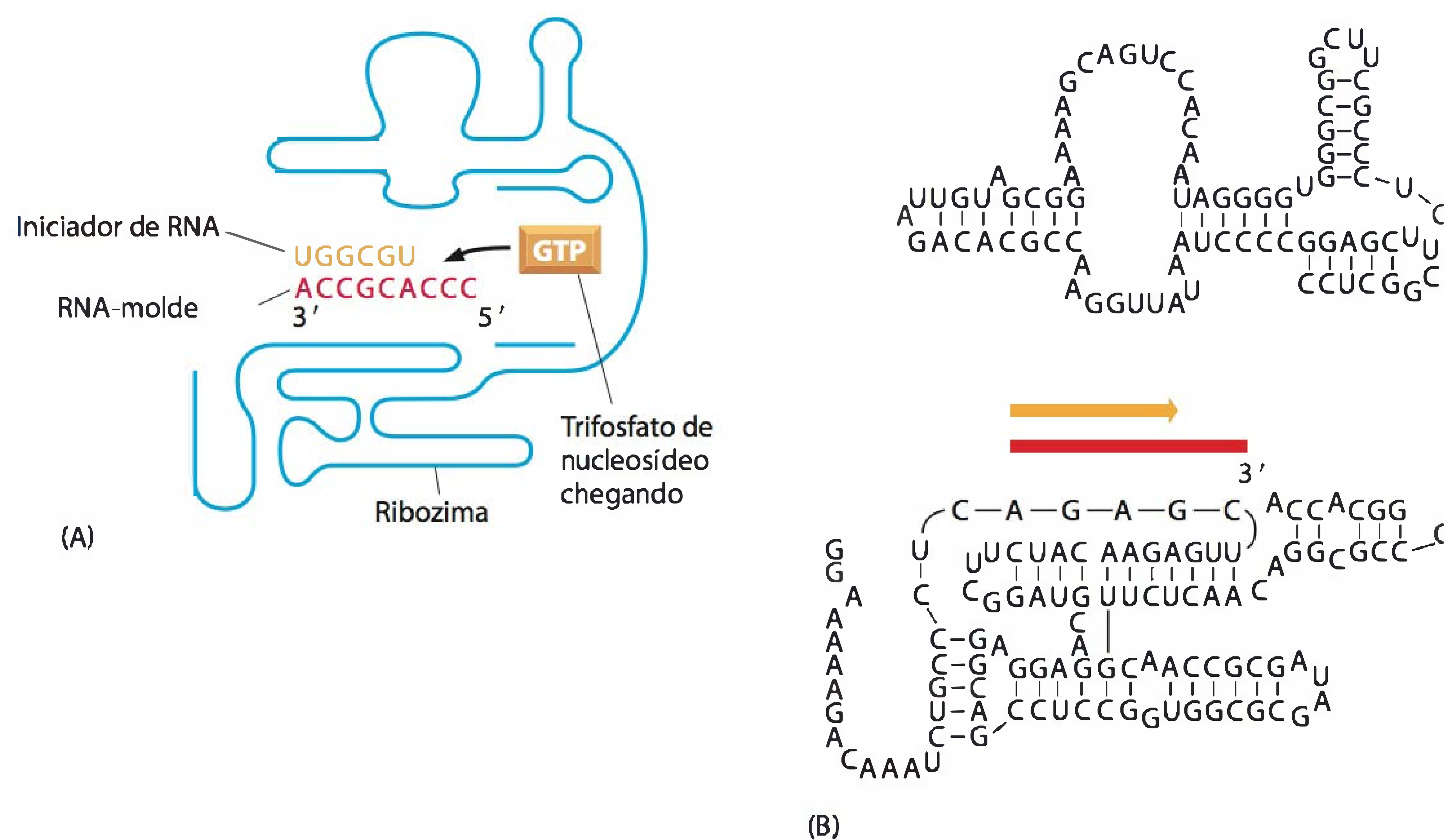


Figura 6-106 Ribozima criada em laboratório que pode catalisar a síntese de RNA mediada por molde a partir de trifosfatos de nucleosídeo. (A) Diagrama esquemático da ribozima mostrando um passo da reação de polimerização mediada por molde que ela catalisa. (B) Sequência de nucleotídeos da ribozima com os pareamentos de base indicados. Apesar de relativamente ineficiente (ela pode apenas pode sintetizar segmentos curtos de RNA), esta ribozima adiciona a base correta, conforme especificado pelo molde, mais de 95% das vezes. (De W. K. Johnston et al., *Science* 292:1319-1325, 2001. Com permissão de AAAS.)

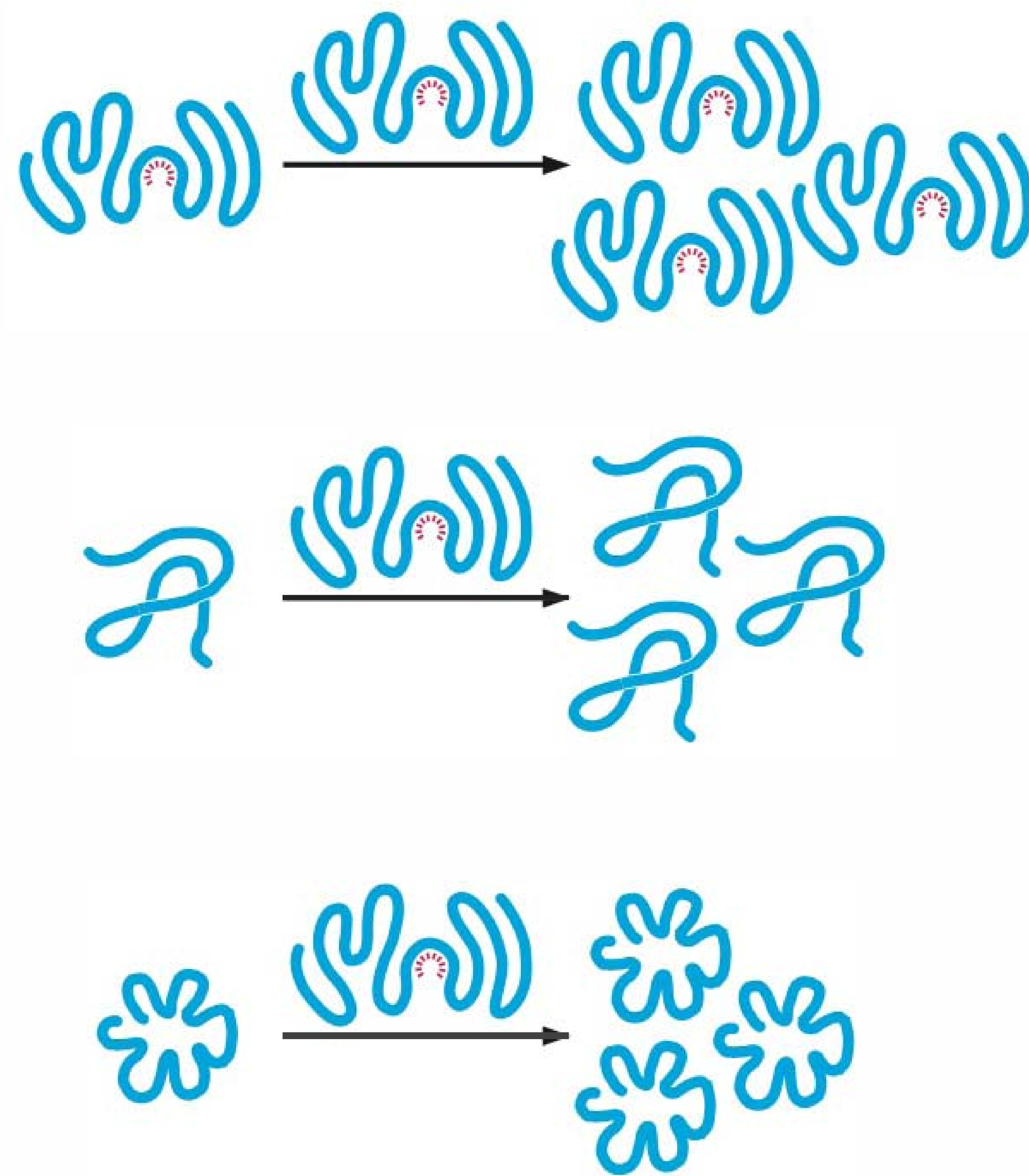


Figura 6-107 Uma família de moléculas de RNA de suporte mútuo. Uma molécula é uma ribozima que replica a si e também as outras moléculas de RNA. As outras moléculas podem catalisar operações secundárias necessárias para a sobrevivência do sistema cooperativo, por exemplo, pela síntese de ribonucleotídeos para a síntese de RNA ou de fosfolipídeos para a compartimentalização.

Como ocorreu a evolução da síntese de proteínas?

Os processos moleculares envolvidos na síntese de proteínas nas células atuais parecem extremamente complexos. Embora compreendamos a maioria desses processos, eles não apresentam um sentido conceitual da forma que a transcrição de DNA, o reparo de DNA e a replicação de DNA o fazem. É especialmente difícil de imaginar como a síntese de proteínas evoluiu, tendo em vista que hoje ela é realizada por um sistema complexo interligado de moléculas de proteína e RNA; obviamente, as proteínas não podem ter existido antes que uma versão inicial dos mecanismos de tradução tenha existido. A hipótese do mundo de RNA é muito atraente, pois o uso do RNA tanto para informação quanto para catálise parece ser econômica e conceitualmente simples. Apesar de atrativa em relação ao início da vida, essa ideia não é capaz de explicar como os sistemas atuais de síntese de proteínas puderam se desenvolver. Embora possamos somente especular sobre a origem da síntese de proteínas e do código genético, várias abordagens experimentais têm proporcionado cenários possíveis.

Nas células modernas, alguns pequenos peptídeos (como os antibióticos) são sintetizados sem a ação do ribossomo; as enzimas peptídeo-sintetases montam esses peptídeos, em sua sequência correta de aminoácidos, sem mRNAs que guiem sua síntese. É possível que essa síntese não-codificada, uma versão primitiva da síntese proteica, tenha evoluído durante o mundo de RNA e tenha sido catalisada por moléculas de RNA. Essa ideia não apresenta falhas conceituais atualmente, pois, como vimos, o rRNA catalisa a formação de ligações peptídicas nas células atuais. Também sabemos que ribozimas criadas em laboratório podem realizar reações de aminoacilação específicas; ou seja, podem carregar aminoácidos específicos em tRNAs específicos. É, portanto, possível que adaptadores semelhantes aos tRNAs, cada um associado a um aminoácido específico, tenham surgido no mundo de RNA, formando a base de um código genético.

Em princípio, outros RNAs (os precursores dos mRNAs) podem ter fornecido moldes grosseiros para o direcionamento de polimerização não-aleatória de uns poucos aminoácidos. Qualquer RNA que direcionasse a síntese de um polipeptídeo útil apresentaria uma grande vantagem na grande luta pela sobrevivência. Podemos imaginar uma ribozima peptidil-transferase relativamente não-específica, a qual, ao longo do tempo, tornou-se maior e adquiriu a capacidade de posicionar eficientemente tRNAs carregados sobre RNAs-molde – levando finalmente ao ribossomo moderno. Uma vez que a síntese de proteínas tenha evoluído, pode ter ocorrido a transição para um mundo dominado por proteínas, no qual elas

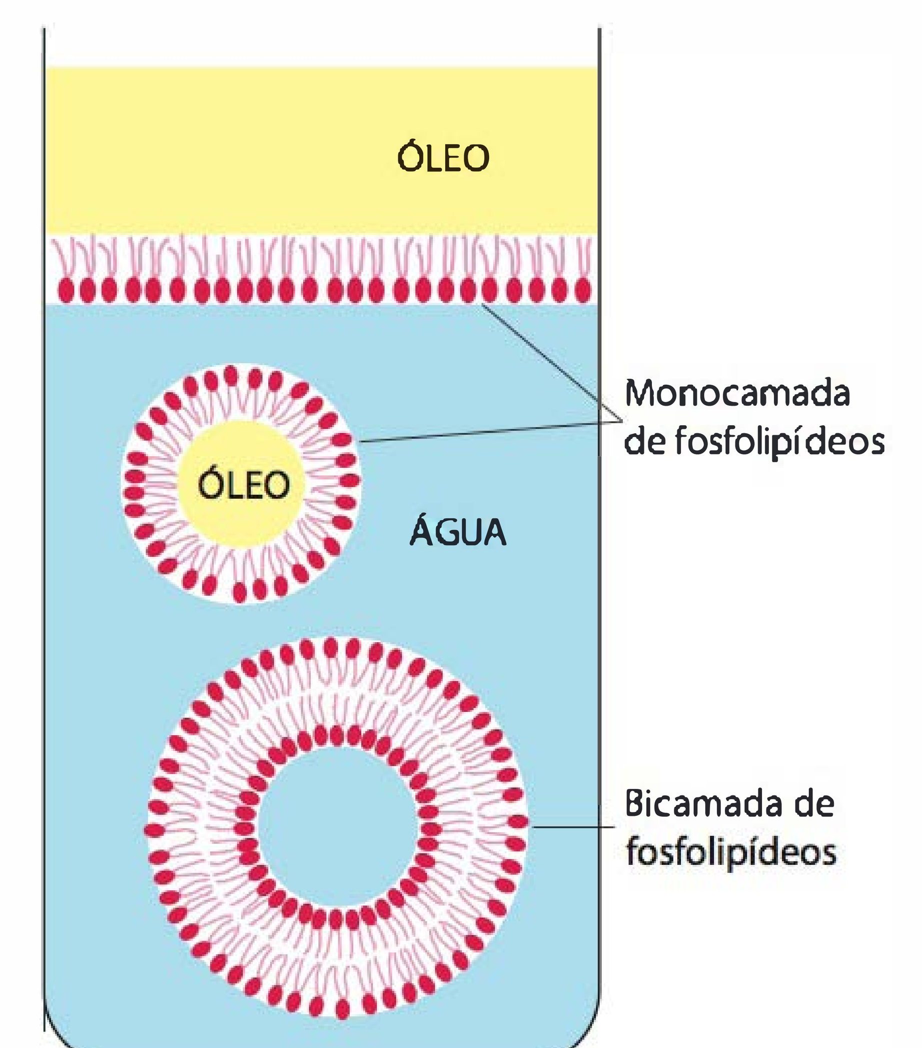


Figura 6-108 Formação de membrana por fosfolipídeos. Visto que estas moléculas apresentam cabeças hidrofílicas e caudas lipofílicas, elas alinham-se entre si em uma interface óleo/água posicionando suas cabeças na água e suas caudas no óleo. Na água, elas se associam para formar vesículas bicamada fechadas nas quais as caudas lipofílicas estão em contato uma com a outra, e as cabeças hidrofílicas estão expostas à água.

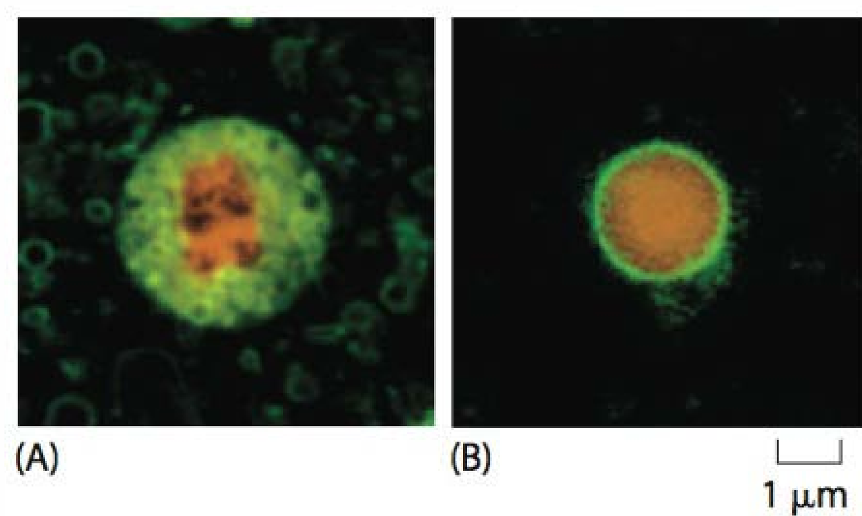


Figura 6-109 Encapsulamento do RNA por moléculas anfipáticas simples. Para estes experimentos, a argila montmorillonita foi usada para aproximar RNA e ácidos graxos. (A) Uma partícula de montmorillonita, recoberta por RNA (*vermelho*), foi aprisionada no interior de uma vesícula de ácido graxo (*verde*). (B) RNA (*vermelho*), em solução foi encapsulado por ácidos graxos (*verde*). Esses experimentos mostram que a montmorillonita pode acelerar bastante a geração espontânea de vesículas de moléculas anfipáticas e aprisionar RNA em seu interior. Já foi sugerido que ações similares em conceito podem ter levado à formação das primeiras células primitivas da Terra (De M. M. Hanczyc et al., *Science* 302:618-622, 2003. Com permissão de AAAS.)

se tornaram cada vez mais responsáveis pela maior parte das tarefas estruturais e catalíticas, devido a sua maior versatilidade: possuem 20 subunidades diferentes, em vez de quatro. Apesar de os cenários apresentados serem altamente especulativos, temos conhecimento de características e propriedades das moléculas de RNA que são consistentes com essas ideias.

Todas as células atuais usam DNA como material hereditário

Se as especulações evolutivas sobre a hipótese do mundo de RNA estão corretas, essas células primordiais também diferiam fundamentalmente das células que conhecemos hoje por terem sua informação hereditária estocada sob a forma de RNA e não de DNA (**Figura 6-110**). As evidências de que o RNA surgiu antes do DNA na evolução podem ser encontradas nas diferenças químicas entre eles. A ribose, como a glicose e outros carboidratos simples, pode ser formada a partir de formaldeído (HCHO), um composto químico simples facilmente produzido em experimentos laboratoriais que tentam simular as condições da Terra primitiva. O açúcar desoxirribose é mais difícil de produzir e, nas células atuais, é produzido a partir de ribose em uma reação catalisada por uma enzima proteica, sugerindo que a ribose precedeu a desoxirribose nas células. Possivelmente, o DNA apareceu no cenário mais tarde, mas provou ser mais adaptado do que o RNA como um repositório permanente da informação genética. Particularmente, a desoxirribose na sua estrutura de açúcar-fosfato produz cadeias de DNA quimicamente mais estáveis que as cadeias de RNA, de tal forma que os DNAs de comprimentos maiores podem ser mantidos sem quebras.

As outras diferenças entre RNA e DNA – a estrutura em dupla-hélice do DNA e o uso da timina em vez da uracila – incrementam ainda mais a estabilidade do DNA, fazendo com que os muitos acidentes inevitáveis que ocorrem na molécula sejam mais fáceis de reparar, como discutido em detalhe no Capítulo 5 (ver p. 296-297 e 300-301).

Resumo

De acordo com nosso conhecimento a respeito dos organismos atuais e das moléculas que eles contêm, é provável que o desenvolvimento de mecanismos diretamente autocatalíticos fundamentais para os sistemas vivos tenha começado com a evolução de famílias de moléculas que podiam catalisar sua própria replicação. Com o tempo, uma família cooperativa de RNAs catalisadores possivelmente desenvolveu a capacidade de direcionar a síntese de polipeptídeos. É presumível que o DNA tenha sido uma aquisição tardia: conforme o acúmulo de catalisadores proteicos adicionais permitia a evolução de células mais eficientes e complexas, a dupla-hélice de DNA substituía o RNA como uma molécula mais estável para o estoque da crescente quantidade de informação genética necessária para essas células.

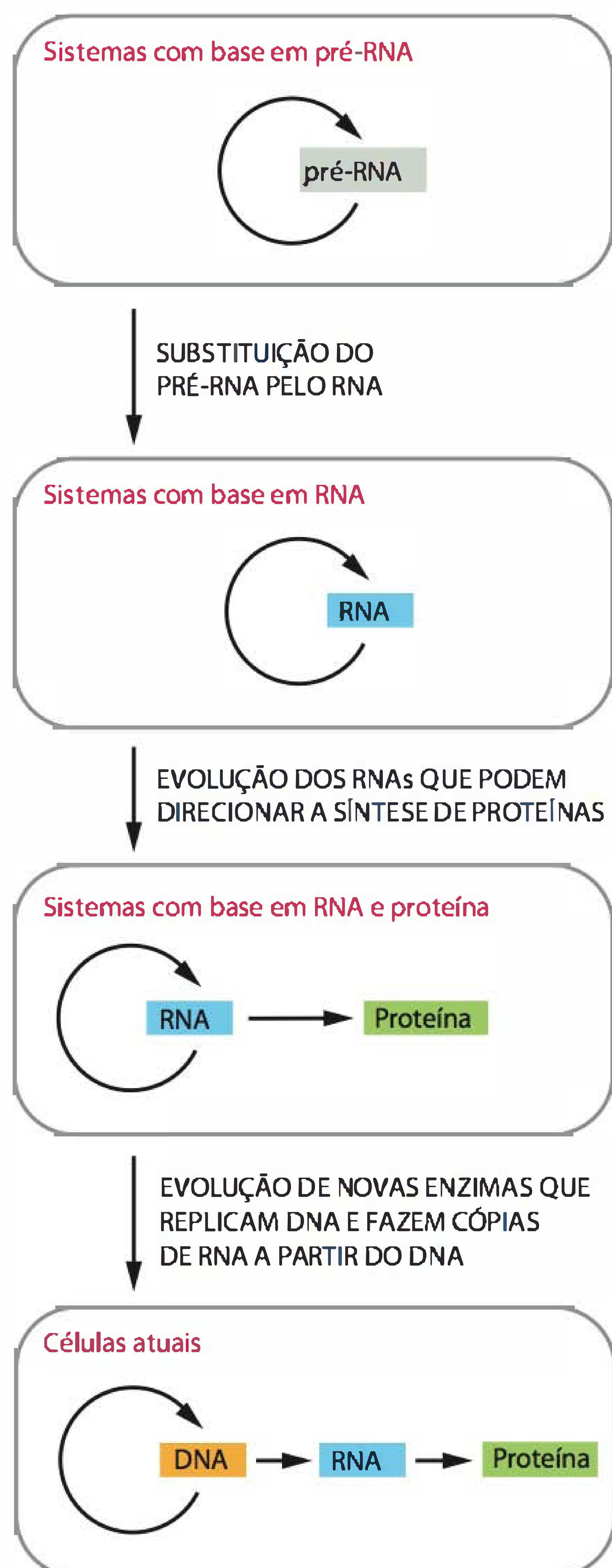


Figura 6-110 Hipótese de que o RNA precedeu o DNA e as proteínas na evolução. Nas primeiras células, as moléculas de pré-RNA devem ter possuído tanto funções genéticas quanto estruturais e catalíticas, e estas funções devem ter sido gradualmente substituídas pelo RNA. Nas células atuais, o DNA é o repositório de informação genética, e as proteínas realizam a grande maioria das funções catalíticas nas células. O RNA funciona principalmente como um intermediário na síntese de proteínas, embora continue atuando como catalisador em um pequeno número de reações importantes.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

6-1 As consequências de erros na transcrição são menores do que as de erros na replicação de DNA.

6-2 Visto que os íntrons são, em sua maioria, "lixo" genético, não há necessidade de removê-los com exatidão durante o *splicing* do RNA.

6-3 O pareamento oscilante ocorre entre a primeira posição do códon e a terceira posição do anticódon.

6-4 Acredita-se que as enzimas proteicas tenham amplamente superado numericamente as ribozimas nas células atuais, pois catalisam uma gama muito maior de reações com maior eficiência.

Discuta as seguintes questões.

6-5 Em que direção, sobre o molde, a RNA-polimerase da **Figura Q6-1** deve se mover para gerar as estruturas em supertorção ilustradas? Você esperaria que fossem geradas supertorções se a RNA-polimerase pudesse girar livremente em torno do eixo de DNA à medida que progredisse sobre o molde?

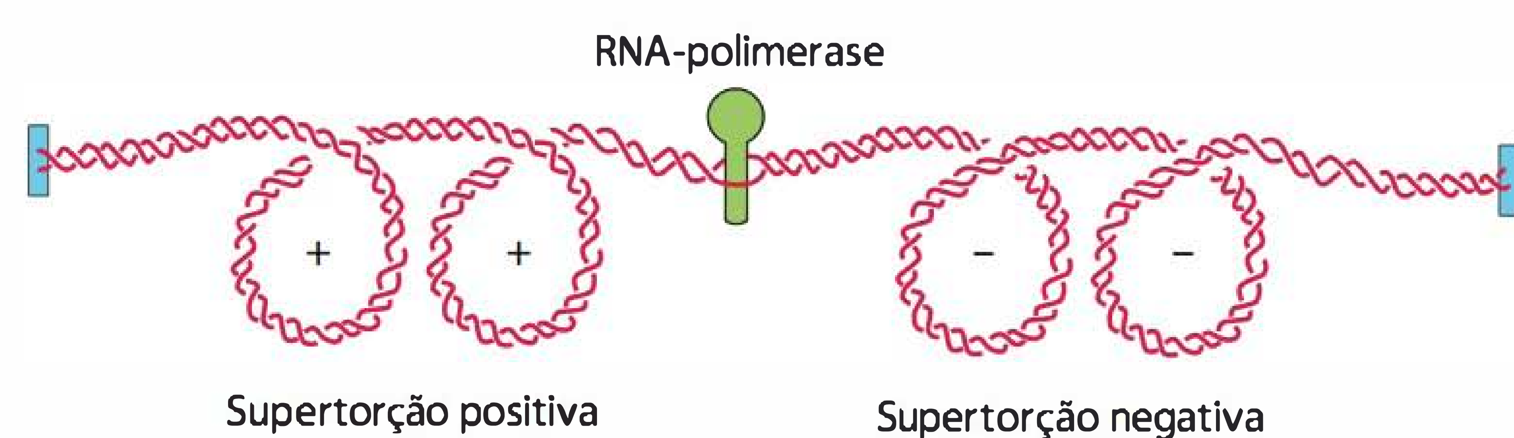


Figura Q6-1 Supertorções adjacentes a uma RNA-polimerase em movimento (Questão 6-5).

6-6 Existem fosfatos ligados ao CTD (domínio C-terminal) das RNA-polimerases II durante a transcrição. Quais são as diferentes funções da fosforilação do CTD da RNA-polimerase II?

6-7 O gene da α-tropomiosina humana sofre *splicing* alternativo, produzindo diversas formas de mRNA de α-tropomiosina em diferentes células (**Figura Q6-2**). Todas as formas de mRNA compartilham a sequência dos éxons 1 e 10. Os éxons 2 e 3 são éxons alternativos usados em diferentes RNAs, assim como os éxons 7 e 8. Qual das afirmações a seguir, referentes aos éxons 2 e 3, é a mais exata? Essa afirmação também é a mais exata em relação aos éxons 7 e 8? Justifique suas respostas.

A. Os éxonts 2 e 3 devem apresentar o mesmo número de nucleotídeos.

B. Cada um dos éxons 2 e 3 deve conter um número integral de códons (ou seja, o número de nucleotídeos dividido por 3 deve ser inteiro).

C. Cada um dos éxons 2 e 3 deve conter um número de nucleotídeos que, quando dividido por 3, deixa o mesmo resto (ou seja, 0, 1 ou 2).

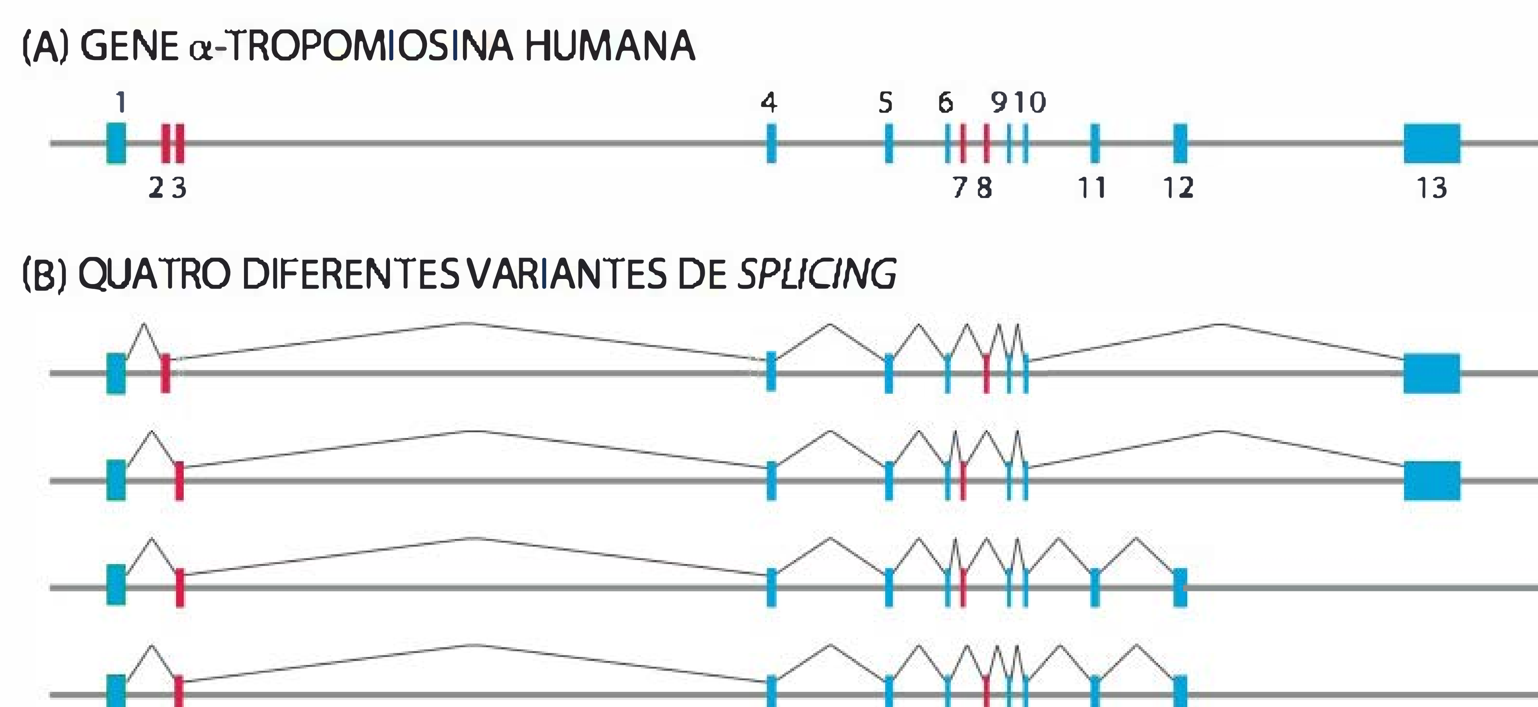


Figura Q6-2 mRNAs que sofreram *splicing* alternativo a partir do gene da α-tropomiosina humana (Questão 6-7). (A) Os éxons no gene da α-tropomiosina humana. As posições e os tamanhos relativos dos éxons estão ilustrados em *retângulos azuis* e *vermelhos*, respectivamente. (B) Padrões de *splicing* de quatro mRNAs de α-tropomiosina. O *splicing* está indicado pelas *linhas* que conectam os éxons que são incluídos no mRNA.

6-8 Após tratamento de células com um composto químico mutagênico, você isolou duas linhagens. Uma das linhagens carregava alanina e outra carregava metionina em um sítio proteico que normalmente conteria valina (**Figura Q6-3**). Após novo tratamento desses dois mutantes com o mutagênico, você isolou mutantes de cada um que agora carregam treonina no sítio original de valina (Figura Q6-3). Assumindo que todas as mutações envolvem uma única substituição nucleotídica, deduza os códons que foram usados para valina, metionina, treonina e alalina no sítio afetado. Você esperaria ser capaz de isolar mutantes para treonina a partir da linhagem original em apenas uma etapa?

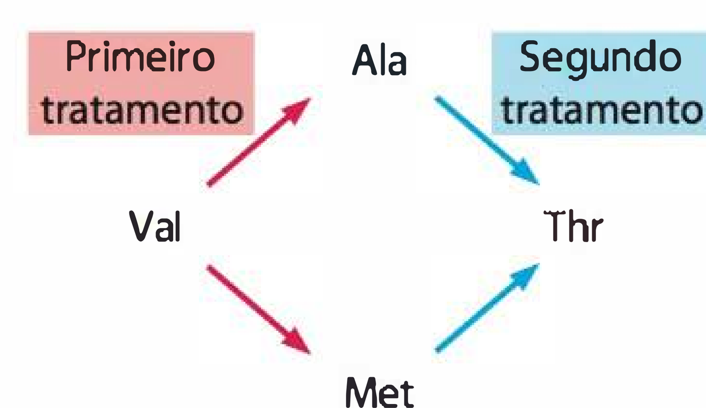


Figura Q6-3 Dois ciclos de mutagênese e os aminoácidos alterados em uma única posição da proteína (Questão 6-8).

6-9 O fator de extensão EF-Tu introduz dois pequenos momentos de parada durante o pareamento de bases códon-anticódon e a formação de uma ligação peptídica. Esses intervalos aumentam a exatidão da síntese proteica. Descreva esses intervalos e explique como eles aumentam a fidelidade da tradução.

6-10 As chaperonas moleculares semelhantes a Hsp60 e Hsp70 compartilham afinidade por regiões hidrofóbicas expostas em proteínas, usando-as como indicadores de dobramento incompleto. Por que você supõe que regiões hidrofóbicas sirvam como sinais indicadores do padrão de dobramento de uma proteína?

6-11 A maioria das proteínas requer chaperonas moleculares para auxiliar seu dobramento correto. Como você acha que as próprias chaperonas conseguem dobrar-se corretamente?

6-12 Quais as características especiais do RNA que o tornam tão atrativo como precursor evolutivo do DNA e das proteínas? O que torna o DNA um material melhor do que o RNA para a função de estoque de informações genéticas?

6-13 Se uma molécula de RNA pode formar uma estrutura em grampo com uma alça interna simétrica, como ilustrado na **Figura Q6-4**, pode o complemento desse RNA formar uma estrutura semelhante? Em caso positivo, existiriam regiões de identidade entre essas duas estruturas? Quais?

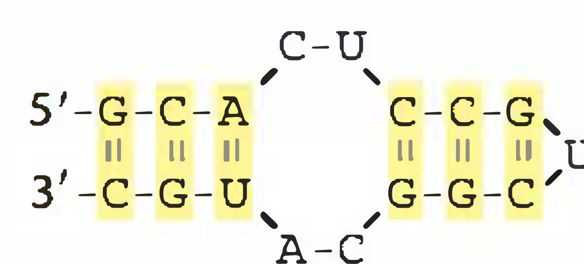


Figura Q6-4 Estrutura de RNA em grampo contendo uma alça interna simétrica (Questão 6-13).

REFERÊNCIAS

Geral

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2006) Biochemistry, 6th ed. New York: WH Freeman.
Brown TA (2002) Genomes 2, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.
Gesteland RF, Cech TR & Atkins JF (eds) (2006) The RNA World, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.
Lodish H, Berk A, Kaiser C et al (2007) Molecular Cell Biology, 6th ed. New York: WH Freeman.
Stent GS (1971) Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco: WH Freeman.
The Genetic Code (1966) *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol* 31.
The Ribosome (2001) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66.
Watson JD, Baker TA, Bell SP et al (2003) Molecular Biology of the Gene, 5th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Do DNA ao RNA

Bentley DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17:251–256.
Berget SM, Moore C & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3171–3175.
Black DL (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291–336.
Brenner S, Jacob F & Meselson M (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.
Cate JH, Gooding AR, Podell E et al. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* 273:1678–1685.
Chow LT, Gelinas RE, Broker TR et al (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12:1–8.
Cramer P (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12:89–97.
Daneholt B (1997) A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88:585–588.
Dreyfuss G, Kim VN, & Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:195–205.
Houseley J, LaCava J & Tollervey D (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:529–539.
Izquierdo JM, & Valcárcel J (2006) A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 20:1679–1684.
Kornberg RD (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30:235–239.
Malik S & Roeder RG (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30:256–263.
Matsui T, Segall J, Weil PA & Roeder RG (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* 255:11992–11996.
Patel AA & Steitz JA (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4|:960–970.
Phatnani HP & Greenleaf AL (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20:2922–2936.
Query CC & Konarska MM (2006) Splicing fidelity revisited. *Nature Struct Mol Biol* 13:472–474.
Ruskin B, Krainer AR, Maniatis T et al (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38:317–331.
Spector DL (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 72:573–608.
Staley JP & Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92:315–326.
Thomas MC & Chiang CM (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 41:105–178.
Wang D, Bushnell DA, Westover KD et al (2006) Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 127:941–954.

Do RNA à proteína

Allen GS & Frank J (2007) Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol* 63:941–950.
Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230.
Brunelle JL, Youngman EM, Sharma D et al (2006) The interaction between C75 of tRNA and the A loop of the ribosome stimulates peptidyl transferase activity. *RNA* 12:33–39.
Chien P, Weissman JS, & DePace AH (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* 73:617–656.
Crick FHC (1966) The genetic code: III. *Sci Am* 215:55–62.
Hershko A, Ciechanover A & Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nature Med* 6:1073–1081.
Ibba M & Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 69:617–650.
Kozak M (1992) Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol* 8:197–225.
Kuzmiak HA, & Maquat LE (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12:306–316.
Moore PB & Steitz TA (2005) The ribosome revealed. *Trends Biochem Sci* 30:281–283.
Noller HF (2005) RNA structure: reading the ribosome. *Science* 309:1508–1514.
Ogle JM, Carter AP & Ramakrishnan V (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 28:259–266.
Prusiner SB (1998) Nobel lecture. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363–13383.
Rehwinkel J, Raes J & Izaurralde E (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* 31:639–646.
Sauer RT, Bolon DN, Burton BM et al (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119:9–18.
Shorter J & Lindquist S (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature Rev Genet* 6:435–450.
Varshavsky A (2005) Regulated protein degradation. *Trends in Biochem Sci* 30:283–286.
Voges D, Zwickl P & Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015–1068.
Weissmann C (2005) Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell* 122:165–168.
Young JC, Agashe VR, Siegers K et al (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:781–791.

O mundo de RNA e a origem da vida

Joyce GF (1992) Directed molecular evolution. *Sci Am* 267:90–97.
Orgel L (2000) Origin of life. A simpler nucleic acid. *Science* 290:1306–1307.
Kruger K, Grabowski P, Zaug P et al (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31:147–157.
Silverman SK (2003) Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA. *RNA* 9:377–383.
Szostak JW, Bartel DP & Luisi PL (2001) Synthesizing life. *Nature* 409:387–390.

Controle da Expressão Gênica

7

UMA VISÃO GERAL DO CONTROLE GÊNICO 411

MOTIVOS DE LIGAÇÃO AO DNA NAS PROTEÍNAS DE REGULAÇÃO GÊNICA 416

COMO FUNCIONAM OS COMUTADORES GENÉTICOS 432

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE CRIAM TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS 454

CONTROLES PÓS-TRANSCRICIONAIS 477

O DNA de um organismo codifica todas as moléculas de RNA e de proteína necessárias para a construção de suas células. Apesar disso, uma descrição completa da sequência de DNA de um organismo – seja ela de alguns milhões de nucleotídeos, como em uma bactéria, ou de alguns bilhões de nucleotídeos, como em um humano – não nos possibilita reconstruir o organismo, assim como uma lista de palavras em inglês não nos permite reconstruir uma peça de Shakespeare. Em ambos os casos, o problema é conhecer como os elementos em uma sequência de DNA ou de palavras em uma lista são usados. Em quais condições cada produto gênico é produzido e, uma vez produzido, o que ele faz?

Neste capítulo discutimos a primeira metade desse problema – as regras e os mecanismos pelos quais um conjunto de genes é seletivamente expresso em cada célula. Os mecanismos que controlam a expressão dos genes operam em muitos níveis, e discutimos os diferentes níveis sucessivamente. Começamos com uma visão geral de alguns princípios básicos do controle gênico em organismos multicelulares.

UMA VISÃO GERAL DO CONTROLE GÊNICO

Os diferentes tipos celulares em um organismo multicelular diferem dramaticamente tanto em estrutura como em função. Se compararmos um neurônio de mamíferos com um linfócito, por exemplo, as diferenças são tão extremas que é difícil imaginar que as duas células contêm o mesmo genoma (**Figura 7-1**). Por essa razão, e porque a diferenciação celular frequentemente é irreversível, os biólogos originalmente suspeitaram que genes deveriam ser seletivamente perdidos quando uma célula se diferencia. Agora sabemos, entretanto, que a diferenciação celular geralmente depende de mudanças na expressão gênica ao invés de quaisquer alterações na sequência de nucleotídeos do genoma da célula.

Os diferentes tipos celulares de um organismo multicelular contêm o mesmo DNA

Os tipos celulares em um organismo multicelular tornam-se diferentes uns dos outros porque eles sintetizam e acumulam diferentes conjuntos de moléculas de RNA e proteína. As evidências de que eles geralmente fazem isso sem alterar a sequência do seu DNA são oriundas de um conjunto de experimentos clássicos em rãs. Quando o núcleo de uma célula de rã totalmente diferenciada é injetado dentro de um óvulo de rã cujo núcleo tenha sido removido, o núcleo doador injetado é capaz de direcionar o óvulo recipiente a produzir um girino normal (**Figura 7-2**A). Uma vez que o girino contém uma gama completa de células diferenciadas cujas sequências de DNA são derivadas do núcleo da célula doadora original, conclui-se que a célula doadora diferenciada não poderia ter perdido nenhuma sequência de DNA importante. Uma conclusão semelhante foi obtida em experimentos feitos com várias plantas. Aqui, pedaços diferenciados de tecidos da planta são colocados em cultura e então dissociados em células únicas. Frequentemente uma dessas células individuais pode regenerar uma planta adulta inteira (Figura 7-2B). Finalmente, esse mesmo princípio foi demonstrado em mamíferos, incluindo-se ovelhas, gado, porcos, cabras, cães e camundongos, pela introdução de núcleos de células somáticas em óvulos que tiveram seus núcleos retirados; quando colocados em mães substitutas, alguns desses óvulos (chamados de zigotos reconstruídos) desenvolvem-se em animais sadios (Figura 7-2C).

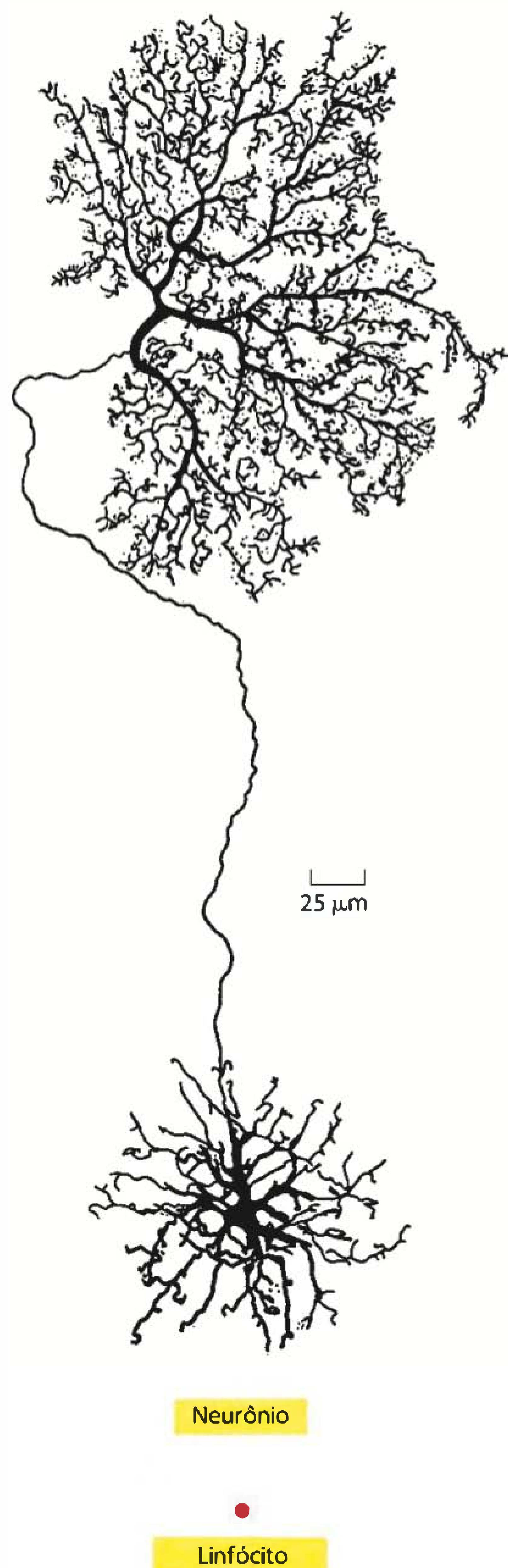


Figura 7-1 Um neurônio e um linfócito de mamífero. Os longos galhos deste neurônio da retina possibilitam-no receber sinais elétricos de muitas células e carregar estes sinais para muitas células vizinhas. O linfócito é uma célula branca envolvida na resposta imune à infecção e move-se livremente pelo corpo. Ambas as células contêm o mesmo genoma, mas expressam RNAs e proteínas diferentes. (De B. B. Boycott, Essays on the Nervous System [R. Bellairs e E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

Mais evidências que grandes blocos de DNA não são perdidos ou rearranjados durante o desenvolvimento de vertebrados vêm da comparação de padrões detalhados de bandeamento que são detectáveis nos cromossomos condensados na mitose (ver Figura 4-11). Por esse critérios, os conjuntos de cromossomos das células diferenciadas no corpo humano parecem ser idênticos. Além disso, comparações dos genomas das diferentes células com base na tecnologia do DNA recombinante têm mostrado, como uma regra geral, que as alterações na expressão gênica que acompanham o desenvolvimento de organismos multicelulares não são acompanhadas por mudanças nas sequências de DNA dos genes correspondentes. Existem, entretanto, alguns poucos casos em que rearranjos de DNA no genoma ocorrem durante o desenvolvimento de um organismo – mais notavelmente, na geração da diversidade do sistema imune de mamíferos, discutido no Capítulo 25.

Diferentes tipos celulares sintetizam diferentes conjuntos de proteínas

Como um primeiro passo para entender a diferenciação celular, gostaríamos de saber quantas diferenças existem entre um tipo celular e outro. Embora ainda não saibamos a resposta para essa questão fundamental, podemos fazer certas afirmações gerais.

1. Muitos processos são comuns a todas a células, e quaisquer duas células em um único organismo, portanto, possuem muitas proteínas em comum. Estas incluem as proteínas estruturais dos cromossomos, RNA-polimerases, enzimas de reparo do DNA, proteínas ribossomais, enzimas envolvidas nas reações centrais do metabolismo e muitas das proteínas que formam o citoesqueleto.
2. Algumas proteínas são abundantes nas células especializadas nas quais elas atuam e não podem ser detectadas em nenhum outro local, mesmo por testes sensíveis. A hemoglobina, por exemplo, somente pode ser detectada nas células vermelhas do sangue.
3. Estudos sobre o número de RNAs mensageiros (mRNAs) diferentes sugerem que, em qualquer época, uma célula humana típica expressa cerca de 30 a 60% dos seus aproximadamente 25.000 genes. Quando os padrões de mRNAs em uma série de diferentes linhas celulares humanas são comparados, observa-se que o nível de expressão de quase todos os genes ativos varia de um tipo celular para outro. Algumas dessas diferenças são surpreendentes, como a da hemoglobina citada anteriormente, mas a maioria é muito mais sutil. Mesmo genes expressos em todos os tipos celulares variam seu nível de expressão de um tipo celular para outro. Os padrões de abundância de mRNA (determinados usando microarranjos de DNA, discutidos no Capítulo 8) são tão característicos de cada tipo celular que podem ser usados para classificar células cancerosas humanas de tecidos de origem desconhecida (**Figura 7-3**).
4. Embora as diferenças nos mRNAs entre os tipos celulares especializados sejam surpreendentes, elas, no entanto, subestimam a amplitude total de diferenças no padrão de produção de proteínas. Como veremos neste capítulo, existem muitos passos após a transcrição nos quais a expressão gênica pode ser regulada. Por exemplo, o *splicing* alternativo pode produzir uma família inteira de proteínas a partir de um único gene. Finalmente, proteínas podem ser covalentemente modificadas após a sua síntese. Dessa forma, uma melhor maneira de apreciar as diferenças radicais na expressão gênica entre os tipos celulares é através de métodos que exponham diretamente os níveis de proteína e suas modificações pós-traducionais (**Figura 7-4**).

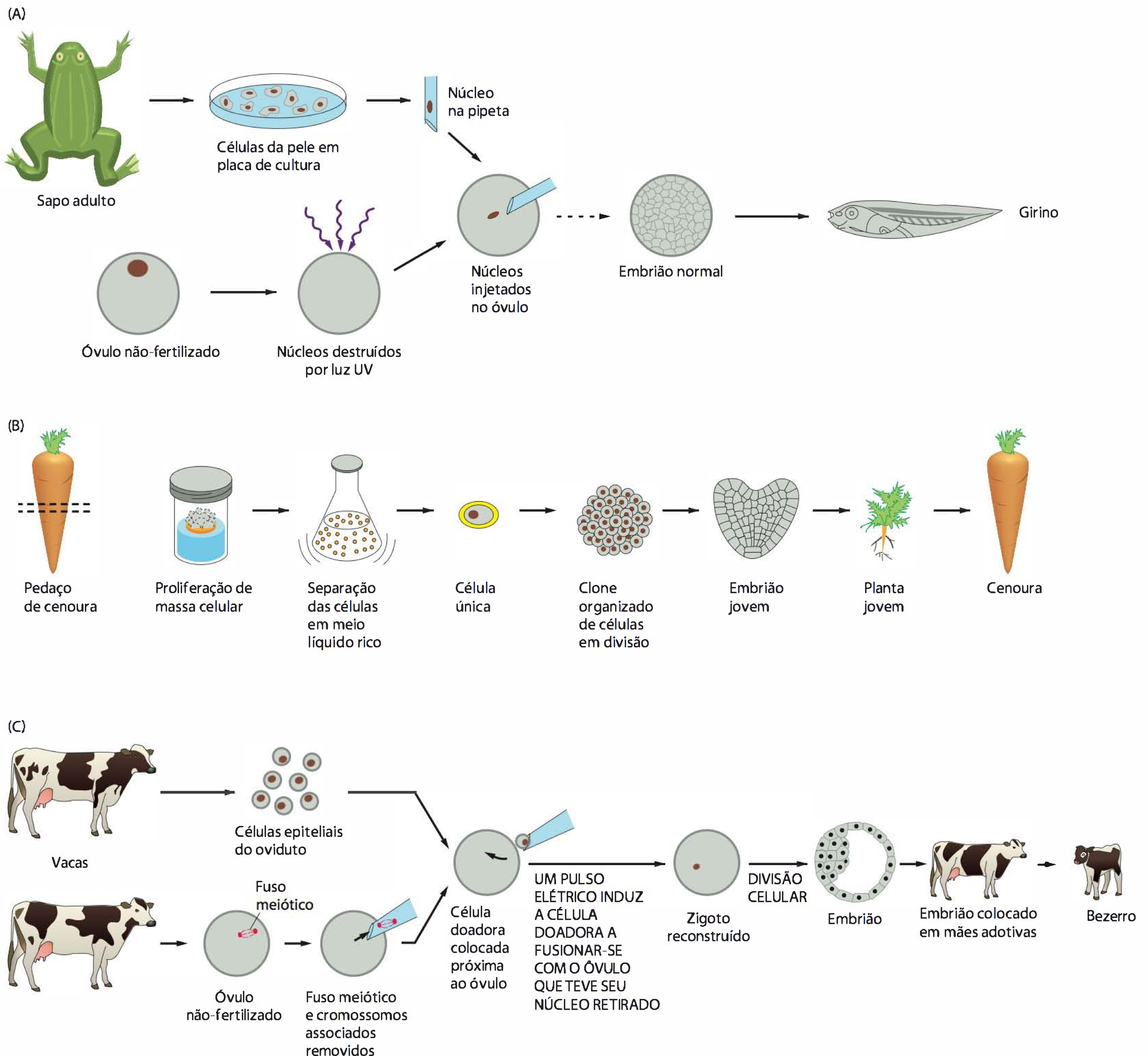


Figura 7-2 Evidências de que uma célula diferenciada contém todas as instruções genéticas necessárias para conduzir a formação de um organismo completo. (A) O núcleo de uma célula da pele de um sapo adulto transplantado em um óvulo que teve seu núcleo retirado pode dar origem a um girino completo. A *seta tracejada* indica que, para dar ao genoma transplantado tempo para ajustar-se ao meio embrionário, é necessário um passo de transferência adicional no qual um dos núcleos é retirado do embrião inicial que começa seu desenvolvimento e é recolocado em um segundo óvulo que teve o núcleo retirado. (B) Em muitos tipos de plantas, células diferenciadas retêm a habilidade de "diferenciar-se", de forma que uma única célula pode formar um clone de células da progênie que mais tarde darão origem a uma planta completa. (C) Uma célula diferenciada de uma vaca adulta introduzida em um óvulo que teve seu núcleo retirado de uma célula de uma vaca diferente pode dar origem a um bezerro. Bezerros diferentes produzidos a partir da mesma célula diferenciada doadora são geneticamente idênticos e são, dessa maneira, clones uns dos outros. (A, modificada de J. B. Gurton, *Sci. Am.* 219: 24-35, 1968. Com permissão da Scientific American.)

Sinais externos podem induzir uma célula a alterar a expressão de seus genes

A maioria das células especializadas em um organismo multicelular é capaz de alterar seus padrões de expressão gênica em resposta a sinais extracelulares. Se uma célula do fígado é exposta a um hormônio glicocorticoide, por exemplo, a produção de várias proteínas específicas é aumentada dramaticamente. Glicocorticoides são liberados no corpo durante

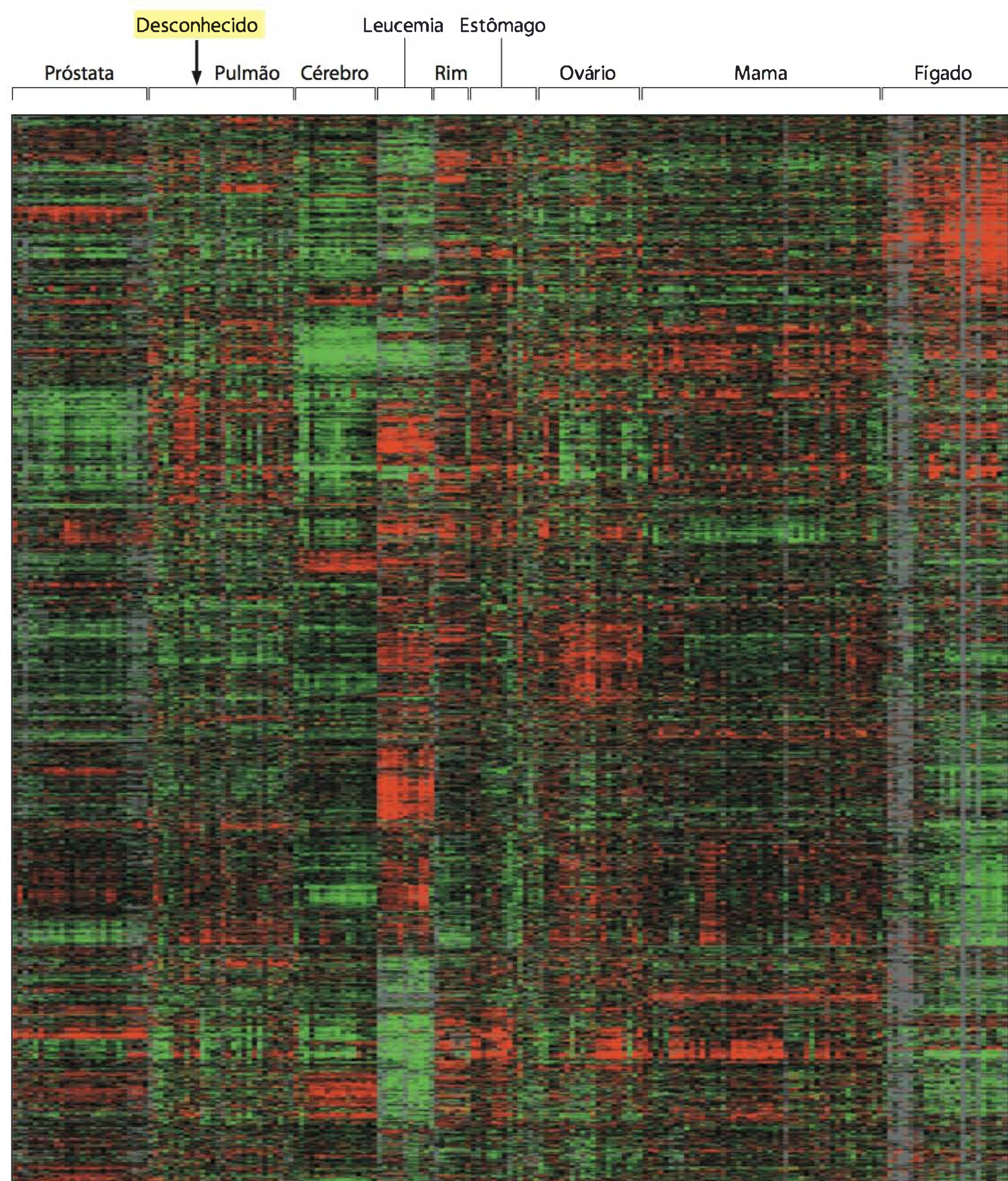


Figura 7-3 Diferenças no padrão de expressão de mRNAs entre diferentes tipos de células cancerosas humanas. Esta figura resume o grande conjunto de medidas nas quais os níveis de mRNA de 1.800 genes selecionados (arranjados de *cima* para *baixo*) foram determinados para 142 tumores humanos diferentes (arranjados da *esquerda* para a *direita*), cada um de um paciente diferente. Cada barra pequena *vermelha* indica que um determinado gene em um determinado tumor é transcrito em um nível significativamente maior do que a média entre todas as linhagens celulares. Cada barra *verde* pequena indica um nível de expressão menor do que a média, e cada barra *negra* indica um nível de expressão semelhante à média entre os diferentes tumores. O procedimento usado para gerar esses dados – isolamento de mRNA seguido por hibridização de microarranjos de DNA – é descrito no Capítulo 8 (ver p. 574-575). A figura mostra que os níveis de expressão relativa de cada um dos 1.800 genes analisados varia entre os diferentes tumores (visto seguindo-se um determinado gene da *esquerda* para a *direita* ao longo da figura). Essa análise também mostra que cada tipo de tumor possui um padrão de expressão gênica característico. Essa informação pode ser usada para "tipar" células cancerosas de origem desconhecida pela comparação dos perfis de expressão gênica com os dos tumores conhecidos. Por exemplo, na figura uma amostra desconhecida foi identificada como um câncer de pulmão. (Cortesia de Patrick O. Brown, David Botstein e Stanford Expression Collaboration.)

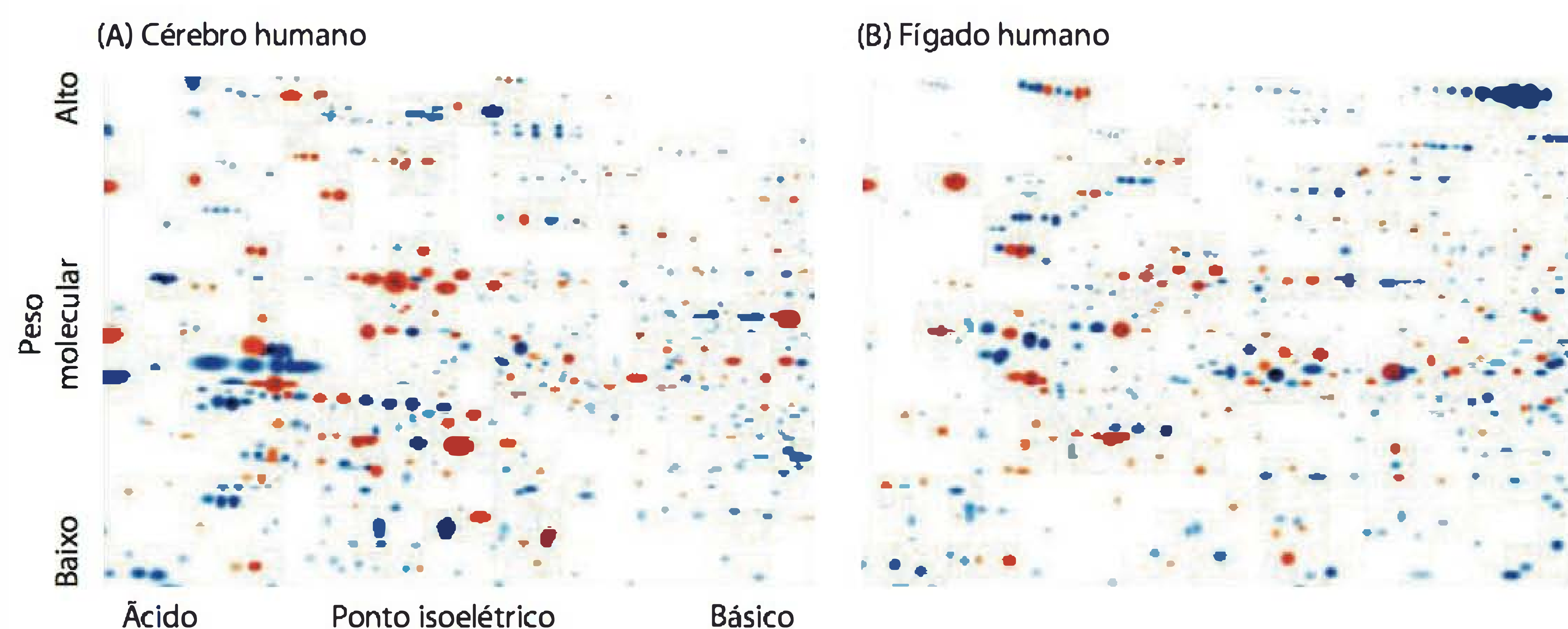


Figura 7-4 Diferenças nas proteínas expressas por dois tecidos humanos. Em cada painel, as proteínas estão mostradas usando a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (ver p. 521-522). As proteínas foram separadas pelo peso molecular (de *cima* para *baixo*) e ponto isoelétrico, o pH no qual a proteína não possui carga líquida (da *direita* para a *esquerda*). Os pontos de proteína coloridos artificialmente em *vermelho* são comuns a ambas as amostras; os em *azul* são específicos para um dos dois tecidos. As diferenças entre as duas amostras de tecido subestimam bastante suas similaridades: mesmo para as proteínas compartilhadas entre os dois tecidos, sua abundância relativa normalmente é diferente. Note que esta técnica separa as proteínas tanto por tamanho como por carga; portanto, uma proteína que possua, por exemplo, vários estados diferentes de fosforilação aparecerá como uma série de *pontos horizontais* (ver porção *superior à direita* do painel *direito*). Somente uma porção pequena do espectro completo de proteínas é mostrada em cada amostra. Embora a eletroforese em gel bidimensional forneça uma maneira simples de visualizar as diferenças entre as duas amostras de proteínas, métodos com base em espectrometria de massa (ver p. 519-521) fornecem informações muito mais detalhadas e são, dessa forma, utilizados com mais frequência (Cortesia de Tim Myers e Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

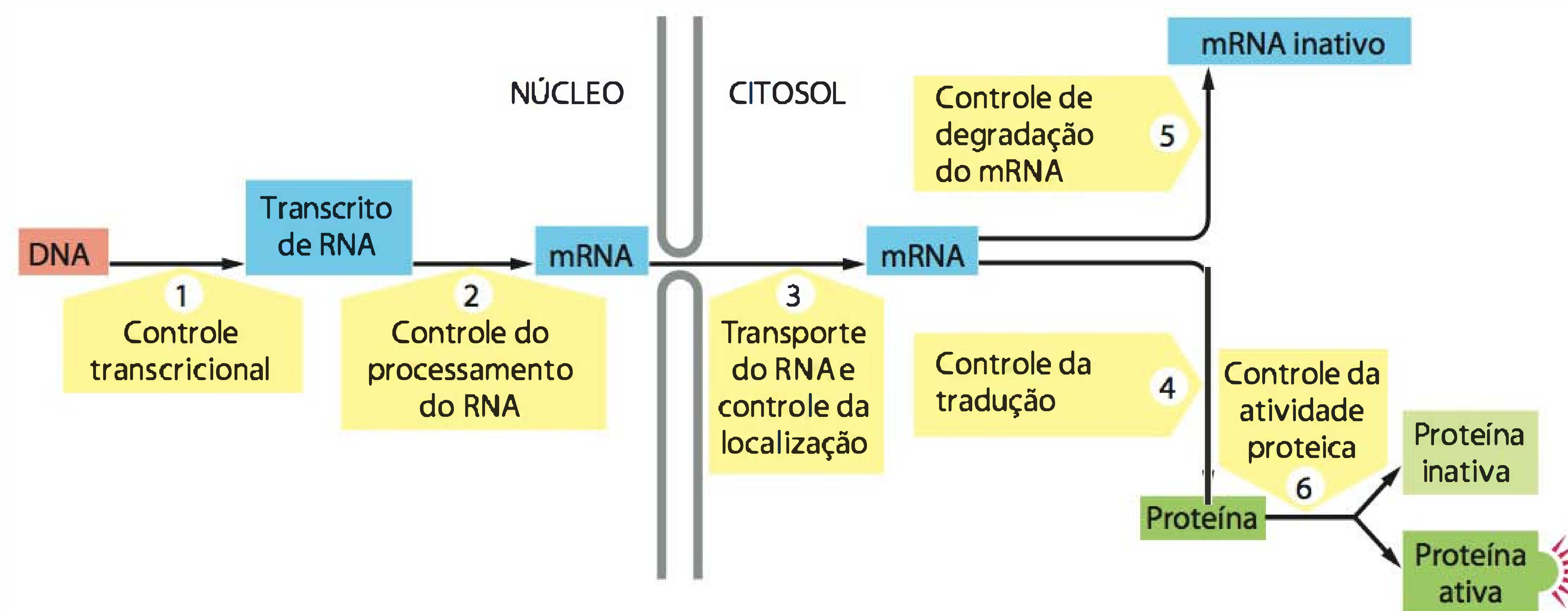


Figura 7-5 Seis passos nos quais a expressão gênica eucariótica pode ser controlada. Os controles que operam nos passos de 1 a 5 são discutidos neste capítulo. O passo 6, a regulação da atividade proteica, ocorre majoritariamente por modificações covalentes pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação e ubiquitinação (ver Tabela 3-3, p. 186), sendo discutido em muitos capítulos ao longo do livro.

períodos de inanição ou exercício intenso e sinalizam ao fígado para aumentar a produção de glicose a partir de aminoácidos e outras pequenas moléculas; o conjunto de proteínas cuja produção é induzida inclui enzimas como a tirosina-aminotransferase, a qual auxilia na conversão de tirosina a glicose. Quando o hormônio não está mais presente, a produção dessas proteínas diminui para o seu nível normal.

Outros tipos celulares respondem aos glicocorticoides diferentemente. Nas células adiposas, por exemplo, a produção de tirosina-aminotransferase é reduzida, enquanto alguns outros tipos celulares simplesmente não respondem aos glicocorticoides. Esses exemplos ilustram a característica geral da especialização celular: diferentes tipos celulares frequentemente respondem de maneiras diversas para o mesmo sinal extracelular. Subjacentes a esses ajustes que ocorrem em resposta aos sinais extracelulares, existem características dos padrões de expressão gênica que não são alteradas e conferem a cada tipo celular sua característica distintiva permanente.

A expressão gênica pode ser regulada em muitas etapas no caminho que vai do DNA ao RNA até a proteína

Se as diferenças entre os vários tipos celulares dependem dos genes particulares que a célula expressa, em qual nível o controle da expressão gênica é exercido? Como vimos no capítulo anterior, existem muitos passos no caminho que leva do DNA à proteína. Agora sabemos que todos eles podem em princípio ser regulados. Portanto, uma célula pode controlar as proteínas que produz (1) controlando quando e como um determinado gene é transcrito (**controle transcricional**), (2) controlando como o transcrito de RNA é submetido a *splicing* ou é processado (**controle do processamento de RNA**), (3) selecionando quais mRNAs completos são exportados do núcleo para o citoplasma e determinando onde no citoplasma eles ficam localizados (**transporte de RNA e controle da localização**), (4) selecionando quais mRNAs no citoplasma são traduzidos pelos ribossomos (**controle traducional**), (5) desestabilizando seletivamente certas moléculas de mRNA no citoplasma (**controle da degradação do mRNA**), ou (6) ativando, inativando, degradando ou compartimentalizando seletivamente moléculas de proteína específicas após a sua produção (**controle da atividade proteica**) (**Figura 7-5**).

Para a maioria dos genes, os controles transcricionais são os mais importantes. Isso faz sentido porque, de todos os possíveis pontos de controle ilustrados na Figura 7-5, somente o controle transcricional garante que a célula não irá sintetizar intermediários supérfluos. Nas seções seguintes, discutimos os componentes de DNA e proteína que desempenham esta função regulando o início da transcrição gênica. Iremos retornar ao final do capítulo para as muitas vias adicionais de regulação da expressão gênica.

Resumo

O genoma de uma célula contém em sua sequência de DNA a informação para fazer muitos milhares de diferentes moléculas de proteína e RNA. Uma célula normalmente expressa somente uma fração dos seus genes, e os diferentes tipos de células em organismos multicelulares surgem porque diferentes conjuntos de genes são expressos. Além disso, as células podem alterar o padrão de genes que elas expressam em resposta a mudanças em seu meio ambiente, como sinais de outras células. Embora todas as etapas envolvidas na expressão de um gene possam em princípio ser reguladas, para a maioria dos genes o início da transcrição do RNA é o ponto de controle mais importante.

MOTIVOS DE LIGAÇÃO AO DNA NAS PROTEÍNAS DE REGULAÇÃO GÊNICA

Como uma célula determina quais dos seus milhares de genes transcrever? Como mencionado no Capítulo 6, a transcrição de cada gene é controlada por uma região reguladora de DNA relativamente próxima ao sítio onde a transcrição se inicia. Algumas regiões reguladoras são simples e atuam como comutadores que são acionados por um único sinal. Muitas outras são complexas e assemelham-se a minúsculos microprocessadores, respondendo a uma variedade de sinais que interpretam e integram para ligar ou desligar um gene vizinho. Tanto complexos como simples, esses mecanismos de comutação contêm dois tipos de componentes fundamentais: (1) pequenos trechos de DNA de uma sequência definida e (2) *proteínas de regulação gênica* que reconhecem e ligam-se a este DNA.

Começamos a nossa discussão sobre as proteínas de regulação gênica pela descrição de como elas foram descobertas.

Proteínas de regulação gênica foram descobertas por genética bacteriana

Análises genéticas em bactérias, realizadas na década de 1950, forneceram as primeiras evidências para a existência de **proteínas de regulação gênica** (muitas vezes indiscriminadamente chamadas de “fatores de transcrição”) que ligam ou desligam conjuntos específicos de genes. Um destes reguladores, o *repressor lambda*, é codificado por um vírus bacteriano, o *bacteriófago lambda*. O repressor desliga os genes virais que codificam para os componentes das novas partículas virais e, portanto, possibilita ao genoma viral permanecer como um passageiro silencioso no genoma bacteriano, multiplicando-se com a bactéria enquanto as condições são favoráveis para o crescimento bacteriano (ver Figura 5-78). O repressor lambda estava entre as primeiras proteínas de regulação gênica a ser caracterizada, e ainda permanece sendo uma das mais bem conhecidas, como discutiremos mais tarde. Outros reguladores bacterianos respondem a condições nutricionais desligando genes que codificam conjuntos específicos de enzimas metabólicas quando elas não são necessárias. O *repressor Lac*, a primeira dessas proteínas a ser reconhecida, desliga a produção das proteínas responsáveis pelo metabolismo da lactose quando este açúcar está ausente do meio.

O primeiro passo em direção ao entendimento da regulação gênica foi o isolamento de cepas mutantes de bactérias e bacteriófagos lambda que eram incapazes de desligar conjuntos específicos de genes. Foi proposto na época e provado mais tarde que a maioria desses mutantes era deficiente em proteínas que atuavam como repressores desses conjuntos de genes. Devido ao fato de essas proteínas, assim como a maioria das proteínas reguladoras, estarem presentes em pequenas quantidades, era difícil e demorado isolá-las. Elas foram finalmente purificadas pelo fracionamento dos extratos celulares. Uma vez isoladas, as proteínas mostraram-se capazes de ligarem-se a sequências específicas de DNA próximas dos genes que elas regulam. As sequências precisas de DNA que elas reconhecem foram então determinadas por uma combinação de genética clássica e métodos para a análise de interações proteína-DNA, discutidos mais tarde neste capítulo.

A porção externa da hélice de DNA pode ser lida por proteínas

Como discutido no Capítulo 4, o DNA em um cromossomo consiste em uma dupla-hélice muito longa (**Figura 7-6**). As proteínas de regulação gênica precisam reconhecer sequências de nucleotídeos específicas embutidas dentro dessa estrutura. Foi originalmente pensado que essas proteínas necessitariam de um acesso direto às ligações de hidrogênio entre os pares de bases no interior da dupla-hélice para distinguir entre uma sequência de DNA e outra. Está hoje esclarecido, entretanto, que a porção externa da dupla-hélice apresenta informações da sequência de DNA que as proteínas de regulação gênica podem reconhecer sem ter que abrir a dupla-hélice. A borda de cada par de bases está exposta na superfície da dupla-hélice, apresentando um padrão preciso de doadores de ligações de hidrogênio,

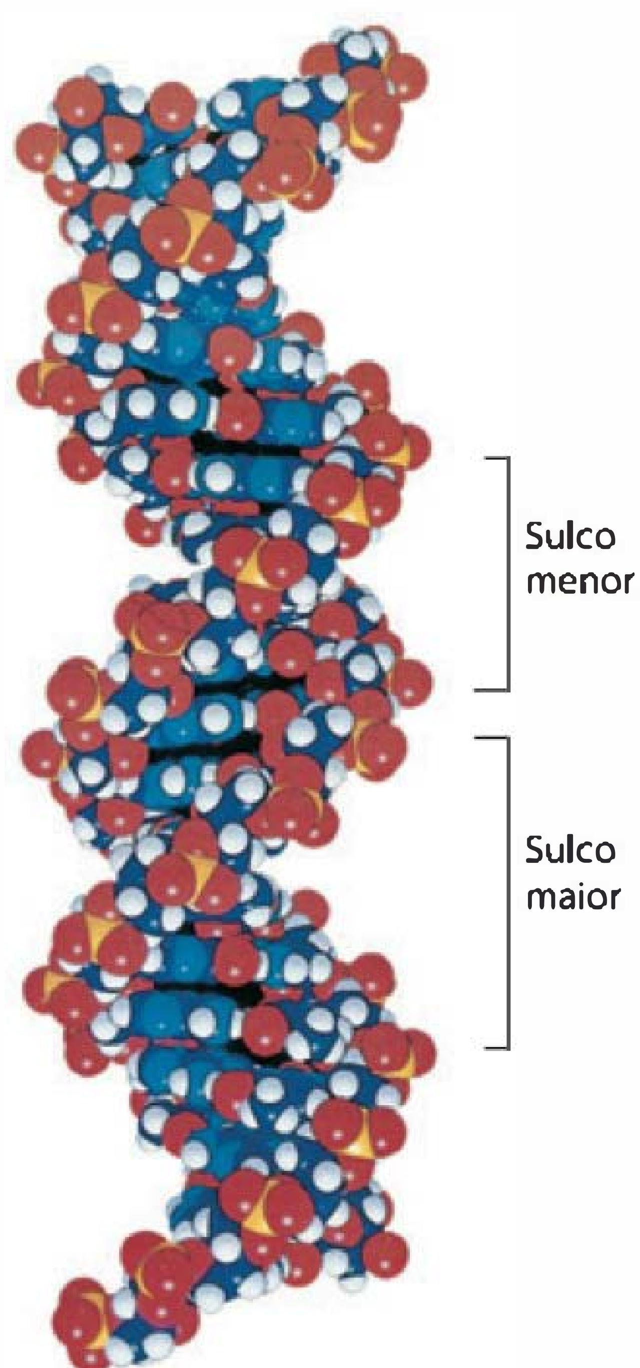


Figura 7-6 Estrutura dupla-hélice do DNA. Modelo de preenchimento de espaços do DNA mostrando os sulcos maior e menor na parte externa da dupla-hélice. Os átomos estão coloridos da seguinte forma: carbono, *azul-escuro*; nitrogênio, *azul-claro*; hidrogênio, *branco*; oxigênio, *vermelho*; fósforo, *amarelo*.

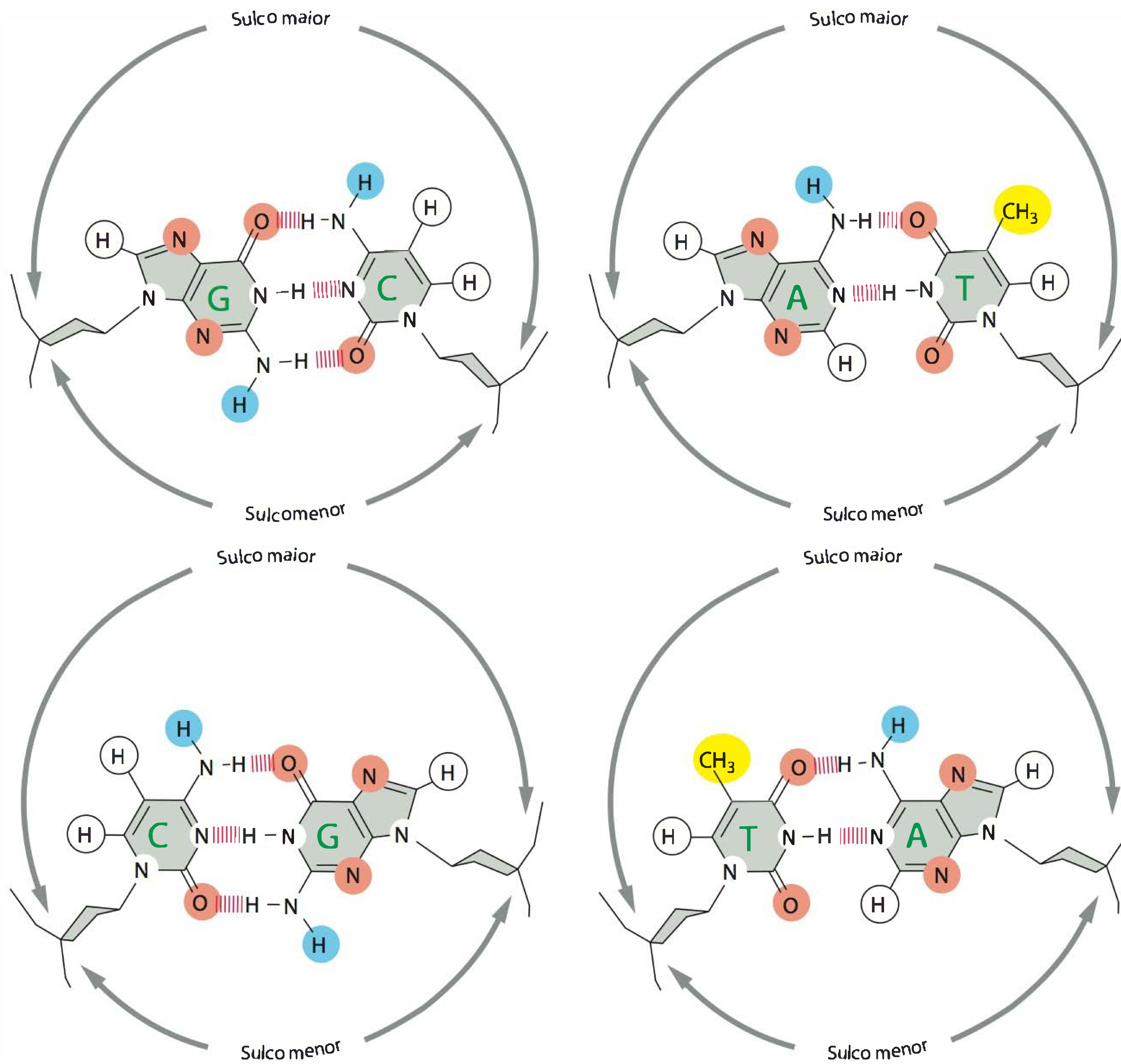


Figura 7-7 Como os diferentes pares de bases no DNA podem ser reconhecidos a partir das suas bordas sem a necessidade de abrir a dupla-hélice. As quatro possíveis combinações de pares de bases estão mostradas, com os possíveis doadores de ligações de hidrogênio indicados em *azul*, os possíveis aceptores de ligações de hidrogênio indicados em *vermelho*, e as ligações de hidrogênio e os pares de bases propriamente ditos como uma série de pequenas linhas paralelas *vermelhas*. Grupos metila, os quais formam protuberâncias hidrofóbicas, estão mostrados em *amarelo*, e os átomos de hidrogênio que estão ligados a carbonos e, portanto, não estão disponíveis para formar ligações de hidrogênio estão em *branco*. (De C. Branden e J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

de aceptores de ligações de hidrogênio e de sinais hidrofóbicos, que podem ser reconhecidos pelas proteínas em ambos os sulcos, maior e menor (**Figura 7-7**). Contudo, somente no sulco maior os padrões são marcadamente diferentes para cada um dos quatro arranjos entre os quatro pares de bases (**Figura 7-8**). Por essa razão, as proteínas de regulação gênica geralmente ligam-se ao sulco maior – como veremos a seguir.

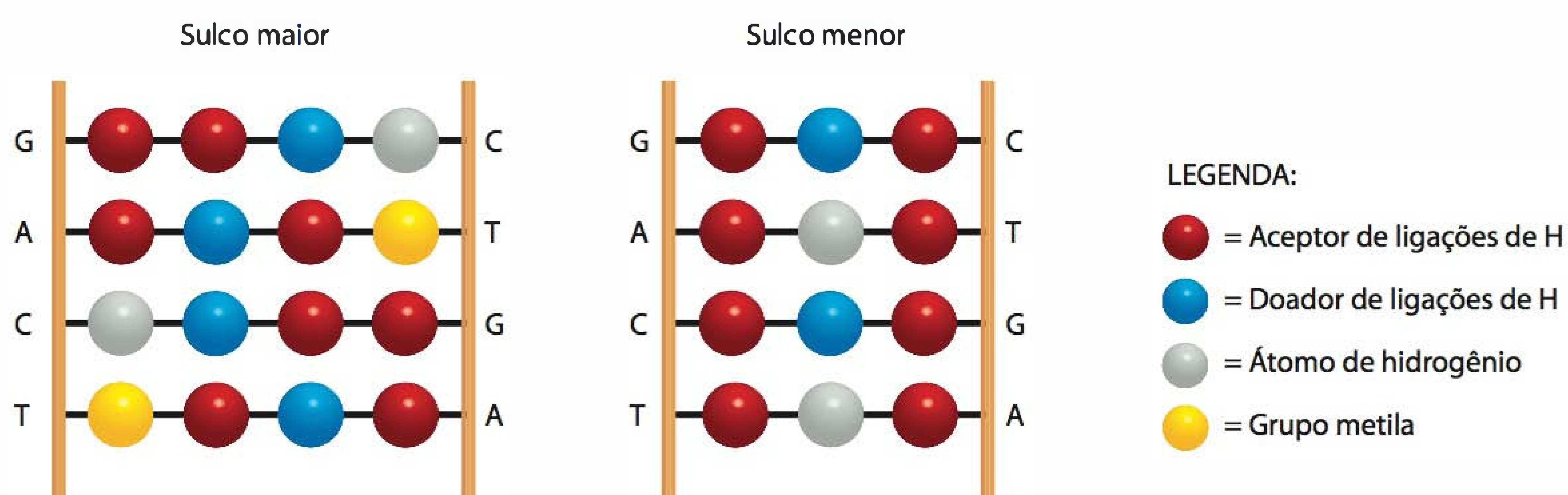


Figura 7-8 Um código de reconhecimento do DNA. A borda de cada par de bases, visualizada aqui olhando diretamente para os sulcos maior ou menor, contém um padrão distinto de doadores de ligações de hidrogênio, de aceptores de ligações de hidrogênio e grupos metila. A partir do sulco maior, cada uma das quatro configurações de pares de bases projeta um padrão único de características. A partir do sulco menor, entretanto, os padrões são semelhantes para G-C e C-G, assim como para A-T e T-A. O código de cores é o mesmo da Figura 7-7. (De C. Branden e J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

Sequências curtas de DNA são componentes fundamentais dos comutadores genéticos

Uma sequência de nucleotídeos pode ser "lida" como um padrão de características moleculares na superfície da dupla-hélice de DNA. Sequências de nucleotídeos particulares, cada uma tipicamente com menos de 20 pares de nucleotídeos de comprimento, funcionam como componentes fundamentais dos comutadores genéticos, servindo como sítios de reconhecimento para a ligação de proteínas de regulação gênica específicas. Milhares dessas sequências de DNA têm sido identificadas, cada uma reconhecida por uma proteína de regulação gênica diferente (ou por um conjunto de proteínas de regulação gênica relacionadas). Algumas dessas proteínas de regulação gênica discutidas no decorrer deste capítulo estão listadas na **Tabela 7-1**, junto das sequências de DNA que elas reconhecem.

Voltamo-nos agora para as proteínas de regulação gênica propriamente ditas, o segundo componente fundamental dos controles genéticos. Começamos com as características estruturais que permitem a essas proteínas reconhecerem sequências de DNA pequenas e específicas contidas em uma dupla-hélice muito maior.

As proteínas de regulação gênica contêm motivos estruturais que podem ler sequências de DNA

O reconhecimento molecular na biologia geralmente depende de um encaixe exato entre as superfícies de duas moléculas, e o estudo das proteínas de regulação gênica forneceu alguns dos exemplos mais claros desse princípio. Uma proteína de regulação gênica reconhece uma sequência de DNA específica porque a superfície da proteína é extensivamente complemen-

Tabela 7-1 Algumas proteínas de regulação gênica e as sequências de DNA que elas reconhecem

	Nome	Sequências de DNA reconhecidas*
Bactéria	Repressor Lac	5′ AATTGTGAGCGGATAACAATT 3′ TTAACACTCGCCTATTGTTAA
	CAP	TGTGAGTTAGCTCACT ACACTCAATCGAGTGA
	Repressor Lambda	TATCACCGCCAGAGGT ATAGTGGCGGTCTCCAT
Levedura	Gal4	CGGAGGACTGTCCTCCG GCCTCCTGACAGGAGGC
	Matα2	CATGTAATT GTACATTAA
	Gcn4	ATGACTCAT TACTGAGTA
Drosophila	Kruppel	AACGGGTTAA TTGCCCAATT
	Bicoid	GGGATTAGA CCCTAATCT
Mamíferos	Sp1	GGGCGG CCCGCC
	Domínio Oct1 Pou	ATGCAAAT TACGTTTA
	GATA1	TGATAG ACTATC
	MyoD	CAAATG GTTTAC
	p53	GGGCAAGTCT CCCGTTCAGA

*Por conveniência, somente uma sequência de reconhecimento, ao invés de uma sequência consenso (ver Figura 6-12), é mostrada para cada proteína.

tar às características especiais da superfície da dupla-hélice naquela região. Na maioria dos casos, a proteína faz um grande número de contatos com o DNA, envolvendo ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas. Embora cada contato individual seja fraco, os aproximadamente 20 contatos que são formados normalmente em uma interface proteína-DNA somam-se para assegurar que a interação seja altamente específica e muito forte (**Figura 7-9**). De fato, as interações DNA-proteína incluem algumas das interações moleculares mais fortes e mais específicas conhecidas na biologia.

Embora cada exemplo de reconhecimento proteína-DNA seja único quanto aos detalhes, os estudos de cristalografia por raios X e de espectroscopia por NMR de várias centenas de proteínas de regulação gênica têm revelado que muitas das proteínas contêm um ou outro motivo de um pequeno conjunto de motivos estruturais de ligação ao DNA. Esses motivos geralmente usam tanto hélices α quanto folhas β pregueadas para ligarem-se ao sulco maior do DNA; esse sulco, como vimos, contém informação suficiente para distinguir uma sequência de DNA de qualquer outra. O encaixe é tão bom que foi sugerido que as dimensões estruturais da unidade básica dos ácidos nucleicos e das proteínas evoluíram juntas para permitir o encadeamento dessas moléculas.

O motivo hélice-volta-hélice é um dos motivos de ligação ao DNA mais simples e mais comuns

O primeiro motivo proteico de ligação ao DNA a ser reconhecido foi o **hélice-volta-hélice**. Originalmente identificado em proteínas bacterianas, esse motivo tem sido encontrado desde então em centenas de proteínas de ligação ao DNA tanto de eucariotos como de procariotos. É constituído de duas hélices α conectadas por uma pequena cadeia estendida de aminoácidos, os quais constituem a "volta" (**Figura 7-10**). As duas hélices são mantidas em um ângulo fixo, principalmente por meio de interações entre elas. A hélice mais C-terminal é chamada de *hélice de reconhecimento*, pois se encaixa no sulco maior do DNA; as suas cadeias laterais de aminoácidos, as quais diferem de proteína para proteína, desempenham um papel importante no reconhecimento de sequências de DNA específicas, às quais a proteína se liga.

Externamente à região hélice-volta-hélice, a estrutura de várias proteínas que contêm esse motivo pode variar bastante (**Figura 7-11**). Portanto, cada proteína "apresenta" seu motivo hélice-volta-hélice para o DNA de uma maneira única, característica que, acredita-se, incrementa a versatilidade do motivo hélice-volta-hélice pelo aumento do número de sequências de DNA que o motivo pode ser usado para reconhecer. Além disso, na maioria dessas proteínas, partes da cadeia polipeptídica externa ao domínio hélice-volta-hélice também fazem contatos importantes com o DNA, auxiliando no ajuste fino das interações.

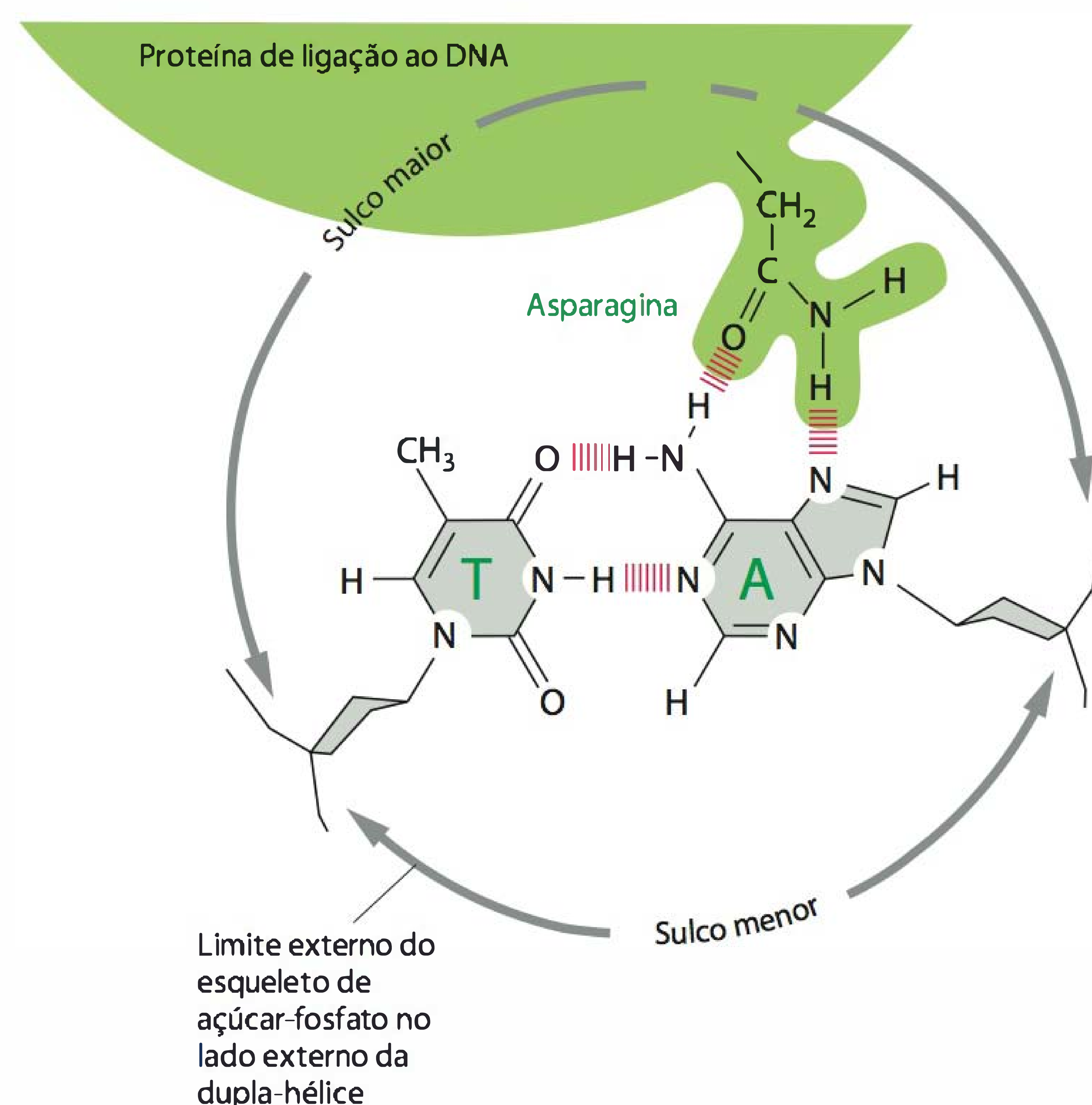


Figura 7-9 Ligação de uma proteína de regulação gênica ao sulco maior do DNA. Somente um único contato é mostrado. Normalmente, a interface proteína-DNA consistiria de 10 a 20 desses contatos, envolvendo aminoácidos diferentes, cada um contribuindo para a força da interação proteína-DNA.

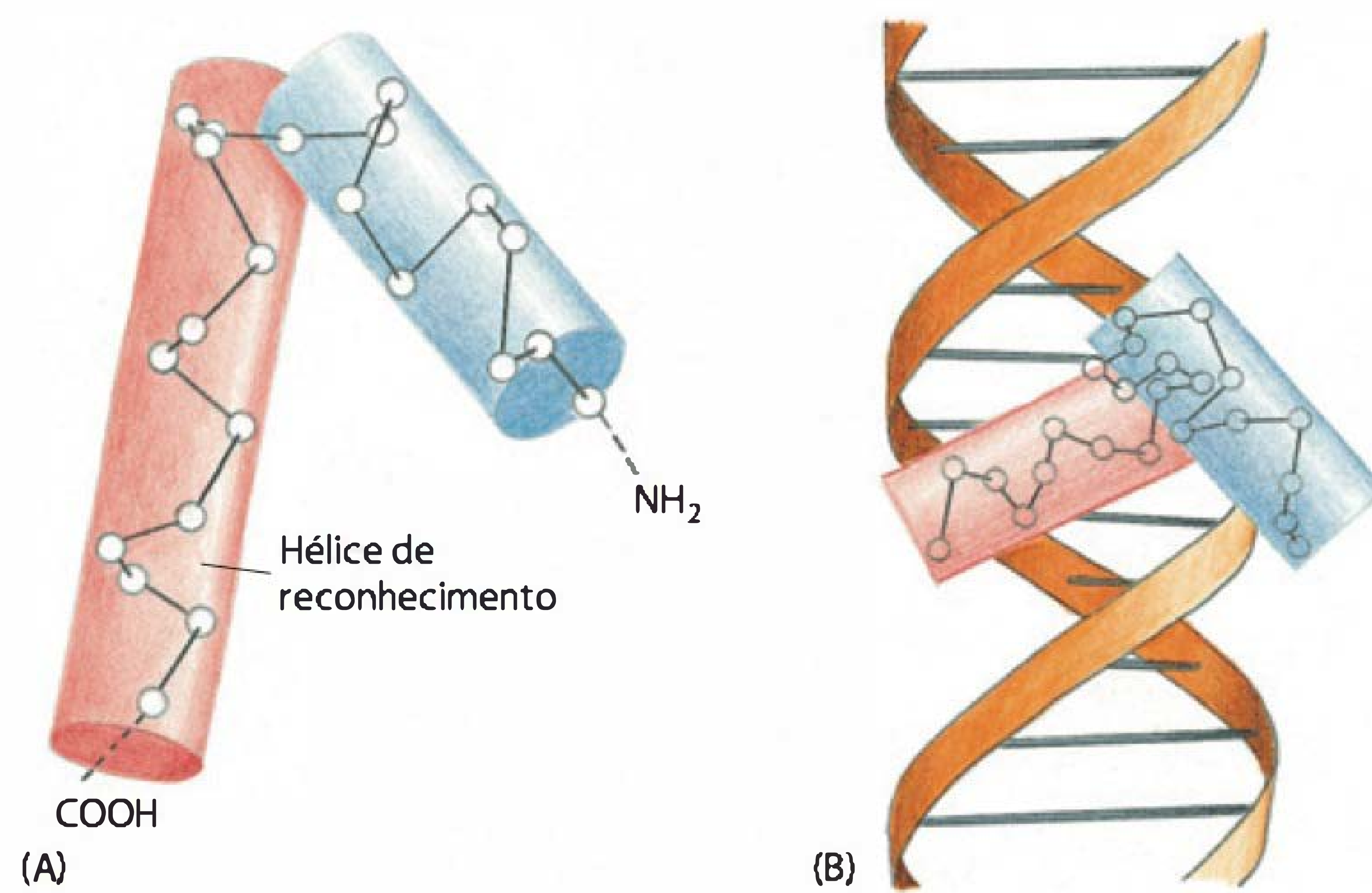


Figura 7-10 Motivo de ligação ao DNA hélice-volta-hélice. O motivo é mostrado em (A), onde cada círculo *branco* denota o carbono central de um aminoácido. A hélice α C-terminal (*vermelha*) é chamada de hélice de reconhecimento porque participa do reconhecimento sequência-específico do DNA. Como mostrado em (B), essa hélice encaixa-se no sulco maior do DNA, onde interage com as bordas dos pares de bases (ver também Figura 7-7). A hélice α N-terminal (*azul*) funciona principalmente como um componente estrutural que auxilia a posicionar a hélice de reconhecimento.

O grupo de proteínas hélice-volta-hélice mostrado na Figura 7-11 demonstra uma característica comum a muitas proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas. Elas ligam-se como dímeros simétricos às sequências de DNA que são compostas de dois "meio-sítios" muito similares, os quais também estão arranjados simetricamente (**Figura 7-12**). Esse arranjo permite que cada monômero da proteína faça um conjunto praticamente idêntico de contatos e aumente bastante a afinidade de ligação: em um cálculo aproximado, duplicando o número de contatos duplica-se a energia livre da interação e, portanto, *eleva-se ao quadrado* a constante de afinidade.

As proteínas homeodomínio constituem-se em uma classe especial de proteínas hélice-volta-hélice

Não muito após as primeiras proteínas reguladoras terem sido descobertas em bactérias, as análises genéticas na mosca-da-fruta *Drosophila* levaram à caracterização de uma importante classe de genes, os *genes seletores homeóticos*, que têm um papel crítico na orquestração do desenvolvimento da mosca. Como discutido no Capítulo 22, desde então foi demonstrado que eles também têm uma função fundamental no desenvolvimento de animais mais complexos. Mutações nesses genes causam a conversão de uma parte do corpo da mosca em outra, indicando que as proteínas por eles codificadas controlam decisões críticas no desenvolvimento.

Quando as sequências de nucleotídeos de vários genes seletores homeóticos foram determinadas no começo da década de 1980, cada uma mostrou codificar uma região de 60 aminoácidos quase idêntica que define esta classe de proteínas, sendo denominada **homeodomínio**. Quando a estrutura tridimensional do homeodomínio foi determinada, viu-se

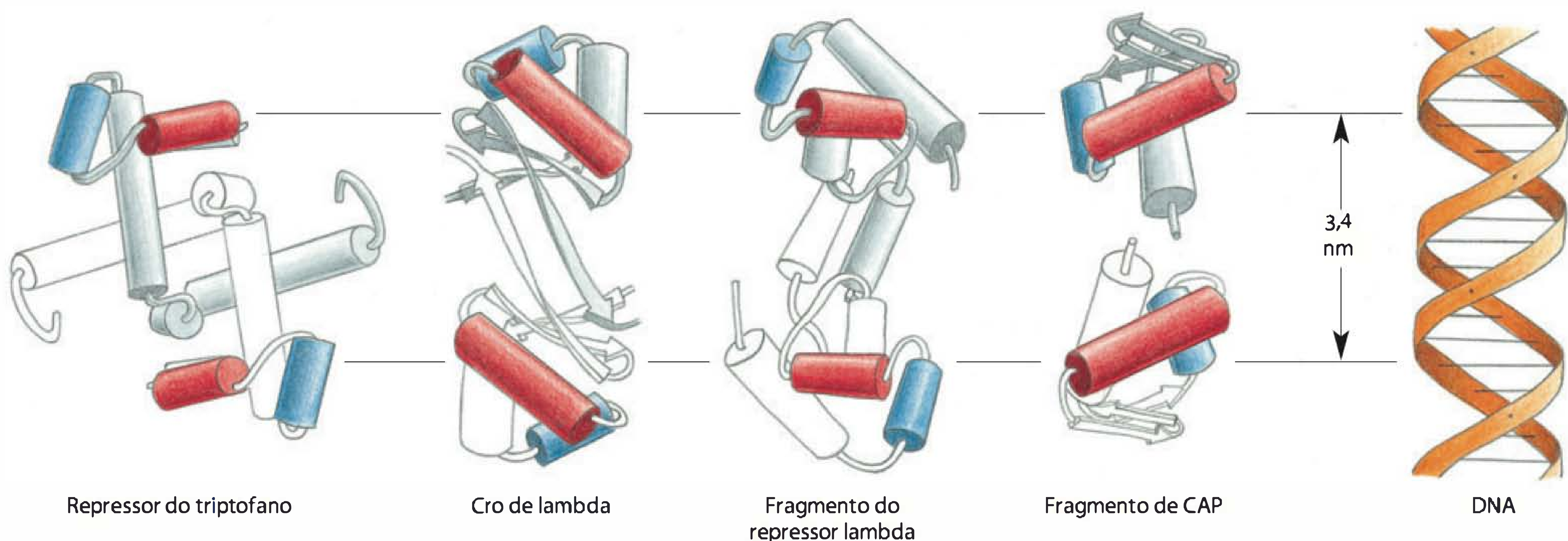


Figura 7-11 Algumas proteínas de ligação ao DNA hélice-volta-hélice. Todas as proteínas ligam-se ao DNA como dímeros nos quais as duas cópias da hélice de reconhecimento (*cilindro vermelho*) são separadas por exatamente uma volta da hélice de DNA (3,4 nm). A outra hélice do motivo hélice-volta-hélice está em *azul*, como na Figura 7-10. As proteínas repressor lambda e Cro controlam a expressão gênica do bacteriófago lambda, e o repressor do triptofano e a proteína ativadora do catabolismo (CAP) controlam a expressão de conjuntos de genes em *E. coli*.

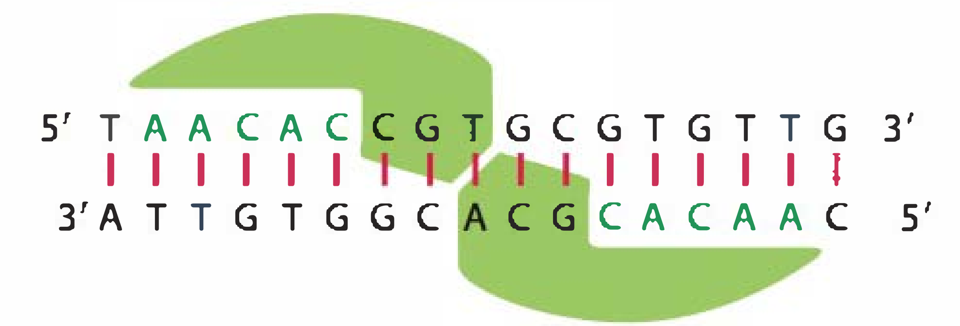


Figura 7-12 Sequência de DNA específica reconhecida pela proteína Cro do bacteriófago lambda. Os nucleotídeos marcados em *verde* nesta sequência estão arranjados simetricamente, permitindo que cada metade do sítio de DNA seja reconhecida da mesma maneira por cada monômero da proteína, também mostrados em *verde*. Ver Figura 7-11 para a estrutura real da proteína.

que ela continha um motivo hélice-volta-hélice relacionado ao das proteínas de regulação gênica bacterianas, fornecendo uma das primeiras indicações de que os princípios da regulação gênica, estabelecidos nas bactérias, também são relevantes para organismos mais complexos. Mais de 60 proteínas com homeodomínios foram descobertas até hoje, somente em *Drosophila*, e proteínas com homeodomínios têm sido identificadas em praticamente todos os organismos estudados, de leveduras a plantas e humanos.

A estrutura de um homeodomínio ligado a sua sequência específica de DNA é mostrada na **Figura 7-13**. Enquanto o motivo hélice-volta-hélice das proteínas de regulação gênica bacterianas frequentemente é embutido em diferentes contextos estruturais, o motivo hélice-volta-hélice dos homeodomínios é sempre circundado pela mesma estrutura (a qual forma o resto do homeodomínio), sugerindo que o motivo é sempre apresentado para o DNA da mesma maneira. Além disso, estudos estruturais têm mostrado que uma proteína com homeodomínio de levedura e uma proteína com homeodomínio de *Drosophila* apresentam conformações muito similares, e reconhecem o DNA quase exatamente da mesma maneira, embora sejam idênticas em somente 17 das 60 posições dos aminoácidos (ver Figura 3-13).

Existem vários tipos de motivos de ligação ao DNA dedos de zinco

O motivo hélice-volta-hélice é composto somente por aminoácidos. Um segundo grupo importante de motivos de ligação ao DNA adiciona um ou mais átomos de zinco como componentes estruturais. Embora todos os motivos de ligação ao DNA coordenados por zinco sejam chamados de **dedos de zinco**, essa descrição refere-se somente a sua aparência em desenhos esquemáticos, datados da sua descoberta (**Figura 7-14**A). Os estudos estruturais subsequentes têm mostrado que eles pertencem a vários grupos estruturais distintos, dois dos quais são mostrados aqui. O primeiro tipo foi inicialmente descoberto na proteína que ativa a transcrição de um gene eucariótico de RNA ribossomal (rRNA). Ele possui uma estrutura simples, consistindo em uma hélice α e uma folha β pregueada mantidas juntas pelo zinco (Figura 7.14B). Esse tipo de dedo de zinco frequentemente é encontrado em um grupo contendo dedos de zinco adicionais, arranjados um após o outro de maneira que a hélice α de cada um possa ligar-se ao sulco maior do DNA, formando uma sequência praticamente contínua de hélices α ao longo do sulco. Dessa maneira, uma interação DNA-proteína forte e específica é construída por meio de uma unidade de repetição básica estrutural (**Figura 7-15**).

Outro tipo de dedo de zinco é encontrado em uma grande família de proteínas receptoras intracelulares (discutidas em detalhe no Capítulo 15). Ele forma um tipo diferente

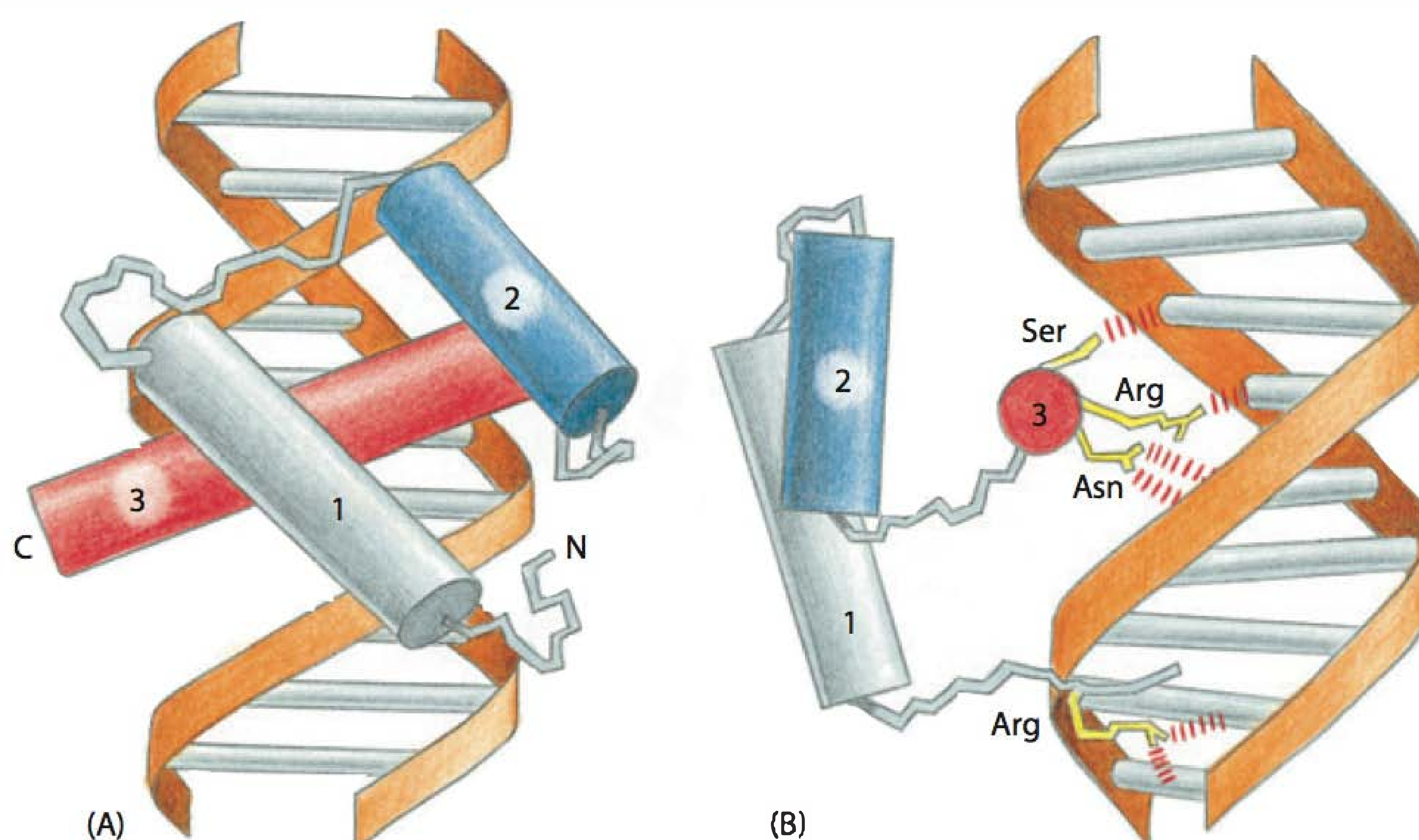


Figura 7-13 Um **homeodomínio ligado a sua sequência de DNA específica.** Duas diferentes visões da mesma estrutura estão mostradas. (A) O homeodomínio está dobrado em três hélices α, as quais estão intimamente empacotadas juntas por interações hidrofóbicas. A parte contendo as hélices 2 e 3 assemelha-se bastante ao motivo hélice-volta-hélice. (B) A hélice de reconhecimento (hélice 3, *vermelha*) faz contatos importantes com o sulco maior do DNA. A asparagina (Asn) da hélice 3, por exemplo, interage com uma adenina, como mostrado na Figura 7-9. Os pares de nucleotídeos também interagem no sulco menor por um braço flexível ligado à hélice I. O homeodomínio mostrado aqui é de uma proteína de regulação gênica de levedura, porém assemelha-se muito a homeodomínios de muitos organismos eucarióticos. (Adaptada de C. Wolberger et al., *Cell* 67:517-528, 1991. Com permissão de Elsevier).

Figura 7-14 Um tipo de proteína dedo de zinco. Esta proteína pertence à família Cys-Cys-His-His das proteínas dedo de zinco, denominada de acordo com os aminoácidos que seguram o zinco. (A) Desenho esquemático da sequência de aminoácidos de um dedo de zinco de uma proteína de rã desta classe. (B) A estrutura tridimensional desse tipo de dedo de zinco é construída a partir de uma folha β antiparalela (aminoácidos 1 a 10) seguida por uma hélice α (aminoácidos 12 a 24). Os quatro aminoácidos que se ligam ao zinco (Cys 3, Cys 6, His 19 e His 23) seguram firmemente uma extremidade da hélice α a uma extremidade da folha β. (Adaptada de M. S. Lee et al., *Science* 245:635-637, 1989. Com permissão de AAAS.)

de estrutura (semelhante em alguns aspectos ao motivo hélice-volta-hélice) na qual duas hélices α são empacotadas juntas com átomos de zinco (**Figura 7-16**). Como as proteínas hélice-volta-hélice, essas proteínas normalmente formam dímeros que permitem que uma das duas hélices α de cada subunidade tenha interação com o sulco maior do DNA. Embora os dois tipos de estruturas dedos de zinco discutidos nesta seção sejam estruturalmente distintos, eles compartilham duas características importantes: ambos utilizam o zinco como elemento estrutural e ambos usam a hélice α para reconhecer o sulco maior do DNA.

Folhas β pregueadas também podem reconhecer DNA

Nos motivos de ligação ao DNA discutidos até agora, as hélices α são o mecanismo principal usado para reconhecer sequências específicas de DNA. Um grupo de proteínas reguladoras, entretanto, evoluiu para uma estratégia de reconhecimento totalmente diferente. Nesse caso, a informação na superfície do sulco maior é lida por uma folha β pregueada formada por duas fitas, com as cadeias laterais dos aminoácidos estendendo-se a partir da folha em direção ao DNA (**Figura 7-17**). Como no caso de uma hélice α de reconhecimento, esse motivo com folha β pregueada pode ser usado para o reconhecimento de muitas sequências de DNA diferentes; a sequência de DNA exata reconhecida depende da sequência de aminoácidos que fazem parte da folha β pregueada.

Figura 7-15 Ligação ao DNA por uma proteína dedo de zinco. (A) A estrutura de um fragmento de uma proteína de regulação gênica de camundongo ligada a um sítio específico de DNA. Essa proteína reconhece o DNA usando três dedos de zinco do tipo Cys-Cys-His-His (ver Figura 7-14) arranjados em repetições diretas. (B) Os três dedos de zinco possuem sequências de aminoácidos similares e ligam-se ao DNA de maneiras semelhantes. Em ambos (A) e (B), o átomo de zinco em cada dedo é representado por uma pequena esfera. (Adaptada de N. Pavletich e C. Pabo, *Science* 252:810-817, 1991. Com permissão de AAAS.)

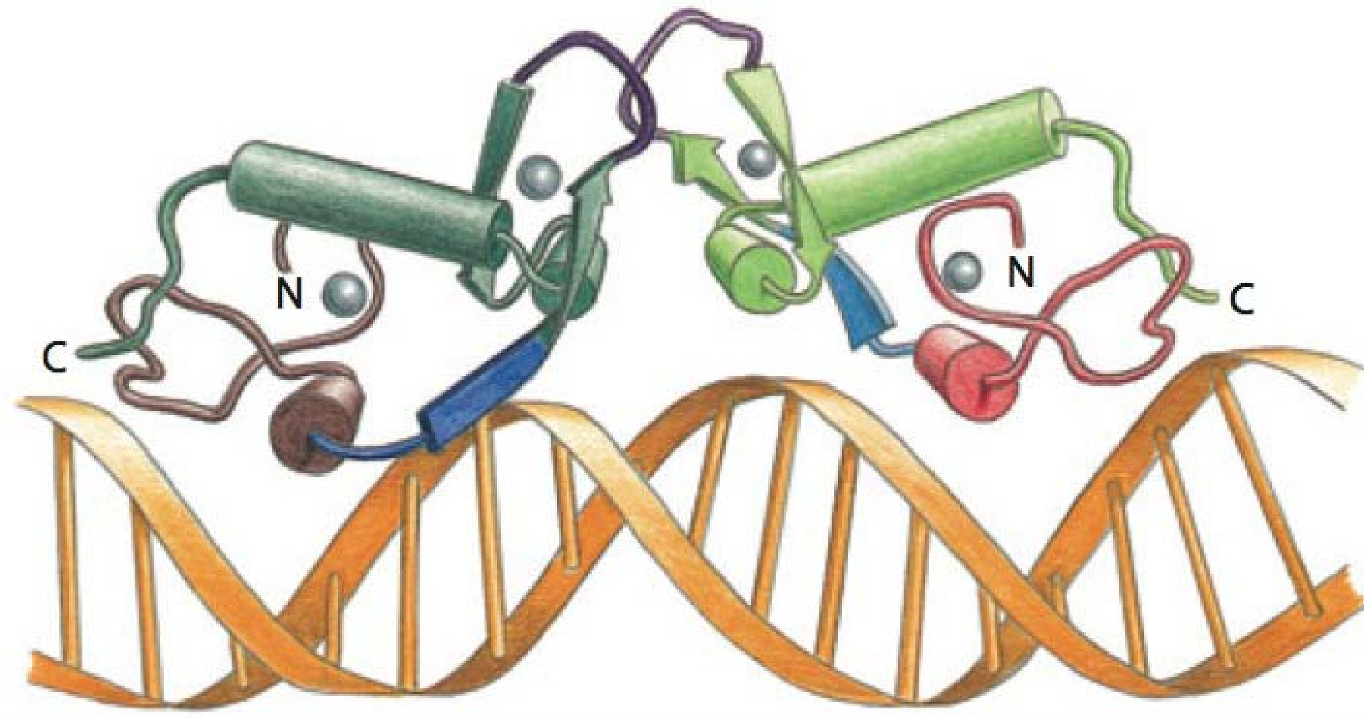


Figura 7-16 Dímero do domínio dedo de zinco de uma família de receptores intracelulares ligado a sua sequência de DNA específica. Cada domínio dedo de zinco contém dois átomos de Zn (indicado por pequenas *esferas cinzas*); um estabiliza a hélice de reconhecimento do DNA (mostrado em *marrom* em uma subunidade e em *vermelho* em outra) e outro estabiliza uma alça (mostrado em *púrpura*) envolvida na formação do dímero. Cada átomo de zn é coordenado por quatro resíduos de cisteína apropriadamente espaçados. Como as proteínas hélice-volta-hélice mostradas na Figura 7-11, as duas hélices de reconhecimento do dímero são mantidas separadas por uma distância correspondente a uma volta da dupla-hélice de DNA. O exemplo específico mostrado é um fragmento do receptor de glicocorticoides. Esta é a proteína por meio da qual células detectam e respondem transcricionalmente aos hormônios glicocorticoides produzidos na glândula adrenal em resposta ao estresse. (Adaptada de B. F. Luisi et al., *Nature* 352:497-505, 1991. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Algumas proteínas utilizam alças que entram nos sulcos maior e menor para o reconhecimento do DNA

Algumas proteínas de ligação ao DNA utilizam alças peptídicas proeminentes para ler as sequências de nucleotídeos, ao invés de hélices α e folhas β pregueadas. Por exemplo, p53, um *supressor de tumor* crítico em humanos, reconhece pares nucleotídicos a partir tanto do sulco maior como do sulco menor utilizando tais alças (**Figura 7-18**). A função normal da proteína p53 é regular de forma rigorosa o crescimento e a proliferação celular. A sua importância pode ser apreciada pelo fato de que aproximadamente metade de todos os cânceres humanos adquire mutações somáticas no gene da p53; essa etapa é chave para a progressão de muitos tumores, como veremos no Capítulo 20. Muitas das mutações na p53 observadas nas células cancerosas destroem ou alteram a sua propriedade de ligação ao DNA; inclusive, Arg248, a qual se liga ao sulco menor do DNA (ver Figura 7-18), é o resíduo mutado com mais frequência da p53 nos cânceres humanos.

O motivo zíper de leucina faz a mediação tanto da ligação ao DNA como da dimerização proteica

Muitas proteínas de regulação gênica reconhecem o DNA como homodímeros, provavelmente porque, como vimos, essa é uma maneira simples de obter uma ligação específica forte (ver Figura 7-12). Normalmente, a porção da proteína responsável pela dimerização é diferente da porção responsável pela ligação ao DNA. Um motivo, entretanto, combina essas duas funções de uma maneira elegante e econômica. É denominado **motivo zíper de leucina**, assim chamado pela maneira como as duas hélices, uma de cada monômero, são reunidas para formar uma pequena região helicoidal (ver Figura 3-9). As hélices são mantidas juntas por interações entre cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (frequentemente em leucinas) que se estendem de um lado de cada hélice. Um pouco além da interface de dimerização, as duas hélices α separam-se para formar uma estrutura em forma de Y, a qual permite que suas cadeias laterais entrem em contato com o sulco maior do DNA. O dímero, portanto, segura a dupla-hélice como um prendedor de roupas em um varal (**Figura 7-19**).

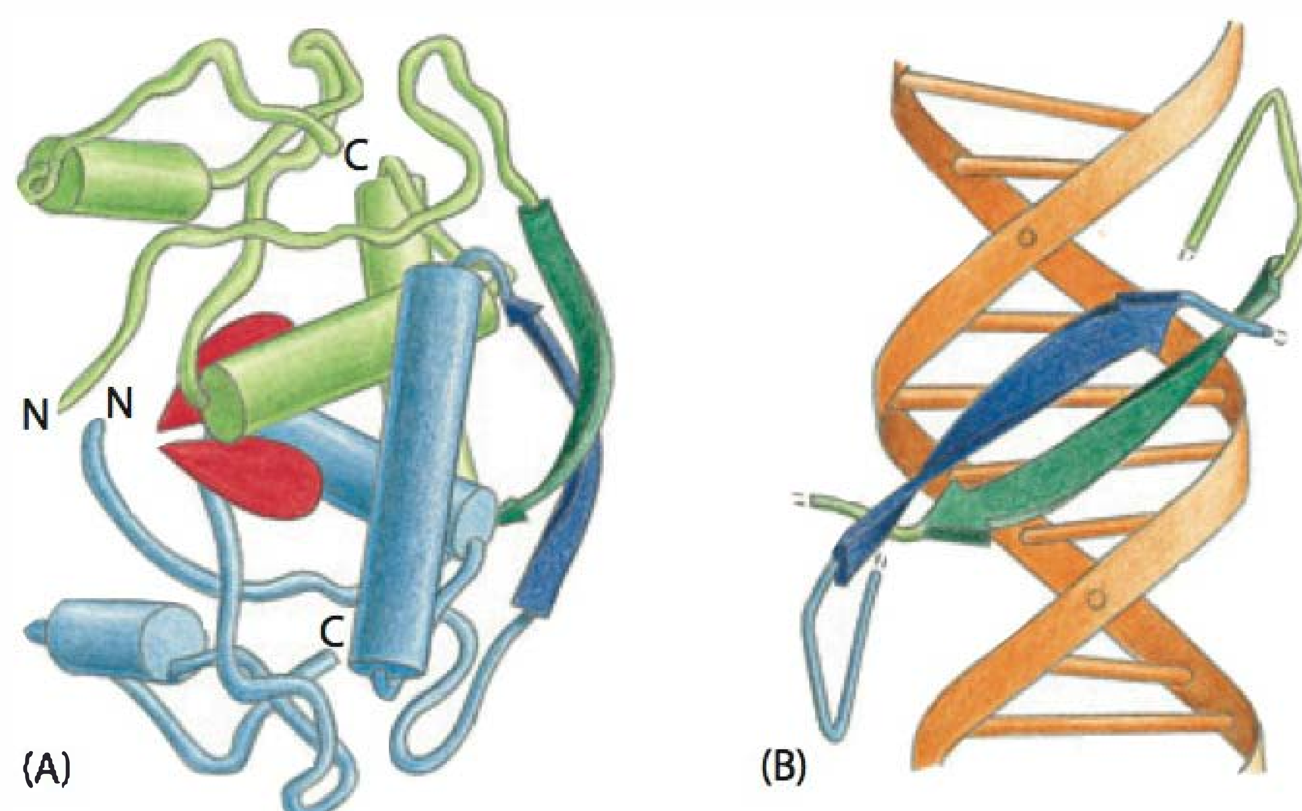


Figura 7-17 Proteína repressora Met bacteriana. O repressor bacteriano Met regula os genes codificantes das enzimas que catalisam a síntese de metionina. Quando esse aminoácido está abundante, ele liga-se ao repressor, causando uma mudança na estrutura da proteína que a possibilita ligar-se ao DNA firmemente, interrompendo a síntese das enzimas. (A) Para ligar-se firmemente ao DNA, o repressor Met precisa formar um complexo com *S*-adenosil metionina, mostrada em *vermelho*. Uma subunidade da proteína dimérica é mostrada em *verde*, enquanto a outra é mostrada em *azul*. A folha β com duas fitas que se liga ao DNA é formada por uma fita de cada subunidade, sendo mostrada em *verde-escuro* e *azul-escuro*. (B) Diagrama simplificado do repressor Met ligado ao DNA, mostrando como a folha β com duas fitas do repressor liga-se ao sulco maior. Por clareza, as outras regiões do repressor foram omitidas. (A, adaptada de S. Phillips, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:89-98, 1991, com permissão de Elsevier; B, adaptada de W. Somers e S. Phillips, *Nature* 359:387-393, 1992. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

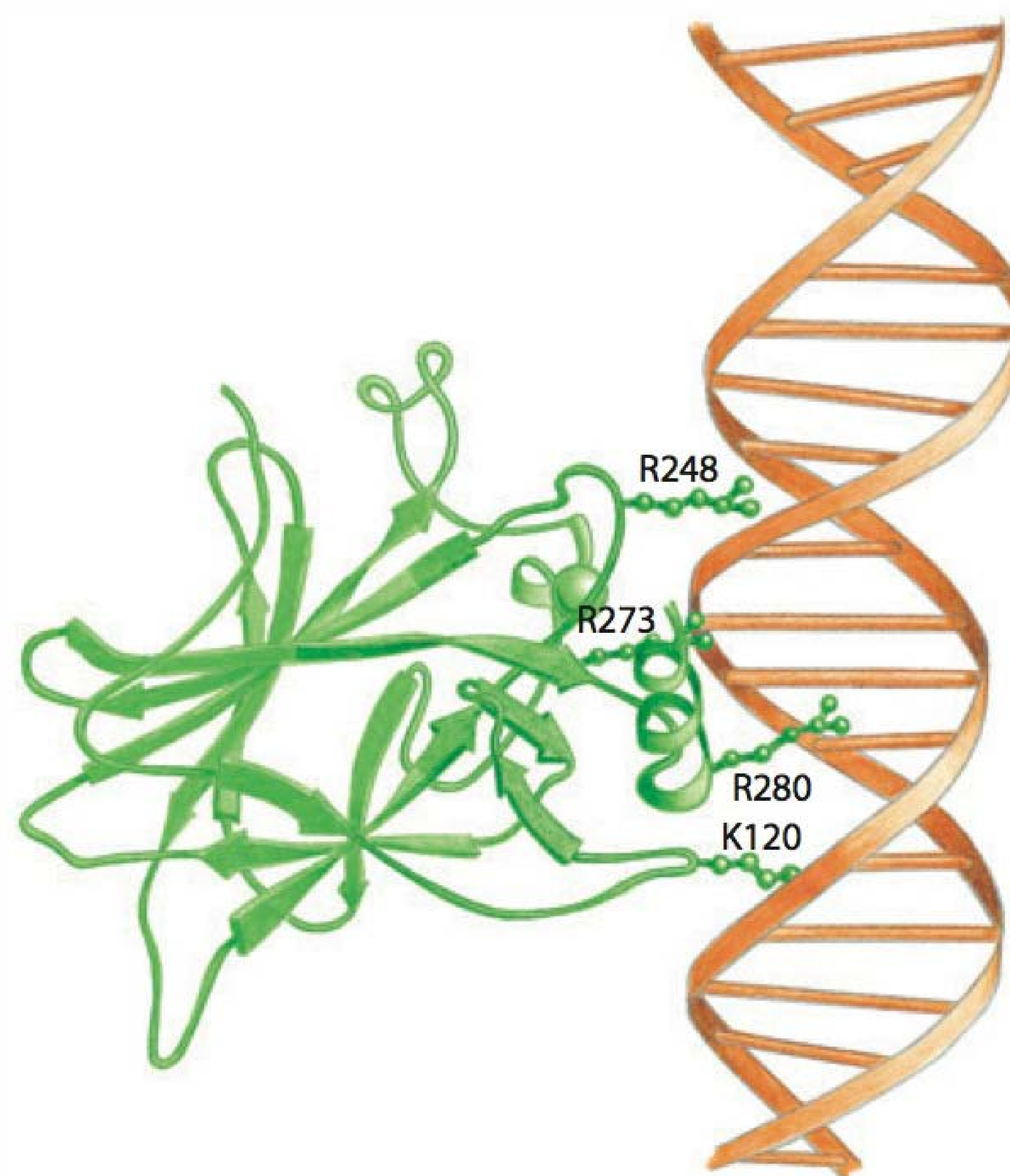


Figura 7-18 Reconhecimento do DNA pela proteína p53. Os contatos de DNA mais importantes são feitos pela arginina 248 e lisina 120, as quais se conectam a partir das alças projetadas por entre os sulcos menor e maior. A conformação da proteína p53 necessita de um átomo de zinco (mostrado como uma esfera), mas a maneira pela qual o zinco é incorporado pela proteína é completamente diferente das proteínas dedo-de-zinco descritas anteriormente.

A heterodimerização expande o repertório de sequências de DNA que as proteínas de regulação gênica podem reconhecer

Muitas das proteínas de regulação gênica que vimos até aqui se ligam ao DNA como homodímeros, ou seja, dímeros constituídos de duas subunidades idênticas. Entretanto, muitas proteínas de regulação gênica também podem se associar a parceiros não idênticos para formar heterodímeros compostos de duas subunidades diferentes. Uma vez que normalmente os heterodímeros se formam a partir de duas proteínas com especificidades distintas de ligação ao DNA, a mistura e a combinação das proteínas de regulação gênica, dessa forma, aumentam



Figura 7-19 Dímero de zíperes de leucina ligado ao DNA. Dois domínios de ligação ao DNA em hélice α (*abaixo*) dimerizam através de suas regiões de zíperes de leucina em hélice α (*acima*) para formar uma estrutura em forma de Y invertido. Cada braço do Y é formado por uma única hélice α, uma a partir de cada monômero, a qual medeia a ligação a uma sequência de DNA específica no sulco maior do DNA. Cada hélice α liga-se a uma metade de uma estrutura simétrica de DNA. A estrutura mostrada é a da proteína Gcn4 de levedura, a qual regula a transcrição em resposta à disponibilidade de aminoácidos no meio ambiente. (Adaptada de T. E. Ellenberger et al., *Cell* 71:1223-1237, 1992. Com permissão de Elsevier.)

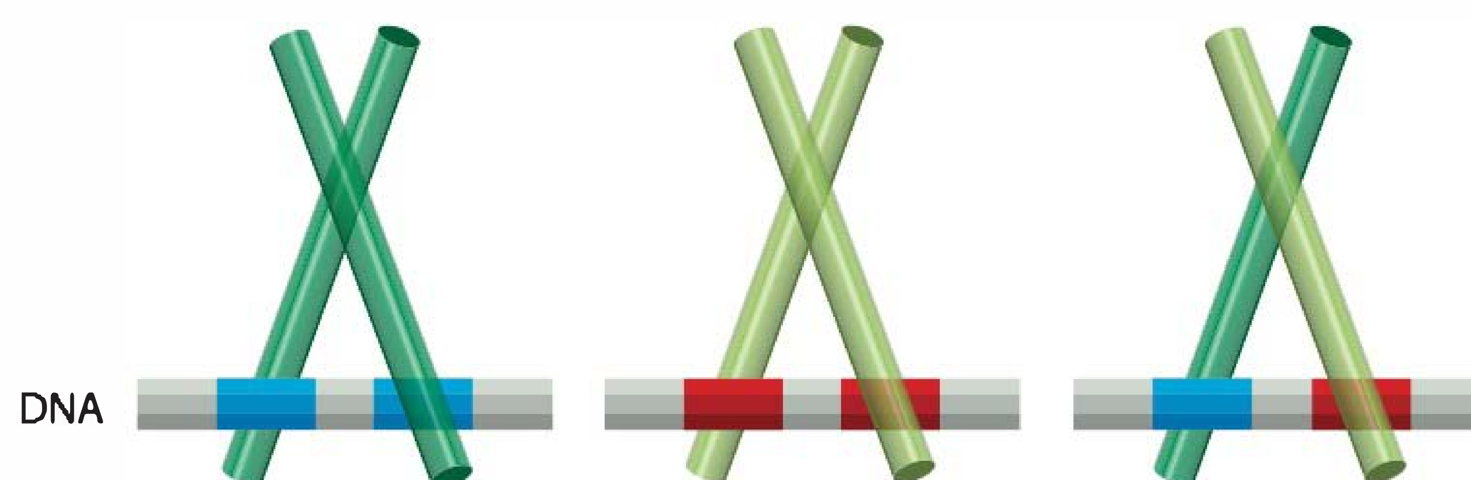


Figura 7-20 A heterodimerização de proteínas zíper de leucina pode alterar sua especificidade de ligação ao DNA. Homodímeros de zíperes de leucina ligam-se a sequências simétricas de DNA, como mostrado nos desenhos à esquerda e no centro. Essas duas proteínas reconhecem sequências de DNA diferentes, como indicado pelas regiões *vermelha* e *azul* no DNA. Os dois monômeros diferentes podem combinar-se para formar um heterodímero, o qual agora reconhece uma sequência de DNA híbrida, composta de uma região *vermelha* e uma *azul*.

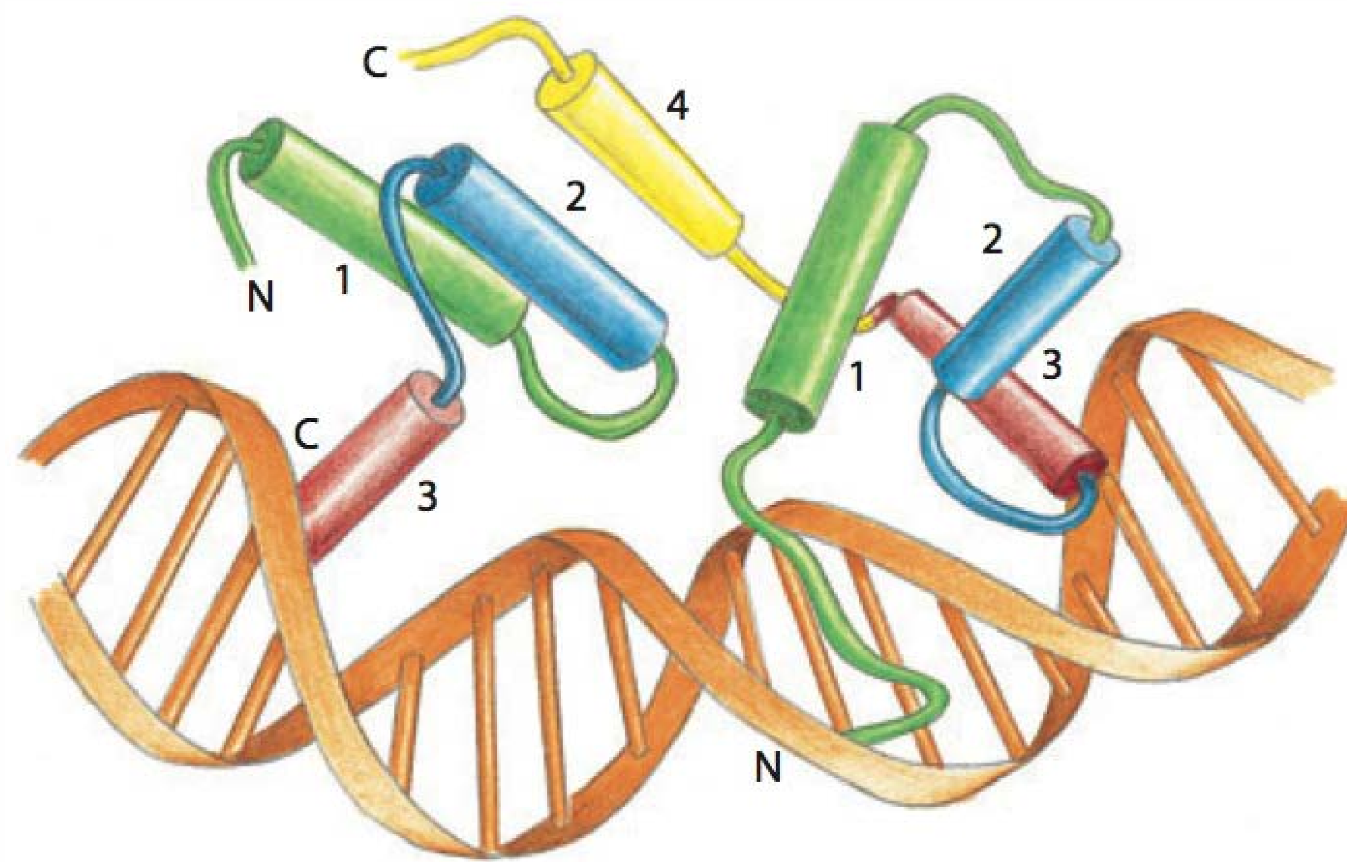


Figura 7-21 Heterodímero composto de duas proteínas contendo homeodomínios ligados ao seu sítio de reconhecimento de DNA. A hélice *amarela* 4 da proteína à direita (Matα2) não está estruturada na ausência da proteína à esquerda (Mata1), formando uma hélice somente após heterodimerização. A sequência de DNA é, portanto, reconhecida conjuntamente por ambas as proteínas; alguns dos contatos proteína-DNA feitos por Matα2 estão mostrados na Figura 7-13. Essas duas proteínas são de leveduras que se reproduzem por brotamento, onde o heterodímero especifica um tipo celular particular (ver Figura 7-65). As hélices estão numeradas de acordo com a Figura 7-13. (Adaptada de T. Li et al., *Science* 270:262-269, 1995. Com permissão de AAAS.)

muito o repertório das especificidades de ligação ao DNA que essas proteínas podem apresentar. Como ilustrado na **Figura 7-20**, três especificidades distintas de ligação ao DNA poderiam, em princípio, ser geradas a partir de dois tipos de monômeros de zíper de leucina, enquanto seis poderiam ser criadas a partir de três tipos de monômeros e assim por diante.

Existem, entretanto, limites para essa promiscuidade: se todos os muitos tipos de proteínas zíper de leucina em uma célula eucariótica típica formassem heterodímeros, a quantidade de "interações cruzadas" entre os circuitos de regulação gênica de uma célula seria grande o suficiente para causar o caos. Se um heterodímero pode ou não ser formado depende do quão bem as superfícies hidrofóbicas de duas hélices α de zíperes de leucina se entrelaçam entre si, o que, por sua vez, depende da sequência exata de aminoácidos das duas regiões de zíper. Assim, cada proteína zíper de leucina na célula forma dímeros somente com uma pequena porção de outras proteínas zíper de leucina.

A heterodimerização é um exemplo de **controle combinatório**, no qual as combinações de diferentes proteínas, em vez das proteínas individuais, controlam um processo celular. A heterodimerização como mecanismo de controle combinatório da expressão gênica ocorre em muitos tipos de proteínas de regulação gênica (**Figura 7-21**). O controle combinatório é o tema principal encontrado repetidamente neste capítulo, e a formação de complexos heterodiméricos de regulação gênica somente é uma das várias maneiras pelas quais as proteínas atuam em combinações para controlar a expressão gênica.

Algumas combinações de proteínas de regulação gênica tornaram-se "permanentemente ligadas" na célula; por exemplo, dois domínios distintos de ligação ao DNA podem, por rearranjos gênicos ocorridos ao longo de escalas de tempo evolutivas, terem sido interligados em uma única cadeia polipeptídica que apresenta uma nova especificidade de ligação ao DNA (**Figura 7-22**).

O motivo hélice-alça-hélice também faz a mediação da dimerização e da ligação ao DNA

Outro motivo importante de ligação ao DNA, relacionado ao zíper de leucina, é o **motivo hélice-alça-hélice (HLH, *helix-loop-helix*)**, o qual não deve ser confundido com o motivo

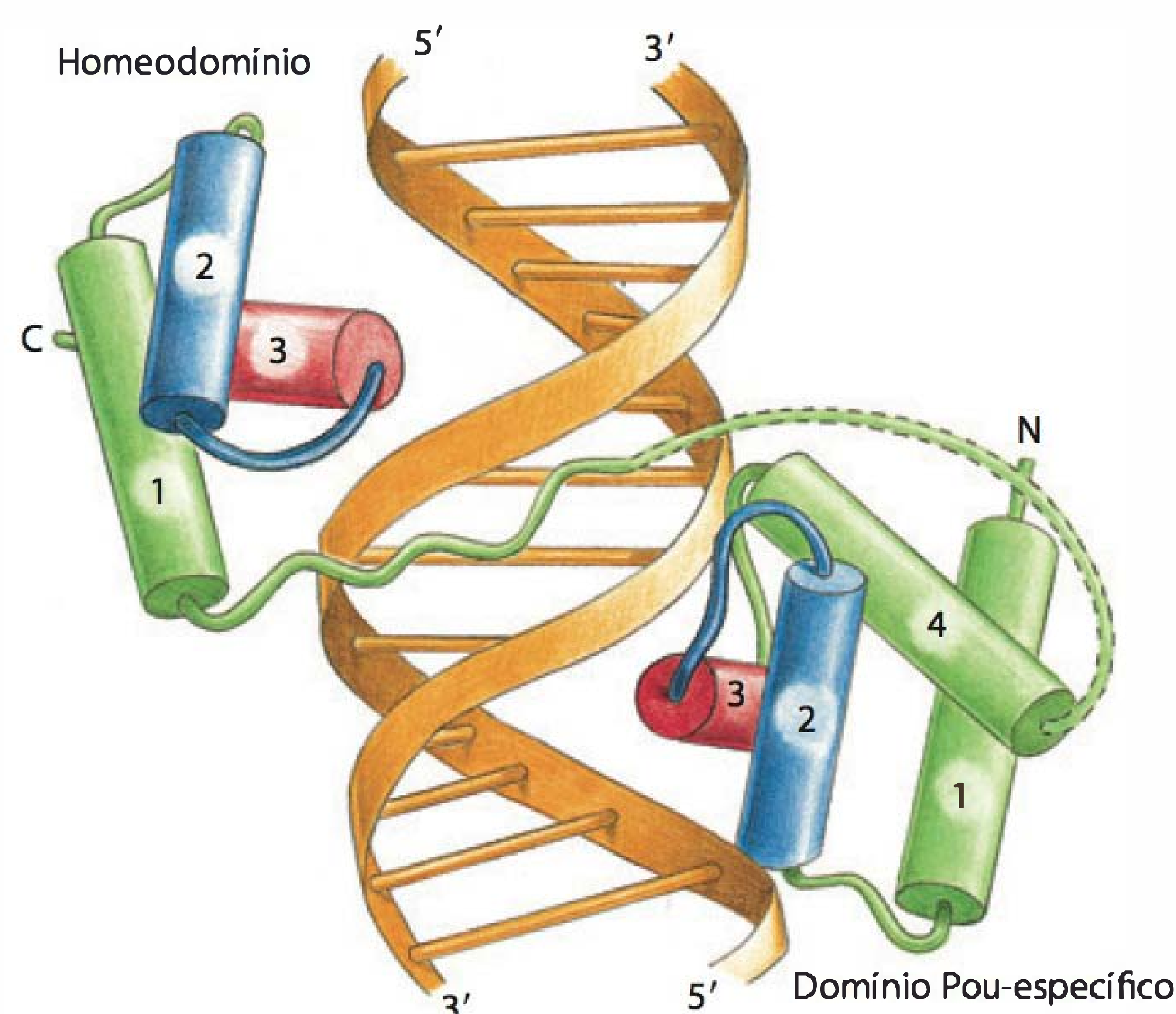


Figura 7-22 Dois domínios de ligação ao DNA covalentemente ligados por um polipeptídeo flexível. A estrutura mostrada (chamada de domínio Pou) consiste um homeodomínio e uma estrutura hélice-volta-hélice ligados por um polipeptídeo flexível tipo "trela", indicado pelas linhas tracejadas. A proteína inteira é codificada por um único gene, sendo sintetizada como uma cadeia polipeptídica contínua. A ligação covalente de duas estruturas dessa maneira resulta em um grande aumento na afinidade da proteína por sua sequência de DNA específica comparada à afinidade por DNA de cada estrutura separada. O grupo de proteínas de regulação gênica de mamíferos exemplificado por essa estrutura regula a produção de fatores de crescimento, imunoglobulinas e outras moléculas envolvidas no desenvolvimento. O exemplo particular mostrado é da proteína Oct1. (Adaptada de J. D. Klemm et al., *Cell* 77:21-32, 1994. Com permissão de Elsevier.)

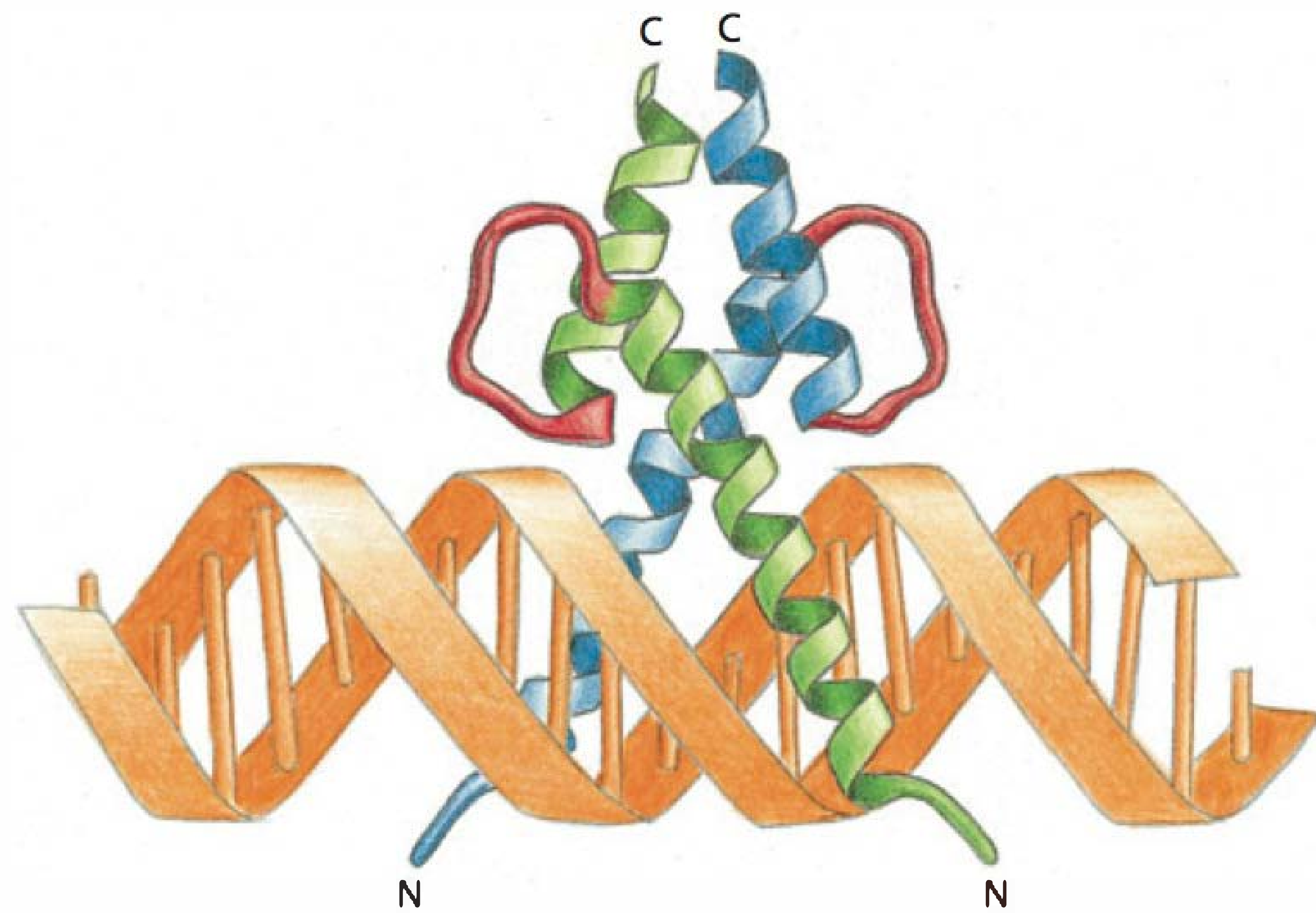


Figura 7-23 Dímero de hélice-alça--hélice (HLH) ligado ao DNA. Os dois monômeros são mantidos juntos em um feixe de quatro hélices: cada monômero contribui com duas hélices α conectadas por uma alça flexível de proteína (*vermelha*). Uma sequência específica de DNA é ligada pelas duas hélices α que se projetam a partir do feixe de quatro hélices. (Adaptada de A. R. Ferre-D'Amare et al., *Nature* 363:38-45, 1993. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

hélice-volta-hélice discutido anteriormente. Um motivo HLH consiste em uma pequena hélice α conectada por uma alça a uma segunda hélice α maior. A flexibilidade da alça permite que uma hélice se dobre e se empacote contra a outra. Como mostrado na **Figura 7-23**, essa estrutura em dupla-hélice liga-se tanto ao DNA como ao motivo de uma segunda proteína HLH. A segunda proteína HLH pode ser a mesma (criando um homodímero) ou diferente (criando um heterodímero). Em cada caso, as duas hélices α que se extendem a partir da interface de heterodimerização produzem contatos específicos com o DNA.

Muitas proteínas HLH não possuem a extensão hélice α responsável pela ligação ao DNA. Essas proteínas truncadas podem formar heterodímeros com proteínas HLH completas, porém os heterodímeros não são capazes de se ligar ao DNA firmemente, pois formam somente a metade dos contatos necessários. Portanto, além de criar dímeros ativos, a heterodimerização fornece uma maneira de manter sob controle proteínas de regulação gênica específicas (**Figura 7-24**).

Ainda não é possível prever as sequências de DNA reconhecidas por todas as proteínas de regulação gênica

Os vários motivos de ligação ao DNA que foram discutidos fornecem arcabouços estruturais a partir dos quais as cadeias laterais de aminoácidos estendem-se para ligarem-se a pares de bases específicos no DNA. É razoável perguntar, portanto, se há um código de reconhecimento simples aminoácido-par de bases: um par de bases GC, por exemplo, sempre é contatado pela cadeia lateral de um aminoácido particular? A resposta é não, embora alguns tipos de interações aminoácido-base aparentem ser muito mais frequentes que outras (**Figura 7-25**). Como vimos no Capítulo 3, as superfícies de proteínas com praticamente qualquer forma e composição química podem ser produzidas a partir de somente 20 aminoácidos, e uma proteína de regulação gênica utiliza diferentes combinações desses aminoácidos para criar uma superfície que é precisamente complementar a uma sequência particular de DNA. Sabemos que o mesmo par de bases pode, desse modo, ser reconhecido de muitas maneiras, dependendo do seu contexto (**Figura 7-26**). Apesar disso, os biólogos moleculares estão começando a entender os princípios do reconhecimento proteína-DNA suficientemente bem para que possamos projetar novas proteínas que reconhecerão qualquer sequência desejada de DNA.

Uma vez introduzidas as características gerais das proteínas de regulação gênica, mostramos agora alguns métodos que são atualmente utilizados para estudá-las.

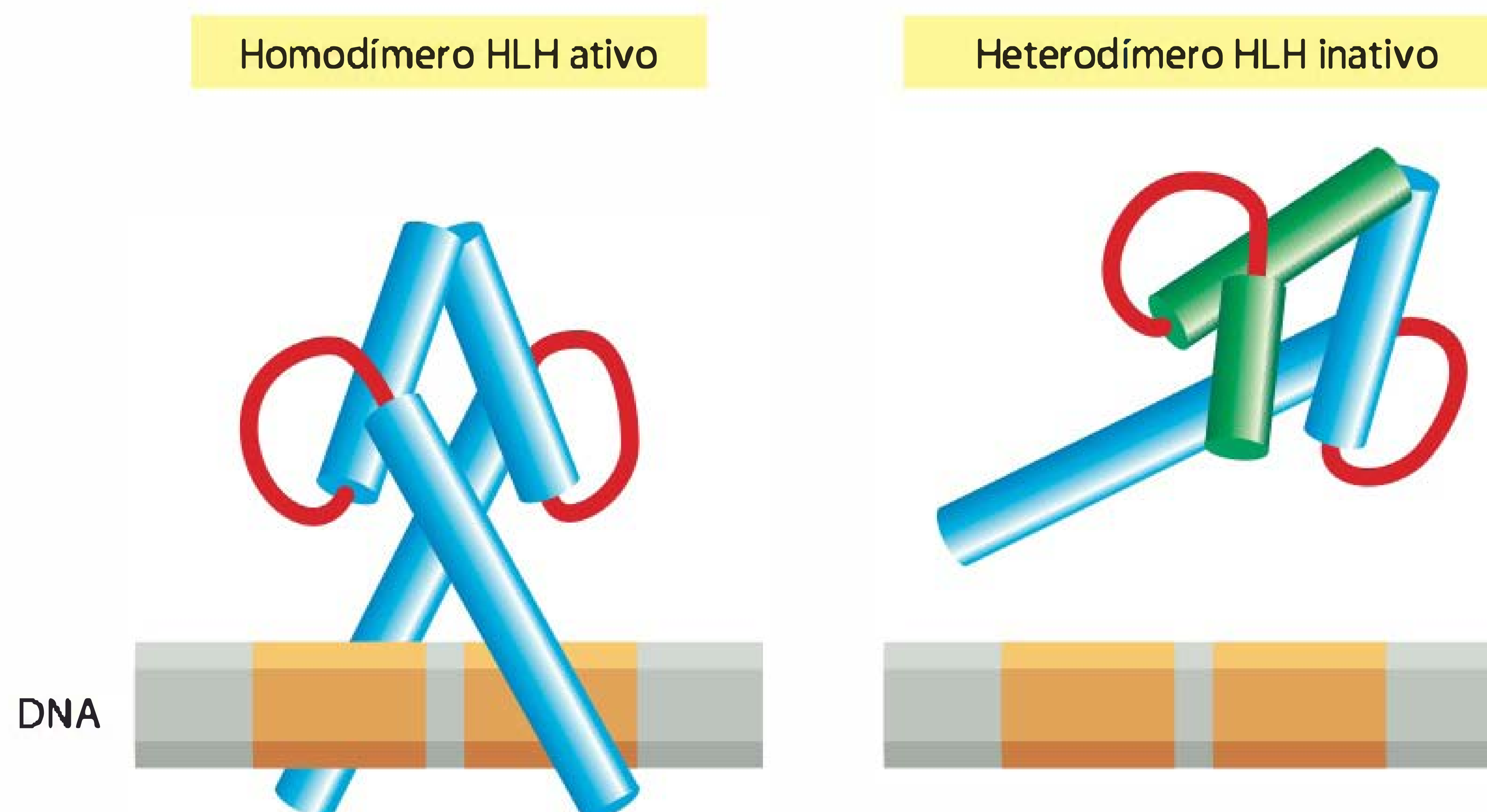


Figura 7-24 Regulação inibitória por proteínas truncadas HLH. O motivo HLH é responsável tanto pela dimerização como pela ligação ao DNA. À *esquerda*, um homodímero reconhece uma sequência simétrica de DNA. À *direita*, a ligação de uma proteína HLH inteira (*azul*) a uma proteína HLH truncada (*verde*) que não possui a hélice α de ligação ao DNA gera um heterodímero que não é capaz de se ligar fortemente ao DNA. Se presente em excesso, a proteína truncada bloqueia a homodimerização da proteína HLH inteira e, portanto, a impede de ligar-se ao DNA.

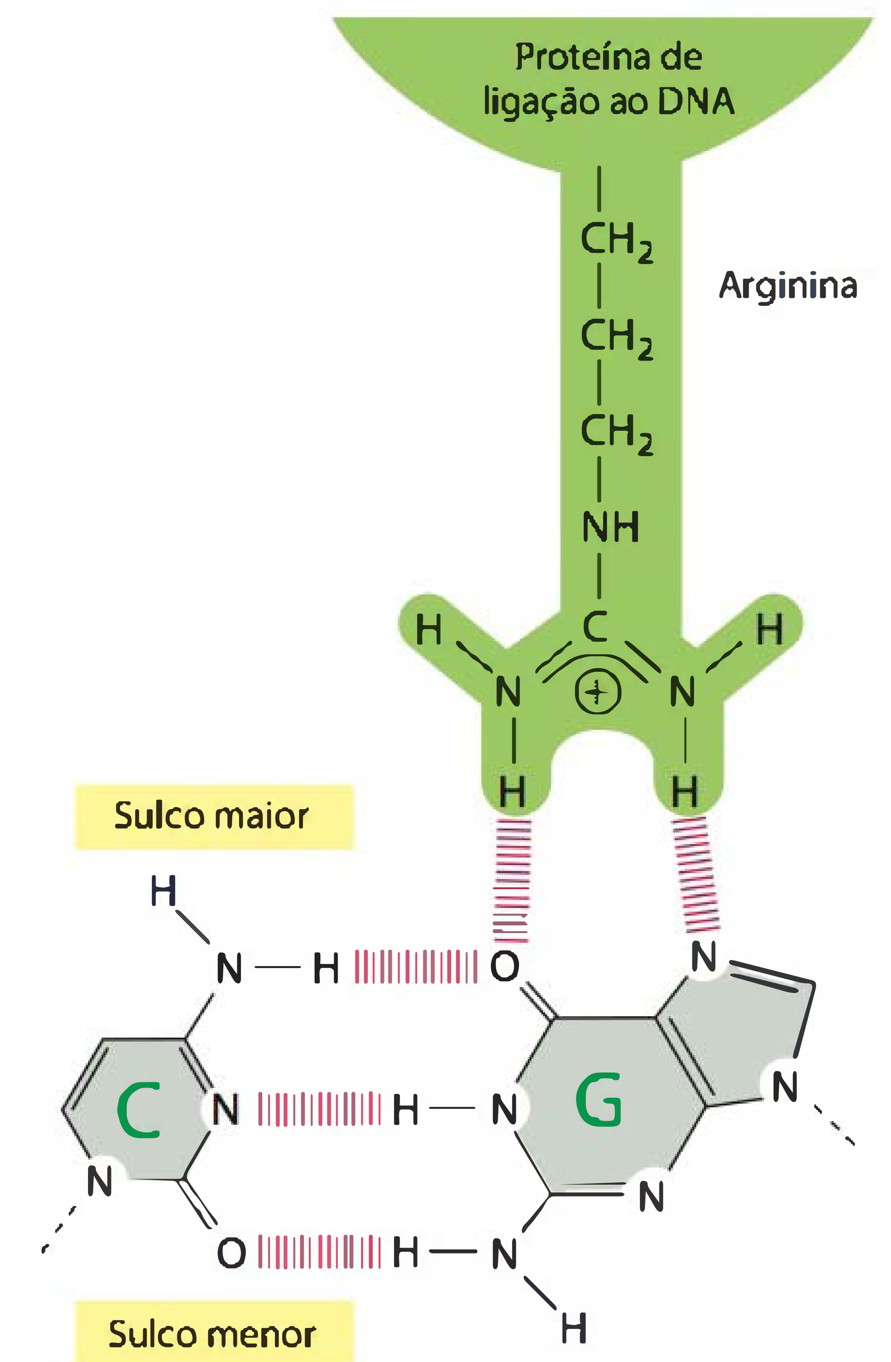


Figura 7-25 Uma das interações proteína-DNA mais comuns. Em virtude de sua geometria específica de aceptores de ligações de hidrogênio (ver Figura 7-7), a guanina pode ser reconhecida sem ambiguidade pela cadeia lateral da arginina. Outra interação comum proteína-DNA foi mostrada na Figura 7-9.

Um ensaio de alteração da mobilidade em gel permite que as proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA sejam facilmente detectadas

As análises genéticas, as quais forneceram um caminho até as proteínas de regulação gênica de bactérias, de leveduras e de *Drosophila*, são muito mais difíceis em vertebrados. Dessa forma, o isolamento de proteínas de regulação gênica teve que esperar o desenvolvimento de estratégias diferentes. Muitas dessas estratégias têm como base a detecção, em um extrato celular, de uma proteína de ligação ao DNA que reconheça especificamente uma sequência de DNA conhecida como controladora da expressão de um gene particular. A maneira mais comum de detectar proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas é usar uma técnica com base no efeito de uma proteína ligada na migração de moléculas de DNA em um campo elétrico.

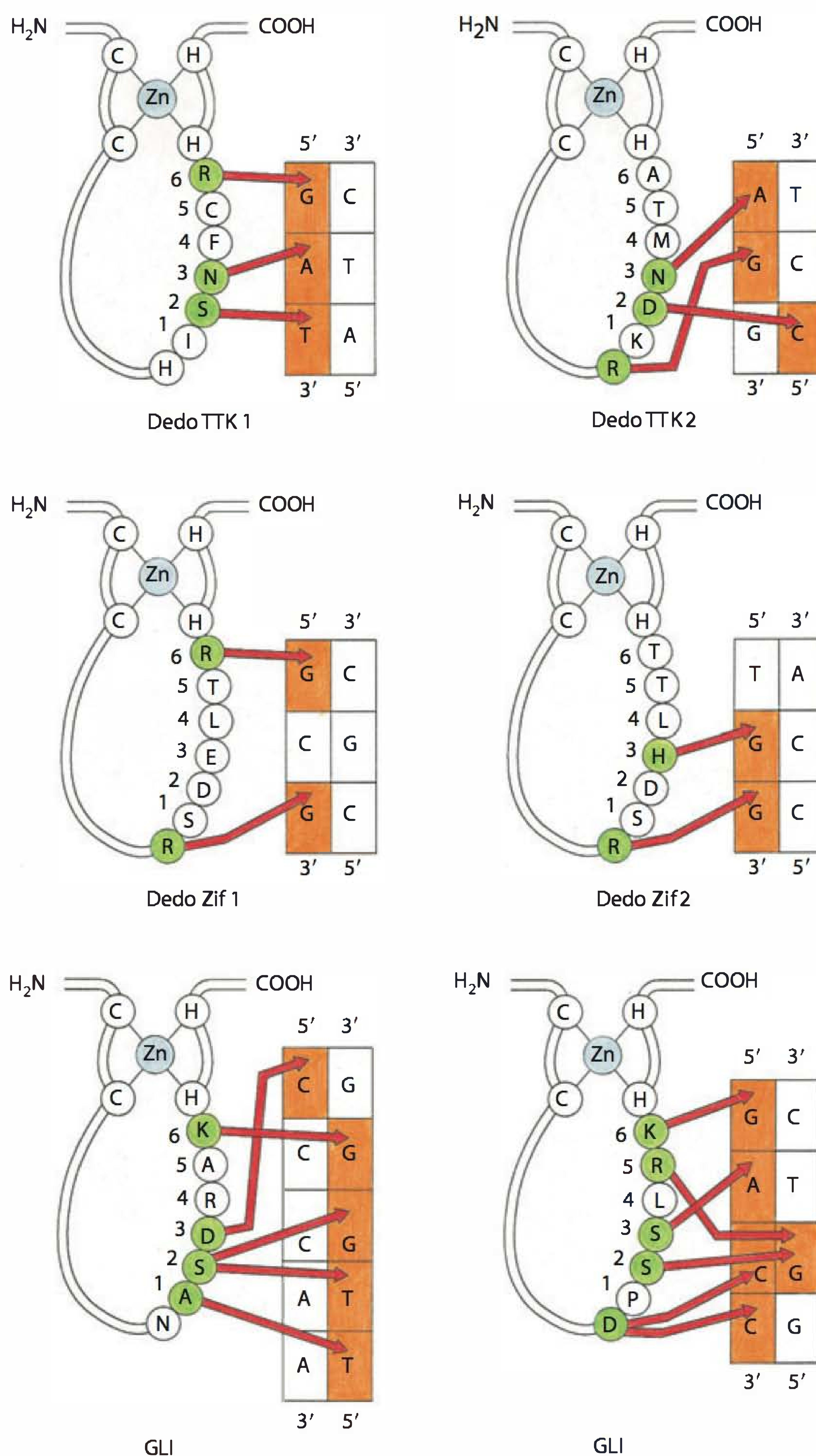


Figura 7-26 Resumo das interações sequência-específicas entre diferentes dedos de zinco e suas sequências de reconhecimento de DNA. Mesmo que todos os seis dedos de zinco possuam a mesma estrutura (ver Figura 7-14), cada um liga-se a uma sequência de DNA diferente. Os aminoácidos numerados formam a hélice α que reconhece o DNA (Figuras 7-14 e 7-15), e aqueles que fazem contatos sequência-específicos com o DNA estão coloridos em *verde*. As bases em contato com a proteína estão em *laranja*. Embora contatos arginina-guanina sejam comuns (ver Figura 7-25), a guanina também pode ser reconhecida por serina, histidina e lisina, como mostrado. Além disso, o mesmo aminoácido (serina, neste exemplo) pode reconhecer mais de uma base. Dois dos dedos de zinco representados são da proteína TTK (uma proteína de *Drosophila* que funciona no desenvolvimento); dois são da proteína de camundongo (Zif268) que foi mostrada na Figura 7-15; e dois são da proteína humana (GL1) cujas formas aberrantes podem causar certos tipos de cânceres. (Adaptada de C. Branden e J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

Uma molécula de DNA é altamente carregada negativamente e irá, portanto, mover-se rapidamente em direção ao eletrodo positivo quando sujeita a um campo elétrico. Quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (ver p. 534), as moléculas de DNA são separadas de acordo como o seu tamanho, pois as moléculas menores são capazes de penetrar a fina malha do gel mais facilmente que as maiores. As moléculas de proteína ligadas a uma molécula de DNA a farão mover-se mais lentamente através do gel; em geral, quanto maior a proteína ligada, maior o retardo da molécula de DNA. Esse fenômeno fornece a base para o **ensaio de alteração da mobilidade em gel**, o qual permite que mesmo quantidades pequenas de uma proteína de ligação ao DNA sequência-específica sejam facilmente detectadas. Nesse ensaio, um curto fragmento de DNA de tamanho e sequência específicos (produzido tanto pela clonagem de DNA como pela síntese química, como discutido no Capítulo 8) é marcado radiativamente e misturado com um extrato celular; a mistura é então aplicada em um gel de poliacrilamida e submetida à eletroforese. Se o fragmento de DNA corresponde à região cromossomal onde, por exemplo, várias proteínas sequência-específicas se ligam, a autorradiografia (ver p. 602-603) revelará uma série de bandas de DNA, cada uma retardada em uma extensão diferente e representando um complexo DNA-proteína distinto. As proteínas responsáveis por cada banda no gel podem, então, ser separadas por fracionamentos subsequentes do extrato celular (**Figura 7-27**). Uma vez que uma proteína de ligação ao DNA sequência-específica tenha sido purificada, o ensaio de alteração da mobilidade em gel pode ser usado para estudar a força e a especificidade das interações com diferentes sequências de DNA, a duração dos complexos DNA-proteína e outras propriedades críticas para o funcionamento da proteína na célula.

A cromatografia de afinidade ao DNA facilita a purificação de proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA

Um método de purificação particularmente eficaz, chamado de **cromatografia de afinidade ao DNA**, pode ser usado, uma vez que a sequência de DNA que uma proteína de regulação gênica reconhece tenha sido determinada. Um oligonucleotídeo de fita dupla com a sequência correta é sintetizado por métodos químicos e ligado a uma matriz porosa insolúvel, como a agarose; a matriz com o oligonucleotídeo ligado é então usada para construir uma coluna que se liga seletivamente a proteínas que reconhecem essa sequência particular de DNA

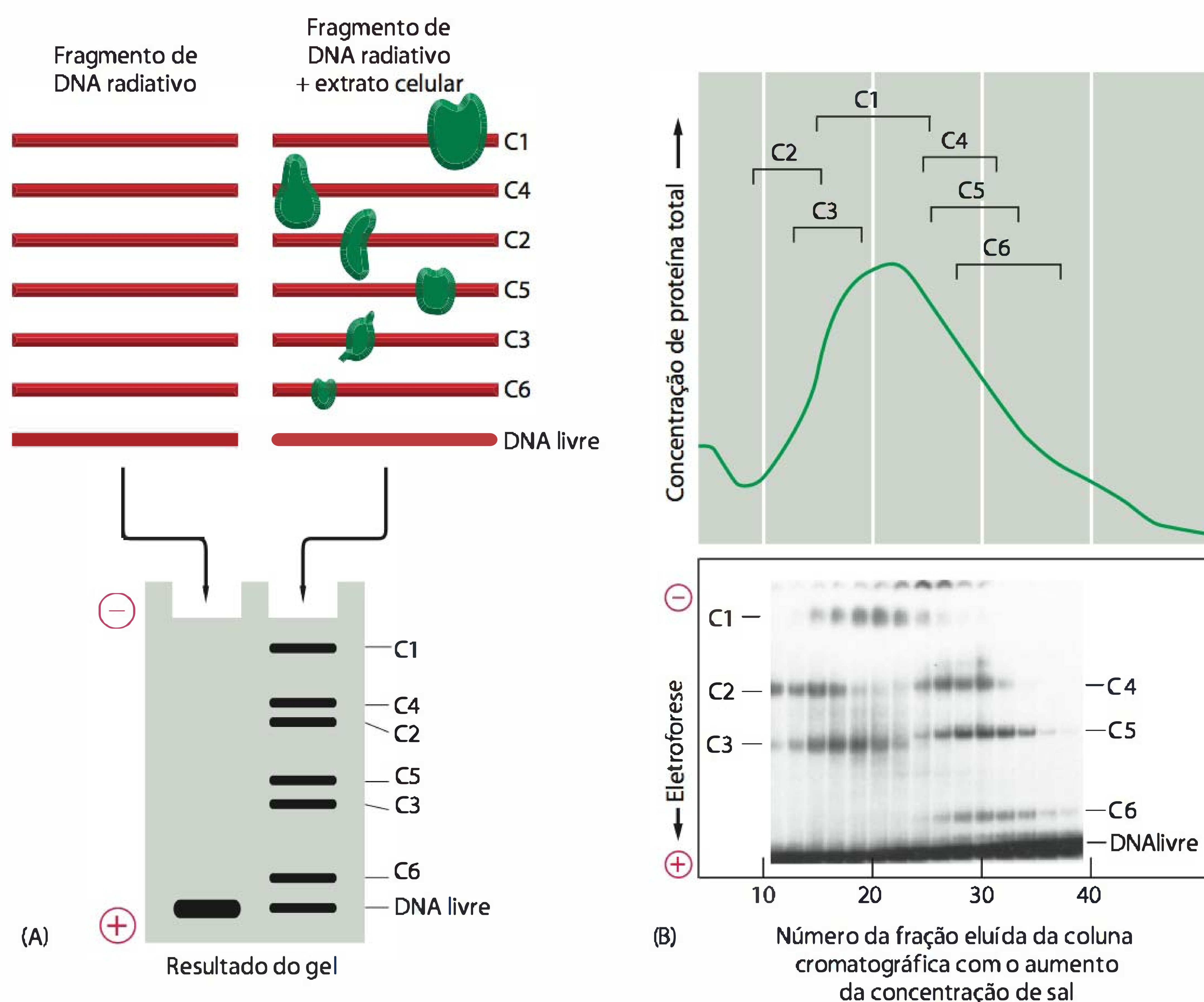


Figura 7-27 Ensaio de alteração da mobilidade em gel. O princípio do ensaio está mostrado esquematicamente em (A). Neste exemplo, um extrato de uma linhagem celular produtora de anticorpos é misturado a um fragmento de DNA radiativo contendo em torno de 160 nucleotídeos de uma sequência reguladora de DNA de um gene codificante da cadeia leve do anticorpo feito pela linhagem celular. O efeito das proteínas no extrato sobre a mobilidade do fragmento de DNA é analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida seguido por autorradiografia. Os fragmentos de DNA livres migram rapidamente para o centro do gel, enquanto aqueles fragmentos ligados a proteínas são retardados; a descoberta de que seis bandas são retardadas sugere que o extrato contém seis proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA (indicadas como C1-C6) que se ligam a esta sequência de DNA. (Por simplicidade, qualquer fragmento de DNA com mais de uma proteína ligada foi omitido da figura). Em (B) o extrato (*acima*) foi fracionado por uma técnica-padrão de cromatografia (ver p. 512-513), e cada fração foi misturada ao fragmento radiativo de DNA, aplicado em uma canaleta de um gel de poliacrilamida, e analisada como em (A). (B, modificada de C. Scheidereit, A. Heguy e R. G. Roeder, *Cell* 51:783-793, 1987. Com permissão de Elsevier.)

(**Figura 7-28**). As purificações da magnitude de 10 mil vezes podem ser alcançadas, dessa maneira, com um esforço relativamente pequeno.

Embora a maioria das proteínas de regulação gênica esteja presente em níveis muito baixos na célula, geralmente pode ser isolada proteína purificada suficiente, por cromatografia de afinidade, para se obter uma sequência de aminoácidos parcial por espectrometria de massa, ou por outros métodos (discutidos no Capítulo 8). Se a sequência genômica completa de um organismo é conhecida, a sequência parcial de aminoácidos da proteína pode ser usada para identificar o gene. O gene não fornece somente a sequência de aminoácidos completa da proteína; ele também fornece os meios para produzir a proteína em quantidades ilimitadas, por meio de técnicas de engenharia genética, também discutidas no Capítulo 8.

A sequência de DNA reconhecida por uma proteína de regulação gênica pode ser determinada experimentalmente

Proteínas de regulação gênica podem ser descobertas antes que a sequência de DNA que elas reconhecem seja conhecida. Por exemplo, muitas das proteínas homeodomínio de *Drosophila* foram descobertas por meio do isolamento de mutações que alteravam o desenvolvimento da mosca. Isso permitiu que os genes que codificam as proteínas fossem identificados, e as proteínas podiam, então, ser superexpressas em células em cultura e facilmente purificadas. O *DNA footprinting* (pegadas no DNA) é um método de determinação das sequências de DNA reconhecidas por uma proteína de regulação gênica uma vez que ela tenha sido purificada. Essa estratégia também necessita de um fragmento purificado de DNA dúplex que contenha dentro dele um sítio de reconhecimento para a proteína. Pequenas sequências de reconhecimento podem ocorrer por acaso em qualquer fragmento de DNA longo, embora com frequência seja necessário usar o DNA correspondente a uma região reguladora para um gene conhecido que seja controlado pela proteína de interesse. O *DNA footprinting* tem como base nucleases ou substâncias químicas que clivam o DNA randomicamente em qualquer ligação fosfodiéster. Uma proteína de regulação gênica ligada bloqueia as ligações fosfodiéster do ataque, indicando assim de forma precisa o sítio de reconhecimento como a zona protegida, ou pegada (**Figura 7-29**).

Uma segunda maneira de determinar as sequências de DNA reconhecidas por uma proteína de regulação gênica não necessita de conhecimento anterior de quais genes a proteína

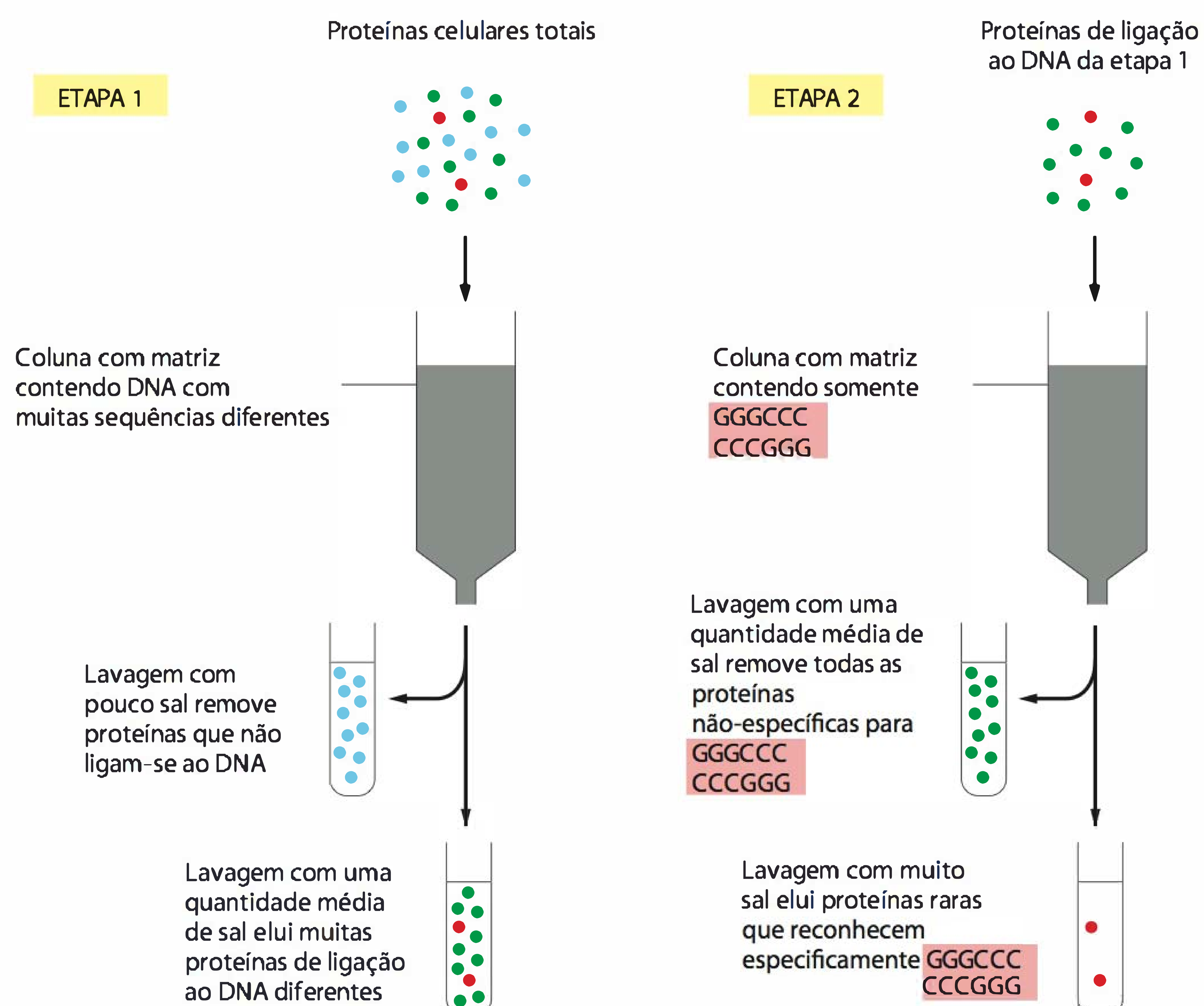


Figura 7-28 Cromatografia de afinidade ao DNA. Em uma primeira etapa, todas as proteínas que podem ligar-se ao DNA são separadas do restante das proteínas celulares em uma coluna contendo um enorme número de sequências de DNA diferentes. A maioria das proteínas sequência-específicas de ligação ao DNA possui uma fraca (não-específica) afinidade pela maior parte do DNA, sendo, portanto, retida na coluna. Essa afinidade é devida a atrações iônicas, e as proteínas podem ser retiradas do DNA por uma solução que contenha uma concentração moderada de sal. Em uma segunda etapa, a mistura de proteínas de ligação ao DNA é passada através de uma coluna que contenha somente DNA de uma sequência particular. Normalmente, todas as proteínas de ligação ao DNA irão ligar-se à coluna, a grande maioria por interações não-específicas. Elas são novamente eluídas por soluções com concentrações de sal moderadas, deixando na coluna somente aquelas proteínas (normalmente uma ou somente algumas poucas) que se ligam especificamente e, portanto, muito fortemente a essa sequência particular de DNA. Essas proteínas restantes podem ser eluídas da coluna com soluções contendo uma concentração de sal muito alta.

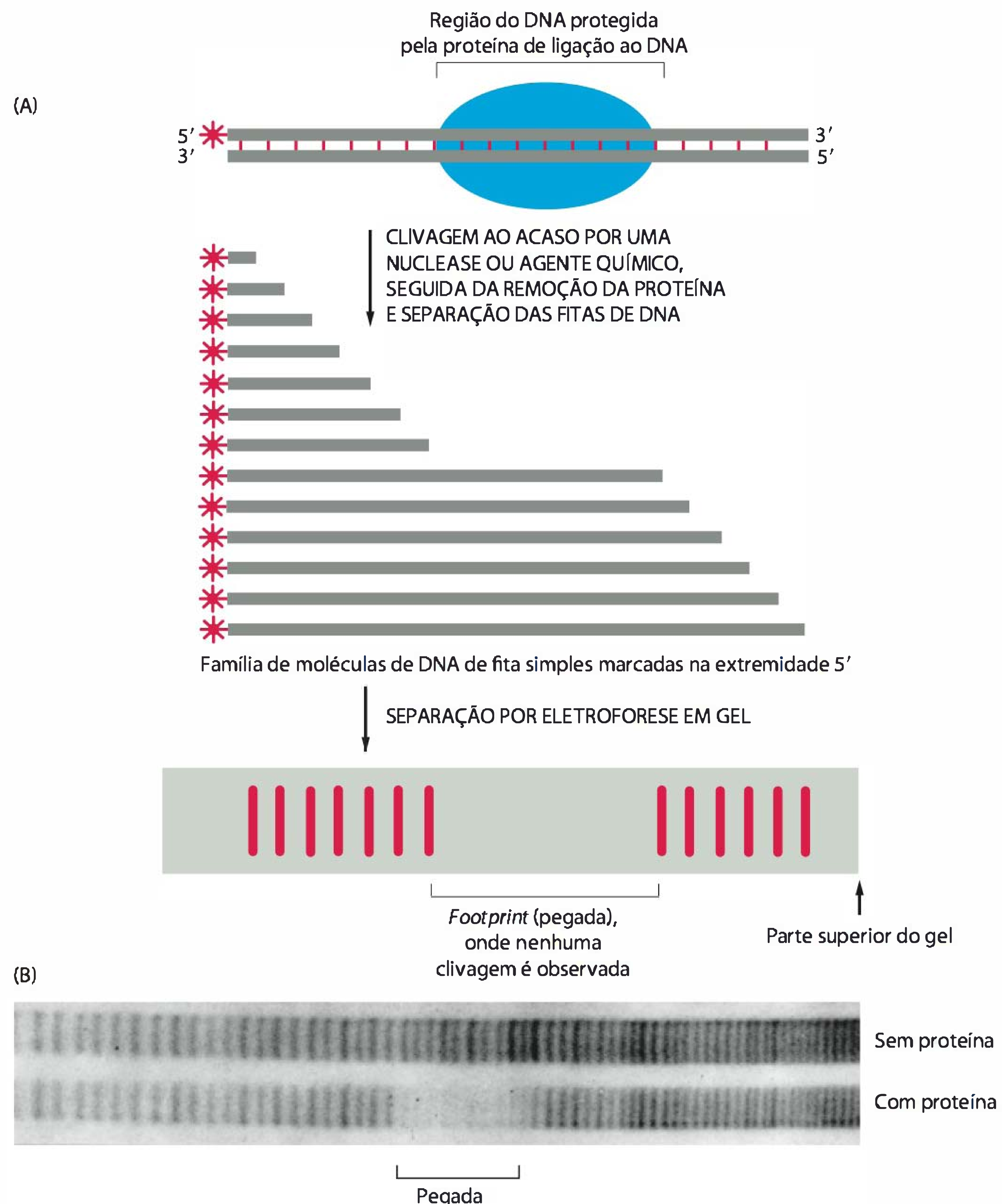


Figura 7-29 DNA *footprinting*. (A) Representação esquemática do método. Um fragmento de DNA é marcado em uma extremidade com ^{32}P, uma metodologia descrita na Figura 8-34; a seguir, o DNA é clivado com uma nuclease ou substância química que produza cortes em uma fita ao acaso. Após a molécula ser desnaturada para separar as suas duas fitas, os fragmentos resultantes da fita marcada são separados em um gel e detectados por autorradiografia (ver Figura 8-33). O padrão de bandas do DNA cortado na presença de uma proteína de ligação ao DNA é comparado com o do DNA cortado na sua ausência. Quando a proteína está presente, ela cobre os nucleotídeos no seu sítio de ligação e protege as suas ligações fosfodiéster da clivagem. Como resultado, aqueles fragmentos marcados, que de outra forma terminariam no sítio de ligação, estão faltando, deixando uma falha no gel chamada de *footprint* (pegada). No exemplo mostrado, a proteína de ligação ao DNA protege sete ligações fosfodiéster do agente de clivagem do DNA. (B) Uma pegada real utilizada para determinar o sítio de ligação para uma proteína de regulação gênica de humanos. O agente de clivagem foi uma pequena molécula orgânica contendo ferro que normalmente corta em qualquer ligação fosfodiéster com praticamente a mesma frequência. (B, cortesia de Michele Sawadogo e Robert Roeder.)

poderia regular. Aqui, a proteína purificada é utilizada para selecionar, a partir de um grande conjunto de pequenos nucleotídeos de sequências diferentes, somente aquelas que se ligam fortemente a ela. Após vários ciclos de seleção, as sequências de nucleotídeos dos DNAs que se ligaram fortemente são determinadas e uma sequência consenso de reconhecimento de DNA para a proteína de regulação gênica pode ser formulada (**Figura 7-30**). Uma vez que a sequência de DNA reconhecida por uma proteína de regulação gênica seja conhecida, son-

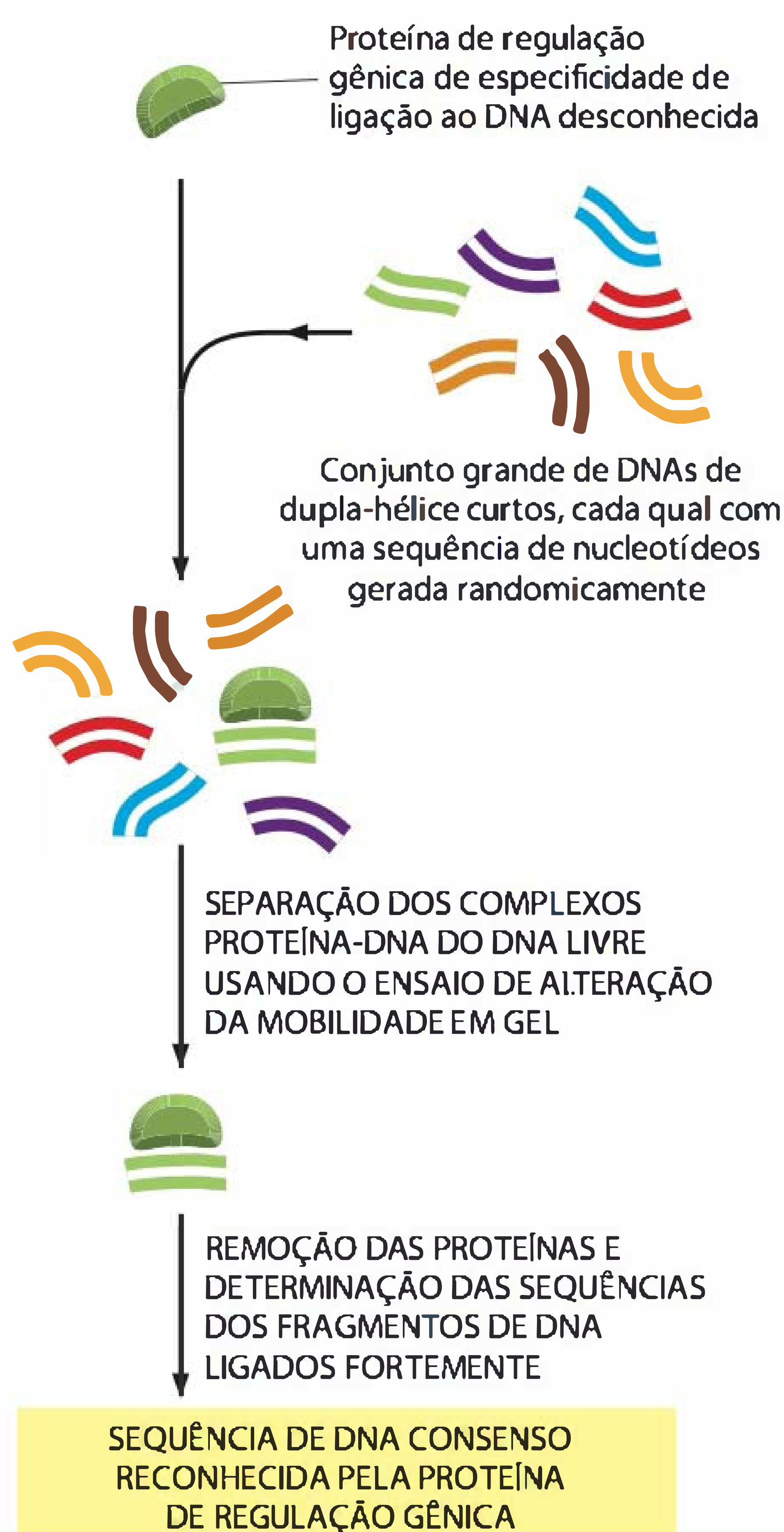


Figura 7-30 Método para determinação da sequência de DNA reconhecida por uma proteína de regulação gênica. Uma proteína de regulação gênica é misturada com milhões de pequenos fragmentos de DNA diferentes, cada um com uma sequência diferente de nucleotídeos. Uma coleção de tais fragmentos de DNA pode ser produzida pela programação de um sintetizador de DNA, uma máquina que sintetiza quimicamente DNA de qualquer sequência desejada (discutida no Capítulo 8). Por exemplo, existem 4^{11}, ou aproximadamente 4,2 milhões de sequências possíveis para um fragmento de 11 nucleotídeos. Os fragmentos de DNA de fita dupla que se ligarem fortemente à proteína de regulação gênica são então separados dos fragmentos de DNA que não se ligam. Um método para executar essa separação é pelas alterações de mobilidade em gel, como descrito na Figura 7-27. Após a separação dos complexos DNA-proteína do DNA livre, os fragmentos de DNA são removidos da proteína, e muitas rodadas adicionais do mesmo processo de seleção são feitas (não-mostrado). As sequências de nucleotídeos daqueles fragmentos de DNA que permanecem após múltiplas rodadas de seleção podem ser determinadas, e uma sequência consenso de reconhecimento de DNA pode ser gerada.



Figura 7-31 ***Footprinting* filogenético.** Este exemplo compara sequências de DNA *upstream* do mesmo gene de cinco leveduras intimamente relacionadas; nucleotídeos idênticos estão ressaltados em *amarelo*. O *footprinting* filogenético revela os sítios de reconhecimento de DNA para proteínas regulatórias, uma vez que normalmente são mais conservados do que as sequências circundantes. Somente uma região *upstream* de um gene particular é mostrada neste exemplo, mas a estratégia normalmente é usada para analisar genomas inteiros. As proteínas de regulação gênica que se ligam ao sítio destacado em *vermelho* estão mostradas na Figura 7-21. Alguns dos *footprints* filogenéticos menores neste exemplo representam sítios de ligação para proteínas de regulação gênica adicionais, as quais não foram todas identificadas. (De M. Kellis et al., *Nature* 423:241-254, 2003, com permissão de Macmillan Publishers Ltd., e D.J. Galgoczy et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:18069-18074, 2004, com permissão da National Academy of Sciences.)

dagens de sequências genômicas por computador podem identificar genes candidatos cuja proteína de regulação gênica poderia controlar. Entretanto, essa estratégia não é à prova de erros. Por exemplo, muitos organismos produzem um conjunto de proteínas de regulação gênica relacionadas que reconhecem sequências de DNA muito semelhantes, e essa estratégia não consegue distingui-las. Na maioria dos casos, a previsão dos sítios de ação das proteínas de regulação gênica obtidas a partir da procura em sequências genômicas necessita, ao final, ser testada experimentalmente.

O *footprinting* filogenético identifica sequências de DNA reguladoras por meio da genômica comparativa

A ampla disponibilidade de sequências genômicas completas fornece um método surpreendentemente simples para a identificação de sítios reguladores importantes no DNA, mesmo quando a proteína de regulação gênica que se liga a eles seja desconhecida. Nessa estratégia, genomas de várias espécies intimamente relacionadas são comparados. Se as espécies são escolhidas apropriadamente, as porções codificantes para proteínas dos genomas serão muito semelhantes, mas as regiões entre as sequências que codificam moléculas de proteína ou RNA terão divergido consideravelmente, pois a maioria dessas sequências é funcionalmente irrelevante e assim não é pressionada na evolução. Entre as exceções estão as sequências reguladoras que controlam a transcrição gênica (**Figura 7-31**). Embora a identidade das proteínas de regulação gênica que reconhecem as sequências conservadas de DNA precise ser determinada de outras formas, o *footprinting* filogenético é um método poderoso para a identificação de muitas das sequências de DNA que controlam a expressão gênica.

A técnica de imunoprecipitação da cromatina identifica sítios de DNA ocupados por proteínas de regulação gênica em células vivas

Uma proteína de regulação gênica não ocupa em nenhum momento todos os seus possíveis sítios de ligação ao DNA no genoma. Sob algumas condições, a proteína pode não ser sintetizada e, dessa forma, estar ausente da célula; ela pode estar presente, mas faltar uma outra capaz de formar um heterodímero com ela; ou ela pode ser excluída do núcleo



Figura 7-32 Imunoprecipitação da cromatina. Esta metodologia permite a identificação dos sítios no genoma que são ocupados *in vivo* por uma proteína de regulação gênica. Para a amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerasechain reaction*), ver Figura 8-45. As identidades dos fragmentos de DNA precipitados e amplificados podem ser determinadas pela hibridização da mistura de fragmentos em microarranjos de DNA, conforme descrito no Capítulo 8.

até que um sinal apropriado seja recebido do ambiente celular. Mesmo se a proteína de regulação gênica estiver presente no núcleo e for competente para ligar-se ao DNA, componentes da cromatina ou outras proteínas de regulação gênica que possam ligar-se às mesmas sequências ou a sequências superpostas podem ocupar muitos dos possíveis sítios de ligação no DNA.

A **imunoprecipitação da cromatina** fornece uma maneira de determinar empiricamente os sítios no DNA que uma determinada proteína de regulação gênica ocupa sob um conjunto particular de condições (**Figura 7-32**). Nessa metodologia, as proteínas são covalentemente ligadas ao DNA nas células vivas, as células são lisadas e o DNA é mecanicamente quebrado em pequenos fragmentos. Anticorpos direcionados contra uma determinada proteína de regulação gênica são então usados para purificar o DNA que estava covalentemente ligado a esta proteína na célula. Se este DNA for hibridizado a microarranjos que contenham todo o genoma dividido em uma série de fragmentos discretos de DNA (ver Figura 8-73), a localização genômica precisa de cada fragmento de DNA precipitado pode ser determinada. Dessa maneira, os sítios de DNA ocupados por uma proteína de regulação gênica nas células originais podem ser mapeados no genoma celular (**Figura 7-33**).

A imunoprecipitação da cromatina também é rotineiramente usada para identificar as posições ao longo do genoma que estão empacotadas pelos vários tipos de histonas modificadas (discutido no Capítulo 4). Nesse caso, são empregados anticorpos específicos para uma modificação em uma histona em particular.

Resumo

As proteínas de regulação gênica reconhecem pequenos trechos de DNA de fita dupla de uma sequência definida e, assim, determinam quais dos milhares de genes em uma célula serão transcritos. Milhares de proteínas de regulação gênica têm sido identificadas em uma grande variedade de organismos. Embora cada uma dessas proteínas tenha características únicas, a maioria liga-se ao DNA como homodímeros ou heterodímeros e reconhece o DNA por meio de um entre um pequeno número de motivos estruturais. Os motivos comuns incluem o hélice-volta-hélice, o homeodomínio, o zíper de leucina, o hélice-alça-hélice e os dedos de zinco de vários tipos. A sequência precisa de aminoácidos que está dobrada em um motivo determina a sequência de DNA que uma proteína de regulação gênica reconhece. A heterodimerização aumenta a amplitude de sequências de DNA que podem ser reconhecidas. Técnicas eficazes estão agora disponíveis para a identificação e o isolamento destas proteínas, dos genes que as codificam, das sequências de DNA que elas reconhecem e para o mapeamento de todos os genes que elas regulam em um genoma.

COMO FUNCIONAM OS COMUTADORES GENÉTICOS

Na seção anterior, descrevemos os componentes básicos dos comutadores genéticos: proteínas de regulação gênica e as sequências específicas de DNA que estas proteínas reconhecem. Agora discutiremos como esses componentes operam para ativar e desativar os genes em resposta a uma variedade de sinais.

Na metade do século XX, a ideia de que os genes poderiam ser ativados e desativados era revolucionária. Esse conceito foi um grande avanço e surgiu originalmente a partir dos estudos de como as bactérias *E. coli* adaptam-se a mudanças na composição de seu meio de cultura. Os estudos paralelos com o bacteriófago lambda levaram a muitas das mesmas conclusões e auxiliaram a estabelecer o mecanismo básico. Vários desses princípios aplicam-se às células eucarióticas. Entretanto, a enorme complexidade da regulação gênica nos organismos superiores, combinada com o empacotamento do seu DNA na cromatina, cria desafios especiais e novas oportunidades de controle, como veremos mais adiante. Iniciare-

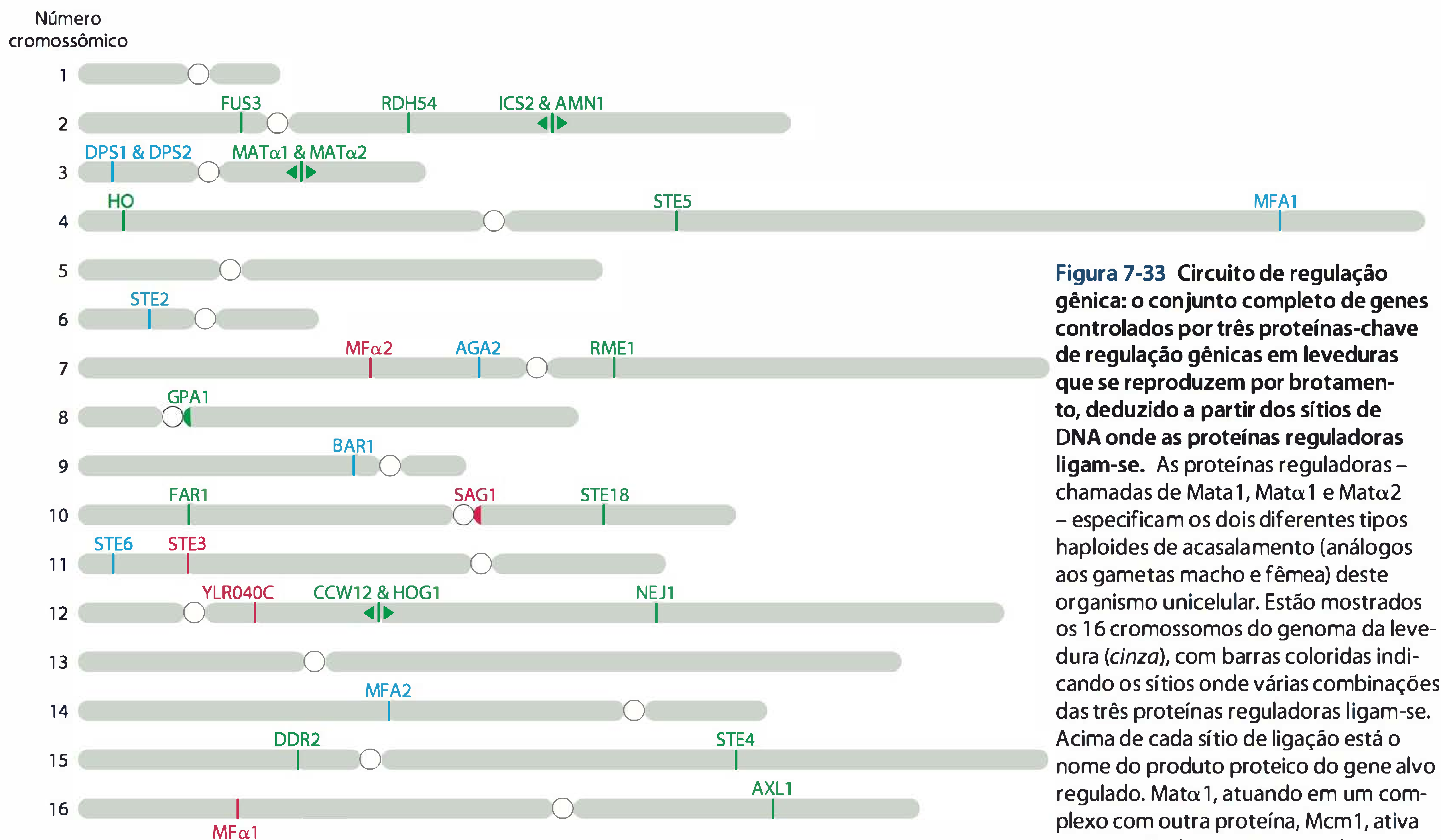


Figura 7-33 Circuito de regulação gênica: o conjunto completo de genes controlados por três proteínas-chave de regulação gênicas em leveduras que se reproduzem por brotamento, deduzido a partir dos sítios de DNA onde as proteínas reguladoras ligam-se. As proteínas reguladoras – chamadas de Mata1, Matα1 e Matα2 – especificam os dois diferentes tipos haploides de acasalamento (análogos aos gametas macho e fêmea) deste organismo unicelular. Estão mostrados os 16 cromossomos do genoma da levedura (*cinza*), com barras coloridas indicando os sítios onde várias combinações das três proteínas reguladoras ligam-se. Acima de cada sítio de ligação está o nome do produto proteico do gene alvo regulado. Matα1, atuando em um complexo com outra proteína, Mcm1, ativa a expressão dos genes marcados em *vermelho*; Matα2, atuando em complexo com Mcm1, reprime os genes marcados em *azul*; e Mata1, em um complexo com Matα2, reprime os genes marcados em *verde* (ver Figuras 7-21 e 7-65). As *setas duplas* representam genes transcritos de forma divergente, os quais são controlados pelas proteínas de regulação gênica indicadas. Este mapa completo de proteínas reguladoras ligadas foi determinado utilizando uma combinação de imunoprecipitação ampla da cromatina no genoma (ver Figura 7-32) e *footprinting* filogenético (ver Figura 7-29). Tais determinações de circuitos transcricionais completos mostram que as redes transcricionais não são infinitamente complexas, embora possam parecer desta forma inicialmente. Esse tipo de estudo também auxilia a revelar a lógica geral dos circuitos transcricionais utilizados pelas células modernas. (De D. J. Galgoczy et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:18069-18074, 2004, com permissão da National Academy of Sciences.)

mos com o exemplo mais simples – um sistema do tipo ativado-desativado em bactérias que respondem a um único sinal.

O repressor do triptofano é um comutador simples que liga e desliga os genes nas bactérias

O cromossomo da bactéria *E. coli*, um organismo unicelular, consiste em uma única molécula de DNA circular de aproximadamente $4{,}6 \times 10^6$ pares de nucleotídeos. Esse DNA codifica aproximadamente 4.300 proteínas, embora apenas uma fração seja sintetizada pela célula de cada vez. A expressão de muitos genes é regulada de acordo com o alimento disponível no ambiente. Esse fato é ilustrado pelos cinco genes de *E. coli* que codificam enzimas que sintetizam o aminoácido triptofano. Esses genes estão agrupados em um único **operon**; em outras palavras, eles estão adjacentes no cromossomo e são transcritos a partir de um único *promotor*, como uma única longa molécula de mRNA (**Figura 7-34**). Mas, quando o triptofano está presente no meio de cultura e entra na célula (p. ex., quando a bactéria está no intestino de um mamífero que acabou de alimentar-se de proteína), a célula não necessita mais dessas enzimas, e a sua produção é desativada.

A base molecular desse controle é consideravelmente conhecida em seus detalhes. Como descrito no Capítulo 6, o promotor é uma sequência de DNA específica que direciona a RNA-polimerase a ligar-se ao DNA, abrir a dupla-hélice e começar a síntese de uma molé-

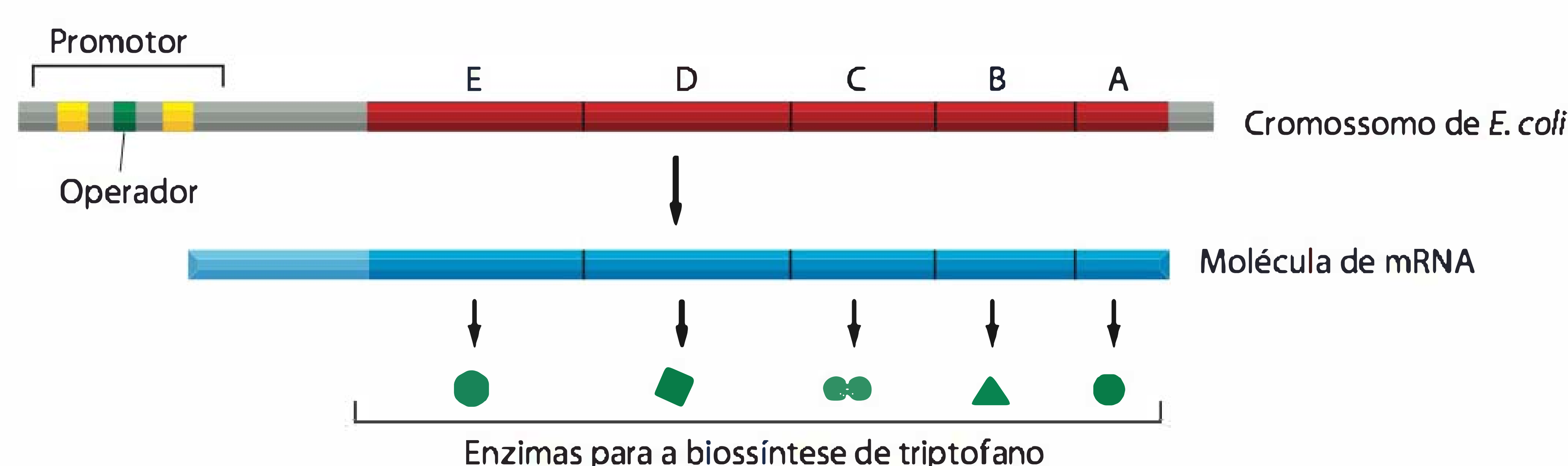


Figura 7-34 Conjunto de genes em *E. coli* que codificam para enzimas que produzem o aminoácido triptofano. Estes cinco genes do operon *Trp*, denominados *TrpA*, *B*, *C*, *D* e *E* – são transcritos como uma única molécula de mRNA, uma característica que permite que a sua expressão seja controlada de forma coordenada. Conjuntos de genes transcritos como uma única molécula de mRNA são comuns em bactérias. Cada um desses conjuntos é chamado de operon.

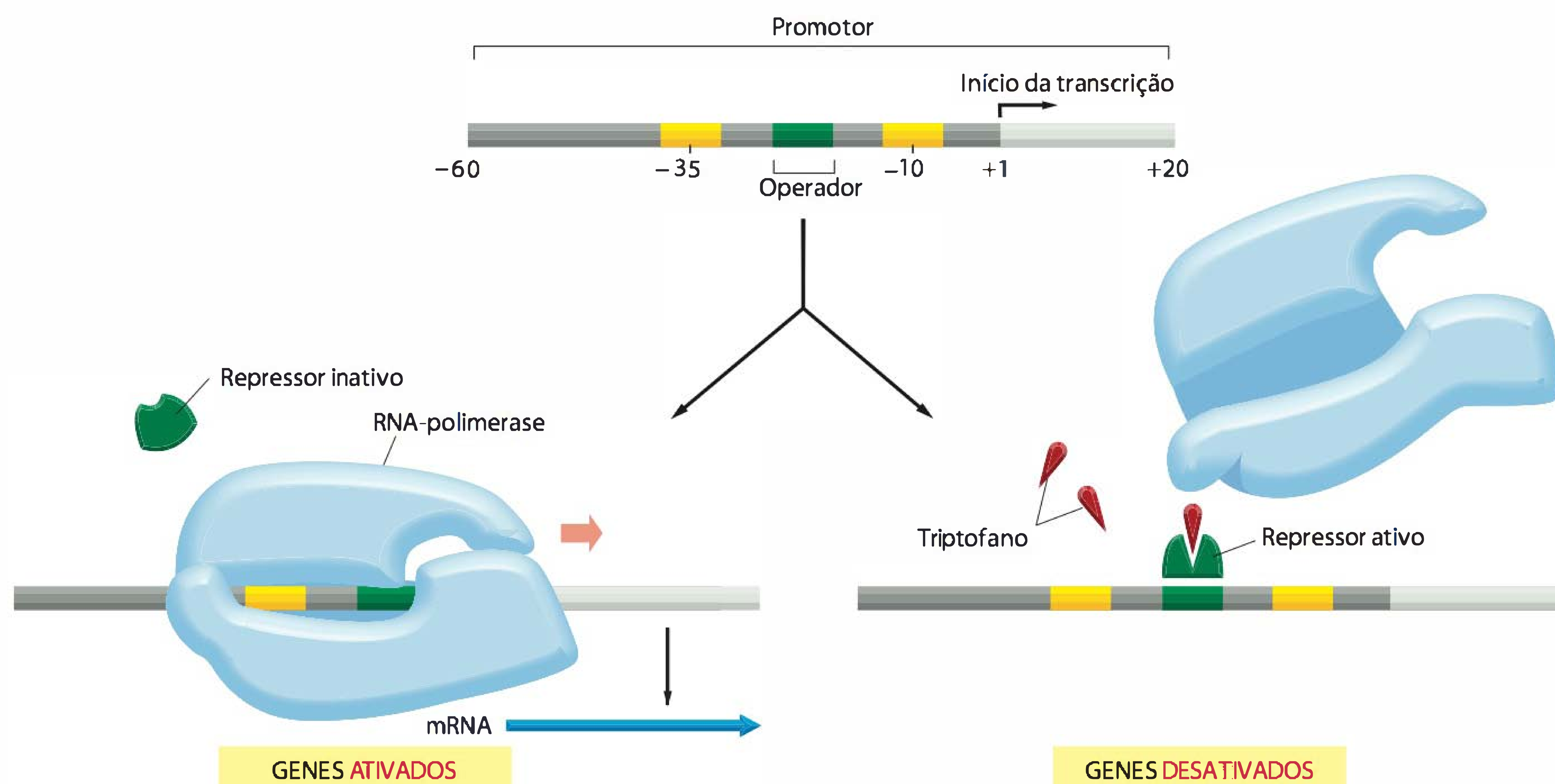


Figura 7-35 Controlando a ativação e desativação dos genes de triptofano. Se o nível de triptofano dentro da célula está baixo, a RNA-polimerase liga-se ao promotor e transcreve os cinco genes do operon do triptofano (*Trp*). Se o nível do triptofano está alto, entretanto, o repressor do triptofano é ativado a fim de ligar-se ao operador, onde ele bloqueia a ligação da RNA-polimerase ao promotor. Sempre que o nível de triptofano intracelular diminui, o repressor libera o seu triptofano e torna-se inativo, permitindo que a polimerase inicie a transcrição desses genes. O promotor inclui dois blocos-chave de informação na sequência de DNA, as regiões −35 e −10 destacadas em *amarelo* (ver Figura 6-12).

cula de RNA. Dentro do promotor que direciona a transcrição dos genes da via biossintética do triptofano, está presente um elemento regulador chamado de **operador** (ver Figura 7-34). Ele é simplesmente uma região curta de DNA regulador com sequência de nucleotídeos definida que é reconhecida por uma proteína repressora, nesse caso o **repressor do triptofano**, um membro da família hélice-volta-hélice (ver Figura 7-11). O promotor e o operador estão arranjados de tal forma que, quando o repressor do triptofano ocupa o operador, ele bloqueia o acesso da RNA-polimerase ao promotor, impedindo, assim, a expressão das enzimas produtoras de triptofano (**Figura 7-35**).

O bloqueio da expressão gênica é regulado de uma maneira engenhosa: para ligar-se ao DNA operador, a proteína repressora deve possuir duas moléculas de triptofano ligadas a ela. Como mostrado na **Figura 7-36**, a ligação do triptofano inclina o motivo hélice-volta-hélice do repressor, de modo que ele é apresentado de forma apropriada ao sulco maior do DNA; sem o triptofano, o motivo volta-se para o interior, e a proteína não pode ligar-se ao operador. Portanto, o repressor e o operador formam um mecanismo simples que controla a ativação e a desativação da produção das enzimas da via biossintética do triptofano, de acor-

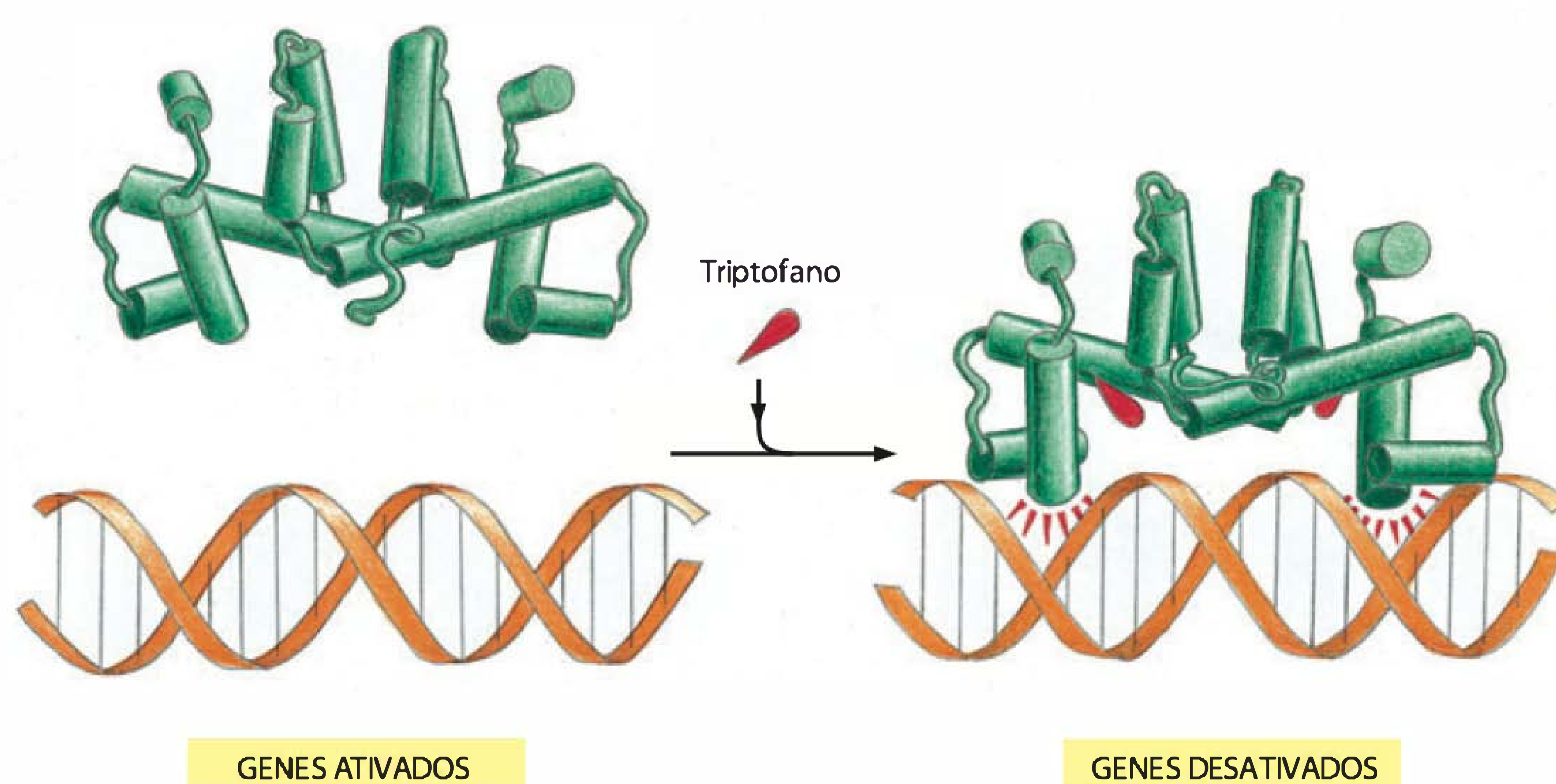


Figura 7-36 A ligação do triptofano à proteína repressora do triptofano altera a conformação do repressor. Esta alteração estrutural possibilita a esta proteína de regulação gênica ligar-se fortemente a uma sequência de DNA específica (o operador), bloqueando, portanto, a transcrição dos genes que codificam as enzimas necessárias à produção do triptofano (o operon *Trp*). É mostrada a estrutura tridimensional desta proteína hélice-volta-hélice bacteriana, como determinada por difração de raios X com e sem triptofano ligado. A ligação do triptofano aumenta a distância entre as duas hélices de reconhecimento no homodímero, permitindo ao repressor encaixar-se adequadamente ao operador. (Adaptada de R. Zhang et al., *Nature* 327:591-597, 1987. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

do com a disponibilidade de triptofano livre. Como a forma ativa da proteína, que é capaz de ligar-se ao DNA, serve para desativar genes, esse modo de regulação gênica é chamado de **controle negativo**, e as proteínas reguladoras que atuam dessa maneira são chamadas de *repressores transcricionais* ou *proteínas de repressão gênica*.

Os ativadores transcricionais ativam os genes

Vimos no Capítulo 6 que a RNA-polimerase de *E. coli* purificada (incluindo a subunidade σ) pode ligar-se a um promotor e iniciar a transcrição de DNA. Muitos promotores bacterianos, entretanto, são pouco funcionais por si próprios, seja porque são reconhecidos fracamente pela RNA-polimerase, seja porque a polimerase tem dificuldade em abrir a hélice de DNA e iniciar a transcrição. Em cada um dos casos, esses promotores pouco funcionais podem ser auxiliados por proteínas de regulação gênica, que se ligam em sítios próximos no DNA e entram em contato com a RNA-polimerase, de maneira que aumentam dramaticamente a probabilidade de que o transcrito seja iniciado. Devido ao fato de a forma ativa dessas proteínas ligantes de DNA servir para ativar genes, esse modo de regulação gênica é chamado de **controle positivo**, e as proteínas de regulação gênica que assim atuam são conhecidas como *ativadores transcricionais* ou *proteínas de ativação gênica*. Em alguns casos, as proteínas de ativação gênica bacterianas possibilitam à RNA-polimerase ligar-se ao promotor por fornecerem uma superfície de contato adicional para a polimerase. Em outros casos, elas entram em contato com a RNA-polimerase e facilitam a transição da conformação inicial de ligação ao DNA da polimerase para a forma transcricionalmente ativa, pela estabilização do seu estado de transição. Como os repressores, as proteínas de ativação gênica precisam estar ligadas ao DNA para exercerem os seus efeitos. Dessa forma, cada proteína de regulação gênica atua seletivamente, controlando somente aqueles genes que apresentem uma sequência de DNA reconhecida por ela.

Proteínas ativadoras ligadas ao DNA podem aumentar a taxa de início da transcrição até 1.000 vezes, um valor consistente com a interação relativamente fraca e não específica entre o ativador e a RNA-polimerase. Por exemplo, uma alteração de 1.000 vezes na afinidade da RNA-polimerase por seu promotor corresponde a uma mudança no ΔG de ~4 kcal/mol, a qual poderia ser derivada de algumas poucas ligações fracas não-covalentes. Dessa forma, proteínas ativadoras podem trabalhar simplesmente fornecendo algumas poucas interações favoráveis que auxiliem na atração da RNA-polimerase ao promotor.

Como no controle negativo, realizado por um repressor transcricional, um ativador transcricional pode operar como parte de um mecanismo genético simples de ativação-desativação. A proteína ativadora bacteriana CAP (*proteína ativadora de catabolismo,* de *catabolite activator protein*), por exemplo, ativa genes que possibilitam que a *E. coli* utilize fontes alternativas de carbono quando a glicose, sua fonte de carbono preferida, não está disponível. A diminuição dos níveis de glicose induz um aumento da molécula sinalizadora intracelular AMP cíclico, a qual se liga à proteína CAP, possibilitando que ela se ligue a sua sequência específica de DNA próxima dos promotores-alvo e, portanto, ativando os genes apropriados. Dessa maneira, a expressão do gene-alvo é ativada ou desativada, dependendo de os níveis de AMP cíclico na célula estarem altos ou baixos, respectivamente. A **Figura 7-37** resume as diferentes maneiras como os controles positivo e negativo podem ser usados para regular genes.

Em muitos aspectos, os ativadores e os repressores transcricionais são semelhantes em estrutura. O repressor do triptofano e o ativador transcricional CAP, por exemplo, utilizam um motivo hélice-volta-hélice (ver Figura 7-11) e ambos requerem um pequeno cofator para se ligarem ao DNA. De fato, algumas proteínas bacterianas (incluindo a CAP e o repressor do bacteriófago lambda) podem atuar tanto como ativadoras quanto como repressoras, dependendo do local exato da sequência de DNA que elas reconhecem em relação ao promotor: se o sítio de ligação para a proteína sobrepõe-se ao promotor, a polimerase não pode ligar-se, e a proteína atua como um repressor (**Figura 7-38**).

Um ativador transcricional e um repressor transcricional controlam o operon *Lac*

Tipos mais complicados de controles genéticos combinam os controles negativo e positivo. O *operon Lac* na *E. coli*, por exemplo, ao contrário do *operon Trp*, está sob os controles transcricionais negativo e positivo por meio das proteínas repressoras Lac e CAP, respectivamente. O operon *Lac* codifica as proteínas requeridas para o transporte do dissacarídeo lactose

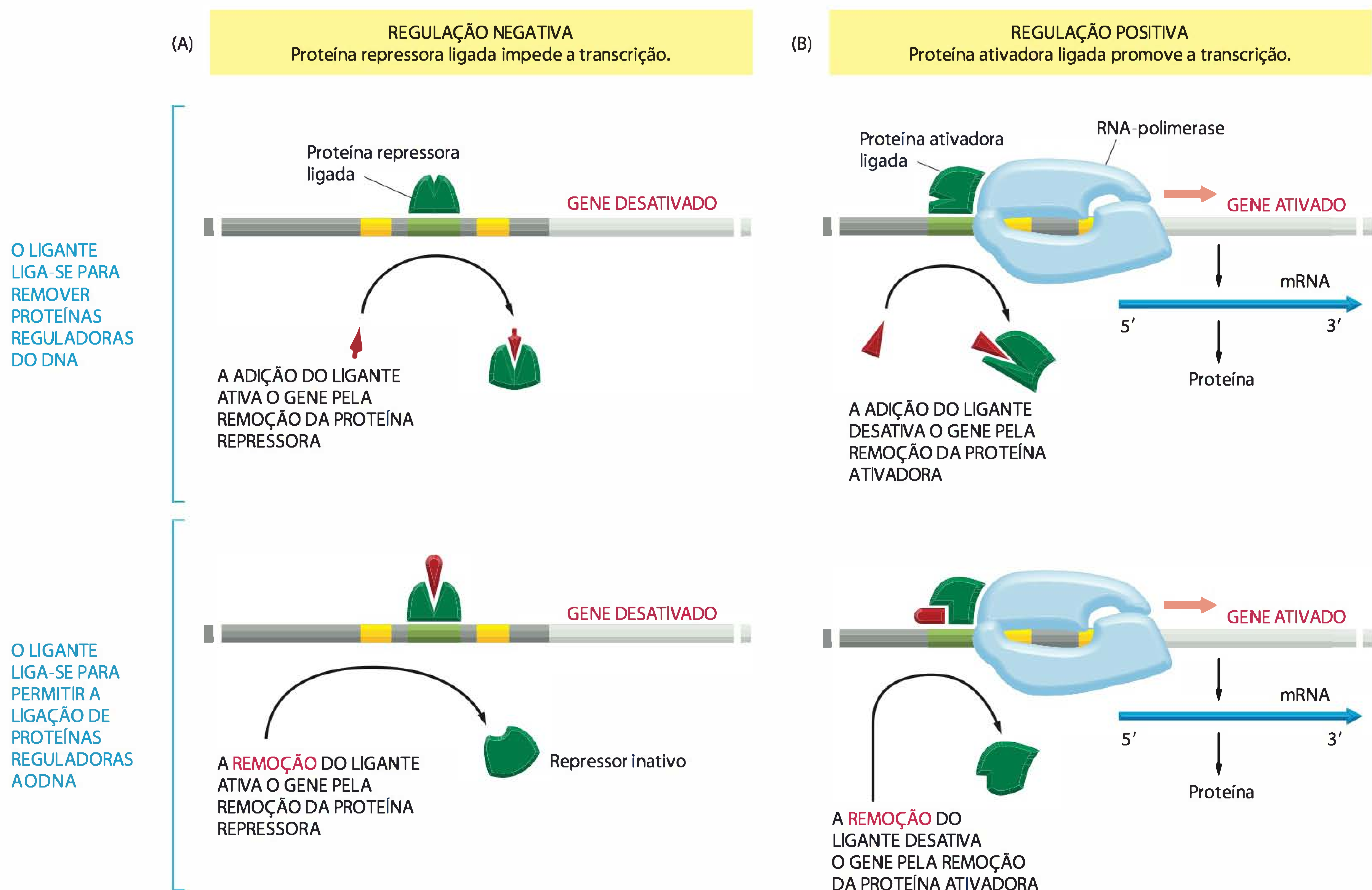


Figura 7-37 Resumo dos mecanismos pelos quais proteínas de regulação gênica controlam a transcrição gênica em procariotos. (A) Regulação negativa; (B) regulação positiva. Note que a adição de um ligante "indutor" pode ativar um gene tanto removendo uma proteína de repressão gênica do DNA (*painel acima, à esquerda*) como promovendo a ligação de uma proteína de ativação gênica (*painel abaixo, à direita*). Da mesma maneira, a adição de um ligante "inibitório" pode desativar um gene tanto removendo uma proteína de ativação gênica do DNA (*painel acima, à direita*) como promovendo a ligação de uma proteína de repressão gênica (*painel abaixo, à esquerda*).

para dentro da célula e para a sua quebra. A CAP, como vimos, possibilita que a bactéria utilize fontes alternativas de carbono, tais como a lactose, na ausência de glicose. No entanto, é desperdício para a CAP induzir a expressão do operon *Lac*, se a lactose não está presente, e o repressor Lac assegura que o operon *Lac* esteja desativado na ausência de lactose. Esse arranjo possibilita que a região controladora do operon *Lac* responda e integre dois sinais diferentes, de maneira que o operon somente é altamente expresso quando duas condições são encontradas: a lactose tem que estar presente e a glicose tem que estar ausente. Qualquer outra das três combinações de sinais mantém o agrupamento de genes no estado desativado (**Figura 7-39**).

A lógica simples desse controle genético atraiu pela primeira vez a atenção dos biólogos há mais de 50 anos. Como explicado anteriormente, a base molecular do controle foi descoberta por uma combinação de genética e de bioquímica, fornecendo a primeira ideia sobre como a expressão gênica é controlada.

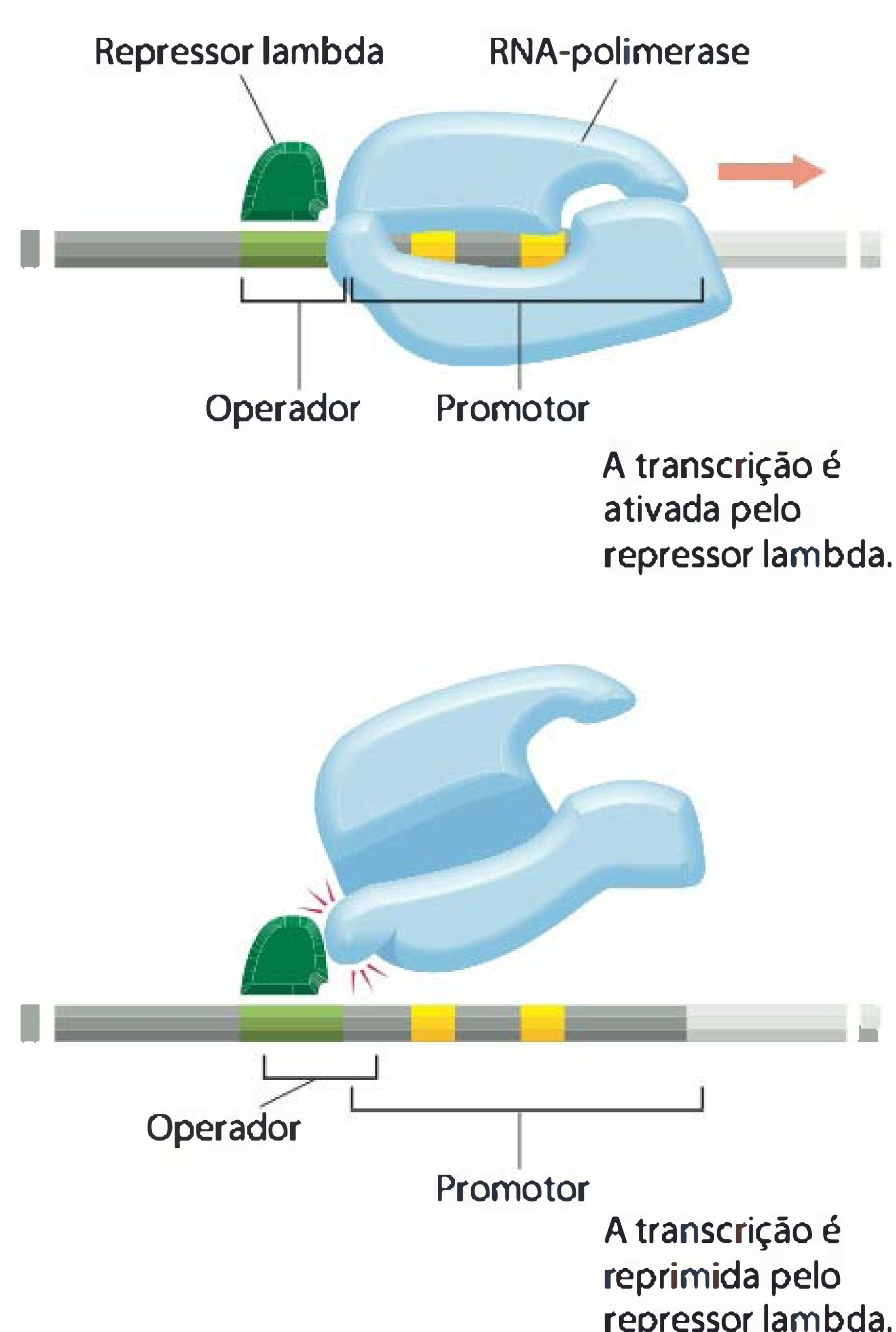


Figura 7-38 Algumas proteínas bacterianas de regulação gênica podem atuar como ativadores e repressores transcricionais, dependendo da localização precisa dos seus sítios de ligação no DNA. Um exemplo é o repressor do bacteriófago lambda. Para alguns genes, a proteína atua como um ativador transcricional fornecendo um contato favorável para a RNA-polimerase (*acima*). Em outros genes (*abaixo*), o operador está localizado um par de bases mais próximo do promotor, e, ao invés de auxiliar a polimerase, o repressor agora compete com ela pela ligação ao DNA. O repressor lambda reconhece o seu operador pelo motivo hélice-volta-hélice, como mostrado na Figura 7-11.

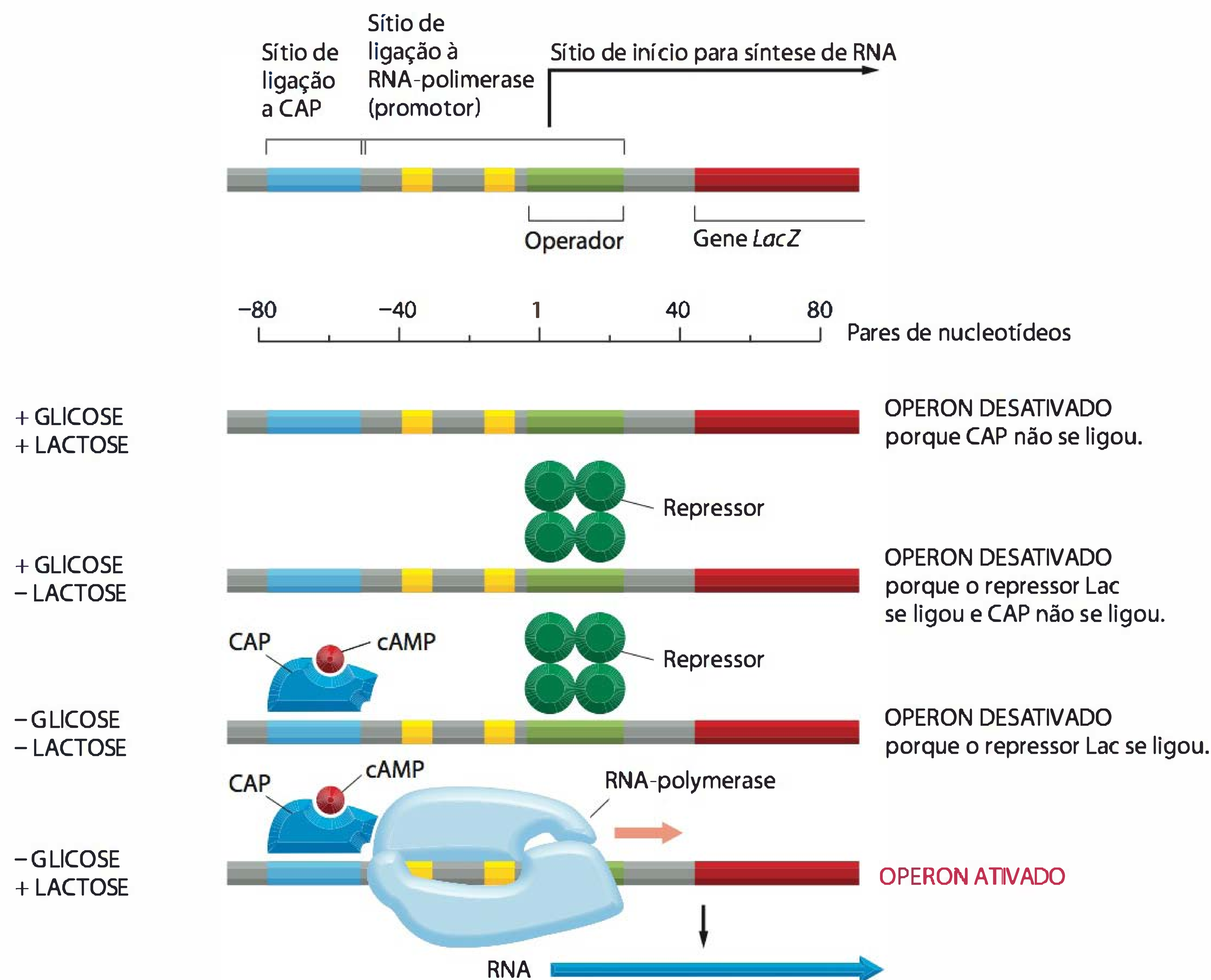


Figura 7-39 Controle duplo do operon *Lac*. Os níveis de glicose e lactose controlam o início da transcrição do operon *Lac* por seus efeitos sobre a proteína repressora de *Lac* e CAP, respectivamente. *LacZ*, o primeiro gene do operon *Lac*, codifica a enzima β-galactosidase, a qual quebra o dissacarídeo lactose em galactose e glicose. A adição de lactose aumenta a concentração de alolactose, um isômero da lactose, o qual se liga à proteína repressora e a remove do DNA. A adição de glicose diminui a concentração de AMP cíclico; uma vez que o AMP cíclico não mais se liga a CAP, essa proteína de ativação gênica não mais se ligará à CAP, desativando o operon.

As características essenciais do operon *Lac* estão resumidas na figura, mas na realidade a situação é mais complexa. Existem vários sítios de ligação para o repressor Lac localizados em diferentes posições ao longo do DNA. Embora o que foi mostrado exerça o maior efeito, os outros são necessários para uma repressão completa (ver Figura 7-40). Além disso, a expressão do operon *Lac* nunca é completamente desligada. Uma pequena quantidade da enzima β-galactosidase é necessária para converter lactose em alolactose e assim permitir que o repressor Lac seja inativado quando lactose é adicionada ao meio de cultura.

A formação de alças no DNA ocorre durante a regulação gênica bacteriana

O controle do operon *Lac*, como mostrado na Figura 7-39, é simples e econômico, porém o estudo contínuo deste e de outros exemplos de regulação gênica bacteriana revelaram uma nova característica da regulação gênica, conbecida como *formação de alças no DNA*. Acreditava-se que o operon *Lac* contivesse um único operador, porém trabalhos subsequentes revelaram operadores secundários adicionais localizados ao redor. Uma única molécula tetramérica do repressor Lac pode ligar-se a dois operadores simultaneamente, formando uma alça com o DNA entre eles. A habilidade de ligar-se simultaneamente aos dois operadores fortalece a interação total do repressor Lac com o DNA e assim induz níveis maiores de repressão na célula (**Figura 7-40**).

A formação de alças também permite que duas proteínas diferentes liguem-se uma à outra facilmente ao longo do DNA de dupla-hélice. O DNA pode ser considerado como uma corda, auxiliando uma proteína a interagir com outra mesmo que milhares de pares de nucleotídeos possam separar os sítios de ligação das duas proteínas (**Figura 7-41**). Veremos

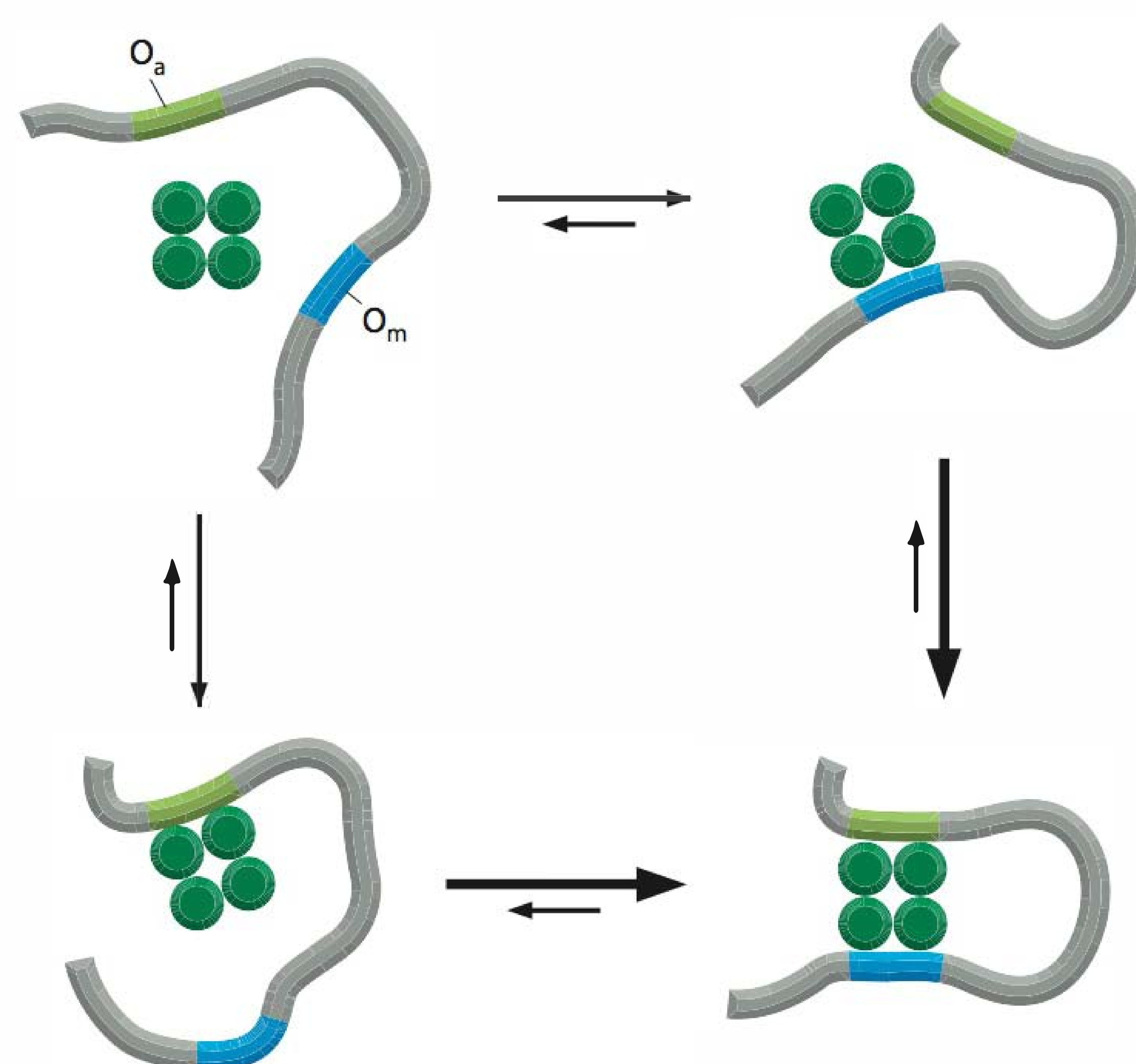


Figura 7-40 A formação de alças no DNA pode estabilizar interações proteína-DNA. O repressor Lac, um tetrâmero, pode ligar-se simultaneamente a dois operadores. O operon *Lac* é constituído de 3 operadores, mas, para simplificar, somente dois estão mostrados aqui, o operador principal (O_m) e o operador auxiliar (O_a). A figura mostra todos os estados possíveis do repressor Lac ligado a esses dois operadores. Nas concentrações do repressor Lac na célula e na ausência de lactose, o estado abaixo à direita é o mais estável, e para dissociar-se completamente do DNA o repressor Lac precisa primeiro passar através de um intermediário onde esteja ligado a somente um único operador. Nesses estados, a concentração local do repressor é muito alta em relação ao operador livre, e a reação para a forma com ligação dupla é favorecida sobre a reação de dissociação. Dessa maneira, mesmo um sítio de baixa afinidade (O_a) pode aumentar a ocupação de um sítio de alta afinidade (O_m) e originar níveis maiores de repressão gênica na célula. (Adaptada de J. M. G. Vilar e S. Leibler, *J. Mol. Biol.* 331:981-989, 2003. Com permissão da Academic Press.)

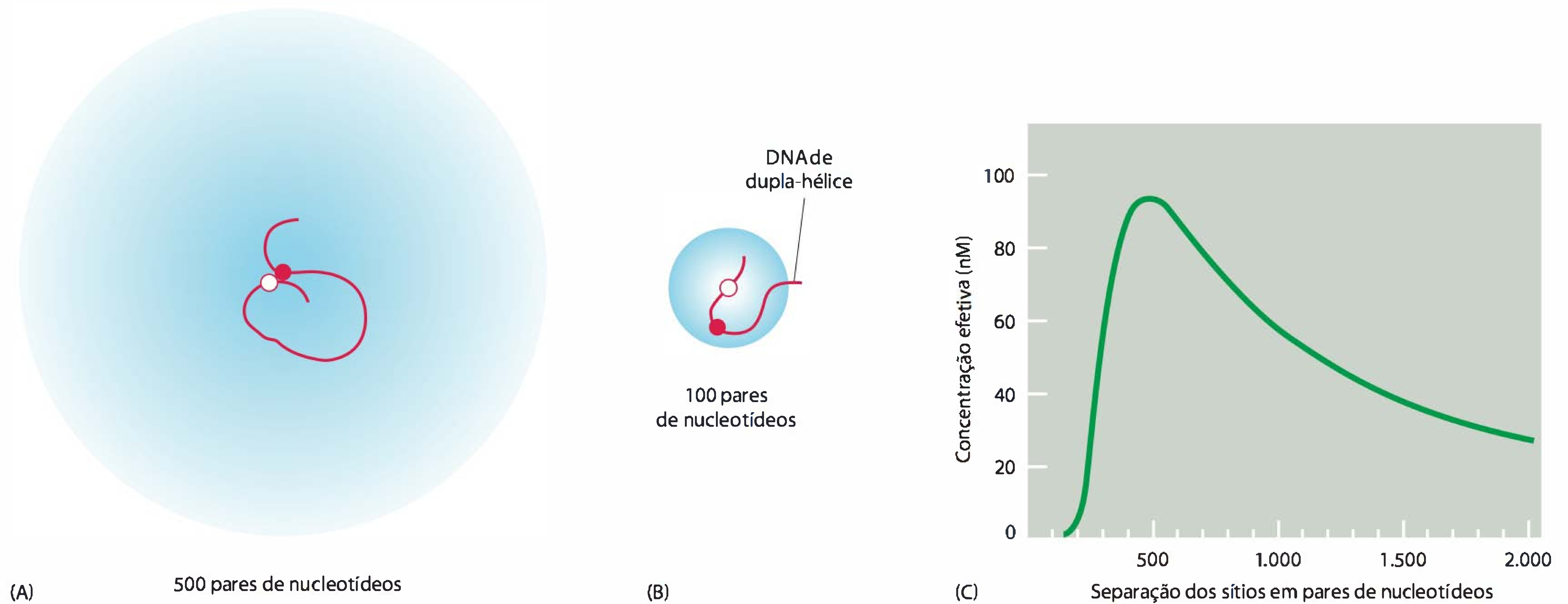


Figura 7-41 A ligação de duas proteínas a sítios separados no DNA de fita dupla pode aumentar bastante a probabilidade de interagirem. (A) A interação de uma proteína com outra via uma alça de DNA intermediário de 500 pares de nucleotídeos aumenta a frequência de colisões. A intensidade da coloração *azul* reflete a probabilidade da proteína *vermelha* localizar-se em cada posição no espaço relativo à proteína *branca*. (B) A flexibilidade do DNA é tal que uma sequência mediana apresenta uma torção muito próxima dos 90° (uma volta curva) aproximadamente a cada 200 pares de nucleotídeos. Portanto, quando duas proteínas são separadas por somente 100 pares de nucleotídeos, o seu contato é relativamente restrito. Nesses casos, a interação proteica é facilitada quando dois sítios de ligação à proteína são separados por um múltiplo de aproximadamente 10 pares de nucleotídeos, o que coloca ambas as proteínas no mesmo lado da dupla-hélice de DNA (a qual possui em torno de 10 nucleotídeos por volta) e assim no interior da alça de DNA, onde elas podem entrar em contato mais facilmente. (C) Concentração teórica efetiva da proteína *vermelha* no sítio onde a proteína *branca* está ligada, como uma função de sua separação. Experimentos sugerem que as concentrações efetivas reais em distâncias curtas são maiores do que as preditas aqui. (C, cortesia de Gregory Bellomy, modificada de M. C. Mossing e M. T. Record, *Science* 233:889-892, 1986. Com permissão de AAAS.)

a seguir que a formação de alças no DNA é especialmente importante na regulação gênica eucariótica. Entretanto, ela também desempenha funções cruciais em muitos exemplos de regulação gênica bacteriana além do operon *Lac*. Por exemplo, a formação de alças no DNA permite que a proteína de ativação gênica bacteriana NtrC facilmente contate de maneira direta a RNA-polimerase, mesmo que as duas proteínas estejam ligadas a várias centenas de pares de nucleotídeos de distância (**Figura 7-42**).

As bactérias utilizam subunidades de RNA-polimerase intercambiáveis para auxiliar na regulação da transcrição gênica

Vimos a importância das proteínas de regulação gênica que se ligam às sequências do DNA e sinalizam para a RNA-polimerase se ela deve ou não iniciar a síntese de uma cadeia de RNA.

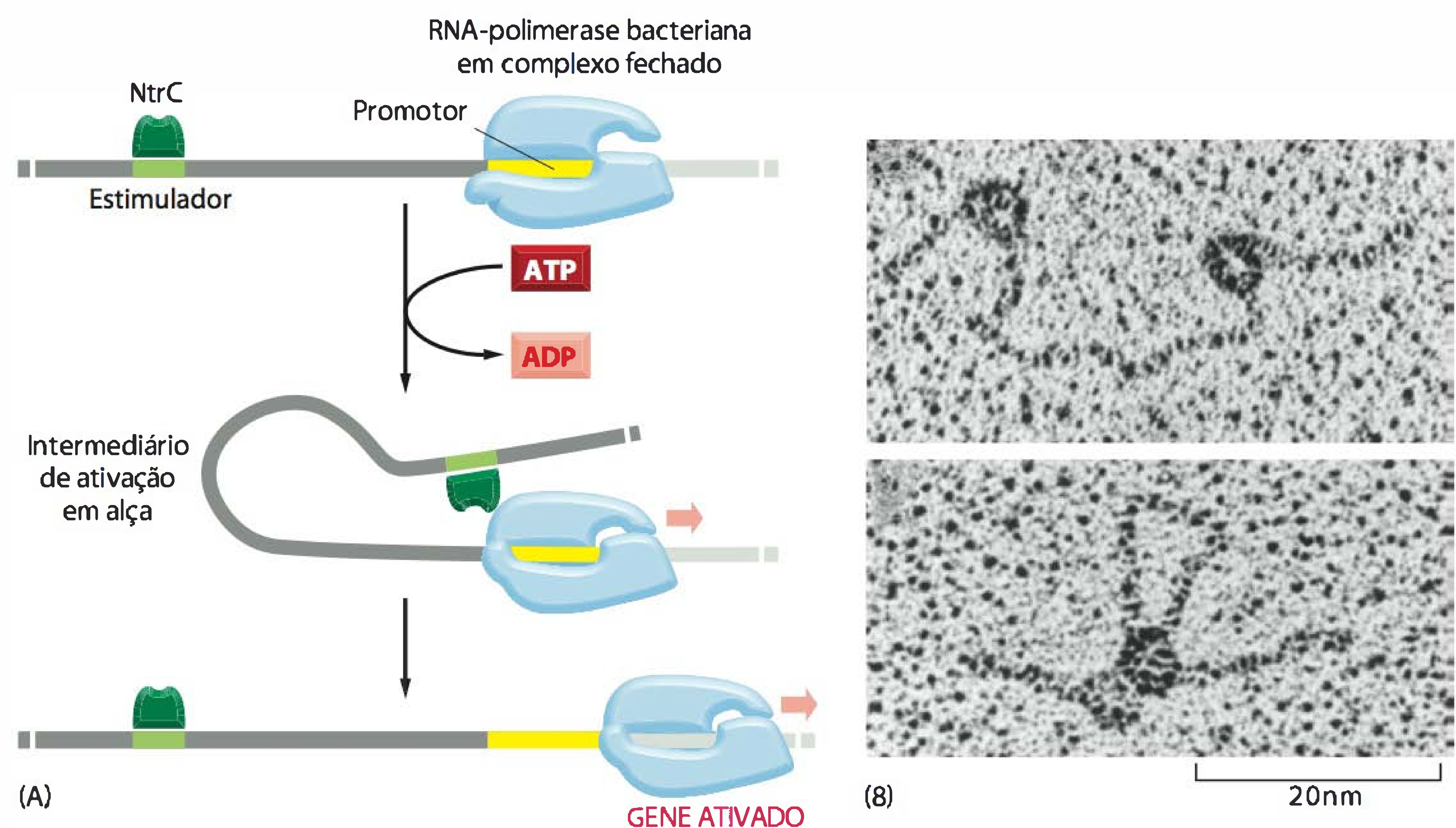


Figura 7-42 Ativação gênica à distância. (A) NtrC é uma proteína de regulação gênica bacteriana que ativa a transcrição pelo contato direto com a RNA-polimerase e pela indução da transição entre a forma inicial de ligação ao DNA da polimerase e a forma transcricionalmente competente (discutido no Capítulo 6). Como indicado, a transição estimulada por NtrC requer a energia produzida pela hidrólise de ATP, embora essa necessidade não seja comum para o início de transcrição bacteriana. (B) A interação entre NtrC e a RNA-polimerase, com a alça de DNA intermediária pode ser vista no microscópio eletrônico. (B, cortesia de Harrison Echols e Sydney Kustu.)

Tabela 7-2 Fatores sigma de *E. coli*

Fator sigma	Promotores reconhecidos
σ^{70}	A maioria dos genes
σ^{32}	Genes induzidos por choque térmico
σ^{28}	Genes da fase estacionária e resposta ao estresse
σ^{28}	Genes envolvidos em motilidade e quimiotaxia
σ^{54}	Genes para o metabolismo do nitrogênio
σ^{24}	Genes que lidam com proteínas mal-dobradas no periplasma

As denominações do fator sigma referem-se aos seus pesos moleculares aproximados, em quilodáltons.

Embora esta seja uma das muitas maneiras pelas quais tanto encariotos como procariotos controlam o início da transcrição, algumas bactérias e seus vírus usam uma estratégia adicional com base em subunidades intercambiáveis da RNA-polimerase. Como descrito no Capítulo 6, uma unidade sigma (σ) é necessária para a RNA-polimerase bacteriana reconhecer um promotor. A maioria das bactérias produz uma ampla gama de subunidades sigma, cada qual podendo interagir com o cerne da RNA-polimerase e direcioná-la para um conjunto diferente de promotores (**Tabela 7-2**). Esse esquema permite que um grande conjunto de genes seja inibido e um novo conjunto seja ativado simplesmente pela substituição de uma subunidade sigma pela outra; a estratégia é eficiente por desviar-se da necessidade de lidar com genes um por um. Além disso, algumas bactérias codificam para aproximadamente cem diferentes tipos de subunidades sigma e assim dependem bastante dessa forma de regulação gênica. Os vírus bacterianos frequentemente utilizam-na subversivamente para apropriarem-se da polimerase do hospedeiro e ativar vários conjuntos de genes virais rápida e sequencialmente (**Figura 7-43**).

Comutadores complexos evoluíram para o controle da transcrição gênica em eucariotos

Bactérias e eucariotos compartilham muitos princípios da regulação gênica, incluindo a função-chave desempenhada por proteínas de regulação gênica que se ligam fortemente a regiões curtas de DNA, a importância das interações fracas proteína-proteína na ativação gênica e a versatilidade proporcionada pela formação de alças no DNA. Entretanto, em comparação, a regulação gênica em eucariotos envolve muito mais proteínas, regiões muito maiores de DNA, e frequentemente parece muito complexa. Essa complexidade aumentada fornece para a célula eucariótica uma vantagem importante. Comutadores genéticos em bactérias, como vimos, normalmente respondem a um ou poucos sinais. Mas em eucariotos é comum dúzias de sinais convergirem para um único promotor, com a maquinaria de transcrição integrando todos esses sinais diferentes para a produção de níveis apropriados de mRNA. Iniciaremos a nossa descrição da regulação gênica eucariótica delineando as características principais que a distinguem da regulação gênica em bactérias.

- Como discutido no Capítulo 6, a RNA-polimerase II de eucariotos, que transcreve todos os genes codificantes de proteína, necessita de cinco fatores de transcrição gerais (27 subunidades *in toto*, ver Tabela 6-3, p. 341), ao passo que a RNA-polimerase bacteriana necessita somente de um único fator geral de transcrição, a subunidade σ. Como vimos, o acoplamento em etapas dos fatores de transcrição gerais no promotor eu-

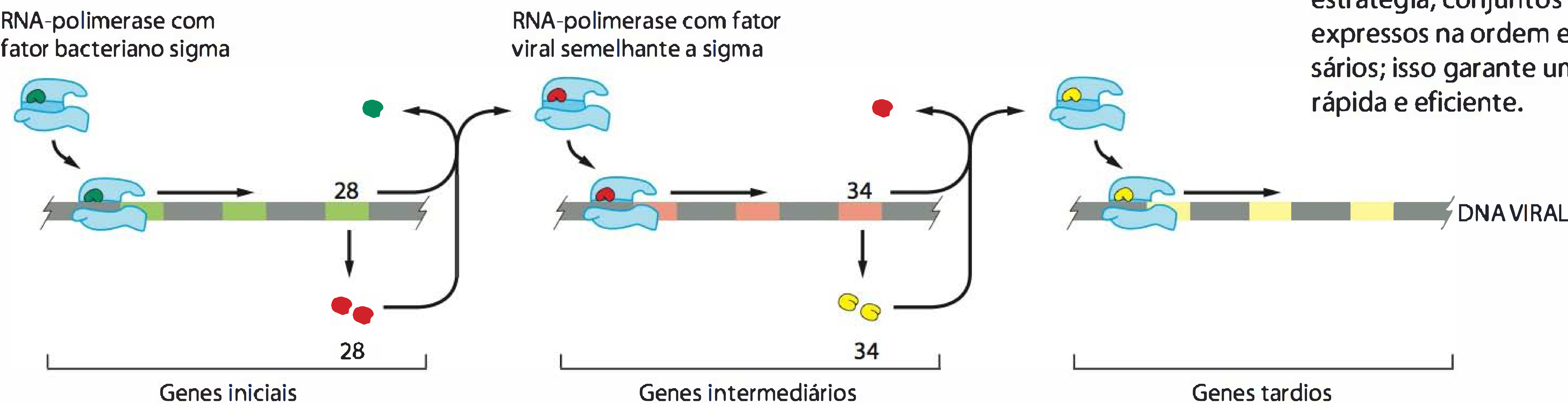


Figura 7-43 Subunidades intercambiáveis da RNA-polimerase como uma estratégia para o controle da expressão gênica em um vírus bacteriano. O vírus bacteriano SPO1, o qual infecta a bactéria *B. subtilis*, utiliza a polimerase bacteriana para transcrever seus genes iniciais imediatamente após o DNA viral entrar na célula. Um dos genes iniciais, chamado de 28, codifica um fator semelhante a sigma que se liga à RNA-polimerase substituindo o fator sigma bacteriano. Essa nova forma de polimerase inicia especificamente a transcrição dos genes "intermediários" SPO1. Um dos genes intermediários codifica um segundo fator semelhante a sigma, 34, que desloca o produto 28 e direciona a RNA-polimerase a transcrever os genes "tardios". Esse último conjunto de genes produz as proteínas que empacotam o cromossomo viral em uma capa viral e lisam a célula. Por essa estratégia, conjuntos de genes virais são expressos na ordem em que são necessários; isso garante uma replicação viral rápida e eficiente.

cariótico fornece, em princípio, múltiplos passos nos quais a célula pode acelerar ou diminuir a taxa de início de transcrição em resposta a proteínas de regulação gênica.

- As células eucarióticas não possuem operons – conjuntos de genes relacionados transcritos juntos – e assim precisam regular cada gene individualmente.
- Cada gene bacteriano normalmente é controlado somente por uma ou algumas proteínas de regulação gênica, mas é comum nos eucariotos os genes serem controlados por muitas (às vezes centenas) proteínas reguladoras diferentes. Essa complexidade é possível porque, como veremos, muitas proteínas de regulação gênica podem atuar através de distâncias muito grandes (dezenas de milhares de pares de nucleotídeos) ao longo do DNA, permitindo que um número quase ilimitado delas influencie a expressão de um único gene.
- Um componente central da regulação gênica em eucariotos é o *Mediador*, um complexo de 24 subunidades que serve como um intermediário entre as proteínas de regulação gênica e a RNA-polimerase (ver Figura 6-19). O mediador fornece uma área de contato estendida para as proteínas de regulação gênica em comparação à fornecida pela RNA-polimerase sozinha, como em bactérias.
- Terceiro, o empacotamento do DNA eucariótico na cromatina fornece muitas oportunidades para regulação transcricional não disponíveis em bactérias.

Tendo discutido os fatores de transcrição para a RNA-polimerase II no Capítulo 6 (ver p. 340-343), concentraremo-nos aqui nas últimas quatro destas características e em como elas são utilizadas para controlar a expressão gênica eucariótica.

Uma região eucariótica de controle gênico consiste em um promotor e em sequências reguladoras de DNA

Como as proteínas de regulação gênica podem controlar a transcrição mesmo estando ligadas a um DNA distante do promotor, as sequências de DNA que controlam a expressão de um gene frequentemente estão distribuídas por longos trechos de DNA. Usaremos o termo **região de controle gênico** para nos referirmos a toda a extensão do DNA envolvida na regulação da transcrição de um gene, incluindo o **promotor**, onde os fatores gerais de transcrição e a polimerase se associam, e todas as **sequências reguladoras** nas quais as proteínas de regulação gênica ligam-se para controlar a taxa dos processos de associação ao promotor (**Figura 7-44**). Em animais e plantas, não é raro encontrar sequências reguladoras de um gene localizadas a distâncias tão grandes como 50 mil pares de nucleotídeos. Embora muito desse DNA sirva apenas como sequência "espaçadora" e não seja reconhecido diretamente pelas proteínas de regulação gênica, esse DNA pode fornecer a flexibilidade necessária para uma formação eficiente de alças no DNA. Nesse contexto, também é importante lembrar que, como nas outras regiões dos cromossomos eucarióticos, muito do DNA nas regiões de controle gênico está empacotado em nucleossomos e em formas de maior hierarquia na cromatina, desse modo compactando o seu tamanho e alterando as suas propriedades.

Neste capítulo, usamos normalmente o termo **gene** para indicar somente um segmento de DNA que é transcrito em RNA (ver Figura 7-44). Entretanto, a visão clássica de um gene também inclui a sua região de controle, tornando a maioria dos genes eucarióticos consideravelmente maiores. A descoberta do *splicing* alternativo do RNA tem complicado ainda mais a definição de gene – um ponto que foi discutido brevemente no Capítulo 6 e ao qual retornaremos mais tarde, neste capítulo.

São as proteínas de regulação gênica que permitem que os genes de um organismo sejam individualmente ativados ou desativados. Ao contrário do pequeno número de fatores gerais de transcrição, que são proteínas abundantes e que se associam sobre os promotores de todos os genes transcritos pela RNA-polimerase II, existem milhares de proteínas de regulação gênica diferentes. Por exemplo, dos aproximados 25 mil genes humanos, estima-se que 8% (~2.000 genes) codifiquem para proteínas de regulação gênica. A maioria delas reconhece sequências de DNA usando um dos motivos de DNA examinados anteriormente. Não surpreendentemente, a célula eucariótica regula cada um dos seus muitos genes de maneira única. Considerando-se o número total de genes em eucariotos e a complexidade de sua regulação, tem sido difícil formular regras simples de regulação gênica que se apliquem em cada caso. Podemos, entretanto, fazer algumas generalizações a respeito de como as proteínas de regulação gênica, uma vez ligadas a regiões de controle gênico no DNA, influenciam o conjunto de eventos que levam à ativação ou à repressão gênica.

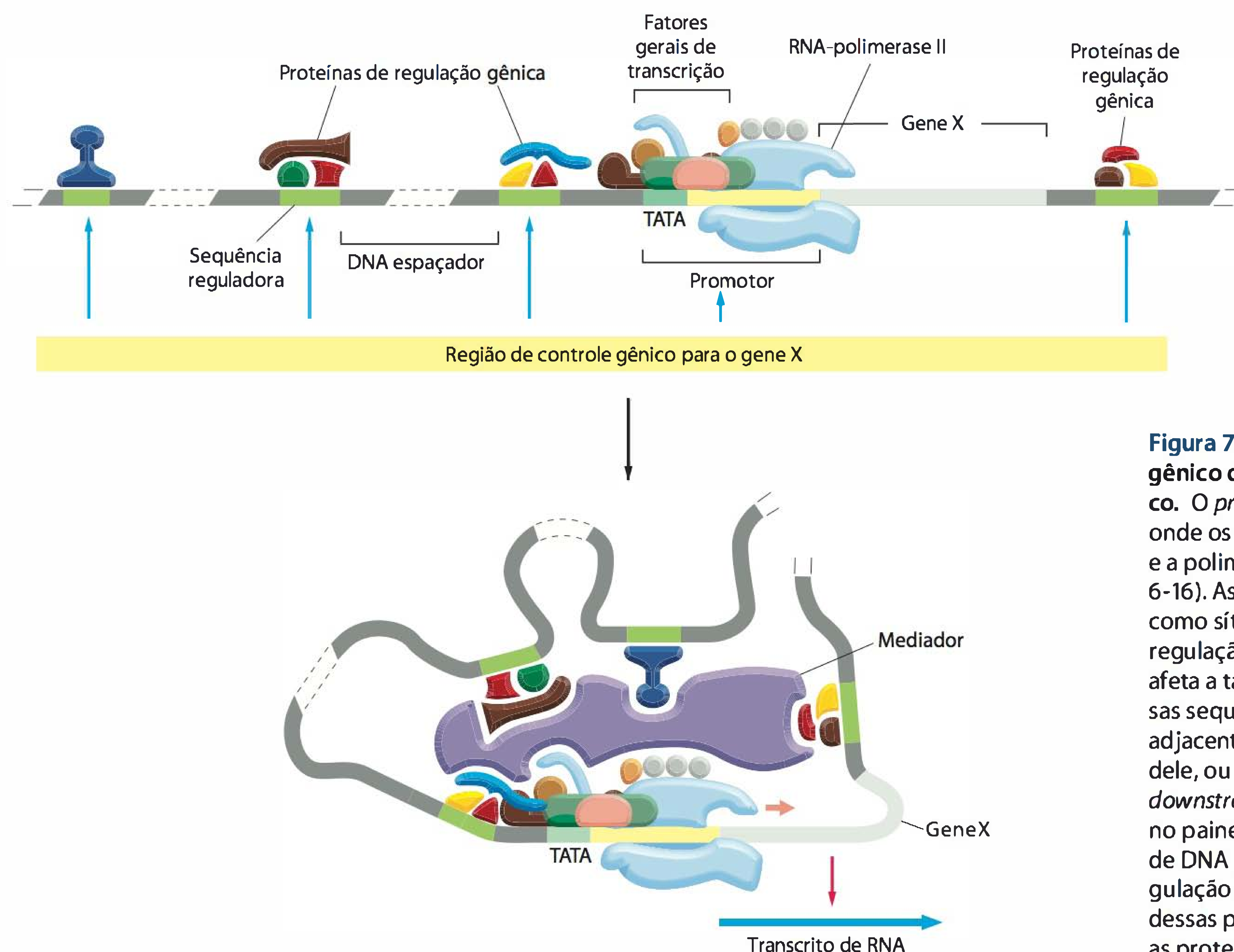


Figura 7-44 A região de controle gênico de um gene eucariótico típico. O *promotor* é a sequência de DNA onde os fatores de transcrição gerais e a polimerase se associam (ver Figura 6-16). As *sequências reguladoras* servem como sítios de ligação para proteínas de regulação gênica, cuja presença no DNA afeta a taxa de início de transcrição. Essas sequências podem estar localizadas adjacentes ao promotor, muito acima dele, ou mesmo dentro de íntrons ou *downstream* do gene. Como mostrado no painel inferior, a formação das alças de DNA permite que as proteínas de regulação gênica liguem-se em quaisquer dessas posições para interagirem com as proteínas que se associam no promotor. Muitas proteínas de regulação gênica atuam pelo Mediador, enquanto outras influenciam os fatores gerais de transcrição e a RNA-polimerase diretamente. Embora não mostrado aqui, muitas proteínas de regulação gênica também influenciam a estrutura da cromatina da região controladora do DNA, dessa forma afetando o início da transcrição indiretamente (ver Figura 4-45). Como indicado no texto, para simplificar, gene "X" refere-se aqui à sequência codificante dentro do gene.

Enquanto o Mediador e os fatores gerais de transcrição são semelhantes para todos os genes transcritos pela RNA-polimerase II, as proteínas de regulação gênica e a localização dos sítios de ligação relativos ao promotor são diferentes para cada gene.

As proteínas eucarióticas ativadoras de genes promovem a associação da RNA-polimerase e dos fatores gerais de transcrição no sítio de início da transcrição

Os sítios de DNA aos quais as proteínas de ativação gênica eucarióticas se ligam eram originalmente chamados de *estimuladores*, pois sua presença "estimulava" a taxa de início da transcrição. Foi uma surpresa quando pela primeira vez descobriu-se que essas proteínas ativadoras poderiam ligar-se dezenas de milhares de pares de nucleotídeos de distância do promotor; mas, como vimos, a formação de alças no DNA fornece pelo menos uma explicação para essa observação inicialmente intrigante.

As proteínas de ativação gênica possuem um desenho modular que consiste em dois domínios distintos. Um domínio, geralmente, contém um dos motivos estruturais discutidos previamente que reconhece uma sequência de DNA reguladora específica. O segundo domínio – algumas vezes chamado de *domínio de ativação* – acelera a taxa de início da transcrição. Esse tipo de desenho modular foi primeiramente revelado por experimentos nos quais técnicas de engenharia genética foram utilizadas para criar uma proteína híbrida contendo o domínio de ativação de uma proteína fusionado ao domínio de ligação ao DNA de uma proteína diferente (**Figura 7-45**).

Uma vez ligadas ao DNA, como as proteínas eucarióticas de ativação gênica aumentam a taxa de início de transcrição? Como veremos rapidamente, existem vários mecanismos pelos quais isso pode ocorrer e, em muitos casos, os diferentes mecanismos trabalham em conjunto em um único promotor. Mas, independentemente da via bioquímica precisa, a principal função dos ativadores é atrair, posicionar e modificar os fatores gerais de transcrição, o Mediador e a RNA-polimerase II no promotor, de maneira que a transcrição possa começar. Eles fazem isso tanto atuando diretamente nesses componentes como alterando a estrutura da cromatina ao redor do promotor.

Algumas proteínas de ativação ligam-se diretamente a um ou mais fatores gerais de transcrição, acelerando a sua montagem em um promotor que esteja ligado pelo DNA àquele ativador. Outros interagem com o Mediador e o atraem para o DNA onde ele pode, então, facilitar a montagem da RNA-polimerase e dos fatores gerais de transcrição no promotor

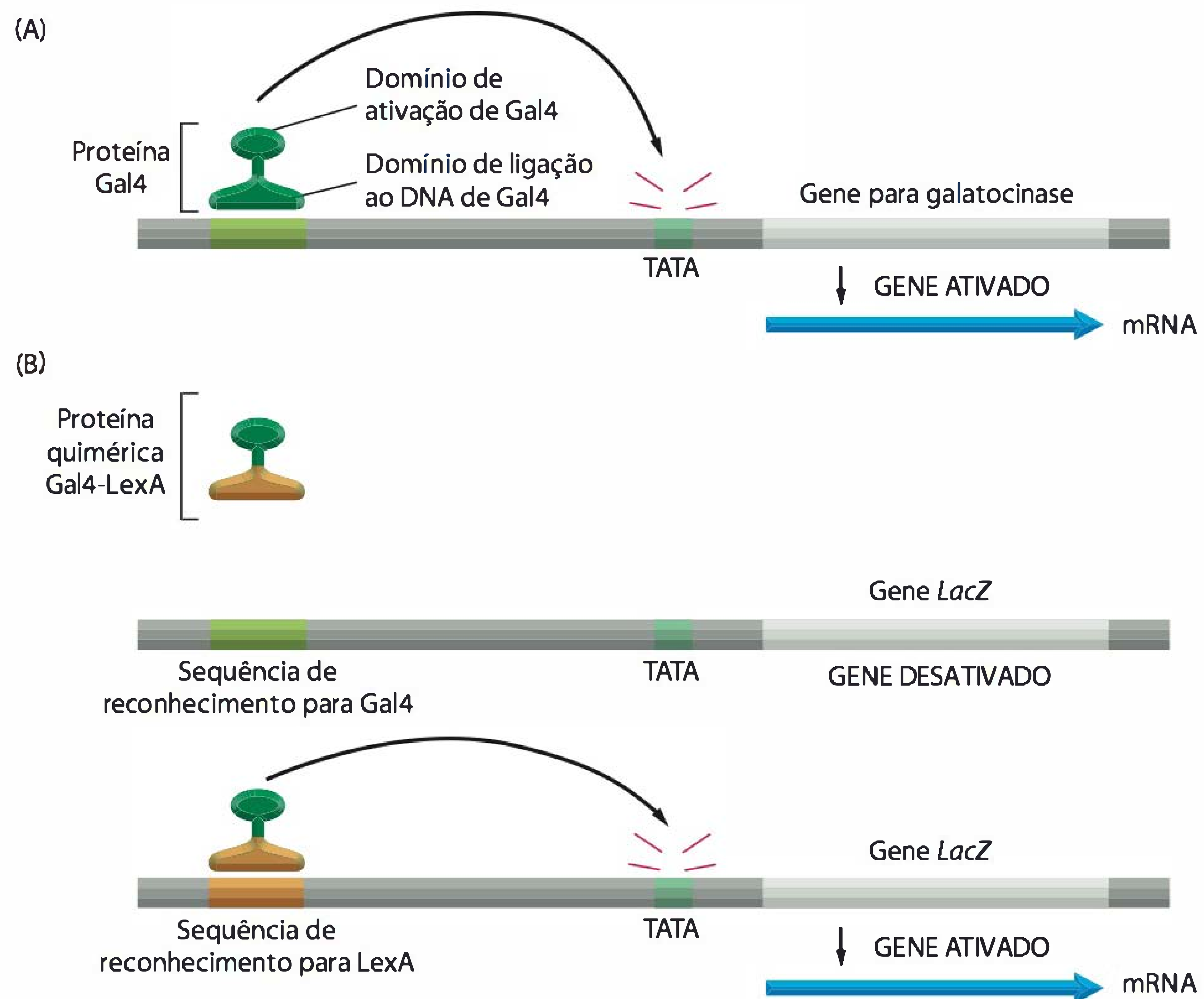


Figura 7-45 Estrutura modular de uma proteína de ativação gênica. Esquematização de um experimento que revela a presença de domínios independentes de ligação ao DNA e de ativação da transcrição na proteína de ativação gênica de levedura Gal4. Um ativador funcional pode ser reconstituído a partir da porção C-terminal da proteína de levedura Gal4 se ela estiver ligada ao domínio de ligação ao DNA de uma proteína de regulação gênica bacteriana (a proteína LexA) por técnicas de fusão gênica. Quando a proteína híbrida bactéria-levedura resultante é produzida em células de levedura, ela irá ativar a transcrição de genes de levedura que possuírem o sítio de ligação ao DNA específico para a proteína bacteriana inserido próximo a eles. (A) Gal4 normalmente é responsável pela ativação da transcrição dos genes de levedura que codificam para as enzimas que convertem galactose em glicose. (B) A proteína de regulação gênica quimérica, produzida por técnicas de manipulação genética, necessita do sítio de ligação ao DNA da proteína LexA para a sua atividade. No experimento mostrado, a região de controle para um desses genes foi fusionada ao gene de *E. coli LacZ*, o qual codifica para a enzima β-galactosidase (ver Figura 7-39). A β-galactosidase é muito fácil de ser detectada bioquimicamente e assim fornece uma maneira conveniente de monitorar o nível de expressão especificado por uma região de controle gênico. Como utilizado aqui, *LacZ* é considerado um *gene repórter*, uma vez que "reporta" a atividade de uma região de controle gênico.

(ver Figura 7-44). Nesse sentido, os ativadores eucarióticos lembram os de bactérias no recrutamento da RNA-polimerase a sítios específicos no DNA de maneira que ela possa iniciar a transcrição.

As proteínas eucarióticas ativadoras de genes modificam a estrutura local da cromatina

Os fatores gerais de transcrição, o Mediador e a RNA-polimerase parecem incapazes de, por si só, associarem-se a um promotor que esteja empacotado em nucleossomos convencionais. Além disso, foi proposto que tal empacotamento pode ter evoluído para impedir uma transcrição "frouxa". Além de suas ações diretas na montagem da maquinaria de transcrição no promotor, as proteínas de ativação gênica também promovem o início da transcrição alterando a estrutura da cromatina das sequências reguladoras e dos promotores dos genes.

Como vimos no Capítulo 4, as duas maneiras mais importantes de alterar localmente a estrutura da cromatina ocorrem por modificações covalentes nas histonas, por remodelamento de nucleossomos, por remoção de nucleossomos e por substituição de nucleossomos. Proteínas de ativação gênica utilizam todos os quatro mecanismos pela atração de enzimas de modificação de histonas, complexos de remodelamento de cromatina dependentes de ATP e chaperonas de histonas para alterar a estrutura da cromatina dos promotores que elas controlam (**Figura 7-46**). Em termos gerais, acredita-se que essas alterações locais na estrutura da cromatina possibilitam uma maior acessibilidade ao DNA envolvido, facilitando a associação dos fatores gerais de transcrição, do Mediador e da RNA-polimerase ao promotor. Modificações locais da cromatina também permitem a ligação de proteínas de regulação gênicas adicionais na região de controle do gene.

Entretanto, a função mais importante das modificações covalentes das histonas na transcrição provavelmente não está na alteração da estrutura da cromatina; ao invés disso, como discutido no Capítulo 4, essas modificações fornecem interações favoráveis para a ligação de um grande conjunto de proteínas que leem um "código de histonas". Para o início da transcrição, essas proteínas incluem outras enzimas modificadoras de histonas (complexos leitor-escritor), complexos de remodelamento da cromatina e pelo menos um dos fatores gerais de transcrição (**Figura 7-47**).

As alterações na estrutura da cromatina que ocorrem durante o início da transcrição podem persistir por tempos de duração variados. Em alguns casos, assim que a proteína de regulação gênica dissocia-se do DNA, as modificações na cromatina são revertidas rapidamente, restaurando o gene para o seu estado de pré-ativação. Essa reversão rápida é especialmente importante para os genes que a célula precisa rapidamente ativar e desativar

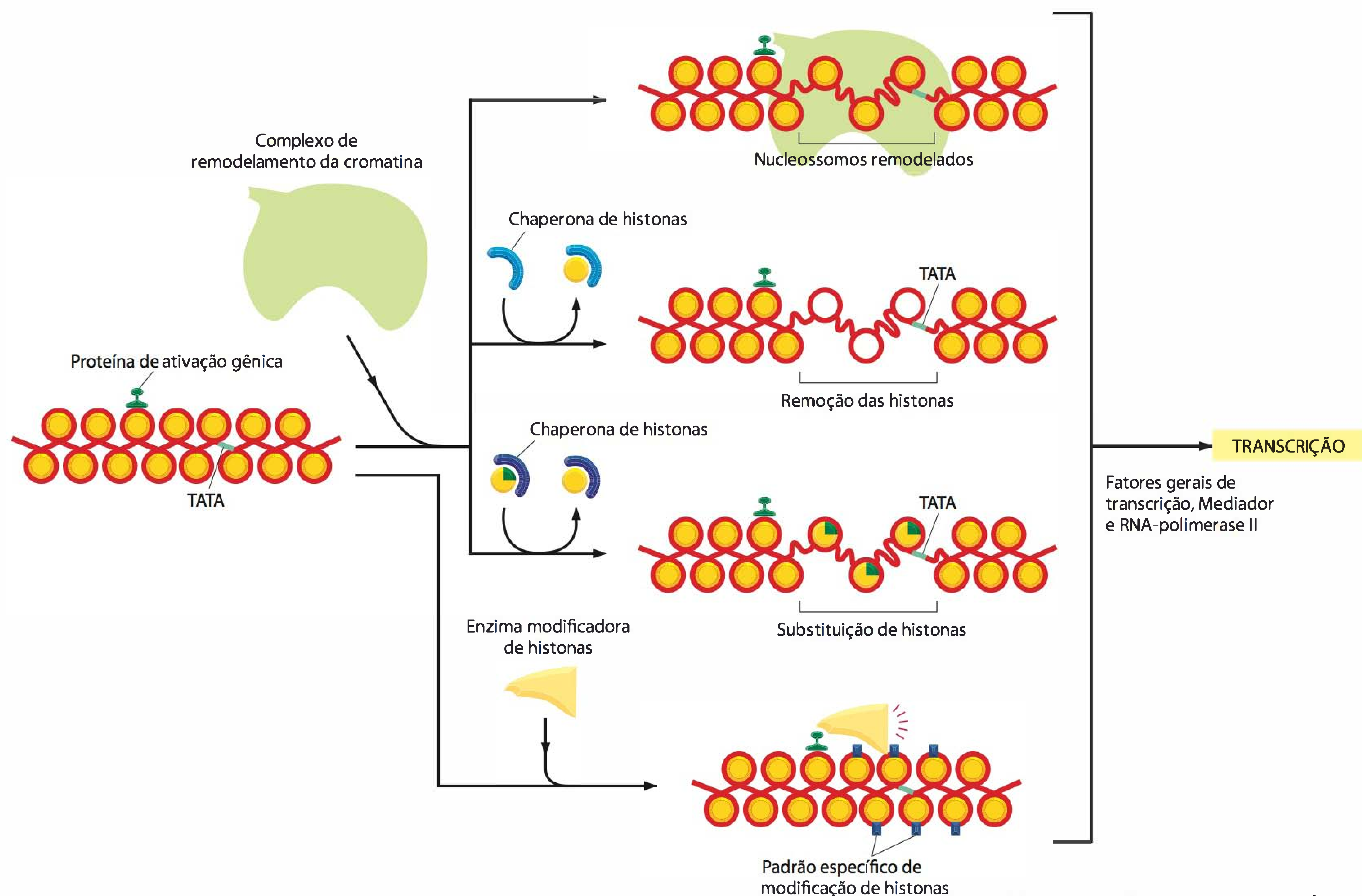


Figura 7-46 Quatro maneiras pelas quais proteínas de ativação eucarióticas podem direcionar alterações locais na estrutura da cromatina para estimular o início da transcrição. Embora mostrados como vias separadas, esses mecanismos frequentemente atuam juntos durante a ativação de um gene. Por exemplo, a acetilação prévia das histonas torna mais fácil para as chaperonas de histonas removê-las dos nucleossomos. Alguns padrões de modificações de histonas que promovem o início da transcrição estão listados na Figura 4-44, e um exemplo específico é dado na Figura 4-47. O remodelamento dos nucleossomos e a remoção das histonas favorecem o início da transcrição pelo aumento da acessibilidade ao DNA, que, dessa forma, facilita a ligação do Mediador, da RNA-polimerase e dos fatores gerais de transcrição, assim como de proteínas de ativação adicionais. O início da transcrição e a formação de uma estrutura compacta de cromatina podem ser considerados como reações de associação bioquímica competindo, e as enzimas que aumentam – mesmo que transitoriamente – a acessibilidade do DNA na cromatina tenderão a favorecer o início da transcrição.

em resposta a sinais externos, como o hormônio glicocorticoide discutido anteriormente neste capítulo. Entretanto, em outros casos, a estrutura alterada da cromatina parece persistir mesmo após a proteína de regulação gênica que direcionou o seu estabelecimento ter se dissociado do DNA. Em princípio, essa memória pode estender-se para a próxima geração celular porque, como discutido no Capítulo 4, a estrutura da cromatina pode se autorrenovar (ver Figura 4-52). É interessante considerar a possibilidade de que diferentes modificações nas histonas persistam por tempos diferentes a fim de fornecer à célula um mecanismo para memórias de longa, média e curta durações para os padrão de expressão gênica.

Um tipo especial de modificação da cromatina ocorre enquanto a RNA-polimerase II transcreve ao longo de um gene. Na maioria dos casos, os nucleossomos imediatamente à frente da polimerase são acetilados por complexos escritores carregados pela polimerase, removidos pelas chaperonas de histonas e depositados atrás da polimerase em movimento. Eles então rapidamente desacetilados e metilados, também por complexos leitores-escritores carregados pela polimerase, deixando atrás nucleossomos especialmente resistentes à transcrição. Embora esse processo surpreendente possa parecer contra-intuitivo, ele provavelmente evoluiu para evitar um reinício de transcrição espúrio atrás de uma polimerase em movimento, o que é, essencialmente, um apagar de rastros ao longo da cromatina. Mais adiante neste capítulo, quando discutirmos *RNA de interferência*, os perigos potenciais para a célula de tal transcrição inapropriada se tornarão especialmente óbvios.

Acabamos de ver que as proteínas de ativação gênica podem influenciar profundamente a estrutura da cromatina. Entretanto, mesmo antes dessas proteínas ativadoras entrarem em ação, muitos genes são "preparados" para tornarem-se rapidamente ativados. Por exemplo, as regiões reguladoras de muitos genes são "marcadas" por uma região curta sem nucleossomos flanqueada por nucleossomos que contêm a variante de histonas H2AZ. Esse arranjo, o qual é especificado pela sequência de DNA, permite o livre acesso das proteínas de regulação gênica à região sem nucleossomos; além disso, acredita-se que os nucleossomos contendo H2AZ sejam rapidamente desacoplados, facilitando dessa forma ainda mais o início da transcrição.

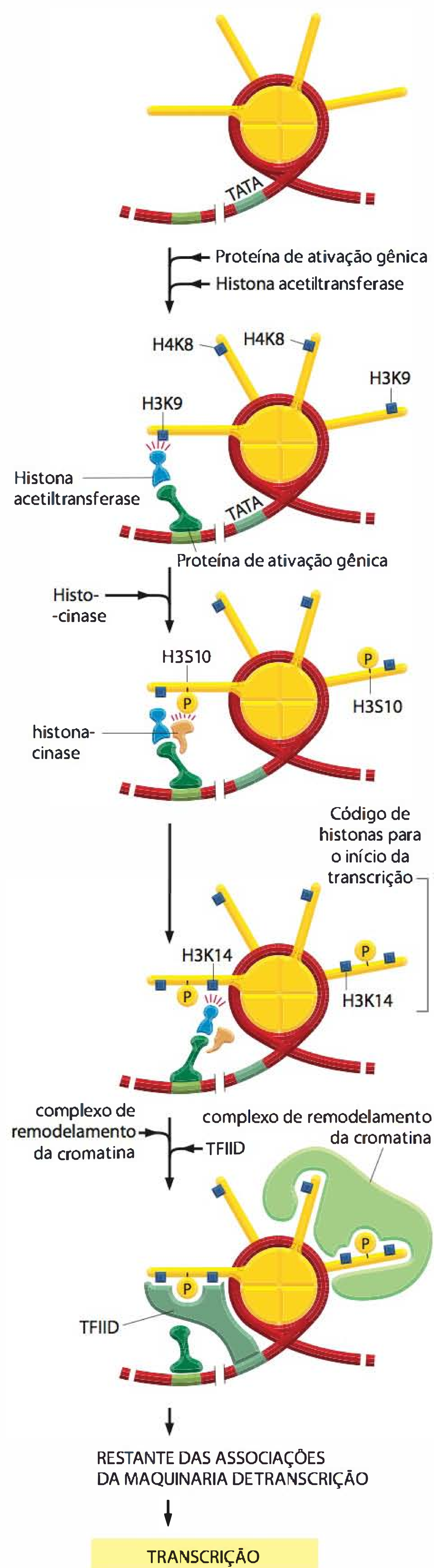


Figura 7-47 Escrevendo e lendo o código de histonas durante o início da transcrição. Neste exemplo, retirado do promotor do gene do interferon humano, uma proteína de ativação gênica liga-se ao DNA empacotado na cromatina e primeiramente atrai uma histona acetiltransferase para acetilar a lisina 9 da histona H3 e a lisina 8 da histona H4. A seguir, a histona-cinase, atraída por uma proteína de ativação gênica, fosforila a serina 10 da histona H3, mas apenas pode fazer isso depois que a lisina 9 tenha sido acetilada. Nesse momento, o código de histonas para o início da transcrição, colocado em ação pela ligação da proteína de ativação gênica, foi escrito. Note que a escrita é sequencial, com cada modificação de histona dependendo de uma modificação prévia.

A leitura final do código ocorre quando o fator geral de transcrição TFIID e o complexo de remodelamento da cromatina SWI/SNF ligam-se, ambos promovendo fortemente as etapas subsequentes de início da transcrição. TFIID e promovendo SWI/SNF reconhecem caudas de histonas acetiladas por um *bromodomínio*, um domínio proteico especializado em ler particularmente essa marca nas histonas; um bromodomínio é carregado em uma subunidade de cada complexo proteico. (Adaptada de T. Agalioti, G. Chen e D. Thanos, *Cell* 111:381-392, 2002. Com permissão de Elsevier.)

As proteínas de ativação gênica atuam sinergicamente

Vimos que as proteínas eucarióticas de ativação gênica podem influenciar vários passos diferentes no início da transcrição. Em geral, onde diversos fatores atuam juntos na estimulação de uma taxa de reação, o efeito conjunto não é somente a soma das estimulações causadas por cada fator isolado, mas o seu produto. Se, por exemplo, o fator A diminui em determinado grau a barreira de energia livre para uma reação e, dessa maneira, acelera a reação cem vezes, e o fator B, que atua em outro aspecto da reação, faz algo semelhante, então A e B atuando em paralelo irão diminuir a barreira em um grau duplicado, acelerando a reação 10 mil vezes. Mesmo que A e B simplesmente auxiliem na atração da mesma proteína, a afinidade daquela proteína para o sítio de reação aumenta de forma multiplicada. Portanto, as proteínas de ativação gênica, frequentemente, exibem o que é denominado de *sinergia transcricional*, em que a taxa de transcrição produzida por várias proteínas ativadoras atuando juntas é muito maior do que a produzida por qualquer dos ativadores atuando sozinho (**Figura 7-48**). Não é difícil verificar como múltiplas proteínas de regulação gênica, cada uma ligando-se a diferentes sequências reguladoras de DNA, agem em conjunto no controle da taxa final de transcrição de um gene eucariótico.

Uma vez que as proteínas de ativação gênicas podem influenciar muitos passos diferentes na via para a ativação transcricional, é importante considerar se esses passos sempre ocorrem em uma ordem determinada. Por exemplo, o remodelamento da cromatina necessariamente precede a acetilação das histonas, como no exemplo da Figura 7-47? O Mediador entra antes ou após a RNA-polimerase? As respostas para essas questões parecem ser diferentes para diferentes genes – inclusive para o mesmo gene sob a influência de proteínas de

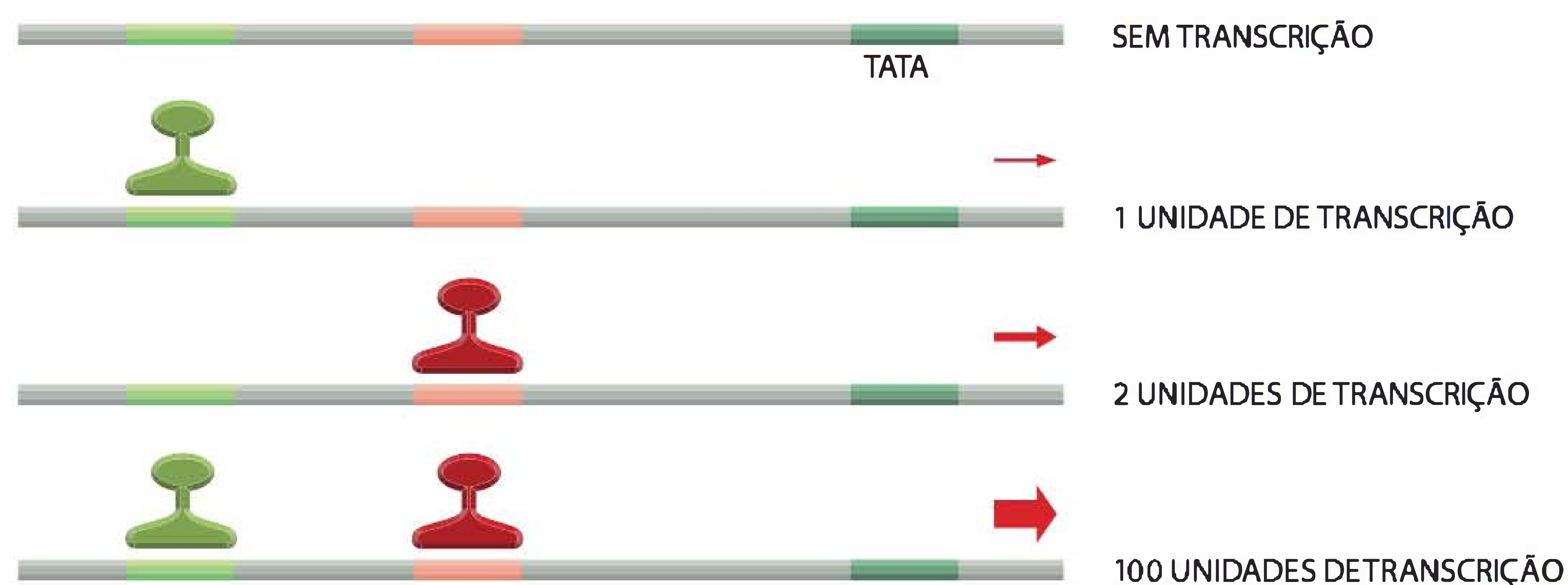


Figura 7-48 Sinergia transcricional. Este experimento compara a taxa de transcrição produzida por três regiões reguladoras construídas experimentalmente em uma célula eucariótica e revela a sinergia transcricional, um efeito maior que o somatório dos múltiplos ativadores. A sinergia transcricional normalmente é observada entre diferentes proteínas de ativação gênica do mesmo organismo e mesmo entre proteínas ativadoras de espécies eucarióticas diferentes quando introduzidas experimentalmente dentro da mesma célula. Essa última observação reflete o alto grau de conservação da elaborada maquinaria responsável pelo início da transcrição eucariótica.

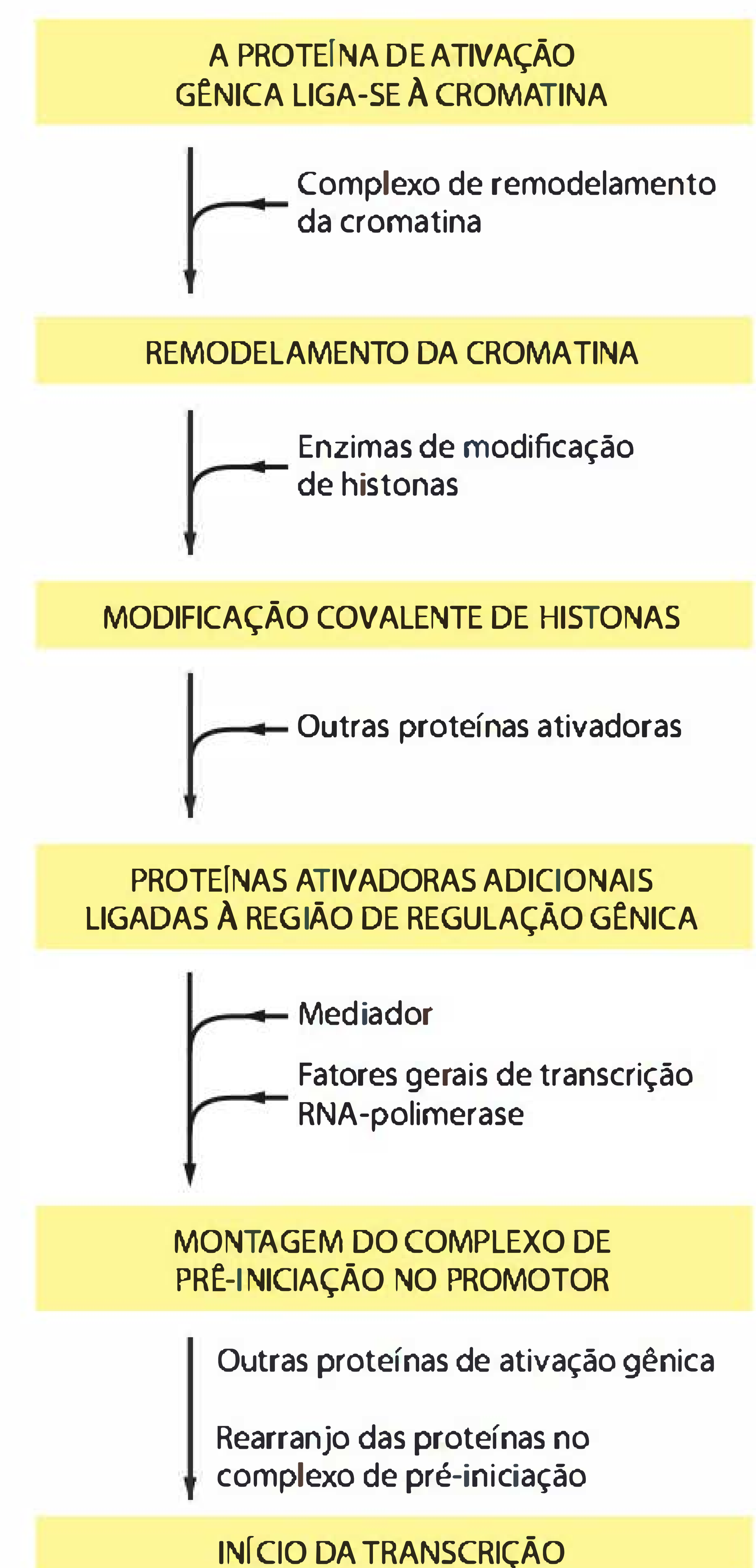


Figura 7-49 Ordenação dos eventos que levam ao início da transcrição de um gene específico. Neste exemplo bem estudado da levedura que se reproduz por brotamento *S. cerevisiae*, as etapas em direção ao início da transcrição ocorrem em uma ordem particular; entretanto, essa ordem difere de um gene para o outro. Por exemplo, em outro gene, as modificações nas histonas ocorrem primeiro, seguidas pelo recrutamento da RNA-polimerase, seguido pelo recrutamento do complexo de remodelamento da cromatina. A Figura 7-47 ilustra ainda uma outra forma possível de eventos.

regulação gênicas diferentes (**Figura 7-49**). Independentemente dos mecanismos precisos e da ordem na qual eles são realizados, uma proteína de regulação gênica precisa estar ligada ao DNA direta ou indiretamente para influenciar a transcrição do seu gene-alvo, e a taxa de transcrição de um gene, em última análise, depende do espectro das proteínas reguladoras ligadas *upstream* ou *downstream* do sítio de início da transcrição.

As proteínas eucarióticas de repressão gênica podem inibir a transcrição de várias maneiras

Assim como as bactérias, os eucariotos utilizam **proteínas de repressão gênica**, além das proteínas ativadoras, para regular a transcrição de seus genes. Entretanto, em virtude das diferenças na maneira pela qual a transcrição é iniciada em eucariotos e bactérias, os repressores eucarióticos possuem muito mais mecanismos de ação possíveis. Vimos no Capítulo 4 que grandes regiões do genoma podem ser silenciadas pelo empacotamento do DNA em heterocromatina. Entretanto, os genes eucarióticos raramente estão organizados ao longo do genoma de acordo com a sua função; assim, essa estratégia normalmente não é útil para a maioria dos exemplos de regulação gênica. Ao invés disso, a maior parte dos repressores eucarióticos precisa agir gene a gene. Ao contrário dos repressores bacterianos, a maioria não compete diretamente com a RNA-polimerase pelo acesso ao DNA; eles atuam por vários outros mecanismos, alguns dos quais estão ilustrados na **Figura 7-50**. Assim como as proteínas de ativação gênica, muitas proteínas eucarióticas repressoras atuam por mais de um mecanismo em um determinado gene-alvo, garantindo, dessa forma, uma repressão eficiente.

A repressão gênica é especialmente importante para animais e plantas cujo crescimento depende de programas de desenvolvimento elaborados e complexos. A expressão alterada de um único gene em uma etapa crítica pode resultar em consequências desastrosas para o indivíduo. Por essa razão, muitos dos genes codificando as proteínas de regulação do desenvolvimento mais importantes são mantidos fortemente reprimidos quando não são necessários.

As proteínas eucarióticas de regulação gênica frequentemente ligam-se ao DNA de forma cooperativa

Até agora observamos que, quando proteínas eucarióticas ativadoras e repressoras ligam-se a sequências de DNA específicas, elas movimentam uma série complexa de eventos que culminam no início da transcrição ou o seu oposto, a repressão. Entretanto, essas proteínas raramente reconhecem o DNA como polipeptídeos individuais. Na realidade, a ligação eficiente ao DNA em uma célula eucariótica normalmente necessita de várias proteínas de sequências DNA-específicas atuando conjuntamente. Por exemplo, duas proteínas de regulação gênica com uma afinidade fraca uma pela outra poderiam cooperar na ligação a uma sequência de DNA, nenhuma das proteínas possuindo afinidade suficiente pelo DNA para ligar-se ao sítio de DNA por si própria. Em um caso bem estudado, o dímero de proteína ligado ao DNA cria uma superfície distinta reconhecida por uma terceira proteína, que carrega um domínio ativador que estimula a transcrição. Esse exemplo ilustra um ponto geral importante: as interações proteína-proteína que são muito fracas para promover a associação das proteínas em solução podem levar as proteínas a associarem-se ao DNA, com a sequência de DNA atuando como um sítio de "cristalização", ou como uma semente para a montagem de um complexo proteico.

Como mostrado na **Figura 7-51**, uma proteína de regulação gênica individual pode, frequentemente, participar de mais de um tipo de complexo regulador. Uma proteína poderia funcionar, por exemplo, em uma situação como parte de um complexo que ativa a transcrição e, em outra situação, como parte de um complexo que reprime a transcrição. Assim,

proteínas eucarióticas de regulação gênica individuais não são necessariamente ativadoras ou repressoras exclusivas; ao contrário, elas funcionam como unidades reguladoras usadas para gerar complexos cuja função depende da montagem final de todos os componentes individuais. Essa montagem final, por sua vez, depende tanto do arranjo das sequências de DNA da região controladora como de quais proteínas de regulação gênica estão presentes na sua forma ativa na célula. Cada gene eucariótico é, dessa forma, regulado por um "comitê" de proteínas, as quais precisam estar presentes para expressarem o gene em seu nível apropriado.

Em alguns casos, a sequência de DNA específica na qual a proteína reguladora liga-se diretamente pode afetar a conformação dessa proteína e assim influenciar a atividade transcricional subsequente. Quando ligado a um tipo de sequência de DNA, por exemplo, um receptor de hormônio esteroide interage com um correpressor e acaba desligando a transcrição. Quando ligado a uma sequência de DNA um pouco diferente, ele assume uma conformação diferente e interage com um coativador, estimulando a transcrição.

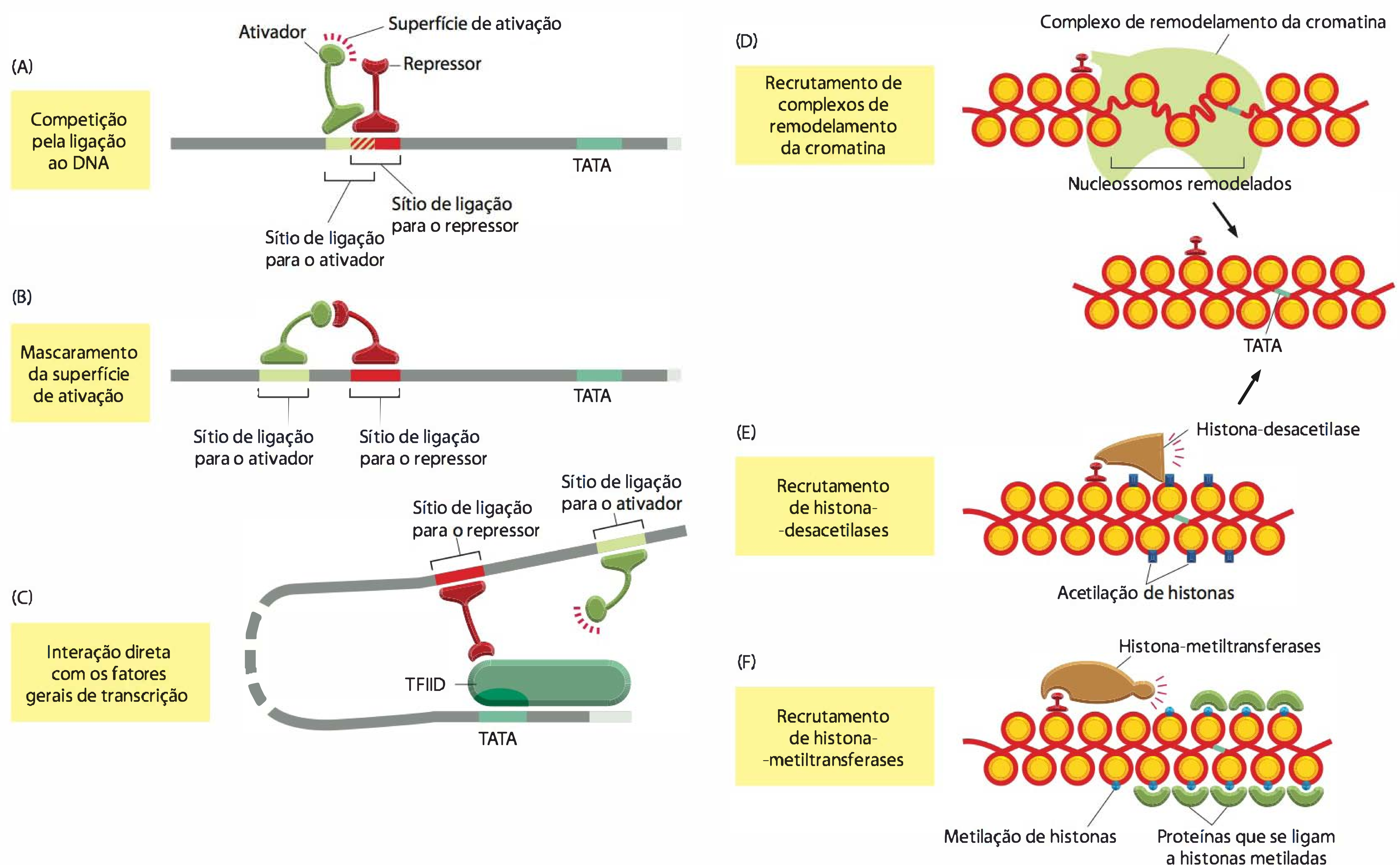


Figura 7-50 Seis maneiras nas quais proteínas eucarióticas de repressão gênica podem operar. (A) As proteínas de ativação gênica e as proteínas de repressão gênica competem pela ligação às mesmas sequências reguladoras de DNA. (B) Ambas as proteínas podem ligar-se ao DNA, porém o repressor liga-se ao domínio ativador da proteína ativadora, dessa forma impedindo-a de realizar suas funções de ativação. Em uma variação dessa estratégia, o repressor liga-se fortemente ao ativador sem ter que estar ligado ao DNA diretamente. (C) O repressor bloqueia a montagem dos fatores gerais de transcrição. Alguns repressores também atuam em estágios mais tardios do início da transcrição, por exemplo, impedindo a liberação da RNA-polimerase dos fatores gerais de transcrição. (D) O repressor recruta um complexo de remodelamento da cromatina, o qual retorna o estado nucleossomal da região do promotor para a sua forma pré-transcricional. (E) O repressor atrai a histona desacetilase para o promotor. Como vimos, a acetilação de histonas pode estimular o início da transcrição (Figura 7-47), e o repressor simplesmente reverte essa modificação. (F) O repressor atrai a histona-metiltransferase a qual modifica certas posições nas histonas, as quais, por sua vez, são ligadas por proteínas que mantêm a cromatina em uma forma transcricionalmente silenciosa. Por exemplo, em *Drosophila*, a histona-metiltransferase Suv39 metila a posição K9 da histona H3, uma modificação que é ligada pela proteína HP1. Em outro exemplo, E(z) metila a posição K27 de H3, e esta modificação é ligada pela proteína Polycomb. HP1 e Polycomb reconhecem lisinas metiladas por um *cromodomínio*. Elas podem atuar localmente para desativar genes específicos, como mostrado aqui, ou podem ocupar toda uma região de um cromossomo para reprimir um conjunto de genes. Um sétimo mecanismo de controle negativo – a inativação de um ativador transcricional por heterodimerização – foi ilustrado na Figura 7-24. Para simplificar, os nucleossomos foram omitidos de (A)–(C), e as escalas de (D)–(F) foram reduzidas com relação a (A)–(C).

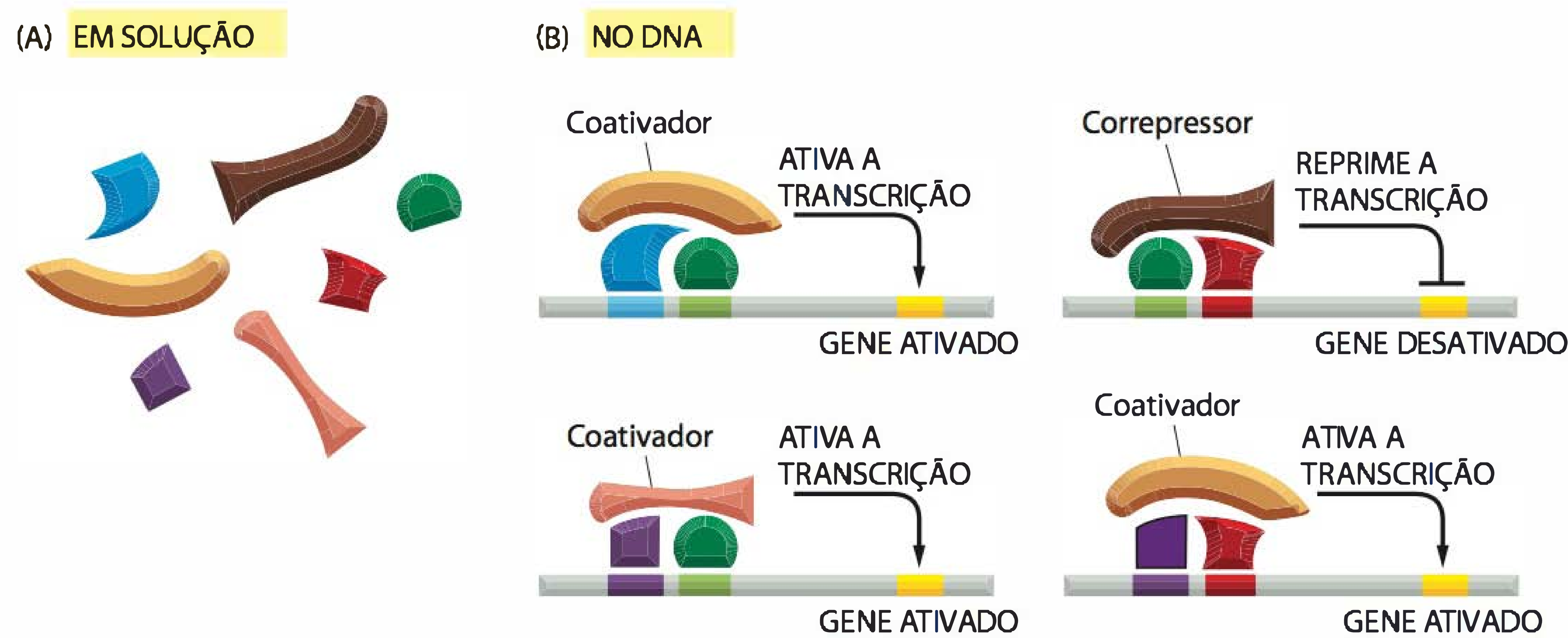


Figura 7-51 Proteínas de regulação gênica eucarióticas frequentemente associam-se em complexos no DNA. Sete proteínas de regulação gênica estão mostradas em (A). A natureza e a função do complexo que elas formam dependem da sequência específica de DNA que inicia a sua associação. Em (B), alguns complexos ativam a transcrição gênica, enquanto outros reprimem a transcrição. Note que as proteínas *verde* e *vermelha* são compartilhadas por ambos os complexos ativadores e repressores. Proteínas que não se ligam por si próprias ao DNA, mas associam-se a outras proteínas de regulação gênica ligadas ao DNA, frequentemente são denominadas coativadores ou correpressores. Entretanto, esses termos são de certa forma confusos, pois incluem uma enorme variedade de proteínas, como leitores e escritores de histonas, complexos de remodelamento de cromatina e muitas outras classes de proteínas. Algumas não possuem nenhuma atividade intrínseca por si próprias, mas servem somente como "suporte" para atrair aquelas que possuem.

Normalmente, a associação de um grupo de proteínas reguladoras no DNA é guiada por algumas porções relativamente curtas de sequências de nucleotídeos (ver Figura 7-51). Entretanto, em alguns casos extremos de regulação por comitês, uma estrutura mais elaborada DNA-proteína é formada (**Figura 7-52**). Considerando-se que a montagem final necessita da presença de muitas proteínas de regulação gênica que ligam-se ao DNA, ela fornece uma maneira simples de garantir que um gene seja expresso somente quando a combinação correta dessas proteínas está presente na célula. Vimos anteriormente como a formação de heterodímeros de regulação gênica em solução fornece um mecanismo para o controle combinatório da expressão gênica. A montagem de complexos maiores de proteínas de regulação gênica no DNA fornece um segundo mecanismo importante para o controle combinatório, oferecendo oportunidades muito mais ricas.

Os comutadores genéticos complexos que regulam o desenvolvimento em *Drosophila* são formados por módulos menores

Considerando-se que as proteínas de regulação gênica podem ser posicionadas ao longo de longas porções de DNA, que essas proteínas podem se associar em complexos em cada sítio, e que os complexos podem influenciar a estrutura da cromatina e o recrutamento e a montagem da maquinaria geral de transcrição no promotor, pareceria quase não haver limite de possibilidades para a elaboração de mecanismos de controle para regular a transcrição genética eucariótica.

Um exemplo particularmente surpreendente de um controle genético complexo e multicomponente é o que controla a transcrição do gene *Even-skipped* (*Eve*) da *Drosophila*, cuja expressão desempenha uma função importante no desenvolvimento do embrião de *Drosophila*. Se esse gene é inativado por mutação, muitas partes do embrião não se formam, e ele morre em uma etapa precoce de seu desenvolvimento. Como discutido no Capítulo 22, no estágio do desenvolvimento no qual *Eve* começa a ser expresso, o embrião é uma única célula gigante contendo múltiplos núcleos em um citoplasma comum. Entretanto, esse citoplasma não é uniforme: ele contém uma mistura de proteínas de regulação gênica que estão distribuídas desigualmente ao longo do comprimento do embrião, fornecendo uma informação de posição que distingue uma parte do embrião da outra (**Figura 7-53**). (O modo como essas diferenças são inicialmente estabelecidas é discutido no Capítulo 22.) Embora os núcleos sejam inicialmente idênticos, eles rapidamente iniciam a expressão de genes diferentes, pois são expostos a diferentes proteínas de regulação gênica. Os núcleos próximos da extremidade anterior do embrião em desenvolvimento, por exemplo, estão expostos a um conjunto de proteínas de regulação gênica distinto do conjunto que influencia os núcleos da extremidade posterior do embrião.

As sequências reguladoras de DNA do gene *Eve* são projetadas para perceber as concentrações das proteínas de regulação gênica em cada posição ao longo do comprimento do embrião e interceptar essa informação de tal maneira que o gene *Eve* seja expresso em sete faixas, cada uma inicialmente com 5 a 6 núcleos de comprimento e precisamente posicionadas ao longo do eixo ântero-posterior do embrião (**Figura 7-54**). Como esse feito notável de processamento de informação é realizado? Embora os detalhes ainda não sejam entendidos, vários princípios gerais emergiram de estudos com *Eve* e com outros genes de *Drosophila* que são regulados de maneira semelhante.

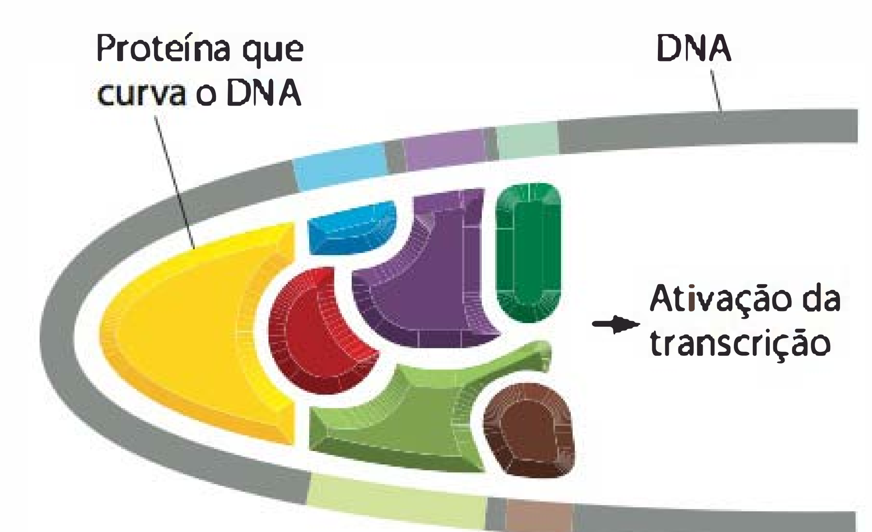


Figura 7-52 Representação esquemática de um conjunto de proteínas reguladoras gênicas ligadas a um estimulador. A proteína representada em *amarelo* é denominada proteína arquitetural uma vez que sua principal função é curvar o DNA para permitir a associação cooperativa de outros componentes. A estrutura descrita aqui tem como base o que é encontrado na região de controle do gene que codifica para uma subunidade do receptor de célula T (discutido no Capítulo 25) e ativa a transcrição em um promotor próximo. Somente certas células do sistema imune em desenvolvimento, o qual ao final origina células T maduras, possui o conjunto completo de proteínas necessárias para formar essa estrutura.

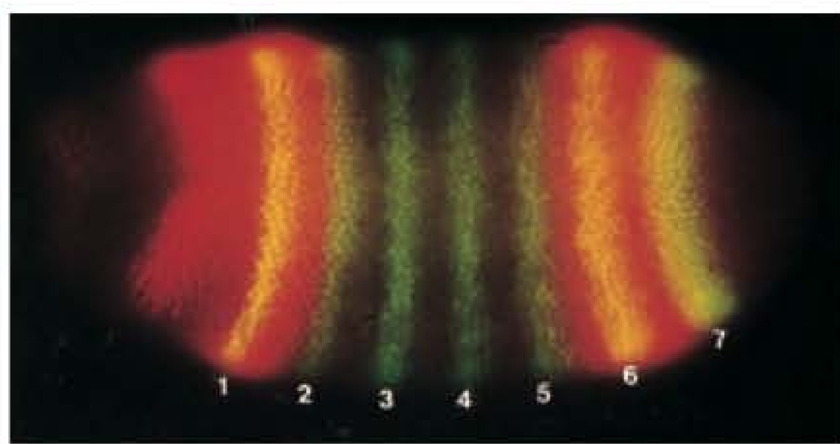


Figura 7-54 As sete faixas da proteína codificada pelo gene *Even-skipped* (*Eve*) em um embrião de *Drosophila* em desenvolvimento. Duas horas e meia após a fertilização, o óvulo foi fixado e corado com anticorpos que reconhecem a proteína Eve (*verde*) e anticorpos que reconhecem a proteína Giant (*vermelha*). Onde ambas as proteínas Eve e Giant estão presentes, a coloração aparece *amarela*. Nesta etapa do desenvolvimento, o óvulo contém aproximadamente 4.000 núcleos. As proteínas Eve e Giant estão ambas localizadas no núcleo, e as faixas de Eve apresentam cerca de quatro núcleos de largura. O padrão de coloração da proteína Giant também é mostrado na Figura 7-52/7-53. (Cortesia de Michael Levine.)

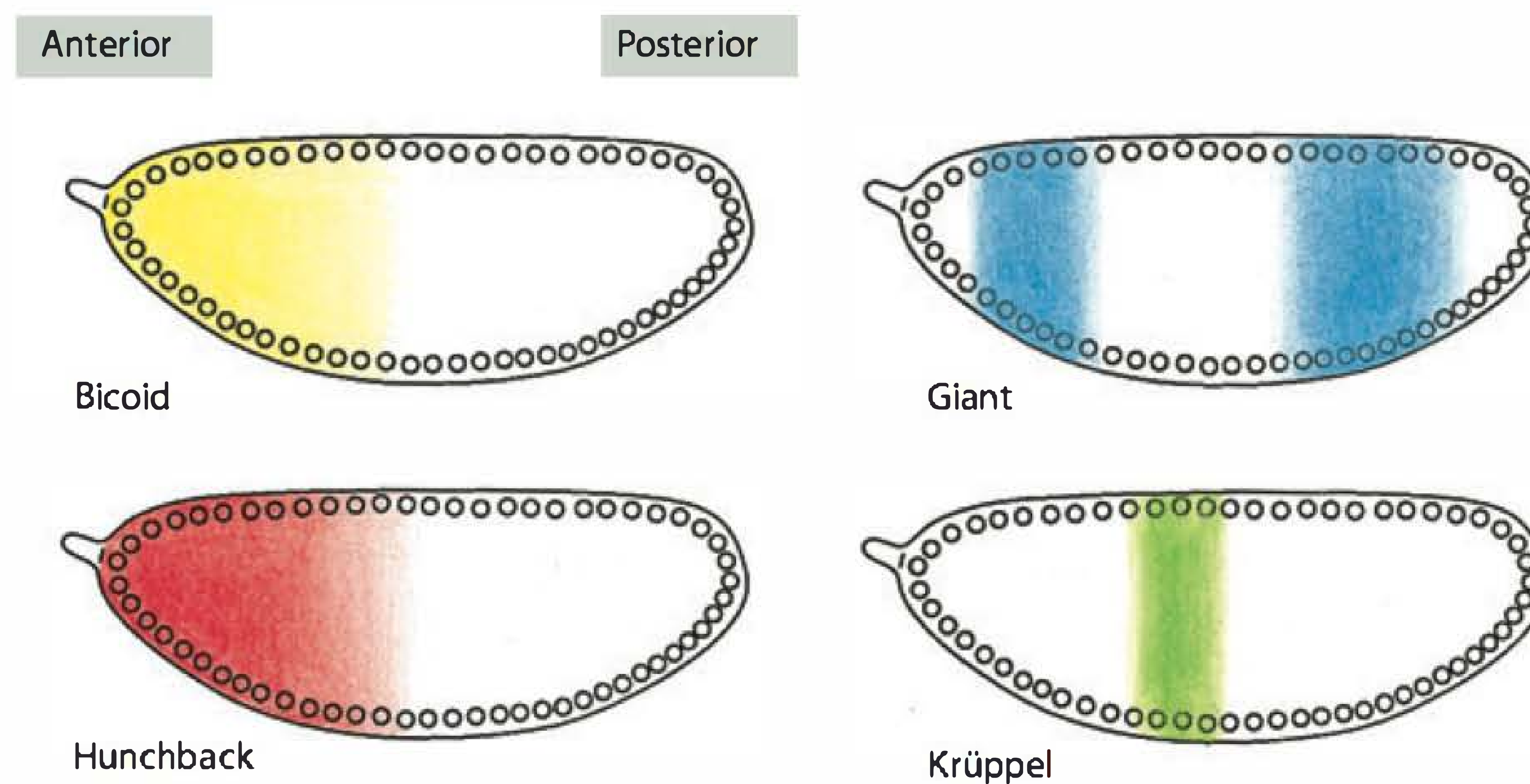


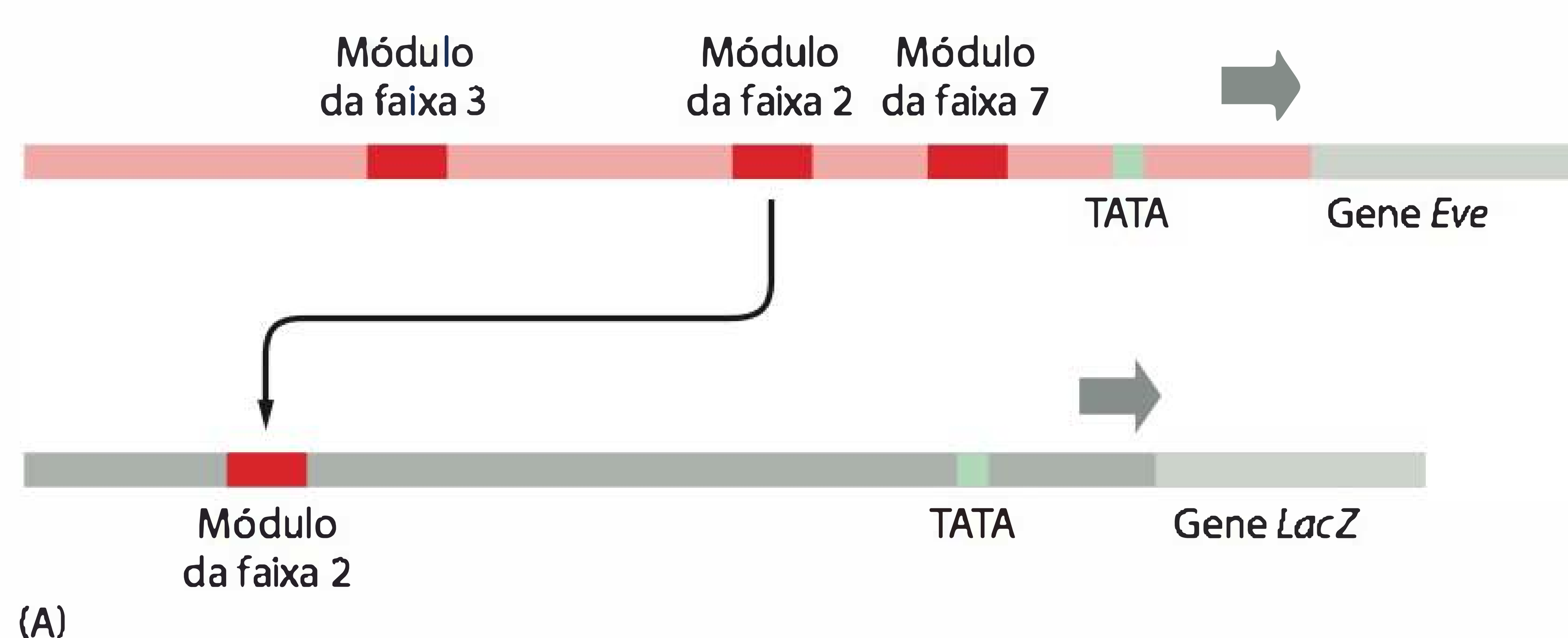
Figura 7-53 Distribuição não uniforme de quatro proteínas de regulação gênica em um embrião jovem de *Drosophila*. Neste estágio, o embrião é um sincício, com múltiplos núcleos em um citoplasma comum. Embora o detalhe não esteja ilustrado nestas representações, todas estas proteínas estão concentradas no núcleo.

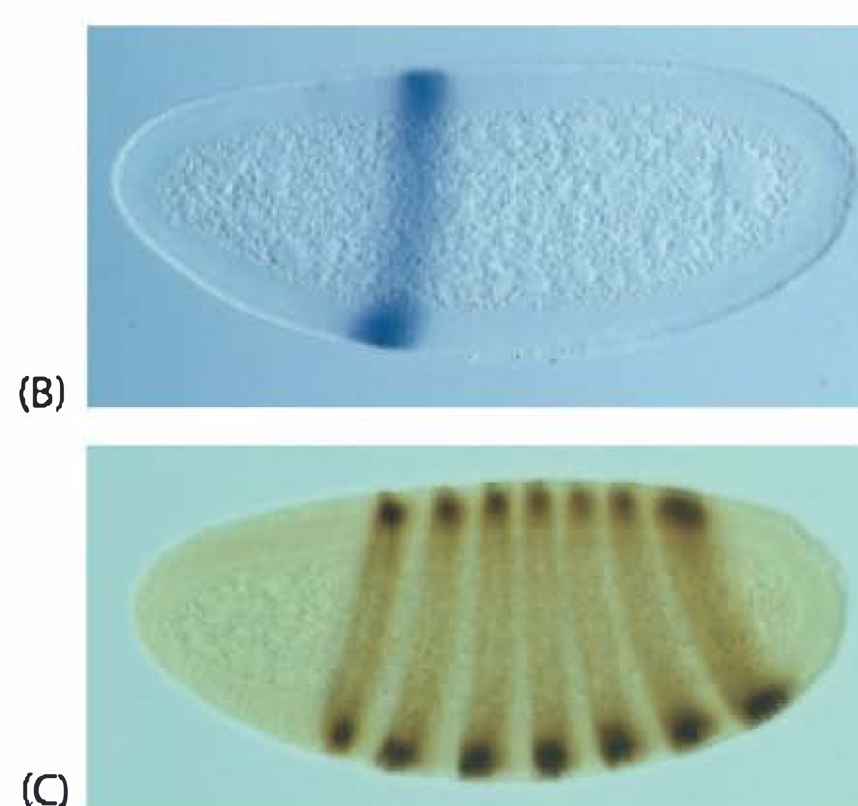
A região reguladora do gene *Eve* é muito grande (aproximadamente 20 mil pares de nucleotídeos). Ela é formada por uma série de módulos reguladores relativamente simples, cada qual contendo múltiplas sequências reguladoras e sendo responsável por especificar uma faixa particular da expressão de *Eve* ao longo do embrião. Essa organização modular da região controladora do gene *Eve* é mostrada por experimentos nos quais um módulo regulador particular (digamos, o que especifica a faixa 2) é removido do seu conjunto normal na região acima do gene *Eve*, colocado à frente de um gene repórter (ver Figura 7-45), e reintroduzido no genoma da *Drosophila*. Quando são examinados os embriões em desenvolvimento derivados de moscas que carregam essa construção genética, o gene repórter é encontrado sendo expresso precisamente na posição da faixa 2 (**Figura 7-55**). Os experimentos semelhantes revelam a existência de outros módulos reguladores, cada qual especificando uma das outras seis faixas, ou alguma parte do padrão de expressão que o gene apresenta em estágios mais tardios do desenvolvimento (ver Figura 22-39).

O gene *Eve* de *Drosophila* é regulado por controles combinatórios

Um estudo detalhado do módulo regulador da faixa 2 forneceu informações sobre como ele lê e interpreta a informação de posição. Ele contém sequências de reconhecimento para duas proteínas de regulação gênica (Bicoid e Hunchback) que ativam a transcrição de *Eve* e duas (Kruppel e Giant) que a reprimem (**Figura 7-56**). (As proteínas de regulação gênica de *Drosophila* frequentemente têm nomes sugestivos, refletindo o fenótipo que resulta se o gene codificante para a proteína é inativado por mutação.) As concentrações relativas dessas quatro proteínas determinam se os complexos proteicos que são formados no módulo da faixa 2 ativam a transcrição do gene *Eve*. A **Figura 7-57** mostra as distribuições das quatro proteínas de regulação gênica ao longo da região do embrião de *Drosophila* onde se forma a faixa 2. Acredita-se que ambas as proteínas repressoras, quando ligadas ao DNA, desliguem o módulo da faixa 2, enquanto que ambas as proteínas, Bicoid e Hunchback, devem se ligar

Figura 7-55 Experimento demonstrando a construção modular da região reguladora do gene *Eve*. (A) Um pedaço de 480 pares de nucleotídeos da região reguladora de *Eve* foi removido e inserido *upstream* de um promotor-teste que direciona a síntese da enzima β-galactosidase (o produto do gene *LacZ* de *E. coli*). (B) Quando essa construção artificial foi reintroduzida no genoma dos embriões de *Drosophila*, os embriões expressaram β-galactosidase (detectável por coloração histoquímica) precisamente na posição da segunda das sete faixas de Eve (C). (B e C, cortesia de Stephen Small e Michael Levine.)





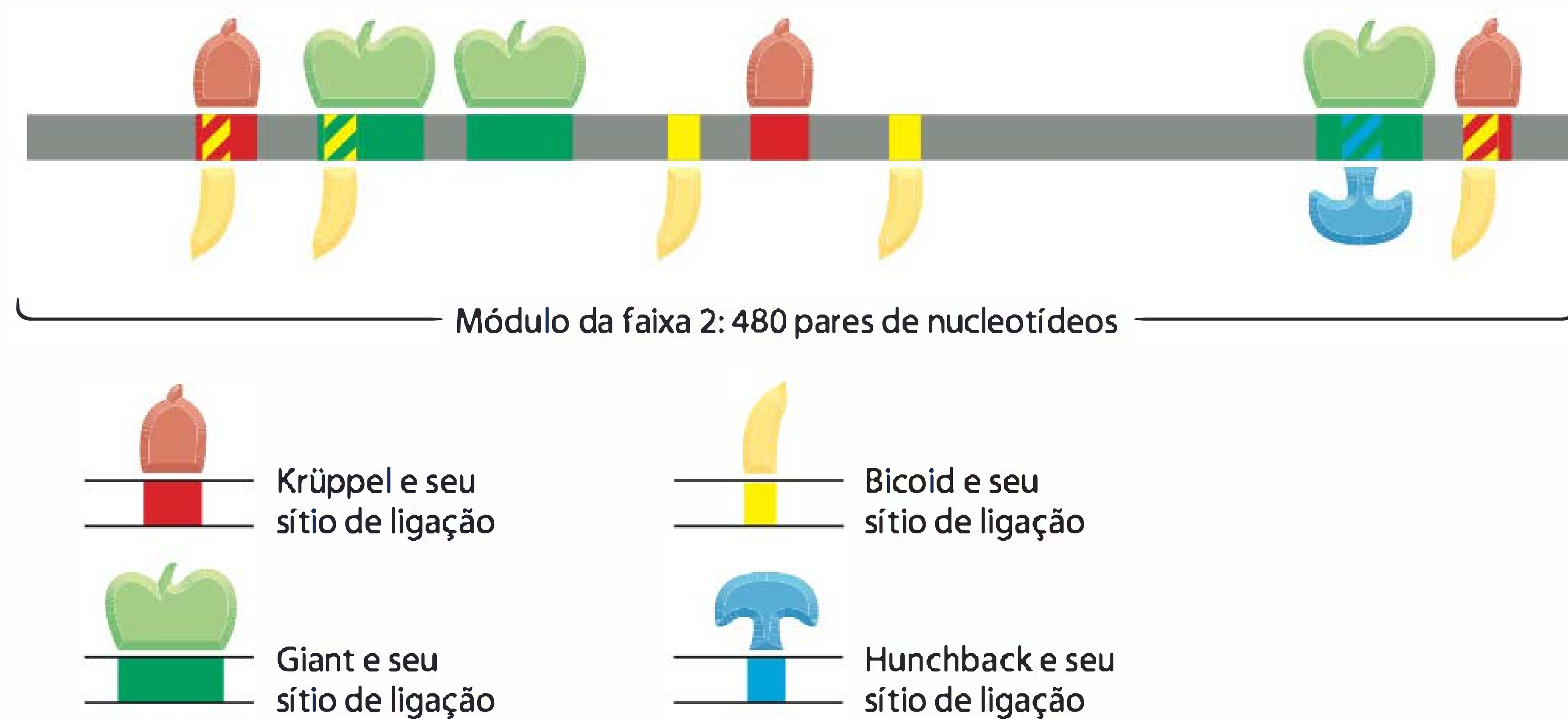


Figura 7-56 Visão aproximada da unidade da faixa 2 de *Eve*. O segmento da região de controle gênico de *Eve* identificada na figura anterior contém sequências reguladoras, cada qual se ligando a uma ou outra de quatro proteínas de regulação gênica. Sabe-se a partir de experimentos genéticos que essas quatro proteínas de regulação gênica são responsáveis pela expressão correta de *Eve* na faixa 2. Moscas que são deficientes nos dois ativadores gênicos Bicoid e Hunchback, por exemplo, falham em expressar eficientemente *Eve* na faixa 2. Em moscas deficientes em qualquer dos dois repressores gênicos, Giant e Kruppel, a faixa 2 expande-se e cobre uma região anormalmente ampla do embrião. Os sítios de ligação ao DNA para essas proteínas de regulação gênica foram determinados por clonagem dos genes codificantes das proteínas, superexpressão das proteínas em *E. coli*, purificação das mesmas e realização de experimentos de DNA *footprinting* (ver Figura 7-29). O diagrama acima indica que, em alguns casos, os sítios de ligação para as proteínas de regulação gênica superpõem-se e as proteínas podem competir pela ligação ao DNA. Por exemplo, acredita-se que a ligação de Kruppel e a ligação de Bicoid no sítio extremo direito sejam mutuamente exclusivas.

para uma máxima ativação. Essa unidade reguladora simples combina esses quatro sinais posicionais de maneira a ativar o módulo da faixa 2 (e, dessa maneira, a expressão do gene *Eve*) somente naqueles núcleos em que os níveis tanto de Bicoid quanto de Hunchback são altos, e onde Kruppel e Giant estão ausentes. Essa combinação de ativadores e repressores ocorre apenas em uma região do embrião em estágio inicial; em todas as outras regiões, portanto, o módulo da faixa 2 está silencioso.

Já foram anteriormente discutidos dois mecanismos de controle combinatório da expressão gênica – a heterodimerização de proteínas de regulação gênica em solução (ver Figura 7-20) e a associação de combinações de proteínas de regulação gênica em pequenos complexos no DNA (ver Figura 7-51). É provável que ambos os mecanismos participem da complexa regulação da expressão do gene *Eve*. Além disso, a regulação da faixa 2 recém-descrita ilustra um terceiro tipo de controle combinatório. Como as sequências reguladoras individuais no módulo da faixa 2 de *Eve* estão enfileiradas ao longo do DNA, muitos conjuntos

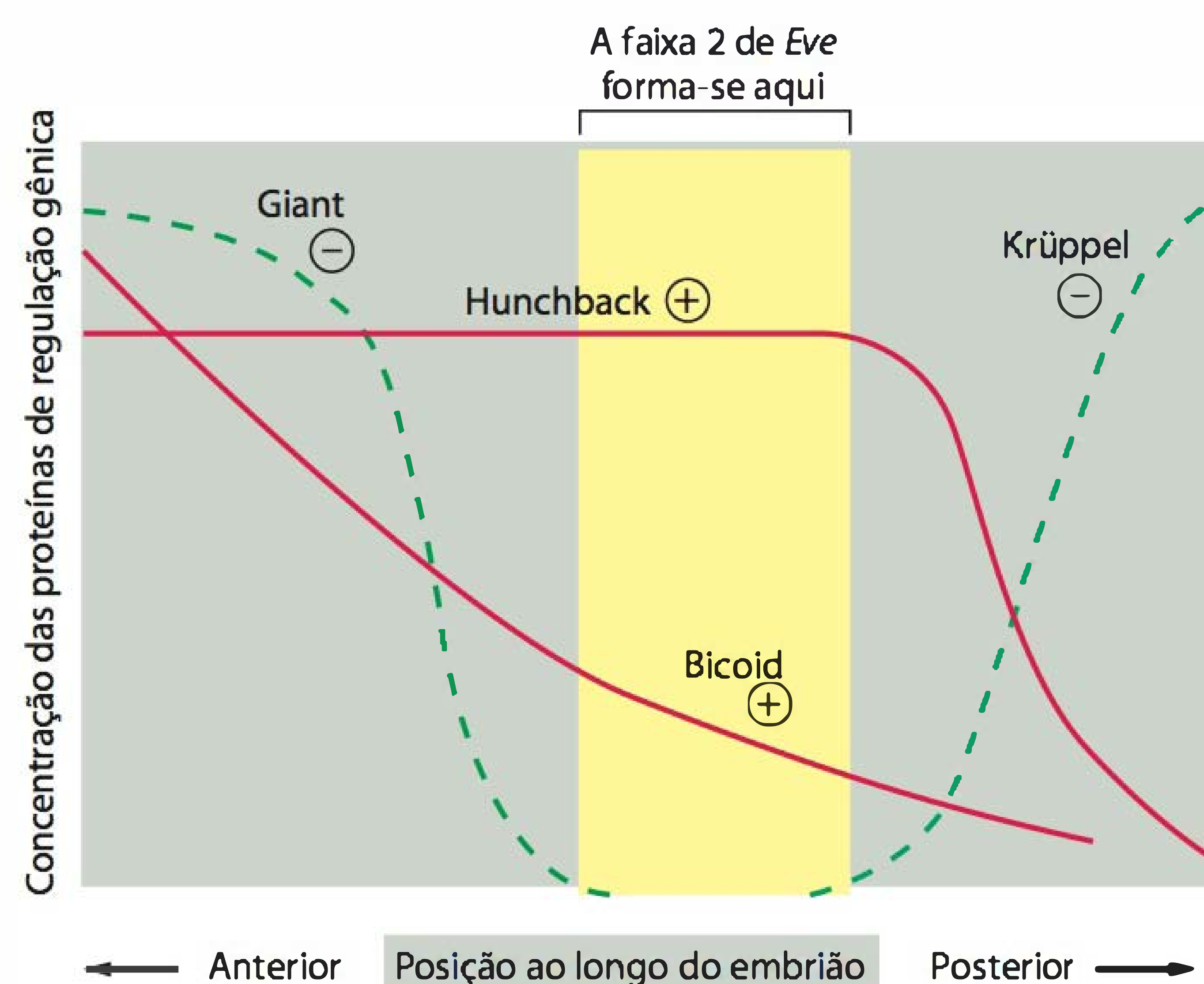


Figura 7-57 Distribuição das proteínas de regulação gênica responsáveis por garantir que *Eve* seja expresso na faixa 2. As distribuições dessas proteínas foram visualizadas pela coloração de um embrião em desenvolvimento de *Drosophila* com anticorpos direcionados contra cada umas das quatro proteínas (ver Figuras 7-53 e 7-54). A expressão de *Eve* na faixa 2 somente ocorre na posição onde os dois ativadores (Bicoid e Hunchback) estão presentes e os dois repressores (Giant e Kruppel) estão ausentes. Nos embriões de moscas que não possuem Kruppel, por exemplo, a faixa 2 expande-se na porção posterior. Da mesma forma, a faixa 2 expande-se na porção posterior se os sítios de ligação ao DNA para Kruppel no módulo da faixa 2 (ver Figura 7-56) forem inativados por mutação.

O próprio gene *Eve* codifica uma proteína de regulação gênica, a qual, após seu padrão de expressão estar distribuído nas sete faixas, regula a expressão de outros genes de *Drosophila*. Conforme o desenvolvimento continua, o embrião é subdividido em regiões cada vez mais finas que eventualmente originarão as diferentes partes do corpo de uma mosca adulta, como discutido no Capítulo 22.

Este exemplo de embriões de *Drosophila* não é comum no que se refere aos núcleos estarem expostos diretamente a informações posicionais na forma de concentrações de proteínas de regulação gênica. Nos embriões da maioria dos organismos, núcleos individuais estão em células separadas, e a informação posicional extracelular precisa ser passada através da membrana plasmática ou, mais comumente, gerar sinais no citosol de maneira a influenciar o genoma.

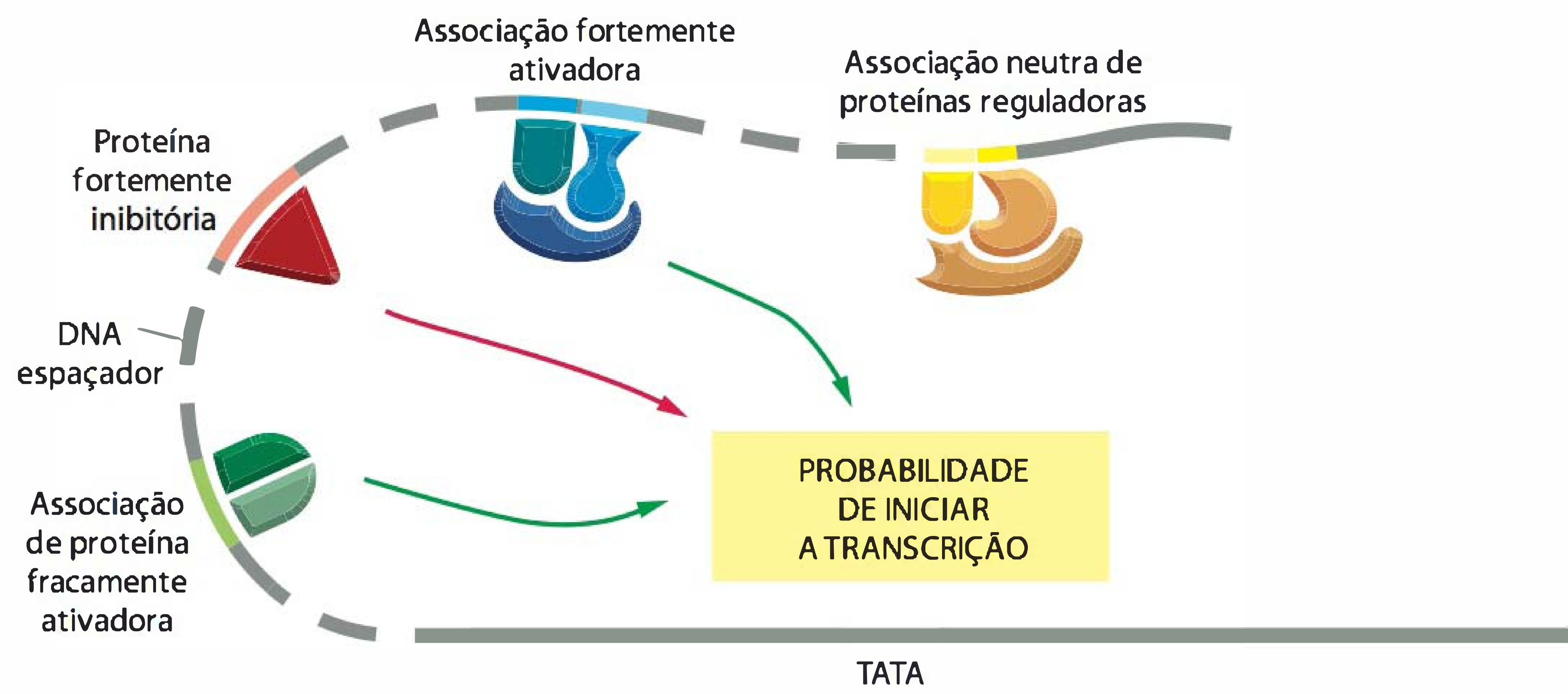


Figura 7-58 Integração de múltiplas informações em um promotor. Múltiplos conjuntos de proteínas de regulação gênica podem trabalhar juntos para influenciar o início da transcrição em um promotor, como fazem no módulo da faixa 2 de *Eve* ilustrado previamente na Figura 7-56. Ainda não se sabe em detalhes como a integração dos múltiplos componentes é conseguida, porém é provável que a atividade transcricional final do gene resulte da competição entre ativadores e repressores que atuam por mecanismos resumidos nas Figuras 7-46 e 7-50.

de proteínas de regulação gênica podem ligar-se simultaneamente em sítios separados e influenciar o promotor de um gene. O promotor integra os sinais transcricionais fornecidos por todas as proteínas ligadas (**Figura 7-58**).

A regulação da expressão de *Eve* é um exemplo impressionante de controle combinatório. Sete combinações de proteínas de regulação gênica – uma combinação para cada faixa – ativam a transcrição de *Eve*, enquanto que muitas outras combinações (todas encontradas em regiões entre as faixas do embrião) mantêm os elementos da faixa silenciosos. Acredita-se que os outros módulos reguladores da faixa sejam construídos de modo semelhante àquele descrito para a faixa 2, sendo projetados para ler informações de posição fornecidas por outras combinações de proteínas de regulação gênica. A região inteira de controle gênico estende-se ao longo de 20 mil pares de nucleotídeos de DNA e liga mais de 20 proteínas diferentes. Uma região de controle grande e complexa é então formada a partir de uma série de pequenos módulos, cada qual consistindo de arranjos únicos de pequenas sequências de DNA reconhecidas por proteínas de regulação gênica específicas.

As regiões complexas de controle gênico dos mamíferos também são construídas a partir de módulos reguladores simples

Talvez 8% da capacidade codificante do genoma dos mamíferos sejam dedicados à síntese de proteínas que servem como reguladores da transcrição de genes. Esse grande número de genes reflete a rede extremamente complexa de controles que governam a expressão dos genes de mamíferos. Cada gene é regulado por um conjunto de proteínas de regulação gênica; cada uma dessas proteínas é o produto de um gene que, por sua vez, é regulado por um conjunto inteiro de outras proteínas, e assim por diante. Além disso, as moléculas reguladoras proteicas são elas próprias influenciadas por sinais de fora da célula, que podem ativá-las ou desativá-las de vários modos (**Figura 7-59**). Portanto, o padrão de expressão gênica em uma célula pode ser visto como o resultado de uma complicada computação molecular executada pela rede de controle gênico intracelular em resposta às informações que estão ao redor da célula. Discutiremos isso em mais detalhes nos Capítulos 15 e 22, os quais tratam da sinalização e do desenvolvimento celular, mas a complexidade é extraordinária mesmo com relação a um mecanismo genético individual que regula a atividade de um único gene. Não é incomum, por exemplo, encontrar um gene de mamífero com uma região controladora com 100.000 pares de nucleotídeos de comprimento, nos quais muitos módulos, cada um contendo determinado número de sequências reguladoras que se ligam a proteínas de regulação gênica, estão intercalados por longas regiões de DNA não-codificante.

Um dos exemplos mais bem conhecidos de uma região reguladora complexa de mamíferos é encontrado no gene da β-globina humana, expressa exclusivamente nas células vermelhas do sangue. Uma série complexa de proteínas de regulação gênica controla a expressão do gene, algumas atuando como ativadoras e outras como repressoras (**Figura 7-60**). As concentrações (ou atividades) de muitas dessas proteínas de regulação gênica alteram-se durante o desenvolvimento, e somente uma combinação particular de todas as proteínas desencadeia a transcrição do gene. O gene da β-globina humana é parte do agrupamento de genes de globina (**Figura 7-61**A), os quais são todos transcritos exclusivamente nos eritrócitos, ou seja, nas células da linhagem das células vermelhas do sangue, mas em diferentes estágios de desenvolvimento dos mamíferos (ver Figura 7-61B). O gene de ε-globina é expresso no embrião inicial, γ no embrião tardio e no feto e δ e β principalmente no adulto. Os

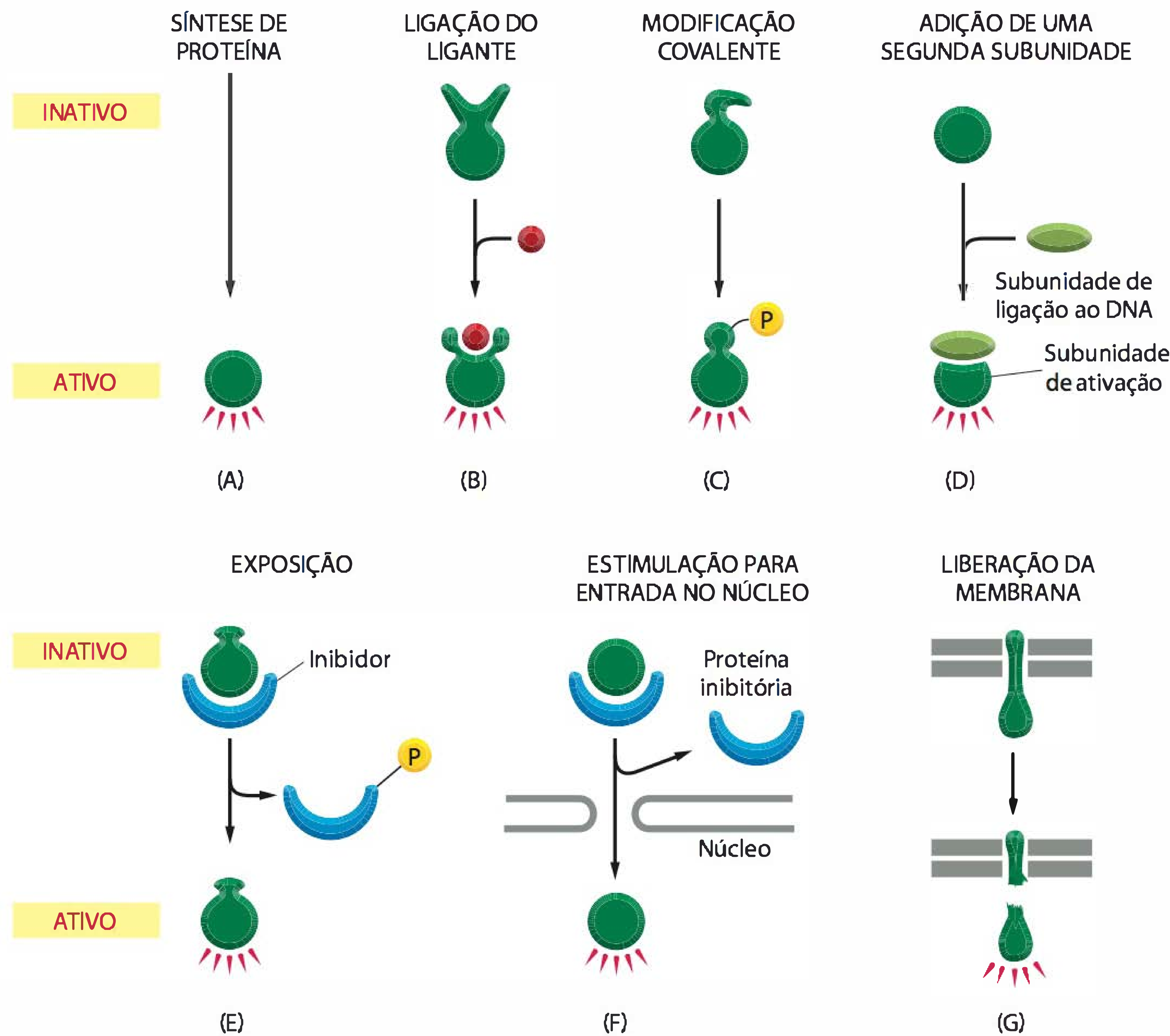


Figura 7-59 Algumas maneiras de regulação da atividade das proteínas de regulação gênica em células eucarióticas. (A) A proteína é sintetizada somente quando necessário, sendo rapidamente degradada por proteólise de maneira que ela não é acumulada. (B) Ativação pela ligação de um ligante. (C) Ativação por modificação covalente. A fosforilação é indicada aqui, mas muitas outras modificações são possíveis (ver Tabela 3-3, p. 186). (D) Formação de um complexo entre a proteína de ligação ao DNA e uma proteína separada com um domínio ativador de transcrição. (E) Exposição de um domínio de ativação pela fosforilação de uma proteína inibitória. (F) Estimulação para a entrada no núcleo através da remoção de uma proteína inibitória que de outra maneira impediria a proteína reguladora de entrar no núcleo. (G) Liberação de uma proteína reguladora de uma bicamada de membrana por proteólise regulada.

produtos gênicos diferem levemente em suas propriedades de ligação ao oxigênio, adaptando-os para as diferentes condições de oxigenação no embrião, no feto e no adulto. Cada um dos genes de globina tem o seu próprio conjunto de proteínas reguladoras necessárias para ativar o gene em um tempo apropriado.

Os genes de globina são diferentes por, em tempo e local apropriados, serem transcritos em taxas extremamente altas: além disso, as células vermelhas do sangue não são muito

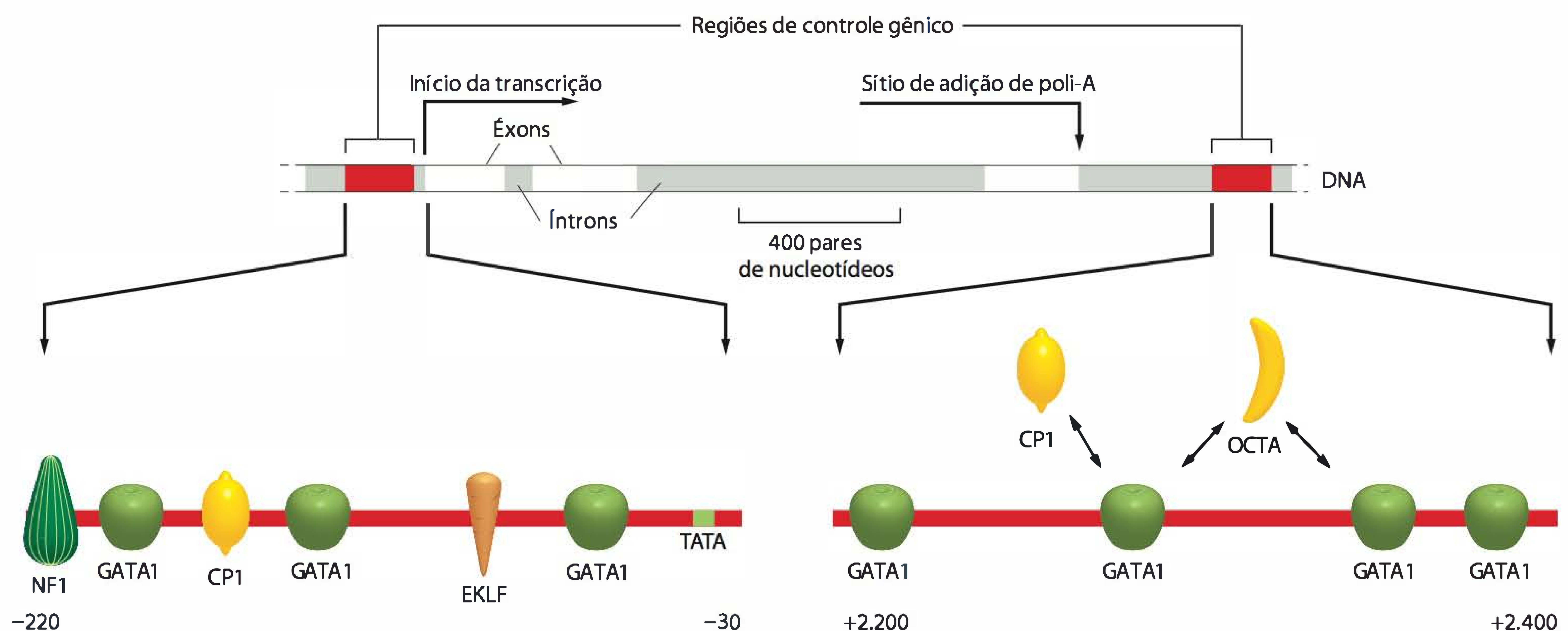


Figura 7-60 Modelo para o controle do gene de β-globina humana. O diagrama mostra algumas das proteínas de regulação gênica que controlam a expressão do gene durante o desenvolvimento das células vermelhas do sangue (ver Figura 7-61). Algumas das proteínas de regulação gênica mostradas, como a CP1, são encontradas em muitos tipos celulares, enquanto outras, como a GATA1, estão presentes em somente alguns tipos de células – incluindo as células vermelhas do sangue – e desta maneira se acredita contribuam para a especificidade de expressão do gene de β-globina nos tipos celulares. Como indicado pelas *setas com duas pontas*, muitos dos sítios para GATA1 sobrepõem-se àqueles das outras proteínas de regulação gênica; acredita-se que a ocupação desses sítios por GATA1 exclua a ligação de outras proteínas. Uma vez ligadas ao DNA, as proteínas de regulação gênica recrutam os complexos de remodelamento da cromatina, as enzimas modificadoras de histonas, os fatores gerais de transcrição, o Mediador e a RNA-polimerase para o promotor. (Adaptada de B. Emerson, in Gene Expression: General and Cell-Type Specific [M. Karin, ed.], pp. 116-161. Boston: Birkhauser, 1993.)

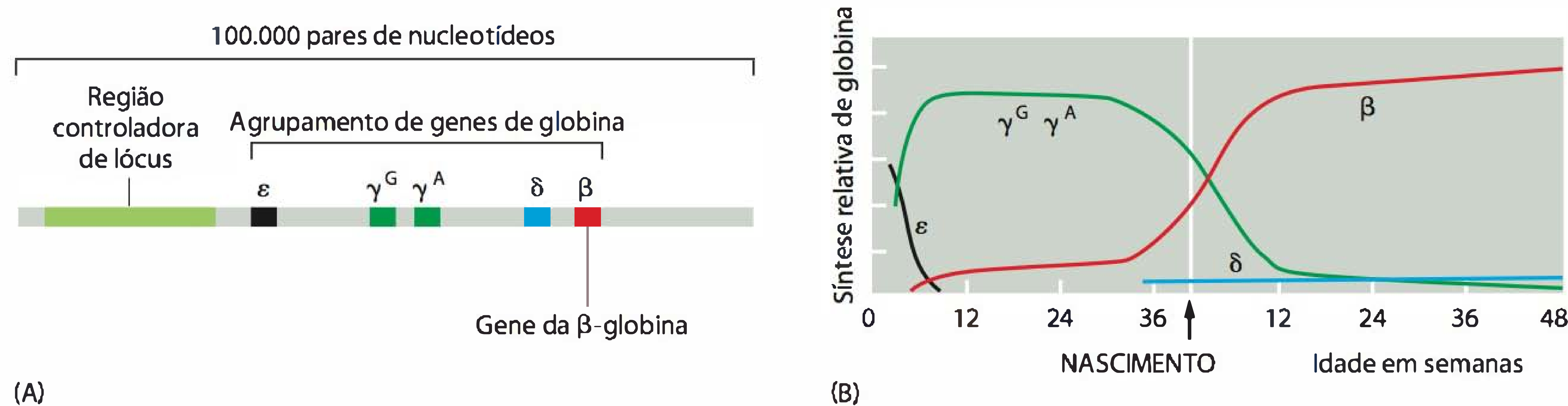


Figura 7-61 Agrupamento dos genes de globina tipo β em humanos. (A) A grande região cromossômica mostrada congrega 100.000 pares de nucleotídeos e contém os cinco genes de globina e uma região controladora de lócus (LCR). (B) Mudanças na expressão dos genes de globina tipo β em várias etapas do desenvolvimento humano. Cada uma das cadeias de globina codificadas por esses genes combina-se a uma cadeia de α-globina para formar a hemoglobina nas células vermelhas do sangue (ver Figura 4-86). (A, de F. Grosveld, G. B. van Assendelft, D. R. Greaves e G. Kolias, *Cell* 51:975-985, 1987. Com permissão de Elsevier.)

mais do que sacos de hemoglobina sintetizada pelas células precursoras. Para atingir esse nível extraordinariamente alto de transcrição, os genes de globina, além das suas sequências reguladoras individuais, compartilham uma região controladora chamada de *região de controle do lócus* (LCR, *locus control region*), a qual se localiza longe *upstream* do agrupamento gênico, sendo necessária para a expressão adequada de cada gene no agrupamento (ver Figura 7-61A). A importância da LCR pode ser vista em pacientes com determinado tipo de talassemia, uma forma herdada de anemia. Nesses pacientes, o lócus da β-globina sofreu uma deleção que removeu toda ou parte da LCR. Embora a β-globina e suas sequências reguladoras próximas estejam intactas, o gene permanece transcricionalmente silencioso, mesmo nas células eritroides.

A maneira pela qual a LCR funciona não é entendida em detalhes, mas sabe-se que as proteínas de regulação gênica que se ligam à LCR interagem, pela formação de alças no DNA, com proteínas ligadas às regiões controladoras dos genes de globina que elas regulam. Dessa forma, as proteínas ligadas na LCR auxiliam a atrair complexos de remodelação da cromatina, enzimas modificadoras de histonas e componentes da maquinaria de transcrição que atuam em conjunto com as regiões reguladoras específicas de cada gene de globina individual. Além disso, a LCR inclui uma *sequência-barreira* (ver Figura 4-47) que impede o espalhamento da cromatina circundante no lócus de β-globina, como discutido no Capítulo 4. Essa característica dualística distingue a LCR das globinas de muitos outros tipos de sequências reguladoras no genoma humano; entretanto, os genes de globina não são os únicos a possuírem uma LCR, pois LCRs também estão presentes *upstream* de outros genes altamente transcritos e tipos celulares específicos. Deveríamos considerar as LCRs não como elementos de DNA únicos com propriedades especializadas, mas, ao contrário, como combinações especialmente poderosas de tipos mais fundamentais de sequências reguladoras.

Os isoladores são sequências de DNA que impedem as proteínas eucarióticas de regulação gênica de influenciar genes distantes

Todos os genes possuem regiões controladoras, as quais ditam em que tempo, condições e em que tecidos o gene será expresso. Também vimos que as proteínas de regulação gênica podem atuar por regiões muito longas de DNA. Como então essas regiões controladoras dos diferentes genes mantêm-se sem interferir umas com as outras? Em outras palavras, o que impede que uma proteína de regulação gênica ligada a uma região controladora de um gene influencie inapropriadamente a transcrição de genes adjacentes?

Para evitar esse tipo de cruzamento de informações, vários tipos de elementos de DNA atuam para compartimentalizar o genoma em domínios reguladores discretos. No Capítulo 4, discutimos as sequências-barreira que impedem a heterocromatina de espalhar-se aos genes que precisam ser expressos. Um segundo tipo de elemento de DNA, chamado de isolador, impede os estimuladores de funcionarem a esmo e ativarem genes inapropriados (**Figura 7-62**). O isolador pode aparentemente bloquear a comunicação entre o estimulador e

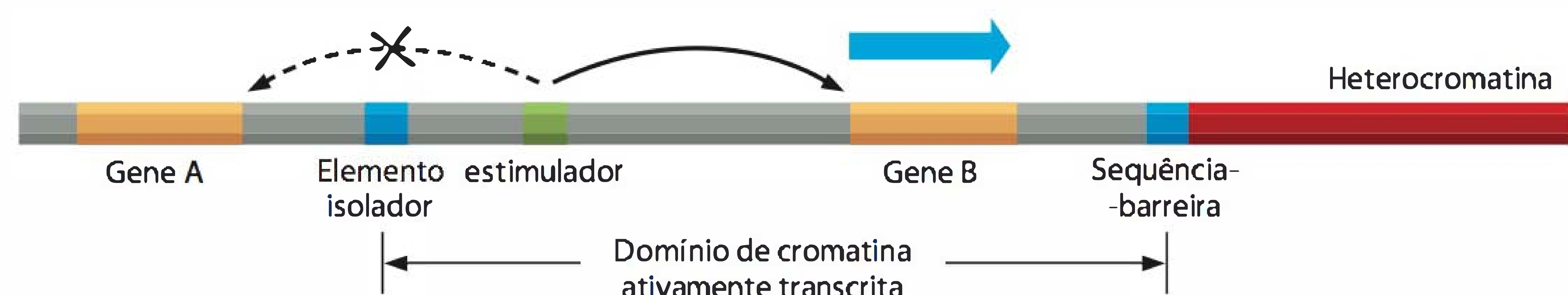


Figura 7-62 Diagrama esquemático resumindo as propriedades dos isoladores e sequências-barreira. Os isoladores bloqueiam diretamente a ação dos estimuladores (*lado esquerdo*), e as sequências-barreira impedem o espalhamento da heterocromatina (*lado direito*). Assim, o gene B é apropriadamente regulado e o estimulador do gene B é impedido de influenciar a transcrição do gene A. Como as sequências-barreira provavelmente funcionam está descrito na Figura 4-47. Ainda não se sabe como os isoladores exercem os seus efeitos; uma possibilidade é a de que eles sirvam como "chamarizes", fixando a maquinaria transcricional e impedindo-a de interagir com um estimulador autêntico. Outra é a de que eles ancoram o DNA ao envelope nuclear, interferindo dessa forma com a alça de DNA entre um estimulador e um promotor inapropriado.

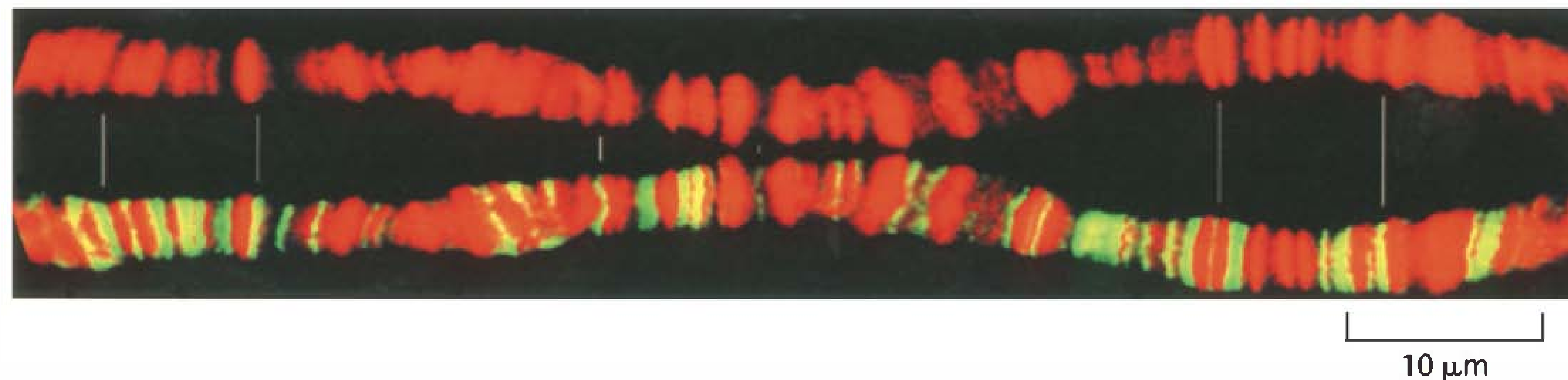


Figura 7-63 Localização de uma proteína de *Drosophila* ligante de isoladores em cromossomos politênicos. Um cromossomo politênico (discutido no Capítulo 4) foi corado com iodeto de propídeo (*vermelho*) para mostrar seus padrões de bandeamento – com as bandas aparecendo em *vermelho-brilhante* e as interbandas como lacunas escuras no padrão (*acima*). As posições nesse cromossomo politênico que estão ligadas a uma proteína isoladora particular (chamada de BEAF) estão coradas em *verde-brilhante* pelo uso de anticorpos direcionados contra a proteína (*inferior*). BEAF localiza-se preferencialmente em regiões interbandas, refletindo a sua função na organização dos cromossomos em domínios estruturais assim como funcionais. Por conveniência, estas duas micrografias do mesmo cromossomo politênico estão arranjadas como imagens especulares. (Cortesia de Uli Laemmli, de K. Zhao et al., *Cell* 81:879-889, 1995. Com permissão de Elsevier.)

o promotor, mas, para fazê-lo, ele precisa estar localizado entre os dois. Embora as proteínas que se ligam aos isoladores tenham sido identificadas, como elas neutralizam direcionalmente os estimuladores ainda é um mistério.

Apesar de seus mecanismos não serem entendidos em detalhe, acredita-se que a distribuição dos isoladores e das sequências-barreira em um genoma o divide em domínios independentes de regulação gênica e estrutura de cromatina (**Figura 7-63**). Aspectos dessa organização podem ser visualizados nos cromossomos inteiros pela coloração das proteínas especializadas que se ligam a esses elementos de DNA.

Embora os cromossomos estejam organizados em domínios ordenados que desencorajam os estimuladores de atuarem indiscriminadamente, existem circunstâncias especiais em que se verificou que um estimulador localizado em um cromossomo ativa um gene localizado em outro cromossomo. Um exemplo surpreendente ocorre na regulação dos receptores olfatórios de mamíferos. Estas são as proteínas expressas por neurônios sensoriais que permitem aos animais discriminarem de forma acurada muitos milhares de odores distintos (ver p.917). Os humanos, por exemplo, possuem 350 genes de receptores olfatórios, cuidadosamente regulados de maneira que somente um desses genes é expresso em cada neurônio sensorial. Os genes dos receptores olfatórios estão dispersos entre muitos cromossomos diferentes, mas há somente um único estimulador para todos eles. Uma vez que esse estimulador ative um gene de receptor pela associação com a sua região reguladora, ele permanece estavelmente associado, impedindo, assim, a ativação de quaisquer outros genes receptores. Embora haja pouca compreensão a respeito desse mecanismo, ele indica a extrema versatilidade das estratégias de regulação transcricional.

Os comutadores genéticos evoluíram rapidamente

Vimos que as regiões de controle dos genes dos eucariotos frequentemente estão espalhadas por longas porções de DNA, enquanto as dos genes procarióticos normalmente estão agrupadas ao redor do ponto inicial de transcrição. Parece provável que os arranjos rígidos dos comutadores genéticos bacterianos tenham se desenvolvido a partir de formas mais extensas de mecanismos em resposta à pressão evolutiva sofrida pelas bactérias para manter um tamanho de genoma pequeno. Essa compressão cobra um preço, entretanto, uma vez que restringe a complexidade e a adaptabilidade dos mecanismos de controle. Ao contrário, a forma extensa das regiões controladoras eucarióticas – com módulos reguladores definidos separados por longas regiões de DNA espaçador – facilitaria a mistura dos módulos reguladores durante a evolução, tanto criando novos circuitos reguladores como modificando os velhos. Como vimos nos Capítulos 1 e 4, e veremos novamente no Capítulo 22, mudanças na regulação gênica – ao invés da aquisição de novos genes – explica muito da ampla variedade de vida na Terra. Deduzir a história de como as regiões de controle gênico evoluíram apresenta-se como um desafio fascinante aos biólogos, com muitos indícios disponíveis nos genomas atuais.

Resumo

A transcrição de genes individuais é ativada e desativada nas células por proteínas de regulação gênica. Nos procariotos, essas proteínas normalmente ligam-se a sequências de DNA específicas próximas do sítio de início da RNA-polimerase e, dependendo da natureza da proteína reguladora e da localização precisa do seu sítio de ligação em relação ao sítio de início, pode tanto ativar como reprimir a transcrição do gene. A flexibilidade da hélice do DNA, entretanto, também permite que proteínas ligadas em sítios distantes afetem a RNA-polimerase no promotor, pela curvatura do DNA intermediário. A regulação de genes de eucariotos superiores é muito mais complexa, condizente com um tamanho de genoma maior e com a grande variedade de tipos celulares que é formada. Um

único gene eucariótico normalmente é controlado por muitas proteínas de regulação gênica ligadas a sequências que podem estar localizadas a milhares de pares de nucleotídeos do promotor que direciona a transcrição do gene. Os ativadores e os repressores eucarióticos atuam por meio de vários mecanismos – geralmente alterando a estrutura local da cromatina e controlando a associação dos fatores gerais de transcrição, do Mediador e da RNA-polimerase no promotor. O tempo e o local em que cada gene é transcrito, assim como a sua taxa de transcrição sob diferentes condições, são determinados pelo espectro de proteínas de regulação gênica que se liga à região reguladora do gene.

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES QUE CRIAM TIPOS CELULARES ESPECIALIZADOS

Embora todas as células devam ser capazes de ativar e desativar seus genes em resposta às mudanças em seus ambientes, as células dos organismos multicelulares desenvolveram essa capacidade em um grau extremo e de várias maneiras especializadas, para formar uma gama organizada de tipos celulares diferenciados. Em particular, uma vez que uma célula em um organismo celular torna-se comprometida a diferenciar-se em um tipo celular específico, a célula mantém essa escolha por muitas gerações celulares subsequentes, o que significa que ela se lembra das mudanças na expressão gênica envolvidas nessa escolha. Esse fenômeno de *memória celular* é um pré-requisito para a criação de tecidos organizados e para a manutenção de tipos celulares estavelmente diferenciados. Em contraste, outras mudanças na expressão gênica em eucariotos, assim como a maioria em bactérias, são apenas transitórias. O repressor do triptofano, por exemplo, desativa os genes do triptofano nas bactérias somente na presença de triptofano; assim que ele é removido do meio, os genes são novamente ativados, e os descendentes da célula não terão registro de que os seus ancestrais foram expostos ao triptofano. Mesmo nas bactérias, entretanto, uns poucos tipos de mudanças na expressão gênica podem ser herdados estavelmente.

Nesta seção, não somente examinamos os mecanismos celulares de memória, mas também como os mecanismos de regulação gênica podem ser combinados para criar "circuitos" lógicos pelos quais as células integram sinais, indicam o tempo correto, relembram eventos de seu passado e ajustam os níveis de expressão gênica de cromossomos inteiros. Começamos considerando alguns dos mecanismos genéticos melhor entendidos de diferenciação celular, que operam em células bacterianas e de leveduras.

Rearranjos de DNA fazem a mediação da variação de fase em bactérias

Vimos que a diferenciação celular em eucariotos superiores normalmente ocorre sem alterações detectáveis na sequência de DNA. Em alguns procariotos, ao contrário, um padrão estavelmente herdável de regulação gênica é alcançado por rearranjos de DNA que ativam ou inativam genes específicos. Uma vez que as alterações nas sequências de DNA são copiadas fielmente durante replicações de DNA subsequentes, um estado alterado da atividade gênica será herdado por toda a progênie da célula na qual o rearranjo ocorreu. Alguns desses rearranjos de DNA são, entretanto, reversíveis, de forma que indivíduos ocasionais retornam às configurações de DNA originais. O resultado é um padrão alternado de atividade gênica que pode ser detectado pela observação de longos períodos de tempo e de muitas gerações.

Um exemplo bem estudado desse mecanismo de diferenciação ocorre na bactéria *Salmonella,* sendo conhecido como **variação de fase**. Embora esse modo de diferenciação não tenha nenhuma contraparte em eucariotos superiores, ele pode ter considerável impacto sobre eles, pois as bactérias causadoras de doenças usam-no para evadir sua detecção pelo sistema imune. A alteração da expressão gênica na *Salmonella* ocorre pela inversão ocasional de um pedaço específico de DNA de 1.000 pares de nucleotídeos. Isso altera a expressão da proteína de superfície celular flagelina, para a qual a bactéria possui dois genes diferentes (**Figura 7-64**). A inversão é catalisada por uma enzima de recombinação sítio-específica e, assim, altera a orientação do promotor que está entre o segmento de DNA invertido. Com o promotor em uma orientação, as bactérias sintetizam um tipo de flagelina; com o promotor na outra orientação, elas sintetizam o outro tipo. Uma vez que as inversões somente ocorrem raramente, múltiplos clones de bactérias irão crescer com um tipo de flagelina ou com o outro.

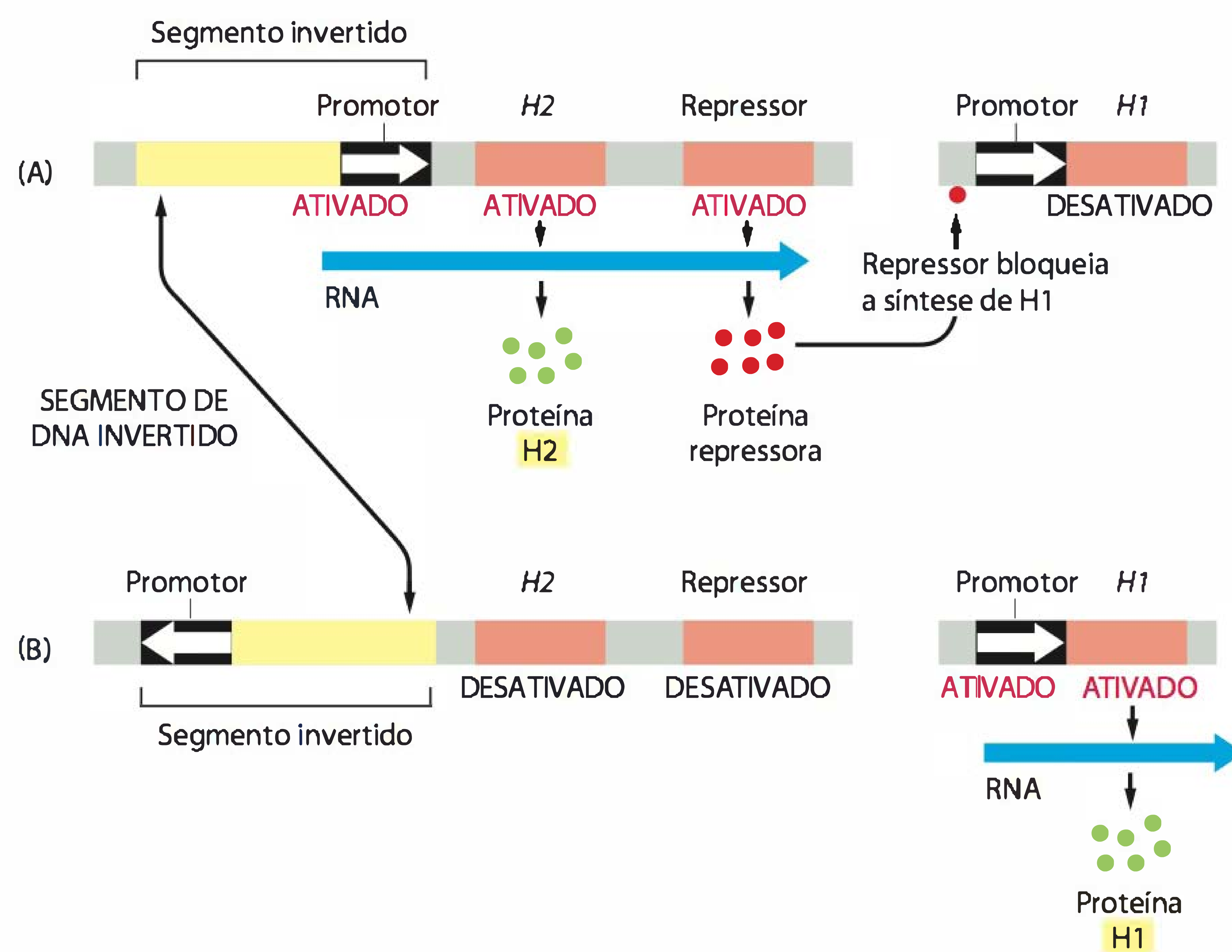


Figura 7-64 Controlando a expressão gênica por inversão de DNA em bactérias. A alternância da transcrição de dois genes de flagelina em uma bactéria *Salmonella* é causada por um evento de recombinação sítio-específico que inverte um pequeno segmento de DNA contendo um promotor. (A) Em uma orientação, o promotor ativa a transcrição do gene da flagelina *H2*, assim como a proteína repressora que bloqueia a expressão do gene da flagelina *H1*. (B) Quando o promotor é invertido, ele não mais ativa *H2* ou o repressor, e o gene *H1*, o qual é dessa forma liberado da repressão, é expresso em seu lugar. O mecanismo de recombinação raramente é ativado (cerca de uma a cada 10^5 divisões celulares). Portanto, a produção de uma flagelina ou outra tende a ser fielmente herdada em cada clone de células.

É quase certo que a variação de fase tenha evoluído por proteger a população bacteriana contra a resposta imune do seu hospedeiro vertebrado. Se o hospedeiro produz anticorpos contra um tipo de flagelina, algumas poucas bactérias cuja flagelina foi alterada pela inversão gênica ainda serão capazes de sobreviver e de se multiplicarem.

As bactérias isoladas do ambiente frequentemente exibem variação de fase em um ou mais traços fenotípicos. Essas "instabilidades" comumente são perdidas com o tempo em linhagens de bactérias padronizadas usadas em laboratório, e os mecanismos envolvidos foram estudados somente em alguns poucos casos. Nem todos envolvem inversões de DNA. Uma bactéria que causa uma doença humana sexualmente transmissível comum (*Neisseria gonorrhoeae*), por exemplo, evita o ataque imune com uma mudança herdável nas suas propriedades de superfície gerada por conversão gênica (discutido no Capítulo 5), ao invés de inversão. Esse mecanismo transfere as sequências de DNA de uma biblioteca de "cassetes gênicos" silenciosos para um sítio no genoma onde os genes são expressos; ele tem a vantagem de criar muitas variantes da proteína principal de superfície da bactéria.

Um conjunto de proteínas de regulação gênica determina o tipo celular em leveduras que se reproduzem por brotamento

Devido ao fato de as leveduras serem tão fáceis de crescer e de manipular geneticamente, elas têm servido como organismos-modelo para o estudo dos mecanismos de controle gênico em células eucarióticas. A levedura comum de padaria, *Saccharomyces cerevisiae*, tem atraído interesse especial em virtude de sua habilidade de diferenciar-se em três tipos celulares. A *S. cerevisiae* é um eucarioto unicelular que existe tanto em estado haploide como diploide. As células diploides formam-se por um processo conhecido como **acasalamento**, no qual duas células haploides se fusionam. Para que duas células haploides acasalem-se, elas precisam ser diferentes quanto ao *tipo de acasalamento* (sexo). Na *S. cerevisiae* existem dois tipos de acasalamento, α e **a**, os quais são especializados em acasalarem-se um com o outro. Cada um produz uma molécula sinalizadora difusível específica (fator de acasalamento) e uma proteína receptora de superfície celular específica. Em conjunto, elas possibilitam que a célula reconheça e seja reconhecida pela célula do tipo oposto, com a qual ela se fusiona. As células diploides resultantes, chamadas de **a**/α, são distintas de seus pais: elas não são capazes de acasalar, mas podem formar esporos (esporular) quando há falta de alimento, dando origem a células haploides pelo processo de meiose (discutido no Capítulo 21).

Os mecanismos pelos quais esses três tipos celulares são estabelecidos e mantidos ilustram várias das estratégias discutidas para alterar o padrão de expressão gênica. O tipo de célula haploide é determinado por um único lócus, o **lócus do tipo de acasamento (Mat,**

mating-type), o qual, em uma célula tipo **a**, codifica para uma única proteína de regulação gênica, Mata1, e em uma célula α codifica para duas proteínas de regulação gênica, Matα1 e Matα2. A proteína Mata1 não tem efeito na célula haploide tipo **a** que a produz, mas torna-se importante mais tarde, na célula diploide resultante do acasalamento. Por outro lado, a proteína Matα2 atua na célula α como um repressor transcricional que desliga genes específicos de **a**, enquanto que a proteína Matα1 atua como um ativador transcricional que ativa genes específicos de α. Uma vez que as células dos dois tipos de acasalamento tenham se fusionado, a combinação das proteínas reguladoras Mata1 e Matα2 gera um padrão completamente novo de expressão gênica, diferente dos apresentados pelas células parentais. A **Figura 7-65** ilustra o mecanismo pelo qual os genes específicos para o tipo de acasalamento são expressos em diferentes padrões nos três tipos celulares. Esse exemplo estava entre os primeiros casos de controle gênico combinatório a ser identificados e ainda é um dos mais bem estudados em nível molecular.

Embora na maioria das cepas de laboratório de *S. cerevisiae* os tipos celulares **a** e α sejam estavelmente mantidos por muitas divisões celulares, algumas cepas isoladas do ambiente podem trocar repetidamente entre os tipos celulares **a** e α por um mecanismo de rearranjo gênico cujos efeitos lembram os rearranjos de DNA de *N. gonorrhoeae*, embora o mecanismo exato pareça ser peculiar das leveduras. Em cada lado do lócus *Mat* no cromossomo de levedura, há um lócus silencioso codificando para as proteínas de regulação gênica dos tipos de acasalamento: o lócus silencioso em um lado codifica Matα1 e Matα2; o lócus silencioso no outro lado codifica Mata1. Aproximadamente a cada nova divisão celular, o gene ativo no lócus *Mat* é excisado e substituído por uma cópia recém-sintetizada do lócus silencioso, determinando o tipo de acasalamento oposto. Uma vez que a mudança envolve a remoção de um gene de uma "região" ativa e a sua substituição por outra, esse mecanismo é chamado de *mecanismo de cassete*. Essa mudança é reversível porque, embora o gene original do lócus Mat seja descartado, uma cópia silenciosa permanece no genoma. Novas cópias de DNA feitas a partir dos genes silenciosos funcionam como cassetes disponíveis que serão inseridos alternadamente no lócus *Mat*, que serve como a "cabeça de leitura do cassete" (**Figura 7-66**).

Os cassetes silenciosos são mantidos em uma forma especializada de cromatina e transcricionalmente inativa. O estudo desses cassetes – que tem perdurado por aproximadamen-

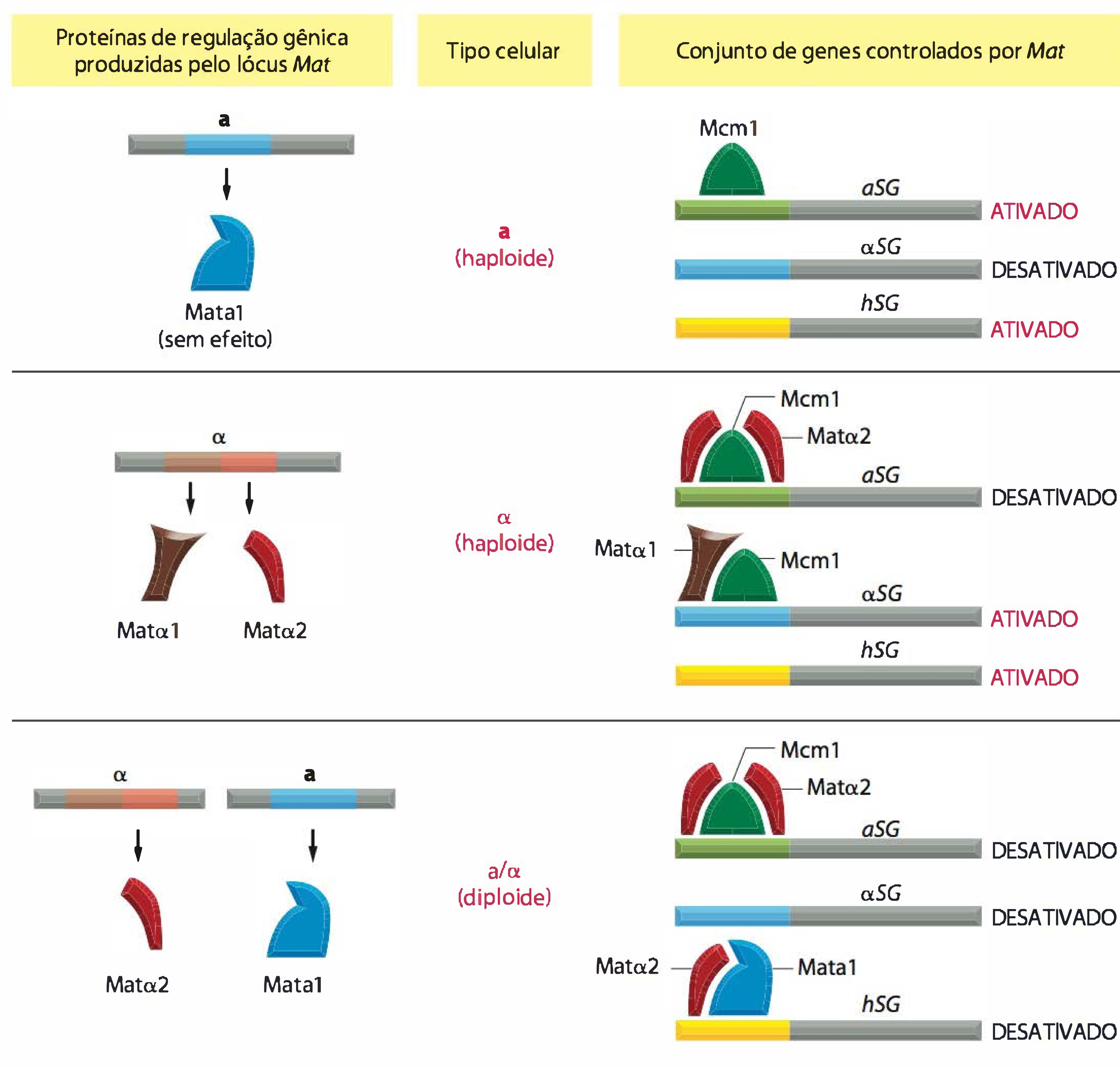


Figura 7-65 Controle do tipo celular em leveduras. O tipo de célula de levedura é determinado por três proteínas de regulação gênica (Matα1, Matα2 e Mata1) produzidas pelo lócus *Mat*. Diferentes conjuntos de genes são transcritos em células haploides do tipo a, em células haploides do tipo α e em células diploides (tipo a/α). As células haploides expressam um conjunto de genes haploide-específicos (*hSG*) e um conjunto de genes específicos de α (*αSG*), ou um conjunto de genes específicos de a (*aSG*). As células diploides não expressam nenhum desses genes. As proteínas reguladoras Mat controlam muitos genes-alvo em cada tipo de célula pela ligação, em várias combinações, a várias sequências reguladoras específicas *upstream* desses genes. Note que a proteína Matα1 é uma proteína de ativação gênica, enquanto que a proteína Matα2 é uma proteína de repressão gênica. Ambas trabalham em combinação com uma proteína de regulação gênica chamada de Mcm1 que está presente em todos os três tipos celulares. Na célula do tipo diploide, Matα2 e Mata1 formam um heterodímero (mostrado em detalhes na Figura 7-21) que desativa um conjunto de genes (incluindo o gene codificante da proteína ativadora Matα1) diferente daquele desativado pelas proteínas Matα2 e Mcm1. Esse sistema relativamente simples de proteínas de regulação gênica é um exemplo de controle combinatório da expressão gênica.

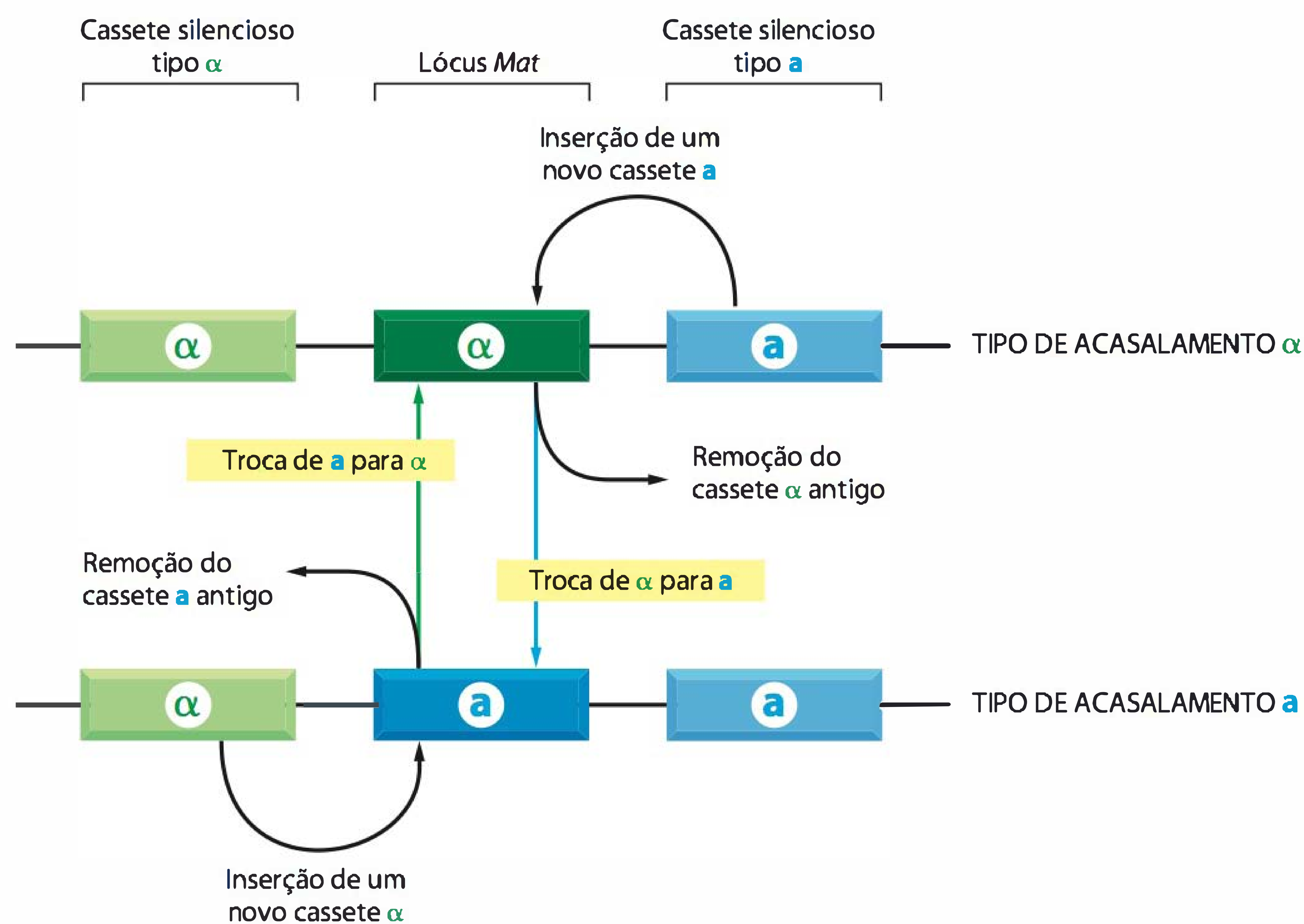


Figura 7-66 Modelo cassete de controle do tipo de acasalamento de levedura. O mecanismo de cassete ocorre por um processo de conversão gênica que envolve uma enzima especializada (a endonuclease HO) que produz um corte fita dupla em uma sequência específica de DNA no lócus *Mat*. O DNA próximo ao corte é então excisado e substituído por uma cópia do cassete silencioso do tipo de acasalamento oposto. O mecanismo dessa forma especializada de conversão gênica é semelhante ao mecanismo geral da ligação terminal homóloga discutida no Capítulo 5 (ver p. 308-309).

te 40 anos – forneceu muitas das informações-chave para a função da estrutura da cromatina na regulação gênica.

Duas proteínas que reprimem a síntese uma da outra determinam o estado herdável do bacteriófago lambda

Como vimos no início deste capítulo, o núcleo de uma única célula diferenciada contém toda a informação genética necessária à produção de um vertebrado ou uma planta completos. Essa observação elimina a possibilidade de que uma mudança irreversível na sequência de DNA seja um mecanismo principal na diferenciação de células eucarióticas superiores, embora tais mudanças ocorram na diferenciação de linfócitos (discutido no Capítulo 25). Mudanças *reversíveis* na sequência de DNA, semelhantes às recém-descritas de *Salmonella* e leveduras, em princípio poderiam ser responsáveis por algumas das alterações herdadas na expressão gênica observadas em organismos superiores, mas não existem atualmente evidências de que tais mecanismos sejam amplamente usados.

Outros mecanismos que tratamos de passagem neste capítulo, entretanto, também são capazes de produzir padrões de regulação gênica que podem ser herdados por gerações celulares subsequentes. Um dos exemplos mais simples é encontrado no vírus bacteriano (bacteriófago) lambda, em que um controle induz o vírus a alternar-se entre dois estados estáveis autossustentados. Esse tipo de controle pode ser visto como um protótipo para controles semelhantes, porém mais complexos, que operam no desenvolvimento de eucariotos superiores.

Mencionamos anteriormente que o bacteriófago lambda pode, em condições favoráveis, integrar-se ao DNA de uma célula de *E. coli* para ser replicado automaticamente cada vez que uma bactéria se divide. Alternativamente, o vírus pode multiplicar-se no citoplasma, matando o seu hospedeiro (ver Figura 5-78). O controle entre esses dois estados é mediado por proteínas codificadas pelo genoma do bacteriófago. O genoma contém aproximadamente 50 genes, os quais são transcritos em padrões muito diferentes nos dois estados. Um vírus destinado a integrar-se, por exemplo, precisa produzir a proteína *integrase* de lambda, que é necessária para inserir o DNA de lambda no cromossomo bacteriano, mas precisa reprimir a produção das proteínas virais responsáveis pela multiplicação viral. Uma vez que um padrão transcricional ou outro tenha sido estabelecido, ele será mantido estavelmente.

No centro desse complexo mecanismo de controle de regulação gênica estão duas proteínas de regulação gênica sintetizadas pelo vírus: a **proteína repressora de lambda** (proteína cI), apresentada anteriormente, e a **proteína Cro**. Essas proteínas reprimem a síntese uma da outra, em um arranjo que origina somente dois estados estáveis (**Figura 7-67**). No estado 1 (o *estado de profago*), o repressor lambda ocupa o operador, bloqueando a síntese de Cro e também ativando a sua própria síntese. No estado 2 (o *estado lítico)*, a

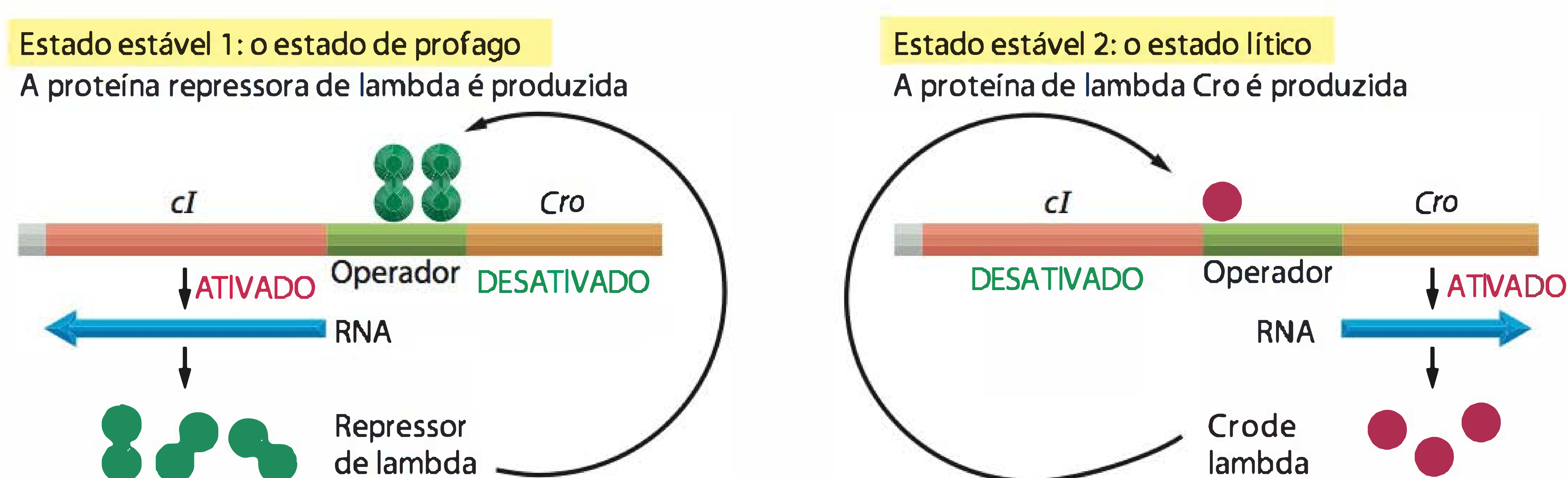


Figura 7-67 Versão simplificada do sistema regulador que determina o modo de crescimento do bacteriófago lambda na célula hospedeira *E. coli*. No estado estável 1 (o estado de profago), o bacteriófago sintetiza uma proteína repressora, a qual ativa a sua própria síntese e desativa a síntese de várias outras proteínas do bacteriófago, incluindo a proteína Cro. No estado 2 (o estado lítico), o bacteriófago sintetiza a proteína Cro, a qual desativa a síntese da proteína repressora, de maneira que muitas proteínas do bacteriófago são produzidas e o DNA viral replica-se livremente na célula de *E. coli*, produzindo finalmente muitas partículas de bacteriófago novas e matando a célula. Este exemplo mostra como duas proteínas de regulação gênica podem ser combinadas em um circuito para produzir dois estados herdáveis. A proteína repressora de lambda e a proteína Cro reconhecem o operador por um motivo hélice-volta-hélice (ver Figura 7-11).

proteína Cro ocupa um sítio diferente no operador, bloqueando a síntese do repressor, mas permitindo a sua própria síntese. No estado de profago, a maioria do DNA de um bacteriófago estavelmente integrado não é transcrita; no estado lítico, esse DNA é extensivamente transcrito, replicado, empacotado em novos bacteriófagos e liberado pela lise das células do hospedeiro.

Quando a bactéria hospedeira está crescendo bem, um vírus infectivo tende a adotar o estado 1, permitindo que o DNA do vírus multiplique-se com o cromossomo do hospedeiro. Quando a célula hospedeira é danificada, um vírus integrado converte-se do estado 1 para o estado 2 a fim de multiplicar-se no citoplasma da célula e fazer uma saída rápida. Essa conversão é desencadeada pela resposta do hospedeiro a danos ao DNA, a qual inativa a proteína repressora. Na ausência de tal interferência, entretanto, o repressor lambda tanto desativa a produção da proteína Cro como ativa a sua própria síntese, e esse *circuito de retroalimentação positiva* auxilia a manter o estado de profago.

Circuitos de regulação gênica podem ser usados para produzir mecanismos de memória

Os circuitos de retroalimentação positiva fornecem uma estratégia geral simples para a memória celular – ou seja, para o estabelecimento e a manutenção de padrões herdáveis de transcrição gênica. A **Figura 7-68** mostra o princípio básico, simplificado ao máximo. As células eucarióticas utilizam muitas variações dessa estratégia simples. Várias proteínas de regulação gênica que estão envolvidas no estabelecimento do plano corporal da *Drosophila* (discutido no Capítulo 22), por exemplo, estimulam a sua própria transcrição, criando um circuito de retroalimentação positiva que promove a sua síntese continuada; ao mesmo tempo, muitas dessas proteínas reprimem a transcrição de genes codificantes para outras proteínas de regulação gênica importantes. Assim, um padrão sofisticado de comportamento herdado pode ser conseguido com apenas algumas poucas proteínas de regulação gênica que afetam reciprocamente a síntese e as atividades umas das outras.

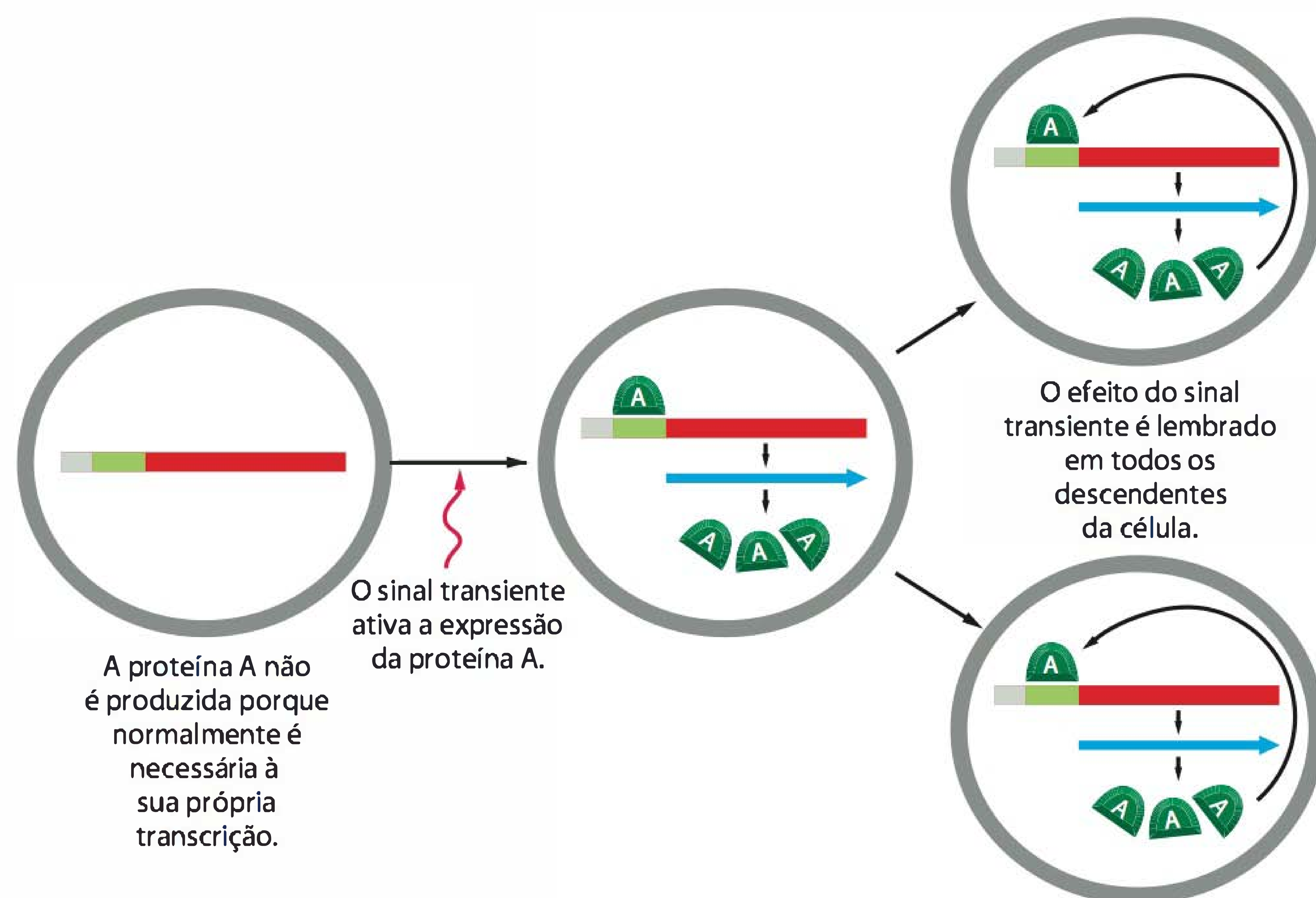
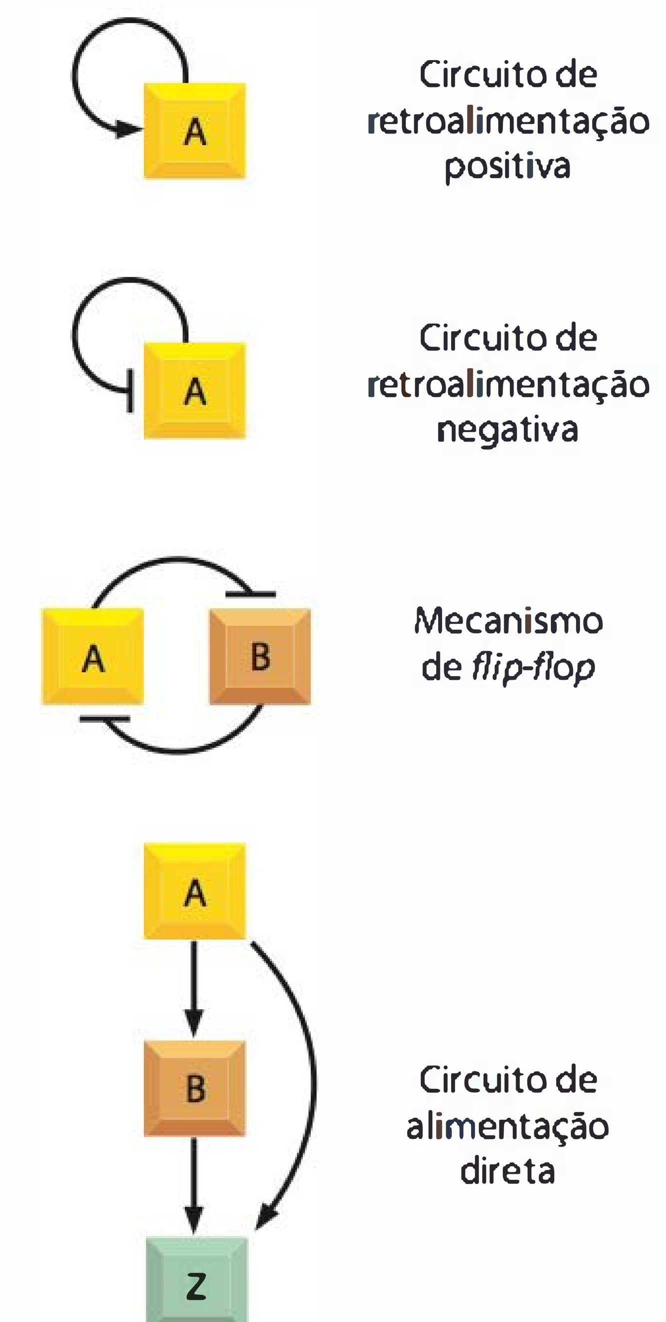


Figura 7-68 Diagrama esquemático mostrando como um circuito de retroalimentação positiva pode criar uma memória celular. A proteína A é uma proteína de regulação gênica que ativa a sua própria transcrição. Todos os descendentes da célula original irão dessa maneira "lembrar-se" de que a célula progenitora experimentou um sinal transiente que iniciou a produção da proteína.

Figura 7-69 Tipos comuns de motivos de redes em circuitos transcricionais. A e B representam proteínas de regulação gênica, as setas indicam controle transcricional positivo e as linhas com barras indicam controle transcricional negativo. Descrições mais detalhadas de circuitos de retroalimentação positiva e mecanismos de *flip-flop* estão presentes nas Figuras 7-70 e 7-71, respectivamente. Em circuitos de alimentação direta, A e B representam proteínas reguladoras, as quais ativam a transcrição de um gene-alvo, o Z.



Circuitos de transcrição permitem à celula realizar operações lógicas

Os circuitos de regulação gênica simples podem ser combinados para criar todos os tipos de mecanismos de controle, assim como elementos simples de controle eletrônico em um computador são combinados para produzir todos os tipos de operações lógicas complexas. A análise de circuitos de regulação gênica tem revelado que certos tipos de arranjos muitas vezes são encontrados em células de espécies amplamente diferentes. Por exemplo, *circuitos de retroalimentação positiva* e *negativa* são especialmente comuns em todas as células (**Figura 7-69**). Como vimos, o primeiro fornece um mecanismo de memória simples; o segundo com frequência é usado para manter a expressão do gene próximo ao nível padrão independentemente das variações nas condições bioquímicas dentro da célula. Suponha, por exemplo, que uma proteína repressora ligue-se a uma região reguladora de seu próprio gene e exerça uma forte retroalimentação negativa, de tal forma que a transcrição ocorra em uma taxa muito baixa quando a concentração da proteína repressora estiver acima de um determinado valor crítico (determinado pela sua afinidade ao seu sítio de ligação ao DNA), e em uma taxa muito alta quando estiver abaixo do valor crítico. A concentração da proteína irá então manter-se próxima do valor crítico, uma vez que qualquer circunstância que induza uma queda abaixo daquele valor levará a um aumento acentuado na síntese, e qualquer aumento acima daquele valor induzirá a inibição da síntese. Tais ajustes irão, entretanto, levar tempo, de maneira que uma alteração abrupta das condições causará uma alteração intensa, porém transitória da expressão gênica. Como discutimos no Capítulo 15, o sistema de retroalimentação negativa pode, assim, funcionar como um detector de alterações súbitas. Alternativamente, se há um atraso na alça de retroalimentação, o resultado pode ser oscilações espontâneas na expressão do gene (ver Figura 15-28). Os detalhes quantitativos da alça de retroalimentação negativa determinam quais dos possíveis comportamentos irão ocorrer.

Com dois ou mais genes, a amplitude possível dos circuitos de controle e dos comportamentos dos circuitos rapidamente torna-se mais complexa. O bacteriófago lambda, como vimos, exemplifica um tipo comum de circuito de dois genes que pode alternar-se entre a expressão de um gene e a expressão do outro. Outro arranjo de circuito comum é o chamado circuito de *alimentação direta* (ver Figura 7-69); entre outras coisas, ele pode servir como filtro, respondendo a sinais prolongados recebidos sem considerar aqueles que são curtos (**Figura 7-70**). Uma célula pode usar esses vários instrumentos em rede como mecanismos lógicos em miniatura para processar informações de maneiras surpreendentemente sofisticadas.

Os tipos simples de mecanismos descritos são combinados em uma célula eucariótica típica para a criação de circuitos extremamente complexos (**Figura 7-71**). Cada célula em um organismo multicelular em desenvolvimento está equipada com essa maquinaria de controle e precisa, na verdade, utilizar o sistema interligado de controles transcricionais interligados para computar como deve se comportar em cada ponto do tempo para responder às muitas diferentes informações passadas e presentes recebidas. Estamos somente começando a entender como estudar tais redes complexas de controle intracelular. Além disso,

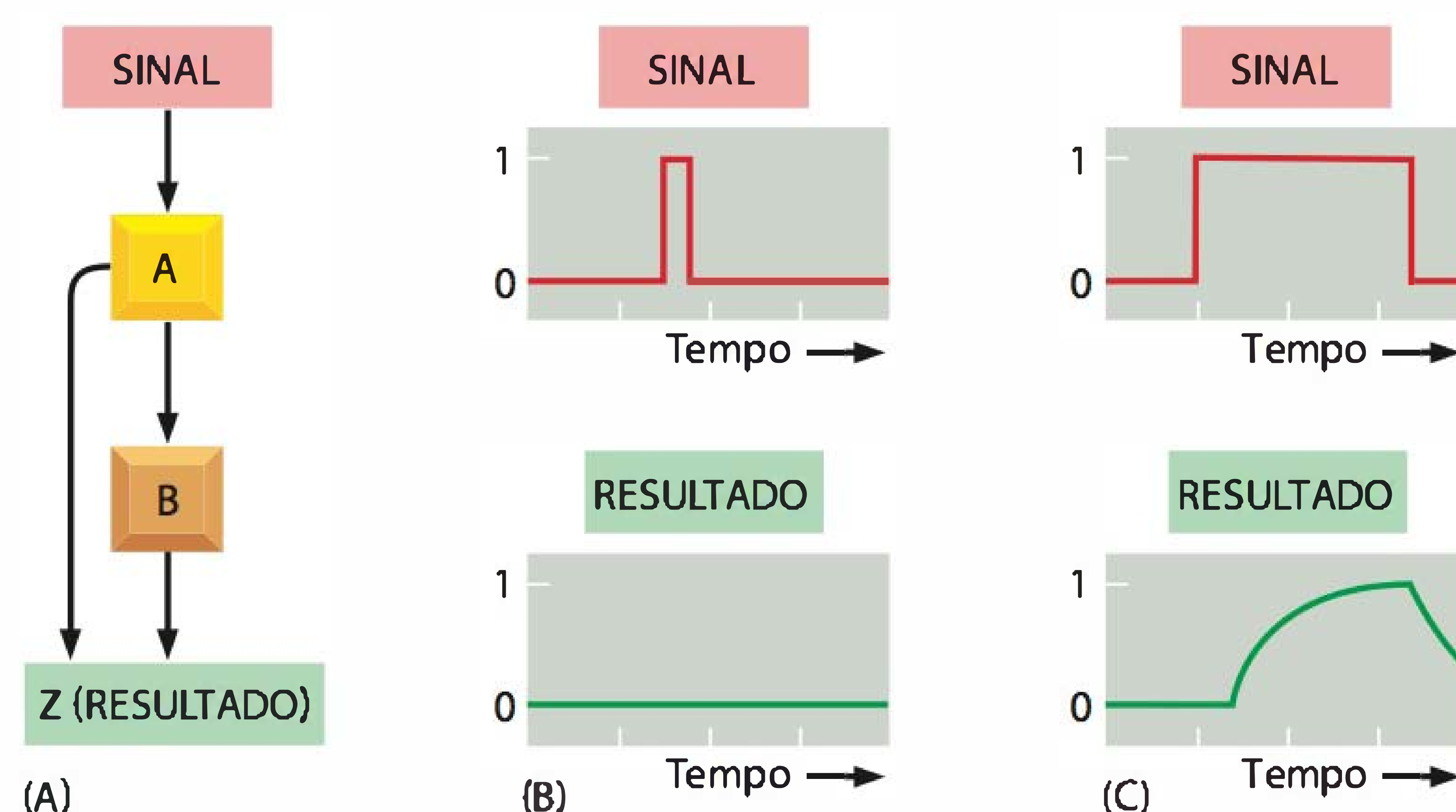


Figura 7-70 Como um circuito de alimentação direta pode quantificar a duração de um sinal. (A) Neste exemplo teórico, as proteínas de ativação gênica A e B são ambas necessárias para a transcrição de Z, e A torna-se ativa somente quando um sinal estiver presente. (B) Se o sinal para A é breve, A não permanece ativa o suficiente para B acumular-se, e o gene Z não é transcrito. (C) Se o sinal para A for persistente, B acumula-se, A permanece ativa e Z é transcrito. Este arranjo permite que a célula ignore flutuações rápidas do sinal e responda somente a níveis persistentes. Esta estratégia poderia ser utilizada, por exemplo, para distinguir entre sinais ocasionais e um sinal verdadeiro.

O comportamento mostrado aqui foi computado para um conjunto particular de valores em parâmetros descrevendo as propriedades quantitativas de A, B e Z e as suas sínteses. Com valores diferentes para esses parâmetros, circuitos de alimentação direta podem em princípio desempenhar outras formas de "cálculos". Muitos circuitos de alimentação direta têm sido descobertos nas células, e a análise teórica auxilia os pesquisadores a apreciar e subsequentemente testar as diferentes maneiras nas quais eles podem funcionar. (Adaptada de S. S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan e U. Alon, *Nat. Genet.* 31:64-68, 2002. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

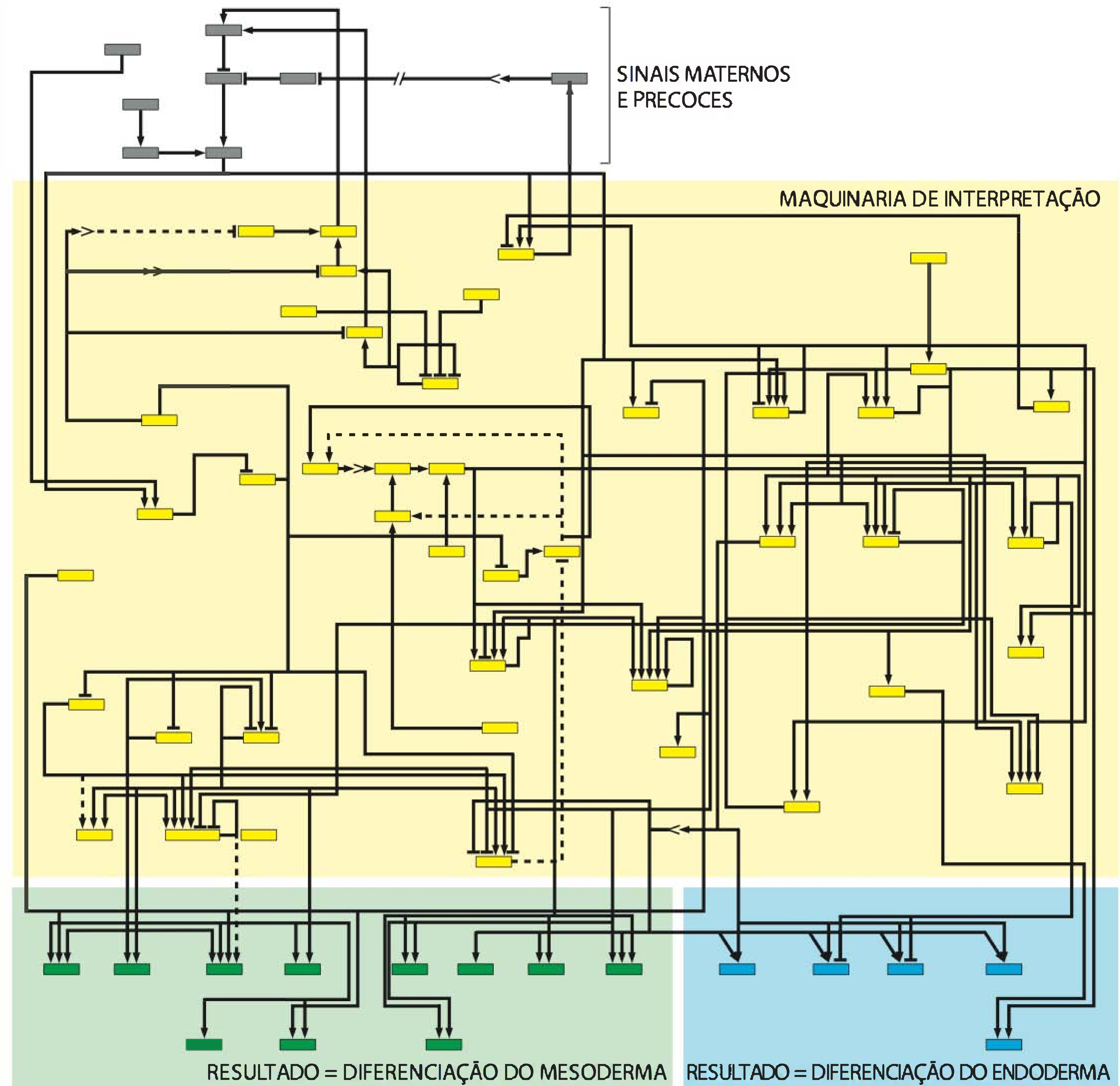


Figura 7-71 Circuito gênico demasiadamente complexo que especifica uma parte do embrião em desenvolvimento do ouriço-do-mar. Cada *caixa colorida pequena* representa um gene diferente. Aqueles em *amarelo* codificam para proteínas de regulação gênica e aqueles em *verde* e *azul* codificam para proteínas que conferem às células do mesoderma e do endoderma, respectivamente, as suas características especializadas. Os genes descritos em *cinza* estão largamente ativos na mãe e fornecem ao ovo os sinais necessários para o seu desenvolvimento apropriado. As *setas* indicam momentos nos quais uma proteína de regulação gênica ativa a transcrição de outro gene. As linhas terminando em *barras* indicam exemplos de repressão gênica.

sem informações quantitativas muito mais precisas e completas do que temos, é impossível predizer o comportamento de um sistema como aquele mostrado na Figura 7-71: o diagrama do circuito por si só não é o suficiente.

A biologia sintética cria novos mecanismos a partir de porções biológicas existentes

Nossa discussão focalizou-se nos circuitos transcricionais de ocorrência natural, mas também é instrutivo projetar e construir circuitos artificiais em laboratório e introduzi-los em células para examinarmos o seu comportamento. A **Figura 7-72** mostra, por exemplo, como uma célula bacteriana pode alterar-se entre três estados em uma ordem determinada, funcionando dessa forma como um oscilador ou relógio simples. A construção de tais mecanismos a partir de partes existentes frequentemente é chamada de *biologia sintética*. Os cientistas utilizam essa metodologia para testar se realmente entendem as propriedades das partes componentes; caso sim, eles deveriam ser capazes de combinar essas partes em novas formas e predizer com acuracidade as características do novo mecanismo. O fato de que essas predições normalmente falham mostra o quão longe estamos de um entendimento real a respeito do funcionamento detalhado da célula. Existem muitas lacunas no nosso conhecimento que necessitarão de aplicações adequadas de metodologias quantitativas das ciências físicas para os sistemas biológicos complexos.

Os relógios circadianos têm como base circuitos de retroalimentação em regulação gênica

A vida na Terra evoluiu na presença de um ciclo de dia e noite, e muitos dos organismos atuais (desde arquebactérias a plantas e humanos) apresentam um ritmo interno que dita diferentes comportamentos, em diferentes momentos do dia. Esses comportamentos podem variar de uma mudança metabólica cíclica nas atividades metabólicas de um fungo aos elaborados ciclos de dormir-acordar dos humanos. Os osciladores internos que controlam tais ritmos diurnos são chamados de relógios circadianos.

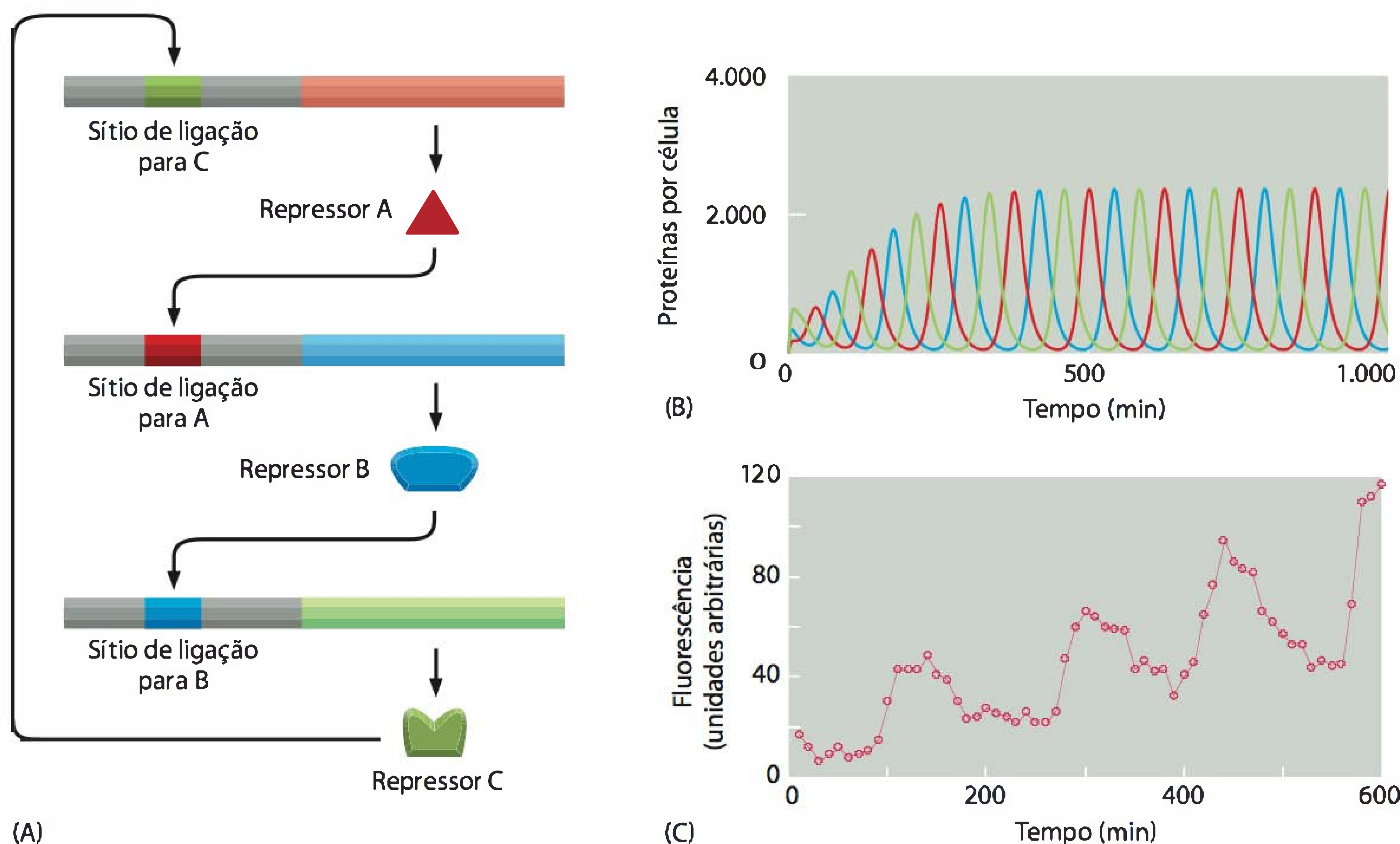


Figura 7-72 Oscilador genético simples ou "relógio" desenhado em laboratório. (A) Técnicas de DNA recombinante foram utilizadas para produzir três genes artificiais, cada um codificando para uma proteína repressora bacteriana diferente e cada um controlado pelo produto de outro gene no conjunto, de forma a criar um circuito regulador como mostrado. Esses repressores (indicados como A, B e C na figura) são o repressor Lac (ver Figura 7-39), o repressor Tet, o qual regula genes em resposta à tetraciclina, e o repressor lambda (ver Figura 7-67). Quando introduzidos em uma célula bacteriana, os três genes formam um circuito de retroalimentação negativa retardada: o produto do gene A, por exemplo, atua pelos genes B e C para inibir indiretamente a sua própria expressão. A retroalimentação negativa retardada origina as oscilações. (B) Predição computacional do comportamento oscilatório. A célula cicla repetitivamente por uma série de estados, expressando A, então B, então C, então A novamente, e assim por diante, onde cada produto gênico escapa da inibição pelo anterior e reprime o seguinte. (C) Oscilações reais observadas em uma célula contendo os três genes artificiais em (A), demonstrado por um repórter fluorescente para a expressão de um desses genes. A amplitude do sinal fluorescente ampliando-se reflete o crescimento da célula bacteriana. (Adaptada de M. B. Elowitz e S. Leibler, *Nature* 403:335-338, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Ao carregar o seu próprio relógio circadiano, um organismo pode antecipar as alterações regulares diárias no seu ambiente e realizar as ações apropriadas antecipadamente. É obvio que o relógio interno não pode ser perfeitamente acurado; deve ser capaz de ser readequado por informações externas, como a luz do dia. Dessa forma, os relógios circadianos continuam funcionando mesmo quando as informações do ambiente (mudanças entre luz e escuridão) são removidas, mas o período desse ritmo de trabalho livre geralmente é um pouco menor ou um pouco maior do que 24 horas. Os sinais externos, indicando a hora do dia, promovem pequenos ajustes no funcionamento do relógio, de maneira a manter o organismo em sincronia com o seu ambiente. Com mudanças mais drásticas, os ciclos circadianos tornam-se gradualmente reprogramados (direcionados) por um novo ciclo de luz e escuridão, como qualquer um que tenha experimentado uma rápida troca de fuso horário pode atestar.

Poderíamos supor que o relógio circadiano de uma criatura multicelular complexa como um humano seria ele próprio um mecanismo multicelular complexo, com diferentes grupos de células responsáveis por diferentes partes do mecanismo de oscilação. É surpreendente, entretanto, que, na maioria dos organismos, incluindo os humanos, os marcadores de tempo sejam células individuais. Assim, um relógio que opera em cada membro de um grupo especializado de células do cérebro (as células SCN do núcleo supraquiasmático do hipotálamo, do inglês, SNC, *suprachiamatic nucleus*) controla nossos ciclos diurnos de dormir e acordar, da temperatura corporal e da liberação de hormônios. Mesmo que essas células sejam removidas do cérebro e colocadas em um meio de cultura, elas continuam a oscilar individualmente, mostrando um padrão cíclico de expressão gênica com um período de aproximadamente 24 horas. No corpo intacto, as células SCN recebem informações neuronais da retina, direcionando-as ao ciclo de luz e escuridão, e mandam informações a respeito da hora do dia para outra área do cérebro, a glândula pineal, que retransmite o sinal temporal para o resto do corpo pela liberação do hormônio melatonina em concomitância com o relógio.

Embora as células SCN tenham uma função central como marcadoras do tempo nos mamíferos, foi demonstrado que elas não são as únicas células no corpo dos mamíferos que possuem ritmo circadiano interno, ou habilidade para se reprogramarem em resposta à luz. De maneira semelhante, na *Drosophila*, muitos tipos diferentes de células, incluindo as do tórax, do abdome, da antena, da perna, da asa e do testículo, continuam um ciclo circadiano mesmo após terem sido dissecadas do resto do corpo da mosca. Os relógios nesses tecidos isolados, como aqueles nas células SCN, podem ser reprogramados por ciclos de luz e escuridão impostos externamente.

O funcionamento dos relógios circadianos, assim, é um problema fundamental na biologia celular. Embora ainda não conheçamos todos os detalhes, os estudos em uma ampla variedade de organismos revelaram muitos dos princípios básicos e dos componentes moleculares. Em relação aos animais, grande parte do que conhecemos provém de achados a partir de mutações em *Drosophila* que tornam o funcionamento do relógio circadiano da mosca mais rápido, ou lento, ou o impedem de funcionar; esse trabalho levou à descoberta que muitos dos mesmos componentes estão envolvidos no relógio circadiano dos mamíferos.

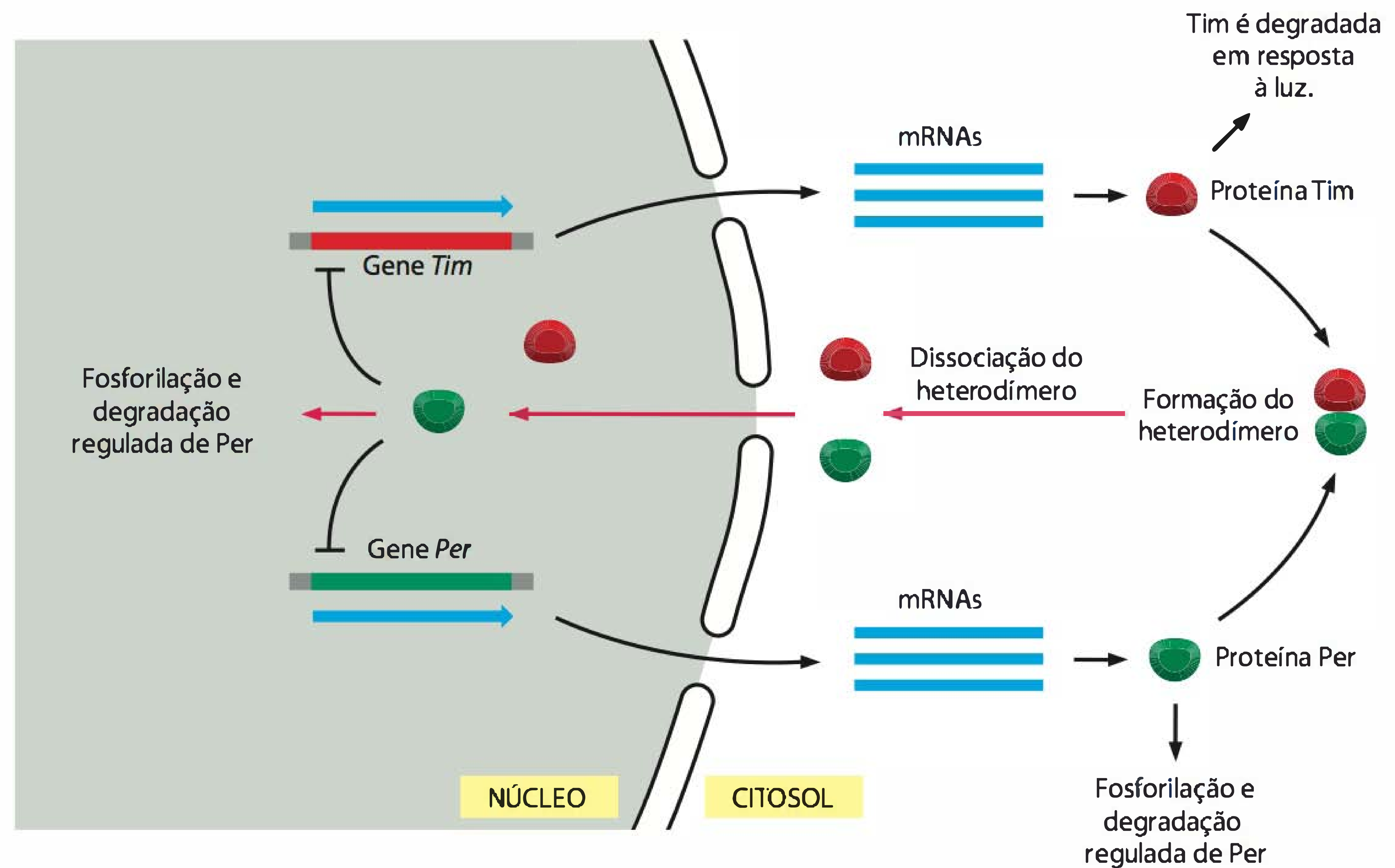


Figura 7-73 Esboço do mecanismo do relógio circadiano nas células de *Drosophila*. A característica central do relógio é a acumulação periódica e a degradação de duas proteínas de regulação gênica, Tim (abreviatura para eterno [*timeless*], com base no fenótipo de uma mutação gênica) e Per (abreviatura para período). Os mRNAs codificantes para essas proteínas são traduzidos no citosol, e quando cada proteína tiver se acumulado em níveis críticos elas formam um heterodímero. Após um retardo temporal, o heterodímero dissocia-se e Tim e Per são transportadas ao núcleo, onde regulam vários produtos gênicos que medeiam os efeitos do relógio. Uma vez no núcleo, Per também reprime os genes *Tim* e *Per*, criando um sistema de retroalimentação que induz a queda dos níveis de Tim e Per. Além dessa retroalimentação transcricional, o relógio depende de um conjunto de outras proteínas. Por exemplo, a degradação controlada de Per indicada no diagrama impõe atrasos na acumulação periódica de Tim e Per, as quais são cruciais para o funcionamento do relógio. As etapas nas quais atrasos específicos são impostos estão mostradas em *vermelho*.

O ajuste (ou a reprogramação) do relógio ocorre em resposta a novos ciclos de luz-escuridão. Embora a maioria das células de *Drosophila* não possua fotorreceptores verdadeiros, a luz é sentida por flavoproteínas intracelulares, também chamadas de criptocromos. Na presença de luz, essas proteínas associam-se à proteína Tim e induzem a sua degradação, dessa maneira reprogramando o relógio. (Adaptada de J. C. Dunlap, *Science* 311:184-186, 2006. Com permissão de AAAS.)

O mecanismo do relógio de *Drosophila* está resumido na **Figura 7-73**. O ponto central do oscilador é um circuito de retroalimentação transcricional que traz embutido um mecanismo de retardo: a acumulação de certos produtos gênicos-chave desativa a transcrição, porém com um atraso, de maneira que – em linhas gerais – a célula oscila entre um estado em que os produtos estão presentes e a transcrição é desativada, e outro onde os produtos estão ausentes e a transcrição é ativada.

Apesar da relativa simplicidade do princípio básico por atrás dos relógios circadianos, os detalhes são complexos. Uma razão para essa complexidade é que o relógio precisa ser tamponado contra mudanças na temperatura, as quais normalmente aceleram ou desaceleram as associações moleculares. Ele também precisa funcionar de maneira acurada, porém sendo capaz de ser reprogramado. Embora ainda não seja entendido como os relógios biológicos funcionam em uma velocidade constante mesmo com alterações de temperatura, o mecanismo para a reprogramação do relógio de *Drosophila* é a destruição induzida pela luz de uma das proteínas-chave de regulação gênica (ver Figura 7-73).

A expressão de um conjunto de genes pode ser coordenada por uma única proteína

As células devem ser capazes de ativar e desativar os genes individualmente, porém também devem coordenar a expressão de grandes grupos de genes diferentes. Por exemplo, quando as células eucarióticas quiescentes recebem um sinal para dividirem-se, muitos genes não expressos até aquele momento são ativados conjuntamente para promover os eventos que possam levar à divisão celular (discutido no Capítulo 17). Uma das maneiras pelas quais as bactérias coordenam a expressão de um conjunto de genes é mantendo-os agrupados juntos em um *operon* sob o controle de um único promotor (ver Figura 7-34). Em eucariotos, entretanto, cada gene é transcrito a partir de um promotor separado.

Como, então, os eucariotos coordenam a expressão gênica? Essa é uma questão especialmente importante, porque, como vimos, a maioria das proteínas de regulação gênica atua como parte de um "comitê" de proteínas reguladoras, as quais são necessárias para expressar o gene na célula certa, no tempo certo, em resposta aos sinais certos e em um nível apropriado. Como então uma célula eucariótica pode ativar e desativar rápida e decisivamente grandes grupos de genes?

A resposta é que mesmo que o controle da expressão gênica seja combinatório, os efeitos de uma única proteína de regulação gênica ainda podem ser decisivos na ativação ou na desativação de um gene particular, simplesmente por completar a combinação necessária para maximizar a ativação ou a repressão daquele gene. Essa situação é análoga a ajustar o número final do segredo de um cofre: o cofre será aberto prontamente se os outros números tiverem sido previamente ajustados. Além disso, o mesmo número pode completar a com-

binação em diferentes cofres. De forma análoga, a adição de uma proteína particular pode ativar muitos genes diferentes.

Um exemplo em humanos é o controle da expressão gênica pela *proteína receptora de glicocorticoides*. Para ligar-se aos sítios regulador no DNA, essa proteína de regulação gênica precisa primeiramente formar um complexo com uma molécula de um hormônio esteroide glicocorticoide, como o cortisol (ver Figura 15-13). Esse hormônio é liberado no corpo durante horas de fome e de intensa atividade física e, entre suas outras atividades, ele estimula as células do fígado a aumentarem a produção de glicose a partir de aminoácidos e de outras pequenas moléculas. Em resposta, as células do fígado aumentam a expressão de genes diferentes, codificando para enzimas metabólicas e outros produtos. Embora todos esses genes possuam regiões de controle diferentes e complexas, a sua expressão máxima depende da ligação do complexo receptor hormônio-glicocorticoide em um sítio regulador no DNA de cada gene. Quando o corpo se recupera e o hormônio não está mais presente, a expressão de cada um desses genes diminui para o seu nível normal no fígado. Dessa maneira, uma única proteína de regulação gênica pode controlar a expressão gênica de muitos genes diferentes (**Figura 7-74**).

Os efeitos de um receptor de glicocorticoides não estão confinados às células do fígado. Em outros tipos celulares, a ativação dessa proteína de regulação gênica por hormônios também promove alterações nos níveis de expressão de muitos genes; os genes afetados, entretanto, frequentemente são diferentes daqueles afetados nas células do fígado. Como vimos, cada tipo celular possui um conjunto individualizado de proteínas de regulação gênica e, devido ao controle combinatório, essas proteínas afetam criticamente a ação do receptor de glicocorticoides. Como o receptor é capaz de associar-se com muitos conjuntos diferentes de proteínas de regulação gênica de tipos celulares específicos, ele pode produzir um espectro distinto de efeitos em cada tipo celular.

A expressão de uma proteína de regulação gênica crítica pode desencadear a expressão de uma bateria inteira de genes situados *downstream* no cromossomo

A habilidade para ativar ou desativar muitos genes de forma coordenada não é importante somente na regulação dia-a-dia da função celular. Também é a maneira pela qual as células eucarióticas se diferenciam em tipos celulares especializados durante o desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento das células musculares oferece um exemplo surpreendente.

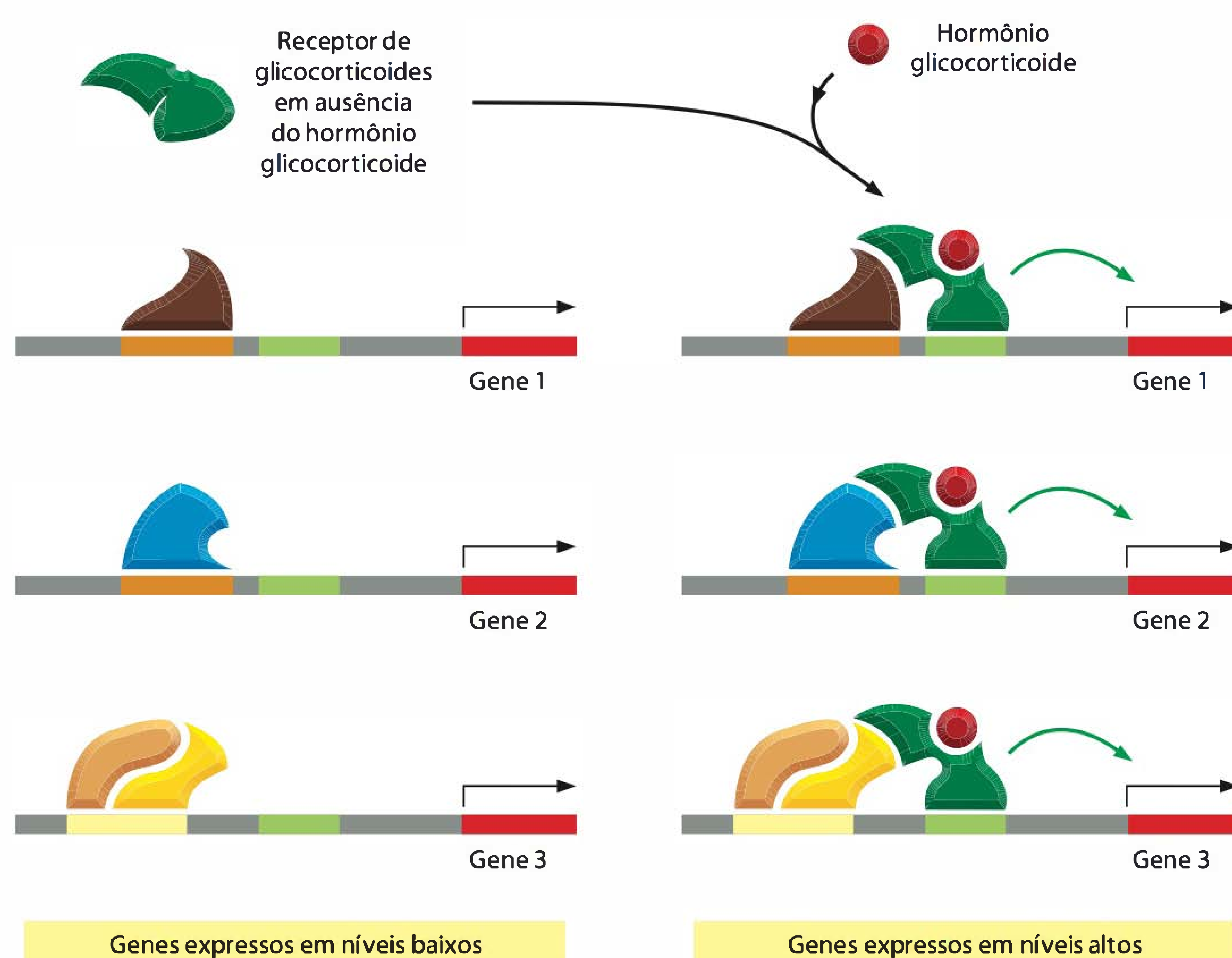


Figura 7-74 Uma única proteína de regulação gênica pode coordenar a expressão de vários genes diferentes. A ação do receptor de glicocorticoides está ilustrada esquematicamente. À *esquerda* está uma série de genes, cada qual possuindo várias proteínas de ativação gênica ligadas a sua região reguladora. Entretanto, essas proteínas ligadas não são suficientes para sozinhas ativarem totalmente a transcrição. À *direita* é mostrado o efeito de adicionar uma proteína de regulação gênica adicional – o receptor de glicocorticoides em um complexo com o hormônio glicocorticoide – que pode se ligar à região reguladora de cada gene. O receptor de glicocorticoides completa a combinação de proteínas de regulação gênica necessária à iniciação máxima da transcrição, e os genes são agora ativados como um conjunto. Na ausência do hormônio, o receptor de glicocorticoides torna-se indisponível para ligar-se ao DNA.

Além de ativar a expressão gênica, a forma ligada ao hormônio do receptor de glicocorticoides reprime a transcrição de certos genes, dependendo das proteínas de regulação gênica previamente presentes em suas regiões controladoras. O efeito do receptor de glicocorticoides em qualquer dado gene depende, dessa forma, do tipo celular, das proteínas de regulação gênica contidas nele e da região reguladora do gene. A estrutura da porção de ligação ao DNA do receptor de glicocorticoides é mostrada na Figura 7-16.

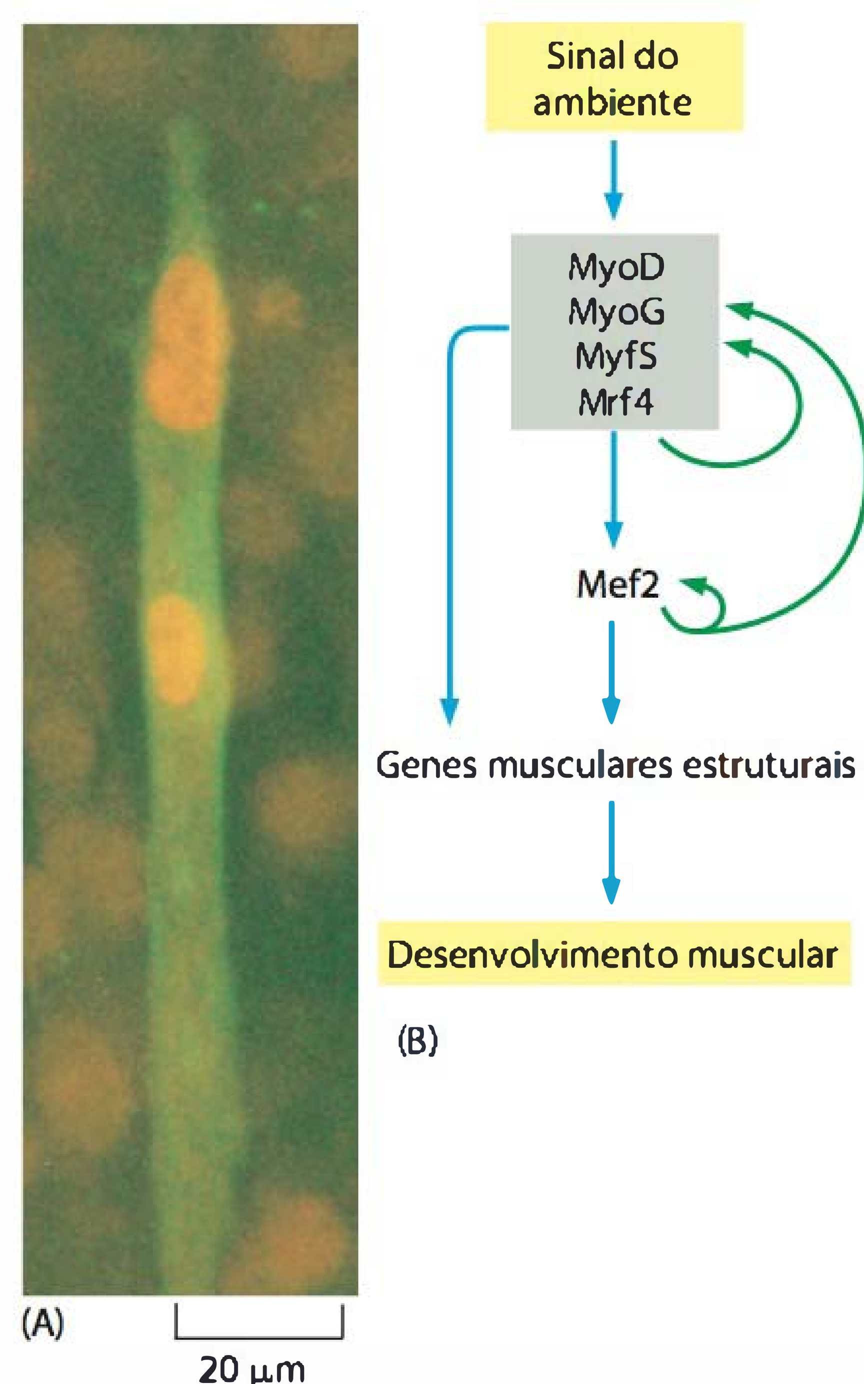


Figura 7-75 Função das proteínas de regulação miogênicas no desenvolvimento muscular. (A) O efeito da expressão da proteína MyoD em fibroblastos. Como mostrado nesta micrografia imunofluorescente, fibroblastos da pele de um embrião de galinha foram convertidos em células musculares pela expressão induzida experimentalmente do gene *MyoD*. Os fibroblastos que foram induzidos a expressar o gene *MyoD* fusionaram-se para formar células multinucleadas alongadas semelhantes às musculares, as quais estão coradas em *verde* com um anticorpo que detecta uma proteína específica de músculo. Fibroblastos que não expressam o gene *MyoD* estão fracamente visíveis ao fundo. (B) Um esquema simplificado para algumas das proteínas de regulação envolvidas no desenvolvimento do músculo esquelético. Sinais externos resultam na síntese de quatro proteínas de regulação gênica miogênicas intimamente relacionadas, MyoD, Myf5, MyoG e Mrf4. Essas proteínas de regulação gênica ativam a sua própria síntese assim como a de outras proteínas em uma série complexa de circuitos de retroalimentação, somente algumas das quais estão mostradas na figura. Estas proteínas por sua vez ativam diretamente a transcrição de genes musculares estruturais, assim como a do gene *Mef2*, o qual codifica uma proteína de regulação gênica adicional. Mef2 atua em combinação com as proteínas miogênicas em um circuito de retroalimentação positiva que auxilia a manter a transcrição dos genes miogênicos. (A, cortesia de Stephen Tapscott e Harold Weintraub; B, adaptada de J. D. Molkentin e E. N. Olson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9366-9373, 1996. Com permissão da National Academy of Sciences.)

Como descrito no Capítulo 16, uma célula muscular esquelética de mamífero é uma célula gigante altamente diferenciada, formada pela fusão de muitas células precursoras musculares chamadas de *mioblastos*, e dessa forma contém muitos núcleos. A célula muscular madura sintetiza um grande número de proteínas características, incluindo vários tipos de actina, miosina, tropomiosina e troponina (todas parte do aparato contrátil), de creatina-fosfocinase (para o metabolismo especializado das células musculares) e de receptores de acetilcolina (para tornar a membrana sensível à estimulação dos nervos). Nos mioblastos em proliferação, essas proteínas específicas de músculos e seus mRNAs estão ausentes, ou se apresentam em concentrações muito baixas. Assim que os mioblastos começam a fusionarem-se uns com os outros, os genes correspondentes são todos ativados de forma coordenada como parte de uma transformação geral do padrão de expressão gênica.

Esse programa inteiro de diferenciação muscular pode ser desencadeado em cultura a partir de fibroblastos da pele e de certos outros tipos celulares, pela introdução de qualquer uma de uma família de proteínas hélice-alça-hélice – as assim chamadas proteínas miogênicas (MyoD, Myf5, MyoG e Mrf4) – que normalmente são expressas somente nas células musculares (**Figura 7-75**A). Os sítios de ligação para essas proteínas reguladoras estão presentes em sequências de DNA reguladoras adjacentes a muitos genes musculares específicos, e dessa forma as proteínas miogênicas ativam diretamente a transcrição desses genes. Além disso, as proteínas miogênicas estimulam a sua própria transcrição, assim como a de várias outras proteínas de regulação gênica envolvidas no desenvolvimento muscular, criando uma série elaborada de circuitos de retroalimentação positiva e alimentação direta que amplificam e mantêm o programa de desenvolvimento muscular, mesmo após o sinal inicial ter se dissipado (Figura 7-75B; ver também Capítulo 22).

É provável que os tipos celulares convertidos em células musculares pela adição das proteínas miogênicas já tenham acumulado várias proteínas de regulação gênica que podem cooperar com as proteínas miogênicas na ativação dos genes musculares específicos. Outros tipos celulares não são convertidos em músculos pela miogenina ou suas parentes; essas células presumivelmente não acumulam as outras proteínas de regulação gênica necessárias.

A conversão de um tipo celular (fibroblasto) em outro (músculo esquelético) por meio de uma única proteína de regulação gênica reenfatiza um dos mais importantes princípios discutidos neste capítulo: as grandes diferenças existentes entre os tipos celulares – em tamanho, forma, composição química e função – podem ser produzidas por diferenças na expressão gênica.

O controle gênico combinatório cria muitos tipos celulares diferentes nos eucariotos

Já discutimos como múltiplas proteínas de regulação gênica podem atuar combinadas para regular a expressão de um gene individual. Mas, como o exemplo das proteínas miogênicas mostra, o controle gênico combinatório significa mais do que isso: não somente cada gene responde às muitas proteínas de regulação gênica que o controlam, mas também cada proteína de regulação gênica contribui no controle de muitos genes. Além disso, embora algumas proteínas de regulação gênica sejam específicas de um único tipo celular, a maioria está ativada em uma ampla variedade de tipos celulares, em vários sítios no corpo e em muitas épocas do desenvolvimento. Esse ponto é ilustrado esquematicamente na **Figura 7-76**, a qual mostra como o controle gênico combinatório torna possível gerar uma grande parte da complexidade biológica mesmo com relativamente poucas proteínas de regulação gênica.

Com o controle combinatório, uma dada proteína de regulação gênica não tem necessariamente uma única função simples e definível como comandante de uma bateria particular de genes ou como especificadora de um determinado tipo celular. Em vez disso, as proteínas de regulação gênica podem ser comparadas às palavras de uma linguagem: elas podem ser usadas com diferentes significados em uma grande variedade de contextos e raramente são utilizadas sozinhas; é a combinação bem-escolhida que transmite a informação que especifica um evento gênico regulador.

Um requisito do controle combinatório é o de que muitas proteínas de regulação gênica precisam ser capazes de trabalhar juntas a fim de influenciar a taxa final de transcrição. Experimentos demonstram que mesmo proteínas de regulação gênica não-relacionadas, de espécies eucarióticas amplamente diferentes, podem cooperar quando introduzidas na

mesma célula. Essa situação reflete o alto grau de conservação da maquinaria de transcrição. Parece que o modo de ação multifuncional e combinatório das proteínas de regulação gênica colocou uma rígida restrição em sua evolução: elas precisam interagir com outras proteínas de regulação gênica, os fatores gerais de transcrição, o Mediador, a RNA-polimerase e as enzimas modificadoras da cromatina.

Uma consequência importante do controle gênico combinatório é que o efeito da adição de uma nova proteína de regulação gênica em uma célula dependerá do passado histórico da célula, uma vez que essa história irá determinar quais proteínas de regulação gênica já estão presentes. Assim, durante o desenvolvimento uma célula pode acumular uma série de proteínas de regulação gênica que, inicialmente, não precisam alterar a expressão gênica. A adição dos membros finais da combinação necessária de proteínas de regulação gênica completa a mensagem reguladora, podendo levar a grandes alterações na expressão gênica. Tal esquema, como vimos, auxilia a explicar como a adição de uma única proteína de regulação gênica a um fibroblasto pode produzir a dramática transformação de um fibroblasto em uma célula muscular. Ela também pode ser responsável pela diferença importante, discutida no Capítulo 22, entre o processo de *determinação celular*, no qual uma célula se compromete com um destino de desenvolvimento particular, e o processo de *diferenciação celular*, no qual uma célula comprometida expressa suas características especializadas.

A formação de um órgão inteiro pode ser desencadeada por uma única proteína de regulação gênica

Vimos que, mesmo que o controle combinatório seja a norma para os genes eucarióticos, uma única proteína de regulação gênica, se completar uma combinação apropriada, pode ser decisiva em ativar ou desativar um conjunto completo de genes, e vimos ainda como isso

Figura 7-76 A importância do controle gênico combinatório para o desenvolvimento. Combinações de umas poucas proteínas de regulação gênica podem gerar muitos tipos celulares durante o desenvolvimento. Neste esquema idealizado simples, a "decisão" de fazer uma de duas proteínas de regulação gênica (mostradas como *círculos* numerados) é feita após cada ciclo de divisão celular. Ao perceber a sua posição relativa no embrião, a célula-filha voltada ao lado *esquerdo* do embrião é sempre induzida a sintetizar as proteínas numeradas pares de cada par, enquanto que a célula-filha voltada ao lado *direito* do embrião é sempre induzida a sintetizar as proteínas numeradas ímpares. A produção de cada proteína de regulação gênica é supostamente autoperpetuada uma vez que tenha sido iniciada (ver Figura 7-68). Dessa forma, pela memória celular, a especificação combinatória final é construída passo por passo. Neste exemplo puramente hipotético, oito tipos celulares finais (G-N) foram criados usando-se cinco proteínas de regulação gênica diferentes.

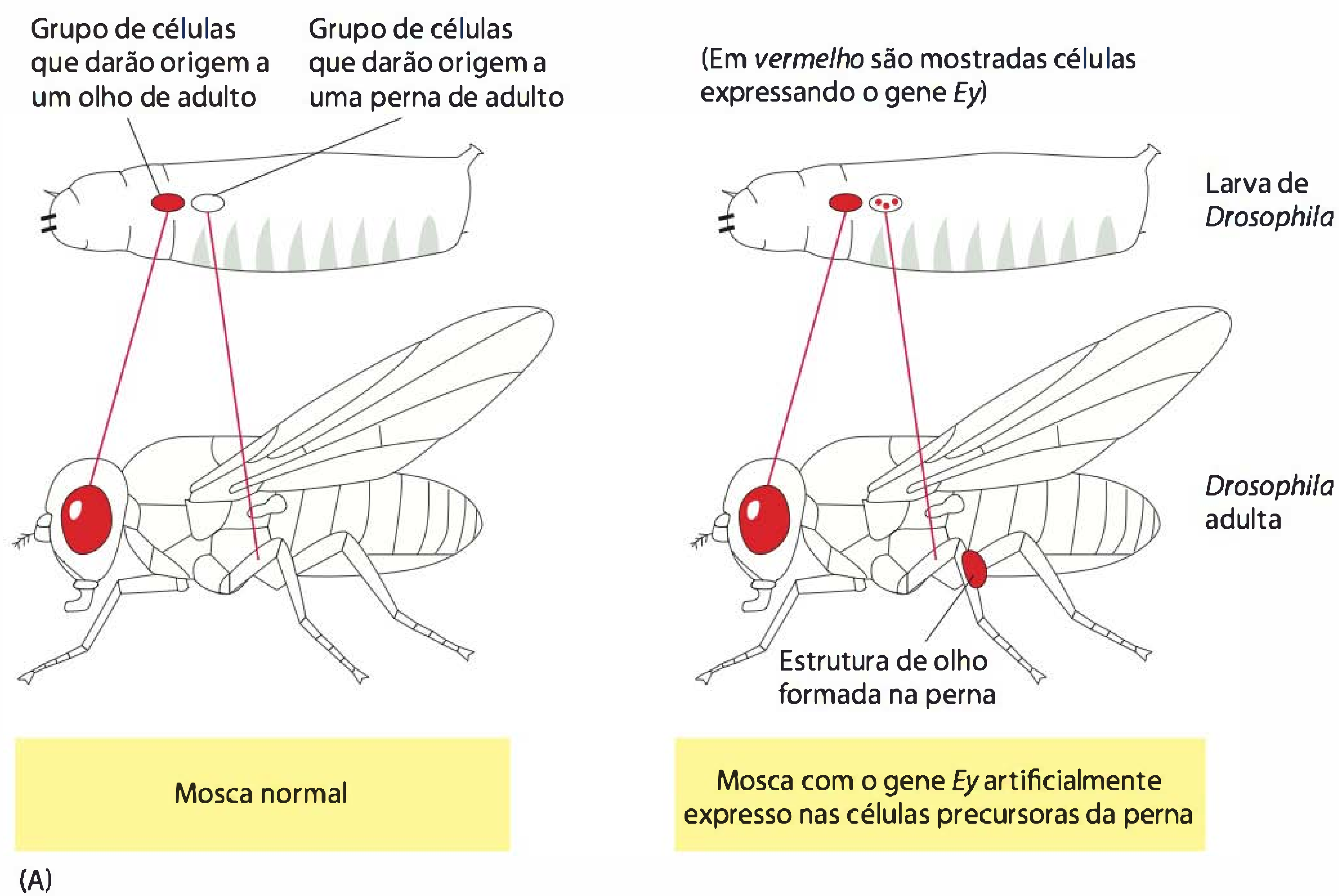




Figura 7-77 A expressão do gene Ey de *Drosophila* em células precursoras da perna desencadeia o desenvolvimento de um olho na perna. (A) Diagramas simplificados mostrando o resultado de quando uma larva de mosca contém o gene *Ey* expresso normalmente (*esquerda*) ou um gene *Ey* que é adicionalmente expresso de forma artificial nas células que normalmente darão origem ao tecido da perna (*direita*). (B) Fotografia de uma perna anormal que contém um olho em localização errada (ver também Figura 22-2). (B, cortesia de Walter Gehring.)

pode converter um tipo celular em outro. Um desdobramento dramático desse princípio vem de estudos sobre o desenvolvimento do olho em *Drosophila*, camundongos e humanos. Aqui, uma proteína de regulação gênica, chamada de Ey (abreviatura para *Eyeless*, sem olhos, em inglês) em moscas e Pax6 em vertebrados, é crucial. Quando expressa no contexto correto, Ey pode desencadear a formação não somente de um único tipo celular, mas de todo um órgão (um olho), composto de diferentes tipos de células, todas apropriadamente organizadas no espaço tridimensional.

A evidência mais notável da função de Ey vem de experimentos em moscas-da-fruta, nos quais o gene *Ey* é expresso de forma artificial precocemente no desenvolvimento em grupos de células que normalmente irão formar partes da perna. Essa expressão gênica anormal induz o desenvolvimento de olhos nas pernas (**Figura 7-77**).

O olho da *Drosophila* é composto de milhares de células, e a questão de como uma proteína reguladora coordena a especificação de toda uma ordenação em um tecido é um tópico central da *biologia do desenvolvimento*. Como discutido no Capítulo 22, ela envolve interações célula-célula assim como proteínas de regulação gênica intracelulares. Aqui notamos que Ey controla diretamente a expressão de muitos outros genes pela ligação a suas regiões reguladoras. Alguns dos genes controlados por Ey codificam eles próprios proteínas de regulação gênica que, por sua vez, controlam a expressão de outros genes. Além disso, alguns desses genes reguladores atuam no próprio *Ey* para criar um circuito de retroalimentação positiva que garante a síntese continuada da proteína Ey enquanto as células dividem-se e aumentam a sua diferenciação (**Figura 7-78**). Dessa maneira, a ação de apenas uma proteína reguladora pode ativar uma cascata de proteínas de regulação gênica e de mecanismos de interação célula-célula, cujas ações resultam em um grupo organizado de tipos diferentes de células. Podemos começar a imaginar como, por repetidas aplicações desse princípio, um organismo complexo é construído parte por parte.

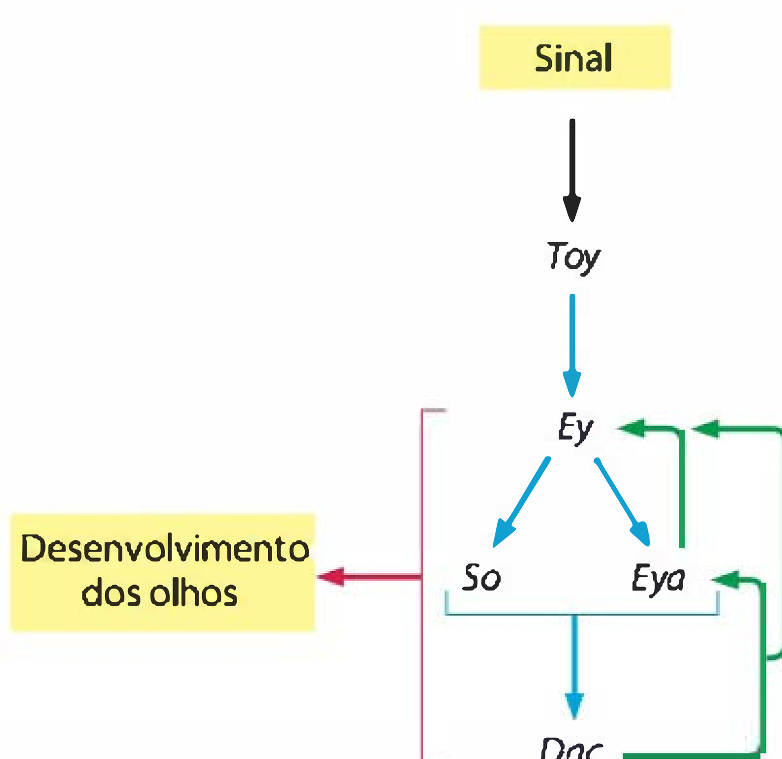


Figura 7-78 Proteínas de Regulação Gênica que especificam o desenvolvimento de olhos em *Drosophila*. *Toy* (*Twin of eyeless*, *"gêmeos sem olhos"*, em inglês) e *Ey* (*Eyeless*, *"sem olhos"* em inglês) codificam proteínas de regulação gênica semelhantes, Toy e Ey, ambas as quais, quando expressas ectopicamente, podem desencadear o desenvolvimento de olhos. No desenvolvimento de olho normal, a expressão de *Ey* necessita do gene *Toy*. Uma vez que a transcrição é ativada por Toy, Ey ativa a transcrição de *So* (*Sine oculis*) e *Eya* (*Eyes absent*, *"olhos ausentes"*, em inglês), os quais atuam juntos para expressar o gene *Dac* (*Dachshund*). Como indicado pelas *setas verdes*, algumas das proteínas de regulação gênica formam circuitos de retroalimentação positiva que reforçam o comprometimento inicial com o desenvolvimento dos olhos. A proteína Ey é conhecida por ligar-se diretamente a muitos genes-alvo para o desenvolvimento dos olhos, incluindo aqueles codificantes para as lentes do cristalino, rodopsinas e outras proteínas fotorreceptoras. (Adaptada de T. Czerny et al., *Mol. Cell* 3:297-307, 1999. Com permissão de Elsevier.)

O padrão de metilação do DNA pode ser herdado quando as células de vertebrados se dividem

Até agora enfatizamos a regulação da transcrição gênica por proteínas que se associam com DNA. Entretanto, o próprio DNA pode ser covalentemente modificado, e nas seções subsequentes veremos que isso também fornece oportunidades para a regulação da expressão gênica. Nas células de vertebrados, a metilação da citosina fornece um mecanismo importante pelo qual os padrões de expressão são passados para a progênie celular. A forma metilada da citosina, 5-metilcitosina (5-metil C), correlaciona-se à citosina da mesma maneira que a timina correlaciona-se à uracila e, da mesma forma, a modificação não produz efeito sobre o pareamento de bases (**Figura 7-79**). A **metilação do DNA** vertebrado é restrita aos nucleotídeos de citosina (C) na sequência CG, que faz o pareamento de bases com a mesma sequência (na orientação oposta) na outra fita da hélice de DNA. Consequentemente, um mecanismo simples permite a existência de um padrão de metilação do DNA a ser herdado diretamente pelas fitas-filhas de DNA. Uma enzima chamada de *metiltransferase de manutenção* atua preferencialmente naquelas sequências CG que estão pareadas com uma sequência CG que já esteja metilada. Como resultado, o padrão de metilação do DNA da fita de DNA parental serve como molde para a metilação da fita-filha de DNA, tornando esse padrão diretamente herdável após a replicação do DNA (**Figura 7-80**).

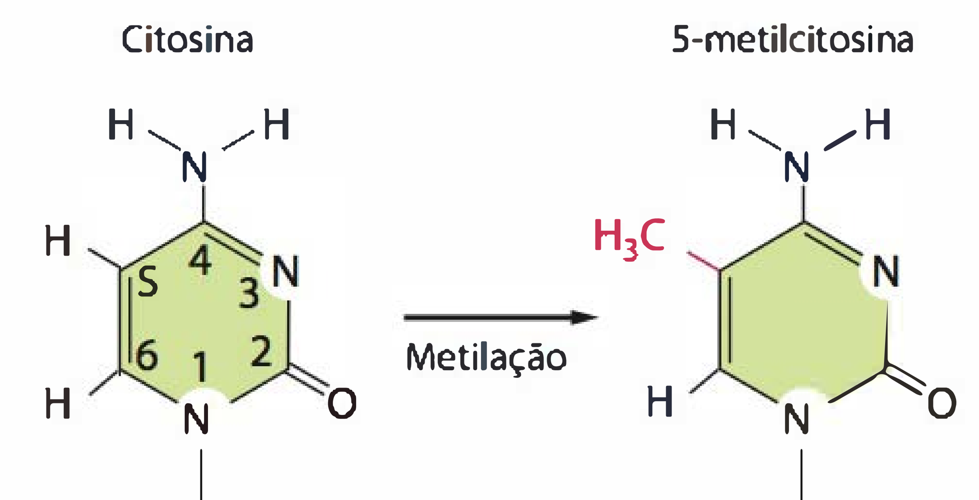
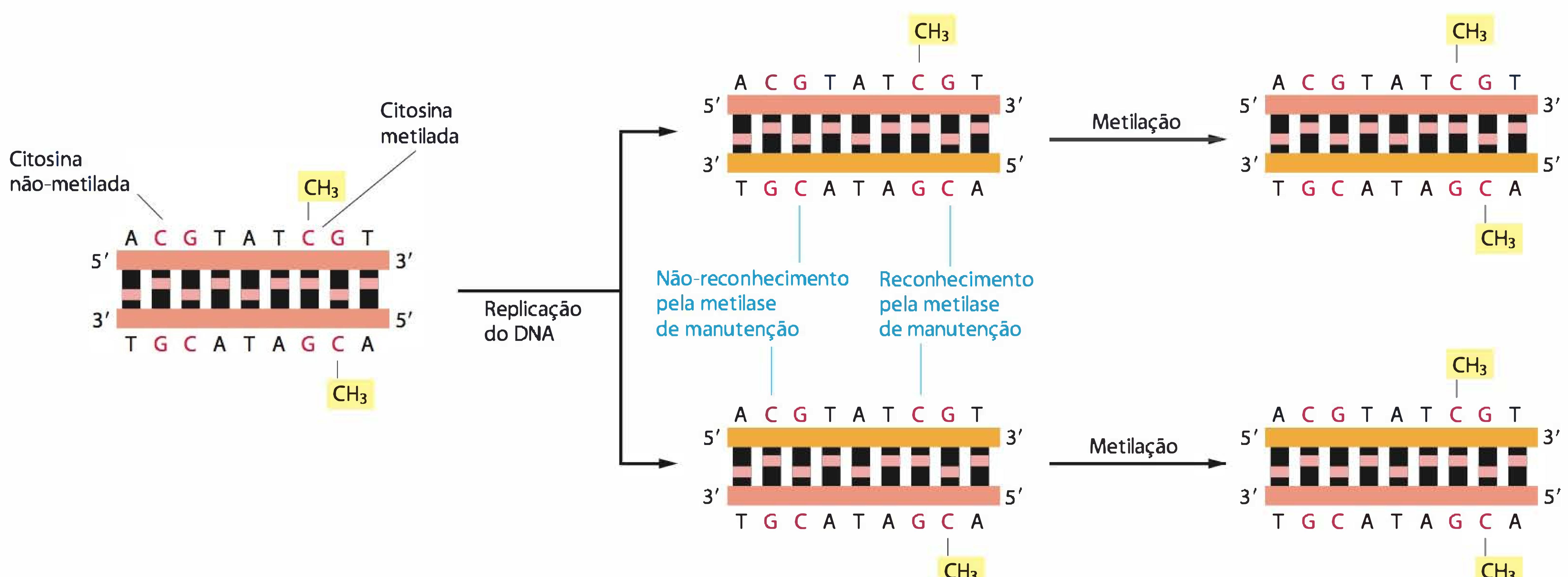


Figura 7-79 A formação de 5-metilcitosina ocorre pela metilação de uma base citosina na dupla-hélice do DNA. Em vertebrados, esse evento é confinado a nucleotídeos de citosina (C) selecionados na sequência CG.

A estabilidade dos padrões de herança de metilação do DNA pode ser explicada pelas metiltransferases de manutenção do DNA. Os padrões de metilação do DNA, entretanto, são dinâmicos durante o desenvolvimento dos vertebrados. Logo após a fertilização ocorre uma ampla onda de desmetilação do genoma, quando a grande maioria dos grupos metil é perdida do DNA. Essa desmetilação pode ocorrer tanto pela supressão da atividade das metiltransferases de manutenção do DNA, resultando em uma perda passiva de grupos metil durante cada ciclo de replicação do DNA, como por uma enzima de desmetilação específica. Mais tarde no desenvolvimento, novos padrões de metilação são estabelecidos por várias *metiltransferases de DNA de novo*, as quais são direcionadas ao DNA por proteínas de ligação ao DNA sequência-específicas, onde elas modificam dinucleotídeos CG não-metilados adjacentes. Uma vez que novos padrões de metilação sejam estabelecidos, eles podem ser propagados por meio das rodadas de replicação do DNA pelas metiltransferases de manutenção.

A metilação do DNA possui vários usos na célula vertebrada. Talvez a sua função mais importante seja a de trabalhar em conjunto com outros mecanismos de controle da expressão gênica para o estabelecimento de uma forma particularmente eficiente de expressão gênica que possa ser repassada para a progênie celular de forma segura (**Figura 7-81**). Essa combinação de mecanismos garante que os genes eucarióticos não necessários possam ser reprimidos em graus muito altos. Por exemplo, a taxa na qual um gene de vertebrados é transcrito pode variar 10^6 vezes entre um tecido e outro. Os genes de vertebrados não-expressos são muito menos "vazantes" em termos de transcrição do que os genes bacterianos, nos quais a maior diferença conhecida nas taxas de transcrição entre os estados de genes expressos e não-expressos é de aproximadamente 1.000 vezes.

Figura 7-80 Como os padrões de metilação do DNA são fielmente herdados. No DNA de vertebrados, uma grande fração dos nucleotídeos citosina na sequência CG é metilada (ver Figura 7-79). Devido à existência de uma enzima metiladora direcionada por metil (a metiltransferase de manutenção), uma vez que o padrão de metilação do DNA é estabelecido, cada sítio de metilação é herdado na progênie do DNA, como mostrado.



Como a metilação do DNA auxilia na repressão gênica ainda não está elucidado em detalhes, mas dois mecanismos gerais foram esclarecidos. A metilação da região promotora de um gene ou de suas regiões reguladoras pode interferir diretamente com a ligação de proteínas necessárias para o início da transcrição. Além disso, a célula possui um repertório de proteínas que se ligam especificamente ao DNA metilado (ver Figura 7-81), bloqueando assim o acesso de outras proteínas. Um reflexo da importância da metilação do DNA nos humanos é o amplo envolvimento de erros nesse mecanismo na progressão do câncer (ver Capítulo 20).

Retomaremos ao tópico de silenciamento gênico pela metilação do DNA mais adiante neste capítulo, quando discutiremos a inativação do cromossomo X e outros exemplos de silenciamento gênico em grande escala. Primeiro, entretanto, descreveremos algumas outras maneiras pelas quais a metilação do DNA afeta os nossos genomas.

A impressão genômica necessita da metilação do DNA

As células de mamíferos são diploides, contendo um conjunto de genes herdado do pai e um conjunto de genes herdado da mãe. A expressão de uma pequena minoria de genes depende de ele ser herdado da mãe ou do pai: enquanto a cópia herdada do pai é ativa, a herdada da mão é silenciosa, ou vice-versa. Esse fenômeno é chamado de **impressão genômica**. O gene para *o fator-2 de crescimento semelhante à insulina* (*Igf2, insulin-like growth factor-2*) é um exemplo bem estudado de um gene impresso. O *Igf2* é necessário para o crescimento

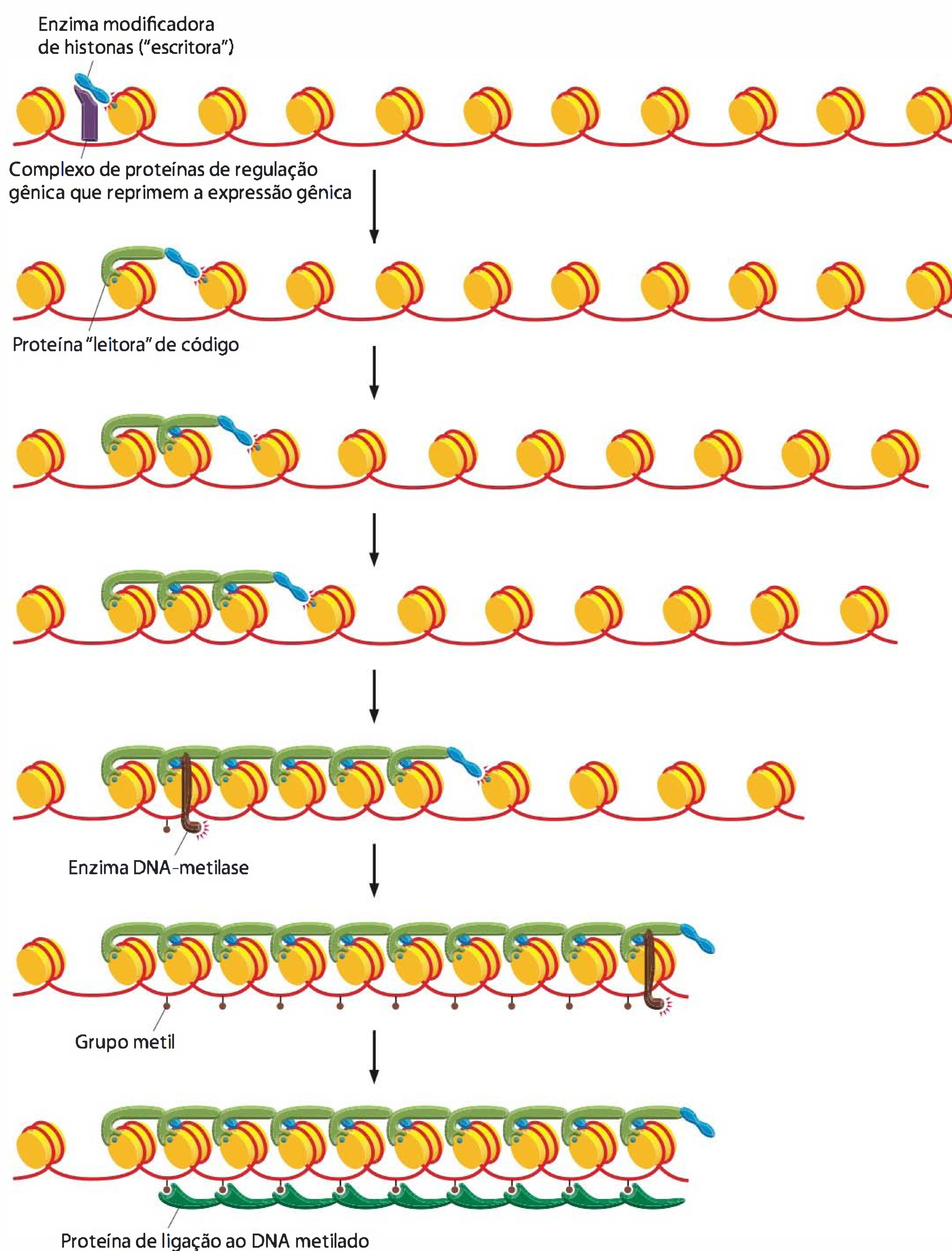


Figura 7-81 Múltiplos mecanismos contribuem para a repressão gênica estável. Neste exemplo esquemático, as proteínas leitoras e escritoras de histonas, sob a direção de proteínas de regulação gênica, estabelecem uma forma repressora de cromatina. Uma DNA-metilase *de novo* é atraída pela leitora de histonas e metilases próximas às citosinas no DNA, as quais são, por sua vez, ligadas por proteínas de ligação ao DNA metilado. Durante a replicação do DNA, algumas das histonas modificadas (ponto *azul*) serão herdadas por um cromossomo-filho, algumas pelo outro, e em cada filho elas podem induzir a reconstrução do mesmo padrão de modificações da cromatina (ver Figura 5-39). Ao mesmo tempo, o mecanismo mostrado na Figura 7-80 induzirá ambos os cromossomos-filhos a herdarem o mesmo padrão de metilação. Os dois mecanismos de herança serão mutuamente reforçados, se a metilação do DNA estimular a atividade da escritora de histonas. Este esquema pode explicar a herança pelas células-filhas das modificações tanto nas histonas como no DNA. Ele também é capaz de explicar a tendência de algumas modificações da cromatina de espalharem-se ao longo do cromossomo (ver Figura 4-45).

pré-natal, e camundongos que não expressam o *Igf2* nascem com a metade do tamanho de um camundongo normal. Entretanto, somente a cópia paterna do *Igf2* é transcrita e somente esta cópia do gene influencia no fenótipo. Como resultado, os camundongos com o gene *Igf2* paterno mutado são diminutos, enquanto que os camundongos com o gene *Igf2* materno mutado são normais.

Precocemente no embrião, os genes sujeitos à impressão são marcados por metilação, conforme derivados de cromossomos oriundos do esperma ou do óvulo. Dessa maneira, a metilação do DNA é usada como um marcador para distinguir duas cópias de um gene que, de outro modo, poderiam ser idênticas (**Figura 7-82**). Como os genes impressos não são afetados pela onda de desmetilação que ocorre em seguida, após a fertilização (ver p. 467), esse

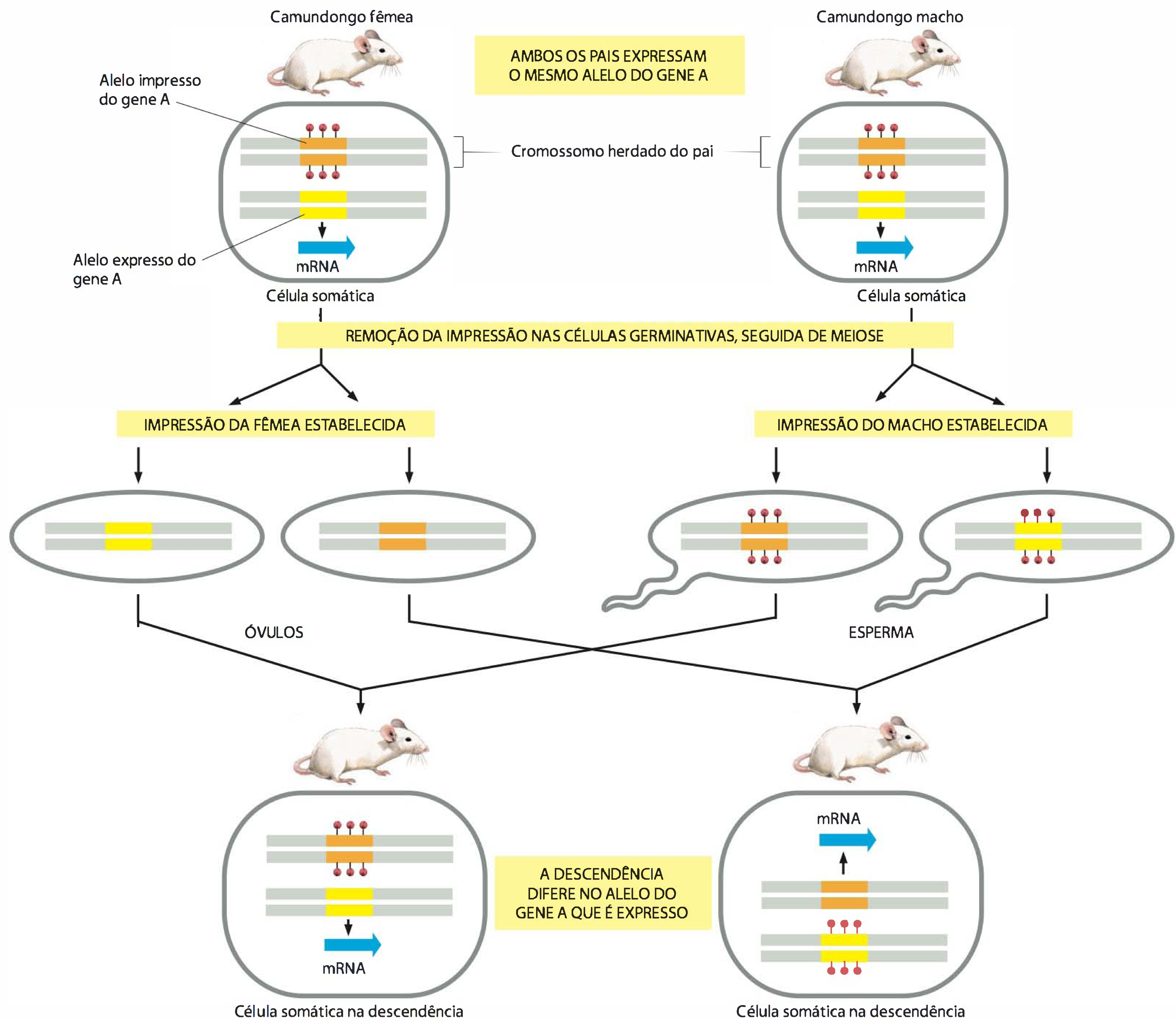


Figura 7-82 ***Imprinting* no camundongo.** A porção *mais acima* da figura mostra um par de cromossomos homólogos das células somáticas de dois camundongos adultos, um macho e uma fêmea. Neste exemplo, ambos os camundongos herdaram o homólogo de cima de seu pai e o homólogo de baixo de sua mãe, e a cópia paternal de um gene submetido a *imprinting* (indicado em *laranja*) está metilada, o que impede a sua expressão. A cópia derivada da mãe do mesmo gene (*amarelo*) é expressa. O restante da figura mostra o resultado de um cruzamento entre esses dois camundongos. Durante a meiose e a formação das células germinativas, as impressões são primeiramente apagadas e então refeitas (porção *mediana* da figura). Nos óvulos produzidos pelas fêmeas, nenhum alelo do gene A está metilado. No esperma do macho, ambos os alelos do gene A estão metilados. São mostrados *mais abaixo* na figura dois dos possíveis padrões de impressão herdados pela progênie de camundongos; o camundongo à *esquerda* possui o mesmo padrão de *imprinting* que seus pais, enquanto que o camundongo à *direita* possui o padrão oposto. Se os dois alelos do gene A são distintos, esses padrões de *imprinting* diferentes podem causar diferenças fenotípicas na progênie de camundongos, mesmo que carreguem exatamente as mesmas sequências de DNA dos dois alelos do gene A. O *imprinting* fornece uma exceção importante ao comportamento genético clássico, e acredita-se que várias centenas de genes de camundongo sejam afetados dessa maneira. Entretanto, a grande maioria dos genes de camundongo não é impressa, e assim as regras da herança mendeliana aplicam-se para a maior parte do genoma de camundongos.

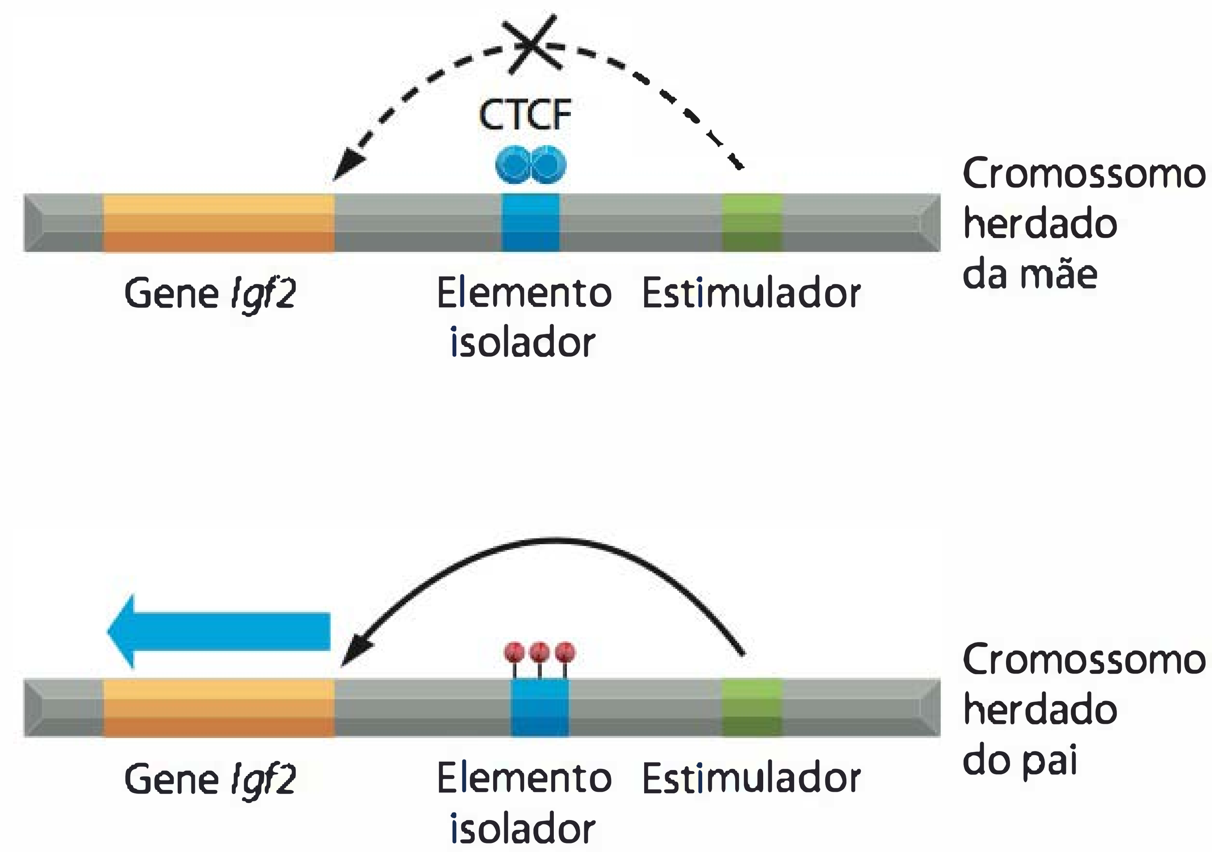


Figura 7-83 Mecanismo de *imprinting* do gene *Igf2* de camundongos. Nos cromossomos herdados da fêmea, uma proteína chamada de CTCF liga-se a um isolador (ver Figura 7-62), bloqueando a comunicação entre o estimulador (*verde*) e o gene *Igf2* (*laranja*). Dessa forma, IGF2 não é expressa a partir do cromossomo herdado da mãe. Devido *ao imprinting*, o isolador no cromossomo derivado do macho é metilado; isso inativa o isolador pelo bloqueio da ligação da proteína CTCF, e permite ao estimulador ativar a transcrição do gene *Igf2*. Em outros exemplos de *imprinting*, a metilação bloqueia a expressão gênica por interferir com a ligação de proteínas necessárias à transcrição dos genes.

marcador possibilita que células somáticas "relembrem" a origem parental de cada uma das duas cópias e, consequentemente, regulem a sua expressão de forma apropriada. Na maioria das situações, o *imprint* de metil silencia a expressão de genes próximos. Em alguns casos, entretanto, o *imprint* de metil pode ativar a expressão de um gene. No caso do *Igf2*, por exemplo, a metilação de um elemento isolador (ver Figura 7-62) no cromossomo derivado paterno bloqueia a sua função e permite que um estimulador distante ative a transcrição do gene *Igf2*. No cromossomo derivado materno, o isolador não é metilado, e o gene *Igf2*, portanto, não é transcrito (**Figura 7-83**).

Por que o *imprintig* existe é um completo mistério. Em vertebrados, ela é restrita aos mamíferos placentários, e todos os genes que sofreram *imprintig* estão envolvidos no desenvolvimento fetal. Uma ideia é a de que o *imprintig* reflete um meio-termo na batalha evolutiva entre os machos querendo produzir proles maiores e as fêmeas querendo limitar o tamanho da prole. Qualquer que seja o objetivo, o *imprintig* fornece uma evidência surpreendente de que outras características do DNA, que não a sua sequência de nucleotídeos, podem ser herdadas.

As ilhas ricas em CG estão associadas a muitos genes em mamíferos

Devido à maneira de trabalhar das enzimas de reparo do DNA, os nucleotídeos C metilados no genoma tendem a ser eliminados durante o curso da evolução. A desaminação acidental de um C não-metilado origina um U (ver Figura 5-45), o qual não está normalmente presente no DNA e, assim, é reconhecido facilmente pela enzima de reparo do DNA uracila DNA-glicosilase, sendo excisado e então substituído por um C (como discutido no Capítulo 5). Contudo, uma desaminação acidental de um 5-metil C não pode ser reparada dessa maneira, pois o produto da desaminação é um T e, portanto, é indistinguível dos outros nucleotídeos T não-mutantes do DNA. Embora exista um sistema enzimático especial para remover os nucleotídeos T mutantes, muitas das desaminações escapam da detecção, de maneira que aqueles nucleotídeos C no genoma que são metilados tendem a mutar para T durante o tempo evolutivo.

Durante o curso da evolução, mais de 3 de cada 4 CGs foram perdidos dessa forma, deixando os vertebrados com uma considerável deficiência desse dinucleotídeo. As sequências CG que permaneceram estão desigualmente distribuídas no genoma; elas estão presentes em quantidades 10 a 20 vezes maiores que a sua densidade média em regiões selecionadas, chamadas de **ilhas CG**, que apresentam de 1.000 a 2.000 pares de nucleotídeos. Com algumas exceções importantes, essas ilhas parecem permanecer não-metiladas em todos os tipos celulares. Elas frequentemente circundam os promotores dos chamados *genes housekeeping* – aqueles genes que codificam para muitas proteínas essenciais para a viabilidade celular e que são expressas na maioria das células (**Figura 7-84**).

A distribuição das ilhas CG (também chamadas de ilhas CpG, para diferenciar os dinucleotídeos CG dos pares de nucleotídeos CG) pode ser explicada se assumimos que a metilação CG foi adotada nos vertebrados principalmente como uma maneira de manter o DNA em um estado transcricionalmente inativo (ver Figura 7-81). Nos vertebrados, novas mutações de metil-C para T podem ser transmitidas para a próxima geração somente se elas ocorrerem na linhagem germinativa, a linhagem celular que dá origem ao esperma e aos óvulos. A maioria do DNA nas células germinativas de vertebrados é inativa e altamente metilada. Por longos períodos de tempo evolutivo, as sequências metiladas CG nas regiões inativas

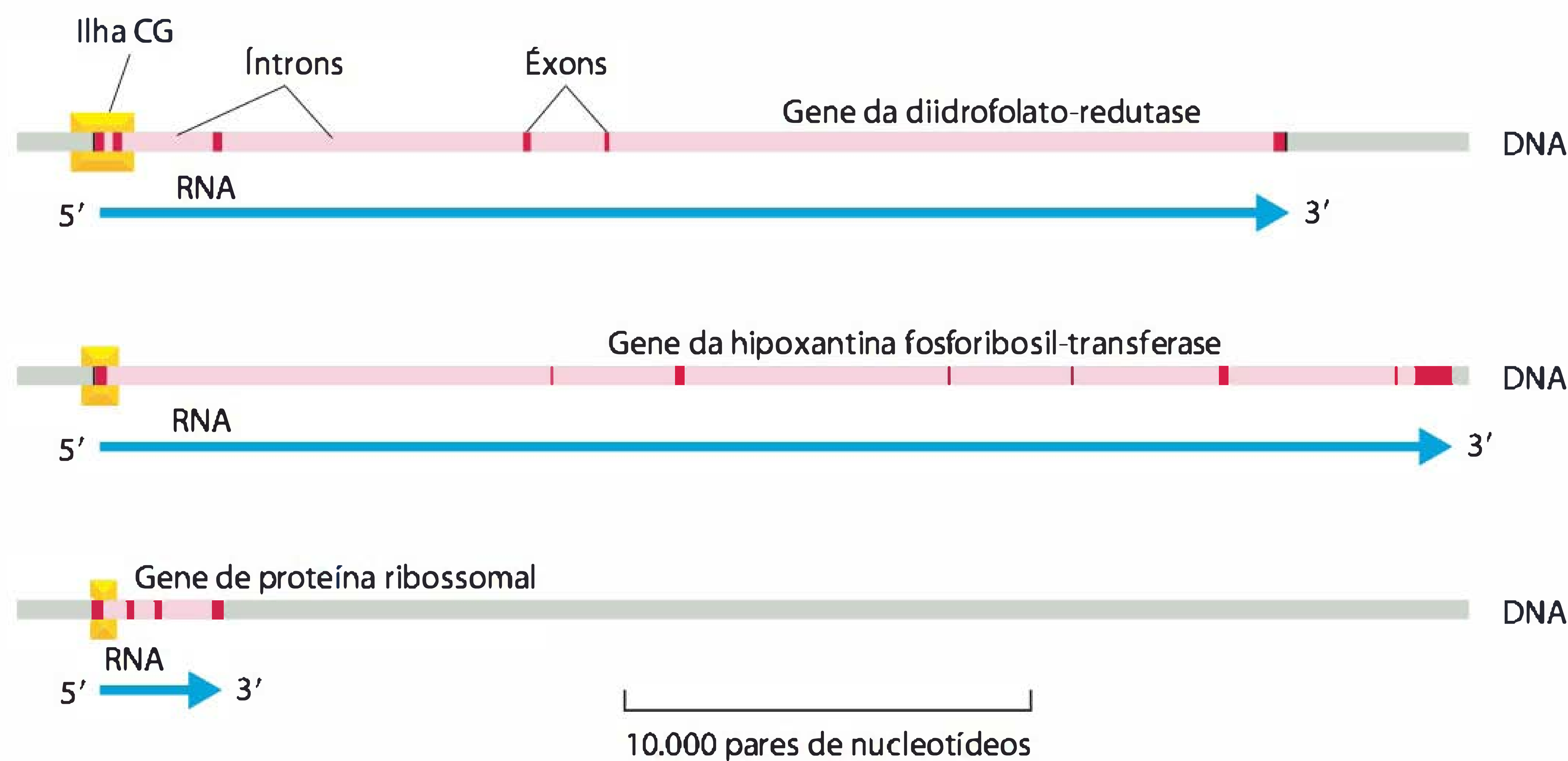


Figura 7-84 Ilhas CG ao redor do promotor em três genes *housekeeping* de mamíferos. As *caixas amarelas* mostram a extensão de cada ilha. Como para a maioria dos genes em mamíferos (ver Figura 6-25), os éxons (*vermelho-escuro*) são muito curtos em relação aos íntrons (*vermelho-claro*). (Adaptada de A. P. Bird, *Trends Genet*. 3:342-347, 1987. Com permissão de Elsevier.)

foram, presumivelmente, perdidas por eventos de desaminação espontânea que não foram apropriadamente reparados. Entretanto, os promotores de genes que permanecem ativos nas linhagens germinativas (incluindo a maioria dos genes *housekeeping*) são mantidos não-metilados e, portanto, as desaminações espontâneas de Cs que ocorram dentro deles podem ser reparadas corretamente. Tais regiões são preservadas nas células dos vertebrados atuais como ilhas CG (**Figura 7-85**). Além disso, qualquer mutação de uma sequência CG no genoma que destruísse a função ou a regulação de um gene no adulto seria selecionada contra, e algumas ilhas CG são simplesmente o resultado de uma densidade maior que o normal de sequências CG críticas para esses genes.

O genoma de mamíferos contém em torno de 20.000 ilhas CG. A maioria das ilhas marca os finais 5′ das unidades de transcrição e assim, presumivelmente, dos genes. A presença das ilhas CG, dessa forma, frequentemente fornece uma maneira conveniente de identificação dos genes nas sequências de DNA dos genomas de vertebrados.

Mecanismos epigenéticos garantem que padrões estáveis de expressão gênica possam ser transmitidos para as células-filhas

Como vimos, uma vez que uma célula em um organismo se diferencia em um tipo celular particular, ela geralmente permanece especializada daquela maneira; se ela se divide, as suas filhas herdam o mesmo caráter de especialização. Por exemplo, células do fígado, células pigmentares e células endoteliais (discutidas no Capítulo 23) dividem-se muitas vezes na vida de um indivíduo, cada uma delas produzindo acuradamente células-filhas do mesmo tipo. Tais células diferenciadas precisam lembrar o seu padrão específico de expressão gênica e passá-lo a sua progênie através de todas as divisões celulares subsequentes.

Já foram descritas muitas maneiras de possibilitar às células-filhas "lembrarem-se" a que tipo de células elas supostamente correspondem. Uma das mais simples é por um circuito de retroalimentação positiva no qual uma proteína de regulação gênica chave ativa, direta ou indiretamente, a transcrição do seu próprio gene (ver Figuras 7-68 e 7-69). Interligar circuitos de retroalimentação positiva fornece ainda mais estabilidade pelo tamponamento do circuito contra as flutuações dos níveis de qualquer proteína de regulação gênica (Figuras 7-75B e 7-78). Também vimos anteriormente que a metilação do DNA pode servir como uma maneira de propagar os padrões de expressão gênica para os descendentes (ver Figura 7-80).

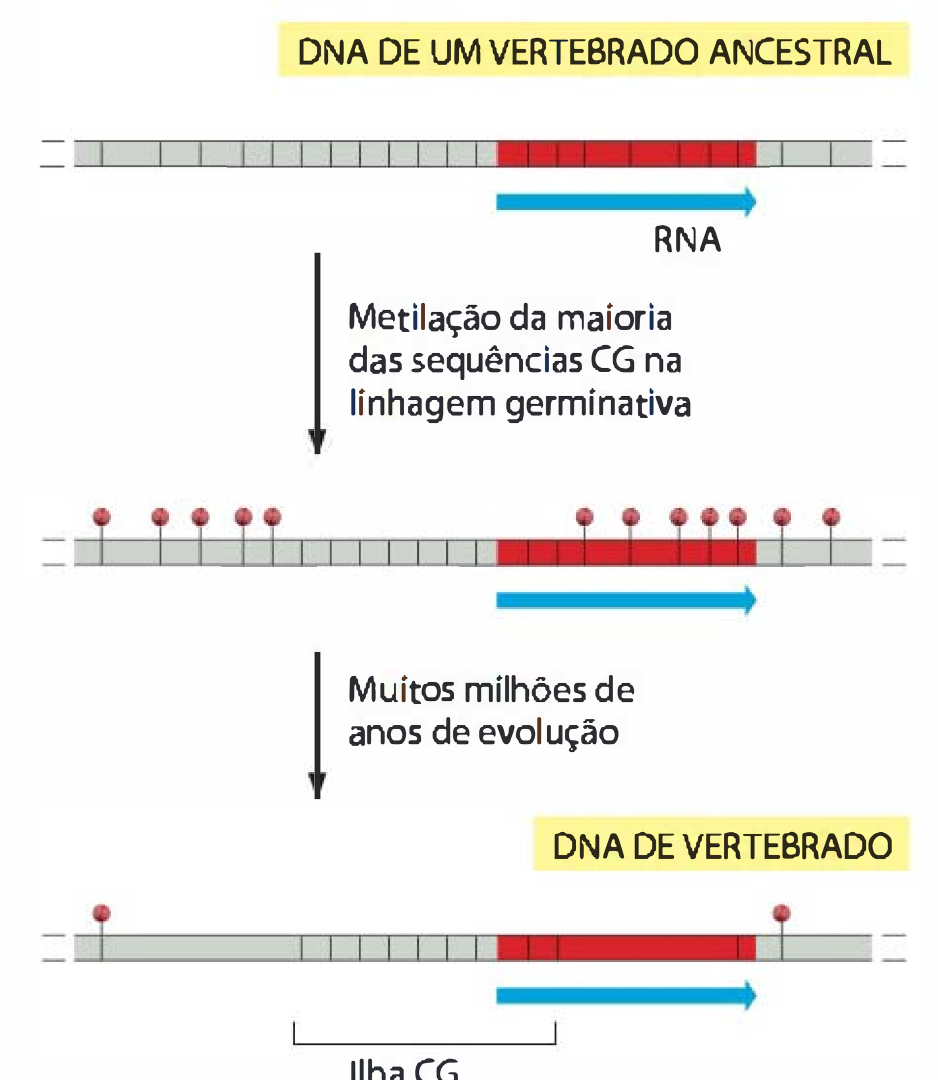


Figura 7-85 Mecanismo para explicar a deficiência geral acentuada de sequências CG e o seu agrupamento em ilhas CG nos genomas de vertebrados. Uma *linha negra* marca a localização de um dinucleotídeo CG na sequência de DNA, enquanto um "*pirulito*" vermelho indica a presença de um grupo metil no dinucleotídeo CG. As sequências CG que se situam nas sequências reguladoras dos genes transcritos nas células germinativas não são metiladas e, assim, tendem a ser retidas na evolução. Sequências metiladas CG, por outro lado, tendem a serem perdidas pela desaminação de 5-metil C para T, a não ser que a sequência CG seja crítica para a sobrevivência.

Os circuitos de retroalimentação positiva e a metilação do DNA são comuns tanto em bactérias como em eucariotos; mas os eucariotos também dispõem de outras maneiras de manter um estado diferenciado por muitas gerações celulares. Como vimos no Capítulo 4, a estrutura da cromatina pode por si própria ser acuradamente propagada da célula parental para a filha. Existem muitos mecanismos para isso, mas o mais simples tem como base as modificações covalentes das histonas. Como vimos, essas modificações formam um "código de histonas", com diferentes padrões de modificação servindo como sítios de ligação para diferentes proteínas leitoras. Se essas proteínas, por sua vez, servem como (ou atraem) enzimas escritoras que replicam os mesmos padrões de modificação que as atraíram no primeiro momento, então a distribuição das regiões de cromatina ativa e silenciosa pode ser acuradamente propagada (ver Figura 5-39). De certa forma, a modificação autossustentada de histonas é uma forma de circuito de retroalimentação positiva que está amarrada ao DNA, mas que não necessita da participação das sequências envolvidas.

A habilidade de uma célula-filha de reter uma memória do padrão de expressão gênica que estava presente na célula parental é um exemplo de **herança epigenética**. Esse termo possui significados levemente diferentes em ramos distintos da biologia, mas será utilizado em seu sentido mais amplo a fim de cobrir qualquer diferença no fenótipo de uma célula ou organismo que não resulte de mudanças na sequência nucleotídica do DNA (ver Figura 4-35). Acabamos de discutir três dos mais importantes mecanismos relacionados a mudanças epigenéticas, mas existem ainda outros (**Figura 7-86**). As células frequentemente combinam esses mecanismos para garantir que padrões de expressão gênica sejam mantidos e herdados de forma acurada e segura – por um período de até cem anos ou mais, no nosso próprio caso.

Por mais de meio século, os biólogos têm se preocupado com o DNA como o carregador da informação herdável – e somente isso. Entretanto, está claro que os cromossomos huma-

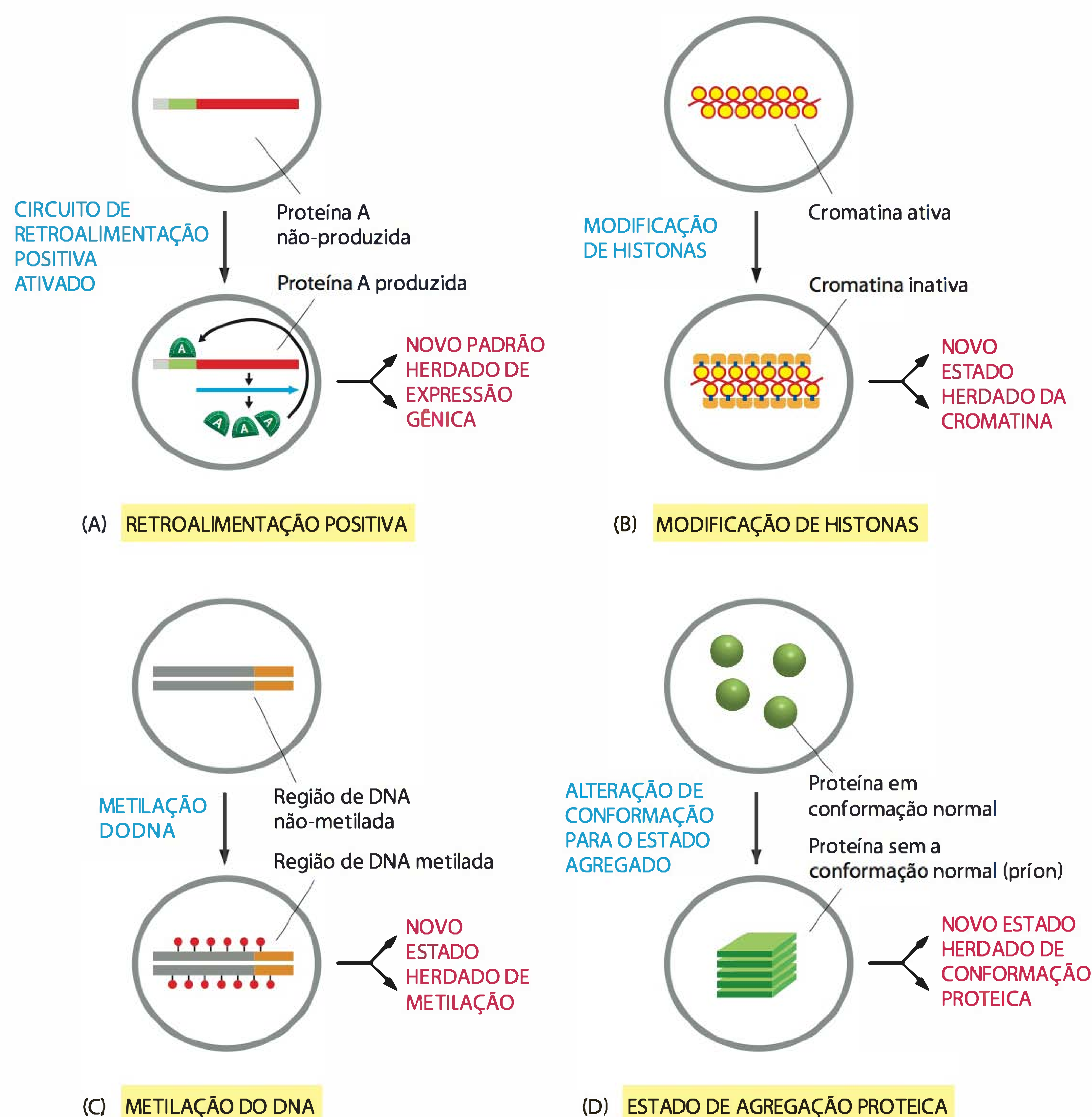


Figura 7-86 Quatro mecanismos distintos que podem produzir uma forma epigenética de herança em um organismo. (Para a herança de modificações em histonas, ver Figura 4-52; para a herança de conformações proteicas, ver Figura 6-95.)

nos também carregam uma grande quantidade de informação que é epigenética e não está contida na sequência de DNA por si só. O *imprinting* é um exemplo. Outro é visto no fenômeno de *expressão mono-alélica*, no qual somente uma das cópias de certos genes humanos é expressa. Para muitos desses genes, a decisão de qual alelo expressar e qual silenciar ocorre ao acaso, mas uma vez feita, ela é repassada às células da progênie. A seguir, veremos um exemplo extremo desse fenômeno na inativação do cromossomo X.

A rede de efeitos das mudanças epigenéticas desencadeadas ao acaso ou pelo ambiente em humanos pode ser vista pela comparação de gêmeos idênticos: os seus genomas possuem a mesma sequência de nucleotídeos, mas quando os seus padrões de modificação de histonas e metilação do DNA são comparados, muitas diferenças são observadas. Devido a essas diferenças serem correlacionadas de forma aproximada não somente com a idade, mas também com o tempo que os gêmeos permanecem distantes um do outro, acredita-se que algumas dessas alterações resultem de fatores ambientais (**Figura 7-87**). Embora estudos sobre o *epigenoma* estejam em estágios iniciais, a ideia de que eventos epigenéticos possam ser registrados permanentemente pelas nossas células é fascinante e apresenta um desafio importante para a próxima geração de cientistas biólogos.



Figura 7-87 Gêmeos idênticos criados separados um do outro. (Cortesia de Nancy L. Regal.)

As grandes alterações cromossômicas na estrutura da cromatina podem ser herdadas

Vimos que os estados da cromatina e de metilação do DNA podem ser herdados, servindo para o estabelecimento e a preservação dos padrões de expressão gênica por muitas gerações celulares. Talvez o exemplo mais notável desses efeitos ocorra em mamíferos, nos quais uma alteração na estrutura da cromatina de um cromossomo inteiro é utilizada para modular os níveis de expressão de todos os genes daquele cromossomo.

Machos e fêmeas diferem em seus *cromossomos sexuais*. As fêmeas possuem dois cromossomos X, enquanto que os machos possuem um X e um Y. Como resultado, as células das fêmeas contêm duas vezes mais cópias de genes do cromossomo X do que as células dos machos. Em mamíferos, os cromossomos sexuais X e Y diferem radicalmente em seu conteúdo gênico: o cromossomo X é grande e contém mais de mil genes, enquanto o cromossomo Y é menor e contém menos de cem genes. Os mamíferos desenvolveram um mecanismo de *compensação de dose* para equalizar a dosagem dos produtos gênicos do cromossomo X entre machos e fêmeas. As mutações que interferem na compensação de dose são letais: a relação correta dos produtos gênicos dos cromossomos X para os dos *autossomos* (cromossomos não-sexuais) é crítica para a sobrevivência.

Nos mamíferos, a compensação de dose é alcançada pela inativação transcricional de um dos dois cromossomos X nas células somáticas das fêmeas, processo conhecido como **inativação do X**. No início do desenvolvimento de um embrião de fêmea, quando ele consiste em alguns milhares de células, um dos dois cromossomos X em cada célula torna-se altamente condensado em um tipo de heterocromatina. O cromossomo X condensado pode ser facilmente visto sob o microscópio óptico nas células em interfase; ele foi inicialmente chamado de *corpúsculo de Barr* e está localizado próximo à membrana nuclear (**Figura 7-88**). Como resultado da inativação do X, dois cromossomos X podem coexistir dentro do mesmo núcleo, expostos às mesmas proteínas de regulação gênica reguladoras difusíveis, ainda que difiram completamente em sua expressão.

A escolha inicial sobre qual cromossomo X inativar, o herdado da mãe (X_m) ou o herdado do pai (X_p), é feita ao acaso. Uma vez que X_p ou X_m tenha sido inativado, ele permanece silencioso por todas as divisões celulares daquela célula e da sua progênie, indicando que o estado inativado é fielmente mantido por muitos ciclos de replicação do DNA e mitoses. Devido ao fato de a inativação do X ocorrer ao acaso e após milhares de células já terem sido

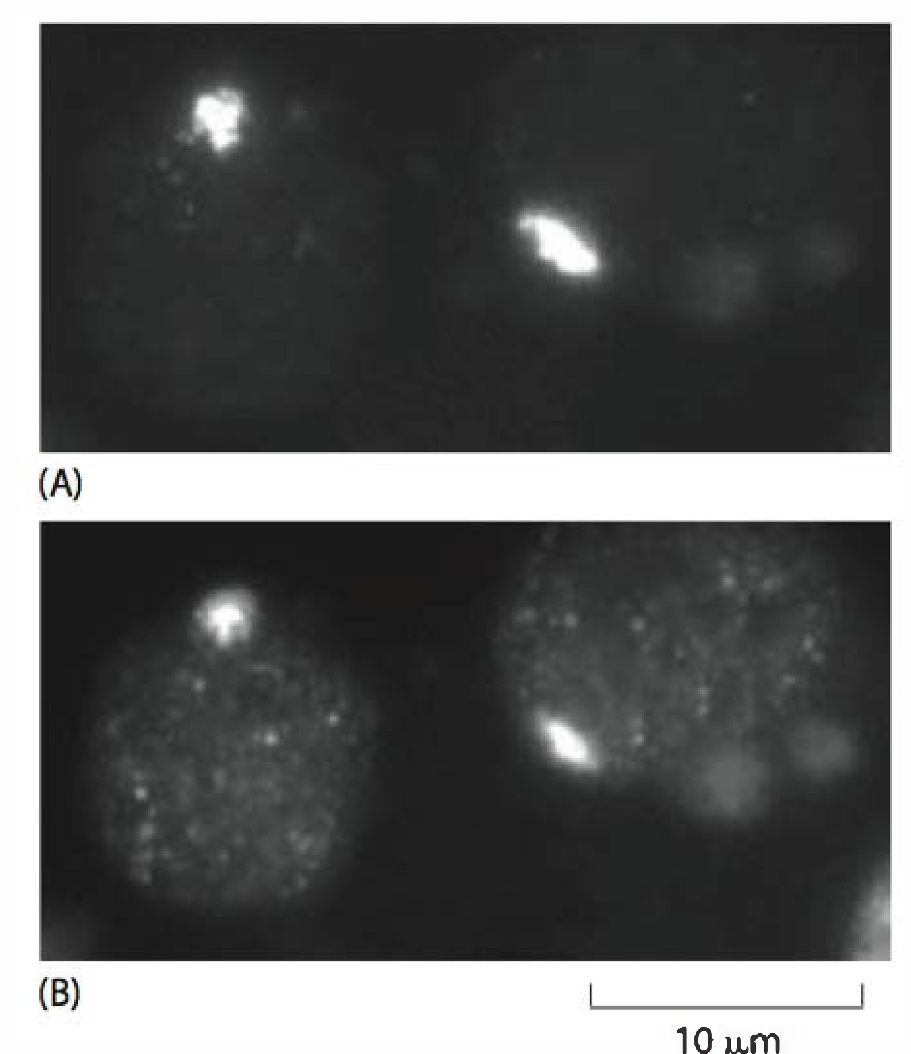


Figura 7-88 Inativação do cromossomo X em células de fêmeas. (A) Somente o cromossomo X inativo está recoberto com o RNA XIST, visualizado aqui por meio hibridização *in situ* por RNAs marcados fluorescentemente de sequência nucleotídica complementar. O painel mostra os núcleos de duas células adjacentes. (B) A mesma amostra, marcada com anticorpos contra um componente do complexo grupo Polycomb, o qual recobre o cromossomo X e auxilia a silenciar a expressão dos seus genes. (De B. Panning, *Methods Enzymol*. 376:419-428, 2004. Com permissão da Academic Press.)

formadas no embrião, cada fêmea é um mosaico de grupos clonais de células nas quais X_p ou X_m estão silenciosos (**Figura 7-89**). Esses grupos clonais estão distribuídos em pequenos agrupamentos no animal adulto, uma vez que as células-irmãs tendem a permanecer juntas durante os estágios mais tardios no desenvolvimento. Por exemplo, a inativação do X origina a coloração de pelagem vermelha e preta "casco-de-tartaruga" em algumas fêmeas de gatos. Nessas gatas, um cromossomo X carrega um gene que produz pelos vermelhos, e outro cromossomo X carrega um alelo do mesmo gene que resulta em pelos pretos; é a inativação ao acaso do X que produz manchas de células de duas cores distintas. Ao contrário das fêmeas, os gatos machos desse grupo genético são totalmente vermelhos ou totalmente pretos, dependendo de qual cromossomo X eles herdaram de suas mães.

Embora a inativação do cromossomo X seja mantida por milhares de gerações celulares, ela não é sempre permanente. Em particular, ela é revertida durante a formação das células germinativas, de maneira que todos os oócitos haploides contêm um cromossomo X ativo e podem expressar os produtos gênicos ligados ao X.

Como um cromossomo inteiro tem sua transcrição inativada? A inativação do cromossomo X é iniciada e espalha-se a partir de um único sítio no meio do cromossomo X, o **centro de inativação do X** (**XIC,** ***X-inactivation center***). Dentro do XIC está codificada uma molécula de RNA incomum, o *RNA XIST*, o qual é expresso somente a partir do cromossomo X inativado e cuja expressão é necessária para a inativação do X. O RNA XIST não é traduzido em proteína e permanece no núcleo, onde, ao final, cobre o cromossomo X inativo inteiro. A distribuição do RNA XIST por todo o cromossomo a partir de XIC correlaciona-se à distribuição do silenciamento gênico, indicando que o RNA XIST participa da formação e da propagação da heterocromatina (**Figura 7-90**). Curiosamente, cerca de 10% dos genes no cromossomo X escapam desse silenciamento e permanecem ativos.

Além de conter o RNA XIST, a heterocromatina do cromossomo X é caracterizada por apresentar uma variante específica da histona 2A, pela hipoacetilação das histonas H3 e H4,

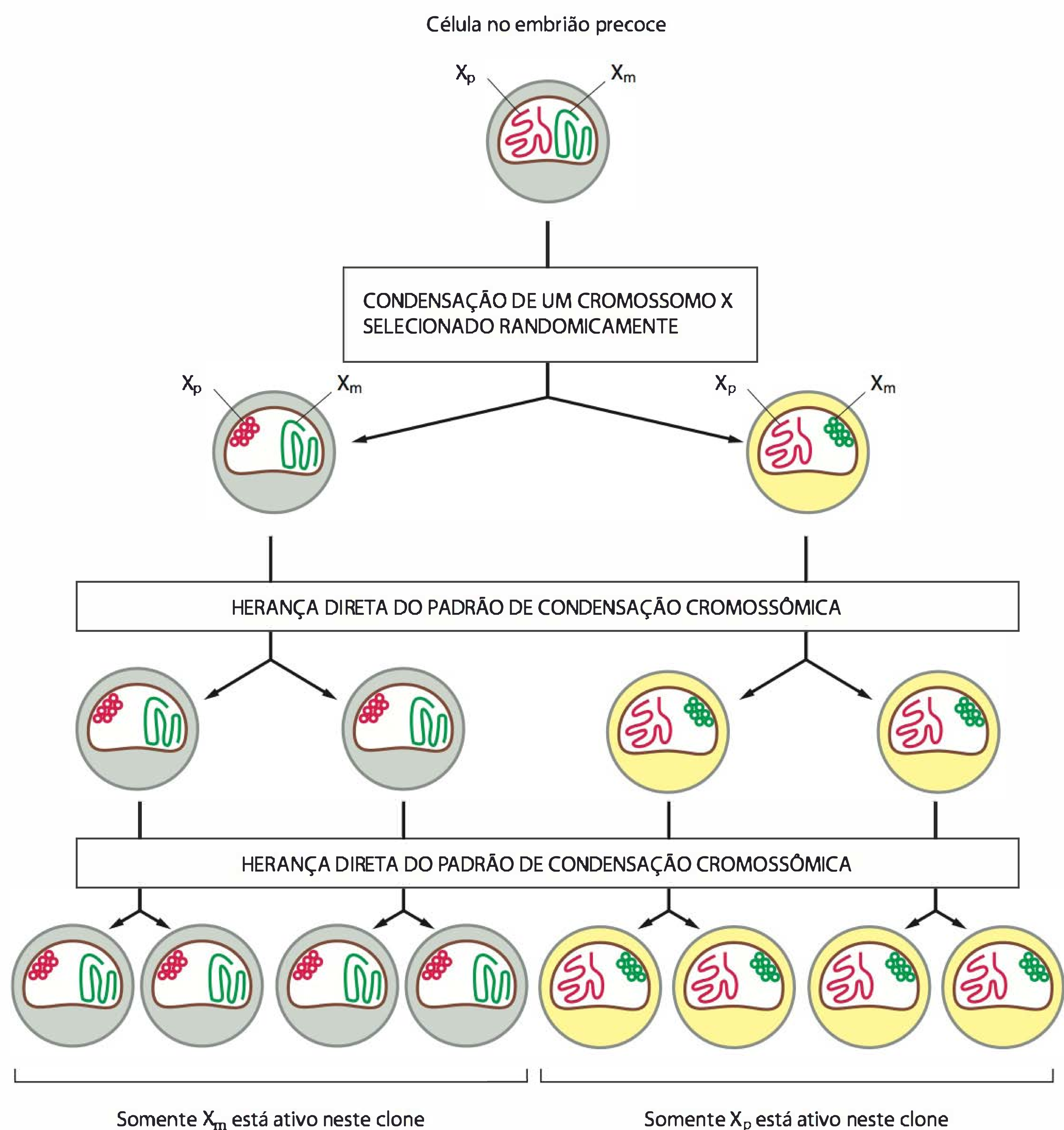


Figura 7-89 Inativação do X. A herança clonal de um cromossomo X inativo condensado que ocorre nas fêmeas de mamíferos.

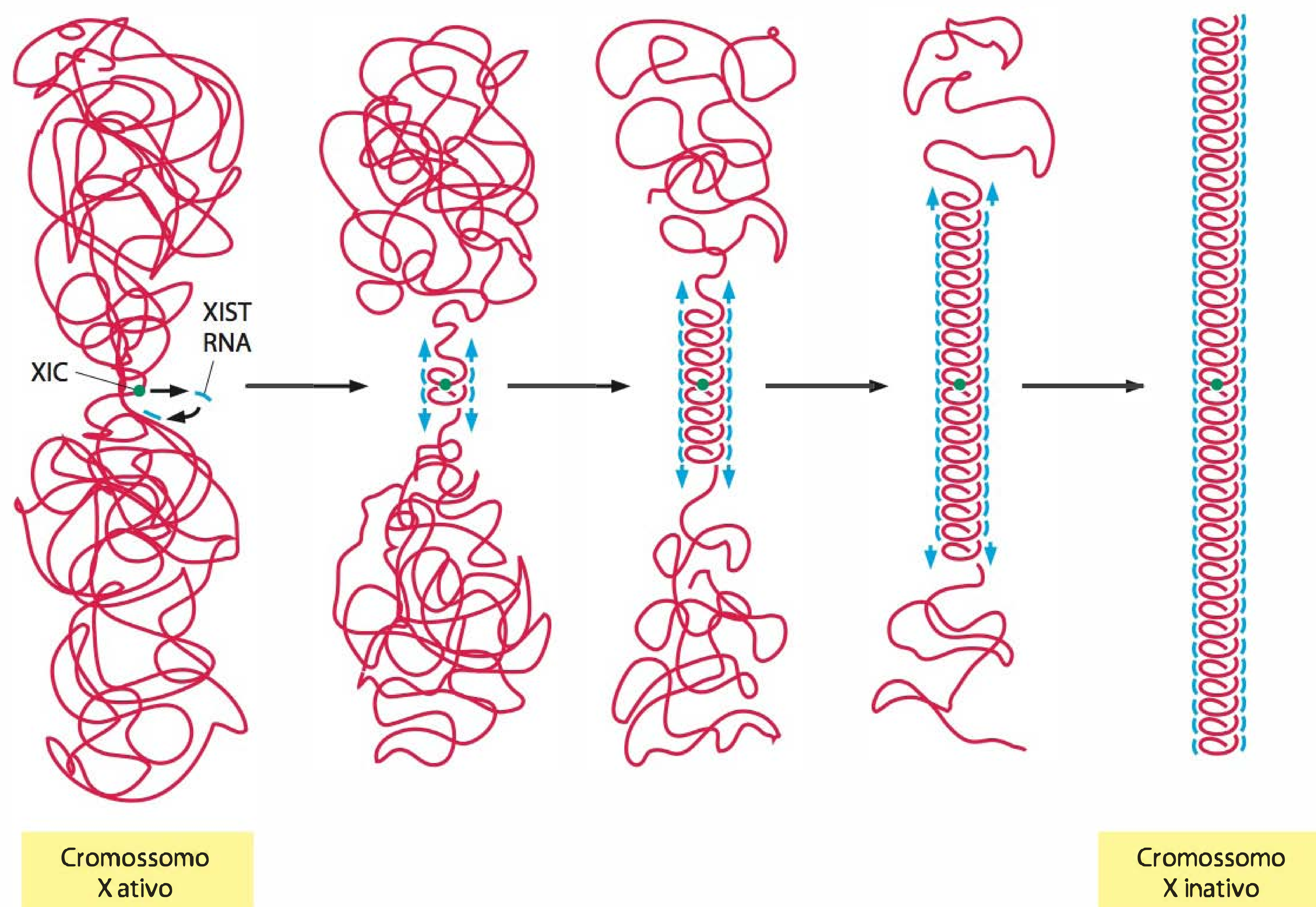


Figura 7-90 Inativação do cromossomo X de mamíferos. A inativação do cromossomo X de mamíferos começa com a síntese do RNA XIST (transcrito específico de inativação do X) a partir de lócus XIC (centro de inativação do X). A associação do RNA XIST com o cromossomo X é correlacionada à condensação do cromossomo. No início da embriogênese, a associação de XIST e a condensação cromossômica gradualmente movem o lócus XIC em direção às extremidades do cromossomo. Os detalhes de como isso ocorre permanecem desconhecidos.

pela ubiquitinação da histona 2A, pela metilação de uma posição específica na histona H3 e por padrões específicos de metilação do DNA subjacente (para uma sugestão de como essas modificações podem estar ligadas de forma causal, ver Figura 7-81). A combinação de tais modificações presumivelmente torna o cromossomo X inativo muito resistente à transcrição. Devido a essas modificações serem, pelo menos em princípio, autopropagativas, é fácil vislumbrar como, uma vez formadas, um cromossomo X inativado pode ser estavelmente mantido por muitas divisões celulares.

Muitas características da inativação do cromossomo X de mamíferos ainda são desconhecidas. Como é feita a decisão inicial sobre qual cromossomo X inativar? Qual é o mecanismo que impede o outro cromossomo X de também ser inativado? Como o RNA XIST coordena a formação da heterocromatina? Como alguns genes do cromossomo X escapam da inativação? Estamos somente começando a entender esse mecanismo de regulação gênica que é crucial para a sobrevivência de nossa própria espécie.

A inativação do cromossomo X nas fêmeas é somente uma das maneiras pelas quais os organismos com reprodução sexuada resolvem o problema da compensação de dose. Em *Drosophila*, a maior parte dos genes do único cromossomo X presente nas células dos machos é transcrita em níveis duas vezes maiores do que as suas contrapartes nas células das fêmeas. Essa "regulação positiva" macho-específica da transcrição resulta de uma alteração na estrutura da cromatina de todo o cromossomo X do macho. Um complexo de compensação de dose, contendo várias enzimas modificadoras de histonas assim como dois RNAs não-codificantes transcritos a partir do cromossomo X, é formado em centenas de posições ao longo do cromossomo X e produz padrões de modificações de histonas que acredita-se aumentem a transcrição – por efeitos na iniciação ou alongamento – na maioria dos genes do cromossomo X do macho.

A compensação de dose no verme nematódeo ocorre por uma terceira estratégia. Aqui, os dois sexos são machos (com um cromossomo X) e hermafroditas (com dois cromossomos X), e a compensação de dose ocorre por uma "regulação negativa" duplicada da transcrição de cada um dos cromossomos X nas células do hermafrodita. Isso ocorre por meio de alterações estruturais cromossomais amplas nos cromossomos X dos hermafroditas (**Figura 7-91**). Um complexo de compensação de dose, o qual é completamente diferente daquele de *Drosophila* e assemelha-se, por outro lado, ao complexo de *condensinas* que auxiliam na condensação dos cromossomos durante a mitose e a meiose (ver Figura 17-27), associa-se ao longo de cada cromossomo X dos hermafroditas e, por um mecanismo desconhecido, superpõe uma repressão global duas vezes maior no nível normal de expressão de cada gene.

Embora as estratégias para a compensação de dose difiram entre mamíferos, moscas e vermes, todas envolvem alterações estruturais em todo o cromossomo X. É provável que as

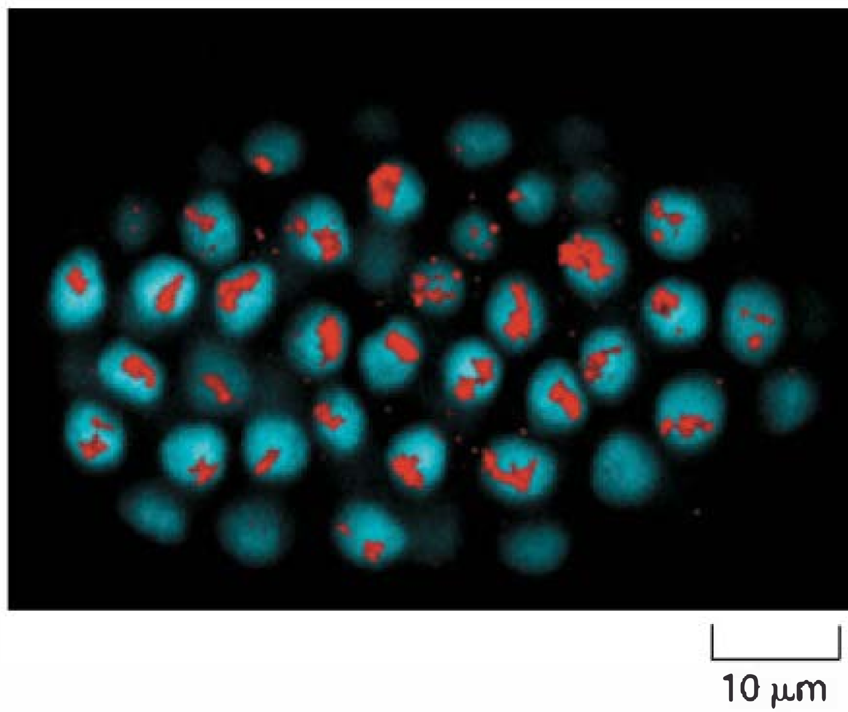


Figura 7-91 Localização das proteínas de compensação de dose para os cromossomos X dos núcleos de *C. elegans* hermafroditas (XX). Esta imagem mostra muitos núcleos de um embrião em desenvolvimento. O DNA total está corado em *azul* pelo uso do intercalante de DNA DAPI, e a proteína Sdc2 está corada em *vermelho* pelo uso de anticorpos acoplados a um corante fluorescente. Este experimento mostra que a proteína Sdc2 associa-se somente com um número limitado de cromossomos, identificados por outros experimentos como sendo dois cromossomos X. Sdc2 está ligada ao longo de todo o comprimento do cromossomo X e atrai o complexo de compensação de dose. (De H. E. Dawes et al., *Science* 284:1800-1804, 1999. Com permissão de AAAS.)

características gerais da estrutura do cromossomo tenham sido adaptadas e atreladas durante a evolução para superar um problema altamente específico da regulação gênica encontrado pelos animais de reprodução sexual.

O controle da expressão gênica é intrinsecamente variável

Até agora neste capítulo discutimos a expressão gênica como se fosse um processo estritamente determinístico, de maneira que, se alguém conhecesse as concentrações de todas as proteínas de regulação gênica relevantes e outras moléculas controladoras, o nível da expressão gênica seria previsível de forma precisa. Na realidade, existe uma grande quantidade de variações ao acaso no comportamento das células. Em parte, isso acontece porque existem flutuações ao acaso no ambiente, alterando as concentrações das moléculas reguladoras dentro da célula de maneiras imprevisíveis. Outra causa possível, em alguns casos, pode corresponder ao comportamento caótico do sistema de controle intracelular: análises matemáticas mostram que mesmo sistemas de controle extremamente simples podem ser sensíveis ao extremo para os parâmetros de controle, de maneira que, por exemplo, uma pequena diferença nas condições iniciais pode levar a resultados radicalmente diferentes em longo prazo. Porém, adicionalmente a essas causas para a falta de previsibilidade, existe uma razão adicional e mais fundamental para que todos os comportamentos celulares sejam inevitavelmente ao acaso em algum grau.

Células são sistemas químicos que consistem em números relativamente pequenos de moléculas, e as reações químicas ao nível das moléculas individuais ocorrem essencialmente ao acaso, ou de maneira *estocástica*. Uma dada molécula possui uma determinada probabilidade por unidade de tempo de sofrer uma reação química, mas se ela irá realmente ocorrer em um determinado momento é imprevisível, dependendo das colisões termais ao acaso e das regras probabilísticas da mecânica quântica. Quanto menor o número de moléculas regulando um processo dentro da célula, mais severamente será afetado pela casualidade dos eventos químicos ao nível da molécula isolada. Dessa forma, existe algum grau de acaso em qualquer aspecto do comportamento celular, mas determinados processos são legados ao acaso de maneira extrema.

O controle da transcrição, em particular, depende da condição química precisa do gene. Considere um caso idealizado simples, no qual um gene é transcrito enquanto possuir uma proteína ativadora da transcrição ligada à sua região reguladora, tornando-se transcricionalmente silencioso quando esta proteína não está ligada. A reação de associação/dissociação entre o DNA regulador e a proteína é estocástica: se o estado ligado possui uma meia-vida $t_{1/2}$ de uma hora, o gene algumas vezes pode permanecer ativado por 30 minutos ou menos, algumas vezes por duas horas ou mais em um determinado período, antes que a proteína ativadora se dissocie. Dessa maneira, a transcrição irá variar entre ativada e desativada de forma essencialmente ao acaso. A taxa média de variação e a relação do tempo médio no estado "ativado" com o tempo médio no estado "desativado" serão determinadas pelos valores de $k_{desativado}$ e $k_{ativado}$ para a reação de ligação e pela concentração da proteína ativadora na célula. A quantidade dos transcritos gênicos acumulados na célula flutuará de forma coordenada; se o tempo de vida dos transcritos é longo comparado ao $t_{1/2}$, as flutuações serão leves; se for curto, elas serão severas.

Uma maneira de demonstrar tais flutuações ao acaso na expressão de cópias gênicas individuais é modificar geneticamente células nas quais uma cópia de uma região de controle gênico está ligada a uma sequência codificando para uma proteína repórter fluorescente verde, enquanto outra cópia está ligada de forma semelhante a uma sequência codificando para uma proteína repórter fluorescente vermelha. Embora essas construções gênicas estejam na mesma célula e no mesmo ambiente, elas flutuam de forma independente em seus níveis de expressão. Como resultado, em uma população de células em que todas carregam o mesmo par de construções, algumas células aparecerão verdes, outras vermelhas e, ainda, outras uma mistura das duas cores e, portanto, em gradientes variáveis de amarelo (ver Figura 8-75). De forma mais geral, as decisões sobre o destino celular frequentemente são produzidas de maneira estocástica, presumivelmente como resultado de tais flutuações ao acaso; será apresentado um exemplo no Capítulo 23, onde discutiremos a gênese dos diferentes tipos de células brancas (leucócitos) do sangue.

Em alguns tipos de células e para alguns aspectos do comportamento celular, o acaso no controle da transcrição gênica, assim como acabamos de descrever, parece ser a principal fonte de variabilidade randômica; em outros tipos celulares, outras formas de varia-

ção randômica predominam. Onde o acaso em um sistema de controle seria prejudicial, mecanismos de controle especiais evoluíram para minimizar os seus efeitos; o circuito de alimentação direta discutido anteriormente é um exemplo de tal mecanismo, servindo para filtrar os efeitos de flutuações rápidas em um sinal de controle. Mas em todas as células, algum grau de randomicidade é inevitável. É uma característica fundamental do comportamento celular.

Resumo

Os muitos tipos de células em animais e em plantas são criados em grande parte por mecanismos que fazem genes diferentes serem transcritos em células diferentes. Uma vez que muitas células animais especializadas podem manter suas características específicas por muitos ciclos de divisões celulares, mesmo quando crescidas em cultura, os mecanismos de regulação gênica envolvidos em criá-las precisam ser estáveis, uma vez estabelecidos, e herdáveis, quando a célula se divide. Essas características dotam a célula com uma memória da sua história de desenvolvimento. As bactérias e as leveduras também exibem memória celular e fornecem sistemas-modelo normalmente inacessíveis para o estudo de mecanismos de regulação gênica.

Circuitos de retroalimentação positiva diretos ou indiretos, os quais possibilitam que as proteínas de regulação gênica perpetuem a sua própria síntese, fornecem o mecanismo mais simples para a memória celular. Circuitos de transcrição também fornecem à célula meios para desenvolverem operações lógicas e medirem tempo. Circuitos simples de transcrição combinados em grandes redes reguladoras direcionam programas altamente sofisticados de desenvolvimento embrionário.

Nos eucariotos, a transcrição de um gene geralmente é controlada por combinações de proteínas de regulação gênica. Acredita-se que cada tipo de célula em um organismo eucarioto superior contenha uma combinação específica de proteínas de regulação gênica que garantem a expressão somente dos genes apropriados para aquele tipo de célula. Uma dada proteína de regulação gênica pode estar ativa em várias circunstâncias e, normalmente, estará envolvida na regulação de muitos genes.

Ao contrário das bactérias, as células eucarióticas utilizam os estados herdáveis da condensação da cromatina como mecanismos adicionais para a regulação da expressão gênica e para criar memória celular. Um caso especialmente dramático é a inativação de um cromossomo X inteiro nas fêmeas de mamíferos. Nos eucariotos, a metilação do DNA também pode silenciar genes de forma herdável. Além disso, ela também é a base para o fenômeno da impressão genômica em mamíferos, nos quais a expressão de um gene depende de ele ser herdado da mãe ou do pai.

CONTROLES PÓS-TRANSCRICIONAIS

Em princípio, cada passo necessário para o processo de expressão gênica pode ser controlado. De fato, podemos encontrar exemplos de cada tipo de regulação, e muitos genes são regulados por múltiplos mecanismos. Conforme vimos, os controles na iniciação da transcrição gênica são a forma crítica de regulação da maioria dos genes. Mas outros controles podem atuar mais tarde, na via do DNA para a proteína, a fim de modular a quantidade de produto gênico que é produzida – e em alguns casos para determinar a sequência de aminoácidos do produto proteico. Esses **controles pós-transcricionais**, que operam após a RNA-polimerase ter-se ligado ao promotor do gene e iniciado a síntese do RNA, são cruciais para a regulação de muitos genes.

Nas seções seguintes, consideraremos as variações de regulação pós-transcricional em ordem temporal, de acordo com a sequência de eventos que seria experimentada por uma molécula de RNA após a sua transcrição ter começado (**Figura 7-92**).

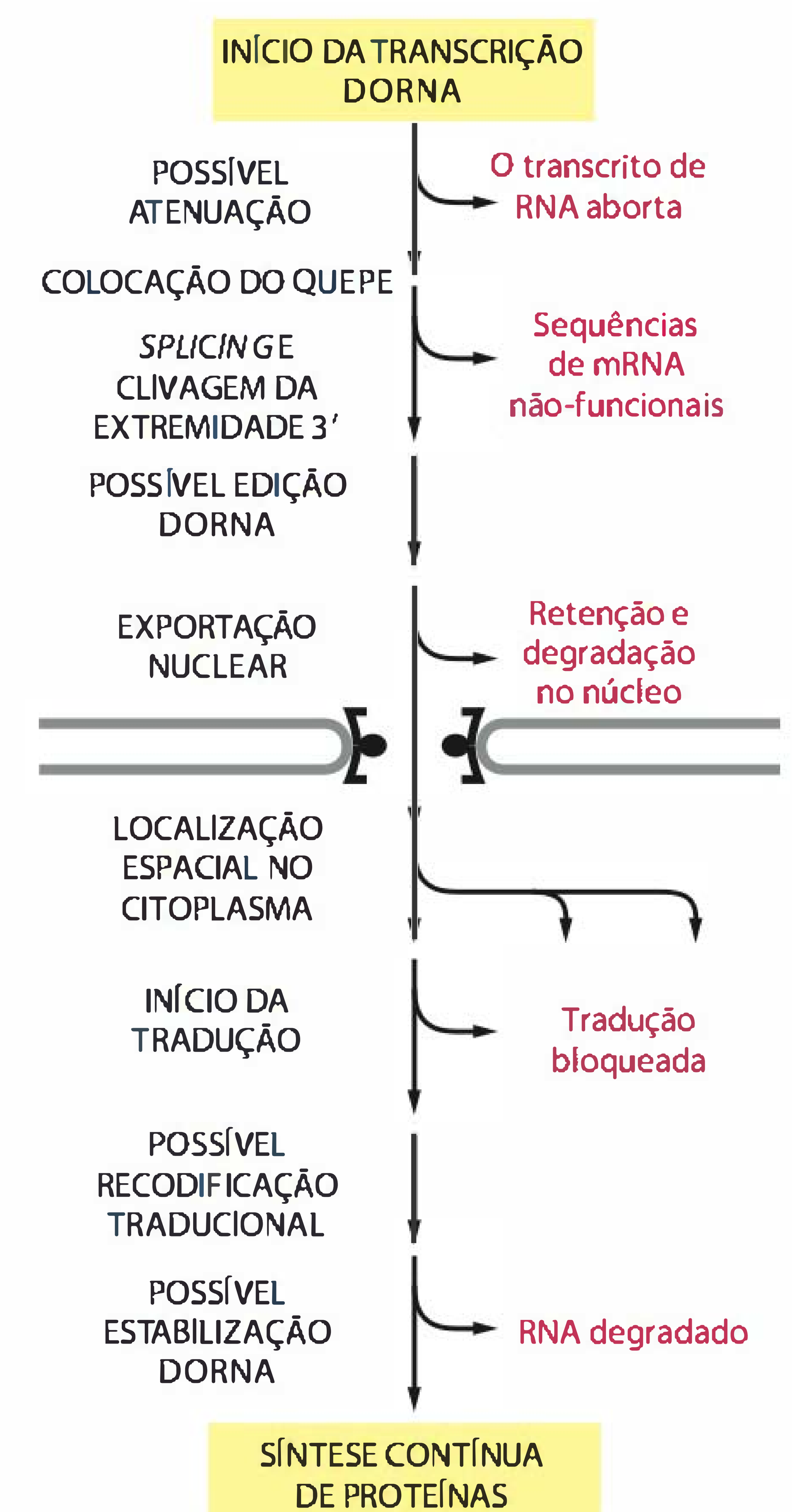


Figura 7-92 Controles pós-transcricionais na expressão gênica. A taxa final de síntese de uma proteína pode, em princípio, ser controlada em qualquer das etapas mostradas. O *splicing* de RNA, a edição do RNA e a tradução recodificada (descrita no Capítulo 6) também podem alterar a sequência de aminoácidos em uma proteína, tornando possível para a célula produzir mais de uma variante proteica a partir do mesmo gene. Somente algumas das etapas descritas aqui provavelmente sejam importantes para a regulação de qualquer proteína em particular.

A atenuação da transcrição produz a terminação prematura de algumas moléculas de RNA

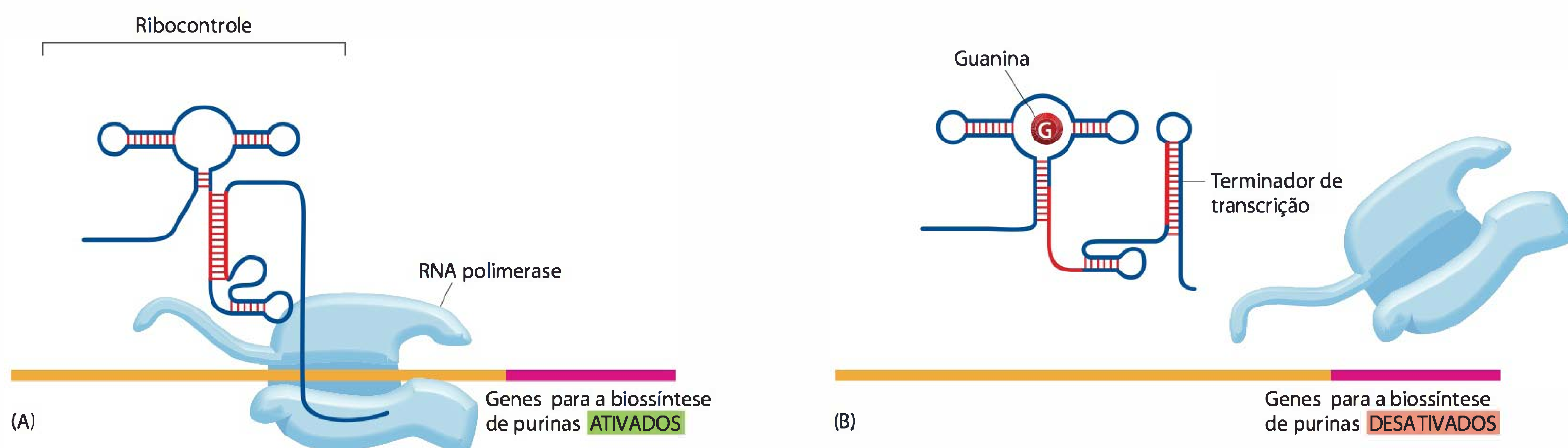
Há muito tempo sabe-se que a expressão de certos genes bacterianos é inibida pela terminação prematura da transcrição, um fenômeno chamado de **atenuação da transcrição**. Em alguns desses casos, a cadeia nascente de RNA adota uma estrutura que a induz a interagir com a RNA-polimerase de maneira a abortar a sua transcrição. Quando o produto gênico é necessário, as proteínas reguladoras ligam-se à cadeia nascente de RNA e interferem com a atenuação, permitindo a transcrição de uma molécula completa de RNA.

A atenuação da transcrição também ocorre em eucariotos. Um exemplo bem estudado ocorre durante o ciclo de vida do HIV, o vírus humano da imunodeficiência, agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*). Uma vez que tenha se integrado no genoma hospedeiro, o DNA viral é transcrito pela RNA-polimerase II celular (ver Figura 5-71). Entretanto, a polimerase do hospedeiro normalmente termina a transcrição após sintetizar transcritos de várias centenas de nucleotídeos e, assim, não transcreve eficientemente o genoma viral inteiro. Quando as condições para o crescimento viral são ótimas, uma proteína codificada pelo vírus chamada de Tat, a qual se liga a uma estrutura específica grampo-alça no RNA nascente que contém uma "base saliente", impede a sua terminação prematura. Uma vez ligada a essa estrutura específica de RNA (chamada de Tar), a Tat associa-se a várias proteínas celulares, as quais permitem que a RNA-polimerase continue a transcrever. A função normal de pelo menos algumas dessas proteínas celulares é evitar pausas e a terminação prematura da RNA-polimerase, enquanto ela transcreve genes celulares normais. Os genes eucarióticos normalmente contêm longos íntrons; para transcrever um gene de maneira eficiente, a RNA-polimerase II não pode se demorar em sequências de nucleotídeos que sejam promotoras de pausas. Assim, um mecanismo celular normal, aparentemente, foi adaptado pelo HIV para permitir que a transcrição do seu genoma seja controlada por uma única proteína viral.

Ribocontroles poderiam representar formas ancestrais de controle gênico

No Capítulo 6, discutimos a ideia de que, antes de as células modernas terem surgido na Terra, o RNA tanto estocava a informação hereditária como catalisava reações químicas. A recente descoberta de *ribocontroles* mostra que o RNA pode também formar mecanismos de controle que regulam a expressão gênica. Os ribocontroles são sequências curtas de RNA que alteram a sua conformação ligando-se a pequenas moléculas, como metabólitos. Cada ribocontrole reconhece uma molécula pequena específica, e a alteração conformacional resultante é utilizada para regular a expressão gênica. Os ribocontroles frequentemente são localizados próximos à extremidade 5′ dos mRNAs e dobram-se enquanto o mRNA está sendo sintetizado bloqueando ou permitindo o progresso da RNA-polimerase dependendo de a molécula reguladora pequena estar ligada (**Figura 7-93**).

Os ribocontroles são particularmente comuns em bactérias, nas quais eles detectam pequenos metabólitos-chave na célula e ajustam a expressão gênica de forma apropriada. Talvez as suas características mais surpreendentes sejam a alta especificidade e afinidade



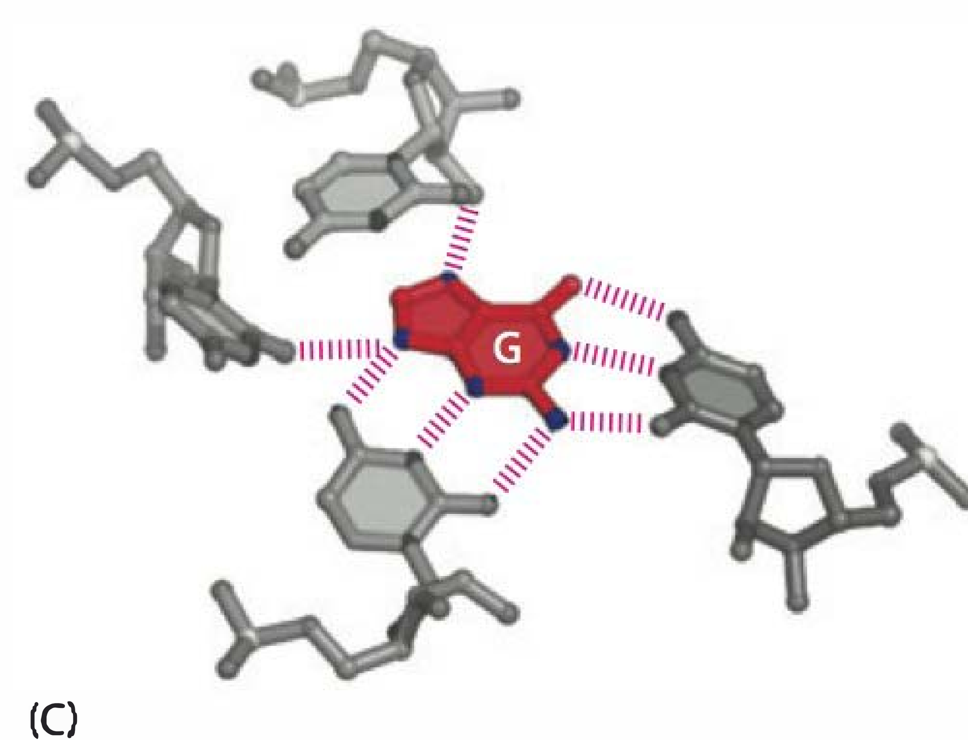


Figura 7-93 Ribocontrole que responde à guanina. (A) Neste exemplo de bactérias, o ribocontrole regula a expressão de genes da biossíntese de purinas. Quando os níveis de guanina nas células estão baixos, uma RNA-polimerase promovendo alongamento transcreve os genes para a biossíntese de purinas, e as enzimas necessárias para a síntese de guanina são desta forma expressas. (B) Quando a guanina está abundante, ela liga-se ao ribocontrole, induzindo-o a sofrer uma alteração conformacional que força a RNA-polimerase a terminar a transcrição (ver Figura 6-11). (C) Guanina (*vermelho*) ligada ao ribocontrole. Somente aqueles nucleotídeos que formam a região de ligação à guanina estão mostrados. Muitos outros ribocontroles existem, incluindo aqueles que reconhecem a *S*-adenosil-metionina, a coenzima B_{12}, o mononucleotídeo flavina, a adenina, a lisina e a glicina. (Adaptada de M. Mandal e R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.* 5:451-463, 2004, com permissão de Macmillan Publishers Ltd., e C. K. Vanderpool e S. Gottesman, *Mol. Microbiol.* 54:1076-1089, 2004, com permissão de Blackwell Publishing.)

com as quais cada um reconhece somente a molécula pequena apropriada; em muitos casos, cada característica química da molécula pequena é lida pelo RNA (Figura 7-93C). Além disso, as afinidades de ligação observadas são tão altas quanto às observadas entre pequenas moléculas e proteínas.

Os ribocontroles são, talvez, os exemplos mais econômicos de mecanismos de controle gênico, uma vez que dispensam a necessidade de proteínas reguladoras por completo. No exemplo mostrado na Figura 7-93, o ribocontrole regula o alongamento da transcrição, mas também regula outras etapas na expressão gênica, como veremos mais adiante neste capítulo. Claramente, mecanismos de controle gênico altamente sofisticados podem ser produzidos a partir de pequenas sequências de RNA.

O *splicing* alternativo do RNA pode produzir diferentes formas de uma proteína a partir do mesmo gene

Como discutido no Capítulo 6, os transcritos de muitos genes eucariotos são encurtados pelo *splicing* do RNA, no qual as sequências dos íntrons são removidas do precursor do mRNA. Vimos também que uma célula pode emendar o "transcrito primário" de diferentes maneiras e assim fazer diferentes cadeias polipeptídicas a partir do mesmo gene – um processo chamado de ***splicing* alternativo do RNA** (Figuras 6-27 e **7-94**). Uma proporção substancial dos genes de animais (estimados em 40% em moscas e 75% em humanos) produz múltiplas proteínas desse modo.

Quando existem diferentes possibilidades de *splicing* em várias posições no transcrito, um único gene pode produzir dúzias de proteínas diferentes. Em um caso extremo, um gene da *Drosophila* pode produzir em torno de 38 mil proteínas diferentes a partir de um único gene por meio do *splicing* alternativo (**Figura 7-95**), embora somente uma fração pequena dessas formas tenha sido experimentalmente observada. Considerando que o genoma da *Drosophila* possui aproximadamente 14 mil genes identificados, é claro que a complexidade proteica de um organismo pode exceder bastante o número desses genes. Este exemplo também ilustra o perigo de equacionar um número gênico com a complexidade de um organismo. Por exemplo, o *splicing* alternativo é relativamente raro em leveduras unicelulares que se reproduzem por brotamento, mas muito comum em moscas. As leveduras que se reproduzem por brotamento possuem ~6.200 genes, dos quais aproximadamente 300 estão sujeitos ao *splicing*, e praticamente todos apresentam apenas um único íntron. Dizer que as moscas possuem somente 2 a 3 vezes mais genes que as leveduras é subestimar muito a diferença em complexidade desses dois genomas.

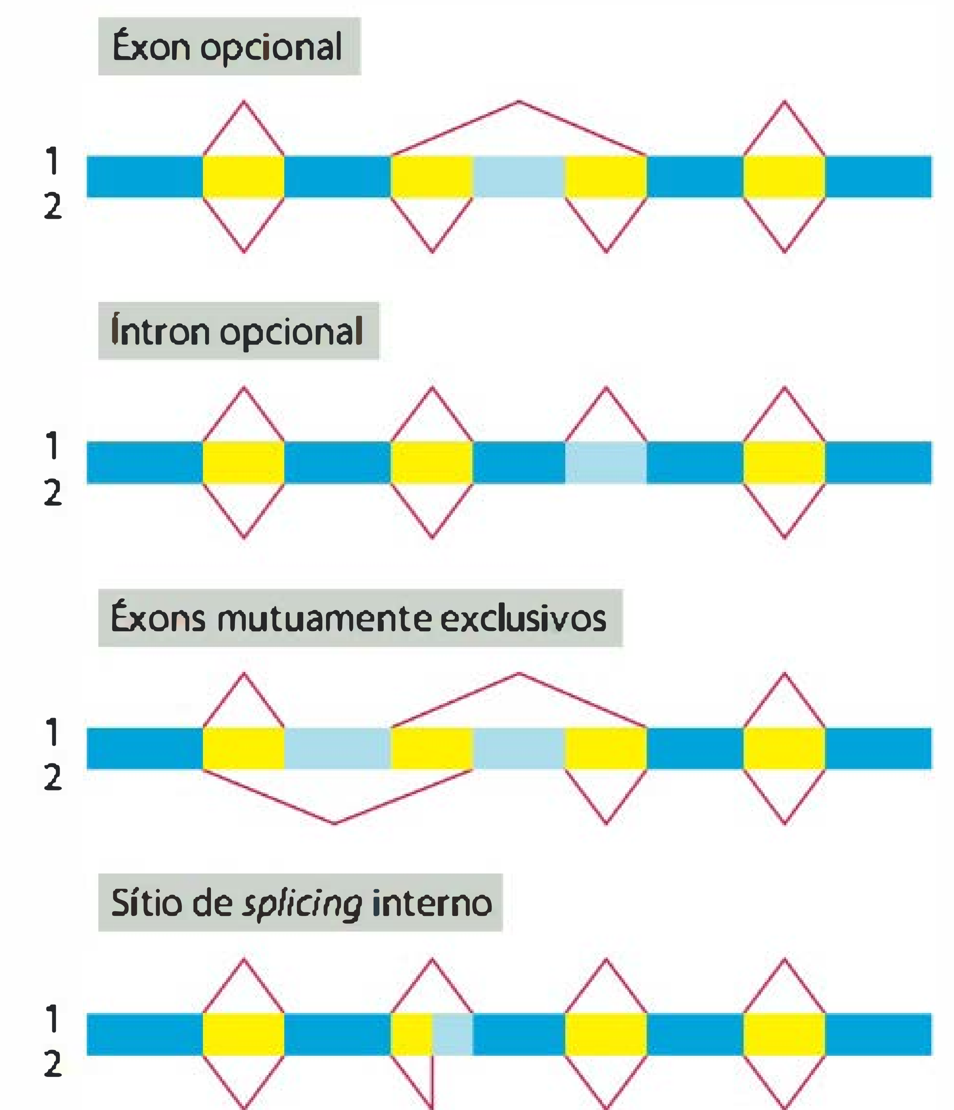


Figura 7-94 Quatro padrões de *splicing* alternativo de RNA. Em cada caso, um único tipo de transcrito de RNA pode sofrer o *splicing* de duas maneiras alternativas a fim de produzir dois mRNA distintos (1 e 2). As *caixas azul-escuras* marcam as possíveis sequências de éxons que são retidas em ambos os mRNAs. As *caixas azul-claras* marcam as possíveis sequências de éxons que são incluídas em somente um dos mRNAs. As caixas são interligadas por *linhas vermelhas* para indicar quando as sequências intrônicas (*amarelo*) são removidas. (Adaptada com permissão de A. Andreadis, M. E. Gallego, e B. Nadal-Ginard, *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:207-242, 1987. Com permissão de Annual Reviews.)

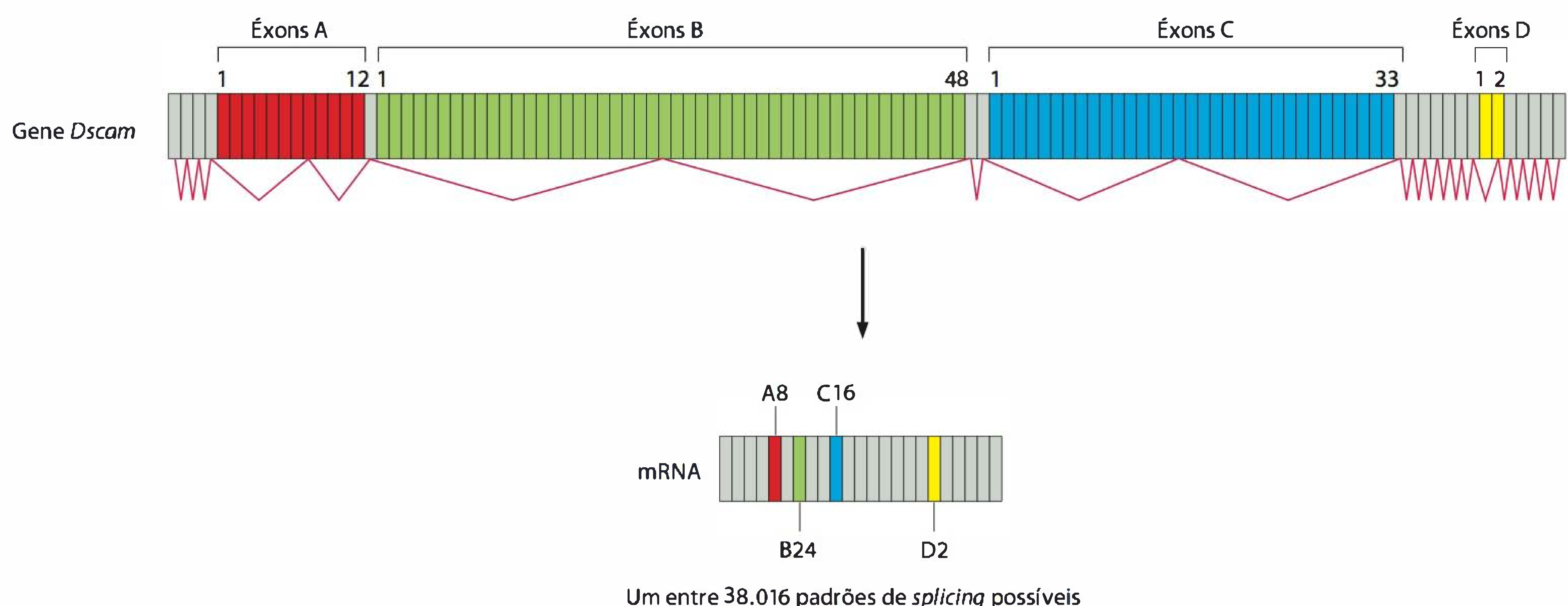


Figura 7-95 *Splicing* alternativo de transcritos de RNA do gene *Dscam* de *Drosophila*. As proteínas DSCAM são receptores-guia de axônios que auxiliam a direcionar cones de crescimento para os seus alvos apropriados no sistema nervoso em desenvolvimento. O mRNA final contém 24 éxons, quatro dos quais (indicados A, B e C) estão presentes no gene *Dscam* como uma série de éxons alternativos. Cada RNA contém 1 de 12 alternativas para o éxon A (*vermelho*), 1 de 48 alternativas para o éxon B (*verde*), 1 de 33 alternativas para o éxon C (*azul*) e 1 de 2 alternativas para o éxon D (*amarelo*). Se todas as combinações possíveis forem usadas, 38.016 proteínas diferentes podem ser produzidas em princípio a partir do gene *Dscam*. Somente um dos muitos padrões possíveis de *splicing* (indicado pela *linha vermelha* e pelo mRNA maduro abaixo dela) é mostrado. Cada variante da proteína Dscam se dobraria praticamente na mesma estrutura (predominantemente uma série de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina ligados a uma região que atravessa a membrana [ver Figura 25-74]), mas a sequência de aminoácidos dos domínios variaria de acordo com o padrão de *splicing*. É possível que essa diversidade de receptores contribua para a formação de circuitos neurais complexos, mas as propriedades precisas e as funções de muitas variantes Dscam ainda não são bem entendidas. (Adaptada de D. L. Black, *Cell* 103:367-370, 2000. Com permissão de Elsevier.)

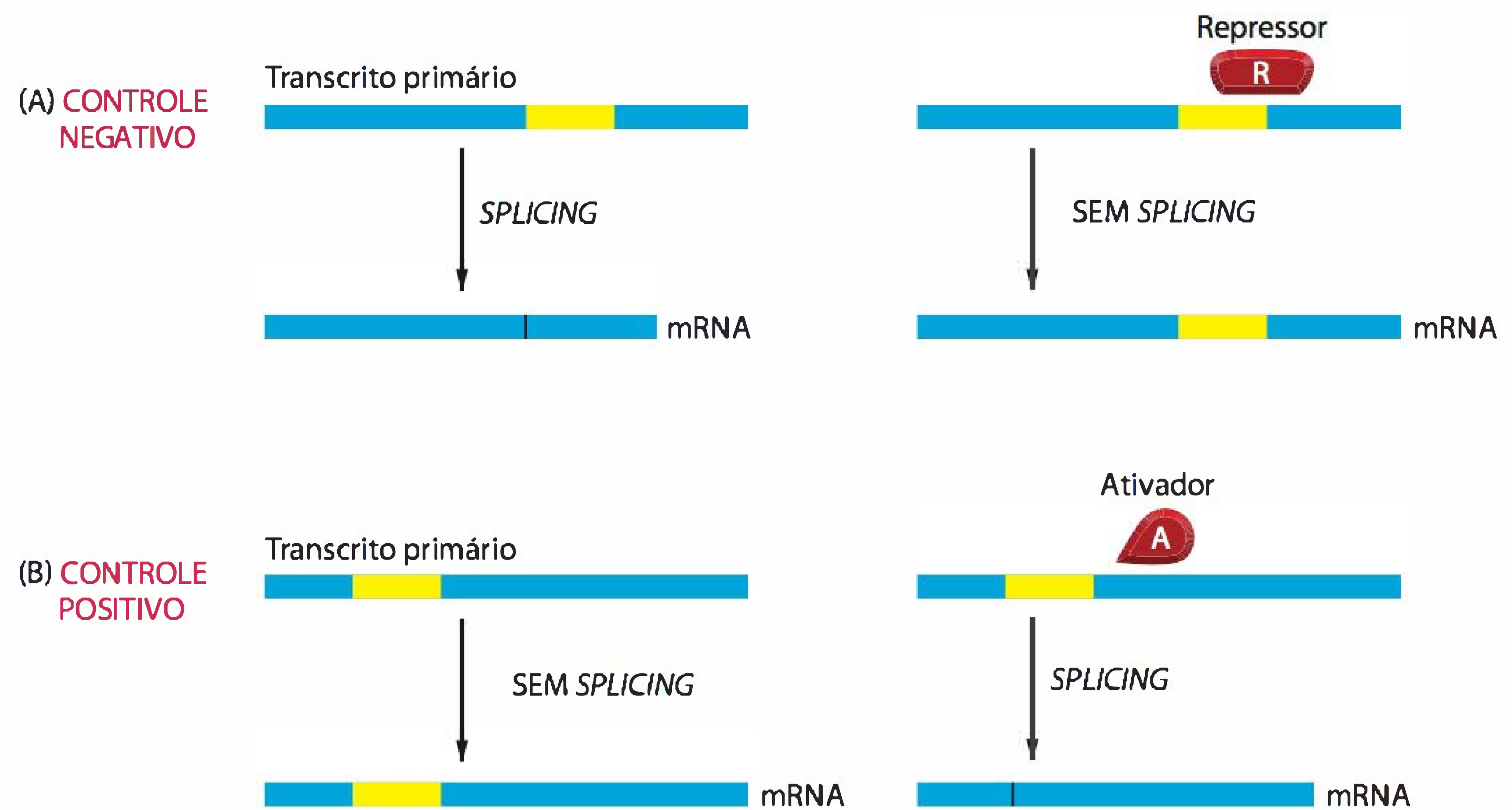


Figura 7-96 Controles negativo e positivo do *splicing* alternativo do RNA. (A) No controle negativo, uma proteína repressora liga-se ao transcrito de pré-mRNA e bloqueia o acesso da maquinaria de *splicing* a uma junção de *splicing*. (B) No controle positivo, a maquinaria do *splicing* não é capaz de remover eficientemente uma sequência intrônica particular sem a assistência de uma proteína ativadora. Devido às sequências nucleotídicas que se ligam a esses ativadores poderem estar localizadas a muitos pares de nucleotídeos das junções de *splicing* que elas controlam, elas frequentemente são chamadas de *estimuladores de splicing*.

Em alguns casos, o *splicing* alternativo do RNA ocorre porque há uma *ambiguidade na sequência do íntron*: o mecanismo-padrão do spliceossomo para a remoção das sequências intrônicas (discutido no Capítulo 6) não é capaz de distinguir completamente entre dois ou mais pareamentos alternativos de sítios de *splicing* 5′ e 3′, de maneira que as diferentes escolhas são feitas ao acaso nos diferentes transcritos. Onde tal *splicing* alternativo constitutivo ocorre, várias versões da proteína codificada pelo gene são feitas em todas as células nas quais o gene é expresso.

Em muitos casos, entretanto, o *splicing* alternativo do RNA é regulado em vez de ser constitutivo. Nos exemplos mais simples, o *splicing* regulado é usado para alterar a produção de uma proteína não-funcional para a produção de uma proteína funcional. A transposase que catalisa a transposição do elemento P da *Drosophila*, por exemplo, é produzida em uma forma funcional nas células germinativas e em uma forma não-funcional nas células somáticas da mosca, permitindo ao elemento P espalhar-se por todo o genoma da mosca, sem causar danos às células somáticas (ver Figura 5-69). A diferença na atividade do transposon foi explicada pela presença de uma sequência intrônica no RNA da transposase que é removida somente nas células germinativas.

Além de alternar entre a produção de uma proteína funcional e a produção de uma proteína não-funcional, a regulação do *splicing* de RNA pode gerar diferentes versões de uma proteína em diferentes tipos celulares, de acordo com as necessidades da célula. A tropomiosina, por exemplo, é produzida em formas especializadas em diferentes tipos de células (ver Figura 6-27). As formas de tipos celulares específicos de muitas outras proteínas são produzidas da mesma maneira.

O *splicing* do RNA pode ser regulado tanto negativamente, por uma molécula que impeça que a maquinaria de *splicing* tenha acesso a um sítio particular de *splicing* no RNA, como positivamente, por uma molécula reguladora que auxilie a direcionar a maquinaria de *splicing* para outro sítio de *splicing* que, de outra maneira, seria ignorado (**Figura 7-96**).

Devido à plasticidade do *splicing* do RNA, o bloqueio de um sítio de *splicing* "forte" frequentemente irá expor um sítio "fraco" e resultará em padrões diferentes de *splicing*. Da mesma maneira, a ativação de um sítio de *splicing* subótimo pode resultar em um *splicing* alternativo pela supressão de um sítio de *splicing* alternativo competidor. Assim, o *splicing* de uma molécula de pré-mRNA pode ser considerado como um equilíbrio delicado entre sítios de *splicing* competidores – um equilíbrio que pode ser facilmente alterado pelas proteínas de regulação gênica.

A definição de gene modificou-se desde a descoberta do *splicing* alternativo do RNA

A descoberta de que os genes eucarióticos normalmente contêm íntrons, e que suas sequências codificantes podem ser montadas em mais de uma maneira, levantou novas questões a respeito da definição do gene. Um gene foi primeiramente definido em termos moleculares no começo dos anos de 1940, a partir de trabalhos sobre a genética bioquímica do fungo *Neurospora*. Até então, um gene havia sido definido operacionalmente como uma região do genoma que segregava como uma única unidade durante a meiose e dava origem a um

traço fenotípico definível, como olhos vermelhos ou brancos na *Drosophila*, ou sementes de ervilhas enrugadas ou lisas. O trabalho em *Neurospora* mostrou que a maioria dos genes correspondia a uma região do genoma que direciona a síntese de uma única enzima. Isso levou à hipótese de que um gene codificava uma cadeia polipeptídica. A hipótese provou ser útil para pesquisas subsequentes; quanto mais o mecanismo de expressão gênica era entendido, nos anos de 1960, mais o gene era identificado como uma região de DNA que era transcrita em RNA codificando uma única cadeia polipeptídica (ou um único RNA estrutural como um tRNA ou uma molécula de rRNA). A descoberta dos genes segmentados e dos íntrons, no final dos anos de 1970, poderia ser prontamente acomodada segundo a definição original do gene, contanto que uma única cadeia polipeptídica fosse especificada pelo RNA transcrito, a partir de qualquer sequência de DNA. Atualmente, está claro que muitas sequências de DNA em células eucarióticas superiores podem produzir um conjunto de proteínas distintas (porém relacionadas) pelo *splicing* alternativo do RNA. Como então um gene pode ser definido?

Naqueles casos relativamente raros nos quais duas proteínas eucarióticas muito diferentes são produzidas a partir de uma única unidade de transcrição, se considera que as duas proteínas são produzidas por genes distintos que se sobrepõem no cromossomo. Parece desnecessariamente complexo, entretanto, considerar a maioria das variantes proteicas produzidas pelo *splicing* alternativo de RNA como derivadas de genes sobrepostos. Uma alternativa mais sensata é modificar a definição original, enquadrando como gene qualquer sequência de DNA que é transcrita como uma única unidade e que codifica um conjunto de cadeias polipeptídicas intimamente relacionadas (isoformas proteicas). Essa definição de gene também acomoda aquelas sequências de DNA que codificam variantes proteicas produzidas por outros processos pós-transcricionais que não o *splicing* de RNA, como a troca de fase traducional (ver Figura 6-78), a adição regulada de poli-A e a edição do RNA (discutida a seguir).

A determinação sexual na *Drosophila* depende de uma série regulada de eventos de *splicing* de RNA

Apresentamos agora um dos mais entendidos exemplos de *splicing* regulado de RNA. Na *Drosophila*, o sinal primário para determinar se a mosca se desenvolverá como macho ou fêmea é a relação cromossomos X/autossomos. Os indivíduos com uma relação de 1 para cromossomos X/autossomos (normalmente dois cromossomos X e dois conjuntos de autossomos) desenvolvem-se como fêmeas, enquanto aqueles com uma relação de 0,5 (normalmente um cromossomo X e dois conjuntos de autossomos) desenvolvem-se como machos. Essa relação é estimada precocemente no desenvolvimento e é relembrada desde então por célula. Três produtos gênicos cruciais transmitem a informação a respeito dessa relação para muitos outros genes que especificam características de machos e de fêmeas (**Figura 7-97**). Como explicado na **Figura 7-98**, a determinação de sexo em *Drosophila* depende de uma cascata de eventos de *splicing* regulado de RNA que envolve esses três produtos gênicos.

Embora a determinação do sexo na *Drosophila* forneça um dos exemplos melhor entendidos de uma cascata reguladora com base no *splicing* de RNA, não está claro por que a mosca utilizaria essa estratégia. Outros organismos (p. ex., o nematódeo) usam um esquema inteiramente diferente para a determinação de sexo – com base em controles transcricionais e traducionais. Além disso, a via de determinação do macho da *Drosophila* requer que um número de moléculas não-funcionais seja continuamente produzido, o que parece ser uma perda desnecessária. Uma especulação é a de que essa cascata de *splicing* de RNA, assim como os ribocontroles discutidos anteriormente, representa uma estratégia de controle an-

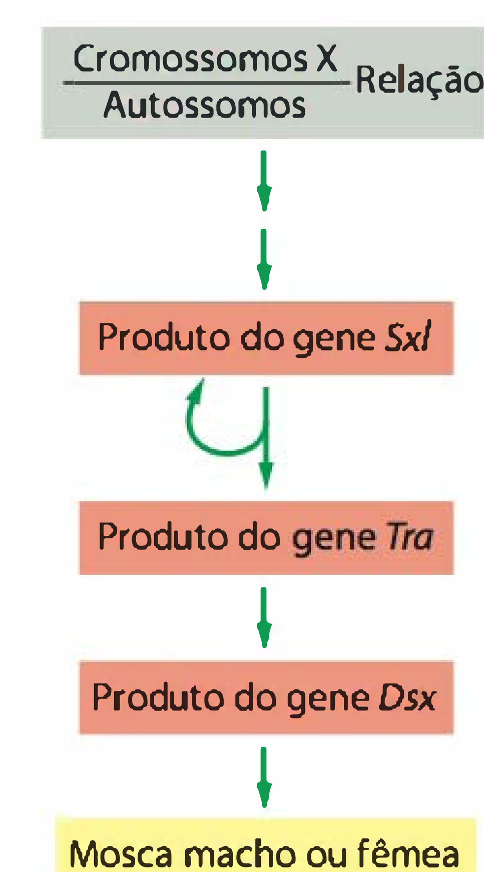


Figura 7-97 Determinação de sexo em *Drosophila*. Os produtos gênicos mostrados atuam em uma cascata sequencial para determinar o sexo da mosca de acordo com a relação cromossomos X/autossomos (X/A). Os genes são chamados de *Sexo-letal* (*Sex-lethal* [*Sxl*]), *Transformador* (*Transformer* [*Tra*]) e *Duplo-sexo* (*Doublesex* [*Dsx*]) devido aos fenótipos que resultam quando o gene é inativado por uma mutação. A função desses produtos gênicos é transmitir a informação a respeito da relação cromossomos X/autossomos para muitos outros genes que criam os fenótipos relacionados ao sexo. Esses outros genes funcionam como dois conjuntos alternativos: aqueles que especificam características femininas e aqueles que especificam características masculinas (ver Figura 7-98).

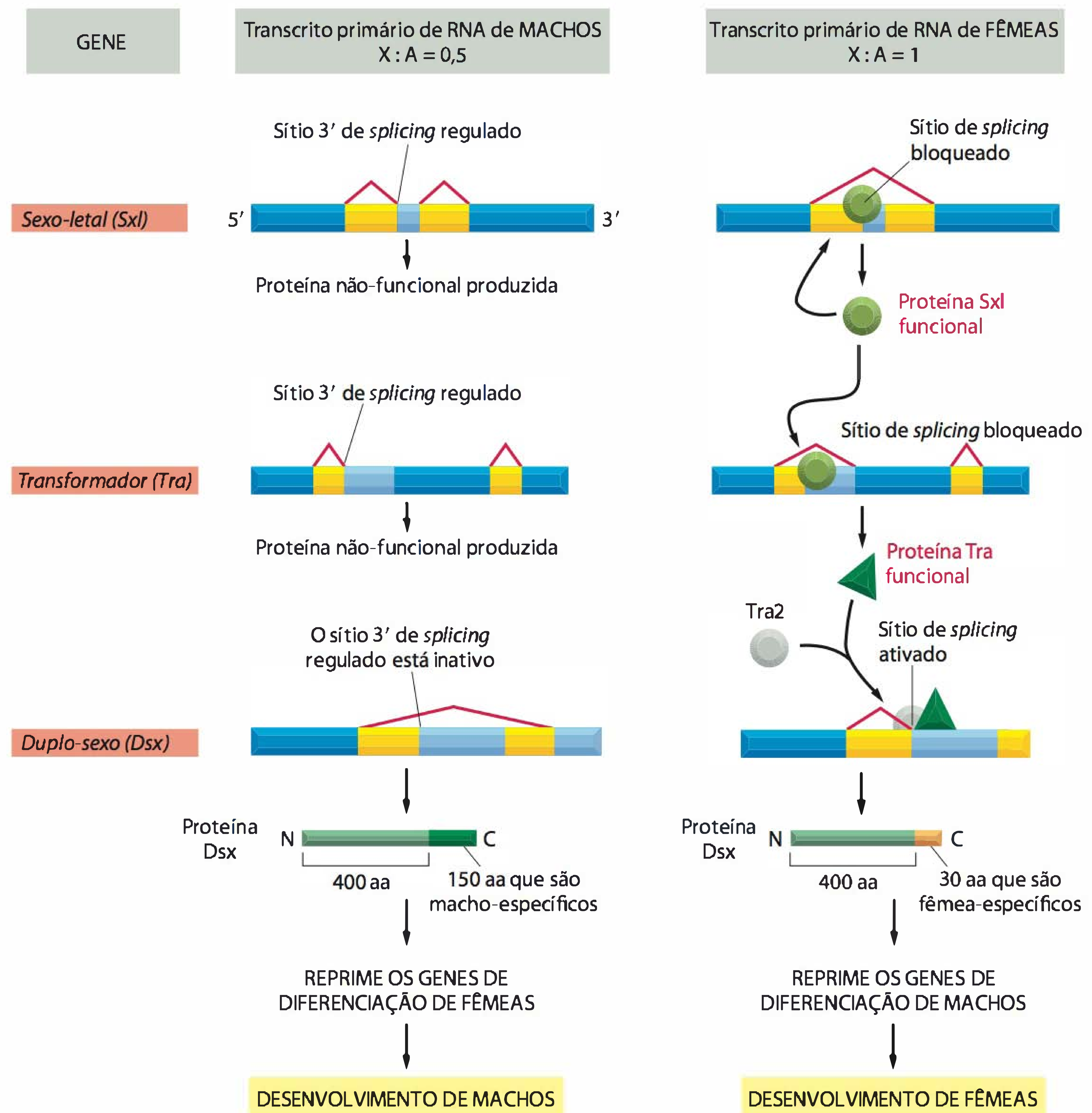


Figura 7-98 Cascata de alterações na expressão gênica que determinam o sexo de uma mosca por *splicing* alternativo do RNA. Uma relação de 0,5 para cromossomos X/autossomos resulta no desenvolvimento de machos. O macho é a via "normal" na qual ambos os genes *Sxl* e *Tra* são transcritos, mas os RNAs são constitutivamente submetidos a *splicing* a fim de produzir somente moléculas de RNA não-funcionais, e o transcrito de *Dsx* é submetido a *splicing* para produzir uma proteína que desativa os genes que especificam características femininas. Uma relação de 1 para cromossomos X/autossomos desencadeia a via de diferenciação das fêmeas no embrião pela ativação transiente de um promotor dentro do gene *Sxl*, o qual induz a síntese de uma classe especial de transcritos *Sxl* que são constitutivamente submetidos a *splicing* para produzir proteínas Sxl funcionais. Sxl é uma proteína regulatória de *splicing* com dois sítios de ação: (1) liga-se ao transcrito de RNA de *Sxl* produzido constitutivamente, causando um *splicing* específico de fêmeas que continua a produção de uma proteína Sxl funcional, e (2) liga-se ao RNA de *Tra* produzido constitutivamente, causando um *splicing* alternativo deste transcrito, o qual agora produz uma proteína reguladora Tra ativa. A proteína Tra atua com a proteína Tra2, que é produzida constitutivamente para produzir a forma submetida a um *splicing* específico de fêmeas do transcrito *Dsx*; este codifica a forma das fêmeas da proteína Dsx, a qual desativa os genes que especificam características de machos.

Os componentes dessa via foram inicialmente identificados pelo estudo de mutantes de *Drosophila* que estavam alterados no seu desenvolvimento sexual. O gene *Dsx*, por exemplo, tem seu nome (*Doublesex*) derivado da observação de que uma mosca sem esse produto gênico expressa as características de machos e fêmeas. Note que essa via inclui tanto o controle negativo como positivo de *splicing* (ver Figura 7-96). Sxl liga-se a uma sequência de nucleotídeos rica em pirimidinas que é parte de uma sequência consenso padrão de *splicing* e bloqueia o acesso para o fator normal de *splicing*, U2AF (ver Figura 6-29). Tra liga-se a sequências específicas de RNA em um éxon e ativa um sinal de *splicing* normalmente subótimo pela ligação de U2AF.

tigo, que restou de um estágio inicial da evolução, quando o RNA era a molécula biológica predominante e os controles da expressão gênica deviam ter como base, quase que inteiramente, as interações RNA-RNA.

Uma mudança no sítio de clivagem no transcrito de RNA e de adição de poli-A pode alterar a extremidade C-terminal de uma proteína

Vimos no Capítulo 6 que a extremidade 3′ de uma molécula de mRNA eucariótica não é formada pela terminação da síntese de RNA pela RNA-polimerase. Ao invés disso, ela resulta de uma reação de clivagem do RNA que é catalisada por fatores adicionais enquanto o transcrito está se alongando (ver Figura 6-37). Uma célula pode controlar o sítio dessa clivagem de maneira a alterar a extremidade C-terminal da proteína resultante.

Um exemplo bem estudado é a troca da síntese de moléculas de anticorpos ligados à membrana por anticorpos secretados que ocorre durante o desenvolvimento dos linfócitos B (ver Figura 25-17). Muito cedo na história de vida de um linfócito B, o anticorpo que ele produz fica ancorado na membrana plasmática, onde serve como um receptor para os antígenos. A estimulação por antígenos induz os linfócitos B a multiplicarem-se e a começarem a secretar seus anticorpos. A forma secretada do anticorpo é idêntica à forma ligada à membrana, exceto pela extremidade C-terminal. Nessa parte da proteína, a forma ligada à membrana possui uma longa cadeia de aminoácidos hidrofóbicos que atravessa a bicamada lipídica da membrana, enquanto a forma secretada possui uma cadeia muito menor de aminoácidos hidrofílicos. Assim, a troca do anticorpo ligado à membrana pelo secretado necessita de uma sequência de nucleotídeos diferente no final 3′ do mRNA; essa diferença é gerada por meio de uma mudança no tamanho do transcrito primário do RNA, causada por uma mudança no sítio de clivagem do RNA, como mostrado na **Figura 7-99**. Essa mudança é causada por um aumento de concentração da subunidade de CstF, a proteína que se liga a sequências ricas em G/U dos sítios de clivagem do RNA e de adição de poli-A e que

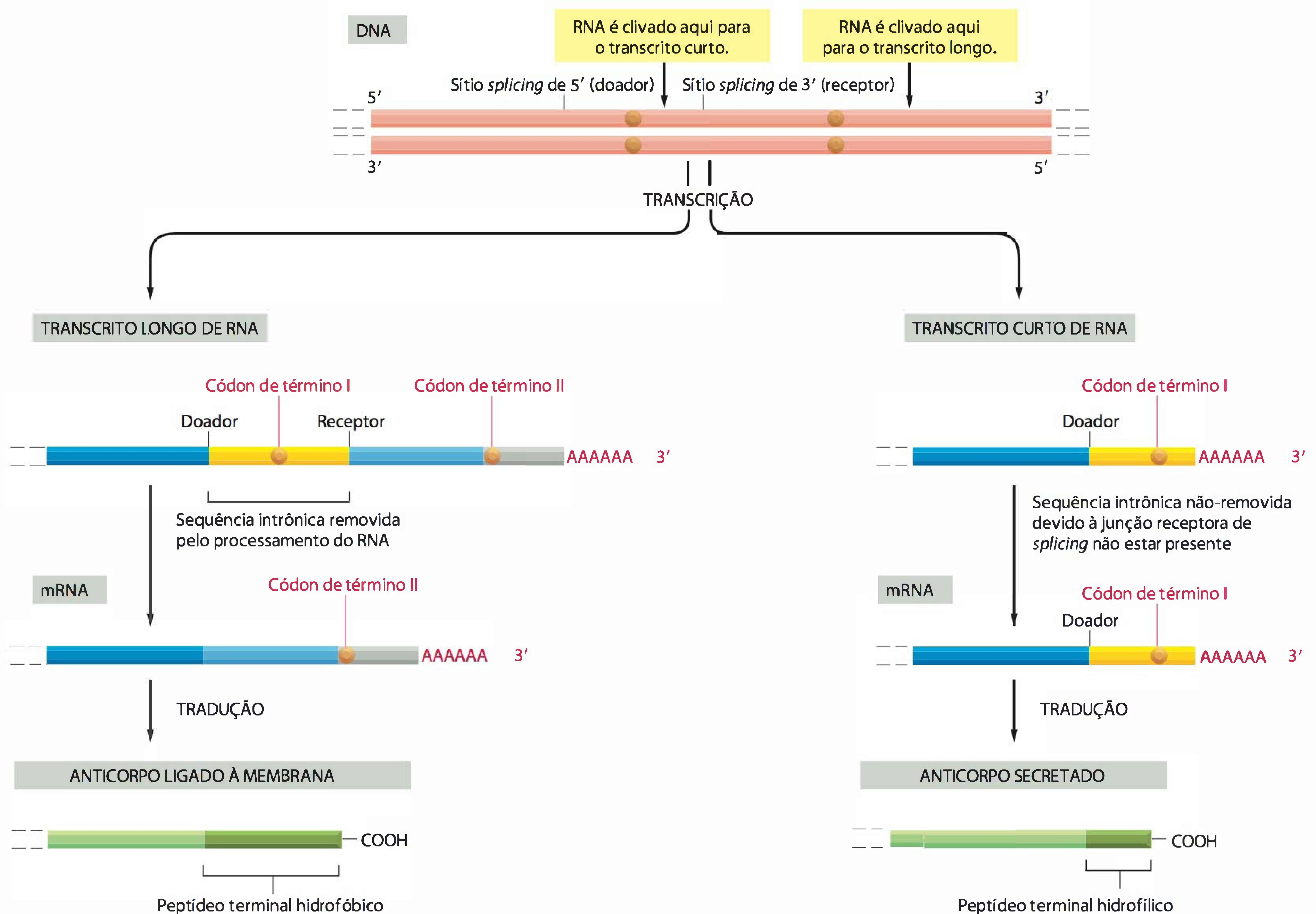


Figura 7-99 Regulação do sítio de clivagem do RNA e adição de poli-A determinam se uma molécula de anticorpo será secretada ou permanecerá ligada à membrana. Em linfócitos B não-estimulados (*esquerda*), um transcrito de RNA longo é produzido, e a sequência intrônica próxima do seu final 3′ é removida por um *splicing* de RNA, dando origem a uma molécula de mRNA que codifica para uma molécula de anticorpo ligada à membrana. Por outro lado, após a estimulação por antígenos (*direita*) o transcrito primário é clivado *upstream* do sítio de *splicing* à frente da última sequência exônica. Como resultado, uma parte da sequência intrônica que é removida do transcrito longo permanece como uma sequência codificante em um transcrito curto. Estas são as sequências nucleotídicas que codificam a porção hidrofílica C-terminal da molécula de anticorpo secretada.

promove a clivagem do RNA (ver Figuras 6-37 e 6-38). Os primeiros sítios de clivagem e de adição de poli-A encontrados por uma RNA-polimerase transcrevendo o gene de anticorpo são subótimos e, normalmente, não reconhecidos nos linfócitos B não-estimulados, levando à produção do transcrito de RNA mais longo. Quando ativado a produzir anticorpos, o linfócito B aumenta a sua concentração de CstF; como resultado, a clivagem passa a ocorrer no sítio subótimo e o transcrito mais curto é produzido. Dessa maneira, uma mudança na concentração de um fator geral de processamento do RNA pode produzir efeitos dramáticos na expressão de um gene particular.

A edição do RNA pode alterar o significado da mensagem do RNA

Os mecanismos moleculares usados pelas células são uma fonte contínua de surpresas. Um exemplo é o processo de **edição do RNA**, que altera as sequências de nucleotídeos assim que eles são transcritos e, dessa forma, altera a mensagem que eles carregam. A forma mais dramática de edição do RNA foi descoberta nos transcritos do RNA que codificam para proteínas da mitocôndria de tripanossomos. Aqui, um ou mais nucleotídeos U são inseridos (ou, menos frequentemente, removidos) em regiões selecionadas de um transcrito, alterando tanto o módulo de leitura original como a sequência e, dessa forma, mudando o significado da mensagem. Em alguns genes, a edição é tão extensa que quase a metade dos nucleotídeos no mRNA maduro são nucleotídeos U que foram inseridos durante o processo de edição. Um conjunto de moléculas de RNA de 40 a 80 nucleotídeos de tamanho que é transcrito separadamente contém a informação que especifica exatamente como o transcrito inicial de RNA deve ser alterado. Esses chamados *RNAs-guia* possuem um final 5′ que é complementar em sequência a uma extremidade da região do transcrito a ser editada, seguido pela sequência que especifica o conjunto de nucleotídeos a ser inserido no transcrito (**Figura 7-100**). O mecanismo de edição é notavelmente complexo: em cada posição editada, o RNA é quebrado, nucleotídeos U são adicionados à extremidade 3′ quebrada e o RNA é ligado.

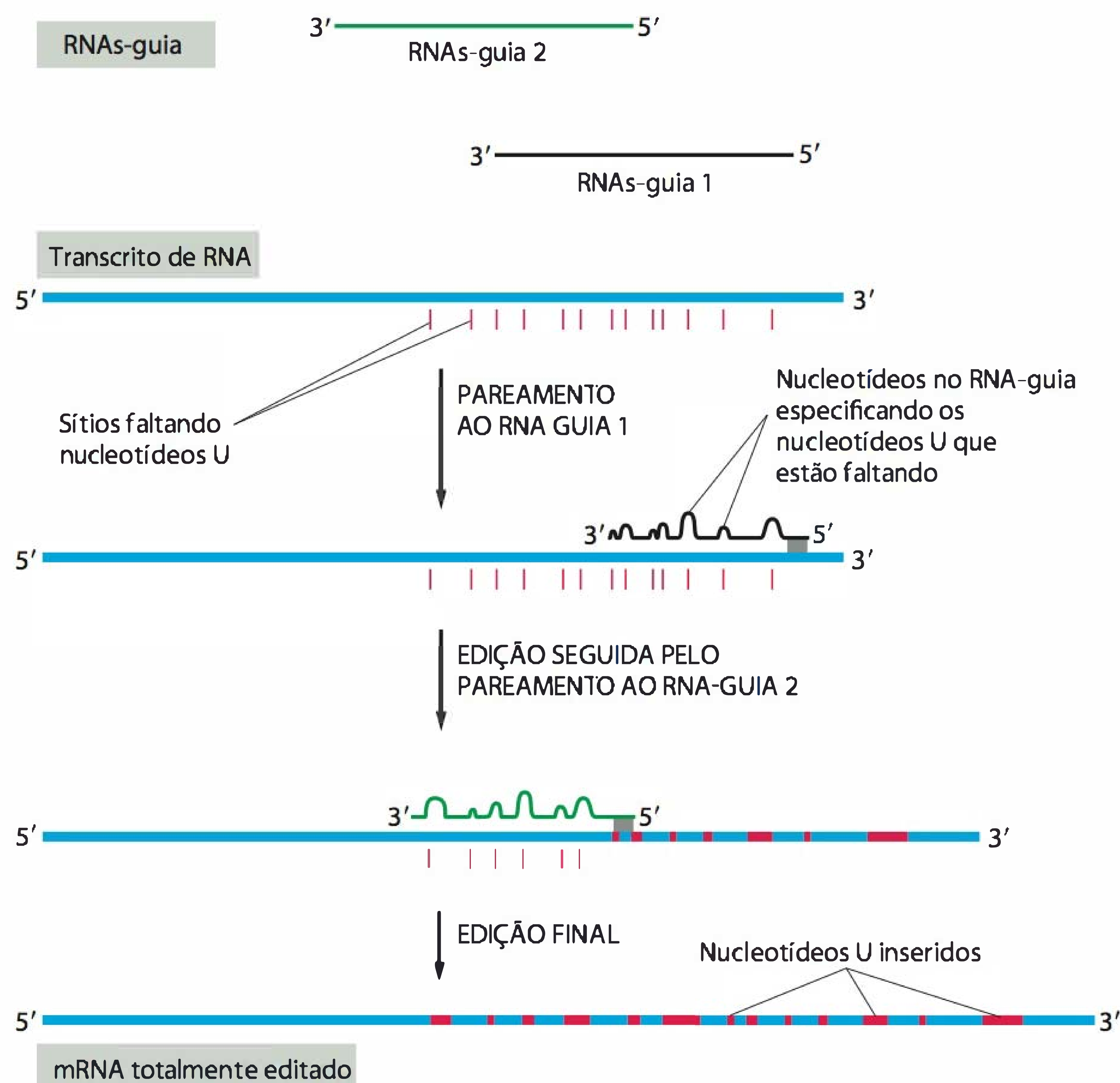


Figura 7-100 Edição do RNA na mitocôndria de tripanossomos. A edição geralmente inicia próximo ao final 3′ e progride em direção ao final 5′ do transcrito de RNA, como mostrado, pois a "sequência-âncora" do final 5′ da maioria dos RNAs-guia pode parear-se somente com sequências editadas. Os nucleotídeos U são adicionados por uma enzima especializada chamada de uridilil-transferase.

A edição do RNA de um tipo muito mais refinado ocorre em mamíferos. Aqui, dois tipos de edição ocorrem, a desaminação da adenina para a produção de inosina (edição de A para I) e a desaminação da citosina para a produção de uracila (edição de C para U; ver Figura 5-50). Devido a essas modificações químicas alterarem as propriedades de pareamento das bases (I pareia com C e U pareia com A), elas podem produzir profundos efeitos no significado do RNA. Se a edição ocorre em uma região codificante, ela pode alterar a sequência de aminoácidos da proteína ou produzir uma proteína truncada. Edições que ocorram fora das sequências codificantes podem afetar o padrão de *splicing* do pré-mRNA, o transporte do mRNA do núcleo para o citosol ou a eficiência com a qual o RNA é traduzido.

O processo de edição de A para I é particularmente prevalente em humanos, onde estima-se afetar mais de 1.000 genes. Enzimas chamadas de *adenosina-desaminases agindo no RNA* (*ADARs, adenosine deaminases acting on RNA*) produzem esse tipo de edição; essas enzimas reconhecem uma estrutura de RNA de fita dupla que é formada pelo pareamento de bases entre o sítio a ser editado e uma sequência complementar, localizada em qualquer outra região na mesma molécula de RNA, comumente em um íntron 3′ (**Figura 7-101**). Essas sequências complementares especificam se o mRNA deve ser editado e, caso deva, exatamente onde a edição deve ser feita. Um exemplo especialmente importante de edição de A para I ocorre no pré-mRNA que codifica para um canal iônico regulado por transmissores no cérebro. Uma única edição altera uma glutamina para arginina; o aminoácido afetado reside na parede interna do canal, e a edição altera a permeabilidade do canal ao Ca^{+2}. A importância dessa edição em camundongos tem sido demonstrada pela deleção do gene relevante ADAR. Os camundongos mutantes são propensos a ataques epiléticos e morrem durante ou em seguida após o desmame. Se o gene para o canal iônico regulado está mutado para produzir diretamente a forma editada da proteína, os camundongos que não apresentam ADAR desenvolvem-se normalmente, mostrando que a edição do RNA do canal iônico geralmente é crucial para o desenvolvimento apropriado do cérebro.

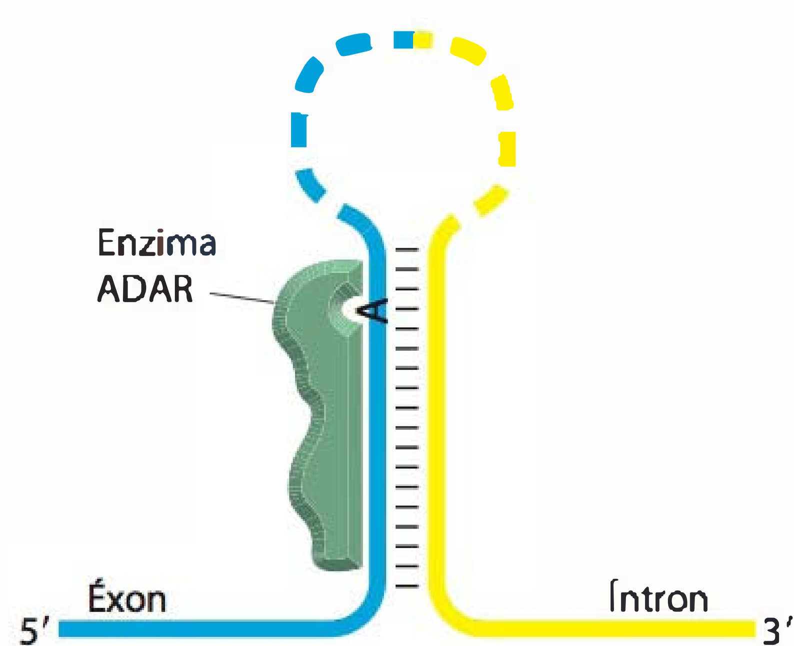


Figura 7-101 Mecanismo de edição de A-I em mamíferos. A posição de uma edição é sinalizada por sequências de RNA presentes na mesma molécula de RNA. Normalmente, uma sequência complementar à posição de uma edição está presente em um íntron, e o RNA de fita dupla resultante atrai a enzima de edição A-I ADAR. Esse tipo de edição ocorre no núcleo, antes que o pré-mRNA tenha sido totalmente processado. Camundongos e humanos possuem três enzimas ADAR: ADAR1 é necessária no fígado para o desenvolvimento apropriado das células vermelhas do sangue, ADR2 é necessária para o desenvolvimento apropriado do cérebro (como descrito no texto), e a função de ADR3 ainda não é conhecida.

A edição de C para U, a qual é feita por um conjunto diferente de enzimas, também é crucial em mamíferos. Por exemplo, em certas células do intestino, o mRNA para a apolipoproteína B sofre uma edição de C para U que cria um códon de parada prematuro e, assim, produz uma versão menor da proteína. Nas células do fígado, a enzima de edição não é expressa e a apolipoproteína B completa é produzida. As duas isoformas proteicas possuem propriedades diferentes e cada uma desempenha uma função especializada no metabolismo de lipídeos que é específica para o órgão que a produz.

A razão da existência da edição nos mamíferos é um mistério. Uma ideia é a de que ela surgiu na evolução para corrigir "erros" no genoma. Outra é a de que ela surgiu como

uma maneira, de certa forma vigorosa, para a célula produzir proteínas sutilmente diferentes a partir do mesmo gene. Uma terceira visão é que a edição de RNA evoluiu originalmente como um mecanismo de defesa contra retrovírus e retrotransposons e foi mais tarde adaptada pela célula para alterar os significados de certos mRNAs. Além disso, a edição do RNA ainda desempenha funções importantes na defesa celular. Alguns retrovírus, incluindo o HIV (ver Figura 5-71), são editados extensivamente após infectarem as células. Essa hiperedição cria muitas mutações deletérias no genoma do RNA viral e também induz os mRNAs virais a serem retidos no núcleo, onde serão finalmente degradados. Embora alguns retrovírus modernos protejam-se contra esse mecanismo de defesa, ele presumivelmente auxilia a manter muitos vírus sob controle.

Os primatas possuem níveis muito mais altos de edição de A para I do que outros mamíferos, e a maioria ocorre nos RNAs que são transcritos a partir dos elementos Alu altamente abundantes. Tem sido proposto que a edição de A para I impediu que esses elementos móveis subvertessem completamente os nossos genomas pela inativação dos transcritos de RNA que eles necessitam para se proliferarem (ver Figura 5-74). Se essa ideia está correta, a edição do RNA pode exercer um impacto profundo na moldagem do genoma humano moderno.

O transporte do RNA a partir do núcleo pode ser regulado

Estima-se que, nos mamíferos, somente em torno de uma vigésima parte da massa total de RNA sintetizado deixa o núcleo. Vimos no Capítulo 6 que a maioria das moléculas de RNA de mamíferos sofre um processamento extensivo, e as "sobras" de fragmentos de RNA (os íntrons excisados e as sequências de RNA 3′ ao sítio de clivagem/poli-A) são degradadas no núcleo. Os RNAs processados de forma incompleta ou danificados também são normalmente degradados no núcleo, como parte de um sistema de controle de qualidade da produção do RNA.

Como descrito no Capítulo 6, a exportação de moléculas de RNA do núcleo é postergada até o processamento ter-se completado. Entretanto, mecanismos que deliberadamente sobreponham esse controle podem ser usados para regular a expressão gênica. Essa estratégia forma a base para um dos exemplos mais bem entendidos de **transporte nuclear regulado** do mRNA, o qual ocorre no HIV, o vírus que causa a AIDS.

Como vimos no Capítulo 5, o HIV, uma vez dentro da célula, direciona a formação de uma cópia de DNA de fita dupla do seu genoma, o qual é, então, inserido no genoma do hospedeiro (ver Figura 5-71). Uma vez inserido, o DNA viral é transcrito como uma longa molécula de RNA pela RNA-polimerase II da célula hospedeira. Esse transcrito é submetido a vários tipos de *splicing* para produzir 30 espécies de mRNA diferentes, que, por sua vez, são traduzidos em proteínas diferentes (**Figura 7-102**). A fim de produzir a progênie de vírus, transcritos virais inteiros não submetidos a *splicing* precisam ser exportados do núcleo para o citosol, onde serão empacotados em capsídeos virais e servem como genomas virais (ver Figura 5-71). Esse largo transcrito, assim como os mRNAs do HIV que foram submetidos a *splicing* alternativo e que precisam ser transportados para o citoplasma para a síntese proteica, ainda carrega íntrons completos. O bloqueio da célula hospedeira para a exportação nuclear do RNA não submetido a *splicing* dessa forma apresenta um problema especial para o HIV.

O bloqueio é superado de forma engenhosa. O vírus codifica uma proteína (chamada de Rev) que se liga a uma sequência específica de RNA (chamada de elemento de resposta a Rev, RRE, *Rev responsive element*) localizada dentro de um íntron viral. A proteína Rev interage com o receptor de exportação nuclear (exportina 1), que direciona o movimento dos RNAs virais através dos poros nucleares para o citosol, apesar da presença de sequências intrônicas. Discutiremos em detalhe o funcionamento dos receptores de exportação no Capítulo 12.

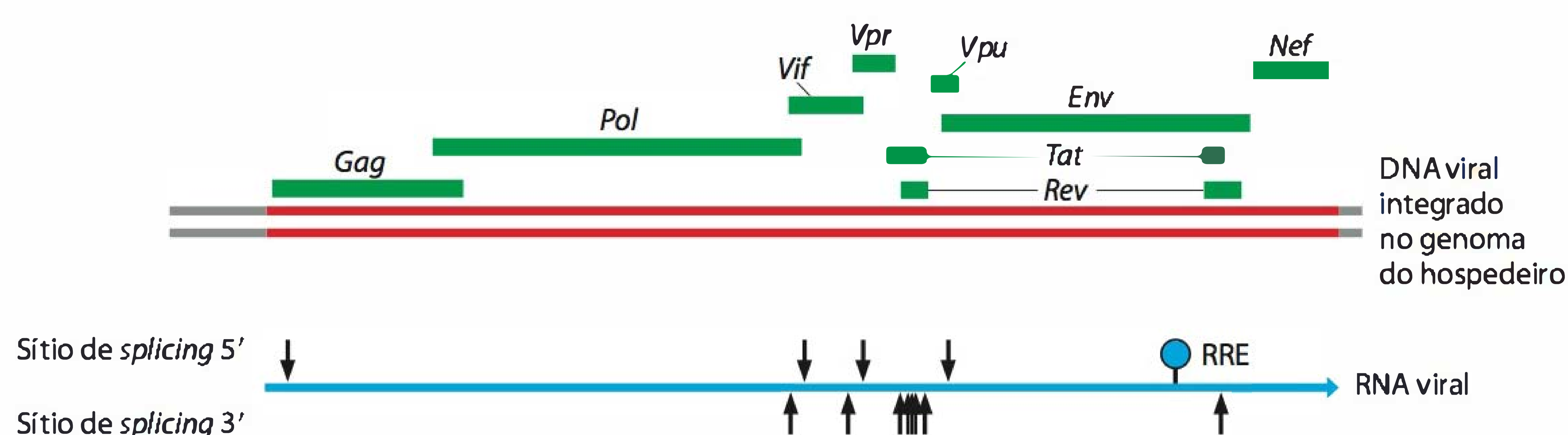


Figura 7-102 Genoma compacto do HIV, o vírus da AIDS humana. As posições de nove genes do HIV estão mostradas em *verde*. A *linha vermelha dupla* indica uma cópia de DNA do genoma viral que se tornou integrado no DNA hospedeiro (*cinza*). Note que as regiões codificantes de muitos genes sobrepõem-se, e as de *Tat* e *Rev* são divididas por íntrons. A *linha azul* na parte de baixo da figura representa o transcrito do pré-mRNA do DNA viral mostrando as localizações de todos os possíveis sítios de *splicing* (*setas*). Existem muitas maneiras alternativas de *splicing* do transcrito viral; por exemplo, os mRNAs de *Env* retêm o íntron que havia sido retirado por *splicing* dos mRNAs de *Tat* e *Rev*. O elemento de resposta a Rev (RRE) é indicado por um círculo azul, sendo um trecho longo de 234 nucleotídeos de RNA que se dobra em uma estrutura definida; Rev reconhece um grampo particular dentro dessa estrutura maior.

O gene *Gag* codifica para uma proteína clivada em várias proteínas menores que formam o capsídeo viral. O gene *Pol* codifica para uma proteína clivada para produzir a transcriptase reversa (a qual transcreve o RNA em DNA) assim como a integrase envolvida na integração do genoma viral (como DNA de fita dupla) no genoma do hospedeiro. Pol é produzida por uma alteração do módulo de leitura ribossomal da tradução que inicia em *Gag* (ver Figura 6-78). O gene *Env* codifica para as proteínas do envelope (ver Figura 5-71). Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu e Nef são pequenas proteínas com uma variedade de funções. Por exemplo, Rev regula a exportação nuclear (ver Figura 7-103) e Tat regula o alongamento da transcrição pelo genoma viral integrado (ver p. 478).

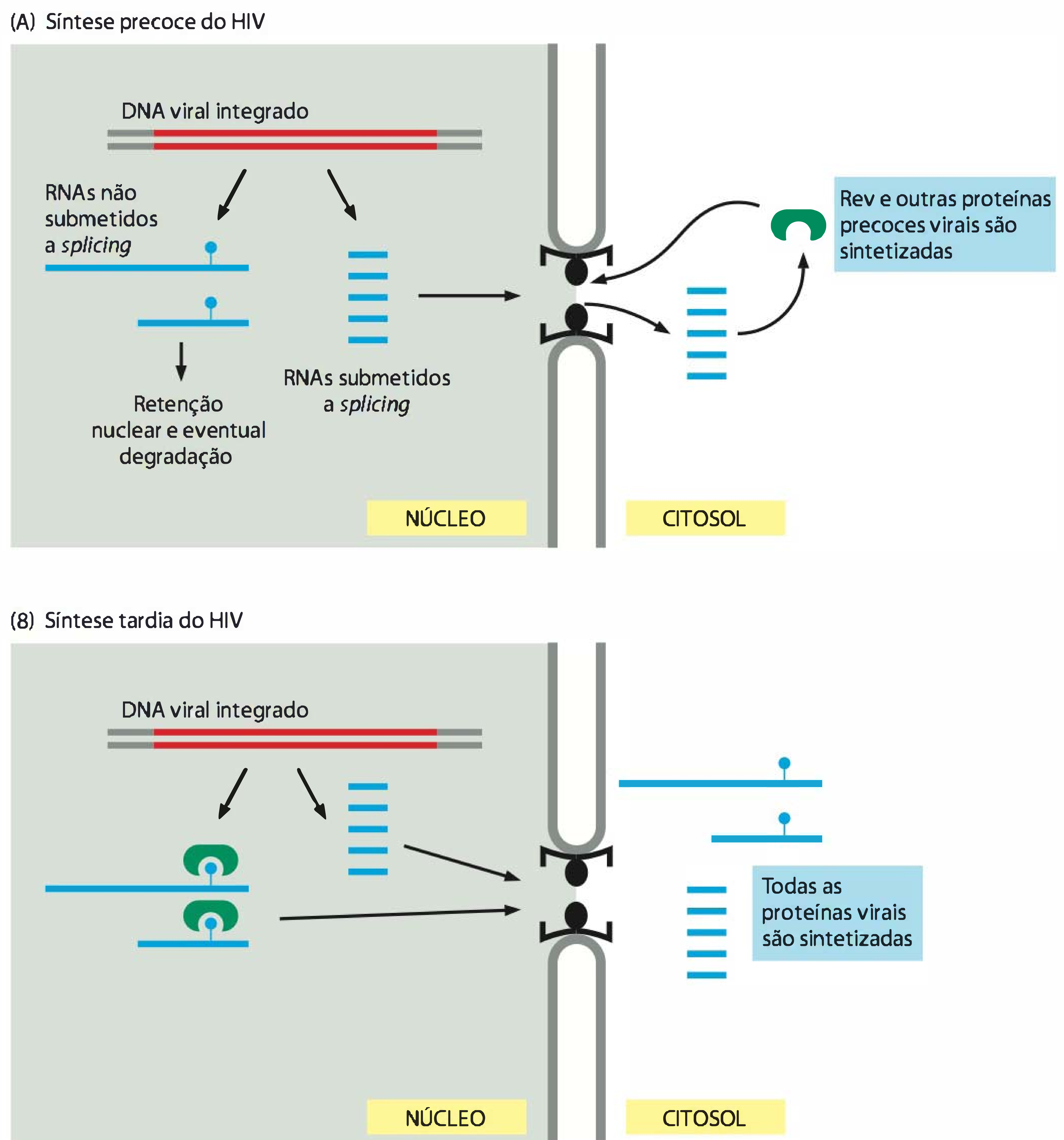


Figura 7-103 Regulação da exportação nuclear pela proteína Rev do HIV. Precocemente na infecção pelo HIV (A), somente os RNAs submetidos a *splicing* completo (os quais contêm as sequências codificantes para Rev, Tat e Nef) são exportados do núcleo e traduzidos. Uma vez que proteína Rev suficiente tenha sido acumulada e transportada ao núcleo (B), os RNAs virais não submetidos a *splicing* podem ser exportados do núcleo. Muitos desses RNAs são traduzidos em proteína, e os transcritos completos são empacotados em novas partículas virais.

A regulação da exportação nuclear pela Rev tem várias consequências importantes para o crescimento e a patologia do HIV. Além de garantir a exportação nuclear de RNAs específicos não submetidos a *splicing*, ela divide a infecção viral em uma fase precoce (na qual a Rev é traduzida a partir de um RNA submetido a *splicing* total, e RNAs contendo um íntron são retidos no núcleo e degradados) e uma fase tardia (na qual RNAs não submetidos a *splicing* são exportados devido à função da Rev). Essa regulação temporal auxilia a replicação do vírus, fornecendo os produtos gênicos praticamente na ordem em que eles são necessários (**Figura 7-103**). É também possível que a regulação pela Rev auxilie o vírus HIV a atingir a latência, uma condição em que o genoma do HIV está integrado no genoma da célula hospedeira, mas a produção das proteínas virais está temporariamente suspensa. Se, após a sua entrada inicial na célula hospedeira, as condições tornarem-se desfavoráveis para a transcrição e a replicação viral, a Rev é produzida em níveis muito baixos para promover a exportação do RNA não submetido a *splicing*. Essa situação bloqueia o ciclo de crescimento viral. Quando as condições para a replicação viral melhoram, os níveis da Rev aumentam, e o vírus pode entrar no ciclo replicativo.

Alguns mRNAs estão localizados em regiões específicas do citoplasma

Uma vez que um mRNA eucariótico recentemente produzido tenha passado através de um poro nuclear e entrado no citosol, ele normalmente é encontrado pelos ribossomos, os quais o traduzem em uma cadeia polipeptídica (ver Figura 6-40). Uma vez que a primeira rodada de tradução "passa" no teste de degradação mediada por ausência de sentido (ver Figura 6-80), o mRNA normalmente é traduzido corretamente. Se o mRNA codifica uma proteína que é destinada a ser secretada ou expressa na superfície celular, ela será direcionada para o retículo endoplasmático (RE) por uma sequência-sinal no terminal amino da proteína; os componentes do aparato de distribuição de proteínas reconhecem a sequência-sinal assim que ela emerge do ribossomo e direcionam o complexo inteiro de ribossomo, o mRNA e a

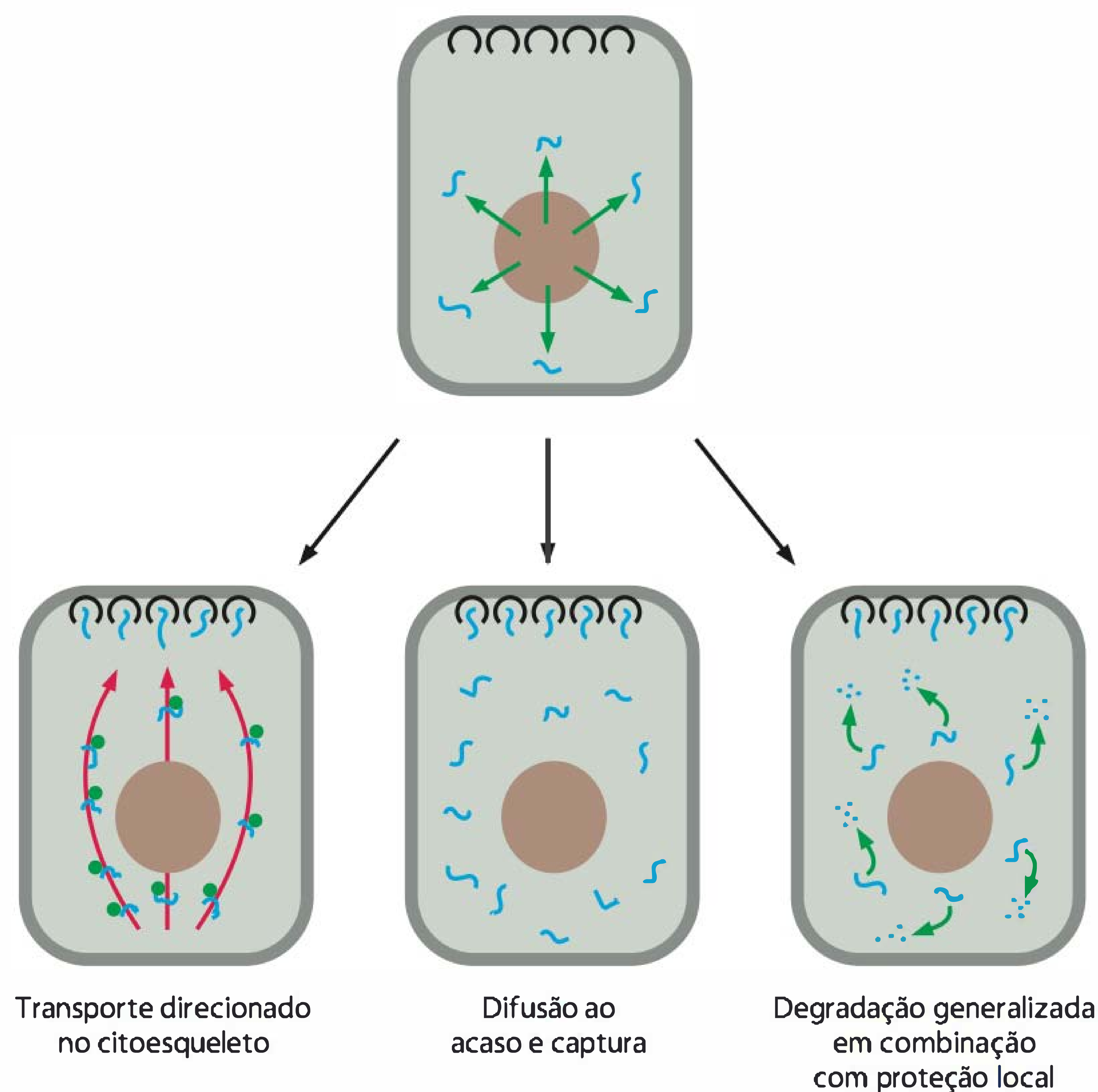


Figura 7-104 Três mecanismos para a localização dos mRNAs. O mRNA a ser localizado deixa o núcleo através dos poros nucleares (*acima*). Alguns dos mRNAs localizados (*diagrama esquerdo*) dirigem-se para seu destino pela associação com motores do citoesqueleto. Como descrito no Capítulo 16, esses motores usam a energia da hidrólise do ATP para mover-se unidirecionalmente ao longo dos componentes do citoesqueleto (*vermelho*). Nos seus destinos, os mRNAs são colocados em posição por proteínas-âncora (*preto*). Outros mRNAs difundem-se randomicamente através do citosol e são simplesmente capturados e assim concentrados nos sítios de localização (*diagrama central*). Alguns desses mRNAs (*diagrama direito*) são degradados no citosol a não ser que tenham se ligado, por difusão ao acaso, ao complexo de localização proteica que ancora e protege o mRNA da degradação (*preto*). Cada um desses mecanismos necessita de sinais no mRNA, os quais normalmente estão localizados na UTR 3′ (ver Figura 7-105). Em muitos casos de localização do mRNA, mecanismos adicionais bloqueiam a tradução do mRNA até que ele seja localizado apropriadamente. (Adaptada de H. D. Lipshitz e C. A. Smibert, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:476-488, 2000. Com permissão de Elsevier.)

proteína nascente para a membrana do RE, onde o restante da cadeia polipeptídica é sintetizado, como discutido no Capítulo 12. Em outros casos, a proteína inteira é sintetizada por ribossomos livres no citosol, e os sinais na cadeia polipeptídica completa podem, então, direcionar a proteína para outros sítios na célula.

Alguns RNAs são eles próprios direcionados a localizações intracelulares específicas antes de uma tradução eficiente começar, permitindo à célula posicionar os seus mRNAs próximos dos sítios onde as proteínas codificadas são necessárias. Essa estratégia fornece à célula muitas vantagens. Por exemplo, ela permite o estabelecimento de assimetrias no citosol da célula, uma etapa-chave em muitos estágios do desenvolvimento. mRNAs localizados, acoplados ao controle de tradução, também permitem que a célula regule a expressão gênica de forma independente em suas diferentes partes. Essa característica é particularmente importante em células grandes e altamente polarizadas como os neurônios, onde os cones de crescimento precisam responder aos sinais sem esperar o envolvimento do núcleo distante. A localização do RNA tem sido observada em muitos organismos, incluindo fungos unicelulares, plantas e animais, sendo provável que seja um mecanismo comum que as células utilizam para concentrar a produção em altos níveis de proteínas em sítios específicos.

Vários mecanismos distintos para a localização do mRNA foram descobertos (**Figura 7-104**), mas todos necessitam de sinais específicos no próprio mRNA. Esses sinais normalmente estão concentrados na *região 3′não-traduzida* (*UTR, untranslated region*), a região de RNA que se estende a partir do códon de parada que termina a síntese de proteína para o início da cauda de poli-A (**Figura 7-105**). Essa localização do mRNA normalmente está acoplada a controles traducionais para garantir que o mRNA permaneça quiescente até que tenha sido colocado em posição.

O ovo de *Drosophila* exibe um exemplo notável de localização do mRNA. O mRNA que codifica a proteína de regulação gênica bicoid é localizado pela fixação ao citoesqueleto na extremidade anterior do ovo em desenvolvimento. Quando a tradução desse mRNA é desencadeada pela fertilização, é gerado um gradiente da proteína bicoid, o qual desempenha um papel crucial na direção do desenvolvimento da parte anterior do embrião (mostrado na Figura 7-53 e discutido em maiores detalhes no Capítulo 22). Muitos mRNAs nas células somáticas também são localizados de maneira similar. O mRNA que codifica a actina, por exemplo, está localizado no córtex celular rico em filamentos de actina, nos fibroblastos de mamíferos, devido a um sinal UTR 3′.

Vimos no Capítulo 6 que as moléculas de mRNA saem do núcleo carregando numerosas marcas na forma de modificações do RNA (o Quepe 5′ e a cauda de poli-A 3′) e proteínas ligadas (p. ex., complexos éxon-junção) que significam o término bem-sucedido das diferentes etapas do processamento do pré-mRNA. Como recém-descrito, pode-se considerar a UTR 3′ de um mRNA como um "código de endereçamento", o qual direciona os mRNAs para

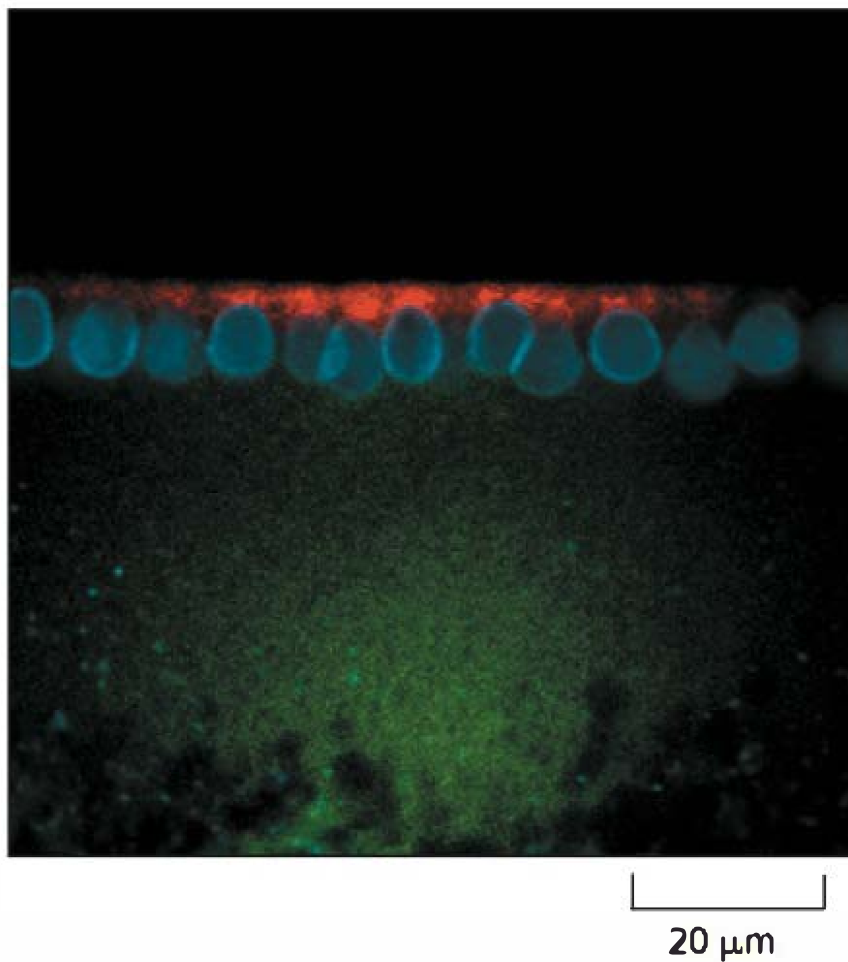


Figura 7-105 Importância da UTR 3′ na localização de mRNAs em regiões específicas do citoplasma. Para este experimento, dois RNAs diferentes marcados fluorescentemente foram preparados pela transcrição *in vitro* de DNA na presença de derivados de UTP marcados fluorescentemente. Um RNA (marcado com um fluorocromo *vermelho*) contém a região codificante para a proteína hairy de *Drosophila* e inclui a UTR 3′ adjacente (ver Figura 6-22). O outro RNA (marcado em *verde*) contém a região codificante de hairy com a UTR 3′ deletada. Os dois DNAs foram misturados e injetados em um embrião de *Drosophila* em um estágio do desenvolvimento onde múltiplos núcleos residem em um citoplasma comum (ver Figura 7-53). Quando os RNAs fluorescentes foram visualizados 10 minutos mais tarde, o RNA completo de hairy (*vermelho*) foi localizado no lado apical do núcleo (*azul*), mas o transcrito que não possui a UTR 3′ (*verde*) falhou na localização. Hairy é uma das muitas proteínas de regulação gênica que especificam informações posicionais no embrião de *Drosophila* em desenvolvimento (discutido no Capítulo 22). Acredita-se que a localização do seu mRNA (mostrado neste experimento como dependente da sua UTR 3′) seja crítica para o desenvolvimento apropriado da mosca. (Cortesia de Simon Bullock e David Ish-Horowicz.)

diferentes locais na célula. A seguir veremos ainda que os mRNAs também carregam a informação que especifica a média de tempo que cada mRNA fica no citosol e a eficiência com que cada mRNA é traduzido em proteína. Em um sentido geral, as regiões não-traduzidas dos mRNAs eucarióticos assemelham-se às regiões de controle transcricional dos genes: as suas sequências de nucleotídeos contêm informações que especificam como o RNA deve ser usado, e as proteínas que interpretam essas informações ligam-se especificamente a essas sequências. Assim, acima e abaixo da especificação das sequências de aminoácidos das proteínas, as moléculas de mRNA são ricas em muitos tipos adicionais de informações.

As regiões 5′ e 3′ não-traduzidas dos mRNAs controlam a sua tradução

Uma vez que um mRNA tenha sido sintetizado, um dos meios mais comuns de regular os níveis do seu produto proteico é pelo controle da etapa em que a tradução é iniciada. Mesmo que os detalhes dos mecanismos de iniciação da tradução difiram entre eucariotos e bactérias (como vimos no Capítulo 6), são usadas algumas das mesmas estratégias reguladoras básicas.

Nos mRNAs bacterianos, uma região conservada de seis nucleotídeos, a *sequência de Shine-Dalgarno*, sempre é encontrada alguns nucleotídeos acima do códon de iniciação AUG. Essa sequência forma um pareamento de bases com o RNA 16S na subunidade pequena do ribossomo, posicionando corretamente o códon de iniciação AUG no ribossomo. Como essa interação contribui para uma maior eficiência da iniciação, ela equipa a célula bacteriana com uma maneira simples para regular a síntese de proteínas por meio de mecanismos de **controle traducional**. Esses mecanismos, desempenhados por proteínas ou moléculas de RNA, geralmente envolvem ou a exposição ou o bloqueio da sequência de Shine-Dalgarno (**Figura 7-106**).

Os mRNAs eucarióticos não contêm uma sequência Shine-Dalgarno. Ao invés disso, como discutido no Capítulo 6, a seleção de um códon AUG como o sítio de início da tradução é determinada pela sua proximidade ao quepe no final 5′ da molécula de mRNA, que é o sítio no qual a subunidade ribossomal menor liga-se ao mRNA e inicia a procura por um códon de iniciação AUG. Apesar das diferenças no início da tradução, os eucariotos utilizam estratégias semelhantes para regular a tradução. Por exemplo, repressores traducionais ligam-se à extremidade 5′ do mRNA e assim inibem o início da tradução. Outros repressores reconhecem as sequências de nucleotídeos na UTR 3′ de mRNAs específicos e diminuem o início da tradução interferindo com a comunicação entre o quepe 5′ e a cauda de poli-A 3′, etapa necessária para uma tradução eficiente (ver Figura 6-72). Um tipo importante de controle traducional em eucariotos recai a pequenos RNAs (denominados *microRNAs* ou *miRNAs*) que se ligam aos mRNAs e reduzem a produção de proteína. Os miRNAs são sintetizados e processados de maneira especializada, e voltaremos a eles no final do capítulo.

A fosforilação de um fator de iniciação regula de maneira global a síntese proteica

As células eucarióticas diminuem a taxa total de síntese proteica em resposta a várias situações, incluindo a privação de fatores de crescimento ou nutrientes, as infecções por vírus e os aumentos súbitos na temperatura. Grande parte dessa diminuição é causada pela fosforilação do fator de início da tradução eIF2 por proteína-cinases específicas que respondem às mudanças nas condições.

A função normal de eIF2 está resumida no Capítulo 6. Ele forma um complexo com GTP e medeia a ligação do tRNA iniciador metionil à subunidade ribossomal menor, a qual então liga-se ao final 5′ do mRNA e inicia a procura ao longo do mRNA. Quando um códon AUG é reconhecido, o GTP ligado é hidrolisado a GDP pela proteína eIF2, causando uma alteração conformacional na proteína e a liberando da subunidade ribossomal menor. A subunidade ribossomal maior, então, se junta à menor para formar o ribossomo completo, que inicia a síntese proteica (ver Figura 6-71).

Devido a eIF2 ligar-se muito fortemente a GDP, um fator de troca de nucleotídeos guanina (ver Figura 3-73), denominado eIF2B, é necessário para induzir a liberação de GDP, de maneira que uma nova molécula de GTP possa se ligar e eIF2 possa ser reutilizado (**Figura 7-107**A). A reutilização de eIF2 é inibida quando ele está fosforilado – o eIF2 fosforilado liga-

se a eIF2B de maneira anormalmente forte, inativando eIF2B. Há mais eIF2 do que eIF2B nas células, e mesmo uma fração dos eIF2 fosforilados pode capturar praticamente todos os eIF2B. Isso impede a reutilização do eIF2 não-fosforilado e retarda de maneira significativa a síntese proteica (Figura 7-107B).

A regulação do nível de eIF2 é especialmente importante nas células de mamíferos, sendo parte do mecanismo que permite entrar em um estado não-proliferativo de inatividade (chamado de G_0) – no qual a taxa de síntese proteica total é reduzida para em torno de um quinto da taxa das células em proliferação (discutido no Capítulo 17).

A iniciação em códons AUG *upstream* do início da tradução pode regular o início da tradução eucariótica

Vimos no Capítulo 6 que a tradução eucariótica normalmente inicia-se no primeiro AUG *downstream* ao final 5′ do mRNA, uma vez que ele é o primeiro AUG encontrado por uma subunidade ribossomal menor exploradora. Mas os nucleotídeos imediatamente ao lado do AUG também influenciam a eficiência do início da tradução. Se o sítio de reconhecimento for muito pobre, as subunidades ribossomais exploradoras irão ignorar o primeiro códon AUG no mRNA e pularão para o segundo ou o terceiro códon AUG. Esse fenômeno, conhecido como "exploração frouxa", é uma estratégia frequentemente utilizada para produzir duas ou mais proteínas intimamente relacionadas, diferindo somente nos seus terminais amino,

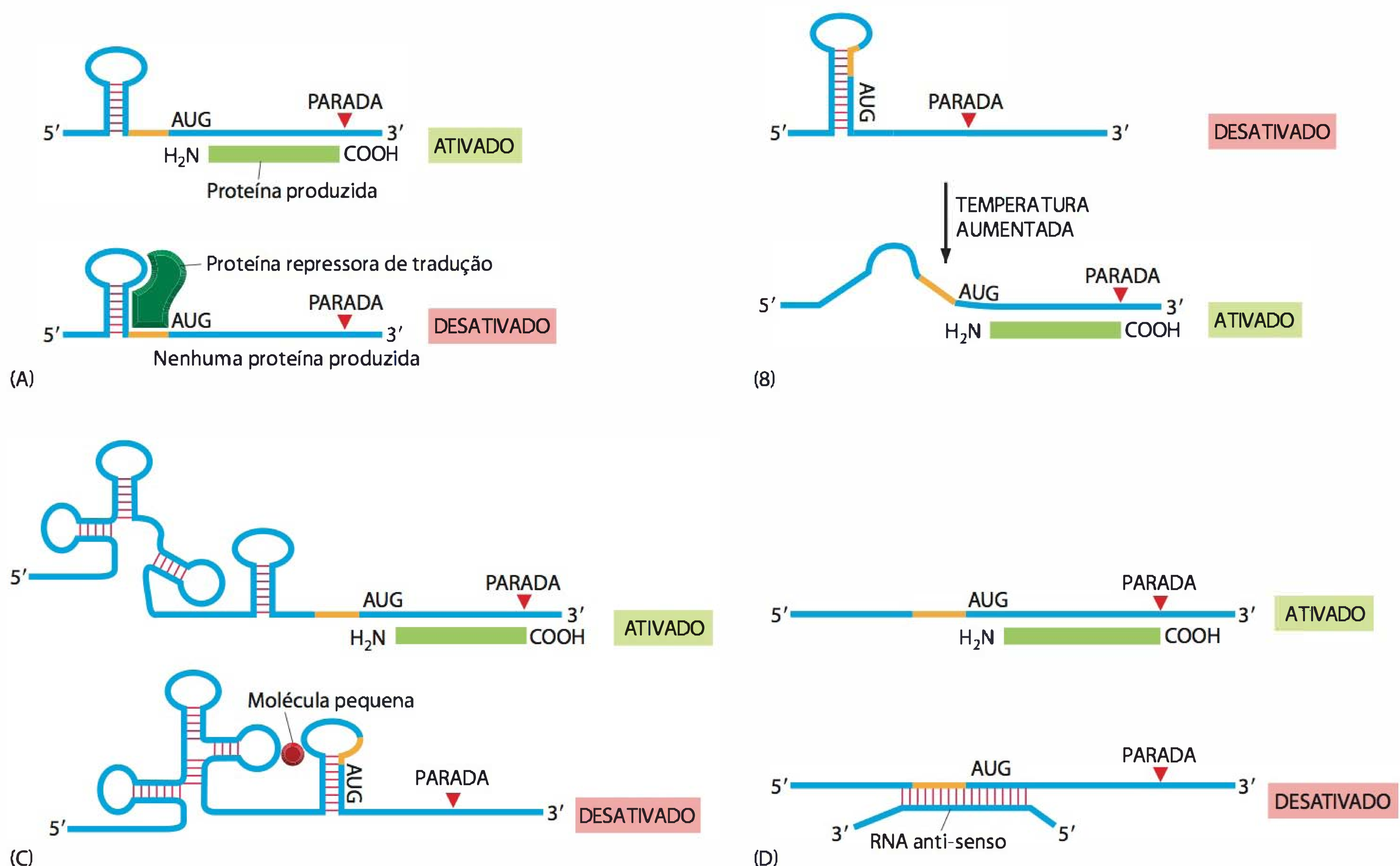


Figura 7-106 Mecanismos de controle traducional. Embora estes exemplos sejam de bactérias, muitos do princípios operam em eucariotos. (A) Proteínas de ligação ao RNA sequência-específicas reprimem a tradução de mRNAs específicos pelo bloqueio do acesso do ribossomo à sequência Shine-Dalgarno (*laranja*). Por exemplo, algumas proteínas ribossomais reprimem a tradução de seu próprio RNA. Esse mecanismo desencadeia-se somente quando as proteínas ribossomais são produzidas em excesso em relação ao RNA ribossomal e não são, dessa forma, incorporadas nos ribossomos, permitindo à célula manter quantidades balanceadas dos vários componentes necessários para formar os ribossomos. Nesses casos, a sequência de RNA reguladora presente no mRNA frequentemente combina com a sequência de RNA que a proteína reconhece durante a montagem do ribossomo. (B) Um "termossensor" de RNA permite o início da tradução eficiente somente em temperaturas elevadas nas quais a estrutura alça-grampo tenha sido desfeita. Um exemplo ocorre no patógeno humano *Listeria monocytogenes*, no qual a tradução dos seus genes de virulência aumenta a 37°C, a temperatura do hospedeiro. (C) A ligação de uma molécula pequena a um ribocontrole induz um rearranjo estrutural do RNA, sequestrando a sequência de Shine-Dalgarno (*laranja*) e bloqueando o início da tradução. Em muitas bactérias, a *S*-adenosil-metionina atua dessa maneira para bloquear a produção das enzimas que a sintetizam. (D) Um RNA "anti-senso" produzido fora do genoma pareia-se com um mRNA específico e bloqueia a sua tradução. Muitas bactérias regulam a expressão de proteínas de estocagem de ferro dessa forma. Quando o ferro está abundante, um transcrito anti-senso é regulado negativamente, permitindo assim uma tradução eficiente dos genes codificando as proteínas de estocagem. Os RNAs anti-senso são utilizados extensivamente pelas células eucarióticas para regular a expressão gênica. O mecanismo é um pouco diferente do mostrado aqui, sendo discutido em detalhes mais adiante neste capítulo.

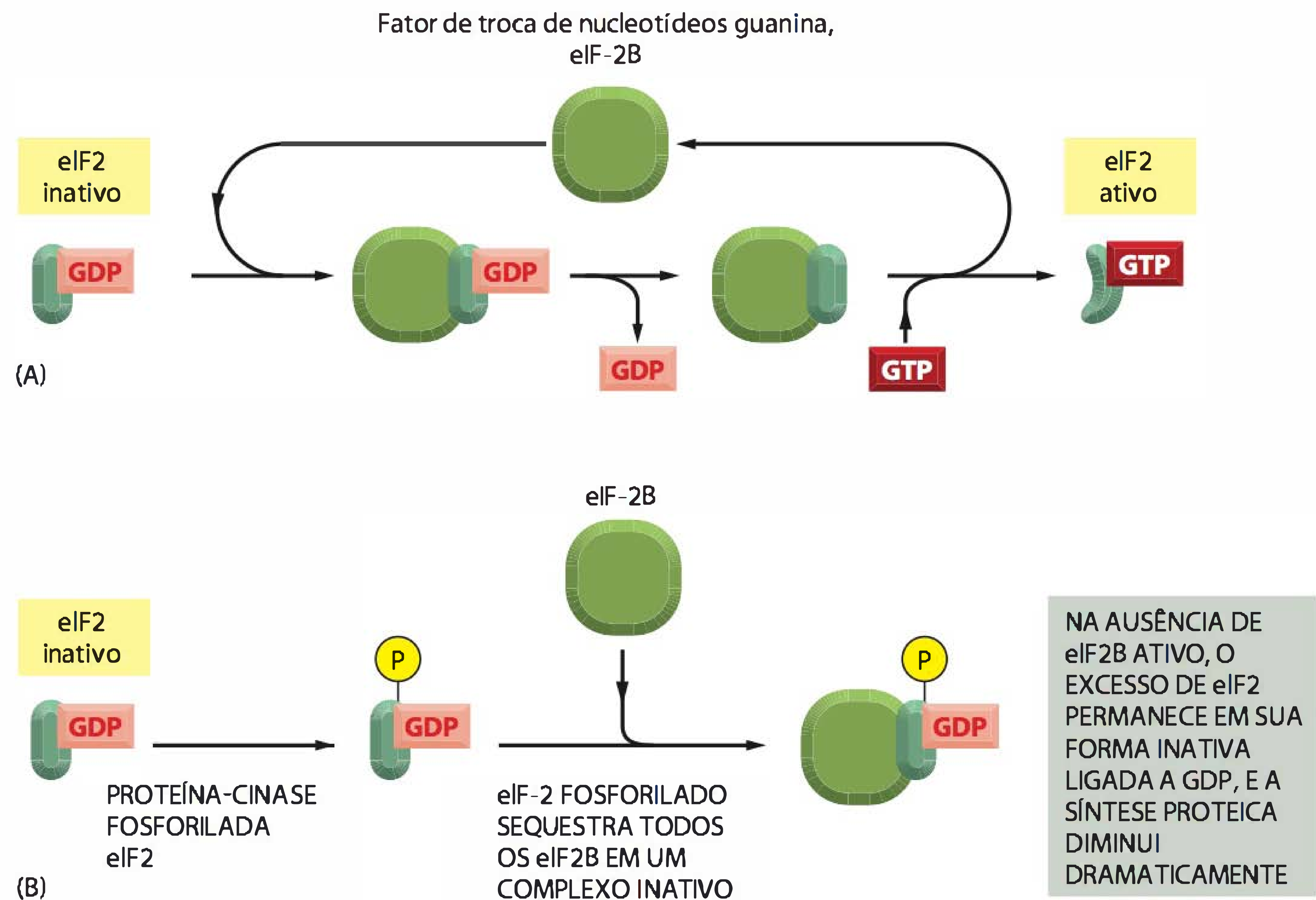


Figura 7-107 O ciclo eIF2. (A) Reciclagem da utilização de eIF2 por um fator de troca de nucleotídeos guanina (eIF2B). (B) A fosforilação de eIF2 controla a taxa de síntese proteica pelo bloqueio de eIF2B.

a partir do mesmo mRNA. De maneira muito importante, ela permite que alguns genes produzam a mesma proteína com e sem uma sequência-sinal ligada ao seu terminal amino, de forma que a proteína é direcionada para duas localizações diferentes na célula (p. ex., tanto para a mitocôndria como para o citosol). Em alguns casos, a célula pode regular a abundância relativa das isoformas de proteína produzidas pela exploração frouxa; por exemplo, um tipo celular específico que aumenta a abundância do fator de iniciação eIF4F favorece o uso do AUG mais próximo do final 5′ do mRNA.

Outro tipo de controle encontrado em eucariotos usa uma ou mais fases abertas de leitura pequenas (sequências nucleotídicas livres de códons de parada) que se localizam entre o final 5′ do mRNA e o começo do gene. Fases abertas de leitura (ORFs, *open reading frames*) serão discutidas mais detalhadamente no Capítulo 8: para os objetivos de agora, uma ORF pode ser considerada como uma região de DNA que inicia com um códon de início (ATG) e termina com um códon de parada, sem códons de parada entre eles, e dessa forma poderia, em princípio, codificar um polipeptídeo. Frequentemente, as sequências de aminoácidos codificadas por essas fases abertas de leitura localizadas acima do gene (uORFs, *upstream open reading frame*) não são críticas; em vez disso, as uORFs exercem uma função puramente reguladora. Uma uORF presente em uma molécula reguladora geralmente irá diminuir a tradução do gene *downstream* pelo sequestro do complexo ribossomal de iniciação explorador e fazendo o ribossomo traduzir a uORF e dissociar-se do mRNA antes que ele atinja as sequências codificantes da proteína.

Quando a atividade de um fator geral de transcrição (como o eIF2 discutido anteriormente) é reduzida, pode-se esperar que a tradução de todos os mRNAs seja igualmente reduzida. Ao contrário dessa expectativa, entretanto, a fosforilação de eIF2 pode ter efeitos seletivos, até mesmo aumentando a tradução de mRNAs específicos que contêm uORFs. Isso pode possibilitar que as células de levedura, por exemplo, adaptem-se à privação de nutrientes específicos pela desativação da síntese de todas as proteínas, exceto aquelas que são necessárias para a síntese dos nutrientes que estão faltando. Os detalhes desse mecanismo foram esclarecidos em um mRNA de leveduras específico que codifica uma proteína chamada de Gcn4, uma proteína de regulação gênica necessária para a ativação de muitos genes codificantes de proteínas importantes para a síntese de aminoácidos.

O mRNA de *Gcn4* contém quatro uORFs pequenas responsáveis pelo aumento seletivo da tradução de *Gcn4* em resposta à fosforilação de eIF2 provocada pela privação de aminoácidos. O mecanismo pelo qual a tradução de *Gcn4* é aumentada é complexo. Em resumo, as subunidades ribossomais movem-se ao longo do mRNA, encontrando cada uma das uORFs, mas traduzindo somente um subconjunto delas; se a última uORF é traduzida, como é o caso das células normais sem privações, os ribossomos dissociam-se ao final da uORF, e a tradução de *Gcn4* é ineficiente. O decréscimo na atividade de eIF2 derivado da privação de

nutrientes (ver Figura 7-108) torna mais provável que um ribossomo explorador mova-se através da quarta uORF antes que ele adquira a habilidade de iniciar a tradução. Tal subunidade ribossomal está livre para iniciar a tradução das sequências de *Gcn4*, sendo a quantidade aumentada dessa proteína de regulação gênica que induz a produção de um conjunto de proteínas que aumentam a síntese de aminoácidos dentro da célula.

Os sítios internos de entrada no ribossomo fornecem oportunidades para o controle traducional

Embora aproximadamente 90% dos mRNAs eucarióticos sejam traduzidos a partir do primeiro AUG abaixo do quepe 5′, certos AUGs, como vimos na última seção, podem ser omitidos durante o processo de exploração. Nesta seção, discutiremos, ainda, outra maneira pela qual as células podem iniciar a tradução em posições distantes do final 5′ do mRNA, utilizando um tipo especializado de sequência de RNA chamado de **sítio interno de entrada no ribossomo** (**IRES**, ***internal ribosome entry site***). Um IRES pode ocorrer em muitos locais de um mRNA e, em alguns casos incomuns, duas sequências distintas codificantes de proteínas são carregadas em *tandem* no mesmo mRNA eucariótico; a tradução do primeiro ocorre por um mecanismo usual de exploração, e a tradução do segundo, por um IRES. Os IRESs apresentam, normalmente, várias centenas de nucleotídeos em tamanho e dobram-se em estruturas específicas que ligam não todas, mas muitas das mesmas proteínas que são usadas para iniciar a tradução normal dependente de quepe (**Figura 7-108**). De fato, IRESs diferentes necessitam de diferentes subconjuntos de fatores de iniciação. Entretanto, todos suprimem a necessidade de uma estrutura quepe 5′ e do fator de iniciação da tradução que a reconhece, eIF4E.

Alguns vírus utilizam IRESs como parte de uma estratégia para promoverem a tradução das suas moléculas de mRNA próprias enquanto bloqueiam a tradução normal dependente de quepe 5′ dos mRNAs do hospedeiro. Na infecção, esses vírus produzem uma protease (codificada pelo genoma viral) que cliva o fator de tradução celular eIF4G, tornando-o assim incapaz de ligar-se a eIF4E, o complexo de ligação ao quepe. Isso desliga grande parte da tradução da célula hospedeira e efetivamente desvia a maquinaria de tradução para as sequências IRESs, as quais estão presentes em muitos mRNAs virais. O eIF4G truncado continua competente para iniciar a tradução nos sítios internos e pode até mesmo estimular a tradução de certos mRNAs virais contendo IRES.

A ativação seletiva da tradução mediada por IRES também ocorre nos mRNAs celulares. Por exemplo, quando as células de mamíferos entram na via da morte celular programada (discutida no Capítulo 18), o eIF2G é clivado, e segue-se um decréscimo geral na tradução. Entretanto, algumas proteínas críticas para o controle da morte celular parecem ser traduzidas a partir dos mRNAs contendo IRES, permitindo a sua síntese contínua. Dessa forma, o mecanismo de IRES permite que mRNAs selecionados sejam traduzidos em altas taxas, apesar do decréscimo geral da capacidade celular de iniciar a síntese de proteínas.

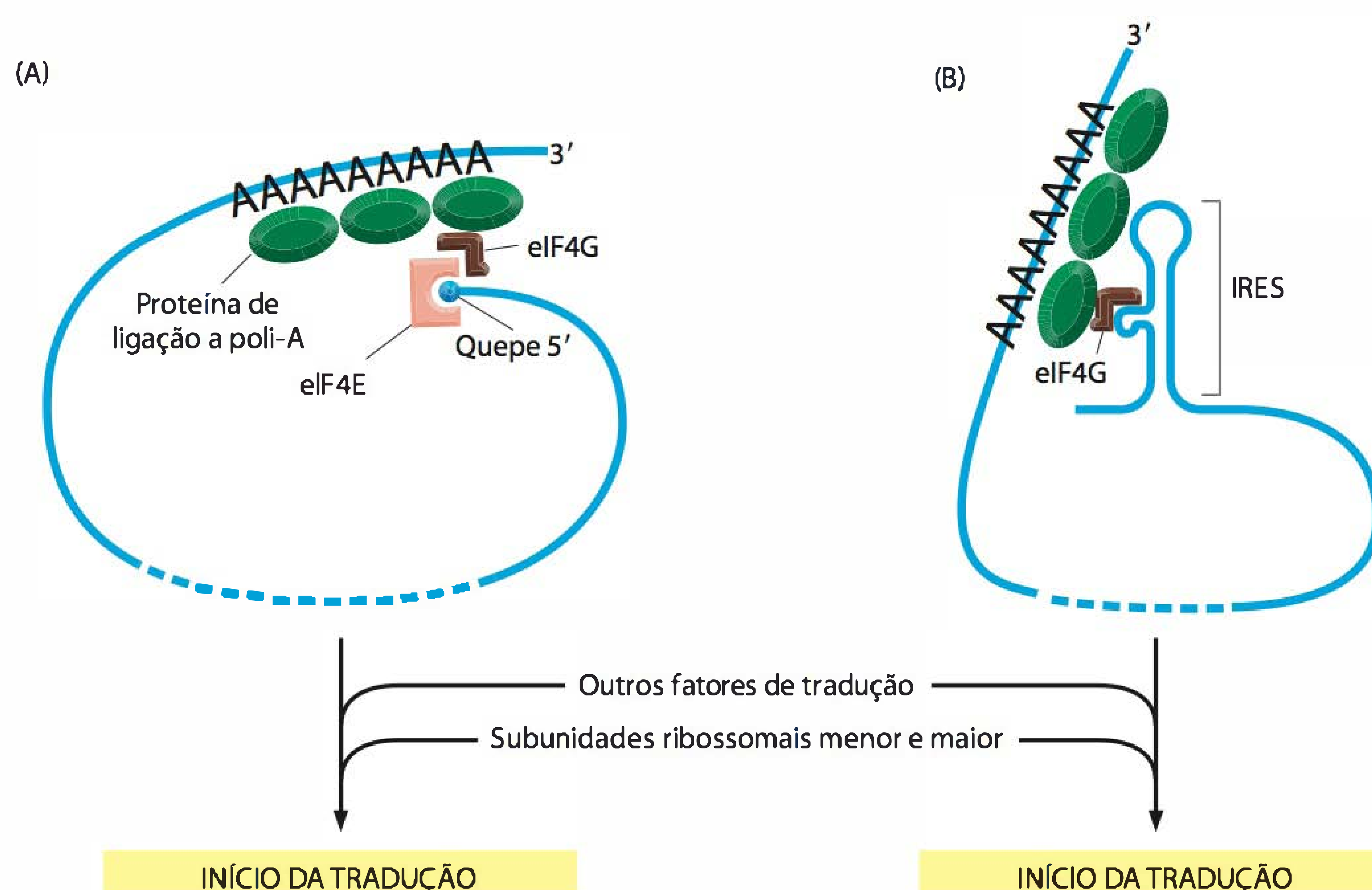


Figura 7-108 Dois mecanismos de iniciação da tradução. (A) O mecanismo normal dependente de quepe requer um conjunto de fatores de iniciação cuja associação ao mRNA é estimulada pela presença de quepe 5′ e da cauda de poli-A (ver também Figura 6-72). (B) O mecanismo dependente de IRES necessita somente de um subconjunto de fatores de iniciação da tradução normais, e esses se associam diretamente a IRES na conformação correta. (Adaptada de A. Sachs, *Cell* 101:243-245, 2000. Com permissão de Elsevier.)

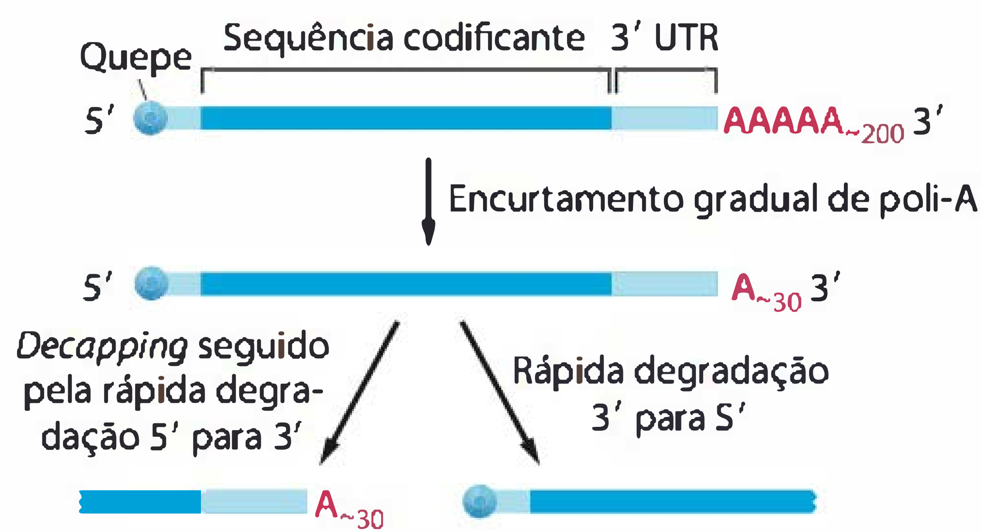


Figura 7-109 Dois mecanismos de degradação de mRNAs eucarióticos. (A) Um limiar crítico de tamanho da cauda de poli-A que induz a degradação 3′-5′, a qual pode ser desencadeada pela perda de proteínas de ligação a poli-A (ver Figura 6-40). Como mostrado na Figura 7-110, a enzima de desadenilação associa-se à cauda de poli-A 3′ e o quepe 5′, e esse arranjo pode sinalizar o *decapping* após o encurtamento de poli-A. Embora as degradações 5′ para 3′ e 3′ para 5′ estejam mostradas em moléculas de RNA separadas, esses dois processos podem ocorrer juntos na mesma molécula. (Adaptada de C. A. Beelman e R. Parker, *Cell* 81:179-183, 1995. Com permissão de Elsevier.)

A expressão gênica pode ser controlada por uma mudança na estabilidade do mRNA

A grande maioria dos mRNAs de uma célula bacteriana é muito instável, possuindo uma meia-vida de menos de três minutos. As exonucleases, que degradam na direção 3′ para 5′, normalmente são responsáveis pela rápida destruição desses mRNAs. Como os seus mRNAs são rapidamente sintetizados e degradados, uma bactéria pode adaptar-se rapidamente às alterações ambientais.

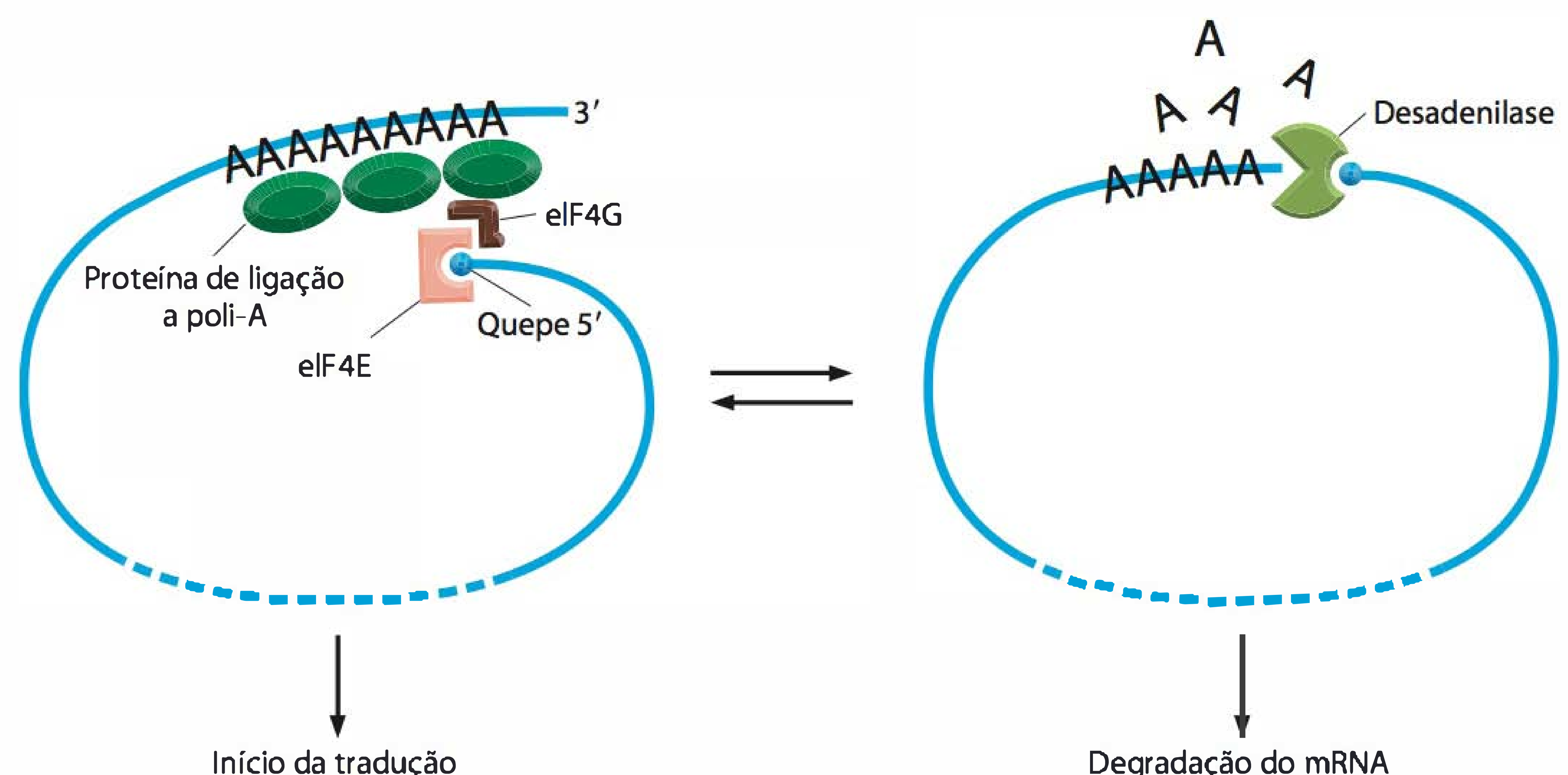
Como regra geral, os mRNAs nas células eucarióticas são mais estáveis. Alguns, como aqueles codificantes para β-globina, possuem meia-vida de mais de 10 horas, porém a maioria apresenta meia-vida consideravelmente menor, normalmente de 30 minutos ou menos. Os mRNAs que codificam para proteínas como fatores de crescimento e proteínas de regulação gênica, cujas taxas de produção necessitam alterar-se rapidamente nas células, possuem meia-vida especialmente curta.

Existem dois mecanismos gerais para a destruição dos mRNAs eucarióticos. Ambos iniciam com o encurtamento gradual da cauda de poli-A por uma exonuclease, um processo que se inicia assim que o mRNA alcança o citoplasma. Em analogia, esse encurtamento da poli-A atua como um cronômetro que faz a contagem regressiva do tempo de vida de cada mRNA. Uma vez que um limiar crítico do encurtamento da cauda tenha sido atingido (cerca de 25 em humanos), as duas vias divergem. Em uma, o quepe 5′ é removido (um processo chamado de *decapping*) e o "mRNA" exposto é rapidamente degradado a partir da sua extremidade 5′. Na outra, o mRNA continua a ser degradado a partir da extremidade 3′, pela cauda de poli-A até as sequências codificantes (**Figura 7-109**). A maioria dos mRNAs eucarióticos é degradada por ambos os mecanismos.

Quase todos os mRNAs são submetidos a esses dois tipos de degradação, e as sequências específicas de cada mRNA determinam o quão rápido cada etapa ocorre e, dessa forma, o quanto cada mRNA irá persistir na célula e ser capaz de produzir proteínas. As sequências UTR 3′ são especialmente importantes para o controle da meia-vida dos mRNAs e frequentemente carregam sitos de ligação para proteínas específicas que aumentam ou diminuem a taxa de encurtamento da cauda de poli-A, o *decapping* ou a degradação 3′ para 5′. A meia-vida de mRNA também é afetada pelo quão eficientemente ela é traduzida. O encurtamento da poli-A e o *decapping* competem diretamente com a maquinaria de tradução do mRNA; dessa forma, alguns fatores que afetam a eficiência de tradução de um mRNA tenderão a possuir o efeito oposto em sua degradação (**Figura 7-110**).

Embora o encurtamento da poli-A controle a meia-vida da maioria dos mRNAs eucarióticos, alguns podem ser degradados por um mecanismo especializado que se desvia dessa etapa completamente. Em alguns casos, nucleases específicas clivam o mRNA internamente, *decapping* efetivamente uma extremidade e removendo a cauda de poli-A da outra de maneira que ambas as metades são rapidamente degradadas. Os mRNAs destruídos dessa maneira carregam sequências nucleotídicas específicas, frequentemente nas UTRs 3′, que servem como sequências de reconhecimento para essas endonucleases. Essa estratégia torna especialmente simples regular fortemente a estabilidade desses mRNAs pelo bloqueio do sítio da endonuclease em resposta a sinais extracelulares. Por exemplo, a adição de ferro às células diminui a estabilidade do mRNA que codifica a proteína receptora que se liga à

Figura 7-110 Competição entre a tradução do mRNA e a degradação do mRNA. As mesmas duas características do mRNA, o quepe 5′ e o sítio de poli-A 3′, são usadas no início da tradução e na degradação do mRNA dependente de desadenilação (ver Figura 7-109). A desadenilase que encurta a cauda de poli-A na direção 3′ para 5′ associa-se ao quepe 5′. Como descrito no Capítulo 6 (ver Figura 6-72), a maquinaria do início da tradução também se associa ao quepe 5′ e a cauda de poli-A. (Adaptada de M. Gao et al., *Mol. Cell* 5:479-488, 2000. Com permissão de Elsevier.)



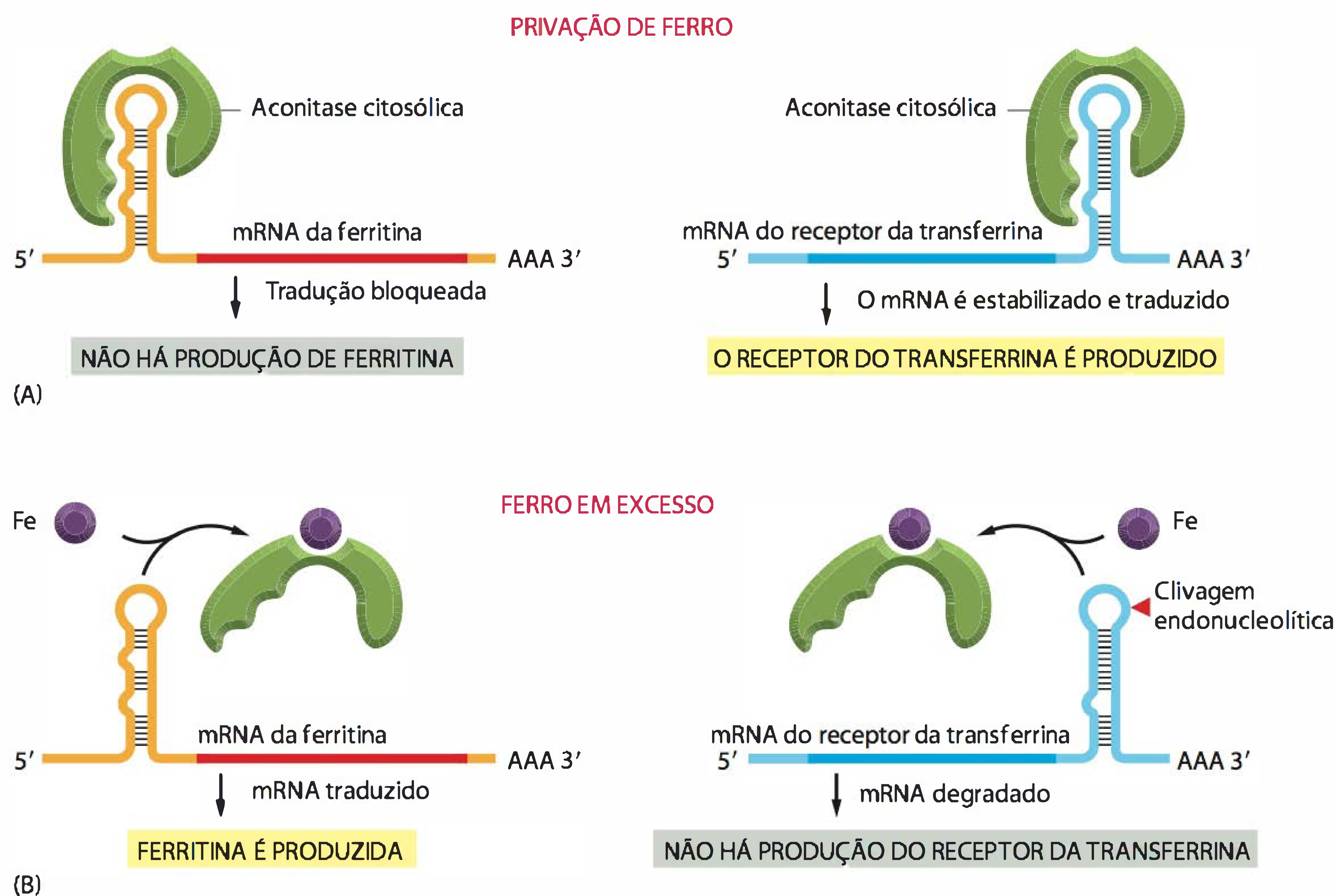


Figura 7-111 Dois controles pós-traducionais mediados por ferro. (A) Na falta de ferro, a ligação da aconitase à UTR 5′ do mRNA do receptor da ferritina bloqueia o início da tradução; a sua ligação à UTR 3′ do mRNA do receptor da ferritina bloqueia um sítio de clivagem de endonuclease e assim estabiliza o mRNA. (B) Em resposta a um aumento na concentração de ferro no citosol, uma célula aumenta a síntese de ferritina para ligar-se ao ferro extra e diminui a síntese de receptores de transferrina a fim de importar menos ferro pela membrana plasmática. Ambas as respostas são mediadas pela mesma proteína reguladora de resposta ao ferro, a aconitase, a qual reconhece características comuns na estrutura alça-grampo dos mRNAs codificantes da ferritina e do receptor da transferrina. A aconitase dissocia-se do mRNA quando ele liga-se ao ferro. Contudo, devido ao receptor da transferrina e a ferritina serem regulados por tipos diferentes de mecanismos, seus níveis respondem de maneira oposta às concentrações de ferro mesmo quando são reguladas pela mesma proteína reguladora de resposta ao ferro. (Adaptada de M. W. Hentze et al., *Science* 238:1570-1573, 1987 e J. L. Casey et al., *Science* 240:924-928, 1988. Com permissão de AAAS.)

proteína transportadora de ferro transferrina, diminuindo a produção desse receptor. Esse efeito é mediado pela proteína de ligação ao RNA sensível a ferro aconitase (a qual também controla a tradução do mRNA da ferritina). A aconitase pode ligar-se à UTR 3′ do mRNA do receptor da transferrina e causar um aumento na produção do receptor pelo bloqueio da clivagem endonucleolítica do mRNA. Com a adição do ferro, a aconitase é liberada do mRNA, expondo o sítio de clivagem e assim diminuindo a estabilidade do mRNA (**Figura 7-111**).

A adição citoplasmática de poli-A pode regular a tradução

A poliadenilação inicial de uma molécula de RNA (discutida no Capítulo 6) ocorre no núcleo, aparentemente de forma automática, em quase todos os mRNAs precursores eucarióticos. Como acabamos de ver, as caudas de poli-A, na maioria dos mRNAs, são gradualmente encurtadas no citosol, e os mRNAs finalmente são degradados. Em alguns casos, entretanto, as caudas de poli-A de mRNAs específicos são alongadas no citosol, e esse mecanismo fornece uma forma adicional de regulação traducional.

Os oócitos e os ovos em maturação fornecem o exemplo mais notável. Muitas das vias de degradação normais do mRNA parecem estar desativadas nessas células gigantes, de maneira que as células podem construir grandes estoques de mRNAs na preparação para a fertilização. Muitos mRNAs são estocados no citoplasma com somente 10 a 30 As em seus finais 3′ e, dessa forma, não são traduzidos. Em momentos específicos, durante a maturação e imediatamente após a fertilização do oócito, quando as proteínas codificadas por esses mRNAs são necessárias, a poli-A é adicionada a mRNAs selecionados, estimulando a iniciação de suas traduções.

Pequenos transcritos de RNA não-codificante regulam muitos genes de animais e plantas

No capítulo anterior introduzimos o dogma central, de acordo com o qual o fluxo da informação genética ocorre do DNA através do RNA para a proteína (Figura 6-2). Entretanto, viu-se que moléculas de RNA desempenham muitas tarefas críticas na célula além de servirem como carreadores intermediários da informação genética. Uma série de descobertas recentes e impressionantes revelou que RNAs não-codificantes são muito mais prevalentes do que era imaginado previamente, e desempenham funções não antecipadas anteriormente, porém amplamente distribuídas, na regulação da expressão gênica.

Um tipo de pequenos RNAs não-codificantes chamados de **microRNA** (miRNA) é de importância especial para animais e plantas. Os humanos, por exemplo, expressam mais de 400 miRNAs diferentes, os quais parecem regular pelo menos um terço de todos os genes codificantes de proteínas. Uma vez produzidos, os miRNAs pareiam-se com mRNAs específicos

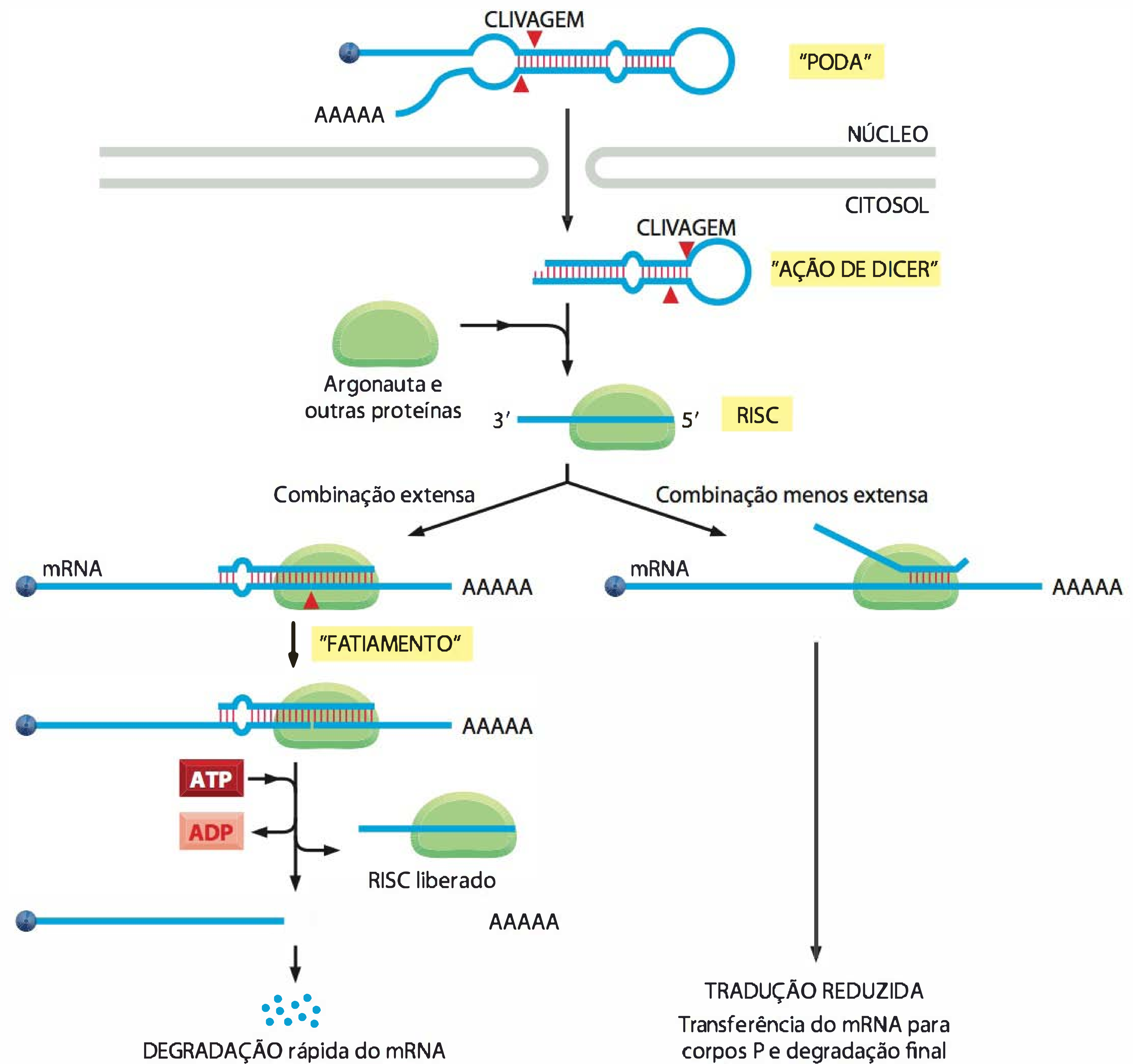


Figura 7-112 Processamento do miRNA e mecanismo de ação. O miRNA precursor, pela complementaridade entre uma parte e outra de sua sequência, forma uma estrutura de fita dupla. Esta é podada ainda enquanto no núcleo e então exportada para o citosol, onde é adicionalmente clivada pela enzima Dicer para formar o miRNA apropriado. Argonauta, em conjunto com outros componentes de RISC, inicialmente associa-se com ambas as fitas do miRNA e cliva e descarta uma delas. A outra fita guia RISC para mRNAs específicos pelo pareamento de bases. Se a combinação RNA:RNA é extensiva, como visto muitas vezes em plantas, Argonauta cliva o mRNA-alvo, induzindo a sua rápida degradação. Nos animais, a combinação miRNA-mRNA frequentemente não se estende além da curta região "semente" de 7 nucleotídeos próxima da extremidade 5′ do miRNA. Este pareamento de bases menos extenso induz a inibição da tradução, a desestabilização do mRNA e a transferência do mRNA para os corpos P, onde finalmente é degradado.

e regulam a sua estabilidade e tradução. Os precursores dos miRNAs são sintetizados pela RNA-polimerase II e são submetidos à adição de quepe e poliadenilados. Eles então sofrem um tipo especial de processamento, após o qual o miRNA é montado com um conjunto de proteínas para formar um *complexo de silenciamento induzido por RNA* (RISC, *RNA-induced silencing complex*). Uma vez formado, o RISC procura pelos seus mRNAs-alvo pela busca por sequências nucleotídicas complementares (**Figura 7-112**). Essa procura é bastante facilitada pela proteína Argonauta, um componente do RISC, o qual encaixa a região 5′ do miRNA de forma que ela seja posicionada de maneira otimizada para o pareamento com outra molécula de RNA (**Figura 7-113**). Nos animais, a extensão do pareamento normalmente é de sete pares de nucleotídeos e ocorre na UTR 3′ do mRNA-alvo.

Uma vez que um mRNA tenha se ligado a um miRNA, várias situações são possíveis. Se o pareamento é extenso, o mRNA é clivado pela proteína Argonauta, removendo de forma efetiva a cauda de poli-A e expondo-a a exonucleases (ver Figura 7-109). Seguindo-se a clivagem do mRNA, RISC (com o seu miRNA associado) é liberado e pode procurar mRNAs adicionais. Assim, um único miRNA pode atuar cataliticamente para destruir muitos mRNAs complementares. Acredita-se que os miRNAs sejam sequências-guia que promovem o contato de nucleases destrutivas com mRNAs específicos.

Se o pareamento entre o miRNA e o mRNA é menos extenso, a Argonauta não corta o mRNA; ao invés disso, a tradução do mRNA é reprimida e o mRNA é desestabilizado. Esse efeito está associado ao encurtamento da cauda de poli-A e ao direcionamento do mRNA para estruturas citosólicas chamadas de *corpos de processamento* (*corpos P*). Aqui, os mRNAs são sequestrados dos ribossomos, sendo então submetidos à retirada do quepe e degradados. Os corpos P são estruturas dinâmicas compostas de grandes complexos de mRNAs e enzimas que degradam RNA, e acredita-se que sejam os sítios na célula onde a destruição final da maioria dos mRNAs, mesmo aqueles que não são controlados por miRNAs, ocorre (**Figura 7-114**).

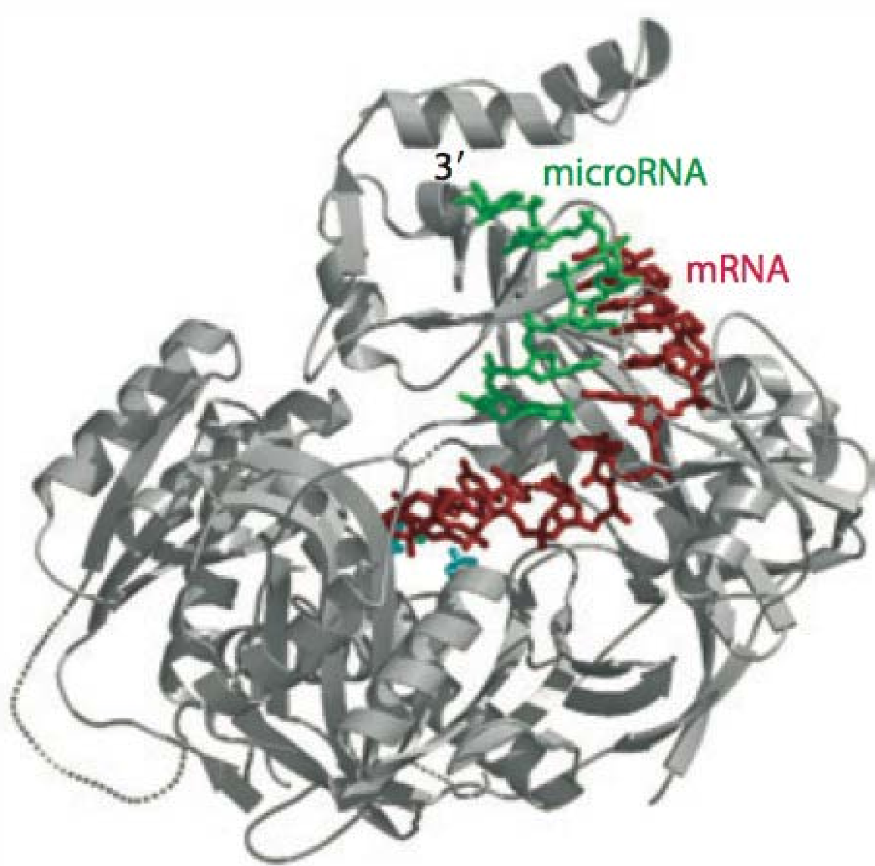


Figura 7-113 Estrutura da proteína Argonauta ligada a um pareamento perfeito entre miRNA e mRNA. (Adaptada de N. H. Tolia e L. Joshua-Tor, *Nat. Chem. Biol.* 3:36-43, 2007. Com permissão da Macmillan Publishers Ltd.)

Muitas características tornam os miRNAs reguladores especialmente úteis na expressão gênica. Primeiro, um único miRNA pode regular um conjunto inteiro de mRNAs diferentes se os mRNAs carregarem uma sequência comum em suas UTRs. Essa situação é comum em humanos, onde alguns miRNAs controlam centenas de mRNAs diferentes. Segundo, a regulação por miRNAs pode ser combinatória. Quando o pareamento entre o miRNA e o

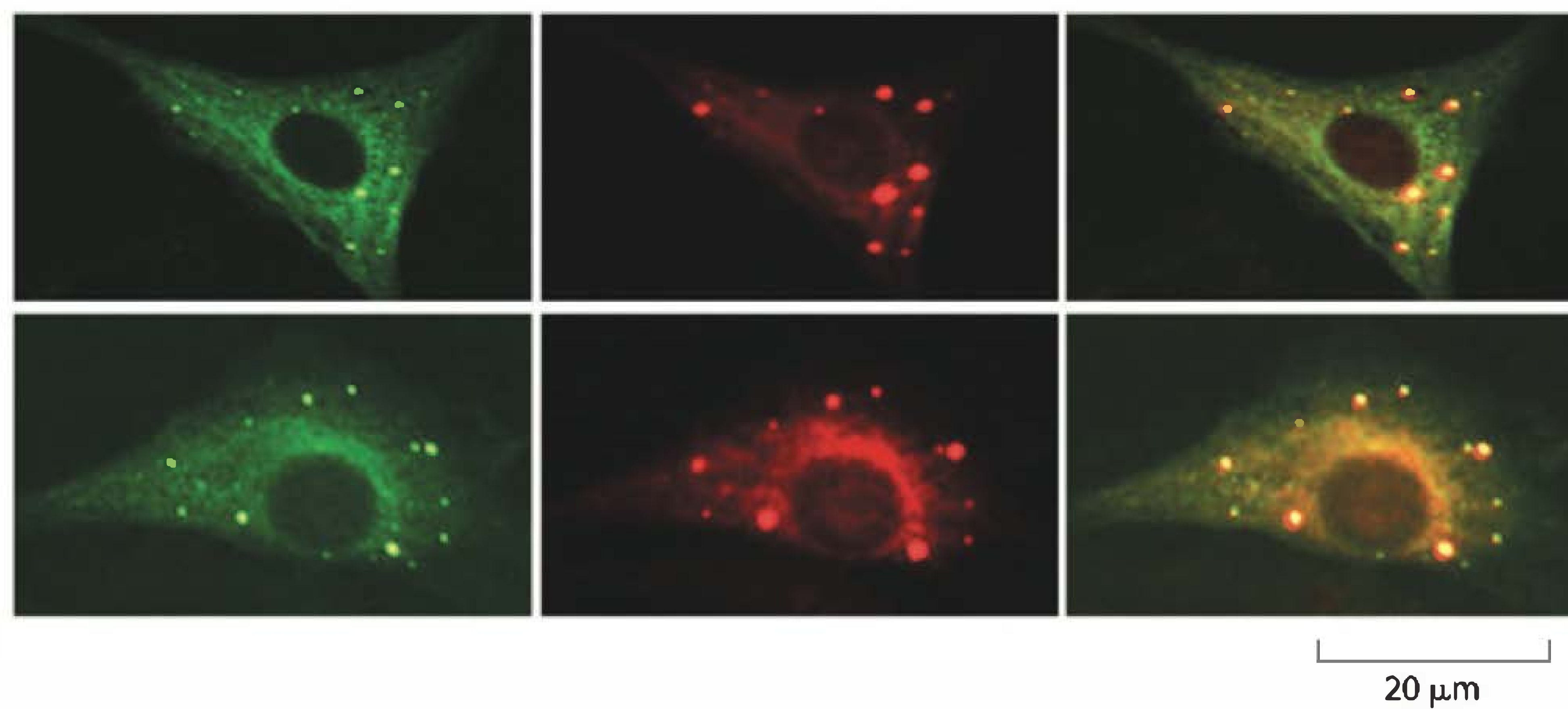


Figura 7-114 Visualização dos corpos P. Células humanas foram coradas com anticorpos para um componente da enzima Dcp1a, a qual retira quepe dos mRNAs (*painéis à esquerda*) e para proteína Argonauta (*painéis centrais*). A imagem incorporada (*painéis à direita*) mostra que as duas proteínas se colocalizam convergindo em uma região do citoplasma chamada de corpos P. (Adaptada de J. Liu et al., *Nat. Cell Biol.* 7:643-644, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

mRNA falha em desencadear a clivagem, miRNAs adicionais ligando-se ao mesmo mRNA conduzem a reduções maiores na sua tradução. Como discutido antes neste capítulo, para as proteínas de regulação gênica, o controle combinatório expande bastante as possibilidades disponíveis para a célula por interligar a expressão gênica com uma combinação de diferentes reguladores ao invés de um único regulador. Terceiro, um miRNA ocupa um espaço relativamente pequeno no genoma quando comparado a uma proteína. Inclusive o seu pequeno tamanho é uma das razões para que os miRNAs tenham sido descobertos apenas recentemente. Embora estejamos somente começando a entender o impacto total dos miRNAs, está claro que eles representam uma parte importante do equipamento celular para a regulação da expressão dos seus genes.

O RNA de interferência é um mecanismo de defesa celular

Muitas das proteínas que participam dos mecanismos reguladores dos miRNAs descritos a pouco também servem para uma segunda função como mecanismo de defesa: elas orquestram a degradação de moléculas de RNA estranhas, especialmente aquelas que ocorrem em forma de fita dupla. Denominado **RNA de interferência (RNAi)**, esse mecanismo é encontrado em uma ampla variedade de organismos, incluindo fungos unicelulares, plantas, vermes, sugerindo que seja um mecanismo de defesa evolutivamente antigo. Muitos elementos de transposição e vírus produzem RNA de fita dupla, pelo menos transitoriamente, em seus ciclos celulares, e o RNAi auxilia a manter esses invasores potencialmente perigosos sob controle. Como veremos, o RNAi também forneceu aos cientistas uma técnica experimental poderosa para desativar a expressão de genes individuais.

A presença de RNA de fita dupla livre desencadeia o RNAi pela atração de um complexo proteico contendo *Dicer*, a mesma nuclease que processa miRNA (ver Figura 7-112). Esse complexo proteico cliva o RNAs de fita dupla em pequenos fragmentos (de aproximadamente 23 pares de nucleotídeos) chamados de **pequenos RNAs de interferência (siRNAs, *small interfering RNAs*)**. Esses siRNAs ligam-se, então, a Argonauta e a outros componentes de RISC, como vimos anteriormente para os miRNAs, e uma fita do RNA dúplex é clivada por Argonauta e descartada. A molécula de siRNA de fita simples que permanece direciona RISC novamente para as moléculas de RNA complementares produzidas pelo vírus ou elemento de transposição; devido ao fato de a combinação ser exata, Argonauta cliva essas moléculas, levando a sua rápida destruição (**Figura 7-115**).

Cada vez que RISC cliva uma nova molécula de RNA, ele é liberado; assim como vimos para os miRNAs, uma única molécula de RNA pode atuar cataliticamente para destruir muitos RNAs complementares. Alguns organismos empregam um mecanismo adicional que amplifica a resposta de RNAi ainda mais. Nesses organismos, as RNA-polimerases dependentes de RNA podem converter os produtos de clivagem mediados por siRNA em mais RNA de fita dupla. Essa amplificação garante que, uma vez iniciada, a interferência do RNA possa continuar mesmo após todo o RNA de fita dupla inicial ter sido degradado ou diluído. Por exemplo, ela permite que as células da progênie continuem realizando a interferência de RNA que foi provocada nas células parentais.

Em alguns organismos, a atividade de interferência de RNA pode ser espalhada pela transferência dos fragmentos de RNA de célula para célula. Isso é particularmente importante em plantas (cujas células estão ligadas por canais conectores finos, como discutido no Capítulo 19), pois permite a uma planta inteira tornar-se resistente a um vírus de RNA, mesmo que somente algumas de suas células tenham sido infectadas. Em geral, a resposta

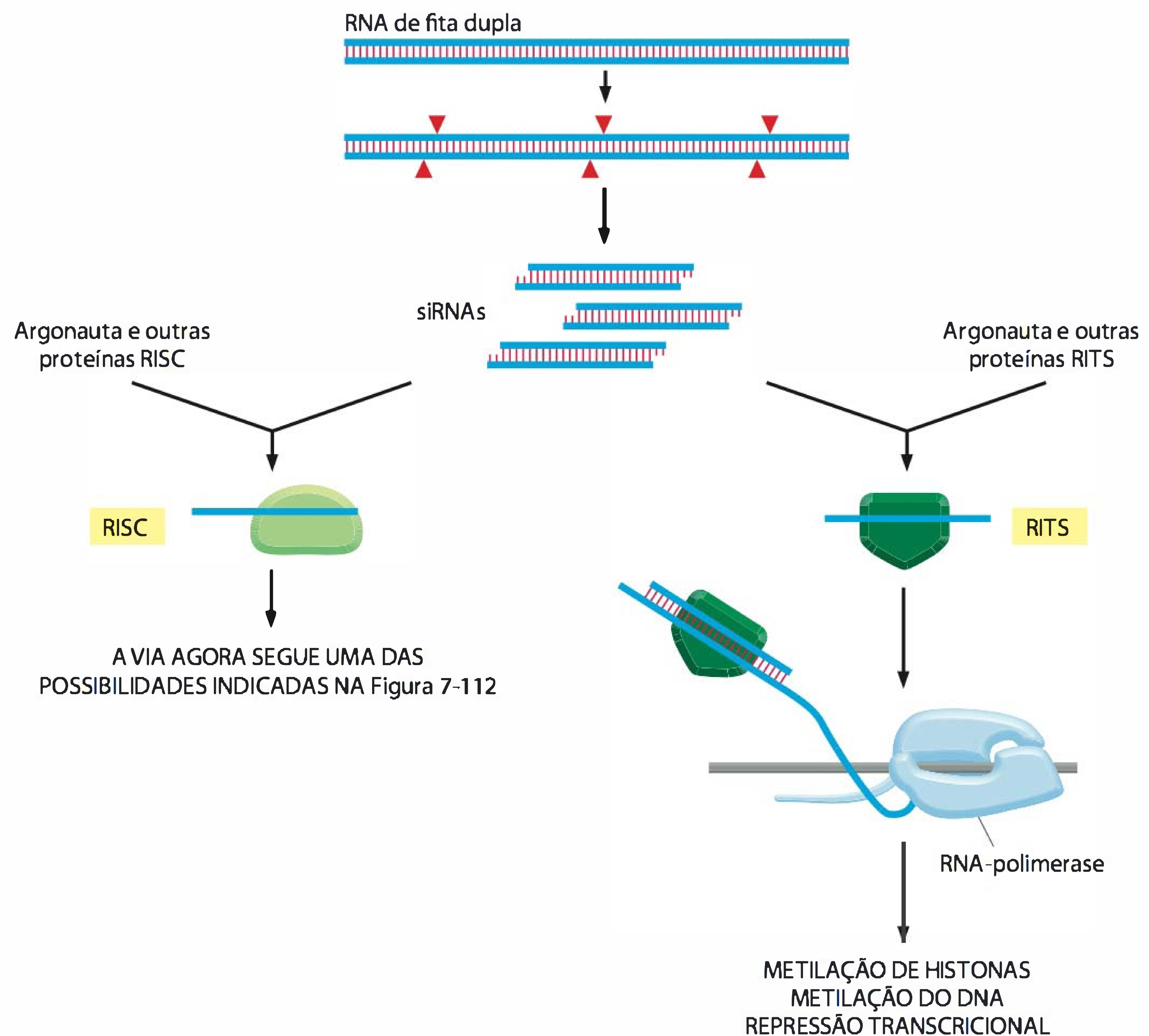


Figura 7-115 Formação de heterocromatina mediada por siRNA. Em muitos organismos, RNA de fita dupla pode desencadear tanto a destruição de mRNAs complementares (*esquerda*) como o silenciamento transcricional (*direita*). A mudança na estrutura da cromatina induzida pelos complexos RITS (silenciamento transcricional induzido por RNA) ligados lembra a da Figura 7-81.

de RNAi lembra certos aspectos dos sistemas imunes animais; em ambos, um organismo invasor induz uma resposta customizada e – pela amplificação das moléculas de "ataque" – o hospedeiro torna-se sistematicamente protegido.

O RNA de interferência pode direcionar a formação de heterocromatina

A via de interferência do RNA recém-descrita não necessariamente é interrompida com a destruição das moléculas de RNA-alvo. Em alguns casos, a maquinaria do RNAi pode desativar seletivamente a síntese dos RNAs-alvo. Para esse mecanismo impressionante ocorrer, os pequenos siRNAs produzidos pela proteína Dicer são agrupados com um grupo de proteínas (incluindo Argonauta) para formar o complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA (RITS, *RNA-induced transcriptional silencing*). Usando o siRNA como sequência-guia, esse complexo liga-se a transcritos de RNA complementares assim que eles emergem de uma RNA-polimerase II em transcrição (ver Figura 7-115). Posicionado no genoma dessa maneira, o complexo RITS atrai proteínas que modificam covalentemente histonas e ao final direcionam a formação e o espalhamento de heterocromatina para impedir o início da transcrição adicional. Em alguns casos, o complexo RITS também induz a metilação do DNA, a qual, como vimos, pode reprimir ainda mais a expressão gênica. Devido à heterocromatina e à metilação do DNA poderem ser autopropagadas, um sinal de interferência de RNA inicial pode continuar a silenciar a expressão gênica muito após todas as moléculas de siRNA terem se dissipado.

A formação de heterocromatina direcionada por RNAi é um mecanismo importante de defesa celular que limita a acumulação de elementos de transposição no genoma pela manutenção deles em uma forma transcricionalmente silenciosa. Entretanto, esse mesmo mecanismo também é utilizado em muitos processos normais na célula. Por exemplo, em muitos organismos a maquinaria de interferência do RNA mantém a heterocromatina formada ao redor dos centrômeros. Sequências de DNA centroméricas são transcritas em ambas as direções, produzindo transcritos de RNA complementares que podem parear-se com RNA de fita dupla. Esse RNA de fita dupla desencadeia a via de interferência do RNA e estimula a formação de heterocromatina nos centrômeros. Essa heterocromatina, por sua vez, é necessária para os centrômeros segregarem os cromossomos de forma acurada durante a mitose (ver Figura 4-50).

O RNA de interferência tornou-se uma ferramenta experimental poderosa

Embora provavelmente tenha surgido como um mecanismo de defesa, o RNAi tornou-se totalmente integrado a muitos aspectos da biologia celular normal, estendendo-se desde o controle da expressão gênica até a estrutura dos cromossomos. Os cientistas também o desenvolveram como uma ferramenta experimental poderosa que permite que quase qualquer gene seja inativado evocando a resposta de RNAi para ele. Essa técnica, empregada em células em cultura e, em alguns casos, em animais e plantas inteiros, tem revolucionado as estratégias genéticas na biologia celular e molecular. Iremos discuti-la em maior detalhe no capítulo seguinte (ver p. 571-572). O RNAi também possui grande potencial para o tratamento de doenças humanas. Considerando-se que muitas doenças humanas resultam da expressão alterada de genes, a habilidade de desativar esses genes pela introdução experimental de moléculas complementares de siRNA é uma grande promessa médica. Surpreendentemente, o mecanismo de interferência do RNA foi descoberto apenas recentemente, e ainda estamos sendo surpreendidos pelos detalhes de seu mecanismo e pela amplitude de suas implicações biológicas.

Resumo

Muitas etapas na via do RNA para a proteína são reguladas pelas células para o controle da expressão gênica. Os genes em sua maioria são regulados em múltiplos níveis, além de serem controlados no estágio inicial da transcrição. Os mecanismos reguladores incluem (1) atenuação do transcrito de RNA pela sua terminação prematura, (2) seleção de sítios de splicing *alternativos do RNA, (3) controle da formação dos finais 3′ por clivagem e adição de poli-A, (4) edição do RNA, (5) controle do transporte do núcleo para o citosol, (6) localização dos mRNAs em sítios determinados da célula, (7) controle do início da tradução e (8) degradação regulada do mRNA. A maioria desses processos de controle necessita do reconhecimento de sequências específicas ou de estruturas na molécula de RNA que está sendo regulada, tarefa desempenhada tanto por proteínas reguladoras como por moléculas de RNA reguladoras. O RNAi pode induzir os mRNAs a serem destruídos ou terem a sua tradução reprimida. Ele também pode induzir que genes específicos sejam empacotados em heterocromatina.*

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

7-1 Em termos de sua função bioquímica, o motivo hélice-alça-hélice está mais intimamente relacionado ao motivo zíper de leucina do que ao motivo hélice-volta-hélice.

7-2 Rearranjos genéticos reversíveis são uma maneira comum de regular a expressão gênica em células de procariotos e mamíferos.

7-3 Acredita-se que ilhas CG surgiram durante a evolução, pois estão associadas a porções do genoma que permaneceram ativas por não estarem metiladas na linhagem germinativa.

Discuta as seguintes questões.

7-4 Uma pequena porção de uma análise bidimensional de proteínas de cérebro humano está mostrada na **Figura Q7-1**. Essas proteínas foram separadas com base no tamanho em uma dimensão e carga elétrica (ponto isoelétrico) na outra. Nem todos os pontos proteicos em cada análise são produtos de genes diferentes; alguns representam formas modificadas de uma proteína que migrou para diferentes posições. Escolha alguns conjuntos de pontos que poderiam representar proteínas que diferem pelo número de fosfatos que carregam. Explique a base para a sua seleção.

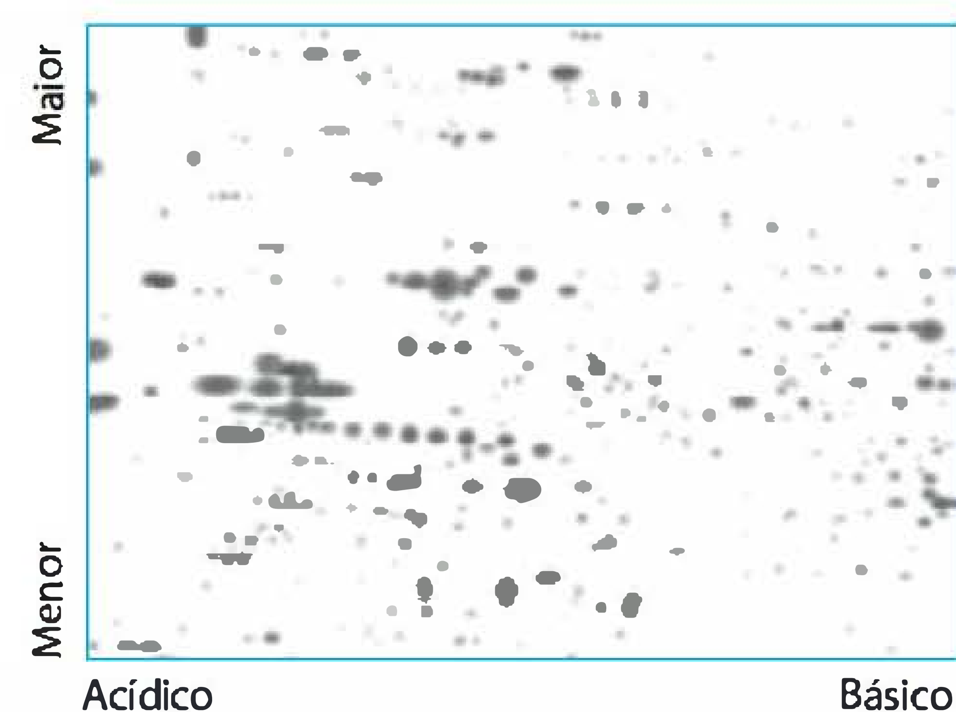


Figura Q7-1 Separação de proteínas bidimensional a partir do cérebro humano (Questão 7-4). As proteínas foram analisadas utilizando eletroforese em gel bidimensional. Somente uma pequena porção do espectro de proteínas está mostrada. (Cortesia de Tim Myers e Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

7-5 A análise por microarranjos de DNA dos padrões de abundância de mRNA em diferentes tipos celulares humanos mostra que o nível de expressão de quase todos os genes ativos é diferente. Os padrões de abundância de mRNA são tão característicos do tipo celular que podem ser usados para determinar o tecido de origem das células cancerosas, mesmo que elas tenham sofrido metástase para diferentes partes do corpo. Por definição, entretanto, as células cancerosas são diferentes de suas células precursoras não-cancerosas. Como você supõe então que os padrões de expressão de mRNA poderiam ser usados para determinar a fonte do tecido de um câncer humano?

7-6 O núcleo de uma célula eucariótica é muito maior do que uma bactéria e contém muito mais DNA. Como consequência, uma proteína de ligação ao DNA em uma célula eucariótica precisa ser capaz de selecionar o seu sítio de ligação específico entre muitas sequências não-relacionadas a mais do que uma proteína de ligação ao DNA em uma bactéria. Esse fato apresenta problemas especiais para a regulação gênica eucariótica?

Considere a seguinte situação. Assuma que o núcleo eucariótico e a célula bacteriana possuam cada uma única cópia de um mesmo sítio de ligação ao DNA. Além disso, assuma que o núcleo possua um volume 500 vezes maior do que uma bactéria e 500 vezes mais DNA. Se a concentração da proteína de regulação gênica que se liga ao sítio fosse a mesma no núcleo e na bactéria, a proteína de regulação gênica encontraria o seu sítio de ligação tanto no núcleo eucariótico quanto na bactéria? Explique a sua resposta.

7-7 Proteínas de ligação ao DNA frequentemente encontram os seus sítios específicos muito mais rapidamente do que poderia ser antecipado pela difusão tridimensional simples. O repressor Lac, por exemplo, associa-se ao operador *Lac* – seu sito de ligação ao DNA – mais de 100 vezes mais rápido do que seria esperado a partir desse modelo. Claramente, o repressor precisa encontrar o operador por mecanismos que reduzem a dimensionalidade ou o volume da procura de maneira a apressar a aquisição dos alvos.

Várias técnicas têm sido utilizadas para investigar esse problema. Uma das mais elegantes utilizou em grande escala moléculas de RNA-polimerase fluorescente que podiam ser acompanhadas individualmente. Uma gama de moléculas de DNA foi alinhada em paralelo e ancorada em uma lâmina de vidro. Então permitiu-se que as moléculas de RNA-polimerase fluorescentes as atravessassem em um ângulo oblíquo (**Figura Q7-2**A). Traços das RNA-polimerases individuais mostraram que cerca da metade migrou na mesma direção da maior parte das moléculas migrantes e metade desviou-se da migração principal de maneira característica (Figura Q7-2B). Se as moléculas de RNA-polimerase eram incubadas inicialmente com pequenos fragmentos de DNA contendo um promotor forte, todos os traços seguiam a migração geral.

A. Explique por que algumas moléculas de RNA-polimerase desviaram-se da migração geral como mostrado na Figura Q7-2B. Por que a incubação com pequenos fragmentos de DNA contendo um promotor forte elimina os traços que se desviaram da migração geral?

B. Esses resultados sugerem uma explicação para como as moléculas de ligação ao DNA sítio-específicas funcionam para encontrar os seus sítios mais rápido do que o esperado pela difusão?

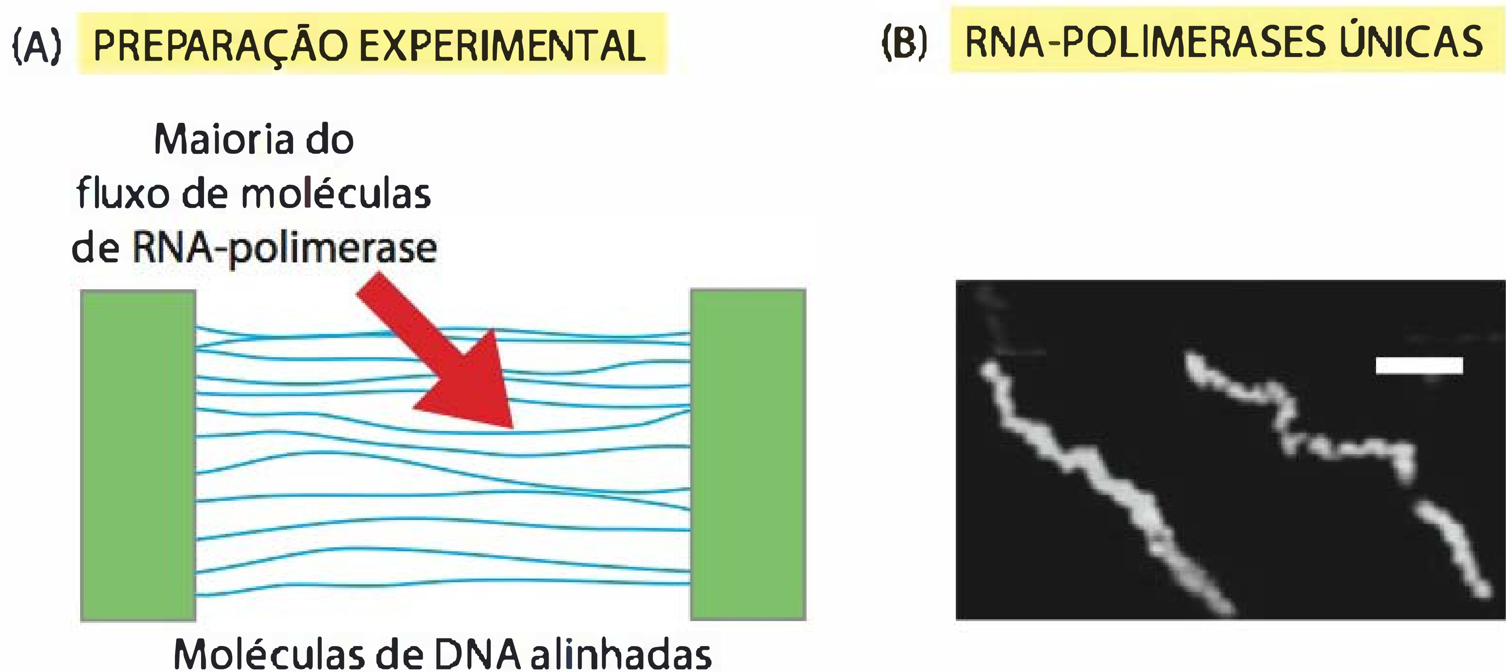


Figura Q7-2 Interações de moléculas de RNA-polimerase individuais com o DNA (Questão 7-7). (A) Preparação experimental. As moléculas de DNA são alinhadas e ancoradas a uma lâmina de vidro, e moléculas de RNA altamente fluorescentes são posicionadas para que as atravessem. (B) Traços de duas moléculas de RNA-polimerase individuais. A molécula à *esquerda* migrou juntamente com a maioria do fluxo, e a outra à *direita* desviou-se dela. A barra de escala é de 10 μm. (B, reimpressa a partir de H. Kabata et al., *Science* 262:1561-1563, 1993. Com permissão de AAAS.)

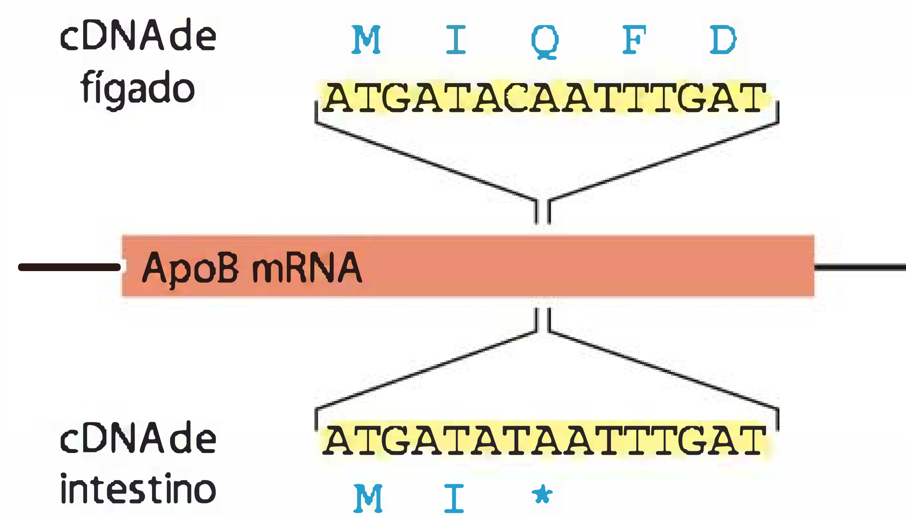


Figura Q7-3 Localização das diferenças de sequências nos clones de cDNA de RNA de ApoB isolados do fígado e do intestino (Questão 7-9). As sequências de aminoácidos correspondentes, no código de uma letra, estão indicadas com as sequências de cDNA.

C. Com base na sua explicação, você esperaria que uma molécula de ligação ao DNA específica poderia encontrar um sítio-alvo mais rápido em uma população de pequenas moléculas de DNA ou em uma população de moléculas de DNA longas? Assuma que a concentração de sítios-alvo seja idêntica e que exista somente um sítio-alvo por molécula de DNA.

7-8 A maioria das pessoas completamente cegas possui ritmos circadianos que são "livres"; ou seja, seus ritmos não estão sincronizados a sinais de tempo ambientais e eles oscilam em um ciclo de cerca de 24,5 horas. Por que você suporia que os relógios circadianos de pessoas cegas não estariam integrados às mesmas 24 horas do relógio como a maioria da população? Você pode adivinhar os sintomas que poderiam estar associados a relógios circadianos livres? Você suporia que uma pessoa cega tenha problemas para dormir?

7-9 Nos humanos, duas formas intimamente relacionadas de apoliproteína B (ApoB) são encontradas no sangue como constituintes das lipoproteínas do plasma. ApoB48 (massa molecular, 48 quilodáltons) é sintetizada pelo intestino, sendo um componente-chave dos quilomícrons, as partículas grandes de lipoproteína responsáveis pela liberação dos triglicerídeos da dieta ao tecido adiposo para estocagem. A ApoB100 (massa molecular, 100.000 quilodáltons) é sintetizada no fígado para a formação de partículas de lipoproteínas muito menores e de densidade muito baixa usadas na distribuição dos triglicerídeos de forma a corresponder às necessidades de energia. Um conjunto clássico de estudos definiu a relação surpreendente entre essas duas proteínas.

Sequências de cópias de DNA cíclico (cDNA) clonadas a partir dos mRNAs desses dois tecidos revelaram uma única diferença: cDNAs de células intestinais possuíam um T, como parte de um códon de parada, em um ponto onde os cDNAs das células do fígado possuíam um C, como parte de um códon de glutamina (**Figura Q7-3**). Para verificar as diferenças nos mRNAs e para procurar as diferenças correspondentes no genoma, RNA e DNA foram isolados de células intestinais e do fígado e então submetidos a amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos que flanqueavam a região de interesse. Os segmentos de DNA amplificados das quatro amostras foram testados para a presença de T ou C para os oligonucleotídeos contendo tanto a sequência de cDNA do fígado (oligo-Q) quanto a sequência de cDNA intestinal (oligo-PARADA). Os resultados estão mostrados na **Tabela Q7-1**.

As duas formas de ApoB são produzidas pelo controle transcricional a partir de dois genes diferentes, por um controle de processamento de um transcrito de RNA a partir de um único gene ou por uma clivagem diferencial do produto proteico a partir de um único gene? Explique sua resposta.

Tabela Q7-1 Hibridização de oligonucleotídeos específicos para os segmentos amplificados de RNA e DNA do fígado e do intestino (Questão 7-9).

	Rna		Dna	
	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino
Oligo-Q	+	–	+	+
Oligo-STOP	–	+	–	–

A hibridização está indicada por +; a sua ausência por –.

REFERÊNCIAS

Geral

Brown TA (2002) Genomes 2, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.
Epigenetics (2004) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69.
Hartwell L, Hood L, Goldberg ML et al (2006) Genetics: from Genes to Genomes, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.
Lodish H, Berk A, Kaiser CL et al (2007) Molecular Cell Biology, 6th ed. New York: WH Freeman.
McKnight SL & Yamamoto KR (eds) (1993) Transcriptional Regulation. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Mechanisms of Transcription (1998) *Cold Spring HarbSymp Quant Biol* 63.
Ptashne M & Gann A (2002) Genes and Signals. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
Regulatory RNAs (2006) *Cold Spring HarbSymp Quant Biol* 71.
Watson JD, Baker TA, Bell SP et al (2003) Molecular Biology of the Gene, 5th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Uma visão geral do controle gênico

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA & Wilmut I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64–66.
Davidson EH (2006) The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution. Burlington, MA: Elsevier.
Gurdon JB (1992)The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68:185–199.
Levine M & Tjian R (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424:147–151.
Ross DT, Scherf U, Eisen MB et al (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genet* 24:227–235.

Motivos de ligação ao DNA nas proteínas de regulação gênica

Gehring WJ, Affolter M & Burglin T (1994) Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63:487–526.
Harbison CT, Gordon DB, Lee TI et al (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431:99–104.
Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, et al (2000) An overview of the structures of protein–DNA complexes. *Gen Biol* 1:reviews 001.1–001.37.
McKnight SL (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci Am* 264:54–64.
Pabo CO & Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053–1095.
Rhodes D & Klug A (1993) Zinc fingers. *Sci Am* 268:56–65.
Seeman NC, Rosenberg JM & Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:804–808.

Como funcionam os comutadores genéticos

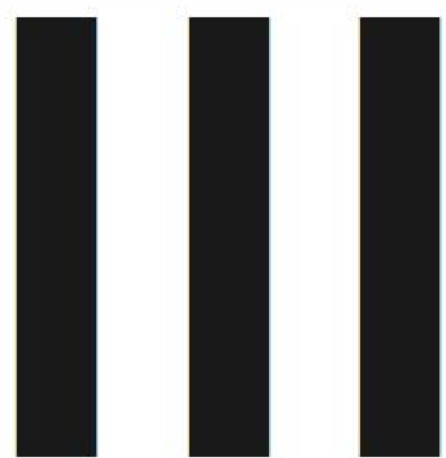
Becker PB & Hörz W (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71:247–273.
Beckwith J (1987) The operon: an historical account. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Neidhart FC, Ingraham JL, Low KB et al eds), vol 2, pp 1439–1443. Washington, DC: ASM Press.
Gaszner M & Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Rev Genet* 7:703–713.
Gilbert W and Muller-Hill B (1967)The lac operator is DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:2415.
Green MR (2005) Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* 18:399–402.
Jacob F & Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318–356.
Lawson CL, Swigon D, Murakami KS et al (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* 14:10–20.
Millar CB, & Grunstein M (2006) Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:657–666.
Narlikar GJ, Fan HY & Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475–487.
Oehler S, Eismann ER, Krämer H et al (1990)The three operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J* 9:973–979.
Ptashne M (2004) A Genetic Switch: Phage and Lambda Revisited, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ptashne M (1967) Specific binding of the lambda phage repressor to lambda DNA. *Nature* 214:232–234.
St Johnston D & Nusslein-Volhard C (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68:201–219.
Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45.

Mecanismos genéticos moleculares que criam tipos celulares especializados

Alon, U (2006) An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits (Chapman & Hall/Crc Mathematical and Computational Biology Series) TF Chapman.
Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ et al (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Rev Genet* 6:544–556.
Bernstein BE, Meissner A & Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669–681.
Herskowitz I (1989) A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342:749–757.
Klose RJ & Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89–97.
Meyer BJ (2000) Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16:247–253.
Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414:122–128.
Tapscott SJ (2005) The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132:2685–2695.

Controles pós-transcricionais

Bass BL (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71:817–846.
Blencowe BJ (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126:37–47.
Brennecke J, Stark A, Russell RB et al (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology* 3.
Fire A, Xu S, Montgomery MK et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
Frankel AD & Young JAT (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1–25.
Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* 58:303–328.
Mello CC & Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342.
Parker R & Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25:635–646.
Stuart KD, Schnaufer A, Ernst NL et al (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci* 30:97–105.
Tolia NH & Joshua-Tor L (2007) Slicer and the argonautes. *Nature Chem Biol* 3:36–43.
Tomari Y & Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19:517–529.
Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ et al (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20:515–524.
Verdel A & Moazed D (2005) RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Letters* 579:5872–5878.
Wilhelm JE & Smibert, CA (2005) Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* 97:235–252.
Winkler WC & Breaker RR (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol* 59:487–517.

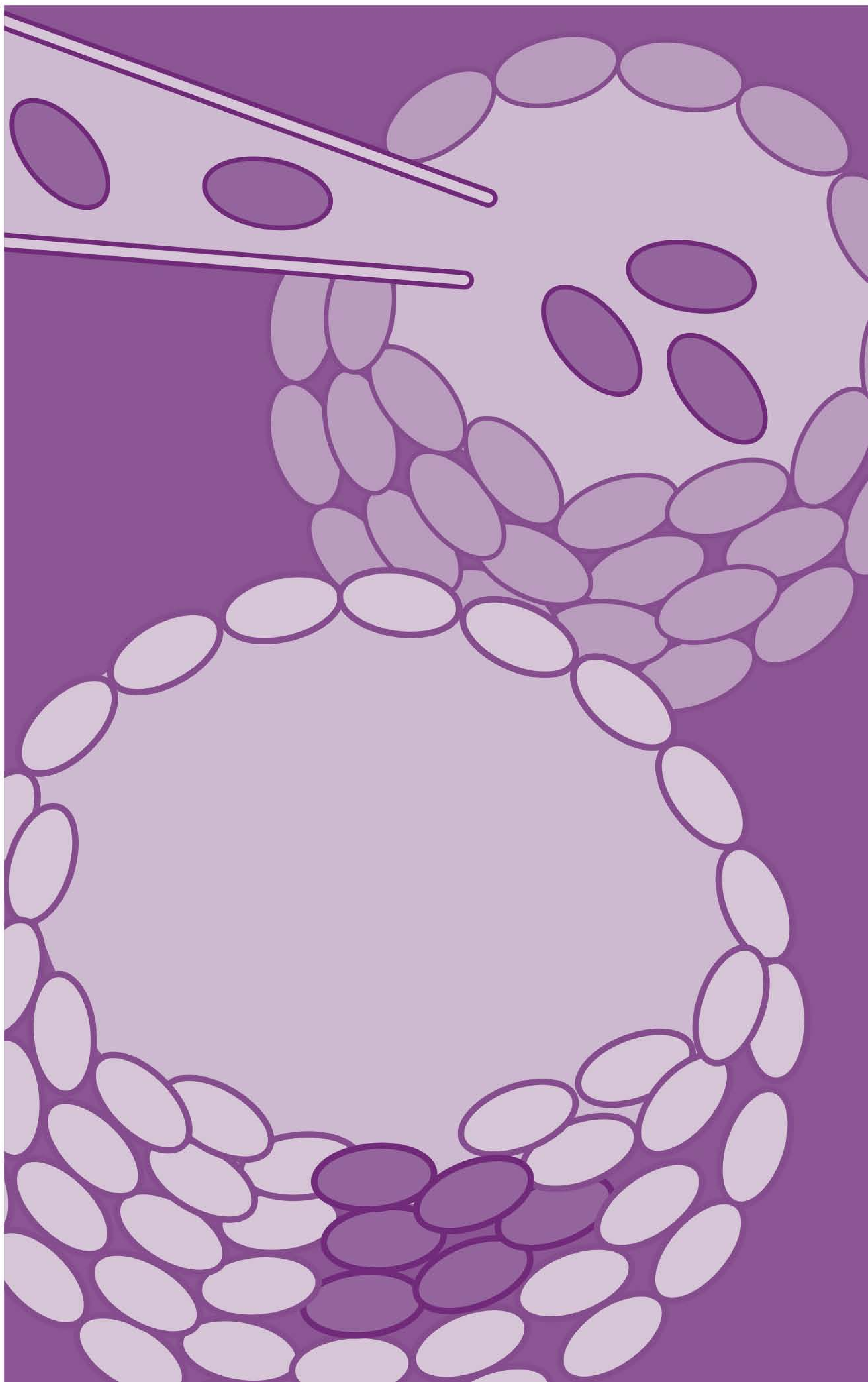


MÉTODOS

Parte III
Capítulos

8 Manipulação de Proteínas, DNA e RNA

9 Visualização de Células



Manipulação de Proteínas, DNA e RNA

8

O progresso na ciência muitas vezes é dirigido pelos avanços na tecnologia. O amplo campo da biologia celular, por exemplo, surgiu quando artesãos ópticos aprenderam a confeccionar pequenas lentes de qualidade suficientemente alta para observar células e suas subestruturas. Inovações na confecção de lentes, ao invés de qualquer avanço conceitual ou filosófico, permitiram a Hooke e van Leeuwenhoek descobrir um mundo celular antes jamais visto, onde pequenas criaturas giravam e rodopiavam em uma pequena gotícula de água (**Figura 8-1**).

O século XXI promete ser particularmente excitante para a biologia. Novos métodos para analisar proteínas, DNA e RNA estão fornecendo uma explosão de informações e permitindo aos cientistas estudar células e suas macromoléculas por meios nunca imaginados anteriormente. Agora temos acesso a sequências de vários bilhões de nucleotídeos, provendo mapas moleculares completos de dúzias de organismos – de micróbios e sementes de mostarda até vermes, moscas, camundongos, cães, chimpanzés e humanos. Novas técnicas potentes estão nos auxiliando a decifrar esta informação, permitindo não somente que compilemos catálogos detalhados enormes de genes e proteínas, mas iniciar a desemaranhar como esses componentes trabalham juntos para formar células e organismos funcionais. O objetivo de se obter um completo entendimento do que acontece dentro de uma célula, enquanto ela responde ao seu meio e interage com suas vizinhas, ainda é distante. Queremos saber quais os genes são ativados, quais os transcritos de mRNA estão presentes e quais proteínas estão ativas – onde estão localizadas, com quais outras proteínas e outras moléculas elas se associam e a quais vias ou redes elas pertencem. Também queremos entender como a célula controla com sucesso este número impressionante de variáveis e como ela escolhe entre um número quase ilimitado de possibilidades para realizar seus diversos papéis biológicos. Tais informações nos permitirão começar a construir uma estrutura para delinear, e finalmente predizer, como genes e proteínas funcionam para assentar os fundamentos para a vida.

Neste capítulo, apresentamos alguns dos principais métodos utilizados para estudar os componentes moleculares das células, particularmente proteínas, DNA e RNA. Consideramos como separar as células de diferentes tipos de tecidos, como crescer células fora do corpo e como romper células e isolar suas organelas e constituintes macromoleculares na forma pura. Também apresentamos as últimas técnicas utilizadas para determinar a estrutura, a função e as interações das proteínas e discutimos as descobertas marcantes na tecnologia do DNA que continua a revolucionar nossa compreensão sobre a função das células.

As técnicas e os métodos descritos neste capítulo tornaram possíveis as descobertas que são apresentadas em todo este livro, e estão sendo utilizados atualmente por dezenas de milhares de cientistas a cada dia.

Neste capítulo

ISOLAMENTO DE CÉLULAS E SEU CRESCIMENTO EM CULTURA 501

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 510

ANÁLISE DE PROTEÍNAS 517

ANÁLISE E MANIPULAÇÃO DE DNA 532

ESTUDO DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DOS GENES 553

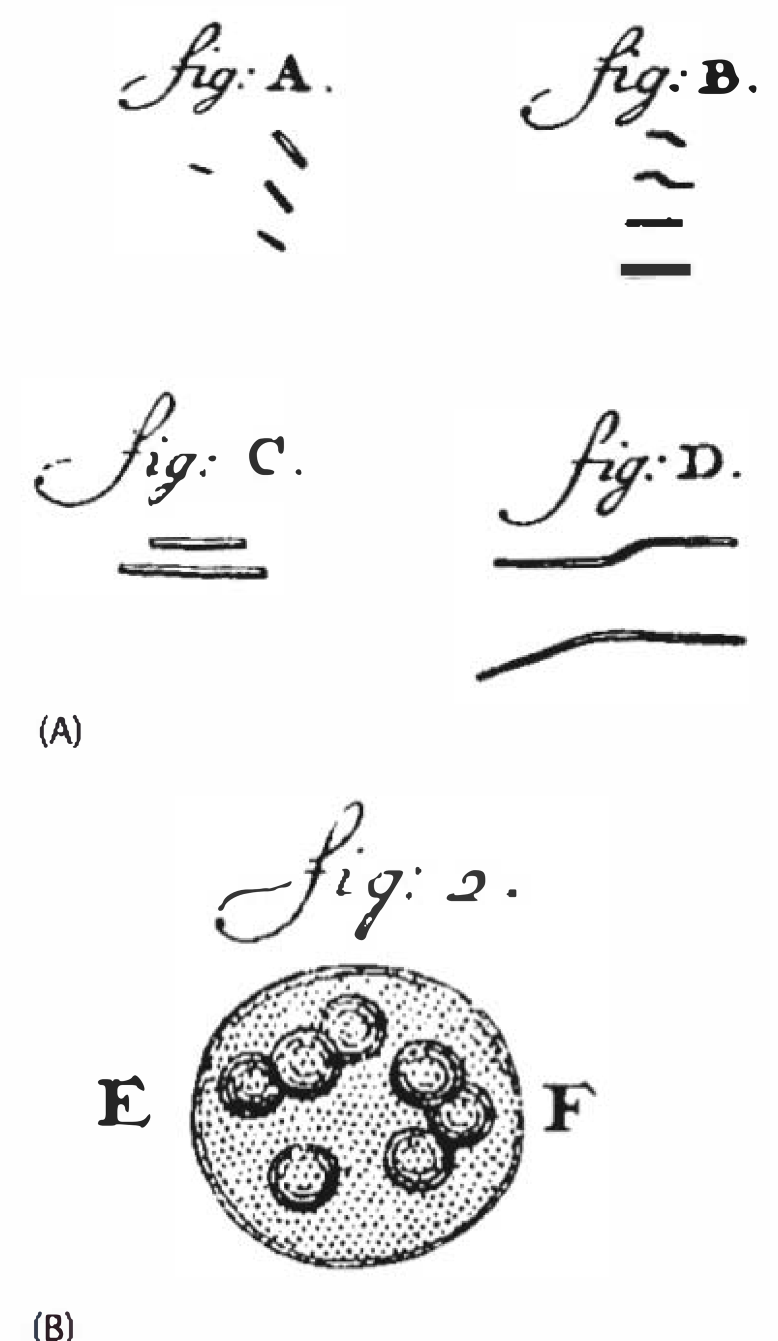


Figura 8-1 Vida microscópica. Uma amostra dos "diversos organismos microscópicos" vistos por van Leeuwenhoek utilizando seu microscópio simples. (A) Bactérias vistas no material que ele retirou do meio de seus dentes. As bactérias vistas na fig. B foram descritas como "nadando primeiro para a frente e depois para trás" (1692). (B) A alga verde eucariótica *Volvox* (1700). (Cortesia da Fundação John Innes).

ISOLAMENTO DE CÉLULAS E SEU CRESCIMENTO EM CULTURA

Embora as organelas e as moléculas grandes em uma célula possam ser visualizadas com microscópios, entender como esses componentes funcionam requer uma análise bioquímica detalhada. A maioria dos procedimentos bioquímicos requer que grandes quantidades de células sejam rompidas fisicamente para se ter acesso aos seus componentes. Se a amostra é um pedaço de tecido, composto por diferentes tipos de células, populações de células he-

terogêneas estarão misturadas. Para obter o máximo de informações possíveis sobre as células em um tecido, biólogos desenvolveram maneiras para dissociar as células dos tecidos e separá-las de acordo com o tipo. Essas manipulações resultam em uma população relativamente homogênea de células que podem então ser analisadas – diretamente, ou após seu número ser bastante aumentado, pela proliferação das células em cultura.

Células podem ser isoladas a partir de tecidos intactos

Tecidos intactos fornecem a fonte de material mais realística, uma vez que representam as células encontradas no corpo da maneira como realmente são. O primeiro passo no isolamento de células individuais é romper a matriz extracelular e as junções entre as células que as mantêm unidas. Com esse propósito, um tecido normalmente é tratado com enzimas proteolíticas (como tripsina e colagenase) para digerir as proteínas na matriz extracelular e com agentes (como ácido etilenodiaminotetracético, ou EDTA) que ligam, ou quelam, o Ca^{2+} do qual a adesão entre as células depende. O tecido pode então ser dissociado em células individuais por agitação leve.

Para algumas preparações bioquímicas, a proteína de interesse pode ser obtida em quantidades suficientes sem que o tecido ou o órgão seja separado em tipos celulares. Exemplos incluem a preparação das histonas a partir de timo de terneiro, actina a partir de músculo de coelhos ou tubulina a partir de cérebro de bovinos. Em outros casos, a obtenção da proteína de interesse requer o enriquecimento de um tipo celular específico. Várias abordagens são utilizadas para separar os diferentes tipos celulares a partir de uma suspensão de mistura de células. A técnica mais comum de separação celular utiliza um anticorpo ligado a um corante fluorescente para marcar determinadas células. É escolhido um anticorpo que se liga especificamente à superfície de apenas um tipo de célula no tecido. Então, as células marcadas podem ser separadas das não-marcadas em um *separador de células ativado por fluorescência* eletrônico. Nesta máquina extraordinária, células individuais deslocam-se em uma fileira única, em um fluxo preciso, atravessam um feixe de *laser* e sua fluorescência é rapidamente medida. Um tubo vibrador gera pequenas gotículas, a maioria contendo uma ou nenhuma célula. As gotículas contendo uma única célula são carregadas automaticamente com uma carga positiva ou negativa no momento da formação, dependendo de a célula que elas contêm ser fluorescente; elas são então defletidas por um campo elétrico intenso para dentro de um depósito apropriado. Aglomerados ocasionais de células detectados pelo seu espalhamento de luz aumentado são deixados sem carga e descartados em um depósito de resíduos. Essas máquinas podem selecionar com acuidade uma célula fluorescente de mil células não-marcadas e selecionar milhares de células a cada segundo (**Figura 8-2**).

As células selecionadas também podem ser obtidas dissecando-se cuidadosamente fatias finas de tecido que foram preparadas para serem examinadas ao microscópio (discutido no Capítulo 9). Em uma abordagem, um corte de tecido é coberto com um filme plástico fino, e a região contendo as células de interesse é irradiada com um pulso focalizado de *laser* infravermelho. Esse pulso leve derrete um pequeno círculo do filme, ligando as células abaixo dele. Essas células capturadas são então removidas para serem analisadas. A técnica, chamada de *microdissecação por captura a laser*, pode ser utilizada para separar e analisar células de diferentes áreas de um tumor, permitindo que suas propriedades ou sua composição molecular sejam comparadas com as células vizinhas normais. Um método relacionado utiliza um feixe de *laser* para cortar, diretamente, um grupo de células e lançá-las em um recipiente apropriado para posterior análise (**Figura 8-3**).

Uma população uniforme de células obtida por qualquer um desses métodos de separação, ou outros, pode ser utilizada diretamente para análises bioquímicas. Após ter rompido as células mecanicamente, com detergentes e outros métodos, o citoplasma ou as organelas individuais podem ser extraídos, e então moléculas específicas podem ser purificadas.

Células podem ser cultivadas em meio de cultura

Embora moléculas possam ser extraídas a partir de tecidos inteiros, essa muitas vezes não é a fonte de material mais conveniente, requerendo, por exemplo, visitas matinais a abatedouros. O problema não é apenas uma questão de conveniência. Os animais domésticos normalmente utilizados como fonte de órgãos não são fáceis de serem manipulados geneticamente. Além disso, a complexidade dos tecidos e órgãos intactos é uma desvantagem inerente quando se tenta purificar determinadas moléculas. Células cultivadas em meio de cultura fornecem uma população mais homogênea de células das quais material pode ser

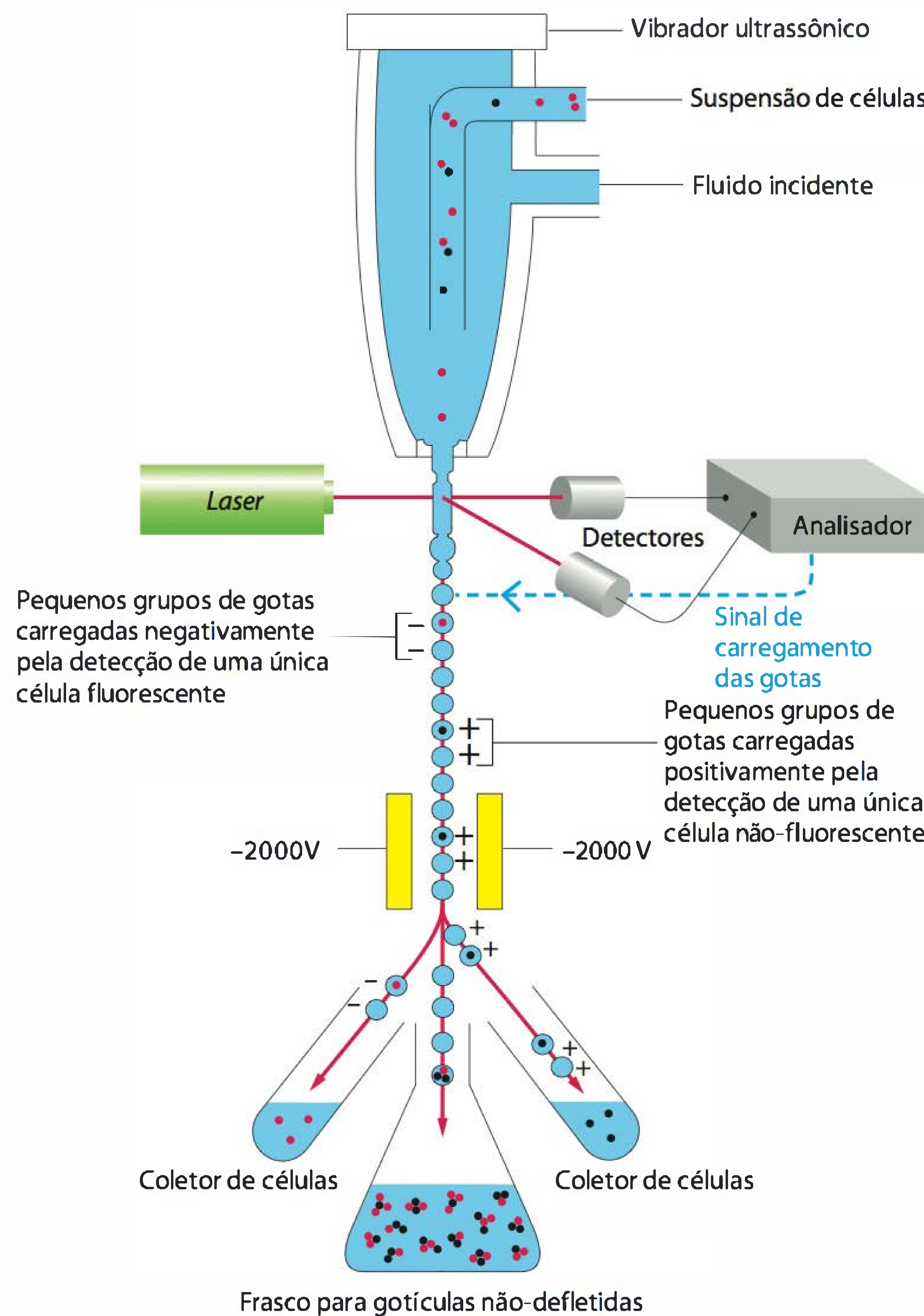


Figura 8-2 Separador de células ativado por fluorescência. Uma célula passando através do feixe de *laser* é monitorada por sua fluorescência. As gotículas contendo células únicas são carregadas negativa ou positivamente, dependendo de a célula ser fluorescente ou não. As gotículas são então defletidas por um campo elétrico para tubos coletores de acordo com a sua carga. Observe que a concentração das células deve ser ajustada de maneira que a maioria das gotículas não contenha células e seja descartada em um recipiente de resíduos juntamente com qualquer aglomerado de células.

extraído, sendo também muito mais convenientes para se trabalhar no laboratório. Dadas as condições apropriadas, a maioria das células vegetais e animais pode viver, multiplicar e até mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma garrafa de cultura de tecidos. As células podem ser observadas continuamente ao microscópio ou analisadas bioquimicamente, e os efeitos de adicionar ou remover moléculas específicas, como hormônios ou fatores de crescimento, podem ser explorados sistematicamente. Além disso, misturando-se dois tipos de células, as interações entre um tipo de célula e outro podem ser estudadas.

Experimentos realizados com células em cultura às vezes são referidos como sendo conduzidos *in vitro* (literalmente, "dentro de vidro"), em contraste com experimentos que utilizam organismos intactos, os quais são referidos como conduzidos *in vivo* (literalmente, "em organismos vivos"). Entretanto, esses termos podem ser confusos, pois frequentemente são utilizados em um sentido muito diferente pelos bioquímicos. Em laboratórios de bioquímica, *in vitro* se refere às reações que ocorrem em um tubo de ensaio na ausência de células vivas, enquanto *in vivo* se refere a qualquer reação que ocorra dentro de uma célula viva, mesmo células que estejam sendo cultivadas em meio de cultura.

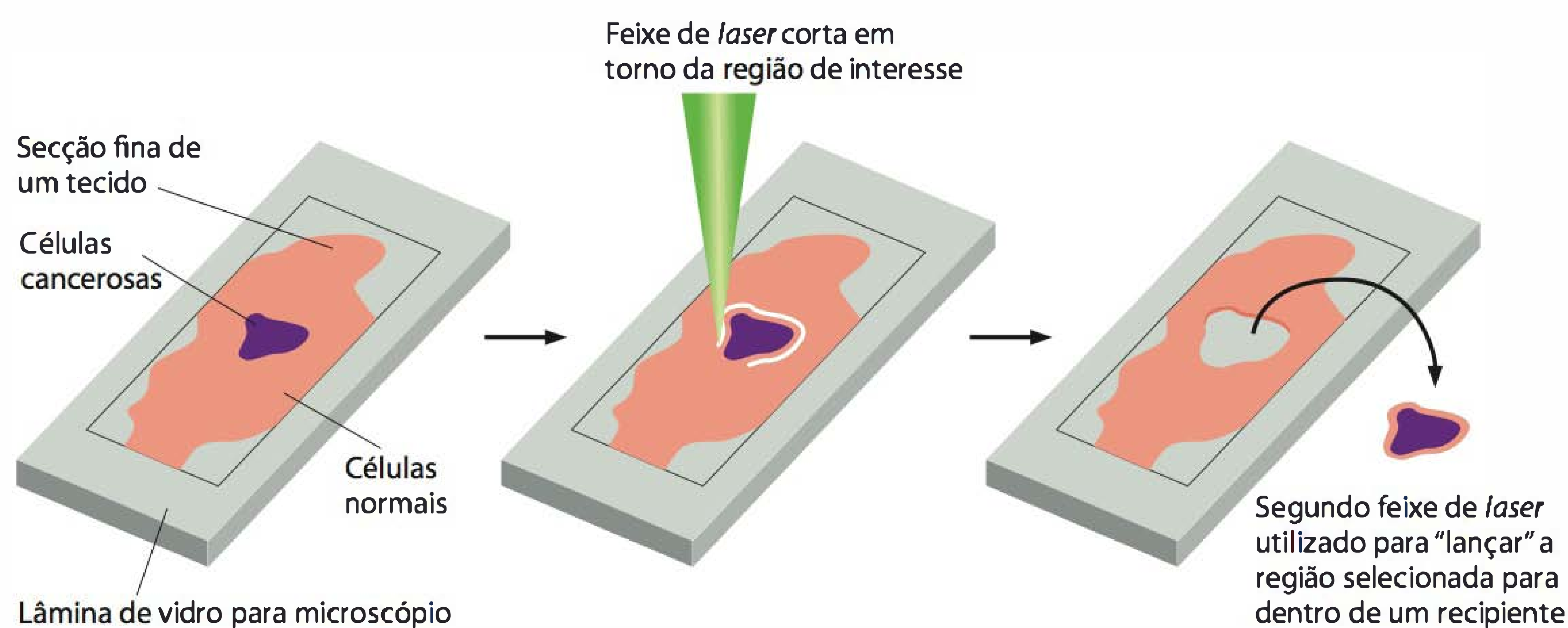


Figura 8-3 Técnicas de microdissecação para selecionar células a partir de fatias de tecidos. Este método utiliza um feixe de *laser* para cortar uma região de interesse e ejetá-la em um recipiente, permitindo o isolamento de até mesmo uma única célula a partir de uma amostra de tecido.

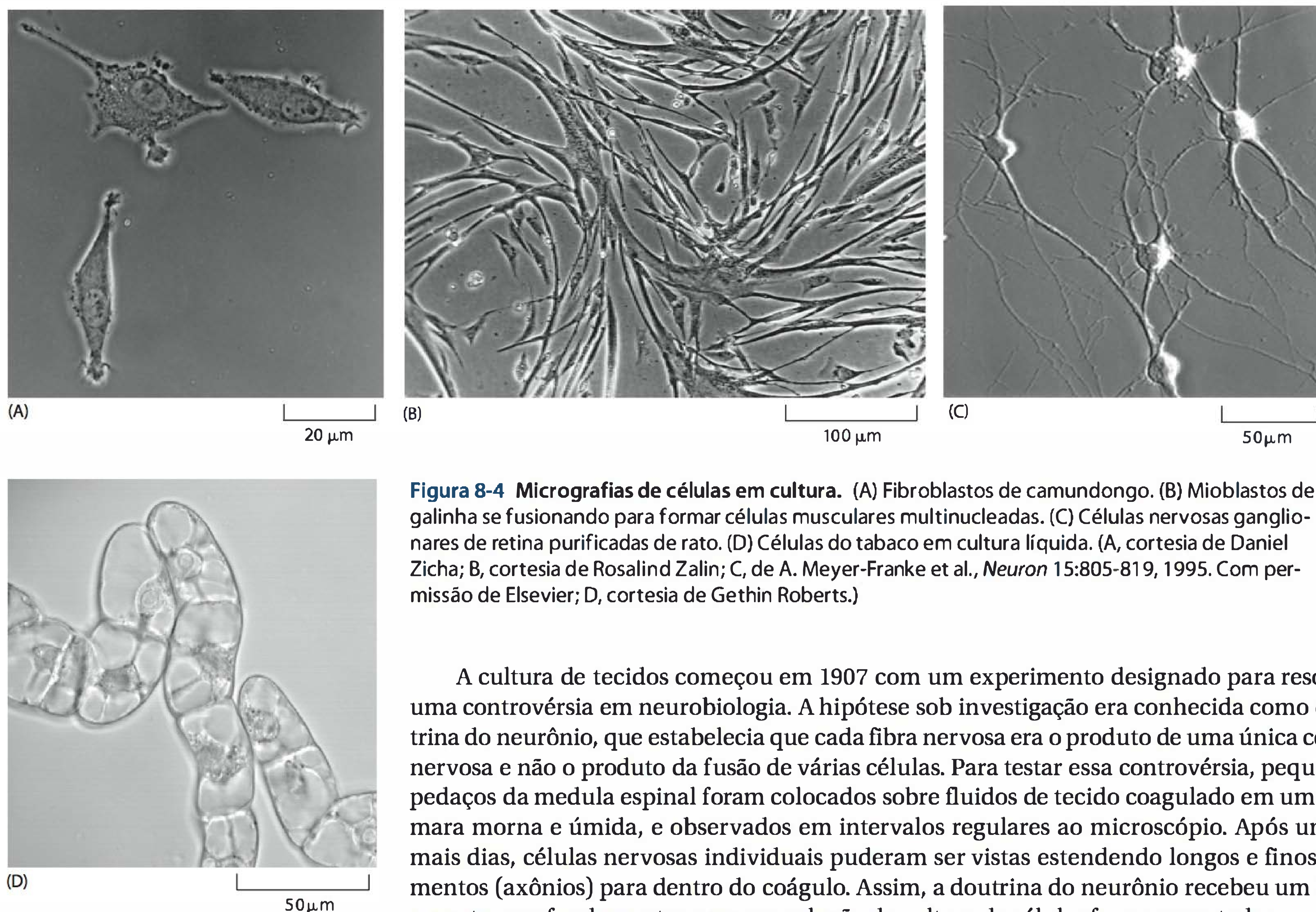


Figura 8-4 Micrografias de células em cultura. (A) Fibroblastos de camundongo. (B) Mioblastos de galinha se fusionando para formar células musculares multinucleadas. (C) Células nervosas ganglionares de retina purificadas de rato. (D) Células do tabaco em cultura líquida. (A, cortesia de Daniel Zicha; B, cortesia de Rosalind Zalin; C, de A. Meyer-Franke et al., *Neuron* 15:805-819, 1995. Com permissão de Elsevier; D, cortesia de Gethin Roberts.)

A cultura de tecidos começou em 1907 com um experimento designado para resolver uma controvérsia em neurobiologia. A hipótese sob investigação era conhecida como doutrina do neurônio, que estabelecia que cada fibra nervosa era o produto de uma única célula nervosa e não o produto da fusão de várias células. Para testar essa controvérsia, pequenos pedaços da medula espinal foram colocados sobre fluidos de tecido coagulado em uma câmara morna e úmida, e observados em intervalos regulares ao microscópio. Após um ou mais dias, células nervosas individuais puderam ser vistas estendendo longos e finos filamentos (axônios) para dentro do coágulo. Assim, a doutrina do neurônio recebeu um forte suporte, e os fundamentos para a revolução da cultura de células foram assentados.

Esses experimentos originais com fibras nervosas utilizavam culturas de pequenos fragmentos de tecidos chamados de explantes. Atualmente, culturas são mais comumente feitas a partir de suspensões de células dissociadas a partir de tecidos utilizando os métodos descritos anteriormente. Diferentemente das bactérias, a maioria das células de tecidos não está adaptada para viver em suspensão no líquido e requer uma superfície sólida sobre a qual pode crescer e se dividir. Para culturas de células, esse suporte geralmente é providenciado pela superfície de uma placa de plástico para cultura de tecidos. Entretanto, as células variam nas suas necessidades, e várias não crescem ou se diferenciam a não ser que a placa de cultura esteja coberta com materiais aos quais as células gostam de se aderir, como polilisina ou componentes da matriz extracelular.

Culturas preparadas diretamente a partir dos tecidos de um organismo são chamadas de *culturas primárias*. Elas podem ser feitas com ou sem uma etapa inicial de fracionamento para separar diferentes tipos de células. Na maioria dos casos, as células em culturas primárias podem ser removidas da placa de cultura e recultivadas repetidamente em uma cultura secundária; dessa maneira, elas podem ser subcultivadas (*passagens*) repetidamente durante semanas ou meses. Tais células frequentemente apresentam várias das propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem (**Figura 8-4**): fibroblastos continuam a secretar colágeno; células derivadas de músculo esquelético embrionário fusionam para formar fibras musculares que contraem espontaneamente na placa de cultura; células nervosas estendem axônios excitáveis eletricamente e fazem sinapses com outras células nervosas; e células epiteliais formam lâminas extensivas com várias das propriedades de um epitélio intacto. Como essas propriedades são mantidas em cultura, elas são acessíveis para serem estudadas de uma maneira que muitas vezes não é possível nos tecidos intactos.

A cultura de tecidos não é limitada a células animais. Quando um pedaço de tecido vegetal é cultivado em um meio estéril contendo nutrientes e reguladores apropriados de crescimento, várias das células são estimuladas a proliferar indefinidamente de uma maneira desorganizada, produzindo uma massa de células relativamente não-diferenciadas chamada de *calo*. Se os nutrientes e reguladores de crescimento são manipulados cuidadosamente, pode-se induzir a formação de uma raiz e então de meristemas apicais na raiz de dentro do calo, e em várias espécies pode-se regenerar uma planta inteira nova. Semelhante a células

animais, culturas de calos podem ser mecanicamente dissociadas em células únicas, que crescerão e se dividirão como uma cultura em suspensão (ver Figura 8-4D).

Linhagens de células eucarióticas são uma fonte amplamente utilizada de células homogêneas

As culturas celulares obtidas pelo rompimento de tecidos tendem a sofrer de um problema – no final as células morrem. A maioria das células de vertebrados para de se dividir após um número finito de divisões celulares em cultura, um processo chamado de *senescência celular replicativa* (discutido no Capítulo 17). Fibroblastos humanos normais, por exemplo, normalmente se dividem somente 25-40 vezes em cultura antes de pararem. Nessas células, a capacidade de proliferação limitada reflete um encurtamento e a perda progressiva das extremidades dos telômeros das células, das sequências repetitivas de DNA e das proteínas associadas dos finais de cada cromossomo (discutido no Capítulo 5). Células somáticas humanas no organismo desativaram a produção da enzima, chamada de *telomerase*, que normalmente mantém os telômeros, por isso seus telômeros encurtam a cada divisão celular. Fibroblastos humanos podem ser induzidos a proliferar indefinidamente fornecendo um gene que codifica para a subunidade catalítica da telomerase; nesse caso, eles podem ser então propagados como uma linhagem celular "imortalizada".

Entretanto, algumas células humanas não são imortalizadas por esse truque. Embora seus telômeros permaneçam longos, elas irão parar de se dividir após um número limitado de divisões, pois as condições da cultura finalmente ativam os *mecanismos de ponto de checagem* (discutido no Capítulo 17) que detêm o ciclo celular – um processo algumas vezes chamado de "choque de cultura". Com o objetivo de imortalizar essas células, deve-se fazer mais do que introduzir a telomerase. Deve-se também inativar os mecanismos de ponto de checagem. Isso pode ser realizado pela introdução de certos oncogenes promotores de câncer, como aqueles derivados de vírus tumorais (discutido no Capítulo 20). Diferentemente de células humanas, a maioria das células de roedores não desliga a produção de telomerase e assim seus telômeros não encurtam a cada divisão celular. Dessa forma, se o choque de cultura puder ser evitado, alguns tipos de células de roedores se dividirão de forma indefinida em cultura. Além disso, células de roedores muitas vezes sofrem modificações genéticas em cultura que inativam seus mecanismos de ponto de checagem, produzindo assim, espontaneamente, linhagens de células imortalizadas.

Linhagens de células muitas vezes podem ser mais facilmente geradas a partir de células de câncer, mas essas culturas diferem daquelas preparadas a partir de células normais de várias maneiras, sendo referidas como *linhagens de células transformadas*. Essas linhagens frequentemente crescem sem aderir a uma superfície, por exemplo, e podem proliferar para uma densidade muito mais alta em uma placa de cultura. Propriedades similares podem ser induzidas experimentalmente em células normais, sendo transformadas com um vírus ou químicos indutores de tumores. As linhagens celulares transformadas resultantes frequentemente podem causar tumores se injetadas em um animal suscetível (embora normalmente apenas uma pequena subpopulação, chamada de células-tronco cancerosas, possa fazê-lo – discutido no Capítulo 20).

Tanto as linhagens celulares transformadas como as não-transformadas são extremamente úteis na pesquisa celular como fonte de um grande número de células de um tipo uniforme, especialmente por poderem ser estocadas em nitrogênio líquido a –196°C por um período indefinido e manter sua viabilidade quando descongeladas. Entretanto, é importante ter em mente que as células em ambos os tipos de linhagens celulares quase sempre diferem de maneira importantes de suas progenitoras normais nos tecidos de onde elas foram originadas.

Algumas das linhagens celulares amplamente utilizadas estão listadas na **Tabela 8-1**. Diferentes linhagens têm diferentes vantagens; por exemplo, as linhagens celulares epiteliais PtK derivadas do canguru rato, diferentemente de outras linhagens celulares onde as células se tornam arredondadas durante a mitose, permanecem achatadas durante a mitose, permitindo que o aparato mitótico seja prontamente observado em ação.

Células-tronco embrionárias poderiam revolucionar a medicina

Entre as linhagens celulares mais promissoras a serem desenvolvidas – de um ponto de vista médico – estão as células-tronco embrionárias (ES, *embryonic stem*). Essas células extraordinárias, pela primeira vez coletadas da massa celular interna do embrião jovem, podem proliferar indefinidamente em cultura e ainda reter um potencial de desenvolvimento irrestrito. Se as células da placa de cultura são recolocadas em um meio embrionário inicial,

Tabela 8-1 Algumas das linhagens celulares comumente utilizadas

Linhagem celular*	Tipo e origem da célula
3T3	Fibroblasto (camundongo)
BHK21	Fibroblasto (*hamster* sírio)
MDCK	Célula epitelial (cão)
HeLa	Célula epitelial (humano)
PtK1	Célula epitelial (canguru rato)
L6	Mioblasto (rato)
PC12	Célula cromafin (da medula adrenal de rato)
SP2	Célula plasmática (camundongo)
COS	Rim (macaco)
293	Rim (humano); transformada com adenovírus
CHO	Ovário (*hamster* chinês)
DT40	Célula de linfoma para recombinação direcionada eficiente (galinha)
R1	Célula-tronco embrionária (camundongo)
E14.1	Célula-tronco embrionária (camundongo)
H1, H9	Célula-tronco embrionária (humano)
S2	Célula semelhante a macrófago (*Drosophila*)
BY2	Célula meristemática indiferenciada (tabaco)

*Várias destas linhagens celulares derivaram de tumores. Todas são capazes de replicação indefinida em cultura e expressam pelo menos algumas das características especiais das suas células de origem.

elas podem dar origem a todos os tipos celulares no corpo, incluindo células germinativas (**Figura 8-5**). Suas descendentes no embrião são capazes de se integrar perfeitamente no local que irão ocupar, adotando as características e os comportamentos que células normais teriam naquele local.

Células com propriedades similares àquelas das células ES de camundongo agora podem ser derivadas de embriões humanos jovens, criando um suprimento potencialmente inacabável de células que podem ser usadas para substituir e reparar tecidos humanos maduros lesionados. Experimentos em camundongos sugerem que pode ser possível, no futuro, o uso de células ES para produzir células especializadas para terapia – para substituir as fibras do músculo esquelético que degeneraram em vítimas de distrofia muscular, as células nervosas que morreram em pacientes com o mal de Parkinson, as células secretoras de insulina que são destruídas no diabete do tipo 1 e as células musculares cardíacas que morreram durante um ataque cardíaco. Talvez um dia até mesmo seja possível crescer órgãos inteiros a partir de células ES por

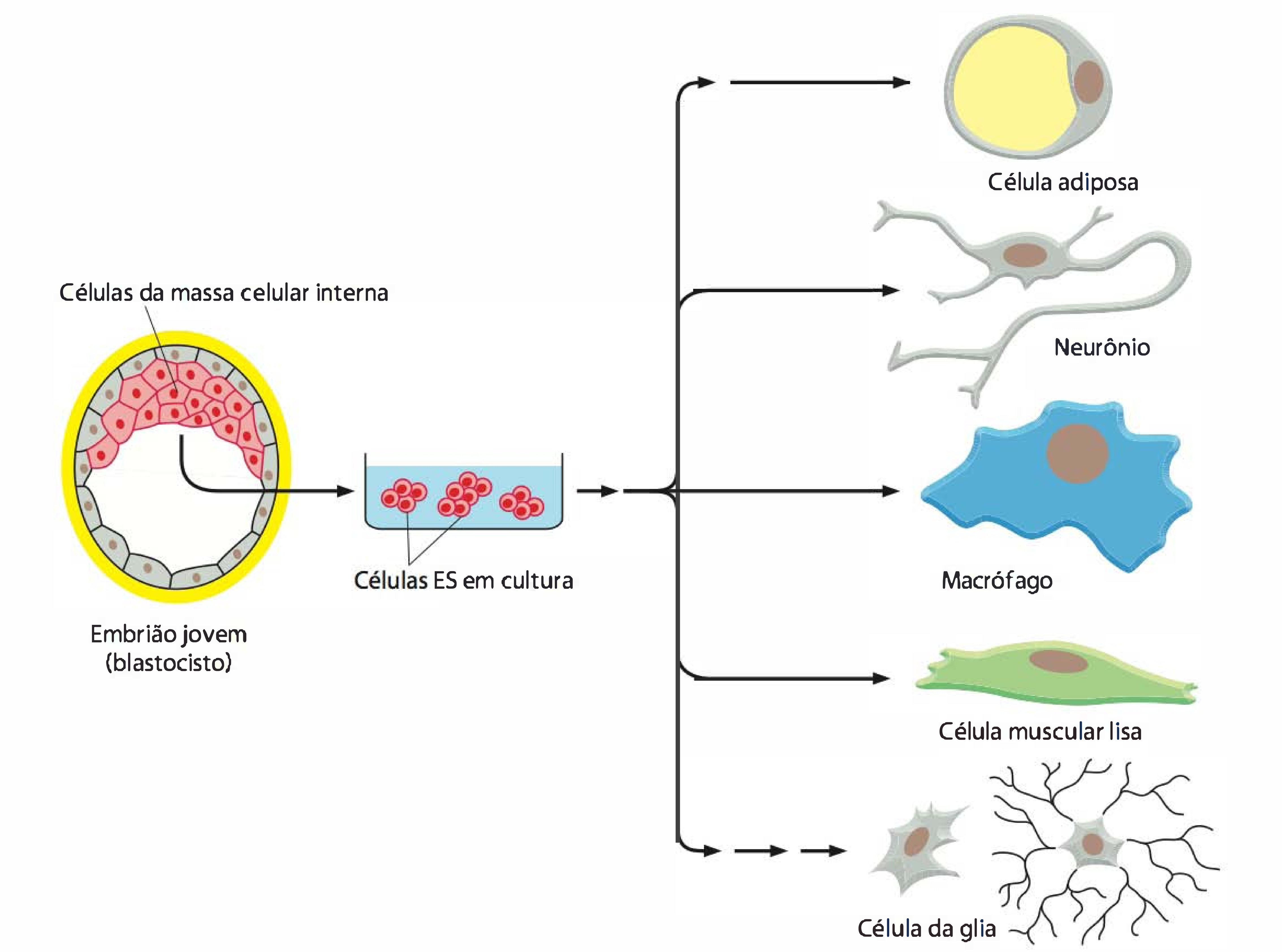


Figura 8-5 Células-tronco embrionárias (ES) derivadas de um embrião. Estas células em cultura dão origem a todos os tipos celulares do corpo. Células ES são coletadas da massa interna de células de um embrião jovem e podem ser mantidas indefinidamente como células-tronco em cultura (discutido no Capítulo 23). Se elas forem recolocadas em um embrião, irão integrar-se perfeitamente e se diferenciar para combinar com qualquer que seja o meio em que elas se encontrem. As células também podem ser mantidas em cultura como uma linhagem celular imortal; elas podem então ser supridas com diferentes hormônios ou fatores de crescimento como estímulo para se diferenciarem em tipos celulares específicos. (Com base em E. Fuchs and J. A. Segré, *Cell* 100:143-155, 2000. Com permissão de Elsevier.)

uma recapitulação do desenvolvimento embrionário. É importante não transplantar células ES por si só em adultos uma vez que podem produzir tumores chamados de teratomas.

Existe um problema principal associado ao uso de células derivadas de células ES para o reparo de tecidos. Se as células transplantadas diferem geneticamente das células do paciente no qual elas são enxertadas, o sistema imune do paciente rejeitará e destruirá tais células. Está claro que esse problema pode ser evitado se as células usadas para reparo forem derivadas do próprio paciente. Como discutido no Capítulo 23, vários tecidos adultos contêm células-tronco dedicadas à produção contínua de apenas um ou poucos tipos celulares especializados, e o grande desafio dos pesquisadores de células-tronco é manipular o comportamento dessas células-tronco adultas para serem usadas no reparo de tecidos.

Entretanto, a tecnologia das células-tronco, pelo menos na teoria, também oferece uma outra opção para o problema da rejeição imune, usando uma estratégia conhecida como "clonagem terapêutica", como explicaremos a seguir.

O transplante nuclear de células somáticas pode prover uma maneira de gerar células-tronco personalizadas

O termo "clonagem" tem sido utilizado de maneiras confusas como um termo geral para tipos de procedimentos bastante distintos. É importante compreender as distinções, particularmente no contexto dos debates públicos sobre a ética da pesquisa em células-tronco.

Como definido pelos biólogos, um clone é simplesmente um grupo de indivíduos idênticos geneticamente por terem descendido de um único ancestral. O tipo mais simples de clonagem é a clonagem de células. Assim, pode-se pegar uma única célula-tronco epidermal da pele e deixá-la crescer e dividir em cultura para obter um grande clone de células epidermais idênticas geneticamente, que podem, por exemplo, ser utilizadas para ajudar a reconstruir a pele de um paciente com graves queimaduras. Esse tipo de clonagem não é nada mais do que uma extensão, por meios artificiais, dos processos de proliferação e reparo celular que ocorrem em um organismo humano normal.

A clonagem de animais multicelulares inteiros, chamada de *clonagem reprodutiva*, é uma iniciativa muito diferente, envolvendo um desvio muito mais radical do curso normal da natureza. Normalmente, cada animal individual tem tanto uma mãe como um pai e não é geneticamente idêntico a nenhum deles. Na clonagem reprodutiva, a necessidade de uma mãe e de um pai e da união sexual é ultrapassada. Para mamíferos, essa difícil façanha foi alcançada em ovelhas e alguns outros animais domésticos pelo *transplante nuclear de células somáticas*. O procedimento inicia com uma célula ovo não-fertilizada. O núcleo dessa célula haploide é sugado e substituído por um núcleo de uma célula somática diploide normal. A célula doadora diploide normalmente é retirada de um tecido de um indivíduo adulto. Permite-se que a célula híbrida, que consiste em um núcleo doador diploide no citoplasma do ovo hospedeiro, se desenvolva por um curto período de tempo em cultura. Em uma pequena proporção de casos, esse procedimento pode dar origem a um embrião jovem, que é então colocado no útero de uma mãe adotiva (**Figura 8-6**). Se o pesquisador tiver sorte, o desenvolvimento continua

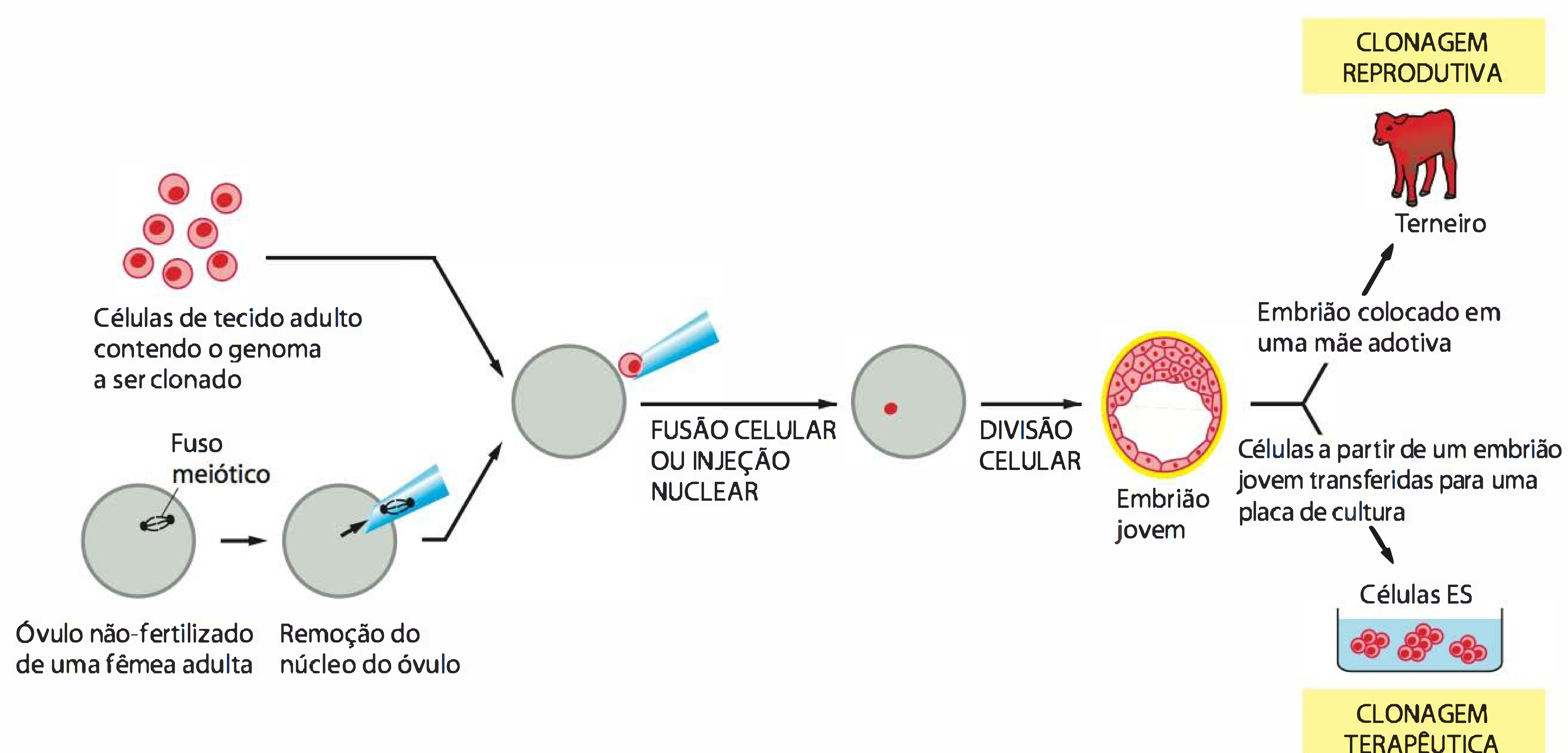


Figura 8-6 Clonagem reprodutiva e terapêutica. Células de tecido adulto podem ser utilizadas para clonagem terapêutica ou para gerar células ES personalizadas (a chamada clonagem terapêutica).

como o de um embrião normal, finalmente dando origem a um animal inteiro. Um indivíduo produzido dessa maneira, por clonagem reprodutiva, deve ser geneticamente idêntico ao indivíduo adulto que doou a célula diploide (exceto pela pequena quantidade de informação genética na mitocôndria, que é herdada apenas do citoplasma do óvulo).

A clonagem terapêutica, que é muito diferente da clonagem reprodutiva, emprega a técnica do transplante nuclear de células somáticas para produzir células ES personalizadas (ver Figura 8-6). Nesse caso, um embrião muito jovem gerado por transplante nuclear, consistindo em cerca de 200 células, não é transferido para o útero de uma mãe adotiva. Ao invés disso, ele é usado como uma fonte da qual células ES são derivadas em cultura, com o objetivo de gerar vários tipos de células que podem ser usadas para o reparo de tecidos. Células obtidas por esse processo são quase idênticas geneticamente ao doador do núcleo original, podendo, assim, ser enxertadas de volta no doador, sem receio de rejeição imunológica.

A transferência nuclear de células somáticas tem um benefício potencial adicional – estudar doenças humanas herdadas. Células ES que receberam um núcleo somático de um indivíduo com uma disfunção hereditária podem ser usadas para o estudo direto do modo pelo qual a doença se desenvolve uma vez que as células são induzidas a se diferenciarem em tipos celulares distintos. Células ES "específicas para doença" e sua progênie diferenciada também podem ser usadas para estudar a progressão de tais doenças e para testar e desenvolver novos fármacos para tratar as doenças. Essas estratégias ainda estão em desenvolvimento, e alguns países recriminam certos aspectos da pesquisa. Ainda precisa ser estudado se células ES humanas podem ser produzidas por transferência nuclear e se irão satisfazer as grandes esperanças que os cientistas médicos têm nelas.

Linhagens celulares de hibridomas são fábricas que produzem anticorpos monoclonais

Como vimos neste livro, anticorpos são ferramentas particularmente úteis para a biologia celular. A sua grande especificidade permite a visualização precisa de proteínas selecionadas entre as várias milhares que cada célula produz normalmente. Anticorpos frequentemente são produzidos por inoculação de animais com a proteína de interesse e isolamento subsequente de anticorpos específicos para aquela proteína a partir do soro do animal. Entretanto, apenas quantidades limitadas de anticorpos podem ser obtidas de um único animal inoculado, e os anticorpos produzidos serão uma mistura heterogênea de anticorpos que reconhecem uma variedade de sítios antigênicos diferentes em uma macromolécula que difere de animal para animal. Além disso, anticorpos específicos para o antígeno constituirão apenas uma fração dos anticorpos encontrados no soro. Uma tecnologia alternativa, que permite a produção de uma quantidade infinita de anticorpos idênticos e que aumenta muito a especificidade e conveniência dos métodos com base em anticorpos, é a produção de anticorpos monoclonais por linhagens celulares de hibridomas.

Esta tecnologia, desenvolvida em 1975, revolucionou a produção de anticorpos, permitindo sua utilização como ferramentas na biologia celular, assim como no diagnóstico e no tratamento de certas doenças, incluindo artrite reumatoide e câncer. O procedimento requer a tecnologia da célula híbrida (**Figura 8-7**) e envolve a propagação de um clone de células de um único linfócito B secretor de anticorpos para obter uma preparação homogênea de anticorpos em grandes quantidades. Os linfócitos B normalmente têm um tempo de vida limitado em cultura, mas linfócitos B individuais produtores de anticorpos de camundongos ou ratos imunizados, quando fusionados com células derivadas de uma linhagem celular de linfócitos B transformados, podem dar origem a híbridos que têm tanto habilidade de fazer um anticorpo em particular como a habilidade de se multiplicar indefinidamente em cultura. Esses **hibridomas** são propagados como clones individuais, cada um fornecendo uma fonte permanente e estável de um único tipo de **anticorpo monoclonal** (**Figura 8-8**). Cada tipo de anticorpo monoclonal reconhece um tipo único de sítio antigênico – por exemplo, um determinado grupo de cadeias laterais de cinco ou seis aminoácidos na superfície de uma proteína. Sua especificidade uniforme faz com que os anticorpos monoclonais sejam muito mais úteis do que o antisoro convencional para a maioria dos propósitos.

Uma vantagem importante da técnica do hibridoma é que os anticorpos monoclonais podem ser feitos contra moléculas que constituem apenas um componente minoritário de uma mistura complexa. Em um antisoro comum feito contra tal mistura, a proporção de moléculas de anticorpo que reconhece o componente minoritário é muito pequena para ser

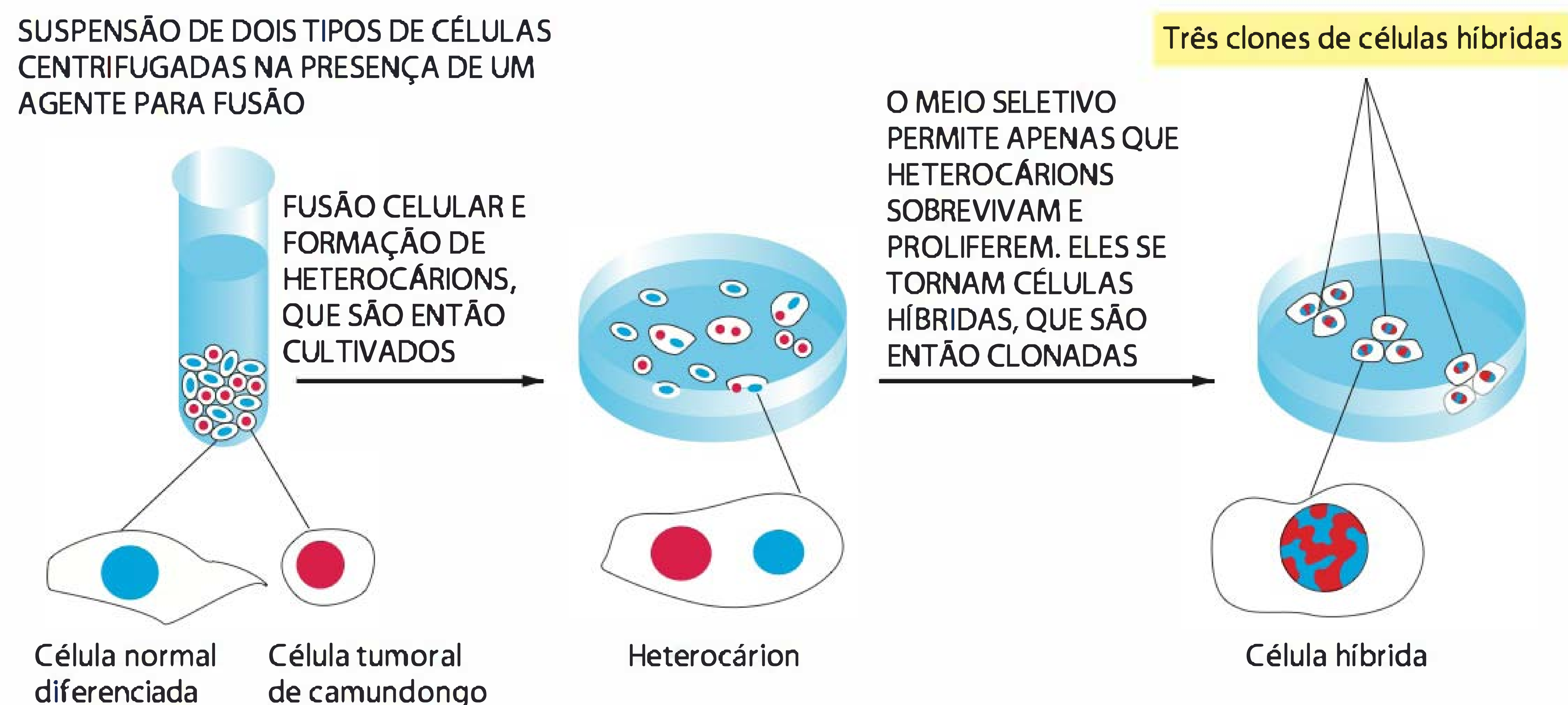


Figura 8-7 Produção de células híbridas. É possível fusionar uma célula com outra para formar um *heterocárion*, uma célula combinada com dois núcleos separados. Normalmente, uma suspensão de células é tratada com certos vírus inativados ou com polietileno glicol, que alteram as membranas plasmáticas das células para induzir sua fusão. Finalmente, um heterocárion entra em mitose e produz uma célula híbrida na qual os dois envelopes nucleares separados foram desestruturados, permitindo que todos os cromossomos sejam unidos em um único grande núcleo. Tais células híbridas podem dar origem a linhagens celulares híbridas imortais. Se uma das células da mãe ou do pai é de uma linhagem celular tumoral, a célula híbrida é chamada de hibridoma.

útil. Contudo, se os linfócitos B que produzem os vários componentes desse antisoro são feitos em hibridomas, torna-se possível rastrear clones de hibridomas individuais a partir de uma grande mistura, para selecionar um que produza o anticorpo monoclonal do tipo desejado e para propagar o hibridoma selecionado indefinidamente de maneira a produzir aquele anticorpo em quantidades ilimitadas. Dessa forma, em princípio, um anticorpo monoclonal pode ser produzido contra qualquer proteína em uma amostra biológica. Uma vez que um anticorpo foi produzido, ele pode ser utilizado para localizar uma proteína em células e tecidos, para seguir seu movimento e para purificar a proteína com o objetivo de estudar sua estrutura e função.

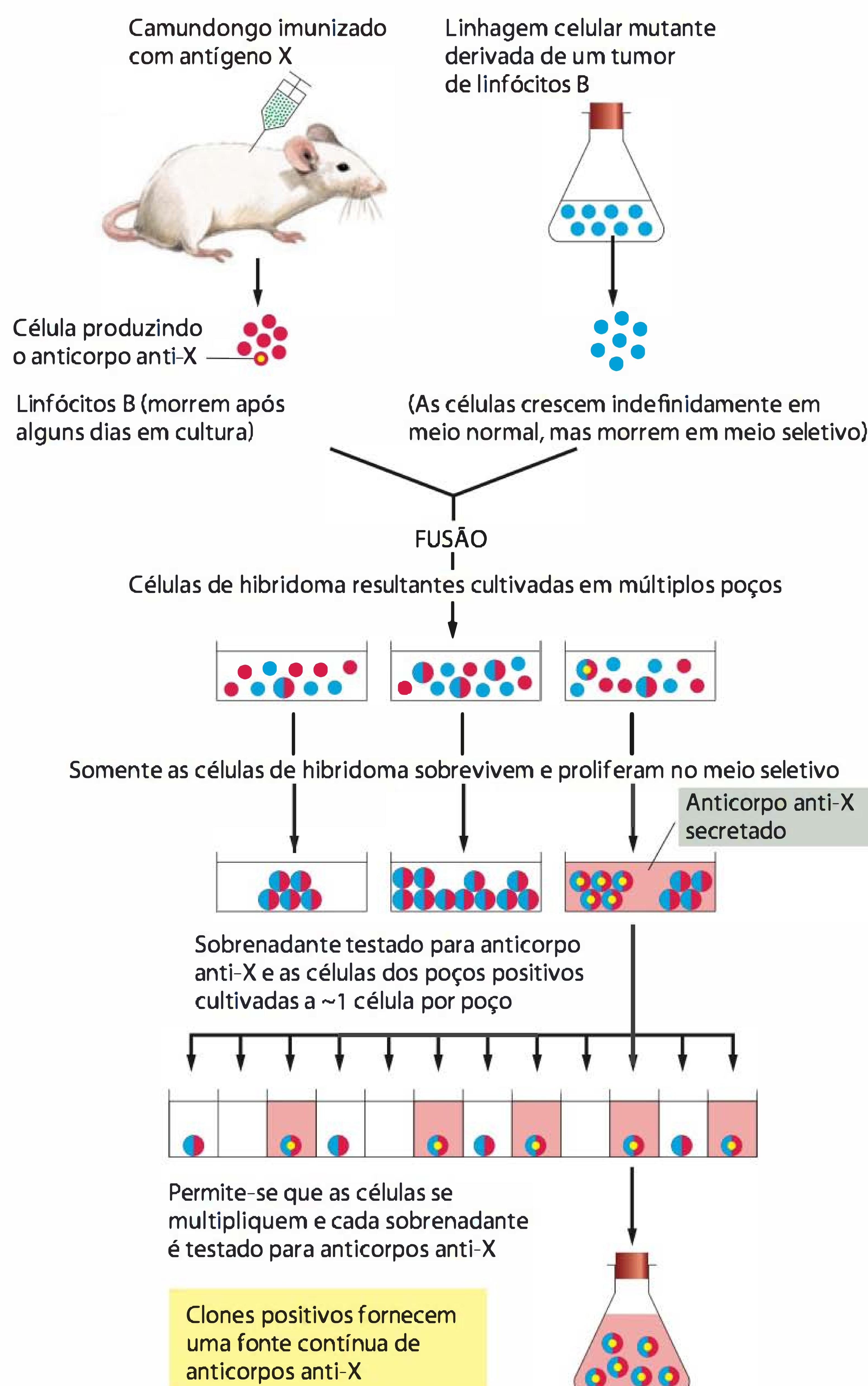


Figura 8-8 Preparação de hibridomas que secretam anticorpos monoclonais contra um antígeno em particular. Aqui o antígeno de interesse foi designado como "antígeno X". O meio de crescimento seletivo utilizado após a etapa de fusão celular contém um inibidor (aminopterina) que bloqueia as vias normais de biossíntese por meio das quais os nucleotídeos são produzidos. As células devem então utilizar uma via alternativa para sintetizar seus ácidos nucleicos. Essa via é defectiva na linhagem celular mutante derivada do tumor de célula B, mas está intacta nas células normais obtidas dos camundongos imunizados. Como nenhum tipo de célula utilizada para a fusão inicial pode sobreviver e proliferar por si só, apenas as células do hibridoma o fazem.

Resumo

Tecidos podem ser dissociados em suas células componentes, das quais tipos individuais de células podem ser purificados e utilizados para análise bioquímica ou para o estabelecimento de culturas de células. Várias células animais e vegetais sobrevivem e proliferam em uma garrafa de cultura se forem providas com um meio de cultura adequado contendo nutrientes e moléculas sinalizadoras apropriadas. Embora a maioria das células animais pare de se dividir após um número finito de divisões celulares, as células que foram imortalizadas por mutações espontâneas ou manipulação genética podem ser mantidas indefinidamente como linhagens celulares. Células-tronco embrionárias podem proliferar indefinidamente em uma placa de cultura, enquanto retêm a capacidade de se diferenciarem em todos os diferentes tipos de células do organismo. Portanto, elas são de grande esperança para a medicina. Células de hibridomas são amplamente utilizadas para produzir quantidades ilimitadas de anticorpos monoclonais uniformes, utilizados para detectar e purificar proteínas celulares, assim como no diagnóstico e no tratamento de doenças.

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O desafio de isolar um único tipo de proteína a partir de milhares de outras proteínas presentes em uma célula é formidável, mas deve ser ultrapassado pelo estudo da função das proteínas *in vivo*. Como veremos mais adiante neste capítulo, a *tecnologia do DNA recombinante* pode simplificar muito a tarefa de "enganar" as células para a produção de grandes quantidades de uma certa proteína, tornando sua purificação muito mais fácil. Independentemente de a fonte da proteína ser uma célula modificada ou um tecido normal, o procedimento de purificação normalmente inicia com o fracionamento subcelular para reduzir a complexidade do material, sendo então seguido pelos passos de purificação com especificidade cada vez maior.

Células podem ser separadas em suas frações componentes

Para se purificar uma proteína, ela precisa primeiro ser extraída de dentro da célula. As células podem ser rompidas de várias maneiras: podem ser submetidas ao choque osmótico ou à vibração ultrassônica, forçadas a atravessar um pequeno orifício ou maceradas em um liquidificador. Esses procedimentos rompem várias das membranas da célula (incluindo a membrana plasmática e o retículo endoplasmático) em fragmentos que imediatamente se unem para formar pequenas vesículas fechadas. Se aplicados com cuidado, entretanto, os procedimentos de ruptura deixam organelas como o núcleo, a mitocôndria, o aparelho de Golgi, os lisossomos e os peroxissomos intactas. A suspensão de células é desse modo reduzida a um caldo grosso (chamado de *homogenato* ou *extrato*) que contém uma variedade de organelas envolvidas por membranas, cada qual com tamanho, carga e densidade distintos. Uma vez que o meio de homogenização tenha sido escolhido com cuidado (por tentativa e erro para cada organela), os vários componentes – incluindo as vesículas derivadas do retículo endoplasmático, chamadas de microssomos – retêm a maioria das suas propriedades bioquímicas originais.

Os diferentes componentes do homogenato devem então ser separados. Tais fracionamentos celulares tornaram-se possíveis somente após o desenvolvimento comercial, no início dos anos de 1940, de um instrumento chamado de *ultracentrífuga preparativa*, que centrifuga extratos de células rompidas em altas velocidades (**Figura 8-9**). Esse tratamento separa os componentes celulares por tamanho e densidade: em geral, as unidades maiores experimentam as forças centrífugas maiores e se movem mais rapidamente. A uma velocidade relativamente baixa, componentes grandes, como núcleos, se depositam no fundo do tubo da centrífuga; a uma velocidade levemente mais alta, um sedimento de mitocôndrias é depositado; a velocidades ainda mais altas e com períodos mais longos de centrifugação, primeiro as vesículas pequenas fechadas e depois os ribossomos podem ser coletados (**Figura 8-10**). Todas essas frações são impuras, mas vários dos contaminantes podem ser removidos ressuspendendo-se o sedimento e repetindo-se o procedimento de centrifugação várias vezes.

A centrifugação é a primeira etapa na maioria dos fracionamentos, mas ela separa apenas os componentes que diferem muito em tamanho. Um grau mais refinado de separação pode ser alcançado colocando-se o homogenato, de maneira que forme uma fina camada,

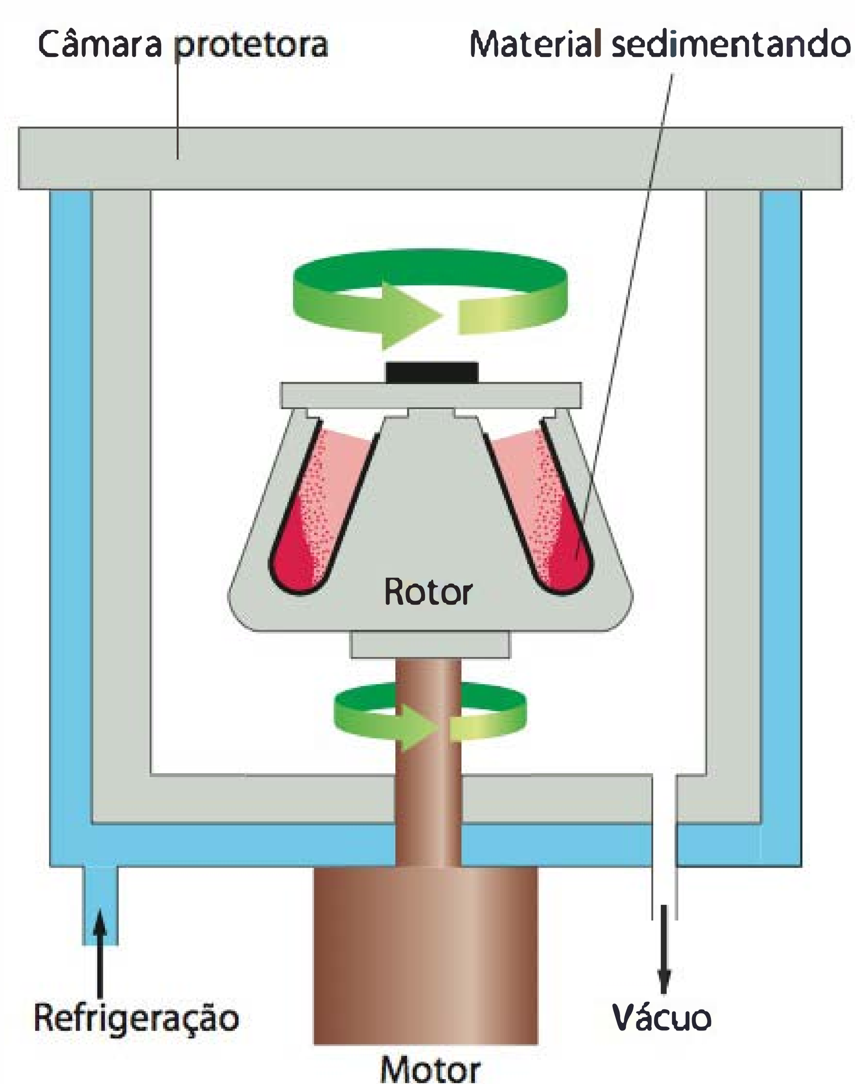


Figura 8-9 Ultracentrífuga preparativa. A amostra é colocada em tubos que são colocados em um anel de orifícios cilíndricos em um *rotor* de metal. A rápida rotação do rotor gera uma força centrífuga enorme, que faz com que as partículas da amostra sedimentem. O vácuo reduz a fricção, prevenindo o aquecimento do rotor e permitindo que o sistema de refrigeração mantenha a amostra a 4°C.

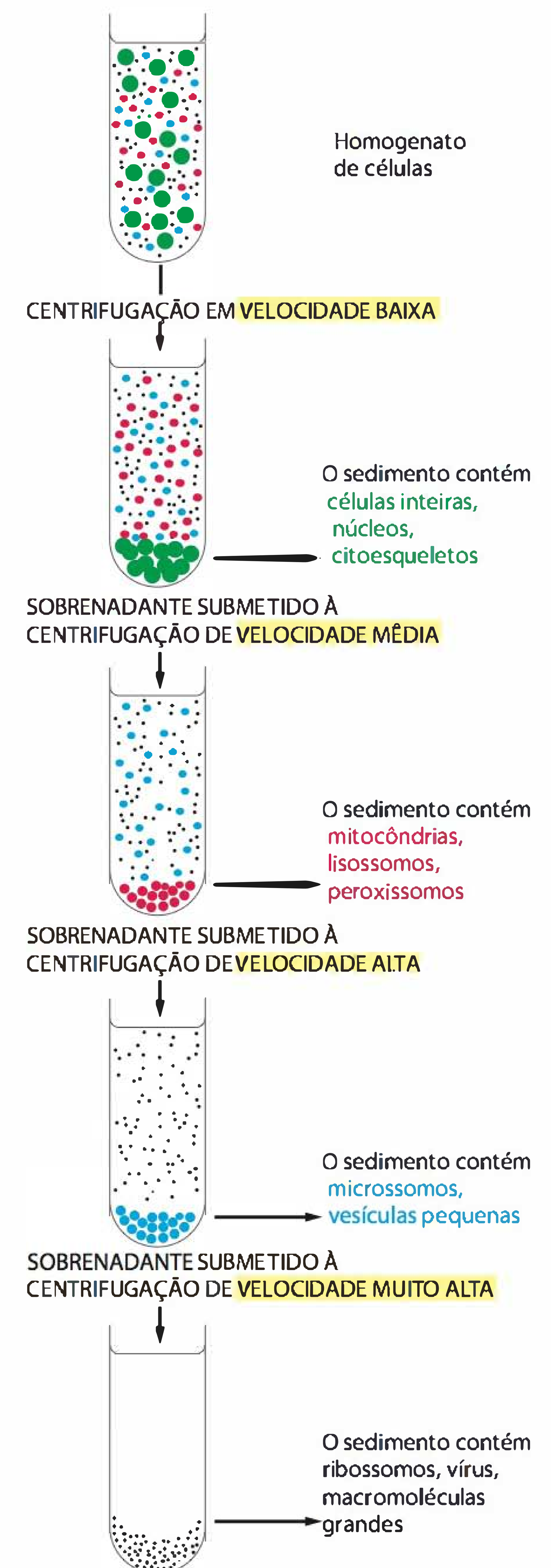


Figura 8-10 Fracionamento celular por centrifugação. A centrifugação repetida a velocidades progressivamente mais altas irá fracionar homogenatos de células em seus componentes. Em geral, quanto menor o componente subcelular, maior é a força centrífuga necessária para sedimentá-lo. Valores típicos para as várias etapas de centrifugação referidos na figura são:
Velocidade baixa: 1.000 vezes a gravidade por 10 minutos.
Velocidade média: 20.000 vezes a gravidade por 20 minutos.
Velocidade alta: 80.000 vezes a gravidade por 1 hora.
Velocidade muito alta: 150.000 vezes a gravidade por 3 horas.

no topo de uma solução salina diluída que encha um tubo de centrífuga. Quando centrifugados, os vários componentes na mistura movem-se como uma série de bandas distintas pela solução salina, cada uma em uma velocidade diferente, em um processo chamado de *sedimentação por velocidade* (**Figura 8-11**A). Para que o procedimento funcione efetivamente, as bandas devem ser protegidas de serem misturadas por convecção, o que normalmente ocorre quando uma solução mais densa (p. ex., uma solução contendo organelas) é colocada no topo de uma solução menos densa (uma solução salina). Isto é conseguido preenchendo-se o tubo de centrífuga com um gradiente de sacarose preparado por um misturador especial. O gradiente de densidade resultante – com a parte mais densa no fundo do tubo – mantém cada região da solução salina mais densa do que qualquer solução acima dela, prevenindo assim que uma mistura por convecção distorça a separação.

Quando sedimentados por tais gradientes diluídos de sacarose, os diferentes componentes celulares separam-se em bandas distintas que podem ser coletadas individualmente. A velocidade relativa na qual cada componente sedimenta depende primariamente de seu tamanho e forma – sendo normalmente descrita em termos do seu coeficiente de sedimentação, ou valor S. As centrífugas atuais rodam a velocidades de até 80.000 rpm e produzem forças tão altas quanto 500.000 vezes a da gravidade. Esta enorme força dirige até mesmo moléculas pequenas, como moléculas de RNA transportador (tRNA) e simples enzimas, a sedimentar a uma velocidade apreciável, e permite que essas moléculas sejam separadas umas das outras pelo tamanho.

A ultracentrífuga também é utilizada para separar componentes celulares com base em sua densidade de flutuação, independentemente de seu tamanho e forma. Nesse caso, a amostra é sedimentada por um gradiente de densidade que contém uma concentração muito alta de sacarose ou de cloreto de césio. Cada componente celular começa a descer pelo gradiente, como na Figura 8-11A, mas finalmente alcança uma posição em que a densidade da solução é igual a sua própria densidade. Nesse ponto, o componente flutua e não pode mais se mover adiante. Uma série de bandas distintas é então produzida no tubo de centrífuga, com as bandas mais próximas do fundo do tubo contendo componentes de maior densidade de flutuação (Figura 8-11B). Esse método, chamado de *sedimentação por equilíbrio*, é tão sensível que é capaz de separar macromoléculas que incorporaram isótopos pesados, como ^{13}C ou ^{15}N, das mesmas moléculas que contêm isótopos comuns mais leves (^{12}C ou ^{14}N). De fato, o método cloreto de césio foi desenvolvido, em 1957, para separar o DNA marcado do não-marcado após a exposição de uma população de bactérias em crescimento a nucleotídeos precursores contendo ^{15}N; esse experimento clássico proporcionou a evidência direta para a replicação semiconservativa do DNA (ver Figura 5-5).

Extratos celulares provêm sistemas acessíveis para o estudo da função das células

O estudo de organelas e outros componentes subcelulares grandes isolados na ultracentrífuga contribuiu muito para o nosso entendimento da função dos diferentes componentes celulares. Experimentos com mitocôndrias e cloroplastos purificados por centrifugação, por exemplo, demonstraram a função central dessas organelas de converter energia em formas que a célula possa utilizar. Similarmente, vesículas soltas, formadas a partir de fragmentos dos retículos endoplasmáticos rugoso e liso (microssomos), têm sido separadas umas das outras e analisadas como modelos funcionais desses compartimentos da célula intacta.

Similarmente, extratos celulares muito concentrados, especialmente extratos de oócitos de *Xenopus laevis* (rã africana), têm tido um papel crítico no estudo de processos muito

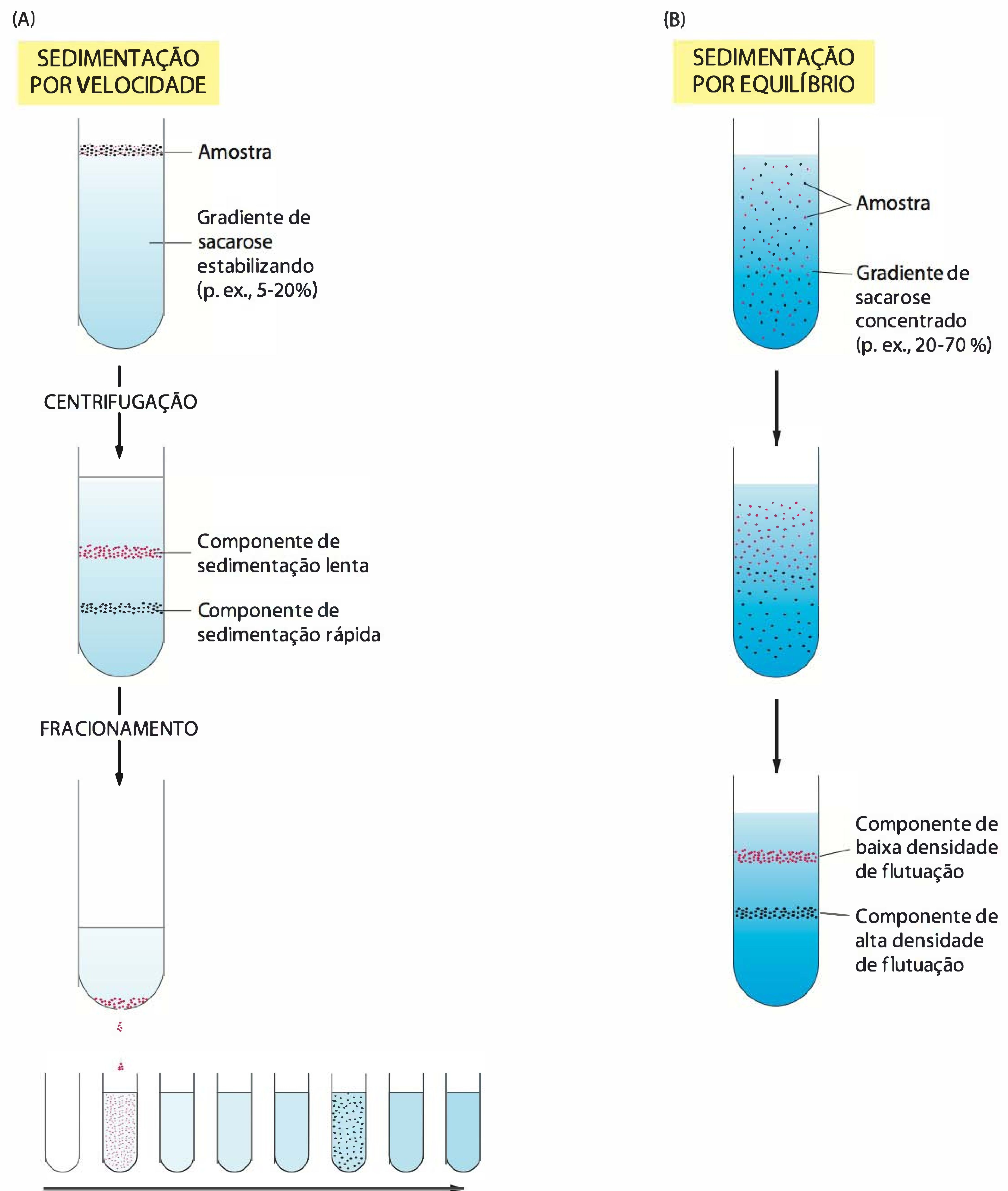


Figura 8-11 Comparação entre a velocidade de sedimentação e o equilíbrio de sedimentação. (A) Na sedimentação por velocidade, os componentes subcelulares sedimentam a velocidades diferentes, de acordo com seu tamanho e forma, quando colocados sobre uma solução diluída contendo sacarose. Para estabilizar as bandas de sedimentação, contra uma mistura por convecção causada pelas pequenas diferenças na temperatura ou na concentração do soluto, o tubo contém um gradiente contínuo de sacarose que aumenta de concentração em direção ao fundo do tubo (normalmente de 5 a 20% de sacarose). Após a centrifugação, os diferentes componentes podem ser coletados individualmente, simplesmente furando-se o tubo plástico de centrífuga e coletando-se as gotas do fundo, como ilustrado aqui. (B) Na sedimentação por equilíbrio, os componentes subcelulares movem-se para cima e para baixo, quando centrifugados em um gradiente, até alcançarem uma posição onde sua densidade se iguala à do meio. Embora um gradiente de sacarose seja mostrado aqui, gradientes mais densos, que são muito úteis para separar proteínas e ácidos nucleicos, podem ser formados com cloreto de césio. As bandas resultantes, em equilíbrio, podem ser coletadas como em (A).

complexos e organizados como o ciclo de divisão celular, a separação dos cromossomos no fuso mitótico e as etapas de transporte vesicular envolvidas no movimento de proteínas do retículo endoplasmático pelo aparelho de Golgi até a membrana plasmática.

Extratos celulares também fornecem, em princípio, o material inicial para a separação completa de todos os componentes macromoleculares individuais da célula. Agora consideramos como essa separação é alcançada, dando enfoque às proteínas.

Proteínas podem ser separadas por cromatografia

Proteínas frequentemente são fracionadas por **cromatografia em colunas**, na qual uma mistura de proteínas em solução é passada através de uma coluna contendo uma matriz sólida porosa. As diferentes proteínas são retardadas diferencialmente pela sua interação com a matriz, e podem ser coletadas separadamente à medida que saem na parte inferior da coluna (**Figura 8-12**). Dependendo da escolha da matriz, as proteínas podem ser separadas de acordo com sua carga (*cromatografia de troca iônica*), sua hidrofobicidade (*cromatografia hidrofóbica*), seu tamanho (*cromatografia de filtração em gel*) ou sua habilidade de se ligar a pequenas moléculas em particular ou a outras macromoléculas (*cromatografia de afinidade*).

Vários tipos de matrizes estão disponíveis comercialmente (**Figura 8-13**). Colunas de troca iônica são empacotadas com pequenas esferas que carregam uma carga positiva ou uma carga negativa, de maneira que as proteínas são fracionadas de acordo com o arranjo das cargas na sua superfície. As colunas hidrofóbicas são empacotadas com esferas das

quais as cadeias laterais hidrofóbicas se salientam, retardando de forma seletiva proteínas com regiões hidrofóbicas expostas. Colunas de filtração em gel, que separam as proteínas de acordo com o seu tamanho, são empacotadas com esferas porosas ínfimas: moléculas que são suficientemente pequenas para entrar nos poros arrastam-se lentamente por dentro de sucessivas esferas à medida que descem pela coluna, enquanto que moléculas maiores permanecem em solução movendo-se entre as esferas e, dessa maneira, movendo-se mais rápido e saindo da coluna primeiro. Além de constituir um método de separação de moléculas, a cromatografia por filtração em gel é um meio conveniente para determinar o seu tamanho.

A não-homogenidade nas matrizes (como a celulose), que propicia um fluxo irregular do solvente através da coluna, limita a resolução da coluna de cromatografia convencional. Resinas cromatográficas especiais (normalmente com base em sílica) compostas de esferas ínfimas (3 a 10 μm de diâmetro) podem ser empacotadas com um aparelho especial para formar uma coluna uniforme. Tais colunas de **cromatografia líquida de alta performance** (**HPLC**, *high-performance liquid chromatography*) possuem um alto grau de resolução. Na HPLC, os solutos se equilibram muito rápido com o interior das pequenas esferas, e assim, solutos com diferentes afinidades pela matriz são separados eficientemente uns dos outros mesmo a fluxos muito rápidos. HPLC é, portanto, o método de escolha para separar várias proteínas e pequenas moléculas.

A cromatografia de afinidade explora sítios de ligação específicos nas proteínas

Se começarmos com uma mistura complexa de proteínas, os tipos de cromatografia em coluna recém-discutidos não produzem frações altamente purificadas: uma simples passagem através da coluna geralmente aumenta a proporção de uma dada proteína na mistura não mais do que vinte vezes. Como a maioria das proteínas individuais representa menos de 1/1.000 das proteínas celulares totais, normalmente é necessário utilizar vários tipos diferentes de colunas em sucessão para alcançar uma pureza suficiente (**Figura 8-14**). Um procedimento mais eficiente, conhecido como **cromatografia de afinidade**, aproveita as interações de ligações biologicamente importantes que ocorrem na superfície das proteínas. Se uma molécula de substrato é covalentemente ligada a uma matriz inerte como uma esfera de polissacarídeo, a enzima que funciona nesse substrato será retida especificamente pela matriz e pode então ser

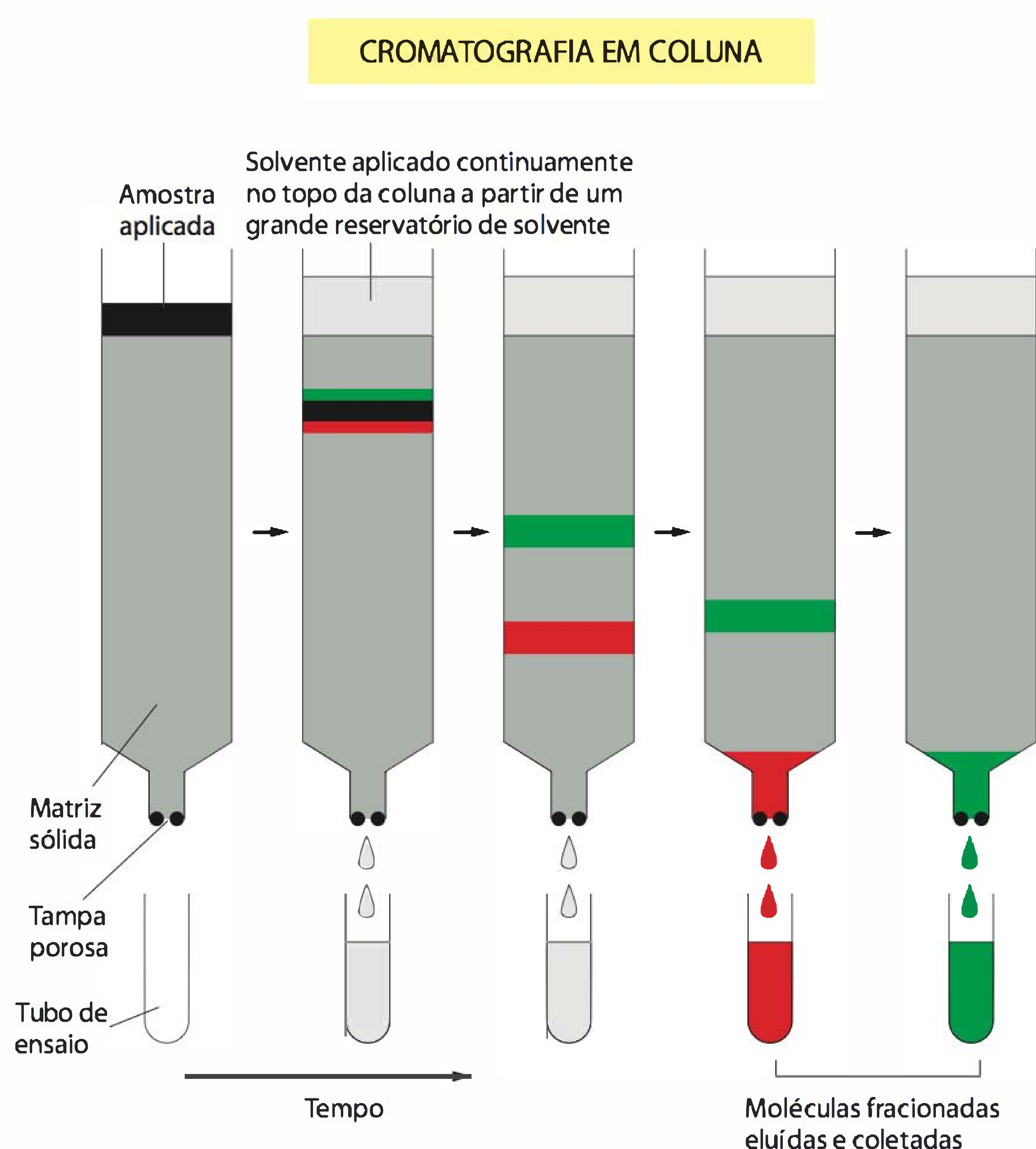


Figura 8-12 Separação de moléculas por cromatografia em coluna. A amostra, uma solução contendo uma mistura de diferentes moléculas, é aplicada no topo de uma coluna cilíndrica de vidro ou plástico cheia de uma matriz sólida permeável, como celulose. Uma quantidade grande de solvente é então bombeada lentamente através da coluna e coletada em tubos separados à medida que emerge na parte inferior da coluna. Como vários componentes da amostra passam pela coluna em diferentes velocidades, eles são fracionados em diferentes tubos.

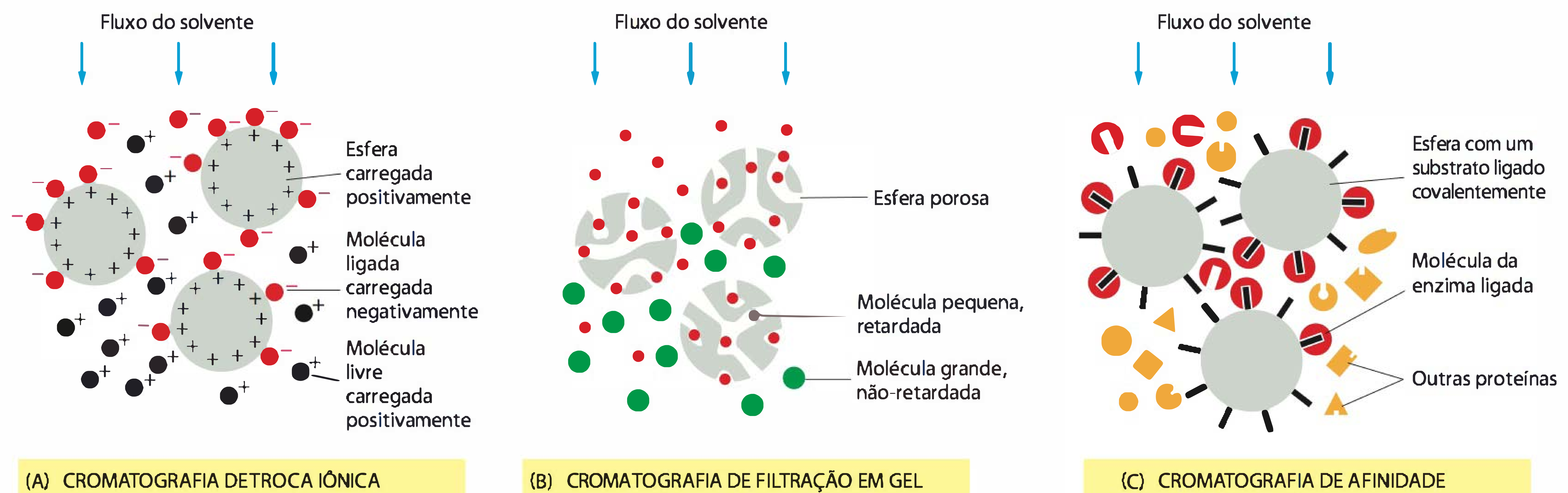


Figura 8-13 Três tipos de matrizes utilizadas para cromatografia. (A) Na cromatografia de troca iônica, a matriz insolúvel carrega cargas iônicas que retardam o movimento das moléculas de carga oposta. As matrizes utilizadas para separar proteínas incluem dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose), que é carregada positivamente, e carboximetilcelulose (CM-celulose) e fosfocelulose, que são carregadas negativamente. Matrizes análogas com base em agarose ou outros polímeros também são utilizadas com frequência. A força da associação entre as moléculas dissolvidas e a matriz para troca iônica depende tanto da força iônica quanto do pH da solução que está passando pela coluna, que pode, portanto, ser variada sistematicamente (como na Figura 8-14) para alcançar uma separação efetiva. (B) Na cromatografia de filtração em gel, a matriz é inerte, mas porosa. Moléculas que são suficientemente pequenas para penetrar a matriz retardam e viajam mais lentamente através da coluna do que moléculas maiores que não podem penetrar. Esferas de polissacarídeos com ligação cruzada (dextran, agarose ou acrilamida) estão disponíveis comercialmente em uma ampla variedade de tamanho de poros, sendo adequadas para o fracionamento de moléculas de várias massas moleculares, a partir de menos de 500 dáltons até mais de 5×10^6 dáltons. (C) A cromatografia de afinidade utiliza uma matriz insolúvel covalentemente ligada a um ligante específico, como uma molécula de anticorpo ou um substrato de uma enzima, que irá ligar uma proteína específica. Moléculas de enzimas que se ligam a substratos imobilizados em tais colunas podem ser eluídas com uma solução concentrada da forma livre da molécula do substrato, enquanto moléculas que se ligam a anticorpos imobilizados podem ser eluídas dissociando-se o complexo antígeno-anticorpo com soluções concentradas de sais ou soluções com pH alto ou baixo. Altos graus de purificação frequentemente são alcançados em um único passo por uma coluna de afinidade.

eluída (lavada) próximo a sua forma pura. Do mesmo modo, oligonucleotídeos pequenos de DNA de uma sequência especificamente desenhada podem ser imobilizados dessa maneira e utilizados para purificar proteínas que se ligam ao DNA, as quais normalmente reconhecem essa sequência de nucleotídeos nos cromossomos (ver Figura 7-28). Alternativamente, anticorpos específicos podem ser acoplados à matriz para purificar moléculas proteicas reconhecidas pelos anticorpos. Pela alta especificidade de todas essas colunas de afinidade, purificações de 1.000 a 10.000 vezes às vezes podem ser alcançadas em um único passo.

Alvos geneticamente modificados fornecem uma maneira fácil de purificar proteínas

Pela utilização dos métodos de DNA recombinante discutidos nas seções subsequentes, qualquer gene pode ser modificado para produzir sua proteína com um marcador de reconhecimento especial ligado a ele, para fazer a subsequente purificação da proteína por cromatografia de afinidade de forma simples e rápida. Muitas vezes o próprio marcador de reconhecimento é um determinante antigênico, ou *epítopo*, que pode ser reconhecido por um anticorpo muito específico. O anticorpo pode então ser utilizado tanto para localizar a proteína nas células como para purificá-la (**Figura 8-15**). Outros tipos de marcadores são especialmente projetados para purificação de proteínas. Por exemplo, o aminoácido histidina se liga a certos íons de metal, incluindo níquel e cobre. Se técnicas de engenharia genética são utilizadas para ligar uma cauda curta de histidinas em uma extremidade da proteína, a proteína levemente modificada pode ser retida seletivamente em uma coluna de afinidade contendo íons de níquel imobilizados. A cromatografia de afinidade por metal pode, desse modo, ser utilizada para purificar essa proteína modificada a partir de uma mistura molecular complexa.

Em outros casos, uma proteína inteira é utilizada como marcador de reconhecimento. Quando células são modificadas para sintetizar a pequena enzima glutationa-*S*-transferase (GST) ligada a uma proteína de interesse, a **proteína de fusão** resultante pode ser purificada a partir de outros conteúdos da célula com uma coluna de afinidade contendo glutationa, uma molécula de substrato que se liga especificamente e de modo forte à GST. Se a purifica-

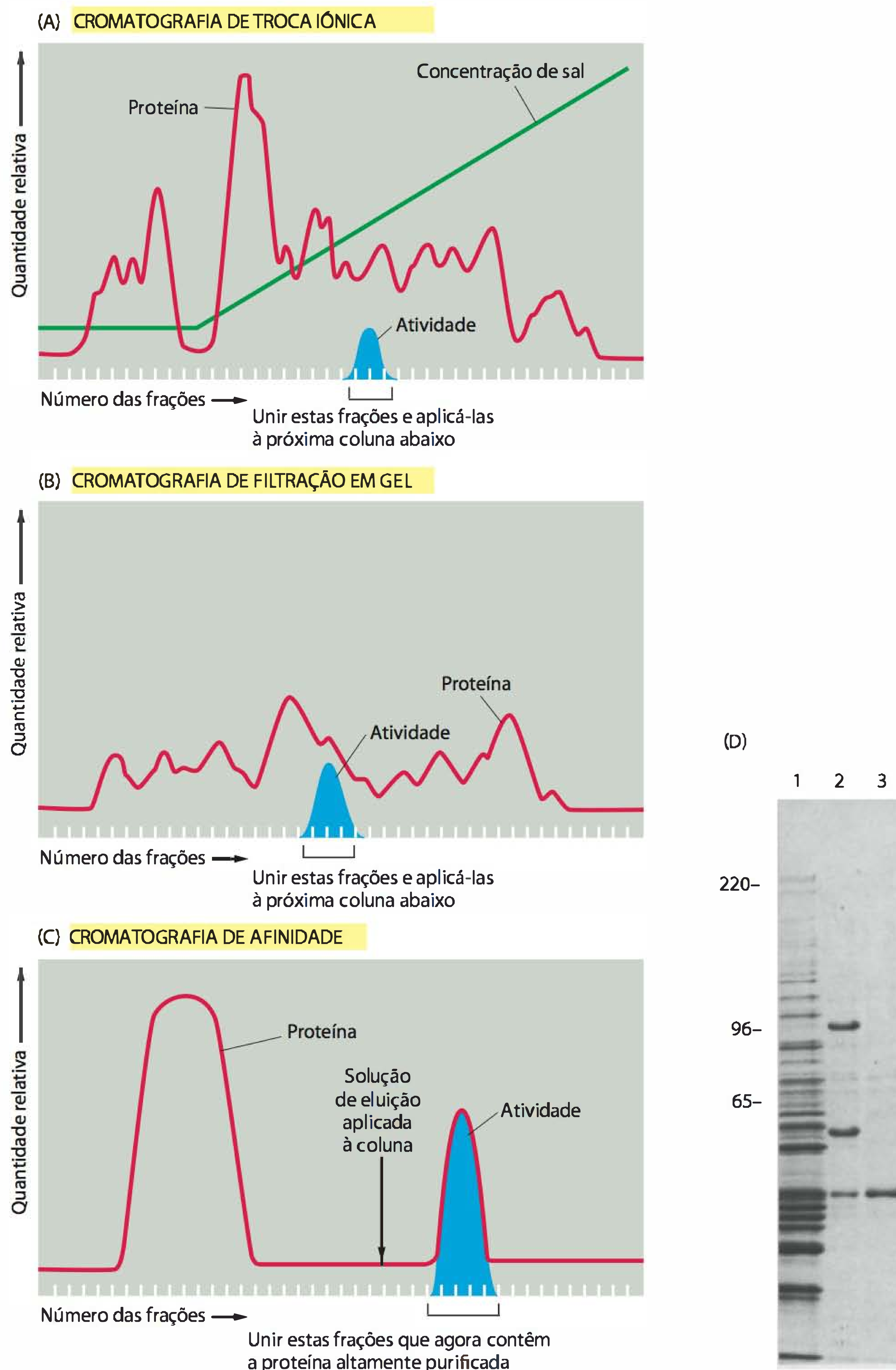


Figura 8-14 Purificação de proteínas por cromatografia. Resultados típicos obtidos quando três etapas cromatográficas diferentes são utilizadas em sucessão para purificar uma proteína. Neste exemplo, um homogenato de células primeiro foi fracionado permitindo-se sua passagem por uma resina de troca iônica empacotada em uma coluna (A). A coluna foi lavada para remover todos os contaminantes não-ligados, e as proteínas ligadas foram então eluídas aplicando-se uma solução, contendo uma concentração de sal que aumenta gradualmente, no topo da coluna. Proteínas com menor afinidade pela resina de troca iônica passaram diretamente pela coluna e foram coletadas nas primeiras frações eluídas na parte inferior da coluna. As proteínas remanescentes foram eluídas em sequência, de acordo com sua afinidade pela resina – aquelas proteínas que se ligam mais fortemente à resina requerendo concentrações mais altas de sal para serem removidas. A proteína de interesse foi eluída em várias frações e detectada pela sua atividade enzimática. As frações com atividade foram selecionadas e então aplicadas em uma segunda coluna, uma coluna de filtração em gel (B). A posição de eluição da proteína ainda impura foi determinada novamente pela sua atividade enzimática, e as frações ativas foram selecionadas e purificadas à homogenidade em uma coluna de afinidade (C) que continha o substrato da enzima imobilizado. (D) Purificação por afinidade de proteínas de *S. cerevisiae* que se ligam à ciclina, como analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, descrita a seguir na Figura 8-18. A canaleta 1 é um extrato total de células; a canaleta 2 mostra as proteínas eluídas da coluna de afinidade contendo ciclina B2; a canaleta 3 mostra uma proteína majoritária eluída de uma coluna de afinidade com ciclina B3. As proteínas nas canaletas 2 e 3 foram eluídas das colunas de afinidade com sal, e os géis foram corados com azul de Coomassie. A escala na esquerda mostra as massas moleculares de proteínas marcadoras, em quilodáltons. (D, de D. Kellogg et al., *J. Cell Biol.* 130:675-685, 1995. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

ção é realizada sob condições que não rompem as interações entre as proteínas, a proteína de fusão pode ser isolada em associação com as proteínas com as quais ela interage dentro da célula (**Figura 8-16**).

Como um refinamento adicional dos métodos de purificação que utilizam marcadores de reconhecimento, uma sequência de aminoácidos que forma um sítio de clivagem para uma enzima proteolítica altamente específica pode ser colocada entre a proteína de escolha e o marcador de reconhecimento. Como as sequências de aminoácidos no sítio de clivagem raramente são encontradas por acaso nas proteínas, o marcador pode ser removido mais tarde sem destruir a proteína purificada.

Esse tipo de clivagem específica é utilizado em uma metodologia de purificação especialmente potente conhecida como marcação para purificação por afinidade em sequência (*tap-tagging*, de *tandem affinity purification tagging*). Aqui, uma extremidade da proteína é modificada para conter dois marcadores de reconhecimento separados por um sítio de clivagem de protease. O marcador da extremidade da construção é escolhido para se ligar de forma irreversível a uma coluna de afinidade, permitindo que a coluna seja lavada extensivamente para remover todas as proteínas contaminantes. A clivagem de protease libera a proteína, que então é purificada usando o segundo marcador. Como essa estratégia de duas

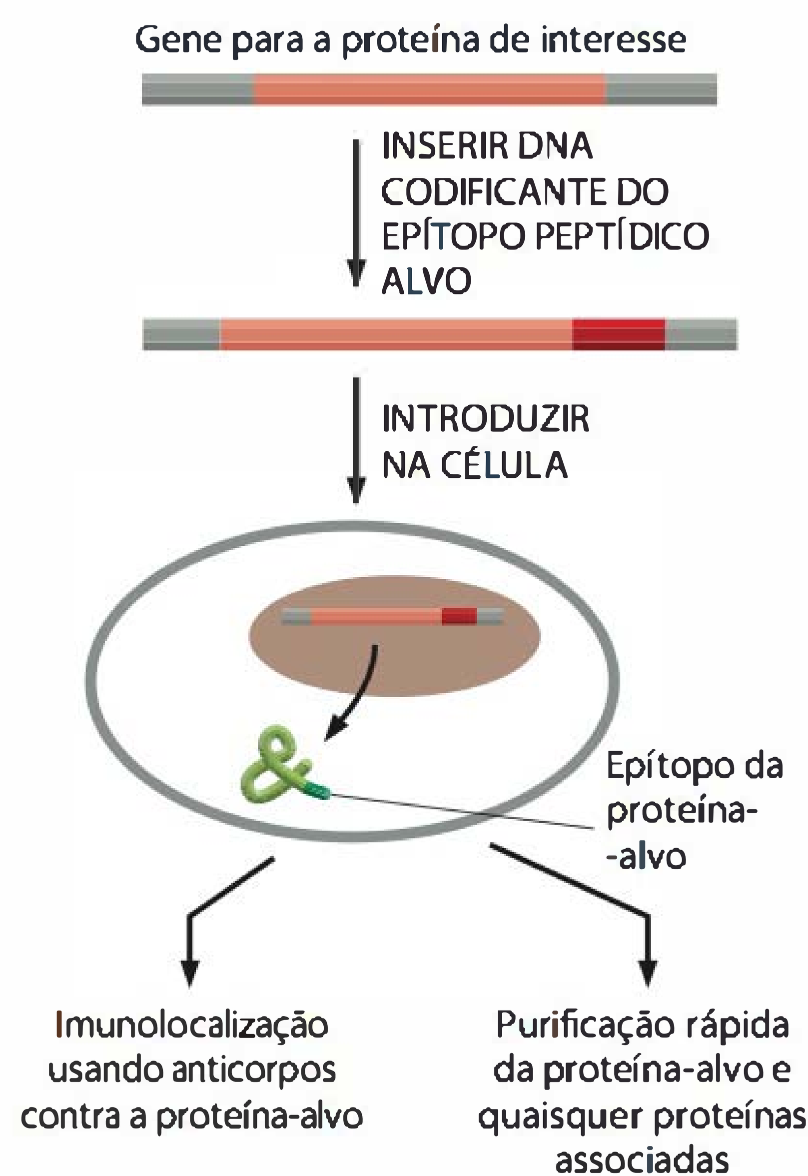


Figura 8-15 Marcação de epítopos para localização ou purificação de proteínas. Utilizando técnicas de engenharia genética convencionais, um marcador peptídico curto pode ser adicionado a uma proteína de interesse. Se o próprio marcador é um determinante antigênico, ou *epítopo*, ele pode ser alvo de um anticorpo apropriado disponível comercialmente. O anticorpo, marcado de forma adequada, pode ser usado para determinar a localização da proteína nas células ou para purificá-la por imunoprecipitação ou cromatografia de afinidade. Na imunoprecipitação, os anticorpos contra o marcador epítopo são adicionados a uma solução contendo a proteína-alvo; os anticorpos se ligam especificamente às moléculas de proteína-alvo e precipitam-na na solução à medida que as proteínas formam complexos com o anticorpo.

etapas fornece um grau especialmente alto de purificação com um esforço relativamente pequeno, ela é muito utilizada em biologia celular. Assim, por exemplo, um grupo de aproximadamente 6.000 cepas de leveduras, cada uma com um gene diferente fusionado ao DNA que codifica um *tap-tag*, foi construído para permitir que qualquer proteína de levedura seja purificada rapidamente.

Sistemas livres de células purificados são necessários à dissecação precisa das funções moleculares

É importante estudar processos biológicos livres de todas as reações laterais complexas que ocorrem em uma célula viva utilizando **sistemas livres de células purificados.** Para tornar isso possível, homogenatos de células são fracionados com a finalidade de purificar cada uma das macromoléculas individuais necessárias para catalisar o processo biológico de interesse. Por exemplo, os experimentos para decifrar o mecanismo de síntese proteica iniciaram com um homogenato de células que podia traduzir moléculas de RNA para produzir proteínas. O fracionamento desse homogenato, etapa por etapa, produziu por sua vez os ribossomos, os tRNAs e várias enzimas que juntas constituem a maquinaria de síntese proteica. Uma vez que os componentes individuais puros estão disponíveis, cada um pode ser adicionado ou retirado separadamente para definir seu papel exato no processo como um todo.

O principal objetivo dos biólogos celulares é a reconstituição de cada processo biológico em um sistema livre de células purificado. Apenas dessa maneira todos os componentes necessários para o processo podem ser definidos e pode-se controlar suas concentrações, como necessário para descobrir seus mecanismos de ação precisos. Embora muito ainda precise ser feito, uma grande parte do que conhecemos atualmente sobre a biologia molecular das células foi descoberta por estudos em tais sistemas livres de células. Esses sistemas têm sido utilizados, por exemplo, para decifrar os detalhes moleculares da replicação do DNA e da transcrição do DNA, do *splicing* do RNA, da tradução de proteínas, da contração muscular, do transporte de partículas ao longo dos microtúbulos e de vários outros processos que ocorrem nas células.

Resumo

Populações de células podem ser analisadas bioquimicamente rompendo-as e fracionando seu conteúdo, permitindo que sistemas funcionais livres de células sejam desenvolvidos. Sistemas livres de células purificados são necessários para determinar os detalhes moleculares de processos celulares complexos, que requerem uma purificação extensiva de todas as proteínas e outros componentes envolvidos. As proteínas nos extratos celulares solúveis podem ser purificadas por colunas de croma-

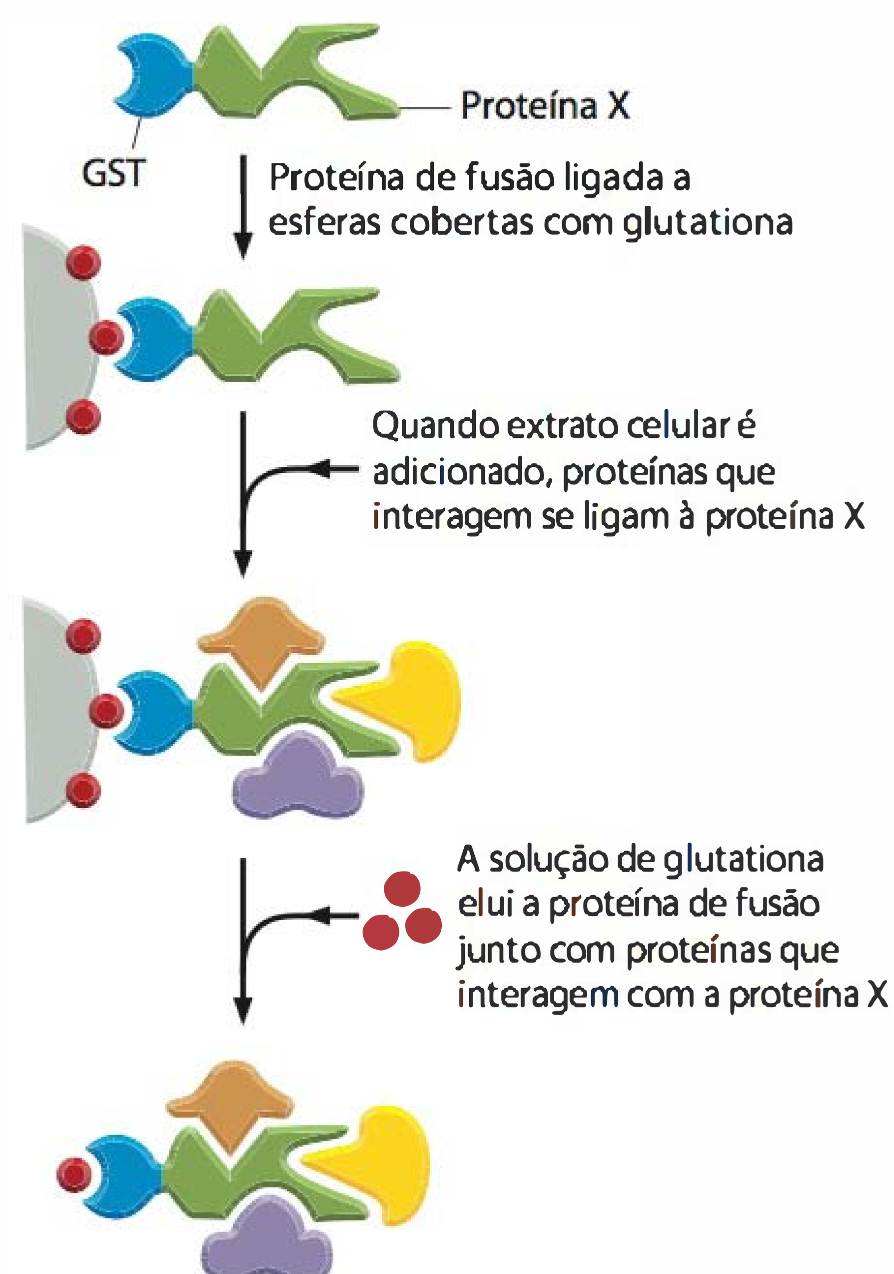


Figura 8-16 Purificação de complexos proteicos utilizando uma proteína de fusão marcada com GST. Proteínas de fusão com GST, produzidas em células por técnicas de DNA recombinante, podem ser capturadas em uma coluna de afinidade contendo esferas cobertas com glutationa. Proteínas que não se ligaram às esferas são lavadas. A proteína de fusão junto com outras proteínas na célula que estão fortemente ligadas a ela podem então ser eluídas com glutationa. As identidades dessas proteínas adicionais podem ser determinadas por espectrometria de massa (ver Figura 8-21). Colunas de afinidade também podem ser montadas para conter anticorpos contra GST ou outras pequenas proteínas ou epítopos-alvo convenientes (ver Figura 8-15).

tografia; dependendo do tipo de matriz da coluna, proteínas biologicamente ativas podem ser separadas com base em sua massa molecular, hidrofobicidade, características de carga ou afinidade por outras moléculas. Em uma purificação típica, a amostra é passada por várias colunas diferentes por vez – as frações enriquecidas obtidas de uma coluna são aplicadas na próxima. Técnicas de DNA recombinante, a serem descritas mais adiante, permitem que marcadores de reconhecimento especiais sejam ligados a proteínas, simplificando bastante sua purificação.

ANÁLISE DE PROTEÍNAS

As proteínas realizam a maioria dos processos nas células: elas catalisam reações metabólicas, utilizam a hidrólise de nucleotídeos para realizar o trabalho mecânico e servem como elementos estruturais majoritários das células. Uma grande variedade de estruturas e funções proteicas estimulou o desenvolvimento de um grande número de técnicas para estudá-las.

As proteínas podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

As proteínas normalmente possuem uma carga positiva ou negativa, dependendo da mistura de aminoácidos carregados que elas contêm. Um campo elétrico aplicado a uma solução que contém uma molécula proteica faz com que a proteína migre a uma velocidade que depende da sua carga líquida, do seu tamanho e de sua forma. A aplicação mais popular dessa propriedade é a **eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS** (**SDS-PAGE,** *SDS polyacrylamide-gel electrophoresis*). Ela utiliza um gel de poliacrilamida de ligações altamente cruzadas como uma matriz inerte, pela qual as proteínas migram. O gel é preparado pela polimerização de monômeros; o tamanho do poro do gel pode ser ajustado de maneira que seja suficientemente pequeno para retardar a migração das moléculas proteicas de interesse. As próprias proteínas não estão em uma simples solução aquosa, mas em uma solução que inclui um detergente fortemente carregado negativamente, dodecil sulfato de sódio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) (**Figura 8-17**). Como esse detergente se liga a regiões hidrofóbicas das moléculas proteicas, causando o seu desdobramento em cadeias polipeptídicas estendidas, as moléculas proteicas individuais são liberadas de suas associações com outras proteínas ou moléculas lipídicas tornando-se completamente solúveis na solução detergente. Além disso, um agente redutor como o β-mercaptoetanol (ver Figura 8-17) normalmente é adicionado para quebrar quaisquer ligações S-S nas proteínas, de forma que todos os polipeptídeos constituintes, presentes em múltiplas subunidades, possam ser analisados separadamente.

O que ocorre quando uma mistura de proteínas solubilizadas em SDS é analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida? Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada. Proteínas do mesmo tamanho tendem a migrar pelo gel com velocidades similares, pois (1) sua estrutura nativa está completamente desdobrada pelo SDS, de maneira que a suas formas são as mesmas, e (2) elas se ligam a uma mesma quantidade de SDS, tendo, portanto, a mesma quantidade de cargas negativas. Proteínas maiores, com mais carga, são submetidas a forças elétricas maiores e também a um retardamento maior. Livres em solução, os dois efeitos seriam anulados, mas nas malhas do gel de poliacrilamida, que age como uma peneira molecular, as proteínas maiores são retardadas muito mais do que as proteínas menores. Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de discretas bandas de proteínas arranjadas de acordo com a sua massa molecular (**Figura 8-18**). As proteínas majoritárias facilmente são detectadas corando-se as proteínas do gel com um corante como o azul de Coomassie. Até mesmo as proteínas menos abundantes são visualizadas em géis tratados com coloração de prata ou ouro, de modo que pequenas quantidades como 10 ng de proteína podem ser detectadas em uma banda.

O método SDS-PAGE é muito utilizado, pois pode separar todos os tipos de proteínas, incluindo aquelas que normalmente são insolúveis em água – como várias proteínas nas membranas. Como o método separa os polipeptídeos pelo tamanho, ele fornece informações sobre a massa molecular e a composição das subunidades das proteínas. A **Figura 8-19** apresenta uma fotografia de um gel utilizado para analisar cada um dos estágios sucessivos na purificação de uma proteína.

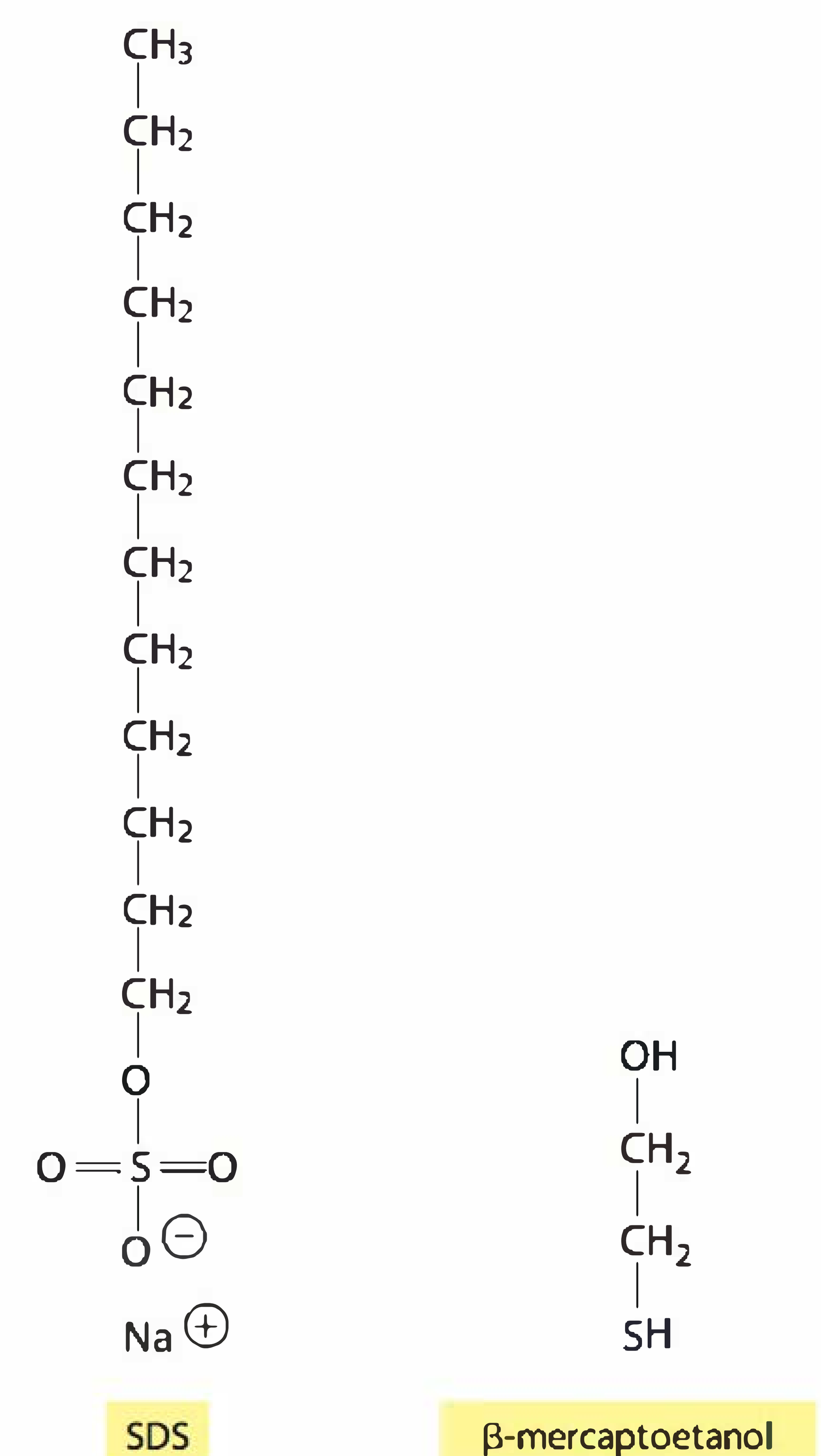


Figura 8-17 O detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e o agente redutor β-mercaptoetanol. Estes dois químicos são utilizados para solubilizar proteínas para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. O SDS é mostrado aqui em sua forma ionizada.

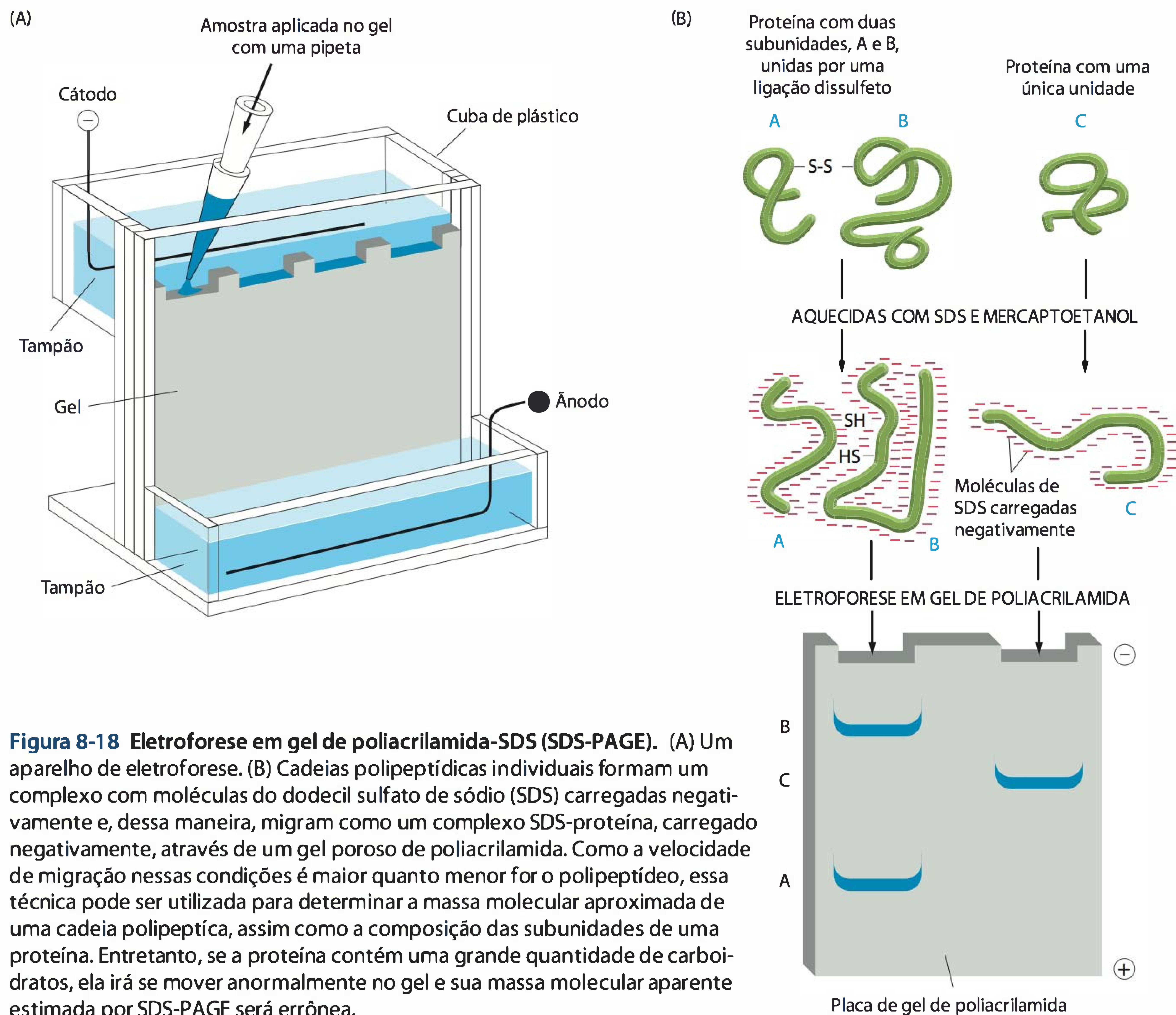


Figura 8-18 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). (A) Um aparelho de eletroforese. (B) Cadeias polipeptídicas individuais formam um complexo com moléculas do dodecil sulfato de sódio (SDS) carregadas negativamente e, dessa maneira, migram como um complexo SDS-proteína, carregado negativamente, através de um gel poroso de poliacrilamida. Como a velocidade de migração nessas condições é maior quanto menor for o polipeptídeo, essa técnica pode ser utilizada para determinar a massa molecular aproximada de uma cadeia polipeptíca, assim como a composição das subunidades de uma proteína. Entretanto, se a proteína contém uma grande quantidade de carboidratos, ela irá se mover anormalmente no gel e sua massa molecular aparente estimada por SDS-PAGE será errônea.

Proteínas específicas podem ser detectadas por *blotting* com anticorpos

Uma proteína específica pode ser identificada após o seu fracionamento em um gel de poliacrilamida pela exposição de todas as proteínas presentes no gel a um anticorpo específico que tenha sido acoplado a um isótopo radiativo, a uma enzima facilmente detectável ou a um corante fluorescente. Por conveniência, esse procedimento normalmente é realizado depois de todas as proteínas separadas presentes no gel terem sido transferidas (por *blotting*) para uma folha de papel de nitrocelulose ou membrana de náilon. Coloca-se a membrana sobre o gel e direciona-se as proteínas para fora dele, com um campo elétrico forte, para transferir a proteína para a membrana. A membrana é então colocada em uma solução com o anticorpo marcado para revelar a proteína de interesse. Esse método de detecção de proteínas é chamado de ***Western blotting*** ou ***immunoblotting*** (**Figura 8-20**).

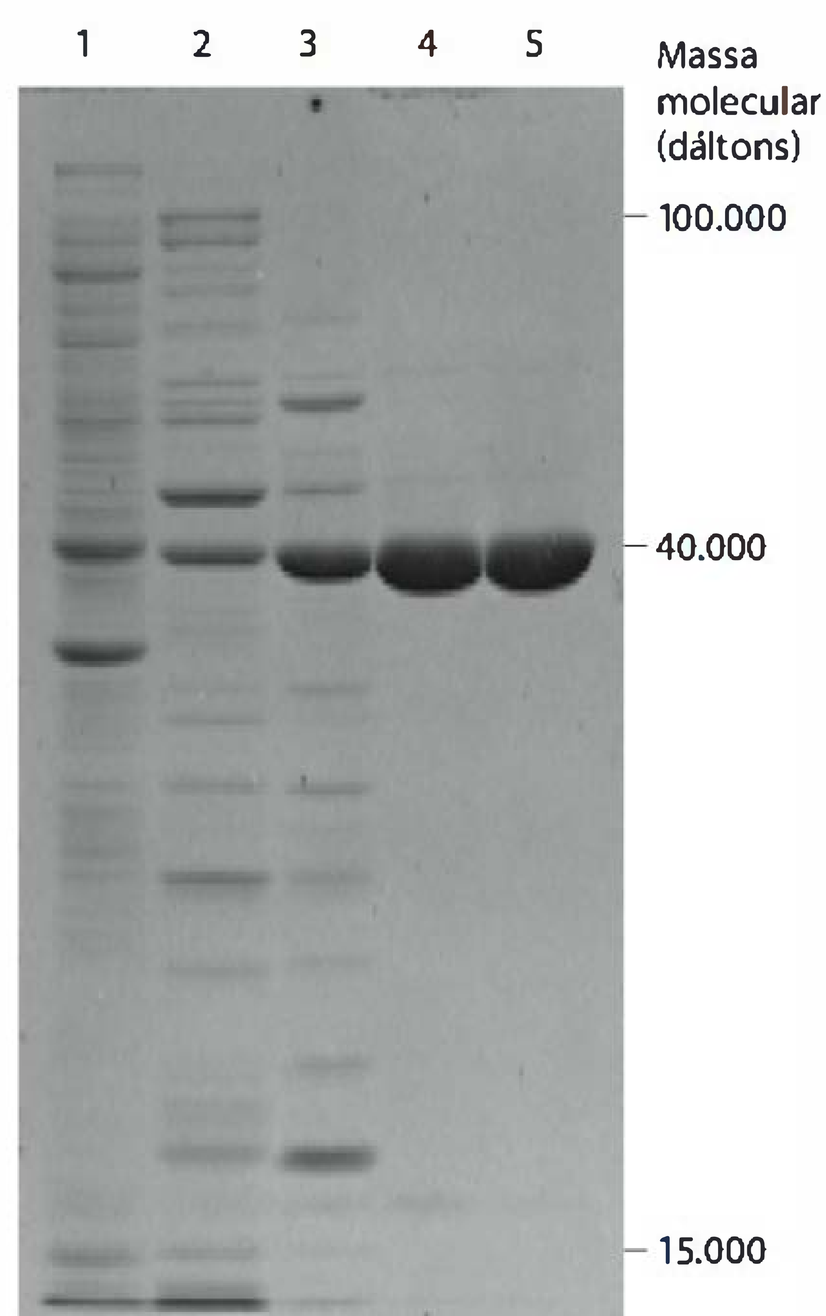


Figura 8-19 Análise de amostras de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A fotografia mostra um gel corado com Coomassie que foi utilizado para detectar as proteínas presentes nos estágios sucessivos da purificação de uma enzima. A canaleta mais à esquerda (canaleta 1) contém a mistura complexa de proteínas do extrato de células inicial, e cada canaleta sucessiva analisa as proteínas obtidas após um fracionamento por cromatografia da amostra de proteína analisada na canaleta anterior (ver Figura 8-14). A mesma quantidade de proteína (10 μg) foi aplicada no gel no topo de cada canaleta. Proteínas individuais normalmente aparecem como bandas finas coradas com corante; entretanto, uma banda se alarga quando contém muita proteína. (De T. Formosa e B. M. Alberts, *J. Biol. Chem.* 261:6107-6118, 1986.)

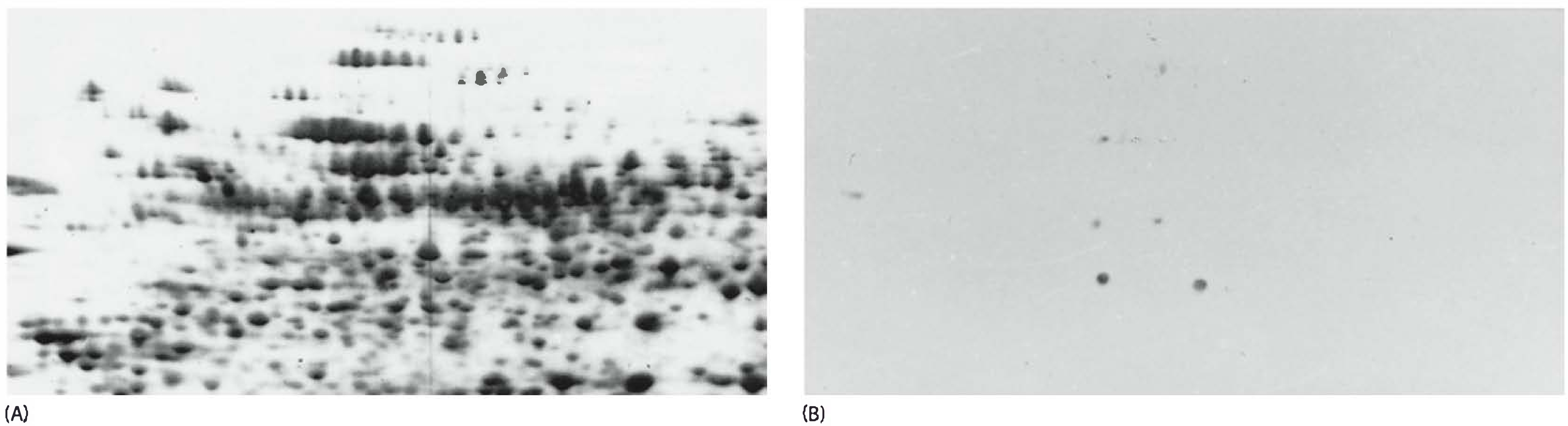


Figura 8-20 ***Western blotting.*** Todas as proteínas de células de tabaco em divisão em cultura são primeiramente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (descrito na Figura 8-23). Em (A), as posições das proteínas são reveladas por uma coloração sensível a proteínas. Em (B), as proteínas separadas em um gel idêntico foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose e expostas a um anticorpo que reconhece apenas aquelas proteínas fosforiladas nos resíduos de treonina durante a mitose. As posições de cerca de doze proteínas reconhecidas por esse anticorpo são reveladas por um anticorpo secundário ligado a uma enzima. Essa técnica também é conhecida como *immunoblotting* (ou *Western blotting*). (De J. A. Traas, et al., *Plant J.* 2:723-732, 1992. Com permissão de Blackwell Publishing.)

A espectrometria de massas fornece um método altamente sensível para identificar proteínas desconhecidas

Um problema frequente na biologia celular e bioquímica é a identificação de uma proteína ou coleção de proteínas obtidas por um dos processos de purificação discutidos nas páginas anteriores (p. ex., a Figura 8-16). Como as sequências dos genomas da maioria dos organismos experimentais comuns agora são conhecidas, catálogos de todas as proteínas produzidas nesses organismos estão disponíveis. A tarefa de identificar uma proteína desconhecida (ou uma coleção de proteínas desconhecidas) se reduz a comparar algumas sequências de aminoácidos presentes na amostra desconhecida com genes conhecidos catalogados. Essa tarefa agora é realizada quase que exclusivamente pelo uso da espectrometria de massas em conjunto com pesquisas de dados pelo computador.

Partículas carregadas têm uma dinâmica muito precisa quando submetidas a um campo elétrico ou magnético no vácuo. A espectrometria de massas explora esse princípio para separar íons de acordo com a relação entre massa e carga. É uma técnica muito sensível, que requer pouco material e é capaz de determinar a massa precisa de proteínas intactas e de peptídeos derivados delas por clivagem enzimática ou química. As massas podem ser obtidas com bastante acuidade, muitas vezes com um erro de menos de uma parte em um milhão. A forma mais comum utilizada da técnica é chamada de ionização/dessorção de matriz assistida por *laser* – espectometria por tempo de voo.(maldi-tof, *matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight spectrometry*). Nesse método, as proteínas na amostra são primeiro quebradas em peptídeos curtos. Esses peptídeos são misturados com um ácido orgânico e então secados sobre uma lâmina de metal ou cerâmica. Um *laser* então atinge a amostra, ejetando os peptídeos a partir da lâmina na forma de gás ionizado, onde cada molécula carrega uma ou mais cargas positivas. Os peptídeos ionizados são acelerados em um campo elétrico e voam em direção ao detector. Sua massa e carga determinam o tempo que levam para alcançar o detector: peptídeos grandes se movem mais lentamente, e moléculas muito carregadas se movem mais rapidamente. Pela análise desses peptídeos ionizados que carregam uma única carga, as massas precisas dos peptídeos presentes na amostra original podem ser determinadas. MALDI-TOF também pode ser utilizada para medir com acuidade a massa de proteínas intactas tão grandes como 200.000 dáltons. Essa informação é então utilizada para analisar bancos de dados nos quais as massas de todas as proteínas e de todos os seus fragmentos peptídicos preditos foram organizadas a partir de sequências genômicas do organismo (**Figura 8-21**A). Uma combinação clara com uma determinada fase de leitura aberta frequentemente pode ser realizada sabendo-se a massa de apenas alguns peptídeos derivados de uma dada proteína.

MALDI-TOF fornece medidas acuradas da massa molecular de proteínas e peptídeos. Além disso, empregando-se o uso de dois espectrômetros de massas alinhados (um arranjo conhecido como MS/MS) é possível determinar diretamente as sequências de aminoácidos

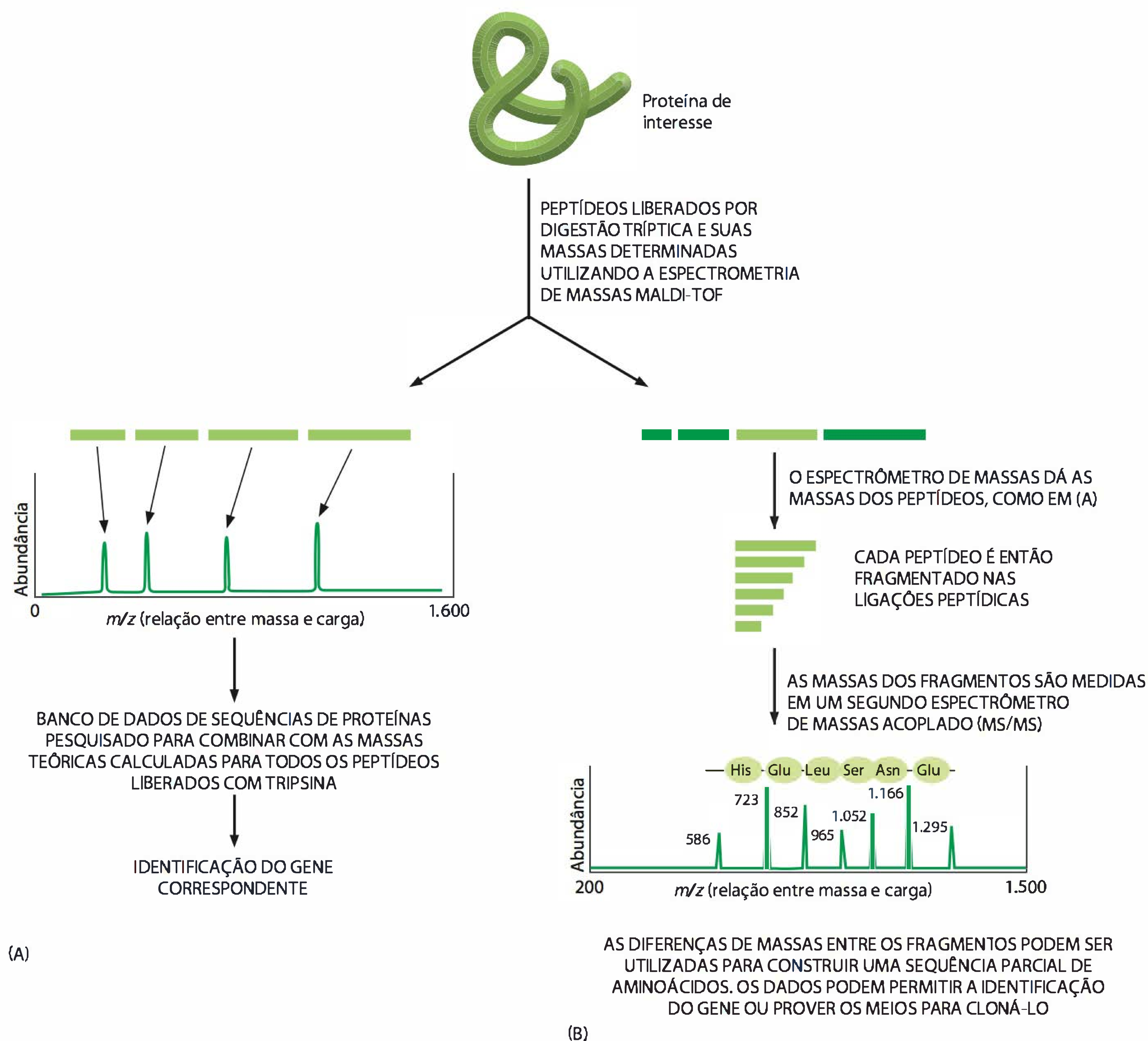


Figura 8-21 **Uso da espectrometria de massas para identificar proteínas e para sequenciar peptídeos.** Uma proteína isolada é digerida com tripsina, e os fragmentos de peptídeos são então colocados no espectrômetro de massas. Duas metodologias diferentes podem então ser utilizadas para identificar a proteína. (A) No primeiro método, massas peptídicas são medidas precisamente usando-se a espectrometria de massas MALDI-TOF. Bancos de dados de sequências são então rastreados para encontrar o gene que codifica a proteína cujo perfil de digestão tríptica calculada se ajuste aos valores. (B) A espectrometria de massas também pode ser utilizada para determinar diretamente a sequência de aminoácidos de fragmentos peptídicos. Nesse exemplo, peptídeos trípticos são primeiro separados com base em sua massa dentro de um espectrômetro de massas. Cada peptídeo é então fragmentado primeiro pela clivagem de suas ligações peptídicas. Esse tratamento gera um grupo de peptídeos, cada um diferenciando-se em tamanho por um aminoácido. Esses fragmentos são alimentados em um segundo espectrômetro de massas, e suas massas são determinadas. A diferença nas massas entre dois peptídeos intimamente relacionados pode ser utilizada para deduzir o aminoácido "perdido". Por aplicações repetidas desse procedimento, uma sequência parcial de aminoácidos da proteína original pode ser determinada. Para simplificar, a análise mostrada inicia com uma única espécie de proteína purificada. Na verdade a espectrometria de massas normalmente é realizada com misturas de proteínas (ver Figura 8-16) e pode identificar todas as proteínas presentes na mistura. Como explicado no texto, a espectrometria de massas também pode detectar modificações pós-traducionais das proteínas.

de peptídeos individuais em uma mistura complexa. Como descrito anteriormente, a amostra proteica é primeiro quebrada em peptídeos menores, que são separados uns dos outros por espectrometria de massas. Cada peptídeo é então fragmentado por colisões com átomos de gás de muita energia. Esse método de fragmentação cliva preferencialmente as ligações peptídicas, gerando uma escada de fragmentos, cada um diferenciando-se por apenas um único aminoácido. O segundo espectrômetro de massas então separa esses fragmentos e apresenta suas massas. A sequência de aminoácidos de um peptídeo pode ser deduzida a partir das diferenças na massa (Figura 8-21B).

MS/MS é particularmente útil para detectar e mapear com precisão modificações pós-traducionais de proteínas, como fosforilações ou acetilações. Como essas modificações

conferem um aumento característico de massa a um aminoácido, elas são facilmente detectadas por espectrometria de massas. Como descrito no Capítulo 3, proteômica, um termo geral que engloba várias técnicas experimentais diferentes, é a caracterização de todas as proteínas na célula, incluindo todas as interações entre proteínas e todas as modificações pós-traducionais. Em combinação com as rápidas técnicas de purificação discutidas na última seção, a espectrometria de massas emergiu como o método mais potente para mapear as modificações pós-traducionais tanto de uma dada proteína quanto das proteínas que permanecem associadas a ela durante sua purificação.

Métodos de separação bidimensional são especialmente potentes

Como diferentes proteínas podem ter tamanhos, formas, massas e carga total diferentes, a maioria das técnicas de separação como eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS ou cromatografia de troca iônica não consegue mostrar todas as proteínas em uma célula ou mesmo em uma organela. Em contraste, a **eletroforese bidimensional em gel**, que combina dois procedimentos de separação diferentes, pode resolver até 2.000 proteínas – o número total de proteínas diferentes em uma simples bactéria – na forma de um mapa bidimensional de proteínas.

Na primeira etapa, as proteínas são separadas por sua carga intrínseca. A amostra é dissolvida em um volume pequeno de uma solução contendo um detergente não-iônico (sem carga), juntamente com β-mercaptoetanol e o reagente desnaturante, ureia. Essa solução solubiliza, desnatura e dissocia todas as cadeias polipeptídicas, mas mantém suas cargas intrínsecas inalteradas. As cadeias polipeptídicas são então separadas em um gradiente de pH por um procedimento chamado de *focalização isoelétrica*, que aproveita a variação na carga líquida de uma molécula proteica com o pH da solução onde se encontra. Cada proteína tem um ponto isoelétrico característico, o pH no qual a proteína não apresenta carga líquida e dessa maneira não migra em um campo elétrico. Na focalização isoelétrica, as proteínas são separadas por eletroforese em um pequeno tubo de gel de poliacrilamida onde um gradiente de pH é estabelecido por uma mistura de tampões especiais. Cada proteína migra para uma posição no gradiente que corresponde ao seu ponto isoelétrico e permanece lá (**Figura 8-22**). Esta é a primeira dimensão da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.

Na segunda etapa, o pequeno gel contendo as proteínas separadas é novamente submetido à eletroforese, mas na direção de um ângulo reto em relação à direção utilizada na primeira etapa. Dessa vez, o SDS é adicionado e as proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho, como no SDS-PAGE unidimensional: o pequeno gel original é submerso em SDS e então colocado na borda de um gel de poliacrilamida-SDS, através do qual cada cadeia polipeptídica migra para formar um ponto discreto. Essa é a segunda dimensão da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. As únicas proteínas que não separam são aquelas que têm tanto tamanho como ponto isoelétrico idênticos, uma situação relativamente rara. Mesmo traços de cada cadeia polipeptídica podem ser detectados no gel por vários procedimentos de coloração – ou por autorradiografia se a amostra proteica foi inicialmente marcada com um radioisótopo (**Figura 8-23**). A técnica tem tanto poder de resolução que pode distinguir entre duas proteínas que diferem em apenas um único aminoácido carregado.

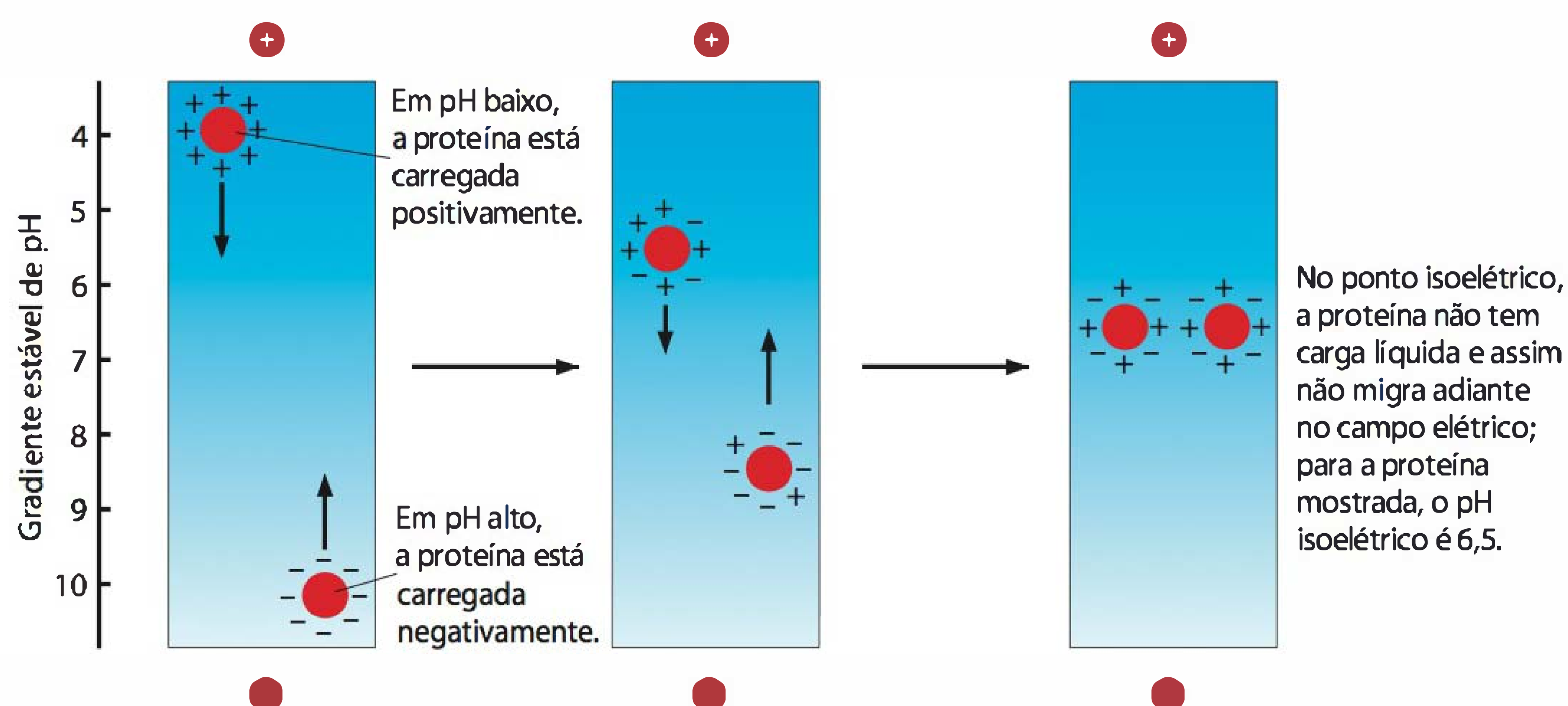


Figura 8-22 Separação de moléculas proteicas por focalização isoelétrica. Em um pH baixo (alta concentração de H^+), os grupos carboxílicos ácidos das proteínas tendem a ficar sem carga (–COOH) e seus grupos básicos contendo nitrogênio ficam totalmente carregados (p. ex., $-NH_3^+$), dando à maioria das proteínas uma carga líquida positiva. Em pH alto, os grupos carboxílicos ácidos são negativamente carregados ($-COO^-$) e os grupos básicos tendem a ficar sem carga (p. ex., $-NH_2$), dando à maioria das proteínas uma carga líquida negativa. Em seu *pH isoelétrico*, uma proteína não tem carga líquida, uma vez que as cargas positivas e negativas se equilibram. Desse modo, quando um tubo contendo um gradiente fixo de pH é submetido a um campo elétrico forte na direção apropriada, cada espécie proteica presente migra até formar uma banda delgada em seu pH isoelétrico, como mostrado.

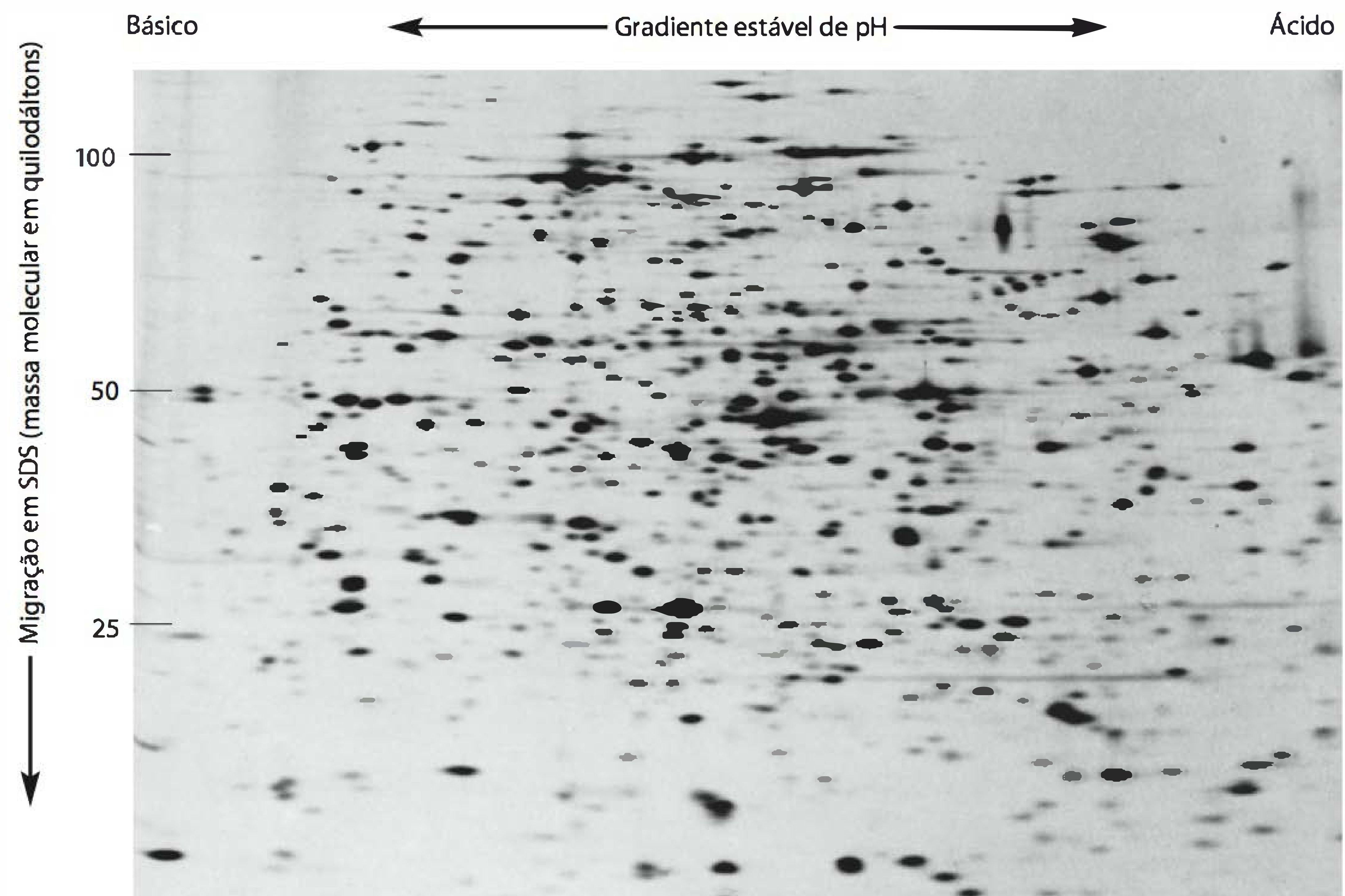


Figura 8-23 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Todas as proteínas em uma célula bacteriana *E. coli* estão separadas neste gel, onde cada ponto corresponde a uma cadeia polipeptídica diferente. As proteínas foram primeiramente separadas com base no seu ponto isoelétrico por focalização isoelétrica, da esquerda para a direita. Depois, foram fracionadas de acordo com sua massa molecular por eletroforese, de cima para baixo, na presença de SDS. Observe que proteínas diferentes estão presentes em quantidades muito diferentes. As bactérias foram cultivadas na presença de uma mistura de aminoácidos marcados com radioisótopos, de maneira que todas as suas proteínas são radiativas e puderam ser detectadas por autorradiografia (ver p. 602-603). (Cortesia de Patrick O´Farrell.)

Uma técnica "bidimensional" diferente, ainda mais potente, agora está disponível quando o objetivo é determinar todas as proteínas presentes em uma organela ou uma outra mistura complexa de proteínas. Como a técnica tem como base a espectrometria de massas, ela requer que as proteínas sejam de um organismo com um genoma completamente sequenciado. Primeiro, a mistura de proteínas presente é digerida com tripsina para produzir pequenos peptídeos. Depois, esses peptídeos são separados por uma série de etapas de cromatografia líquida automatizada. Como na segunda dimensão, cada peptídeo separado é alimentado diretamente em espectrômetros de massas alinhados (MS/MS) que permitem que sua sequência de aminoácidos, assim como suas modificações pós-traducionais, seja determinada. Esse arranjo, onde espectrômetros de massas alinhados (MS/MS) são conectados com a saída de um sistema de cromatografia líquida (LC, *liquid chromatography*) automatizada, é denominado LC-MS/MS. Atualmente está se tornando rotina submeter uma preparação inteira de organela para análise por LC-MS/MS e identificar centenas de proteínas e suas modificações. É claro que nenhum procedimento de isolamento de organela é perfeito, e algumas das proteínas identificadas serão proteínas contaminantes. Elas frequentemente podem ser excluídas pela análise das frações vizinhas da purificação da organela e por sua "subtração" das frações do pico da organela.

Medidas hidrodinâmicas revelam o tamanho e a forma de um complexo proteico

A maioria das proteínas em uma célula atua como parte de complexos maiores, e o conhecimento do tamanho e da forma desses complexos muitas vezes leva a pistas a respeito da sua função. Essa informação pode ser obtida de várias maneiras importantes. Às vezes, um complexo pode ser diretamente visualizado utilizando-se a microscopia eletrônica, como descrito no Capítulo 9. Uma abordagem complementar tem como base as propriedades hidrodinâmicas de um complexo, ou seja, seu comportamento à medida que se move por um meio líquido. Normalmente, duas medidas separadas são realizadas. Uma medida é a velocidade de um complexo à medida que ele se move sob a influência de um campo centrífugo produzido por uma ultracentrífuga (ver Figura 8-11A). A constante de sedimentação (ou valor S) obtida depende tanto do tamanho como da forma do complexo e não transmite, por si só, informação especialmente útil. Entretanto, uma vez que uma segunda medida hidrodinâmica é realizada – mapeando-se a migração de um complexo por uma coluna de cromatografia de filtração em gel (ver Figura 8-13B) – tanto a forma aproximada de um complexo como sua massa molecular podem ser calculadas.

A massa molecular também pode ser determinada mais diretamente utilizando-se uma ultracentrífuga analítica, um aparelho complexo que permite que medidas da absorbância

proteica de uma amostra sejam realizadas enquanto ela é submetida a forças centrífugas. Nessa abordagem, a amostra é centrifugada até atingir o equilíbrio, onde a força centrífuga sobre um complexo proteico se equilibra exatamente com sua tendência a difundir. Como seu ponto de equilíbrio é dependente na massa molecular do complexo, mas não na sua forma particular, a massa molecular pode ser diretamente calculada, como necessário para determinar a estequiometria de cada proteína em um complexo proteico.

Grupos de proteínas que interagem podem ser identificados por métodos bioquímicos

Como a maioria das proteínas na célula funciona como parte de complexos com outras proteínas, uma importante maneira para começar a caracterizar o papel biológico de uma proteína desconhecida é identificar todas as outras proteínas com as quais ela se liga especificamente.

Um método para identificar proteínas que se ligam umas às outras de maneira forte é a *imunoprecipitação*. Nesse caso, um anticorpo reconhece uma proteína-alvo específica; reagentes que se ligam ao anticorpo e estão ligados a uma matriz sólida então carregam o complexo para fora da solução para o fundo de um tubo de ensaio. Se a proteína-alvo original está associada a outra proteína de forma forte quando ela é capturada pelo anticorpo, a parceira também precipitará. Esse método é útil para identificar proteínas que fazem parte de um complexo dentro das células, incluindo aquelas que interagem apenas de maneira transiente – por exemplo, quando moléculas de sinalização extracelulares estimulam as células (discutido no Capítulo 15). Um outro método frequentemente utilizado para identificar proteínas parceiras de ligação é a cromatografia de afinidade à proteína (ver Figura 8-13C). Para empregar essa técnica para capturar proteínas que interagem, uma proteína-alvo é ligada a esferas de polímeros empacotadas em uma coluna. Quando as proteínas em um extrato proteico são passadas por essa coluna, aquelas proteínas que interagem com a proteína-alvo são retiradas pela matriz de afinidade. Essas proteínas podem então ser eluídas e sua identidade é determinada por espectrometria de massas.

Além de capturar complexos proteicos em colunas ou em tubos de ensaio, pesquisadores estão desenvolvendo arranjos de proteínas com alta densidade para investigar as interações proteicas. Esses arranjos, que contêm milhares de proteínas diferentes ou anticorpos distribuídos em uma lâmina de vidro imobilizados em minúsculos poços, permitem que se pesquisem as atividades bioquímicas e os perfis de ligação de um grande número de proteínas de uma só vez. Por exemplo, se uma proteína marcada com um agente fluorescente é incubada com arranjos contendo milhares de proteínas imobilizadas, cada ponto que permanece fluorescente após uma lavagem extensiva contém uma proteína com a qual a proteína marcada se liga especificamente.

As interações entre proteínas também podem ser identificadas por uma técnica de dois híbridos em leveduras

Até o momento, enfatizamos abordagens bioquímicas para estudar as interações entre proteínas. Entretanto, uma estratégia particularmente potente, chamada de **sistema de dois híbridos**, explora os mecanismos das próprias células para revelar as interações entre proteínas.

A técnica se aproveita da natureza modular de proteínas ativadoras de genes (ver Figura 7-45). Essas proteínas tanto se ligam a sequências específicas de DNA como ativam a transcrição de genes, e essas atividades frequentemente são realizadas por dois domínios separados da proteína. Utilizando as técnicas de DNA recombinante, esses dois domínios proteicos são utilizados para criar proteínas de fusão separadas "isca" e "peixe". Para criar a proteína de fusão "isca", a sequência de DNA que codifica para a proteína-alvo é fusionada com a sequência de DNA que codifica para o domínio de ligação ao DNA de uma proteína ativadora de genes. Quando essa construção é introduzida em levedura, as células produzem a proteína de fusão, com a proteína-alvo ligada a esse domínio de ligação ao DNA (**Figura 8-24**). Essa proteína de fusão se liga à região reguladora de um gene repórter, onde ela serve como uma "isca" para pescar proteínas que interagem com a proteína-alvo. Para procurar por parceiras de ligação em potencial (possível peixe para a isca), as proteínas candidatas também devem ser construídas como proteínas de fusão: o DNA que codifica para o domínio ativador de uma proteína ativadora de gene é fusionado a um grande número de genes diferentes. Membros dessa coleção de genes – codificando para possível "peixe"– são introduzidos in-

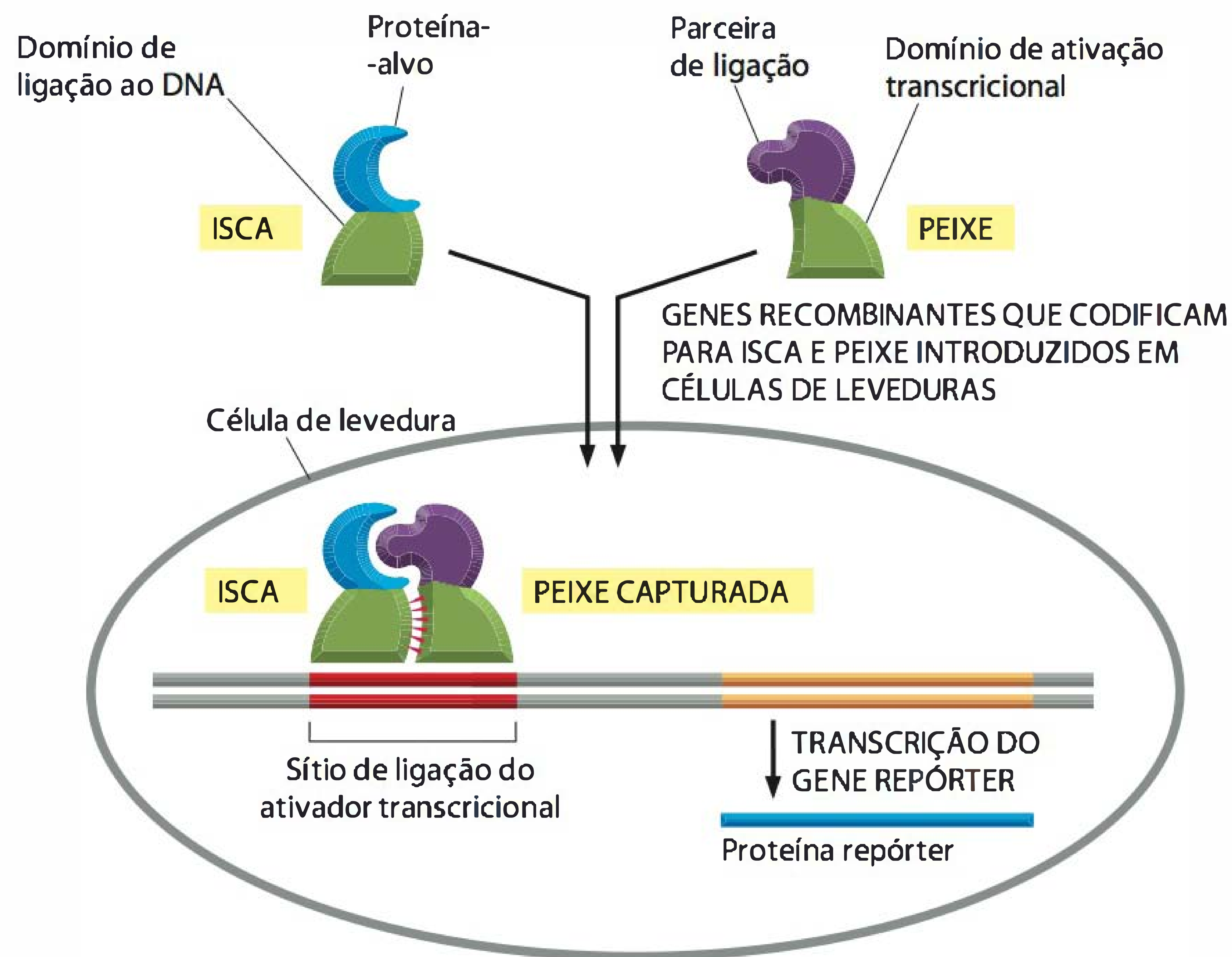


Figura 8-24 Sistema de dois híbridos em leveduras para detectar as interações entre proteínas. A proteína-alvo é fusionada a um domínio de ligação ao DNA que direciona a proteína de fusão à região reguladora de um gene repórter como "isca". Quando essa proteína-alvo se liga a uma outra proteína especialmente projetada no núcleo da célula ("peixe"), a sua interação une duas metades de um ativador transcricional, que então ativa a expressão do gene repórter.

dividualmente em células de leveduras contendo a isca. Se a célula de levedura recebe um clone de DNA que expressa uma parceira peixe para a proteína isca, as duas metades do ativador transcricional são unidas, ativando o gene repórter (ver Figura 8-24).

Essa técnica engenhosa parece complexa, mas o sistema de dois híbridos é relativamente simples para ser usado em laboratório. Embora as interações entre proteínas ocorram no núcleo da célula de levedura, as proteínas de todas as partes da célula e de qualquer organismo podem ser estudadas dessa forma. O sistema de dois híbridos tem sido escalonado para mapear as interações que ocorrem entre todas as proteínas que um organismo produz. Nesse caso, um grupo de fusões isca e peixe é produzido para cada proteína da célula e cada combinação isca/peixe pode ser monitorada. Dessa forma, mapas das interações entre proteínas têm sido gerados para a maioria das proteínas em leveduras, *C. elegans* e *Drosophila*.

Dados combinados derivados de diferentes técnicas produzem mapas confiáveis de interações entre proteínas

Como discutido previamente no Capítulo 3, mapas extensivos de interações entre proteínas podem ser muito úteis para identificar as funções das proteínas (ver Figura 3-82). Por essa razão, tanto o método de dois híbridos como a técnica bioquímica discutida anteriormente conhecida como *tap-tagging* (ver p. 515-516) foram automatizados para determinar as interações entre milhares de proteínas. Infelizmente, diferentes resultados são encontrados em diferentes experimentos, e várias das interações detectadas em um laboratório não são detectadas em outros. Dessa forma, os mapas de interações entre proteínas mais úteis são aqueles que combinam dados de vários experimentos, necessitando que cada interação no mapa seja confirmada por mais de uma técnica.

Métodos ópticos podem monitorar as interações entre proteínas em tempo real

Uma vez que se sabe que duas proteínas – ou uma proteína e uma molécula pequena – se associam, torna-se importante caracterizar sua interação com mais detalhes. As proteínas podem se associar por mais ou menos tempo (como as subunidades da RNA-polimerase ou o proteassomo), ou interagir em encontros transientes que podem durar apenas poucos milissegundos (como uma proteína-cinase e seu substrato).

Para compreender como uma proteína funciona dentro de uma célula, precisamos determinar com qual afinidade ela se liga a outras proteínas, o quão rápido ela se dissocia e como modificações covalentes, pequenas moléculas ou outras proteínas influenciam essas interações. Tais estudos da dinâmica das proteínas muitas vezes empregam métodos ópticos.

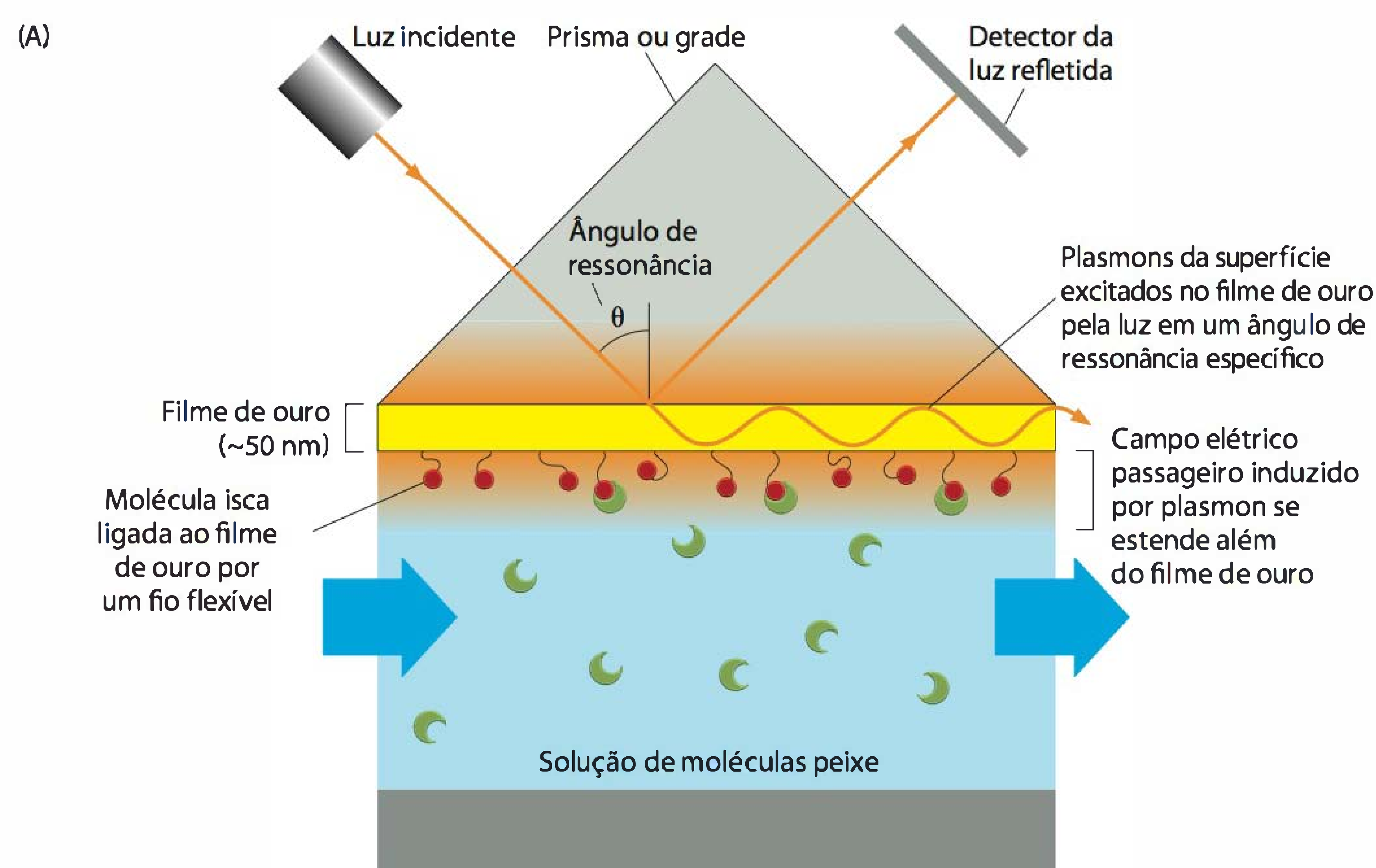
Certos aminoácidos (p. ex., triptofano) exibem uma fluorescência fraca que pode ser detectada com fluorímetros sensíveis. Em muitos casos, a intensidade da fluorescência, ou o espectro de emissão dos aminoácidos fluorescentes localizados em uma interface entre proteínas, se

modificará quando as proteínas se associarem. Quando essa modificação pode ser detectada por fluorimetria, ela fornece uma medida sensitiva e quantitativa da ligação proteica.

Um método particularmente útil para monitorar a dinâmica da ligação de uma proteína com outras moléculas é chamado de **ressonância plasmônica de superfície** (**SPR**, *surface plasmon resonance*). O método SPR tem sido utilizado para caracterizar uma ampla variedade de interações moleculares, incluindo a ligação entre anticorpo e antígeno, o acoplamento entre ligante e receptor e a ligação de proteínas ao DNA, carboidratos, pequenas moléculas e outras proteínas.

A SPR detecta as interações de ligação pelo monitoramento da reflexão de um feixe de luz sob a interface entre uma solução aquosa de moléculas de ligação em potencial e uma superfície biossensora carregando uma proteína isca imobilizada. A proteína isca é ligada a uma camada muito delgada de metal que cobre um lado de um prisma de vidro (**Figura 8-25**). Um feixe de luz é passado através do prisma; a um certo ângulo, chamado de *ângulo de ressonância*, parte da energia da luz interage com a nuvem de elétrons no filme metálico, gerando um plasmon – uma oscilação dos elétrons em ângulos retos ao plano do filme, oscilando para cima e para baixo entre suas superfícies mais alta e mais baixa como um peso em um elástico. O plasmon, por sua vez, gera um campo elétrico que se estende a uma curta distância – cerca do comprimento de onda da luz – acima e abaixo da superfície de metal. Qualquer alteração na composição do meio entre o espectro do campo elétrico causará uma modificação mensurável no ângulo de ressonância.

Para medir a ligação, permite-se que uma solução contendo proteínas (ou outras moléculas) que possam interagir com a proteína isca imobilizada passe pela superfície biossen-



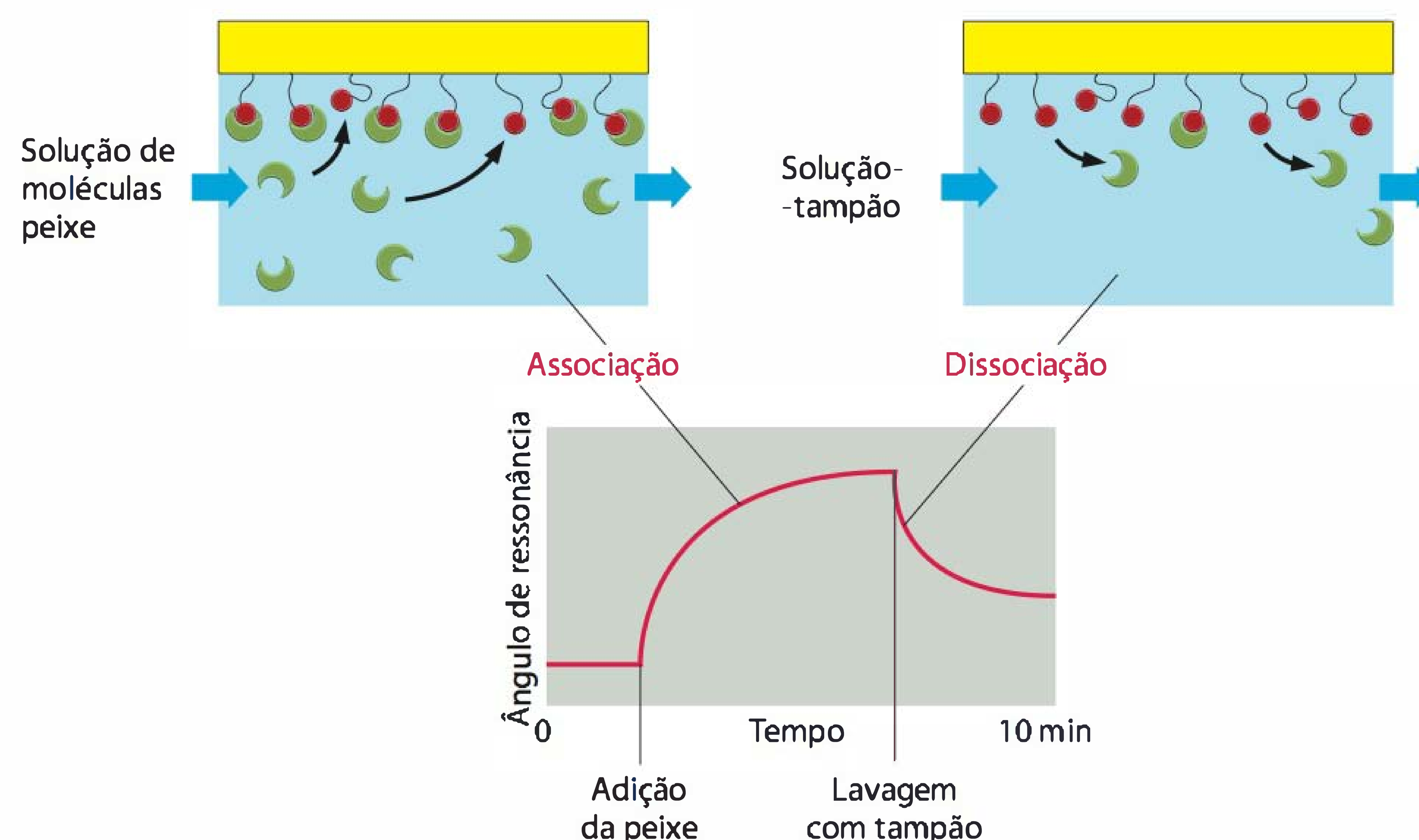


Figura 8-25 Ressonância plasmônica de superfície. (A) A SPR pode detectar as interações de ligações pelo monitoramento da reflexão de um feixe de luz sob a interface entre uma solução aquosa de moléculas com potencial de ligação (*verde*) e uma superfície biossensora coberta com uma proteína isca imobilizada (*vermelho*). (B) Permite-se que uma solução de proteínas peixe passe pela proteína isca imobilizada. A ligação de moléculas peixe à proteína isca produz uma alteração que pode ser medida no ângulo de ressonância, assim como ocorre na sua dissociação quando uma solução-tampão as lava. Essas alterações, monitoradas em tempo real, refletem a associação e a dissociação dos complexos moleculares.

sora. Proteínas que se ligam à isca alteram a composição dos complexos moleculares sobre a superfície de metal, causando uma alteração no ângulo de ressonância (ver Figura 8-25). As alterações no ângulo de ressonância são monitoradas em tempo real e refletem a cinética da associação – ou dissociação – de moléculas com a proteína isca. A velocidade de associação (k_{on}) é medida à medida que as moléculas interagem, e a velocidade de dissociação (k_{off}) é determinada à medida que o tampão lava as moléculas ligadas da superfície sensora. Uma constante de ligação (K) é calculada dividindo-se k_{off} por k_{on}. Além de determinar a cinética, a SPR pode ser utilizada para determinar o número de moléculas que se ligaram em cada complexo: a magnitude da alteração do sinal de SPR é proporcional à massa do complexo imobilizado.

O método SPR é particularmente útil, pois requer apenas pequenas quantidades da proteína, a proteína não precisa ser marcada e as interações da proteína com outras moléculas podem ser monitoradas em tempo real.

Um terceiro método óptico para testar a interação de proteínas utiliza a *proteína fluorescente verde* (GFP, *green fluorescent protein*) (discutida em detalhes a seguir) e suas derivadas de diferentes cores. Nessa aplicação, duas proteínas de interesse são marcadas com diferentes fluorocromos, de modo que o espectro de emissão de um fluorocromo sobrepõe o espectro de absorção do segundo fluorocromo. Se duas proteínas – e seus fluorocromos ligados – se aproximarem muito (entre cerca de 1e10 nm), a energia da luz absorvida é transferida de um fluorocromo para o outro. A transferência de energia, chamada de **transferência de energia por ressonância de fluorescência** (**FRET**, *fluorescence resonance energy transfer*), é determinada iluminando-se o primeiro fluorocromo e medindo-se a emissão do segundo (**Figura 8-26**). Essa técnica é especialmente potente pois, quando combinada à microscopia de fluorescência, ela pode ser utilizada para caracterizar interações entre proteínas em locais específicos dentro das células vivas.

Algumas técnicas podem monitorar moléculas únicas

Os métodos bioquímicos descritos até agora nesse capítulo são usados para estudar grandes populações de moléculas, uma limitação que reflete o pequeno tamanho de moléculas biológicas típicas em relação a dos métodos para detectá-las. Entretanto, o desenvolvimento recente de métodos de medição muito sensíveis e precisos criou um novo ramo da biofísica – o estudo de moléculas únicas. O estudo de moléculas únicas é particularmente importante na biologia celular, pois muitos processos têm como base as atividades de apenas poucas moléculas críticas na célula.

O primeiro exemplo de uma técnica para estudar a função de moléculas proteicas únicas foi o uso de um eletrodo para medir o fluxo de corrente por canais de íons únicos (ver Figura 11-33). Uma outra abordagem é ligar a proteína a uma estrutura maior, como esfera de poliestireno, a qual pode então ser observada por microscopia convencional. Essa estratégia tem sido particularmente útil na medida dos movimentos de proteínas motoras. Por exemplo, mo-

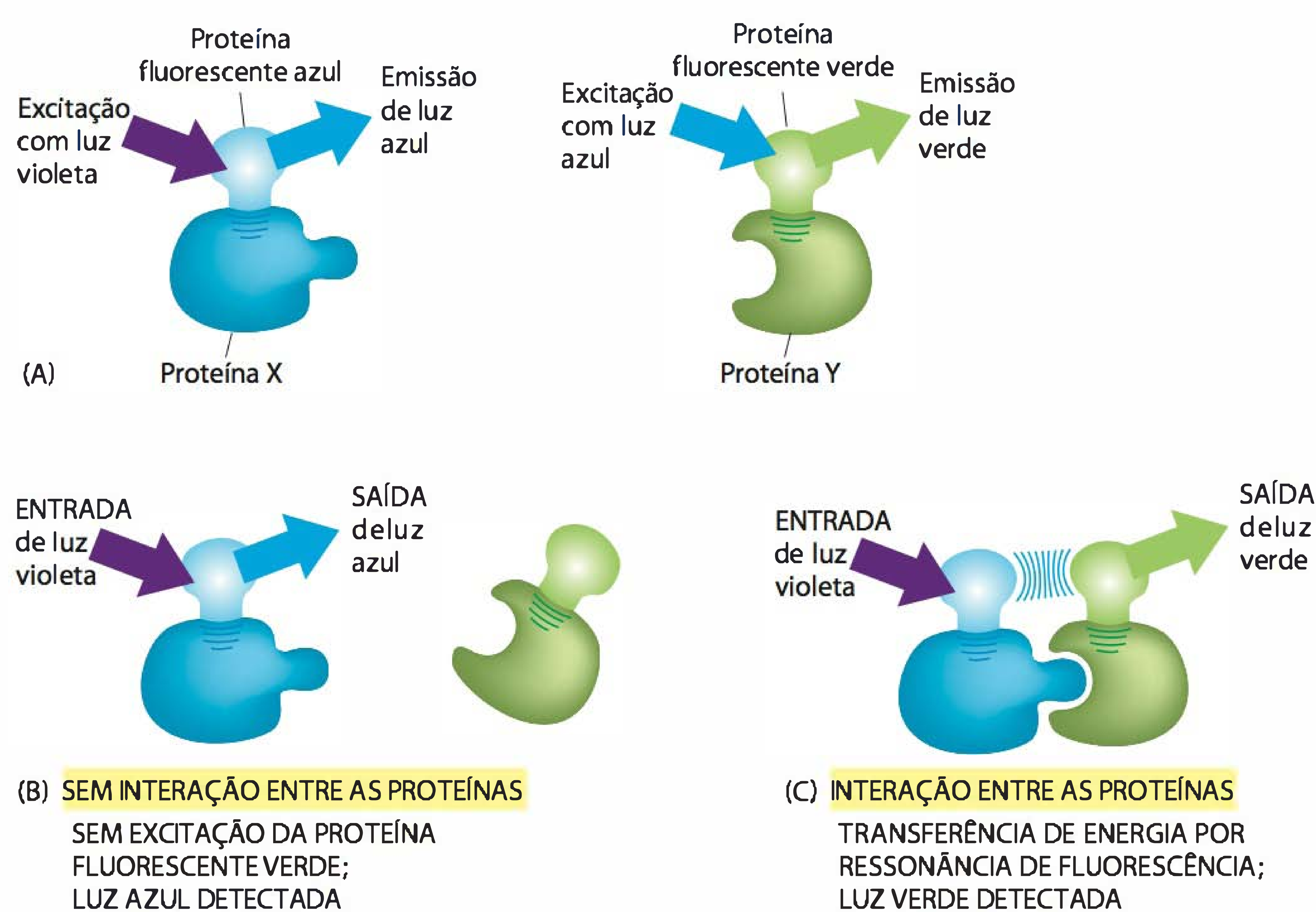


Figura 8-26 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). Para determinar se (e quando) duas proteínas interagem dentro de uma célula, as proteínas são primeiro produzidas como proteínas de fusão ligadas a variantes de cores diferentes da proteína fluorescente verde (GFP). (A) Nesse exemplo, a proteína X é acoplada a uma proteína fluorescente azul, que é excitada por luz violeta (370-440 nm) e emite luz azul (440-480 nm); a proteína Y é acoplada a uma proteína fluorescente verde, que é excitada por luz azul e emite luz verde (510 nm). (B) Se as proteínas X e Y não interagirem, a incidência de luz violeta na amostra gera fluorescência apenas a partir da proteína fluorescente azul. (C) Quando as proteínas X e Y interagem, FRET pode ocorrer. A incidência de luz violeta na amostra excita a proteína fluorescente azul, cuja emissão por sua vez excita a proteína fluorescente verde, resultando na emissão de luz verde. Os fluorocromos devem estar muito próximos – dentro de cerca de 1a10 nm um do outro – para que FRET ocorra. Como nem todas as moléculas das proteínas X e Y estão ligadas todo o tempo, alguma luz azul ainda pode ser detectada. Mas quando as duas proteínas começam a interagir, a emissão a partir da GFP doadora decai à medida que a emissão a partir da GFP aceptora aumenta.

léculas da proteína motora cinesina (discutida no Capítulo 16) podem ser ligadas a uma esfera, e por meio da observação do movimento da esfera ligada à cinesina, ao longo do microtúbulo, o tamanho do passo da motora (ou seja, a distância movida para cada molécula de ATP hidrolisada) pode ser medido. Como veremos no Capítulo 9, microscópios ópticos têm uma resolução limitada por causa da difração da luz, mas métodos computacionais e ópticos podem ser utilizados para determinar a posição de uma esfera com uma precisão muito maior do que a resolução limite do microscópio. Com o uso de tais técnicas, movimentos muito pequenos – na ordem de nanômetros – podem ser facilmente detectados e quantificados.

Uma outra vantagem de se ligar moléculas a esferas grandes é que as esferas podem servir como "alças" pelas quais as moléculas podem ser manipuladas. Isso permite que forças sejam aplicadas às moléculas e sua resposta seja observada. Por exemplo, a velocidade ou o tamanho do passo de uma motora pode ser medido em função da força contra a qual ela está puxando. Como discutido no próximo capítulo, um feixe de *laser* focalizado pode ser utilizado como uma "pinça óptica" para gerar uma força mecânica sobre uma esfera, permitindo que proteínas motoras sejam estudadas sob uma força aplicada (ver Figura 9-35). Esferas também podem ser manipuladas usando-se um campo magnético, uma tecnologia conhecida como "pinças magnéticas". Caso múltiplas esferas estejam presentes em um campo magnético, todas experimentarão a mesma força, permitindo que grandes quantidades de esferas sejam manipuladas em paralelo em um único experimento.

Enquanto esferas podem ser utilizadas como marcadoras para rastrear os movimentos de proteínas, é claramente preferível sermos capazes de visualizar as próprias proteínas. No próximo capítulo, veremos que refinamentos recentes na microscopia tornaram isso possível.

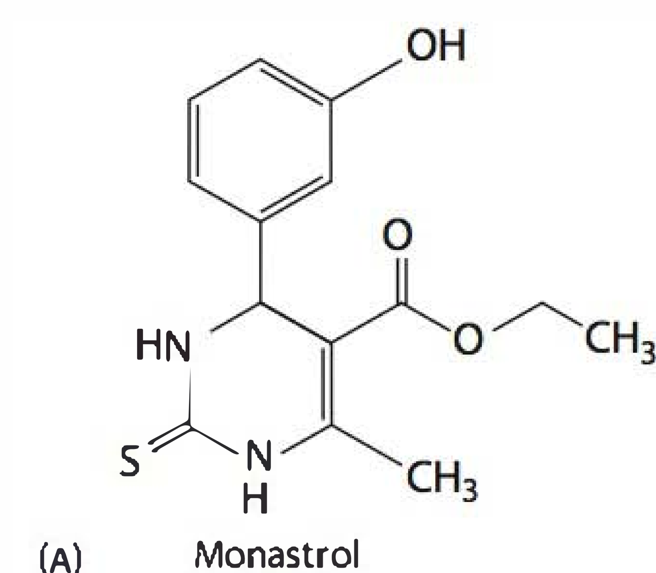
A função da proteína pode ser interrompida seletivamente com pequenas moléculas

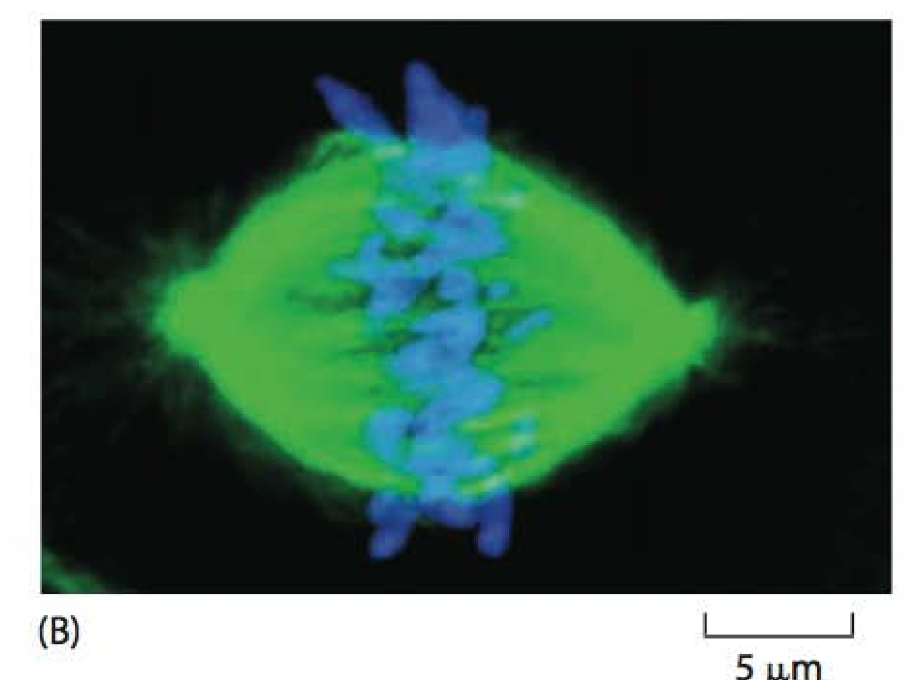
Inibidores químicos têm contribuído para o desenvolvimento da biologia celular. Por exemplo, o inibidor de microtúbulos colchicina é utilizado de rotina para testar se os microtúbulos são necessários para um dado processo biológico; ele também levou à primeira purificação da tubulina, várias décadas atrás. No passado, essas pequenas moléculas normalmente eram produtos naturais; isto é, eram sintetizadas por criaturas vivas. Embora, como um todo, os produtos naturais tenham sido muito úteis na ciência e na medicina (ver, p. ex., Tabela 6-4, p. 385), eles atuaram em um número limitado de processos biológicos. Entretanto, o recente desenvolvimento de métodos para sintetizar centenas de milhares de pequenas moléculas e para realizar varreduras automatizadas em larga escala mantém a promessa de identificar inibidores químicos para praticamente qualquer processo biológico. Em tais abordagens, grandes coleções de compostos químicos pequenos são testadas simultaneamente, em células vivas ou em ensaios livres de células. Uma vez que um inibidor é identificado, ele pode ser utilizado como sonda para identificar, por cromatografia de afinidade (ver Figura 8-13C) ou outros meios, a proteína na qual o inibidor se liga. A principal estratégia, muitas vezes chamada de **biologia química**, identificou com sucesso inibidores de várias proteínas que realizam processos-chave na biologia celular. A proteína cinesina que funciona na mitose, por exemplo, foi identificada por esse método (**Figura 8-27**). Inibidores químicos deram aos biólogos celulares um grande controle sobre o momento da inibição, uma vez que as substâncias podem ser rapidamente adicionadas ou removidas das células, permitindo que a função da proteína seja ativada ou desativada rapidamente.

A estrutura proteica pode ser determinada pelo uso de difração de raios X

A principal técnica que tem sido utilizada para descobrir a estrutura tridimensional de moléculas, incluindo proteínas, a uma resolução atômica é a **cristalografia por raios X**. Os raios X, assim como a luz, são uma forma de radiação eletromagnética, mas têm um comprimento de ondas mais curto, normalmente em torno de 0,1 nm (o diâmetro de um átomo de hidrogênio). Se um estreito feixe paralelo de raios X é direcionado para uma amostra de proteína pura, a maioria dos raios X passa diretamente através dela. Uma pequena fração, entretanto, é espalhada pelos átomos na amostra. Se a amostra é um cristal bem-ordenado, as ondas dispersas intensificarão umas às outras em pontos determinados e aparecerão como pontos de difração quando captadas por um detector apropriado (**Figura 8-28**).

A posição e a intensidade de cada ponto no padrão de difração de raios X contêm informação sobre as localizações dos átomos no cristal que deram origem a ele. A dedução da es-





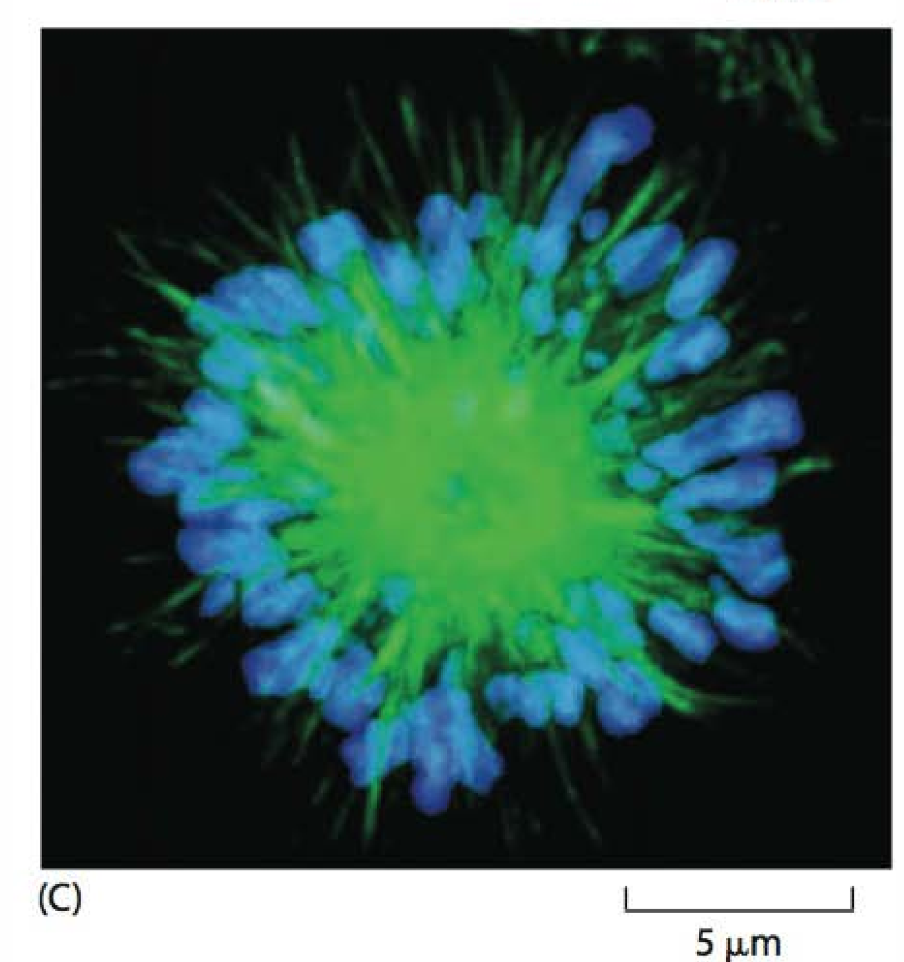


Figura 8-27 Inibidores de moléculas pequenas para manipulação de células vivas. (A) Estrutura química do monastrol, um inibidor de cinesina identificado em uma varredura de larga escala para moléculas pequenas que interrompem a mitose. (B) Fuso mitótico normal visto em uma célula não-tratada. Os microtúbulos estão corados em *verde* e os cromossomos em *azul*. (C) Fuso monopolar que se forma em células tratadas com monastrol. (B e C, de T. U. Mayer et al., *Science* 28:971-974, 1999. Com permissão de AAAS.)

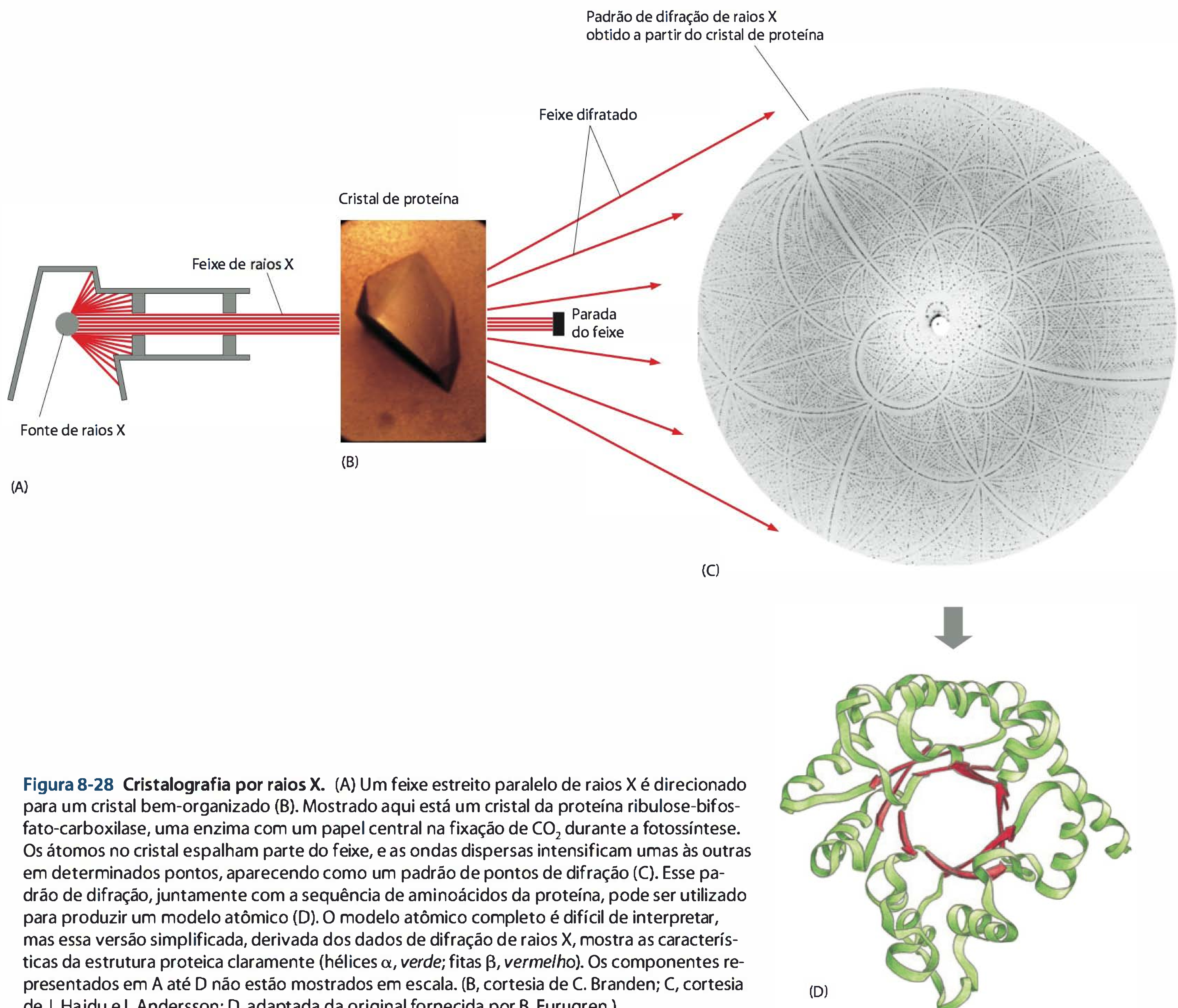


Figura 8-28 Cristalografia por raios X. (A) Um feixe estreito paralelo de raios X é direcionado para um cristal bem-organizado (B). Mostrado aqui está um cristal da proteína ribulose-bifosfato-carboxilase, uma enzima com um papel central na fixação de CO_2 durante a fotossíntese. Os átomos no cristal espalham parte do feixe, e as ondas dispersas intensificam umas às outras em determinados pontos, aparecendo como um padrão de pontos de difração (C). Esse padrão de difração, juntamente com a sequência de aminoácidos da proteína, pode ser utilizado para produzir um modelo atômico (D). O modelo atômico completo é difícil de interpretar, mas essa versão simplificada, derivada dos dados de difração de raios X, mostra as características da estrutura proteica claramente (hélices α, *verde*; fitas β, *vermelho*). Os componentes representados em A até D não estão mostrados em escala. (B, cortesia de C. Branden; C, cortesia de J. Hajdu e I. Andersson; D, adaptada da original fornecida por B. Furugren.)

trutura tridimensional de uma molécula grande a partir do padrão de difração do seu cristal é uma tarefa complexa e não foi conseguida para uma molécula proteica até 1960. Mas nos anos recentes a análise por difração de raios X tem se tornado cada vez mais automatizada, e agora a etapa mais lenta provavelmente seja a geração de cristais de proteína adequados. Essa etapa requer grandes quantidades de proteína muito pura e muitas vezes envolve anos de tentativas e erros para descobrir as condições adequadas de cristalização; o ritmo acelerou bastante com o uso de técnicas de DNA recombinante para produzir proteínas puras e técnicas de robótica para testar grandes números de condições de cristalização.

A análise do padrão de difração resultante produz um mapa tridimensional complexo da densidade dos elétrons. A interpretação desse mapa – tradução dos seus contornos em uma estrutura tridimensional – é um procedimento complicado que requer conhecimento da sequência de aminoácidos da proteína. Muito por tentativa e erro, a sequência e o mapa da densidade dos elétrons são correlacionados por computador para se conseguir a melhor combinação. A confiabilidade do modelo atômico final depende da resolução dos dados cristalográficos originais: uma resolução de 0,5 nm pode produzir um mapa de baixa resolução do esqueleto polipeptídico, enquanto que uma resolução de 0,15 nm permite que todos os átomos que não são do hidrogênio na molécula sejam posicionados de modo confiável.

Um modelo atômico completo muitas vezes é complexo demais para ser apreciado diretamente, mas versões simplificadas que mostram as características estruturais essenciais das proteínas podem ser prontamente derivadas dele (ver Painel 3-2, p. 132-133). As estrutu-

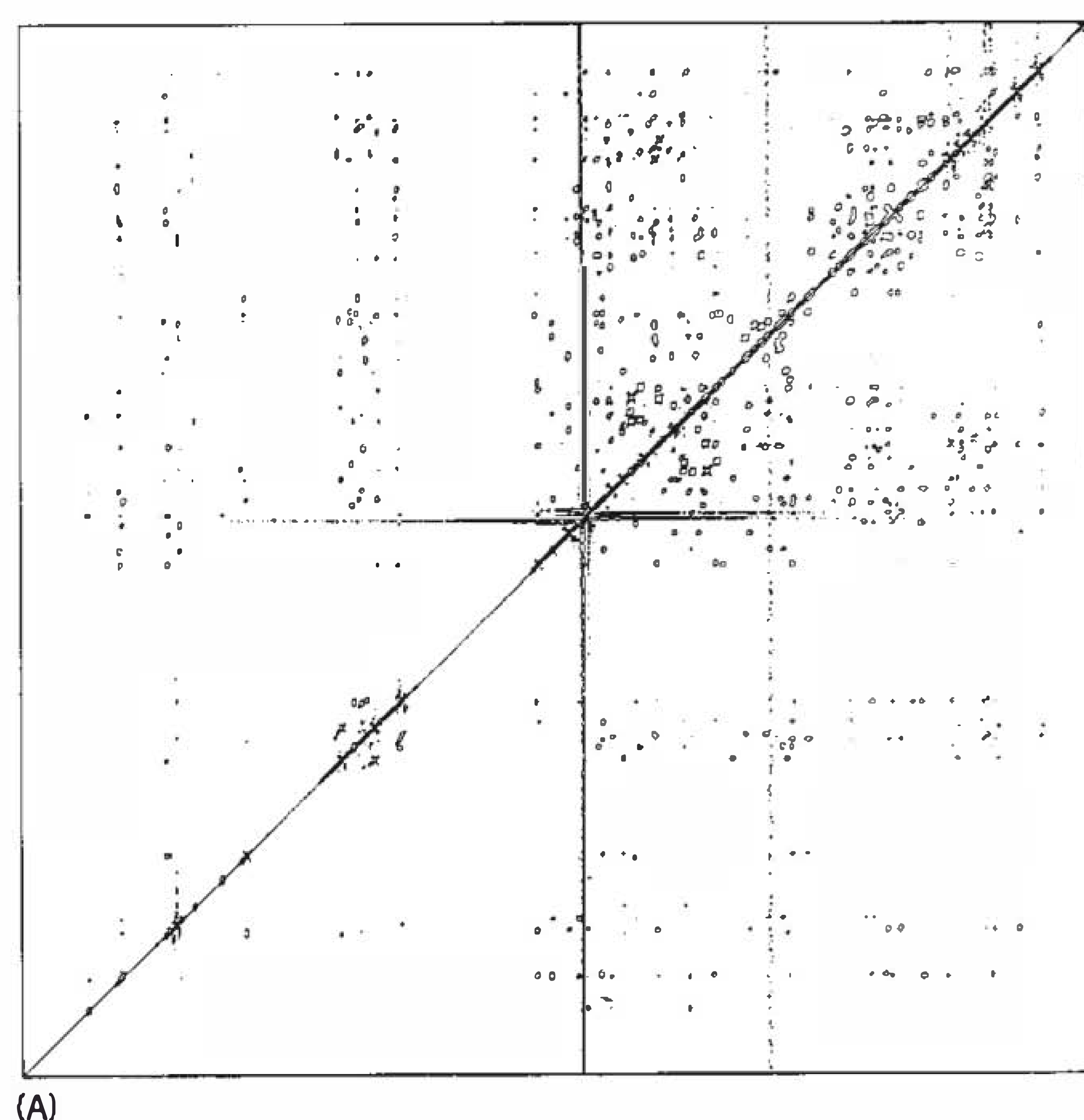
ras tridimensionais de cerca de 20.000 proteínas diferentes têm sido determinadas por cristalografia por raios X ou por espectrometria NMR (ver a seguir) – suficiente para começar a observar o surgimento de famílias com estruturas comuns. Essas estruturas ou dobramentos de proteínas muitas vezes parecem ser mais conservados na evolução do que as sequências de aminoácidos que os formam (ver Figura 3-13).

Técnicas de cristalografia por raios X também podem ser aplicadas no estudo de complexos macromoleculares. Em um triunfo recente, o método foi utilizado para determinar a estrutura do ribossomo, uma máquina grande e complexa feita de vários RNAs e mais de 50 proteínas (ver Figura 6-64). A determinação necessitou do uso de um síncrotron, uma fonte de radiação que gera raios X com a intensidade necessária para analisar os cristais de tais complexos macromoleculares grandes.

A NMR pode ser utilizada para determinar a estrutura de proteínas em solução

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (**NMR**, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) foi muito utilizada por vários anos para analisar a estrutura de pequenas moléculas. Essa técnica está sendo cada vez mais utilizada para estudar pequenas proteínas ou domínios proteicos. Diferentemente da cristalografia por raios X, a NMR não depende da disponibilidade de amostra cristalina. Essa técnica simplesmente requer um pequeno volume de solução proteica concentrada que é colocado em um campo magnético forte; de fato, ela é a principal técnica que gera evidências detalhadas sobre a estrutura tridimensional de moléculas em solução.

Certos núcleos atômicos, particularmente o núcleo do hidrogênio, têm um momento magnético ou *spin*: isto é, eles possuem uma magnetização intrínseca, como uma barra magnética. O *spin* se alinha ao longo do campo magnético forte, mas pode ser mudado para um estado excitado, desalinhado, em resposta a pulsos de radiofrequência (RF) aplicados de radiação eletromagnética. Quando o núcleo de hidrogênio excitado retorna a seu estado alinhado, ele emite a radiação RF, que pode ser medida e apresentada como um espectro. A natureza da radiação emitida depende do meio de cada núcleo de hidrogênio e, se um núcleo é excitado, ele influencia a absorção e a emissão da radiação por outro núcleo localizado próximo a ele. Consequentemente, é possível, por uma elaboração engenhosa da técnica de NMR básica conhecida como NMR bidimensional, distinguir os sinais a partir do núcleo de hidrogênio em diferentes resíduos de aminoácidos, e identificar e medir as pequenas mudanças nesses sinais que ocorrem quando os núcleos de hidrogênio estão próximos o suficiente para interagir. Como o tamanho de tal mudança revela a distância entre o par de átomos de hidrogênio que estão interagindo, a NMR pode fornecer informações sobre as distâncias entre as partes da molécula proteica. Combinando-se essa informação ao conhecimento da sequência de aminoácidos, é possível em princípio computar a estrutura tridimensional da proteína (**Figura 8-29**).



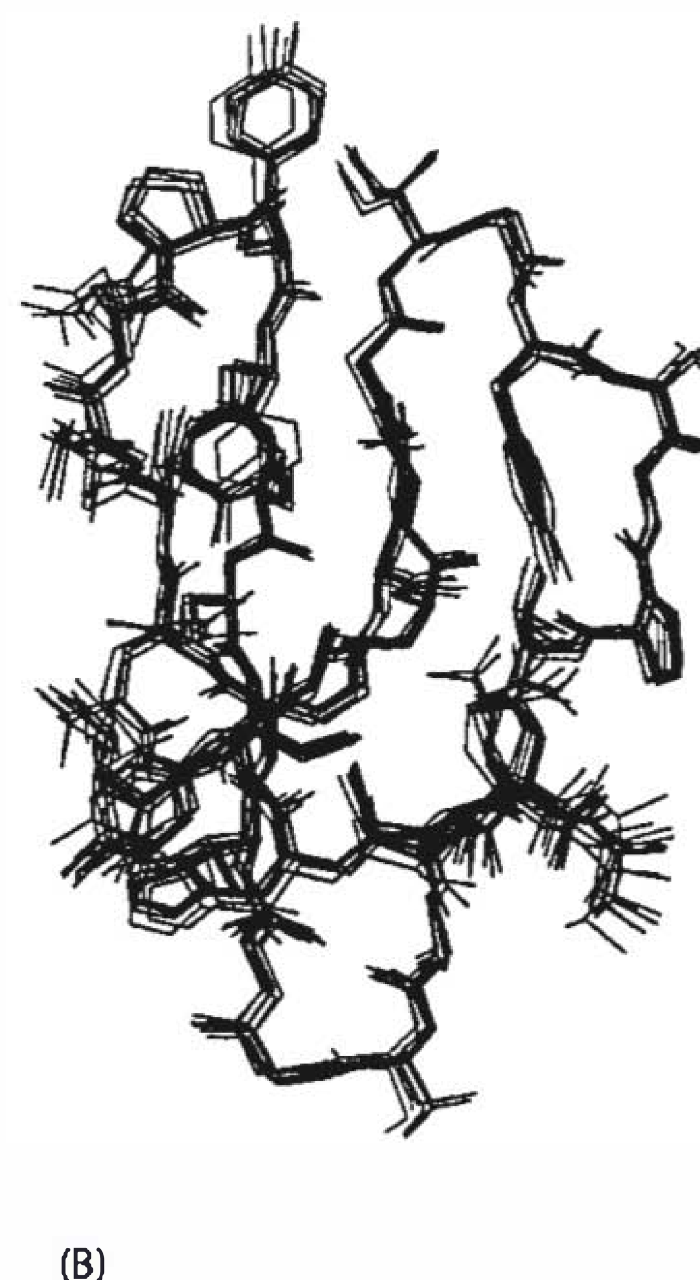


Figura 8-29 Espectroscopia de NMR. (A) Um exemplo dos dados da máquina de NMR. Este espectro bidimensional de NMR é derivado do domínio C-terminal da enzima celulase. Os pontos representam as interações entre átomos de hidrogênio que estão próximos a vizinhos na proteína e então refletem a distância que os separa. Métodos computacionais complexos, em conjunto com a sequência de aminoácidos conhecida, permitem que estruturas compatíveis possíveis sejam derivadas. Em (B), dez estruturas da enzima, que satisfazem as restrições de distância igualmente bem, estão representadas sobrepostas, dando uma boa indicação da provável estrutura tridimensional. (Cortesia de P. Kraulis.)

Por razões técnicas, a estrutura de pequenas proteínas de cerca de 20.000 dáltons ou menos pode ser mais prontamente determinada por espectroscopia de NMR. A resolução diminui à medida que o tamanho de uma macromolécula aumenta. Contudo, avanços técnicos recentes empurraram o limite para cerca de 100.000 dáltons, tornando assim a maioria das proteínas acessível à análise estrutural por NMR.

Como estudos por NMR são realizados em solução, esse método também oferece um meio conveniente de monitorar alterações na estrutura proteica, por exemplo, durante o dobramento da proteína ou quando a proteína se liga a outra molécula. A NMR também é muito utilizada para investigar moléculas diferentes de proteínas, sendo útil, por exemplo, como um método para determinar as estruturas tridimensionais de moléculas de RNA e as cadeias laterais complexas de carboidratos das glicoproteínas.

Alguns marcos no desenvolvimento da cristalografia por raios X e NMR estão listados na **Tabela 8-2**.

A sequência da proteína e sua estrutura fornecem pistas sobre a função proteica

Tendo discutido métodos para purificar e analisar proteínas, voltamos para uma situação comum na biologia celular e molecular: um pesquisador identificou um gene importante para um processo biológico, mas não tem conhecimento direto das propriedades bioquímicas do seu produto proteico.

Graças à proliferação das sequências de proteínas e ácidos nucleicos que estão catalogadas nos bancos de dados genômicos, a função de um gene – e a proteína por ele codificada – pode muitas vezes ser predita simplesmente comparando-se sua sequência com as dos genes anteriormente caracterizados (ver Figura 3-14). Como a sequência de amino-

Tabela 8-2 **Marcos importantes no desenvolvimento da cristalografia por raios X e NMR e suas aplicações a moléculas biológicas**

1864	**Hoppe-Seyler** cristaliza e dá nome à proteína hemoglobina.
1895	**Röntgen** observa que uma nova forma de radiação penetrante, a qual ele nomeou raios X, é produzida quando raios do cátodo (elétrons) atingem um alvo de metal.
1912	**Von Laue** obtém os primeiros padrões de difração de raios X, passando raios X através de um cristal de sulfeto de zinco. **W. L. Bragg** propõe uma simples relação entre o padrão de difração de raios X e o arranjo de átomos em um cristal que produziu o padrão.
1926	**Summer** obtém cristais da enzima urease a partir de extratos de feijão e demonstra que as proteínas têm atividade catalítica.
1931	**Pauling** publica seu primeiro experimento na "The Nature of the Chemical Bond", detalhando as regras da ligação covalente.
1934	**Bernal** e **Crowfoot** apresentam os primeiros padrões detalhados de difração de raios X de uma proteína, obtidos a partir de cristais da enzima pepsina.
1935	**Patterson** desenvolve um método analítico para a determinação do espaçamento interatômico a partir de dados de raios X.
1941	**Astbury** obtém o primeiro padrão de difração de raios X do DNA.
1946	**Block** e **Purcell** descrevem NMR.
1951	**Pauling** e **Corey** propõem uma estrutura de conformação helicoidal de uma cadeia de L-aminoácidos – a hélice α – e a estrutura de uma folha β pregueada, as quais foram, mais tarde, encontradas em várias proteínas.
1953	**Watson** e **Crick** propõem o modelo de dupla-hélice do DNA, com base nos padrões de difração de raios X obtidos por **Franklin** e **Wilkins**.
1954	**Perutz** e colegas desenvolvem métodos de átomos pesados para solucionar o problema de fase na cristalografia de proteínas.
1960	**Kendrew** descreve a primeira estrutura detalhada de uma proteína (mioglobina de esperma de baleia) a uma resolução de 0,2 nm, e **Perutz** apresenta uma estrutura com resolução mais baixa da proteína hemoglobina.
1966	**Phillips** descreve a estrutura da lisozima, a primeira enzima a ter a sua estrutura analisada em detalhes.
1971	**Jeener** propõe a utilização de NMR bidimensional, e **Wuthrich** e colegas utilizaram pela primeira vez o método para solucionar uma estrutura proteica no início dos anos de 1980.
1976	**Kim** e **Rich,** assim como **Klug** e colegas, descrevem a estrutura tridimensional detalhada do tRNA determinada por difração de raios X.
1977-1978	**Holmes** e **Klug** determinam a estrutura do vírus do mosaico do tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*), e **Harrison** e **Rossman** determinam a estrutura de dois pequenos vírus esféricos.
1985	**Michel, Deisenhofer** e colegas determinam a primeira estrutura de uma proteína transmembrana (o centro de reação de uma bactéria) por cristalografia por raios X. **Henderson** e colegas obtêm a estrutura da bacteriorrodopsina, uma proteína transmembrana, por métodos de microscopia eletrônica de alta resolução entre 1975 e 1990.

```
Score =  399 bits (1025), Expect = e-111
Identities = 198/290 (68%), Positives = 241/290 (82%), Gaps = 1/290

Query: 57  MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIREISLLKELNH 116
            ME ++KVEKIGEGTYGVVYKA +K T E +ALKKIRL+ E EGVPSTAIREISLLKE+NH
Sbjct: 1   MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKALDKATNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIREISLLKEMNH 60

Query: 117 PNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHS 176
             NIV+L DV+H+E ++YLVFE+L  DLKKFMD+          LIKSYL+Q+L G+A+CHS
Sbjct: 61  GNIVRLHDVVHSEKRLYLVFEYLDLDLKKFMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQILHGVAYCHS 120

Query: 177 HRVLHRDLKPQNLLINTE-GAIKLADFGLARAFGVPVRTYTHEVVTLWYRAPEILLGCKY 235
            HRVLHRDLKPQNLLI+    A+KLADFGLARAFG+PVRT+THEVVTLWYRAPEILLG +
Sbjct: 121 HRVLHRDLKPQNLLIDRRTNALKLADFGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGARQ 180

Query: 236 YSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQLFRIFRTLGTPDEVVWPGVTSMPDYKPS 295
            YST VD+WS+GCIFAEMV ++ LFPGDSEID+LF+IFR LGTP+E  WPGV+ +PD+K +
Sbjct: 181 YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQKPLFPGDSEIDELFKIFRILGTPNEQSWPGVSCLPDFKTA 240

Query: 296 FPKWARQDFSKVVPPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRISAKAALAHPFFQDV 345
            FP+W  QD + VVP LD  G  LLS+ML Y+P+KRI+A+ AL H +F+D+
Sbjct: 241 FPRWQAQDLATVVPNLDPAGLDLLSKMLRYEPSKRITARQALEHEYFKDL 290
```

Figura 8-30 Resultados de uma análise por BLAST. Bancos de dados de sequências podem ser pesquisados para encontrar sequências similares de aminoácidos ou de nucleotídeos. Aqui uma busca por proteínas similares à proteína humana reguladora do ciclo celular Cdc2 (*Query*) localizou a Cdc2 de milho (*Sbjct*), que é idêntica em 68% (e similar em 82%) à Cdc2 humana na sua sequência de aminoácidos. O alinhamento inicia no resíduo 57 da proteína Query, sugerindo que a proteína humana tem uma região N-terminal que está ausente na proteína do milho. Os blocos verdes indicam as diferenças na sequência; e a barra amarela resume as similaridades: quando as duas sequências de aminoácidos são idênticas, o resíduo é mostrado; as substituições conservativas de aminoácidos estão indicadas por um sinal de soma (+). Apenas uma pequena lacuna foi introduzida – indicada pela seta vermelha na posição 194 da sequência Query – para alinhar as duas sequências ao máximo. O escore de alinhamento (*Score*), que é expresso em dois tipos diferentes de unidades, leva em conta as penalidades para substituições e lacunas; quanto mais alto o escore de alinhamento, melhor é a semelhança. O significado do alinhamento está refletido no valor de *Expectation* (E), que representa quantas vezes se esperaria que ocorresse um alinhamento ao acaso. Quanto menor o valor de E, mais significativa é a semelhança; o valor extremamente baixo aqui (e^{-111}) indica certa significância. Os valores de E muito mais altos do que 0,1 provavelmente não refletem uma relação verdadeira. Por exemplo, um valor de E de 0,1 significa que existe uma chance de 1 em 10 que tal alinhamento ocorra somente por acaso.

ácidos determina a estrutura proteica e a estrutura dita a função bioquímica, as proteínas que compartilham uma sequência de aminoácidos similar normalmente têm a mesma estrutura e realizam funções bioquímicas semelhantes, mesmo quando são encontradas em organismos pouco relacionados. Na biologia celular moderna, o estudo de uma proteína recém-descoberta normalmente inicia por uma procura por proteínas previamente caracterizadas que são similares em suas sequências de aminoácidos.

A procura por genes ou proteínas homólogas em uma coleção de sequências conhecidas normalmente é realizada pela *World Wide Web* e envolve simplesmente a seleção de um banco de dados e a entrada da sequência desejada. Um programa de alinhamento de sequências – os mais populares são BLAST e FASTA – rastreia o banco de dados por sequências similares deslizando a sequência submetida ao longo das sequências arquivadas até que um grupo de resíduos se alinhe total ou parcialmente (**Figura 8-30**). Os resultados de até mesmo uma análise complexa – que pode ser realizada em uma sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos – são obtidos em poucos minutos. Tais comparações podem predizer as funções de proteínas individuais, de famílias proteicas ou mesmo da maioria do complemento da proteína de um organismo recém-sequenciado.

Como explicamos no Capítulo 3, várias proteínas que adotam a mesma conformação e têm funções relacionadas possuem uma relação muito distante para serem identificadas como claramente homólogas a partir de uma comparação de apenas sua sequência de aminoácidos (ver Figura 3-13). Assim, a capacidade de predizer com precisão a estrutura tridimensional de uma proteína a partir da sua sequência de aminoácidos melhoraria nossa habilidade de inferir uma função proteica a partir da informação da sequência no banco de dados genômico. Em anos recentes, o principal progresso tem sido realizado na predição da estrutura precisa de uma proteína. Essas predições têm como base, em parte, nosso conhecimento de dezenas de milhares de estruturas proteicas que já foram determinadas por cristalografia por raios X e espectrometria NMR e, em parte, cálculos usando nosso conhecimento sobre as forças físicas que atuam sobre os átomos. Entretanto, permanece o desafio substancial e importante para predizer as estruturas de proteínas que são grandes ou têm múltiplos domínios, ou para predizer as estruturas com os níveis muito altos de resolução necessários para ajudar na descoberta de substâncias com base em computação.

Enquanto encontrar sequências e estruturas homólogas para uma nova proteína fornece várias pistas sobre sua função, normalmente é necessário testar essas pistas por experimentação direta. Entretanto, as pistas geradas a partir de comparações de sequências normalmente levam o pesquisador na direção correta, e com isso o seu uso tornou-se uma das estratégias mais importantes na biologia celular moderna.

Resumo

A maioria das proteínas funciona em concerto com outras proteínas, e existem vários métodos para identificar e estudar as interações entre elas. Inibidores de pequenas moléculas permitem o estudo das funções das proteínas nas quais eles atuam em células vivas. Como as proteínas com estruturas similares frequentemente têm funções semelhantes, a atividade bioquímica de uma proteína muitas vezes pode ser predita pesquisando-se em bancos de dados proteínas já caracterizadas que são similares em suas sequências de aminoácidos.

ANÁLISE E MANIPULAÇÃO DE DNA

Até o início da década de 1970, o DNA era a molécula biológica mais difícil de ser analisada. Extremamente longa e quimicamente monótona, a fita de nucleotídeos que forma o material genético de um organismo somente podia ser examinada de forma indireta, pelo sequenciamento de proteína ou RNA ou pela análise genética. Atualmente, a situação mudou de forma significativa. Considerada a macromolécula da célula mais difícil de ser analisada, o DNA passou a ser a mais fácil. Agora é possível isolar uma região específica de quase todos os genomas para produzir um número praticamente ilimitado de cópias deles, e determinar a sequência de seus nucleotídeos em poucas horas. No ápice do Projeto Genoma Humano, os grandes laboratórios com máquinas automatizadas geraram sequências de DNA a uma velocidade de 1.000 nucleotídeos por segundo, diariamente. Por meio de técnicas relacionadas, um gene isolado pode ser alterado (engenharia de DNA) e transferido de volta para a linhagem germinativa de um animal ou de um vegetal, tornando-se uma parte funcional e hereditária do genoma do organismo.

Esses avanços técnicos na **engenharia genética** – a habilidade de manipular DNA com precisão em um tubo de ensaio ou em um organismo – tiveram grande impacto em todos os aspectos da biologia celular, facilitando o estudo de células e de suas macromoléculas de modo inimaginável anteriormente. A **tecnologia do DNA recombinante** compreende uma mistura de técnicas, algumas recentemente desenvolvidas e algumas adotadas de outras áreas como a genética microbiana (**Tabela 8-3**). Dentre estas técnicas estão as seguintes técnicas-chave:

1. Clivagem de DNA em sítios específicos por meio de nucleases de restrição, que facilitaram muito o isolamento e a manipulação de genes individuais.
2. Ligação de DNA, que torna possível desenhar e construir moléculas de DNA não encontradas na natureza.
3. Clonagem de DNA pelo uso de vetores de clonagem, ou pela reação em cadeia da polimerase, na qual uma porção de DNA é repetidamente copiada para gerar vários bilhões de moléculas idênticas.
4. Hibridização de ácidos nucleicos, que torna possível encontrar uma sequência específica de DNA ou de RNA com grande precisão e sensibilidade, com base em sua habilidade de se ligar seletivamente a uma sequência complementar de ácidos nucleicos.
5. Determinação rápida da sequência de nucleotídeos de qualquer DNA (mesmo genomas inteiros), o que torna possível identificar genes e deduzir a sequência de aminoácidos das proteínas que eles codificam.
6. Monitoramento simultâneo do nível de mRNA produzido por gene na célula, utilizando microarranjos de ácidos nucleicos, nos quais dezenas de milhares de reações de hibridização ocorrem simultaneamente.

Nesta seção, descreveremos cada uma dessas técnicas básicas, que juntas revolucionaram o estudo da biologia celular.

Nucleases de restrição cortam grandes moléculas de DNA em fragmentos

Diferentemente de uma proteína, um gene não existe como uma entidade separada nas células, mas sim como uma região pequena de uma molécula de DNA muito maior. Embora a molécula de DNA na célula possa ser quebrada aleatoriamente em pequenos pedaços por força mecânica, um fragmento contendo um único gene no genoma de mamíferos continua sendo apenas um entre centenas de milhares de fragmentos de DNA, ou até mais, indistinguíveis pelo seu tamanho médio. Como um gene como este pode ser purificado? Como todas as moléculas de DNA consistem em uma mistura aproximadamente igual dos mesmos quatro nucleotídeos, elas não podem ser prontamente separadas, como as proteínas podem, de acordo com as suas cargas e propriedades de ligação diferentes.

A solução desses problemas começou a emergir com a descoberta das **nucleases de restrição**. Essas enzimas, que podem ser purificadas a partir de bactérias, cortam a dupla-hélice de DNA em sítios específicos, definidos pela sequência de nucleotídeos local, clivando, desse modo, uma longa molécula de DNA de fita dupla em fragmentos de tamanhos estritamente definidos. Diferentes nucleases de restrição têm especificidades diferentes, sendo relativamente simples encontrar uma enzima que possa criar um fragmento de DNA que inclua um gene em particular. O tamanho do fragmento de DNA pode então ser utilizado como base para a purificação parcial de um gene de uma mistura.

Tabela 8-3 Alguns dos maiores passos no desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante e da tecnologia de transgênicos

1869	**Miescher** isola pela primeira vez o DNA de células brancas do sangue obtidos de curativos com pus de pacientes em um hospital.
1944	**Avery** fornece evidências de que o DNA, e não a proteína, carrega a informação genética durante a transformação bacteriana.
1953	**Watson** e **Crick** propõem o modelo de dupla-hélice para a estrutura de DNA, com base nos resultados de raios X de **Franklin** e **Wilkins**.
1955	**Kornberg** descobre a DNA-polimerase, a enzima atualmente utilizada para produzir sondas de DNA marcadas.
1961	**Marmur** e **Doty** descobrem a renaturação do DNA, estabelecendo a especificidade e a viabilidade das reações de hibridização dos ácidos nucleicos.
1962	**Arber** fornece a primeira evidência para a existência das nucleases de restrição do DNA, levando a sua purificação e a sua utilização na caracterização da sequência de DNA por **Nathans** e **H. Smith**.
1966	**Nirenberg, Ochoa** e **Khorana** elucidam o código genético.
1967	**Gellert** descobre a DNA-ligase, a enzima utilizada para unir fragmentos de DNA.
1972-1973	Técnicas de clonagem de DNA são desenvolvidas pelos laboratórios de **Boyer, Cohen, Berg** e seus colegas na Universidade de Stanford e na Universidade da Califórnia em São Francisco.
1975	**Southern** desenvolve a hibridização após a transferência de gel para a detecção de sequências específicas de DNA.
1975-1977	**Sanger** e **Barrell**, assim como **Maxam** e **Gilbert,** desenvolvem métodos rápidos de sequenciamento de DNA.
1981-1982	**Palmiter** e **Brinster** produzem camundongos transgênicos; **Spradling** e **Rubin** produzem moscas-das-frutas transgênicas.
1982	**GenBank**, o banco de dados público de sequências genéticas do NIH, é estabelecido no Laboratório Nacional de Los Alamos.
1985	**Mullis** e colaboradores inventam a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*).
1987	**Capecchi** e **Smithies** introduzem métodos para realizar a substituição de genes-alvo em células-tronco embrionárias de camundongo.
1989	**Fields** e **Song** desenvolvem o sistema de dois híbridos em leveduras para identificar e estudar a interação de proteínas.
1989	**Olson** e colegas descrevem sítios de sequências marcadoras, extensões únicas de DNA que são utilizadas para fazer mapas físicos dos cromossomos humanos.
1990	**Lipman** e colegas publicam o BLAST, um algoritmo utilizado para procurar homologia entre sequências de DNA e de proteína.
1990	**Simon** e colegas estudam como utilizar eficientemente os cromossomos artificiais de bactérias (BACs, *bacterial artificial chromosomes*) para carregar grandes pedaços de DNA humano clonado para sequenciamento.
1991	**Hood** e **Hunkapillar** introduzem uma nova tecnologia de sequenciamento automatizado de DNA.
1995	**Venter** e colegas sequenciam o primeiro genoma completo, o da bactéria *Haemophilus influenzae*.
1996	**Goffeau** e um grupo internacional de pesquisadores anunciam a conclusão da primeira sequência genômica de um eucarioto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
1996-1997	**Lockhart e colegas**, assim como **Brown** e **DeRisi**, produzem microarranjos de DNA, que permitem a monitoração simultânea de milhares de genes.
1998	**Sulston** e **Waterston** e colegas produzem a primeira sequência completa de um organismo multicelular, o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*.
2001	Grupo de pesquisadores anuncia a conclusão do esboço da sequência genômica humana.
2004	Publicação da sequência genômica humana "concluída".

Diferentes espécies de bactérias produzem diferentes nucleases de restrição, que as protegem de viroses, degradando o DNA viral. Cada nuclease bacteriana reconhece uma sequência específica de 4 a 8 nucleotídeos no DNA. Essas sequências, que também ocorrem no genoma da própria bactéria, são protegidas da clivagem pela metilação nos nucleotídeos A ou C; as sequências no DNA estranho geralmente não são metiladas e, assim, são clivadas pelas nucleases de restrição. Muitas nucleases de restrição foram purificadas de diversas espécies de bactérias; várias centenas, das quais a maioria reconhece sequências de nucleotídeos diferentes, estão agora disponíveis comercialmente.

Algumas nucleases de restrição produzem clivagens assimétricas, que deixam pequenas caudas de fita simples nas duas extremidades de cada fragmento (**Figura 8-31**). Esse tipo de extremidade é conhecido como *extremidade coesiva*, uma vez que cada cauda pode formar pares de bases complementares com a cauda de qualquer outra extremidade produzida pela mesma enzima (**Figura 8-32**). As extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição permitem que quaisquer dois fragmentos de DNA possam ser unidos, desde que os fragmentos tenham sido gerados pela mesma nuclease de restrição (ou por uma outra nuclease que produza as mesmas extremidades coesivas). As moléculas de DNA produzidas pela união de dois ou mais fragmentos de DNA são chamadas de moléculas de **DNA recombinante**.

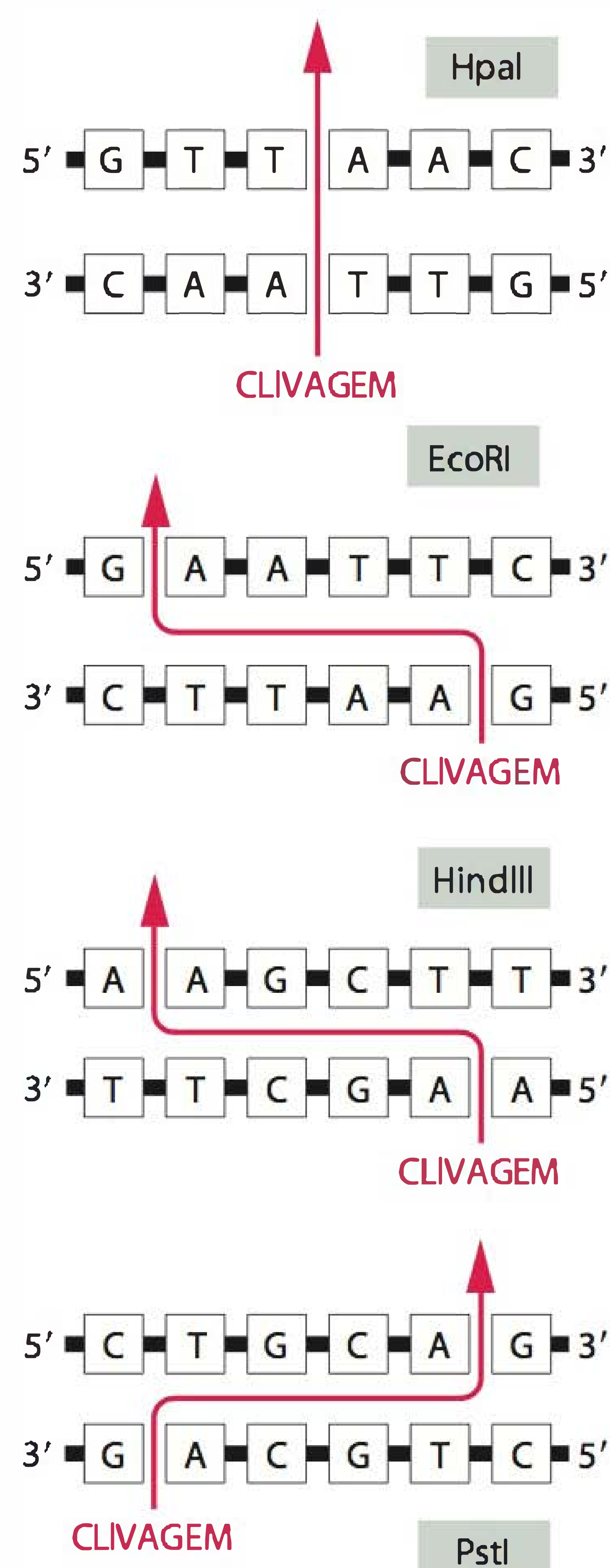


Figura 8-31 Sequências nucleotídicas de DNA reconhecidas por quatro nucleases de restrição muito utilizadas. Como nos exemplos mostrados, tais sequências frequentemente têm seis pares de base de comprimento e são "palindrômicas" (isto é, a sequência nucleotídica é a mesma se a hélice é girada 180 graus em torno do eixo central da região curta da hélice que é reconhecida). As enzimas clivam ambas as fitas de DNA na sequência de reconhecimento ou próximo a ela. Para os genes que codificam algumas enzimas, como HpaI, a clivagem gera extremidades cegas; para outras, como EcoRI, HindIII e PstI, a clivagem é assimétrica e cria extremidades coesivas. As nucleases de restrição são obtidas a partir de várias espécies de bactérias; HpaI é de *Haemophilus parainfluenzae*, EcoRI é de *Escherichia coli*, HindIII é de *Haemophilus influenzae* e PstI é de *Providencia stuartii*.

A eletroforese em gel separa moléculas de DNA de diferentes tamanhos

Os mesmos tipos de métodos de eletroforese em gel que provaram ser tão úteis na análise de proteínas podem determinar o tamanho e a pureza das moléculas de DNA. O procedimento é na verdade mais simples do que para proteínas: como cada nucleotídeo em uma molécula de ácido nucleico já carrega uma única carga negativa (no grupo fosfato), não existe a necessidade de adicionar o detergente SDS carregado negativamente, necessário para fazer com que as moléculas de proteína movam-se uniformemente na direção do eletrodo positivo. No caso de fragmentos de DNA menores do que 500 nucleotídeos de comprimento, géis de poliacrilamida especialmente projetados permitem a separação de moléculas que diferem apenas em um nucleotídeo no comprimento (**Figura 8-33**A). Os poros nos géis de poliacrilamida, entretanto, são muito pequenos para permitirem a passagem de moléculas de DNA muito grandes; para separá-las por tamanho, é utilizado um gel muito mais poroso formado por uma solução diluída de agarose (um polissacarídeo isolado de algas marinhas) (Figura 8-33B). Esses métodos de separação de DNA são amplamente utilizados tanto para propósitos analíticos como para propósitos preparativos.

Uma variação da eletroforese em gel de agarose, chamada de *eletroforese em gel de campo pulsado*, torna possível separar até mesmo moléculas de DNA muito longas. A eletroforese em gel de agarose comum falha ao separar tais moléculas porque o campo elétrico as estira, de modo que migram através do gel, em configurações que lembram os movimentos sinuosos de uma serpente, a uma velocidade que é independente do seu tamanho. Ao contrário, na eletroforese em gel de campo pulsado, a direção do campo elétrico se modifica periodicamente, o que força a molécula a se reorientar antes de continuar a se mover sinuosamente através do gel. Essa reorientação leva muito mais tempo para as moléculas maiores, de modo que as moléculas mais longas se movem mais lentamente do que as mais curtas. Consequentemente, até mesmo cromossomos inteiros de bactérias ou de leveduras podem ser separados em bandas discretas em géis de campo pulsado, podendo assim ser classificados e identificados com base no seu tamanho (Figura 8-33C). Embora um cromossomo típico de mamífero de 10^8 pares de bases seja muito longo para ser separado mesmo dessa maneira, os segmentos maiores desse cromossomo são prontamente separados e identificados se o DNA cromossomal é cortado primeiro com uma nuclease de restrição selecionada para reconhecer sequências que ocorrem apenas raramente (uma vez a cada 10 mil ou mais pares de nucleotídeos).

As bandas de DNA em géis de agarose ou de poliacrilamida são invisíveis a menos que o DNA seja marcado ou corado de alguma maneira. Um método sensível para corar DNA é expô-lo ao corante *brometo de etídeo*, que fluoresce sob luz ultravioleta quando está ligado ao DNA (ver Figura 8-33B,C). Um método de detecção ainda mais sensível incorpora um radioisótopo nas moléculas de DNA antes da eletroforese; o ^{32}P frequentemente é utilizado, já que pode ser incorporado nos fosfatos do DNA e emite uma partícula energética β que é facilmente detectada por autorradiografia, como na Figura 8-33. (Para discussão de radioisótopos, ver p. 601).

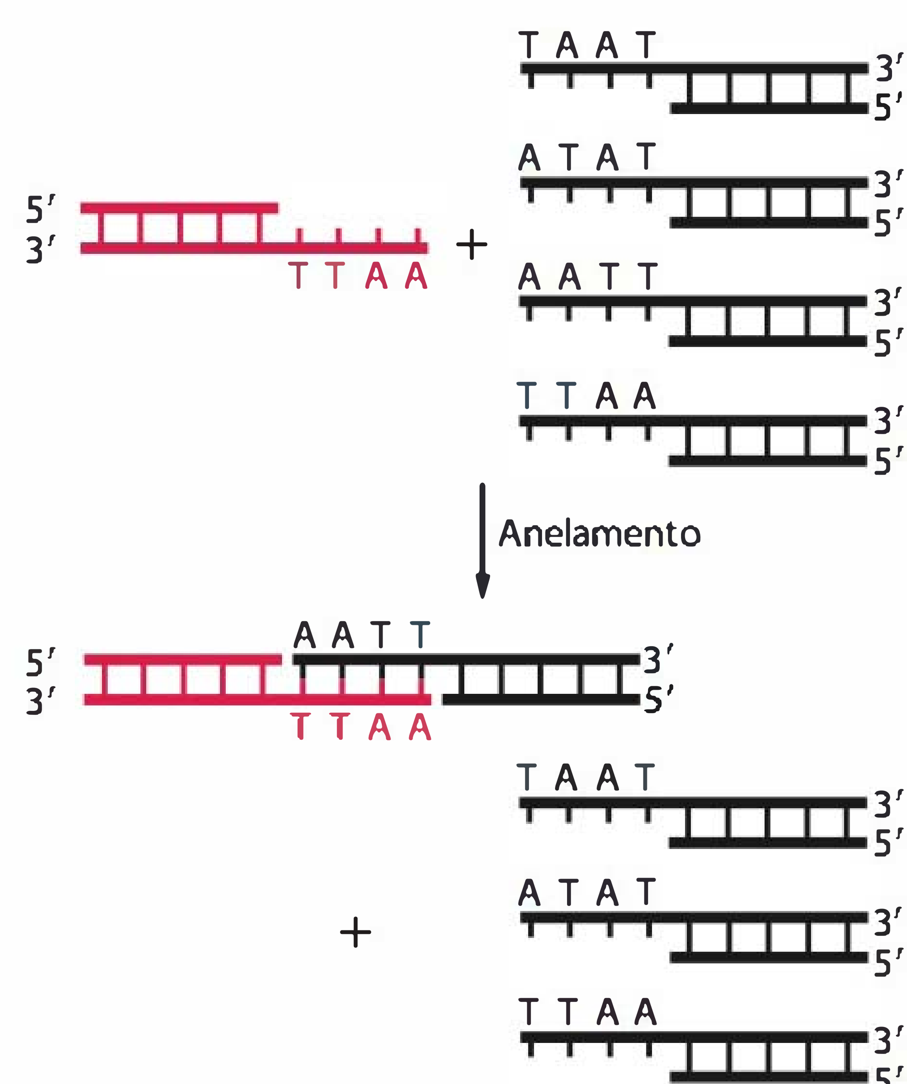


Figura 8-32 O uso de nucleases de restrição para produzir fragmentos de DNA que podem ser facilmente unidos. Fragmentos com as mesmas extremidades coesivas podem ser prontamente unidos pela complementaridade de bases entre suas extremidades coesivas, como ilustrado. Os dois fragmentos de DNA que são unidos neste exemplo foram produzidos pela nuclease de restrição EcoRI, enquanto os outros três fragmentos foram produzidos por nucleases de restrição diferentes que geraram extremidades coesivas diferentes (ver Figura 8-31). Os fragmentos com extremidades cegas, como os gerados por HpaI (ver Figura 8-31), podem ser unidos, com maior dificuldade.

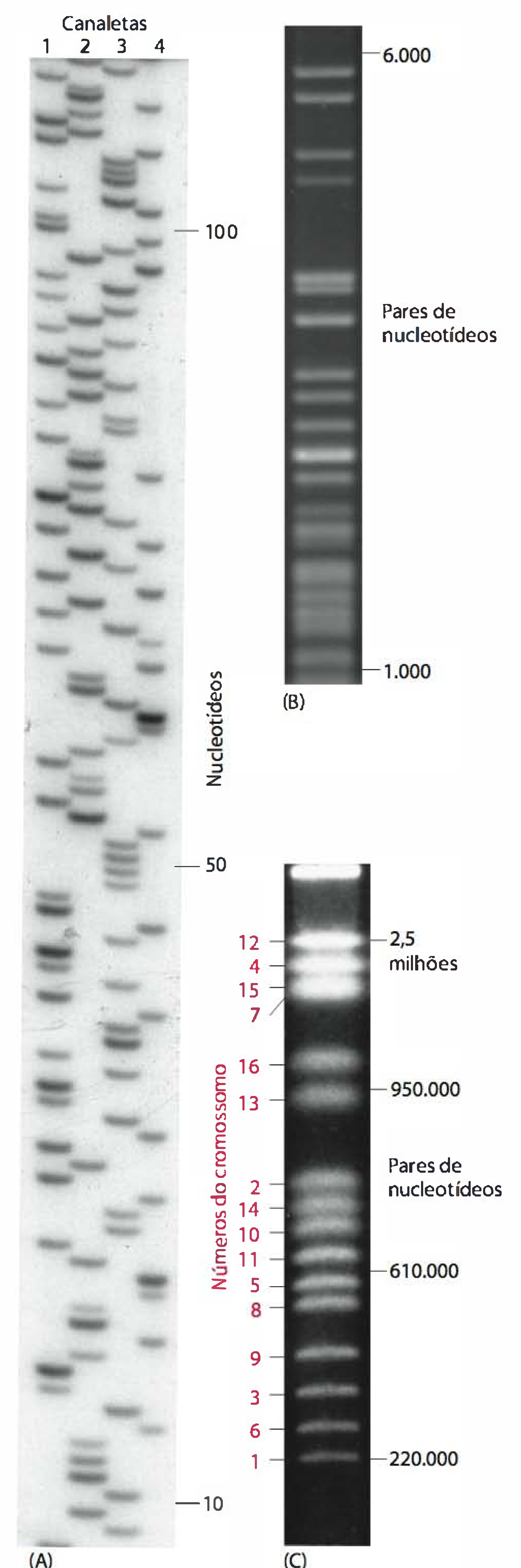


Figura 8-33 Técnicas de eletroforese em gel para separar moléculas de DNA pelo tamanho. Nos três exemplos mostrados, a eletroforese ocorre do topo para o final, de maneira que as moléculas de DNA maiores – e assim mais lentas – estão mais perto do topo do gel. (A) Um gel de poliacrilamida com pequenos poros é utilizado para fracionar DNA de fita simples. Na faixa de tamanho entre 10 e 500 nucleotídeos, as moléculas de DNA que diferem no tamanho por apenas um único nucleotídeo podem ser separadas umas das outras. No exemplo, as quatro canaletas representam um conjunto de moléculas de DNA sintetizadas durante um procedimento de sequenciamento de DNA. O DNA a ser sequenciado foi replicado artificialmente a partir de um sítio inicial fixo até pontos de parada variáveis, produzindo um conjunto de réplicas parciais com diferentes comprimentos. (A Figura 8-50 explica como tais conjuntos de réplicas parciais são sintetizados.) A canaleta 1 mostra todas as réplicas parciais que terminam em um G; a canaleta 2, todas aquelas que terminam em um A; a canaleta 3, todas aquelas que terminam em um T; e a canaleta 4, todas aquelas que terminam em um C. Como as moléculas de DNA utilizadas nestas reações são marcadas radiativamente, suas posições podem ser determinadas por autorradiografia, como mostrado.

(B) Um gel de agarose com poros de tamanho médio é utilizado para separar moléculas de DNA de fita dupla. Esse método é mais efetivo para separar moléculas com tamanhos entre 300 e 10.000 pares de nucleotídeos. Essas moléculas de DNA são fragmentos produzidos pela clivagem do genoma de um vírus bacteriano com uma nuclease de restrição e foram detectadas por sua fluorescência quando coradas com o corante brometo de etídeo. Em (C), a técnica de eletroforese em gel de agarose por campo pulsado foi utilizada para separar 16 cromossomos diferentes de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), que variam de tamanho de 220 mil a 2,5 milhões de pares de nucleotídeos. O DNA foi corado como em (B). As moléculas de DNA tão grandes quanto 10^7 pares de nucleotídeos podem ser separadas dessa maneira. (A, cortesia de Leander Lauffer e Peter Walter; B, cortesia de Ken Kreuzer; C, de D. Vollrath e R. W. Davis, *Nucleic Acids Res.* 15:7865-7876, 1987. Com permissão de Oxford University Press.)

As moléculas de DNA purificadas podem ser marcadas especificamente *in vitro* com radioisótopos ou com marcadores químicos

Dois procedimentos são amplamente utilizados para marcar as moléculas de DNA isoladas. No primeiro método, uma DNA-polimerase copia o DNA na presença de nucleotídeos que são radiativos (normalmente marcados com ^{32}P) ou marcados quimicamente (**Figura 8-34A**). Dessa maneira, as "sondas de DNA" contendo vários nucleotídeos marcados podem ser produzidas para reações de hibridização de ácidos nucleicos (discutido a seguir). O segundo procedimento utiliza a enzima de bacteriófago polinucleotídeo-cinase para transferir um único fosfato marcado com ^{32}P do ATP para a extremidade 5' de cada cadeia do DNA (Figura 8-34B). Como apenas um átomo de ^{32}P é incorporado pela cinase em cada fita de DNA, as moléculas de DNA marcadas dessa maneira em geral não são suficientemente radiativas para serem utilizadas como sondas de DNA; por serem marcadas em apenas uma extremidade, entretanto, elas têm sido de extremo valor para outras aplicações, incluindo DNA *footprinting*, como discutido no Capítulo 7.

Os métodos de marcação radiativa estão sendo substituídos pela marcação com moléculas que podem ser detectadas quimicamente ou por fluorescência. Para produzir tais moléculas de DNA não-radiativas, são utilizados precursores de nucleotídeos especialmente modificados (Figura 8-34C). Permite-se que uma molécula de DNA produzida dessa maneira se ligue a sua sequência de DNA complementar por hibridização, como discutido na próxima seção, sendo então detectada com um anticorpo (ou outro ligante) que reconhece especificamente sua cadeia lateral modificada (**Figura 8-35**).

As reações de hibridização de ácidos nucleicos fornecem uma maneira sensível para detectar as sequências específicas de nucleotídeos

Quando uma solução aquosa de DNA é aquecida até 100°C ou exposta a um pH muito alto (pH ≥ 13), a complementaridade de bases, que normalmente mantém as duas fitas da dupla-hélice unidas, é rompida, e a dupla-hélice rapidamente se dissocia em duas fitas simples. Esse processo, chamado de *desnaturação de DNA*, foi considerado irreversível durante vários anos. Em 1961, entretanto, descobriu-se que fitas simples complementares de DNA prontamente reconstituiriam duplas-hélices por um processo chamado de **hibridização** (também chamado de *renaturação do DNA*), se fossem mantidas por um período prolongado a 65°C. Podem ocorrer reações similares de hibridização entre quaisquer duas fitas simples de cadeias de ácidos nucleicos (DNA/DNA, RNA/RNA ou RNA/DNA), desde que tenham sequências de nucleotídeos complementares. Essas reações de hibridização específicas são

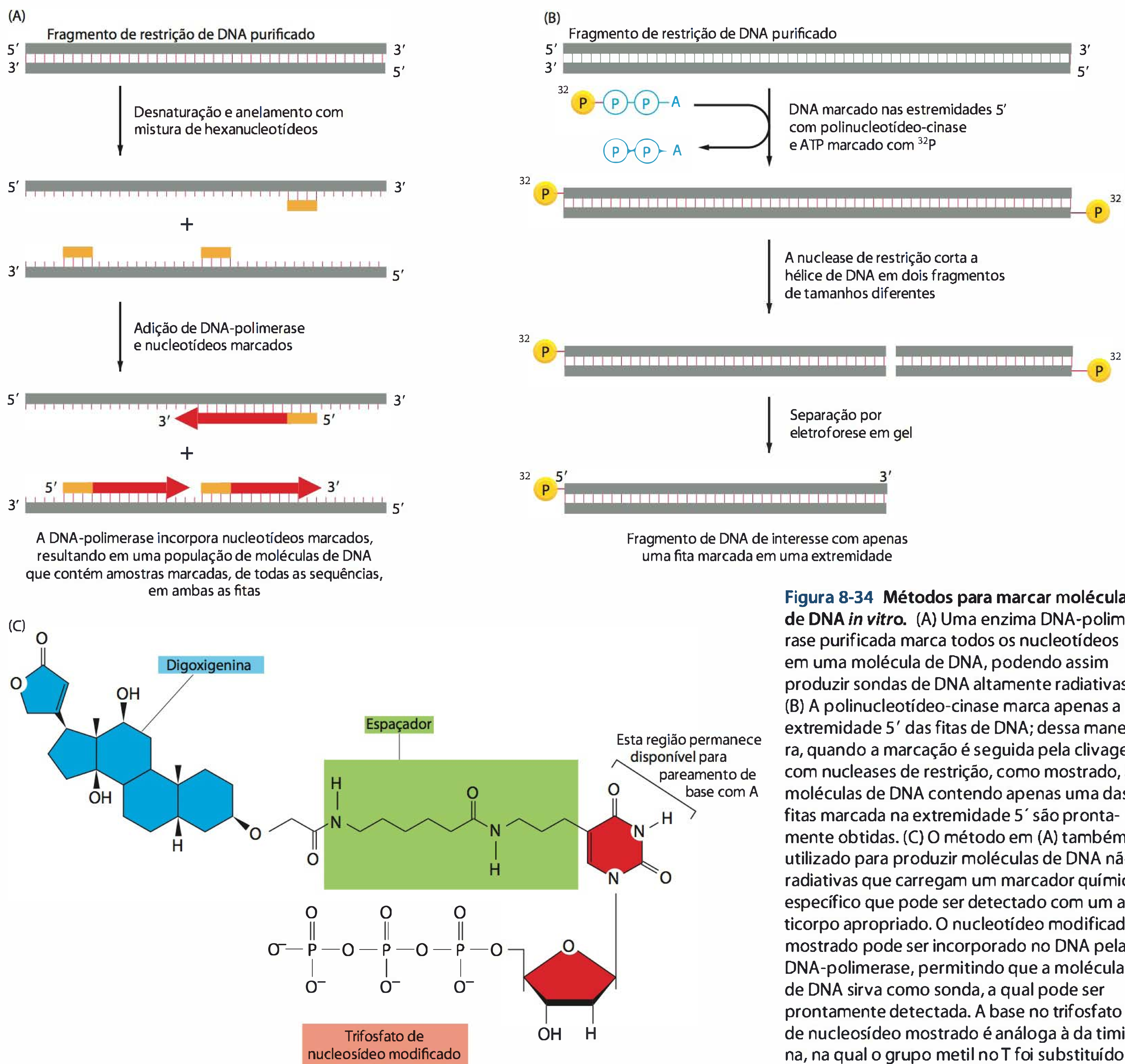


Figura 8-34 Métodos para marcar moléculas de DNA *in vitro*. (A) Uma enzima DNA-polimerase purificada marca todos os nucleotídeos em uma molécula de DNA, podendo assim produzir sondas de DNA altamente radiativas. (B) A polinucleotídeo-cinase marca apenas a extremidade 5′ das fitas de DNA; dessa maneira, quando a marcação é seguida pela clivagem com nucleases de restrição, como mostrado, as moléculas de DNA contendo apenas uma das fitas marcada na extremidade 5′ são prontamente obtidas. (C) O método em (A) também é utilizado para produzir moléculas de DNA não-radiativas que carregam um marcador químico específico que pode ser detectado com um anticorpo apropriado. O nucleotídeo modificado mostrado pode ser incorporado no DNA pela DNA-polimerase, permitindo que a molécula de DNA sirva como sonda, a qual pode ser prontamente detectada. A base no trifosfato de nucleosídeo mostrado é análoga à da timina, na qual o grupo metil no T foi substituído por um braço espaçador ligado ao esteroide digoxigenina de plantas. Um anticorpo antidigoxigenina ligado a um marcador visível como um corante fluorescente é usado para visualizar a sonda. Outros marcadores químicos, como a biotina, podem ser ligados a nucleotídeos e utilizados essencialmente do mesmo modo.

amplamente utilizadas para detectar e caracterizar sequências de nucleotídeos específicas tanto nas moléculas de RNA como nas de DNA.

As moléculas de DNA de fita simples utilizadas para detectar sequências complementares são conhecidas como **sondas**; essas moléculas, que carregam marcadores radiativos ou químicos para facilitar sua detecção, podem ter de 15 a milhares de nucleotídeos de extensão. As reações de hibridização utilizando sondas de DNA são tão sensíveis e seletivas que podem detectar sequências complementares presentes a uma concentração tão baixa quanto uma molécula por célula. Dessa maneira, é possível determinar quantas cópias de qualquer sequência de DNA estão presentes em uma determinada amostra de DNA. A mesma técnica pode ser utilizada para procurar genes relacionados, mas não idênticos. Para en-

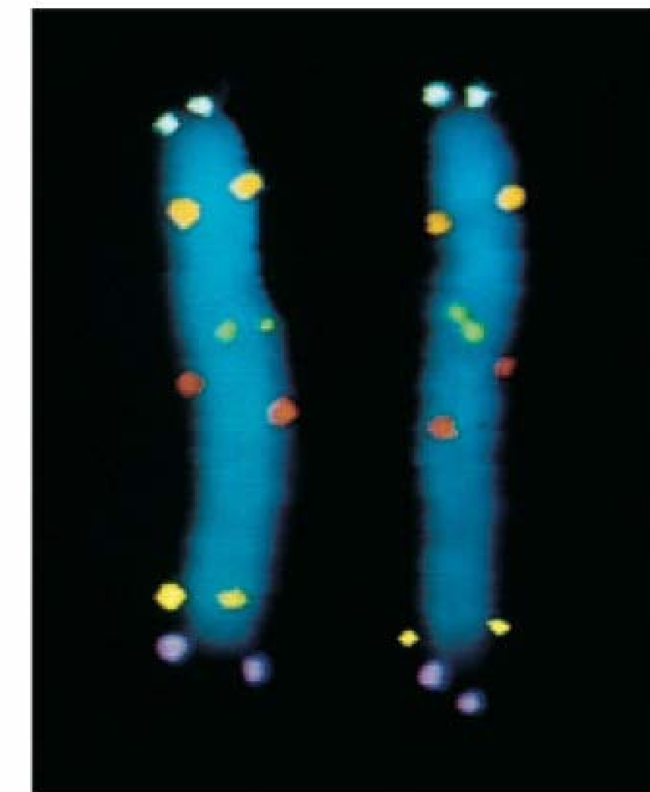


Figura 8-35 Hibridização *in situ* para localizar genes específicos nos cromossomos. Aqui, seis diferentes sondas de DNA foram utilizadas para marcar a posição das respectivas sequências de nucleotídeos no cromossomo 5 humano durante a metáfase. As sondas foram marcadas quimicamente e detectadas com anticorpos fluorescentes. Ambas as cópias do cromossomo 5 são mostradas, alinhadas lado a lado. Cada sonda produz dois pontos em cada cromossomo, uma vez que cromossomos em metáfase possuem DNA replicado e, assim, contêm duas hélices de DNA idênticas. (Cortesia de David C. Ward.)

contrar o gene de interesse em um organismo cujo genoma ainda não foi sequenciado, por exemplo, uma porção de um gene conhecido pode ser utilizada como sonda (**Figura 8-36**).

Alternativamente, as sondas de DNA podem ser utilizadas para reações de hibridização com RNA, em vez de DNA, para saber se uma célula está expressando um dado gene. Nesse caso, uma sonda de DNA que contém parte da sequência do gene é hibridizada com RNA purificado da célula em questão para determinar se o RNA inclui sequências nucleotídicas complementares à sonda de DNA e, caso isso ocorra, em quais quantidades. Em procedimentos um pouco mais elaborados, a sonda de DNA é tratada com nucleases específicas depois da hibridização, para determinar as regiões exatas da sonda de DNA que se parearam com as moléculas de RNA. Desse modo, pode-se determinar os sítios de início e de término da transcrição do RNA, assim como as ligações precisas das sequências de íntrons e de éxons em um gene (**Figura 8-37**).

Atualmente, as posições das ligações de íntrons/éxons normalmente são determinadas pelo sequenciamento das sequências de *DNA complementar* (*cDNA*) que representam os mRNAs expressos em uma célula e pela comparação delas com a sequência de nucleotídeos do genoma. Descreveremos mais adiante como os cDNAs são preparados a partir de mRNAs.

A hibridização de sondas de DNA com RNAs permite determinar se um gene em particular está ou não sendo transcrito; além disso, quando a expressão de um gene se altera, pode-se determinar se a alteração é devida ao controle transcricional ou pós-transcricional (ver Figura 7-92). Esses testes de expressão gênica foram realizados inicialmente com uma sonda de DNA de cada vez. Atualmente, os *microarranjos de DNA* permitem a monitoração simultânea de centenas ou de milhares de genes de uma vez, como discutiremos mais adiante. Os métodos de hibridização são hoje tão utilizados em biologia celular que é difícil imaginar como poderíamos estudar a estrutura e a expressão dos genes sem eles.

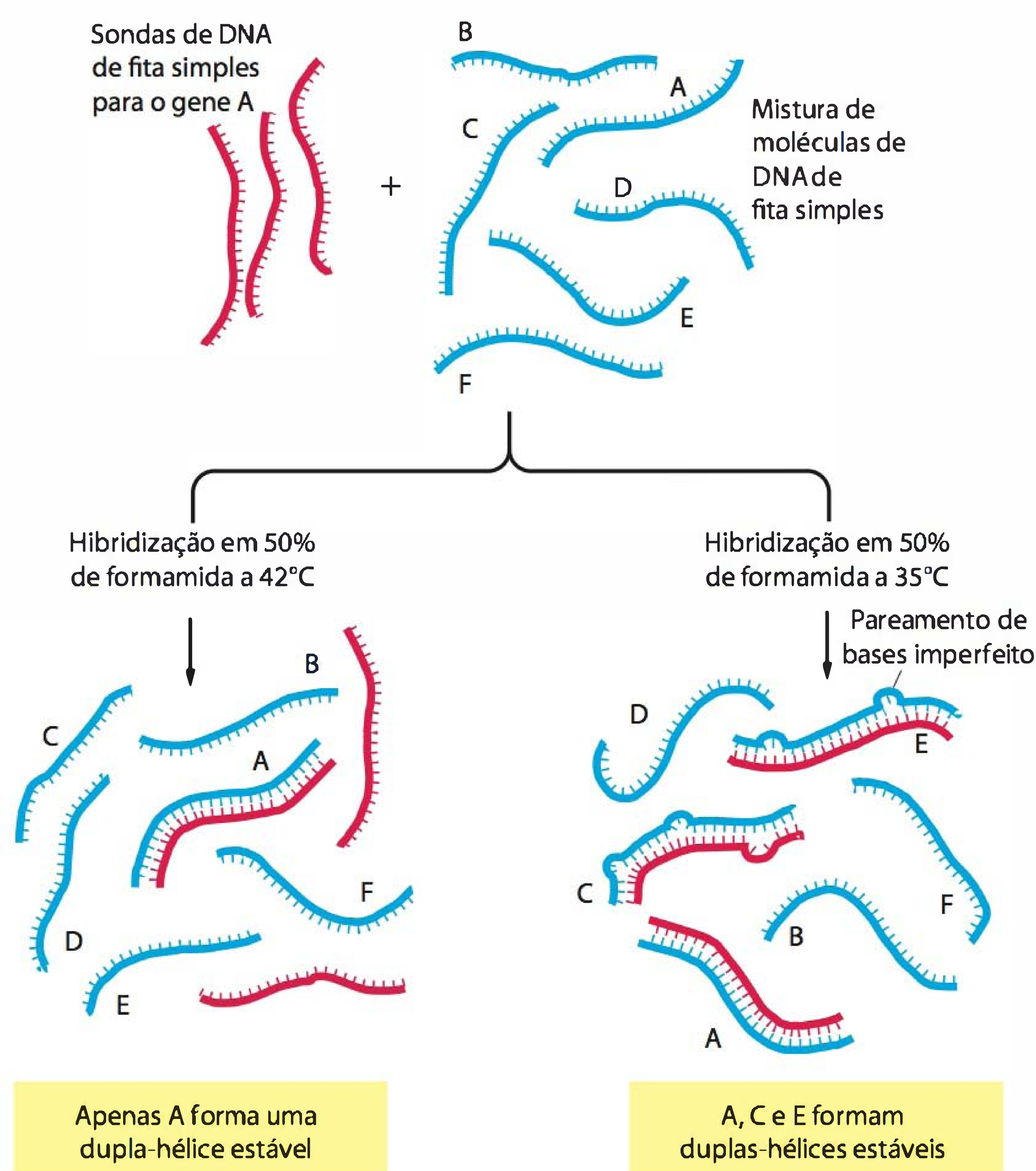


Figura 8-36 Condições de hibridização estringentes *versus* não-estringentes. Para utilizar uma sonda de DNA para encontrar um pareamento idêntico, condições de hibridização estringentes são utilizadas; a temperatura da reação é mantida apenas alguns graus abaixo da temperatura na qual uma hélice de DNA perfeita desnatura no solvente utilizado (sua *temperatura de fusão*), de maneira que todas as hélices imperfeitas formadas estão instáveis. Quando uma sonda de DNA está sendo utilizada para encontrar DNAs com sequências relacionadas, assim como idênticas, condições menos estringentes são utilizadas; a hibridização é realizada a uma temperatura mais baixa que permite que até mesmo duplas-hélices pareadas imperfeitamente se formem. Apenas as condições de hibridização a uma temperatura baixa podem ser utilizadas para localizar genes que não são idênticos, mas relacionados ao gene A (C e E neste exemplo).

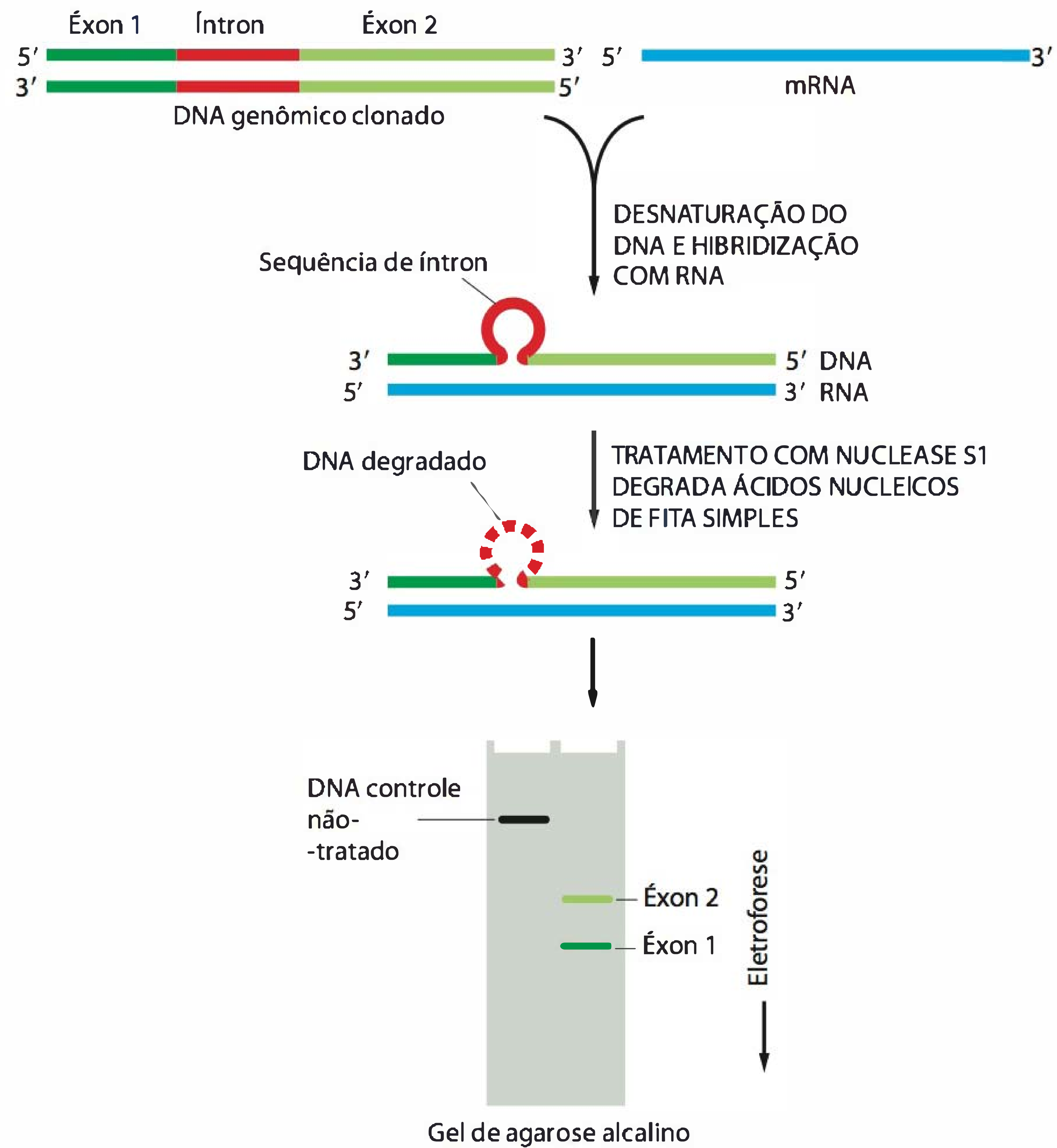


Figura 8-37 Utilização da hibridização de ácidos nucleicos na determinação da região de um fragmento de DNA clonado presente em uma molécula de mRNA. O método mostrado requer uma nuclease que clive a cadeia de DNA apenas onde ela não está pareada por bases a uma cadeia de RNA complementar. As posições dos íntrons em genes eucarióticos são mapeadas pelo método mostrado. Para esse tipo de análise, o DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose desnaturante, que o leva a migrar como moléculas de fita simples. A localização de cada extremidade de uma molécula de RNA pode ser determinada utilizando-se métodos similares.

O *Northern* e o *Southern blotting* facilitam a hibridização com moléculas de ácidos nucleicos separadas por eletroforese

Em uma complexa mistura de ácidos nucleicos, sondas de DNA frequentemente são utilizadas para detectar apenas aquelas moléculas com sequências complementares a toda a sonda ou parte dela. A eletroforese em gel pode ser utilizada para fracionar as diversas moléculas de RNA ou de DNA em uma mistura bruta, de acordo com seu tamanho, antes da reação de hibridização ser realizada; se a sonda se liga a moléculas de apenas um ou poucos tamanhos, pode-se ter certeza de que a hibridização foi específica. Além disso, a informação obtida sobre o tamanho dos fragmentos pode ser incalculável por si só. Um exemplo ilustra este ponto.

Suponha que alguém deseja determinar a natureza do defeito em um camundongo mutante, que produz anormalmente pequenas quantidades de albumina, uma proteína que as células do fígado normalmente secretam no sangue em grandes quantidades. Primeiro, são coletadas amostras idênticas de tecido do fígado de camundongos mutantes e de camundongos normais (os últimos servindo como controle), e as células são rompidas em um detergente forte para inativar nucleases que possam degradar os ácidos nucleicos. A seguir, o RNA e o DNA são separados de todos os outros componentes celulares: as proteínas presentes são completamente desnaturadas e removidas por extrações repetidas com fenol – um solvente orgânico potente que é parcialmente miscível com água; os ácidos nucleicos, que permanecem na fase aquosa são então precipitados com álcool para separá-los das pequenas moléculas da célula. Então, o DNA é separado do RNA por suas diferentes solubilidades em álcool, e qualquer ácido nucleico contaminante do tipo indesejado é eliminado pelo tratamento com uma enzima altamente específica – RNase ou DNase. Os mRNAs normalmente são separados dos RNAs grandes por sua retenção em uma coluna de cromatografia que liga especificamente as caudas de poli-A dos mRNAs.

Para analisar os mRNAs que codificam para albumina, uma técnica chamada de ***Northern blotting*** é utilizada. Primeiro, as moléculas intactas de mRNA purificadas a partir das células de fígado mutantes e controle são fracionadas de acordo com seus tamanhos em uma série de bandas, por eletroforese em gel. Então, para tornar as moléculas de RNA acessíveis às sondas de DNA, é feita uma réplica do padrão de bandas de RNA no gel por transferência (*blotting*) das moléculas de RNA fracionadas para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon. A membrana é então incubada em uma solução contendo uma sonda de DNA

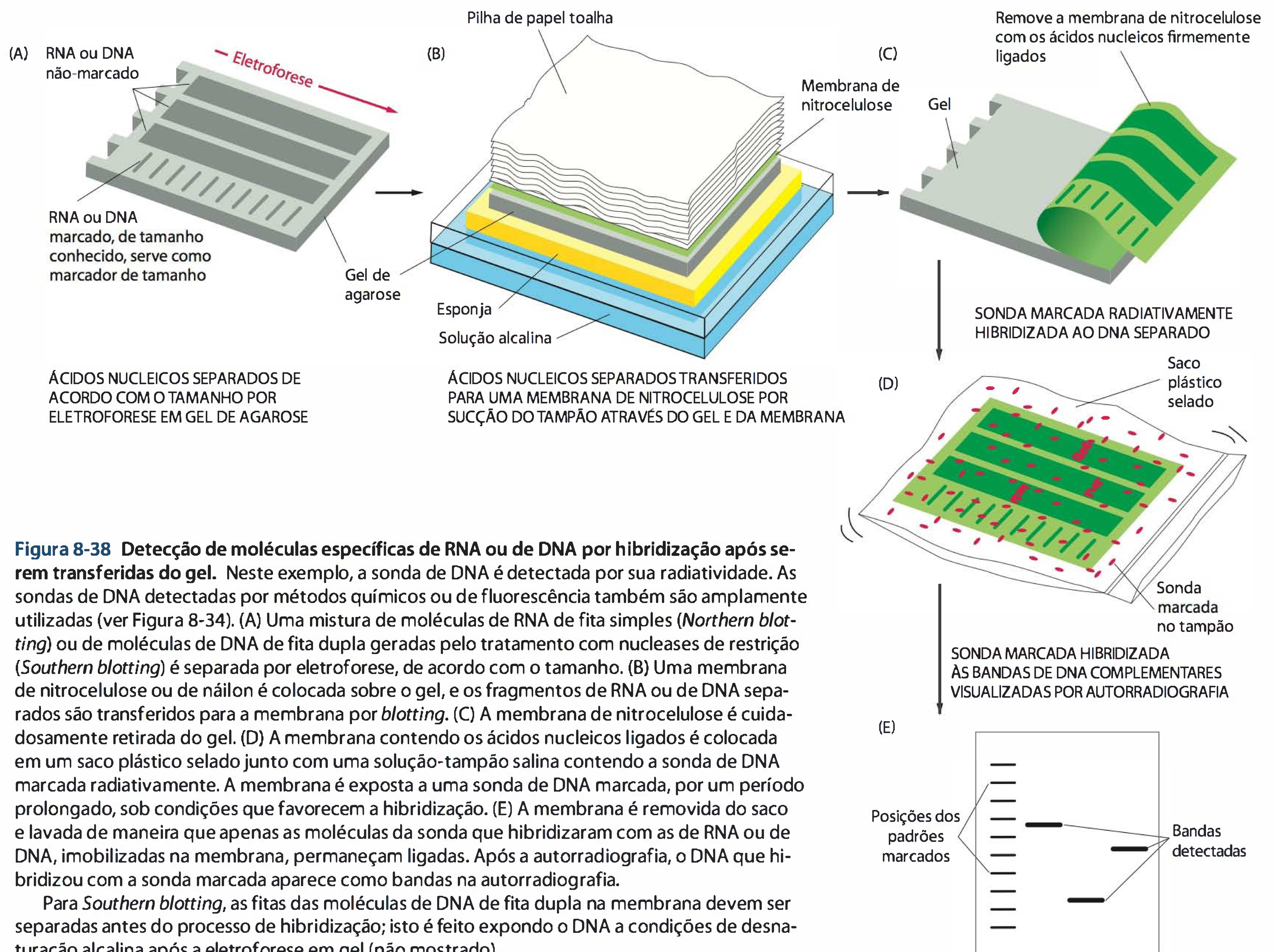


Figura 8-38 Detecção de moléculas específicas de RNA ou de DNA por hibridização após serem transferidas do gel. Neste exemplo, a sonda de DNA é detectada por sua radiatividade. As sondas de DNA detectadas por métodos químicos ou de fluorescência também são amplamente utilizadas (ver Figura 8-34). (A) Uma mistura de moléculas de RNA de fita simples (*Northern blotting*) ou de moléculas de DNA de fita dupla geradas pelo tratamento com nucleases de restrição (*Southern blotting*) é separada por eletroforese, de acordo com o tamanho. (B) Uma membrana de nitrocelulose ou de náilon é colocada sobre o gel, e os fragmentos de RNA ou de DNA separados são transferidos para a membrana por *blotting*. (C) A membrana de nitrocelulose é cuidadosamente retirada do gel. (D) A membrana contendo os ácidos nucleicos ligados é colocada em um saco plástico selado junto com uma solução-tampão salina contendo a sonda de DNA marcada radiativamente. A membrana é exposta a uma sonda de DNA marcada, por um período prolongado, sob condições que favorecem a hibridização. (E) A membrana é removida do saco e lavada de maneira que apenas as moléculas da sonda que hibridizaram com as de RNA ou de DNA, imobilizadas na membrana, permaneçam ligadas. Após a autorradiografia, o DNA que hibridizou com a sonda marcada aparece como bandas na autorradiografia.

Para *Southern blotting*, as fitas das moléculas de DNA de fita dupla na membrana devem ser separadas antes do processo de hibridização; isto é feito expondo o DNA a condições de desnaturação alcalina após a eletroforese em gel (não mostrado).

marcada, cuja sequência corresponde à parte da fita-molde que produz o mRNA da albumina. As moléculas de RNA que hibridizam com a sonda de DNA marcada na membrana (por serem complementares à parte da sequência normal do gene de albumina) são então localizadas pela detecção da sonda ligada por autorradiografia ou por meios químicos (**Figura 8-38**). Os tamanhos das moléculas de RNA hibridizadas podem ser determinados por referência a padrões de RNA de tamanhos conhecidos que são submetidos à eletroforese paralelamente às amostras do experimento. Desse modo, pode-se descobrir que as células do fígado dos camundongos mutantes produzem o RNA de albumina em quantidades normais e de tamanho normal; alternativamente, você pode descobrir que as células o produzem no tamanho normal, mas em quantidades muito reduzidas. Uma outra possibilidade é a de que as moléculas de RNA de albumina mutantes sejam anormalmente pequenas; nesse caso, a membrana poderia ser testada novamente com uma série de sondas de DNA mais curtas, cada qual correspondendo a pequenas porções do gene, para revelar qual é a parte do RNA normal que está faltando.

O método original de hibridização após a transferência de gel, chamado de ***Southern blotting***, analisa o DNA e não o RNA. (O método foi nomeado de acordo com seu inventor e as técnicas de *Northern* e *Western blotting* foram nomeadas com referência a ele.) Aqui o DNA isolado é primeiro clivado em fragmentos facilmente separáveis com nucleases de restrição. Os fragmentos de fita dupla são então separados, de acordo com o tamanho, por eletroforese em gel, e aqueles complementares a uma sonda de DNA são identificados por *blotting* e hibridização, como recentemente descrito para RNA (ver Figura 8-38). Para caracterizar a estrutura do gene de albumina nos camundongos mutantes, uma sonda de DNA específica para albumina seria utilizada para construir um *mapa de restrição* detalhado do genoma na região do gene de albumina (tal mapa consiste no padrão de fragmentos de DNA

produzidos por várias nucleases de restrição). A partir desse mapa, poderia ser determinado se o gene de albumina sofreu algum tipo de rearranjo nos animais defectivos – por exemplo, pela deleção ou pela inserção de uma sequência curta de DNA; a maioria das trocas simples de bases, contudo, não pode ser detectada dessa maneira.

Os genes podem ser clonados usando-se bibliotecas de DNA

Qualquer fragmento de DNA pode ser clonado. Em biologia celular, o termo **clonagem de DNA** é utilizado em dois sentidos. Em um dos sentidos, ele literalmente se refere ao ato de produzir várias cópias idênticas de uma molécula de DNA – a amplificação de uma determinada sequência de DNA. Entretanto, o termo também descreve o isolamento de uma determinada fita de DNA (frequentemente um gene em particular) a partir do resto do DNA da célula, pois esse isolamento é muito facilitado fazendo-se várias cópias idênticas do DNA de interesse. Como discutido anteriormente neste capítulo, a clonagem, particularmente quando utilizada no contexto da biologia do desenvolvimento, também pode se referir à geração de várias células geneticamente idênticas começando a partir de uma única célula ou até mesmo à geração de organismos geneticamente idênticos. Em todos os casos, a clonagem se refere ao ato de produzir várias cópias geneticamente idênticas; nesta seção, usaremos o termo clonagem (clonagem de DNA ou clonagem gênica) para referir métodos designados a gerar várias cópias idênticas de um segmento de ácido nucleico.

A clonagem de DNA no seu sentido mais geral pode ser realizada de várias maneiras. A mais simples envolve a inserção de um fragmento de DNA particular no DNA genômico purificado de um elemento genético que se autorreplica – geralmente um vírus ou plasmídeo. Um fragmento de DNA contendo um gene humano, por exemplo, pode ser ligado, em um tubo de ensaio, a um cromossomo de vírus bacteriano, e a nova molécula de DNA recombinante pode então ser introduzida em uma célula bacteriana, onde o fragmento de DNA inserido será replicado junto com o DNA do vírus. Partindo de apenas uma dessas moléculas de DNA recombinante, que infecta uma única célula, o mecanismo normal de replicação do vírus pode produzir mais de 10^{12} moléculas de DNA viral em menos de um dia, amplificando também a quantidade do fragmento de DNA humano inserido pelo mesmo fator. Um vírus ou plasmídeo assim utilizado é conhecido como *vetor de clonagem*, e o DNA propagado pela inserção nele é considerado *clonado*.

Para isolar um gene específico, inicia-se construindo uma *biblioteca de DNA* – uma coleção abrangente de fragmentos clonados de DNA a partir de uma célula, um tecido ou um organismo. Essa biblioteca inclui (se espera) no mínimo um fragmento que contenha o gene de interesse. As bibliotecas podem ser construídas com um vetor viral ou com um vetor plasmidial, e geralmente estão presentes em uma população de células bacterianas. Os princípios que fundamentam os métodos utilizados para clonar genes são os mesmos para cada tipo de vetor de clonagem, embora os detalhes possam ser diferentes. Atualmente, a maioria das clonagens é realizada em vetores plasmidiais.

Os **vetores plasmidiais** mais utilizados para clonagem de genes são pequenas moléculas circulares de DNA de fita dupla, derivadas de plasmídeos maiores, que ocorrem naturalmente em células bacterianas. Eles geralmente representam apenas uma pequena fração do DNA total da célula bacteriana hospedeira, mas podem ser facilmente separados, pelo seu pequeno tamanho, de moléculas de DNA cromossomal, que são grandes e precipitam como um sedimento após uma centrifugação. Para serem utilizados como vetores de clonagem, os círculos de DNA plasmidial purificados são primeiro clivados com uma nuclease de restrição para criar moléculas de DNA linear. O DNA genômico a ser utilizado na construção da biblioteca é clivado com a mesma nuclease de restrição, e os fragmentos de restrição resultantes (incluindo aqueles contendo o gene a ser clonado) são então adicionados aos plasmídeos clivados e anelados por meio das suas extremidades coesivas para formar círculos de DNA recombinante. Essas moléculas de DNA recombinante, contendo insertos de DNA estranho, são então covalentemente ligadas à enzima DNA-ligase (**Figura 8-39**).

Na próxima etapa da preparação de uma biblioteca, os círculos de DNA recombinante são introduzidos em células bacterianas que foram preparadas para ser transitoriamente permeáveis ao DNA. Essas células bacterianas são *transfectadas* com os plasmídeos. À medida que essas células crescem e se dividem, duplicando em número a cada 30 minutos, os plasmídeos recombinantes também replicam para produzir um número enorme de cópias de círculos de DNA contendo o DNA estranho (**Figura 8-40**). Vários plasmídeos bacterianos carregam genes para resistência a antibióticos (discutido no Capítulo 24), uma propriedade que pode ser explorada para selecionar aquelas células que foram transfectadas com suces-

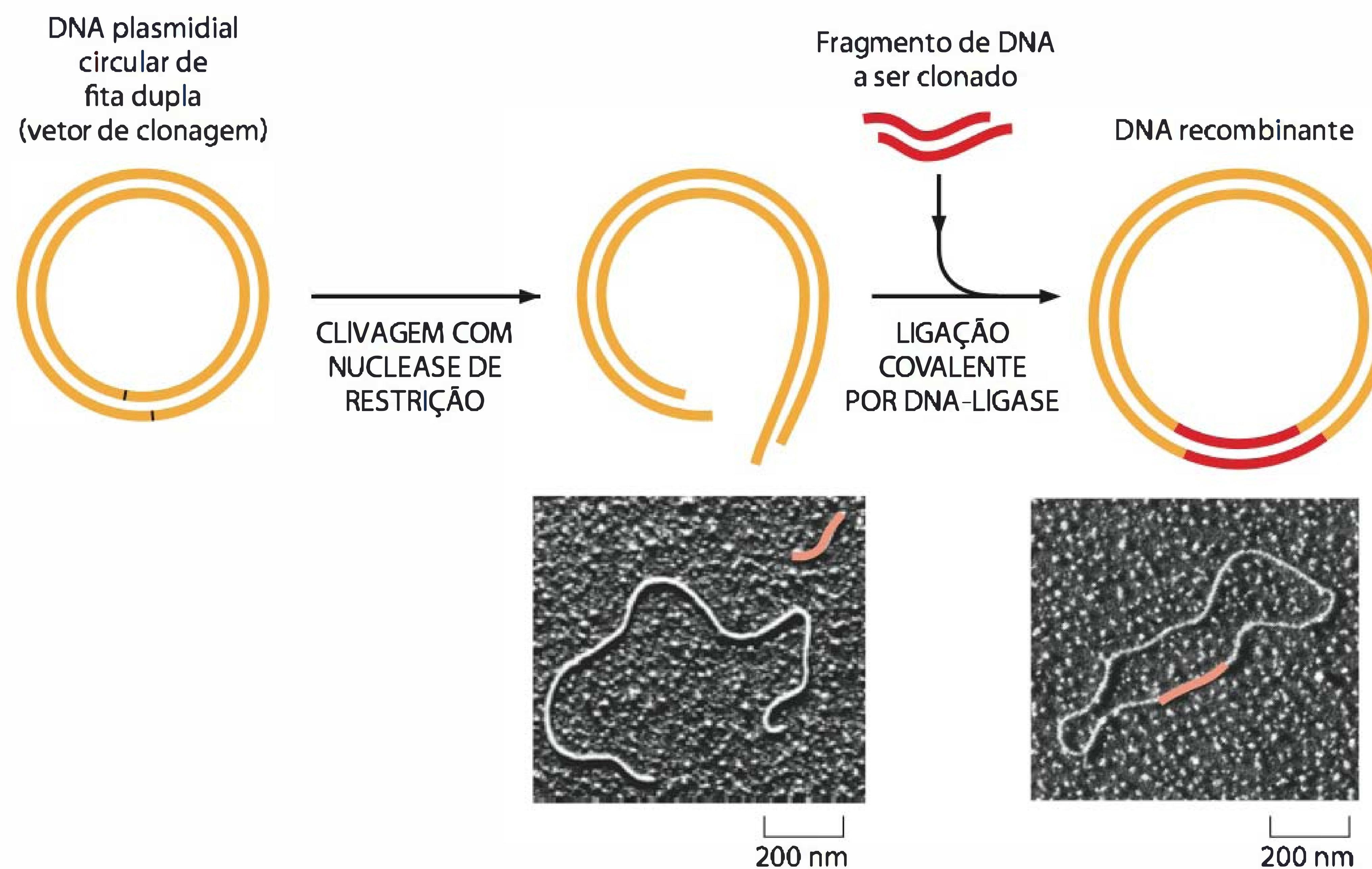


Figura 8-39 Inserção de um fragmento de DNA em um plasmídeo bacteriano com a enzima DNA-ligase. O plasmídeo é aberto pela clivagem com uma nuclease de restrição (nesse caso, uma que produz extremidades coesivas), sendo misturado com o fragmento de DNA a ser clonado (preparado com a mesma nuclease de restrição). A DNA-ligase e o ATP são adicionados. As extremidades coesivas pareiam as bases, e a DNA-ligase sela os espaços no esqueleto do DNA, produzindo uma molécula recombinante de DNA completa. (Micrografias cortesia de Huntington Potter e David Dressler.)

so; se a bactéria é crescida na presença do antibiótico, apenas as células contendo plasmídeos sobreviverão. Cada célula bacteriana original que foi inicialmente transfectada contém, em geral, um inserto de DNA estranho diferente; esse inserto é herdado por todas as progênies de células daquela bactéria que, juntas, formam uma pequena colônia em uma placa de cultura.

Por vários anos, os plasmídeos foram utilizados para clonar fragmentos de DNA de mil a 30 mil pares de nucleotídeos. Os fragmentos de DNA maiores são mais difíceis de manipular e clonar. Então, os pesquisadores começaram a utilizar *cromossomos artificiais de leveduras* (YACs, *yeast artificial chromosomes*), que podem acomodar pedaços muito grandes de DNA (**Figura 8-41**). Atualmente, novos vetores plasmidiais, com base no plasmídeo F de *E. coli*, que ocorre naturalmente, são utilizados para clonar fragmentos de DNA de 300 mil a 1 milhão de pares de nucleotídeos. Diferentemente de plasmídeos bacterianos menores, o plasmídeo F – e seu derivado, o **cromossomo artificial de bactéria** (**BAC**, *bacterial artificial chromosome*) – está presente em apenas uma ou duas cópias por célula de *E. coli*. O fato de que os BACs são mantidos em números muito baixos nas células bacterianas pode contribuir para sua habilidade de manter estáveis grandes sequências de DNA clonadas: com apenas alguns BACs presentes, é menos provável que os fragmentos de DNA clonados se misturem pela recombinação com sequências presentes em outras cópias do plasmídeo. Por sua estabilidade, habilidade de aceitar grandes insertos de DNA e por serem facilmente manipulados, os BACs são agora os vetores preferidos para construir bibliotecas de DNA de organismos complexos – incluindo aqueles representando o genoma humano e o de camundongo.

Dois tipos de bibliotecas de DNA servem para diferentes propósitos

Clivar todo o genoma de uma célula com uma nuclease de restrição específica e clonar cada fragmento como descrito produz um grande número de fragmentos de DNA – na ordem de um milhão para o genoma de um mamífero. Os fragmentos são distribuídos entre milhões de colônias diferentes de células bacterianas transfectadas. Quando trabalhamos com BACs em vez

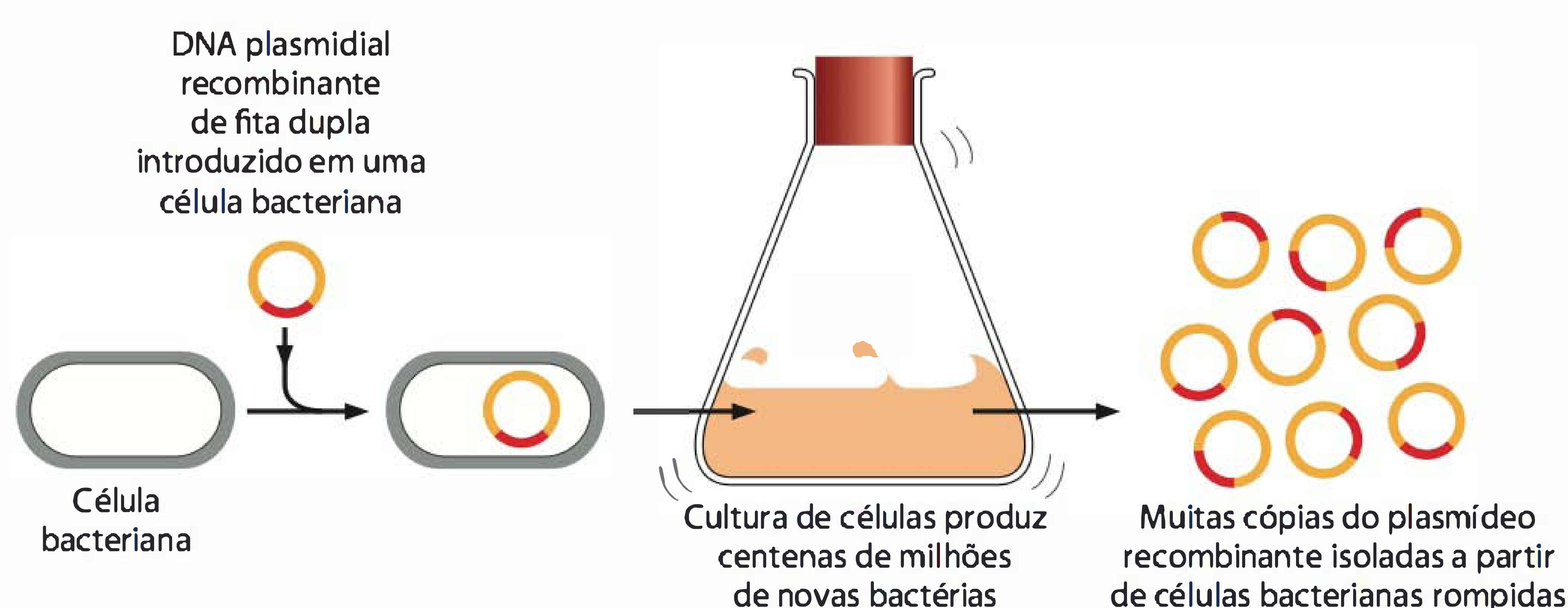


Figura 8-40 A amplificação dos fragmentos de DNA inseridos em um plasmídeo. Para produzir grandes quantidades do DNA de interesse, o DNA plasmidial recombinante na Figura 8-39 é introduzido em uma bactéria, por transfecção, onde replicará vários milhões de vezes enquanto a bactéria se multiplica.

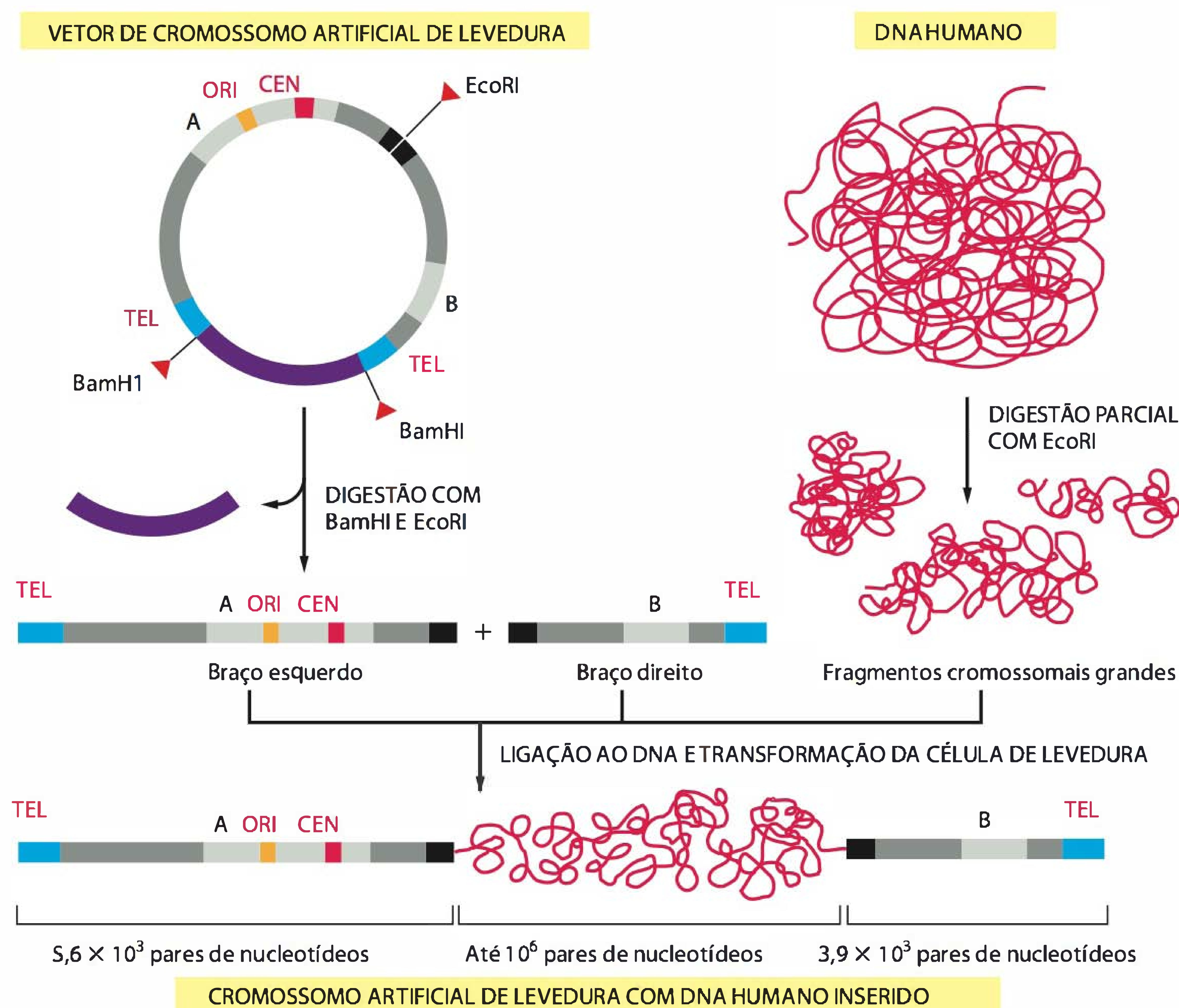


Figura 8-41 Construção de um cromossomo artificial de levedura (YAC). Um vetor YAC permite a clonagem de moléculas de DNA muito grandes. TEL, CEN e ORI são as sequências dos telômeros, centrômeros e origem de replicação, respectivamente, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; todas são necessárias para propagar o YAC. BamHI e EcoRI são os sítios onde as respectivas nucleases de restrição clivam a dupla-hélice de DNA. As sequências chamadas de A e B codificam para as enzimas que servem como marcadores seletivos para permitir o fácil isolamento de células de leveduras que incorporaram o cromossomo artificial. Como as bactérias se dividem mais rapidamente do que as leveduras, a maioria dos projetos de clonagem em larga escala agora utiliza *E. coli* como meio para amplificar DNA. (Adaptada de D. T. Burke, G. F. Carle e M. V. Olson, *Science* 236:806-812, 1987. Com permissão de AAAS.)

de plasmídeos típicos, podem ser inseridos fragmentos maiores, e assim menos células bacterianas transfectadas são necessárias para cobrir o genoma. Em ambos os casos, cada uma das colônias é composta de um clone de células derivadas de uma única célula ancestral e, dessa maneira, guarda várias cópias de uma sequência particular do genoma fragmentado (**Figura 8-42**). Tal plasmídeo contém um **clone de DNA genômico**, e a coleção inteira dos plasmídeos é chamada de **biblioteca de DNA genômico**. Contudo, como o DNA genômico é cortado em fragmentos aleatoriamente, somente alguns fragmentos contêm genes. Vários dos clones de DNA genômico obtidos do DNA de uma célula eucariótica superior contêm apenas DNA não-codificante, que, como discutimos no Capítulo 4, é a maior parte do DNA em tais genomas.

Uma estratégia alternativa é começar o processo de clonagem selecionando-se apenas aquelas sequências de DNA que são transcritas em mRNA e, assim, é presumível que correspondam a genes que codificam para proteínas. Isso é feito extraindo-se o mRNA de células e então fazendo-se uma cópia de DNA de cada molécula de mRNA presente – *DNA complementar* (*cDNA*). Essa reação de cópia é catalisada pela enzima transcriptase reversa de retrovírus, que sintetiza uma cadeia de DNA complementar a partir de um molde de RNA. As moléculas de cDNA de fita simples sintetizadas pela transcriptase reversa são convertidas em moléculas de cDNA de fita dupla pela DNA-polimerase, sendo inseridas em um vetor plasmidial ou vetor viral e clonadas (**Figura 8-43**). Cada clone obtido dessa maneira é chamado de **clone de cDNA**, e a coleção inteira de clones derivados de uma preparação de mRNA constitui uma **biblioteca de cDNA**.

A **Figura 8-44** ilustra algumas diferenças importantes entre os clones de DNA genômico e os clones de cDNA. Os clones genômicos representam uma amostra aleatória de todas as sequências de DNA em um organismo e, com raras exceções, serão os mesmos, independentemente do tipo de célula utilizada para prepará-los. Em contraste, os clones de cDNA contêm apenas aquelas regiões do genoma que foram transcritas em mRNA. Como as células de diferentes tecidos produzem conjuntos distintos de moléculas de mRNA, uma biblioteca distinta de cDNA é obtida para cada tipo de célula utilizado para preparar a biblioteca.



Figura 8-42 Construção de uma biblioteca de DNA genômico humano. Uma biblioteca genômica em geral é estocada como um grupo de bactérias, cada uma carregando um fragmento de DNA humano diferente. Para facilitar, a clonagem de apenas alguns fragmentos representativos (*coloridos*) está mostrada. Na realidade, todos os fragmentos de DNA em *cinza* também seriam clonados.

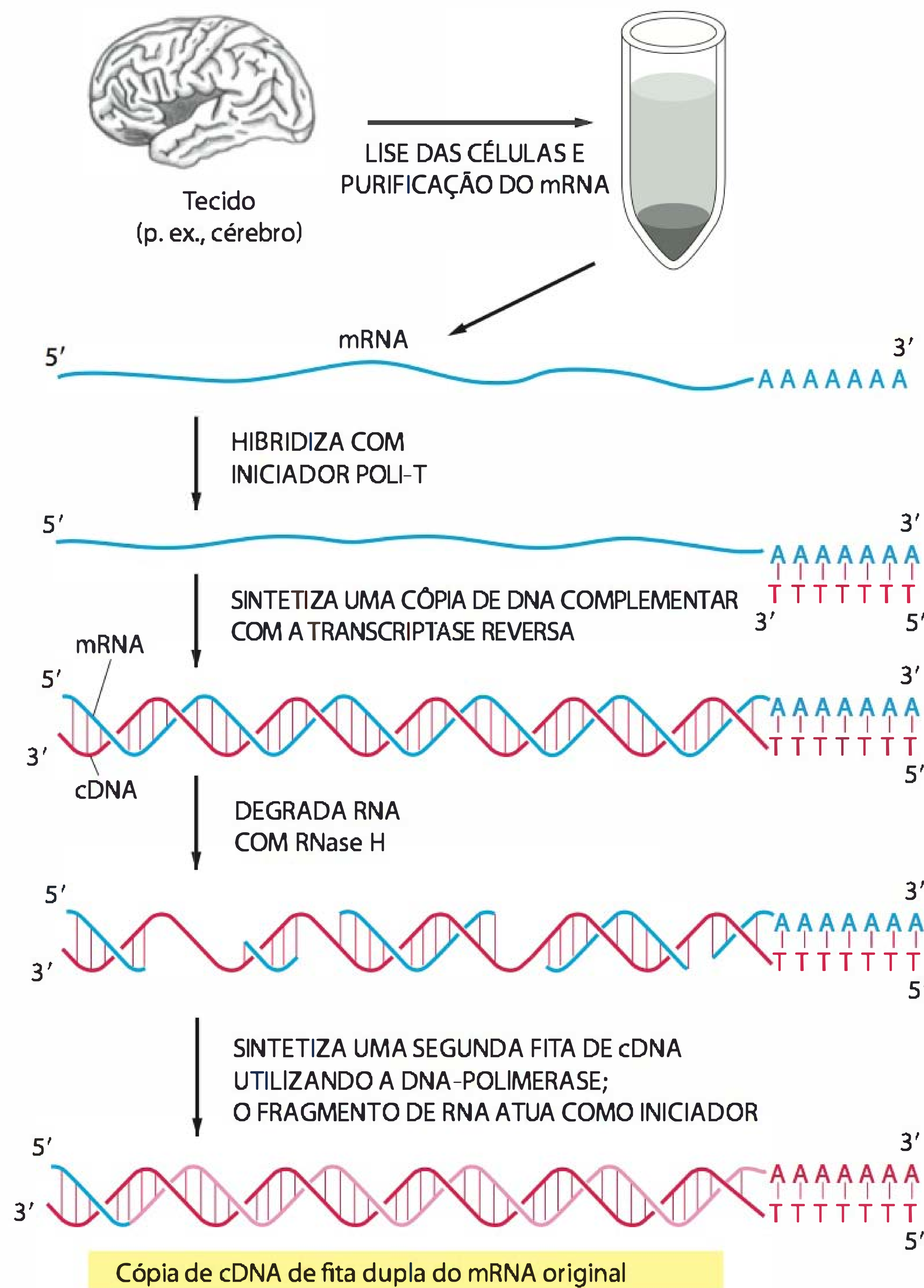


Figura 8-43 Síntese de cDNA. O mRNA total é extraído de um determinado tecido, e a enzima transcriptase reversa produz cópias de DNA (cDNA) a partir das moléculas de mRNA (ver p. 320). Para simplificar, a cópia de apenas um desses mRNAs em cDNA é ilustrada. Um pequeno oligonucleotídeo complementar à cauda de poli-A na extremidade 3′ do mRNA (discutido no Capítulo 6) é primeiro hibridizada ao RNA para atuar como um iniciador para a transcriptase reversa, que então copia o RNA em uma cadeia complementar de DNA, formando uma hélice híbrida de DNA/RNA. O tratamento do híbrido DNA/RNA com RNase H (ver Figura 5-12) cria quebras e espaços na fita de RNA. A enzima DNA-polimerase então copia o cDNA de fita simples remanescente em cDNA de fita dupla. O fragmento do mRNA original é o iniciador para essa reação de síntese, como mostrado. Como a DNA-polimerase utilizada para sintetizar a segunda fita de cDNA pode sintetizar as moléculas de RNA ligadas do início ao fim, o fragmento de RNA pareado com as bases da extremidade 3′ da primeira fita de DNA normalmente age como o iniciador para o produto final da síntese da segunda fita. Esse RNA finalmente é degradado durante as etapas subsequentes da clonagem. Como resultado, as sequências de nucleotídeos nas extremidades 5′ das moléculas de mRNA originais frequentemente estão ausentes das bibliotecas de cDNA.

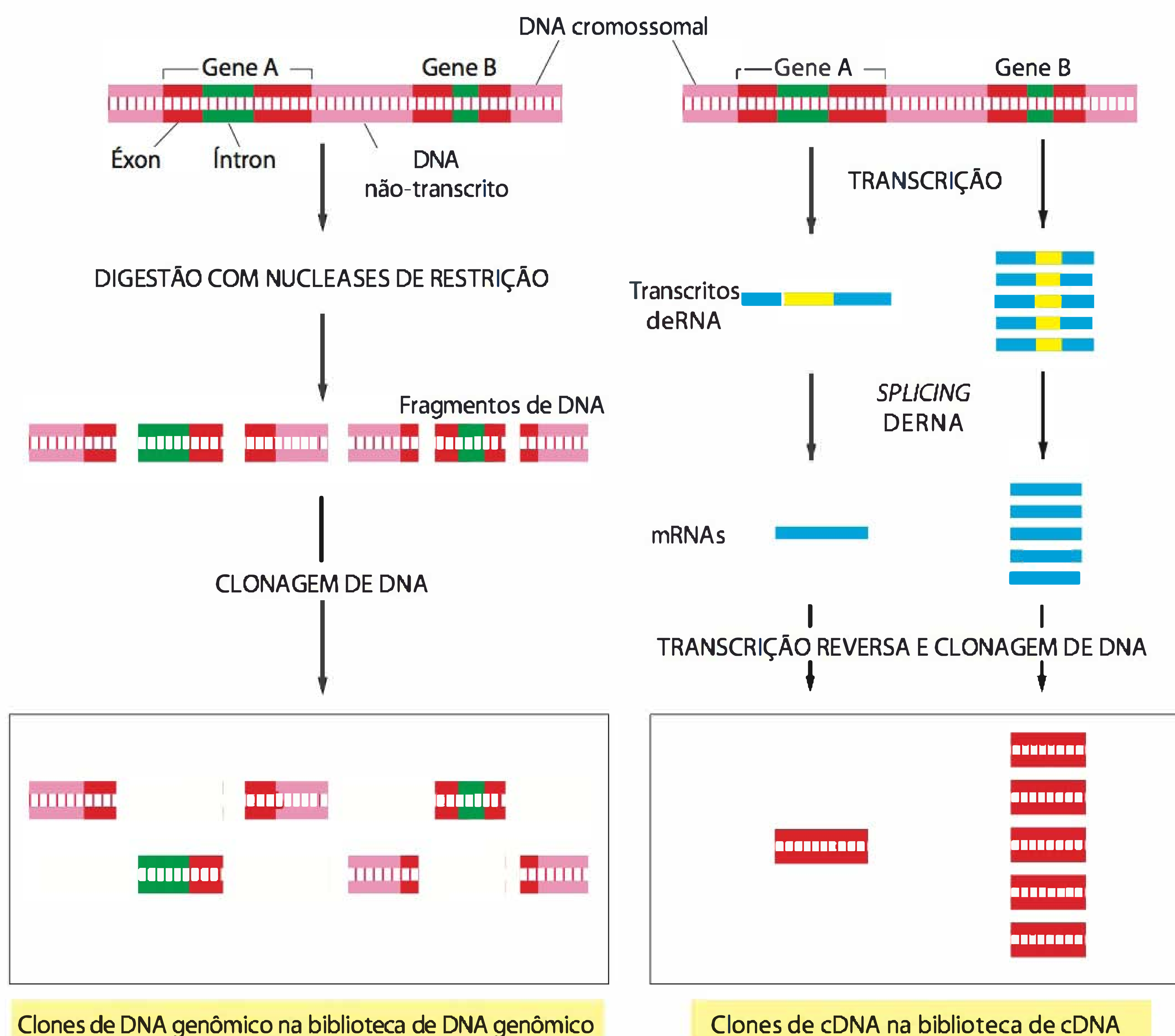


Figura 8-44 Diferenças entre clones de cDNA e clones de DNA genômico derivados de uma mesma região do DNA. Neste exemplo, o gene A frequentemente não é transcrito, enquanto o gene B frequentemente é transcrito, e ambos os genes contêm íntrons (*verde*). Na biblioteca de DNA genômico, tanto os íntrons como o DNA não-transcrito (*rosa*) estão incluídos nos clones, e a maioria dos clones contém, quando muito, apenas parte da sequência codificante de um gene (*vermelho*). Nos clones de cDNA, as sequências de íntrons (*amarelo*) foram removidas pelo *splicing* de RNA durante a formação do mRNA (*azul*), e uma sequência codificante contínua está presente em cada clone. Como o gene B é transcrito mais abundantemente do que o gene A nas células das quais a biblioteca de cDNA foi feita, ele está representado com muito mais frequência do que o gene A na biblioteca de cDNA. Em contraste, em princípio, A e B são representados igualmente na biblioteca de DNA genômico.

Os clones de cDNA contêm sequências codificantes não-interrompidas

Existem várias vantagens em se utilizar uma biblioteca de cDNA para a clonagem de genes. Em primeiro lugar, células especializadas produzem grandes quantidades de algumas proteínas. Nesse caso, o mRNA que codifica para a proteína provavelmente é produzido em quantidades tão grandes que uma biblioteca de cDNA preparada a partir dessas células é muito enriquecida de moléculas de cDNA que codificam para a proteína, reduzindo muito o problema de identificar o clone desejado na biblioteca (ver Figura 8-44). A hemoglobina, por exemplo, é produzida em grandes quantidades por eritrócitos em desenvolvimento (células vermelhas do sangue); por essa razão, os genes de globina estavam entre os primeiros a serem clonados.

A vantagem mais importante dos clones de cDNA é que eles contêm as sequências codificantes não-interrompidas de um gene. Como foi visto, normalmente os genes eucarióticos consistem em sequências curtas de DNA codificante (éxons), separadas por sequências não-codificantes muito mais longas (íntrons); a produção de mRNA requer a remoção das sequências não-codificantes do transcrito de RNA inicial e o *splicing* para unir as sequências codificantes. Nem as células bacterianas nem as de levedura farão essas modificações no RNA produzido a partir de um gene de uma célula de um eucarioto superior. Logo, quando o objetivo da clonagem é deduzir a sequência de aminoácidos de uma proteína a partir da sequência de DNA, ou produzir a proteína em quantidade expressando o gene clonado em uma célula bacteriana ou de levedura, é preferível iniciar com cDNA. As bibliotecas de cDNA possuem um uso adicional: como descrito no Capítulo 7, vários mRNAs de humanos e outros organismos complexos sofrem um *splicing* de RNA alternativo, e as bibliotecas de cDNA muitas vezes representam muitos, se não todos os mRNAs processados alternativamente, produzidos a partir de uma determinada linhagem celular ou tecido.

Bibliotecas de cDNA e genômicas são fontes inesgotáveis amplamente compartilhadas entre os pesquisadores. Atualmente, várias dessas bibliotecas estão disponíveis comercialmente.

Genes podem ser amplificados seletivamente por PCR

Agora que tantas sequências genômicas estão disponíveis, os genes podem ser clonados diretamente, sem a necessidade de primeiro construir bibliotecas de DNA. Uma técnica chamada de **reação em cadeia da polimerase** (**PCR,** *polymerase chain reaction*) possibilita essa clonagem rápida. Começando com um genoma inteiro, a PCR permite que o DNA de uma região selecionada seja amplificado vários bilhões de vezes, "purificando" efetivamente esse DNA do restante do genoma.

Para começar, um par de oligonucleotídeos de DNA, escolhidos para flanquear a sequência de nucleotídeos desejada do gene, é sintetizado por métodos químicos. Esses oligonucleotídeos são, então, utilizados para iniciar a síntese de DNA nas fitas simples geradas pelo aquecimento do DNA do genoma inteiro. O DNA novo sintetizado é produzido em uma reação catalisada *in vitro* por uma DNA-polimerase purificada, e os iniciadores permanecem nas extremidades 5′ dos fragmentos finais de DNA que são produzidos (**Figura 8-45**A).

Nada de especial é produzido no primeiro ciclo da síntese de DNA; a eficácia do método da PCR é revelada apenas depois de repetidos ciclos de síntese de DNA. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. Como cada ciclo requer um breve tratamento de calor para separar as duas fitas da dupla-hélice de DNA-molde, a técnica requer a utilização de uma DNA-polimerase especial, isolada de uma bactéria termofílica, estável a temperaturas muito mais altas do que o normal, de maneira que ela não é desnaturada pelos tratamentos repetidos de calor. Com cada ciclo da síntese de DNA, os fragmentos novos gerados servem como molde na sua vez, e dentro de poucos ciclos o produto predominante é uma espécie única de fragmento de DNA, cujo comprimento corresponde à distância entre os dois iniciadores originais (ver Figura 8-45B).

Na prática, a amplificação efetiva do DNA requer de 20 a 30 ciclos de reação, com os produtos de cada ciclo servindo como DNA-molde para o próximo – dando origem ao termo "reação em cadeia" da polimerase. Um único ciclo necessita de somente cerca de cinco minutos, e o procedimento inteiro pode ser facilmente automatizado. A PCR, portanto, torna possível a "clonagem molecular livre de células" de um fragmento de DNA em poucas horas, em comparação com os vários dias necessários para os procedimentos normais de clona-

gem. Essa técnica agora é bastante utilizada para clonar diretamente o DNA de genes de interesse – iniciando com DNA genômico ou com mRNA isolado de células (**Figura 8-46**).

O método de PCR é extremamente sensível; pode detectar uma única molécula de DNA em uma amostra. Os traços de RNA podem ser analisados da mesma maneira, sendo transcritos primeiro em DNA com a transcriptase reversa. A técnica de clonagem por PCR substituiu rapidamente o *Southern blotting* no diagnóstico de doenças genéticas e na detecção de baixos níveis de infecção viral. É também uma grande promessa em medicina forense, como um meio para análise de vestígios mínimos de sangue ou de outros tecidos – mesmo tão

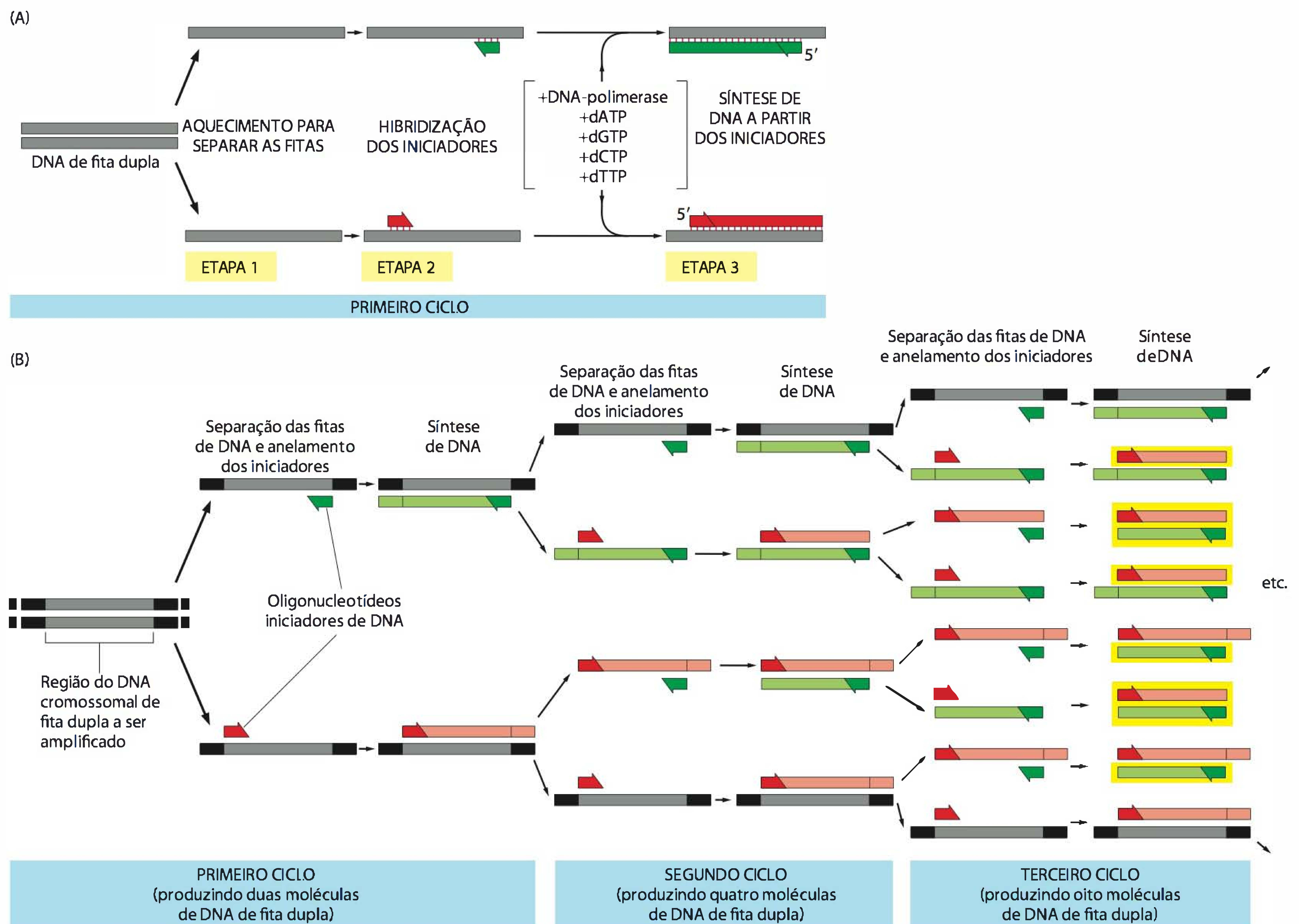


Figura 8-45 Amplificação de DNA pela técnica de PCR. O conhecimento da sequência de DNA a ser amplificada é utilizado para projetar dois oligonucleotídeos iniciadores de DNA sintéticos. Um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro é complementar à sequência na outra fita, mas na extremidade oposta da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA *in vitro*, que é realizada por uma DNA-polimerase, e determinam o segmento do DNA a ser amplificado. (A) A PCR inicia com uma fita dupla de DNA, e cada ciclo da reação inicia com um breve tratamento de calor para separar as duas fitas (etapa 1). Após a separação das fitas, o esfriamento do DNA na presença de um grande excesso dos dois oligonucleotídeos iniciadores de DNA permite que esses iniciadores hibridizem com as sequências complementares nas duas fitas de DNA (etapa 2). Essa mistura é então incubada com DNA-polimerase e os quatro trifosfatos de desoxirribonucleosídeo para sintetizar o DNA, começando pelos dois iniciadores (etapa 3). O ciclo inteiro é então reiniciado por um tratamento de calor para separar as novas fitas de DNA sintetizadas. (B) Como o procedimento é realizado várias vezes, os fragmentos novos sintetizados servem como molde na sua vez, e dentro de poucos ciclos o DNA predominante é idêntico à sequência entre os dois iniciadores, incluindo os dois iniciadores no molde original. Do DNA colocado na reação original, somente a sequência entre os dois iniciadores é amplificada, pois não existem iniciadores anelados em qualquer outro lugar. No exemplo ilustrado, em (B), três ciclos de reação produzem 16 cadeias de DNA, 8 das quais (*em amarelo*) são do mesmo comprimento e correspondem exatamente a uma ou a outra fita da sequência original que está entre colchetes, mostrada bem à esquerda; as outras fitas contêm DNA extra *downstream* da sequência original, replicado nos primeiros poucos ciclos. Após mais quatro ciclos, 240 de 256 cadeias de DNA correspondem exatamente à sequência original que está entre colchetes, e após vários ciclos a mais, essencialmente todas as fitas de DNA têm esse único comprimento.

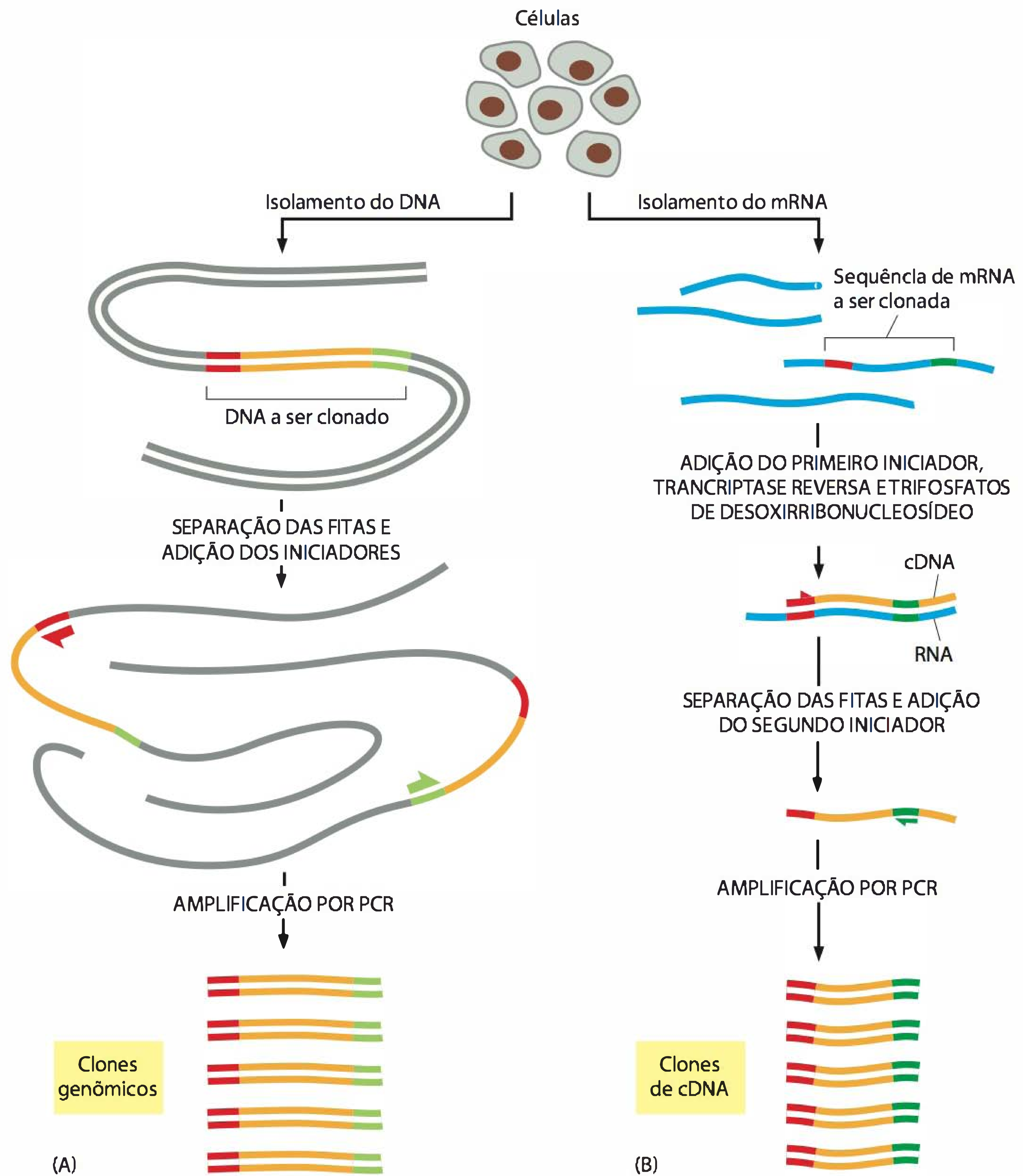


Figura 8-46 Utilização da PCR para obter um clone genômico ou de cDNA. (A) Para obter um clone genômico utilizando PCR, o DNA cromossomal é primeiro purificado a partir de células. Os iniciadores da PCR que flanqueiam a fita de DNA a ser clonada são adicionados, e vários ciclos da reação são completados (ver Figura 8-45). Como apenas o DNA entre (e incluindo) os iniciadores é amplificado, a PCR provê uma maneira de obter uma sequência curta de DNA cromossomal, seletivamente, de uma forma quase pura. (B) Para utilizar a PCR para obter um clone de cDNA de um gene, o mRNA é primeiro purificado a partir das células. O primeiro iniciador é então adicionado à população de mRNAs, e a transcriptase reversa é utilizada para sintetizar uma fita de cDNA. O segundo iniciador é então adicionado, e a molécula de DNA de fita simples é amplificada em vários ciclos de PCR, como mostrado na Figura 8-45. Para ambos os tipos de clonagem, a sequência de nucleotídeos de pelo menos uma parte da região a ser clonada deve ser conhecida antecipadamente.

pouco quanto uma única célula – e para identificar o indivíduo do qual a amostra se originou pela sua "impressão digital" genética (**Figura 8-47**).

As células podem ser usadas como fábricas para produzir proteínas específicas

A vasta maioria das milhares de proteínas diferentes em uma célula, incluindo várias com funções crucialmente importantes, está presente em pequenas quantidades. No passado, para a maior parte delas, foi extremamente difícil, se não impossível, obter mais que poucas microgramas de material puro. Uma das contribuições mais importantes da clonagem de DNA e da engenharia genética para a biologia celular é que tornou-se possível produzir qualquer das proteínas celulares em quantidades quase que ilimitadas.

Grandes quantidades de uma proteína desejada são produzidas em células vivas utilizando **vetores de expressão** (**Figura 8-48**). Em geral, eles são plasmídeos projetados para produzir grandes quantidades de um mRNA estável que pode ser traduzido eficientemente em proteína em bactéria, levedura, inseto ou célula de mamífero transfectada. Para prevenir que a grande quantidade da proteína estranha interfira com o crescimento da célula transfectada, o vetor de expressão muitas vezes é projetado para retardar a síntese do mRNA estranho e da proteína até um pouco antes das células serem coletadas e rompidas (**Figura 8-49**).

Como a proteína desejada é produzida a partir de um vetor de expressão dentro de uma célula, ela deve ser purificada das proteínas da célula hospedeira por cromatografia, após a lise das células; contudo, como existem espécies abundantes no lisado de células (frequentemente 1 a 10% da proteína total), a purificação geralmente é fácil de ser realizada em apenas algumas etapas. Como vimos anteriormente, vários vetores de expressão foram

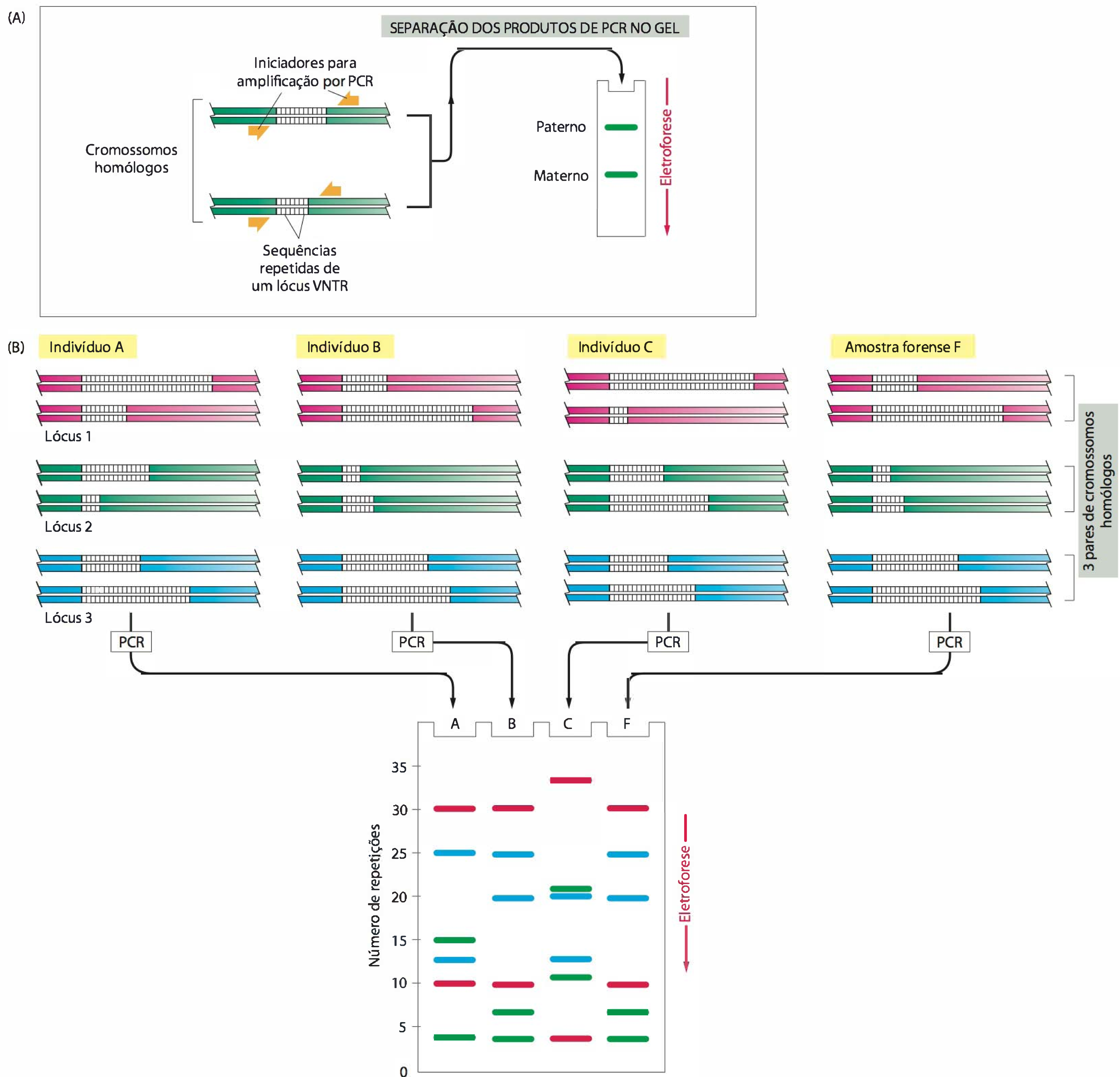


Figura 8-47 Como a PCR é utilizada na ciência forense. (A) As sequências de DNA que criam a variabilidade utilizada nesta análise contêm séries de pequenas sequências repetidas, como CACACA..., que são encontradas em várias posições (Loci) no genoma humano. O número de repetições em cada série pode ser muito variável na população, podendo ser de 4 a 40 em indivíduos diferentes. Uma série de nucleotídeos repetidos desse tipo normalmente é chamada de sequência *microssatélite hipervariável* – também conhecida como sequência VNTR (número variável de repetições em sequência, de *variable number of tandem repeat*). Por causa da variabilidade nessas sequências em cada lócus, os indivíduos em geral herdam uma variante diferente da mãe e do pai; portanto, dois indivíduos não-relacionados comumente não contêm o mesmo par de sequências. Uma análise de PCR utilizando iniciadores que flanqueiam o lócus produz um par de bandas de DNA amplificado a partir de cada indivíduo, uma banda representando a variante materna, e a outra representando a variante paterna. O comprimento do DNA amplificado e, desse modo, a posição da banda produzida após a eletroforese dependem do número exato de repetições no lócus. (B) No exemplo esquematizado mostrado aqui, os mesmos três loci VNTR são analisados (necessitando de três diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores especialmente selecionados) de três suspeitos (indivíduos A, B e C), produzindo seis bandas de DNA para cada pessoa após a eletroforese em gel de poliacrilamida. Embora alguns indivíduos tenham várias bandas em comum, o padrão geral é bastante distinto para cada um deles. O padrão de bandas pode, portanto, servir como uma "impressão digital" para identificar um indivíduo de forma única. A quarta canaleta (F) contém os produtos das mesmas reações realizadas com uma amostra forense. O material inicial para essa PCR pode ser um fio de cabelo, ou uma pequena amostra de sangue que tenha sido deixada na cena do crime. Quando a variabilidade é examinada em 5 a 10 loci VNTR diferentes, a probabilidade de que dois indivíduos aleatórios compartilhem o mesmo padrão genético por acaso pode ser de aproximadamente uma em 10 bilhões. No caso mostrado aqui, os indivíduos A e C podem ser eliminados de inquéritos adicionais, enquanto o indivíduo B continua a ser um suspeito claro de ter cometido o crime. Uma abordagem similar é utilizada rotineiramente para teste de paternidade.

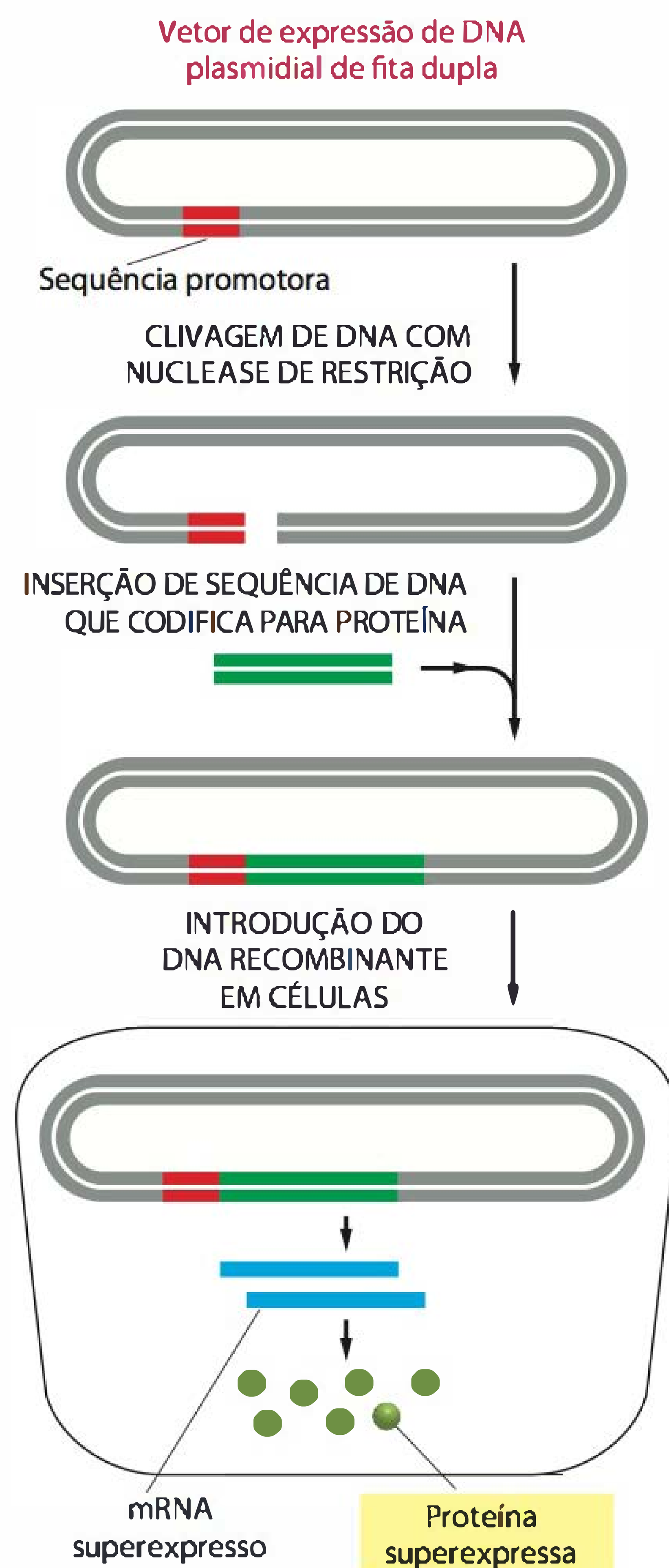


Figura 8-48 Produção de grandes quantidades de uma proteína a partir de uma sequência de DNA que codifica para uma proteína clonada em um vetor de expressão e introduzida em células. Um vetor plasmidial foi modificado para conter um promotor altamente ativo, que causa a produção de grandes quantidades anormais de mRNA a partir de um gene adjacente, codificante para uma proteína, inserido no vetor plasmidial. Dependendo das características do vetor de clonagem, o plasmídeo é introduzido em células de bactéria, levedura, inseto ou mamífero, onde o gene inserido é transcrito de forma eficiente e traduzido em proteína.

projetados para adicionar um marcador molecular – um grupo de resíduos de histidina ou uma pequena proteína marcadora – à proteína expressa, para permitir uma purificação fácil por cromatografia de afinidade (ver Figura 8-16). Uma variedade de vetores de expressão está disponível, cada um modificado por engenharia genética para funcionar em um tipo de célula na qual a proteína deverá ser produzida. Dessa maneira, as células podem ser induzidas a produzir vastas quantidades de proteína úteis na medicina – como a insulina humana e o hormônio de crescimento, o interferon e os antígenos virais para vacinas. Em um contexto mais amplo, esses métodos tornaram possível a produção de qualquer proteína – até mesmo aquelas que podem estar presentes em apenas algumas cópias por célula – em quantidades suficientemente grandes para que sejam utilizadas nos tipos de estudos detalhados de estrutura e de função discutidos anteriormente.

A tecnologia do DNA também pode produzir grandes quantidades de qualquer molécula de RNA cujo gene foi isolado. Os estudos do *splicing* de RNA, da síntese de proteínas e das enzimas com base em RNA, por exemplo, são bastante facilitados pela disponibilidade de moléculas puras de RNA. A maioria dos RNAs está presente apenas em pequenas quantidades nas células, e eles são muito difíceis de ser purificados dos outros componentes celulares – especialmente dos vários milhares de outros RNAs presentes na célula. Contudo, qualquer RNA de interesse pode ser sintetizado eficientemente *in vitro* pela transcrição da sua sequência de DNA (produzida por um dos métodos recém-descritos) com uma RNA-polimerase viral altamente eficiente. Os tipos singulares de RNA produzidos são facilmente purificados do DNA-molde e da RNA-polimerase.

Proteínas e ácidos nucleicos podem ser sintetizados diretamente por reações químicas

Reações químicas têm sido desenvolvidas para sintetizar sequências específicas de aminoácidos ou ácidos nucleicos diretamente. Essas metodologias fornecem fontes diretas de moléculas biológicas e não dependem de qualquer célula ou enzima. A síntese química é o método de escolha para obter ácidos nucleicos de 100 nucleotídeos ou menos, particularmente úteis nas abordagens com base na PCR discutidas anteriormente. A síntese química normalmente também é utilizada para produzir peptídeos específicos que, quando quimicamente ligados a outras proteínas, são usados para gerar anticorpos contra o peptídeo.

O DNA pode ser rapidamente sequenciado

Métodos que permitem que uma sequência de nucleotídeos de qualquer fragmento de DNA seja determinada de forma simples e rápida tornaram possível determinar as sequências de DNA de dezenas de milhares de genes e de vários genomas completos (ver Tabela 1-1, p. 18). O volume de informação da sequência de DNA agora é tão grande (várias dezenas de bilhões de nucleotídeos) que computadores potentes devem ser usados para armazená-lo e analisá-lo.

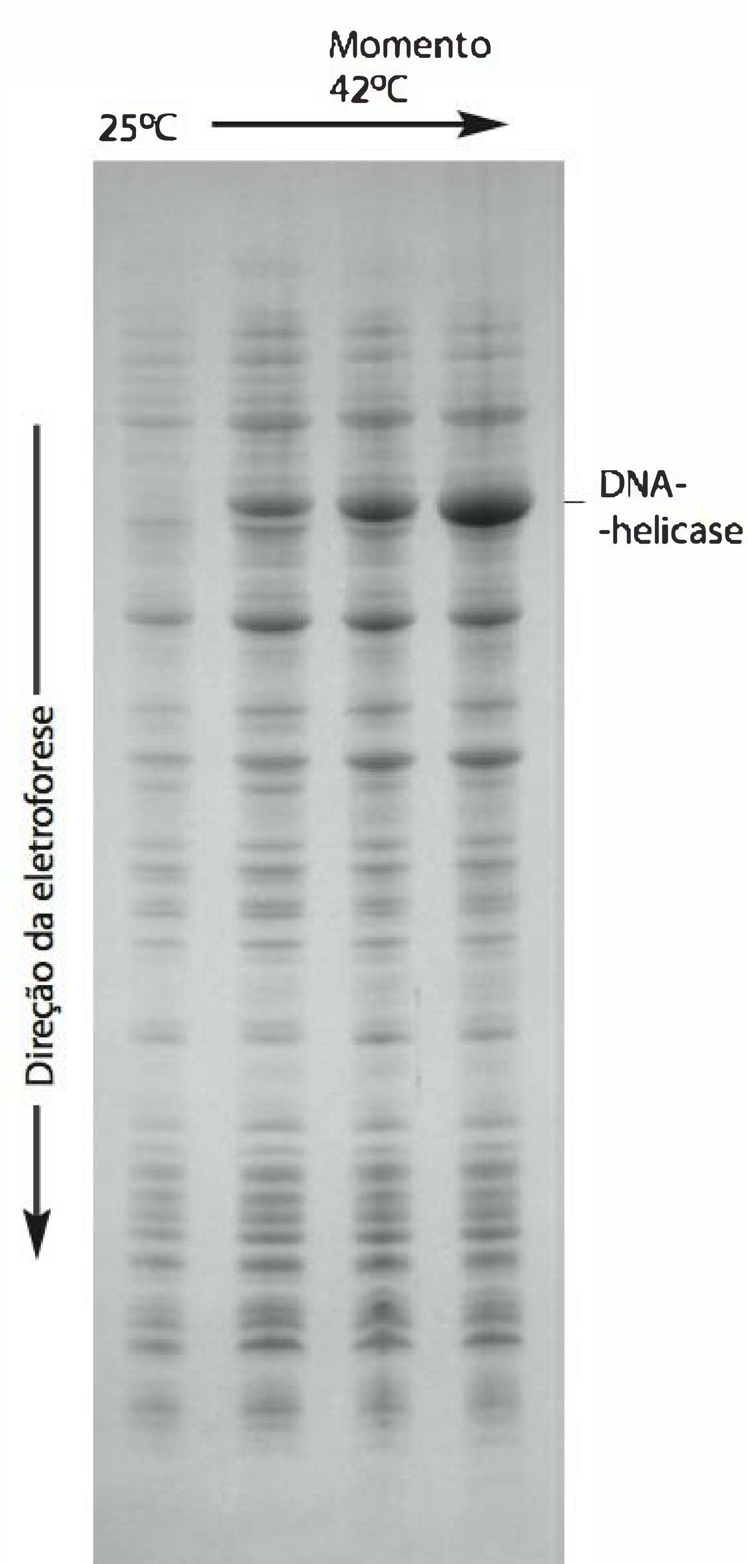


Figura 8-49 Produção de grandes quantidades de uma proteína utilizando um vetor plasmidial de expressão. Neste exemplo, células bacterianas foram transfectadas com a sequência codificante para uma enzima, DNA-helicase; a transcrição dessa sequência codificante está sob controle de um promotor viral que se torna ativo apenas a temperaturas de 37°C ou mais. A proteína total da célula foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, tanto de bactérias crescidas a 25°C (não ocorre a produção da proteína helicase) como, depois de uma alteração das mesmas bactérias, a 42°C por até duas horas (a proteína helicase se tornou a espécie de proteína mais abundante no lisado). (Cortesia de Jack Barry.)

Grandes volumes de sequenciamento de DNA foram possíveis com o desenvolvimento, em meados dos anos de 1970, do **método de didesoxi** para sequenciamento de DNA, que tem como base a síntese de DNA *in vitro* realizada na presença dos trifosfatos de didesoxinucleosídeo terminadores da cadeia (**Figura 8-50**).

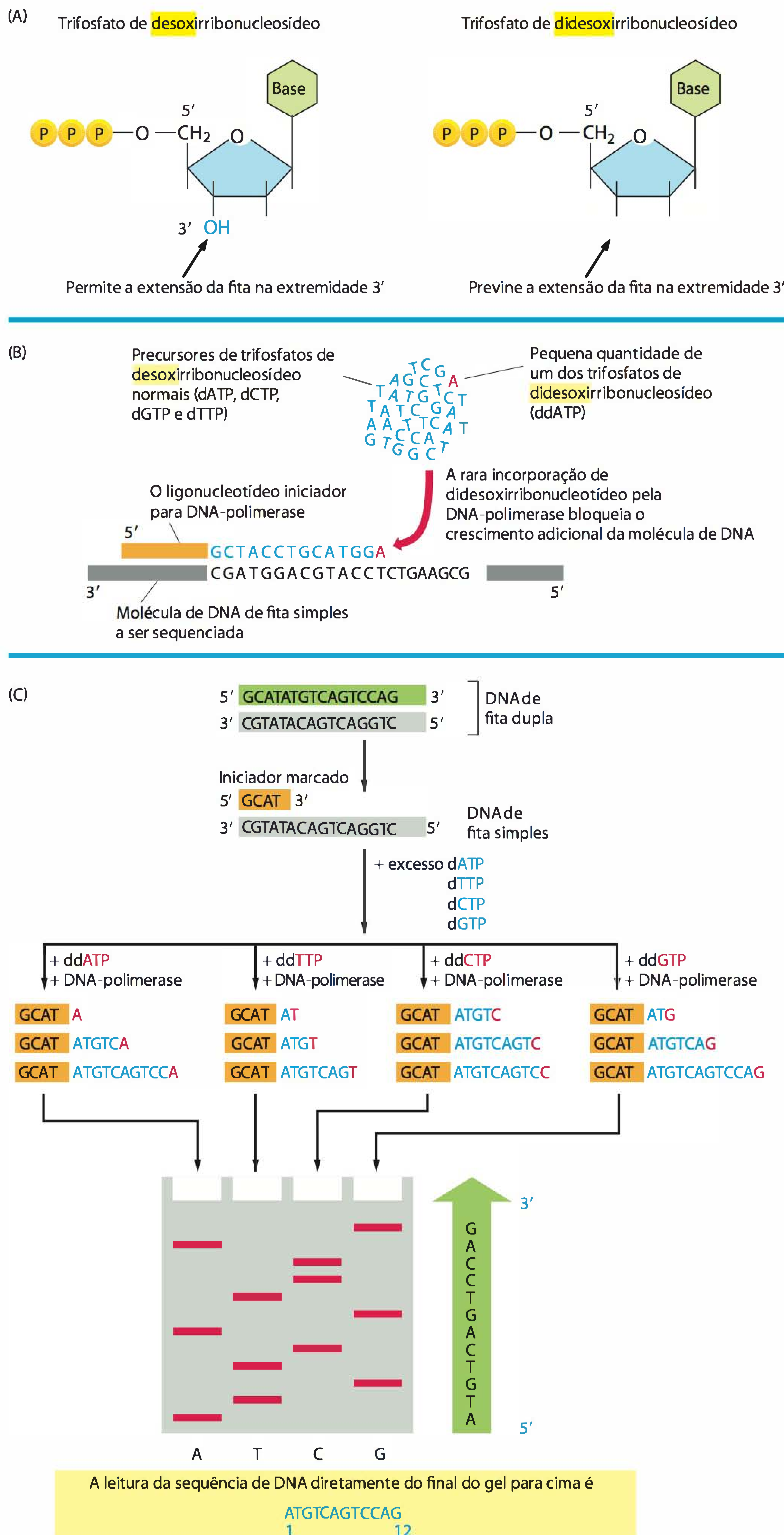


Figura 8-50 Método enzimático – ou didesoxi – de sequenciamento de DNA. (A) Esse método tem como base o uso de trifosfatos de didesoxinucleosídeo, derivados dos trifosfatos de desoxinucleosídeo normais que não têm o grupo hidroxila 3′. (B) O DNA purificado é sintetizado *in vitro* em uma mistura que contém moléculas de fita simples do DNA a ser sequenciado (*cinza*), a enzima DNA-polimerase, um iniciador curto de DNA (*laranja*), que permite que a DNA-polimerase inicie a síntese de DNA, e os quatro trifosfatos de desoxinucleosídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: A, C, G e T em *azul*). Se um análogo do didesoxinucleotídeo (*vermelho*) de um desses nucleotídeos também está presente na mistura de nucleotídeos, ele pode ser incorporado em uma cadeia de DNA crescente. Como essa cadeia agora não tem um grupo OH 3′, a adição do próximo nucleotídeo é bloqueada, e a cadeia de DNA termina nesse ponto. No exemplo ilustrado, uma pequena quantidade do didesoxiATP (ddATP, simbolizado aqui como um A *vermelho*) foi incluída na mistura de nucleotídeos. Ele compete com um excesso do desoxiATP normal (dATP, A *azul*), de maneira que o ddATP é incorporado ocasionalmente de forma aleatória em uma fita de DNA crescente. Essa mistura de reação finalmente produzirá um conjunto de DNAs de diferentes comprimentos, complementares ao DNA-molde que está sendo sequenciado e terminando em cada um dos seus diferentes As. Os comprimentos exatos dos produtos de síntese de DNA podem ser então utilizados para determinar a posição de cada A na cadeia crescente. (C) Para determinar a sequência completa de um fragmento de DNA, o DNA de fita dupla é primeiro separado em fitas simples, e uma das fitas é utilizada como molde para o sequenciamento. Quatro trifosfatos de didesoxirribonucleosídeo diferentes terminadores de cadeia (ddATP, ddCTP, ddGTP ddTTP, novamente mostrados em *vermelho*) são utilizados em quatro reações de síntese de DNA separadas em cópias da mesma fita simples de DNA-molde (*cinza*). Cada reação produz um conjunto de cópias de DNA que termina em pontos diferentes na sequência. Os produtos dessas quatro reações são separados por eletroforese em quatro canaletas paralelas de um gel de poliacrilamida (marcados aqui como A, T, C e G). Os novos fragmentos sintetizados são detectados por um marcador (radiativo ou fluorescente) que foi incorporado no iniciador ou em um dos trifosfatos de desoxinucleosídeo utilizados para estender a cadeia de DNA. Em cada canaleta, as bandas representam os fragmentos que foram terminados em um dado nucleotídeo (p. ex., A na canaleta mais à esquerda), mas em diferentes posições no DNA. Fazendo a leitura das bandas em ordem, iniciando no final do gel e passando por todas as canaletas, a sequência de DNA da nova fita sintetizada poderá ser determinada. A sequência é mostrada na *seta verde*, à direita do gel. Essa sequência é complementar à fita-molde (*cinza*) da molécula de DNA de fita dupla original e idêntica a uma porção da fita 5′→3′ *verde*.

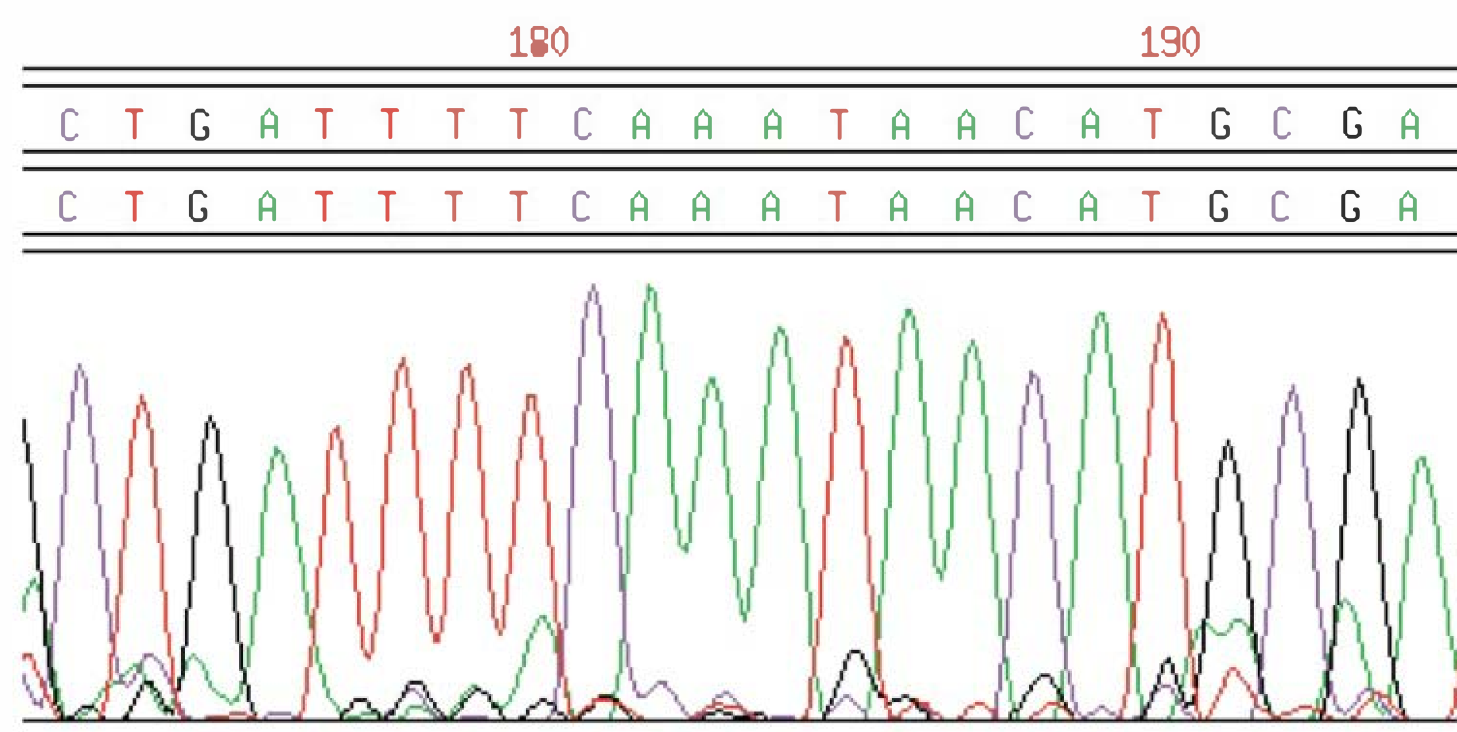


Figura 8-51 Sequenciamento automático de DNA. Aqui está mostrada uma pequena parte dos dados de uma corrida de sequenciamento automático de DNA, como aparece na tela do computador. Cada pico colorido proeminente representa um nucleotídeo na sequência de DNA – uma extensão clara da sequência de nucleotídeos pode ser lida aqui entre as posições 173 e 194 a partir do início da sequência. Os pequenos picos ao longo da linha de base representam o "ruído" e, enquanto forem muito mais baixos do que os picos de "sinal", são ignorados. Este exemplo, em particular, foi retirado de um projeto internacional que determinou a sequência completa de nucleotídeos do genoma da planta *Arabidopsis*. (Cortesia de George Murphy.)

Embora o mesmo método básico seja utilizado atualmente, vários aperfeiçoamentos foram realizados. O sequenciamento de DNA agora é completamente automatizado: pelo uso da robótica, os reagentes são misturados e depois aplicados; após a corrida, são lidos na ordem das bases de nucleotídeos a partir do gel. Os nucleotídeos terminadores de cadeia marcados com corantes fluorescentes coloridos diferentes facilitam o processo; nesse caso, todas as quatro reações de síntese podem ser realizadas no mesmo tubo, e os produtos podem ser separados em uma única canaleta de gel. Um detector posicionado perto do final do gel lê e grava a cor do marcador fluorescente em cada banda, quando esta passa pelo feixe de *laser* (**Figura 8-51**). Um computador, então, faz a leitura e armazena essa sequência de nucleotídeos. Alguns sistemas modernos dispensam por completo o tradicional gel, separando os ácidos nucleicos por eletroforese capilar, um método que facilita a automação rápida.

As sequências de nucleotídeos são utilizadas para predizer a sequência de aminoácidos de proteínas

Agora que o sequenciamento de DNA é tão rápido e seguro, ele se tornou o método preferido para determinar, indiretamente, as sequências de aminoácidos da maioria das proteínas. Dada uma sequência de nucleotídeos que codifica para uma proteína, o procedimento é bastante simples. Embora, em princípio, existam seis fases de leitura diferentes nas quais a sequência de DNA pode ser traduzida em proteína (três em cada fita), a correta geralmente é reconhecida como a única sem códons de terminação frequentes (**Figura 8-52**). Como vimos quando discutimos o código genético no Capítulo 6, uma sequência de nucleotídeos

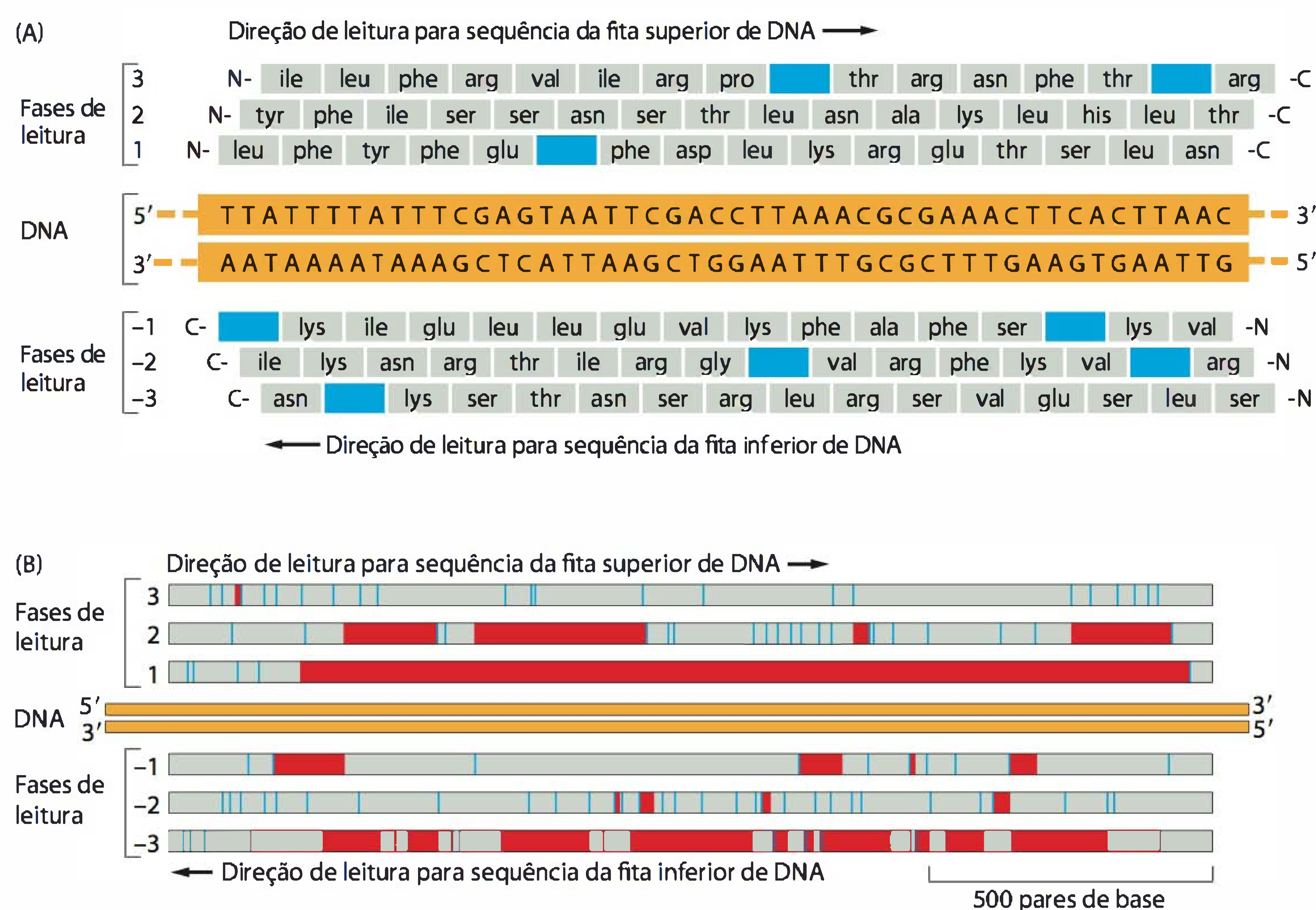


Figura 8-52 Encontrando as regiões em uma sequência de DNA que codificam para uma proteína. (A) Qualquer região da sequência de DNA pode, em princípio, codificar para seis sequências diferentes de aminoácidos, pois qualquer uma das três fases de leitura diferentes pode ser utilizada para interpretar a sequência de nucleotídeos em cada fita. Note que uma sequência de nucleotídeos sempre é lida na direção 5′ para 3′ e codifica para um polipeptídeo do N-terminal para o C-terminal. Para uma sequência de nucleotídeos aleatória lida em uma determinada fase, um sinal de terminação para a síntese de proteína é encontrado, em média, cerca de uma vez a cada 20 aminoácidos. Neste exemplo de sequência de 48 pares de bases, cada um desses sinais (*códon de terminação*) está em azul e somente a fase de leitura 2 não tem um códon de terminação. (B) Análise de uma sequência de DNA de 1.700 pares de bases para a localização de uma possível sequência codificante para proteína. A informação é apresentada como em (A), com cada sinal de terminação para a síntese de proteína assinalado por uma *linha azul*. Além disso, todas as regiões entre possíveis sinais de início e de terminação para a síntese de proteínas (ver p. 381) estão indicadas como *barras vermelhas*. Apenas a fase de leitura 1 realmente codifica para uma proteína, que tem 475 resíduos de aminoácidos de comprimento.

aleatória, lida em fase, codificará um sinal de parada para a síntese proteica, cerca de um a cada 20 aminoácidos. As sequências de nucleotídeos que codificam para uma extensão de aminoácidos muito mais longa do que isso são candidatas a presumíveis éxons e podem ser traduzidas (por computador) em sequências de aminoácidos e comparadas aos bancos de dados quanto a sua similaridade com proteínas conhecidas de outros organismos. Se necessário, uma quantidade limitada de sequências de aminoácidos pode então ser determinada a partir da proteína purificada, para confirmar a sequência prevista do DNA.

O problema, entretanto, é determinar quais as sequências de nucleotídeos – dentro de uma sequência genômica inteira – representam genes que codificam para proteínas. A identificação dos genes é mais fácil quando a sequência de DNA é de um cromossomo bacteriano ou de uma arquibactéria, que não tem íntrons, ou de um clone de cDNA. A localização dos genes nessas sequências de nucleotídeos pode ser predita analisando-se o DNA quanto a determinadas características distintivas (discutidas no Capítulo 6). Resumidamente, esses genes que codificam para proteínas são identificados pela análise da sequência de nucleotídeos por *fases de leitura abertas* (*ORFs*, *open reading frames*), que iniciam com um códon de iniciação, normalmente ATG, e terminam com um códon de terminação, TAA, TAG ou TGA. Para minimizar os erros, os computadores utilizados para procurar ORFs frequentemente são programados para considerar como genes apenas aquelas sequências que são mais longas que 100 códons.

Para genomas mais complexos, como aqueles de animais e plantas, a presença dos íntrons grandes embebidos dentro da porção codificante dos genes complica o processo. Em vários organismos multicelulares, incluindo os humanos, os éxons têm em média somente 150 nucleotídeos de comprimento. Desse modo, deve-se procurar também por outras características que sinalizem a presença de um gene, por exemplo, as sequências que sinalizam uma ligação entre um íntron e um éxon ou regiões reguladoras características antes do gene. Esforços recentes para resolver o problema de predição de éxons voltaram-se para os algoritmos de inteligência artificial, nos quais o computador aprende, com base em exemplos conhecidos, quais grupos de características são mais indicativos de uma ligação a éxons.

Uma segunda abordagem importante para identificar as regiões codificantes nos cromossomos é por meio da caracterização das sequências de nucleotídeos dos mRNAs detectáveis (usando os cDNAs correspondentes). Os mRNAs (e os cDNAs produzidos a partir deles) não têm íntrons, sequências de DNA reguladoras, nem os DNAs "espaçadores" não-essenciais que ficam entre os genes. Desse modo, é útil sequenciar vários cDNAs para produzir um grande banco de dados de sequências codificantes de um organismo. Essas sequências são, então, prontamente utilizadas para distinguir os éxons dos íntrons nas longas sequências de DNA cromossomal que correspondem a genes.

Os genomas de vários organismos foram totalmente sequenciados

Devido, em grande parte, à automação do sequenciamento de DNA, o genoma de vários organismos foi totalmente sequenciado; isso inclui cloroplastos de plantas e mitocôndrias animais, um grande número de bactérias e arquibactérias e vários dos organismos-modelo estudados rotineiramente em laboratório, incluindo várias leveduras, um verme nematódeo, a mosca-das-frutas *Drosophila*, a planta-modelo *Arabidopsis*, o camundongo, o cão, o chimpanzé e, por último, mas não menos importante, os humanos. Os pesquisadores também deduziram as sequências completas de DNA de uma grande quantidade de patógenos humanos. Isso inclui as bactérias que causam cólera, tuberculose, sífilis, gonorreia, doença de Lyme e úlceras de estômago, assim como centenas de viroses – incluindo o vírus da varíola e o vírus de Epstein-Barr (que causa mononucleose infecciosa). O estudo dos genomas desses patógenos deverá prover indícios sobre o que os torna virulentos e mostrará o caminho para tratamentos novos e mais eficazes.

O *Haemophilus influenzae* (uma bactéria que pode causar infecções no ouvido ou meningite em crianças) foi o primeiro organismo que teve sua sequência genômica completa – um total de 1,8 milhão de pares de nucleotídeos – determinada pelo *método de sequenciamento aleatório* (*shotgun*), a estratégia mais comum utilizada atualmente. No método aleatório, longas sequências de DNA são quebradas aleatoriamente em vários fragmentos menores. Cada fragmento é então sequenciado, e um computador é utilizado para ordenar esses pedaços em um cromossomo ou genoma inteiro, utilizando a sobreposição das sequências para guiar a montagem. O método aleatório é a técnica de escolha para sequenciar

pequenos genomas. Embora as sequências sejam maiores, quanto mais sequências genômicas repetitivas, mais difícil é a montagem, e o método aleatório – em combinação com a análise de fragmentos de DNA grandes clonados em BACs – tem tido um papel importante no sequenciamento delas também.

Com novas sequências aparecendo a um ritmo impressionantemente acelerado na literatura científica, a comparação das sequências genômicas completas de diferentes organismos nos permite traçar as relações evolutivas entre genes e organismos, assim como descobrir genes e predizer suas funções (discutido nos Capítulos 3 e 4). Designar funções aos genes frequentemente envolve comparar suas sequências com sequências relacionadas de organismos-modelo que foram bem-caracterizadas em laboratório, como a bactéria *E. coli*, as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombae*, o verme nematódeo *C. elegans* e a mosca-das-frutas *Drosophila* (discutido no Capítulo 1).

Embora os organismos cujos genomas foram sequenciados compartilhem várias vias bioquímicas e possuam várias proteínas homólogas em sua sequência de aminoácidos ou em sua estrutura, as funções de um grande número de novas proteínas identificadas ainda são desconhecidas. Dependendo do organismo, cerca de 15 a 40% das proteínas codificadas por um genoma sequenciado não se assemelham a qualquer outra proteína estudada bioquimicamente. Essa observação revela uma das limitações do campo emergente da genômica: embora a análise comparativa dos genomas revele uma grande quantidade de informações sobre as relações entre genes e organismos, ela frequentemente não fornece informação imediata sobre como esses genes funcionam ou sobre quais papéis eles têm na fisiologia de um organismo. A comparação do complemento inteiro do gene de várias bactérias termofílicas, por exemplo, não revela por que essas bactérias se desenvolvem a temperaturas que excedem 70°C. Além disso, o estudo do genoma da bactéria *Deinococcus radiodurans,* incrivelmente resistente à radiação, não explica como esse organismo pode sobreviver a uma descarga de radiação que pode despedaçar vidro. Serão necessários estudos bioquímicos e genéticos adicionais, como aqueles descritos em outras seções desse capítulo, para determinar como os genes, e as proteínas que eles produzem, funcionam no contexto de organismos vivos.

Resumo

A clonagem de DNA permite que uma cópia de qualquer parte específica de uma sequência de DNA ou de RNA seja selecionada a partir de milhões de outras sequências em uma célula e seja produzida em quantidades ilimitadas em uma forma pura. As sequências de DNA podem ser amplificadas depois da clivagem do DNA cromossomal com uma nuclease de restrição e inserção dos fragmentos de DNA resultantes no cromossomo de um elemento genético autorreplicante, como um vírus ou plasmídeo. Os vetores plasmidiais geralmente são utilizados, e a "biblioteca de DNA genômico" resultante é mantida em milhões de células bacterianas, cada uma carregando um fragmento diferente de DNA clonado. As células individuais dessa biblioteca são cultivadas para produzir grandes quantidades de um único fragmento de DNA clonado. A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite que a clonagem de DNA seja realizada diretamente com uma DNA-polimerase termoestável – desde que a sequência de DNA de interesse já seja conhecida.

Os procedimentos utilizados para obter clones de DNA que correspondem, na sequência, a moléculas de mRNA, são os mesmos, com exceção que uma cópia de DNA da sequência de mRNA, chamada de cDNA, é feita primeiro. Diferentemente dos clones de DNA genômico, os clones de cDNA não têm sequências de íntrons, sendo os clones de escolha para analisar o produto proteico de um gene.

As reações de hibridização dos ácidos nucleicos fornecem um meio sensível de detectar um gene ou outra sequência nucleotídica de escolha qualquer. Sob condições estringentes de hibridização (uma combinação de solvente e de temperatura na qual até mesmo uma dupla-hélice perfeita é pouco estável), duas fitas somente podem parear para formar uma hélice "híbrida" se suas sequências de nucleotídeos forem quase que perfeitamente complementares. A enorme especificidade dessa reação de hibridização permite que qualquer sequência nucleotídica de fita simples seja marcada com um radioisótopo ou químico e seja utilizada como sonda para encontrar uma fita complementar, até mesmo em uma célula ou em um extrato celular que contenha milhões de sequências de DNA ou de RNA diferentes. As sondas desse tipo são amplamente utilizadas para detectar os ácidos nucleicos correspondentes a genes específicos, tanto para facilitar sua purificação e sua caracterização como para localizá-los nas células, nos tecidos e nos organismos.

A sequência nucleotídica do DNA pode ser determinada de forma rápida e simples utilizando-se técnicas altamente automatizadas com base no método didesoxi para sequenciamento de DNA. Essa técnica tornou possível determinar a sequência de DNA completa de genomas de vários organismos. A comparação das sequências genômicas de diferentes organismos nos permite traçar as relações evolutivas entre genes e organismos, e provou ser valiosa para descobrir novos genes e prever suas funções.

Tomadas em conjunto, essas técnicas para análise e manipulação de DNA tornaram possível identificar, isolar e sequenciar genes de vários organismos de interesse. As tecnologias relacionadas permitiram aos cientistas produzir os produtos proteicos desses genes em grandes quantidades necessárias para uma análise detalhada de sua estrutura e função, assim como para propósitos medicinais.

ESTUDO DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DOS GENES

Finalmente, desejamos determinar como os genes – e as proteínas que eles codificam – funcionam no organismo intacto. Embora possa parecer controverso, uma das maneiras mais diretas de descobrir qual a função de um gene é observar o que acontece ao organismo quando o gene é perdido. Estudar organismos mutantes que adquiriram alterações ou deleções em suas sequências de nucleotídeos é uma prática consagrada em biologia e forma a base do importante campo da **genética**. Como as mutações podem interromper os processos celulares, os mutantes frequentemente têm a chave para o entendimento da função do gene. Na abordagem genética clássica, inicia-se isolando os mutantes que têm uma aparência interessante ou incomum: mosca-das-frutas com olhos brancos ou asas enroladas, por exemplo. Trabalhando de frente para trás a partir do **fenótipo** – a aparência ou o comportamento do indivíduo – determina-se então o **genótipo** do organismo, a forma do gene responsável por aquela característica (**Painel 8-1**).

Atualmente, com inúmeras sequências genômicas disponíveis, a exploração da função dos genes frequentemente inicia com uma sequência de DNA. Aqui, o desafio é traduzir a sequência em uma função. Uma abordagem, discutida anteriormente nesse capítulo, é pesquisar em bancos de dados proteínas bem-caracterizadas que tenham sequências de aminoácidos similares à proteína codificada por um novo gene e, a partir daí, empregar alguns dos métodos, descritos na seção anterior, para explorar mais a fundo a função do gene. Contudo, para determinar diretamente o problema de como um gene funciona na célula ou no organismo, a abordagem mais eficaz envolve o estudo de mutantes que não têm o gene ou expressam uma versão alterada dele. A determinação de qual processo celular foi interrompido ou comprometido nesses mutantes com frequência oferece uma perspectiva do papel biológico do gene.

Nesta seção, descrevemos várias abordagens diferentes para determinar a função de um gene, iniciando a partir de uma sequência de DNA ou de um organismo com um fenótipo interessante. Iniciaremos com uma abordagem genética clássica que começa com uma *sondagem genética* para isolar mutantes de interesse e então continua com a identificação do gene ou dos genes responsáveis pelo fenótipo observado. Então descreveremos o conjunto de técnicas que são coletivamente chamadas de *genética reversa*, em que se inicia com um gene ou uma sequência gênica e então se tenta determinar sua função. Essa abordagem muitas vezes envolve algum trabalho de adivinhação – a busca por sequências homólogas e a determinação de quando e onde um gene é expressado – assim como a geração de organismos mutantes e a caracterização de seu fenótipo.

A genética clássica inicia com a interrupção de um processo celular por mutagênese ao acaso

Antes do advento da tecnologia de clonagem de genes, a maioria dos genes era identificada pelas anormalidades produzidas quando o gene era mutado. Essa abordagem genética clássica – identificando os genes responsáveis por fenótipos mutantes – é mais facilmente realizada em organismos que se reproduzem rapidamente e são sensíveis à manipulação genética, como bactérias, leveduras, vermes nematódeos e moscas-das-frutas. Embora mutações espontâneas possam, às vezes, ser encontradas pela análise de populações extremamente grandes – milhares ou dezenas de milhares de organismos individuais – o processo

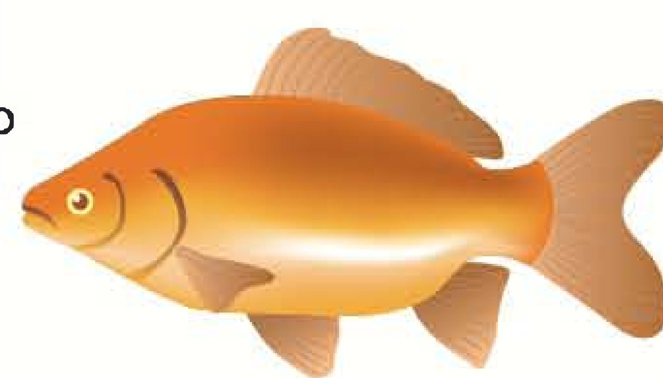
GENES E FENÓTIPOS

Gene: Uma unidade funcional de herança, normalmente correspondendo a um segmento de DNA que codifica para uma única proteína.

Genoma: Toda sequência de DNA de um organismo.

Lócus: a posição do gene no genoma.

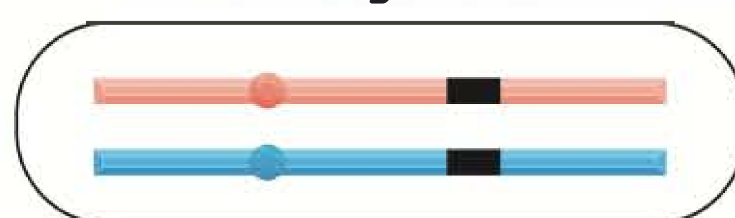
Alelos: formas alternativas de um gene.


Tipo selvagem: o tipo normal, que ocorre naturalmente.

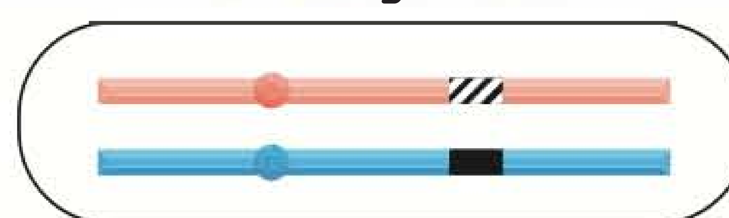

Mutante: difere do tipo selvagem devido a uma alteração genética (uma mutação).

GENÓTIPO: o conjunto específico de alelos que formam o genoma de um indivíduo.

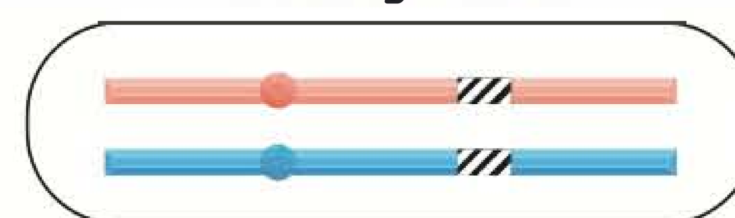
Homozigoto A/A



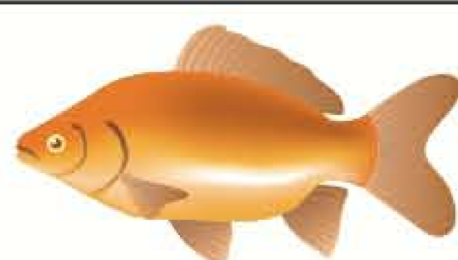
Heterozigoto a/A

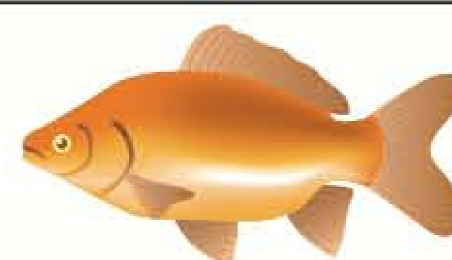


Homozigoto a/a



FENÓTIPO: a característica visível de um indivíduo.







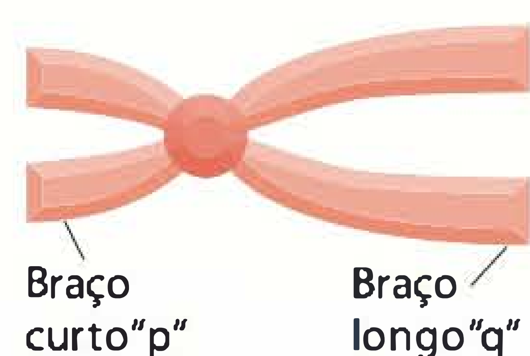
O alelo A é dominante (em relação a a); o alelo a é recessivo (em relação a A).

No exemplo acima, o fenótipo do heterozigoto é o mesmo do que o de um dos homozigotos; nos casos em que ele é diferente de ambos, os dois alelos são considerados como sendo codominantes.

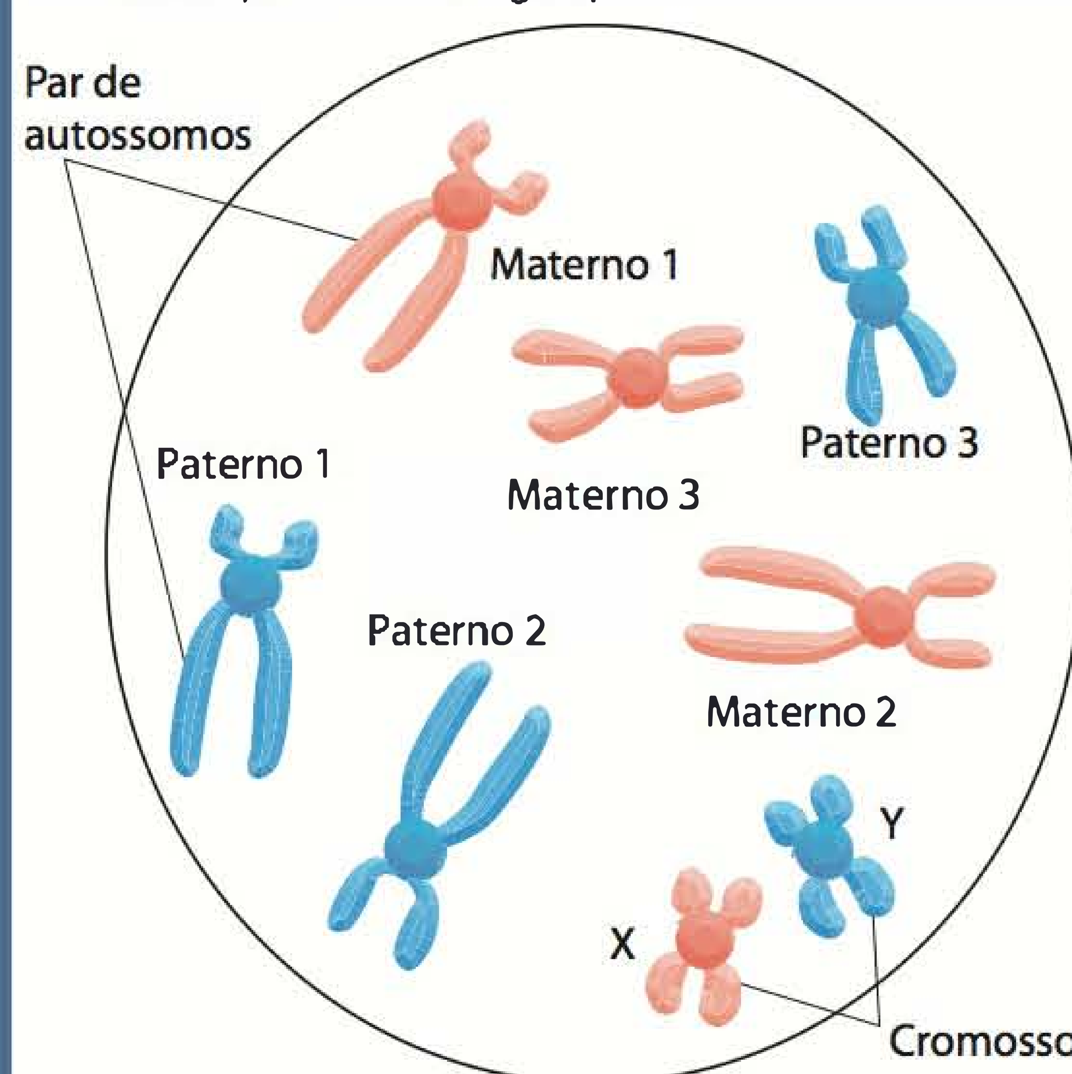
CROMOSSOMOS



Um cromossomo no início do ciclo celular, na fase G_1; a barra única longa representa uma longa dupla-hélice de DNA.

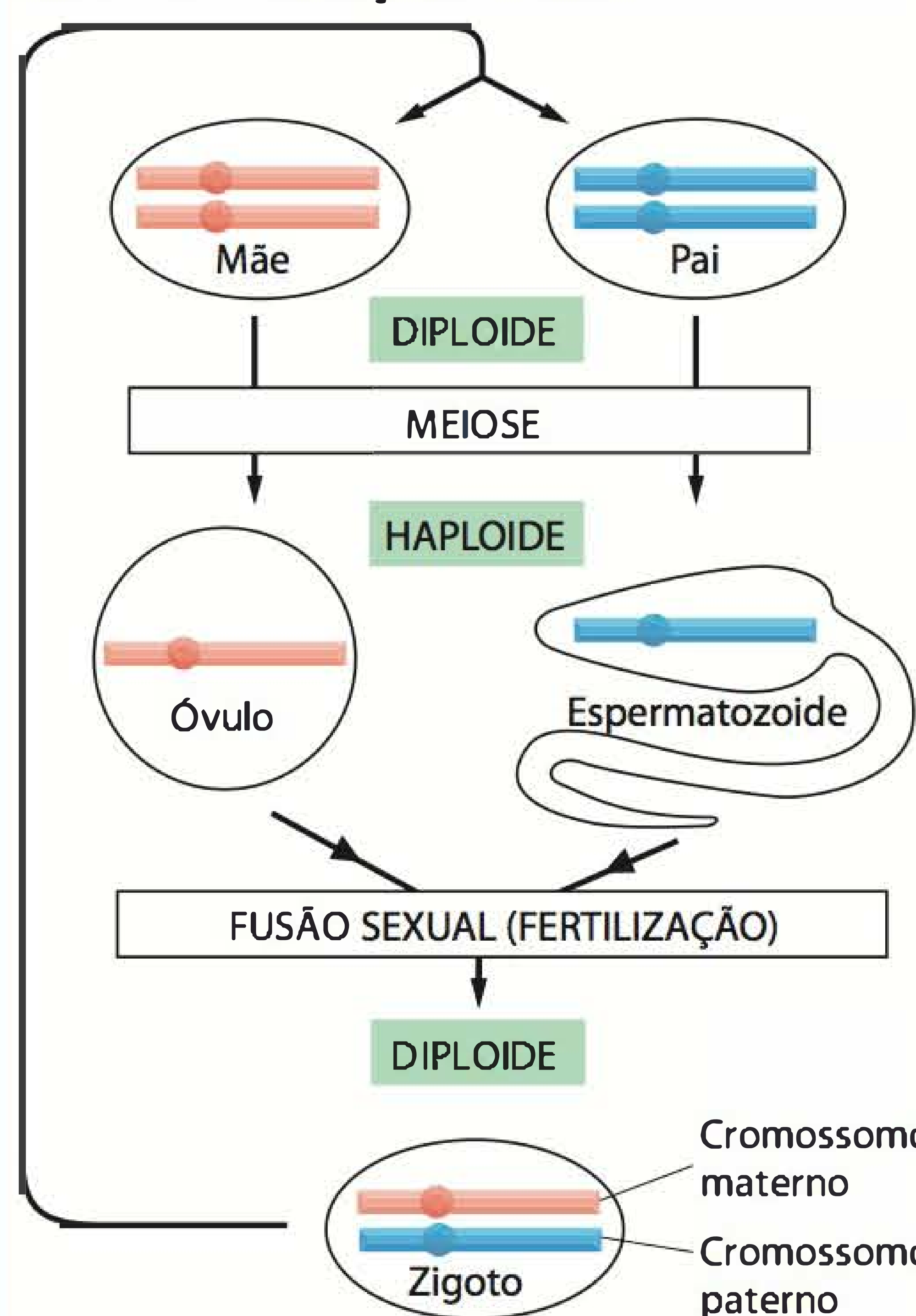


Um cromossomo ao final do ciclo celular, em metáfase; ele é duplicado e condensado, consistindo-se de duas cromátides-irmãs idênticas (cada uma contendo uma dupla-hélice de DNA) ligadas pelo centrômero.



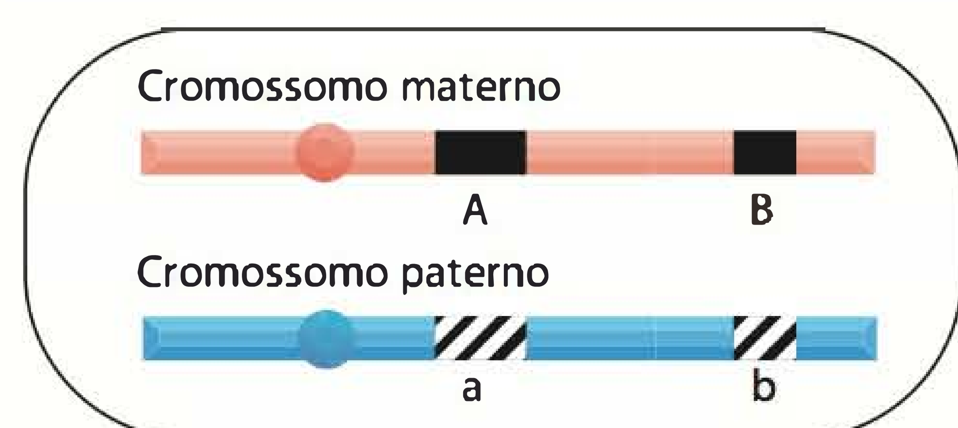
Um conjunto de cromossomos diploides normais, como visto em uma metáfase, preparados pelo rompimento de uma célula em metáfase e coloração dos cromossomos dispersos. No exemplo esquemático mostrado aqui, existem três pares de autossomos (cromossomos herdados simetricamente da mãe e do pai, independentemente do sexo) e dois cromossomos sexuais – um X da mãe e um Y do pai. Os números e os tipos de cromossomos sexuais e seu papel na determinação do sexo variam de uma classe de organismos para a outra, como ocorre para o número de pares de autossomos.

CICLO HAPLOIDE-DIPLOIDE DA REPRODUÇÃO SEXUAL



Para simplificação, o esquema é mostrado para apenas um cromossomo/par cromossômico.

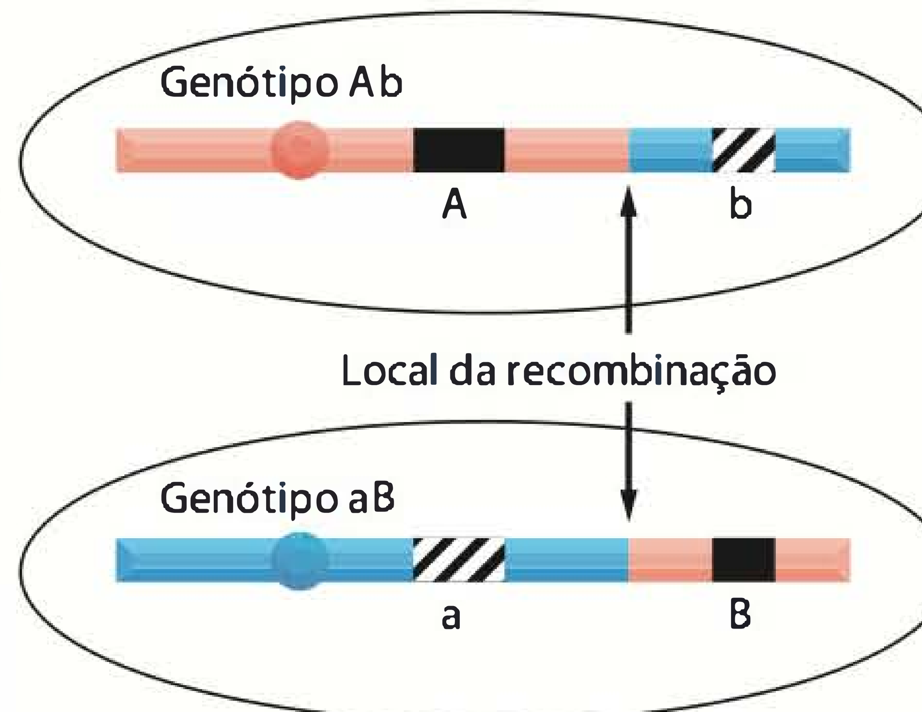
MEIOSE E RECOMBINAÇÃO GENÉTICA



Célula germinativa diploide

Genótipo $\frac{AB}{ab}$

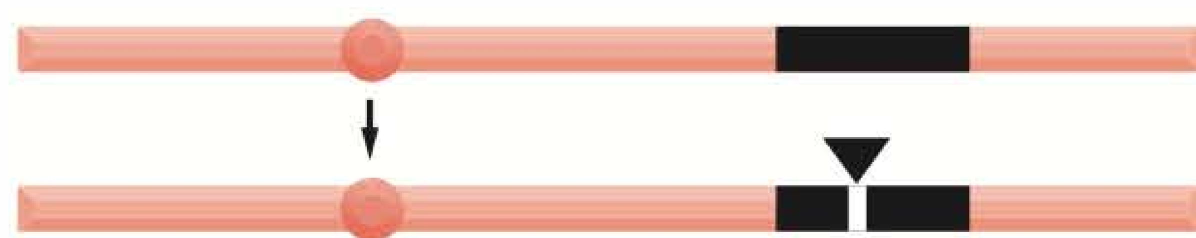
MEIOSE E RECOMBINAÇÃO



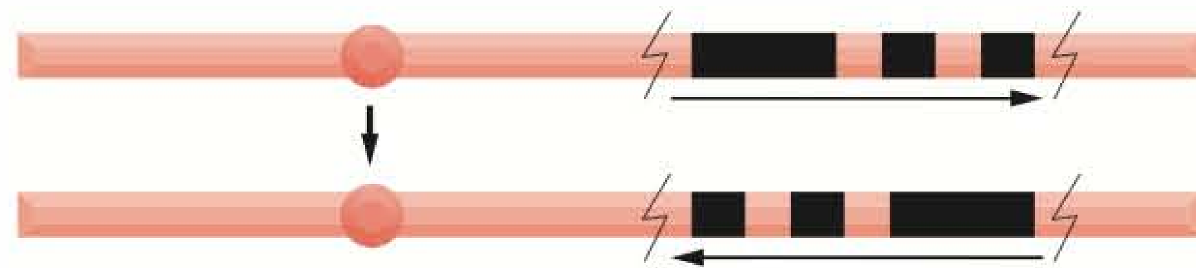
Gametas haploides (óvulos e espermatozoides)

Quanto maior a distância entre dois loci em um único cromossomo, maior é a chance de eles serem separados por recombinação, que ocorre em um sítio entre eles. Se os dois genes são assim recombinados em x% dos gametas, diz-se que eles são separados em um cromossomo por uma distância de mapa genético de x unidades de mapa (ou x centimorgans).

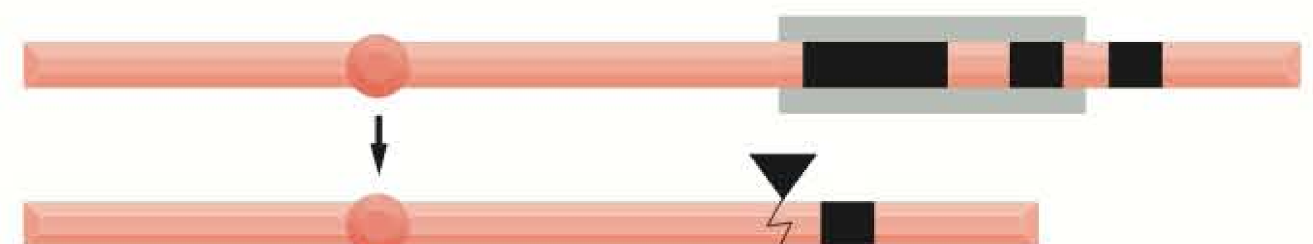
TIPOS DE MUTAÇÕES



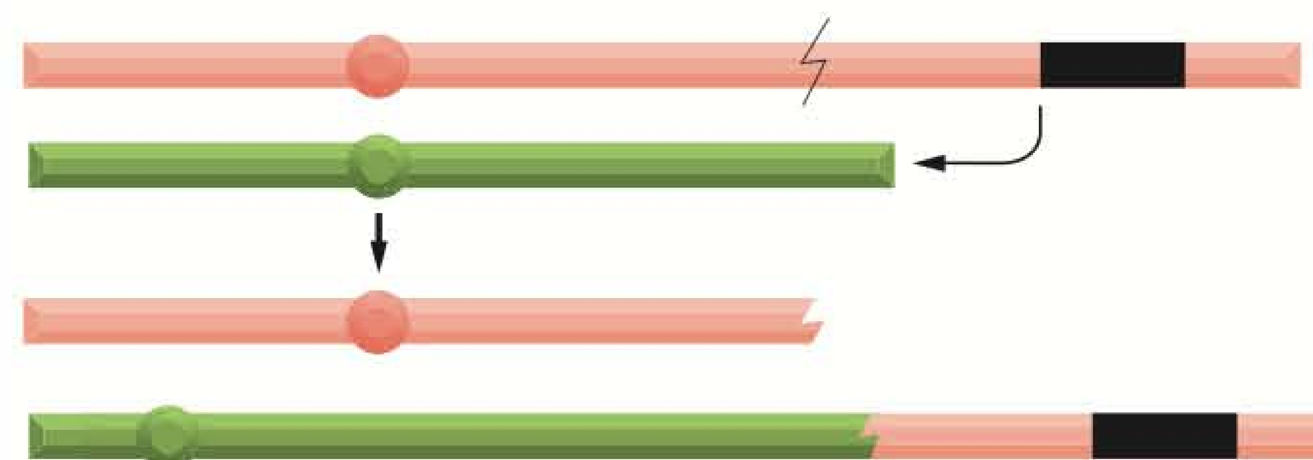
MUTAÇÃO PONTUAL: ocorre em um único sítio no genoma, correspondendo a um único par de nucleotídeos, ou a uma parte muito pequena de um único gene.



INVERSÃO: inverte um segmento de um cromossomo.



DELEÇÃO: elimina um segmento de um cromossomo.



TRANSLOCAÇÃO: retira um segmento de um cromossomo e o liga a outro.

Mutação letal: leva o organismo em desenvolvimento a morrer prematuramente.
Mutação condicional: produz seu efeito fenotípico somente sob certas condições, chamadas de *condições restritivas*. Sob outras condições – as *condições permissivas* – o efeito não é visto. Para uma mutação sensível à temperatura, a condição restritiva tipicamente é a alta temperatura, enquanto a condição permissiva é a baixa temperatura.
Mutação de perda de função: reduz ou suprime a atividade do gene. Esta é a classe mais comum de mutações. As mutações de perda de função normalmente são *recessivas* – o organismo pode funcionar normalmente enquanto manter pelo menos uma cópia normal do gene afetado.
Mutação nula: é uma mutação de perda de função que suprime completamente a atividade do gene.

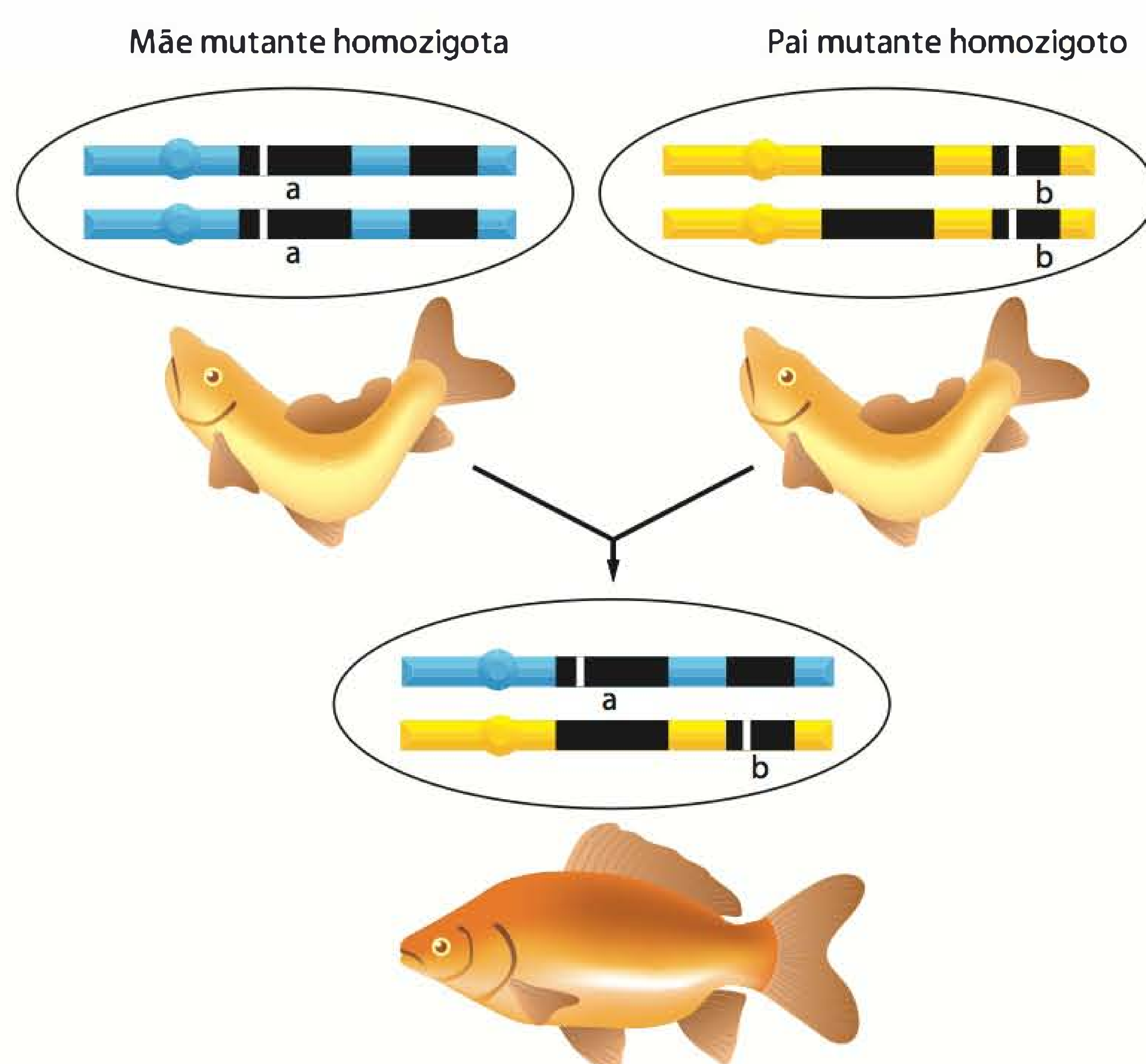
Mutação de ganho de função: aumenta a atividade do gene ou o torna ativo em circunstâncias inapropriadas; essas mutações normalmente são *dominantes*.
Mutação negativa dominante: mutação de ação dominante que bloqueia a atividade do gene causando um fenótipo de perda de função mesmo na presença de uma cópia normal do gene. Esse fenômeno ocorre quando o produto do gene mutante interfere com a função do produto do gene normal.
Mutação supressora: suprime o efeito fenotípico de outra mutação, de maneira que o mutante duplo parece normal. Uma mutação supressora *intragênica* se estabelece em um gene afetado pela primeira mutação; uma mutação supressora *extragênica* se estabelece em um segundo gene – frequentemente um gene cujo produto interage diretamente com o produto do primeiro.

DOIS GENES OU UM?

Dadas duas mutações que produzem o mesmo fenótipo, como poderemos saber se elas são mutações no mesmo gene? Se as mutações são recessivas (como é mais frequente), a resposta pode ser encontrada por um teste de complementação.

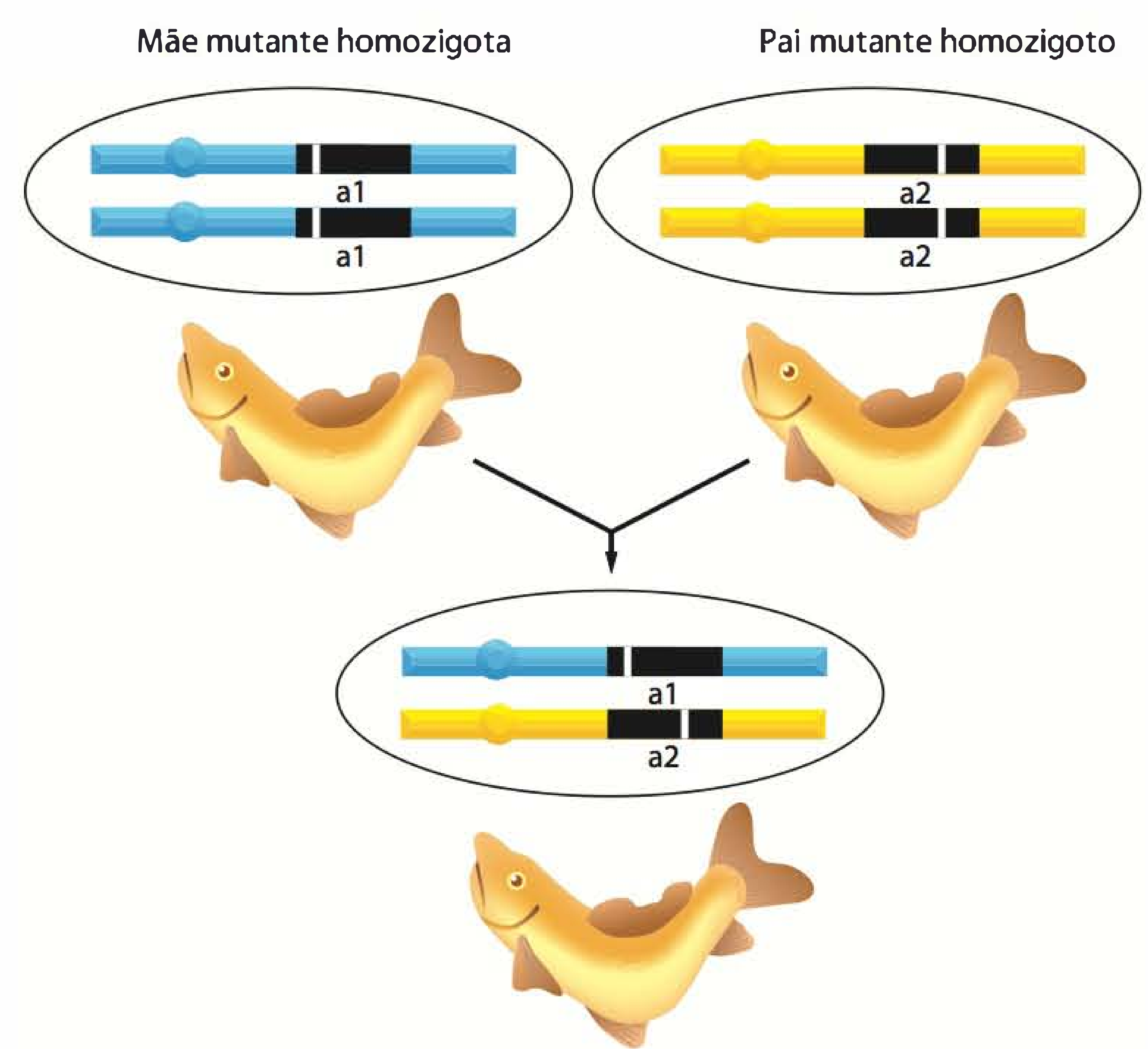
No teste de complementação mais simples, um indivíduo que é homozigoto para uma mutação é cruzado com um indivíduo que é homozigoto para a outra. O fenótipo da descendência dá a resposta para a pergunta.

COMPLEMENTAÇÃO::
MUTAÇÕES EM DOIS GENES DIFERENTES



A descendência híbrida apresenta um fenótipo normal: uma cópia normal de cada gene está presente.

NÃO-COMPLEMENTAÇÃO:
DUAS MUTAÇÕES INDEPENDENDES NO MESMO GENE



A descendência híbrida apresenta um fenótipo mutante: nenhuma cópia normal do gene mutado está presente.



Figura 8-53 Mutante de inserção da boca-de-leão, *Antirrhinum*. Uma mutação em um único gene que codifica para uma proteína reguladora faz com que brotos com folhas se desenvolvam no lugar das flores. A mutação permite que as células adotem uma característica que seria apropriada para uma parte diferente da planta normal. A planta mutante está à *esquerda*, e a planta normal, à *direita*. (Cortesia de Enrico Coen e Rosemary Carpenter.)

de isolar indivíduos mutantes é muito mais eficiente se gerarmos mutações com químicos ou radiação que danificam o DNA. Tratando os organismos com tais mutagênicos, grandes números de indivíduos mutantes podem ser criados rapidamente e então analisados quanto a um defeito específico de interesse, como discutimos brevemente.

Uma abordagem alternativa para mutagênese química ou de radiação é chamada de *mutagênese de inserção*. Esse método depende do fato de que o DNA exógeno, inserido ao acaso no genoma, pode produzir mutações se o fragmento inserido interromper um gene ou suas sequências reguladoras. O DNA inserido, cuja sequência é conhecida, serve então como um marcador molecular que auxilia na identificação subsequente e na clonagem do gene interrompido (**Figura 8-53**). Na *Drosophila*, o uso do elemento transponível P para inativar genes revolucionou o estudo de função gênica na mosca-das-frutas. Os elementos transponíveis (ver Tabela 5-3, p. 318) também vêm sendo utilizados para gerar mutações em bactérias, leveduras, camundongos e na planta *Arabidopsis*.

Tais estudos genéticos clássicos são próprios para dissecar os processos biológicos em organismos experimentais, mas como podemos estudar a função de genes em humanos? Diferentemente dos organismos geneticamente acessíveis que temos discutido, os humanos não se reproduzem rapidamente e não podem ser tratados intencionalmente com mutagênicos. Além disto, qualquer humano com um defeito sério em um processo essencial, como replicação de DNA, morreria muito antes de nascer.

Existem duas maneiras pelas quais podemos estudar os genes humanos. Primeiro, como os genes e a função dos genes têm sido tão conservados ao longo da evolução, o estudo de organismos-modelo menos complexos revela informações críticas sobre os genes e processos similares em humanos. Os genes humanos correspondentes podem, então, ser mais estudados em células humanas em cultura. Segundo, muitas mutações que não são letais – defeitos tecido-específicos nos lisossomos ou nos receptores de superfície de células, por exemplo – têm aparecido espontaneamente na população humana. As análises dos fenótipos de indivíduos afetados, juntamente com o estudo de suas células em cultura, oferecem o entendimento de funções celulares humanas importantes. Embora tais mutações sejam raras, elas são eficientemente descobertas por causa de uma única característica humana: os indivíduos mutantes chamam a atenção por necessitarem de cuidados médicos especiais.

As sondagens genéticas identificam mutantes com anormalidades específicas

Uma vez que tenha sido produzida uma coleção de mutantes em um organismo-modelo, como levedura ou mosca, geralmente devem-se examinar milhares de indivíduos para achar o fenótipo alterado de interesse. Tal procura é chamada de **sondagem genética**, e, quanto maior o genoma, menor é a probabilidade de que qualquer gene seja mutado. Dessa maneira, quanto maior o genoma do organismo, maior é o trabalho de sondagem. O fenótipo pelo qual está sendo feita a sondagem pode ser simples ou complexo. Os fenótipos simples são mais fáceis de detectar: pode-se sondar vários organismos de forma rápida, por exemplo, para mutações que tornam impossível ao organismo sobreviver na ausência de um determinado aminoácido ou nutriente.

Fenótipos mais complexos, como defeitos no aprendizado ou no comportamento, podem exigir sondagens mais elaboradas (**Figura 8-54**). Contudo, mesmo sondagens genéticas utilizadas para dissecar sistemas fisiológicos complexos devem ser o mais simples possível e, se possível, devem permitir o exame de grandes números de mutantes de maneira simultânea. Como um exemplo, uma sondagem particularmente elegante foi projetada para procurar por genes envolvidos no processo visual do peixe-zebra. A base para essa sondagem, que monitora a resposta do peixe ao movimento, é a alteração no comportamento. Os peixes do tipo selvagem tendem a nadar em direção a um movimento percebido, enquanto os mutantes com defeitos no seu sistema visual nadam em direções variadas – um comportamento que é facilmente detectado. Um mutante descoberto nesse rastreamento é chamado de *lakritz*, que não apresenta 80% das células ganglionais da retina, as quais ajudam a liberar os sinais visuais do olho para o cérebro. Como a organização celular da retina do peixe-zebra espelha a de todos os vertebrados, o estudo desses mutantes deve prover também o entendimento do processamento visual em humanos.

Como defeitos em genes que são necessários para os processos celulares importantes – síntese e processamento de RNA, ou controle do ciclo celular, por exemplo – normalmente



Figura 8-54 Fenótipo de comportamento detectado em uma sondagem genética. (A) Comportamento de *C. elegans* do tipo selvagem na alimentação social. Os vermes nadam em voltas até encontrar seus vizinhos e iniciam a alimentação com bactérias. (B) Os animais mutantes se alimentam sozinhos. (Cortesia de Cornelia Bargmann, *Cell* 94: capa, 1998. Com permissão de Elsevier.)

são letais, a função desses genes com frequência é estudada em indivíduos com **mutações condicionais**. Os indivíduos mutantes normalmente funcionam enquanto as condições "permissivas" prevalecerem, mas demonstram uma função gênica anormal quando submetidos a condições "não-permissivas" (restritivas). Em organismos com *mutações sensíveis à temperatura*, por exemplo, a anormalidade pode ser ativada ou inativada de forma experimental simplesmente alterando-se a temperatura; assim, uma célula contendo uma mutação sensível à temperatura em um gene essencial para a sobrevivência morrerá a uma temperatura não-permissiva, mas crescerá normalmente a uma temperatura permissiva (**Figura 8-55**). O gene sensível à temperatura em um mutante como esse em geral contém uma mutação pontual que causa uma mudança sutil no seu produto proteico.

Várias mutações sensíveis à temperatura foram encontradas nos genes bacterianos que codificam para as proteínas necessárias à replicação de DNA. Os mutantes foram identificados pela sondagem de populações de bactérias, tratadas com mutagênicos, por células que param de produzir DNA quando são aquecidas de 30 a 42°C. Esses mutantes foram usados mais tarde para identificar e caracterizar as proteínas de replicação de DNA correspondentes (discutido no Capítulo 5). De forma semelhante, sondagens por mutações sensíveis à temperatura levaram à identificação de várias proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, assim como a várias proteínas envolvidas no movimento de proteínas através da via secretora em levedura (ver Painel 13-1). Abordagens de rastreamento relacionadas demonstraram a função de enzimas envolvidas nas principais vias metabólicas de bactérias e de leveduras (discutido no Capítulo 2) e identificaram vários dos produtos gênicos responsáveis pelo desenvolvimento organizado do embrião da *Drosophila* (discutido no Capítulo 22).

Mutações podem causar a perda ou o ganho da função proteica

Mutações gênicas geralmente são classificadas como "de perda de função" ou "de ganho de função". Uma mutação de perda de função resulta em um produto gênico que não funciona ou que funciona pouco; assim, ela revela a função normal do gene. Uma mutação de ganho de função resulta em um produto gênico que funciona demais, funciona no momento, no local errado ou de uma maneira nova (**Figura 8-56**).

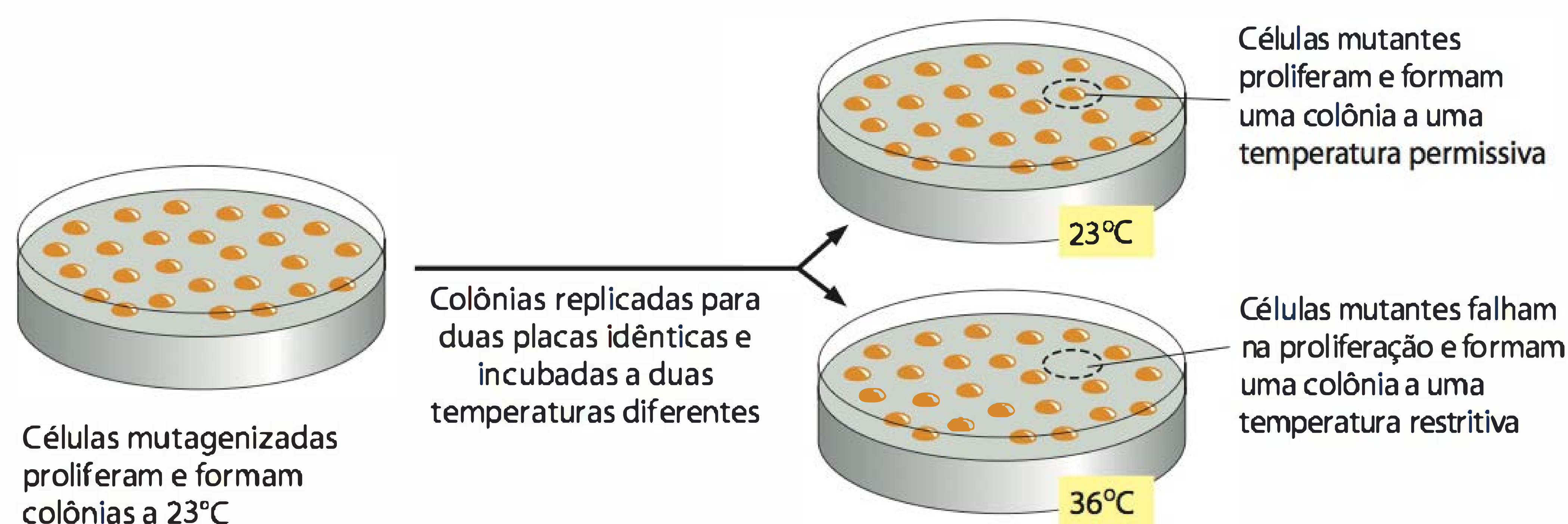


Figura 8-55 Sondagem por mutantes de bactérias ou de leveduras sensíveis à temperatura. As células mutagenizadas são semeadas a uma temperatura permissiva. Elas se dividem e formam colônias, que são transferidas para duas placas de Petri idênticas por semeadura em réplica. Uma dessas placas é incubada a uma temperatura permissiva e, a outra, a uma temperatura restritiva. As células contendo uma mutação sensível à temperatura em um gene essencial para proliferação podem se dividir na temperatura permissiva normal, mas falham em se dividir em temperaturas restritivas elevadas.

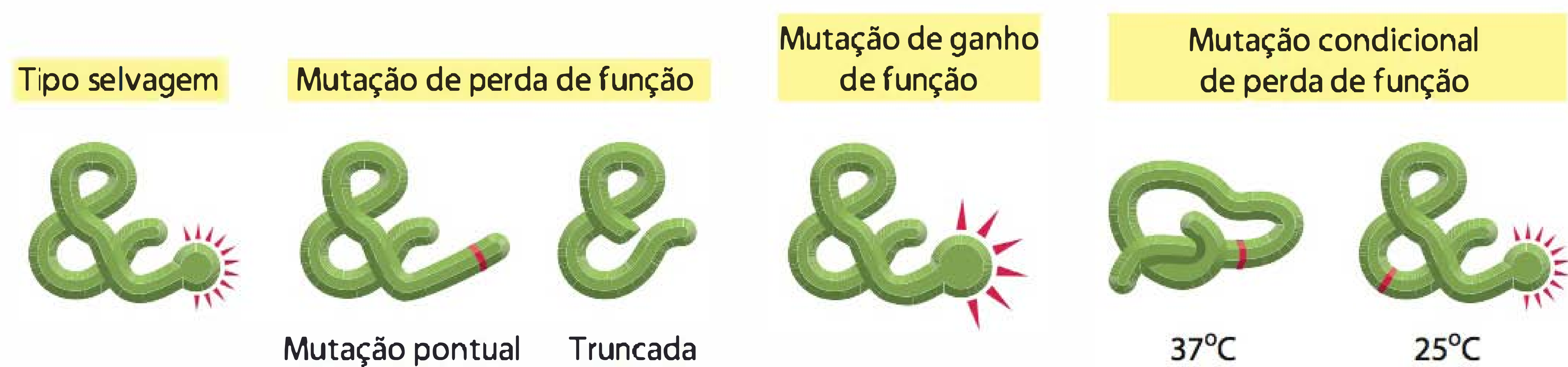


Figura 8-56 Mutações gênicas que afetam seu produto proteico de diferentes formas. Nesse exemplo, a proteína do tipo selvagem tem uma função celular específica representada pelos *raios em vermelho*. Mutações que eliminam essa função, intensificam a função ou tornam a função sensível a temperaturas mais altas são mostradas. A proteína mutante condicional sensível à temperatura carrega uma substituição de aminoácido (*vermelho*) que previne seu próprio dobramento a 37°C, mas permite que a proteína se dobre e funcione normalmente a 25°C. Tais mutações condicionais são especialmente úteis para estudar genes essenciais; o organismo pode ser crescido sob a condição permissiva e então deslocado para uma condição restritiva para estudar a função de um gene.

Uma etapa inicial importante na análise genética de qualquer célula ou organismo mutante é determinar se a mutação causa uma perda ou um ganho de função. Um teste-padrão é determinar se a mutação é *dominante* ou *recessiva*. Uma mutação dominante é aquela que continua causando o fenótipo mutante na presença de uma única cópia do gene tipo selvagem. Uma mutação recessiva é aquela que não é mais capaz de causar o fenótipo mutante na presença de uma única cópia do gene tipo selvagem. Embora tenham sido descritos casos nos quais uma mutação de perda de função seja dominante ou uma mutação de ganho de função seja recessiva, na maioria dos casos as mutações recessivas são de perda de função e as mutações dominantes são de ganho de função. É fácil determinar se uma mutação é dominante ou recessiva. Faz-se simplesmente o cruzamento de um mutante com o tipo selvagem para obter células ou organismos diploides. A progênie do cruzamento será heterozigota para a mutação. Se o fenótipo mutante não é mais observado, pode-se concluir que a mutação é recessiva e provavelmente seja uma mutação de perda de função.

Testes de complementação revelam se dois mutantes estão no mesmo gene ou em genes diferentes

Uma sondagem genética em larga escala pode encontrar várias mutações diferentes que mostram o mesmo fenótipo. Esses defeitos podem estar em diferentes genes que funcionam no mesmo processo ou podem representar mutações diferentes no mesmo gene. Formas alternativas de um gene são conhecidas como **alelos**. A diferença mais comum entre alelos é a substituição de um único par de nucleotídeo, mas alelos diferentes também podem carregar deleções, substituições e duplicações. Como podemos então dizer se duas mutações que produzem o mesmo fenótipo ocorrem no mesmo gene ou em genes diferentes? Se as mutações são recessivas – se, por exemplo, elas representam uma perda de função de um determinado gene – um **teste de complementação** pode ser utilizado para verificar se as mutações estão no mesmo gene ou em genes diferentes. Para testar a complementação em um organismo diploide, um indivíduo que é homozigoto para uma mutação – isto é, possui dois alelos idênticos do gene mutante em questão – é cruzado com um indivíduo que é homozigoto para a outra mutação. Se as duas mutações estão no mesmo gene, a descendência mostra o fenótipo mutante, pois elas continuam não tendo cópias normais do gene em questão (ver Painel 8-1). Se, ao contrário, as mutações ocorrerem em genes diferentes, a descendência resultante mostra um fenótipo normal, pois elas retêm uma cópia normal (e uma cópia mutante) de cada gene; as mutações, desse modo, se complementam e reconstituem um fenótipo normal. Os testes de complementação de mutantes identificados durante sondagens genéticas revelaram, por exemplo, que cinco genes são necessários para que as leveduras digiram o açúcar galactose, que 20 genes são necessários para que *E. coli* construa um flagelo funcional, que 48 genes estão envolvidos na agregação de partículas virais do bacteriófago T4 e que centenas de genes estão envolvidos no desenvolvimento de um nematódeo adulto a partir de um ovo fertilizado.

Os genes podem ser ordenados em vias por análise de epistasia

Uma vez que um conjunto de genes envolvidos em um processo biológico específico foi identificado, o próximo passo muitas vezes é determinar em que ordem os genes funcionam. A ordem dos genes é mais fácil de ser explicada para vias metabólicas, onde, por exemplo, a enzima A é necessária para produzir o substrato para a enzima B. Nesse caso, diríamos que o gene que codifica para a enzima A atua antes (*upstream*) do gene que codifica para a enzima B na via. De forma similar, se uma proteína regula a atividade de outra proteína, diríamos que o primeiro gene atua antes do segundo. A ordem dos genes pode, em vários casos, ser

determinada puramente por análise genética sem qualquer conhecimento sobre o mecanismo de ação dos produtos gênicos envolvidos.

Suponha que tenhamos um processo biossintético que consiste em uma sequência de etapas, de modo que a realização da etapa B seja condicional ao término da etapa A precedente; suponha também que o *gene A* seja necessário para a etapa A, e o *gene B* seja necessário para a etapa B. Então uma mutação nula (uma mutação que abole a função) no gene *A* irá interromper o processo na etapa A, independente de o gene *B* ser funcional ou não, enquanto que uma mutação nula no gene *B* causa uma interrupção na etapa B apenas se o gene *A* ainda for ativo. Em tal caso, diz-se que o gene *A* é *epistático* ao gene *B*. Comparando-se os fenótipos das diferentes combinações de mutações, podemos descobrir a ordem na qual os genes atuam. Esse tipo de análise é chamada de **análise de epistasia**. Como um exemplo, a via de secreção de proteínas em leveduras tem sido analisada dessa forma. Diferentes mutações nessa via fazem com que as proteínas se acumulem de forma aberrante no retículo endoplasmático (RE) ou no aparelho de Golgi. Quando uma célula de levedura é modificada para carregar tanto uma mutação que bloqueia o processamento proteico no RE como uma mutação que bloqueia o processamento no aparelho de Golgi, as proteínas se acumulam no RE. Isso indica que as proteínas devem passar pelo RE antes de serem enviadas para o Golgi, antes da secreção (**Figura 8-57**). Mais estritamente, uma análise de epistasia pode apenas fornecer informação sobre a ordem gênica em uma via quando ambas as mutações são alelos nulos. Quando as mutações retêm uma função parcial, as suas interações de epistasia podem ser difíceis de interpretar.

Às vezes, um mutante duplo apresentará um fenótipo novo ou mais severo do que cada mutante sozinho. Esse tipo de interação genética é chamado de fenótipo *sintético*, e se o fenótipo é a morte do organismo, ele é chamado de *letalidade sintética*. Na maioria dos casos, um fenótipo sintético indica que dois genes agem em duas vias paralelas diferentes, cada um sendo capaz de mediar o mesmo processo celular. Assim, quando ambas as vias são interrompidas no mutante duplo, o processo todo falha e o fenótipo sintético é observado.

Genes identificados por mutações podem ser clonados

Uma vez que os organismos mutantes são produzidos em uma sondagem genética, o próximo passo é identificar o gene ou os genes responsáveis pelo fenótipo alterado. Se o fenótipo foi produzido por mutagênese de inserção, a localização do gene interrompido é bastante simples. Fragmentos de DNA contendo a inserção (p. ex., um transposon ou um retrovírus) são coletados e amplificados por PCR, e a sequência de nucleotídeos do DNA dos flancos é determinada. Bancos de dados genômicos podem então ser examinados para identificar fases de leitura abertas que contenham essa sequência flanqueadora.

Se um agente químico que causa danos ao DNA foi utilizado para gerar as mutações, a identificação do gene inativado muitas vezes é mais laboriosa, mas pode ser realizada por várias abordagens diferentes. Em uma delas, o primeiro passo é determinar experimentalmente a localização do gene no genoma. Para mapear um gene recentemente descoberto, sua localização grosseira no cromossomo é primeiramente determinada avaliando-se o quão distante o gene está de outros genes conhecidos no genoma. A estimativa da distância entre os loci genéticos usualmente é feita pela *análise de ligação*, uma técnica com base na tendência que os genes que ficam próximos uns dos outros têm de ser herdados juntos. Entretanto, até mesmo genes proximamente ligados podem ser separados por recombinação durante a meiose. Quanto maior a distância entre dois loci genéticos, maior a chance de eles serem separados

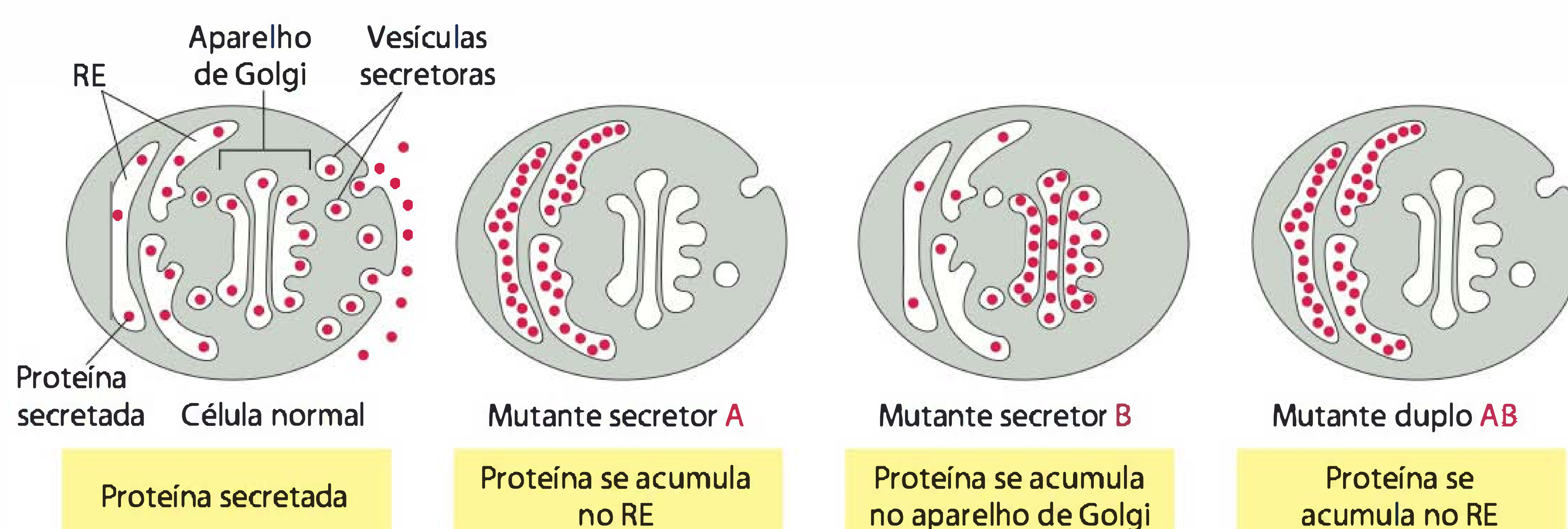


Figura 8-57 Utilização da genética para determinar a ordem das funções dos genes. Em células normais, as proteínas secretoras são carregadas em vesículas que se fusionam com a membrana plasmática para secretar seu conteúdo no meio extracelular. Dois mutantes, A e B, falham em secretar as proteínas. No mutante A, as proteínas secretadas se acumulam no RE. No mutante B, as proteínas secretadas se acumulam no Golgi. No mutante duplo AB, as proteínas se acumulam no RE; isso indica que o gene defectivo no mutante A atua antes do gene defectivo no mutante B na via secretora.

por uma recombinação (ver Painel 8-1). Calculando-se a frequência de recombinação entre dois genes, a distância aproximada entre eles pode ser determinada. Se a posição de um gene é conhecida no genoma, a posição do segundo gene pode ser estimada.

Como os genes nem sempre estão localizados próximos o suficiente uns dos outros para permitir uma indicação precisa da sua posição, a análise de ligação para estimar a localização de um gene desconhecido frequentemente depende de marcadores físicos ao longo do genoma. Esses marcadores, em geral, são extensões de nucleotídeos com uma sequência e uma localização genômica conhecidas que podem existir, no mínimo, em duas formas alélicas. Os marcadores mais simples são os *polimorfismos de nucleotídeos únicos* (SNPs, *single-nucleotide polymorphisms*), sequências curtas que diferem em um par de nucleotídeos entre indivíduos em uma população. Os SNPs podem ser detectados por técnicas de hibridização. Vários desses marcadores físicos, todos distribuídos ao longo dos cromossomos, foram coletados para uma variedade de organismos. Se a distribuição desses marcadores é suficientemente densa, pode-se, por meio de uma análise de ligação que testa para a forte co-herança de um ou mais SNPs com o fenótipo mutante, restringir a possível localização de um gene a uma região do cromossomo que pode conter apenas algumas sequências de genes. Estes são então considerados genes candidatos, e sua estrutura e função podem ser testadas diretamente para determinar qual é o gene responsável pelo fenótipo mutante original.

A genética humana apresenta problemas especiais e oportunidades

Embora a experimentação genética em humanos seja considerada não-ética, sendo banida legalmente, os humanos sofrem de uma grande variedade de desordens genéticas. A análise de ligação descrita anteriormente pode ser utilizada para identificar os genes responsáveis por essas condições herdáveis. Tais estudos requerem amostras de DNA a partir de um grande número de famílias afetadas pela doença. Essas amostras são examinadas para a presença de marcadores físicos como os SNPs, que parecem estar intimamente ligados ao gene da doença, uma vez que são sempre herdados por indivíduos que têm a doença e não pelos parentes não-afetados. O gene da doença é então localizado como descrito anteriormente (**Figura 8-58**). Os genes para fibrose cística e para doença de Huntington, por exemplo, foram descobertos dessa maneira.

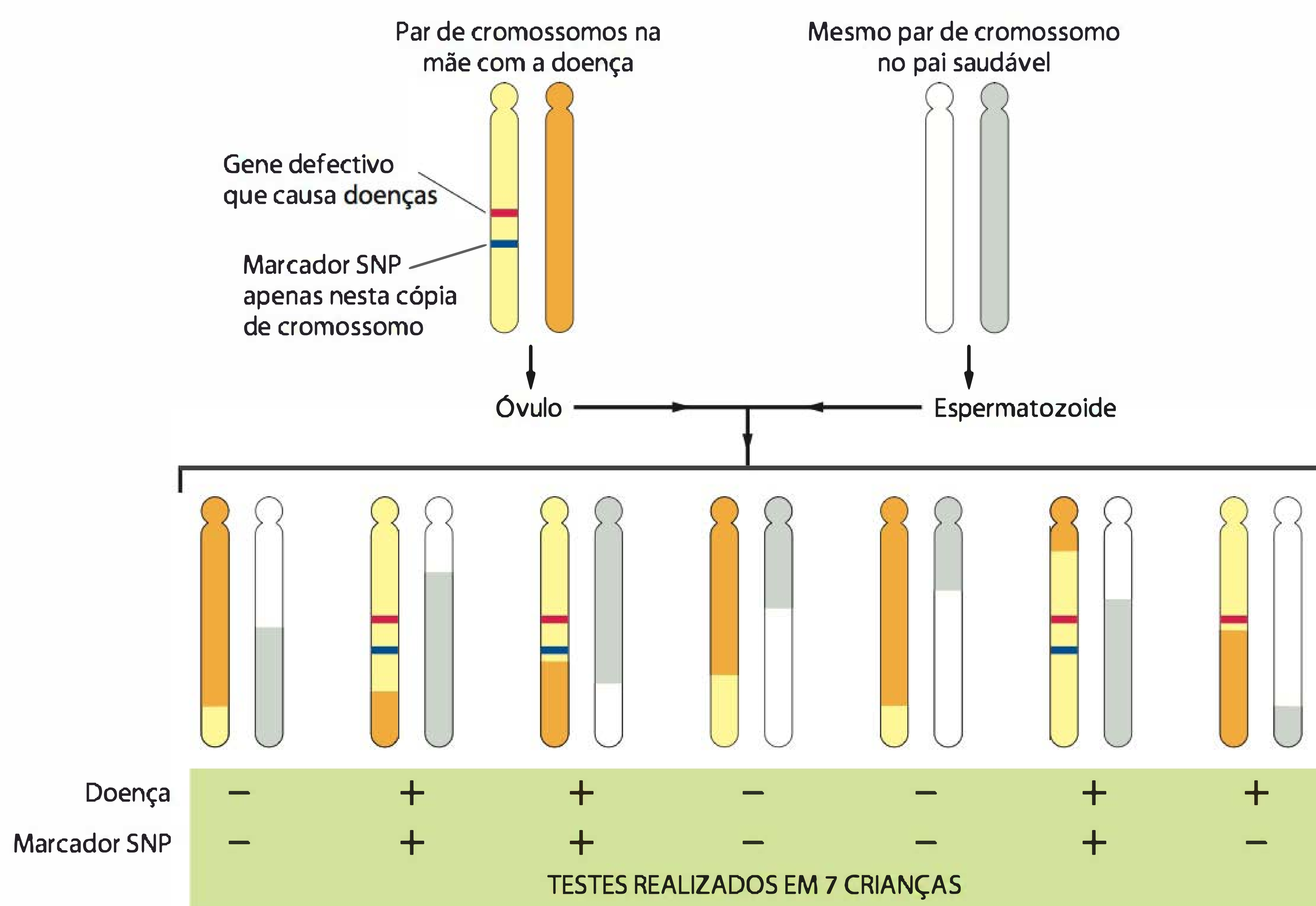


Figura 8-58 Análise de ligação genética utilizando marcadores físicos no DNA para encontrar um gene humano. Neste exemplo, a co-herança de um fenótipo humano específico (aqui uma doença genética) com um marcador de SNP. Se os indivíduos que herdam a doença quase sempre herdam um marcador de SNP específico, então o gene que causa a doença e o SNP, provavelmente, estão próximos no cromossomo, como mostrado aqui. Para provar que a ligação observada é estatisticamente significativa, pode ser necessário o exame de centenas de indivíduos. Note que a ligação não será absoluta, a menos que o marcador SNP esteja localizado no próprio gene. Logo, ocasionalmente, o SNP será separado do gene causador da doença por recombinação meiótica durante a formação do óvulo ou do espermatozoide: isso aconteceu no caso do par de cromossomos mais à direita. Quando trabalhamos com um genoma sequenciado, esse procedimento será repetido com SNPs localizados em cada lado do SNP inicial, até que uma co-herança de 100% seja encontrada.

Note que cada óvulo e cada espermatozoide contribuirá apenas com um cromossomo de cada par a partir dos pais para a criança.

Genes humanos são herdados em blocos haploides, que podem ajudar na busca por mutações que causam doença

Com a sequência genômica humana completa em mãos, podemos estudar a genética humana de uma maneira que era impossível há apenas alguns anos. Por exemplo, podemos começar a identificar aquelas diferenças no DNA que distinguem um indivíduo do outro. Nenhum humano (com exceção de gêmeos idênticos) tem o mesmo genoma que outro. Cada um de nós carrega um conjunto de polimorfismos – diferenças na sequência de nucleotídeos – que nos torna únicos. Esses polimorfismos podem ser utilizados como marcadores para construir mapas genéticos e realizar análises genéticas para correlacionar determinados polimorfismos com doenças específicas ou predisposições a doenças.

O problema é que dois humanos tipicamente diferem cerca de 0,1% em suas sequências de nucleotídeos (aproximadamente uma diferença de um nucleotídeo a cada 1.000 nucleotídeos). Isso é traduzido para cerca de 3 milhões de diferenças entre uma pessoa e outra. Teoricamente, seria necessário procurar por todos esses 3 milhões de polimorfismos para identificar um ou dois responsáveis por uma determinada doença herdável ou pela predisposição à doença. Para reduzir o número de polimorfismos que precisamos estudar, pesquisadores estão tomando vantagem da descoberta recente de que genes humanos tendem a ser herdados em blocos.

A espécie humana é relativamente jovem e acredita-se que somos descendentes de uma população relativamente pequena de indivíduos que viveram na África há cerca de 100.000 anos. Como apenas poucos milhares de gerações nos separam dessa população ancestral, grandes segmentos de cromossomos humanos passaram dos pais para os filhos sem alteração por eventos de recombinação que ocorrem na meiose. De fato, observamos que certos conjuntos de alelos (incluindo SNPs) são herdados em grandes blocos dentro dos cromossomos. Esses segmentos de cromossomos ancestrais – conjuntos de alelos que foram herdados em grupos com poucos rearranjos genéticos através de gerações – são chamados de **blocos de haplótipos**. Como os genes, SNPs e outros marcadores genéticos – que existem em formas alélicas diferentes – os blocos de haplótipos também ocorrem em um número limitado de “sabores” que são comuns na população humana, cada um representando uma combinação alélica passada adiante a partir de um ancestral comum há muito tempo.

Pesquisadores estão construindo um mapa genômico humano com base nesses blocos de haplótipos – chamado de **mapa de haplótipo** (**hapmap,** de *haplotype map*). Geneticistas têm a esperança de que o mapa de haplótipo humano tornará a procura por genes que causam doenças e tornam suscetível a doenças uma tarefa muito mais fácil. Ao invés de procurar em um dos vários milhões de SNPs na população humana, precisa-se apenas procurar em um grupo consideravelmente menor de SNPs selecionados para identificar o bloco de haplótipo que parece ser herdado por indivíduos com a doença. (Essas buscas ainda envolvem amostras de DNA a partir de grandes números de pessoas, e os SNPs agora são normalmente pontuados utilizando-se tecnologias robóticas.) Se um bloco de haplótipo específico é mais comum entre pessoas com a doença do que em indivíduos não-afetados, a mutação ligada a essa doença provavelmente estará localizada no mesmo segmento de DNA (**Figura 8-59**). Pesquisadores podem então apontar para a região específica dentro do bloco procurando pelo gene específico associado à doença. Essa abordagem deveria, em princípio, permitir a análise da genética dessas doenças comuns nas quais múltiplos genes conferem suscetibilidade.

Um exame detalhado dos blocos de haplótipos pode dizer até mesmo se um determinado gene foi favorecido por seleção natural. Como regra, quando surge um novo alelo de um gene que não confere uma vantagem seletiva ao indivíduo, levará um longo tempo para que esse alelo se torne comum na população. Quanto mais comum – e por isso mais velho – um alelo desses é, menor deverá ser o bloco de haplótipo que o circunda, por ter tido várias chances de ser separado das suas variações vizinhas pelos eventos de recombinação que ocorrem na meiose, geração após geração.

Entretanto, um novo alelo pode se espalhar rapidamente pela população se conferir alguma vantagem dramática ao organismo. Por exemplo, mutações ou variações que tornam um organismo mais resistente a uma infecção podem ser selecionadas, pois organismos com essa variação provavelmente sobreviveriam e passariam a mutação para sua descendência. Trabalhando com mapas de haplótipos de genes individuais, pesquisadores detectaram tal

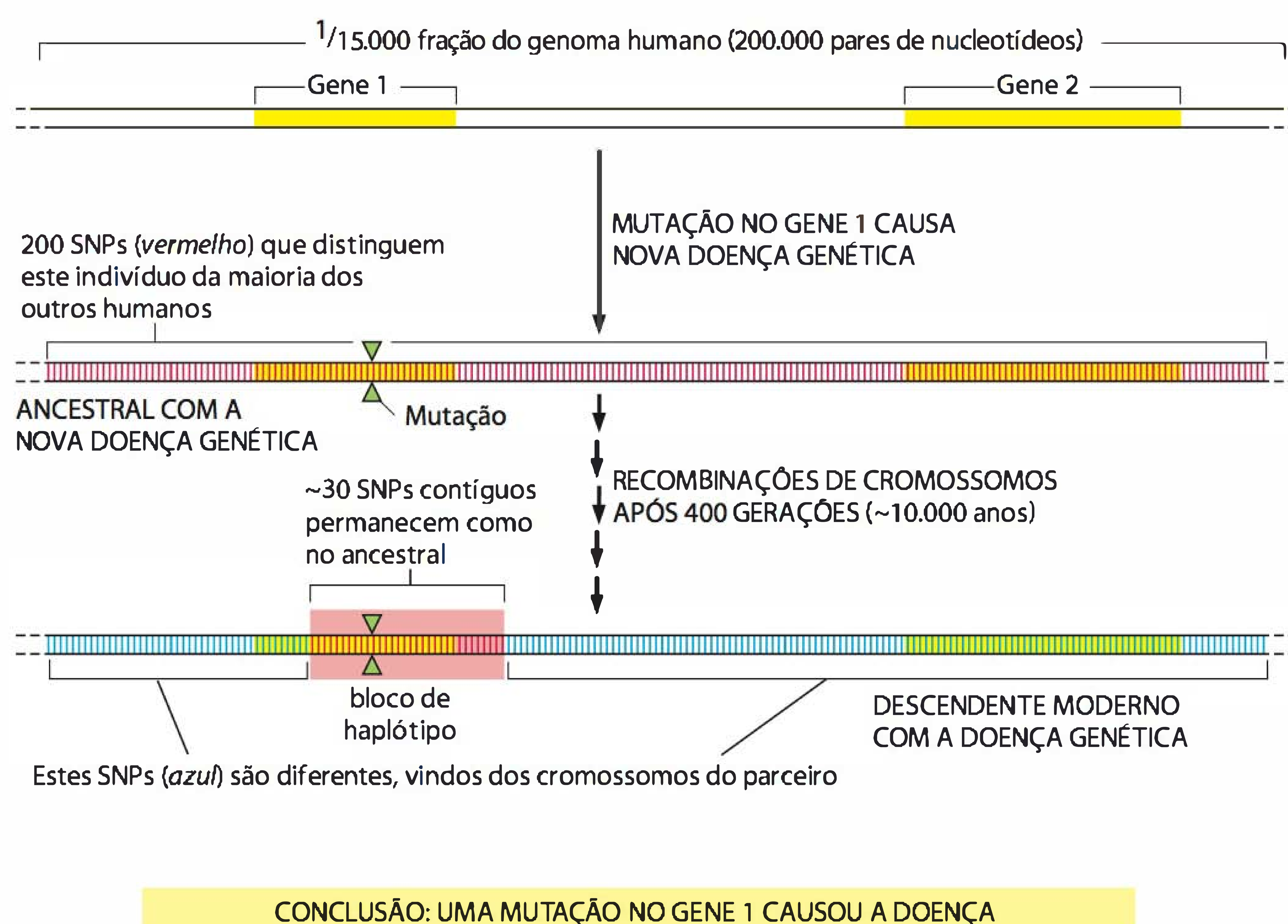


Figura 8-59 Rastreamento da herança de SNPs nos blocos de haplótipos para revelar a localização de um gene causador de doença. Um ancestral que adquire uma mutação causadora de doença no gene 1 passará essa mutação adiante para seus descendentes. Parte desse gene está dentro de um bloco de haplótipo (*sombreado em vermelho*) – um grupo de variações (cerca de 30 SNPs) que têm sido passadas adiante a partir do ancestral em um bloco contínuo. Nas 400 gerações que separam o ancestral dos descendentes atuais com a doença, os SNPs localizados na maior parte da região ancestral de 200.000 pares de nucleotídeos mostraram ter sido misturados por recombinação meiótica no genoma descendente (*azul*). (Note que a sobreposição de amarelo e vermelho é vista como *laranja* e a sobreposição de amarelo e azul é vista como *verde*.) Entretanto, os 30 SNPs dentro do bloco de haplótipo têm sido herdados como um grupo, uma vez que nenhum evento de recombinação os separou ainda. Para localizar um gene que causa a doença herdada, o padrão de SNP em várias pessoas que têm a doença precisa ser analisado. Um indivíduo com a doença permanecerá com o padrão de SNPs ancestral localizado dentro do bloco de haplótipo mostrado, revelando que a mutação causadora da doença provavelmente está dentro daquele bloco de haplótipo – assim, no gene 1. A beleza de usar mapas de haplótipos para esse tipo de análise de ligação é que apenas uma fração do total dos SNPs precisa ser examinada: deveríamos ser capazes de localizar genes após procurarmos por apenas 10% dos 3 milhões de SNPs úteis presentes no genoma humano.

seleção positiva para dois genes humanos que conferem resistência à malária. Os alelos que conferem resistência estão espalhados pela população, mas estão embebidos em grandes blocos de haplótipos incomuns, sugerindo que surgiram recentemente no conjunto de genes humanos (**Figura 8-60**).

Pela revelação das vias ao longo das quais os humanos evoluíram, o mapa de haplótipo humano fornece uma nova janela para nosso passado; auxiliando-nos a descobrir os genes que nos tornam suscetíveis ou resistentes a doenças, o mapa também pode fornecer um guia bruto para nosso futuro individual.

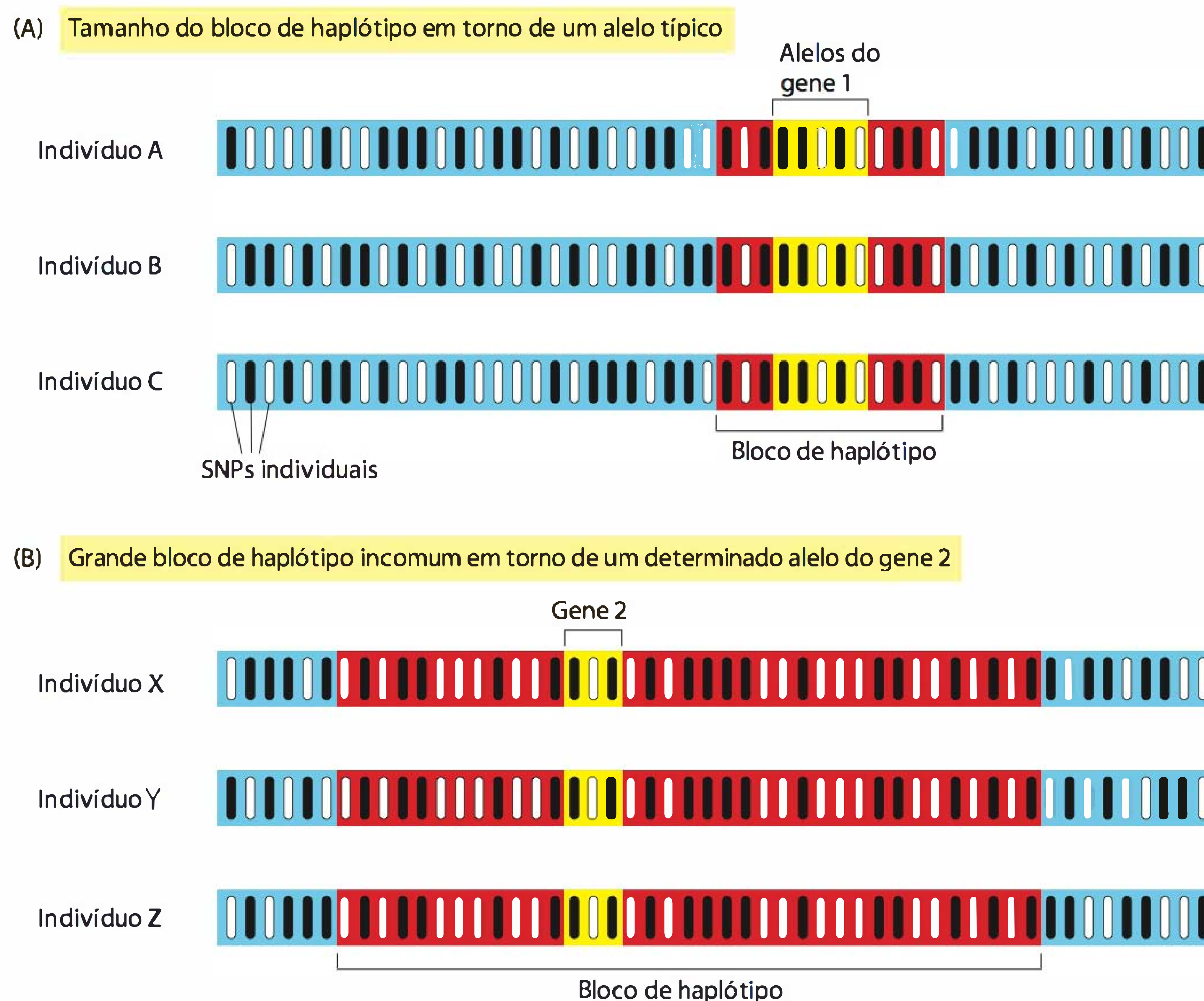


Figura 8-60 Identificação de alelos que foram selecionados por sua história humana bastante recente devido aos grandes blocos de haplótipos incomuns nos quais eles estão localizados. Os SNPs estão indicados neste diagrama por barras verticais, que estão mostradas em *branco* ou *preto*, de acordo com a sua sequência de DNA. Os blocos de haplótipos estão sombreados em *vermelho*, os genes em *amarelo* e o restante do cromossomo em *azul*. Esses dados sugerem que esse alelo em particular do gene 2 surgiu relativamente há pouco tempo na história humana.

Características complexas são influenciadas por múltiplos genes

Um pianista talvez tenha uma tia que toca violino. Em uma outra família, os pais e as crianças podem todos ser gordos. Em uma terceira família, uma avó pode ser alcoólatra e seu neto ser usuário de drogas. Até que ponto tais características – habilidade musical, obesidade e vício – são herdadas geneticamente? Essa é uma pergunta muito difícil de ser respondida. Algumas características ou doenças "ocorrem em famílias", mas aparecem apenas em poucos parentes ou sem um padrão fácil de ser discernível.

Características que não seguem padrões simples (às vezes chamados de mendelianos) de herança, mas têm um componente geneticamente herdado, são chamadas de **características complexas**. Essas características muitas vezes são **poligênicas**; isto é, elas são influenciadas por múltiplos genes, cada um fazendo uma pequena contribuição para o fenótipo em questão. Os efeitos desses genes são aditivos, o que significa que juntos eles produzem uma continuidade de características variáveis dentro de uma população. Individualmente, os genes que contribuem para uma característica poligênica são distribuídos para a descendência em padrões simples, mas como todos influenciam o fenótipo, o padrão de características herdadas pelos descendentes muitas vezes é muito complexo.

Um simples exemplo de uma característica poligênica é a cor dos olhos, determinada por enzimas que controlam a distribuição e a produção do pigmento melanina: quanto mais melanina produzida, mais escura é a cor dos olhos. Como vários genes contribuem para a formação da melanina, a cor dos olhos em humanos apresenta enormes variações, desde o cinza mais pálido até o marrom chocolate escuro.

Embora doenças com base em mutações em genes únicos (p. ex., anemia falciforme e hemofilia) sejam alguns dos primeiros fenótipos humanos herdados, apenas uma pequena fração de características humanas é ditada por genes únicos. A maioria dos fenótipos humanos óbvios – desde altura, peso, cor dos olhos e cor do cabelo até inteligência, temperamento, sociabilidade e humor – surge a partir da interação de vários genes. Múltiplos genes certamente também sustentam uma propensão para as doenças humanas mais comuns: diabete, doenças cardíacas, pressão sanguínea alta, alergias, asma e várias doenças mentais, incluindo depressão e esquizofrenia. Pesquisadores estão explorando novas estratégias – incluindo o uso dos mapas de haplótipos discutidos anteriormente – para entender os efeitos complexos entre genes que atuam juntos para determinar várias das nossas características "humanas".

A genética reversa começa com um gene conhecido e determina quais processos celulares requerem sua função

Como vimos, a genética clássica inicia com um fenótipo mutante (ou, no caso dos humanos, uma variedade de características) e identifica as mutações (e consequentemente os genes) responsáveis por ele. A tecnologia do DNA recombinante, em combinação com o sequenciamento dos genomas, tornou possível um tipo diferente de abordagem genética. Em vez de iniciar com um organismo mutante e utilizá-lo para identificar um gene e sua proteína, um pesquisador pode iniciar com um determinado gene e fazer mutações nele, criando células ou organismos para analisar a função do gene. Como a nova abordagem reverte a direção tradicional da descoberta genética – iniciando a partir de genes até mutações, e não vice-versa – ela é comumente denominada **genética reversa**.

A genética reversa parte de um gene clonado, uma proteína com propriedades interessantes que foi isolada de uma célula ou, simplesmente, de uma sequência genômica. Se o ponto inicial é uma proteína, o gene codificante é primeiro identificado e, se necessário, sua sequência de nucleotídeos é determinada. A sequência do gene pode então ser alterada *in vitro* para criar uma versão mutante. Esse gene mutante modificado, juntamente com uma proteína reguladora apropriada, é transferido para dentro de uma célula onde ele pode se integrar em um cromossomo, tornando-se uma parte permanente do genoma da célula. Todos os descendentes da célula modificada irão agora conter o gene mutante.

Se a célula original utilizada para a transferência do gene é um óvulo fertilizado, organismos multicelulares inteiros, que contêm o gene mutante, podem ser obtidos desde que a mutação não seja letal. Em alguns desses animais, o gene alterado será incorporado nas



Figura 8-61 Expressão incorreta ectópica de Wnt, uma proteína de sinalização que afeta o desenvolvimento do eixo do corpo no embrião jovem de *Xenopus*. Neste experimento, o mRNA codificando para Wnt foi injetado no blastômero vegetal ventral, induzindo um segundo eixo do corpo (discutido no Capítulo 22). (De S. Sokol et al., *Cell* 67:741-752, 1991. Com permissão de Elsevier.)

células germinativas – uma *mutação na linhagem germinativa* – permitindo que o gene mutante seja passado para sua progênie.

Os genes podem ser modificados de várias maneiras

Vimos que organismos mutantes que não têm um determinado gene podem revelar rapidamente a função da proteína que ele codifica. Por essa razão, um "nocaute" gênico – no qual ambas as cópias do gene em um organismo diploide foram inativadas ou deletadas – é um tipo de mutação particularmente útil. Entretanto, existem muito mais tipos de alterações genéticas disponíveis para o pesquisador. Por exemplo, alterando-se a região reguladora de um gene antes de ele ser reintegrado no genoma, pode-se criar organismos mutantes nos quais o produto gênico é expresso em quantidades anormalmente altas, no tecido errado ou no momento errado do desenvolvimento (**Figura 8-61**). Colocando-se o gene sob o controle de um *promotor induzível*, o gene pode ser ativado ou desativado em qualquer momento e os efeitos observados. Promotores induzíveis que funcionam apenas em um tecido específico podem ser usados para monitorar os efeitos de desativar o gene (ou ativar) naquele determinado tecido. Finalmente, mutações *negativas* dominantes muitas vezes são empregadas particularmente naqueles organismos nos quais é mais simples adicionar um gene alterado ao genoma do que substituir os genes endógenos com ele. A estratégia negativa dominante explora o fato de que a maioria das proteínas funciona como parte de complexos proteicos maiores. A inclusão de apenas um componente não-funcional pode desativar tais complexos. Desse modo, quando projetamos um gene que produz grandes quantidades de uma proteína mutante que é inativa, mas que continua capaz de se agrupar no complexo, geralmente é possível produzir uma célula na qual todos os complexos são inativados, apesar da presença da proteína normal (**Figura 8-62**).

Como observado nas discussões anteriores de genética clássica, se uma proteína é necessária para a sobrevivência da célula (ou do organismo), um mutante negativo dominante será inviável, tornando impossível testar a função da proteína. Para evitar esse problema na genética reversa, pode-se acoplar o gene mutante a um promotor induzível para produzir o produto gênico falho apenas sob comando – por exemplo, em resposta a um aumento na temperatura ou à presença de uma molécula-sinal específica.

No estudo da ação de um gene e da proteína que ele codifica, nem sempre se quer fazer mudanças drásticas – inundar células com grandes quantidades da proteína ou eliminar inteiramente um produto gênico. Muitas vezes é útil fazer alterações leves na estrutura de uma proteína de modo que se possa começar a dissecar as porções de uma proteína que são importantes para sua função. A atividade de uma enzima, por exemplo, pode ser estudada alterando-se apenas um único aminoácido no seu sítio ativo. Técnicas especiais são necessárias para alterar genes (e assim seus produtos proteicos) em tais maneiras sutis. A primeira etapa muitas vezes é a síntese química de uma molécula de DNA curta contendo a porção alterada desejada de uma sequência de nucleotídeos do gene. O oligonucleotídeo sintético de DNA é hibridizado com DNA plasmidial de fita simples que contém a sequência de DNA a ser alterada, usando condições que permitam que fitas de DNA que não combinam perfeitamente se pareiem. O oligonucleotídeo sintético servirá como um iniciador para a síntese de DNA pela DNA-polimerase, gerando assim uma dupla-hélice que incorpora a sequência alterada em uma das suas duas fitas. Após a transfecção, são obtidos plasmídeos

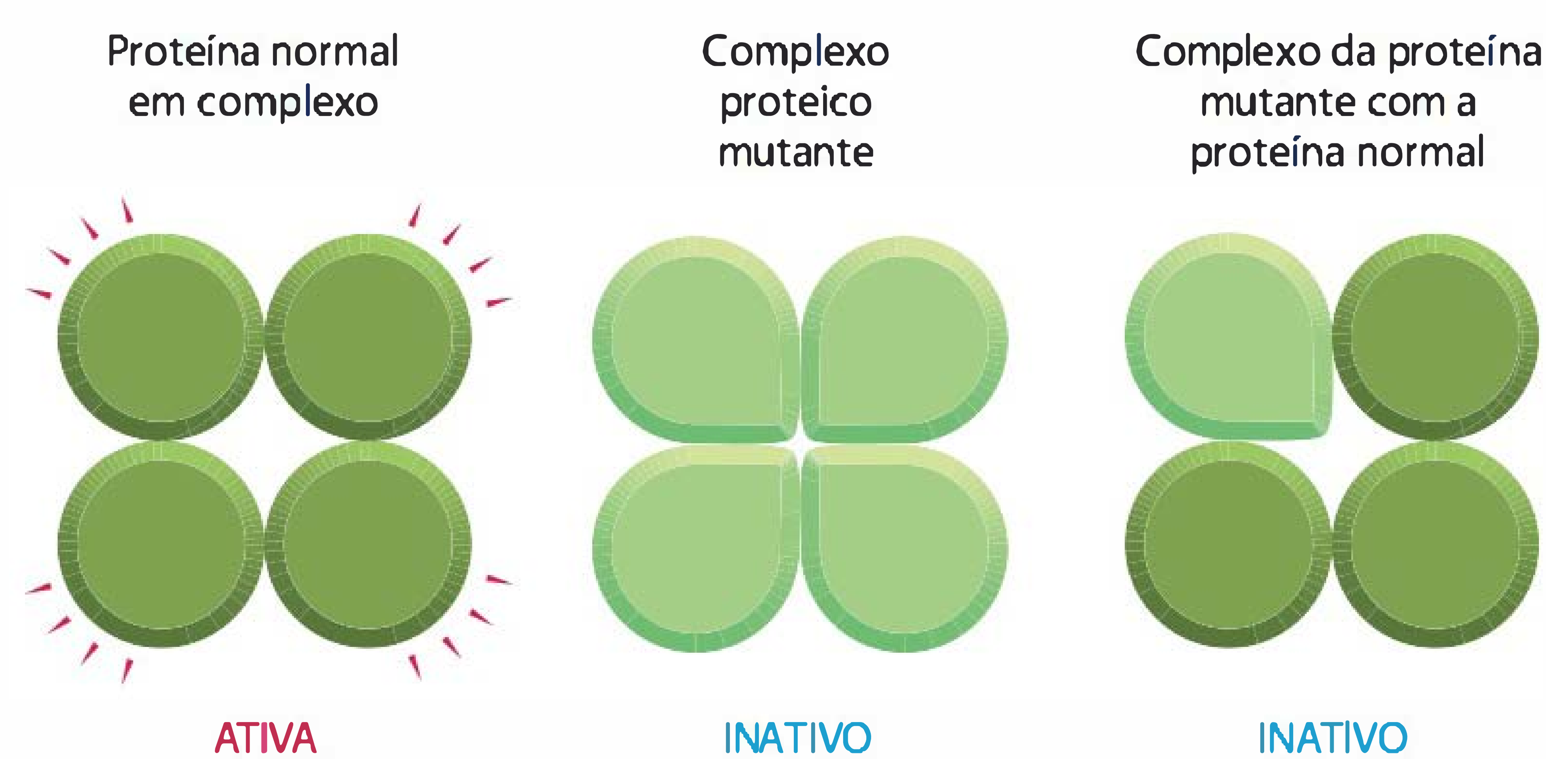


Figura 8-62 Um efeito negativo dominante de uma proteína. Aqui, um gene é modificado para produzir uma proteína mutante que previne que as cópias normais da mesma proteína realizem sua função. Neste exemplo simples, a proteína normal deve formar um complexo de multissubunidades para ser ativa, e a proteína mutante bloqueia a função, formando um complexo misto que é inativo. Dessa maneira, uma única cópia de um gene mutante localizado em qualquer local do genoma pode desativar os produtos normais produzidos pelas outras cópias do gene.

que carregam a sequência gênica modificada. O DNA modificado é então inserido em um vetor de expressão de modo que a proteína nova possa ser produzida nos tipos apropriados de células para estudos detalhados da sua função. Alterando-se aminoácidos selecionados em uma proteína dessa maneira – uma técnica chamada de **mutagênese sítio-dirigida** – pode-se determinar exatamente quais partes da cadeia polipeptídica são importantes para processos como dobramento proteico, interações com outras proteínas e catálise enzimática (**Figura 8-63**).

Genes modificados podem ser inseridos na linhagem germinativa de vários organismos

Genes alterados podem ser introduzidos em células de várias maneiras. O DNA pode ser microinjetado em células de mamíferos com uma micropipeta de vidro ou introduzido por um vírus que foi alterado para carregar genes estranhos. Em células vegetais, os genes frequentemente são introduzidos por uma técnica chamada de bombardeamento de partículas: amostras de DNA são ligadas a esferas de ouro minúsculas e então literalmente atiradas contra a parede celular com uma arma especialmente modificada. A *eletroporação* é o método de escolha para introduzir DNA em bactérias e algumas outras células. Nessa técnica, um choque elétrico breve torna a membrana celular temporariamente permeável, permitindo que o DNA estranho entre no citoplasma.

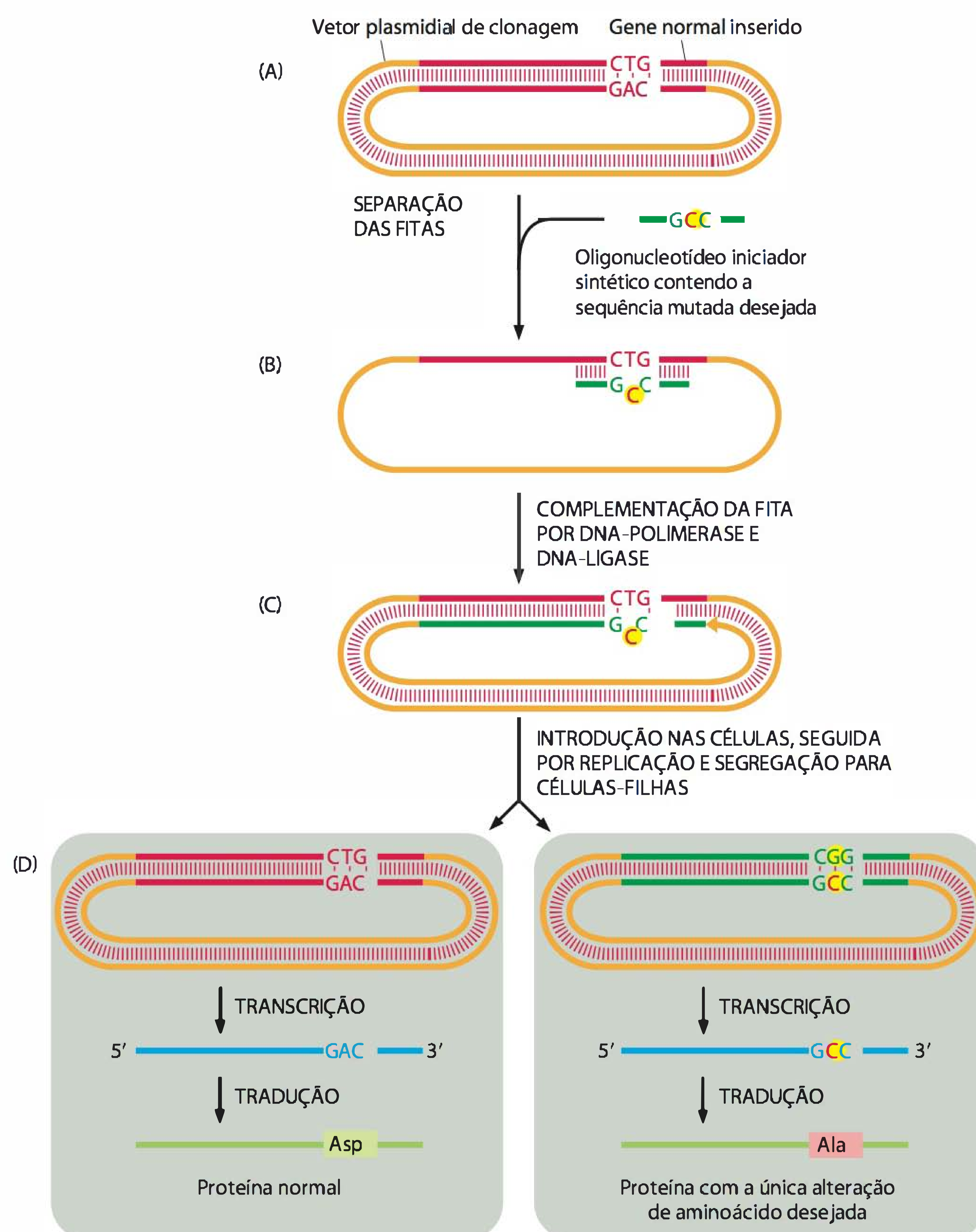


Figura 8-63 Uso de oligonucleotídeos sintéticos para modificar a região codificante de um gene, para uma proteína, por mutagênese sítio-dirigida. (A) Um plasmídeo recombinante contendo um gene inserido é separado nas suas duas fitas de DNA. Um oligonucleotídeo iniciador sintético, correspondendo a parte da sequência do gene, mas contendo um único nucleotídeo alterado em um ponto predeterminado, é adicionado ao DNA de fita simples, sob condições que permitam a hibridização imperfeita de DNA (ver Figura 8-36). (B) O iniciador hibridiza para o DNA, formando um único par de nucleotídeos pareado erradamente. (C) O plasmídeo recombinante se torna uma fita dupla por síntese de DNA *in vitro* (começando a partir do iniciador) seguido pelo fechamento com a DNA-ligase. (D) O DNA de fita dupla é introduzido em uma célula, onde ele é replicado. A replicação utilizando uma fita de DNA-molde produz uma molécula normal de DNA, mas a replicação utilizando a outra fita (aquela que contém o iniciador) produz uma molécula de DNA que carrega a mutação desejada. Apenas a metade das células da progênie terá um plasmídeo que contém o gene mutante desejado. Entretanto, a célula da progênie que contém o gene mutado pode ser identificada, separada das outras células e cultivada para produzir uma população pura de células, onde todas carregam o gene mutado. Apenas uma das várias modificações que podem ser realizadas dessa maneira está mostrada aqui. Com um oligonucleotídeo da sequência apropriada, mais de uma substituição de aminoácido pode ser feita de cada vez, ou um ou mais aminoácidos podem ser inseridos ou deletados. Embora não seja mostrado nesta figura, também é possível criar uma mutação sítio-dirigida utilizando-se oligonucleotídeos apropriados e PCR (em vez de replicação plasmidial) para amplificar o gene mutado.

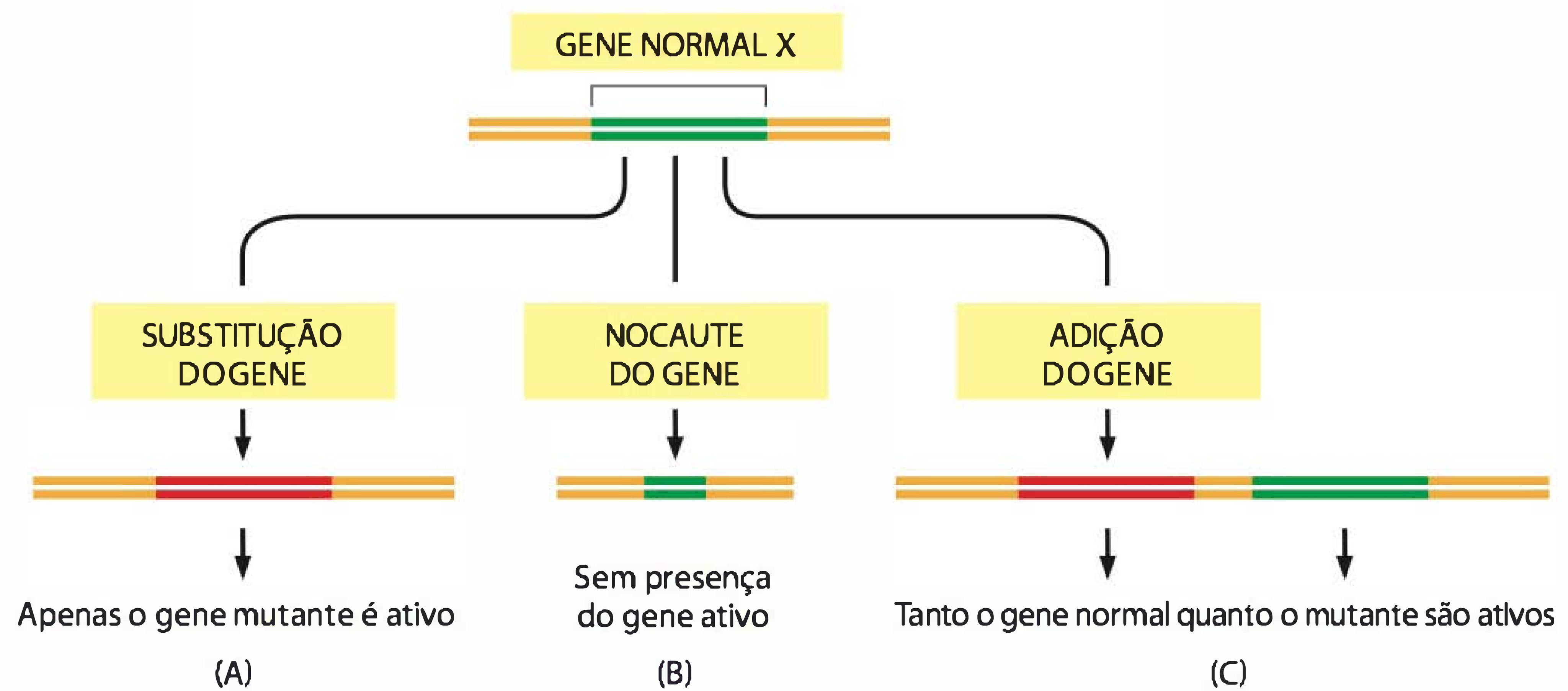


Figura 8-64 Substituição de genes, nocaute de genes e adição de genes. Um gene normal pode ser alterado de várias maneiras para produzir um organismo transgênico. (A) O gene normal (*verde*) pode ser completamente substituído por uma cópia mutante do gene (*vermelho*). Isso fornece informações sobre a atividade do gene mutante sem a interferência do gene normal, e assim os efeitos de mutações pequenas e sutis podem ser determinados. (B) O gene normal pode ser inativado completamente, por exemplo, fazendo-se uma grande deleção nele. (C) Um gene mutante pode simplesmente ser adicionado ao genoma. Em alguns organismos, esse é o tipo mais fácil de modificação genética a ser realizado. Essa abordagem pode prover informações úteis quando o gene mutante introduzido prevalece sobre a função do gene normal, como com uma mutação negativa dominante (ver Figura 8-62).

Diferente de eucariotos superiores (que são multicelulares e diploides), as bactérias, as leveduras e a ameba *Dictyostelium* geralmente existem como células haploides únicas. Nesses organismos, uma molécula de DNA introduzida artificialmente, que carrega um gene mutante, pode, com uma frequência relativamente alta, substituir a cópia única do gene normal por recombinação homóloga; portanto, é simples produzir células nas quais o gene mutante substituiu o gene normal (**Figura 8-64**A). Dessa forma, células que não contêm uma determinada proteína ou produzem uma forma alterada dela podem ser produzidas. A capacidade de realizar substituições gênicas diretas em eucariotos inferiores, combinada ao poder da análise genética padrão nesses organismos haploides, explica em grande parte por que estudos nesses tipos de células têm sido tão importantes para resolver os detalhes dos processos compartilhados por todos os eucariotos.

Os animais podem ser modificados geneticamente

Adições e substituições gênicas também são possíveis, mas são mais difíceis de serem realizadas em animais e plantas. Animais e plantas que foram modificados geneticamente por inserção, deleção ou substituição gênica são chamados de **organismos transgênicos**, e quaisquer genes estranhos ou modificados que são adicionados são chamados de **transgenes**. Concentraremos nossa discussão em camundongos transgênicos, uma vez que um progresso enorme está ocorrendo nessa área. Se uma molécula de DNA que carrega um gene mutante de camundongo é transferida para uma célula de camundongo, ela em geral é inserida aleatoriamente nos cromossomos, mas em cerca de uma a cada mil vezes ela substitui uma das duas cópias do gene normal por recombinação homóloga. Explorando esses raros eventos de inserção gênica (*gene targeting*), qualquer gene específico pode ser alterado ou inativado em uma célula de camundongo por uma substituição direta do gene. No caso especial em que ambas as cópias do gene de interesse são completamente inativadas ou deletadas, o animal resultante é chamado de **camundongo "nocaute"**.

A técnica funciona da seguinte maneira. Na primeira etapa, um fragmento de DNA contendo o gene mutante desejado (ou um fragmento de DNA projetado para interromper um gene-alvo) é inserido em um vetor e depois introduzido em uma cultura de células-tronco embrionárias (ES, *embryonic stem*) (ver Figura 8-5), que são capazes de produzir células de vários tipos diferentes. Após um período de proliferação celular, as raras colônias de células nas quais um evento de recombinação homóloga provavelmente tenha causado uma substituição gênica são isoladas. As colônias corretas entre elas são identificadas por PCR ou por *Southern blotting*: elas contêm sequências de DNA recombinante nas quais o fragmento inserido substituiu toda ou parte de uma cópia do gene normal. Na segunda etapa, as células ES individuais, a partir de uma colônia identificada, são coletadas com uma micropipeta e injetadas em um embrião jovem de camundongo. As células ES transfectadas colaboram com as células do embrião hospedeiro para produzir um camundongo de aparência normal; grande parte desse animal quimérico, incluindo – nos casos favoráveis – células da linhagem germinativa, frequentemente deriva das células ES transfectadas (**Figura 8-65**).

Os camundongos com o transgene na sua linhagem germinal são cruzados para produzir tanto animais machos como fêmeas, cada um heterozigoto para a substituição gênica (isto é, eles têm uma cópia normal e uma mutante do gene). Quando esses dois camundongos são cruzados, um quarto de sua progênie será homozigoto para o gene alterado. Estudos

desses homozigotos permitem que a função do gene alterado – ou os efeitos da eliminação da atividade do gene – seja examinada na ausência do gene normal correspondente.

A habilidade em preparar camundongos transgênicos deficientes de um gene normal conhecido é um grande avanço, e a técnica agora tem sido utilizada para determinar as funções de todos os genes de camundongos (**Figura 8-66**). Uma técnica especial é utilizada para produzir mutantes condicionais, nos quais um gene selecionado se torna interrompido em um tecido específico, em um certo momento do desenvolvimento. A estratégia tira vantagem do sistema de recombinação sítio-específica para excisar – e assim inativar – o gene-alvo em um determinado local ou em um determinado momento. O mais comum desses sistemas de recombinação, chamado de **Cre/lox**, é amplamente utilizado para modificar substituições gênicas em camundongos e em plantas (ver Figura 5-79). Nesse caso, o gene-alvo nas células ES é substituído por uma versão totalmente funcional do gene que é flanqueada por

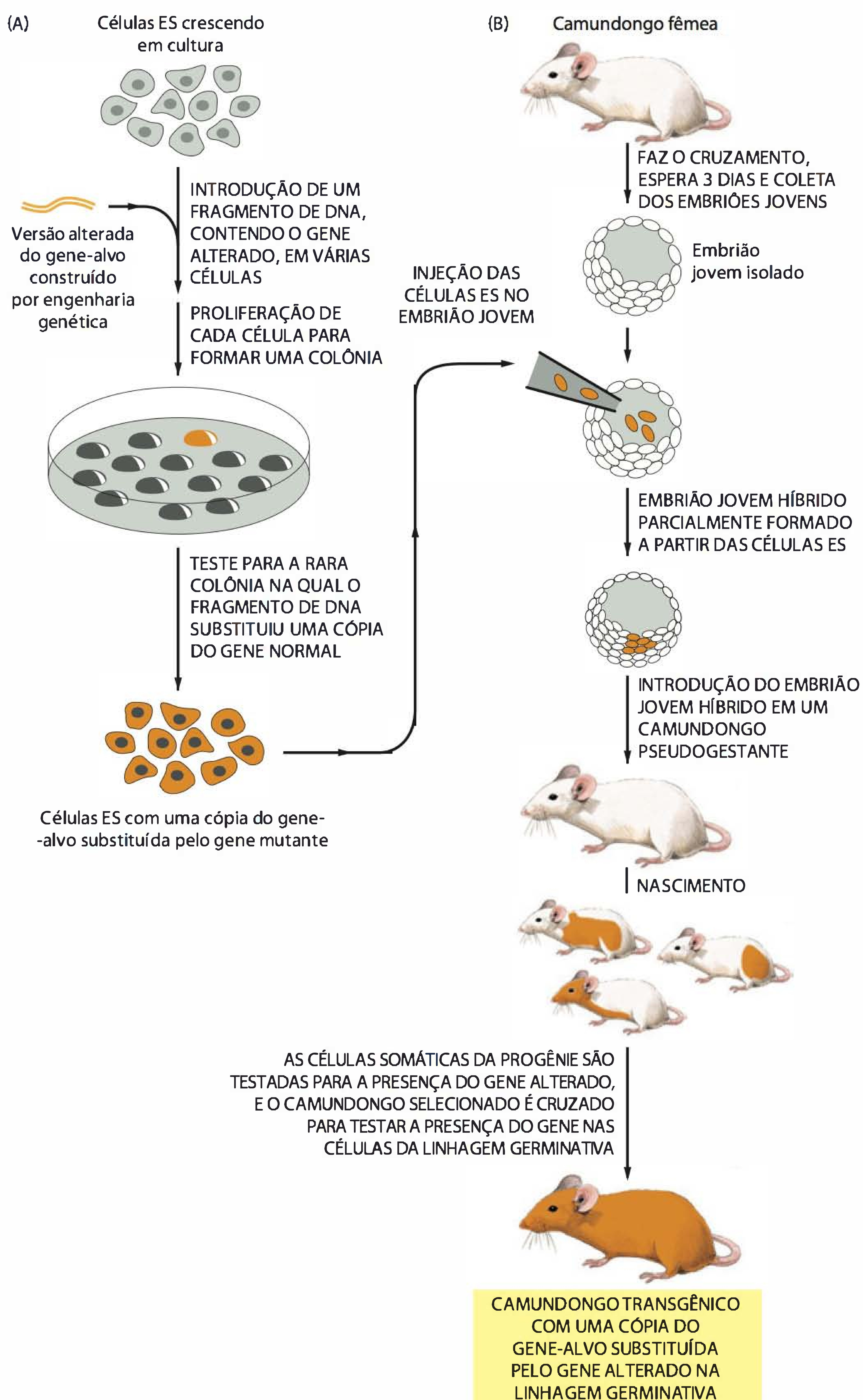


Figura 8-65 Resumo dos procedimentos utilizados para a realização de substituições de genes em camundongos. Na primeira etapa (A), uma versão alterada do gene é introduzida em células ES (células-tronco embrionárias) em cultura. Apenas algumas raras células ES terão seus genes normais correspondentes substituídos pelo gene alterado pelo evento de recombinação homóloga. Embora o procedimento frequentemente seja laborioso, essas raras células podem ser identificadas e cultivadas para produzir vários descendentes, cada um carregando um gene alterado no lugar de um dos seus dois genes normais correspondentes. Na próxima etapa do procedimento (B), as células ES alteradas são injetadas em um embrião de camundongo muito jovem; as células são incorporadas no embrião em crescimento, e um camundongo produzido por um embrião como este irá conter algumas células somáticas (indicadas em *laranja*) que carregam o gene alterado. Alguns desses camundongos também irão conter células da linhagem germinativa que possuem o gene alterado; quando cruzado com um camundongo normal, alguns camundongos dessa progênie irão conter uma cópia do gene alterado em todas as suas células. Se dois desses camundongos são cruzados (não-mostrado), alguns da progênie irão conter dois genes alterados (um em cada cromossomo) em todas as suas células.

Se a alteração gênica original inativa completamente a função do gene, esses camundongos homozigotos são conhecidos como camundongos nocaute. Quando esses camundongos são deficientes de genes que funcionam durante o desenvolvimento, eles frequentemente morrem com defeitos específicos muito antes de se tornarem adultos. Esses defeitos letais são cuidadosamente analisados para ajudar a determinar a função normal do gene ausente.

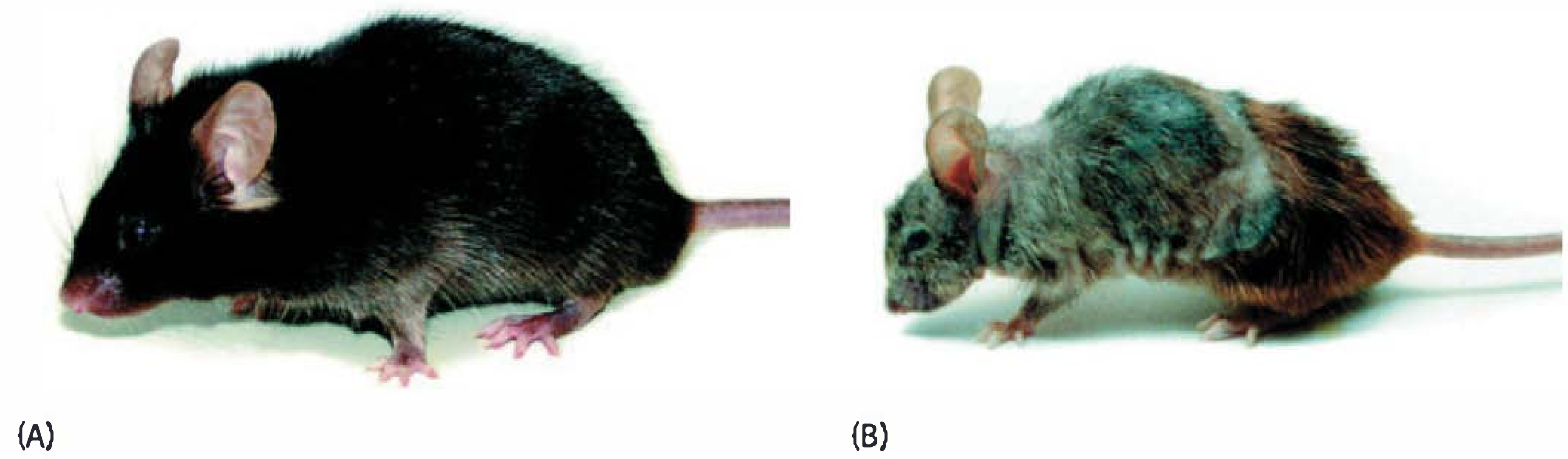


Figura 8-66 Um camundongo transgênico modificado para expressar uma DNA-helicase mutante apresenta envelhecimento precoce. A helicase, codificada pelo gene *Xpd*, está envolvida tanto na transcrição como no reparo do DNA. Comparado com um camundongo tipo selvagem da mesma idade (A), um camundongo transgênico que expressa uma versão defeituosa de *Xpd* (B) exibe vários dos sintomas de envelhecimento precoce, incluindo osteoporose, emagrecimento, cabelos grisalhos, infertilidade e tempo de vida reduzido. A mutação em *Xpd* usada aqui prejudica a atividade da helicase e imita a mutação que nos humanos causa tricotiodistrofia, uma desordem caracterizada por cabelos frágeis, anormalidades esqueléticas e uma expectativa de vida muito reduzida. Esses resultados indicam que um acúmulo de danos no DNA pode contribuir para o processo de envelhecimento tanto em humanos como em camundongos. (De J. de Boer et al., *Science* 296:1276-1279, 2002. Com permissão de AAAS.)

um par das sequências curtas de DNA, chamadas de *sítios lox*, reconhecidos pela proteína *recombinase Cre*. Os camundongos transgênicos que resultam são fenotipicamente normais. Eles são então cruzados com camundongos transgênicos que expressam o gene da recombinase Cre sob o controle de um promotor induzível. Nas células ou nos tecidos específicos nos quais Cre é ativado, ele catalisa a recombinação entre as sequências lox – excisando um gene-alvo e eliminando sua atividade. Sistemas de recombinação semelhantes são utilizados para gerar mutantes condicionais em *Drosophila* (ver Figura 22-49).

As plantas transgênicas são importantes tanto para a biologia celular como para a agricultura

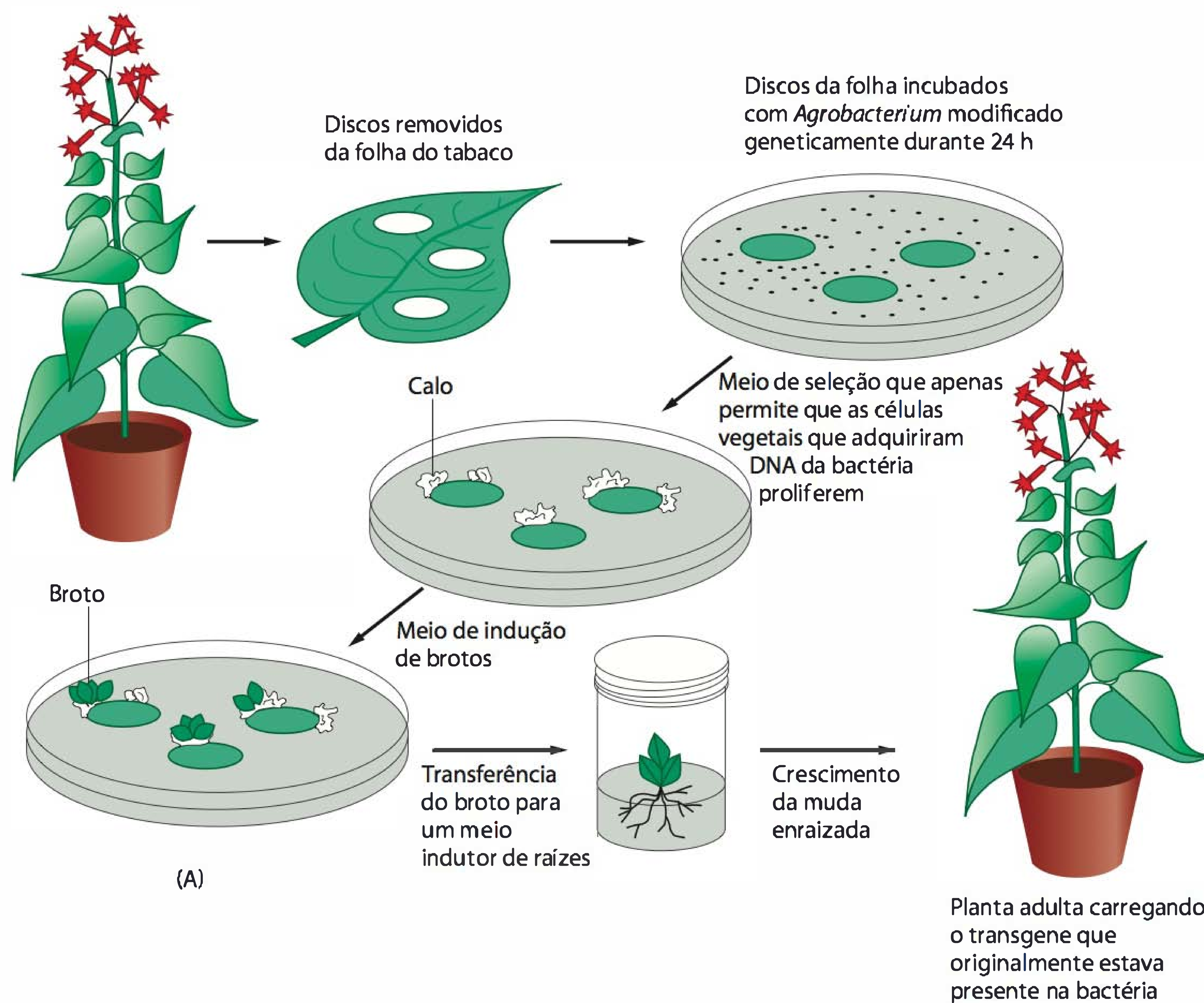
Uma planta danificada muitas vezes pode reparar a si mesma por um processo no qual as células maduras diferenciadas se "desdiferenciam", proliferam e então se diferenciam novamente em outros tipos de células. Em algumas circunstâncias, as células desdiferenciadas podem até mesmo formar um meristema apical, que pode, então, originar uma nova planta completa, incluindo gametas. Essa plasticidade extraordinária no desenvolvimento das células vegetais pode ser explorada para gerar plantas transgênicas a partir de células mantidas em cultura.

Quando um pedaço de tecido vegetal é cultivado em um meio estéril contendo nutrientes e reguladores de crescimento adequados, várias das células são estimuladas a proliferar indefinidamente de uma maneira desorganizada, produzindo uma massa de células relativamente indiferenciadas, chamada de *calo*. Se os nutrientes e os reguladores de crescimento forem manipulados com cuidado, pode-se induzir a formação de um broto e então de meristemas apicais de raiz no interior do calo e, em várias espécies, uma nova planta completa pode ser regenerada.

As culturas de calos podem também ser dissociadas mecanicamente em células individuais, que irão crescer e dividir como uma cultura em suspensão. Em várias plantas – incluindo tabaco, petúnia, cenoura, batata e *Arabidopsis* – uma única célula de uma dessas culturas em suspensão pode dar origem a uma pequena massa disforme (um clone) a partir da qual uma planta completa pode ser regenerada. Uma célula como esta, que tem a habilidade de originar todas as partes do organismo, é considerada **totipotente**. Assim como os camundongos transgênicos podem ser derivados, pela manipulação genética, de células ES em cultura, as plantas transgênicas podem ser criadas a partir de células vegetais totipotentes únicas que foram transfectadas com DNA em cultura (**Figura 8-67**).

A capacidade de produzir plantas transgênicas acelerou muito o progresso da biologia celular de plantas em várias áreas. Ela teve um importante papel, por exemplo, no isolamento de receptores de reguladores de crescimento e na análise dos mecanismos de morfogênese de expressão gênica em plantas. Também abriu várias novas possibilidades na agricultura que puderam beneficiar tanto o produtor como o consumidor. Tornou possível, por exemplo, modificar os lipídeos, o amido e as proteínas armazenadas em sementes, conferir às plantas resistência a pestes e a vírus e criar plantas modificadas que toleram habitats extremos, como pântanos salgados ou solos alagados.

Vários dos maiores avanços no entendimento do desenvolvimento animal vieram de estudos realizados na mosca-das-frutas *Drosophila* e no verme nematódeo *C. elegans*, nos quais uma análise genética extensiva e a manipulação experimental são relativamente simples. Em comparação, o progresso na biologia do desenvolvimento de plantas, no passado, foi relativamente lento. Várias das plantas que se mostraram acessíveis à análise genética – como o milho e o tomate – são dotadas de longos ciclos de vida e genomas muito grandes, tornando muito demoradas tanto a análise genética clássica como a molecular. Em conse-



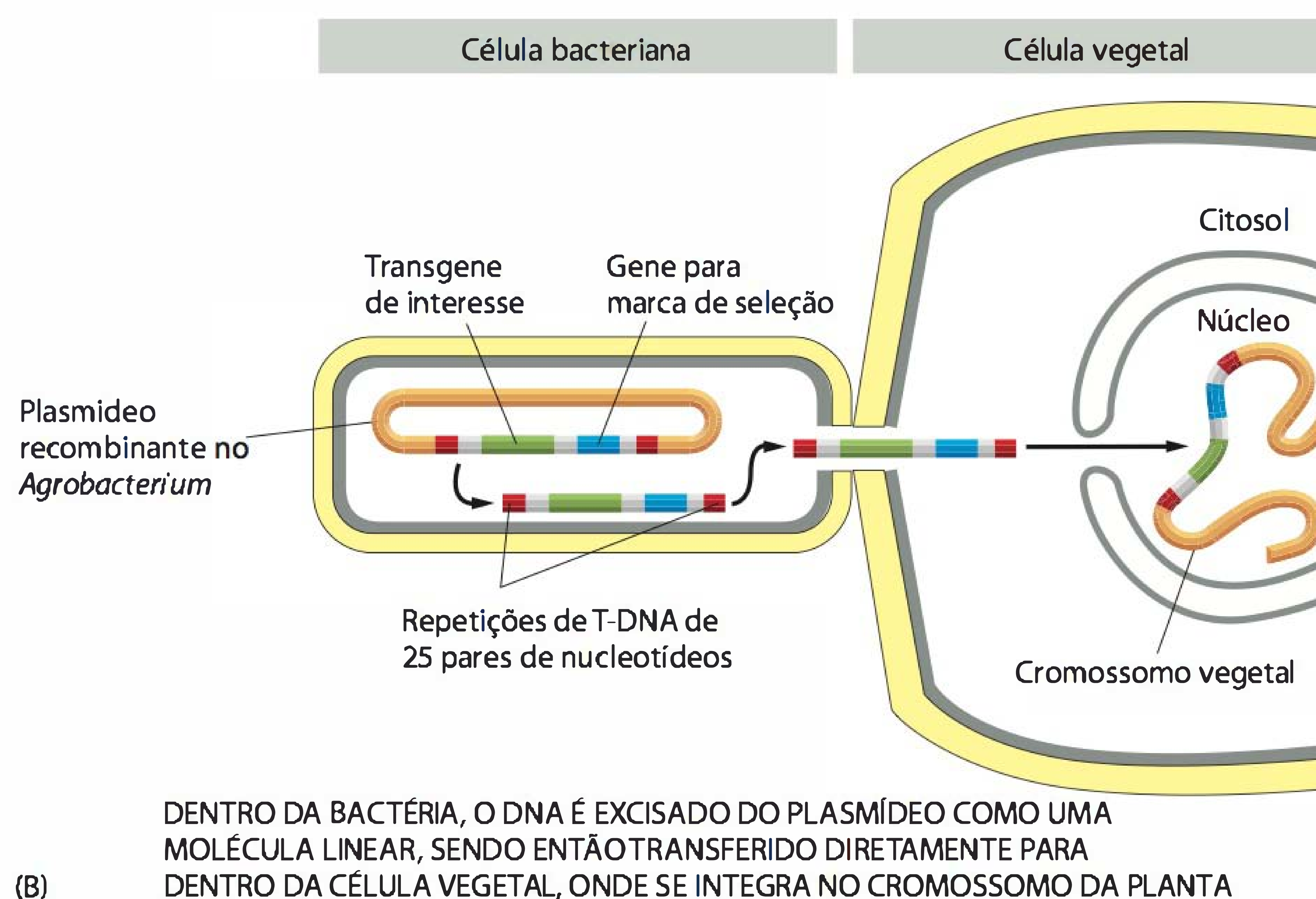


Figura 8-67 **Um procedimento utilizado para produzir uma planta transgênica.** (A) Resumo do processo. Um disco é recortado de uma folha e incubado em cultura com células de *Agrobacterium* que carregam um plasmídeo recombinante tanto com uma marca de seleção como com o transgene desejado. As células lesionadas nas bordas do disco liberam substâncias que atraem as células de *Agrobacterium* e as levam a injetar DNA nessas células. Apenas aquelas células vegetais que incorporam o DNA apropriado e expressam o gene para marca de seleção sobrevivem para proliferar e formar o calo. A manipulação dos reguladores de crescimento e dos nutrientes fornecidos para o calo o induz a formar brotos que subsequentemente formam raízes e crescem até plantas adultas carregando o transgene. (B) A preparação do plasmídeo recombinante e sua transferência para as células vegetais. Um plasmídeo de *Agrobacterium* que normalmente carrega a sequência T-DNA é modificado, substituindo um gene para marca de seleção (como o gene de resistência à kanamicina) e o transgene desejado entre as repetições de T-DNA de 25 pares de nucleotídeos. Quando a *Agrobacterium* reconhece a célula vegetal, ele eficientemente passa a fita de DNA que carrega essas sequências para dentro da célula vegetal, utilizando a maquinaria especial que normalmente transfere a sequência T-DNA do plasmídeo.

quência, uma atenção cada vez maior está sendo dada a uma pequena erva daninha de crescimento rápido, *Arabidopsis thaliana*, que possui várias vantagens como "planta-modelo" (ver Figuras 1-46 e 22-112). O genoma relativamente pequeno da *Arabidopsis* foi o primeiro genoma de planta a ser completamente sequenciado.

Grandes coleções de nocautes dirigidos fornecem uma ferramenta para examinar a função de cada gene em um organismo

Esforços extensivos estão sendo realizados para gerar grandes bibliotecas de mutações em uma variedade de organismos-modelo, incluindo *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* e o camundongo. O objetivo final, em cada caso, é produzir uma coleção de cepas mutantes nas quais cada gene no organismo foi deletado sistematicamente ou alterado de maneira que possa ser interrompido condicionalmente. As coleções desse tipo fornecerão

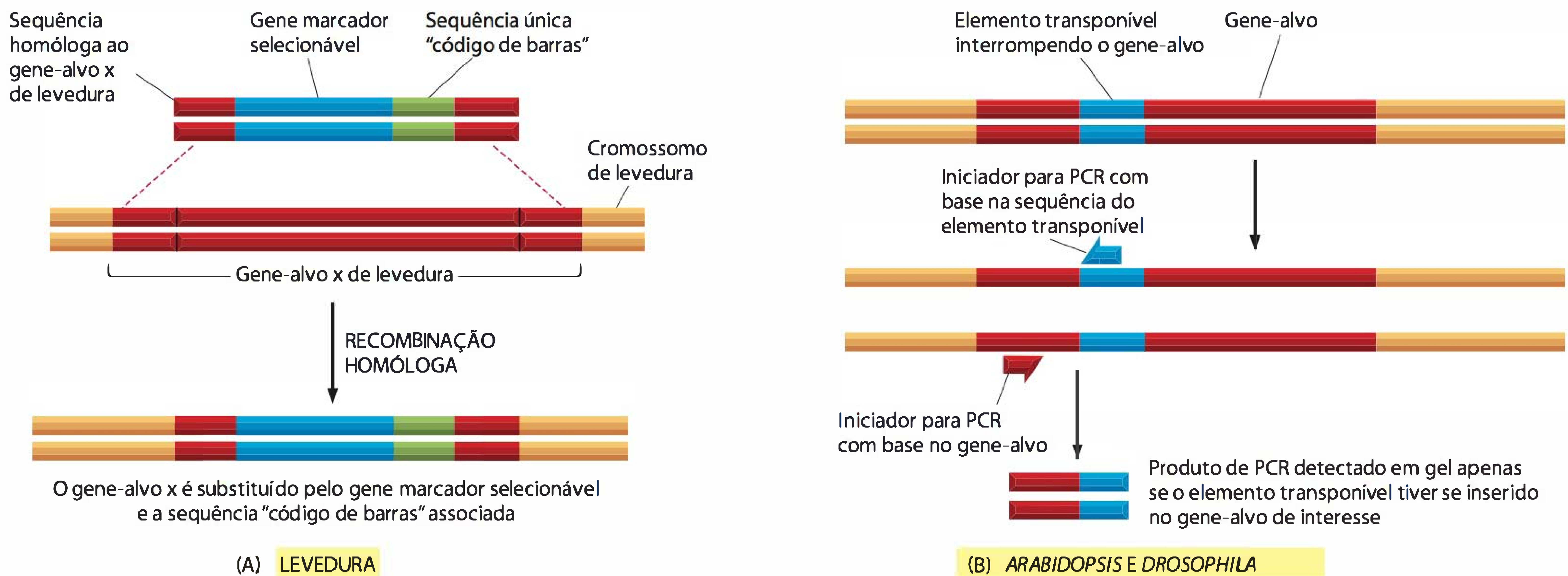


Figura 8-68 Produzindo coleções de organismos mutantes. (A) Um cassete de deleção para uso em leveduras contém sequências de DNA (*vermelho*) homólogas a cada extremidade do gene-alvo x, um gene para marca de seleção (*azul*) e uma única sequência "código de barras" com aproximadamente 20 pares de nucleotídeos de comprimento (*verde*). Esse DNA é introduzido em leveduras, onde prontamente substitui o gene-alvo por recombinação homóloga. Utilizando-se uma coleção de tais cassetes, cada um específico para um gene, uma biblioteca de mutantes de leveduras pode ser construída contendo um mutante para cada gene. (B) Uma abordagem similar pode ser utilizada para preparar mutantes nocaute marcados em *Arabidopsis* e em *Drosophila*. Nesse caso, os mutantes são gerados pela inserção acidental de um elemento transponível em um gene-alvo. O DNA total do organismo resultante pode ser coletado e rapidamente sondado pela interrupção de um gene de interesse utilizando-se iniciadores para PCR que se ligam ao elemento transponível e ao gene-alvo. Um produto de PCR é detectado no gel apenas se o elemento transponível tiver se inserido no gene-alvo (ver Figura 8-45).

uma fonte incalculável para investigar a função dos genes em uma escala genômica. Em alguns casos, cada um dos mutantes individuais da coleção exibirá uma marca molecular distinta – na forma de uma sequência única de DNA – projetada para identificar o gene alterado de forma rápida e rotineira.

Em *S. cerevisiae*, a tarefa de gerar um conjunto completo de 6 mil mutantes, cada um deficiente em apenas um gene, se torna mais simples pela propensão das leveduras para a recombinação homóloga. Para cada gene, um "cassete de deleção" é preparado. O cassete consiste em uma molécula de DNA especial que contém 50 nucleotídeos idênticos na sequência a cada extremidade do gene-alvo cercando um marcador selecionável. Além disso, uma sequência marcadora especial "código de barras" é embebida nessa molécula de DNA para facilitar uma posterior identificação rápida de cada cepa mutante resultante (**Figura 8-68**). Uma grande mistura desses mutantes com genes nocaute pode então ser crescida sob várias condições de teste seletivas – como privação de nutrientes, mudança de temperatura ou na presença de vários fármacos – e as células que sobrevivem podem ser rapidamente identificadas por suas sequências marcadoras únicas. Ao determinar como cada mutante na mistura irá progredir, pode-se começar a determinar quais genes são essenciais, úteis ou irrelevantes para crescer sob várias condições.

O desafio de obter informação a partir do estudo de tais leveduras mutantes está em deduzir a atividade de um gene ou o papel biológico, com base em um fenótipo do mutante. Alguns defeitos – a incapacidade de viver sem histidina, por exemplo – apontam diretamente para a função do gene tipo selvagem. Outras conexões podem não ser tão óbvias. O que uma sensibilidade repentina ao frio poderia indicar sobre o papel de um determinado gene na célula de levedura? Tais problemas são ainda maiores em organismos mais complexos do que as leveduras. A perda de função de um único gene no camundongo, por exemplo, pode afetar vários tipos de tecidos diferentes em diferentes estágios do desenvolvimento – enquanto a perda de outros genes pode não ter um efeito óbvio. Os fenótipos mutantes bem-caracterizados em camundongos frequentemente requerem um exame completo, com conhecimento extenso da anatomia, da histologia, da patologia, da fisiologia e do comportamento complexo do camundongo.

As informações geradas pelo exame de bibliotecas mutantes, entretanto, são importantes. Por exemplo, o estudo de uma grande coleção de mutantes em *Mycoplasma genitalium* – o organismo com o menor genoma conhecido – identificou o mínimo de complementos

de genes essenciais à vida da célula. A análise do conjunto dos mutantes sugere que o crescimento sob condições de laboratório requer cerca de três quartos dos 480 genes que codificam para proteínas em *M. genitalium*. Aproximadamente cem desses genes essenciais não têm função conhecida, o que sugere que um número surpreendente dos mecanismos moleculares básicos que são a base da vida ainda deverá ser descoberto.

O RNA de interferência é uma maneira simples e rápida de testar a função do gene

Embora a realização de nocaute gênico em um organismo e o estudo das suas consequências talvez sejam a abordagem mais potente para compreender as funções do gene, uma maneira muito mais simples para inativar genes foi recentemente descoberta. Chamado de **RNA de interferência** (**RNAi**), esse método explora o mecanismo natural usado em várias plantas, animais, fungos e protozoários para se proteger contra certos vírus e elementos transponíveis (ver Figura 7-115). A técnica introduz uma molécula de fita dupla de RNA, cuja sequência de nucleotídeos combina com parte do gene a ser inativado em uma célula ou organismo. Depois que o RNA é processado, ele hibridiza com o mRNA produzido pelo gene-alvo e o direciona para degradação. Subsequentemente, a célula utiliza pequenos fragmentos desse RNA degradado para produzir mais RNA de fita dupla, que direciona a contínua eliminação do mRNA-alvo. Como esses fragmentos curtos de RNA podem ser passados para as células progenitoras, o RNAi pode causar mudanças herdáveis na expressão gênica. Contudo, como vimos no Capítulo 7, existe um segundo mecanismo pelo qual RNAi pode inativar genes de forma estável. Fragmentos de RNA produzidos pela degradação no citosol podem entrar no núcleo e interagir com o próprio gene-alvo, direcionando seu empacotamento para uma forma transcricionalmente reprimida de cromatina. Essa maneira dupla de controlar a expressão gênica torna o RNAi uma ferramenta especialmente eficaz para inativar genes, um de cada vez.

RNAi frequentemente é usado para inativar genes em *Drosophila* e linhagens de cultura de células de mamíferos. Para isso, conjuntos de 15.000 moléculas de RNAi de *Drosophila* (uma para cada gene) permitem aos cientistas, em alguns meses, testar o papel de cada gene da mosca em um processo que pode ser monitorado usando-se células em cultura. Logo será possível realizar o mesmo tipo de análise com 25.000 genes de camundongo e humanos. RNAi também tem sido amplamente utilizado para estudar a função gênica no nematódeo *C. elegans*. Quando trabalhamos com vermes, introduzir o RNA de fita dupla é bastante simples: o RNA pode ser injetado diretamente no intestino do animal, ou o verme pode ser alimentado com *E. coli* modificada para produzir o RNA (**Figura 8-69**). O RNA é distribuído pelo corpo do verme, onde ele inibe a expressão do gene-alvo em diferentes tipos de tecidos. Como o genoma inteiro de *C. elegans* foi sequenciado, o RNAi está sendo utilizado para auxiliar a determinar as funções dos complementos integrais dos genes do verme.

Mais recentemente, uma técnica relacionada também tem sido amplamente utilizada em camundongos. Nesse caso, o RNAi não é injetado ou utilizado para alimentar um camundongo; particularmente, técnicas de DNA recombinante são utilizadas para produzir animais transgênicos que expressam o RNAi sob o controle de um promotor induzível. Muitas vezes, ele é um RNA especialmente projetado que pode se dobrar sobre si mesmo e, por

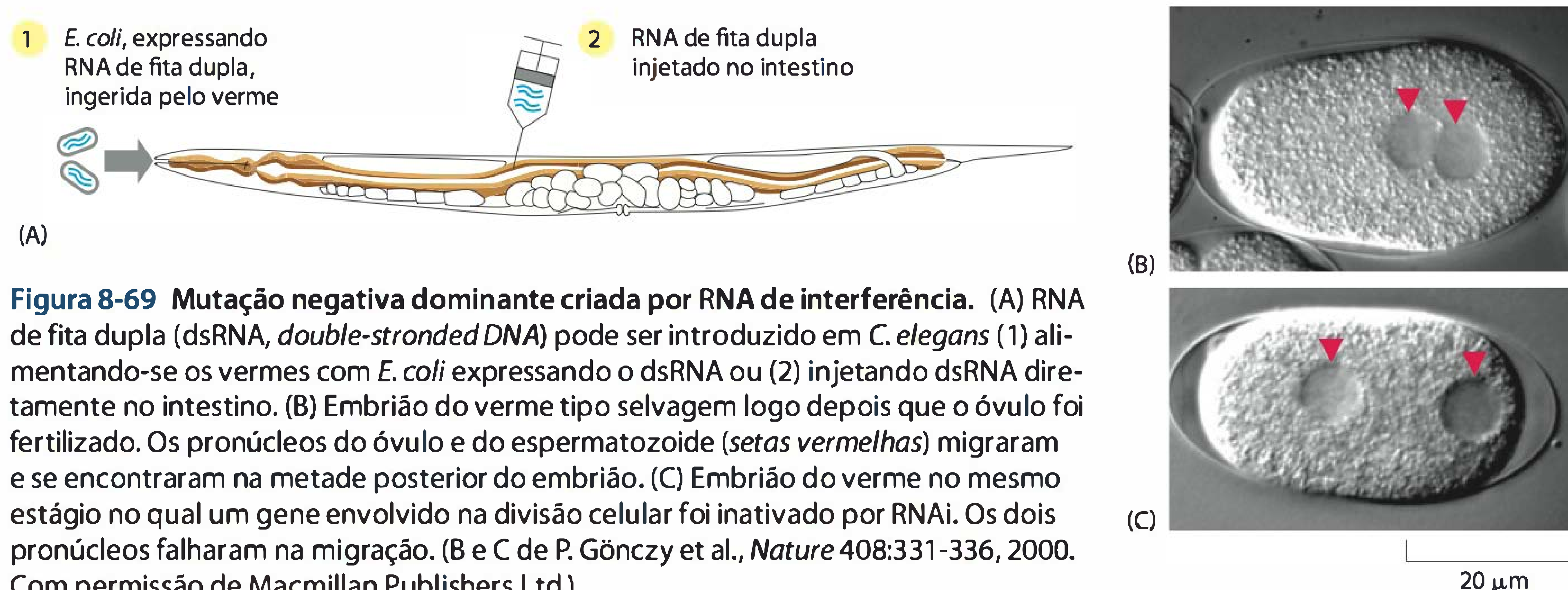


Figura 8-69 Mutação negativa dominante criada por RNA de interferência. (A) RNA de fita dupla (dsRNA, *double-stronded DNA*) pode ser introduzido em *C. elegans* (1) alimentando-se os vermes com *E. coli* expressando o dsRNA ou (2) injetando dsRNA diretamente no intestino. (B) Embrião do verme tipo selvagem logo depois que o óvulo foi fertilizado. Os pronúcleos do óvulo e do espermatozoide (*setas vermelhas*) migraram e se encontraram na metade posterior do embrião. (C) Embrião do verme no mesmo estágio no qual um gene envolvido na divisão celular foi inativado por RNAi. Os dois pronúcleos falharam na migração. (B e C de P. Gönczy et al., *Nature* 408:331-336, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

pareamento de bases, produzir uma região de fita dupla que é reconhecida pela maquinaria de RNAi. O processo inativa apenas os genes que pareiam perfeitamente com a sequência de RNAi. Dependendo dos promotores induzíveis utilizados, o RNAi pode ser produzido apenas em um tecido específico ou apenas em um determinado momento do desenvolvimento, permitindo que a função dos genes-alvo seja analisada em detalhes elaborados.

O RNAi tornou a genética reversa simples e eficiente em vários organismos, mas a técnica tem várias limitações severas comparada com os nocautes genéticos verdadeiros. Por razões desconhecidas, o RNAi não inativa os genes de forma eficiente. Além disso, dentro de organismos inteiros, certos tecidos podem ser resistentes à ação do RNAi (p. ex., neurônios em nematódeos). Um outro problema resulta de vários organismos conterem grandes famílias gênicas, cujos membros exibem similaridade nas sequências. Portanto, RNAi às vezes produz efeitos de "além do alvo", inativando genes relacionados além dos genes-alvo. Uma estratégia para evitar esse problema é utilizar múltiplas moléculas pequenas de RNA que pareiam com diferentes regiões do mesmo gene. No final, os resultados de qualquer experimento de RNAi devem ser vistos como uma forte indicação, mas não necessariamente uma prova, de função gênica normal.

Genes repórter e hibridização *in situ* revelam quando e onde um gene é expresso

Importantes indícios da função gênica muitas vezes podem ser obtidos examinando-se quando e onde um gene é expresso na célula ou em todo o organismo. A determinação do padrão e do momento da expressão gênica pode ser realizada substituindo-se a porção codificante do gene em estudo por um gene repórter. Na maioria dos casos, a expressão do gene repórter é então monitorada pelo rastreamento da fluorescência ou da atividade enzimática do seu produto proteico (ver Figuras 9-26 e 9-27).

Como discutido em detalhes no Capítulo 7, sequências reguladoras de DNA, localizadas antes ou depois da região codificante, controlam a expressão gênica. Essas sequências reguladoras, que determinam exatamente quando e onde o gene é expresso, podem ser facilmente estudadas colocando-se um gene repórter sob seu controle e introduzindo-se essas moléculas de DNA recombinante nas células (**Figura 8-70**).

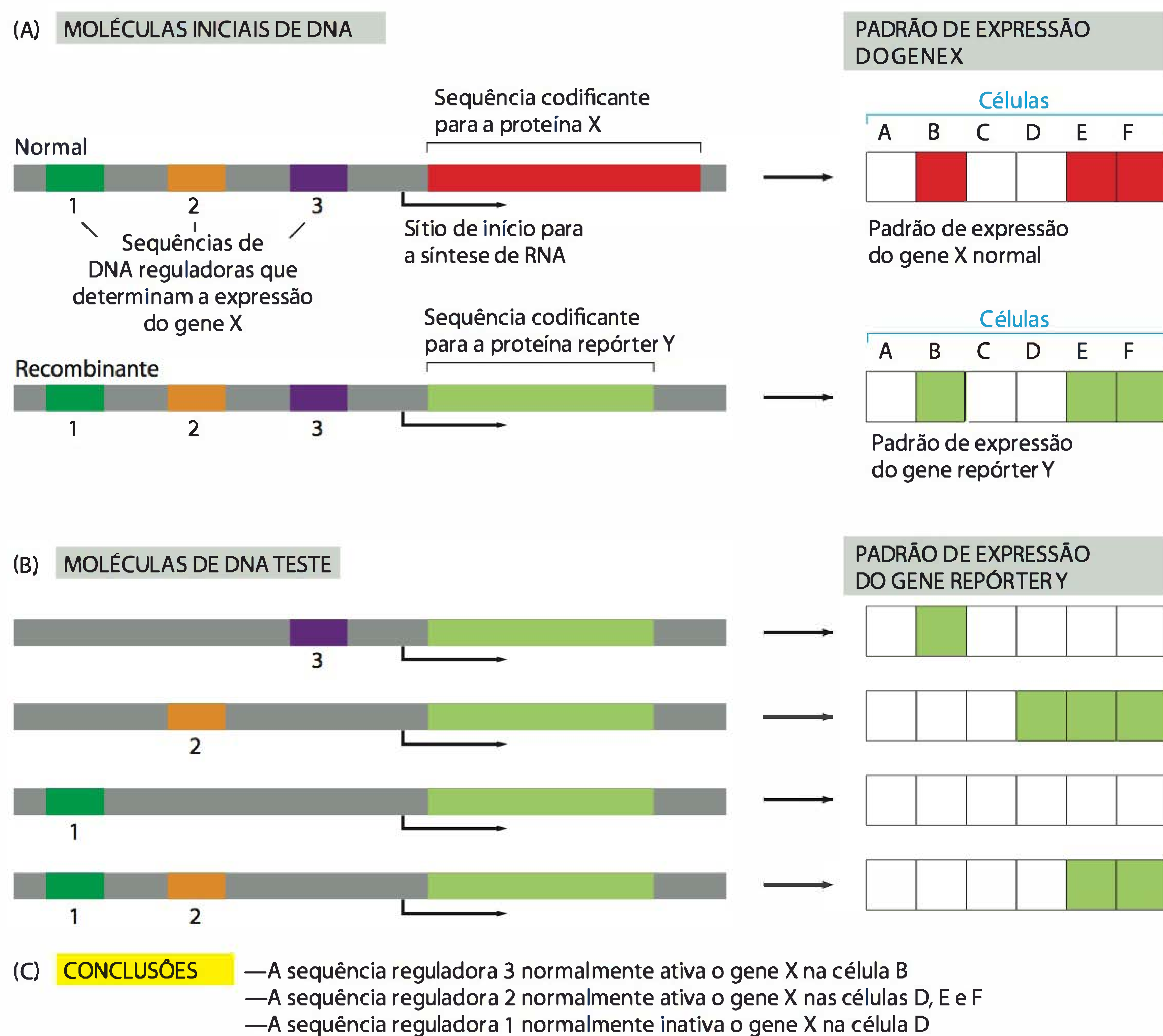


Figura 8-70 Utilização de uma proteína repórter para determinar o padrão de expressão de um gene. (A) Neste exemplo, a sequência codificante para a proteína X é substituída pela sequência codificante para a proteína Y repórter. O padrão de expressão para X e Y é o mesmo. (B) Vários fragmentos de DNA contendo sequências reguladoras candidatas são adicionados em combinações para produzir moléculas de DNA teste que codificam para o gene repórter Y. Essas moléculas de DNA recombinante são então testadas para a expressão após sua transfecção em vários tipos diferentes de células de mamíferos. Os resultados estão resumidos em (C).

Para experimentos em células eucarióticas, duas proteínas repórter comumente utilizadas são as enzimas β-galactosidase (*β-gal*) (ver Figura 7-55B) e a proteína fluorescente verde ou GFP (ver Figura 9-26). A Figura 7-55B mostra um exemplo no qual o gene *β-gal* é utilizado para monitorar a atividade da sequência reguladora do gene *Eve* em um embrião de *Drosophila*.

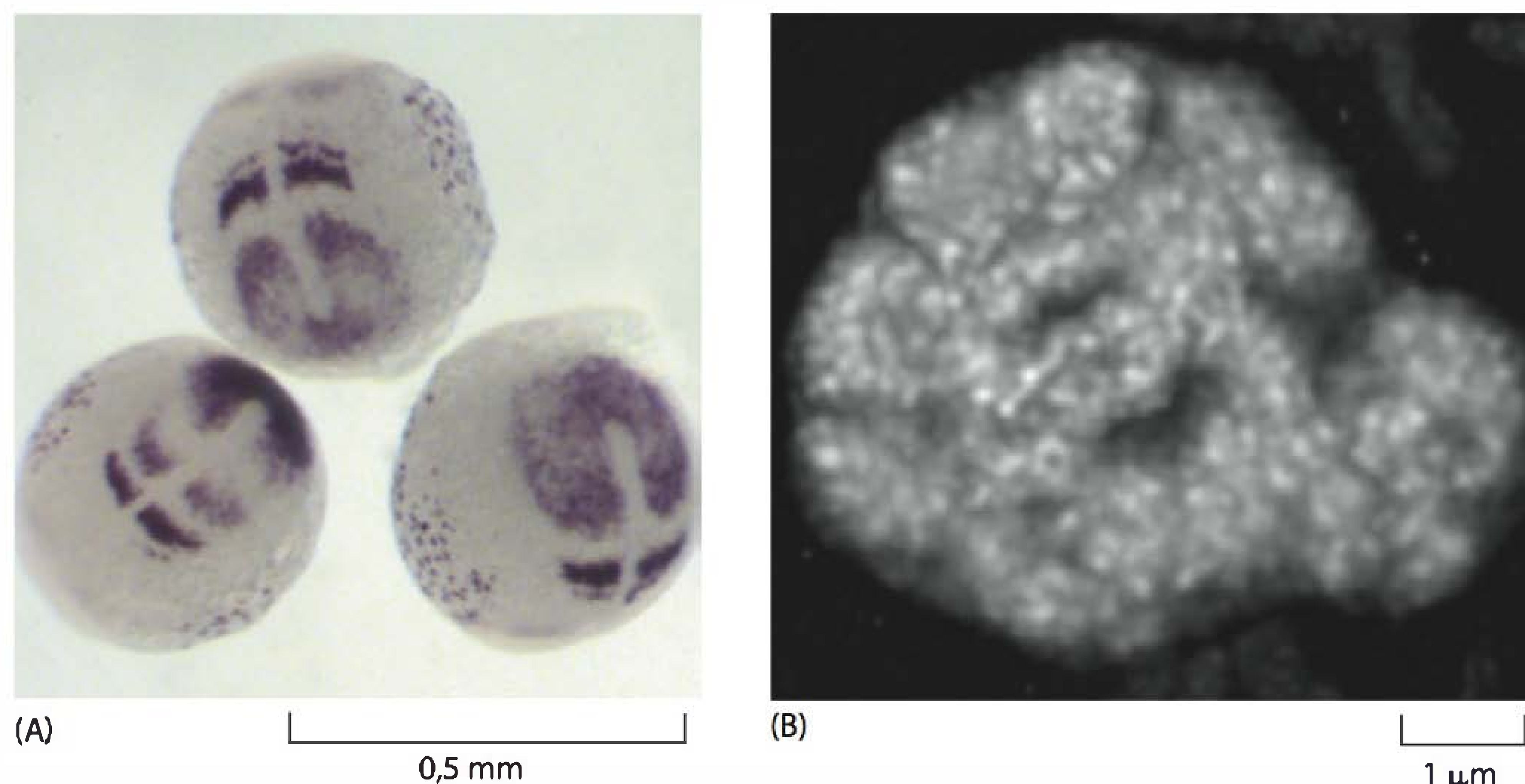


Figura 8-71 Hibridização *in situ* para localização de RNA. (A) Padrão de expressão do mRNA de *DeltaC* no embrião jovem do peixe-zebra. Esse gene codifica para um ligante na via de sinalização Notch (discutido no Capítulo 15), e o padrão mostrado aqui reflete seu papel no desenvolvimento de somitos – os futuros segmentos da coluna vertebral e da cauda. (B) A localização *in situ* em alta resolução de RNA revela os sítios dentro do nucléolo de uma célula de ervilha, onde o RNA ribossomal (rRNA) é sintetizado. As estruturas semelhantes a salsichas, com 0,5 a 1 μm de diâmetro, correspondem às alças do DNA cromossomal que contêm os genes que codificam para rRNA. Cada pequeno ponto branco representa a transcrição de um único gene de rRNA. (A, cortesia de Yun-Jin Jiang; B, cortesia de Peter Shaw.)

Também é possível observar diretamente o momento e o local em que o produto do mRNA de um gene é expresso. Embora essa estratégia muitas vezes forneça as mesmas informações gerais que as abordagens de gene repórter discutidas anteriormente, existem momentos em que ela fornece informação adicional; por exemplo, quando o gene é transcrito mas o mRNA não é imediatamente traduzido, ou quando o produto final do gene é RNA em vez de proteína. Esse procedimento, chamado de **hibridização *in situ***, tem como base os princípios da hibridização de ácidos nucleicos descrita anteriormente. Normalmente, os tecidos são gentilmente fixados de modo que o seu RNA é retido em uma forma exposta que pode hibridizar com uma sonda marcada de DNA ou RNA complementar. Dessa forma, os padrões de expressão gênica diferencial podem ser observados nos tecidos, e a localização de RNAs específicos nas células pode ser determinada (**Figura 8-71**). No embrião de *Drosophila*, por exemplo, tais padrões forneceram novas dicas dos mecanismos que criaram distinções entre células em diferentes posições durante o desenvolvimento (descrito no Capítulo 22).

Utilizando-se abordagens similares, também é possível visualizar sequências específicas de DNA nas células. Nesse caso, preparações de tecidos, células ou até mesmo cromossomos são brevemente expostas a pH alto para romper seus pares de nucleotídeos, e sondas de ácidos nucleicos são adicionadas, hibridizadas com o DNA da célula e então visualizadas (ver Figura 8-35).

A expressão de genes individuais pode ser medida usando-se RT-PCR quantitativo

Embora os genes repórter e a hibridização *in situ* revelem padrões de expressão gênica, muitas vezes se deseja quantificar a expressão gênica medindo diretamente os níveis de mRNA nas células. Embora *Northern blots* (ver Figura 8-38) possam ser adaptados para esse propósito, um método mais acurado tem como base os princípios da PCR (**Figura 8-72**). Esse método, chamado de **RT-PCR quantitativo** (RT-PCR, *reverse transcription-polymerase chain reaction*, transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase), inicia com a população total de moléculas de mRNA purificadas a partir de tecido ou de cultura de células. É importante que nenhum DNA esteja presente na preparação; ele deve ser retirado ou degradado enzimaticamente. Dois iniciadores de DNA que pareiam especificamente com o gene de interesse são adicionados, junto com a transcriptase reversa, a DNA-polimerase e os quatro trifosfatos de desoxinucleosídeo necessários para a síntese. O primeiro ciclo de síntese é a transcrição reversa do mRNA em DNA usando um desses iniciadores. Depois, uma série de ciclos de aquecimento e resfriamento permite a amplificação daquela fita de DNA por PCR convencional (ver Figura 8-45). A parte quantitativa desse método tem como base uma relação direta entre a velocidade em que o produto de PCR é gerado e a concentração original das espécies de mRNA de interesse. Pela adição de corantes químicos na reação de PCR que fluorescem apenas quando ligados a uma fita dupla de DNA, uma medida simples de fluorescência pode ser utilizada para rastrear o progresso da reação e assim deduzir com acuidade a concentração inicial do mRNA que é amplificado (ver Figura 8-72). Embora pareça complicada, essa técnica de RT-PCR quantitativo (às vezes chamada de *PCR em tempo real*) é relativamente rápida

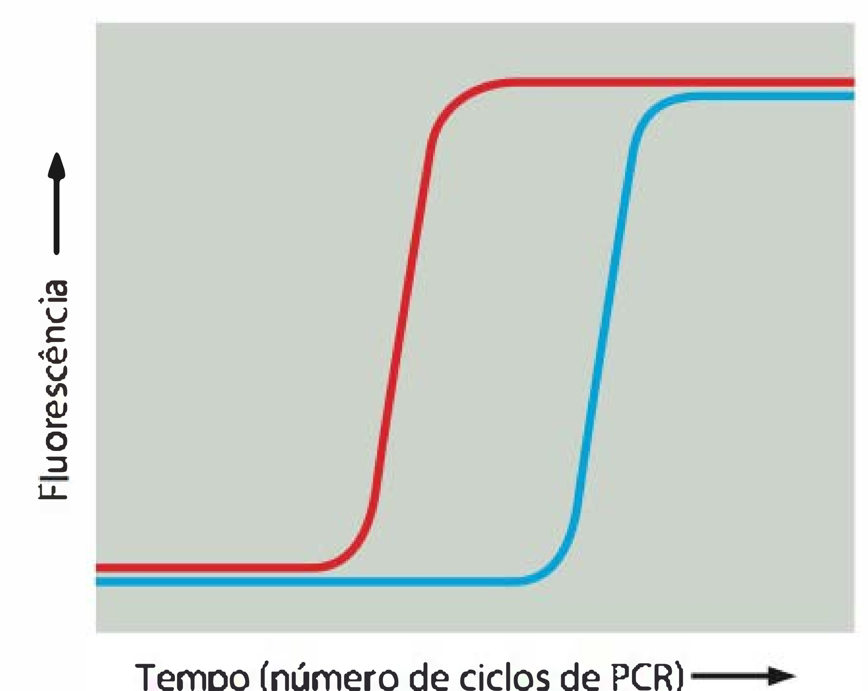
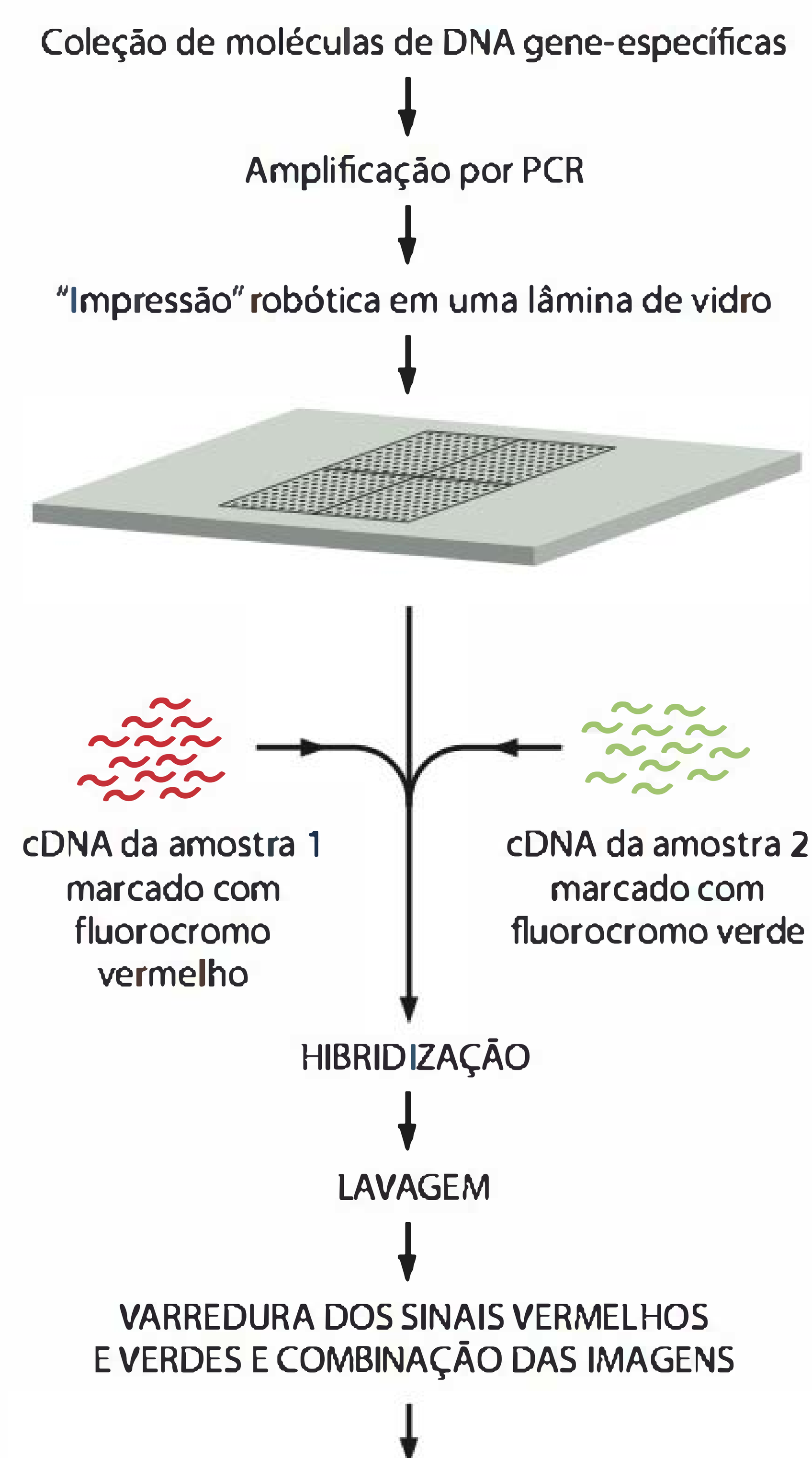


Figura 8-72 Os níveis de RNA podem ser medidos por RT-PCR quantitativo. A fluorescência medida é gerada por um corante que fluoresce apenas quando ligado a produtos de DNA de fita dupla de reações de RT-PCR (ver Figura 8-46B). A amostra vermelha tem uma concentração maior do mRNA sendo medido do que a amostra azul, uma vez que ela requer menos ciclos de PCR para atingir a mesma metade de concentração máxima do DNA de fita dupla. Com base nessa diferença, as quantidades relativas do mRNA nas duas amostras podem ser precisamente determinadas.



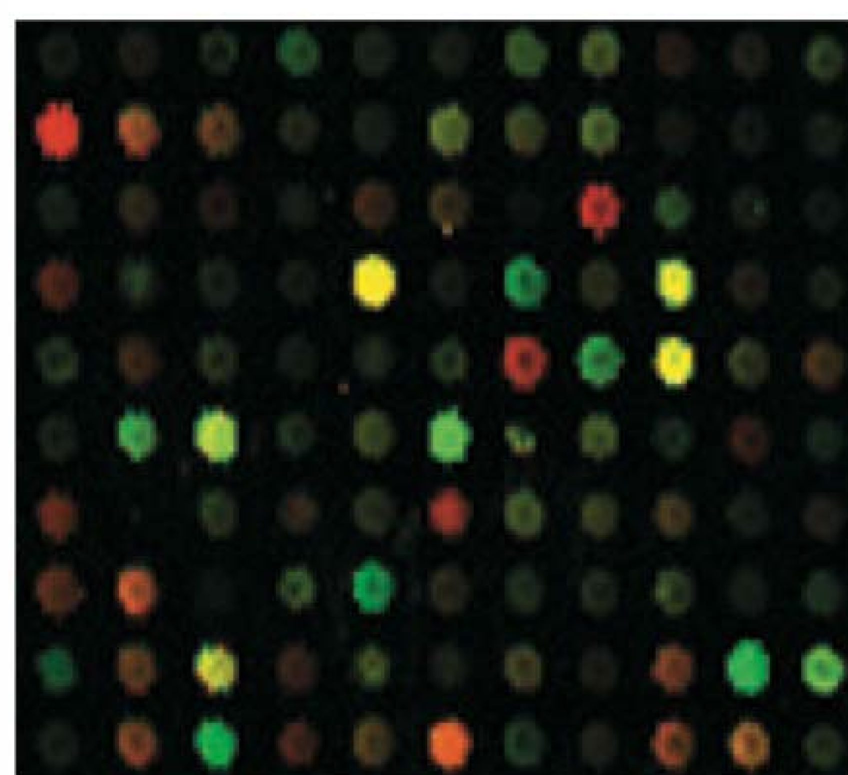


Figura 8-73 Utilização de microarranjos de DNA para monitorar a expressão de milhares de genes simultaneamente. Para preparar o microarranjo, os fragmentos de DNA – cada um correspondendo a um gene – são plotados em cima de uma lâmina, por um robô. Arranjos preparados também estão disponíveis comercialmente. Neste exemplo, o mRNA é coletado de duas amostras de células diferentes para uma comparação direta dos seus níveis relativos de expressão gênica; as duas amostras, por exemplo, poderiam ser de células tratadas com um hormônio e células não-tratadas do mesmo tipo. Essas amostras são convertidas para cDNA e marcadas, uma com fluorocromo vermelho, a outra, com um fluorocromo verde. As amostras marcadas são misturadas e hibridizadas com o microarranjo. Após a incubação, o arranjo é lavado, e a fluorescência é varrida. Na porção mostrada do microarranjo, que representa a expressão de 110 genes de levedura, os pontos *vermelhos* indicam que o gene na amostra 1 é expresso em um nível maior do que o gene correspondente na amostra 2; os pontos *verdes* indicam que a expressão do gene é maior na amostra 2 do que na amostra 1. Os pontos *amarelos* revelam genes que são expressos em níveis iguais em ambas as amostras de células. Os pontos escuros indicam pouca ou nenhuma expressão em cada amostra do gene cujo fragmento está localizado naquela posição do arranjo. (Microarranjo cortesia de J. L. DeRisi et al., *Science* 278:680-686, 1997. Com permissão de AAAS.)

e simples de ser realizada em laboratório; ela substituiu o *Northern blotting* como método de escolha para quantificar níveis de mRNA a partir de qualquer gene.

Os microarranjos monitoram a expressão de milhares de genes de uma só vez

Até agora foram discutidas técnicas que podem ser utilizadas para monitorar a expressão de apenas um gene (ou relativamente poucos genes) de cada vez. Desenvolvidos nos anos de 1990, os **microarranjos de DNA** revolucionaram a análise da expressão gênica pelo monitoramento dos produtos de RNA de milhares de genes de uma só vez. Examinando a expressão de tantos genes simultaneamente, podemos começar a identificar e estudar os padrões de expressão gênica que fundamentam a fisiologia celular: podemos ver quais genes estão ativados (ou inativados) quando as células crescem, se dividem ou respondem a hormônios ou a toxinas.

Os microarranjos de DNA nada mais são do que lâminas de vidro de microscópio crivadas com uma grande quantidade de fragmentos de DNA, cada um contendo uma sequência de nucleotídeos que serve como uma sonda para um gene específico. Os arranjos mais densos podem conter dezenas de milhares desses fragmentos em uma área menor do que um selo, permitindo que milhares de reações de hibridização sejam realizadas em paralelo (**Figura 8-73**). Alguns microarranjos são preparados a partir de fragmentos grandes de DNA que foram gerados por PCR e então plotados em lâminas por um robô. Outros contêm oligonucleotídeos curtos sintetizados na superfície de uma pastilha de vidro com técnicas similares àquelas utilizadas para gravar circuitos em *chips* de computador. Em cada caso, a sequência exata – e posição – de cada sonda no *chip* é conhecida. Dessa maneira, qualquer fragmento de nucleotídeo que hibridize com uma sonda no arranjo pode ser identificado como o produto de um gene específico, simplesmente detectando a posição à qual ela se liga.

Para utilizar um microarranjo de DNA para monitorar a expressão gênica, o mRNA das células que estão sendo estudadas é primeiro extraído e convertido em cDNA (ver Figura 8-43). O cDNA é então marcado com uma sonda fluorescente. O microarranjo é incubado com essa amostra de cDNA marcada e a hibridização é realizada (ver Figura 8-73). O arranjo é então lavado para remover o cDNA que não está ligado firmemente, e as posições no microarranjo às quais os fragmentos de DNA marcados se ligaram são identificadas por um microscópio automatizado de varredura a *laser*. As posições dos arranjos são então comparadas com a do gene específico do qual a amostra de DNA foi plotada.

Tipicamente, os DNAs fluorescentes das amostras experimentais (marcadas, p. ex., com um corante fluorescente vermelho) são misturados a uma amostra-referência de fragmentos de cDNA marcados com um corante fluorescente de cor diferente (p. ex., verde). Desse modo, se a quantidade de RNA expresso de um gene em particular, nas células de interesse, está aumentada em relação à da amostra-referência, o ponto resultante é vermelho. Ao contrário, se a expressão do gene está diminuída em relação à da amostra-referência, o ponto é verde. Se não houver diferença com a amostra-referência, o ponto é amarelo. Utilizando-se uma referência interna como esta, os perfis da expressão gênica podem ser tabelados com grande precisão.

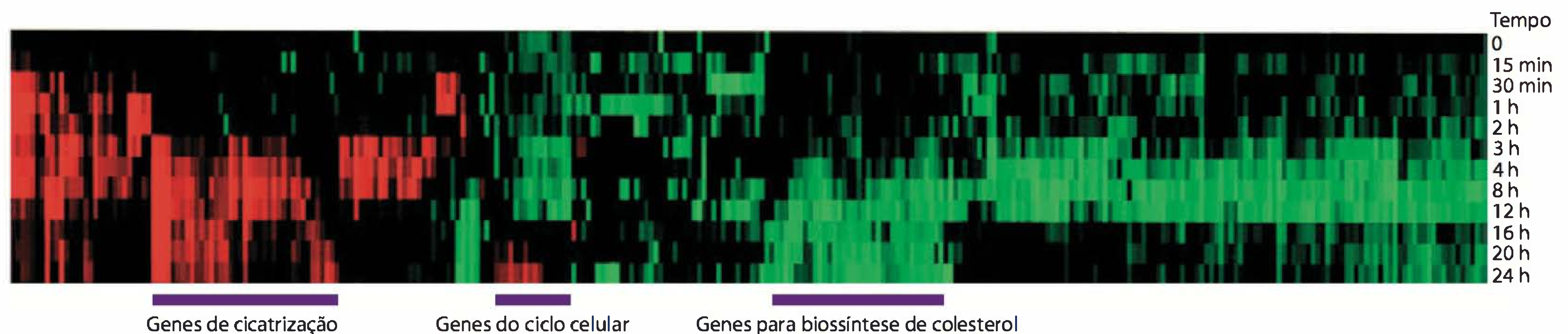


Figura 8-74 Utilização da análise de agrupamentos para identificar grupos de genes que são regulados coordenadamente. Os genes que pertencem ao mesmo agrupamento podem estar envolvidos em vias ou em processos celulares comuns. Para fazer uma análise de agrupamento, os dados de microarranjos são obtidos a partir de amostras de células expostas a várias condições diferentes, e os genes que mostram mudanças coordenadas no seu padrão de expressão são agrupados. Neste experimento, os fibroblastos humanos foram privados de soro por 48 horas; o soro foi então adicionado à cultura no tempo 0, e as células foram coletadas para análise do microarranjo em diferentes pontos de tempo. Dos 8.600 genes analisados no microarranjo de DNA, apenas em torno de 300 mostraram três vezes ou mais variações no seu padrão de expressão em resposta à reintrodução do soro. Aqui o *vermelho* indica um aumento na expressão; o *verde* uma diminuição na expressão. Tendo como base os resultados de vários experimentos de microarranjos, os 8.600 genes foram agrupados em agrupamentos com base nos padrões similares de expressão. Os resultados desta análise mostram que os genes envolvidos na cicatrização de feridas são ativados em resposta ao soro, enquanto os genes envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular e da biossíntese de colesterol são inativados. (De M. B. Eisen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:14863-14868, 1998. Com permissão de National Academy of Sciences.)

Até agora, os microarranjos de DNA têm sido utilizados para examinar tudo, desde as mudanças na expressão gênica que fazem os morangos amadurecerem, até as "assinaturas" da expressão gênica de diferentes tipos de células de câncer humano (ver Figura 7-3); ou desde mudanças que ocorrem à medida que as células progridem pelo ciclo celular até aquelas produzidas em resposta a mudanças repentinas na temperatura. Na verdade, como os microarranjos permitem o monitoramento simultâneo de um grande número de genes, eles podem detectar mudanças sutis em uma célula, mudanças que podem não ser manifestadas em sua aparência ou em seu comportamento.

Estudos gerais de expressão gênica também fornecem uma camada adicional de informação útil para predizer a função gênica. Anteriormente discutimos como a identificação de proteínas parceiras de interação pode gerar dicas sobre a função da proteína. Um princípio semelhante também é verdadeiro para genes: uma informação sobre a função gênica pode ser deduzida pela identificação dos genes que compartilham seu padrão de expressão. Utilizando-se uma técnica chamada de *análise de agrupamentos*, podem-se identificar grupos de genes que são regulados coordenadamente. Os genes que são ativados ou inativados juntos, sob circunstâncias diferentes, provavelmente trabalham em conjunto na célula: eles podem codificar para proteínas que são parte da mesma máquina multiproteica, ou para proteínas que estão envolvidas em uma atividade coordenada complexa, como a replicação do DNA ou o *splicing* do RNA. Caracterizar um gene cuja função é desconhecida pelo seu agrupamento com genes conhecidos que compartilham seu comportamento transcricional é, às vezes, chamado de "culpa pela associação". A análise de agrupamentos tem sido utilizada para analisar os perfis da expressão gênica que fundamentam vários processos biológicos interessantes, incluindo a cicatrização de feridas em humanos (**Figura 8-74**).

Além de monitorar o nível do mRNA correspondente a cada gene no genoma, os microarranjos de DNA têm vários outros usos. Por exemplo, eles podem ser utilizados para monitorar a progressão da replicação do DNA em uma célula (ver Figura 5-32) e, quando combinados com imunoprecipitação, podem apontar cada posição no genoma ocupada por uma dada proteína reguladora de gene (ver Figura 7-32). Os microarranjos também podem ser utilizados para identificar de forma rápida micróbios causadores de doença por hibridização do DNA de tecidos infectados a um arranjo contendo sequências de DNA genômico a partir de grandes coleções de patógenos.

A análise da expressão gênica em células únicas revela o "ruído" biológico

Os métodos recém-descritos para monitorar mRNAs fornecem uma média dos níveis de expressão para cada mRNA ao longo de uma grande população de células. Pelo uso de uma proteína repórter fluorescente cuja expressão está sob controle de um promotor de interesse,

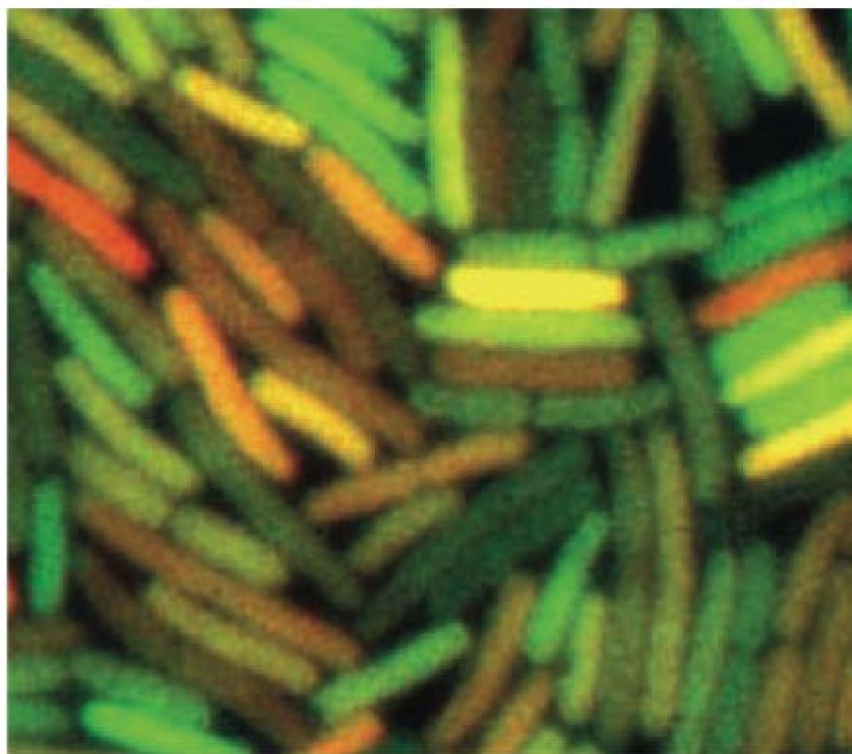


Figura 8-75 Diferentes níveis de expressão gênica em células individuais dentro de uma população da bactéria *E. coli*. Para esses experimentos, duas proteínas repórter diferentes (uma fluorescendo em *verde*, a outra em *vermelho*) controladas por uma cópia do mesmo promotor foram introduzidas em todas as bactérias. Quando iluminadas, algumas células expressam apenas uma cópia do gene e assim aparecem ou em vermelho ou em verde, enquanto outras expressam ambas as cópias do gene e assim aparecem *amarelas*. Esse experimento também revela níveis variados de fluorescência, indicando níveis variados de expressão gênica dentro de uma população de células aparentemente uniforme. (De M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. O. Siggia e P. S. Swain, *Science* 297:1183-1186, 2002. Com permissão de AAAS.)

também é possível medir com acuidade os níveis de expressão em células individuais. Essas novas abordagens revelaram uma quantidade impressionante de variabilidade, muitas vezes chamada de *ruído biológico*, entre as células individuais em uma população homogênea de células. Esses estudos também revelaram a presença de subpopulações distintas de células cuja existência seria mascarada se apenas a média de uma população inteira fosse considerada. Por exemplo, uma distribuição bimodal dos níveis de expressão indicaria que as células podem existir em dois estados distintos (**Figura 8-75**), com o nível de expressão médio da população ficando entre eles. O comportamento de células individuais tem implicações importantes para compreender a biologia, por exemplo, revelando que algumas células trocam constante e rapidamente entre os dois estados.

Atualmente, existem duas abordagens para monitorar a expressão gênica de células individuais. Na abordagem de imagem, células vivas são montadas sobre uma lâmina e visualizadas por meio de um microscópio de fluorescência. Esse método tem a vantagem de uma dada célula poder ser acompanhada com o tempo, permitindo-se medir as alterações da expressão com o tempo. A segunda abordagem, citometria de fluxo, funciona passando-se uma suspensão diluída de células por um iluminador e medindo-se a fluorescência das células individuais à medida que elas passam pelo detector (ver Figura 8-2). Embora ela tenha a vantagem de os níveis de expressão de um grande número de células poderem ser medidos com precisão, a citometria de fluxo não permite que uma dada célula seja acompanhada com o tempo; portanto, é complementar aos métodos de imagem.

Resumo

A genética e a engenharia genética fornecem ferramentas eficazes para o estudo da função gênica tanto em células quanto em organismos. Na abordagem genética clássica, a mutagênese aleatória está associada com o rastreamento, para identificar mutantes que são deficientes em um processo biológico particular. Esses mutantes são, então, utilizados para localizar e estudar os genes responsáveis pelo processo.

A função gênica também pode ser apurada por técnicas de genética reversa. Podem ser utilizados métodos de engenharia genética para alterar genes e reinserí-los em um cromossomo da célula, de maneira que ele se torne uma parte permanente do genoma. Se a célula utilizada para a transferência do gene é um óvulo fertilizado (em um animal) ou uma célula vegetal totipotente em cultura, podem ser produzidos organismos transgênicos que expressam o gene mutante e o passam a sua progênie. Especialmente importante para a biologia celular é a habilidade de alterar células e organismos de maneiras muito específicas – permitindo o discernimento do efeito na célula ou no organismo de uma alteração projetada em uma única proteína ou molécula de RNA.

Vários desses métodos estão sendo difundidos para investigar a função gênica em uma escala genômica. A geração de bibliotecas mutantes, nas quais cada gene em um organismo foi deletado sistematicamente ou interrompido, fornece ferramentas de valor incalculável para explorar o papel de cada gene na colaboração molecular elaborada que dá origem à vida. As tecnologias como microarranjos de DNA podem ser utilizadas para monitorar a expressão de milhares de genes simultaneamente, provendo observações isoladas e detalhadas dos padrões dinâmicos da expressão gênica que fundamentam os processos celulares complexos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

8-1 Uma vez que um anticorpo monoclonal reconhece um sítio antigênico específico (epítopo), ele se liga apenas à proteína específica contra a qual ele foi feito.

8-2 Dado o inexorável progresso da tecnologia, parece inevitável que a sensibilidade de detecção de moléculas no final irá ultrapassar o nível de yoctomole (10^{-24} mole).

8-3 A ressonância plasmônica de superfície (SPR) mede as velocidades de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) entre moléculas em tempo real, usando pequenas quantidades de moléculas não-marcadas, mas ela não fornece a informação necessária para determinar a constante de ligação (K).

8-4 Se cada ciclo de PCR dobra a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, então 10 ciclos gerarão 10^3 vezes de amplificação, 20 ciclos gerarão 10^6 vezes e 30 ciclos 10^9 vezes.

Discuta as seguintes questões.

8-5 Uma etapa comum no isolamento de células a partir de uma amostra de tecido animal é tratá-lo com tripsina, colagenase e EDTA. Por que um tratamento desses é necessário e para que serve cada componente? Por que esse tratamento não mata as células?

8-6 Você acha que seria possível produzir um anticorpo contra outro anticorpo? Explique sua resposta.

8-7 Distinga velocidade de sedimentação e equilíbrio de sedimentação. Para que propósito geral cada técnica é utilizada? Qual delas você supõe ser a mais adequada para separar duas proteínas de diferentes tamanhos?

8-8 A tropomiosina, de 93 kd, sedimenta a 2,6 S, enquanto que a proteína de 65 kd, hemoglobina, sedimenta a 4,3 S. (O coeficiente de sedimentação S é uma medida linear da velocidade de sedimentação: ambas aumentam ou diminuem em paralelo.) Essas duas proteínas são mostradas no modelo de esqueleto de α-carbono na **Figura Q8-1**. Como a proteína maior sedimenta mais lentamente do que a menor? Você pode imaginar alguma analogia da experiência diária que pode lhe ajudar com esse problema?

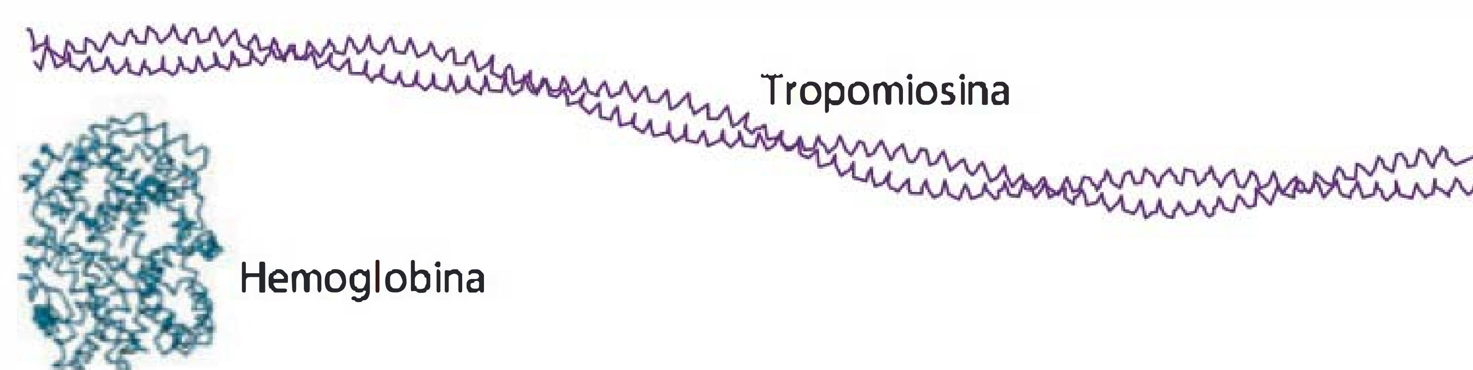


Figura Q8-1 Modelos de esqueleto da tropomiosina e da hemoglobina (Questão 8-8).

8-9 No artigo clássico que demonstra a replicação semiconservativa do DNA, Meselson e Stahl começaram mostrando que o próprio DNA formará uma banda quando submetido a sedimentação por equilíbrio. Eles misturaram DNA de *E. coli* fragmentado aleatoriamente com uma solução de CsCl de modo que a solução final tivesse uma densidade de 1,71 g/mL. Como mostrado na **Figura Q8-2**, com tempos maiores de centrifugação a 70.000 vezes a gravidade, o DNA, que inicialmente estava disperso pelo tubo de centrífuga, tornou-se concentrado com o tempo em uma banda discreta no meio do tubo.

A. Descreva o que está acontecendo com o passar do tempo e explique por que o DNA forma uma banda discreta.

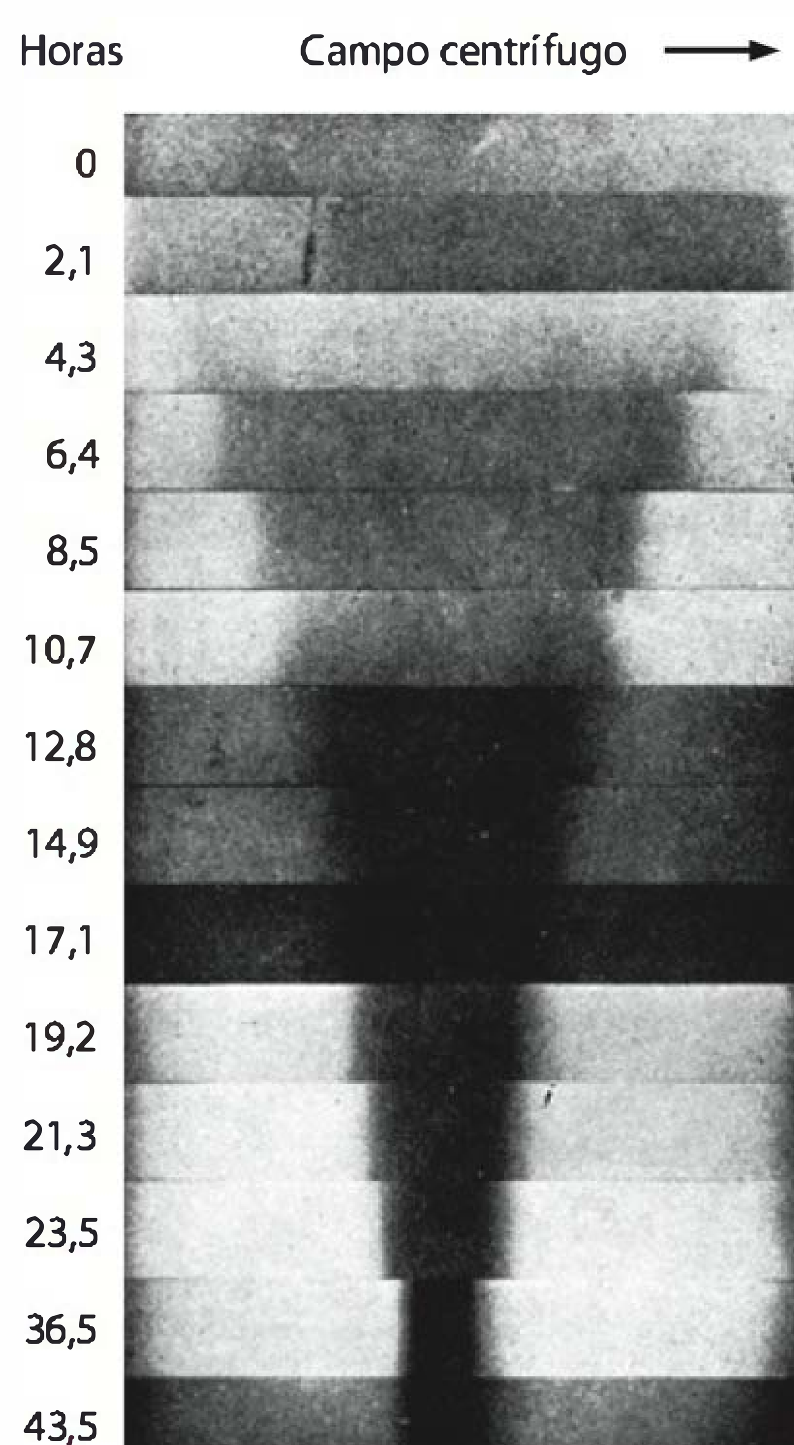


Figura Q8-2 Fotografias por absorção de ultravioleta mostrando os estágios sucessivos nas bandas do DNA de *E. coli* (Questão 8-9). O DNA, que absorve luz UV, aparece como uma *região escura* nas fotografias. O fundo do tubo de centrífuga está à *direita*. (De M. Meselson e F. W. Stahl, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 44:671-682, 1958. Com permissão da National Academy of Sciences.)

B. Qual é a densidade de flutuação do DNA? (A densidade da solução na qual o DNA "flutua" em equilíbrio define a "densidade de flutuação" do DNA.)

C. Mesmo que o DNA seja centrifugado duas vezes – ou mesmo mais – a largura da banda permanece próxima a como ela aparece na parte de baixo da **Figura Q8-2**. Por que a banda não aparece mais delgada? Sugira algumas possíveis razões para explicar a espessura da banda de DNA em equilíbrio.

8-10 A tecnologia do hibridoma permite que se gerem anticorpos monoclonais para praticamente qualquer proteína. Por que então a técnica de proteínas marcadoras com epítopos é tão comumente utilizada, especialmente uma vez que um epítopo marcador tem o potencial de interferir com a função da proteína?

8-11 Quantas cópias de uma proteína precisam estar presentes em uma célula para que sejam visíveis como uma banda no gel? Assuma que você pode aplicar 100 μg de extrato celular em um gel e que você pode detectar 10 ng em uma única banda por coloração de prata. A concentração de uma proteína nas células é de cerca de 200 mg/mL, e uma célula de mamífero típica tem um volume de cerca de 1.000 μm^3 e uma bactéria típica de cerca de 1 μm^3. Dados esses parâmetros, calcule o número de cópias de uma proteína de 120 kd que precisaria estar presente em uma célula de mamífero e em uma bactéria para que produza uma banda detectável no gel. Você pode tentar um palpite de ordem de magnitude antes de começar a calcular.

8-12 Você quer amplificar o DNA entre as duas extensões de sequências mostradas na **Figura Q8-3**. Escolha o par de iniciadores, a partir da lista, que permitisse a você amplificar o DNA por PCR.

DNA a ser amplificado

5′-GACCTGTGGAAGC ———————— CATACGGGATTGA-3′
3′-CTGGACACCTTCG ———————— GTATGCCCTAACT-5′

Iniciadores

(1) 5′-GACCTGTCCAAGC-3′	(5) 5′-CATACGGGATTGA-3′
(2) 5′-CTGGACACCTTCG-3′	(6) 5′-GTATGCCCTAACT-3′
(3) 5′-CGAAGGTGTCCAG-3′	(7) 5′-TGTTAGGGCATAC-3′
(4) 5′-GCTTCCACAGGTC-3′	(8) 5′-TCAATCCCGTATG-3′

Figura Q8-3 DNA a ser amplificado e iniciadores em potencial. (Questão 8-12).

8-13 No primeiro ciclo de PCR utilizando DNA genômico, os iniciadores de DNA começam a síntese, que só termina quando o ciclo acabar (ou quando uma extremidae aleatória de DNA é encontrada). Agora, no final de 20 a 30 ciclos – uma amplificação típica – o único produto visível é definido precisamente pelas extremidades dos iniciadores de DNA. Em quais ciclos é gerado um fragmento de fita dupla com o tamanho correto?

8-14 Explique a diferença entre uma mutação de ganho de função e uma mutação negativa dominante. Por que esses dois tipos de mutação normalmente são dominantes?

8-15 Discuta a seguinte afirmação: "Não teríamos ideia hoje da importância da insulina como hormônio regulador se a sua ausência não estivesse associada à doença humana diabete. Foram as consequências dramáticas da sua ausência que deram enfoque nos esforços iniciais de identificação da insulina e do estudo do seu papel normal na fisiologia".

REFERÊNCIAS

Gerais

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al (eds) (2002) Short Protocols in Molecular Biology, 5th ed. New York: Wiley.

Brown TA (2002) Genomes 2, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.

Spector DL, Goldman RD & Leinwand LA (eds) (1998) *Cells:* A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson JD, Caudy AA, Myers RM & Witkowski JA (2007) Recombinant DNA: Genes and Genomes—A Short Course, 3rd ed. New York: WH Freeman.

Isolamento de células e seu crescimento em cultura

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD et al (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274:998–1001.

Ham RG (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 53:288–293.

Harlow E & Lane D (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Herzenberg LA, Sweet RG & Herzenberg LA (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234:108–116.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor thirty-five years later. *Science* 237:1154–1162.

Lerou PH & Daley GQ (2005) Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19:321–31.

Milstein C (1980) Monoclonal antibodies. *Sci Am* 243:66–74.

Purificação de proteínas

de Duve C & Beaufay H (1981) A short history of tissue fractionation. *J Cell Biol* 91:293s–299s.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H et al (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440:637–43.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Nirenberg MW & Matthaei JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* on naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci. USA* 47:1588–1602.

O'Farrell PH (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007–4021.

Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347–358.

Scopes RK & Cantor CR (1994) Protein Purification: Principles and Practice, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

Análise de proteínas

Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340:245–246.

Giepmans BN, Adams SR et al (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312:217–24.

Kendrew JC (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci Am* 205:96–111.

Knight ZA & Shokat KM (2007) Chemical genetics: Where genetics and pharmacology meet. *Cell* 128:425–30.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B et al (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnol* 17:1030–1032.

Washburn MP, Wolters D and Yates JR (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnol* 19:242–7.

Wuthrich K (1989) Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45–50.

Análise e manipulação de DNA

Adams MD, Celniker SE, Holt RA et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.

Alwine JC, Kemp DJ & Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5350–5354.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA et al (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1474.

Cohen S, Chang A, Boyer H & Helling R (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3240–3244.

International Human Genome Sequencing Consortium (2000) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

International Human Genome Sequencing Consortium (2006) The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Nature* 440:1194–1198.

Jackson D, Symons R & Berg P (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2904–2909.

Maniatis T et al (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15:687–701.

Mullis KB (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56–61.

Nathans D & Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu Rev Biochem* 44:273–93.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.

Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467.

Smith M (1994) Nobel lecture. Synthetic DNA and biology. *Biosci Rep* 14:51–66.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503–517.

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.

Venter JC, Adams MA, Myers EW et al (2000) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.

Estudo da expressão e da função dos genes

Boone C, Bussey H & Andrews BJ (2007) Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nature Rev Genet* 8:437–449.

Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

DeRisi JL, Iyer VR & Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686.

International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–320.

Lockhart DJ & Winzeler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405:827–836.

Mello CC & Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338–342.

Nusslein-Volhard C & Weischaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.

Palmiter RD & Brinster RL (1985) Transgenic mice. *Cell* 41:343–345.

Rubin GM & Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348–353.

Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B et al (2006) Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312:1614–1620.

Weigel D & Glazebrook J (2001) *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Visualização de Células

9

Como as células são pequenas e complexas, é difícil ver sua estrutura, descobrir sua composição molecular e, ainda mais difícil, descobrir como seus vários componentes funcionam. As ferramentas a nossa disposição determinam o que podemos aprender sobre as células, e a introdução de novas técnicas frequentemente tem resultado em maiores avanços na biologia celular. Para compreender a biologia celular contemporânea, é necessário conhecer parte de seus métodos.

Neste capítulo, serão revistos brevemente alguns dos principais métodos em microscopia utilizados para estudar as células. O entendimento da organização estrutural das células é um pré-requisito essencial para o entendimento de como as células funcionam. A microscopia óptica será nosso ponto de partida, pois a biologia celular iniciou com o microscópio óptico e ele continua sendo uma ferramenta essencial. Nos anos recentes, a microscopia óptica tornou-se cada vez mais importante, em grande parte devido ao desenvolvimento de métodos para a marcação específica e a obtenção de imagens dos constituintes celulares individuais, assim como a reconstrução da sua arquitetura tridimensional. Uma importante vantagem da microscopia óptica é que a luz é relativamente não-destrutiva. Pela marcação dos componentes celulares específicos com sondas fluorescentes, como proteínas intrinsecamente fluorescentes, podemos observar o movimento, a dinâmica e as interações nas células vivas. Se utilizarmos um feixe de elétrons, a microscopia eletrônica pode obter imagens de complexos moleculares dentro das células a uma resolução quase atômica e em três dimensões.

Embora a microscopia óptica e a microscopia eletrônica sejam métodos importantes, é o que esses métodos permitiram aos cientistas descobrir sobre a arquitetura estrutural da célula que os tornaram tão interessantes. Utilize esse capítulo como referência e leia-o juntamente aos capítulos seguintes do livro, ao invés de vê-lo como uma introdução a eles.

Neste capítulo

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS AO MICROSCÓPIO ÓPTICO 579

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS E MOLÉCULAS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO 604

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS AO MICROSCÓPIO ÓPTICO

Uma célula animal típica tem de 10 a 20 μm de diâmetro, cerca de um quinto do tamanho da menor partícula visível a olho nu. Somente depois que bons microscópios ópticos tornaram-se disponíveis no início do século XIX, Schleiden e Schwann propuseram que todos os tecidos vegetais e animais são agregados de células individuais. A sua descoberta em 1838, conhecida como **doutrina celular,** marca o nascimento formal da biologia celular.

As células animais não são apenas minúsculas, mas também incolores e transparentes. Consequentemente, a descoberta das suas principais características internas dependeu do desenvolvimento, no final do século XIX, de uma grande variedade de corantes que fornecessem contraste suficiente para tornar essas características visíveis. Similarmente, a introdução do microscópio eletrônico, cada vez mais potente, no início da década de 1940, necessitou do desenvolvimento de novas técnicas para preservar e corar células, antes que a total complexidade da sua delicada estrutura interna pudesse começar a emergir. Até hoje, a microscopia depende tanto das técnicas para preparar a amostra como do desempenho do próprio microscópio. Portanto, nas discussões que seguem, consideraremos tanto os instrumentos como a preparação da amostra, começando com o microscópio óptico.

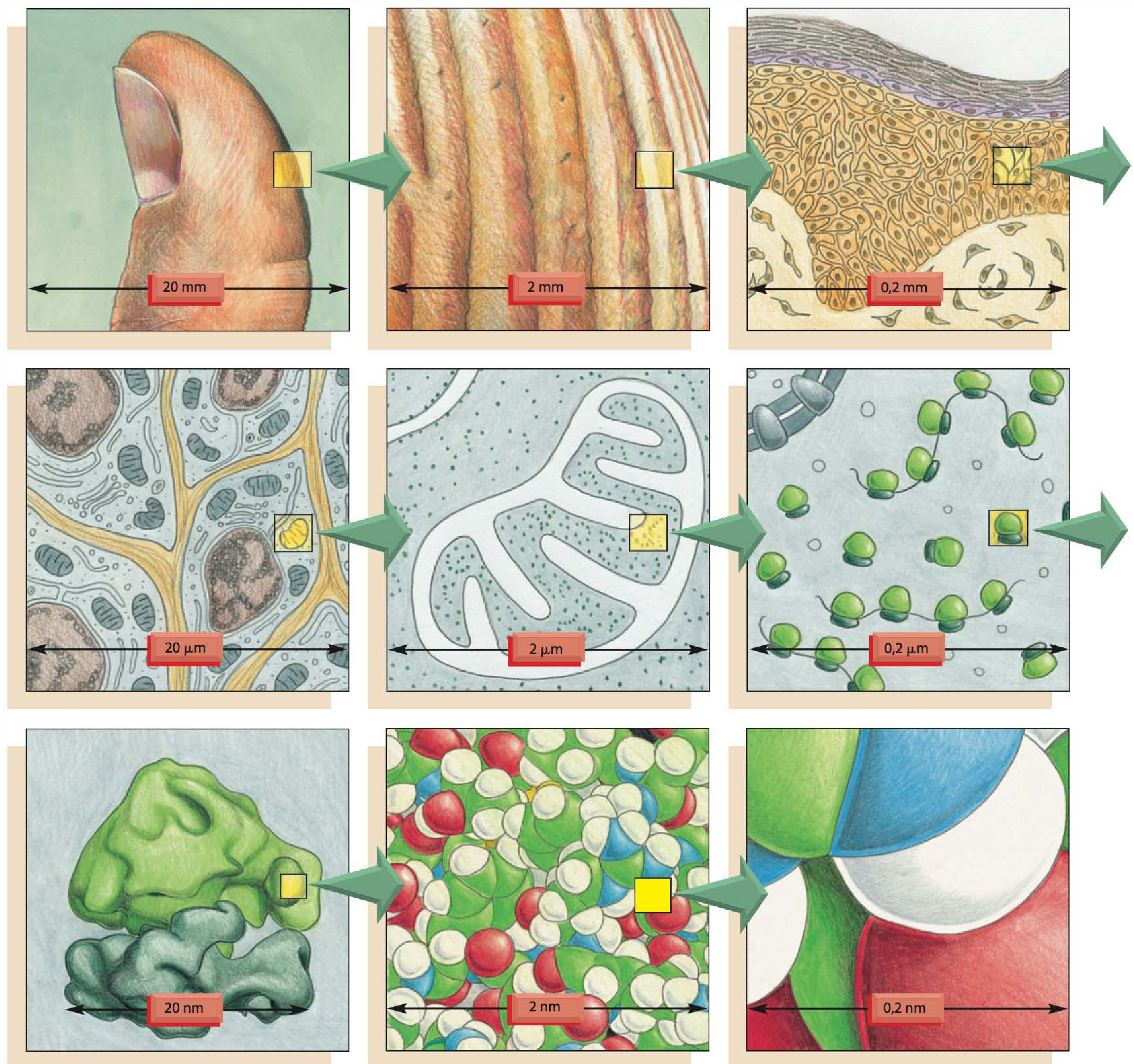


Figura 9-1 Um sentido de escala entre células vivas e átomos. Cada diagrama mostra uma imagem aumentada por um fator de 10 em uma progressão imaginária a partir de um dedo polegar, então células da pele, passando por um ribossomo, até um grupo de átomos, que formam parte de uma das várias moléculas de proteína em nosso corpo. Os detalhes atômicos das macromoléculas, como mostrado nos dois últimos quadros, normalmente estão além do poder do microscópio eletrônico.

A série de imagens na **Figura 9-1** ilustra uma progressão imaginária a partir de um polegar até um grupo de átomos. Cada imagem sucessiva representa um aumento de 10 vezes na magnitude. O olho nu poderia ver características nos dois primeiros quadros, a resolução do microscópio óptico estenderia até o quarto quadro, e o microscópio eletrônico até o sétimo e o oitavo quadro. A **Figura 9-2** mostra os tamanhos de várias estruturas celulares e subcelulares e as variações de tamanho que diferentes tipos de microscópios podem visualizar.

O microscópio óptico pode resolver detalhes com distâncias de 0,2 μm

Uma limitação fundamental de todos os microscópios é que um certo tipo de radiação não pode ser utilizado para examinar detalhes estruturais muito menores do que o seu próprio comprimento de onda. O limite fundamental para a resolução de um microscópio óptico é, portanto, estabelecido pelo comprimento de onda de luz visível, que varia de cerca de 0,4

μm (para violeta) até 0,7 μm (para vermelho-escuro). Em termos práticos, as bactérias e as mitocôndrias, que têm cerca de 500 nm (0,5 μm) de largura, geralmente são os menores objetos dos quais o formato pode ser claramente discernido ao **microscópio óptico**; detalhes menores do que esses são ocultados pelos efeitos resultantes da natureza da onda da luz. Para entender por que isso ocorre, devemos seguir o caminho de um feixe de ondas de luz, quando ele passa através das lentes de um microscópio (**Figura 9-3**).

Devido à natureza de sua onda, a luz não segue exatamente a trajetória idealizada de um raio ininterrupto prevista pela óptica geométrica. Ao invés disso, as ondas de luz viajam por um sistema óptico por várias rotas levemente diferentes, de maneira que interferem umas com as outras e causam efeitos de *difração óptica*. Se dois feixes de ondas, alcançando o mesmo ponto por caminhos diferentes, estão precisamente *em fase*, com crista pareada com crista e depressão com depressão, elas intensificarão umas às outras, de maneira a aumentar a luminosidade. Por outro lado, se as sucessões de ondas estão *fora de fase*, elas irão interferir entre si de forma a se cancelarem parcial ou completamente (**Figura 9-4**). A interação da luz com um objeto modifica a relação de fase das ondas de luz, produzindo efeitos complexos de interferência. Em grande aumento, por exemplo, a sombra de uma borda reta que esteja uniformemente iluminada com luz de comprimento de onda uniforme aparece como um conjunto de linhas paralelas (**Figura 9-5**), enquanto que a borda de um círculo aparece como um conjunto de anéis concêntricos. Pela mesma razão, um único ponto visto por meio de um microscópio aparece como um disco borrado, e dois pontos próximos dão origem a imagens sobrepostas que podem se fundir em uma. Nenhum aperfeiçoamento das lentes pode superar essa limitação imposta pela própria natureza da onda da luz.

O limite de separação pelo qual dois objetos ainda podem ser vistos como distintos – o assim chamado **limite de resolução** – depende tanto do comprimento de onda da luz quanto da *abertura numérica* do sistema de lentes utilizado. Este último número é uma medida da largura da abertura do microscópio, graduada de acordo com sua distância a partir do objeto; quanto maior a abertura do microscópio, mais claramente o objeto pode ser visualizado (**Figura 9-6**). Nas melhores condições, com luz violeta (comprimento de onda = 0,4 μm) e uma abertura numérica de 1,4, o microscópio óptico pode alcançar, teoricamente, um limite de resolução logo abaixo de 0,2 μm. Essa resolução foi alcançada por fabricantes de microscópios no final do século XIX e raramente é equiparada nas indústrias contempo-

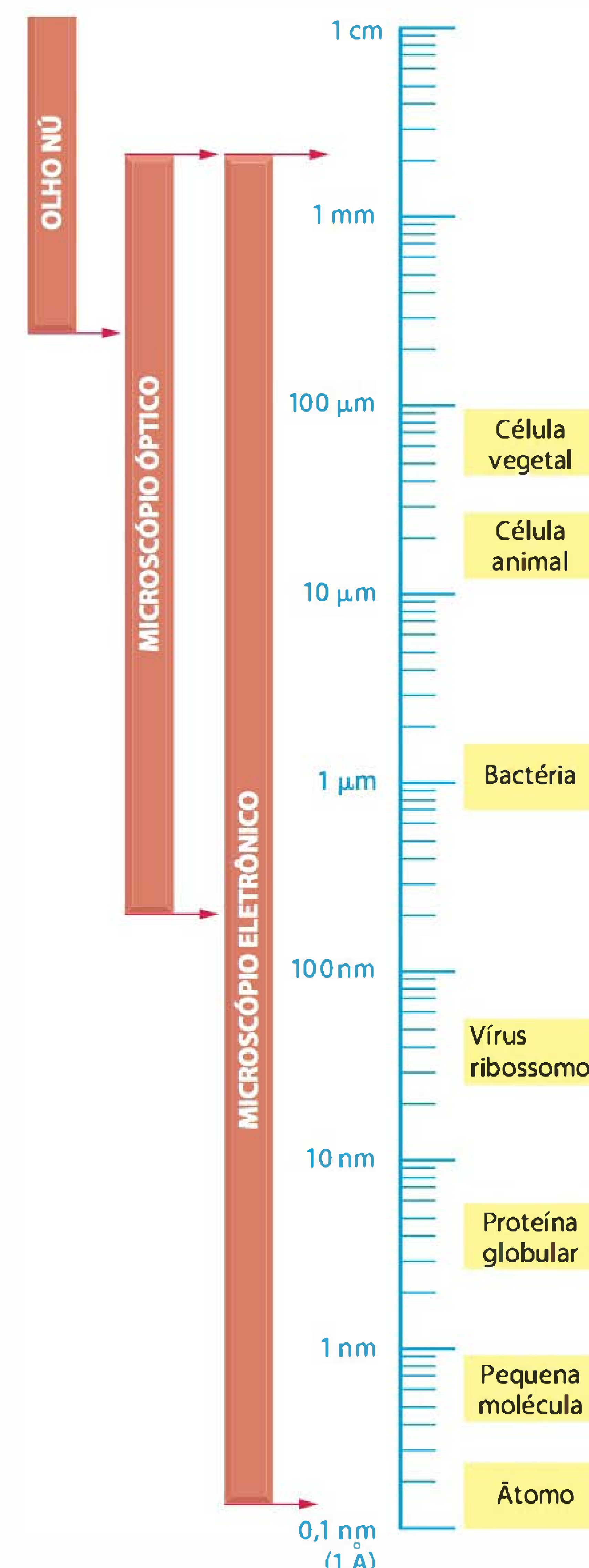


Figura 9-2 Poder de resolução. Os tamanhos das células e de seus componentes estão desenhados em uma escala logarítmica, indicando a amplitude de objetos que podem ser prontamente resolvidos a olho nu e nos microscópios ópticos e eletrônicos. As seguintes unidades de comprimento frequentemente são utilizadas na microscopia:
μm (micrômetro) = 10^{-6} m
nm (nanômetro) = 10^{-9} m
Å (unidade Ångström) = 10^{-10} m

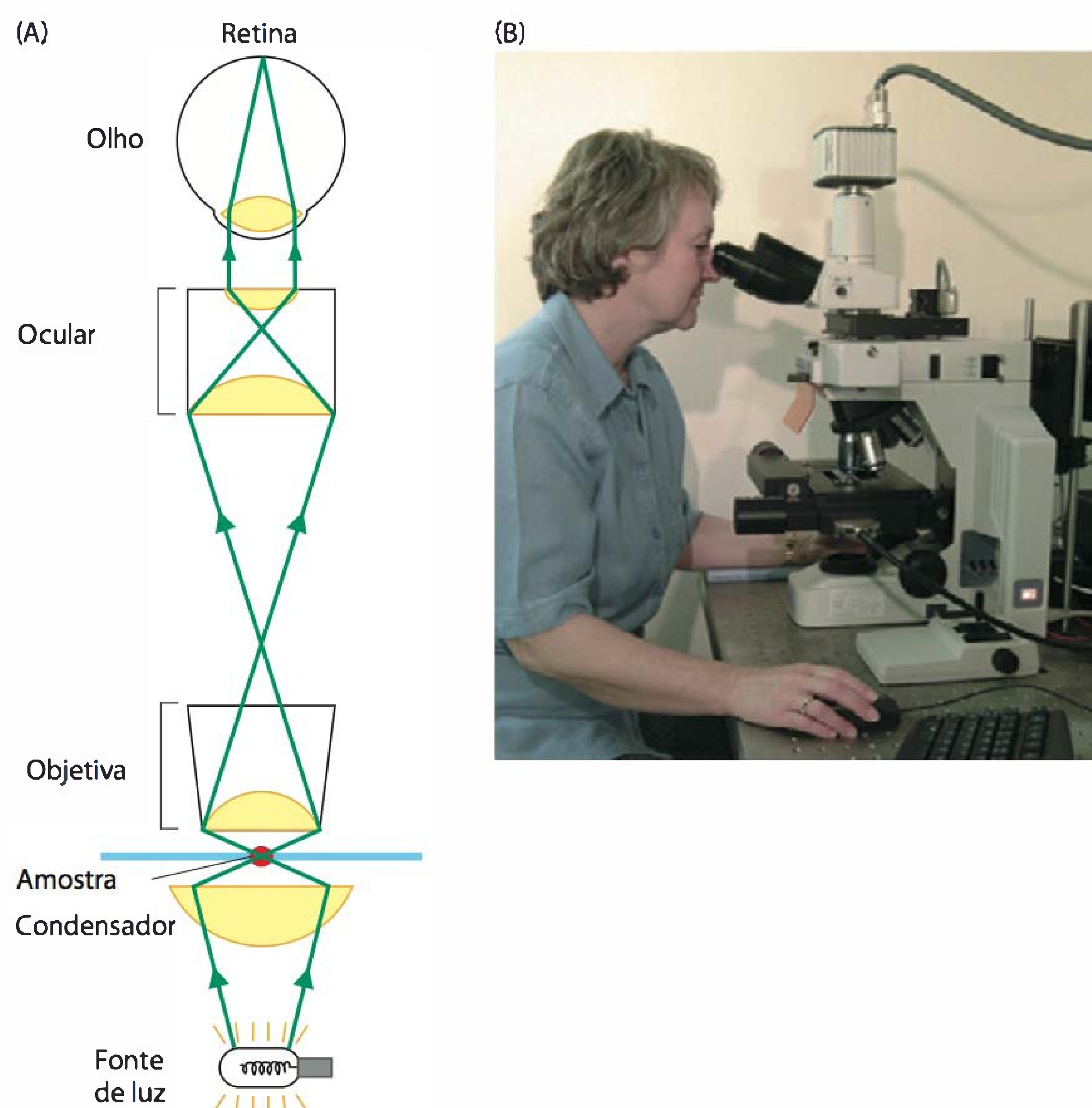


Figura 9-3 Microscópio óptico. (A) Diagrama mostrando o caminho da luz em um microscópio composto. A luz é focalizada na amostra pelas lentes no condensador. Uma combinação de lentes objetivas e de lentes oculares é arranjada para focar, no olho, uma imagem da amostra iluminada. (B) Um microscópio óptico moderno para pesquisa. (B, cortesia de Andrew Davies.)

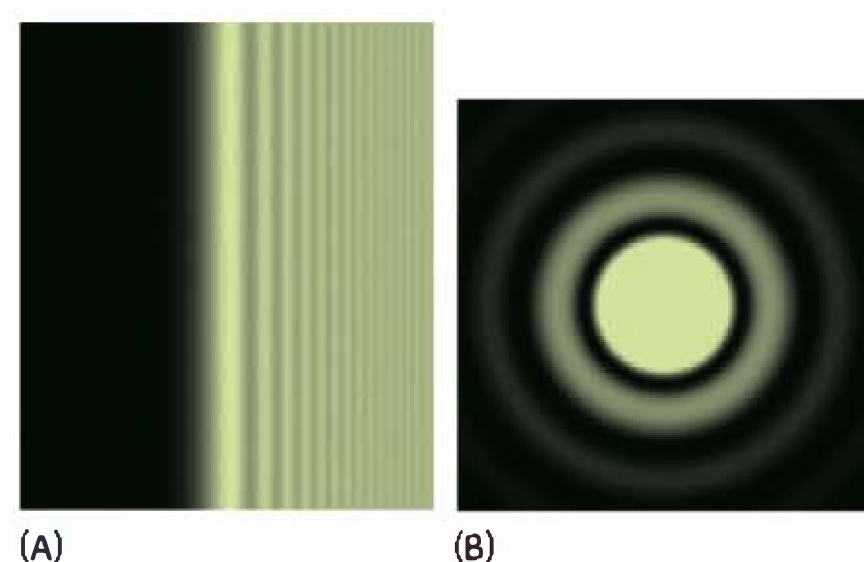


Figura 9-5 Efeitos da borda e de um ponto de luz. (A) Os efeitos de interferência, ou bandas claras e escuras, observados em grande aumento, quando a luz de um determinado comprimento de onda passa pela borda de um objeto sólido colocado entre a fonte de luz e o observador. (B) A imagem de um ponto fonte de luz. A difração se espalha na forma de um complexo-padrão circular cuja largura depende da abertura numérica do sistema óptico: quanto menor a abertura, maior (mais borrada) é a imagem difratada. Dois pontos podem ser resolvidos quando o centro da imagem de um estiver localizado no primeiro anel escuro na imagem do outro: isso define o limite da resolução.

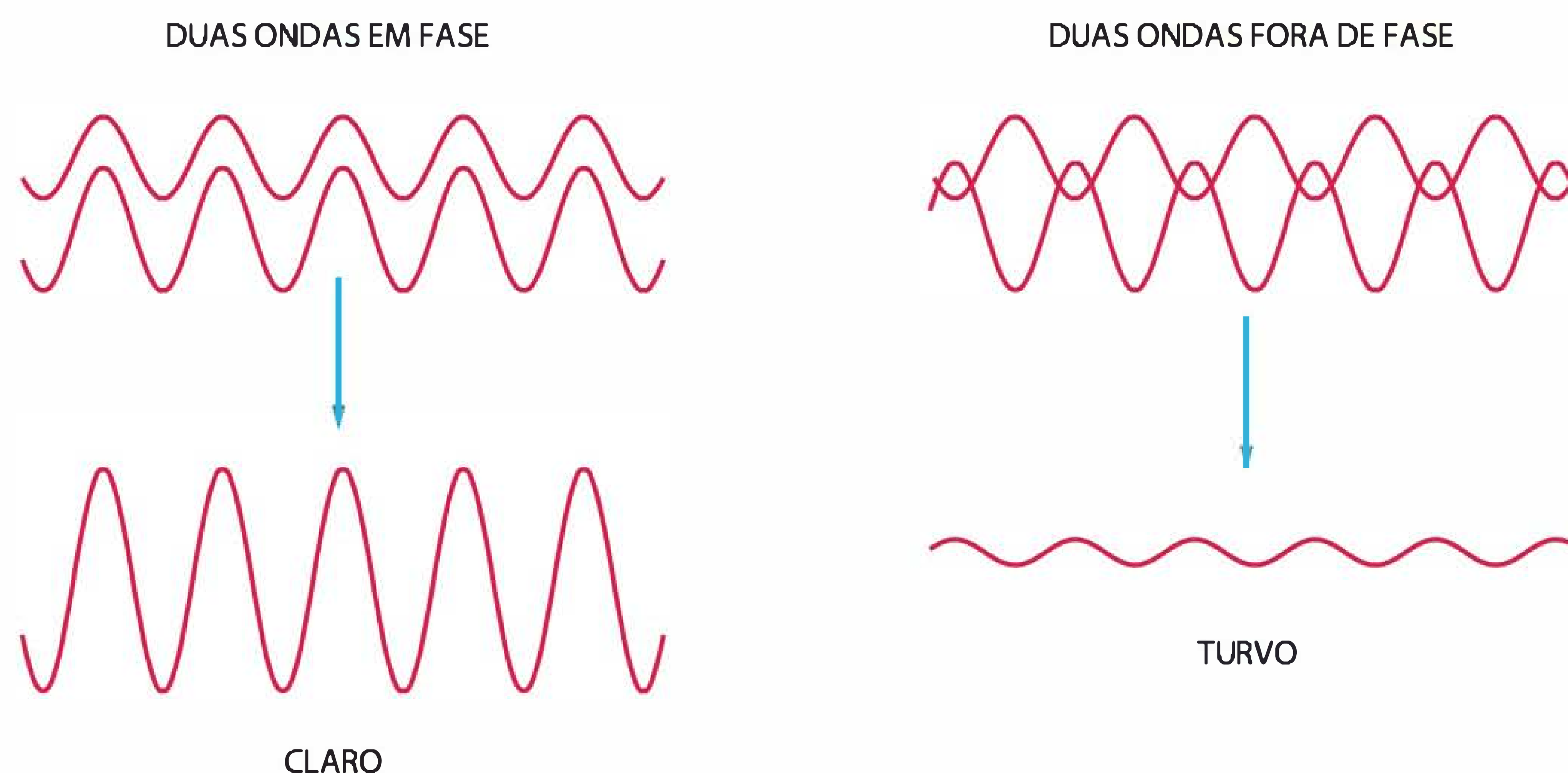


Figura 9-4 Interferência entre ondas de luz. Quando duas ondas de luz se combinam em fase, a amplitude da onda resultante é maior, e a luminosidade é aumentada. Duas ondas de luz que estão fora de fase anulam-se parcialmente e produzem uma onda cuja amplitude, e portanto a luminosidade, está reduzida.

râneas de microscópios. Embora seja possível *aumentar* uma imagem o quanto quisermos – por exemplo, por sua projeção em uma tela – jamais será possível distinguir dois objetos ao microscópio óptico que estão separados por menos de 0,2 μm; eles aparecerão como um único objeto. Observe a diferença entre *resolução*, discutida anteriormente, e *detecção*. Se um pequeno objeto, abaixo do limite de resolução, emite luz própria, então ainda seremos capazes de vê-lo ou detectá-lo. Desse modo, podemos visualizar um único microtúbulo marcado fluorescentemente mesmo que ele seja cerca de dez vezes mais fino do que a resolução limite do microscópio óptico. Entretanto, efeitos de difração farão com que ele apareça borrado e com no mínimo 0,2 μm de espessura (ver Figura 9-17). Por causa da luz intensa que elas emitem, podemos detectar ou ver as estrelas no céu à noite, mesmo elas estando muito abaixo da resolução angular dos nossos olhos sem auxílio. Elas todas aparecem como pontos similares de luz, diferenciando-se apenas por sua cor ou luminosidade. Pelo uso de métodos sensíveis, podemos detectar e seguir o comportamento de até mesmo uma única molécula proteica fluorescente com um microscópio óptico.

Em seguida, veremos como a interferência e a difração podem ser exploradas para estudar células vivas não-coradas.

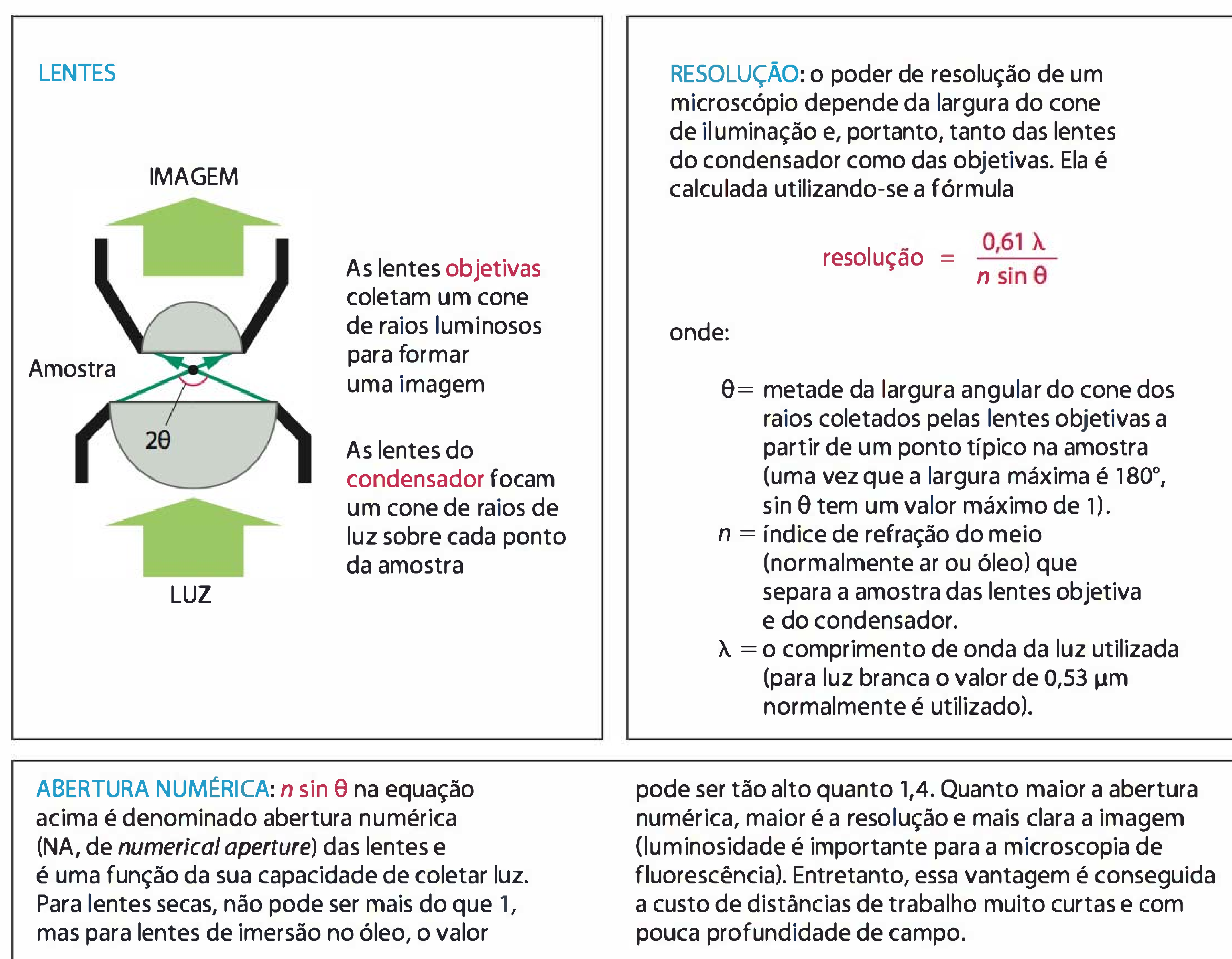


Figura 9-6 Abertura numérica. A trajetória dos raios de luz passando através de uma amostra transparente em um microscópio ilustra o conceito de abertura numérica e sua relação com o limite de resolução.

As células vivas são vistas claramente em um microscópio de contraste de fase ou em um microscópio de contraste de interferência diferencial

Microscopistas estão sempre sendo desafiados pela possibilidade de que alguns componentes da célula sejam perdidos ou alterados durante a preparação da amostra. A única maneira correta de evitar o problema é examinar as células enquanto estão vivas, sem fixá-las ou congelá-las. Para esse propósito, os microscópios ópticos com sistemas ópticos especiais são especialmente úteis.

Quando a luz atravessa uma célula viva, a fase da onda de luz é alterada de acordo com o índice de refração da célula: uma parte relativamente espessa ou densa da célula, como um núcleo, retarda a luz que passa através dela. Consequentemente, a fase da luz é deslocada com relação à luz que passou através de uma região adjacente mais delgada do citoplasma. O **microscópio de contraste de fase** e, de uma maneira mais complexa, o **microscópio de contraste de interferência diferencial** exploram os efeitos de interferência produzidos quando esses dois conjuntos de ondas se recombinam, criando uma imagem da estrutura da célula (**Figura 9-7**). Ambos os tipos de microscopia óptica são amplamente utilizados para visualizar células vivas.

Uma maneira mais simples de visualizar algumas dessas características de uma célula viva é observar a luz que é espalhada por seus vários componentes. No **microscópio de campo escuro,** os raios de luz que iluminam são direcionados pela lateral, de forma que somente a luz difundida passa pelas lentes do microscópio. Como decorrência, a célula aparece como um objeto iluminado contra o fundo escuro. Com um **microscópio** normal **de campo claro**, a luz que passa através de uma célula em cultura forma a imagem diretamente. A **Figura 9-8** compara imagens da mesma célula obtidas por quatro tipos de microscópios ópticos.

As microscopias de contraste de fase, de contraste de interferência diferencial e de campo escuro tornaram possível visualizar os movimentos envolvidos em processos como a mitose e a migração celular. Como vários movimentos celulares são muito lentos para serem vistos em tempo real, é de grande auxílio filmar esses movimentos a intervalos regulares. Aqui uma câmera grava quadros sucessivos separados por um curto intervalo de tempo, de maneira que, quando a série de fotos resultante é reproduzida em velocidade normal, os eventos parecem ser mais rápidos.

As imagens podem ser intensificadas e analisadas por técnicas digitais

Recentemente, os sistemas eletrônicos, ou digitais, de imagem e a tecnologia de **processamento de imagens** associada tiveram um maior impacto na microscopia óptica. Algumas limitações práticas dos microscópios, relacionadas a imperfeições do sistema óptico, foram em grande parte superadas. Os sistemas de imagem eletrônica também contornaram duas limitações fundamentais do olho humano: o olho não pode ver bem com luminosidade muito diminuída e não pode perceber pequenas diferenças de intensidade de luz contra um

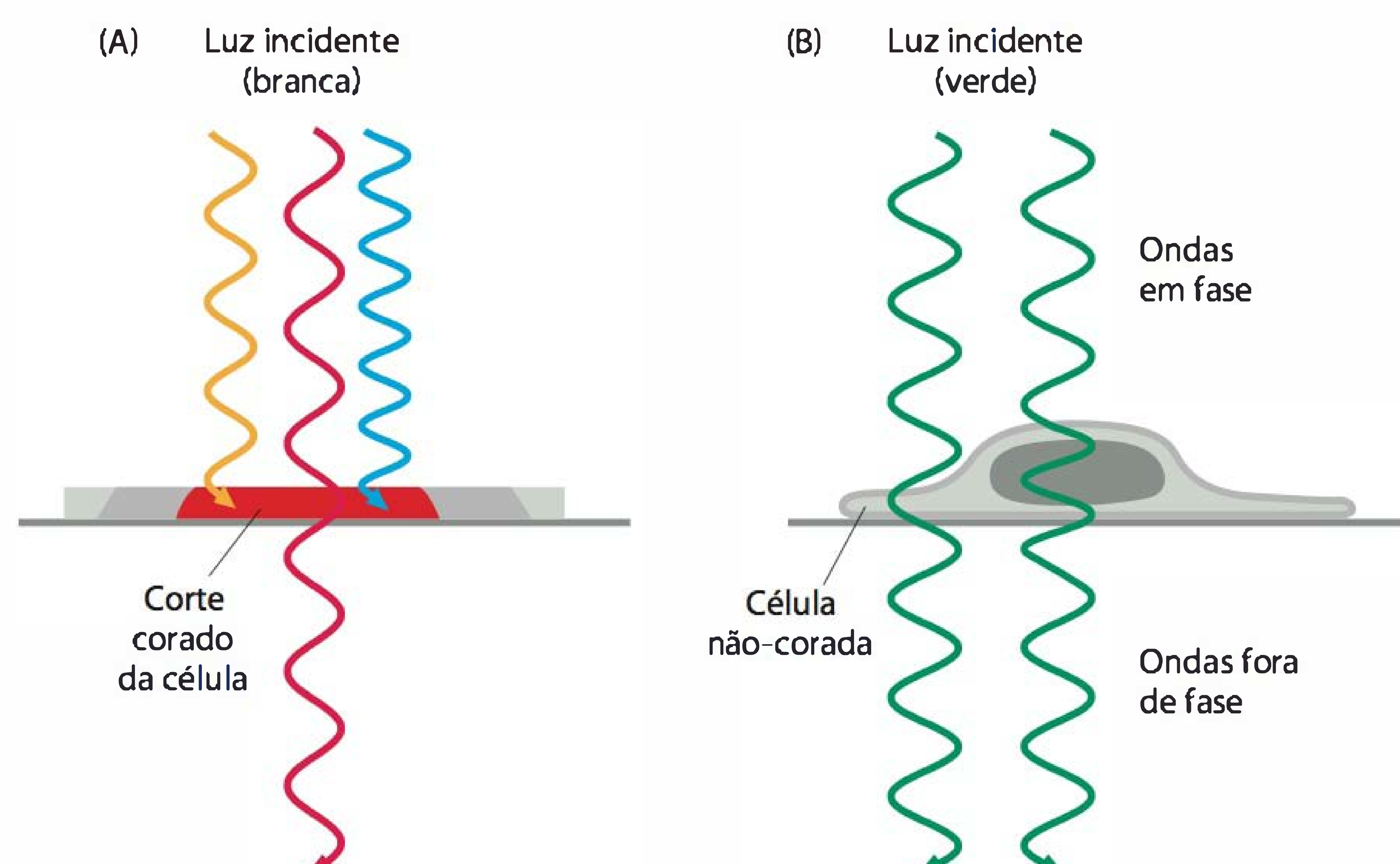


Figura 9-7 Duas maneiras de obtenção de contraste em microscopia óptica. (A) A parte corada da célula absorverá luz de alguns comprimentos de onda, que dependem do corante, mas permitirá que outros comprimentos de onda passem por ela. Assim, uma imagem colorida da célula é obtida, a qual é visível no microscópio óptico normal de campo claro. (B) A luz que passa através da célula viva não-corada sofre poucas modificações na amplitude, e os detalhes estruturais não podem ser vistos, mesmo que a imagem seja muito aumentada. Entretanto, a fase da luz é alterada por sua passagem através das partes mais espessas ou mais densas da célula, e pequenas diferenças de fase podem se tornar visíveis explorando-se os efeitos de interferência com o uso de um microscópio de contraste de fase ou de contraste de interferência diferencial.

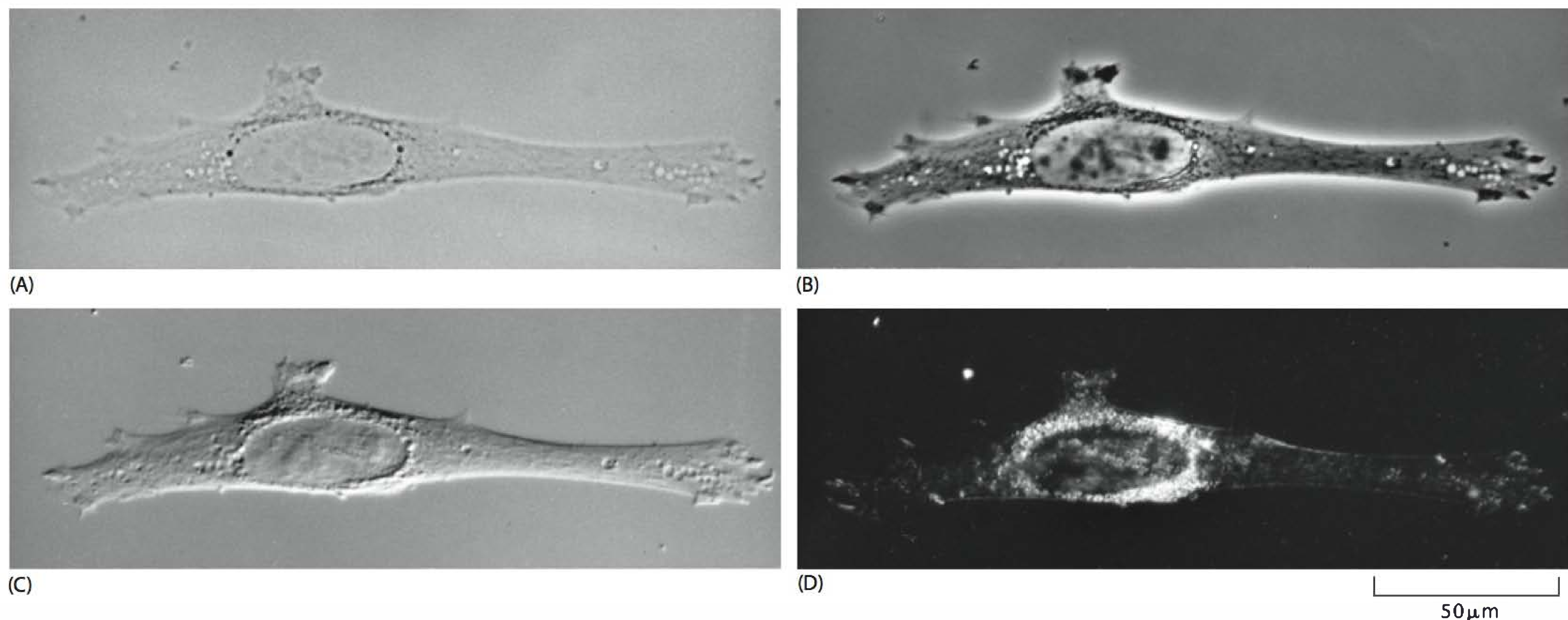


Figura 9-8 Quatro tipos de microscopia óptica. Quatro imagens da mesma célula de fibroblasto em cultura são mostradas. Todas as imagens podem ser obtidas com os mais modernos microscópios pela troca dos componentes ópticos. (A) Microscopia de campo claro. (B) Microscopia de contraste de fase. (C) Microscopia de contraste de interferência diferencial de Nomarski. (D) Microscopia de campo escuro.

fundo luminoso. Para aumentar nossa capacidade de observar células em condições de baixa luminosidade, podemos acoplar uma câmara digital sensível a um microscópio. Essas câmaras contêm um dispositivo de carga acoplado (CCD, *charge-coupled device*), similar àqueles encontrados em câmaras digitais comuns. Tais câmaras CCD frequentemente são resfriadas para reduzir o ruído da imagem. Então, é possível observar as células por longos períodos a níveis muito baixos de luminosidade, evitando assim os efeitos danosos da luz intensa prolongada (e de calor). Tais câmaras de luz baixa são especialmente importantes para visualizar moléculas fluorescentes nas células vivas, como explicado a seguir.

Como as imagens produzidas por câmaras CCD estão na forma eletrônica, elas podem ser prontamente digitalizadas, transferidas para um computador e processadas de várias maneiras para extrair a informação latente. Tal processamento de imagem torna possível compensar vários defeitos de óptica dos microscópios para alcançar o limite teórico de resolução. Além disso, no processamento da imagem digital, o contraste pode ser muito aumentado para superar as limitações dos olhos em detectar pequenas diferenças na intensidade da luz. Embora esse processamento também aumente os efeitos de irregularidades aleatórias de fundo do sistema óptico, a subtração digital de uma imagem de uma área vazia do campo remove tais defeitos. Esse procedimento revela pequenos objetos transparentes que antes eram impossíveis de serem distinguidos do fundo.

O alto contraste alcançável por microscopia de contraste de interferência diferencial computadorizada tornou possível visualizar até mesmo objetos muito pequenos como um microtúbulo isolado (**Figura 9-9**), que tem um diâmetro de 0,025 μm, menor do que um décimo do comprimento de onda da luz. Os microtúbulos individuais também podem ser visualizados em um microscópio de fluorescência, se forem marcados fluorescentemente (ver Figura 9-15). Em ambos os casos, entretanto, os efeitos inevitáveis da difração borram muito a imagem, de maneira que os microtúbulos aparecem no mínimo com 0,2 μm de largura, tornando impossível distinguir um único microtúbulo de um feixe de vários microtúbulos.

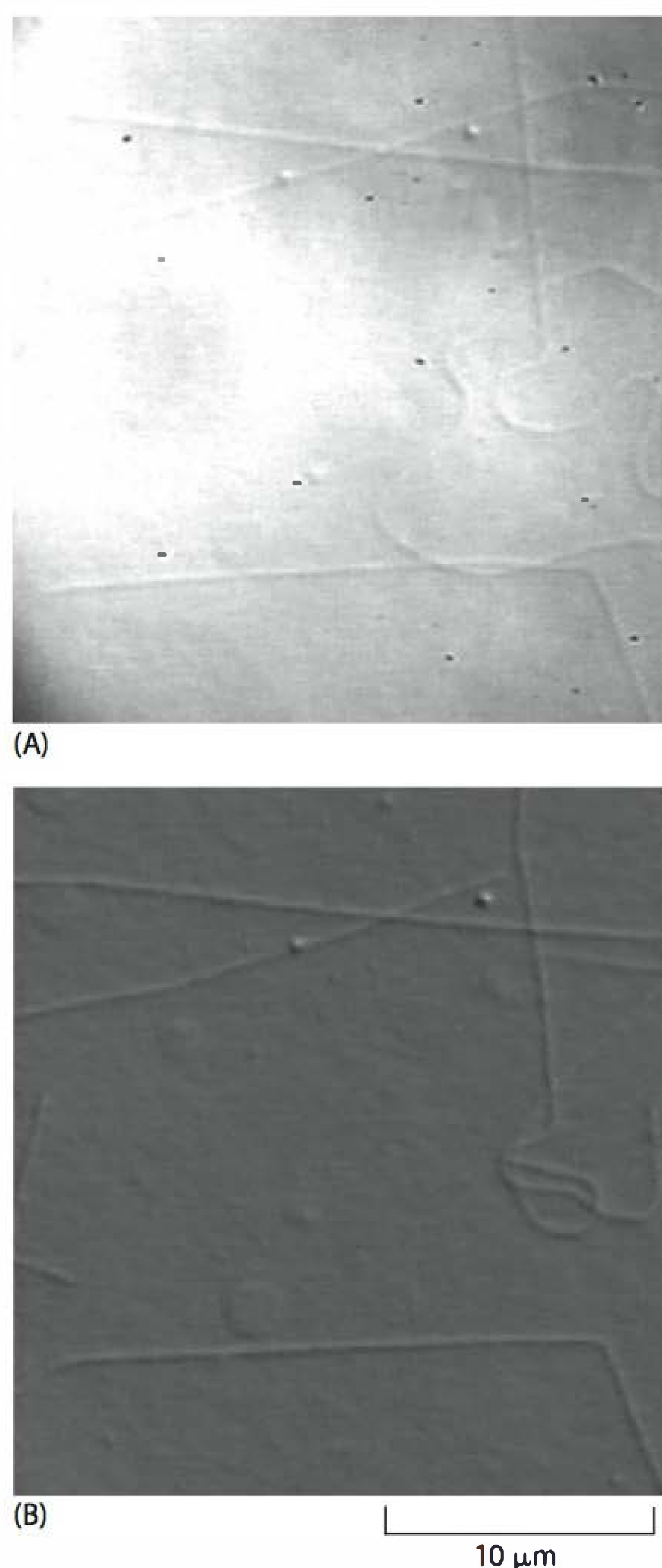


Figura 9-9 Processamento da imagem. (A) Os microtúbulos não-corados são mostrados aqui em uma imagem digital não-processada, capturada utilizando-se microscopia de contraste de interferência diferencial. (B) A imagem foi processada primeiro pela subtração digital do fundo sem uniformidade luminosa e então pelo aumento do contraste digitalmente. O resultado desse processamento de imagem é uma fotografia muito mais fácil de ser interpretada. Note que os microtúbulos são dinâmicos, e alguns modificaram seu comprimento ou sua posição entre as imagens de antes e depois. (Cortesia de Viki Allan.)

Tecidos intactos normalmente são fixados e cortados antes da microscopia

Como a maioria das amostras de tecido é muito espessa para que suas células individuais sejam examinadas diretamente a uma alta resolução, elas precisam ser cortadas em fatias transparentes muito finas, ou *secções*. Primeiro, para imobilizar, matar e preservar as células no tecido elas devem ser tratadas com um *fixador*. Fixadores comuns incluem formaldeído e glutaraldeído, que formam ligações covalentes com os grupos amino livres das proteínas, intercruzando-os de modo que sejam estabilizados e imobilizados na posição.

Como os tecidos geralmente são macios e frágeis, mesmo após a fixação, eles necessitam ser envolvidos em um meio de suporte antes de serem seccionados. Os meios comuns de emblocamento são ceras ou resinas. Na forma líquida, esses meios tanto permeiam como envolvem o tecido fixado; eles então podem ser endurecidos (por resfriamento ou polimerização) para formar um bloco sólido, que pode ser prontamente seccionado com um micrótomo, uma máquina com uma lâmina afiada que funciona como um fatiador de carne (**Figura 9-10**). As secções (normalmente de 1-10 μm de espessura) são estão posicionadas sobre a superfície de uma lâmina de vidro para microscópio.

Existe pouco no conteúdo da maioria das células (que tem 70% do seu peso em água) para impedir a passagem dos feixes de luz. Assim, a maior parte das células em seu estado natural, mesmo se fixadas e seccionadas, é praticamente invisível a um microscópio óptico comum. Existem três abordagens principais para trabalhar com secções finas de tecido que revelam as próprias células ou componentes dentro delas.

Primeiro, e tradicionalmente, as secções podem ser coradas com corantes orgânicos que têm alguma afinidade específica por determinados componentes subcelulares. O corante *hematoxilina*, por exemplo, tem uma afinidade por moléculas carregadas negativamente e por isso revela a distribuição de DNA, RNA e proteínas ácidas em uma célula (**Figura 9-11**). Entretanto, a base química para a especificidade de vários corantes não é conhecida.

Segundo, tecidos seccionados podem ser utilizados para visualizar padrões específicos de expressão gênica diferencial. A hibridização *in situ*, discutida anteriormente (p. 573), revela a distribuição celular e a abundância de moléculas de RNA específicas expressas no material seccionado ou em quantidades inteiras de pequenos organismos ou órgãos (**Figura 9-12**). Um terceiro método, e muito sensível, amplamente utilizado para localizar proteínas de interesse, depende do uso de sondas e marcadores fluorescentes, como explicaremos a seguir.

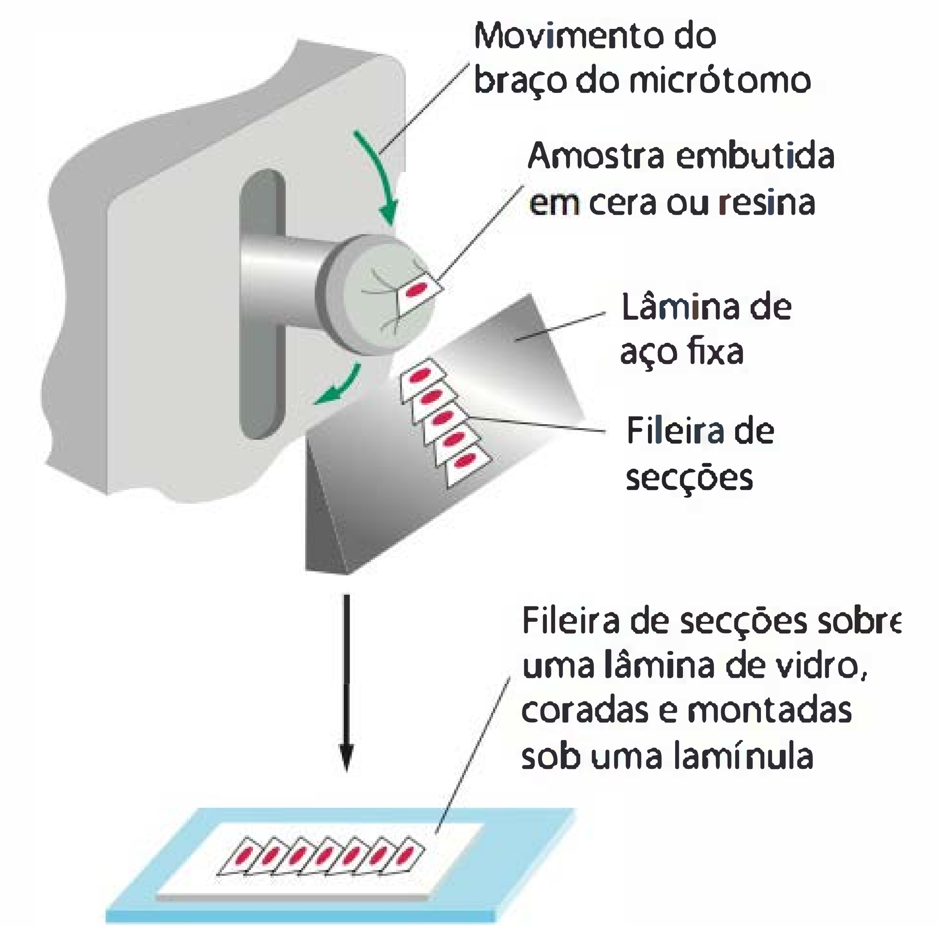


Figura 9-10 Preparação de cortes de tecido. Esta ilustração mostra como um tecido emblocado é seccionado com um micrótomo durante preparação para exame ao microscópio óptico.

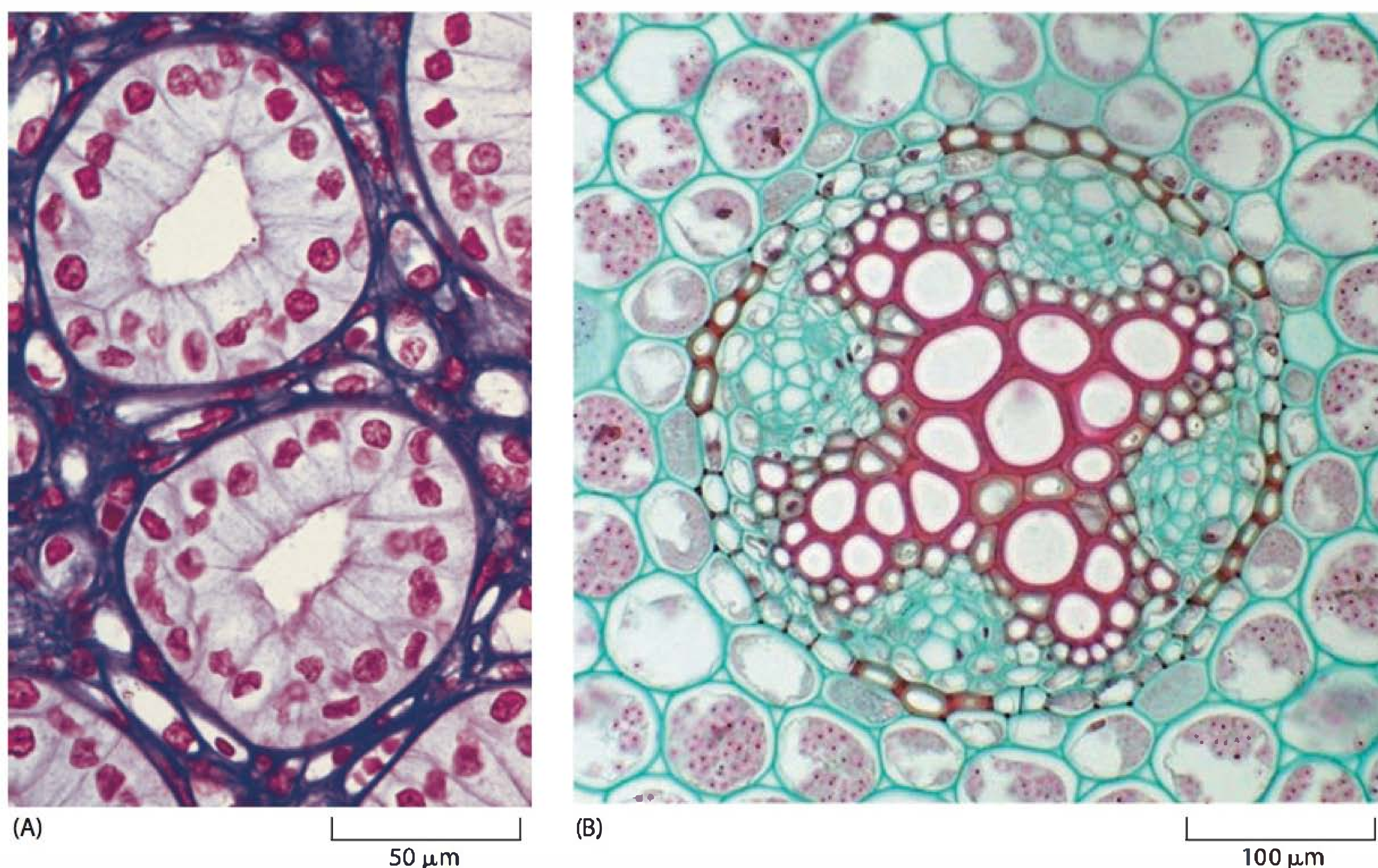


Figura 9-11 Coloração de componentes celulares. (A) Esta secção de células dos ductos coletores de urina dos rins foi corada com uma combinação de corantes, hematoxilina e eosina, comumente utilizados em histologia. Cada ducto é constituído de células rigorosamente compactadas (com os núcleos corados em *vermelho*) que formam um anel. O anel é cercado pela matriz extracelular, corada de *púrpura*. (B) Esta secção de uma raiz de planta jovem é corada com dois corantes, safranina e *fast green*. O *fast green* cora a parede de celulose da célula enquanto a safranina cora as paredes celulares do xilema lignificadas de vermelho-claro. (A, de P. R. Wheater et al., Functional Histology, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1987; B, cortesia de Stephen Grace.)

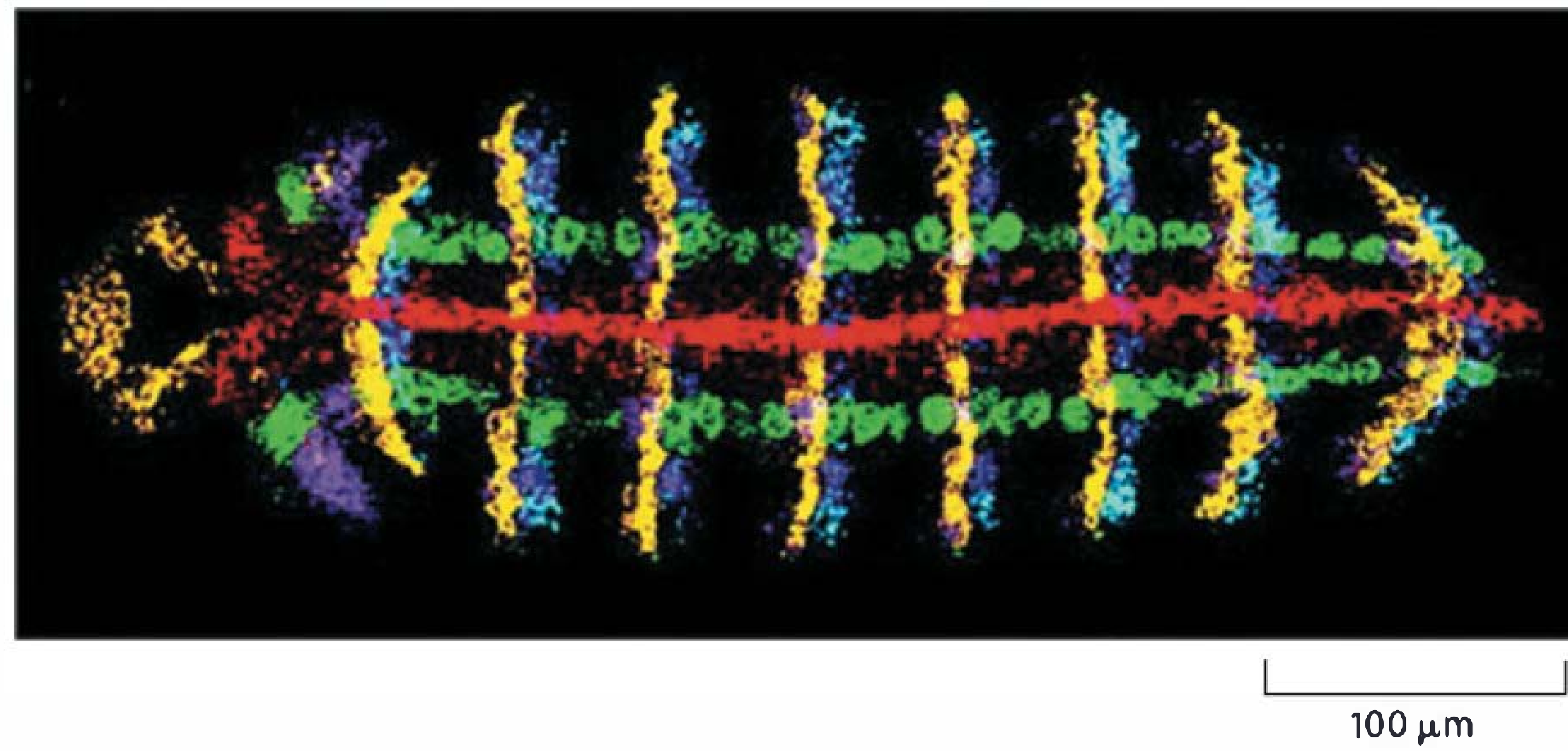


Figura 9-12 Hibridização de RNA *in situ*. Como descrito no capítulo 8 (ver Figura 8-71), é possível visualizar a distribuição de diferentes RNAs em tecidos usando-se a hibridização *in situ*. Aqui, o padrão de transcrição de cinco diferentes genes envolvidos na padronização do embrião jovem de mosca é revelado em um único embrião. Cada sonda de RNA foi marcada fluorescentemente de maneiras diferentes, algumas direta e outras indiretamente, e as imagens resultantes foram falsamente coradas e combinadas para visualizar cada transcrito individual de forma mais clara. Os genes cujo padrão de expressão é revelado aqui são *wingless* (*amarelo*), *engrailed* (*azul*), *short gastrulation* (*vermelho*), *intermediate neuroblasts defective* (*verde*) e *muscle specific homeobox* (*roxo*). (De D. Kosman et al., *Science* 305:846, 2004. Com permissão de AAAS.)

As moléculas específicas podem ser localizadas nas células por microscopia de fluorescência

As moléculas fluorescentes absorvem luz em um comprimento de onda e a emitem em um outro comprimento de onda mais longo. Se iluminarmos tal composto no seu comprimento de onda de absorção e então o visualizarmos por um filtro que permite apenas a passagem de luz com o comprimento de onda emitido, ele brilhará contra um fundo escuro. Como o fundo é escuro, mesmo uma quantidade mínima de corante fluorescente brilhante pode ser detectada. O mesmo número de moléculas de um corante comum, visualizado convencionalmente, seria praticamente invisível, pois as moléculas dariam apenas um colorido fraco à luz transmitida através desta parte corada da amostra.

Os corantes fluorescentes utilizados para corar células são detectados por um **microscópio de fluorescência**. Este microscópio é semelhante a um microscópio óptico comum, exceto que a luz utilizada para iluminação, originada de uma fonte muito potente, passa através de dois conjuntos de filtros – um para filtrar a luz antes de ela atingir a amostra e um para filtrar a luz obtida a partir da amostra. O primeiro filtro permite apenas a passagem de comprimentos de onda que excitem um determinado corante fluorescente, enquanto o segundo filtro bloqueia a passagem desta luz, permitindo somente a passagem daqueles comprimentos de onda emitidos quando o corante fluoresce (**Figura 9-13**).

A microscopia de fluorescência é mais comumente utilizada para detectar proteínas específicas ou outras moléculas em células e tecidos. Uma técnica muito eficaz e amplamente utilizada é acoplar corantes fluorescentes a moléculas de anticorpos, que então servem como reagentes para coloração altamente específicos e versáteis que se ligam seletivamente a determinadas macromoléculas as quais eles reconhecem nas células ou na matriz extracelular. Dois corantes fluorescentes que têm sido comumente utilizados para esse propó-

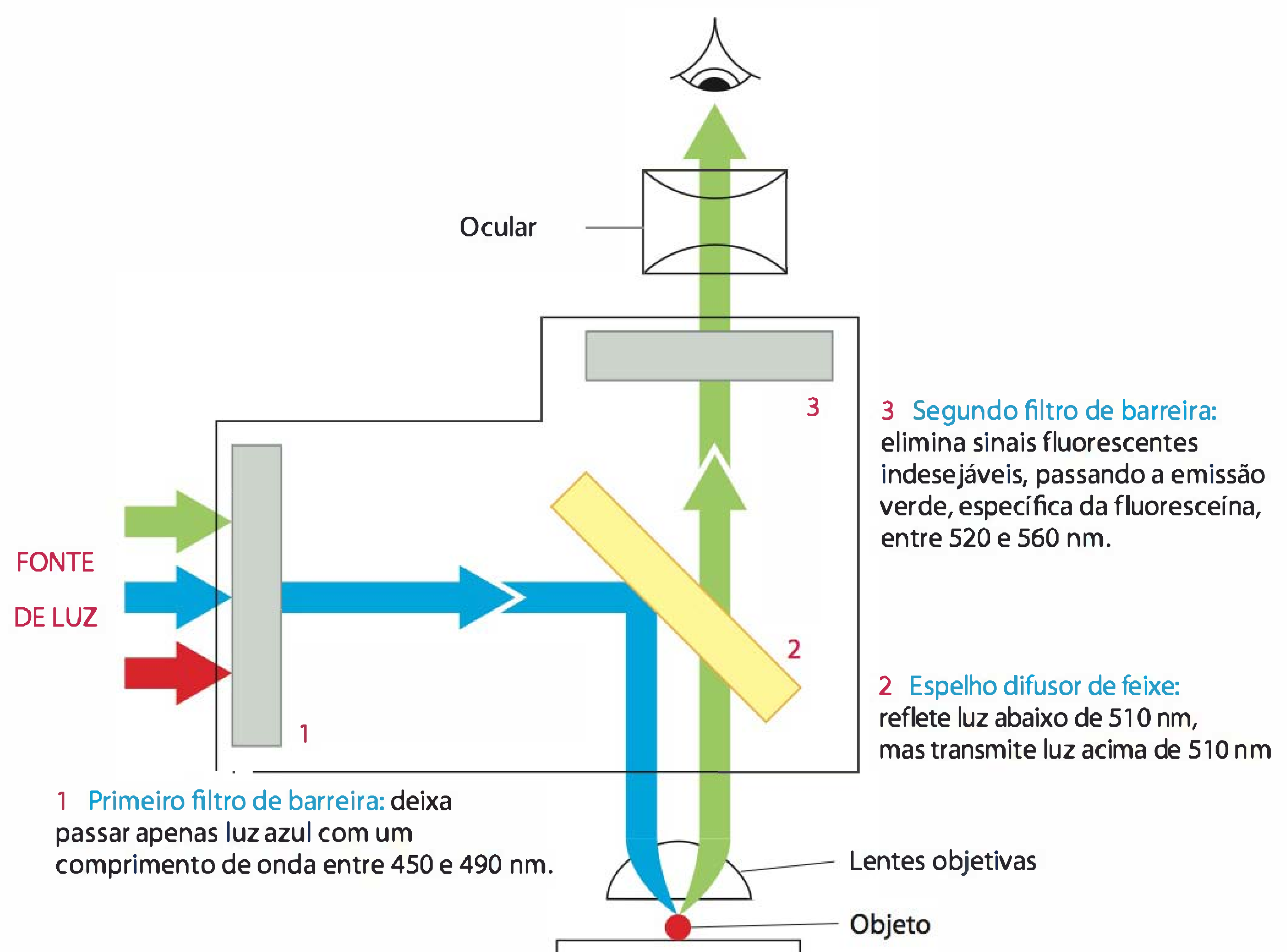


Figura 9-13 Sistema óptico de um microscópio de fluorescência. Um conjunto de filtros consiste em dois filtros de barreira (1 e 3) e um espelho dicroico (separador de raios) (2). Este exemplo mostra o conjunto de filtros para a detecção da molécula fluorescente fluoresceína. Lentes objetivas com alta abertura numérica são especialmente importantes neste tipo de microscopia, pois, em uma dada magnitude, a luminosidade da imagem fluorescente é proporcional ao quarto poder da abertura numérica (ver também Figura 9-6).

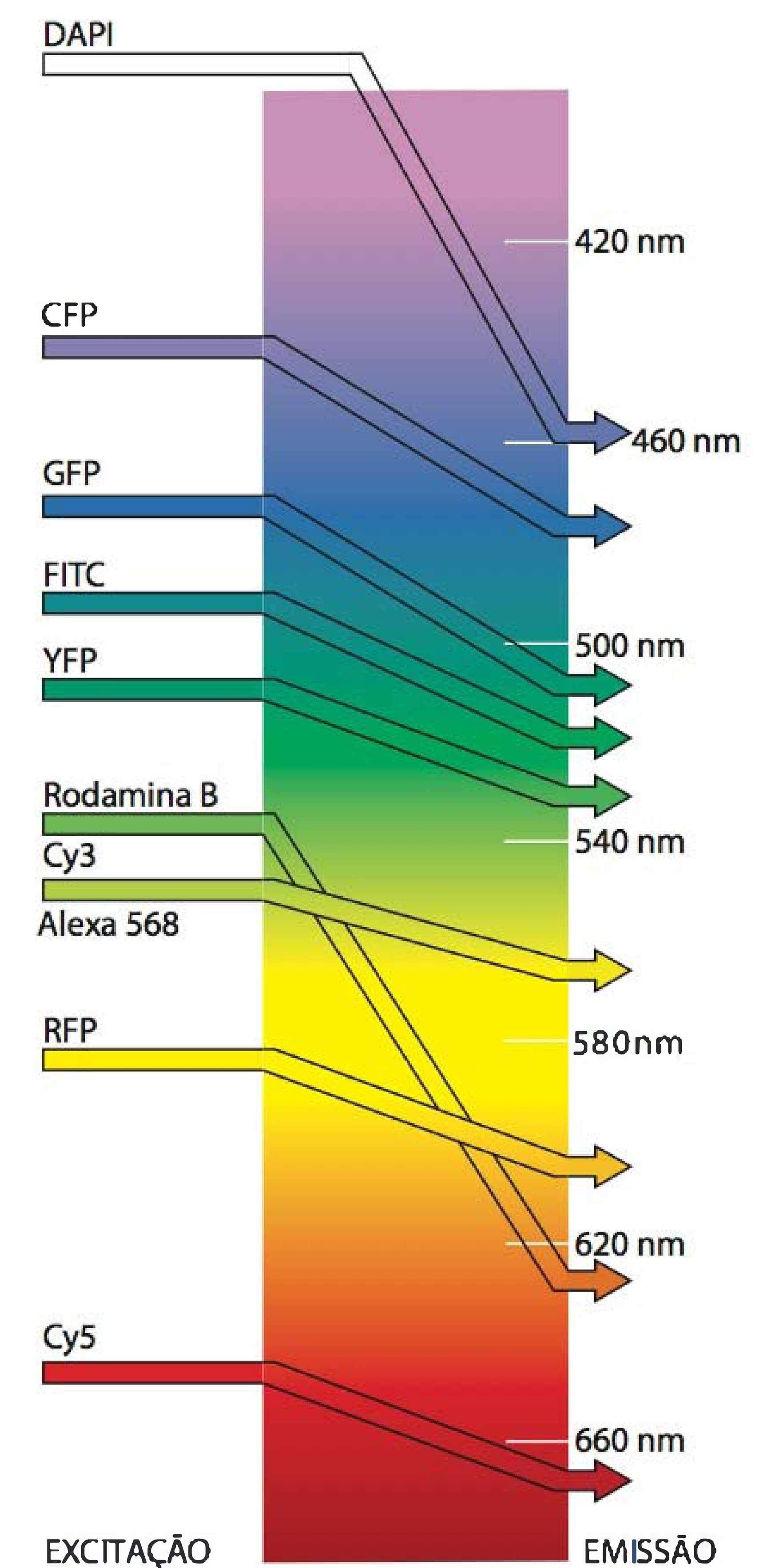


Figura 9-14 Sondas fluorescentes. Os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão de várias sondas fluorescentes, comumente utilizadas, estão mostrados em relação às cores correspondentes do espectro. O fóton emitido por uma molécula fluorescente é necessariamente de menor energia (comprimento de onda mais longo) do que o fóton absorvido, e isso explica a diferença entre os picos de excitação e de emissão. CFP, GFP, YFP e RFP são proteínas fluorescentes azul, verde, amarela e vermelha, respectivamente. Elas não são corantes, e serão discutidas em detalhes mais adiante neste capítulo. O DAPI é amplamente utilizado como uma sonda de DNA fluorescente geral, que absorve luz UV e fluoresce azul-brilhante. FITC é uma abreviação para isotiocianato fluorescente (de *fluorescence isothiocyanate*), um derivado da fluoresceína amplamente utilizado, que fluoresce verde-brilhante. As outras sondas são todas comumente utilizadas para marcar, fluorescentemente, anticorpos e outras proteínas.

sito são a *fluoresceína*, que emite uma fluorescência verde intensa quando excitada com luz azul, e a *rodamina*, que emite uma fluorescência vermelha quando excitada com luz amarelo-esverdeada (**Figura 9-14**). Acoplando-se um anticorpo à fluoresceína e um outro à rodamina, as distribuições de diferentes moléculas podem ser comparadas em uma mesma célula; as duas moléculas são visualizadas separadamente ao microscópio, alterando-se os dois conjuntos de filtros, cada um específico para cada corante. Como mostrado na **Figura 9-15**, três corantes fluorescentes podem ser utilizados, da mesma maneira, para distinguir três tipos de moléculas na mesma célula. Vários corantes fluorescentes mais novos, como Cy3, Cy5 e os corantes Alexa, foram desenvolvidos especificamente para microscopia de fluorescência (ver Figura 9-14). Estes fluorocromos orgânicos têm algumas desvantagens. Eles são excitados apenas por luz de comprimentos de onda precisos, mas diferentes, e, além disso, desbotam muito rápido quando continuamente iluminados. Entretanto, fluorocromos inorgânicos mais estáveis foram desenvolvidos recentemente. Minúsculos cristais de material semicondutor, chamados de nanopartículas, ou *quantum dots*, podem todos ser excitados para fluorescer por um amplo espectro de luz azul. Sua luz emitida tem uma cor que depende do tamanho exato do nanocristal, entre 2 e 10 nm de diâmetro, e adicionalmente a fluorescência enfraquece gradualmente com o tempo (**Figura 9-16**). Estas nanopartículas, quando acopladas a outras sondas, tais como anticorpos, são assim ideais para rastrear moléculas durante determinado momento. Se introduzidas em uma célula viva, em um embrião, por exemplo, a progênie daquela célula pode ser seguida vários dias mais tarde por sua fluorescência, permitindo que as linhagens celulares sejam rastreadas.

Métodos de microscopia de fluorescência, discutidos mais adiante no capítulo, podem ser utilizados para monitorar alterações na concentração e na localização de moléculas específicas dentro de células *vivas* (ver p. 592).

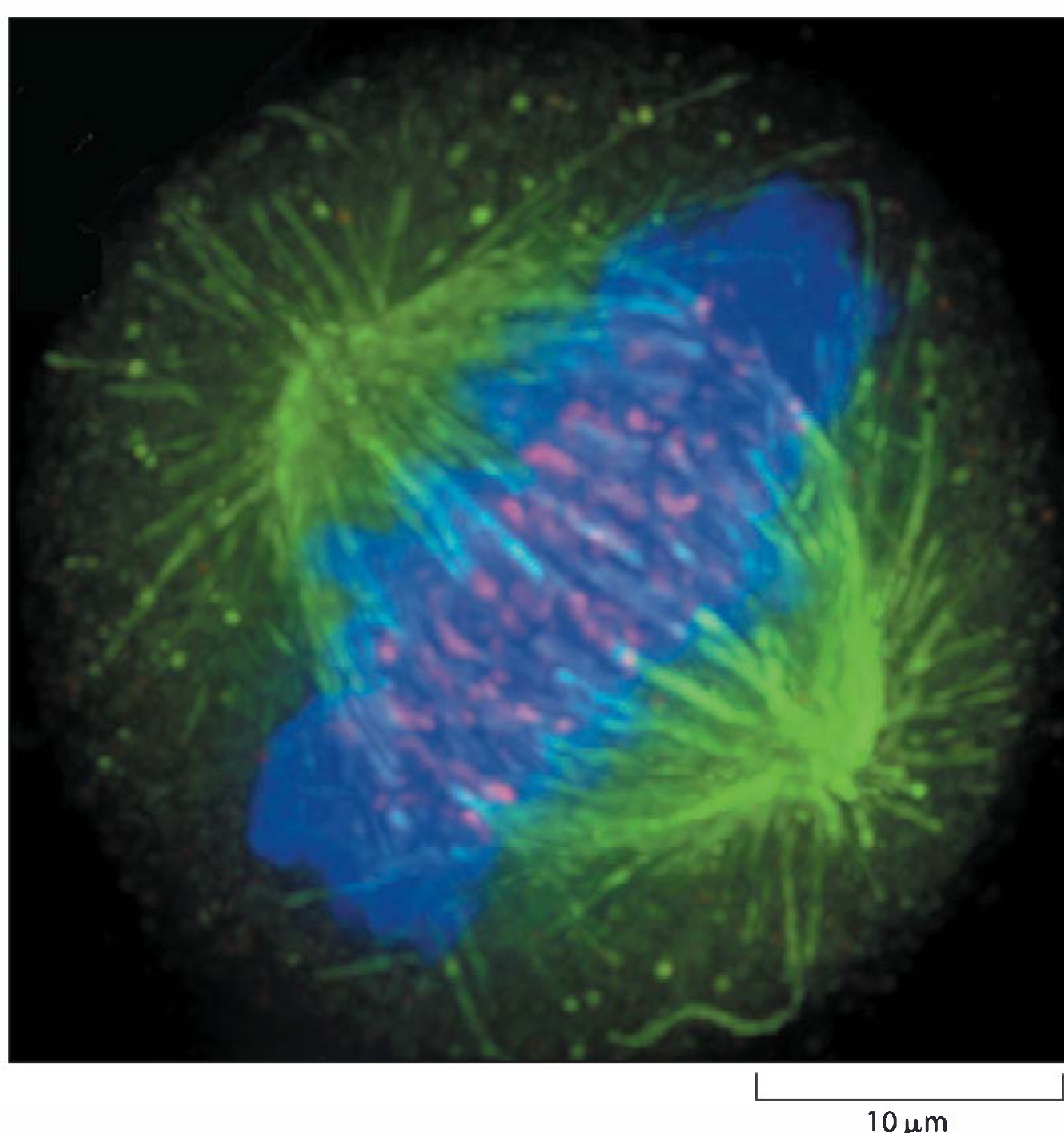


Figura 9-15 Microscopia com múltiplas sondas fluorescentes. Nesta micrografia composta de uma célula em mitose, três sondas fluorescentes diferentes foram usadas para corar três componentes celulares diferentes. Os microtúbulos do fuso são revelados com um anticorpo fluorescente *verde*, os centrômeros com um anticorpo fluorescente *vermelho* e o DNA dos cromossomos condensados com o corante fluorescente *azul* DAPI. (Cortesia de Kevin F. Sullivan.)

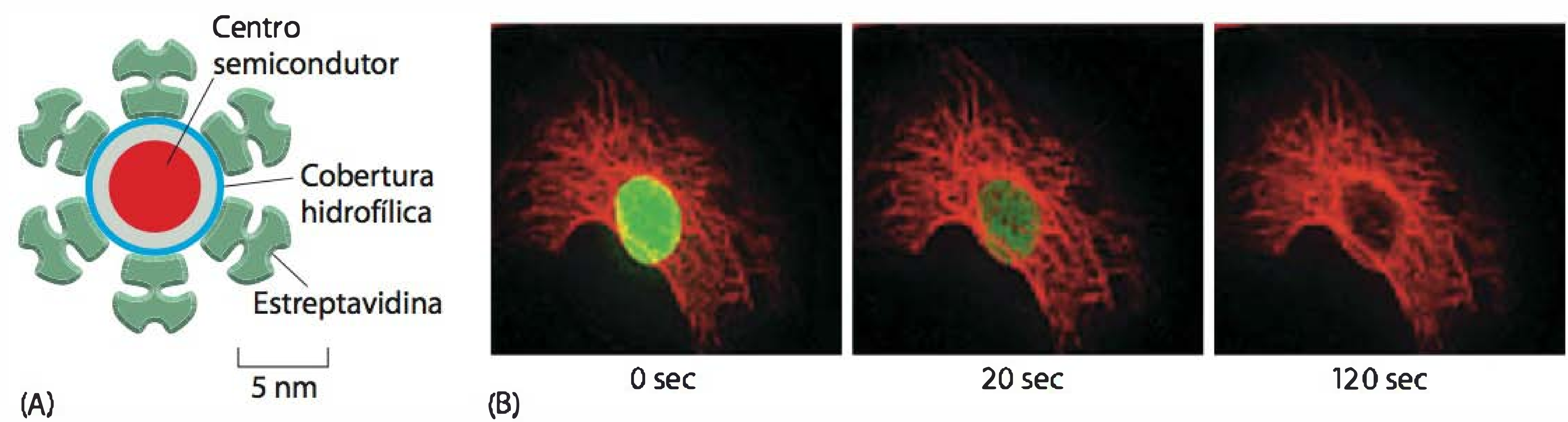


Figura 9-16 Nanopartículas fluorescentes ou *quantum dots* (nanocristais semicondutores). Os nanocristais semicondutores são minúsculas nanopartículas de seleneto de cádmio, um semicondutor com uma cobertura para torná-los solúveis em água (A). Eles podem ser ligados a sondas proteicas, como anticorpos ou estreptavidina, e quando introduzidos em uma célula, se ligarão à proteína de interesse. Nanocristais semicondutores de diferentes tamanhos emitem luz de diferentes cores – quanto maior o nanocristal, mais longo o comprimento de onda – mas eles são todos excitados pela mesma luz azul. (B) Os nanocristais semicondutores podem permanecer radiantes por semanas, diferentemente da maioria dos corantes orgânicos fluorescentes. Nesta célula, uma proteína nuclear é marcada (*verde*) com um corante fluorescente orgânico (Alexa 488), enquanto microtúbulos são corados (*vermelho*) com os nanocristais semicondutores ligados à estreptavidina. Sob exposição contínua à luz azul, o corante fluorescente enfraquece rapidamente enquanto os nanocristais semicondutores continuam a fluorescer. (B, de X. Wu et al., *Nat. Biotechnol.* 21:41-46, 2003. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os anticorpos podem ser utilizados para detectar moléculas específicas

Os anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imune de vertebrados como uma defesa contra infecção (discutido no Capítulo 24). Eles são únicos entre as proteínas, pois são produzidos em bilhões de formas diferentes, cada uma com um sítio de ligação diferente que reconhece uma molécula-alvo específica (ou *antígeno*). A precisa especificidade dos anticorpos pelo antígeno faz deles ferramentas importantes para o biólogo celular. Quando marcados com corantes fluorescentes, eles têm um valor inestimável para localizar moléculas específicas nas células por meio da microscopia de fluorescência (**Figura 9-17**); marcados com partículas eletrodensas, como esferas de ouro coloidal, eles são utilizados para propósitos semelhantes no microscópio eletrônico (discutido a seguir).

Quando utilizamos anticorpos como sondas para detectar e verificar moléculas específicas nas células, frequentemente aumentamos o sinal fluorescente que eles produzem por métodos químicos. Por exemplo, embora uma molécula marcadora, como um corante fluorescente, possa ser ligada diretamente a um anticorpo utilizado para reconhecimento específico – o *anticorpo primário* – um sinal mais forte é alcançado utilizando-se um anticorpo primário não-marcado e, depois, detectando-o com um grupo de *anticorpos secundários* marcados que se ligam a ele (**Figura 9-18**). Este processo é chamado de *imunocitoquímica indireta*.

Os métodos mais sensíveis de amplificação utilizam uma enzima como molécula marcadora, ligada a um anticorpo secundário. A enzima fosfatase alcalina, por exemplo, na presença de agentes químicos apropriados, produz fosfato inorgânico que por sua vez leva à formação localizada de um precipitado colorido. Isso revela a localização do anticorpo secundário e, portanto, a localização do complexo antígeno-anticorpo. Como cada molécula de enzima atua cataliticamente para gerar milhares de moléculas do produto, mesmo quantidades ínfimas de antígeno podem ser detectadas. Um ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), com base neste princípio, é

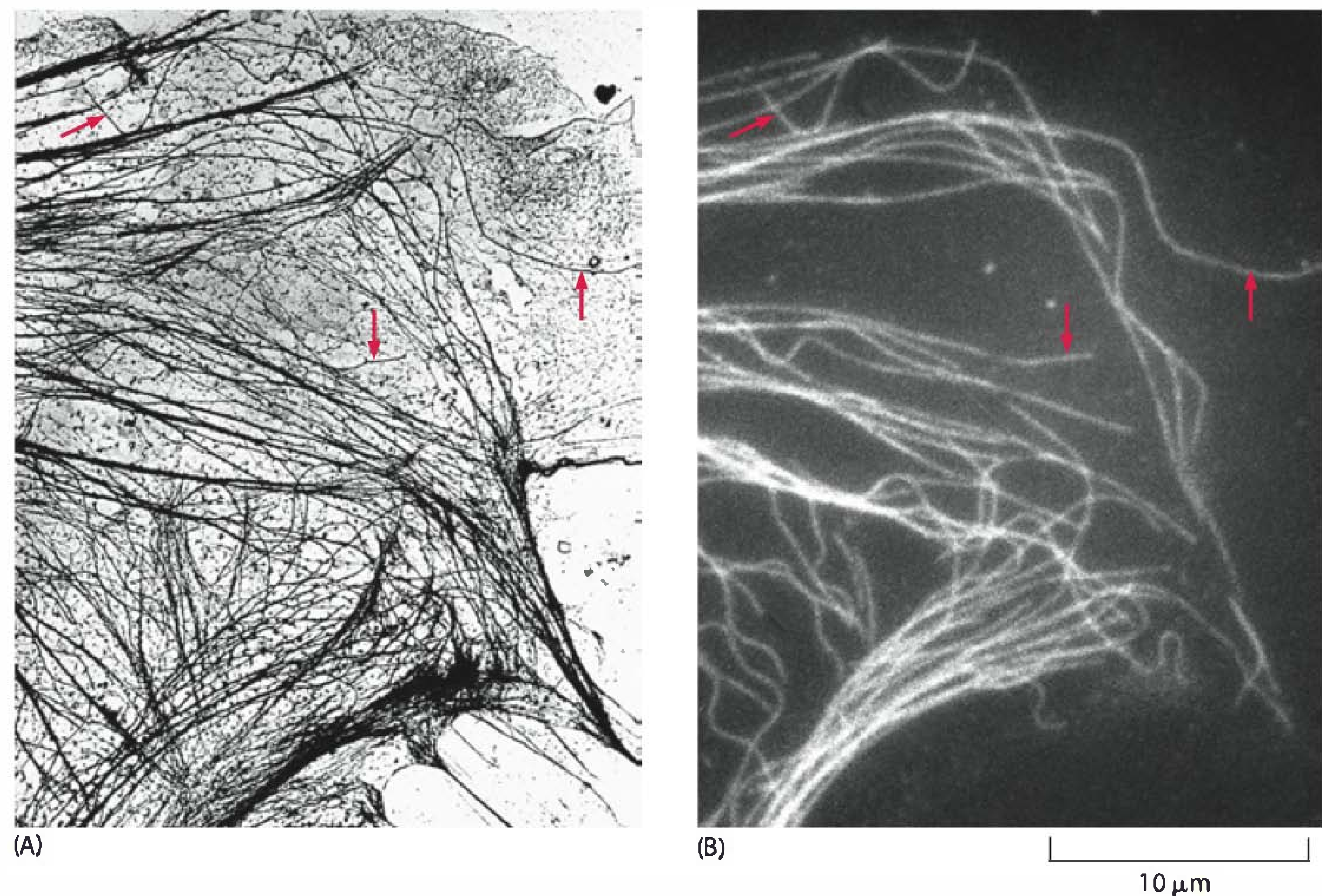


Figura 9-17 Imunofluorescência. (A) Uma micrografia eletrônica de transmissão da periferia de células epiteliais em cultura, mostrando a distribuição dos microtúbulos e de outros filamentos. (B) A mesma área corada com anticorpos fluorescentes contra tubulina, a proteína que se monta para formar os microtúbulos, utilizando a técnica de imunocitoquímica indireta (ver Figura 9-18). As *setas vermelhas* indicam microtúbulos individuais que são prontamente reconhecidos nas duas imagens. Note que, pelos efeitos de difração, os microtúbulos ao microscópio óptico aparecem com 0,2 μm de largura, em vez da sua largura real de 0,025 μm. (De M. Osborn, R. Webster e K. Weber, *J. Cell Biol.* 77:R27-R34, 1978. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

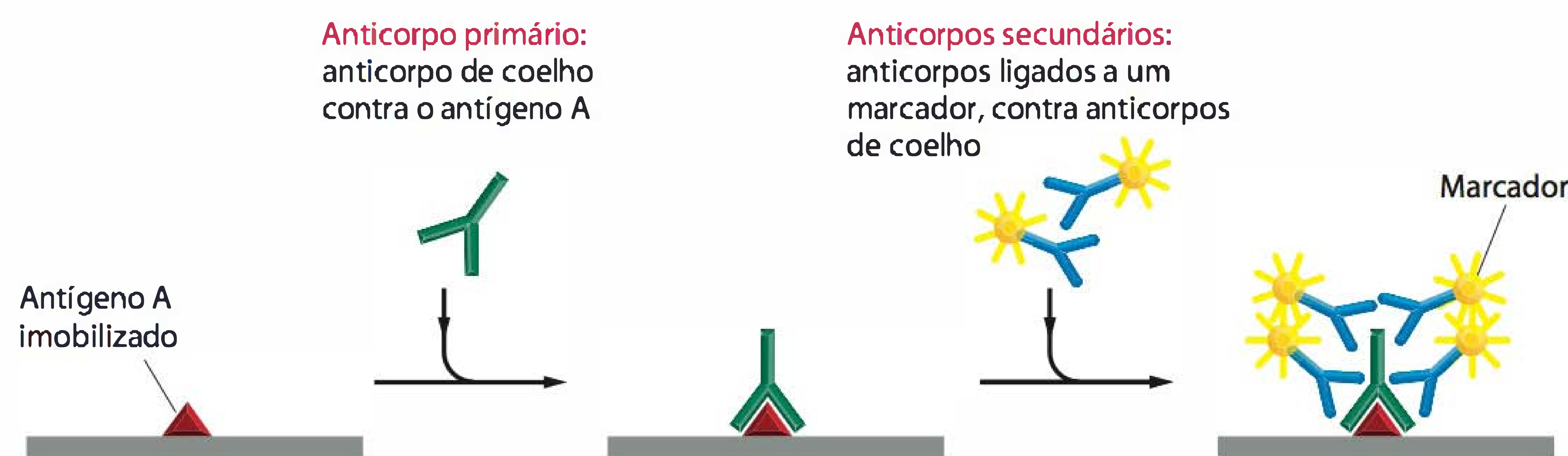


Figura 9-18 Imunocitoquímica indireta. Este método de detecção é muito sensível porque várias moléculas do anticorpo secundário reconhecem cada anticorpo primário. O anticorpo secundário é ligado covalentemente a uma molécula marcadora que o torna prontamente detectável. Os marcadores de moléculas comumente utilizados incluem os corantes fluorescentes (para microscopia de fluorescência), a enzima peroxidase da raiz-forte (tanto para microscopia óptica convencional quanto para microscopia eletrônica), as esferas de ouro coloidal (para microscopia eletrônica) e as enzimas fosfatase alcalina ou peroxidase (para detecção bioquímica).

utilizado com frequência em medicina como um teste sensível – para gravidez ou para vários tipos de infecções, por exemplo. Embora a amplificação da enzima torne os métodos ligados à enzima muito sensíveis, a difusão do precipitado colorido para longe da enzima limita a resolução espacial deste método para microscopia, e marcadores fluorescentes normalmente são utilizados para uma localização óptica mais precisa.

Os anticorpos são produzidos, de maneira simples, injetando-se uma amostra do antígeno várias vezes em um animal, como um coelho ou uma cabra, e depois coletando-se o soro rico em anticorpos. Este *antissoro* contém uma mistura heterogênea de anticorpos, cada um produzido por uma célula secretora de anticorpos diferente (um linfócito B). Os diferentes anticorpos reconhecem várias partes da molécula do antígeno (chamada de determinante antigênico ou epítopo), assim como impurezas na preparação do antígeno. A remoção de moléculas de anticorpos indesejáveis que se ligam a outras moléculas aumenta a especificidade de um antissoro por um determinado antígeno; um antissoro produzido contra uma proteína X, por exemplo, quando passado através de uma coluna de afinidade de antígenos X, se ligará a estes antígenos, permitindo que outros anticorpos passem pela coluna. Os anticorpos anti-X purificados podem ser eluídos subsequentemente da coluna. Mesmo assim, a heterogeneidade desse antissoro, algumas vezes, limita sua utilidade. O uso de anticorpos monoclonais supera bem este problema (ver Figura 8-8). Entretanto, os anticorpos monoclonais também podem ter problemas. Como são espécies únicas da proteína anticorpo, eles mostram uma especificidade quase perfeita para um único sítio ou epítopo no antígeno, mas a acessibilidade ao epítopo e, assim, a utilidade do anticorpo podem depender da preparação da amostra. Por exemplo, alguns anticorpos monoclonais reagirão somente com antígenos não-fixados, outros somente após o uso de fixadores específicos, e ainda outros apenas com proteínas desnaturadas em géis de poliacrilamida-SDS e não com as proteínas na sua conformação nativa.

É possível obter imagens de objetos tridimensionais complexos com o microscópio óptico

Para a microscopia óptica comum, como visto, um tecido deve ser fatiado em cortes finos para ser examinado; quanto mais finos os cortes, mais nítida é a imagem. O processo de corte perde as informações sobre a terceira dimensão. Como então é possível obter uma imagem da arquitetura tridimensional de uma célula ou de um tecido e como podemos visualizar a estrutura microscópica de uma amostra que, por uma razão ou outra, não pode ser primeiro cortada em fatias? Embora um microscópio óptico seja focalizado em um plano focal específico nas amostras tridimensionais complexas, todas as outras partes da amostra acima e abaixo do plano de foco também são iluminadas, e a luz originada a partir dessas regiões contribui para a imagem com manchas "fora de foco". Isso pode tornar muito difícil a interpretação da imagem com detalhes e pode levar à ocultação da estrutura refinada da imagem pela luz fora de foco.

Duas abordagens distintas, mas complementares, foram desenvolvidas para solucionar este problema: uma é computacional, a outra é óptica. Estes métodos de visualização na microscopia tridimensional tornam possível focalizar um plano escolhido em uma amostra espessa enquanto se rejeita a luz que vem de regiões fora de foco acima e abaixo daquele plano. Dessa forma, é vista uma *secção óptica* delgada nítida. A partir de uma série de tais secções ópticas obtidas a partir de diferentes profundidades e armazenadas no computador, torna-se fácil reconstruir uma imagem tridimensional. Os métodos realizam para os microscopistas o que a tomografia computadorizada realiza (por instrumentos diferentes) para os radiologistas que investigam o corpo humano: ambos os aparelhos fornecem vistas seccionais detalhadas do interior de uma estrutura intacta.

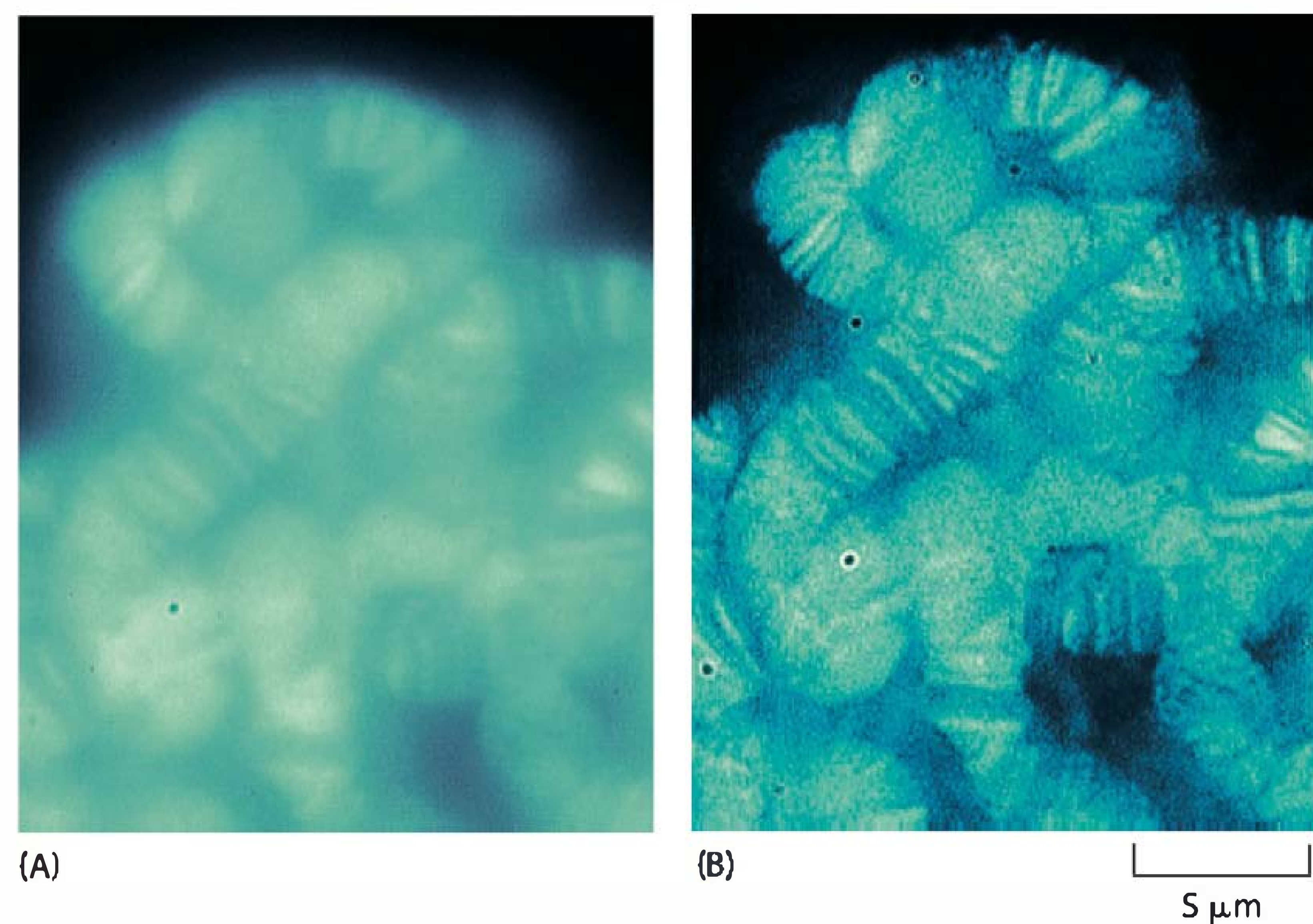


Figura 9-19 Deconvolução da imagem. (A) Uma micrografia óptica dos grandes cromossomos politênicos da *Drosophila*, corados com um corante fluorescente que se liga ao DNA. (B) O mesmo campo de visão depois de uma deconvolução da imagem revela, claramente, o padrão de bandas nos cromossomos. Cada banda tem cerca de 0,25 μm de espessura, aproximando-se do limite de resolução do microscópio óptico. (Cortesia do Laboratório John Sedat.)

A abordagem computacional frequentemente é chamada de *deconvolução de imagem*. Para entender como funciona, lembre que a natureza da onda de luz significa que o sistema de lentes do microscópio produz um pequeno disco borrado como a imagem de uma fonte pontual de luz (ver Figura 9-5), com um borrão aumentado se a fonte pontual estiver acima ou abaixo do plano de foco. Essa imagem borrada de uma fonte pontual é chamada de *função do ponto de espalhamento*. Uma imagem de um objeto complexo pode ser imaginada como sendo construída substituindo cada ponto da amostra por um disco borrado correspondente, resultando em uma imagem borrada por inteiro. Para a deconvolução, primeiro obtemos uma série de imagens (borradas), normalmente com uma câmara CCD refrigerada, focalizando o microscópio em uma série de planos focais por vez – na realidade, uma imagem tridimensional (borrada). A pilha de imagens digitais é então processada por computador para remover o máximo de borrões possíveis. Essencialmente, o programa de computador utiliza a função do ponto de espalhamento do microscópio para determinar qual o efeito que o borrão teria sobre a imagem, e então aplica um "mata-borrão" equivalente (deconvolução), transformando a imagem tridimensional borrada em uma série de secções ópticas limpas. A computação necessária é bastante complexa e costumava ser uma séria limitação. Entretanto, com computadores mais rápidos e baratos, o método de deconvolução da imagem está aumentando em eficiência e popularidade. A **Figura 9-19** mostra um exemplo.

O microscópio confocal produz secções ópticas excluindo a luz fora de foco

O microscópio confocal alcança um resultado similar àquele da deconvolução, mas o faz pela manipulação da luz antes de ela ser medida; desta maneira, é uma técnica análoga, em vez de digital. Os detalhes ópticos do **microscópio confocal** são complexos, mas a ideia básica é simples, como ilustrado na **Figura 9-20**, e os resultados são superiores àqueles obtidos por microscopia óptica convencional (**Figura 9-21**).

O microscópio geralmente é utilizado com óptica de fluorescência (ver Figura 9-13), mas em vez de iluminar toda a amostra de uma vez, da maneira usual, o sistema óptico focaliza a qualquer instante um ponto de luz sobre um único ponto da amostra, a uma profundidade específica. É necessária uma fonte muito brilhante de iluminação localizada; que normalmente é fornecida por um *laser*, cuja luz é passada através de um orifício. A fluorescência emitida a partir do material iluminado é coletada e levada a formar uma imagem em um detector de luz adequado. Um orifício de abertura é colocado na frente do detector, em uma posição que é *confocal* com o orifício iluminador – isto é, precisamente onde os raios emitidos a partir do ponto iluminado na amostra atingem um foco. Assim, a luz deste ponto na amostra converge na abertura e entra no detector.

Em contraste, a luz das regiões fora do plano de foco do ponto de luz também está fora de foco no orifício de abertura e, dessa maneira, é excluída do detector (ver Figura 9-20). Para construir uma imagem bidimensional, os dados de cada ponto no plano de foco são coletados sequencialmente pela varredura do campo em uma moldura-padrão (como em uma

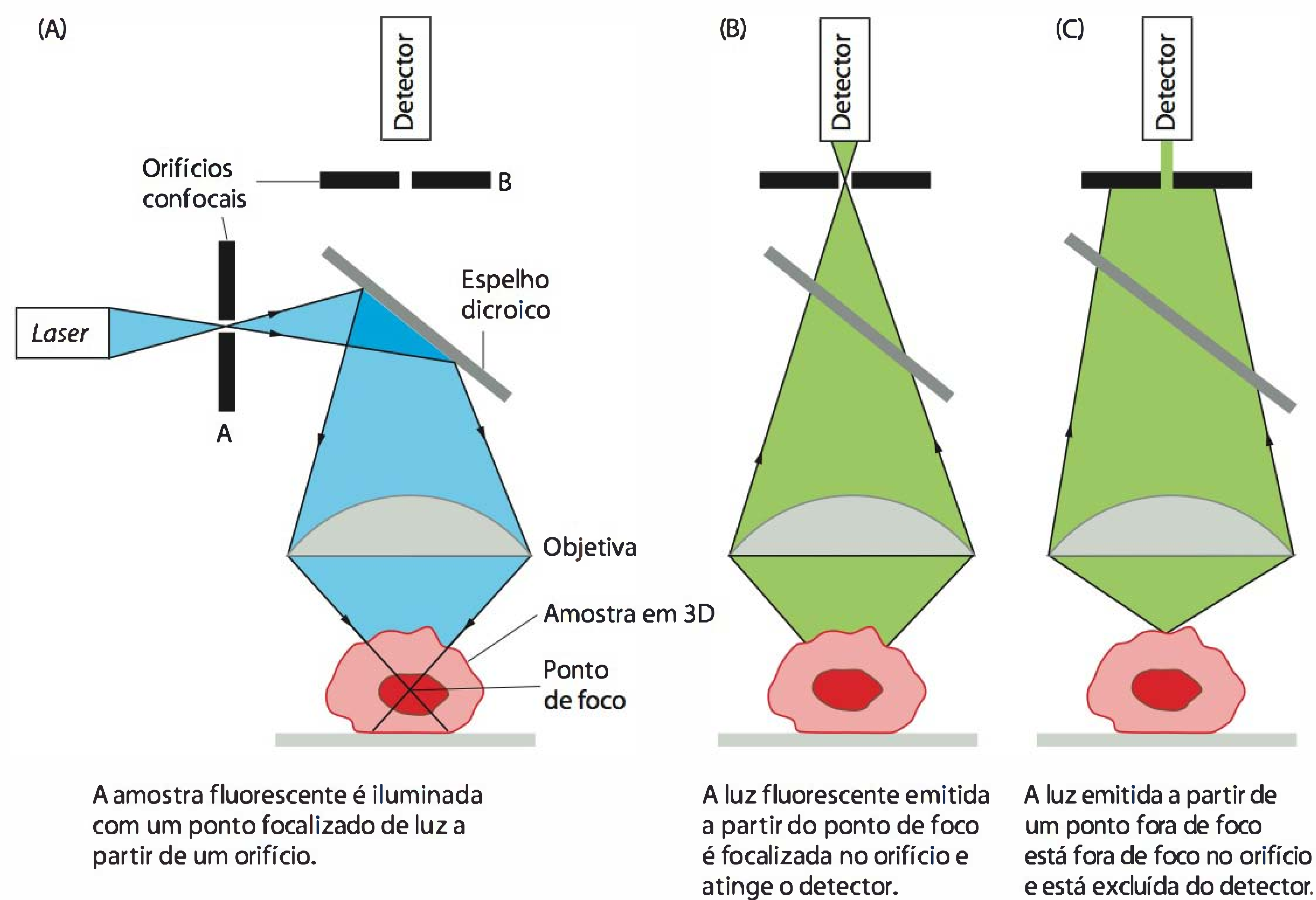


Figura 9-20 Microscópio confocal de fluorescência. Este diagrama simplificado mostra que o arranjo básico dos componentes ópticos é similar ao microscópio-padrão de fluorescência, mostrado na Figura 9-13, exceto que um *laser* é utilizado para iluminar um pequeno orifício onde a imagem é focada em um único ponto na amostra (A). A fluorescência emitida a partir deste ponto focal na amostra é focalizada em um segundo orifício (confocal) (B). A luz emitida de todo o resto da amostra não é focalizada aqui e, portanto, não contribui para a imagem final (C). Pela varredura do feixe de luz sobre a amostra, é gerada uma imagem bidimensional muito nítida, do plano exato de foco, que não é degradada significativamente pela luz de outras regiões da amostra.

tela de televisão) e mostrados em uma tela de vídeo. Embora não seja mostrado na Figura 9-20, a varredura normalmente é realizada desviando-se o raio com um espelho oscilador colocado entre o espelho dicroico e as lentes objetivas, de modo que o ponto de iluminação e o orifício confocal no detector permaneçam rigorosamente ajustados.

O microscópio confocal tem sido utilizado para resolver a estrutura de inúmeros objetos tridimensionais complexos (**Figura 9-22**), incluindo as redes de fibras citoesqueléticas no citoplasma e os arranjos de cromossomos e de genes no núcleo.

Os méritos relativos aos métodos de deconvolução e microscopia confocal para a microscopia óptica tridimensional continuam assuntos de debate. Os microscópios confocais geralmente são mais fáceis de utilizar do que os sistemas de deconvolução, e as secções ópticas finais podem ser vistas rapidamente. Por outro lado, as câmaras CCD resfriadas, utilizadas para sistemas de deconvolução, são extremamente eficientes em coletar pequenas quantidades de luz, podendo ser usadas para gerar imagens tridimensionais detalhadas de amostras que são coradas muito fracamente ou que são muito fáceis de danificar pela luz brilhante utilizada na microscopia confocal.

Entretanto, ambos os métodos têm uma outra desvantagem: nenhum deles é bom para lidar com amostras espessas. Os métodos de deconvolução tornam-se rapidamente ineficazes a uma profundidade de cerca de 40 μm em uma amostra, enquanto que os microscópios confocais apenas podem obter imagens até uma profundidade de cerca de 150 μm.

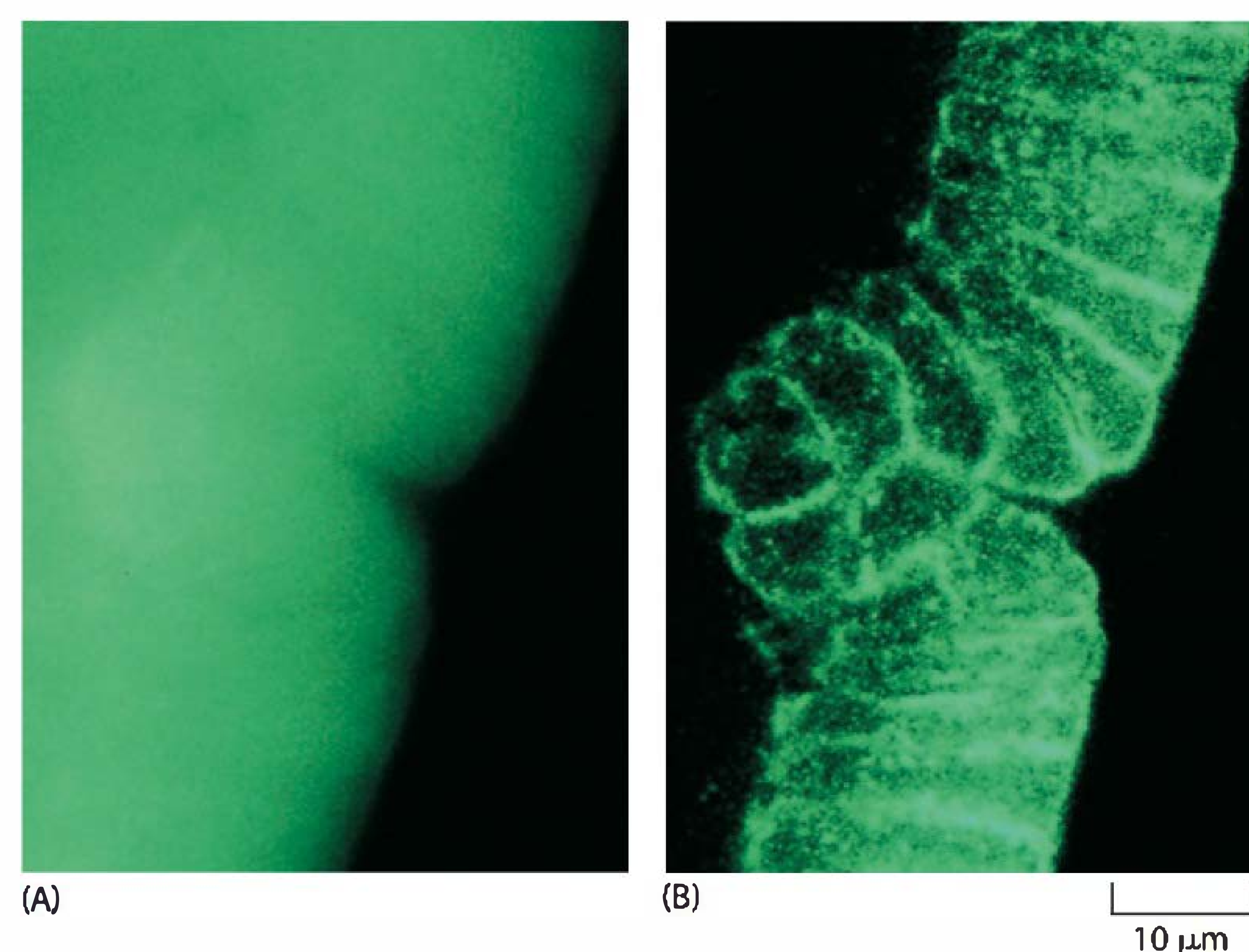


Figura 9-21 Comparação da microscopia de fluorescência convencional com a microscopia de fluorescência confocal. Estas duas micrografias são do mesmo embrião intacto de *Drosophila*, no estágio de gástrula, que foi corado com uma sonda fluorescente para filamentos de actina. (A) A imagem convencional não-processada é borrada pela presença de estruturas fluorescentes acima e abaixo do plano de foco. (B) Na imagem confocal, essa informação fora de foco é removida, resultando em uma secção óptica nítida das células no embrião. (Cortesia de Richard Warn e Peter Shaw.)

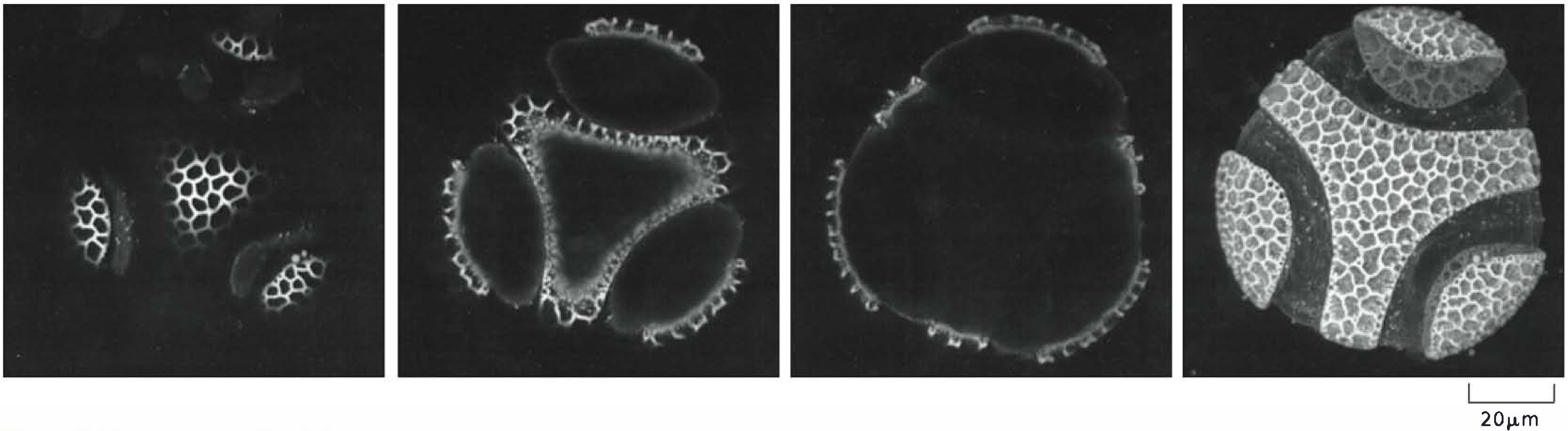


Figura 9-22 Reconstrução tridimensional de imagens a partir de microscópio confocal. (A) Os grãos de pólen, neste caso de uma flor de maracujá, têm a parede celular com uma escultura complexa que contém compostos fluorescentes. As imagens obtidas em diferentes profundidades no grão, utilizando um microscópio confocal, podem ser recombinadas para fornecer uma visão tridimensional do grão inteiro, mostrado à direita. Três secções ópticas individuais, selecionadas de um conjunto de 30, cada uma das quais apresentando uma pequena contribuição da imagem anterior, estão mostradas na esquerda. (Cortesia de Brad Amos.)

Microscópios confocais especiais podem agora obter vantagem da maneira na qual moléculas fluorescentes são excitadas, para investigar até mais fundo em uma amostra. Moléculas fluorescentes normalmente são excitadas por um único fóton de alta energia, de comprimento de onda mais curto do que o da luz emitida, mas podem, além disso, ser excitadas pela absorção de dois (ou mais) fótons de energia mais baixa, enquanto ambos chegarem com uma diferença máxima de um fentossegundo entre eles. O uso dessa excitação de comprimento de onda mais longo tem algumas vantagens importantes. Além de reduzir o ruído de fundo, a luz vermelha ou próxima ao infravermelho pode penetrar mais profundamente a amostra. Microscópios confocais multifóton, construídos para tirar vantagem desse efeito "**dois fótons**", tipicamente podem obter imagens nítidas mesmo a uma profundidade de 0,5 mm em uma amostra. Isso é particularmente interessante para estudos de células vivas, principalmente na obtenção de imagens da atividade dinâmica de sinapses e neurônios logo abaixo da superfície de cérebros vivos (**Figura 9-23**).

Proteínas fluorescentes podem ser utilizadas para marcar proteínas individuais em células e organismos vivos

Até mesmo as estruturas celulares mais estáveis devem ser montadas, desmontadas e reorganizadas durante o ciclo de vida celular. Outras estruturas, muitas vezes enormes na escala molecular, alteram-se, movem-se e se reorganizam à medida que a célula conduz seus assuntos internos e responde ao seu ambiente. Pedaços complexos e muito organizados de uma maquinaria molecular movem os componentes em torno da célula controlando o tráfego para dentro e para fora do núcleo, de uma organela para outra, e para dentro e para fora da própria célula.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para tornar componentes específicos de células vivas visíveis ao microscópio. A maioria desses métodos utiliza proteínas fluorescentes e requer um acerto entre preservação estrutural e marcação eficiente. Todas as moléculas fluorescentes discutidas até agora são produzidas fora das células e então introduzidas artificialmente nelas. Agora, novas oportunidades têm surgido pela descoberta de genes codificantes para moléculas de proteínas que são fluorescentes por si só. A engenharia genética então permitiu a criação de linhagens de células ou organismos que fazem suas próprias marcas e rótulos visíveis, sem a introdução de moléculas estranhas. Estas exibicionistas celulares expõem seus trabalhos internos em cor fluorescente brilhante.

Muito importante entre as proteínas fluorescentes utilizadas por biólogos celulares para esses propósitos é a **proteína fluorescente verde** (**GFP**, *green fluorescent protein*), isolada da água-viva *Aequoria victoria*. Esta proteína é codificada, de maneira normal, por um único gene que pode ser clonado e introduzido em células de outras espécies. A proteína recente-

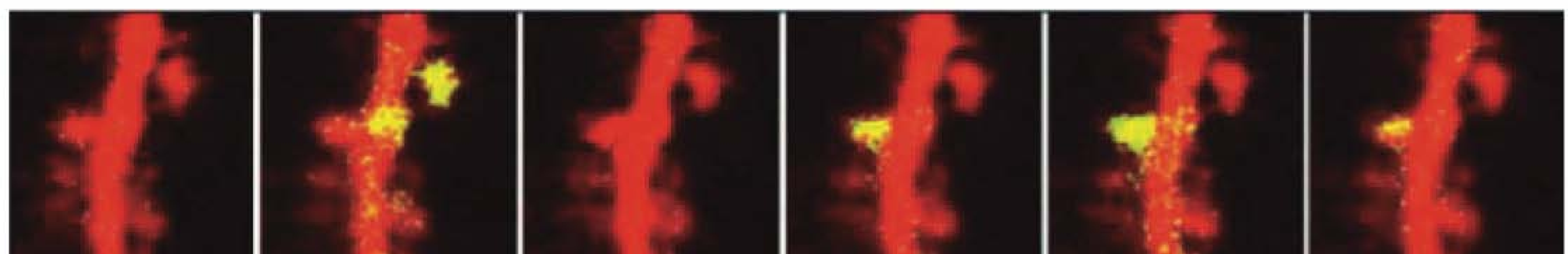


Figura 9-23 Obtenção de imagem por multifótons. Luz infravermelha a *laser* causa menos danos a células vivas e pode penetrar mais adiante, permitindo aos microscopistas olhar mais a fundo em tecidos vivos. O efeito de dois fótons, em que um fluorocromo pode ser excitado por dois fótons infravermelhos coincidentes em vez de um único fóton de alta energia, permite-nos ver aproximadamente 0,5 mm para dentro do córtex de um cérebro de camundongo vivo. Um corante, cuja fluorescência muda com a concentração de cálcio, revela sinapses ativas (*amarelo*) nas espinhas dendríticas (*vermelho*) que mudam em função do tempo. (Cortesia de Karel Svoboda.)

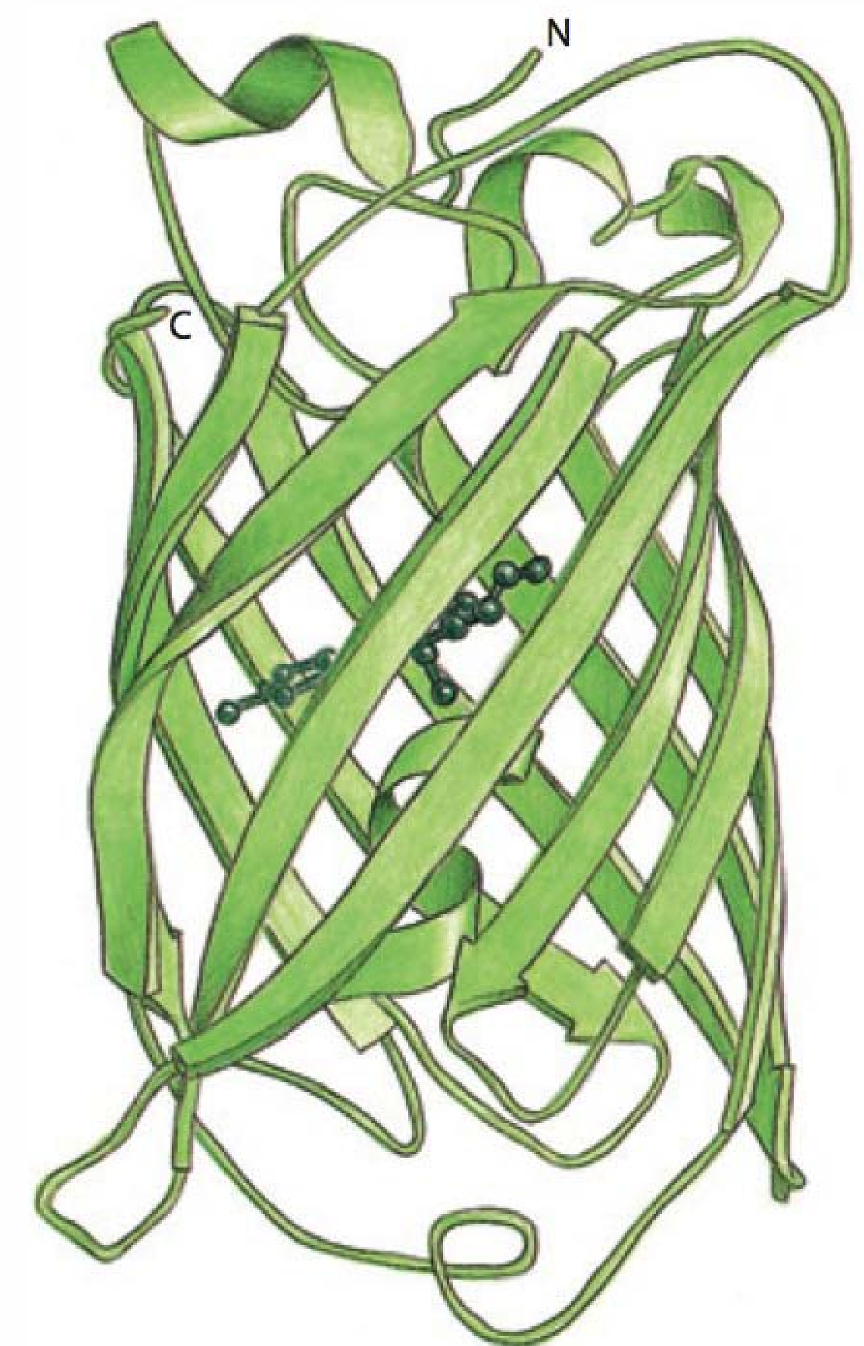


Figura 9-24 Proteína fluorescente verde (GFP). A estrutura da GFP, mostrada aqui esquematicamente, destaca as onze fitas β que formam as aduelas de um barril. No centro do barril está o cromóforo (*verde-escuro*) formado após a tradução, a partir das cadeias laterais protuberantes de três resíduos de aminoácidos. (Adaptada de M. Ormö et al., *Science* 273:1392-1395, 1996. Com permissão de AAAS.)

mente traduzida não é fluorescente, mas dentro de uma hora ou mais (menos para alguns alelos do gene, mais para outros) ela sofre uma modificação pós-traducional, catalisada por ela mesma, para gerar um centro fluorescente eficiente e brilhante, protegido no interior de uma proteína em forma de barril (**Figura 9-24**). Uma mutagênese sítio-dirigida extensiva realizada na sequência do gene original resultou em fluorescência útil em organismos, variando de animais e plantas até fungos e micróbios. A eficiência da fluorescência também tem sido melhorada, e variantes têm sido geradas com espectros de absorção e de emissão alterados na amplitude de azul-verde-amarelo. Recentemente, uma família de proteínas fluorescentes relacionadas descoberta em corais estendeu a amplitude para dentro da região vermelha do espectro (ver Figura 9-14).

Um dos usos mais simples da GFP é como molécula repórter, uma sonda fluorescente para monitorar a expressão gênica. Um organismo transgênico pode ser feito com uma sequência codificante para GFP colocada sob o controle transcricional do promotor pertencente a um gene de interesse, mostrando visivelmente o padrão de expressão do gene no organismo vivo (**Figura 9-25**). Em uma outra aplicação, um sinal de localização do peptídeo pode ser adicionado à GFP para direcioná-la a um compartimento celular específico, como o retículo endoplasmático ou a mitocôndria, iluminando essas organelas de maneira que elas possam ser observadas em vida (ver Figura 12-35B).

A sequência de DNA codificante para GFP também pode ser inserida no início ou no final de um gene para uma outra proteína, gerando um produto quimérico que consiste naquele da proteína com o domínio da GFP ligado. Em vários casos, essa proteína fusionada com GFP se comporta da mesma maneira que a proteína original, revelando diretamente sua localização e suas atividades por meio do seu contraste codificado geneticamente (**Figura 9-26**). Com frequência é possível provar que a proteína fusionada à GFP é funcionalmente equivalente à proteína não-fusionada utilizando-a, por exemplo, para resgatar um mutante deficiente da proteína. A marcação com GFP é a maneira mais clara e mais inequívoca de mostrar a distribuição e a dinâmica de uma proteína em um organismo vivo (**Figura 9-27**).

A dinâmica das proteínas pode ser acompanhada em células vivas

As proteínas fluorescentes estão sendo exploradas não apenas para ver onde em uma célula uma determinada proteína está localizada, mas também para descobrir suas propriedades cinéticas e se ela interage com outras proteínas. Descreveremos agora três técnicas nas quais GFP e seus parentes são utilizados desta forma.

A primeira é a monitoração das interações entre uma proteína e outra por **transferência de energia ressonante fluorescente** (**FRET**, *fluorescence resonance energy transfer*). Nesta técnica, cujos princípios foram descritos anteriormente (ver Figura 8-2), as duas moléculas de interesse são marcadas, cada uma com um fluorocromo diferente, escolhido de modo que o espectro de emissão de um fluorocromo se sobrepõe ao espectro de absorção do outro. Se as duas proteínas se ligam para trazer seus fluorocromos em uma distância muito próxima (mais perto do que cerca de 5 nm), um fluorocromo transfere a energia da luz absorvida diretamente para o outro. Assim, quando o complexo é iluminado no comprimento de onda de excitação do primeiro fluorocromo, luz é produzida no comprimento de onda de emissão

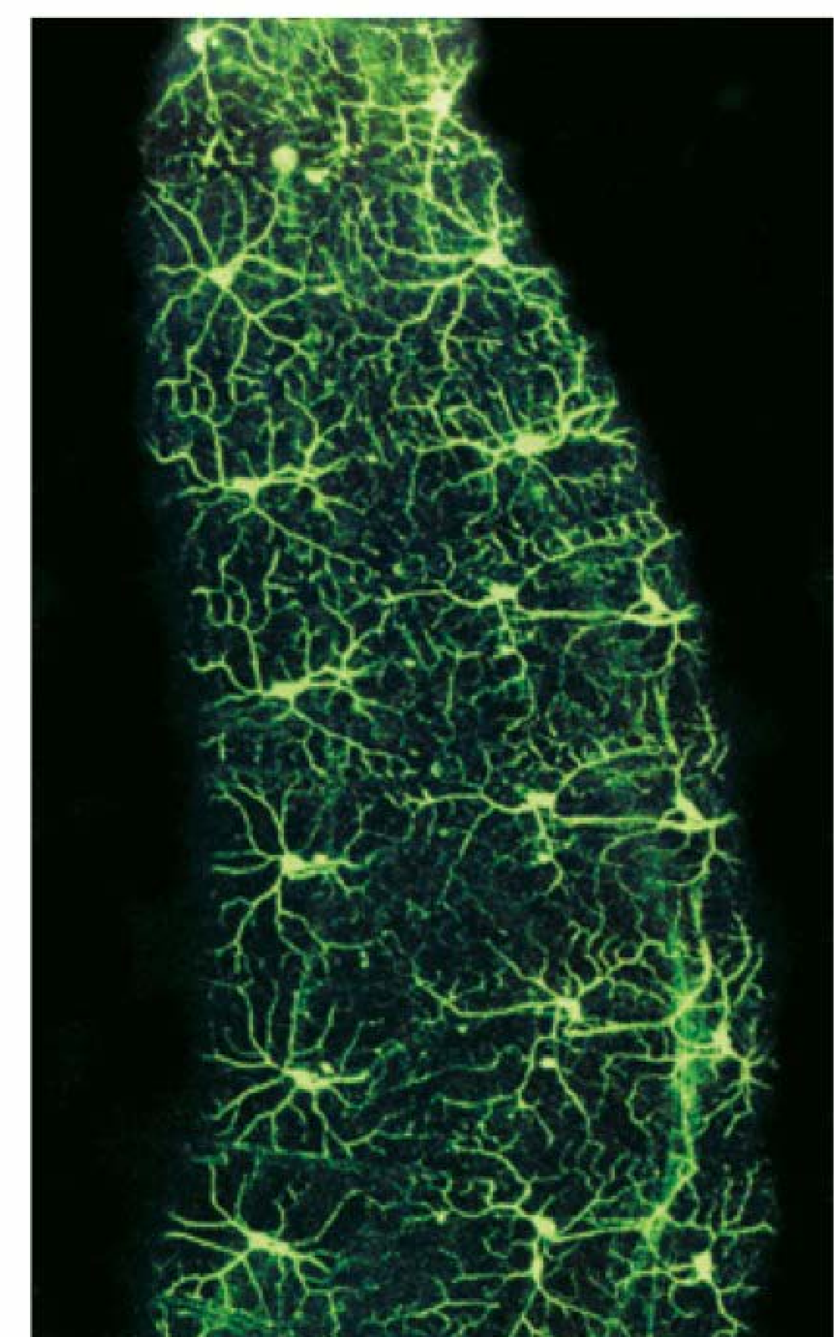


Figura 9-25 A proteína fluorescente verde (GFP) como repórter. Para este experimento, realizado na mosca-das-frutas, o gene para GFP foi unido (utilizando-se técnicas de DNA recombinante) a um promotor de mosca que é ativo apenas em um grupo especializado de neurônios. Esta imagem de um embrião de mosca viva foi obtida por um microscópio de fluorescência e mostra aproximadamente 20 neurônios, cada um com longas projeções (axônios e dendritos) que se comunicam com outras células (não-fluorescentes). Esses neurônios estão localizados logo abaixo da superfície do animal e permitem que ele perceba o meio ao redor. (De W. B. Grueber et al., *Curr. Biol.* 13:618-626, 2003. Com permissão de Elsevier.)

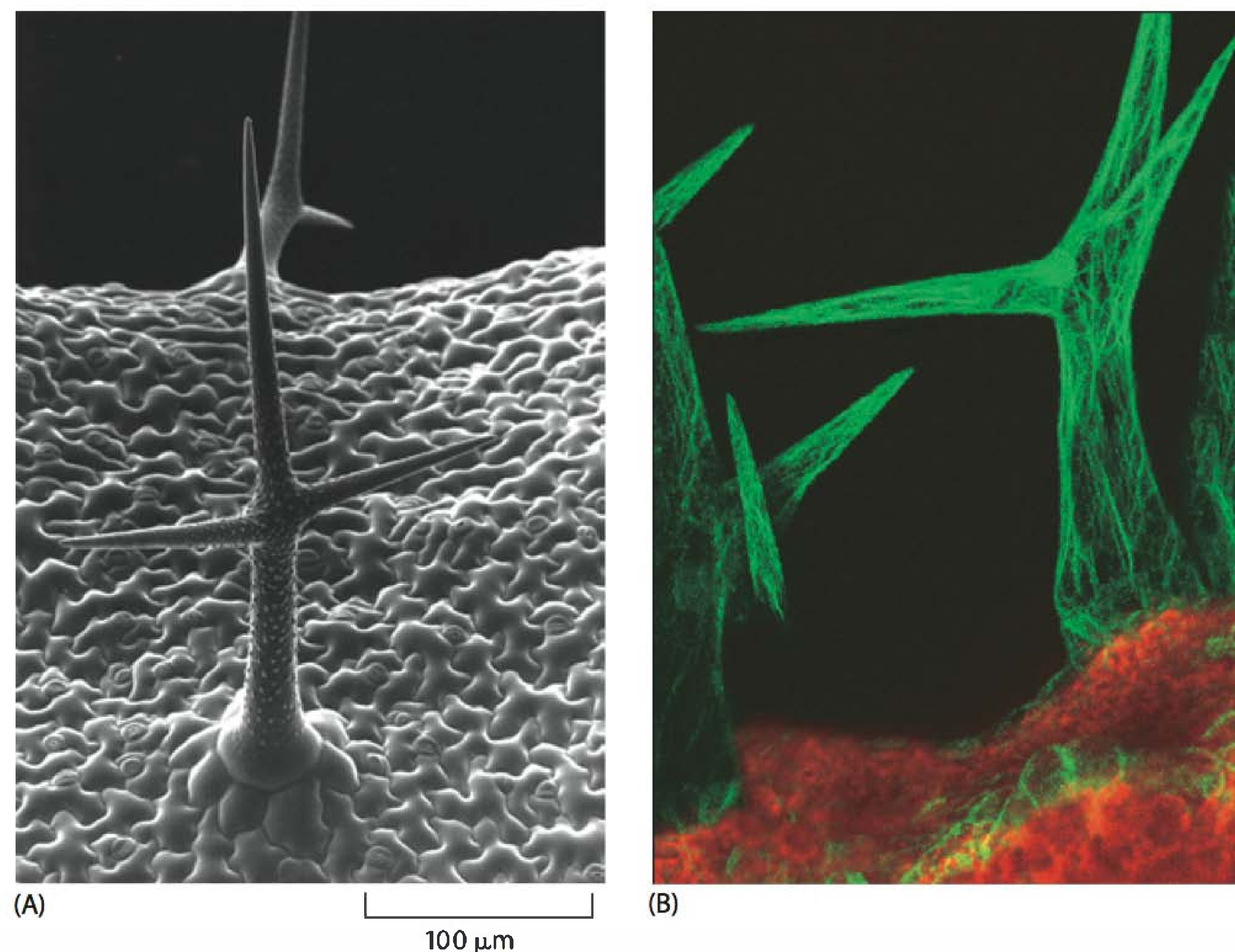


Figura 9-26 Proteínas marcadas com GFP. (A) A superfície superior das folhas da planta *Arabidopsis* está coberta com pelos enormes ramificados de células únicas que crescem a partir da superfície da epiderme. A imagem destes pelos, ou tricomas, pode ser obtida pelo microscópio eletrônico de varredura. (B) Se uma planta *Arabidopsis* é transformada com uma sequência de DNA codificando para talina (uma proteína que se liga à actina), fusionada a uma sequência de DNA que codifica para GFP, a proteína talina fluorescente produzida se liga aos filamentos de actina em todas as células vivas da planta transgênica. A microscopia confocal pode revelar a dinâmica de todo o citoesqueleto de actina do tricoma (*verde*). A fluorescência vermelha surge da clorofila nas células dentro da folha abaixo da epiderme. (A, cortesia de Paul Linstead; B, cortesia de Jaideep Mathur.)

do segundo. Esse método pode ser utilizado com duas variantes de GFP com espectros diferentes como fluorocromos para monitorar processos como a interação de moléculas de sinalização com seus receptores ou proteínas em complexos macromoleculares (**Figura 9-28**).

A complexidade e a rapidez de vários complexos celulares, como as ações de moléculas de sinalização ou os movimentos de proteínas do citoesqueleto, tornam-nas difíceis de serem estudadas ao nível de célula única. Idealmente, gostaríamos de ser capazes de introduzir qualquer molécula de interesse em uma célula viva em um momento e local preciso e acompanhar seu comportamento subsequente, assim como a resposta da célula àquela molécula. A microinjeção é limitada pela dificuldade de controlar o local e o momento da aplicação. Uma abordagem mais poderosa envolve a síntese de uma forma inativa da molécula fluorescente de interesse, sua introdução em uma célula e então a sua ativação repentina em um local escolhido na célula pela incidência de um ponto de luz sobre ela. Esse processo é chamado de **fotoativação**. Precursores fotossensíveis inativos deste tipo, muitas vezes chamados de *moléculas encarceradas*, têm sido produzidos para várias moléculas fluorescentes. Um microscópio pode ser utilizado para focar um forte pulso de luz, a partir de um *laser*, sobre qualquer região minúscula da célula, de modo que o experimentador possa controlar exatamente onde e quando a molécula fluorescente é fotoativada.

Uma classe de proteínas fluorescentes encarceradas é produzida ligando-se um marcador fluorescente fotoativável a uma proteína purificada. É importante que a proteína modificada permaneça biologicamente ativa: a marcação com o corante fluorescente encarcerado adiciona um grupo na superfície de uma proteína, o qual pode facilmente modificar as propriedades da proteína. Um protocolo de marcação satisfatório normalmente é encontrado por tentativa e erro. Uma vez que uma proteína marcada biologicamente ativa foi produzida, ela precisa ser introduzida na célula viva (ver Figura 9-34), onde seu comportamento possa ser acompanhado. A tubulina, marcada com fluoresceína encarcerada, por exemplo, quando injetada em uma célula em divisão, pode ser incorporada nos microtúbulos de um fuso mitótico. Quando uma pequena região do fuso é iluminada com um *laser*, a tubulina mar-

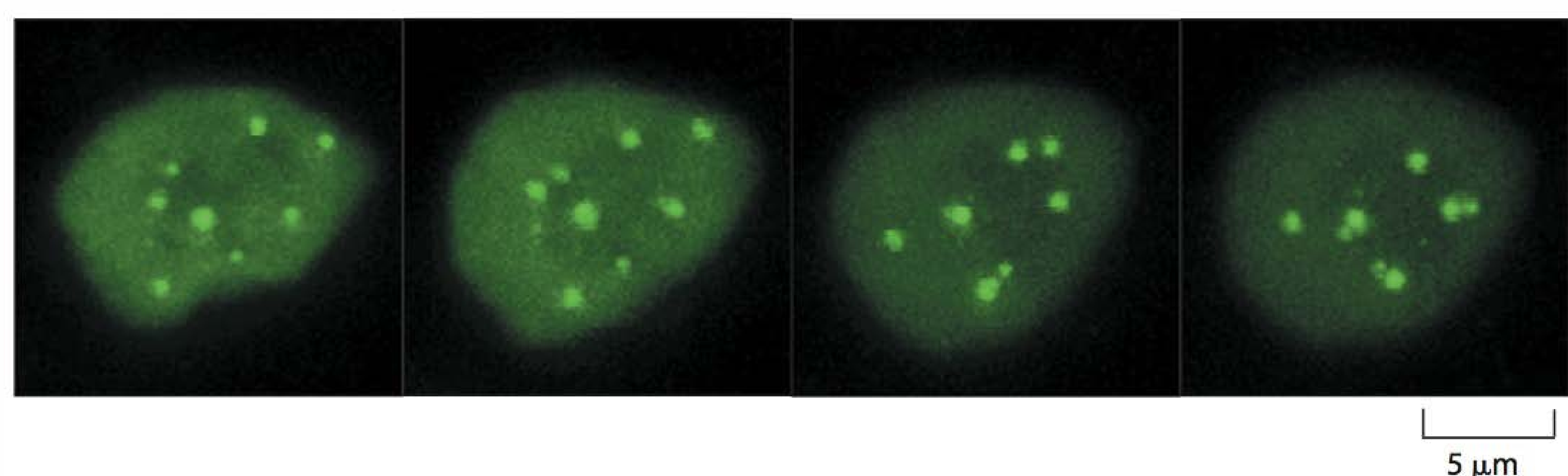


Figura 9-27 Dinâmica da marcação com GFP. Esta sequência de micrografias mostra um conjunto de imagens tridimensionais de um núcleo vivo obtidas no espaço de uma hora. As células de tabaco foram estavelmente transformadas com GFP fusionada a uma proteína do spliceossomo concentrada em pequenos corpos nucleares chamados de corpos de Cajal (ver Figura 6-48). Os corpos de Cajal fluorescentes, facilmente visíveis em uma célula viva com microscopia confocal, são estruturas dinâmicas que se movem em voltas dentro do núcleo. (Cortesia de Kurt Boundock, Liam Dolan e Peter Shaw.)

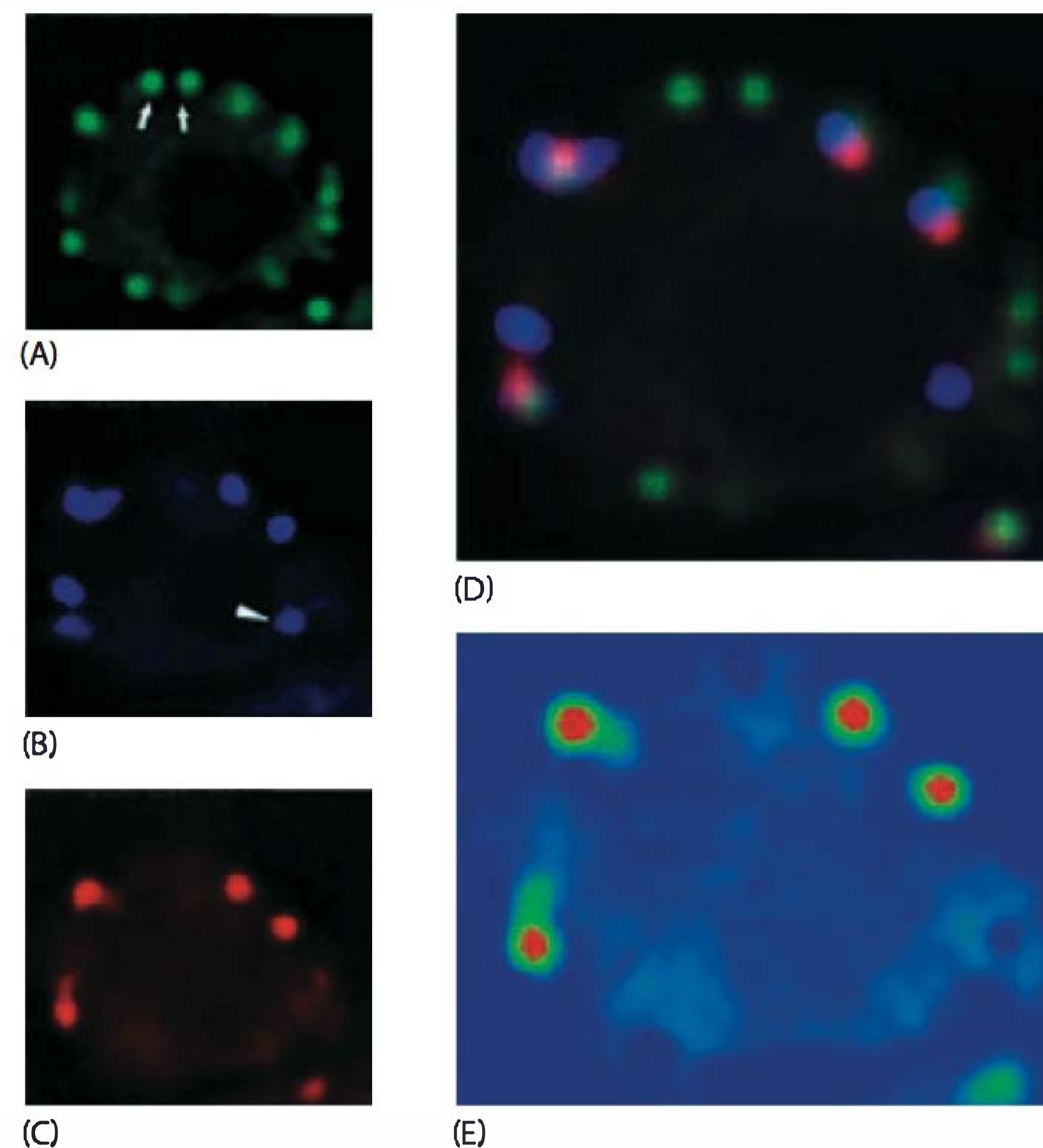


Figura 9-28 Imagem por transferência de energia ressonante fluorescente (FRET). Este experimento mostra que uma proteína chamada de Sla1p interage fortemente com uma outra proteína, chamada de Abp1p, envolvida na ligação da actina cortical na superfície de uma célula de levedura em brotamento. A Sla1p é expressa na célula de levedura (A) como uma proteína de fusão com uma variante de GFP amarela (YFP, *yellow fluorescent protein*), enquanto Abp1p é expressa como uma proteína de fusão (B) com uma variante de GFP azul-esverdeada (CFP, *cyan fluorescent protein*). O sinal FRET (ver também Figura 8-26), mostrado aqui em *vermelho* (C), é obtido pelo excitamento de CFP, mas captando apenas a fluorescência emitida de YFP, que ocorrerá apenas quando as duas moléculas estiverem fortemente associadas (dentro de 0,5 nm). Os pontos no córtex (D), vistos quando (A), (B) e (C) estão sobrepostos, são de três tipos, aqueles onde Sla1p está sozinha (*setas* em A), aqueles onde Abp1p está sozinha (*setas* em B) e aqueles onde elas estão intimamente associadas e geram um sinal FRET, mostrado na imagem falsamente corada e corrigida (E). Uma vez que já se sabia que Sla1p faz parte da maquinaria endocítica, este experimento conecta fisicamente esse processo com o processo de ligação da actina ao córtex da célula. (De D. T. Warren et al., *J. Cell Sci.* 115:1703-1715, 2002. Com permissão de The Company of Biologists.)

cada se torna fluorescente, de modo que seu movimento ao longo dos microtúbulos do fuso pode ser prontamente seguido (**Figura 9-29**).

Um desenvolvimento mais recente na fotoativação é a descoberta de que os genes que codificam para GFP e as proteínas fluorescentes relacionadas podem ser mutados para produzir proteínas variantes, normalmente com um único aminoácido alterado, que fluorescem apenas de modo fraco sob condições de excitação normais, mas podem ser induzidas a fluorescer fortemente por ativação com um forte pulso de luz em um comprimento de onda diferente. Em princípio, o microscopista pode então seguir o comportamento local *in vivo* de qualquer proteína que possa ser expressa como uma fusão com uma dessas variantes de GFP. Essas proteínas fluorescentes fotoativáveis, geneticamente codificadas, evitam dessa forma a necessidade de introduzir a sonda na célula e permitem que o tempo de vida e o comportamento de qualquer proteína seja estudado independentemente de outras proteínas recém-sintetizadas (**Figura 9-30**).

Uma terceira maneira de explorar GFP fusionada a uma proteína de interesse é usar um feixe de luz focalizado a partir de um *laser* para extinguir a fluorescência da GFP em uma região específica da célula. Pela análise da forma de como as moléculas fluorescentes restantes se movem para as áreas esbranquiçadas em função do tempo, podemos obter informações sobre os parâmetros de cinética das proteínas. Essa técnica, normalmente realizada com um microscópio confocal, é conhecida como **recuperação da fluorescência após fotodegradação** (**FRAP**, *fluorescence recovery after photobleaching*) e, como na fotoativação, pode fornecer muitos dados valiosos sobre a proteína de interesse, como coeficientes de difusão, velocidades de transporte ativo ou velocidades de ligação e dissociação de outras proteínas (**Figura 9-31**).

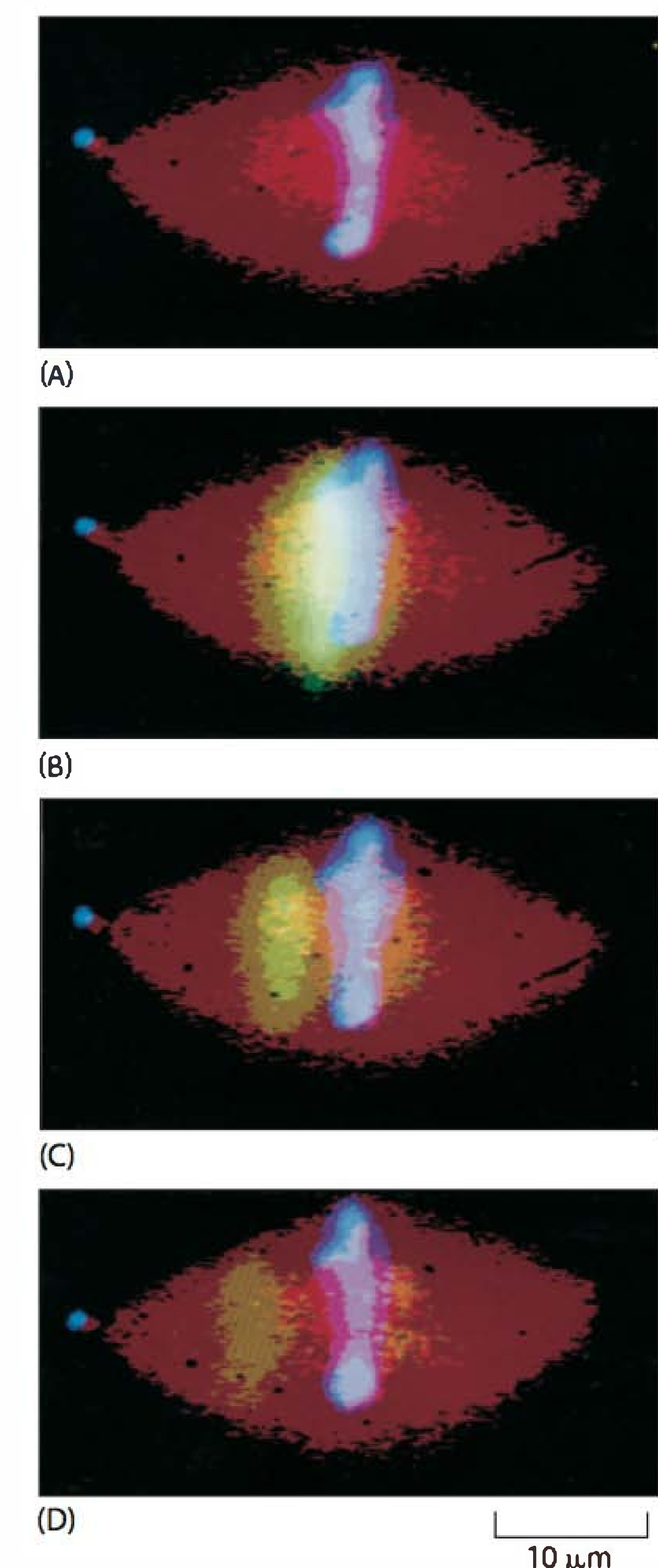


Figura 9-29 Determinação do fluxo de microtúbulos no fuso mitótico utilizando fluoresceína encarcerada ligada à tubulina. (A) Um fuso metafásico formado *in vitro* a partir de extrato de ovos de *Xenopus* incorporou três marcadores fluorescentes: tubulina marcada com rodamina (*vermelho*) para marcar todos os microtúbulos, um corante *azul*, que se liga ao DNA, marcando os cromossomos e tubulina marcada com fluoresceína encarcerada, que também é incorporada em todos os microtúbulos, mas é invisível, pois não fluoresce enquanto não for ativada por luz ultravioleta. (B) Um feixe de luz UV é utilizado para libertar a tubulina marcada com fluoresceína encarcerada, no local exato, principalmente do lado esquerdo da placa de metáfase. Pelos próximos poucos minutos (depois de 1,5 minuto em C, depois de 2,5 minutos em D), o sinal da tubulina marcada com fluoresceína libertada se move em direção ao polo esquerdo do fuso, indicando que a tubulina está se movendo continuamente em direção ao polo mesmo que o fuso (visualizado pela fluorescência *vermelha* da tubulina marcada com rodamina) permaneça imóvel. (De K. E. Sawin e T. J. Mitchison, *J. Cell Biol.* 112:941-954, 1991. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

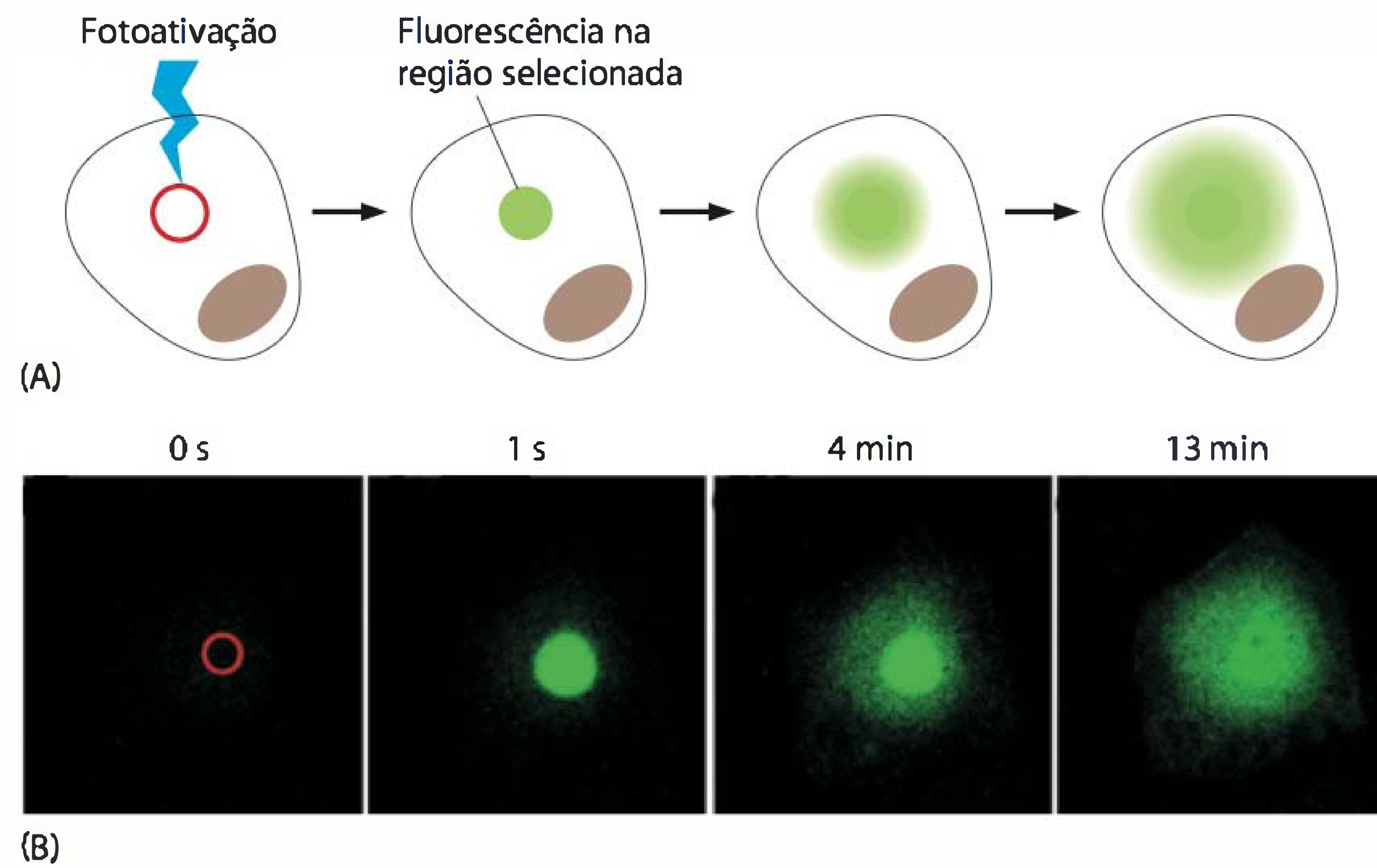


Figura 9-30 Fotoativação. Fotoativação é a ativação induzida por luz de uma molécula inerte para um estado ativo. Neste experimento, uma variante fotoativável de GFP é expressa em uma célula animal cultivada. Antes da ativação (tempo zero), pouca ou nenhuma fluorescência de GFP é detectada na região selecionada (*círculo vermelho*) quando excitada por luz azul a 488 nm. Entretanto, após ativação da GFP, usando um pulso de UV a *laser* a 413 nm, ela rapidamente fluoresce brilhante na região selecionada (*verde*). O movimento de GFP, à medida que ela se difunde para fora desta região, pode ser medido. Uma vez que apenas as proteínas fotoativadas são fluorescentes dentro da célula, as vias de tráfego, de modificação e de degradação das proteínas podem ser monitoradas. (B, de J. Lippincott-Schwartz e G. H. Patterson, *Science* 300:87-91, 2003. Com permissão de AAAS.)

Indicadores emissores de luz podem medir as alterações rápidas nas concentrações intracelulares de íons

Uma maneira para estudar a química de uma única célula viva é inserir a ponta de vidro de um **microeletrodo** sensível a íons diretamente no interior da célula, através da membrana plasmática. Essa técnica é utilizada para medir as concentrações intracelulares de íons inorgânicos comuns, como H^+, Na^+, K^+, Cl^- e Ca^{2+}. Entretanto, os microeletrodos sensíveis a íons revelam a concentração de íons apenas em um ponto na célula e, para um íon presente em concentrações muito baixas, como o Ca^{2+}, suas respostas são lentas e, às vezes, irregulares. Desse modo, esses microeletrodos não são adequados para registrar as mudanças rápidas e transitórias na concentração do Ca^{2+} citosólico que tem um papel importante em permitir que as células respondam a sinais extracelulares. Estas alterações podem ser analisadas com o uso de **indicadores sensíveis a íons**, dos quais a emissão de luz reflete a concentração local do íon. Alguns desses indicadores são luminescentes (emitem luz espontaneamente), enquanto outros são fluorescentes (emitem luz quando expostos à luz).

Aequorina é uma proteína luminescente isolada de água-viva marinha; ela emite luz na presença de Ca^{2+} e responde a alterações na concentração de Ca^{2+} na faixa de 0,5 a 10 μM. Quando microinjetada em um ovo, por exemplo, a aequorina emite um brilho de luz em resposta a uma liberação localizada repentina de Ca^{2+} livre para dentro do citoplasma que ocorre quando o ovo é fertilizado (**Figura 9-32**). A aequorina também foi expressa transgenicamente em plantas e em outros organismos para possibilitar um método de monitorar Ca^{2+} em todas suas células, sem a necessidade da microinjeção, o qual pode ser um procedimento difícil.

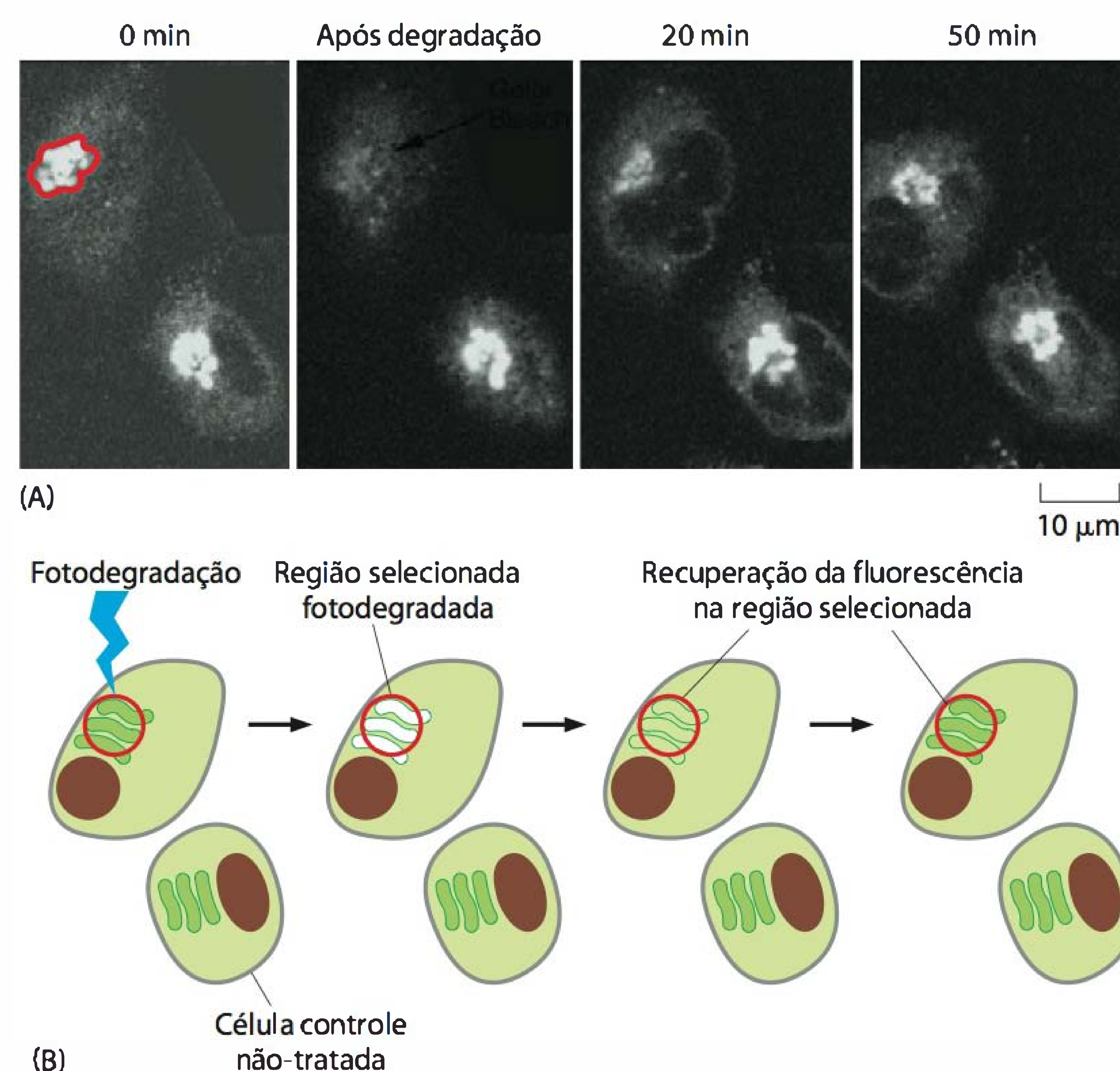


Figura 9-31 Recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP). Um pulso forte de luz *laser* focalizado extinguirá, ou esbranquiçará, a fluorescência da GFP. Pela fotodegradação seletiva de um grupo de moléculas proteicas marcadas fluorescentemente dentro de uma região definida da célula, o microscopista pode monitorar a recuperação com o tempo, à medida que as moléculas fluorescentes restantes se movem para dentro da região esbranquiçada. O experimento mostrado em (A) utiliza células de macaco em cultura que expressam galactosil-transferase, uma enzima que se recicla constantemente entre o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático (RE). O aparelho de Golgi em uma das duas células é fotodegradado seletivamente, enquanto a produção de nova proteína fluorescente é bloqueada pelo tratamento das células com cicloexamida. A recuperação, resultante de moléculas de enzima fluorescentes que se movem do RE para o Golgi, pode então ser acompanhada por um período de tempo. (B) Diagrama esquemático do experimento mostrado em (A). (A, de J. Lippincott-Schwartz et al., *Histochem. Cell Biol.* 116:97-107, 2001. Com permissão de Springer-Verlag.)

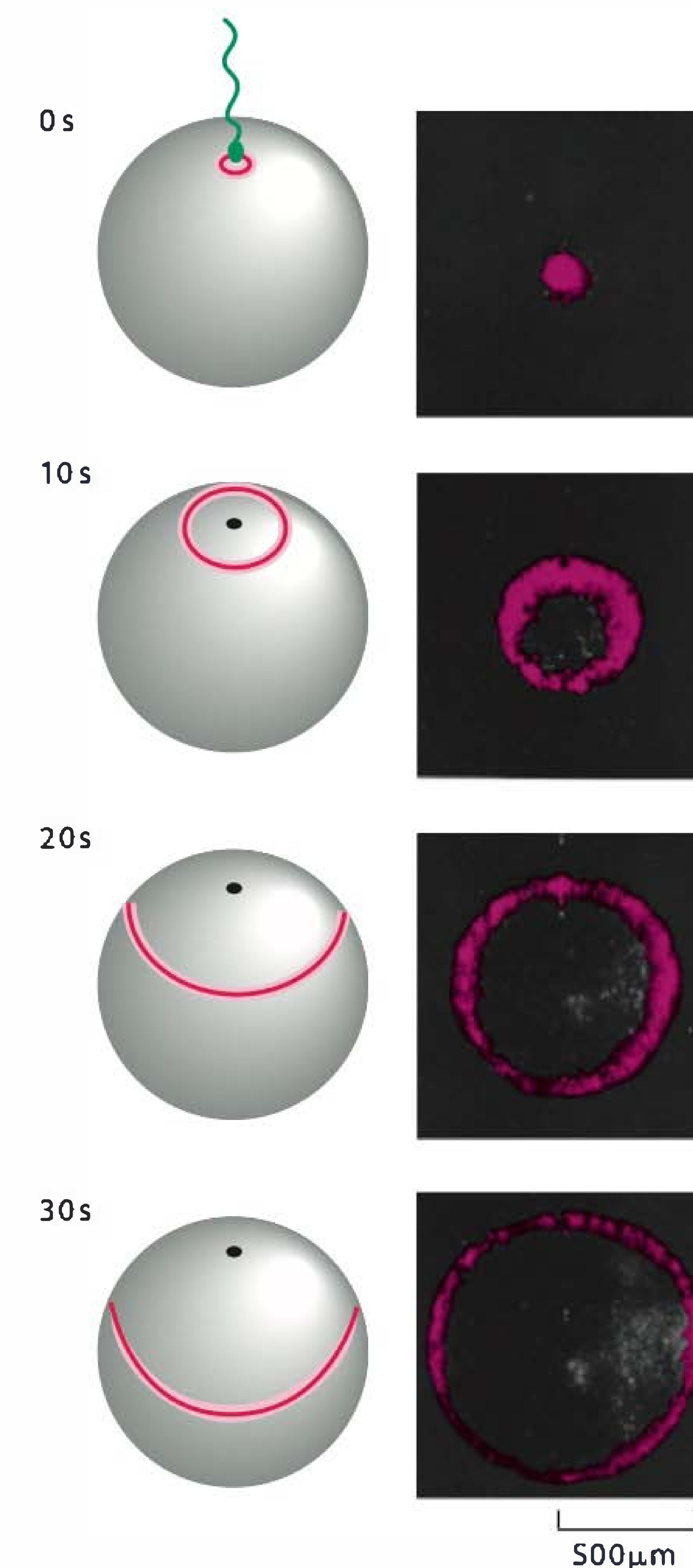


Figura 9-32 Aequorina, uma proteína luminescente. A proteína luminescente aequorina emite luz na presença de Ca^{2+} livre. Aqui, um óvulo do peixe Medaka foi injetado com aequorina, que se difundiu através do citosol, e foi então fertilizado com um espermatozoide e examinado com a ajuda de uma câmara muito sensível. As quatro fotografias foram tiradas pelo lado de entrada do espermatozoide, a intervalos de 10 segundos, e revelam uma onda de liberação de Ca^{2+} para o citosol a partir de reservatórios internos localizados logo abaixo da membrana plasmática. Esta onda se move pelo óvulo, começando a partir do lado da entrada do espermatozoide, como indicado nos diagramas à *esquerda*. (Fotografia reproduzida de J. C. Gilkey, L. F. Jaffe, E. B. Ridgway e G. T. Reynolds, *J. Cell Biol.* 76:448-466, 1978. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

As moléculas bioluminescentes, como a aequorina, emitem ínfimas quantidades de luz – no máximo, uns poucos fótons por molécula indicadora – difíceis de serem medidas. Indicadores fluorescentes produzem ordens de magnitude a mais de fótons por molécula; dessa maneira, são mais fáceis de serem medidos e podem dar uma resolução espacial melhor. Indicadores fluorescentes de Ca^{2+} têm sido sintetizados. Eles ligam Ca^{2+} mais firmemente e são excitados ou emitem luz em comprimentos de onda levemente diferentes quando estão livres de Ca^{2+} do que quando estão na forma ligada ao Ca^{2+}. Medindo a proporção na intensidade da fluorescência em dois comprimentos de onda de excitação ou de emissão, podemos determinar a proporção entre a concentração do indicador ligado a Ca^{2+} e do indicador livre de Ca^{2+}, provendo, desse modo, uma medida acurada da concentração de Ca^{2+} livre. Os indicadores deste tipo são amplamente utilizados na monitoração, a cada segundo, das mudanças na concentração de Ca^{2+} intracelular em diferentes partes de uma célula visualizada em um microscópio de fluorescência (**Figura 9-33**).

Os indicadores fluorescentes similares medem outros íons; alguns detectam H^+, por exemplo, e assim o pH intracelular. Alguns destes indicadores podem entrar nas células por difusão, portanto não precisam ser microinjetados; isso possibilita monitorar grandes números de células individuais simultaneamente em um microscópio de fluorescência. Novos tipos de indicadores, utilizados em conjunto com métodos modernos de processamento de imagem, estão levando a métodos similarmente rápidos e precisos para analisar mudanças na concentração de vários tipos de pequenas moléculas nas células.

Várias estratégias estão disponíveis para que substâncias às quais a membrana é impermeável possam ser introduzidas nas células

Frequentemente é útil introduzir moléculas às quais as membranas são impermeáveis em células vivas, podendo ser elas anticorpos que reconhecem proteínas intracelulares, proteínas celulares normais rotuladas com marcadores fluorescentes, ou moléculas que influenciam o comportamento celular. Uma abordagem é microinjetar as moléculas na célula com uma micropipeta de vidro.

Quando microinjetados em uma célula, anticorpos podem bloquear a função da molécula que eles reconhecem. Anticorpos antimiosina II injetados em um óvulo fertilizado de ouriço-do-mar, por exemplo, impedem que a célula do ovo se divida em duas, mesmo que a divisão nuclear ocorra normalmente. Esta observação demonstra que essa miosina tem um papel essencial no processo contrátil que divide o citoplasma durante a divisão celular, mas que não é necessária à divisão nuclear.



Figura 9-33 Visualização de concentrações de Ca^{2+} intracelular utilizando um indicador fluorescente. A árvore ramificada de dendritos de uma célula de Purkinje no cerebelo recebe mais de 100 mil sinapses a partir de outros neurônios. O estímulo, a partir da célula, é convergido ao longo de um único axônio, visto deixando o corpo da célula na parte inferior desta fotografia. Esta imagem da concentração de Ca^{2+} intracelular em uma única célula de Purkinje (do cérebro de uma cobaia) foi obtida com o uso de uma câmara com pouca luz e o indicador fluorescente sensível a Ca^{2+}, fura-2. A concentração de Ca^{2+} livre está representada por diferentes cores, *vermelho* para a mais alta e *azul* para a mais baixa. Os níveis mais altos de Ca^{2+} estão presentes em milhares de ramificações dendríticas. (Cortesia de D. W. Tank, J. A. Connor, M. Sugimori e R. R. Llinas.)

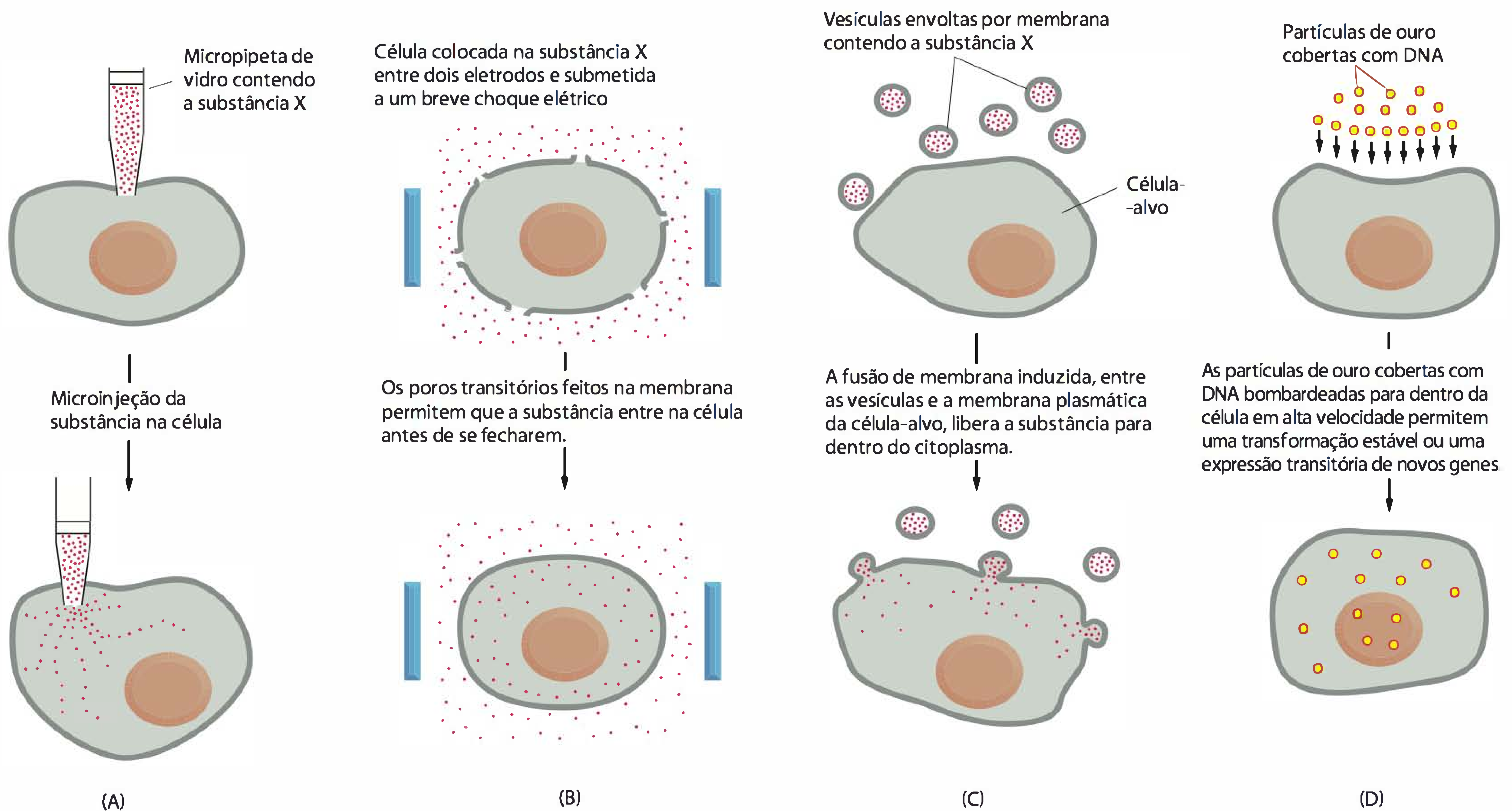


Figura 9-34 Métodos para introduzir na célula uma substância à qual a membrana é impermeável. (A) A substância é injetada com uma micropipeta aplicando pressão ou, se a substância for eletricamente carregada, com aplicação de uma voltagem que impulsiona a substância para dentro da célula como uma corrente iônica (uma técnica chamada de *iontoforese*). (B) A membrana celular se torna transitoriamente permeável à substância por meio do rompimento da estrutura da membrana com um breve, porém intenso, choque elétrico (2.000V/cm durante 200 μseg, p. ex.). (C) As vesículas envoltas por membranas são carregadas com a substância desejada e então induzidas a fusionar com as células-alvo. (D) As partículas de ouro cobertas com DNA são utilizadas para introduzir um novo gene no núcleo.

A microinjeção, embora amplamente utilizada, requer que cada célula seja injetada individualmente; portanto, torna-se possível o estudo de no máximo umas poucas centenas de células de cada vez. Outras abordagens permitem que grandes populações de células sejam permeabilizadas simultaneamente. A ruptura parcial da estrutura da membrana plasmática da célula, por exemplo, a torna mais permeável; isso normalmente é conseguido utilizando-se um choque elétrico potente ou um composto químico, como baixas concentrações de detergente. A técnica elétrica tem a vantagem de criar grandes poros na membrana plasmática, sem danificar as membranas intracelulares. Dependendo do tipo de célula e do tamanho do choque elétrico, os poros permitem até mesmo que macromoléculas entrem (e saiam) do citosol rapidamente. Este processo de *eletroporação* também é valioso em genética molecular, como uma maneira de introduzir moléculas de DNA nas células. Com um tratamento limitado, uma fração grande de células repara sua membrana plasmática e sobrevive.

Um terceiro método para introduzir grandes moléculas nas células é fazer com que vesículas membranosas contendo essas moléculas fusionem-se com a membrana plasmática da célula e liberem seu conteúdo. Esse método é utilizado rotineiramente para liberar ácidos nucleicos para dentro de células de mamíferos, tanto DNA para estudos de transfecção como RNA para experimentos de RNAi (discutido no Capítulo 8). No campo da medicina, esse método também está sendo explorado para a liberação direcionada de novos fármacos.

Finalmente, DNA e RNA, cobertos por minúsculas partículas de ouro, também podem ser fisicamente introduzidos em células simplesmente bombardeando-os a uma alta velocidade. Células vivas bombardeadas com esses ácidos nucleicos cobertos com partículas de ouro (tipicamente menos de 1 μm de diâmetro) podem incorporar sucessivamente o RNA (usado para estudos de expressão transiente ou RNAi p. ex.) ou o DNA (para transfecção estável) introduzido. Esses quatro métodos, ilustrados na **Figura 9-34**, são amplamente utilizados em biologia celular.

A luz pode ser utilizada para manipular objetos microscópicos e obter sua imagem

Os fótons transportam uma pequena quantidade de momentum. Isso significa que um objeto que absorve ou deflete um feixe de luz sofre uma pequena força. Com fontes comuns de luz, essa pressão de radiação é muito pequena para ser significativa. Contudo, ela é impor-

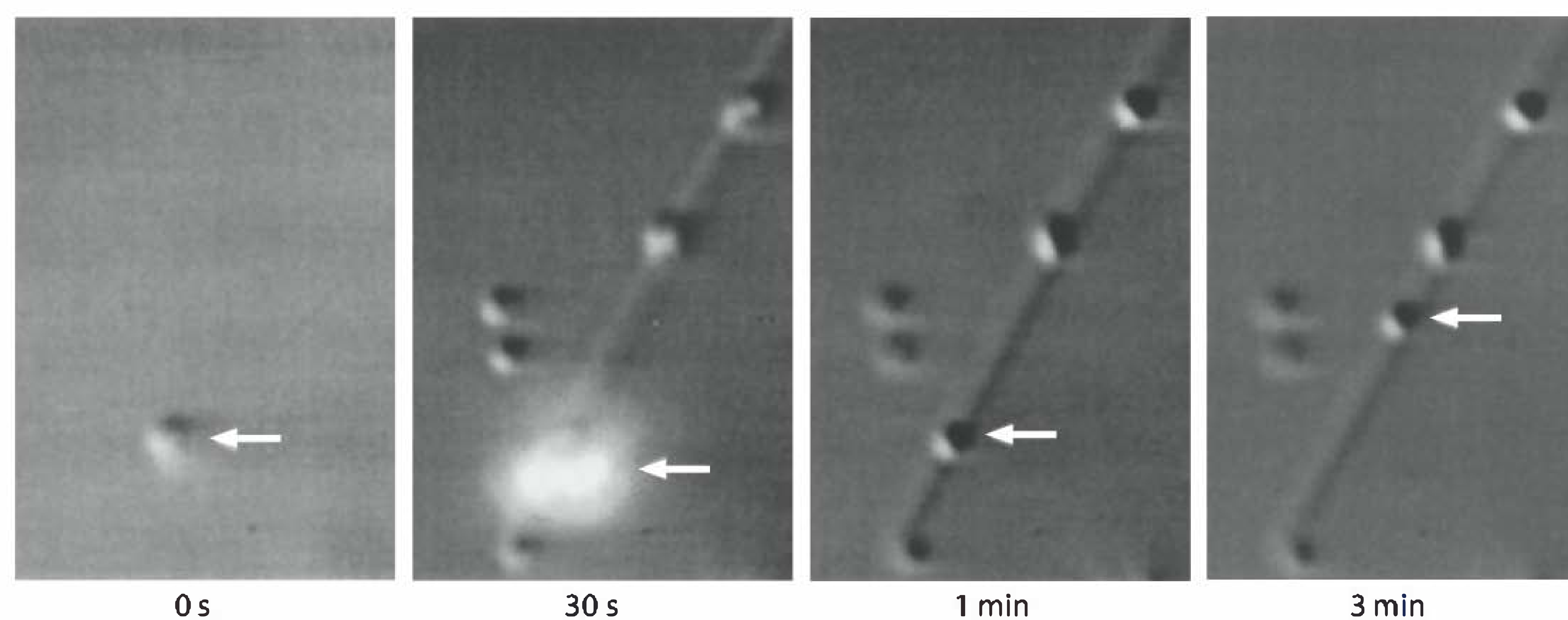


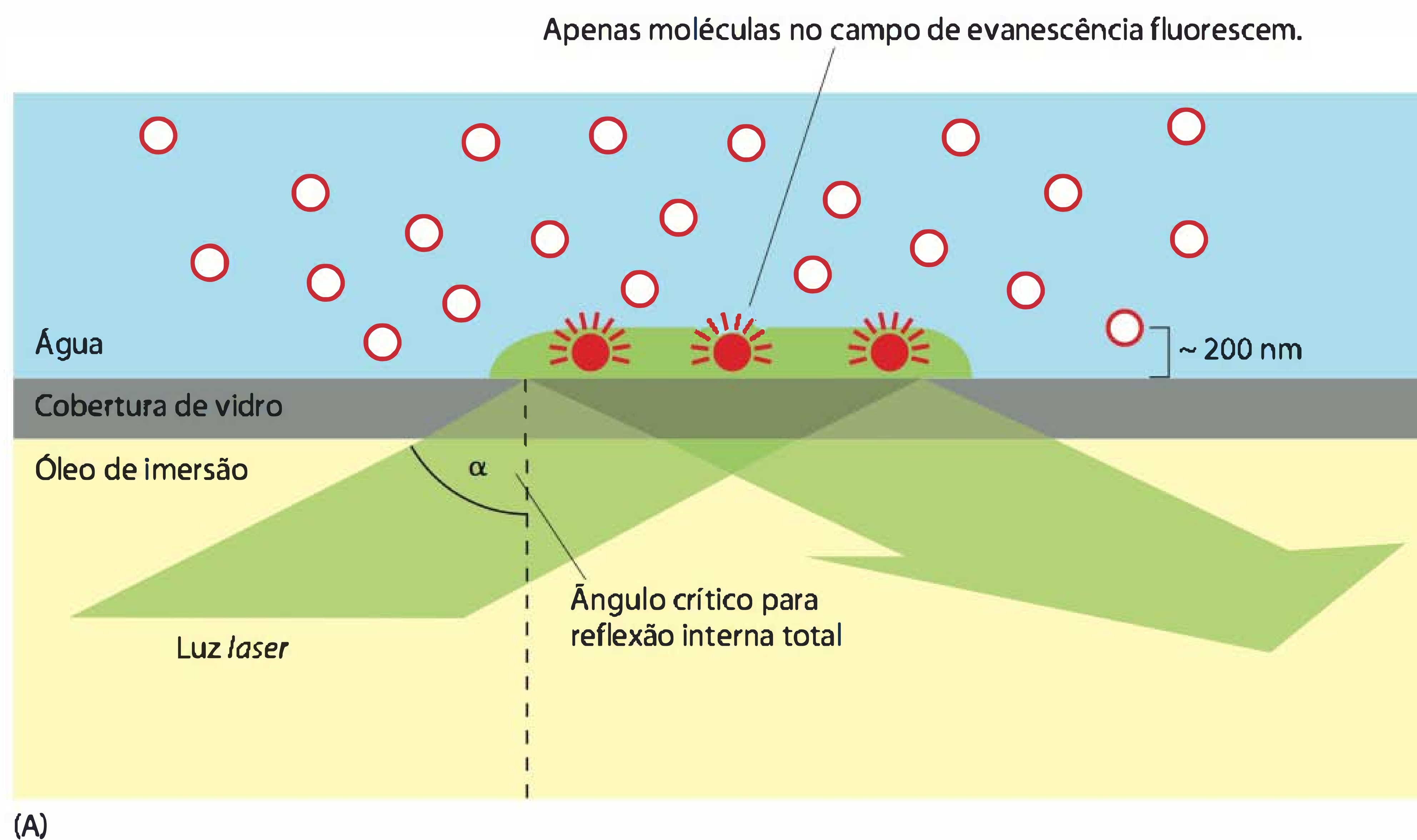
Figura 9-35 Pinças ópticas. Um feixe de *laser* focalizado pode ser usado para capturar partículas microscópicas e movimentá-las ao seu desejo. Neste experimento, tais pinças ópticas são utilizadas para pegar uma pequena esfera de sílica (0,2 nm, *seta*), coberta por poucas moléculas de cinesina (0 s), e colocá-la sobre um axonema ciliar isolado constituído por microtúbulos (30 s). O halo brilhante, visto aqui, é a reflexão do *laser* na interface entre a água e a lamínula. A cinesina sobre a esfera liberada (1 min) une a hidrólise de ATP ao movimento ao longo dos microtúbulos do axonema, fornecendo energia para o transporte da esfera ao longo dele (3 min). (De S. M. Block et al., *Nature* 348:348-352, 1990. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

tante em uma escala cósmica (auxiliando a prevenir colapsos gravitacionais dentro das estrelas) e, mais modestamente, em um laboratório de biologia celular, onde um feixe de *laser* intenso focalizado pode exercer forças grandes o suficiente para empurrar pequenos objetos que estejam ao redor da célula para dentro dela. Se o feixe de *laser* é focalizado em um objeto que tem um índice de refração maior do que seus arredores, ele é refratado, fazendo com que vários fótons mudem de direção. O padrão de deflexão de fótons mantém o objeto no foco do feixe; se ele começar a se afastar dessa posição, ele é empurrado de volta pela pressão da radiação atuando mais fortemente em um lado do que no outro. Desse modo, governando um feixe de *laser* focalizado, normalmente um *laser* infravermelho que é pouco absorvido pelos constituintes celulares, pode-se criar "**pinças ópticas**" para mover objetos subcelulares, como organelas e cromossomos. Este método, às vezes chamado de pinças a *laser*, tem sido utilizado para medir as forças exercidas por uma única molécula de actina-miosina, por microtúbulos motores únicos e pela RNA-polimerase (**Figura 9-35**).

Feixes intensos de *laser* focalizado, que são mais fortemente absorvidos por material biológico, também podem ser utilizados como facas ópticas – para matar células individuais, para cortar ou queimar orifícios nelas, ou para separar um componente intracelular de outro. Dessa maneira, os recursos ópticos fornecem um conjunto de ferramentas básicas para a microcirurgia celular.

Moléculas únicas podem ser visualizadas utilizando-se a microscopia de fluorescência de reflexão interna total

Enquanto esferas podem ser utilizadas como marcadores para acompanhar os movimentos de proteínas, é preferível ser capaz de visualizar as próprias proteínas. Em princípio, isso pode ser conseguido marcando-se a proteína com uma molécula fluorescente, ligando-se quimicamente uma molécula fluorescente pequena a moléculas proteicas isoladas ou expressando-se construções de proteínas de fusão fluorescentes (ver p. 593). Entretanto, em microscópios comuns, moléculas fluorescentes únicas não podem ser prontamente detectadas. A limitação não está relacionada ao limite de resolução, mas, ao contrário, surge da interferência de luz emitida pelas moléculas fora de foco que tendem a apagar a fluorescência a partir de determinada molécula de interesse. Esse problema pode ser solucionado pelo uso de uma técnica óptica especializada chamada de microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF, *total internal reflectance fluorescence*). Em um microscópio TIRF, a luz do *laser* incide sobre a superfície da cobertura de vidro no ângulo crítico preciso no qual a reflexão interna total ocorre (**Figura 9-36**A). Por causa da reflexão interna total, a luz não penetra a amostra e, por isso, a maioria das moléculas fluorescentes não é iluminada. Entretanto, a energia eletromagnética não se estende, como um campo de evanescência, por uma distância muito curta além da superfície da cobertura de vidro e para dentro da amostra, permitindo que apenas aquelas moléculas na camada mais próxima à superfície tornem-se excitadas. Quando essas moléculas fluorescem, sua luz emitida não está mais competindo com a luz fora de foco das moléculas que estão acima, podendo então ser detectadas. TIRF permitiu vários experimentos surpreendentes, como obtenção de imagens de proteínas motoras únicas se movendo ao longo de microtúbulos ou de filamentos de actina únicos se formando e se ramificando, apesar de no momento a técnica estar restrita a uma estreita camada a apenas 100 ou 200 nm da superfície celular (Figura 9-36B e C).



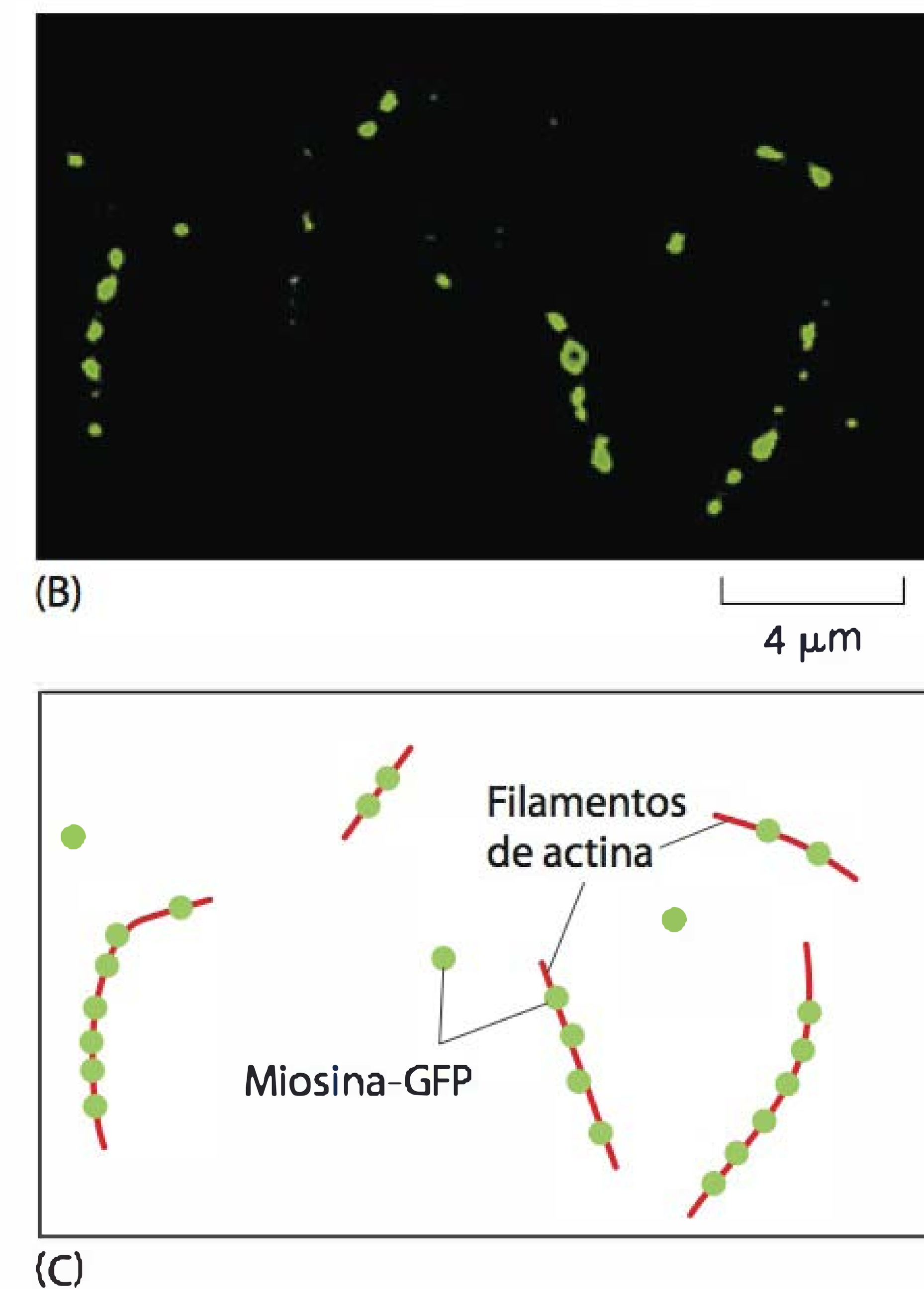


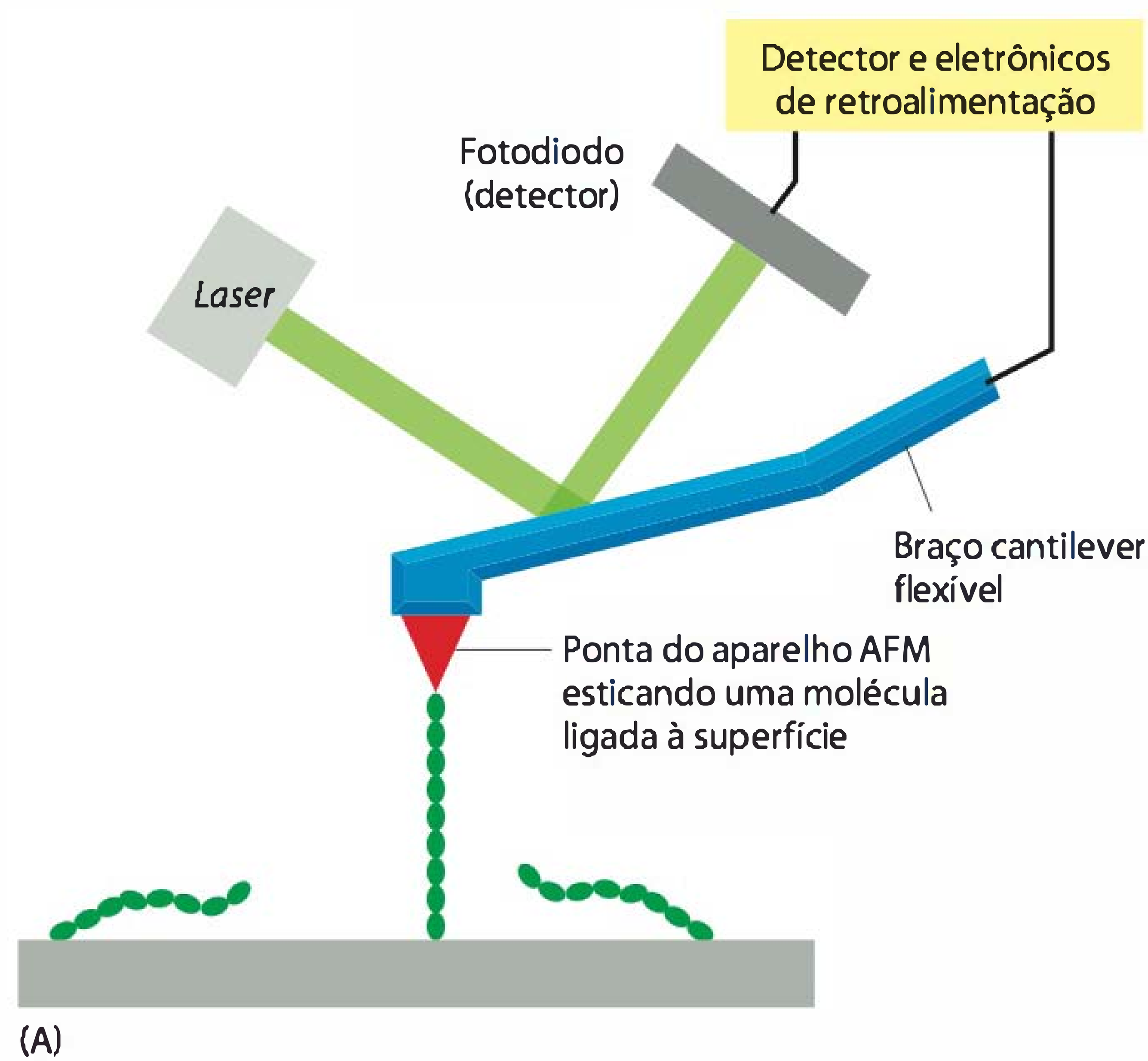
Figura 9-36 A microscopia TIRF permite a detecção de moléculas fluorescentes únicas. (A) A microscopia TIRF utiliza luz *laser* excitatória para iluminar a superfície da cobertura de vidro no ângulo crítico no qual toda a luz é refletida pela interface entre o vidro e a água. Parte da energia eletromagnética se estende por uma curta distância através da interface como uma onda de evanescência que excita apenas moléculas que estão muito próximas à superfície. (B) A microscopia TIRF é utilizada aqui para obter a imagem de moléculas de miosina-GFP individuais (*pontos verdes*) ligadas a filamentos de actina não-fluorescentes (C), que são invisíveis, mas grudadas à superfície da cobertura de vidro. (Cortesia de Dmitry Cherny e Clive R. Bagshaw.)

Moléculas individuais podem ser tocadas e movidas pelo uso da microscopia de força atômica

Enquanto TIRF permite que moléculas individuais sejam visualizadas, esse é apenas um método estritamente passivo. Com o objetivo de investigar a função molecular, é útil ser capaz de manipular as próprias moléculas individuais, e a microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*) fornece um método para realizar isto. Em um aparelho AFM, uma ponta muito pequena e bastante pontiaguda de silício ou nitreto de silício é feita usando-se métodos de nanofabricação similares àqueles usados na indústria de semicondutores. A ponta do aparelho AFM está presa a um braço cantilever flexível montado sobre um sistema muito preciso de posicionamento que permite que ele seja movido sobre distâncias muito pequenas. Além dessa grande capacidade de movimentação precisa, a AFM é capaz de medir a força mecânica sentida pela ponta à medida que ela se move sobre a superfície (**Figura 9-37**A). Quando a AFM foi desenvolvida, a intenção era uma tecnologia de imagem para medir características de escala molecular em uma superfície. Quando utilizada para isso, a sonda é varrida sobre a superfície, movendo-se para cima e para baixo o quanto necessário para manter uma força de interação constante com a superfície, revelando assim quaisquer objetos como proteínas que possam estar presentes na superfície que seria de outra forma plana (ver Figuras 10-14 e 10-32). Entretanto, a AFM não está limitada a superfícies de imagem simples e também pode ser usada para pegar e mover moléculas individuais, em uma versão de escala molecular das pinças ópticas descritas anteriormente. Usando-se essa tecnologia, as propriedades mecânicas de moléculas proteicas individuais podem ser medidas com detalhes. Por exemplo, a AFM tem sido usada para desdobrar uma molécula proteica individual com o objetivo de medir a energia do dobramento do domínio (Figura 9-37B). O potencial total para examinar proteínas mecanicamente, assim como para montar proteínas individuais em arranjos definidos usando-se AFM, está apenas começando a ser explorado, mas ao que parece essa ferramenta se tornará muito importante no futuro.

As moléculas podem ser marcadas com radioisótopos

Como vimos, em biologia celular é importante determinar as quantidades de moléculas específicas e saber onde elas estão nas células e como seu nível e sua localização se alteram em resposta a sinais extracelulares. As moléculas de interesse variam de pequenos íons inorgânicos, como Ca^{2+} ou H^+, a grandes macromoléculas, como proteínas específicas, RNAs ou sequências de DNA. Até o momento descrevemos como métodos sensíveis de fluorescência podem ser utilizados para analisar esses tipos de moléculas, e para seguir o comportamento dinâmico de várias delas em células vivas. Para terminar este capítulo, descreveremos como os radioisótopos são utilizados para traçar o caminho de moléculas específicas através da célula.



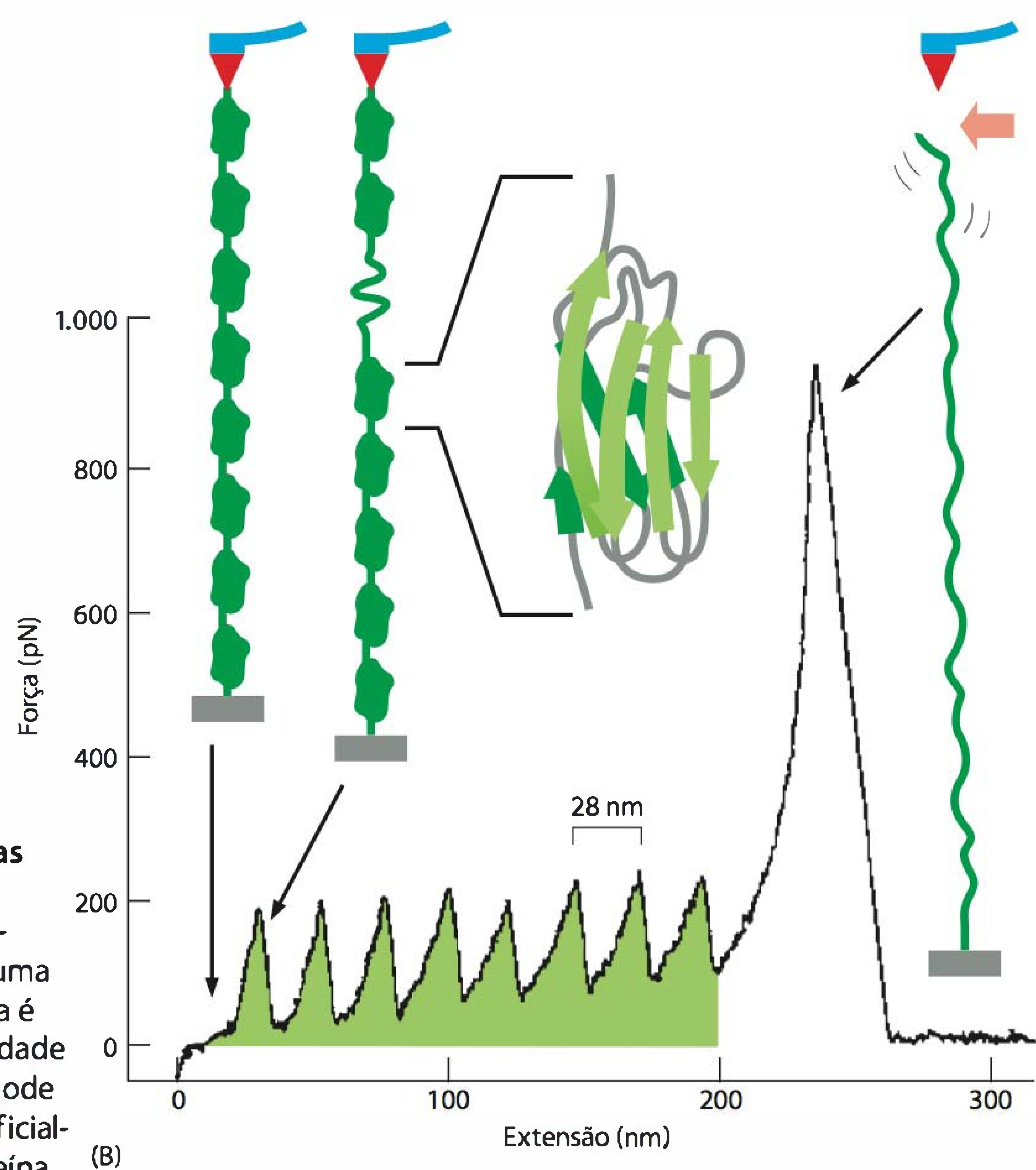


Figura 9-37 Moléculas proteicas individuais podem ser manipuladas por microscopia de força atômica. (A) Diagrama esquemático dos componentes-chave de um microscópio de força atômica (AFM), mostrando a ponta, que reconhece a força, ligada a uma extremidade de uma molécula proteica individual no experimento descrito em (B). (B) Titina é uma molécula proteica enorme que supre o músculo com sua elasticidade passiva (ver Figura 16-76). A capacidade de extensão dessa proteína pode ser testada diretamente usando-se uma proteína curta produzida artificialmente que contém oito domínios Ig repetidos de uma região da proteína titina. Neste experimento, a ponta da AFM é usada para pinçar e esticar progressivamente uma única molécula até que ela finalmente se rompa. Como uma força é aplicada, cada domínio Ig repentinamente começa a se desdobrar, e a força necessária em cada caso (cerca de 200 pN) pode ser obtida. A região da curva de força-extensão mostrada em *verde* capta o evento de desdobramento sequencial para cada um dos oito domínios da proteína. (Adaptada de W. A. Linke et al., *J. Struct. Biol.* 137:194-205, 2002. Com permissão de Elsevier.)

A maioria dos elementos que ocorrem naturalmente é uma mistura de isótopos levemente diferentes. Eles diferem uns dos outros na massa do seu núcleo atômico, mas, por terem o mesmo número de prótons e de elétrons, têm as mesmas propriedades químicas. Nos isótopos radiativos, ou radioisótopos, o núcleo é instável e se desintegra aleatoriamente para produzir um átomo diferente. Durante essas desintegrações, são liberadas tanto partículas subatômicas energéticas, como os elétrons, quanto radiações, como os raios gama. Utilizando a síntese química para incorporar um ou mais átomos radiativos em moléculas pequenas de interesse, como um açúcar ou um aminoácido, o percurso dessa molécula (e de átomos específicos nela) pode ser traçado durante qualquer reação biológica.

Apesar de a ocorrência de radioisótopos naturais ser rara (dada a sua instabilidade), eles podem ser produzidos em grandes quantidades em reatores nucleares, nos quais átomos estáveis são bombardeados com partículas de alta energia. Como resultado, os radioisótopos de vários elementos biologicamente importantes estão disponíveis comercialmente (**Tabela 9-1**). A radiação que eles emitem é detectada de várias maneiras. Os elétrons (partículas β) podem ser detectados em um contador Geiger, pela ionização que eles produzem em um gás, ou podem ser medidos em um contador de cintilações, pela pequena quantidade de luz que induzem no fluido de cintilação. Esses métodos tornam possível medir, com acuidade, a quantidade de um radioisótopo em particular presente em uma amostra biológica. Utilizando microscopia óptica ou eletrônica também é possível determinar a localização de um radioisótopo em uma amostra por autorradiografia, como descreveremos a seguir. Todos esses métodos de detecção são extremamente sensíveis: em circunstâncias favoráveis, quase toda desintegração – e desse modo cada átomo radiativo que decai – pode ser detectada.

Tabela 9-1 Alguns radioisótopos de uso comum em pesquisa biológica

Isótopo	Meia-vida
^{32}P	14 dias
^{131}I	B,1 dias
^{35}S	B7 dias
^{14}C	5.570 anos
^{45}Ca	164 dias
^{3}H	12,3 anos

Os isótopos estão organizados em ordem decrescente de energia da radiação β (elétrons) que emitem. ^{131}I também emite radiação γ. A meia-vida é o tempo necessário para que 50% dos átomos de um isótopo se desintegrem.

Os radioisótopos são utilizados para acompanhar moléculas em células e em organismos

Um dos usos mais antigos de radiatividade em biologia foi para traçar a via química do carbono durante a fotossíntese. Algas verdes unicelulares foram mantidas em uma atmosfera contendo CO_2 ($^{14}CO_2$), marcado radiativamente, e em diferentes intervalos de tempo depois de serem expostas à luz solar, o seu conteúdo solúvel foi separado por cromatografia em papel. Pequenas moléculas contendo átomos de ^{14}C derivados de CO_2 foram detectadas por uma folha de filme fotográfico colocada sobre o cromatograma seco. Dessa maneira, foi identificada a maioria dos principais componentes na via fotossintética, do CO_2 até o açúcar.

As moléculas radiativas podem ser utilizadas para seguir o curso de quase qualquer proteína na célula. Em um experimento típico, as células são suplementadas com uma molécula precursora na forma radiativa. As moléculas radiativas misturam-se com as preexistentes, não-marcadas; ambas são tratadas identicamente pela célula, já que diferem somente no peso do seu núcleo atômico. As alterações na localização ou na forma química das moléculas radiativas podem ser seguidas em função do tempo. A resolução de tais experimentos frequentemente é aumentada utilizando-se um protocolo de marcação do tipo pulso-caça, no qual o material radiativo (o pulso) é adicionado por somente um breve período e então retirado e substituído por moléculas não-radiativas (a caça). São coletadas amostras a intervalos regulares, e a forma química ou a localização da radiatividade é identificada para cada amostra (**Figura 9-38**). Os experimentos de pulso-caça, combinados com autorradiografia, têm sido importantes, por exemplo, na elucidação da via tomada por proteínas secretadas do RE até o exterior da célula.

A marcação radioisotópica é um meio inigualável para diferenciação entre moléculas quimicamente idênticas, mas que têm histórias diferentes – por exemplo, aquelas que diferem em seu tempo de síntese. Dessa maneira, foi mostrado que quase todas as moléculas em uma célula viva estão continuamente sendo degradadas e recolocadas, mesmo quando a célula não está em crescimento e está aparentemente em um estado de equilíbrio. Essa "*modificação*", que às vezes acontece muito lentamente, seria quase que impossível de ser detectada sem radioisótopos.

Atualmente, quase todas as pequenas moléculas mais comuns estão disponíveis no comércio na forma radiativa e praticamente qualquer molécula biológica, não importa quão complicada, pode ser marcada radiativamente. Os compostos podem ser feitos com átomos radiativos incorporados em posições particulares em sua estrutura, permitindo que os destinos distintos de partes diferentes da mesma molécula sejam seguidos durante as reações biológicas (**Figura 9-39**).

Como mencionado anteriormente, um dos usos importantes da radiatividade na biologia celular é localizar um composto radiativo em secções de células intactas ou em tecidos por autorradiografia. Nesse procedimento, as células vivas são expostas brevemente a um pulso de um composto radiativo específico e então incubadas por um período variável – para dar tempo a elas de incorporarem o composto – antes de serem fixadas e processadas para microscopia óptica ou eletrônica. Cada preparação é então coberta com uma camada fina de emulsão fotográfica e deixada no escuro durante vários dias, durante os quais o radioisótopo decai. A emulsão é revelada e a posição da radiatividade em cada célula é indicada pela posição dos grânulos de prata revelados (ver Figura 5-29). Se as células forem expostas a ^{3}H-timidina, um precursor radiativo de DNA, por exemplo, podemos mostrar que o DNA é sintetizado no núcleo e lá permanece (**Figura 9-40**). Contrariamente, se células são expostas a ^{3}H-uridina, um precursor radiativo de RNA, observamos que o RNA é inicialmen-

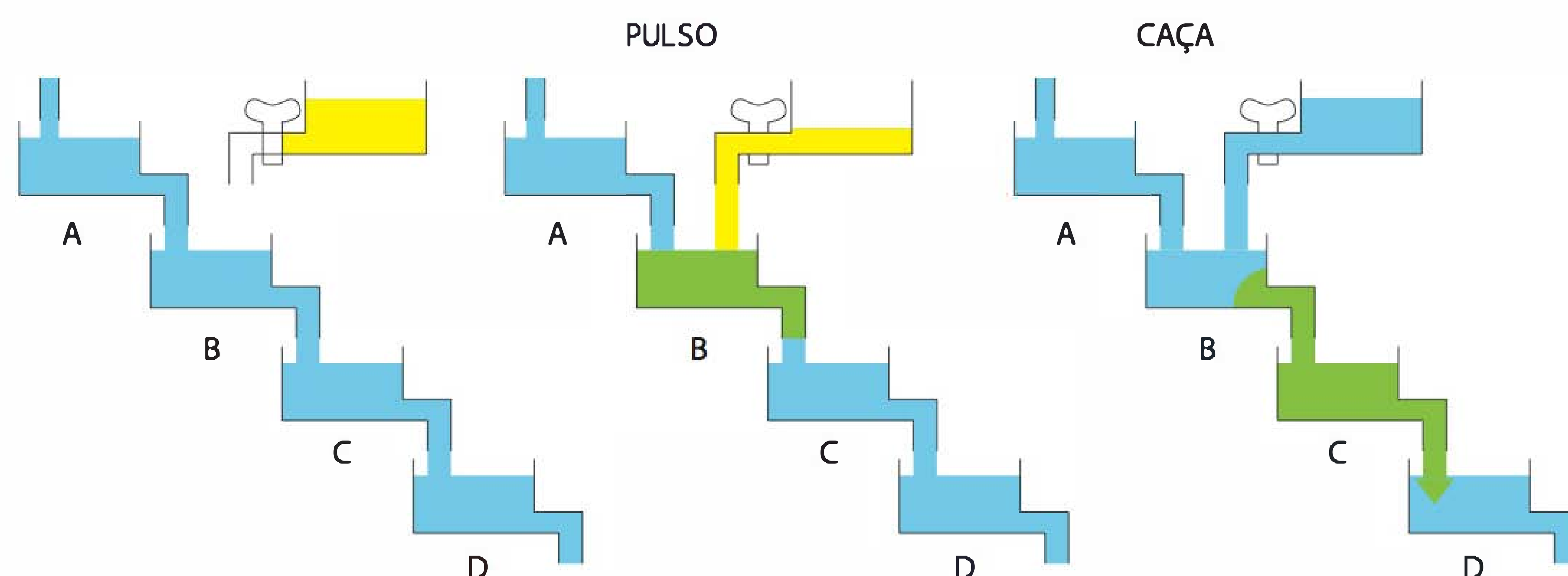


Figura 9-38 Lógica de um experimento típico de pulso-caça utilizando radioisótopos. As câmaras marcadas com A, B, C e D representam, cada uma, diferentes compartimentos na célula (detectados por autorradiografia ou por experimentos de fracionamento celular) ou diferentes compostos químicos (detectados por cromatografia ou outros métodos químicos).

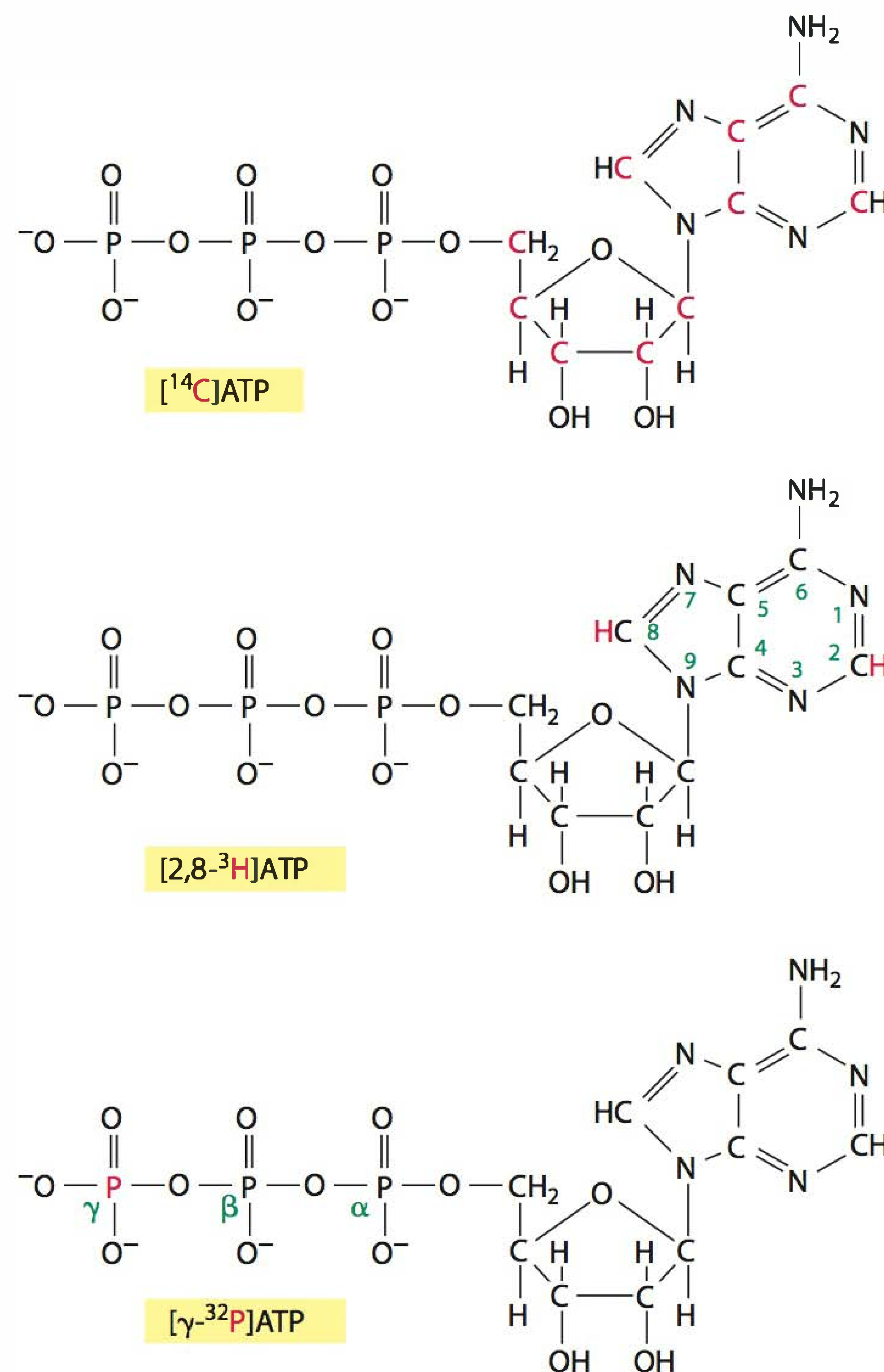


Figura 9-39 Moléculas marcadas radioisotopicamente. Três formas radiativas de ATP, disponíveis comercialmente, com os átomos radiativos em *vermelho*. A nomenclatura utilizada para identificar a posição e o tipo dos átomos radiativos também é mostrada.

te sintetizado no núcleo (ver Figura 4-62) e depois move-se rapidamente para o citoplasma. As moléculas marcadas radiativamente também podem ser detectadas por autorradiografia após serem separadas de outras moléculas por eletroforese em gel: a posição das proteínas (ver Figura 8-23) e dos ácidos nucleicos (ver Figura 8-33A) comumente é detectada em géis por esse processo.

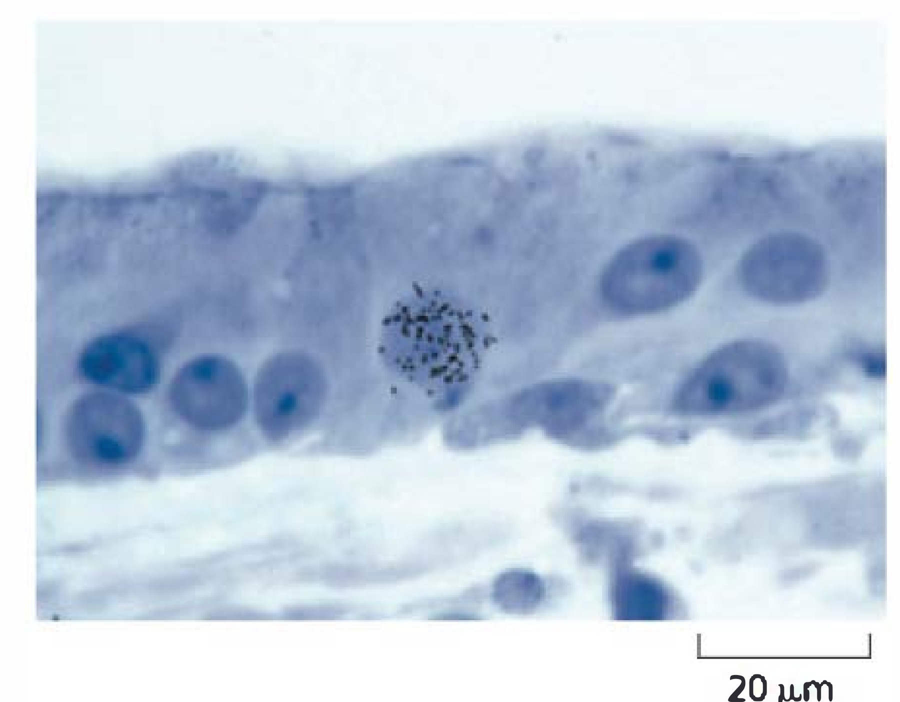


Figura 9-40 Autorradiografia. Este tecido foi exposto por um breve período a ^{3}H-timidina. Células que estão replicando seu DNA incorporam esse precursor de DNA marcado radiativamente em seu núcleo e podem ser subsequentemente visualizadas por autorradiografia. Os grânulos de prata, vistos como *pontos pretos* na emulsão fotográfica sobre a secção, revelam quais células estavam sintetizando novo DNA. O núcleo marcado mostrado aqui se encontra no epitélio sensorial do ouvido interno de uma galinha. (Cortesia de Mark Warchol e Jeffrey Corwin.)

Resumo

Várias técnicas de microscopia óptica estão disponíveis para observar as células. As células que foram fixadas e coradas podem ser estudadas no microscópio óptico convencional, enquanto os anticorpos ligados a corantes fluorescentes podem ser utilizados para localizar moléculas específicas nas células em um microscópio de fluorescência. As células vivas podem ser vistas em microscópios de contraste de fase, de contraste de interferência diferencial, de campo escuro ou de campo claro. Todas as formas de microscopia óptica são facilitadas pelas técnicas de processamento eletrônico de imagem que aumentam a sensibilidade e aperfeiçoam a imagem. Tanto a microscopia confocal como a deconvolução de imagem fornecem secções ópticas delgadas e podem ser utilizadas para reconstruir imagens tridimensionais.

Atualmente existem técnicas disponíveis para detectar, medir e seguir quase que qualquer molécula em uma célula viva. Os corantes indicadores fluorescentes podem ser introduzidos para medir as concentrações de íons específicos em células individuais ou em partes diferentes de uma célula. Proteínas fluorescentes são sondas especialmente versáteis que podem ser anexadas a outras proteínas por meio de manipulação genética. Praticamente qualquer proteína de interesse pode ser modificada geneticamente para uma proteína de fusão fluorescente e então visualizada em células vivas por microscopia de fluorescência. O comportamento dinâmico e as interações de várias moléculas podem agora ser acompanhados em células vivas por variações no uso de proteínas-alvo fluorescentes, em alguns casos ao nível de moléculas únicas. Os isótopos radiativos de vários elementos também podem ser utilizados para seguir o destino de moléculas específicas, tanto bioquímica como microscopicamente.

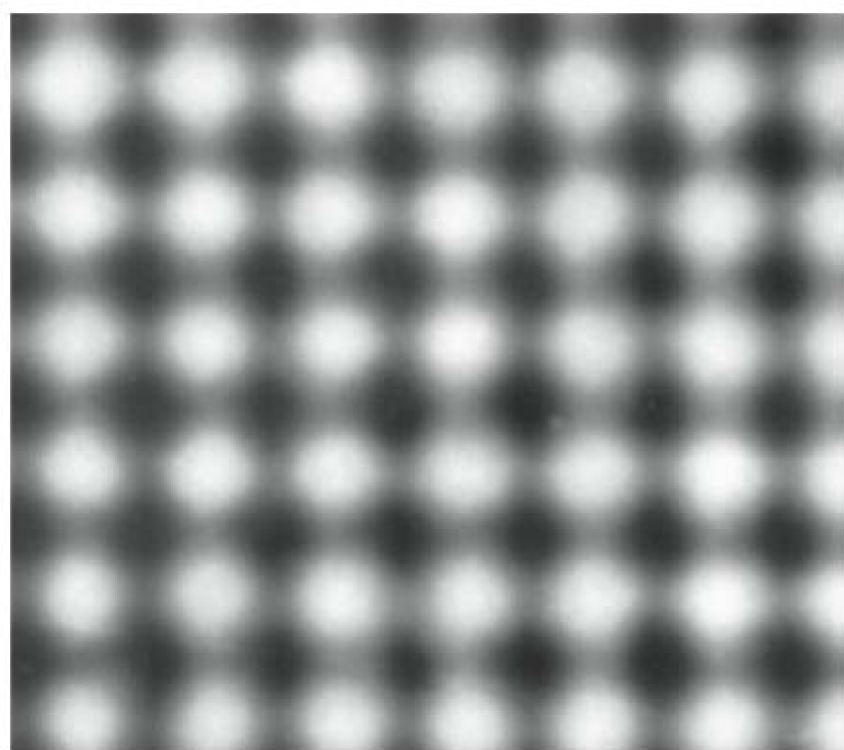


Figura 9-41 Limite de resolução do microscópio eletrônico. Esta micrografia eletrônica de transmissão de uma camada delgada de ouro mostra as fileiras individuais de átomos no cristal como pontos luminosos. A distância entre as fileiras adjacentes de átomos de ouro é de cerca de 0,2 nm (2 Å). (Cortesia de Graham Hills.)

VISUALIZAÇÃO DE CÉLULAS E MOLÉCULAS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

A microscopia óptica é limitada na fineza dos detalhes que ela pode revelar. Microscópios que utilizam outros tipos de radiação – em particular, microscópios eletrônicos – podem resolver estruturas muito menores do que as possíveis com luz visível. Essa resolução mais alta tem um custo: a preparação da amostra para microscopia eletrônica é muito mais complexa e é mais difícil de se ter certeza de que a imagem visualizada corresponde precisamente à estrutura real sendo examinada. Entretanto, agora é possível usar um congelamento muito rápido para preservar fielmente estruturas para microscopia eletrônica. A análise da imagem digital pode ser utilizada para reconstruir objetos tridimensionais pela combinação de informações de várias partículas individuais ou a partir de múltiplas imagens de um único objeto. Juntas, essas abordagens estão estendendo a resolução e a área da microscopia eletrônica até o ponto no qual podemos começar a obter imagens fiéis das estruturas de macromoléculas individuais e dos complexos que elas formam.

O microscópio eletrônico resolve a estrutura fina da célula

A relação entre o limite de resolução e o comprimento de onda de uma radiação luminosa (ver Figura 9-6) é verdadeira para qualquer forma de radiação, seja ela um feixe de luz, seja um feixe de elétrons. Com elétrons, entretanto, o limite de resolução pode ser muito pequeno. O comprimento de onda de um elétron diminui com o aumento da sua velocidade. Em um **microscópio eletrônico** com uma voltagem de aceleração de 100.000 V, o comprimento de onda de um elétron é de 0,004 nm. Teoricamente, a resolução de um microscópio destes deveria ser de cerca de 0,002 nm, 100 mil vezes maior do que a do microscópio óptico. Entretanto, devido ao fato de as aberrações de uma lente de elétrons serem mais difíceis de corrigir do que aquelas produzidas por uma lente de vidro, o poder de resolução da maioria dos microscópios eletrônicos mais modernos é, nas melhores condições, 0,1 nm (1 Å) (**Figura 9-41**). Isso acontece porque apenas o centro das lentes de elétrons pode ser utilizado e a abertura numérica efetiva é minúscula. Ainda mais, os problemas na preparação de amostra, no contraste e nos danos causados pela radiação geralmente têm limitado a resolução efetiva normal para materiais biológicos para 1 nm (10 Å). Contudo, esse valor é cerca de 200 vezes melhor do que a resolução do microscópio óptico. Além disso, em anos recentes, o desempenho dos microscópios eletrônicos foi melhorado pelo desenvolvimento de fontes de iluminação por elétrons, chamadas de canhões de emissão de campo. Essas fontes muito brilhantes e confiáveis podem melhorar substancialmente a resolução alcançada.

No desenho global, o microscópio eletrônico de transmissão (TEM, *transmission electron microscope*) é semelhante a um microscópio óptico, embora seja muito maior

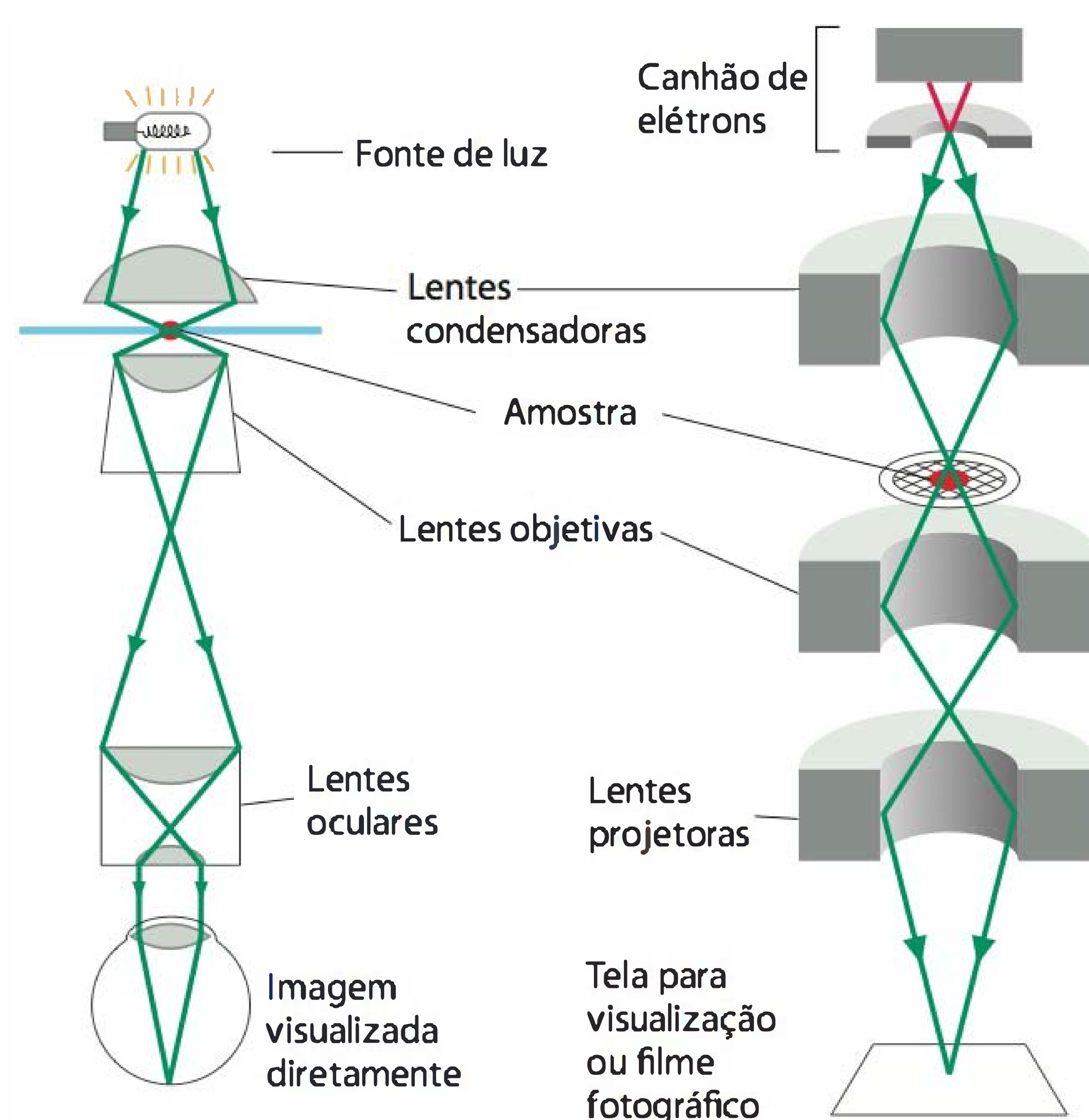




Figura 9-42 As principais características de um microscópio óptico e de um microscópio eletrônico de transmissão. Estes desenhos enfatizam as similaridades entre eles. Enquanto as lentes o microscópio óptico são feitas de vidro, as do microscópio eletrônico são bobinas magnéticas. O microscópio eletrônico requer que a amostra seja colocada no vácuo. A fotografia mostra um microscópio eletrônico de transmissão em uso. (Fotografia cortesia de FEI Company Ltd.)

e "invertido" (**Figura 9-42**). A fonte de iluminação é um filamento ou cátodo que emite elétrons do topo de uma coluna cilíndrica de cerca de 2 m de altura. Como os elétrons são espalhados por colisões com moléculas de ar, o ar precisa primeiro ser bombeado para fora da coluna para criar vácuo. Os elétrons são então acelerados a partir do filamento, por um ânodo próximo, e atravessam um pequeno orifício para formar um feixe de elétrons que desce pela coluna. Bobinas magnéticas, colocadas em intervalos ao longo da coluna, convergem o feixe de elétrons, assim como as lentes de vidro convergem a luz no microscópio óptico. A amostra é colocada no vácuo, por meio de uma câmara de compressão, na trajetória do feixe de elétrons. Como na microscopia óptica, a amostra em geral é corada – neste caso, com material *eletrodenso*, como veremos na próxima seção. Alguns dos elétrons que atravessam a amostra são espalhados pelas estruturas coradas com material eletrodenso; o restante é focado para formar uma imagem de uma maneira análoga ao processo de formação de uma imagem no microscópio óptico. A imagem pode ser observada em uma tela fosforescente ou gravada tanto em uma placa fotográfica como com uma câmera digital de alta resolução. Como os elétrons dispersos são desviados do feixe, as regiões densas da amostra são destacadas como áreas de fluxo reduzido de elétrons, as quais parecem escuras.

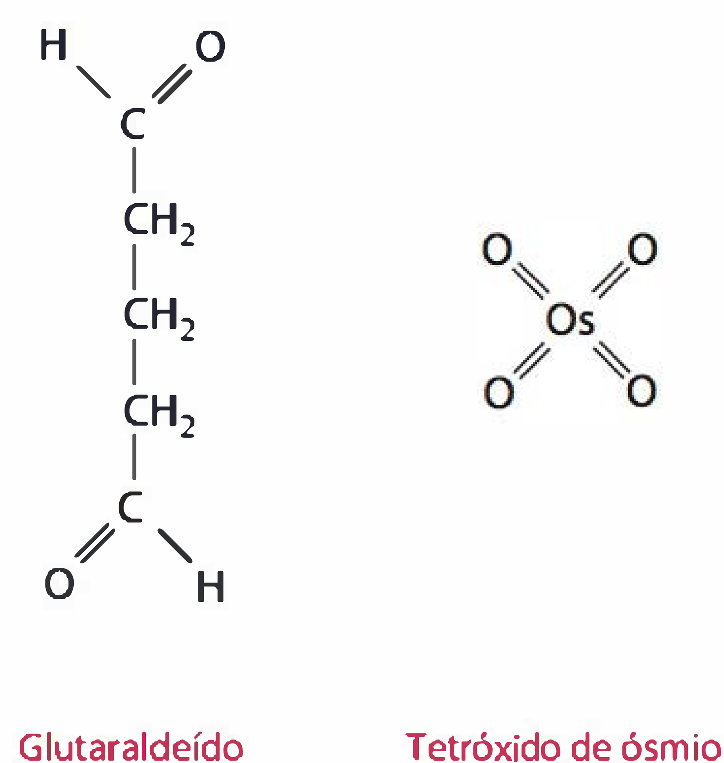


Figura 9-43 Dois fixadores químicos comuns utilizados para microscopia eletrônica. Os dois grupos aldeído reativos do glutaraldeído permitem a formação de ligação cruzada com vários tipos de moléculas, formando ligações covalentes entre elas. O tetróxido de ósmio forma complexos intercruzados com vários compostos orgânicos e torna-se reduzido durante o processo. Esta reação é especialmente útil para a fixação de membranas celulares, uma vez que ligações duplas C=C presentes em vários ácidos graxos reagem com o tetróxido de ósmio.

As amostras biológicas necessitam de preparação especial para o microscópio eletrônico

No início de sua aplicação a materiais biológicos, o microscópio eletrônico revelou muitas estruturas nunca antes imaginadas nas células. Mas antes que estas descobertas pudessem ser feitas, os microscopistas eletrônicos tiveram que desenvolver novos processos para emblocar, cortar e corar os tecidos.

Como a amostra é exposta a alto vácuo no microscópio eletrônico, o tecido vivo normalmente é morto e preservado pela fixação – primeiro com *glutaraldeído*, que faz com que as moléculas de proteína façam ligações covalentemente cruzadas com seus vizinhos, e depois com *tetróxido de ósmio*, que se liga e estabiliza as bicamadas lipídicas, assim como as proteínas (**Figura 9-43**). Como os elétrons têm poder de penetração muito baixo, os tecidos fixados normalmente devem ser cortados em secções extremamente finas (50 a 100 nm de espessura, cerca de 1/200 da espessura de uma única célula) antes de serem visualizados. Isto é conseguido desidratando-se a amostra e permeabilizando-a com uma resina monomérica que polimeriza para formar um bloco sólido de plástico; o bloco é então cortado com uma lâmina de vidro especial, ou de diamante, em um micrótomo especial. Estas *secções finas*, livres de água e outros solventes voláteis, são colocadas em uma pequena grade circular de metal para serem visualizadas ao microscópio (**Figura 9-44**).

As etapas necessárias para preparar o material biológico a ser visualizado ao microscópio eletrônico têm desafiado microscopistas eletrônicos desde o início. Como podemos nos certificar de que a imagem da amostra, fixada, desidratada e emblocada na resina, vista finalmente, confirma qualquer relação com o delicado sistema biológico aquoso que estava presente originalmente na célula viva? As melhores abordagens atuais para esse problema dependem do congelamento rápido. Se um sistema aquoso é resfriado rápido o suficiente para uma temperatura baixa também o suficiente, a água e os outros componentes não têm tempo para se rearranjar ou cristalizar em gelo. Em vez disso, a água é super-resfriada em um estado rígido, mas não cristalino – um "vidro" – chamado de gelo vítreo. Esse estado pode ser alcançado jogando-se a amostra em cima de um bloco de cobre polido e resfriado por hélio líquido, mergulhando-a em um líquido refrigerador ou pulverizando-a com um jato de um líquido refrigerador, como propano líquido, ou resfriando-a sob alta pressão.

Algumas amostras congeladas podem ser examinadas diretamente ao microscópio eletrônico utilizando-se um suporte de amostra especial gelado. Em outros casos, o bloco congelado pode ser fraturado para revelar superfícies internas, ou o gelo ao redor pode ser sublimado para expor superfícies externas. Entretanto, frequentemente queremos examinar cortes finos e corá-los para se obter um contraste adequado na imagem ao microscópio eletrônico (discutido a seguir). Por essa razão, é imprescindível congelar rapidamente o tecido, então substituir a água, mantida no estado vítreo, por solventes orgânicos e, finalmente, emblocar o tecido em resina plástica, cortar as secções e corar. Embora tecnicamente ainda difícil, essa abordagem estabiliza e preserva o tecido em uma condição muito similar ao seu estado original em vida (**Figura 9-45**).

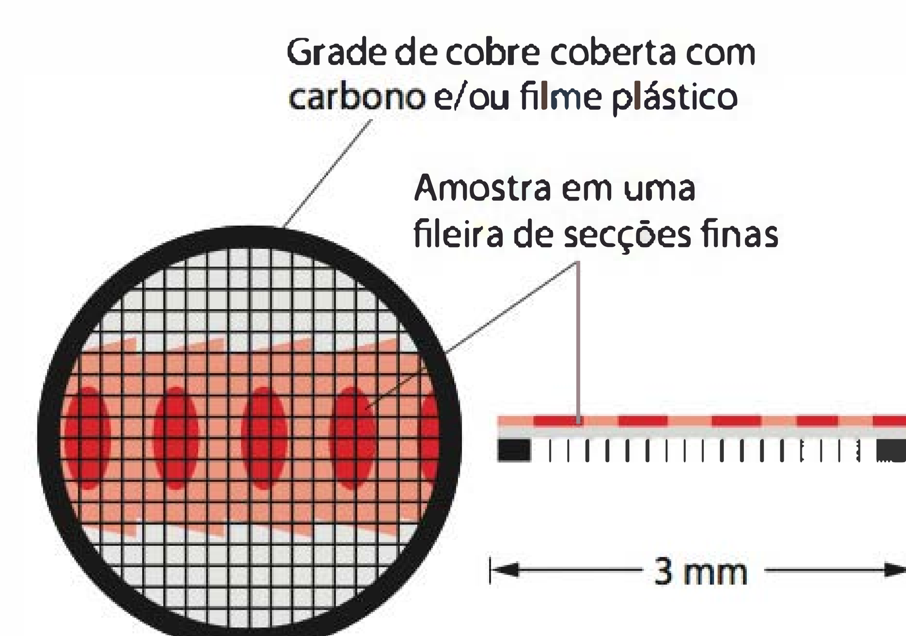


Figura 9-44 A grade de cobre que serve de suporte para as finas secções de uma amostra em um TEM.

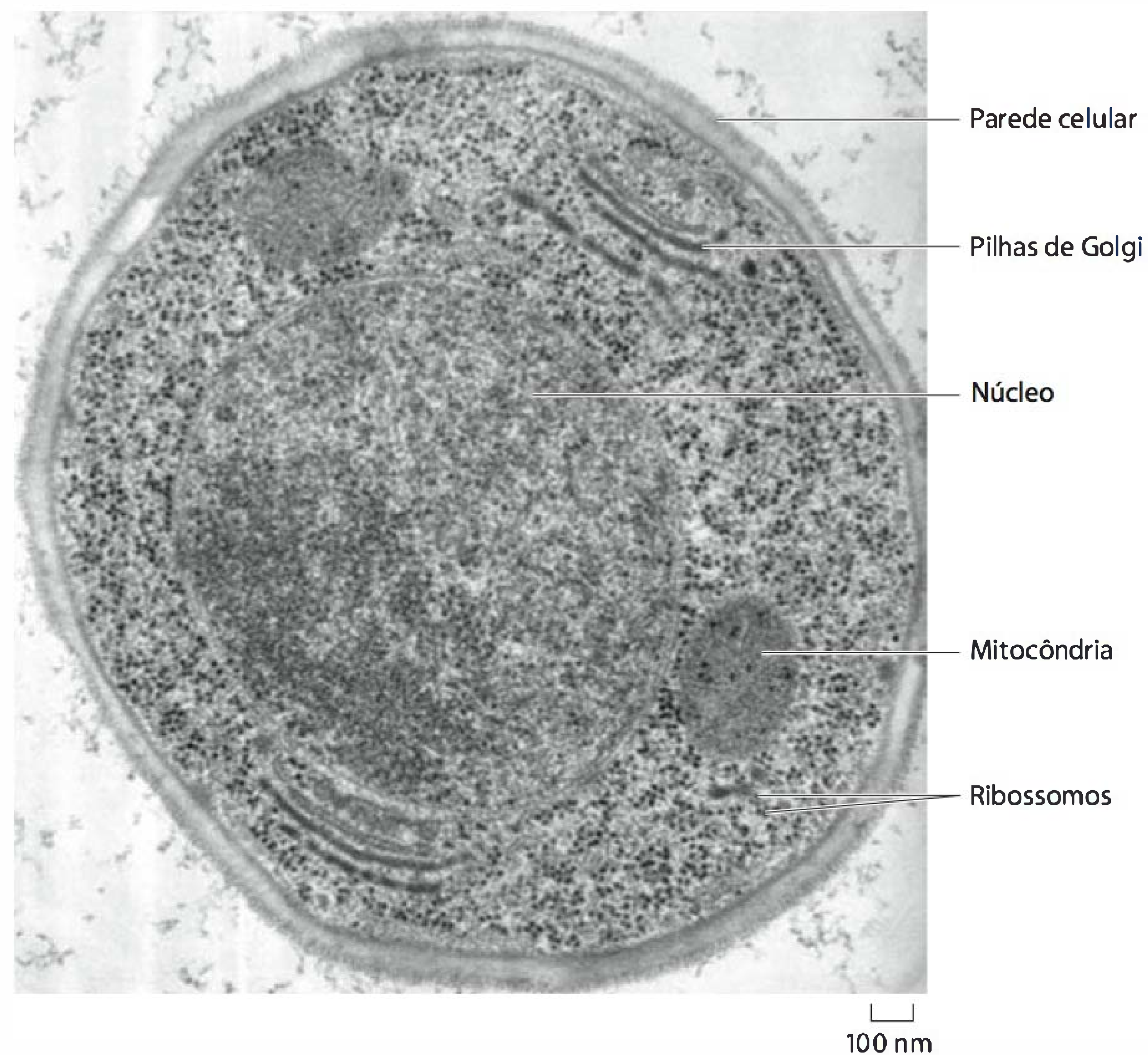


Figura 9-45 Secções finas de uma célula. Esta secção fina é de uma célula de levedura que foi rapidamente congelada e teve seu gelo vítreo substituído por solventes orgânicos e então por resina plástica. Núcleo, mitocôndrias, parede celular, pilhas de Golgi e ribossomos podem ser todos prontamente visualizados em um estado que provavelmente seja o mais parecido possível com o real. (Cortesia de Andrew Staehelin.)

O contraste no microscópio eletrônico depende do número atômico dos átomos na amostra: quanto mais alto o número atômico, mais elétrons são espalhados e maior é o contraste. Os tecidos biológicos são compostos de átomos de número atômico muito baixo (principalmente carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio). Para torná-los visíveis, eles geralmente são impregnados (antes ou depois do corte) com sais de metais pesados, como urânio e chumbo. O grau de impregnação, ou "coloração", com esses sais revela diferentes constituintes celulares com vários graus de contraste. Os lipídeos, por exemplo, tendem a corar mais forte após a fixação com ósmio, revelando a localização das membranas celulares.

As macromoléculas específicas podem ser localizadas por microscopia eletrônica de imunolocalização com ouro

Vimos como os anticorpos podem ser utilizados em conjunto com a microscopia de fluorescência para localizar macromoléculas específicas. Um método análogo – **microscopia eletrônica de imunolocalização com ouro** – pode ser utilizado no microscópio eletrônico. O procedimento usual é incubar uma secção fina com um anticorpo primário específico e depois com um anticorpo secundário ao qual foi acoplada uma partícula de ouro coloidal. A partícula de ouro é eletrodensa e pode ser vista como um ponto preto ao microscópio eletrônico (**Figura 9-46**).

Estes cortes frequentemente falham em transmitir o arranjo tridimensional dos componentes celulares no TEM e podem ser muito enganosos: uma estrutura linear, como um microtúbulo, pode aparecer no corte como um objeto puntiforme, por exemplo, e um corte através de partes protuberantes de um corpo sólido com forma irregular pode dar a aparência de dois ou mais objetos separados. A terceira dimensão pode ser reconstruída a partir de cortes em série (**Figura 9-47**), mas este continua sendo um processo longo e tedioso.

De qualquer maneira, mesmo os cortes finos têm uma profundidade significativa comparada à resolução do microscópio eletrônico, assim eles podem ser enganosos de uma forma oposta. O desenho óptico do microscópio eletrônico – a abertura muito pequena utilizada – produz uma profundidade muito grande do campo. Assim, a imagem visualizada corresponde a uma superposição (uma projeção) das estruturas em diferentes profundidades. Uma complicação adicional para a marcação por imunolocalização com ouro é que os anticorpos e as partículas de ouro coloidal não penetram a resina utilizada para emblocar; assim, eles somente detectam antígenos na superfície do corte. Isso significa que, primeiro, a sensibilidade da detecção é baixa, já que as moléculas de antígenos presentes nas partes mais profundas do corte não são detectadas, e, segundo, pode-se ter uma falsa impressão

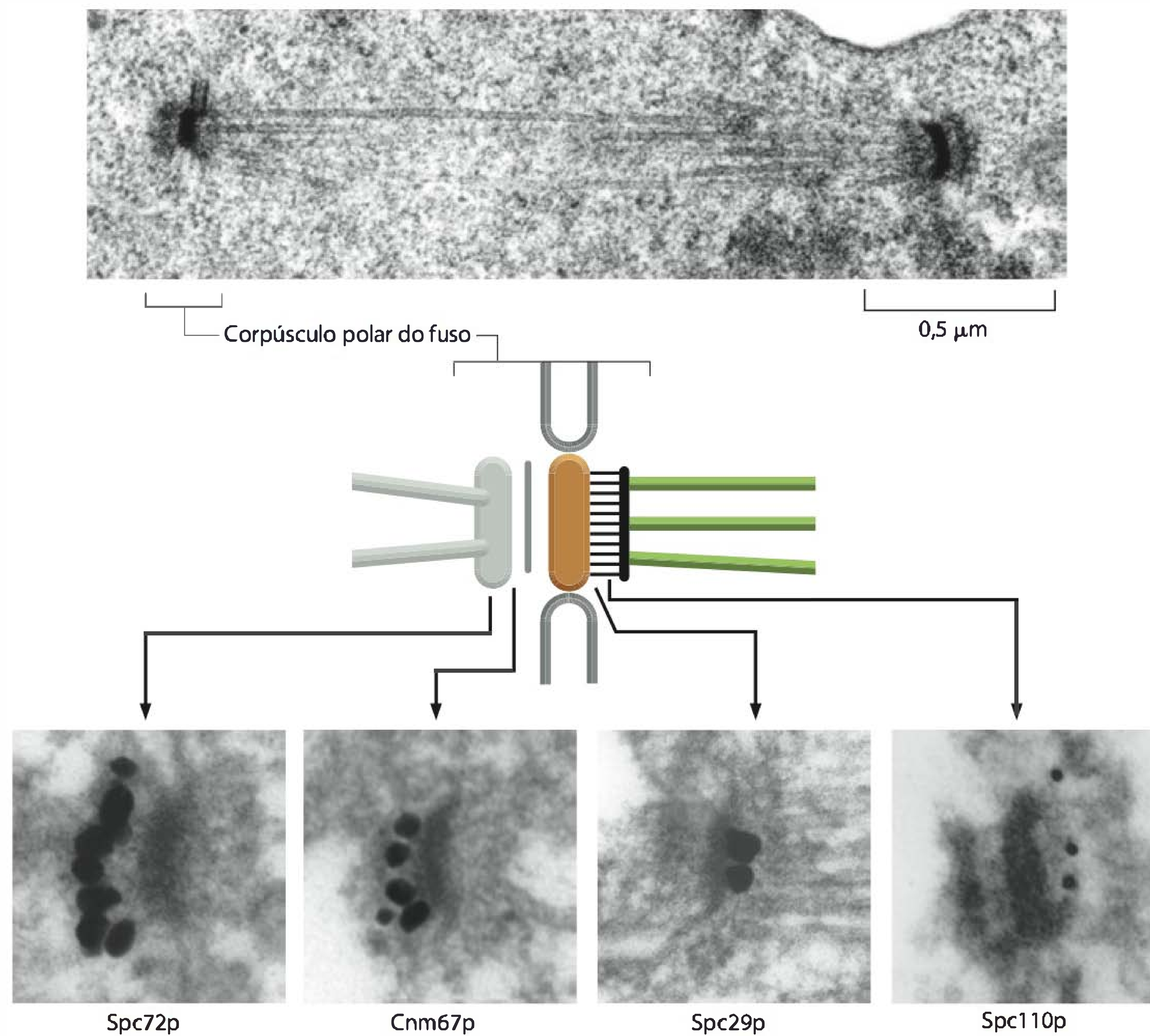


Figura 9-46 Localização de proteínas ao microscópio eletrônico. A microscopia eletrônica de imunolocalização com ouro é utilizada aqui para localizar quatro componentes diferentes de proteínas em posições particulares dentro do corpúsculo polar do fuso de levedura. No topo está um fino corte de um fuso mitótico de levedura mostrando os microtúbulos do fuso que atravessam o núcleo e se conectam a cada extremidade aos corpúsculos polares do fuso, embebidos no envelope nuclear. Um diagrama dos componentes de um único corpúsculo polar do fuso é mostrado abaixo. São utilizados anticorpos contra quatro proteínas diferentes do corpúsculo polar do fuso, junto com partículas de ouro coloidal (*pontos pretos*) para revelar onde, dentro da estrutura complexa, cada proteína está localizada. (Cortesia de John Kilmartin.)

de quais estruturas contêm o antígeno e quais não. A solução para esse problema é realizar a marcação antes de emblocar a amostra no plástico, quando as células e os tecidos ainda estão totalmente acessíveis aos reagentes de marcação. As partículas de ouro extremamente pequenas, cerca de 1 nm em diâmetro, funcionam melhor para esse procedimento. Essas pequenas partículas de ouro em geral não são visíveis diretamente nos cortes finais, assim prata, ou ouro, adicionais são nucleadas em torno de partículas de ouro de 1 nm em um processo químico muito semelhante à revelação fotográfica.

As imagens de superfícies podem ser obtidas por microscopia eletrônica de varredura

Um **microscópio eletrônico de varredura** (**SEM**, *scanning electron microscope*) produz diretamente uma imagem da estrutura tridimensional da superfície de uma amostra. O SEM normalmente é um aparelho menor, mais simples e mais barato do que um microscópio

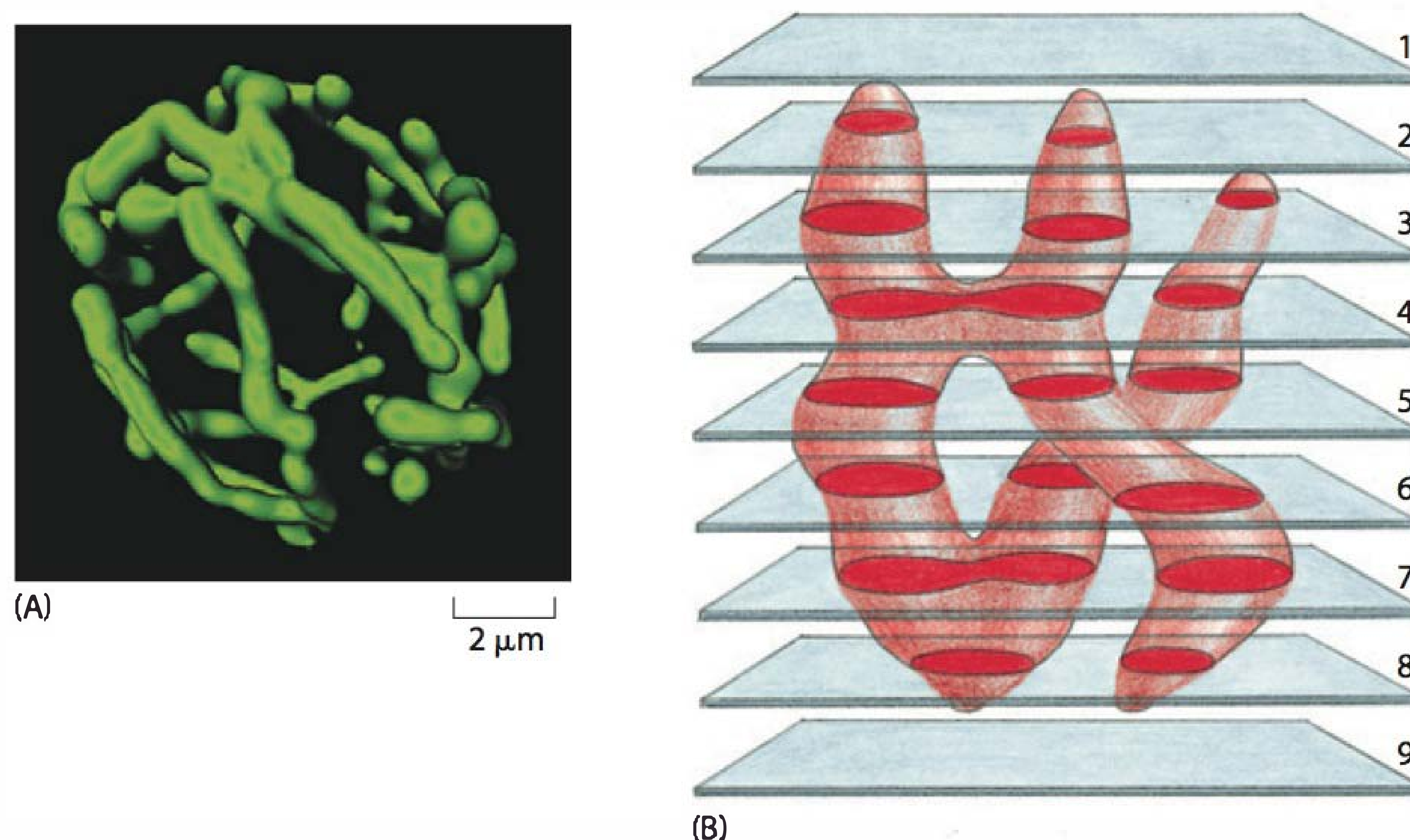


Figura 9-47 Reconstrução tridimensional a partir de cortes em série. (A) Uma reconstrução tridimensional do compartimento de uma mitocôndria de uma célula de levedura viva, montada a partir de uma pilha de secções ópticas, mostra sua estrutura ramificada complexa. Finas secções únicas de tal estrutura no microscópio eletrônico às vezes levam a uma impressão errônea. Neste exemplo (B), a maioria dos cortes através de uma célula contendo uma mitocôndria ramificada parece conter duas ou três mitocôndrias separadas (compare com a Figura 9-45). Além disso, os cortes 4 e 7 podem ser interpretados como uma mitocôndria em processo de divisão. A forma tridimensional real, entretanto, pode ser reconstruída a partir de cortes em série. (A, cortesia de Stefan Hell.)

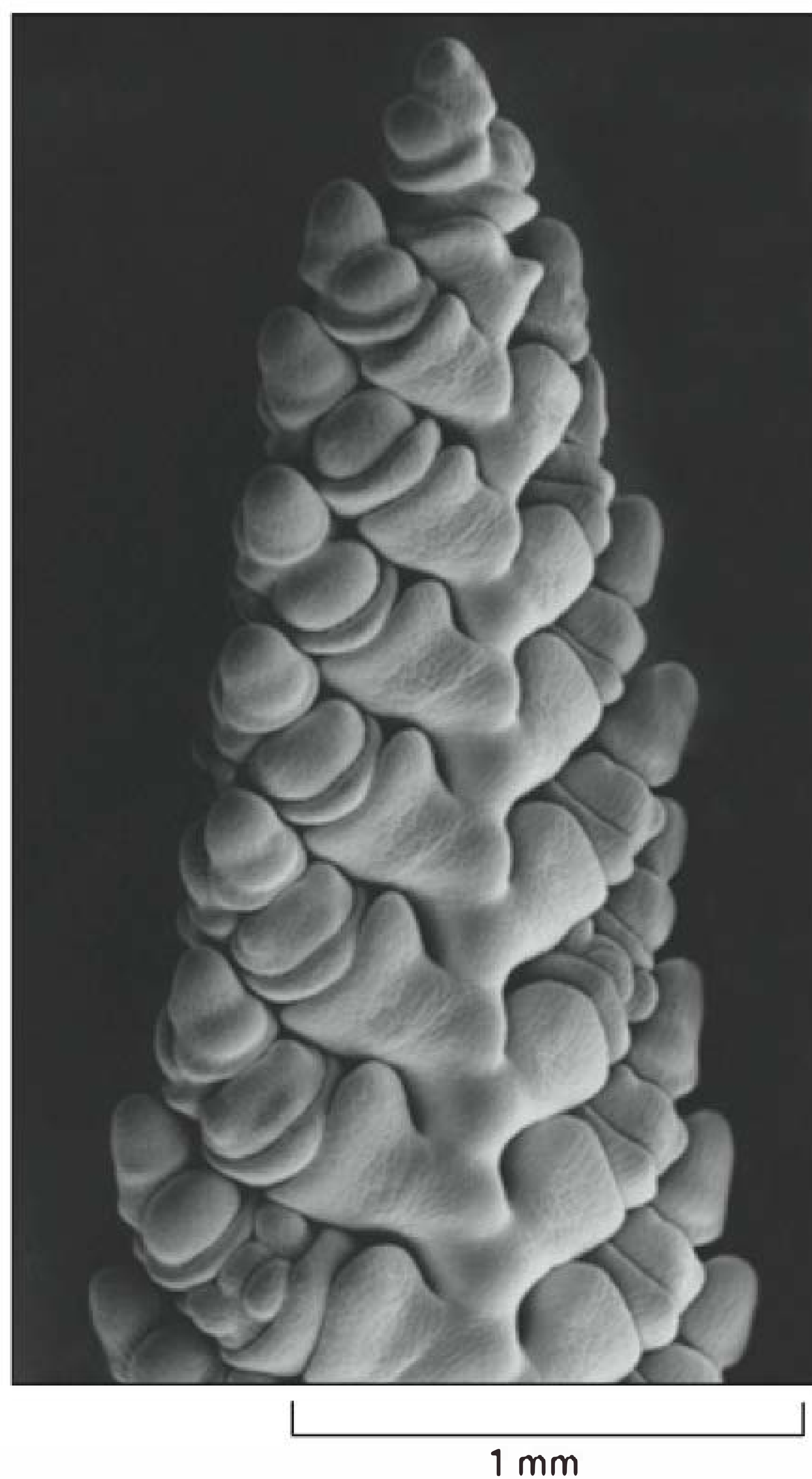


Figura 9-48 Flor, ou espiga, de trigo em desenvolvimento. Esta delicada de flor foi congelada rapidamente, coberta com um fino filme de metal e examinada no seu estado congelado em um SEM. Esta micrografia, que está em um baixo aumento, demonstra a grande profundidade de foco do SEM. (Cortesia de Kim Findlay.)

eletrônico de transmissão. Enquanto o TEM utiliza os elétrons que atravessaram a amostra para formar uma imagem, o SEM utiliza os elétrons que são espalhados ou emitidos a partir da superfície da amostra. A amostra a ser examinada é fixada, desidratada e coberta com uma camada fina de metal pesado. Alternativamente, ela pode ser congelada rapidamente e então transferida para um estágio resfriado da amostra, para exame direto no microscópio. Frequentemente, uma planta inteira ou um pequeno animal podem ser colocados no microscópio com pouca preparação (**Figura 9-48**). A amostra, preparada de qualquer uma dessas maneiras, é então varrida por um feixe de elétrons bastante estreito. A quantidade de elétrons espalhados ou emitidos quando este feixe primário bombardeia cada ponto sucessivo da superfície metálica é medida e utilizada para controlar a intensidade de um segundo feixe, que se movimenta em sincronia com o primeiro e forma a imagem em uma tela de televisão. Dessa maneira, é constituída uma imagem bastante ampliada da superfície como um todo (**Figura 9-49**).

A técnica do SEM propicia uma grande profundidade de foco; além disso, como a quantidade de dispersão de elétrons depende do ângulo da superfície relativa ao feixe, a imagem tem partes claras e sombras que dão uma aparência tridimensional (ver Figura 9-48 e **Figura 9-50**). Entretanto, apenas as características da superfície podem ser examinadas e, na maioria das formas de SEM, a resolução alcançável não é muito alta (cerca de 10 nm, com uma magnificação efetiva de até 20 mil vezes). Como resultado, a técnica normalmente é utilizada para estudar células e tecidos intactos, em vez de organelas subcelulares. Entretanto, SEMs com alta resolução foram desenvolvidos recentemente com um canhão de emissão de campo luminoso como fonte de elétrons. Este tipo de SEM pode produzir imagens que competem em resolução com as imagens do TEM (**Figura 9-51**).

O sombreamento com metais permite que características da superfície sejam examinadas com alta resolução por meio de microscopia eletrônica de transmissão

O TEM também pode ser utilizado para estudar a superfície de uma amostra – e, geralmente, a uma resolução maior do que no SEM – de maneira que macromoléculas individuais possam ser vistas. Como na microscopia eletrônica de varredura, uma camada fina de metal pesado, como platina, é evaporada sobre o espécime desidratado. Neste caso, entretanto, o

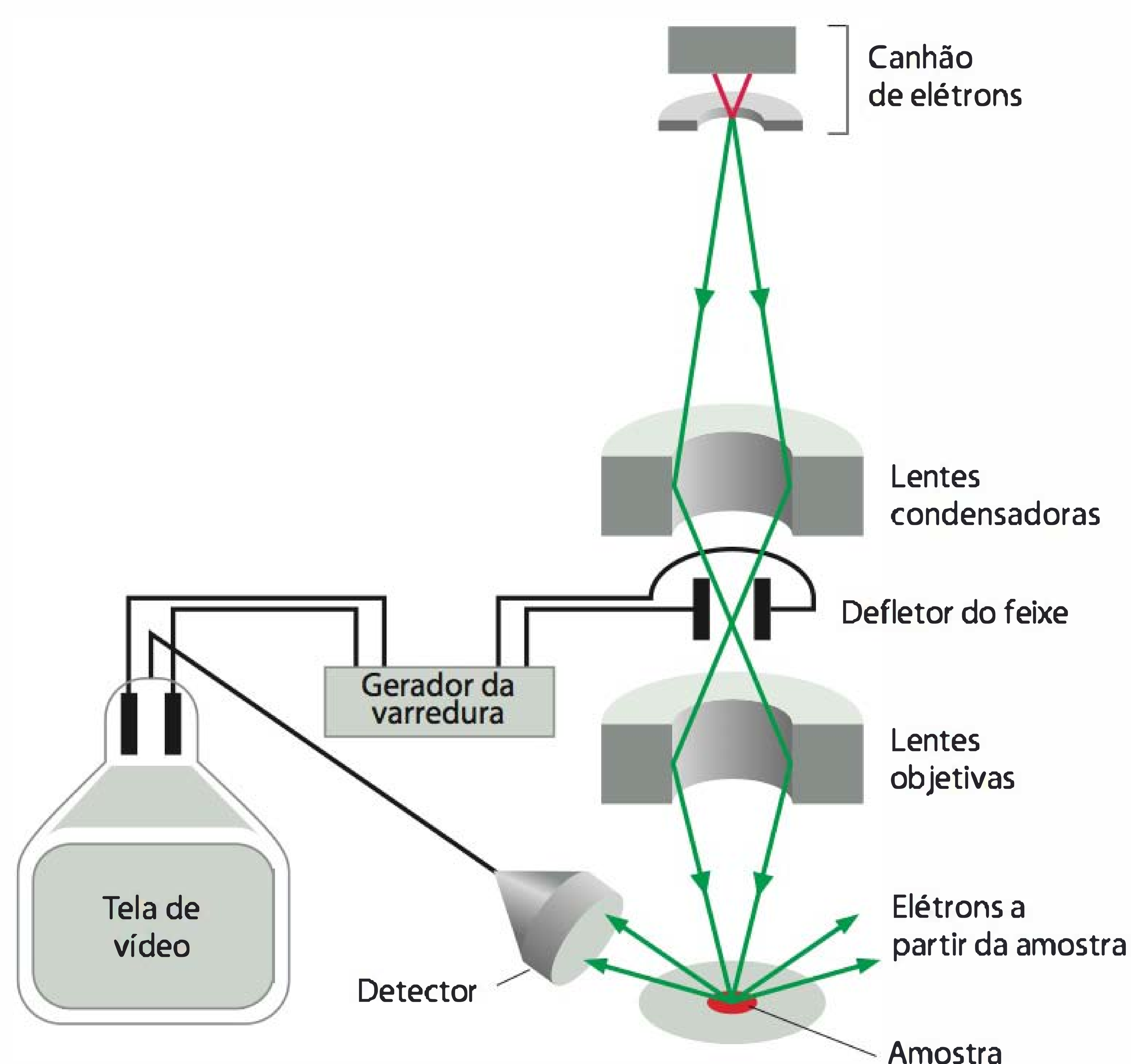




Figura 9-49 Microscópio eletrônico de varredura. Em um SEM, a amostra é varrida por um feixe de elétrons trazido a um foco na amostra pelas bobinas eletromagnéticas que agem como lentes. O detector mede a quantidade de elétrons espalhados ou emitidos quando o feixe bombardeia cada ponto sucessivo na superfície da amostra e controla a intensidade dos pontos sucessivos em uma imagem construída na tela de vídeo. O SEM cria imagens extraordinárias de objetos tridimensionais com grande profundidade de foco e uma resolução entre 3 nm e 20 nm dependendo do instrumento. (Fotografia cortesia de Andrew Davies.)

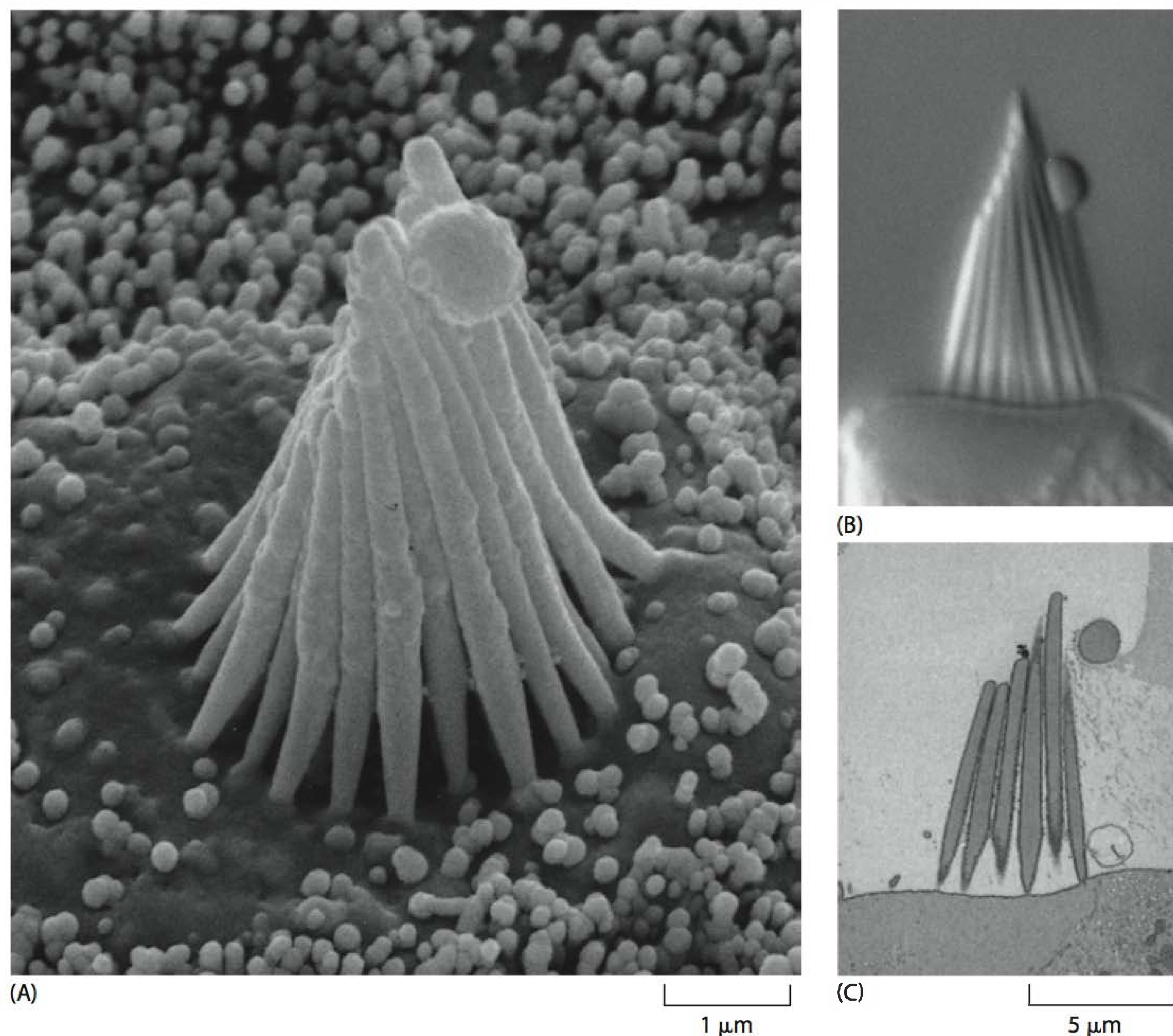


Figura 9-50 Microscopia eletrônica de varredura. (A) Uma micrografia eletrônica de varredura dos estereocílios que se projetam de uma célula ciliada do ouvido interno de um sapo-boi. Para comparação, a mesma estrutura é mostrada em (B) por microscopia óptica de contraste de interferência diferencial e em (C) por microscopia eletrônica de transmissão a partir de secções finas. (Cortesia de Richard Jacobs e James Hudspeth.)

metal é aplicado a partir de um ângulo oblíquo de maneira a depositar uma cobertura que é mais espessa em algumas partes do que em outras – um processo conhecido como *sombreamento com metal*, pois um efeito de sombra é criado para dar à imagem uma aparência tridimensional.

Algumas amostras cobertas deste modo são suficientemente finas ou pequenas para que o feixe de elétrons as penetre diretamente. Este é o caso de moléculas individuais, complexos macromoleculares e vírus – os quais podem ser dessecados, antes do sombreamento, em cima de um filme plano feito de um material relativamente transparente para elétrons, como carbono ou plástico. Também podem ser obtidas imagens da estrutura interna das células utilizando-se sombreamento com metais. Neste caso, as amostras são congeladas rapidamente (como descrito anteriormente) e então quebradas com uma lâmina. O nível de gelo na superfície fraturada é baixado pela sublimação do gelo no vácuo à medida que a temperatura é elevada – em um processo chamado de liofilização. As partes da célula expostas por esse processo de *decapação* são então sombreadas como antes para fazer a réplica de metal. O material orgânico da célula ainda precisa ser dissolvido depois do sombreamento, de maneira que somente a fina *réplica* de metal da superfície da amostra permaneça. A réplica é reforçada com um filme de carbono para que possa ser colocada em uma grade e examinada ao microscópio eletrônico de transmissão de forma rotineira (**Figura 9-52**). Essa técnica expõe estruturas no interior da célula e pode revelar sua organização tridimensional com clareza excepcional (**Figura 9-53**).

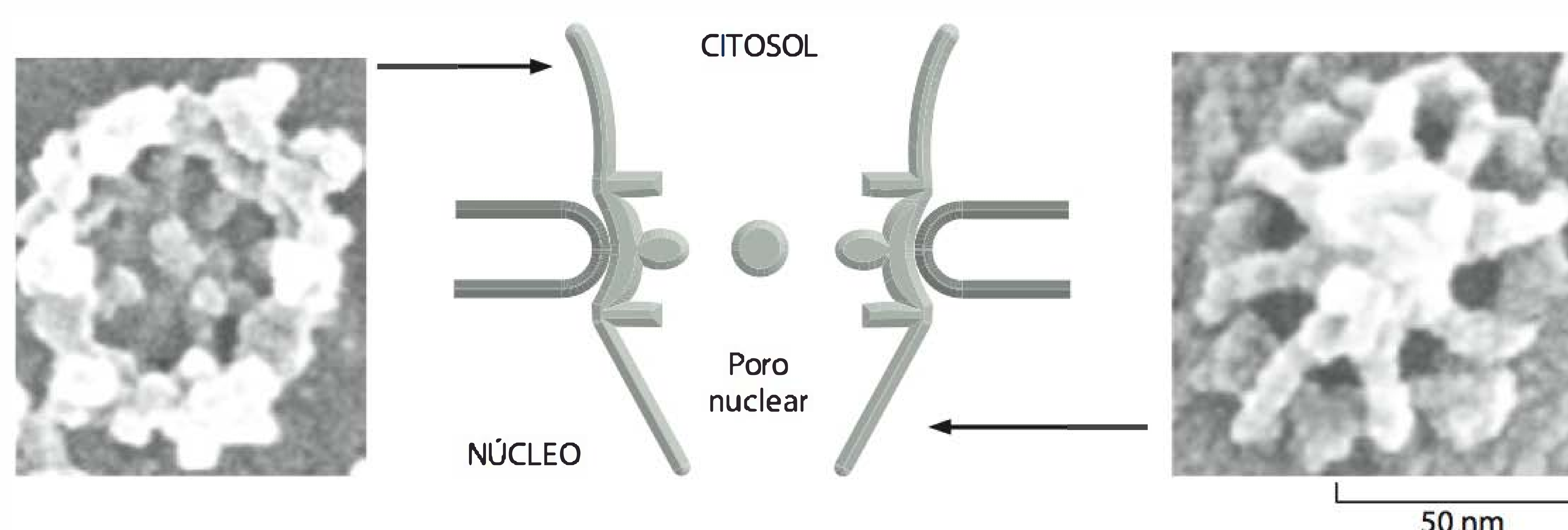


Figura 9-51 Poro nuclear. Imagens de envelopes nucleares, rapidamente congelados, foram obtidas em um SEM com alta resolução, equipado com um canhão de emissão de campo como fonte de elétrons. Estas vistas de cada lado do poro nuclear representam o limite de resolução do SEM e devem ser comparadas com a Figura 12-9. (Cortesia de Martin Goldeberg e Terry Allen.)

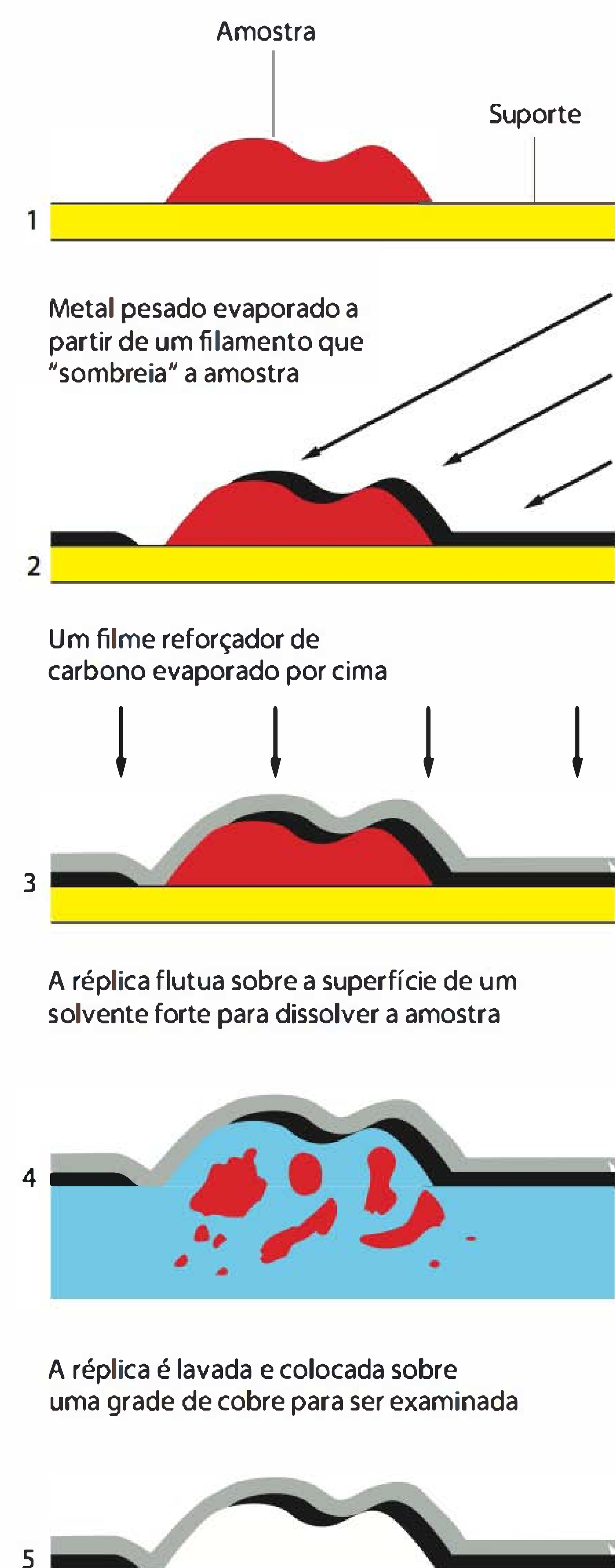


Figura 9-52 Preparação de uma réplica sombreada com metal na superfície de uma amostra. Note que a espessura do metal reflete os contornos da superfície da amostra original.

A coloração negativa e a microscopia crioeletrônica permitem que as macromoléculas sejam visualizadas com alta resolução

Embora macromoléculas isoladas, como DNA ou proteínas grandes, possam ser visualizadas prontamente ao microscópio eletrônico, se elas forem sombreadas com um metal pesado para produzir contraste, detalhes mais minuciosos poderão ser visualizados utilizando-se **coloração negativa**. Nesta técnica, as moléculas sustentadas por um filme delgado de carbono são misturadas com uma solução concentrada de um sal de metal pesado, como acetato de uranila. Após a amostra ter secado, uma camada muito fina do sal do metal cobre todo o filme de carbono, exceto onde ele foi excluído pela presença de uma macromolécula adsorvida. Como as macromoléculas permitem que os elétrons passem muito mais facilmente do que a coloração de metal pesado circundante, é criada uma imagem oposta, ou negativa, da molécula. A coloração negativa é especialmente útil para visualizar grandes agregados de macromoléculas, como vírus ou ribossomos, e para visualizar a estrutura da subunidade dos filamentos de proteína (**Figura 9-54**).

O sombreamento e a coloração negativa são capazes de produzir uma visão de superfície, com alto contraste, de pequenos agrupamentos de macromoléculas, mas ambas as técnicas são limitadas em termos de resolução devido ao tamanho da menor partícula do metal na sombra ou à coloração utilizada. Métodos recentes proporcionam uma alternativa que permite até mesmo que as características internas de estruturas tridimensionais, como vírus e organelas, sejam visualizadas diretamente com alta resolução. Nesta técnica, chamada de **microscopia crioeletrônica**, o congelamento rápido para formar gelo vítreo é novamente a chave. Um filme muito delgado (cerca de 100 nm) de uma suspensão aquosa de vírus ou de um complexo macromolecular purificado é preparado em uma grade de microscópio. A amostra é então rapidamente congelada sendo mergulhada em um líquido refrigerador. Um suporte especial de amostra é utilizado para mantê-la hidratada a –160°C no vácuo do microscópio, onde ela pode ser visualizada diretamente sem fixação, coloração ou secagem. Diferentemente da coloração negativa, na qual o que é visto é o envelope de exclusão de coloração em torno da partícula, a microscopia crioeletrônica hidratada produz uma imagem da própria estrutura macromolecular. Entretanto, para extrair a maior quantidade de informação estrutural, técnicas especiais de processamento de imagem devem ser usadas, como descreveremos a seguir.

Imagens múltiplas podem ser combinadas para aumentar a resolução

Qualquer imagem, tanto produzida por um microscópio eletrônico como por um microscópio óptico, é composta de partículas – elétrons ou fótons – que atingem um detector de qualquer tipo. Mas essas partículas são controladas por mecânica quântica, assim, as quantidades que alcançam o detector são previstas apenas em um sentido estatístico. No limite de um número muito grande de partículas, a distribuição no detector é determinada com exatidão pela imagem da amostra obtida. Entretanto, com um número menor de partículas, essa estrutura subjacente na imagem é ocultada pelas flutuações estatísticas no número de partículas detectadas em cada região. O termo *ruído* descreve a variabilidade casual que confunde a imagem subjacente da amostra. O ruído é importante na microscopia óptica em níveis bai-

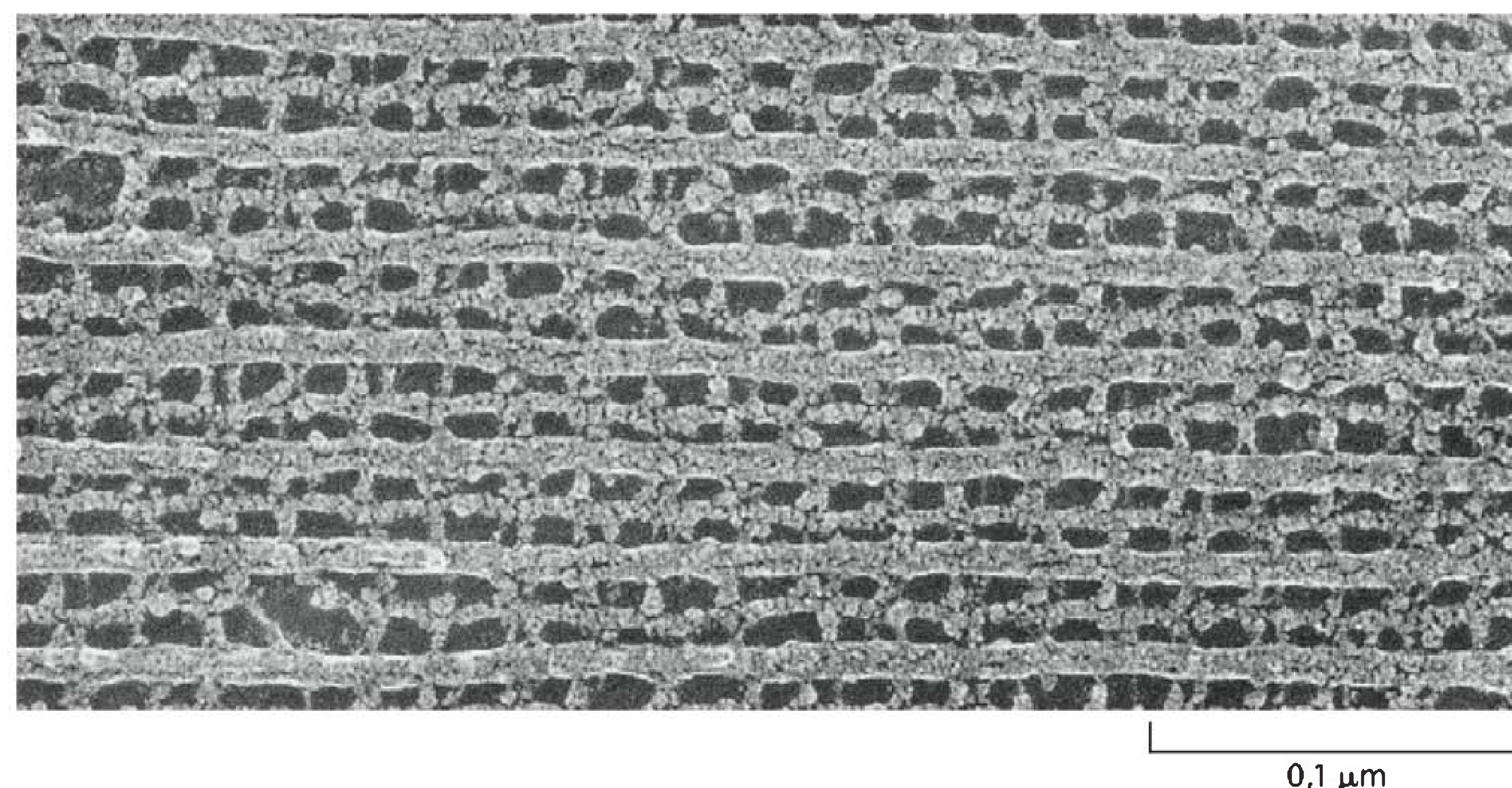


Figura 9-53 Arranjo regular de filamentos de proteína em um músculo de inseto. Para obter esta imagem, as células musculares foram congeladas rapidamente até a temperatura do hélio líquido, fraturadas através do citoplasma e submetidas à decapação profunda. Uma réplica de sombreamento com metal foi então preparada e examinada em alta resolução. (Cortesia de Roger Cooke e John Heuser.)

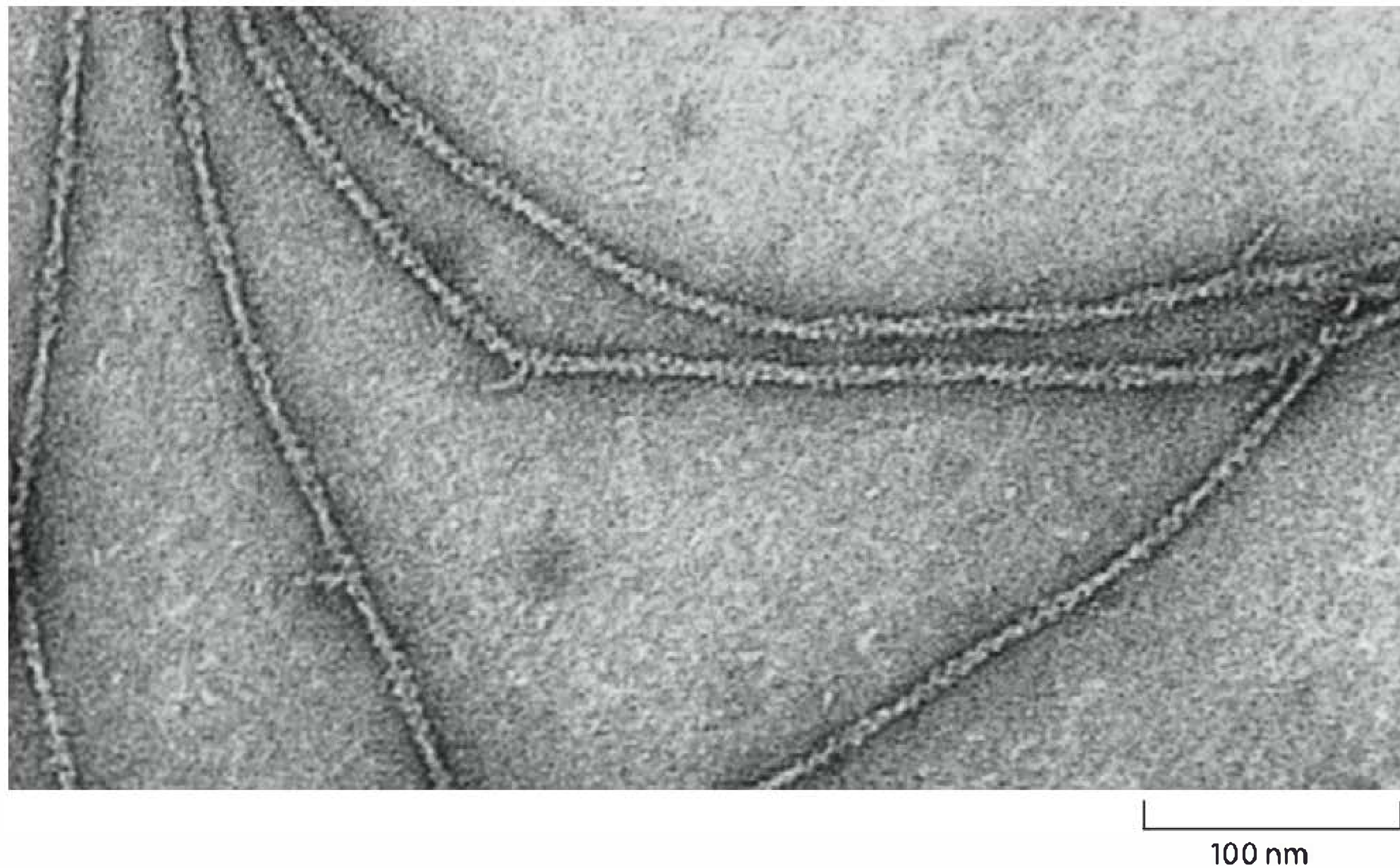


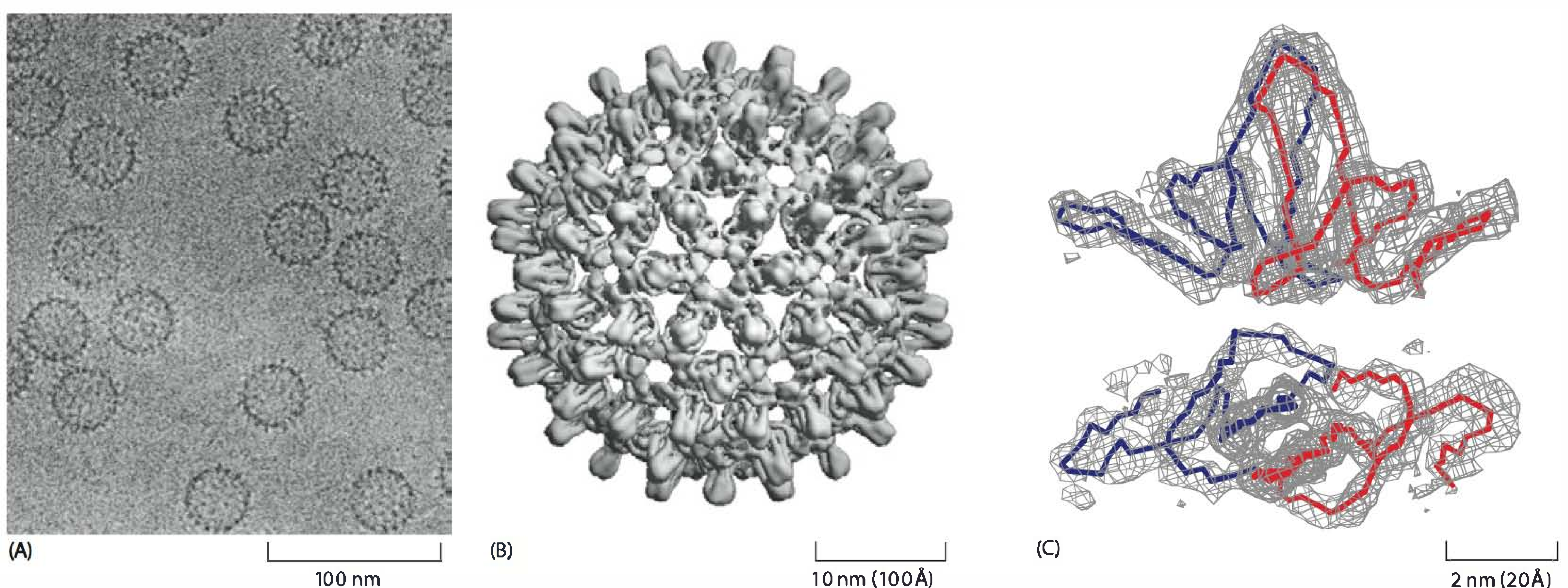
Figura 9-54 Filamentos de actina corados negativamente. Nesta micrografia eletrônica de transmissão, cada filamento tem cerca de 8 nm de diâmetro e, visto em detalhe, parece ser composto por uma cadeia helicoidal de moléculas. (Cortesia de Roger Craig.)

xos de luz, mas é particularmente grave para a microscopia eletrônica de macromoléculas não-coradas. Uma molécula de proteína pode tolerar uma dose de apenas algumas dezenas de elétrons por nanômetro quadrado sem ser danificada, e essa dose é de ordem de magnitude abaixo da que é necessária para definir uma imagem de resolução atômica.

A solução é obter imagens de várias moléculas idênticas – possivelmente dezenas de milhares de imagens individuais – e combiná-las para produzir uma média das imagens, revelando detalhes estruturais que estavam escondidos pelo ruído na imagem original. Esse processo é chamado de **reconstrução de partículas simples**. Entretanto, antes de combinar todas as imagens individuais, elas devem ser alinhadas umas com as outras. Às vezes é possível induzir proteínas e complexos a formar arranjos cristalinos, nos quais cada molécula é mantida na mesma orientação em uma treliça regular. Nesse caso, o problema do alinhamento é facilmente resolvido, e várias estruturas de proteínas foram determinadas com resolução atômica por esse tipo de cristalografia eletrônica. Em princípio, entretanto, os arranjos cristalinos não são absolutamente necessários. Com a ajuda de um computador, as imagens digitais de moléculas distribuídas ao acaso e de moléculas desalinhadas podem ser processadas e combinadas para produzir reconstruções de alta resolução. Embora estruturas que têm alguma simetria intrínseca tornem a tarefa do alinhamento mais fácil e mais exata, essa técnica também tem sido utilizada para objetos, como ribossomos, sem simetria. A **Figura 9-55** mostra a estrutura de um vírus icosaédrico determinada com alta resolução pela combinação de várias partículas e múltiplas vistas.

Com arranjos cristalinos bem organizados, uma resolução de 0,3 nm foi conseguida por microscopia eletrônica – o suficiente para se iniciar a ver arranjos atômicos internos em uma

Figura 9-55 Reconstrução de partículas simples. As camadas esféricas de proteínas do vírus da hepatite B são preservadas em uma fina camada de gelo (A) e geradas no microscópio eletrônico de transmissão. Milhares de partículas individuais foram combinadas por reconstrução de partículas simples para produzir o mapa tridimensional da partícula icosaédrica mostrada em (B). As duas vistas de um único dímero de proteína (C), que formam as pontas na superfície da carapaça, mostram que a resolução da reconstrução (0,74 nm) é suficiente para resolver o dobramento completo da cadeia polipeptídica. (A, cortesia de B. Böttcher, S. A. Wynne e R. A. Crowther; B e C, de B. Böttcher, S. A. Wynne e R. A. Crowther, *Nature* 386:88-91, 1997. Com permissão de Macmilliam Publishers Ltd.)



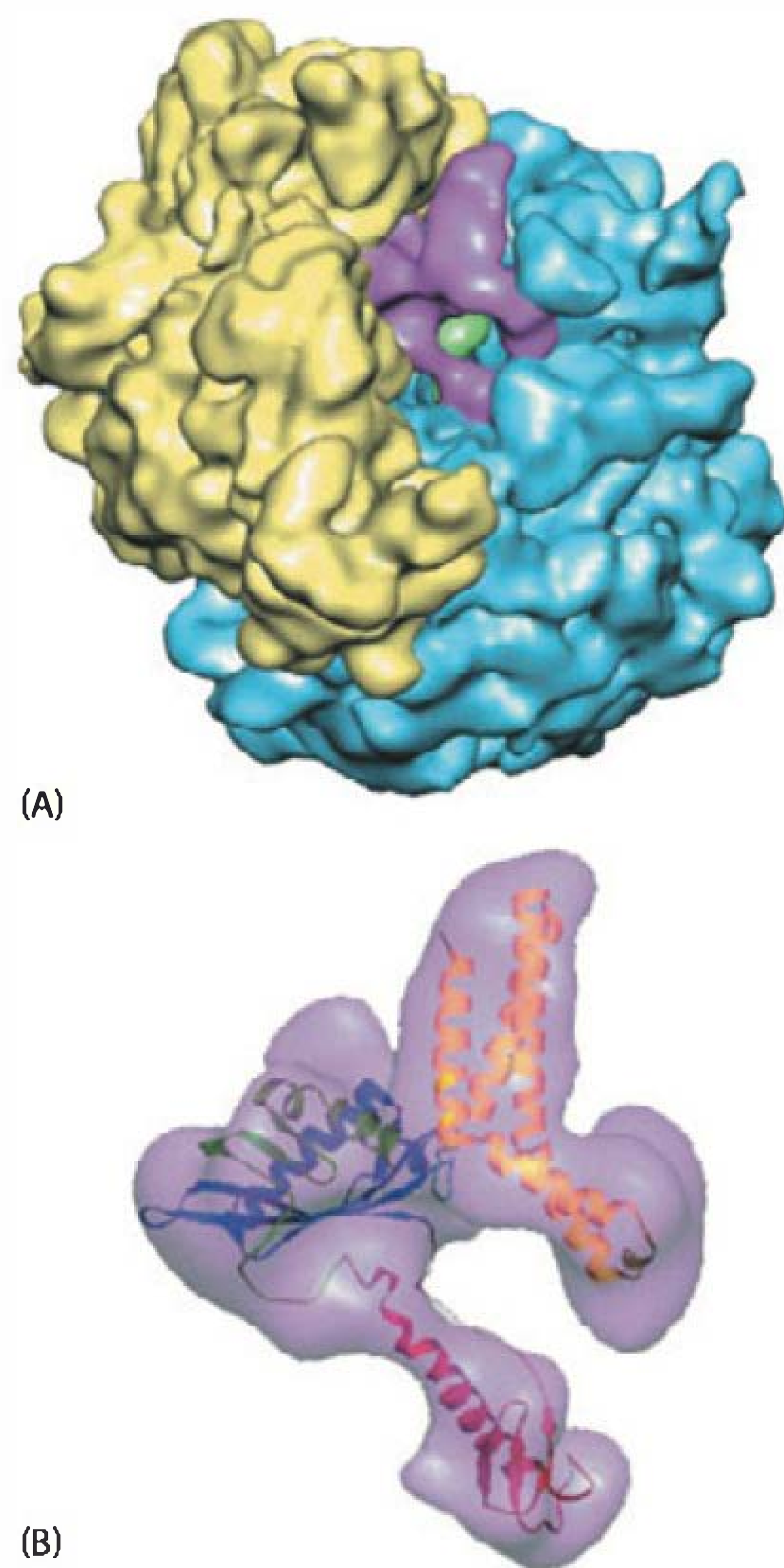


Figura 9-56 Reconstrução de partículas simples e ajuste da modelagem molecular. Ribossomos bacterianos, com e sem o fator de liberação necessário para a liberação do peptídeo a partir do ribossomo, foram usados aqui para derivar mapas de crio-EM tridimensionais de alta resolução a uma resolução melhor do que 1 nm. Imagens de aproximadamente 20 mil ribossomos separados, preservados em gelo, foram usadas para produzir as reconstruções de partículas simples. Em (A), a subunidade ribossomal 30S (*amarelo*) e a subunidade 50S (*azul*) podem ser distinguidas pela densidade de elétrons adicional que pode ser atribuída à liberação do fator RF2 (*rosa*). A estrutura molecular conhecida de RF2 foi então modelada nesta densidade de elétrons (B). (De U. B. S. Rawat et al., *Nature* 421:87-90, 2003. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

proteína e competir com a cristalografia por raios X em resolução. Com a reconstrução de partículas simples, o limite presente é de cerca de 0,5 nm, suficiente para identificar subunidades e domínios proteicos e a estrutura secundária limitada da proteína. Embora a microscopia eletrônica provavelmente não substitua a cristalografia por raios X (discutida no Capítulo 8) como método para determinar estruturas macromoleculares, ela tem algumas vantagens muito claras. Primeiro, ela absolutamente não necessita de amostras cristalinas. Segundo, ela pode lidar com complexos extremamente grandes – estruturas que podem ser muito grandes ou muito variáveis para cristalizar satisfatoriamente.

A análise de estruturas macromoleculares grandes e complexas é consideravelmente auxiliada se a estrutura atômica de uma ou mais das subunidades é conhecida, por exemplo, a partir de cristalografia por raios X. Modelos moleculares podem então ser matematicamente ajustados no envelope da estrutura determinada a uma resolução mais baixa utilizando-se o microscópio eletrônico. A **Figura 9-56** mostra a estrutura de um ribossomo com a localização de um fator de liberação ligado dessa forma (ver também Figuras 6-74 e 6-75).

As vistas diferentes de um único objeto podem ser combinadas para produzir reconstruções tridimensionais

Os detectores utilizados para gravar as imagens dos microscópios eletrônicos produzem imagens bidimensionais. Devido à grande profundidade de campo do microscópio, todas as partes da amostra tridimensional estão em foco, e a imagem resultante é uma projeção da estrutura diretamente no campo da visão. A informação perdida na terceira dimensão pode ser recuperada se tivermos vistas da mesma amostra a partir de direções diferentes. Os métodos computacionais para essa técnica foram desenvolvidos nos anos de 1960 e são muito utilizados em tomografia computadorizada (CT, *computed tomography*) em medicina. Em uma CT, o equipamento de imagem é movido em torno do paciente para gerar as diferentes vistas. Em uma **tomografia por microscópio eletrônico** (**EM**, *electron-microscope*), o suporte da amostra é inclinado no microscópio, alcançando o mesmo resultado. Dessa maneira, pode-se chegar a uma reconstrução tridimensional, em uma orientação-padrão escolhida, combinando-se um conjunto de vistas diferentes de um único objeto no campo de visão do microscópio. Cada vista terá muito ruído, mas combinando-as em três dimensões e fazendo uma média, o ruído pode ser bastante diminuído, gerando uma imagem clara da estrutura molecular. Iniciando com secções plásticas largas do material emblocado, as reconstruções tridimensionais, ou *tomogramas*, são utilizadas extensivamente para descrever a anatomia detalhada de pequenas regiões da célula, como o aparelho de Golgi (**Figura 9-57**) ou o citoesqueleto. Entretanto, cada vez mais, os microscopistas têm aplicado a tomografia por EM a secções congeladas hidratadas não-coradas, e até mesmo a células ou organelas inteiras rapidamente congeladas (**Figura 9-58**). A microscopia eletrônica fornece uma ponte robusta entre a escala de uma simples molécula e aquela de uma célula inteira.

Resumo

Determinar a estrutura detalhada das membranas e das organelas nas células requer a mais alta resolução alcançável em um microscópio eletrônico de transmissão. As macromoléculas específicas podem ser localizadas com ouro coloidal ligado a anticorpos. Vistas tridimensionais das superfícies das células e dos tecidos podem ser obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As formas de macromoléculas isoladas que foram sombreadas com um metal pesado ou delineadas por coloração negativa também podem ser determinadas prontamente por microscopia eletrônica. Utilizando-se métodos computacionais, múltiplas imagens ou vistas de diferentes direções podem ser combinadas para produzir reconstruções detalhadas de macromoléculas e de complexos moleculares por meio das técnicas de tomografia eletrônica e reconstrução de partículas simples, muitas vezes aplicadas a amostras criopreservadas. A resolução obtida com esses métodos significa que estruturas atômicas de macromoléculas individuais muitas vezes podem ser "ajustadas" às imagens derivadas por microscopia eletrônica e que o TEM apresenta-se cada vez mais capaz de fazer a ponte entre o espaço das estruturas determinadas por cristalografia por raios X e aquelas determinadas ao microscópio óptico.

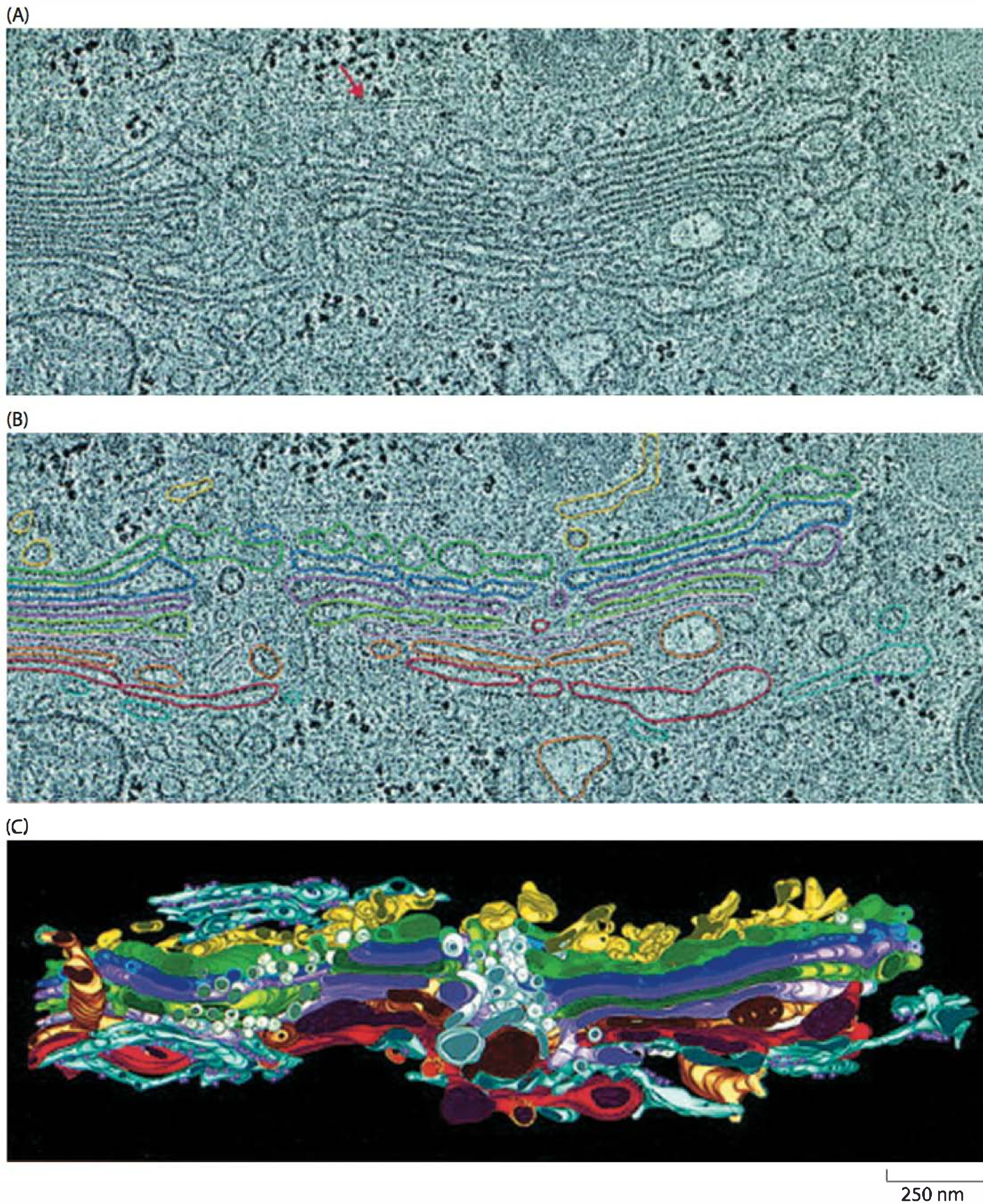


Figura 9-57 Tomografia por microscópio eletrônico (EM). Amostras que foram rapidamente congeladas e então tiveram suas partes congeladas substituídas e emblocadas em plástico preservam sua estrutura em uma condição que é muito similar ao seu estado original em vida. Estes experimentos mostram uma análise da estrutura tridimensional do aparelho de Golgi de uma célula de rim de rato preparada dessa maneira. Várias secções espessas (250 nm) da célula foram posicionadas em um microscópio eletrônico de alta voltagem, ao longo de dois eixos diferentes, e cerca de 160 vistas diferentes foram armazenadas. Os dados digitais foram combinados usando-se métodos de tomografia por EM para produzir uma reconstrução tridimensional final a uma resolução de cerca de 7 nm. O computador pode então apresentar fatias muito finas do conjunto completo de dados tridimensionais, ou tomograma, e duas fatias em série, cada uma de apenas 4 nm de espessura, são mostradas em (A) e (B). Há pouquíssimas variações de uma fatia para outra, mas usando-se o conjunto de todos os dados e corando-se as membranas manualmente (B), uma imagem tridimensional completa do complexo de Golgi completo e de suas vesículas associadas pode ser apresentada (C). (De M. S. Ladinsky et al., *J. Cell Biol.* 144:1135-1149, 1999. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

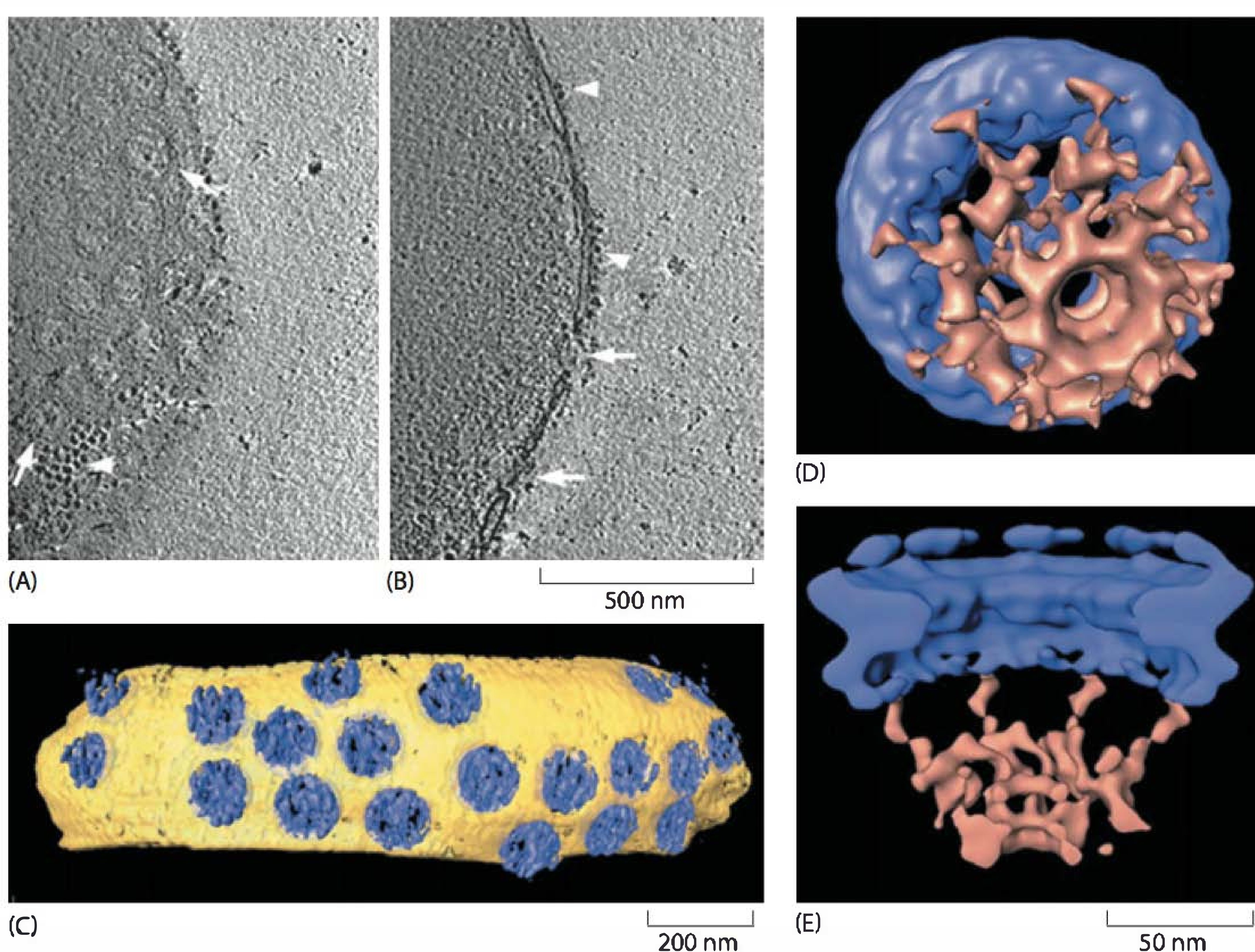


Figura 9-58 Combinação da tomografia crio-EM com reconstrução de partículas simples. Além das secções, a técnica de tomografia por EM também pode ser aplicada a amostras pequenas não-fixadas que são rapidamente congeladas e analisadas, enquanto ainda estão congeladas, usando-se um estágio de inclinação no microscópio. Neste experimento, os pequenos núcleos do *Dictyostelium* são gentilmente isolados e então rapidamente congelados antes que uma série inclinada de suas vistas seja armazenada. Estas diferentes vistas digitais são combinadas por métodos de tomografia por EM para produzir um tomograma tridimensional. Duas fatias digitais finas (10 nm) através desse tomograma são mostradas, nas quais vistas de cima (A) e vistas laterais (B) de poros nucleares individuais podem ser observadas. No modelo tridimensional (C), a superfície dos poros (*azul*) pode ser visualizada embebida no envelope nuclear (*amarelo*). A partir de uma série de tomogramas foi possível extrair grupos de dados para aproximadamente 300 poros nucleares separados, cujas estruturas puderam então ser unificadas usando-se técnicas de reconstrução de partículas simples. A vista da superfície obtida de um desses poros reconstruídos é mostrada a partir da face nuclear em (D) e na secção em (E) e deve ser comparada com a Figura 12-10. O complexo do poro está corado em *azul* e a cesta nuclear em *marrom.* (De M. Beck et al., *Science* 306:1387-1390, 2004. Com permissão de AAAS.)

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

9-1 Como a dupla-hélice de DNA tem apenas 10 nm de largura – muito abaixo da resolução do microscópio óptico – é impossível ver cromossomos em células vivas sem colorações especiais.

9-2 A molécula fluorescente, tendo absorvido um único fóton de luz em um comprimento de onda, sempre a emite em um comprimento maior.

9-3 Moléculas encarceradas podem ser introduzidas em uma célula e então ativadas por um pulso forte de luz *laser* no momento e no local celular precisos escolhidos pelo pesquisador.

Discuta as seguintes questões.

9-4 Os diagramas na **Figura Q9-1** mostram os caminhos dos raios de luz passando por uma amostra com uma lente seca e com uma lente de imersão no óleo. Ofereça uma explicação para o motivo pelo qual as lentes de imersão no óleo deveriam resultar em uma resolução melhor. Ar, vidro e óleo têm índices de refração de 1,00, 1,51 e 1,51, respectivamente.

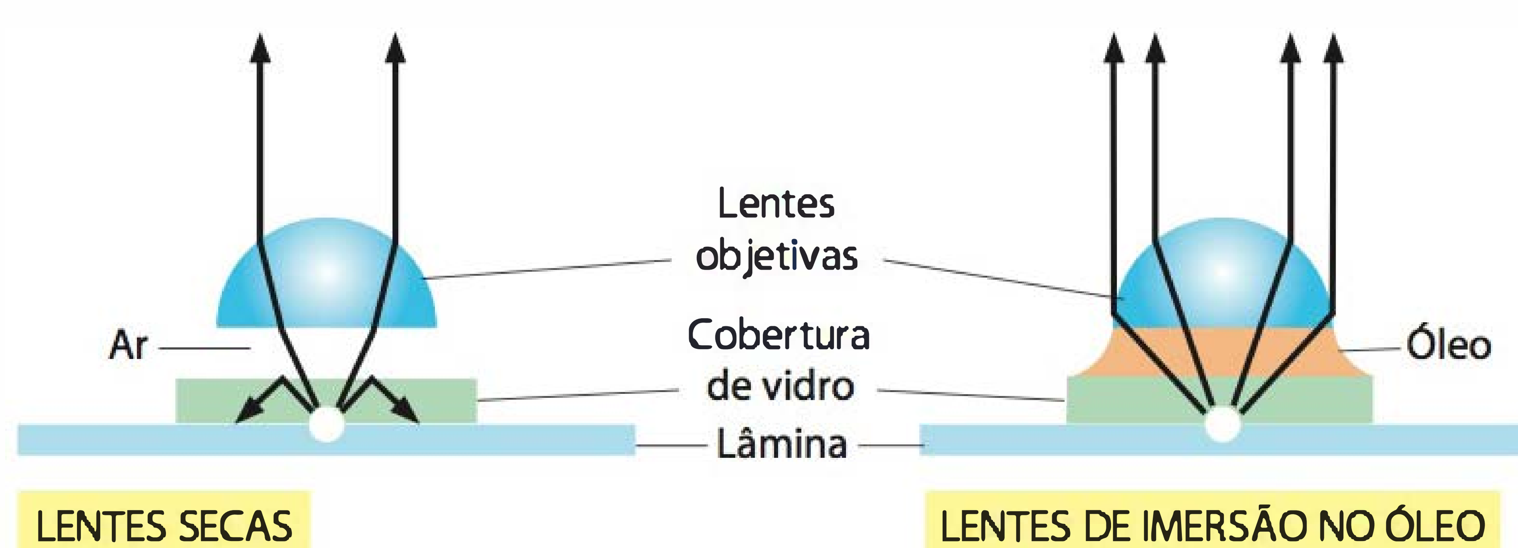


Figura Q9-1 Caminhos dos raios de luz pelas lentes secas e de imersão no óleo (Questão 9-4). O *círculo branco* na origem dos raios de luz é a amostra.

9-5 A **Figura Q9-2** mostra um diagrama do olho humano. Os índices de refração dos componentes no caminho da luz são: córnea 1,38, humor aquoso 1,33, lentes cristalinas 1,41 e humor vítreo 1,38. Onde a refração principal – o foco principal – ocorre? Qual o papel que você supõe para as lentes?

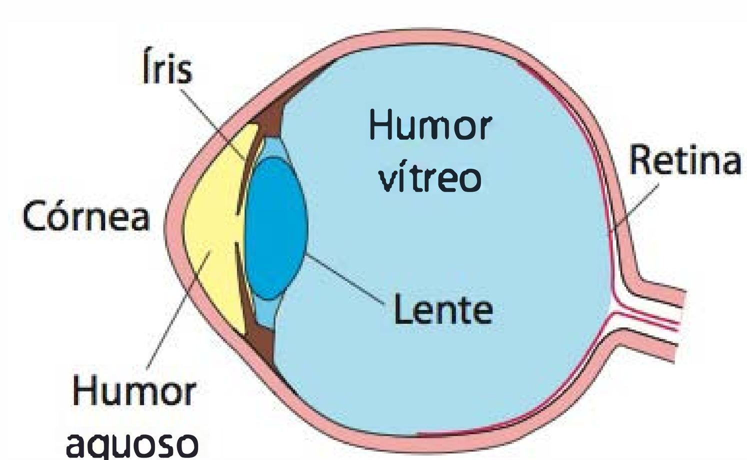


Figura Q9-2 Diagrama do olho humano (Questão 9-5).

9-6 Por que os humanos enxergam tão pouco embaixo da água? E por que óculos de proteção ajudam?

9-7 Explique as diferenças entre resolução e magnificação.

9-8 Anticorpos que se ligam a proteínas específicas são ferramentas importantes para definir a localização de moléculas nas células. A sensibilidade do anticorpo primário – o anticorpo que reage com a molécula-alvo – muitas vezes é aumentada pelo uso de anticorpos secundários marcados que se ligam a ele. Quais são as vantagens e desvantagens de usar anticorpos secundários que carregam marcas fluorescentes *versus* aqueles que carregam enzimas ligadas?

9-9 A **Figura Q9-3** mostra uma série de GFPs modificadas que emitem luz em uma variedade de cores. Como você supõe que o mesmo cromóforo possa fluorescer em tantos comprimentos de onda diferentes?

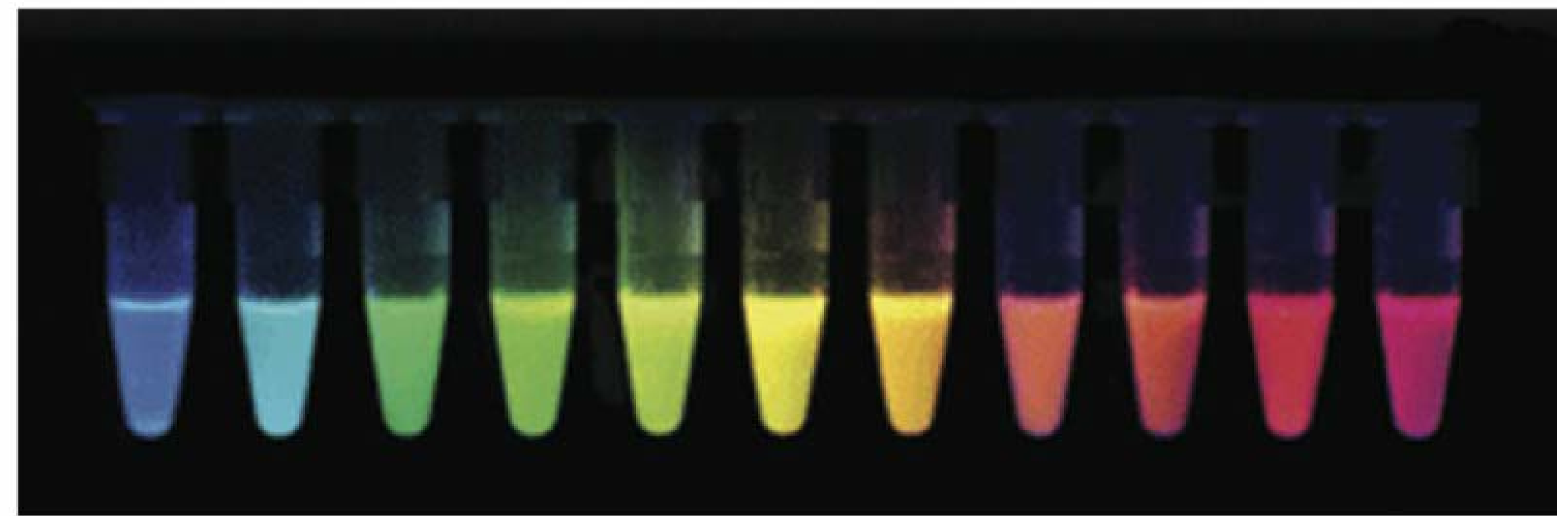
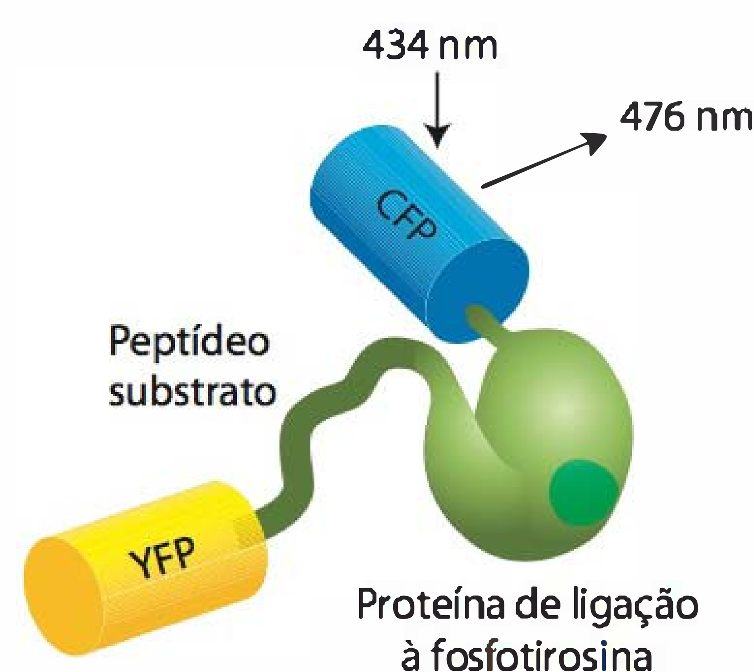


Figura Q9-3 Um arco-íris de cores produzido por GFPs modificadas (Questão 9-9). (De R. F. Service, *Science* 306:1457, 2004. Com permissão de AAAS.)

9-10 Considere um detector de fluorescência desenhado para reportar a localização celular de proteínas tirosina-cinases ativas. Uma proteína fluorescente azul (azul-esverdeado) (CFP) e uma proteína fluorescente amarela (YFP) foram fusionadas a cada extremidade do domínio proteico híbrido. O segmento da proteína híbrida possui um peptídeo substrato reconhecido pela proteína Abl-tirosina cinase e um domínio de ligação da fosfotirosina (**Figura Q9-4**A). A estimulação do domínio CFP não causa a emissão pelo domínio YFP quando os domínios estão separados. Entretanto, quando os domínios CFP e YFP são aproximados, a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) permite a excitação de CFP para estimular a emissão por YFP. FRET destaca-se experimentalmente como um aumento na relação entre emissão a 526 nm *versus* 476 nm (YFP/CFP) quando CFP é excitada por uma luz 434 de nm.

A incubação da proteína repórter com a proteína tirosina-cinase Abl na presença de ATP produziu um aumento na emissão de YFP/CFP (Figura Q9-4B). Na ausência de ATP ou da proteína Abl, não ocorreu FRET. FRET também foi eliminada pela adição de uma tirosina-fosfatase (Figura Q9-4B). Descreva o melhor que você puder como a proteína repórter detecta a proteína tirosina-cinase Abl ativa.

(A) REPÓRTER



(B) FRET

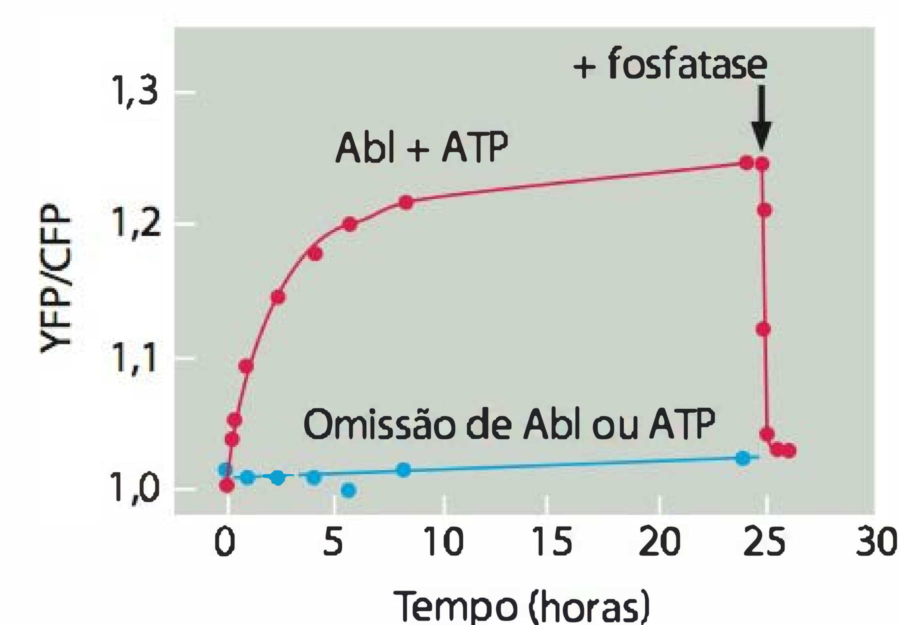


Figura Q9-4 Proteína repórter fluorescente desenhada para detectar a fosforilação da tirosina (Questão 9-10). (A) Estrutura do domínio da proteína repórter. Quatro domínios estão indicados: CFP, YFP, peptídeo substrato de tirosina-cinase e um domínio de ligação à fosfotirosina. (B) Ensaio de FRET. YFP/CFP é normalizado para 1,0 no tempo zero. A repórter foi incubada na presença (ou ausência) de Abl e ATP pelos tempos indicados. A seta indica o momento da adição de uma tirosina-fosfatase. (De A. Y. Ting, K. H. Klain, R. L. Klemke e R. Y. Tsien, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 98:15003-15008, 2001. Com permissão de National Academy of Sciences.)

9-11 O poder de resolução prático dos microscópios eletrônicos modernos é de cerca de 0,1 nm. A principal razão para este obstáculo é a abertura numérica baixa ($n \sin \theta$), que é limitada por θ

(metade da largura angular dos raios coletados nas lentes objetivas). Assumindo que o comprimento de onda (λ) dos elétrons é 0,004 nm e que o índice de refração (n) é 1,0, calcule o valor para θ. Como este valor é comparado com um θ de 60°, que é típico para microscópios ópticos?

$$\text{resolução} = \frac{0{,}61\,\lambda}{n \text{ sen } \theta}$$

9-12 É difícil perceber protuberâncias a partir de depressões apenas visualizando-se o padrão de sombras. Considere a **Figura Q9-5**, que mostra um grupo de círculos sombreados. Na Figura Q9-5A, os círculos parecem ser protuberâncias; entretanto, quando a imagem é simplesmente virada (Figura Q9-5B), os círculos parecem-se com depressões. Esta é uma ilusão clássica. A mesma ilusão está presente no sombreamento com metal, como mostrado nas duas micrografias eletrônicas na Figura Q9-5. Em uma, a membrana parece estar coberta de protuberâncias, enquanto que na outra a membrana parece estar cheia de depressões. É possível, para um microscopista eletrônico ter certeza de que uma das imagens é a correta, ou é tudo arbitrário? Explique seu raciocínio.

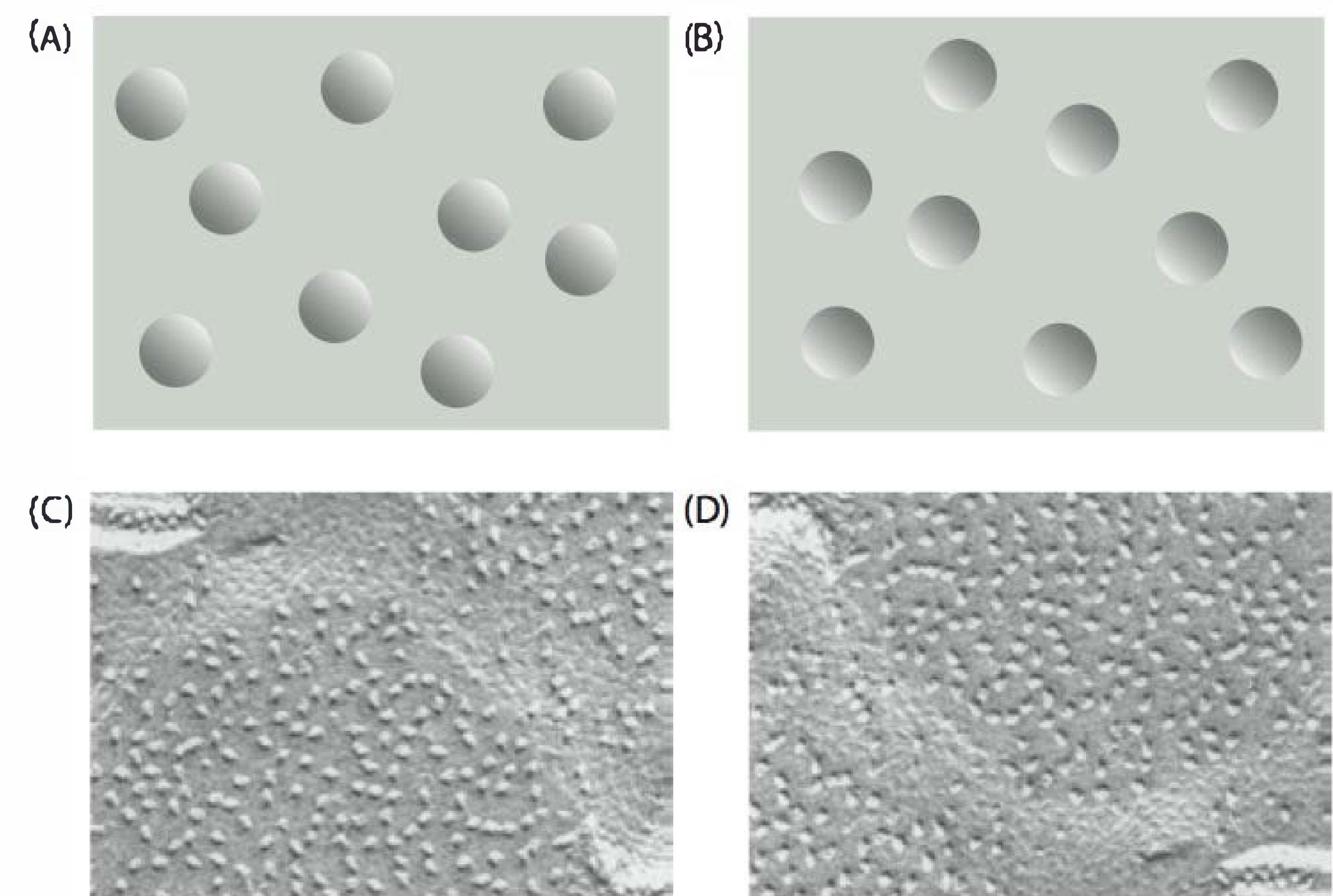


Figura Q9-5 Protuberâncias e depressões (Questão 9-12). (A) Círculos sombreados que se parecem com protuberâncias. (B) Círculos sombreados que se parecem com depressões. (C) Uma micrografia eletrônica orientada de modo que parece estar coberta de protuberâncias. (D) Uma micrografia eletrônica orientada de modo que parece estar coberta de depressões. (C e D, cortesia de Andrew Staehelin.)

REFERÊNCIAS

Geral

Celis JE, Carter N, Simons K et al (eds) (2005) Cell Biology: A Laboratory Handbook, 3rd ed. San Diego: Academic Press. (Volume 3 of this four volume set covers the practicalities of most of the current light and electron imaging methods that are used in cell biology, while volume 4 covers the transfer of molecules into cells.)

Pawley BP (ed) (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed. New York: Springer Science.

Visualização de células ao microscópio óptico

Adams MC, Salmon WC, Gupton SL et al (2003) A high-speed multispectral spinning-disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells. *Methods* 29:29–41.

Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P & Sedat JW (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. In Methods in Cell Biology, vol 30: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, part B (DL Taylor, Y-L Wang eds). San Diego: Academic Press.

Centonze VE (2002) Introduction to multiphoton excitation imaging for the biological sciences. *Methods Cell Biol* 70:129–48.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805.

Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH & Tsien RY (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312:217–224.

Harlow E & Lane D (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Haugland RP (ed) (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 8th ed. Eugene, OR: Molecular Probes, Inc. (Available online at http://www.probes.com/)

Jaiswai JK & Simon SM (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol* 14:497–504.

Jares-Erijman EA & Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature Biotech* 21:1387–1395.

Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N & Patterson G (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol* 5:S7–S14.

Minsky M (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10:128–138.

Miyawaki A, Sawano A & Kogure T (2003) Lighting up cells: labeling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biol* 5:S1–S7.

Parton RM & Read ND (1999) Calcium and pH imaging in living cells. In Light Microscopy in Biology. A Practical Approach, 2nd ed. (Lacey AJ ed) Oxford: Oxford University Press.

Sako Y & Yanagida T (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:SS1–SS5.

Sekar RB & Periasamy A (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 160:629–633.

Shaner NC, Steinbach PA & Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2:905–909.

Sheetz MP (ed) (1997) Laser Tweezers in Cell Biology. *Methods Cell Biol* 55.

Sluder G & Wolf DE (2007) Video Microscopy 3rd ed. *Methods Cell Biol* 81.

Stevens DJ & Allan (2003) Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 300:82–86.

Tsien RY (2003) Imagining imaging's future. *Nature Rev Mol Cell Rev* 4:SS16–SS21.

Weiss DG, Maile W, Wick RA & Steffen W (1999) Video microscopy. In Light Microscopy in Biology: A Practical Approach, 2nd ed. (AJ Lacey ed) Oxford: Oxford University Press.

White JG, Amos WB & Fordham M (1987) An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* 105:41–48.

Zernike F (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121:345–349.

Visualização de células e moléculas ao microscópio eletrônico

Allen TD & Goldberg MW (1993) High resolution SEM in cell biology. *Trends Cell Biol* 3:203–208.

Baumeister W (2002) Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr Opin Struct Biol* 12:679–684.

Böttcher B, Wynne SA & Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatits B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386:88–91.

Dubochet J, Adrian M, Chang J-J et al (1988) Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21:129–228.

Frank J (2003) Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers* 68:223–233.

Hayat MA (2000) Principles and Techniques of Electron Microscopy, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Heuser J (1981) Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3D electron microscopy. *Trends Biochem Sci* 6:64–68.

Lippincott-Schwartz J & Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300:87–91.

McIntosh R, Nicastro D & Mastronarde D (2005) New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* 15:43–51.

McDonald KL & Auer M (2006) High pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques* 41:137–139.

Pease DC & Porter KR (1981) Electron microscopy and ultramicrotomy. *J Cell Biol* 91:287s–292s.

Unwin PNT & Henderson R (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystal specimens. *J Mol Biol* 94:425–440.

IV ORGANIZAÇÃO INTERNA DAS CÉLULAS

Parte IV
Capítulos

10 Estrutura da Membrana

11 Transporte de Membrana de Pequenas Moléculas e as Propriedades Elétricas das Membranas

12 Compartimentos Intracelulares e Endereçamento de Proteínas

13 Tráfego intracelular de Vesículas

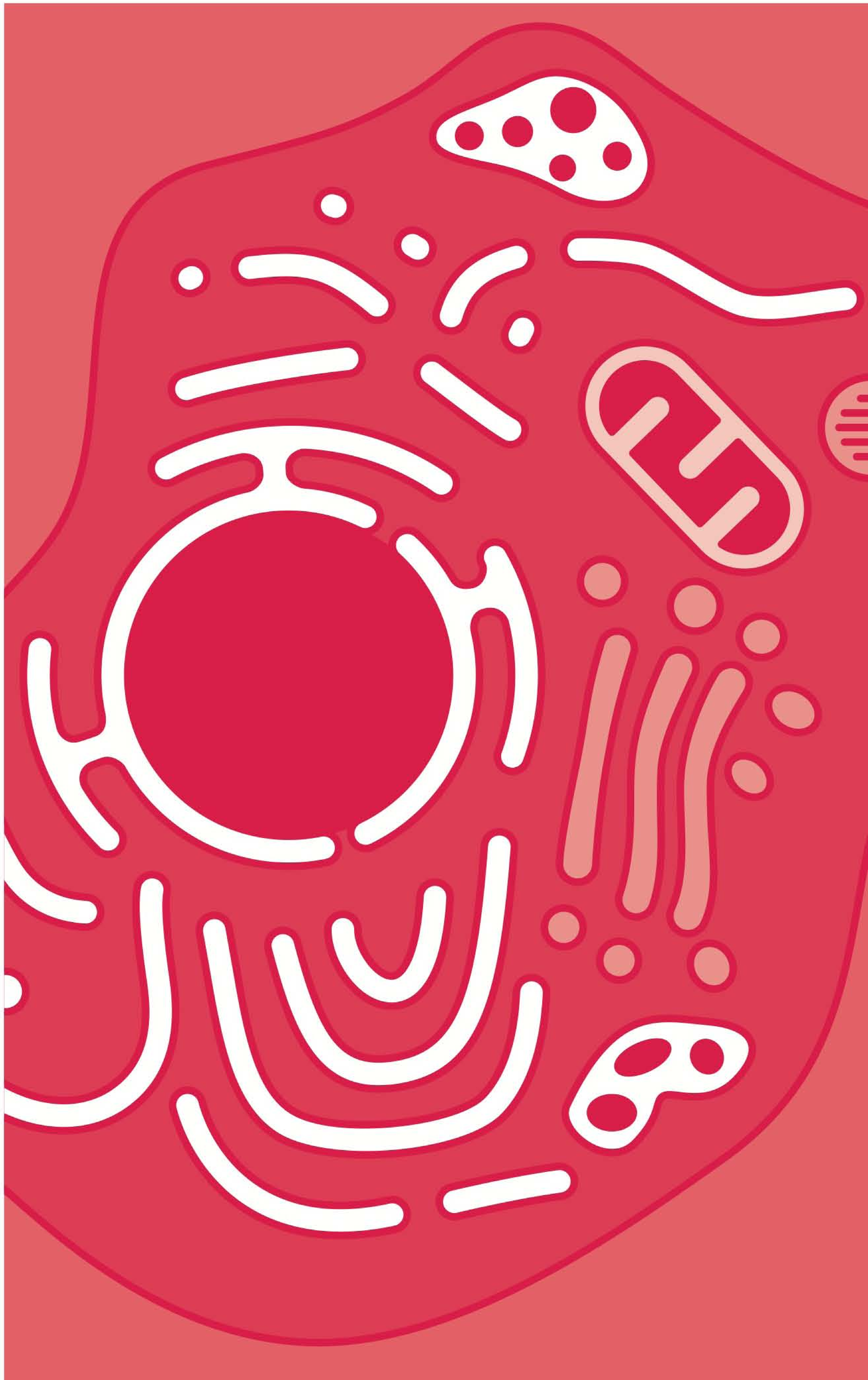
14 Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloroplastos

15 Mecanismos de Comunicação Celular

16 Citoesqueleto

17 Ciclo Celular

18 Apoptose



10

Estrutura da Membrana

Neste capítulo

A BICAMADA LIPÍDICA 617

PROTEÍNAS DE MEMBRANA 629

As membranas celulares são cruciais para a vida da célula. A **membrana plasmática** circunda a célula, define seus limites e mantém as diferenças essenciais entre o citosol e o ambiente extracelular. No interior das células eucarióticas, as membranas do retículo endoplasmático (RE), do aparelho de Golgi, da mitocôndria e de outras organelas circundadas por membranas mantêm as diferenças características entre o conteúdo de cada organela e o citosol. Gradientes de íons através da membrana, estabelecidos pelas atividades das proteínas especializadas da membrana, podem ser usados para sintetizar ATP, direcionar o movimento transmembrana de solutos selecionados ou, como nas células nervosas e musculares, produzir e transmitir sinais elétricos. Em todas as células, a membrana plasmática também contém proteínas que atuam como sensores de sinais externos, permitindo que as células mudem seu comportamento em resposta aos sinais ambientais, incluindo aqueles de outras células. Estas proteínas sensoriais, ou *receptoras*, transferem a informação, ao invés de moléculas, por meio da membrana.

Apesar de suas funções distintas, todas as membranas biológicas possuem uma estrutura geral comum: cada uma é uma fina película de moléculas de lipídeos (gordura) e proteínas unidas principalmente por interações não-covalentes (**Figura 10-1**). As membranas celulares são estruturas dinâmicas, fluidas e a maioria de suas moléculas move-se no plano da membrana. As moléculas lipídicas são organizadas como uma camada dupla contínua de cerca de 5 nm de espessura. Esta *bicamada lipídica* proporciona a estrutura fluida básica da membrana e atua como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas solúveis em água. As moléculas proteicas que atravessam a bicamada lipídica (*proteínas transmembrana*, ver Figura 10-1) medeiam quase todas as funções da membrana, por exemplo, transportando moléculas específicas através dela ou catalisando reações associadas à membrana, como a síntese de ATP. Na membrana plasmática, algumas proteínas transmembrana atuam como ligações estruturais que conectam o citoesqueleto através da bicamada lipídica à matriz extracelular ou a uma célula adjacente enquanto outras atuam como receptores para detectar e transduzir sinais químicos do ambiente celular. Como esperado, existem muitas proteínas de membrana diferentes que permitem que a célula funcione e interaja com seu ambiente, e estima-se que cerca de 30% das proteínas codificadas pelo genoma de uma célula animal sejam proteínas de membrana.

Neste capítulo iremos estudar a estrutura e a organização dos dois principais constituintes das membranas biológicas, os lipídeos e as proteínas. Embora salientemos principalmente a membrana plasmática, a maioria dos conceitos discutidos também é aplicável às várias membranas internas das células. As funções das membranas celulares serão consideradas nos últimos capítulos: seu papel na síntese de ATP, por exemplo, será discutido no Capítulo 14; seu papel no transporte transmembrana de pequenas moléculas, no Capítulo 11; seu papel na sinalização celular e adesão celular, nos Capítulos 15 e 19, respectivamente. Nos Capítulos 12 e 13, discutiremos as membranas internas das células e o tráfego de proteínas através e entre elas.

A BICAMADA LIPÍDICA

A **bicamada lipídica** forma a estrutura básica de todas as membranas celulares. Ela é facilmente observada por microscopia eletrônica, e sua estrutura é atribuível exclusivamente a

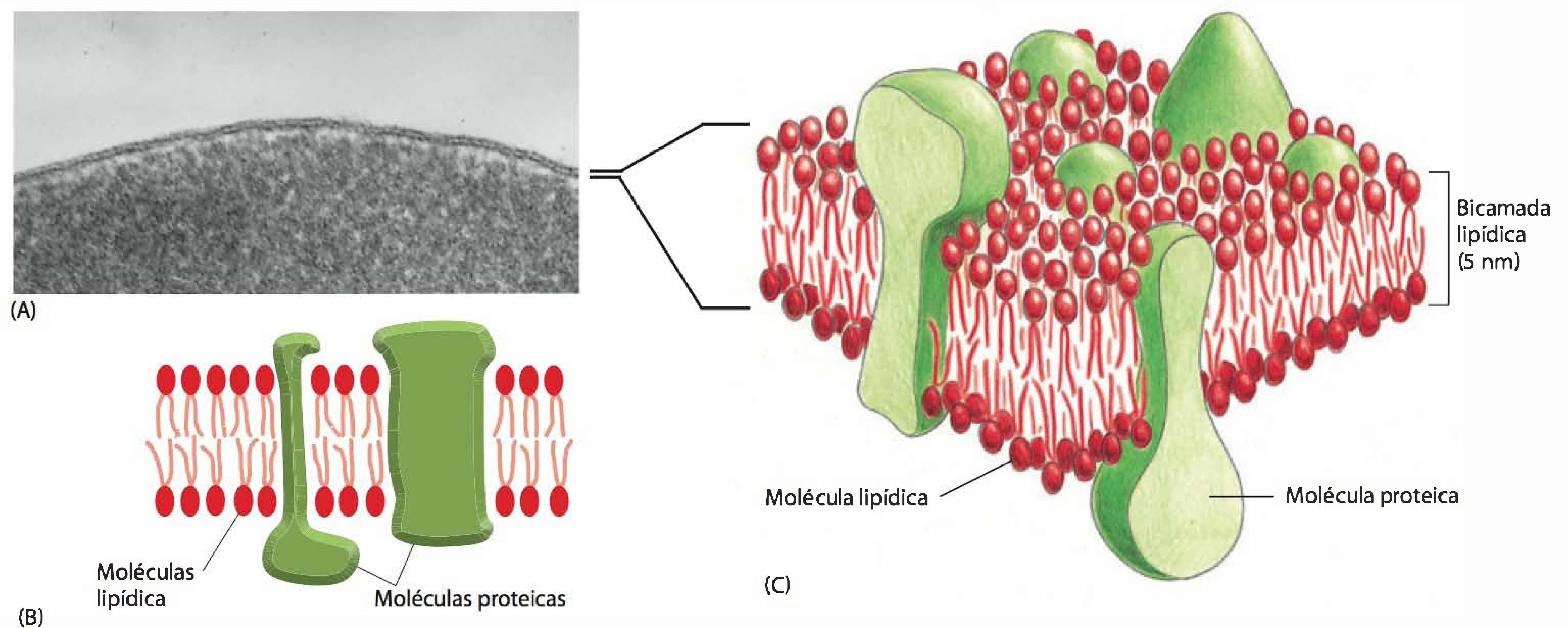


Figura 10-1 Três visões de uma membrana celular. (A) Uma micrografia eletrônica da membrana plasmática (de um eritrócito humano) vista em uma secção transversal. (B e C) Estas representações gráficas mostram visões bi e tridimensionais da membrana celular e a disposição de seus lipídeos e proteínas. (A, cortesia de Daniel S. Friend.)

propriedades especiais das moléculas lipídicas, as quais se reúnem espontaneamente em bicamadas mesmo sob condições artificiais simples.

Fosfoglicerídeos, esfingolipídeos e esteroides são os principais lipídeos das membranas celulares

As moléculas lipídicas constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas das células animais, e quase todo o restante são proteínas. Há aproximadamente 5×10^6 moléculas lipídicas em uma área de 1 μm $\times$ 1 μm de bicamada lipídica, ou cerca de 10^9 moléculas lipídicas na membrana plasmática de uma pequena célula animal. Todas as moléculas lipídicas da membrana plasmática são **anfifílicas**, isto é, possuem uma extremidade **hidrofílica** ("amante da água") ou *polar* e uma extremidade **hidrofóbica** ("teme a água") ou *apolar*.

Os lipídeos mais abundantes das membranas são os **fosfolipídeos**. Eles possuem um grupamento polar e duas *caudas de hidrocarbonos* hidrofóbicas. Nos animais, nas plantas e nas células bacterianas, as caudas normalmente são ácidos graxos e podem diferir em comprimento (normalmente elas contêm entre 14 e 24 átomos de carbono). Tipicamente, uma cauda possui uma ou mais ligações duplas em *cis* (isto é, ela é *insaturada*) enquanto a outra cauda não possui esta ligação (isto é, ela é *saturada*). Como mostra a **Figura 10-2**, cada ligação dupla *cis* cria uma pequena dobra na cauda. Diferenças no comprimento e na saturação das caudas e dos ácidos graxos influenciam como as moléculas fosfolipídicas encaixam-se umas contra as outras, afetando a fluidez da membrana, como discutiremos mais adiante.

Os principais fosfolipídeos da maioria das membranas das células animais são **fosfoglicerídeos**, os quais possuem uma estrutura central de *glicerol* de três carbonos (ver Figura 10-2). Duas longas cadeias de ácidos graxos são unidas por pontes ésteres aos átomos de carbono adjacentes do glicerol, e o terceiro átomo de carbono está ligado a um grupo fosfato, o qual por sua vez é ligado a um entre vários tipos de grupos de cabeças. Combinando diferentes ácidos graxos e grupos de cabeças, as células produzem diferentes fosfoglicerídeos. A *fosfatidiletanolamina*, a *fosfatidilserina* e a *fosfatidilcolina* são os principais fosfoglicerídeos das membranas das células de mamíferos (**Figura 10-3**A-C).

Outro fosfolipídeo importante, denominado *esfingomielina*, é composto por *esfingosina* ao invés de glicerol (Figura 10-3D-E). A esfingosina é uma longa cadeia acil com um grupo amino (NH_2) e dois grupos hidroxila (OH) em uma extremidade da molécula. Na esfingomielina, a cauda de ácido graxo é ligada ao grupo amino e o grupo fosfatidilcolina é ligado ao grupo hidroxila terminal deixando um grupo hidroxila livre. O grupo hidroxila livre contribui para a propriedade polar do grupo de cabeça adjacente e pode formar ligações de hidrogênio com o grupo de cabeças do lipídeo vizinho, com uma molécula de água ou com uma proteína de membrana. Juntos, os fosfolipídeos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina constituem mais da metade da massa de lipídeos da maioria das membranas celulares de mamíferos (ver Tabela 10-1).

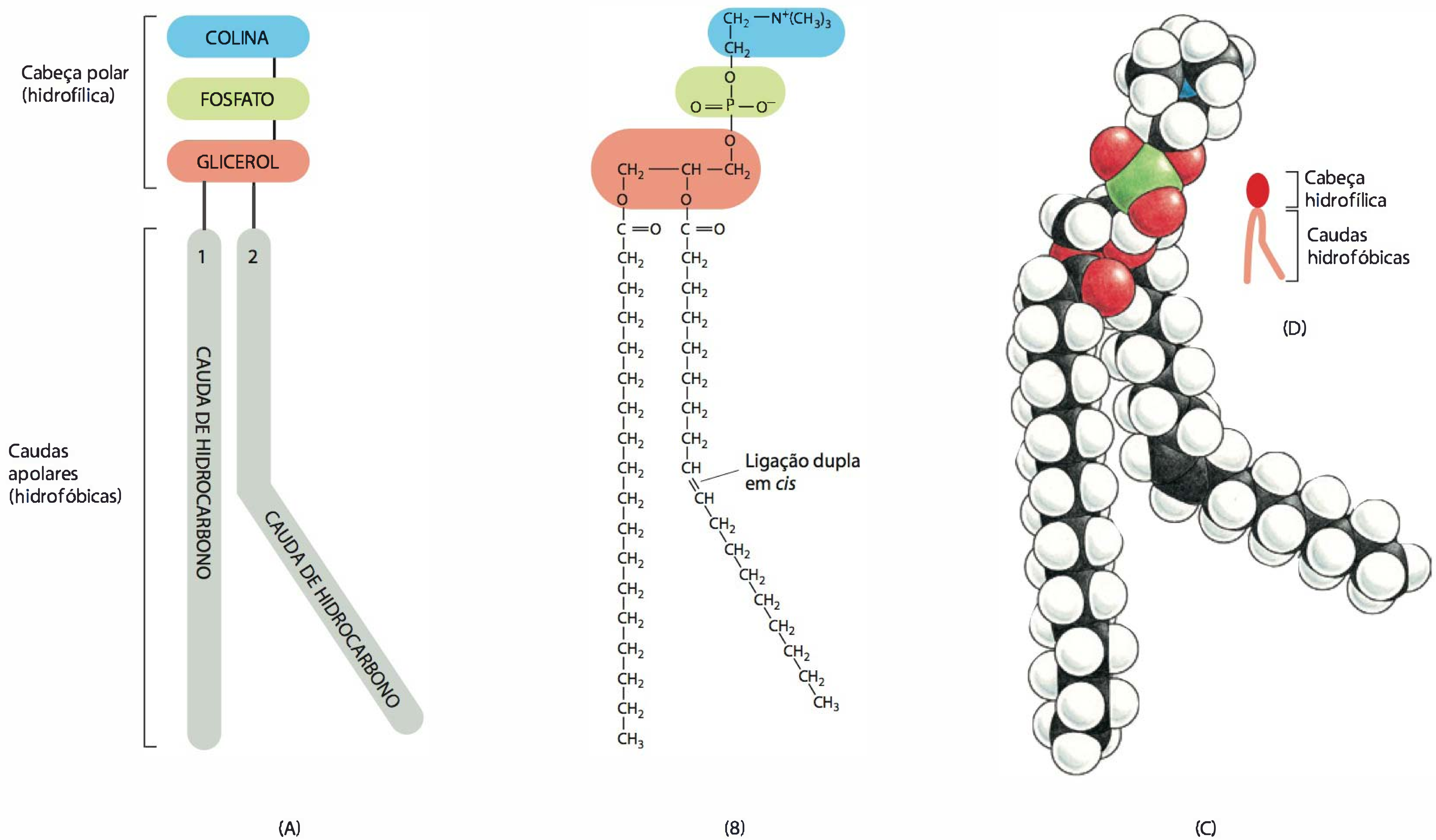


Figura 10-2 As partes da molécula de fosfolipídeo. Este exemplo é uma fosfatidilcolina, representada esquematicamente (A), por uma fórmula (B), por um modelo de preenchimento espacial (C) e por um símbolo (D). A flexão resultante da ligação dupla em *cis* está exagerada para enfatização.

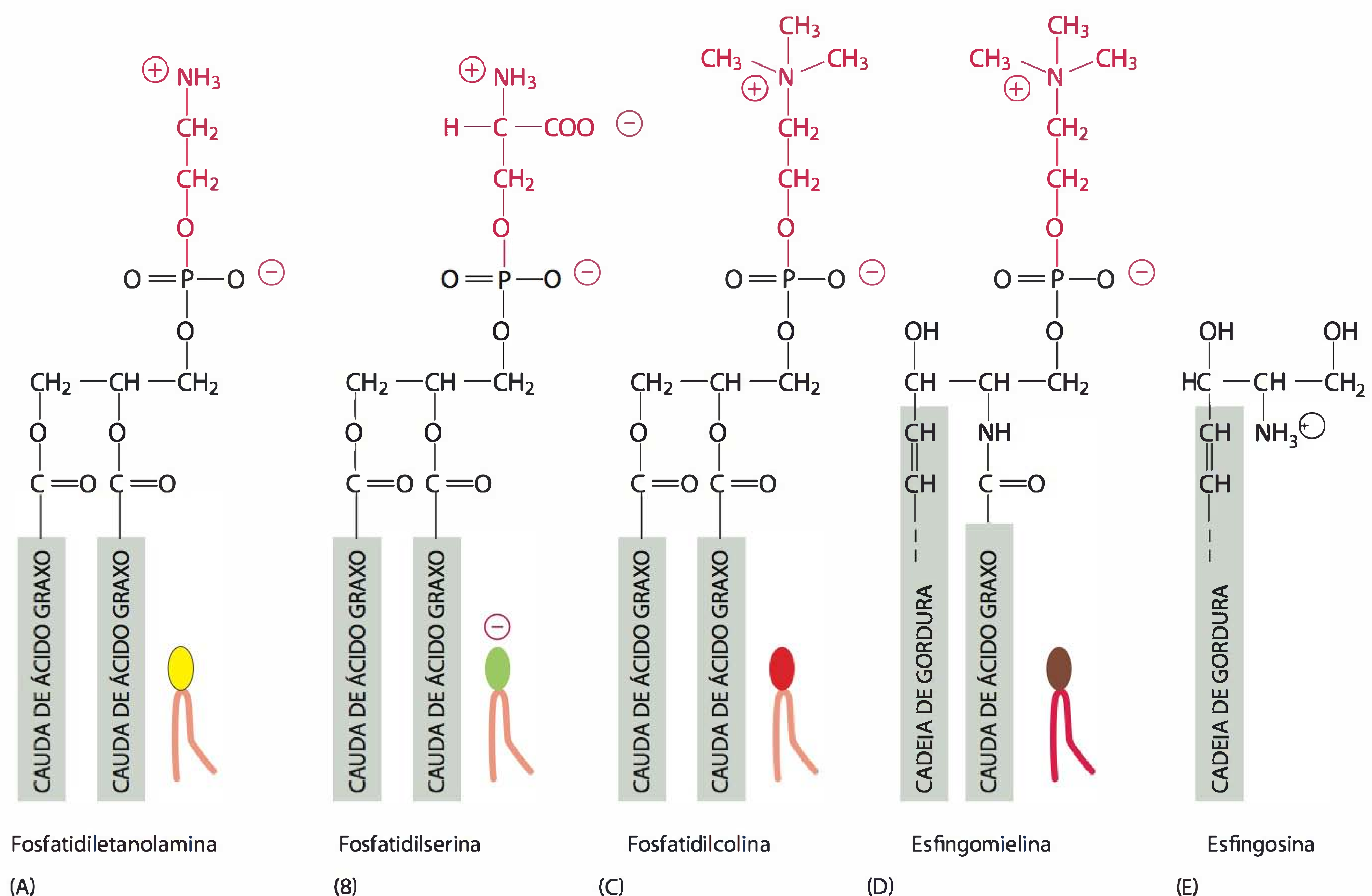


Figura 10-3 Os quatro principais fosfolipídeos das membranas plasmáticas de mamíferos. Observe que os diferentes grupos de cabeças estão representados em cores diferentes. As moléculas lipídicas mostradas em (A-C) são fosfoglicerídeos, os quais são derivados do glicerol. A molécula em (D) é a esfingomielina, a qual é derivada da esfingosina (E) e, portanto, é um esfingolipídeo. Note que somente a fosfatidilserina possui carga total negativa, cuja importância discutiremos mais adiante; os outros três são eletricamente neutros em pH fisiológico, carregando portanto uma carga negativa, e uma carga positiva.

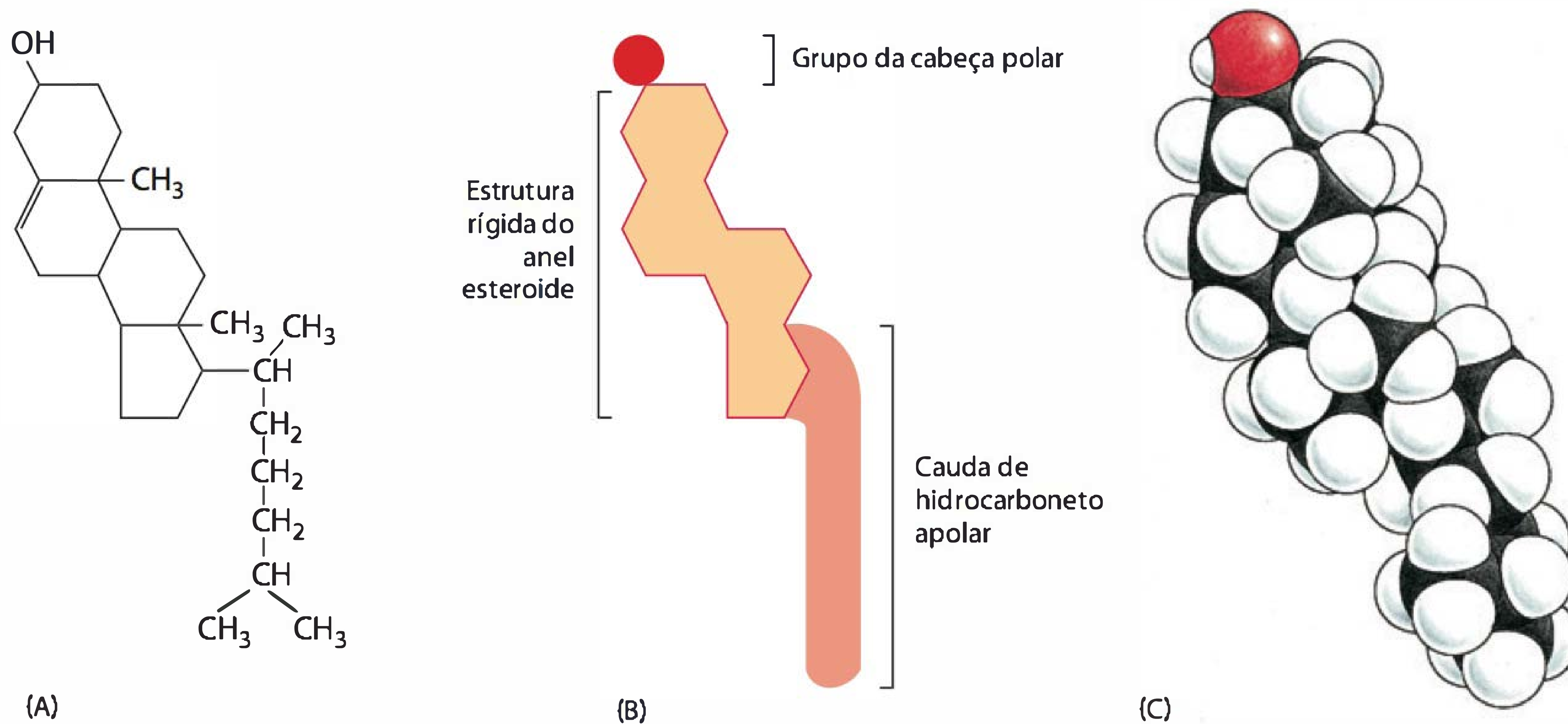


Figura 10-4 Estrutura do colesterol. O colesterol está representado em (A) por uma fórmula química, em (B) por um esquema e em (C) por um modelo de preenchimento espacial.

Além dos fosfolipídeos, a bicamada lipídica de muitas membranas celulares contém *colesterol* e *glicolipídeos*. A membrana plasmática eucariótica contém, especialmente, grandes quantidades de **colesterol** (**Figura 10-4**), até uma molécula para cada molécula de fosfolipídeo. O colesterol é um esterol. Ele contém uma estrutura em anel rígida a qual se liga a um único grupo hidroxila polar e a uma pequena cadeia de hidrocarbono apolar. As moléculas de colesterol orientam-se na bicamada com seu grupo hidroxila próximo aos grupos de cabeças polares das moléculas de fosfolipídeos adjacentes (**Figura 10-5**).

Os fosfolipídeos formam bicamadas espontaneamente

A forma e a natureza anfifílica das moléculas de fosfolipídeos causam a formação de bicamadas espontaneamente em ambientes aquosos. Como discutido no Capítulo 2, as moléculas hidrofílicas dissolvem-se facilmente em água porque contêm grupos polares carregados ou não-carregados que podem formar interações eletrostáticas favoráveis ou ligações de hidrogênio com as moléculas de água. As moléculas hidrofóbicas, por outro lado, são insolúveis em água porque todos ou quase todos os seus átomos são apolares e não-carregados e, portanto, não podem formar interações energeticamente favoráveis com as moléculas de água. Se dispersos na água, irão forçar as moléculas de água adjacentes a se reorganizarem em estruturas semelhantes a gelo que envolvem as moléculas hidrofóbicas (**Figura 10-6**). Sua formação aumenta com a energia livre porque estas estruturas de cadeias cristais são mais organizadas do que as moléculas de água circundantes. Entretanto, o custo dessa energia livre é minimizado se as moléculas hidrofóbicas (ou as porções hidrofóbicas das moléculas anfifílicas) agruparem-se e, assim, um menor número de moléculas de água é afetado.

As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas lipídicas comportam-se da mesma maneira. Assim, as moléculas lipídicas agregam-se espontaneamente mergulhando suas caudas hidrofóbicas de hidrocarbonos no interior e expondo suas cabeças hidrofílicas na água. Dependendo de sua forma, elas podem fazer isso de duas maneiras: podem formar *micelas* esféricas com as caudas para dentro ou formar folhas de camadas duplas, ou *bicamada*, com as caudas hidrofóbicas para o interior entre as cabeças hidrofílicas (**Figura 10-7**).

As moléculas de fosfolipídeos, por serem cilíndricas, formam bicamadas espontaneamente em ambientes aquosos. Neste arranjo energeticamente mais favorável, as cabeças hidrofílicas voltam-se para a água da superfície da bicamada, e as caudas hidrofóbicas estão protegidas da água, voltadas para o interior. As mesmas forças que fazem com que os fosfolipídeos formem as bicamadas também proporcionam uma propriedade de autosselamento. Uma pequena fenda na bicamada cria uma borda livre em contato com água e, devido ao fato de serem energeticamente desfavoráveis, os lipídeos tendem a se rearranjar espontaneamente para eliminar a borda livre. (Nas membranas plasmáticas eucarióticas, as fendas maiores são reparadas pela fusão de vesículas intracelulares.) A proibição das bordas livres tem profundas consequências: a única forma de uma bicamada evitar a existência de bordas é pelo fechamento sobre si mesma, formando um compartimento fechado (**Figura 10-8**).

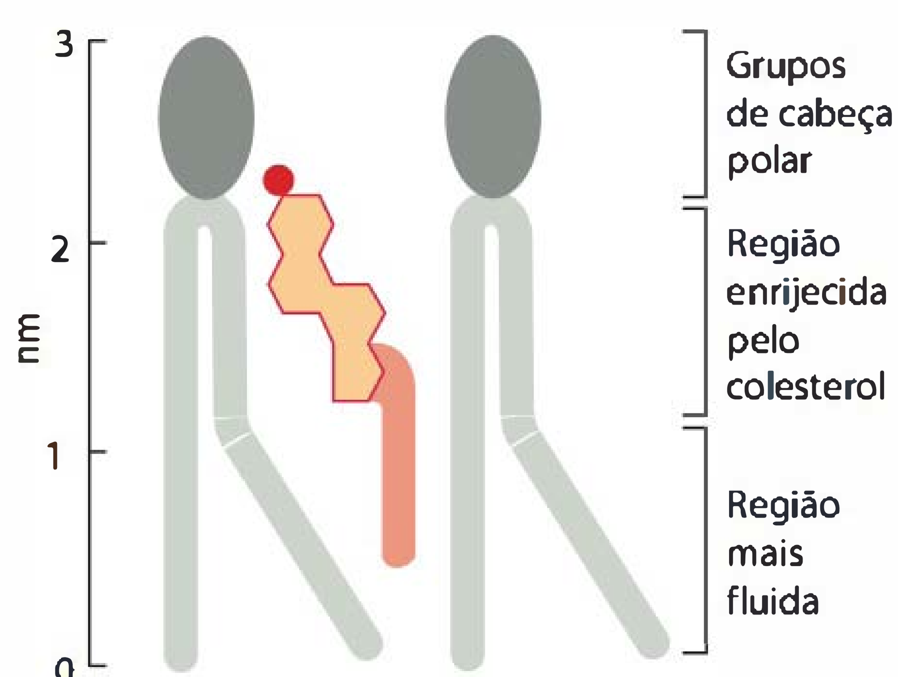


Figura 10-5 O colesterol é uma bicamada lipídica. Representação esquemática de uma molécula de colesterol interagindo com duas moléculas de fosfolipídeo em uma monocamada de uma bicamada lipídica.

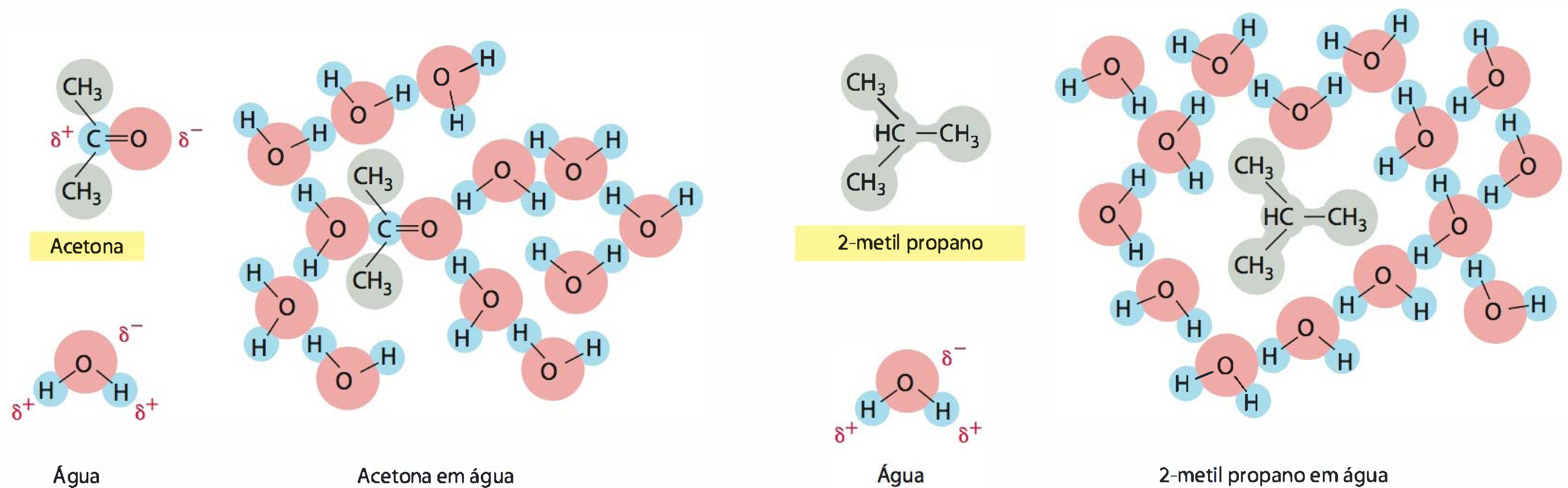


Figura 10-6 Como as moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas interagem de modo diferente com a água. (A) Como a acetona é polar, pode formar interações eletrostáticas favoráveis com as moléculas de água, as quais também são polares. Assim, a acetona se dissolve imediatamente em água. (B) Ao contrário, o 2-metil propano é completamente hidrofóbico. Como não pode formar interações favoráveis com a água, força as moléculas de água adjacentes a se reorganizarem em estruturas semelhantes ao gelo, as quais aumentam a energia livre. Portanto, este composto é praticamente insolúvel em água. O símbolo δ^- indica uma carga parcialmente negativa, e δ^+ indica uma carga parcialmente positiva. Os átomos polares estão representados em cores e os grupos apolares em *cinza*.

Esse comportamento excepcional, fundamental para a formação de células vivas, é decorrente da forma e da natureza anfifílica das moléculas de fosfolipídeos.

A bicamada lipídica também tem outras características que a tornam uma estrutura ideal para membranas celulares. Uma das mais importantes entre elas é a sua fluidez, a qual é crucial para muitas das funções da membrana.

A bicamada lipídica é um fluido bidimensional

Por volta de 1970, pesquisadores reconheceram pela primeira vez que moléculas lipídicas individuais são capazes de se difundir livremente entre as bicamadas lipídicas. A primeira demonstração provém de estudos de bicamadas lipídicas sintéticas. Dois tipos de preparações foram muito úteis em tais estudos: (1) a bicamada na forma de vesículas esféricas, denominadas **lipossomos**, as quais podem variar em tamanho entre 25 nm e 1 μm de diâ-

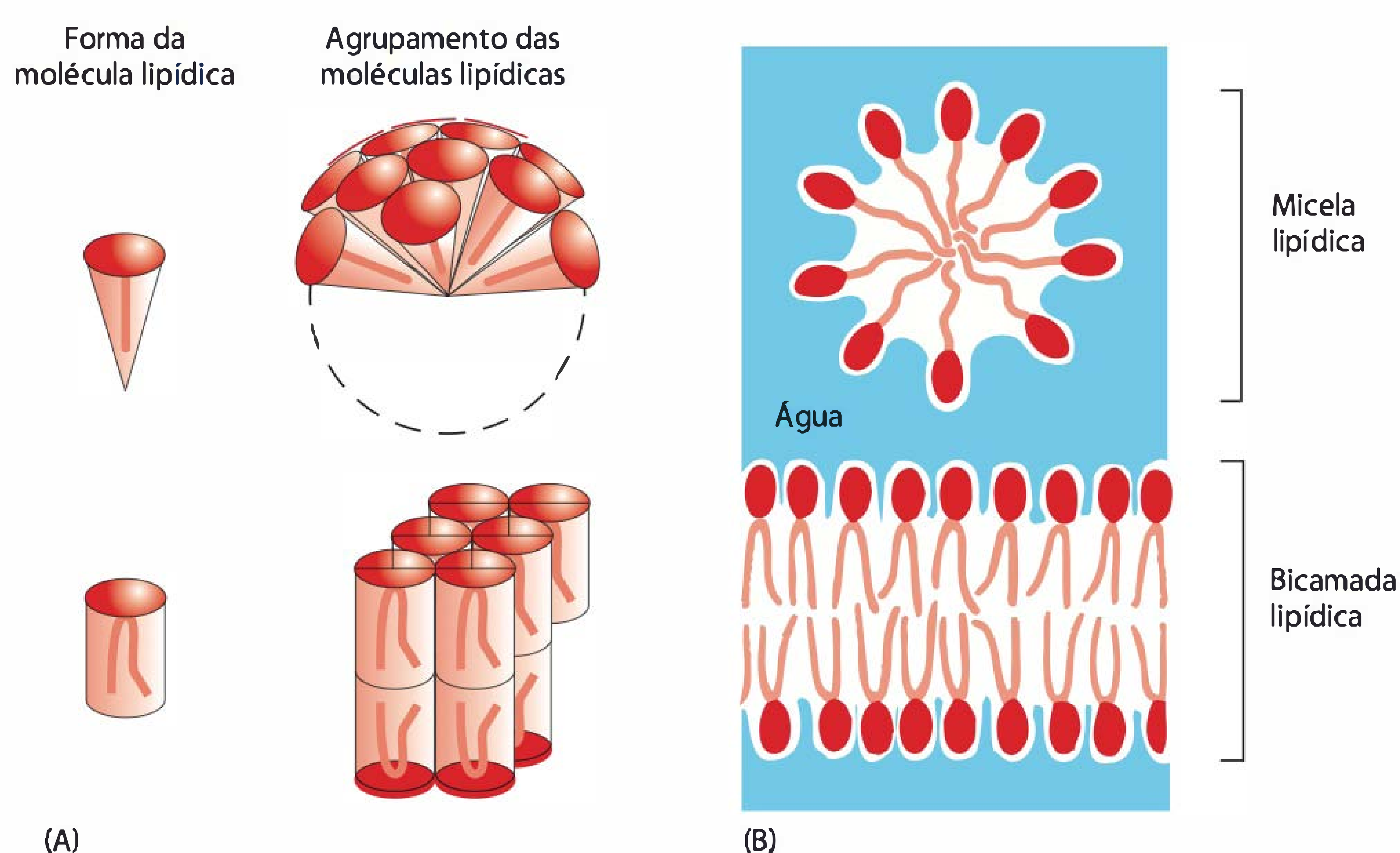


Figura 10-7 Arranjo do agrupamento das moléculas de lipídeos em um ambiente aquoso. (A) Moléculas lipídicas em forma de cunha (*acima*) formam micelas, enquanto moléculas fosfolipídicas em forma cilíndrica (*abaixo*) formam bicamadas. (B) Uma micela lipídica e uma bicamada lipídica observadas em uma secção transversal. As moléculas lipídicas formam espontaneamente uma ou outra dessas estruturas em água, dependendo de sua forma.

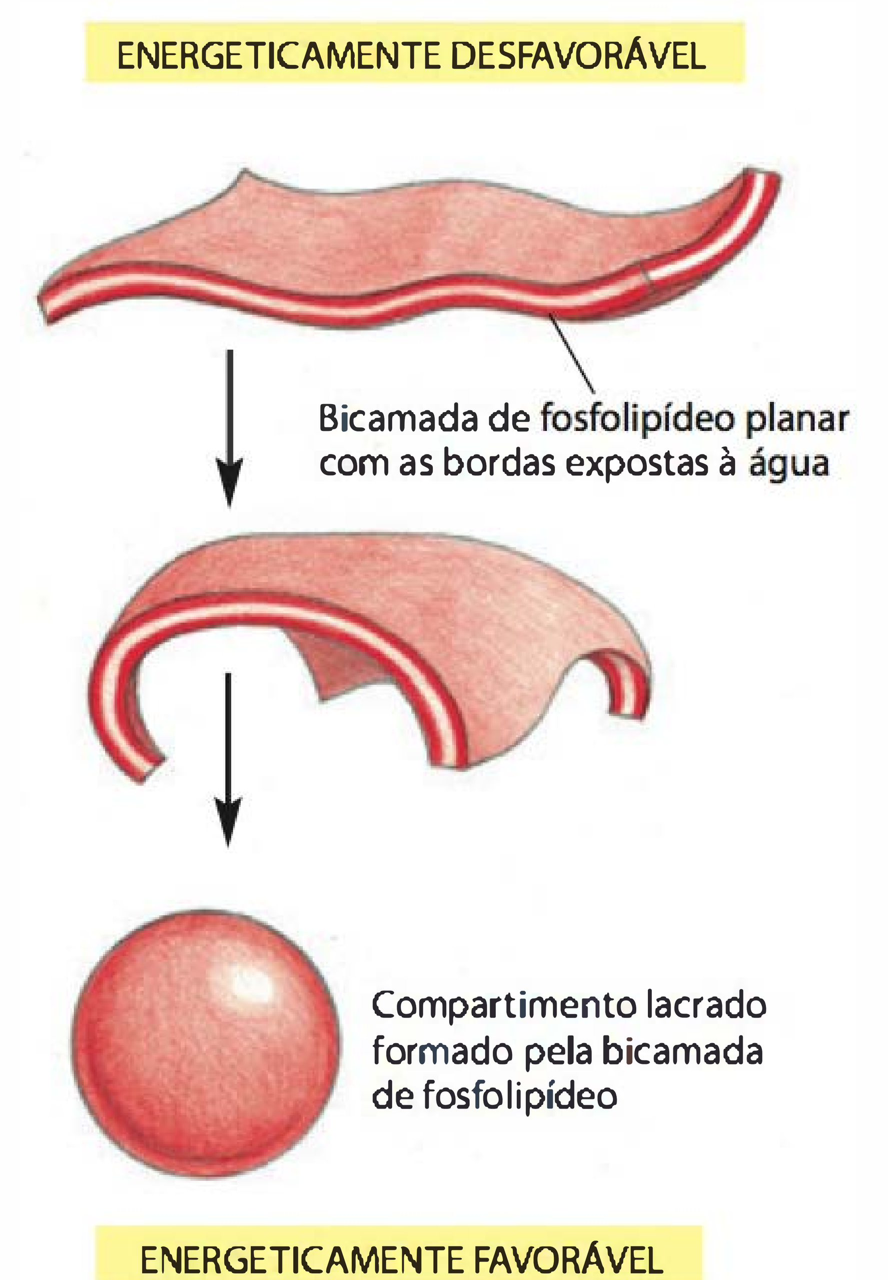


Figura 10-8 Fechamento espontâneo de uma bicamada lipídica para formar um compartimento fechado. A estrutura fechada é estável porque evita a exposição de caudas hidrocarbonadas hidrofóbicas à água, que seriam energeticamente desfavoráveis.

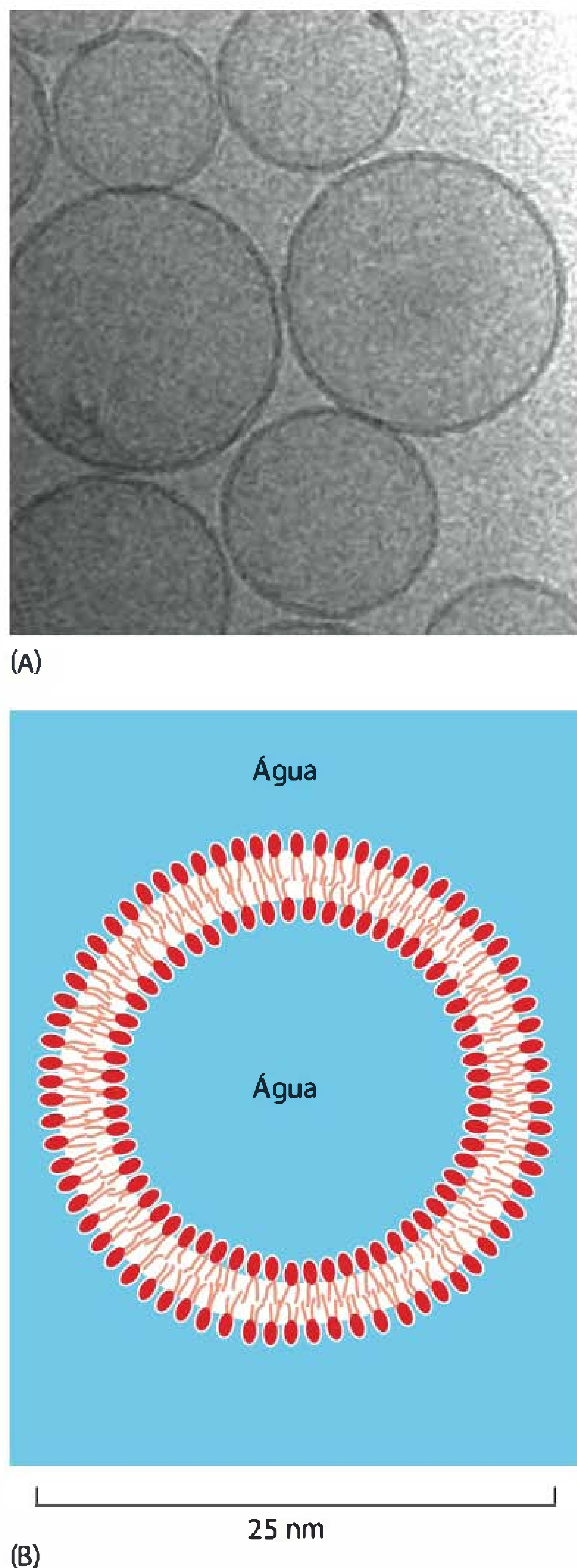


Figura 10-9 Lipossomos. (A) Micrografia eletrônica de vesículas de fosfolipídeos não-coradas e não-fixadas – lipossomos – em água, congeladas rapidamente à temperatura do nitrogênio líquido. (B) Representação gráfica de um pequeno lipossomo esférico visto em secção transversal. Os lipossomos frequentemente são usados como modelo de membrana em estudos experimentais. (A, de P. Frederik e W. Hubert, *Meth. Enzymol*. 391:431, 2005. Com permissão de Elsevier.

metro, dependendo de como elas foram produzidas (**Figura 10-9**); e (2) bicamadas planares, denominadas **membranas negras**, formadas no espaço que divide dois compartimentos aquosos (**Figura 10-10**).

Várias técnicas têm sido usadas para medir o movimento das moléculas lipídicas individuais e seus componentes. Por exemplo, pode-se construir uma molécula lipídica com um corante fluorescente ou uma pequena partícula de ouro ligada a sua cabeça polar e seguir a difusão de cada molécula individual na membrana. Alternativamente, pode-se modificar a cabeça lipídica para portar um marcador de rotação como um grupo nitroxila (>N-O), o qual contém um elétron não-pareado, cuja rotação cria um sinal paramagnético que pode ser detectado por espectroscopia de ressonância rotacional (ESR, *electron spin resonance*). (Os princípios desta técnica são similares aos da ressonância magnética nuclear, apresentada no Capítulo 8.) O movimento e a orientação de um lipídeo marcado na bicamada podem ser deduzidos a partir do espectro de ESR. Tais estudos mostraram que as moléculas fosfolipídicas nas bicamadas sintéticas raramente migram de um lado para outro da monocamada (também chamada de *folheto*). Este processo, denominado *flip-flop* ("retornar"), ocorre menos de uma vez por mês em cada molécula, embora o colesterol seja uma exceção a esta regra e possa realizar o *flip-flop* rapidamente. Por outro lado, moléculas lipídicas trocam de lugar rapidamente com suas vizinhas *dentro* de uma mesma monocamada (cerca de 10^7 vezes por segundo). Isso origina uma rápida difusão lateral, com um coeficiente de difusão (D) de cerca de 10^{-8} cm^2/seg, que significa que uma molécula lipídica média difunde o comprimento de uma célula bacteriana grande (~2 μm) em cerca de um segundo. Estes estudos também mostraram que moléculas lipídicas giram rapidamente ao redor de seu eixo maior e suas cadeias de hidrocarbonos são flexíveis. Simulações em computador mostraram que as moléculas lipídicas são muito desorganizadas nas membranas, apresentando uma superfície irregular, com espaços variáveis e as cabeças orientadas para a fase aquosa de um lado da bicamada (**Figura 10-11**).

Estudos similares de mobilidade foram realizados com moléculas de lipídeos marcadas em membranas biológicas isoladas e em células vivas e apresentaram resultados similares àqueles obtidos nas bicamadas sintéticas. Foi demonstrado que o componente lipídico de uma membrana biológica é um líquido bidimensional no qual as moléculas constituintes estão livres para se mover lateralmente. Como em uma bicamada sintética, moléculas individuais de fosfolipídeos normalmente estão confinadas a sua própria monocamada. Este confinamento cria um problema para sua síntese. As moléculas de fosfolipídeos são manufaturadas em apenas uma monocamada de uma membrana, principalmente na monocamada citosólica da membrana do RE. Se nenhuma dessas moléculas recém-formadas migra imediatamente para a monocamada não-citosólica, não poderá ser formada uma nova bicamada lipídica. O problema pode ser resolvido por uma classe especial de enzimas transmembrana denominadas *translocadoras de fosfolipídeos*, as quais catalisam o rápido *flip-flop* dos fosfolipídeos de uma camada para outra, como apresentado no Capítulo 12.

A fluidez da uma bicamada lipídica depende de sua composição

A fluidez das membranas celulares tem que ser precisamente regulada. Por exemplo, certos processos de transporte através das membranas e atividades enzimáticas cessam quando a viscosidade é aumentada experimentalmente acima de um nível limítrofe.

A fluidez de uma bicamada lipídica depende de sua composição e de sua temperatura, como é facilmente demonstrado em estudos de bicamadas sintéticas. Uma bicamada sinté-

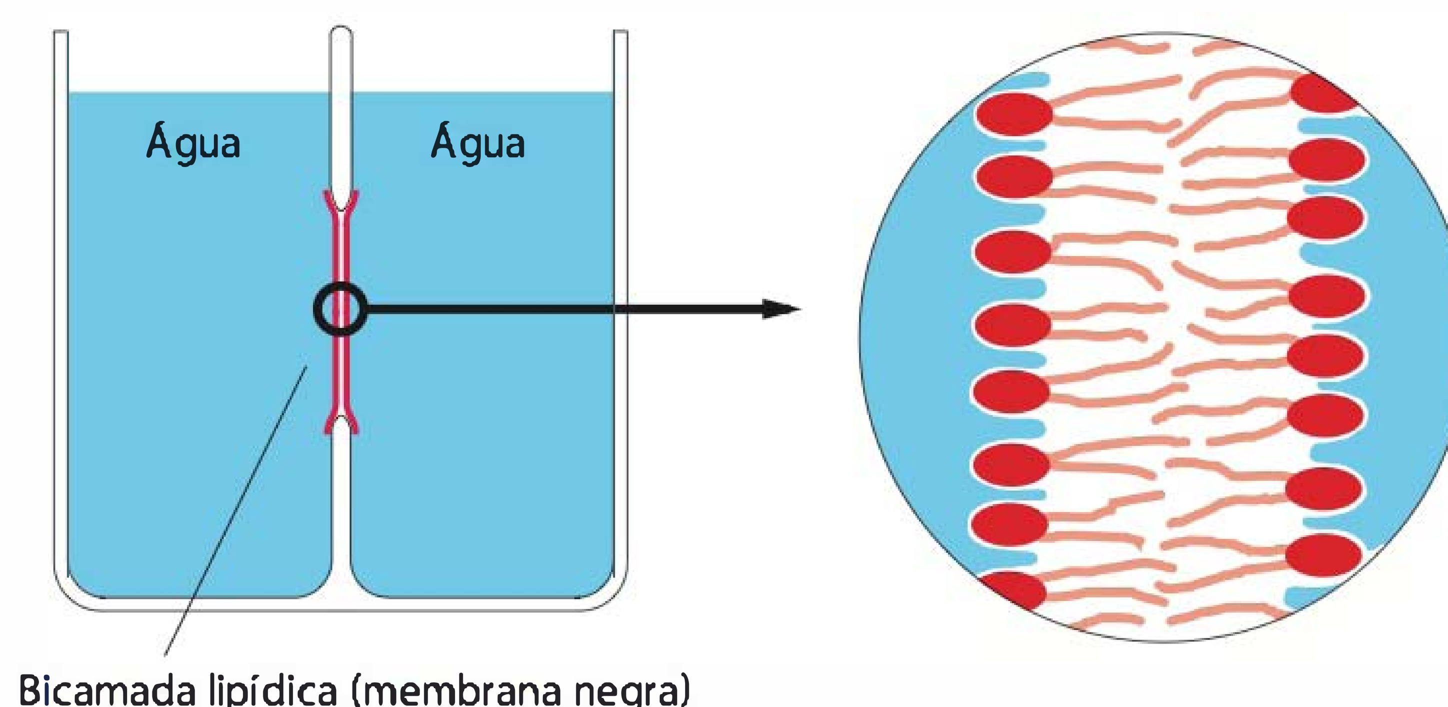


Figura 10-10 Visão da secção transversal de uma membrana negra, uma bicamada lipídica sintética. Esta bicamada planar parece negra quando se forma um pequeno orifício em uma divisória que separa os dois compartimentos aquosos. As membranas negras são usadas para medir as propriedades de permeabilidade das membranas sintéticas.

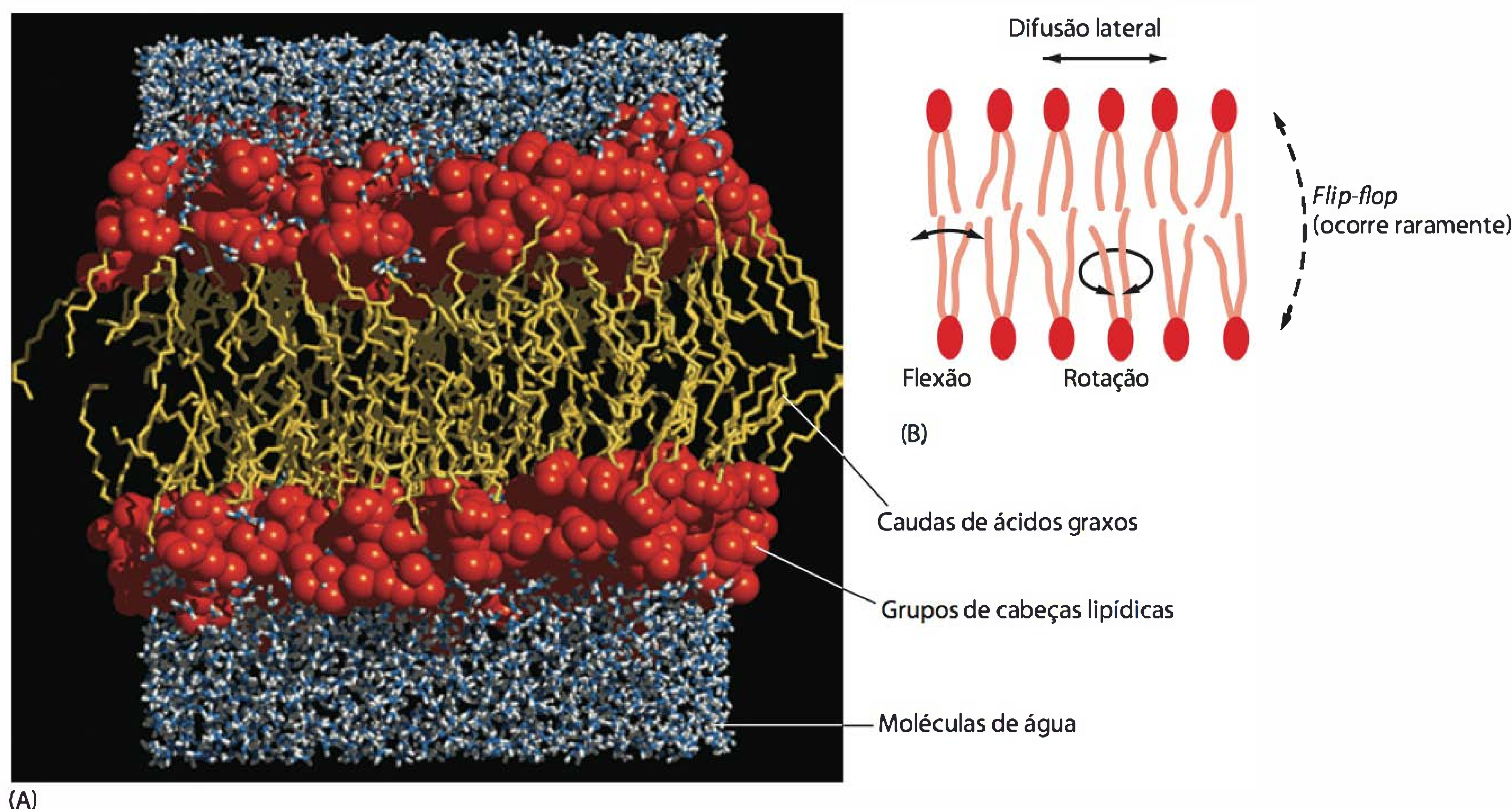


Figura 10-11 Mobilidade das moléculas de fosfolipídeo em uma bicamada lipídica artificial. Iniciando com um modelo de 100 moléculas de fosfatidilcolina organizadas em uma bicamada regular, o computador calcula a posição de cada átomo após 300 picossegundos de estímulo. A partir destes cálculos teóricos (que levavam semanas para serem processados em 1995), surge um modelo de bicamada lipídica que considera quase todas as propriedades mensuráveis de uma bicamada lipídica sintética, como espessura, número de moléculas lipídicas por área de membrana, profundidade de penetração na água e irregularidades das duas superfícies. Observe que as caudas em uma monocamada podem interagir com as da outra monocamada se forem longas o suficiente. (B) As diferentes movimentações de uma molécula lipídica em uma bicamada. (A, com base em S. W. Chiu et al., *Biophys. J.* 69: 1230-1245, 1995. Com permissão da Biophysical Society.)

tica feita de um único tipo de fosfolipídeo muda do estado líquido para um estado cristalino rígido (ou gel) bidimensional em um ponto de congelamento característico. Esta mudança de estado é denominada *transição de fase*, e a temperatura na qual isso ocorre é mais baixa (isto é, a membrana torna-se mais difícil de congelar) se as cadeias de hidrocarbonos forem curtas ou possuírem pontes duplas. Uma cadeia curta reduz a tendência das caudas de hidrocarbonos de interagirem umas com as outras, na mesma camada ou na monocamada oposta, e as pontes duplas *cis* produzem torções nas cadeias de hidrocarbonos que as tornam mais difíceis de se agruparem, de modo que a membrana torna-se mais fluida a baixas temperaturas (**Figura 10-12**). Bactérias, leveduras e outros organismos cujas temperaturas flutuam com a do ambiente ajustam a composição de ácidos graxos das suas membranas lipídicas para manter uma fluidez relativamente constante. Quando a temperatura baixa, por exemplo, as células desses organismos sintetizam ácidos graxos com mais pontes duplas *cis* e evitam a redução da fluidez da bicamada que, de outra forma, ocorreria devido à queda na temperatura.

O colesterol modula as propriedades da bicamada lipídica. Quando misturado com fosfolipídeos, aumenta a propriedade de barreira permeável da bicamada lipídica. Insere-se na bicamada com o grupo hidroxila próximo às cabeças polares dos fosfolipídeos, de modo que seus rígidos anéis esteroides interajam e parcialmente imobilizem aquelas re-

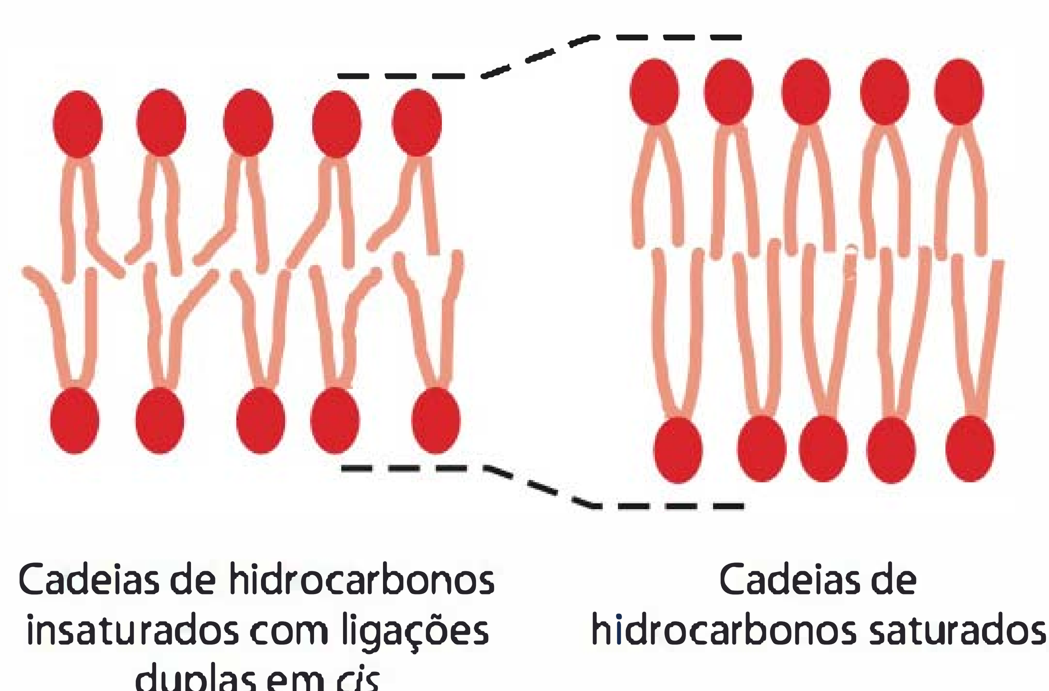


Figura 10-12 A influência de ligações duplas em *cis* nas cadeias de hidrocarbonos. As ligações duplas dificultam o agrupamento das cadeias tornando mais difícil de congelar a bicamada lipídica. Além disso, devido às cadeias de hidrocarbonos de lipídeos insaturados estarem mais distantes, as bicamadas lipídicas por eles formadas são mais delgadas do que as bicamadas formadas por lipídeos saturados.

Tabela 10-1 Composição aproximada dos lipídeos de diferentes membranas celulares

Lipídeo	Porcentagem total de lipídeos por peso					
	Membrana plasmática de um hepatócito	Membrana plasmática de um eritrócito	Mielina	Mitocôndria (Membranas interna e externa)	Retículo endoplasmático	Bactéria *E. Coli*
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidiletanolamina	7	18	15	28	17	70
Fosfatidilserina	4	7	9	2	5	Traços
Fosfatidilcolina	24	17	10	44	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glicolipídeos	7	3	28	Traços	Traços	0
Outros	22	14	8	23	27	30

giões de hidrocarbonos próximas aos grupos de cabeças polares (ver Figura 10-5). Reduzindo a mobilidade dos primeiros grupos CH_2 das cadeias de hidrocarbonos das moléculas de fosfolipídeos, o colesterol torna a bicamada lipídica menos deformável nesta região, reduzindo a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas solúveis em água. Embora o colesterol aumente o empacotamento dos lipídeos na bicamada, isto não torna as membranas menos fluidas. Às altas concentrações encontradas na maioria das membranas plasmáticas dos eucariotos, o colesterol também impede que as cadeias de hidrocarbonos agrupem-se e cristalizem.

A **Tabela 10-1** compara a composição de várias membranas biológicas. Note que a membrana plasmática bacteriana frequentemente é composta por um dos principais tipos de fosfolipídeos e não contém colesterol. Sua estabilidade mecânica é aumentada pela sobreposição da parede celular (ver Figura 11-18). Nas *arquebactérias*, os lipídeos normalmente contêm cadeias de prenil de 20 a 25 carbonos de comprimento ao invés de ácidos graxos; as cadeias de prenil e de ácidos graxos são similarmente hidrofóbicas e flexíveis (ver Figura 10-20F). Assim, a bicamada lipídica pode ser constituída de moléculas com características similares, mas desenhos moleculares diferentes. As membranas plasmáticas da maioria das células eucarióticas são mais variáveis do que as dos procariotos e das arquebactérias, não somente por conterem grandes quantidades de colesterol, mas também por possuírem uma mistura de diferentes fosfolipídeos.

A análise das membranas lipídicas por espectrometria de massas revelou que a composição de lipídeos de uma membrana celular típica é muito mais complexa do que se pensava originalmente. De acordo com estes estudos, as membranas são compostas de uma desconcertante variedade de 500 a 1.000 espécies lipídicas diferentes. Enquanto parte desta complexidade reflete a variação combinatória das cabeças, o comprimento das cadeias de hidrocarbonos e a desaturação das principais classes de fosfolipídeos, as membranas também contêm muitos lipídeos secundários distintos estruturalmente, sendo alguns com funções importantes. Os *inositol fosfolipídeos*, por exemplo, estão presentes em pequenas quantidades, mas desempenham funções cruciais guiando o tráfego da membrana e na sinalização celular (discutido nos Capítulos 13 e 15, respectivamente). Sua síntese e destruição local são reguladas por um grande número de enzimas as quais criam pequenas moléculas de sinalização intracelular e sítios de ancoramento lipídicos nas membranas que recrutam proteínas específicas do citosol, como será discutido mais adiante.

Apesar de sua fluidez, as bicamadas lipídicas podem formar domínios de composições distintas

Espera-se que a maioria dos tipos de moléculas lipídicas esteja distribuída ao acaso na própria monocamada devido ao fato de ser uma bicamada lipídica fluida bidimensional. As forças de van der Waals entre as caudas vizinhas de hidrocarbonos não são seletivas o suficiente para manter unidos os grupos de moléculas de fosfolipídeos. Entretanto, em certas misturas lipídicas, diferentes lipídeos podem agrupar-se transientemente, criando uma rede dinâmica de diferentes domínios. Nas bicamadas lipídicas sintéticas, compostas de fosfatidilcolina, esfingomielina e colesterol, as forças de van der Waals entre as longas cadeias de hidrocarbonos saturadas das moléculas de esfingomielina podem ser fortes o suficiente para manter unidas as moléculas adjacentes de forma transiente (**Figura 10-13**).

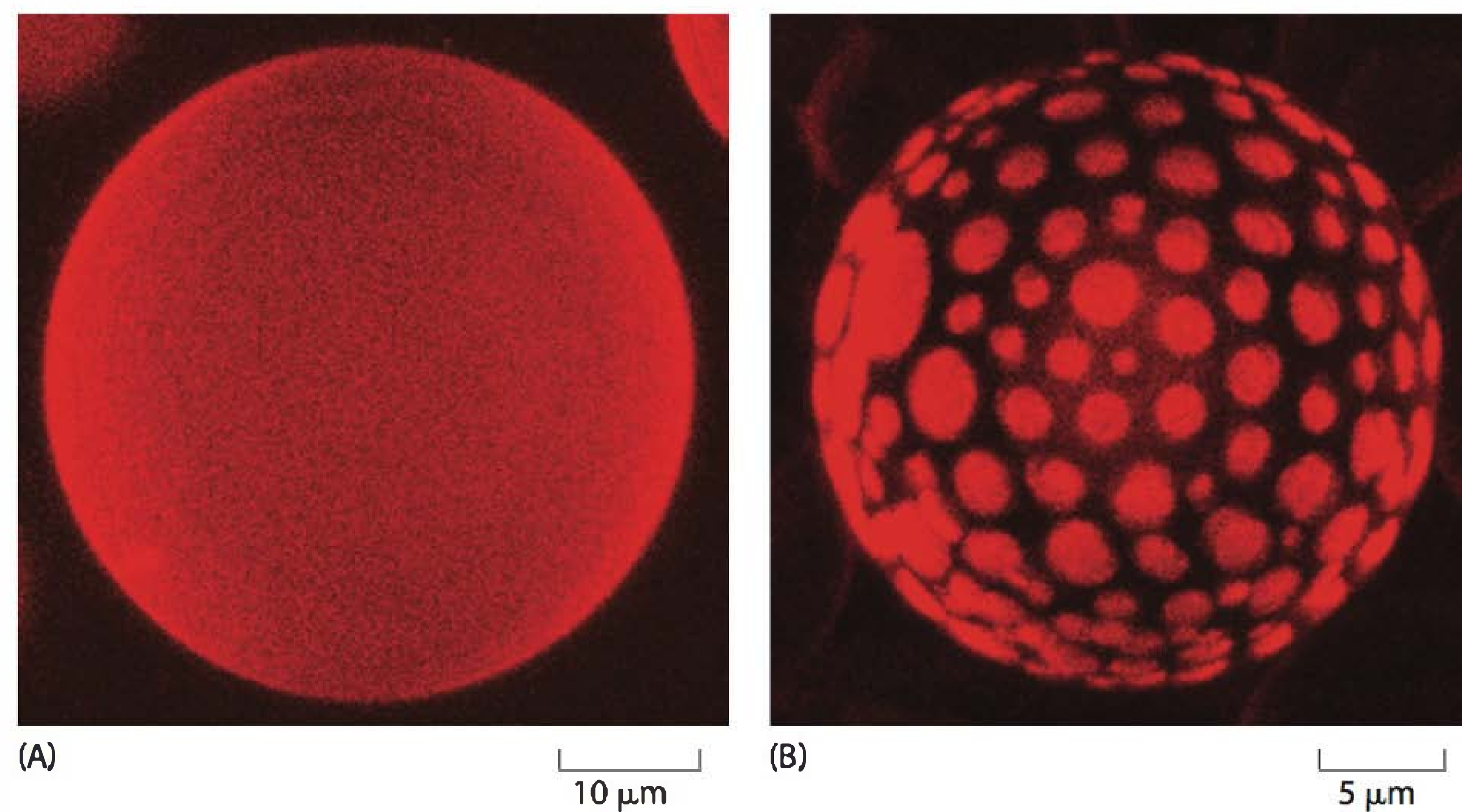


Figura 10-13 Separação de fase lateral em uma bicamada lipídica artificial. (A) Lipossomo gigante produzido com uma mistura 1:1 de fosfatidilcolina e esfingomielina, formando uma bicamada uniforme, enquanto em (B) o lipossomo é produzido com uma mistura 1:1:1 de fosfatidilcolina, esfingomielina e colesterol, formando bicamadas com duas fases não-miscíveis. Os lipossomos são corados com concentrações – traço de um corante fluorescente que preferencialmente divide uma das fases. O tamanho médio dos domínios formados nesses lipossomos gigantes artificiais é muito maior do que o esperado nas membranas biológicas, onde as balsas lipídicas podem ser muito pequenas, com poucos nanômetros de diâmetro. (A, de N. Kahya et al., *J. Struct. Biol.* 147:77-89, 2004. Com permissão de Elsevier; B, cortesia de Petra Schwille.

Houve um grande debate entre os cientistas sobre a possibilidade de as moléculas lipídicas da membrana plasmática das células animais poderem se reunir de forma transiente em domínios especializados, denominados **balsas lipídicas**. Certas regiões especializadas da membrana plasmática, tais como a *caveola*, envolvida na endocitose (discutido no Capítulo 13), são enriquecidas em esfingolipídeos e colesterol, e acredita-se que proteínas específicas se reúnam nestas regiões para auxiliar na estabilização dessas balsas. Os domínios das balsas são mais espessos do que as outras partes das bicamadas (ver Figura 10-12) e acomodam mais adequadamente certas proteínas de membrana, pois as cadeias de hidrocarbonos dos esfingolipídeos são mais longas e retas dos que as de outras membranas lipídicas (**Figura 10-14**). Assim, a segregação lateral de proteínas e de lipídeos nos domínios das balsas irá, em principio, ser um processo mutuamente estabilizador. Dessa forma, as balsas lipídicas podem auxiliar a organizar as proteínas da membrana concentrando-as para o transporte em membranas de vesículas (discutido no Capítulo 13) ou para trabalharem juntas na reunião das proteínas, quando convertem sinais extracelulares em intracelulares (discutido no Capítulo 15).

As gotas lipídicas são circundadas por uma monocamada fosfolipídica

A maioria das células armazena um excesso de lipídeos como **gotas lipídicas**, de onde pode ser obtida a matéria-prima para a síntese de membranas ou uma fonte de alimento. As células de gordura, também denominadas adipócitos, são especializadas no armazenamento de lipídeos (ver Figura 14-34). Elas contêm um grande número de grandes gotas lipídicas de onde os ácidos graxos podem ser liberados quando necessários e exportados para outras células pela corrente sanguínea. As gotas lipídicas armazenam lipídeos neutros como triacil-

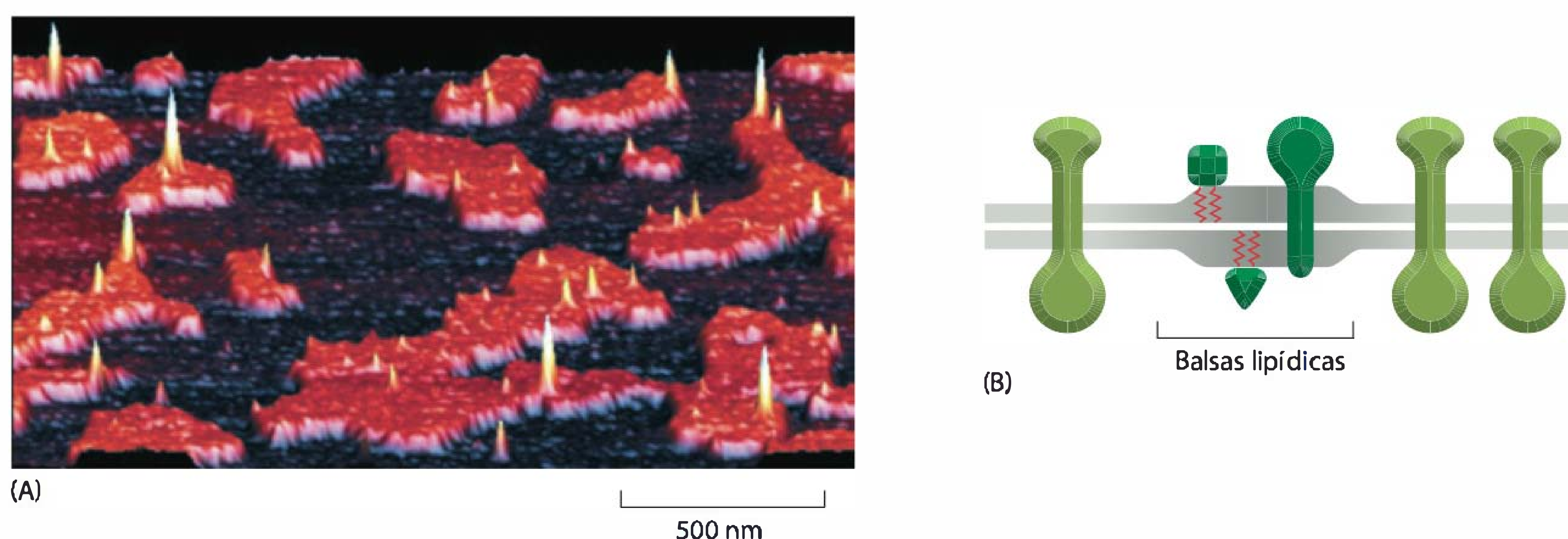


Figura 10-14 Efeitos das balsas lipídicas em bicamadas artificiais. (A) O contorno da superfície de uma bicamada sintética contendo balsas lipídicas e analisadas por microscopia de força atômica. Observe que as áreas das balsas, apresentadas em *laranja*, são mais espessas do que o restante da bicamada. Como na Figura 10-13, as balsas contêm principalmente esfingomielina e colesterol. As espículas amarelas são incorporadas em moléculas de proteínas, as quais são ligadas às bicamadas por ancoramentos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ilustrado na Figura 10-19, exemplo 6) e preferencialmente se separam em domínios de balsas. (B) Devido ao aumento da espessura e à composição de lipídeos, acredita-se que as balsas concentrem proteínas de membrana específicas (*verde-escuro*). (A, de D. E. Saslowsky et al., *J. Biol. Chem.* 277:26966-26970, 2002. Com permissão da American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

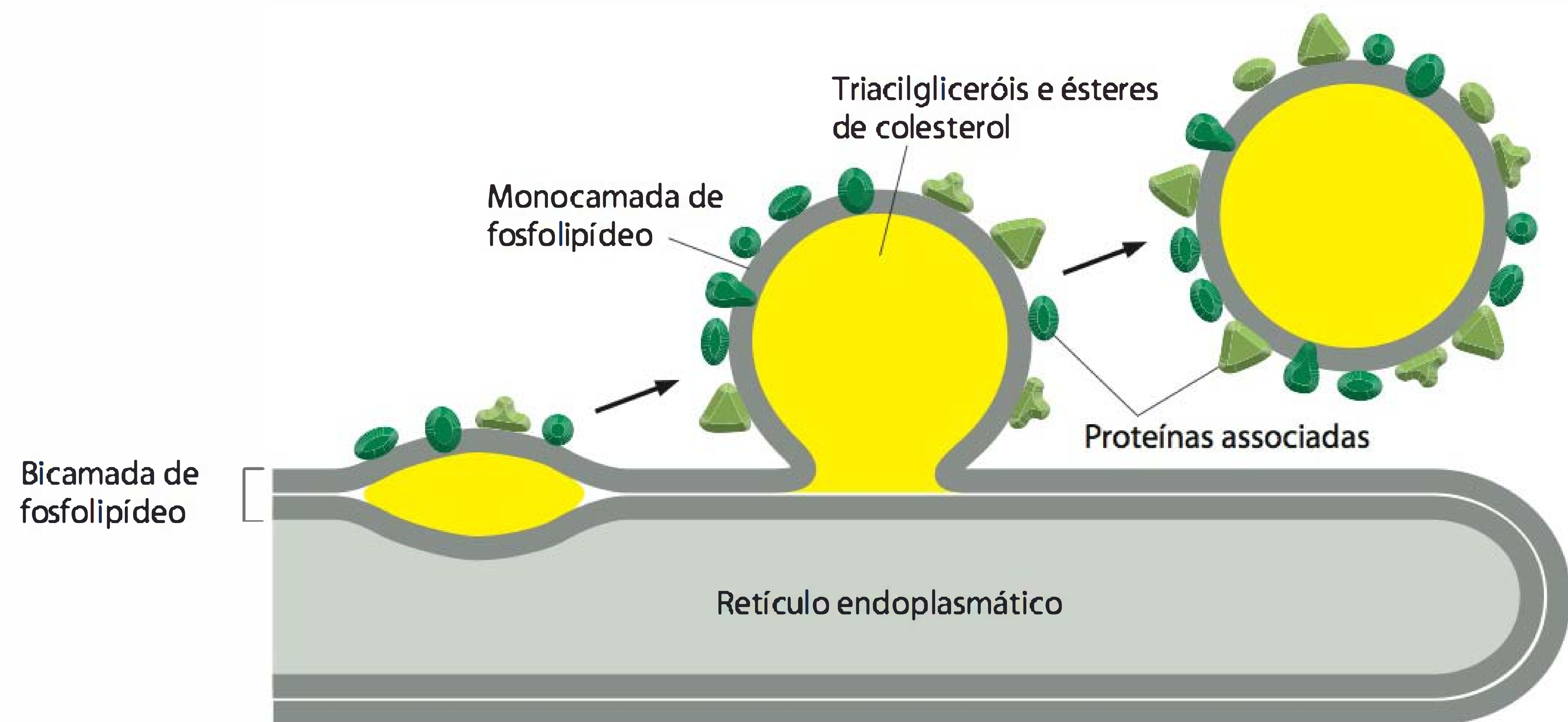


Figura 10-15 Modelo para a formação de gotas lipídicas. Os lipídeos neutros são depositados entre as duas monocamadas da membrana do RE. Ali eles se agregam em gotas tridimensionais que brotam e se destacam da membrana do RE com uma única organela circundada por uma monocamada de fosfolipídeos e proteínas associadas. (Adaptada de S. Martin e R. G. Parton, *Nat. Ver. Mol. Cell Biol.* 7: Rev. 373-378, 2006. Com premissão de Macmillan Publishers Ltd.)

glicerídeos e ésteres de colesterol, os quais são sintetizados de ácidos graxos e colesterol por enzimas na membrana do RE. Elas são moléculas exclusivamente hidrofóbicas e agregam-se em gotas tridimensionais ao invéz de bicamadas, pois esses lipídeos não contêm grupos de cabeças hidrofílicas.

As gotas lipídicas são organelas únicas, pois são circundadas por uma única camada de fosfolipídeos, a qual contém uma grande variedade de proteínas. Algumas dessas proteínas são enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídeos, mas a função da maioria delas é desconhecida. As gotas lipídicas se formam rapidamente quando as células são expostas a altas concentrações de ácidos graxos. Elas se formam de regiões discretas na membrana do RE onde estão concentradas muitas enzimas do metabolismo dos lipídeos. A **Figura 10-15** mostra um modelo de como as gotas lipídicas podem formar e adquirir sua monocamada circundante de fosfolipídeos e proteínas.

A assimetria da bicamada lipídica é funcionalmente importante

As composições de lipídeos das duas monocamadas da bicamada lipídica de muitas membranas são surpreendentemente distintas. Na membrana das hemácias humanas, por exemplo, quase todas as moléculas de fosfolipídeos que possuem colina $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH$ em seu grupo de cabeças (fosfatidilcolina e esfingomielina) estão na monocamada externa, enquanto quase todas que contêm um grupo amino primário terminal (fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina) estão na monocamada interna (**Figura 10-16**). Há uma diferença significante nas cargas entre as duas metades da bicamada porque a fosfatidilserina, negativamente carregada, está localizada na monocamada interna. No Capítulo 12, discutiremos como os fosfolipídeos translocadores ligados à membrana produzem e mantêm a assimetria lipídica.

A assimetria lipídica é funcionalmente importante, especialmente na conversão de sinais extracelulares em sinais intracelulares (discutido no Capítulo 15). Muitas proteínas citosólicas se ligam a grupos de cabeças lipídicas específicos encontrados na monocamada do citosol da bicamada lipídica. A enzima *proteína-cinase C* (*PKC, protein kinase C*), por exemplo, é ativada em resposta a vários sinais extracelulares. Ela se liga à porção citoplasmática da membrana plasmática onde a fosfatidilserina está concentrada e requer este fosfolipídeo negativamente carregado para sua atividade.

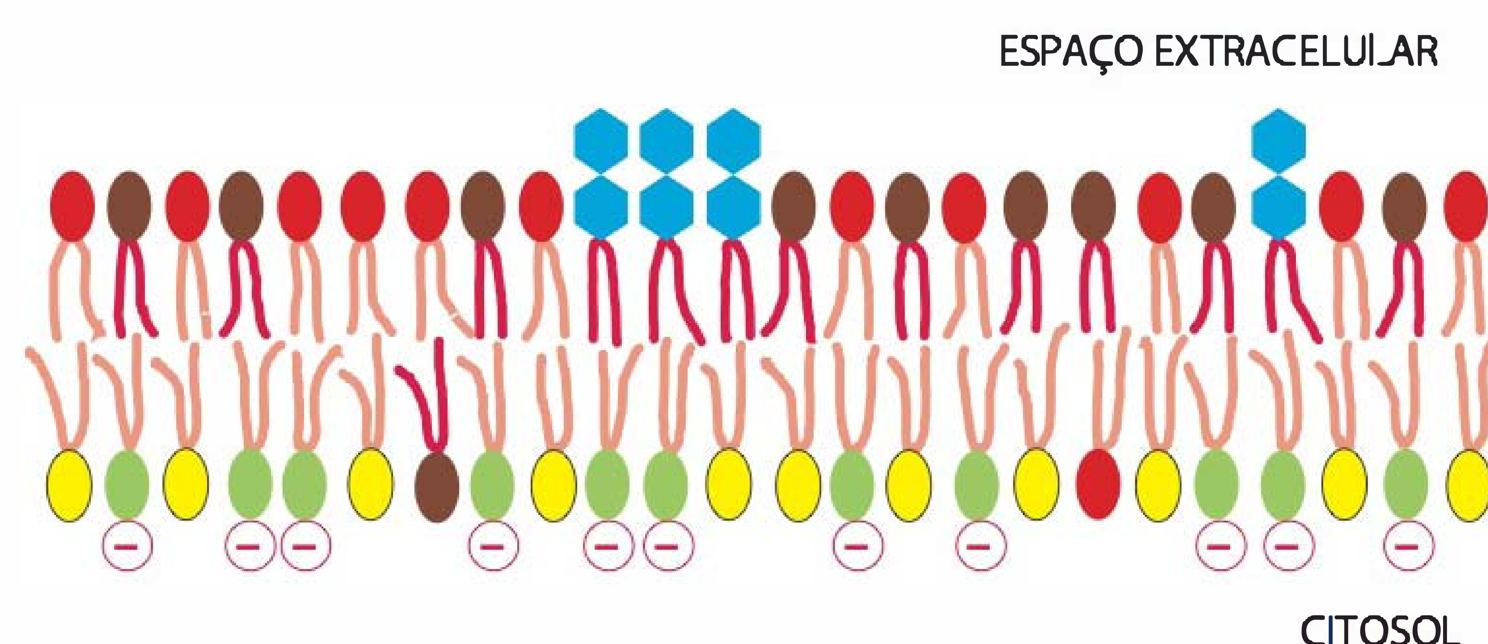


Figura 10-16 Distribuição assimétrica de fosfolipídeos e glicolipídeos na bicamada lipídica de eritrócitos humanos. As cores usadas para os grupos de cabeças polares dos fosfolipídeos são as mesmas introduzidas na Figura 10-3. Além disso, os glicolipídeos estão representados com os grupos de cabeças polares em forma hexagonal (*azul*). Acredita-se que o colesterol (não-mostrado) se distribua igualmente nas duas monocamadas.

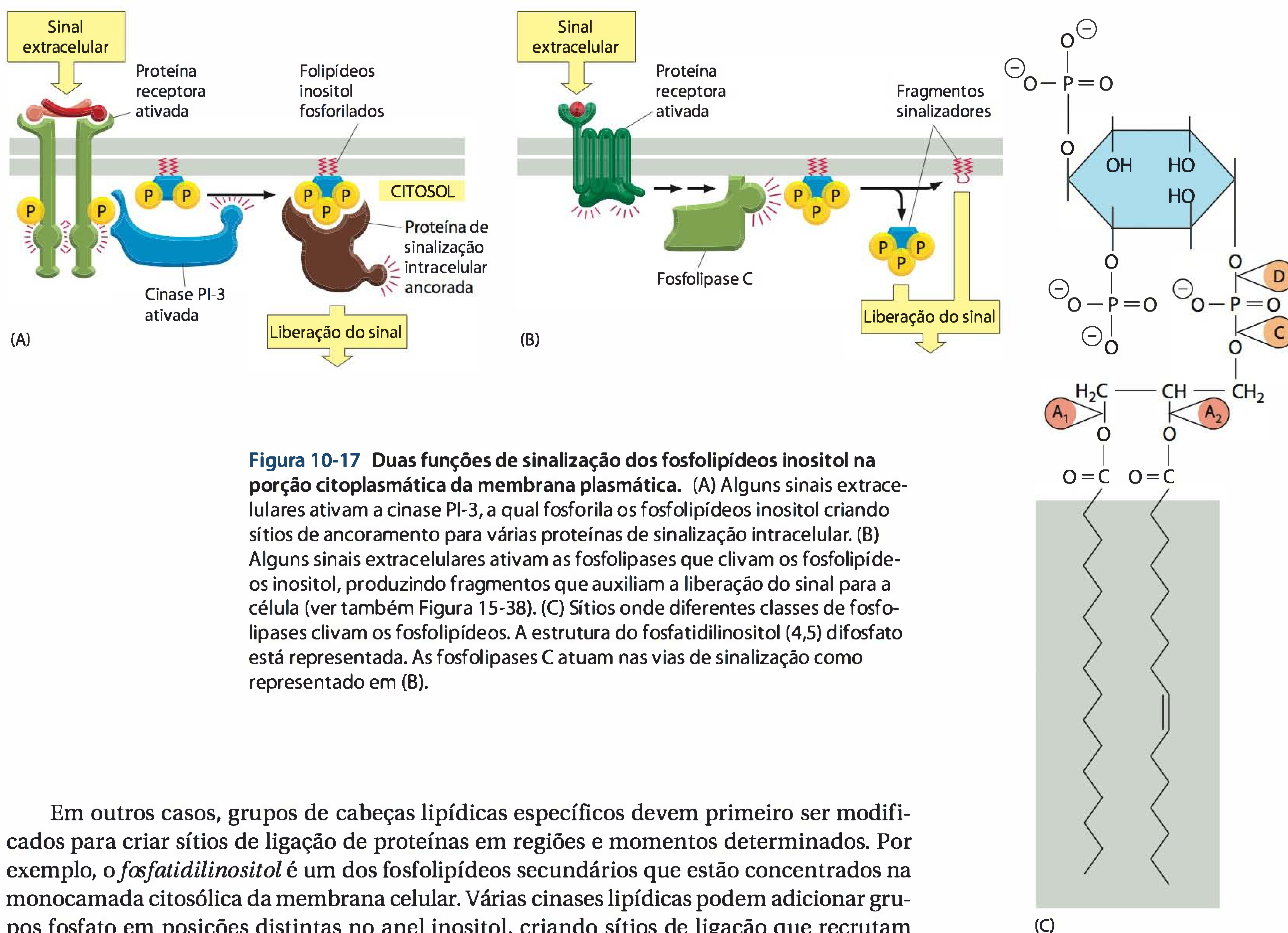


Figura 10-17 Duas funções de sinalização dos fosfolipídeos inositol na porção citoplasmática da membrana plasmática. (A) Alguns sinais extracelulares ativam a cinase PI-3, a qual fosforila os fosfolipídeos inositol criando sítios de ancoramento para várias proteínas de sinalização intracelular. (B) Alguns sinais extracelulares ativam as fosfolipases que clivam os fosfolipídeos inositol, produzindo fragmentos que auxiliam a liberação do sinal para a célula (ver também Figura 15-38). (C) Sítios onde diferentes classes de fosfolipases clivam os fosfolipídeos. A estrutura do fosfatidilinositol (4,5) difosfato está representada. As fosfolipases C atuam nas vias de sinalização como representado em (B).

Em outros casos, grupos de cabeças lipídicas específicos devem primeiro ser modificados para criar sítios de ligação de proteínas em regiões e momentos determinados. Por exemplo, o *fosfatidilinositol* é um dos fosfolipídeos secundários que estão concentrados na monocamada citosólica da membrana celular. Várias cinases lipídicas podem adicionar grupos fosfato em posições distintas no anel inositol, criando sítios de ligação que recrutam proteínas específicas do citosol para a membrana. Um exemplo importante de tal cinase lipídica é a *fosfoinositídio 3-cinase* (*PI 3-cinase*), a qual é ativada em resposta a sinais extracelulares e auxilia no recrutamento de proteínas sinalizadoras intracelulares para a porção citosólica da membrana plasmática (**Figura 10-17**A).Cinases lipídicas similares fosforilam os fosfolipídeos inositol na membrana intracelular auxiliando no recrutamento de proteínas que guiam o transporte de membrana.

Os fosfolipídeos da membrana plasmática ainda são usados de outra forma para converter sinais extracelulares em intracelulares. A membrana plasmática contém várias *fosfolipases* que são ativadas por sinais extracelulares para clivar moléculas fosfolipídicas específicas, gerando fragmentos dessas moléculas que atuam como mediadores celulares de vida curta. Por exemplo, a *fosfolipase C* cliva um fosfolipídeo inositol da monocamada citosólica da membrana plasmática para gerar dois fragmentos, um dos quais permanece na membrana e auxilia a ativação da proteína-cinase C, enquanto o outro é liberado para o citosol e estimula a liberação da Ca^{2+} do RE (Figura 10-17B-C).

Os animais exploram a assimetria dos fosfolipídeos de sua membrana plasmática para distinguir entre células vivas e células mortas. Quando uma célula animal sofre apoptose (uma forma de morte celular programada, discutida no Capítulo 18), a fosfatidilserina, a qual normalmente está confinada à monocamada citosólica da bicamada lipídica da membrana plasmática, rapidamente se transloca para a monocamada extracelular. A fosfatidilserina exposta na superfície celular sinaliza para as células vizinhas, como os macrófagos, para fagocitar e digerir a célula morta. Acredita-se que a translocação da fosfatidilserina nas células apoptóticas ocorra por meio de dois mecanismos:

1. Inativação do translocador de fosfolipídeo, que normalmente transporta este lipídeo da monocamada não-citosólica para a monocamada citosólica.
2. Ativação da scramblase (de *scramble*, embaralhar), que transfere os fosfolipídeos de forma inespecífica nas duas direções entre as duas monocamadas.

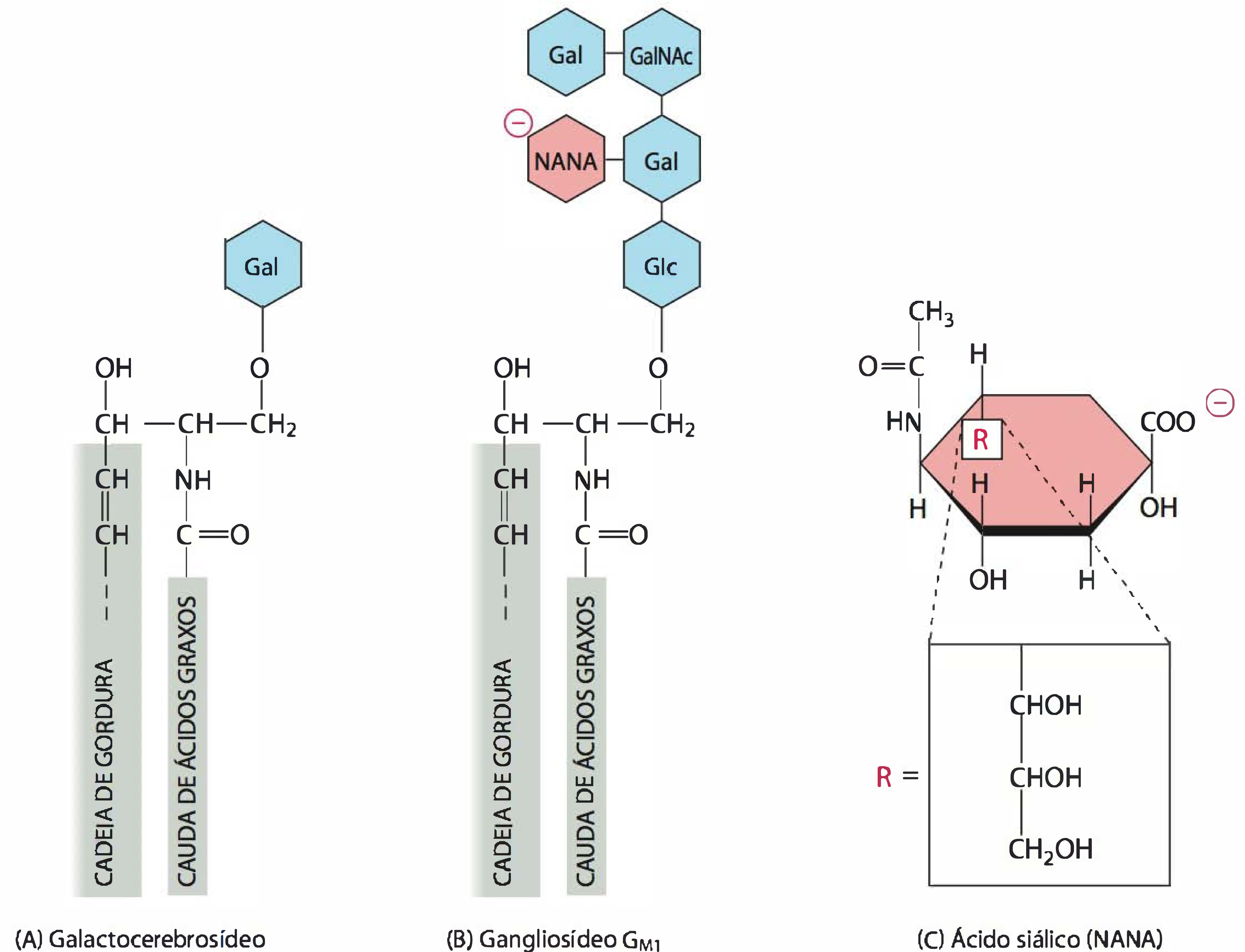


Figura 10-18 Moléculas de glicolipídeos. (A) O galactocerebrosídeo é considerado um *glicolipídeo neutro*, porque o açúcar que forma o grupo da sua cabeça não é carregado. (B) Um gangliosídeo geralmente contém um ou mais resíduos de ácido siálico carregados negativamente (também denominado ácido *N*-acetil neuramínico, ou NANA), cuja estrutura é mostrada em (C). Enquanto em bactérias e plantas quase todos os glicolipídeos são derivados do glicerol, como a maioria dos fosfolipídeos, nas células animais quase todos os glicolipídeos têm como base a esfingosina, como é o caso da esfingomielina (ver Figura 10-3). Gal = galactose, Glc = glicose; GalNAc = *N*-acetilgalatosamina; estes três açúcares não são carregados.

Os glicolipídeos são encontrados na superfície de todas as membranas plasmáticas

Moléculas lipídicas que contêm açúcar, denominadas **glicolipídeos**, encontradas exclusivamente na monocamada não-citosólica da bicamada lipídica, possuem a simetria mais exagerada em sua distribuição na membrana. Nas células animais, elas são constituídas de esfingosina, exatamente como a esfingomielina. Estas intrigantes moléculas tendem a se autoassociarem, parcialmente através de ligações de hidrogênio entre seus açúcares e parcialmente por meio de forças de van der Waals entre suas longas e retas cadeias de hidrocarbonos, e então preferencialmente se dividem em balsas lipídicas. A distribuição assimétrica dos glicolipídeos na bicamada resulta da adição de grupos de açúcares às moléculas lipídicas no lúmen do aparelho de Golgi. Assim, o compartimento no qual eles são produzidos é topologicamente equivalente ao exterior da célula (discutido no Capítulo 12). Assim que são liberados na membrana plasmática, os grupos de açúcares são expostos na superfície celular (ver Figura 10-16), onde desempenham importantes papéis nas interações da célula com suas vizinhas.

Os glicolipídeos provavelmente ocorrem em todas as membranas plasmáticas das células animais, onde geralmente constituem cerca de 5% das moléculas lipídicas da monocamada externa. Eles também são encontrados em algumas membranas intracelulares. Os mais complexos dos glicolipídeos são os **gangliosídeos**, que contêm oligossacarídeos com um ou mais resíduos de ácido siálico, que fornece ao gangliosídeo uma carga líquida negativa (**Figura 10-18**). O mais abundante, entre os mais de 40 diferentes gangliosídeos já identificados, está localizado na membrana plasmática das células nervosas, onde os gangliosídeos constituem 5 a 10% da massa total de lipídeo. Também são encontrados em menores quantidades nos outros tipos celulares.

Sugestões com relação à função dos glicolipídeos provêm de sua localização. Na membrana plasmática das células epiteliais, por exemplo, os glicolipídeos estão confinados na superfície apical exposta, onde podem auxiliar a proteger a membrana contra as severas condições frequentemente ali encontradas (como baixo pH e altas concentrações de enzimas degradantes). Glicolipídeos carregados, como os gangliosídeos, podem ser importantes devido aos seus efeitos elétricos. Sua presença altera o campo elétrico através da membrana e a concentração de íons, principalmente Ca^{2+}, na superfície da membrana. Acredita-se que os glicolipídeos também atuem nos processos de reconhecimento celular, nos quais as proteínas ligadoras de carboidratos ligadas à membrana (*lecitinas*) se ligam aos grupos de açúcares de glicolipídeos e glicoproteínas no processo de adesão célula-célula (discutido no Capítulo 19). Entretanto, surpreendentemente, camundongos mutantes defi-

cientes de complexos de gangliosídeos não apresentam anormalidades óbvias, embora os machos não possam transportar testosterona normalmente nos testículos e, consequentemente, sejam estéreis.

Independentemente de sua função normal, alguns glicolipídeos proporcionam a porta de entrada para certas toxinas bacterianas. O gangliosídio G_{M1} (ver Figura 10-18), por exemplo, atua como um receptor de superfície celular para a toxina bacteriana que causa a diarreia debilitante da cólera. As toxinas da cólera se ligam e entram somente naquelas células que possuem G_{M1} em sua superfície, incluindo as células epiteliais intestinais. Sua entrada na célula leva a um aumento prolongado na concentração do AMP cíclico intracelular (discutido no Capítulo 15), o qual por sua vez causa um grande efluxo de Na^+ e água para o intestino.

Resumo

As membranas biológicas consistem em uma camada dupla contínua de moléculas lipídicas onde as proteínas de membrana ficam embebidas. Esta bicamada lipídica é fluida, com moléculas lipídicas individuais capazes de difundirem-se rapidamente dentro de sua própria monocamada. As moléculas lipídicas de membrana são anfifílicas. Quando colocadas em água, elas se reúnem espontaneamente em bicamadas, as quais formam um compartimento fechado.

As células contêm de 500 a 1.000 diferentes espécies de lipídeos. Há três principais classes de lipídeos de membrana (fosfolipídeos, colesterol e glicolipídeos) e centenas de classes secundárias. A composição de lipídeos das monocamadas interna e externa são diferentes, refletindo as distintas funções das duas faces da membrana celular. Diferentes misturas de lipídeos são encontradas na membrana das células de diferentes tipos, bem como nas várias membranas de uma única célula eucariótica. Os fosfolipídeos inositol são uma classe secundária de fosfolipídeos, os quais, no folheto citosólico da bicamada lipídica da membrana plasmática, desempenham uma importante função na sinalização intracelular: em resposta a sinais extracelulares, cinases lipídicas específicas fosforilam os grupos de cabeças desses lipídeos para formar sítios de ancoramento para proteínas sinalizadoras citosólicas, enquanto que fosfolipases específicas clivam determinados fosfolipídeos inositol para gerar pequenas moléculas de sinalização intracelular.

PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Embora a bicamada lipídica forneça a estrutura básica das membranas biológicas, as proteínas de membrana desempenham a maioria das funções específicas de membrana e, portanto, fornecem a cada tipo de membrana celular suas características e propriedades funcionais. Consequentemente, as quantidades e os tipos de proteínas das membranas são altamente variáveis. Na membrana mielina, a qual atua principalmente como isolante elétrico do axônio da célula nervosa, menos de 25% da massa da membrana são constituídos por proteína. Por outro lado, nas membranas envolvidas com a produção de ATP (como a membrana interna das mitocôndrias e dos cloroplastos), aproximadamente 75% são proteínas. Uma membrana plasmática típica possui uma quantidade intermediária de proteínas, com cerca de metade de sua massa. Há sempre mais moléculas lipídicas do que moléculas de proteína nas membranas celulares, pois as moléculas lipídicas são pequenas quando comparadas com as moléculas de proteína, cerca de 50 moléculas lipídicas para cada molécula de proteína nas membranas celulares que possuem massa de proteína de 50%. As proteínas de membrana variam amplamente em estrutura e no modo como se associam com a bicamada lipídica, refletindo suas funções distintas.

As proteínas de membrana podem se associar à bicamada lipídica de várias maneiras

A **Figura 10-19** mostra as diferentes formas pelas quais as proteínas de membrana podem se associar à membrana. Muitas se estendem por toda a bicamada lipídica, com parte de sua massa nos dois lados (Figura 10-19, exemplos 1, 2 e 3). Como seus vizinhos lipídicos, essas **proteínas transmembrana** são anfifílicas, possuindo uma região hidrofóbica e uma hidrofílica. Suas regiões hidrofóbicas passam pela membrana e interagem com as caudas hidrofóbicas das moléculas lipídicas do interior da bicamada, onde são mantidas fora da água. Suas regiões hidrofílicas estão expostas à água nos dois lados da membrana. A ligação covalente da cadeia de ácidos graxos que se inserem na monocamada citosólica da bicamada lipídica

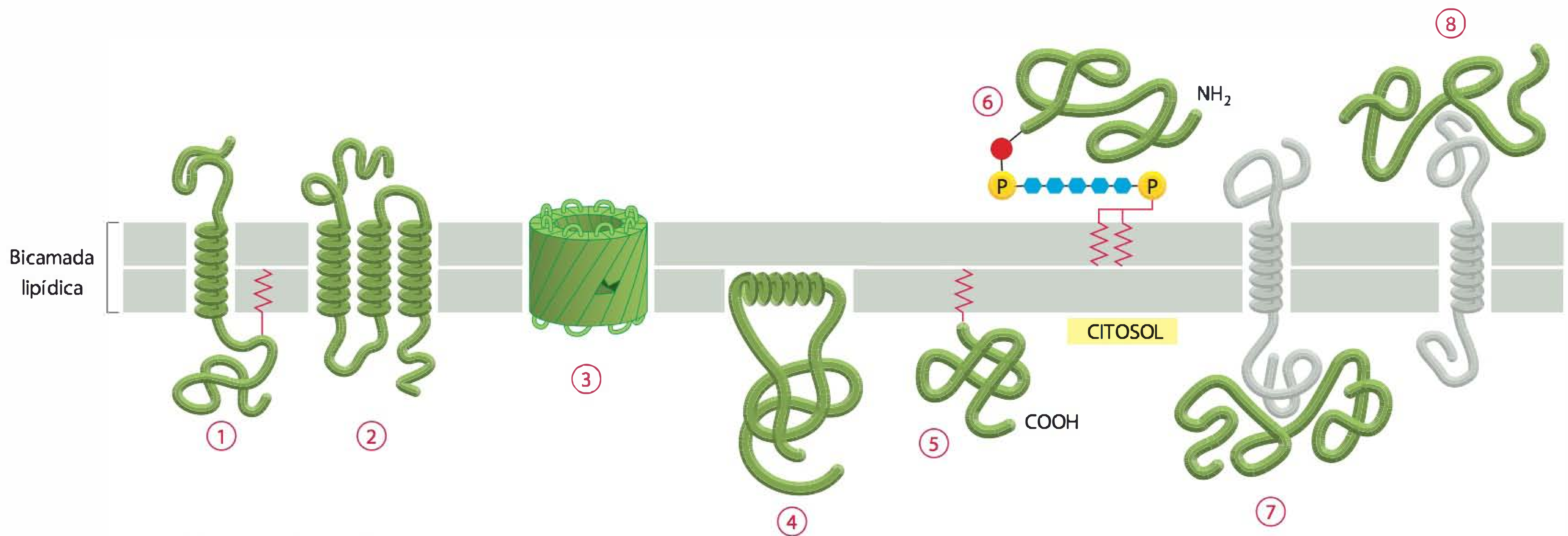


Figura 10-19 Várias maneiras pelas quais as proteínas de membrana se associam à bicamada lipídica. Acredita-se que a maioria das proteínas transmembrana atravesse a bicamada como uma única hélice α (1), como múltiplas hélices α (2) ou como uma folha β (um barril β) (3). Algumas dessas proteínas de "passagem única" e "múltiplas passagens" possuem cadeias de ácidos graxos covalentemente ligadas inseridas na monocamada lipídica citosólica (1). Outras proteínas de membrana estão expostas em apenas um lado da membrana (4). Algumas delas estão ancoradas na superfície citosólica por uma hélice α anfifílica que divide a monocamada citosólica da bicamada lipídica através da face hidrofóbica da hélice. (5) Outras estão ligadas à bicamada apenas por uma cadeia lipídica covalentemente ligada – uma camada de ácido graxo ou um grupo prenil (ver Figura 10-20) – à monocamada citosólica ou, por meio de um oligossacarídeo ligante ao fosfatidilinositol, à monocamada não-citosólica – denominado ancoramento de GPI. (7,8) Finalmente, muitas proteínas são ligadas à membrana somente por interações não-covalentes com outras proteínas da membrana. A maneira como esta estrutura (5) é formada está ilustrada na Figura 10-20, enquanto o modo como o ancoramento de GPI (6) é formado é mostrado na Figura 12-56. Os detalhes de como as proteínas da membrana associam-se à bicamada lipídica serão discutidos no Capítulo 12.

aumenta a hidrofobicidade de algumas dessas proteínas transmembrana (ver Figura 10-19, exemplo 1).

Outras proteínas de membrana estão localizadas inteiramente no citosol e estão associadas à monocamada citosólica da bicamada lipídica, tanto por uma hélice α anfifílica exposta na superfície da proteína (Figura 10-19, exemplo 4) quanto por uma ou mais cadeias lipídicas covalentemente ligadas (Figura 10-19, exemplo 5). Ainda, outras proteínas de membrana estão inteiramente expostas na superfície celular externa, ligadas à bicamada lipídica somente por uma ligação covalente (por um oligossacarídeo específico) ao fosfatidilinositol da monocamada lipídica externa da membrana plasmática (Figura 10-19, exemplo 6).

As proteínas ligadas aos lipídeos, no exemplo 5 da Figura 10-19, são constituídas de proteínas solúveis no citosol e estão subsequentemente ancoradas às membranas por uma ligação covalente a um grupo lipídico. Entretanto, as proteínas do exemplo 6 são constituídas de proteínas que passam uma única vez pela membrana, produzidas no RE. Enquanto ainda no retículo, o segmento transmembrana da proteína é clivado e um **ancoramento de glicosilfosfatidilinositol (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*)** é adicionada, deixando a proteína ligada à superfície não-citosólica da membrana somente por este ancoramento (discutido no Capítulo 12). As vesículas de transporte eventualmente levam as proteínas para a membrana plasmática (discutido no Capítulo 13). Proteínas ligadas à membrana plasmática por um ancoramento de GPI podem ser facilmente distinguidas pelo uso de uma enzima denominada fosfolipase C específica para o fosfatidilinositol. Essa enzima separa as proteínas de seus ancoramentos, liberando-as da membrana.

Algumas proteínas de membrana não se estendem para a porção hidrofóbica da bicamada lipídica; ao invéz disso, elas ficam ligadas a uma das superfícies por interações não-covalentes com outras proteínas de membrana (Figura 10-19, exemplos 7 e 8). Muitas das proteínas deste tipo podem ser liberadas da membrana por procedimentos de extração suaves, como a exposição a forças iônicas muito altas ou muito baixas ou a pH extremo, que interferem com as interações proteína-proteína, mas deixam a bicamada lipídica intacta. Essas proteínas são referidas como **proteínas periféricas de membrana**. Proteínas transmembrana e muitas proteínas mantidas na bicamada lipídica por grupos lipídicos ou regiões de polipeptídeos hidrofóbicos que se inserem no centro hidrofóbico da bicamada lipídica não podem ser liberadas dessa forma. Essas proteínas são denominadas **proteínas integrais de membrana**.

Os ancoramentos de lipídeos controlam a localização de algumas proteínas de sinalização na membrana

O modo como as proteínas de membrana estão associadas à bicamada lipídica reflete a função da proteína. Somente as proteínas transmembrana podem atuar nos dois lados da bicamada ou transportar moléculas através dela. Os receptores de superfície celular, por exemplo, são proteínas transmembrana que ligam moléculas sinalizadoras do espaço extracelular e geram sinais intracelulares diferentes do lado oposto da membrana plasmática. Para transferir uma pequena molécula hidrofílica através da membrana, uma proteína de transporte de membrana deve proporcionar uma via para a molécula atravessar a barreira permeável

hidrofóbica da bicamada lipídica. A arquitetura molecular de proteínas que cruzam a membrana várias vezes são ideais para essa função, como será discutido no Capítulo 11.

Por outro lado, proteínas que atuam em um único lado da bicamada lipídica com frequência estão associadas exclusivamente a um dos lados da monocamada lipídica ou a um domínio da proteína daquele lado. Algumas proteínas de sinalização intracelular, por exemplo, que estão envolvidas na conversão de sinais extracelulares em sinais intracelulares, estão ligadas à porção do citosol da membrana plasmática por um ou mais grupos lipídicos ligados covalentemente, os quais podem ser cadeias de ácidos graxos ou *grupos prenil* (**Figura 10-20**). Em alguns casos, o ácido mirístico, um ácido graxo saturado de 14 carbonos, é adicionado na porção N-terminal do grupo amino da proteína durante sua síntese no ribossomo. Todos os membros da *família Src* de tirosina-cinases citoplasmáticas (discutido no Capítulo 15) são miristoilados desta forma. A ligação à membrana, através de um único ancoramento de lipídeo, não é muito forte, então um segundo grupo lipídico frequentemente é adicionado, ancorando a proteína mais firmemente à membrana. Para a maioria das cinases Src, uma segunda modificação lipídica é a ligação de um ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 carbonos, a uma cadeia lateral de cisteína da proteína. Essa modificação ocorre em resposta a um sinal extracelular que auxilia a recrutar a cinase para a membrana plasmática. Quando a via de sinalização é desligada, o ácido palmítico é removido, permitindo que a cinase volte ao citosol. Outras proteínas de sinalização intracelular, como as pequenas GTPases da família Ras (discutida no Capítulo 15), usam uma combinação de ligação de grupo prenil e ácido palmítico para recrutar as proteínas para a membrana plasmática.

A cadeia polipeptídica cruza a bicamada lipídica em uma conformação de hélice α na maioria das proteínas transmembrana

Uma proteína transmembrana sempre possui uma orientação única na membrana. Isso reflete a maneira assimétrica como ela se insere na bicamada lipídica no RE durante sua biossíntese (discutido no Capítulo 12) e as diferentes funções de seus domínios citosólicos e

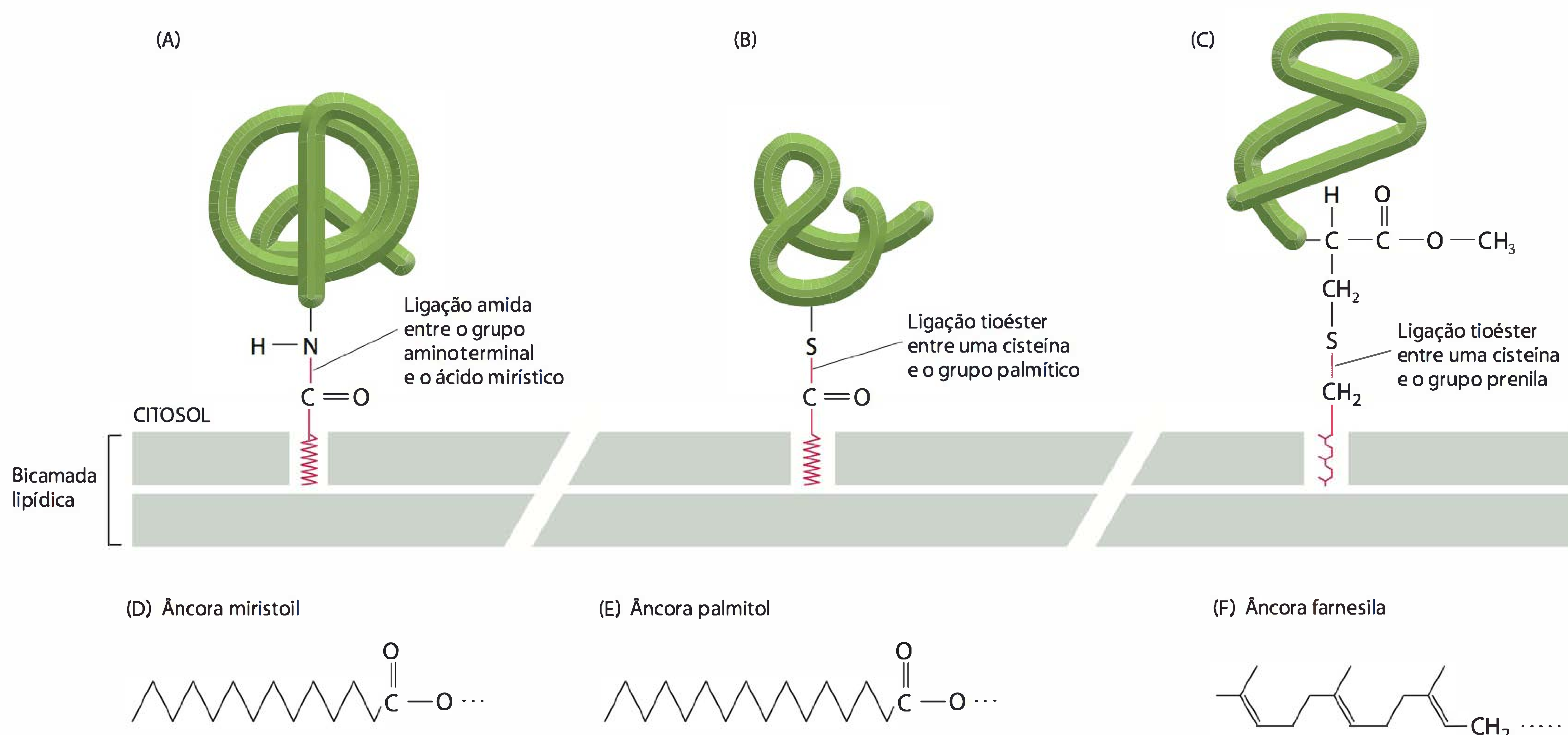


Figura 10-20 Ligação de proteínas de membrana por meio de uma cadeia de ácido graxo ou de um grupo prenil. A ligação covalente de um dos tipos de lipídeos pode auxiliar na localização de proteínas solúveis em água para a membrana, após sua síntese no citosol. (A) Uma das cadeias de ácido graxo (ácido mirístico) é ligada a uma glicina N-terminal por uma ligação amídica. (B) Uma cadeia de ácido graxo (ácido palmítico) é ligada por uma ligação tioéster a uma cisteína. (C) Um grupo prenila (farnesila ou um mais longo, o geranilgeranila) é ligado por uma ligação tioéster a um resíduo de cisteína inicialmente localizado a quatro resíduos da extremidade C-terminal da proteína. Após a prenilação, os três últimos aminoácidos são clivados e o novo C-terminal é metilado antes da inserção da âncora na membrana (não mostrado). A estrutura das âncoras lipídicos são apresentadas abaixo: (D) uma âncora miristoil (uma cadeia de ácido graxo saturado com 14 carbonos), (E) uma âncora palmitol (uma cadeia de ácido graxo saturado com 16 carbonos) e (F) uma âncora farnesila (uma cadeia de 15 carbonos insaturados).

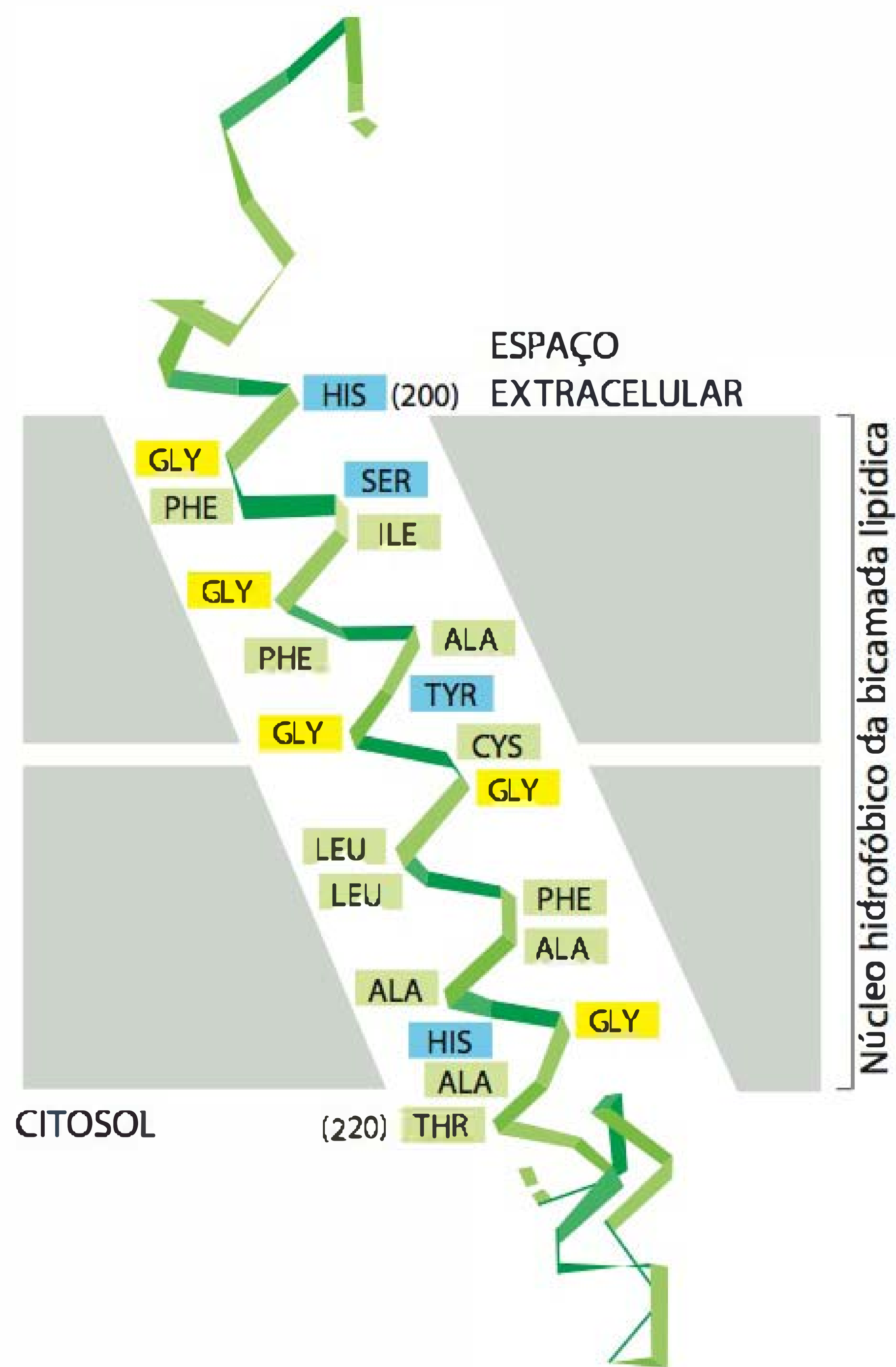


Figura 10-21 Um segmento de uma cadeia polipeptídica transmembrana atravessando a bicamada lipídica como uma hélice α. Apenas a estrutura de carbonos está representada, com os domínios de aminoácidos hidrofóbicos em *verde* e *amarelo*. O segmento polipeptídico mostrado é parte de um centro reativo fotossintético bacteriano ilustrado na Figura 10-34, cuja estrutura foi determinada por difração de raios X. (Com base nos dados de J. Deisenhofer et al. *Nature* 318:618-624, 1985, e H. Michel et al., *EMBO J.* 5:1149-1158, 1986. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

não-citosólicos. Esses domínios são separados por segmentos de cadeias polipeptídicas que atravessam a membrana, os quais contactam o ambiente hidrofóbico da bicamada lipídica e são compostos principalmente por aminoácidos com cadeias laterais apolares. Todas as ligações peptídicas da bicamada são dirigidas para a formação de ligações de hidrogênio, pois as ligações peptídicas são polares e há ausência de água. As ligações de hidrogênio entre as ligações peptídicas são maximizadas se a cadeia polipeptídica formar uma hélice α irregular na região que cruza a bicamada, e esta é a forma como a maioria dos segmentos de cadeias polipeptídicas que cruzam a membrana atravessam a bicamada (**Figura 10-21**).

Nas **proteínas transmembrana de passagem única**, as cadeias polipeptídicas cruzam apenas uma vez (ver Figura 10-19, exemplo 1), enquanto nas **proteínas transmembrana de múltiplas passagens**, a cadeia polipeptídica cruza a membrana várias vezes (ver Figura 10-19, exemplo 2). Uma maneira alternativa para as ligações peptídicas na bicamada lipídica satisfazerem suas necessidades de ligações de hidrogênio é formar múltiplas fitas transmembrana de cadeias polipeptídicas que podem ser organizadas em folhas β torcidas em forma de um barril fechado (os denominados *barris β*; ver Figura 10-19, exemplo 3). Essa forma de estrutura transmembrana de múltiplas passagens é observada nas *proteínas porinas* que discutiremos mais adiante.

O rápido progresso da cristalografia por raios X de proteínas de membrana permitiu determinar a estrutura tridimensional de muitas dessas proteínas. As estruturas confirmaram que frequentemente é possível predizer, a partir da sequência de aminoácidos da proteína, qual parte da cadeia polipeptídica se estende através da bicamada lipídica. Segmentos contendo de 20 a 30 aminoácidos com alto grau de hidrofobicidade são longos o suficiente para atravessar a bicamada como uma hélice α e frequentemente podem ser identificados em *gráficos de hidropatia* (**Figura 10-22**). A partir desses gráficos, estima-se que cerca de 20% das proteínas de um organismo sejam proteínas transmembrana, enfatizando sua importância. Os gráficos de hidropatia não podem identificar os segmentos transmembrana em forma de barril β, pois 10 aminoácidos ou menos já são suficientes para atravessar a bicamada lipídica como uma fita β estendida, e somente alguns aminoácidos das cadeias laterais são hidrofóbicos.

A força para maximizar as ligações de hidrogênio na ausência de água significa que uma cadeia polipeptídica que entra na bicamada provavelmente passe inteiramente através dela antes de mudar de direção, pois a flexão da cadeia requer a perda de interações regulares das ligações de hidrogênio. Proteínas de membrana de múltiplas passagens também podem conter regiões que se dobram na membrana, de qualquer lado, encaixando-se nos espaços entre as hélices α da membrana sem fazer contato com o centro hidrofóbico da bicamada lipídica. Devido ao fato de tais regiões da cadeia polipeptídica interagirem somente com outras regiões polipeptídicas, elas não precisam maximizar as ligações de hidrogênio e portanto, podem formar várias estruturas secundárias, incluindo hélices que se estendem somente parcialmente através da bicamada lipídica (**Figura 10-23**). Tais regiões são importantes para a função de algumas proteínas de membrana, incluindo os canais de água e de K^+; as regiões que contribuem para a formação da parede dos poros que atravessam a membrana e conferem especificidade de substrato a esses canais, como será discutido no Capítulo 11. Essas regiões não podem ser identificadas em gráficos de hidropatia e somente são reveladas por cristalografia por raios X, difração de elétrons (uma técnica similar à difração de raios X, mas realizada em arranjos bidimensionais de proteínas), ou estudos de NMR da estrutura tridimensional da proteína.

As hélices α transmembrana frequentemente interagem umas com as outras

As hélices α transmembrana de muitas proteínas de membrana de passagem única não contribuem para a dobramento dos domínios das proteínas nos dois lados da membrana. Como

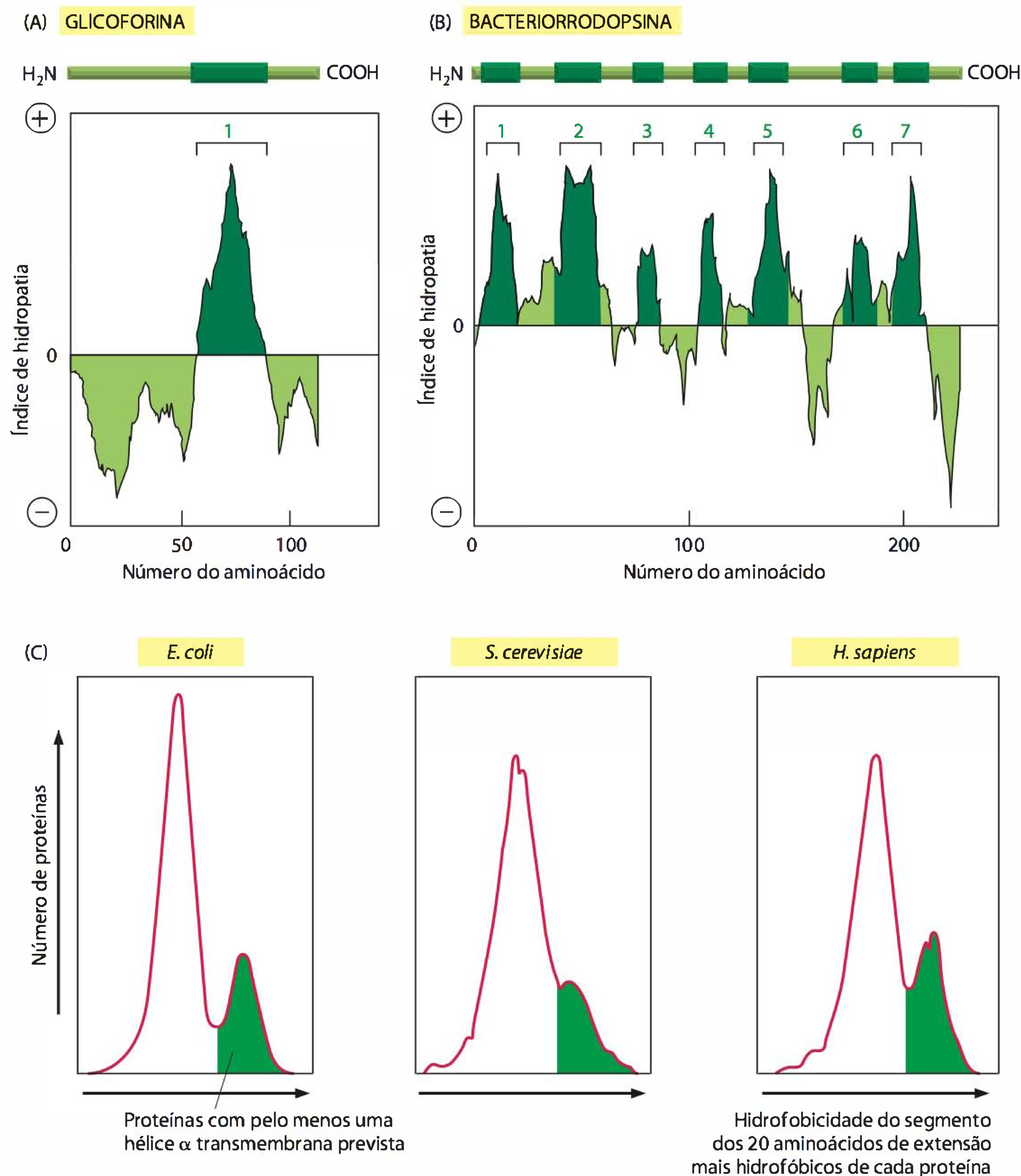


Figura 10-22 Plotagem de hidropatia para localizar possíveis segmentos de hélice α em uma cadeia polipeptídica que atravessa a membrana. A energia livre necessária para transferir segmentos sucessivos de uma cadeia polipeptídica de um solvente apolar para a água é calculada a partir da composição de aminoácidos de cada segmento, usando-se os dados obtidos a partir de modelos compostos. Esses cálculos são feitos para segmentos de um tamanho fixo (normalmente cerca de 10 a 20 aminoácidos), cada um deles iniciando no aminoácido imediatamente sucessivo da cadeia. O "índice de hidropatia" do segmento é plotado no eixo Y como uma função de sua localização na cadeia. Um valor positivo indica que existe a necessidade de energia livre para transferir o segmento para a água (isto é, o segmento é hidrofóbico), e o valor marcado é um índice da quantidade de energia necessária. No índice de hidropatia aparecem picos nas regiões de segmentos hidrofóbicos da sequência de aminoácidos. (A e B) São apresentados dois exemplos de proteínas de membrana discutidos mais adiante neste capítulo. A glicoforina (A) possui uma única hélice α que atravessa a membrana e um pico correspondente na plotagem de hidropatia. A bacteriorrodopsina (B) possui sete hélices α transmembrana e sete picos correspondentes na plotagem de hidropatia. (C) Proporção de proteínas de membrana prevista nos genomas de *E. coli*, *S. cerevisiae* e humano. A área sombreada em verde indica a fração de proteínas que contêm pelo menos uma hélice transmembrana prevista. Os dados para *E. coli* e *S. cerevisiae* representam o genoma completo; os dados para humanos representam parte do genoma. Em cada um dos casos, a área sob a curva é proporcional ao número de genes analisados. (A, adaptada de D. Eisenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-624, 1984. Com permissão de Annual Reviews; C, adaptada de D. Boyd et al., *Protein Sci.* 7:201-205, 1998. Com permissão de The Protein Society.)

consequência, frequentemente é possível planejar células para produzir domínios citosólicos ou extracelulares dessas proteínas como proteínas solúveis em água. Esta estratégia tem sido inestimável para o estudo da estrutura e da função desses domínios, principalmente daqueles das proteínas receptoras transmembrana (discutido no Capítulo 15). Uma hélice α transmembrana, mesmo de proteínas de passagem única, frequentemente faz mais do que apenas ancorar a proteína à bicamada lipídica. Muitas proteínas de passagem única formam homodímeros, os quais são mantidos unidos por interações fortes e altamente específicas entre as duas hélices α transmembrana. A sequência de aminoácidos hidrofóbicos dessas hélices contém a informação que dirige as interações proteína-proteína.

Igualmente, as hélices α transmembrana nas proteínas transmembrana de múltiplas passagens ocupam posições específicas na estrutura dobrada da proteína que são determinadas pelas interações entre as hélices vizinhas. Essas interações são cruciais para a estrutura e a função de muitos canais e transportadores que movem as moléculas através da bicamada lipídica. Em muitos casos, podem-se usar proteases para clivar as alças da cadeia polipeptídica que liga as hélices α transmembrana nos dois lados da membrana, e as hélices permanecem unidas e atuam normalmente. Em alguns casos, pode-se ainda expressar ge-



Figura 10-23 Duas hélices α do canal de água aquaforina, cada uma se estendendo somente até a metade através da bicamada lipídica. Na membrana, a proteína forma um tetrâmero de quatro segmentos de duas hélices, de modo que a superfície colorida mostrada aqui está imersa na interface formada por interações proteína-proteína. O mecanismo pelo qual o canal permite a passagem de moléculas de água através da bicamada lipídica é discutido com mais detalhes no Capítulo 11.

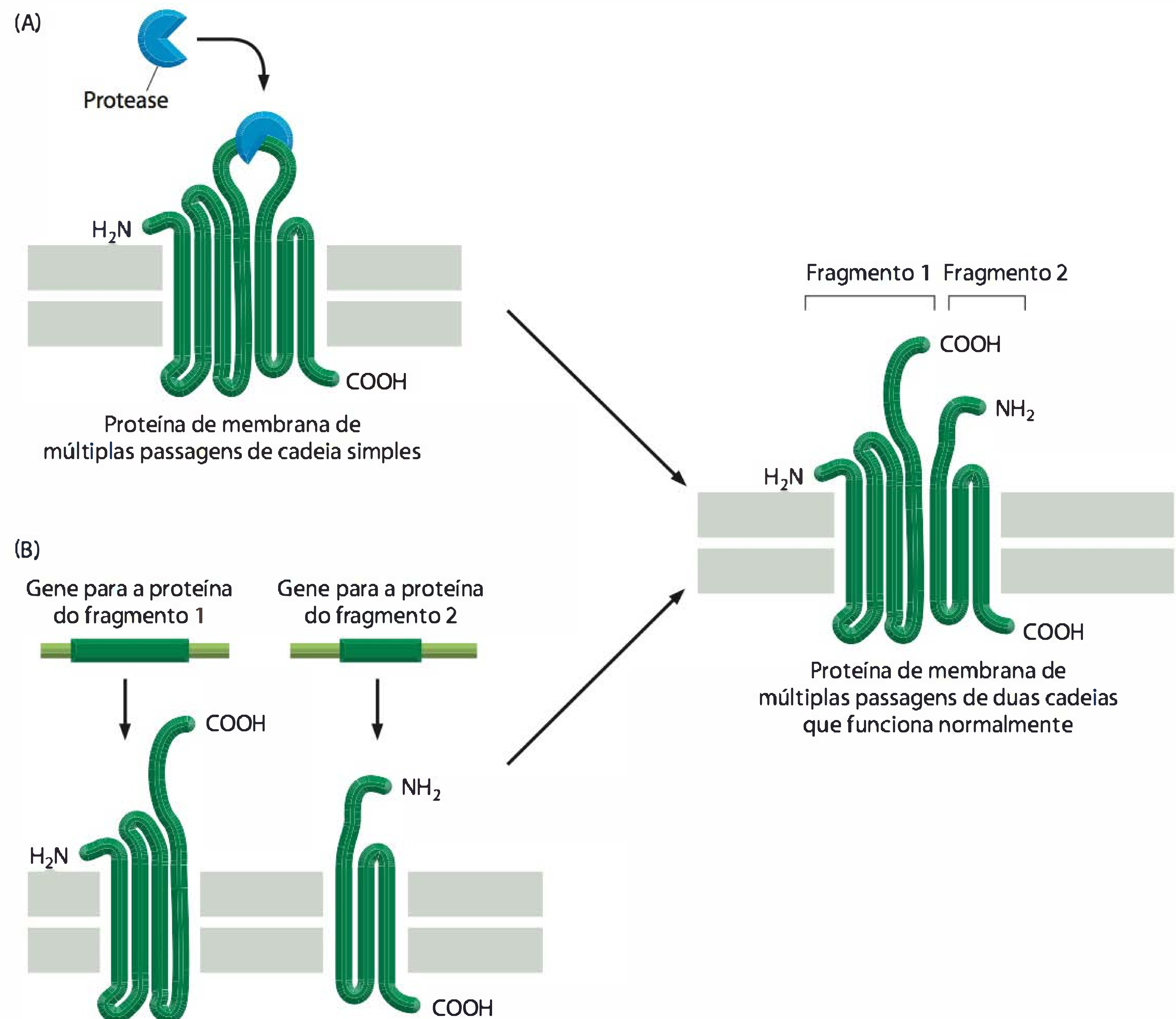


Figura 10-24 Convertendo uma proteína de múltiplas passagens de cadeia única em uma proteína de múltiplas passagens de duas cadeias. (A) A clivagem proteolítica de uma alça para criar dois fragmentos que ficam unidos e funcionam normalmente. (B) Expressão dos mesmos dois fragmentos de genes separados dá origem a uma proteína similar que funciona normalmente.

nes modificados que codificam para partes diferentes de uma proteína de múltiplas passagens nas células vivas, e observar que as regiões separadas reúnem-se adequadamente para formar a proteína transmembrana funcional (**Figura 10-24**), enfatizando a extraordinária especificidade com a qual as hélices α transmembrana podem interagir.

Nas proteínas de múltiplas passagens, hélices transmembrana vizinhas da estrutura dobrada da proteína protegem muitas das hélices transmembrana dos lipídeos da membrana. Por que então estas hélices protegidas são compostas principalmente por aminoácidos hidrofóbicos? A resposta reside no modo pelo qual as proteínas de múltiplas passagens estão integradas à membrana durante sua biossíntese. Como discutiremos no Capítulo 12, as hélices α transmembrana são inseridas na bicamada lipídica sequencialmente por uma proteína translocadora. Após deixar a translocadora, cada hélice é transientemente circundada por lipídeos na bicamada, o que requer que a hélice seja hidrofóbica. É somente quando a proteína se dobra em sua estrutura final que ocorre o contato entre as hélices adjacentes, e o contato proteína-proteína substitui alguns dos contatos proteína-lipídeo (**Figura 10-25**).

Alguns barris β formam grandes canais transmembrana

Ao contrário do que ocorre com as hélices α, as proteínas transmembrana de múltiplas passagens, que possuem seus segmentos transmembrana arranjados como *barris β*, são com-

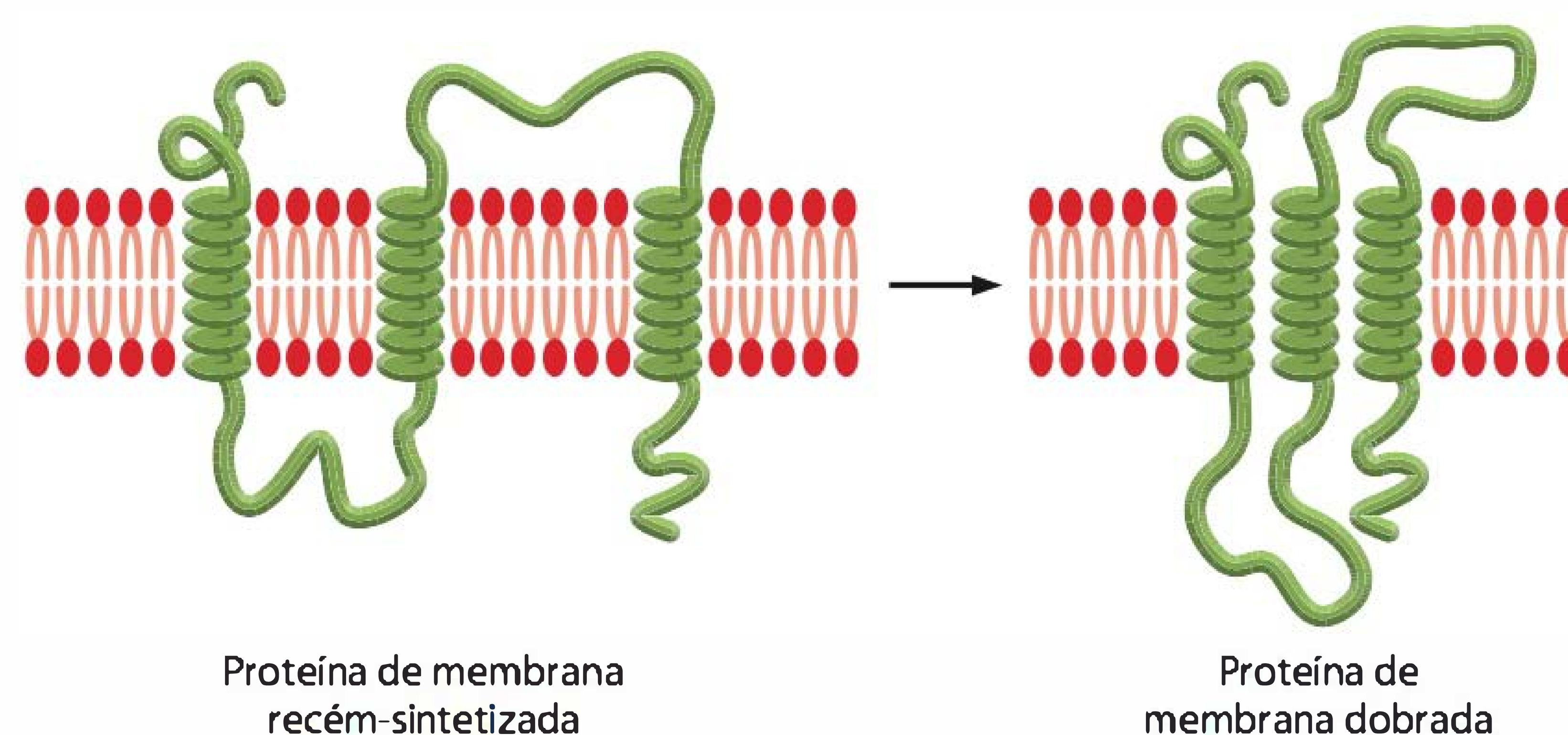


Figura 10-25 Etapas do dobramento de uma proteína transmembrana de múltiplas passagens. Quando as hélices α transmembrana recém-sintetizadas são liberadas na bicamada lipídica, elas inicialmente ficam circundadas por moléculas lipídicas. Com o dobramento da proteína, o contato entre as hélices desloca algumas moléculas lipídicas que circundam as hélices.

parativamente rígidas e tendem a cristalizar facilmente. Assim, algumas delas estão entre as primeiras estruturas de proteínas transmembrana de múltiplas passagens a serem determinadas por cristalografia por raios X. O número de fitas β no barril β varia amplamente, entre 8 a 22 (**Figura 10-26**).

As proteínas do barril β são abundantes na membrana externa das mitocôndrias, dos cloroplastos e de muitas bactérias. Algumas são proteínas formadoras de poros, as quais criam canais cheios de água permitindo que pequenas moléculas hidrofílicas selecionadas atravessem a bicamada lipídica da membrana externa bacteriana. As porinas são exemplos bem estudados (exemplo 3 da Figura 10-26). O barril de porina é formado por 16 fitas de folhas β antiparalelas, as quais são suficientemente grande para enrolarem-se em uma estrutura cilíndrica. As cadeias laterais de aminoácidos polares revestem o canal aquoso na região interna, enquanto que as cadeias laterais apolares projetam-se para o exterior do barril para interagirem com o centro hidrofóbico da bicamada lipídica. As alças da cadeia polipeptídica frequentemente projetam-se para o lúmen do canal, estreitando-o de modo que somente determinados solutos podem passar. Algumas porinas são, portanto, altamente seletivas: a *maltoporina*, por exemplo, preferencialmente permite que a maltose ou os oligômeros de maltose atravessem a membrana externa de *E. coli*.

A *proteína FepA* é um exemplo mais complexo de uma proteína de transporte de barril β (exemplo 4 da Figura 10-26). Ela transporta íons ferro através da membrana externa bacteriana. Ela é formada por 22 fitas β e um grande domínio globular que preenche completamente o interior do barril. Os íons ferro se ligam a este domínio, o qual se acredita que sofra grandes mudanças conformacionais para transferir os íons ferro através da membrana.

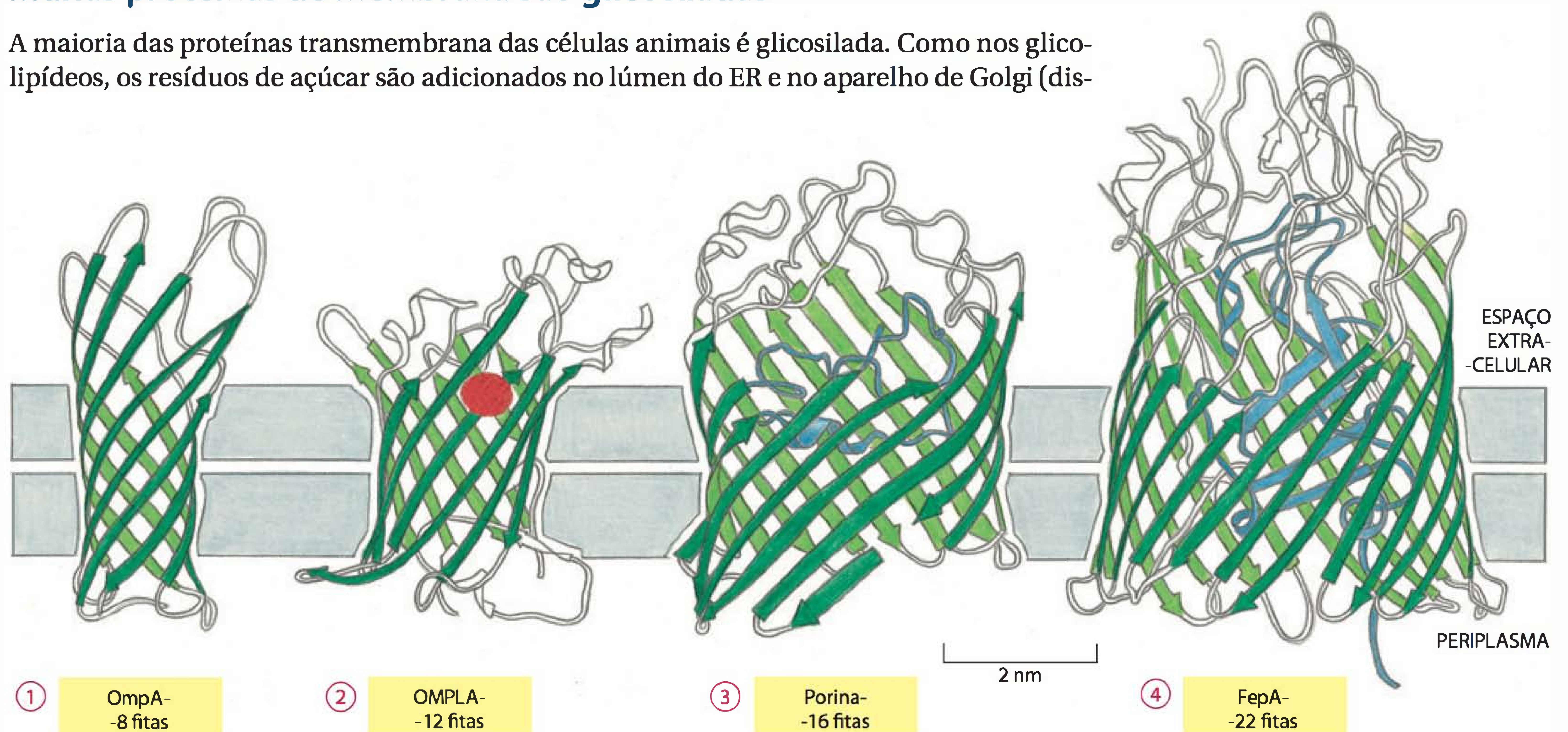
Nem todas as proteínas de barril β são proteínas de transporte. Algumas formam pequenos barris completamente preenchidos por cadeias laterais de aminoácidos que se projetam para o centro. Essas proteínas atuam como receptores ou enzimas (exemplos 1 e 2 da Figura 10-26), e o barril atua como um ancoramento rígido, o qual mantém a proteína na membrana e orienta as alças citosólicas que formam os sítios de ligação para moléculas intracelulares específicas.

Embora as proteínas de barris β tenham várias funções, elas estão muito restritas às membranas externas bacterianas, mitocondriais e de cloroplastos. A maioria das proteínas transmembrana de múltiplas passagens das células eucarióticas e na membrana plasmática bacteriana é formada por hélices α transmembrana. As hélices podem deslizar umas contra as outras, permitindo mudanças conformacionais na proteína que podem abrir e fechar os canais iônicos, transportar solutos ou transduzir sinais extracelulares em intracelulares. Por outro lado, nas proteínas de barris β, as ligações de hidrogênio ligam cada fita β rigidamente a sua vizinha, tornando pouco provável a ocorrência de mudanças conformacionais na parede do barril.

Muitas proteínas de membrana são glicosiladas

A maioria das proteínas transmembrana das células animais é glicosilada. Como nos glicolipídeos, os resíduos de açúcar são adicionados no lúmen do ER e no aparelho de Golgi (dis-

Figura 10-26 Barris β formados por diferentes números de fitas β. (1) A proteína OmpA de *E. coli* atua como um receptor para um vírus bacteriano. (2) A proteína OMPLA de *E. coli* é uma enzima (uma lipase) que hidrolisa moléculas lipídicas. Os aminoácidos que catalisam a reação enzimática (apresentados em *vermelho*) projetam-se para fora da superfície do barril. (3) A porina da bactéria *Rhodobacter capsulatus* forma um poro através da membrana repleto de água. O diâmetro do canal é restrito pelas alças (apresentadas em *azul*) que se posicionam para o interior do canal. (4) A proteína FepA de *E. coli* transporta íons ferro. O interior do barril é preenchido por um domínio de uma proteína globular (apresentada em *azul*) que contém o sítio de ligação do íon ferro (não mostrado). Acredita-se que este domínio mude sua conformação para transportar o ferro ligado, mas os detalhes moleculares dessas mudanças não são conhecidos.



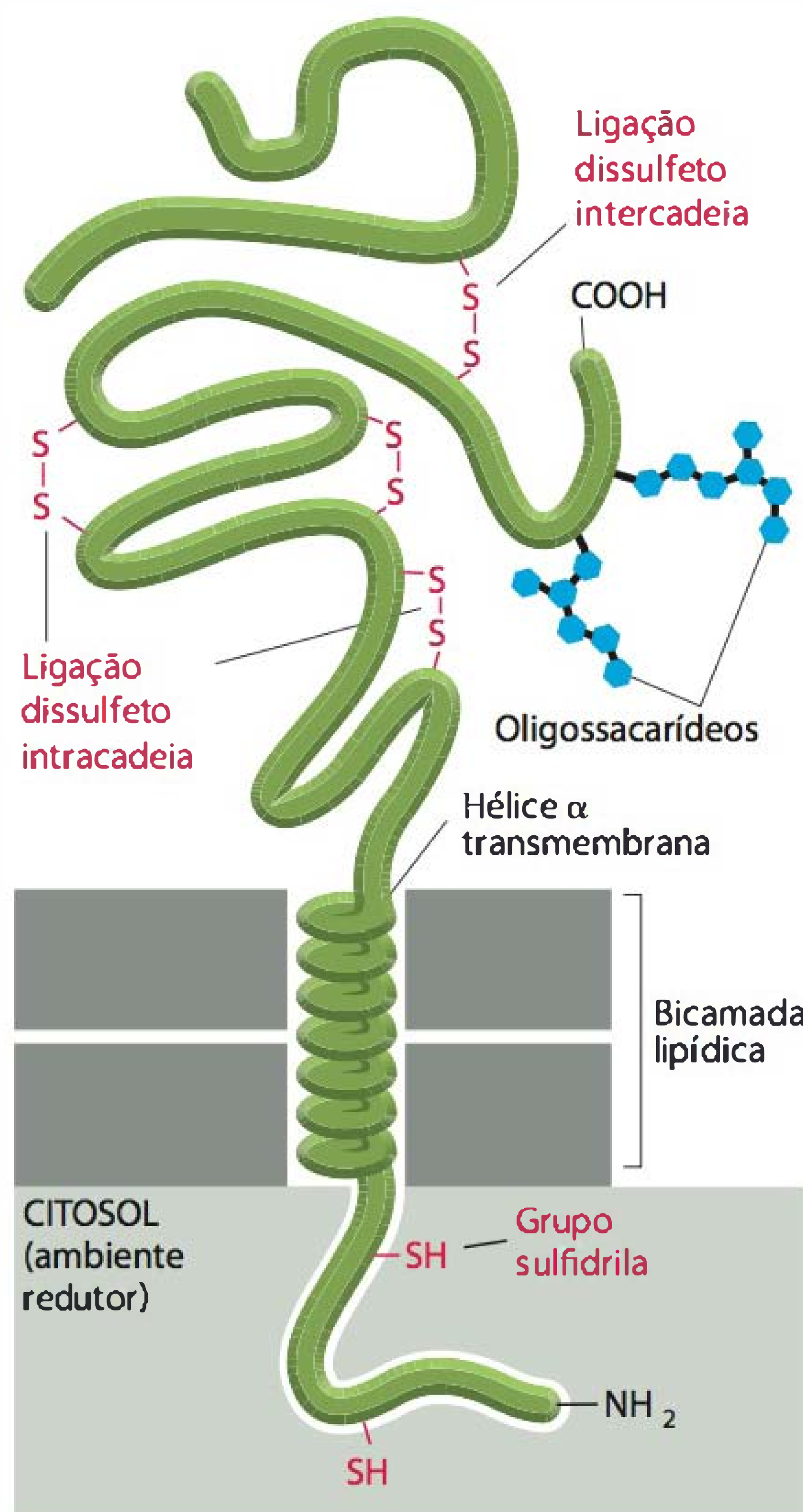


Figura 10-27 Uma proteína transmembrana de passagem única. Observe que a cadeia polipeptídica atravessa a bicamada lipídica como um hélice α em sentido horário, e as cadeias de oligossacarídeos e as ligações dissulfeto estão todas na superfície não-citosólica da membrana. Os grupos sulfidrila do domínio citosólico da proteína normalmente não formam ligações dissulfeto devido ao ambiente redutor do citosol que mantém esses grupos em sua forma reduzida (–SH).

cutido nos Capítulos 12 e 13). Por essa razão, as cadeias de oligossacarídeos estão sempre presentes na porção não-citosólica da membrana. Uma outra diferença importante entre as proteínas (ou partes das proteínas) dos dois lados da membrana resulta do ambiente redutor do citosol. Esse ambiente diminui a chance de que ligações dissulfeto (S-S) inter e intracadeias se formem entre cisteínas da porção citosólica da membrana. Estas ligações formam-se na porção não-citosólica, onde podem auxiliar na estabilização da estrutura dobrada da cadeia polipeptídica ou sua associação com outras cadeias polipeptídicas (**Figura 10-27**).

Os carboidratos revestem a superfície de todas as células eucarióticas, pois a maioria das proteínas da membrana plasmática é glicosilada. Estes carboidratos ocorrem como cadeias de oligossacarídeos covalentemente ligadas às proteínas da membrana (glicoproteínas) e aos lipídeos (glicolipídeos). Elas também ocorrem como as cadeias de polissacarídeos das moléculas de *proteoglicanos* integrais de membrana. Os proteoglicanos, que consistem em longas cadeias polissacarídicas ligadas covalentemente ao centro da proteína, são encontrados principalmente no exterior da célula, como parte da matriz extracelular (discutida no Capítulo 19). No entanto, em alguns proteoglicanos, as proteínas do centro se estendem através da bicamada lipídica ou estão ligadas à bicamada por um ancoramento de GPI.

Os termos glicocálice ou revestimento celular algumas vezes são usados para descrever uma zona da superfície celular rica em carboidratos. Esta **cobertura de carboidrato** pode ser visualizada por meio de vários corantes, como o vermelho de rutênio (**Figura 10-28**A), bem como por sua afinidade por proteínas ligadoras de carboidratos como as **lecitinas**, as quais podem ser marcadas com um corante fluorescente ou outros marcadores visíveis. Apesar de a maioria dos grupos açúcares estar ligada a moléculas intrínsecas de membrana plasmática, a camada de carboidratos também contém glicoproteínas e proteoglicanos que são secretados para o espaço extracelular e então adsorvidos na superfície celular (Figura 10-28B). Muitas dessas macromoléculas adsorvidas são componentes da matriz extracelular, e o limite entre a membrana plasmática e a matriz extracelular frequentemente não é bem definido. Uma das muitas funções da camada de carboidrato é proteger a célula contra danos químicos ou mecânicos e manter outras celulas à distância, prevenindo interações indesejáveis proteína-proteína.

As cadeias laterais oligossacarídicas das glicoproteínas e dos glicolipídeos são muito diversas na organização de seus açúcares. Embora normalmente contenham menos de 15 açúcares, frequentemente são ramificados, e os açúcares podem ser unidos por várias ligações covalentes, diferentemente dos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica, os quais estão unidos por ligações peptídicas idênticas. Até mesmo três açúcares podem ser unidos para formar centenas de trissacarídeos distintos. A diversidade e a posição dos oligossacarídeos expostos na superfície celular os tornam adequados para atuar no processo de reconhecimento celular. Como será discutido no Capítulo 19, as lecitinas ligadas à membrana plasmática, que reconhecem oligossacarídeos específicos nos glicolipídeos e nas glicoproteínas da superfície celular, medeiam muitos dos processos transitórios de adesão célula-célula, incluindo aqueles que ocorrem nas interações espermatozoide-óvulo, coagulação sanguínea, recirculação de linfócitos e respostas inflamatórias.

As proteínas de membrana podem ser solubilizadas e purificadas em detergentes

Em geral, somente os agentes que rompem as associações hidrofóbicas e destroem a bicamada lipídica podem solubilizar as proteínas transmembrana (e algumas outras proteínas fortemente ligadas à membrana). O agente mais útil entre eles para o bioquímico de membrana são os **detergentes**, os quais são pequenas moléculas anfifílicas de estrutura variável. Os detergentes são mais solúveis em água do que os lipídeos. Suas extremidades polares

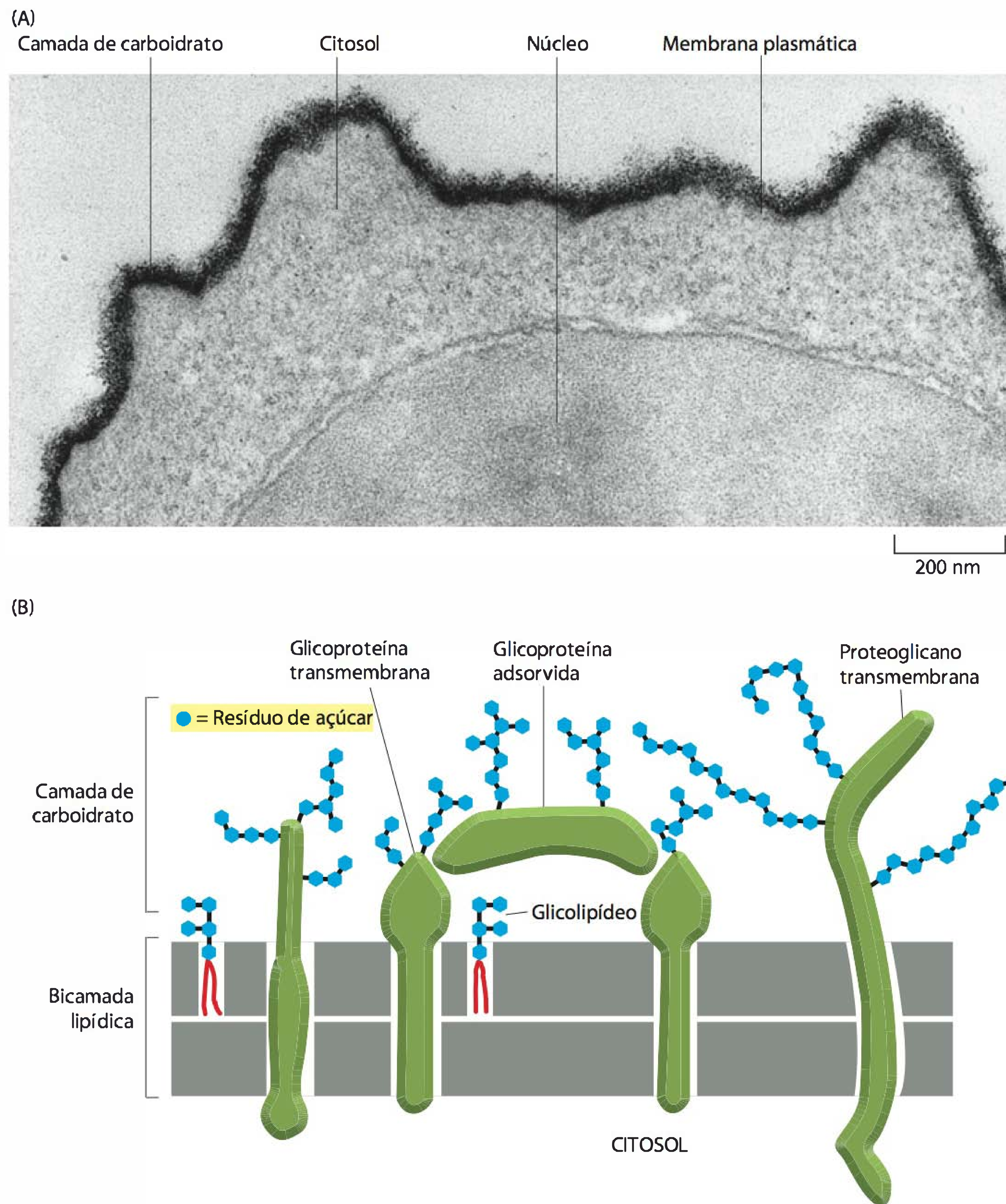


Figura 10-28 Camada de carboidrato da superfície celular. (A) Esta micrografia eletrônica da superfície de um linfócito corado com vermelho de rutênio enfatiza a espessa camada rica em carboidrato que reveste a célula. (B) A camada de carboidrato é formada por cadeias laterais ricas em oligossacarídeos dos glicolipídeos e das glicoproteínas integrais da membrana e por cadeias de polissacarídeos dos proteoglicanos integrais de membrana. Além disso, glicoproteínas e os proteoglicanos adsorvidos (não-mostrados) contribuem para a camada de carboidratos em muitas células. Observe que todos os carboidratos estão na superfície não-citosólica da membrana. (A, cortesia de Audrey M. Glauert e G. M. W. Cook.)

(hidrofílicas) podem ser carregadas (iônicas), como no *dodecilsulfato de sódio* (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), ou não-carregadas (não-iônicas), como no *octilglucosídeo* e no *Triton* (**Figura 10-29**A). Em baixas concentrações, os detergentes são monoméricos em solução, mas quando suas concentrações são aumentadas acima do limiar, o que é denominado *concentração micelar crítica*, ou *CMC*, eles se agregam formando micelas (Figura 10-29B-C). As moléculas de detergente difundem-se rapidamente para dentro e para fora das micelas, mantendo a concentração do monômero em solução constante, independentemente do número de micelas presentes. Tanto a CMC quanto o número médio de moléculas de detergente em uma micela são propriedades características de cada detergente, mas também dependem da temperatura, do pH e da concentração de sais. As soluções de detergente são, portanto, sistemas complexos e difíceis de serem estudados.

Quando misturadas às membranas, as extremidades hidrofóbicas dos detergentes se ligam às regiões hidrofóbicas das proteínas das membranas, onde deslocam as moléculas lipídicas como um colar de moléculas de detergente. Como a outra extremidade da molécula de detergente é polar, esta ligação tende a colocar as proteínas de membrana em solução como complexos proteína-detergente (**Figura 10-30**). Normalmente, algumas moléculas lipídicas também permanecem ligadas à proteína.

Detergentes iônicos fortes como o SDS podem solubilizar mesmo a mais hidrofóbica das proteínas de membrana. Isto permite que as proteínas sejam analisadas por *eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS* (discutido no Capítulo 8), um procedimento que revolucionou o estudo das proteínas de membrana. Tais detergentes fortes desdobram

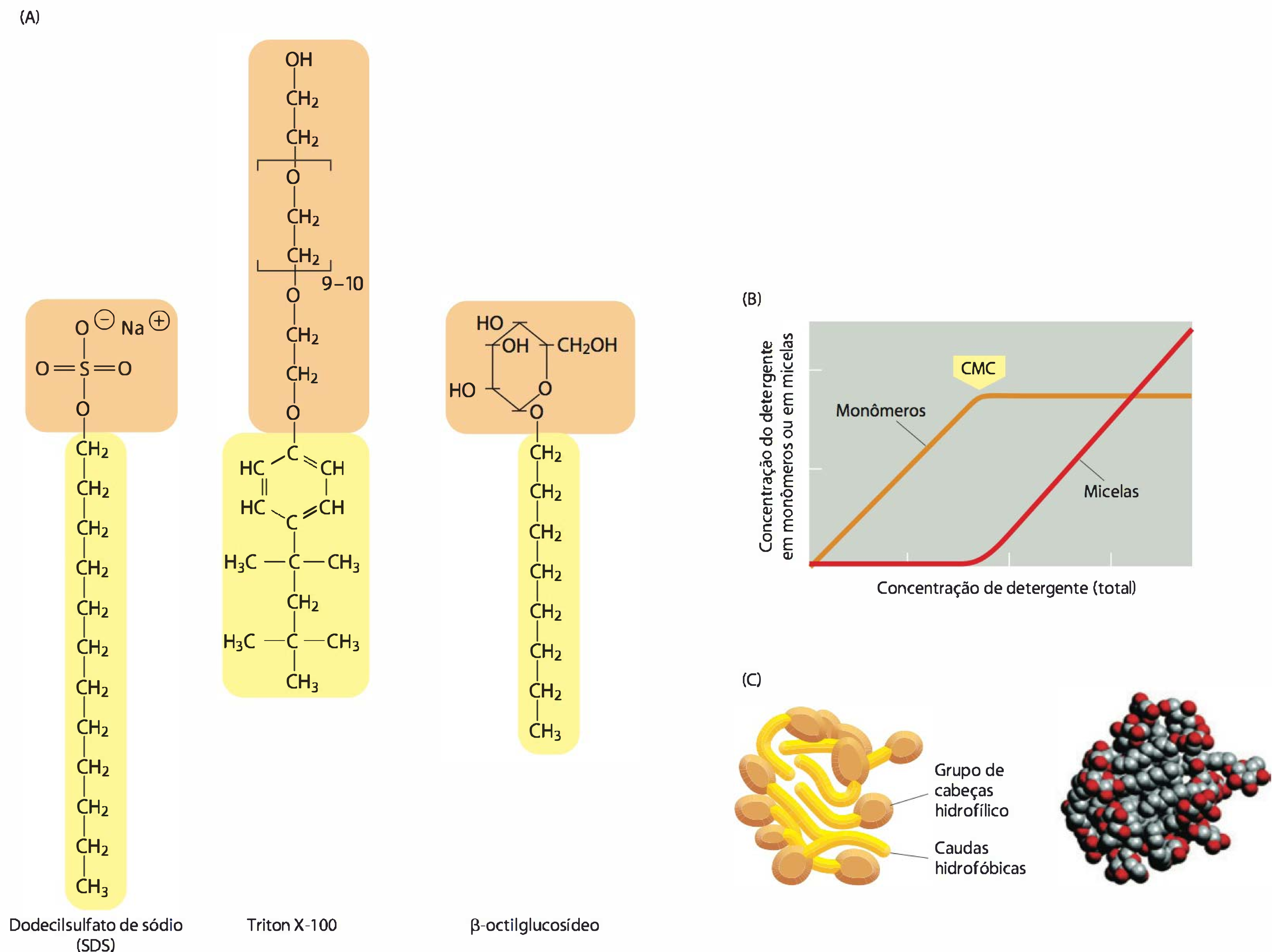


Figura 10-29 Estrutura e função de micelas de detergentes. (A) Os três detergentes normalmente usados são o dodecilsulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico, o Triton X-100 e o β-octilglucosídeo, estes últimos não-iônicos. O Triton X-100 é uma mistura de compostos nos quais a região entre colchetes está repetida 9 a 10 vezes. A porção hidrofóbica de cada detergente está representada em amarelo, e a porção hidrofílica em laranja. (B) Em baixas concentrações, as moléculas de detergente são monoméricas em solução. Com o aumento da concentração acima da concentração micelar crítica (CMC), algumas moléculas do detergente formam micelas. Observe que a concentração do monômero de detergente permanece constante acima da CMC. (C) Devido ao fato de possuírem extremidades polares e apolares, as moléculas de detergente são anfifílicas, e por possuírem a forma de cone, formam micelas ao invés de bicamadas (ver Figura 10-7). As micelas de detergente possuem formas irregulares, e devido às restrições de empacotamento, as caudas hidrofílicas ficam parcialmente expostas à água. O modelo de preenchimento espacial mostra a estrutura da micela composta por 20 moléculas de β-octilglucosídeo, preditas pelos cálculos de dinâmica molecular. (B, adaptada de G. Gunnarsson, B. Jönsson e H. Wennerström, *J. Phys. Chem.* 84:3114-3121, 1980; C, de S. Bogusz, R. M. Venable e R. W. Pastor, *J. Phys. Chem. B.* 104: 5462-5470. Com permissão da American Chemical Society.)

(desnaturam) as proteínas, ligando-se aos “centros hidrofóbicos” internos, tornando as proteínas inativas e incapacitando-as para estudos funcionais. Entretanto, as proteínas podem ser facilmente separadas e purificadas na forma desnaturada em SDS. Em alguns casos, a remoção do detergente permite a renaturação da proteína, recuperando a atividade funcional.

Muitas proteínas de membrana hidrofóbicas podem ser solubilizadas e então purificadas em uma forma ativa pelo uso de detergentes brandos. Esses detergentes cobrem as regiões hidrofóbicas nos segmentos que atravessam a membrana que se tornam expostos após a remoção dos lipídeos, mas não desdobram as proteínas. Se a concentração de detergente de uma solução de proteínas de membrana solubilizadas é reduzida (por diluição, p. ex.), as proteínas de membrana não permanecem solúveis. Na presença de um excesso de moléculas de fosfolipídeos em tal solução, as proteínas de membrana incorporam-se em pequenos lipossomos, que se formam espontaneamente. Desta forma, sistemas de proteínas de membrana funcionalmente ativas podem ser reconstituídos de componentes purificados, proporcionando um poderoso meio para a análise da atividade dos transportadores de

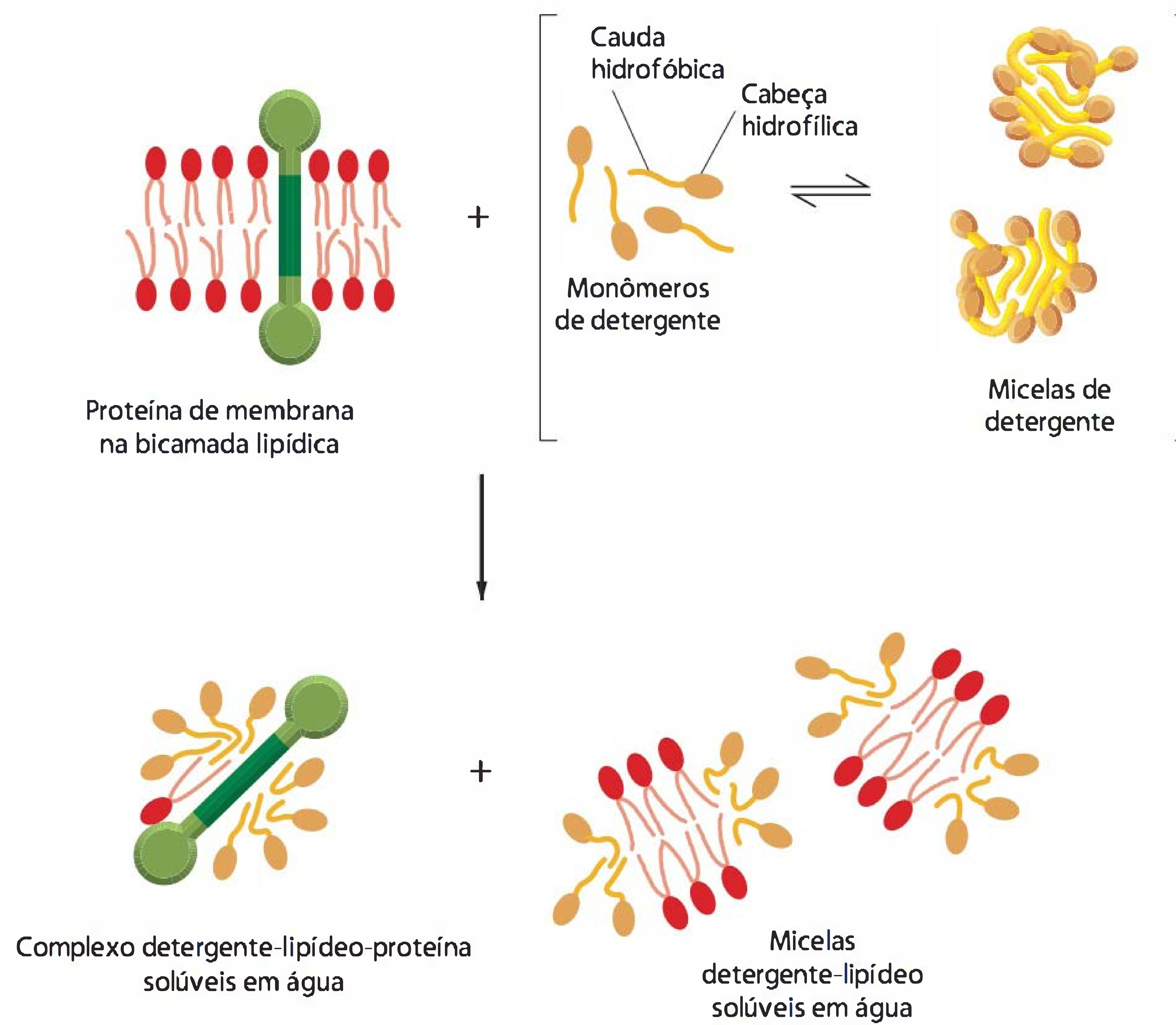


Figura 10-30 Solubilizando proteínas de membrana com um detergente aniônico suave. O detergente rompe a bicamada lipídica e solubiliza as proteínas como complexos detergente-lipídeo-proteína. Os fosfolipídeos da membrana também são solubilizados pelo detergente.

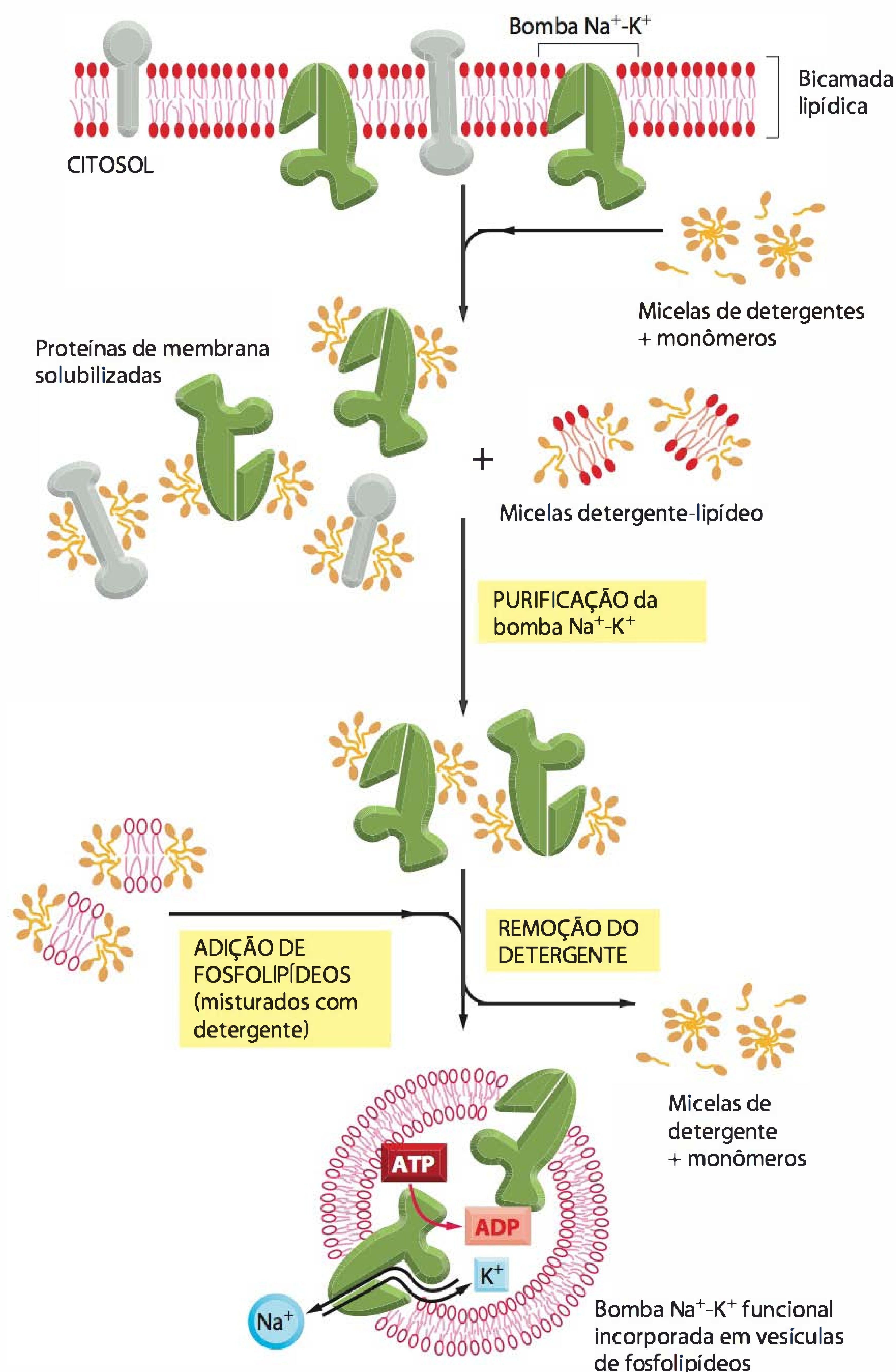


Figura 10-31 Uso de detergentes suaves para solubilizar, purificar e reconstituir sistemas de proteínas de membranas funcionais. Neste exemplo, as moléculas da bomba Na^+-K^+ são purificadas e incorporadas em vesículas de fosfolipídeos. A bomba de Na^+-K^+ é uma bomba de íons presente na membrana plasmática da maioria das células animais. Ela usa a energia da hidrólise do ATP para bombear íons Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro da célula, como discutido no Capítulo 11.

membrana, canais iônicos, receptores de sinalização, e assim por diante (**Figura 10-31**). Tal reconstituição funcional, por exemplo, fornece uma prova para a hipótese de que as ATPases transmembrana usam gradientes de H^+ nas membranas mitocondriais, de cloroplastos e bacterianas para sintetizar ATP.

Os detergentes também desempenham um papel crucial na purificação e na cristalização de proteínas de membrana. O desenvolvimento de novos detergentes e novos sistemas de expressão produzindo grandes quantidades de proteínas de membrana de clones de cDNA (DNA complementar) levou ao rápido aumento do número de estruturas de proteínas de membrana e de complexos de proteínas conhecidos.

A bacteriorrodopsina é uma bomba de prótons que atravessa a bicamada lipídica como sete hélices α

No Capítulo 11, consideraremos como as proteínas de membrana de múltiplas passagens medeiam o transporte seletivo de pequenas moléculas hidrofílicas através da membrana celular. No entanto, o entendimento detalhado de como a proteína de transporte de membrana atua requer uma informação precisa sobre sua estrutura tridimencional na bicamada. A *bacteriorrodopsina* foi a primeira proteína de transporte de membrana a ter sua estrutura determinada. Ela permaneceu sendo um protótipo de muitas proteínas de membrana de múltiplas passagens com uma estrutura similar e merece uma breve descrição.

A "membrana púrpura" da arquebactéria *Halobacterium salinarum* é uma região especializada da membrana plasmática que contém uma única espécie de molécula proteica, a **bacteriorrodopsina** (**Figura 10-32**). Cada molécula de bacteriorrodopsina contém um único grupo que absorve luz, ou cromóforo (denominado *retinal*), que confere à proteína a sua cor púrpura. O retinal é a vitamina A na forma de aldeído, idêntico ao cromóforo encontrado na *rodopsina* das células fotorreceptoras dos olhos dos vertebrados (discutido no Capítulo 15). O retinal está covalentemente ligado à cadeia lateral de uma lisina da proteína bacteriorrodopsina. Quando ativado por um único fóton de luz, o cromóforo excitado muda sua forma e causa uma série de mudanças conformacionais na proteína, resultando na transferência de um H^+ do interior para o exterior da célula (**Figura 10-33**). Sob luz intensa, cada molécula de bacteriorrodopsina pode bombear várias centenas de prótons por segundo. A transferência de prótons estimulada pela luz estabelece um gradiente de H^+ através da membrana plasmática que, por sua vez, estimula a produção de ATP por uma segunda proteína da membrana plasmática da célula. A energia armazenada no gradiente de H^+ também conduz outros processos que requerem energia na célula. Assim, a bacteriorrodopsina converte a energia solar em um gradiente de prótons, o qual fornece energia para a célula bacteriana.

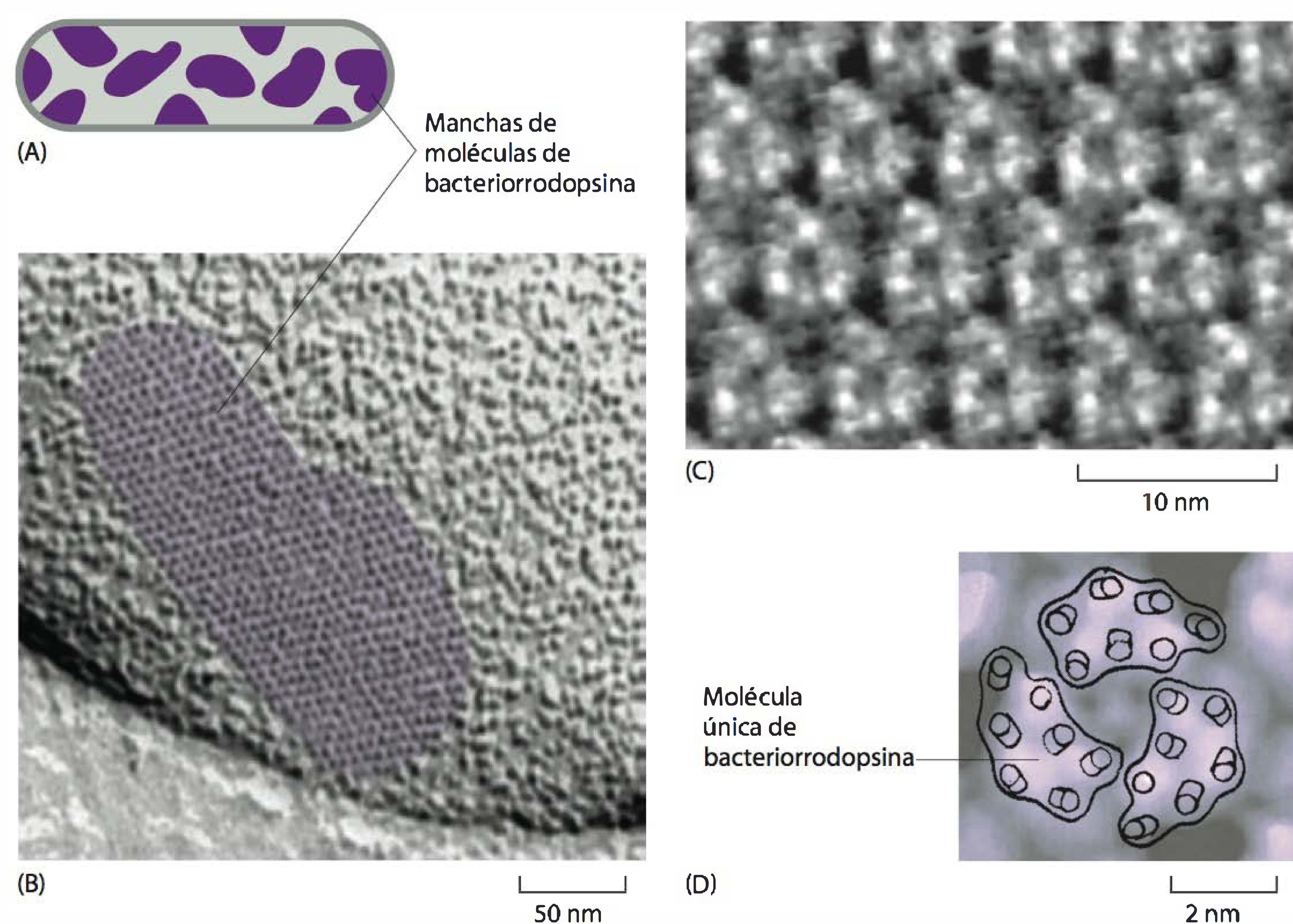


Figura 10-32 Manchas da membrana púrpura, a qual contém bacteriorrodopsina da arquebactéria *Halobacterium salinarum*. (A) Essas arquebactérias vivem em poças de água salgada, onde estão expostas à luz solar. Elas desenvolveram uma variedade de proteínas ativadas pela luz, incluindo a bacteriorrodopsina, a qual é uma bomba de próton da membrana plasmática ativada pela luz solar. (B) As moléculas de bacteriorrodopsina das manchas da membrana púrpura são bem empacotadas em arranjos cristalinos bidimensionais. (C) Detalhe da superfície de moléculas visualizado por microscopia de força atômica. Com esta técnica, podem-se observar as moléculas de bacteriorrodopsina individuais. (D) O diagrama esquemático mostra a localização aproximada de três monômeros de bacteriorrodopsina e suas hélice α individuais (na imagem em B). (B-D, cortesia de Dieter Oesterhelt.)

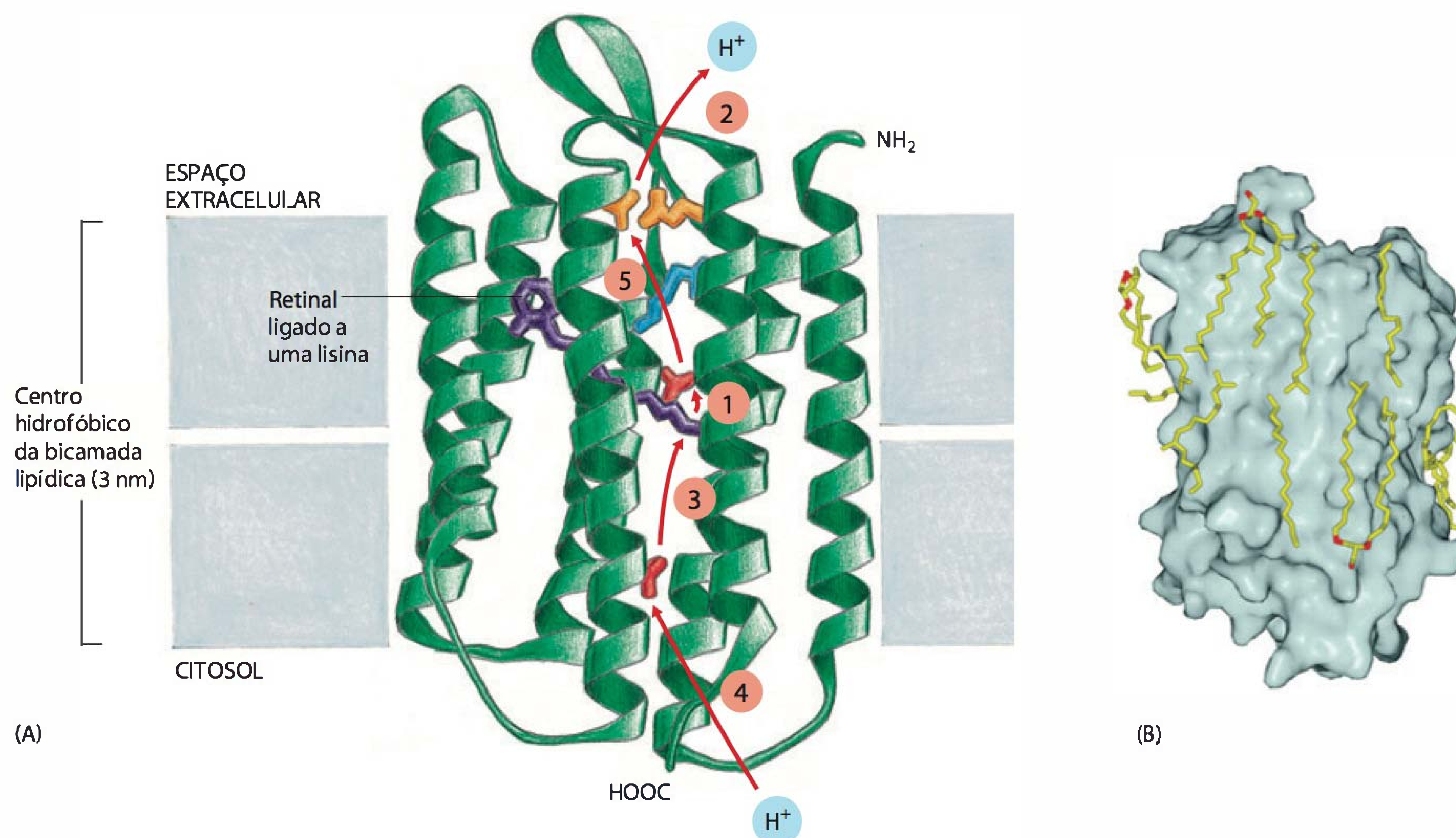


Figura 10-33 Estrutura tridimensional da molécula de bacteriorrodopsina. (A) A cadeia polipeptídica atravessa a bicamada lipídica sete vezes como uma hélice α. São mostrados a localização do cromóforo retinal (*roxo*) e o provável caminho percorrido pelos prótons durante o ciclo de bombeamento ativado pela luz. A primeira e fundamental etapa é a passagem do H^+ do cromóforo pela cadeia lateral do ácido aspártico 85 (*vermelho*, localizado adjacente ao cromóforo) que ocorre quando da absorção de um fóton pelo cromóforo. Subsequentemente, outras transferências de H^+, indicadas em ordem numérica e utilizando as cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos que formam uma passagem através da membrana, completam o ciclo de bombeamento e a enzima retorna ao seu estado inicial. Código de cores: ácido glutâmico (*laranja*), ácido aspártico (*vermelho*), arginina (*azul*). (B) Estrutura cristalina em alta resolução da bacteriorrodopsina mostra muitas moléculas de lipídeos (*amarelo* com as cabeças *vermelhas*) que estão fortemente ligadas a locais específicos na superfície da proteína. (A, adaptada de H. Luecke et al., *J. Mol. Biol.* 286:255-260, 1999. Com permissão de AAAS; B, de H. Luecke et al., J. Mol. Biol. 291:899-911, 1999. Com permissão de Academic Press.)

As numerosas moléculas de bacteriorrodopsina na membrana púrpura estão organizadas como um cristal bidimensional plano. O empacotamento regular tornou possível determinar a estrutura tridimensional da bacteriorrodopsina e a orientação na membrana em alta resolução (3 Å) por meio de uma estratégia alternativa que utiliza uma combinação de microscopia eletrônica e análise da difração de elétrons. Este procedimento, conhecido como **cristalografia de elétrons**, é análogo ao estudo de cristais tridimensionais de proteínas solúveis por análise de difração de raios X e forneceu a primeira estrutura de muitas proteínas de membrana difíceis de cristalizar em soluções de detergentes. A estrutura obtida para a bacteriorrodopsina por cristalografia de elétrons foi confirmada posteriormente e obtida com maior resolução por cristalografia por raios X. Cada molécula de bacteriorrodopsina está pregueada em sete hélices α empacotadas de forma compacta (cada uma contendo cerca de 25 aminoácidos), que passam através da bicamada lipídica em ângulos ligeiramente diferentes. Foi possível determinar a estrutura de algumas conformações intermediárias da proteína durante o ciclo de bombeamento de H^+ após a obtenção de cristais de proteínas bem organizados e pelo seu congelamento a baixas temperaturas.

A bacteriorrodopsina é um membro de uma grande superfamília de proteínas de membrana com estruturas semelhantes, mas funções e orientações distintas. Por exemplo, a rodopsina nos bastonetes da retina de vertebrados e de muitas proteínas receptoras de superfície celular que ligam moléculas sinalizadoras extracelulares também são compostas por sete hélices α transmembrana. Essas proteínas atuam como transdutoras de sinais ao invés de transportadoras: cada uma responde a um sinal extracelular pela ativação de uma proteína ligadora de GTP (proteína G) no interior da célula e, portanto, são chamadas *receptores ligados à proteína G* (*GPCRs, G-protein-coupled receptors*), como será discutido no Capítulo 15. Embora as estruturas da bacteriorrodopsina e dos GPCRs sejam muito similares, eles não apresentam similaridade em sua sequência e, provavelmente, pertencem a dois ramos evolutivamente distintos de uma família proteica ancestral.

A estrutura cristalina de alta resolução da bacteriorrodopsina revelou muitas moléculas lipídicas que estão ligadas em locais específicos na superfície da proteína (Figura 10-33B). Acredita-se que interações com lipídeos específicos auxiliem a estabilizar muitas proteínas de membrana, as quais atuam melhor e cristalizam mais facilmente se alguns dos lipídeos permanecem ligados durante a extração com detergente, ou se lipídeos específicos são novamente adicionados à proteína nas soluções com detergente. A especificidade dessas interações proteína-lipídeo explica por que as membranas eucarióticas contêm tal variedade de lipídeos com as cabeças diferindo em tamanho, forma e carga. Podemos imaginar que os lipídeos de membrana constituem um solvente bidimensional para as proteínas de membrana, assim como a água constitui um solvente tridimensional para as proteínas em solução aquosa. Algumas proteínas de membrana podem atuar somente na presença de cabeças

lipídicas específicas, como muitas enzimas que, quando em solução aquosa, requerem um determinado íon para sua atividade.

As proteínas de membrana frequentemente atuam como grandes complexos

Muitas proteínas de membrana atuam como parte de complexos de múltiplos componentes, sendo que muitos foram estudados por cristalografia por raios X. Um deles é o *centro de reação fotossintética* bacteriano, o qual foi o primeiro complexo de proteína transmembrana a ser cristalizado e analisado por difração de raios X. Os resultados desta análise foram importante para a biologia das membranas porque mostrou pela primeira vez como múltiplos polipeptídeos se associam em uma membrana para formar uma máquina proteica complexa (**Figura 10-34**). No Capítulo 14, discutiremos como tal complexo fotossintético atua para capturar a energia da luz usando-a para bombear prótons através da membrana. Muitos dos complexos proteicos de membrana envolvidos na fotossíntese, na bomba de prótons e no transporte de elétrons são centros de reação ainda maiores do que o fotossintético. O enorme complexo fotossistema II da cianobactéria, por exemplo, contém 19 subunidades proteicas e mais de 60 hélices transmembrana. As proteínas de membrana frequentemente são organizadas em grandes complexos, não somente para captar várias formas de energia, mas também para a transdução de sinais extracelulares em sinais intracelulares (discutido no Capítulo 15).

Muitas proteínas de membrana difundem-se no plano da membrana

Como a maioria dos lipídeos de membrana, as proteínas de membrana não saltam (*flip-flop*) através da bicamada lipídica, mas giram sobre um eixo perpendicular ao plano da bicamada (*difusão rotacional*). Além disso, muitas proteínas de membrana são capazes de se mover lateralmente dentro da membrana (*difusão lateral*). A primeira evidência direta de que al-

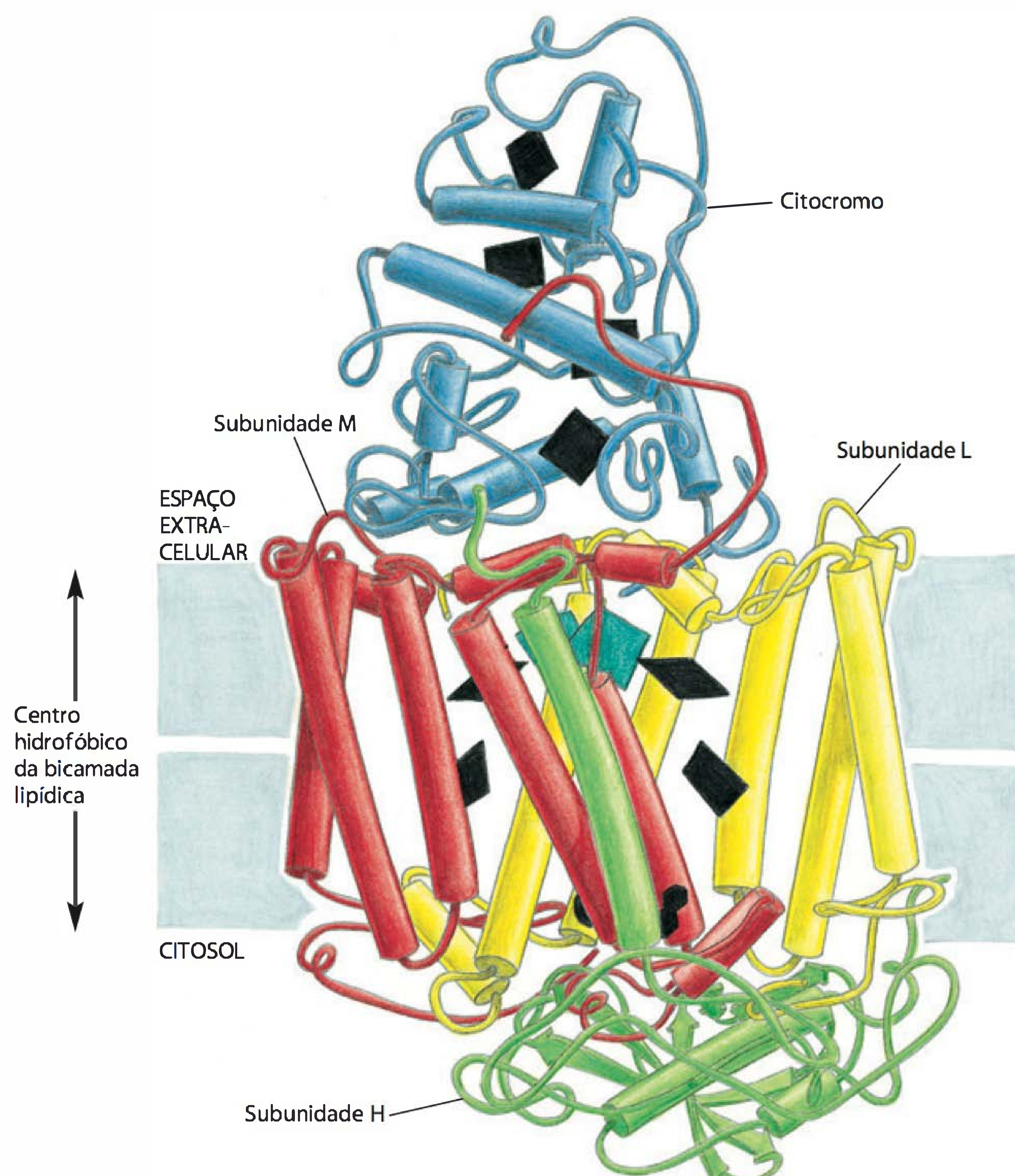


Figura 10-34 Estrutura tridimensional do centro de reação fotossintética da bactéria *Rhodopseudomonas viridis*. A estrutura foi determinada por análise de difração de raios X dos cristais deste complexo de proteína transmembrana. O complexo consiste em quatro subunidades L, M, H e um citocromo. As subunidades L e M formam o cerne do centro de reação e cada uma contém cinco hélices α que atravessam a bicamada. A localização das várias enzimas carreadoras de elétrons estão apresentadas em *preto*. Observe que as coenzimas estão arranjadas nos espaços entre as hélices. Um par especial de molécula de clorofila é apresentado em *azul-turquesa* (discutido no Capítulo 14). (Adaptada de um desenho de J. Richardson com base em dados de J. Deisenhofer et al., *Nature* 318:618-624, 1985. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

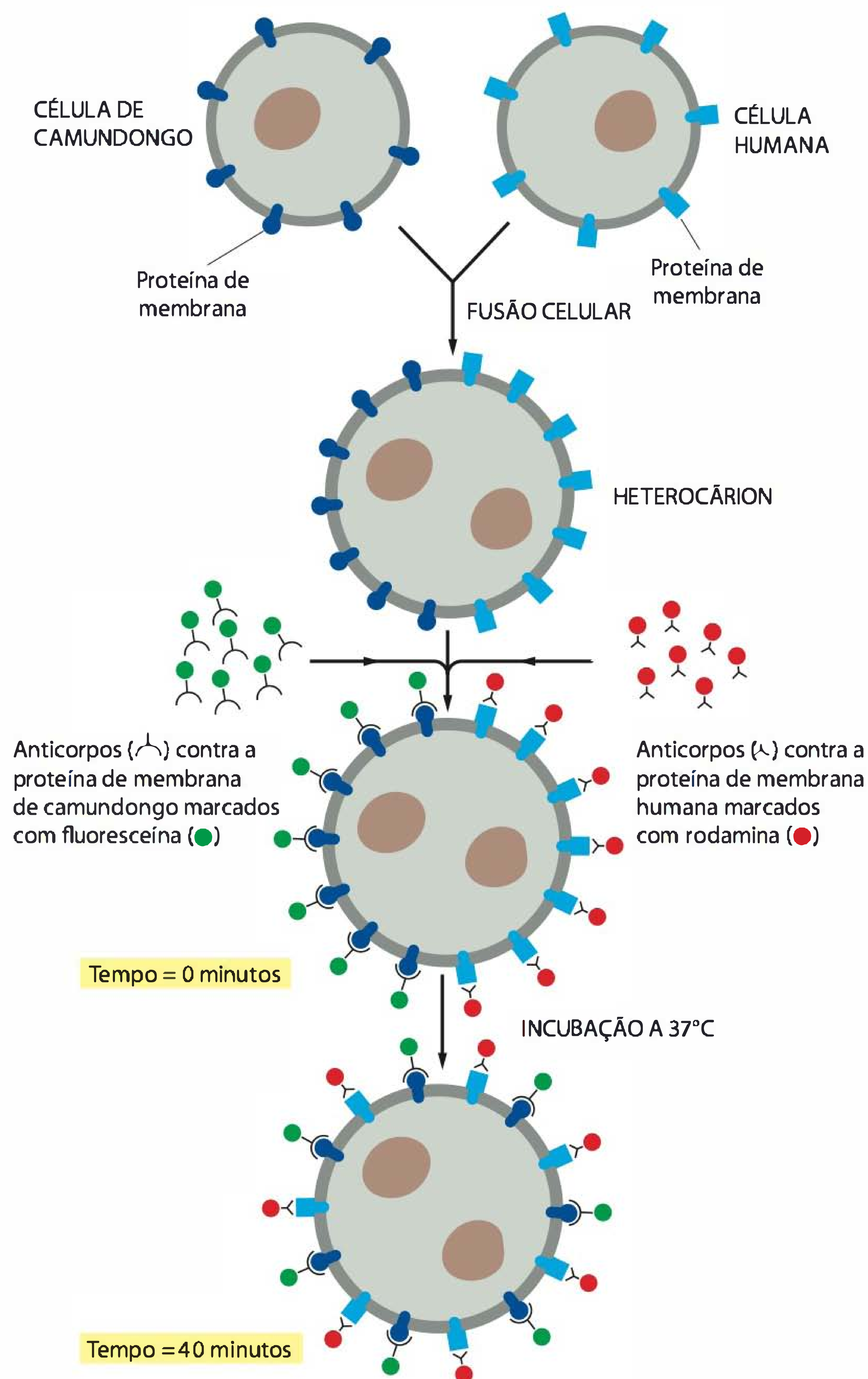


Figura 10-35 Experimento demonstrando a mistura de proteínas da membrana plasmática em células híbridas de camundongo-humanas. As proteínas de camundongo e humanas estão inicialmente confinadas às suas próprias metades da membrana plasmática do heterocárion recém-formado, mas misturam-se com o tempo. Os dois anticorpos usados para visualizar as proteínas podem ser distinguidos em um microscópio, pois a fluoresceína emite fluorescência verde e a rodamina emite fluorescência vermelha. (Com base em L. D. Frye e M. Edidin, *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970. Com permissão da The Company of Biologists.)

gumas proteínas de membrana plasmática se movem no plano da membrana é decorrente de um experimento com células de camundongos artificialmente fusionadas com células humanas para produzir uma célula híbrida (*heterocarionte*). Dois anticorpos marcados diferentemente foram usados para distinguir proteínas selecionadas da membrana plasmática de camundongo e humana. Apesar de, inicialmente, as proteínas de camundongo e humanas estarem confinadas às suas próprias metades no heterocarionte recém-formado, os dois conjuntos de proteínas difundiram-se e se misturaram em toda a superfície da célula em aproximadamente meia hora (**Figura 10-35**).

As taxas de difusão lateral das proteínas de membrana podem ser medidas utilizando-se a técnica de *recuperação da fluorescência após clareamento* (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*). O método normalmente envolve a marcação da proteína de membrana de interesse com um grupamento fluorescente específico. Isto pode ser feito tanto com um ligante fluorescente, como um anticorpo marcado com um fluoróforo que se liga à proteína de interesse, quanto com a tecnologia do DNA recombinante para expressar a proteína fusionada à proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) (discutido no Capítulo 9). O grupamento fluorescente é então clareado em uma pequena área da membrana por um feixe de *laser*, e mede-se o tempo que as proteínas de membrana adjacentes, carregando ligantes não-clareados ou a GFP, levam para se difundir para dentro da área clareada (**Figura 10-36**A). Uma técnica complementar é a *perda da fluorescência na fotodegradação* (FLIP, *fluorescence loss in photobleaching*) na qual um feixe de *laser* irradia continuamente uma pequena área da membrana para clarear todas as moléculas fluorescentes que nela se difundem, reduzindo gradualmente o número de moléculas fluorescentes na membrana circundante (Figura 10-36B). A partir das quantificações por FRAP e FLIP, pode-se calcular

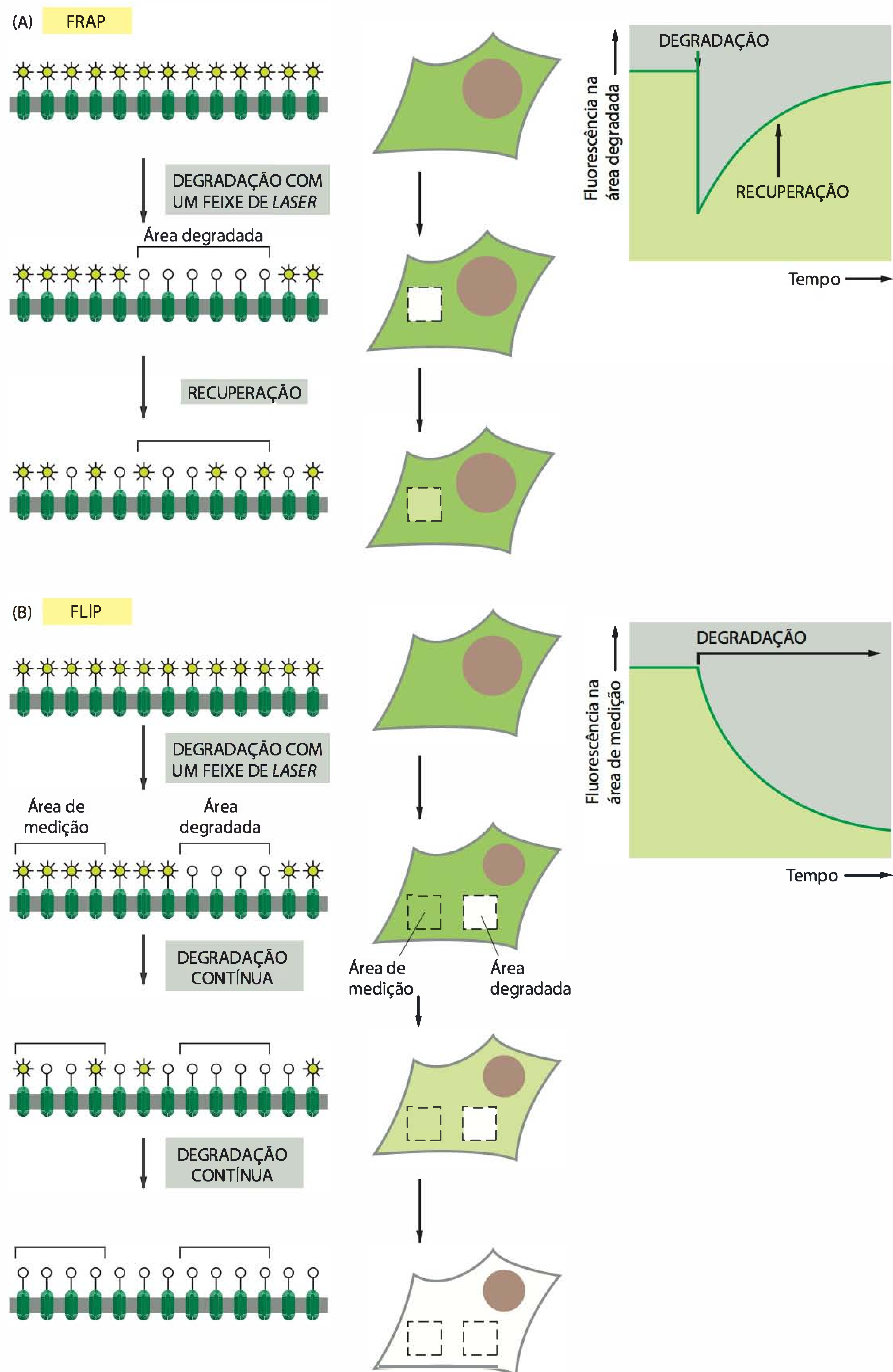


Figura 10-36 Medindo a taxa de difusão lateral de uma proteína de membrana por meio da técnica de fotodegradação. Uma proteína de interesse específica pode ser expressa como uma proteína de fusão com a proteína fluorescente verde (GFP), a qual é intrinsecamente fluorescente. (A) Na técnica de FRAP, as moléculas fluorescentes são degradadas em uma pequena área usando um feixe de *laser*. A intensidade da fluorescência é recuperada à medida que as moléculas degradadas difundem-se para fora e as moléculas não-degradadas difundem-se para dentro da área irradiada (aqui apresentadas como uma vista lateral e superior). O coeficiente de difusão é calculado com base em um gráfico da taxa de recuperação. Quanto maior o coeficiente de difusão da proteína de membrana, mais rápida a recuperação. (B) Na técnica de FLIP, uma área da membrana é irradiada constantemente e a fluorescência é medida em uma área separada. A fluorescência na segunda área decresce progressivamente à medida que as proteínas fluorescentes difundem-se para fora e as moléculas degradadas difundem-se para dentro. Eventualmente, todas as moléculas de proteína fluorescente serão degradadas desde que sejam móveis e não permaneçam ancoradas ao citoesqueleto ou à matriz extracelular.

o coeficiente de difusão da proteína de superfície celular marcada. Os valores para os coeficientes de difusão para diferentes proteínas de membrana em diferentes células são altamente variáveis, pois as interações com outras proteínas impedem a difusão de proteínas em graus variáveis. As medições de proteínas cuja difusão seja minimamente impedida indicam que as membranas celulares possuem uma viscosidade semelhante ao azeite de oliva.

Uma desvantagem das técnicas de FRAP e FLIP é que elas monitoram o movimento de grandes populações de moléculas em áreas relativamente extensas de membrana. Não é possível avaliar moléculas de proteínas individuais. Por exemplo, se a proteína não migra para a área clareada, não é possível afirmar se a molécula é imóvel ou se seus movimentos estão restritos a uma pequena região da membrana, talvez por proteínas do citoesqueleto. A técnica de *localização de uma única partícula* resolve este problema marcando moléculas de membrana individuais com anticorpos ligados a corantes fluorescentes ou a pequenas

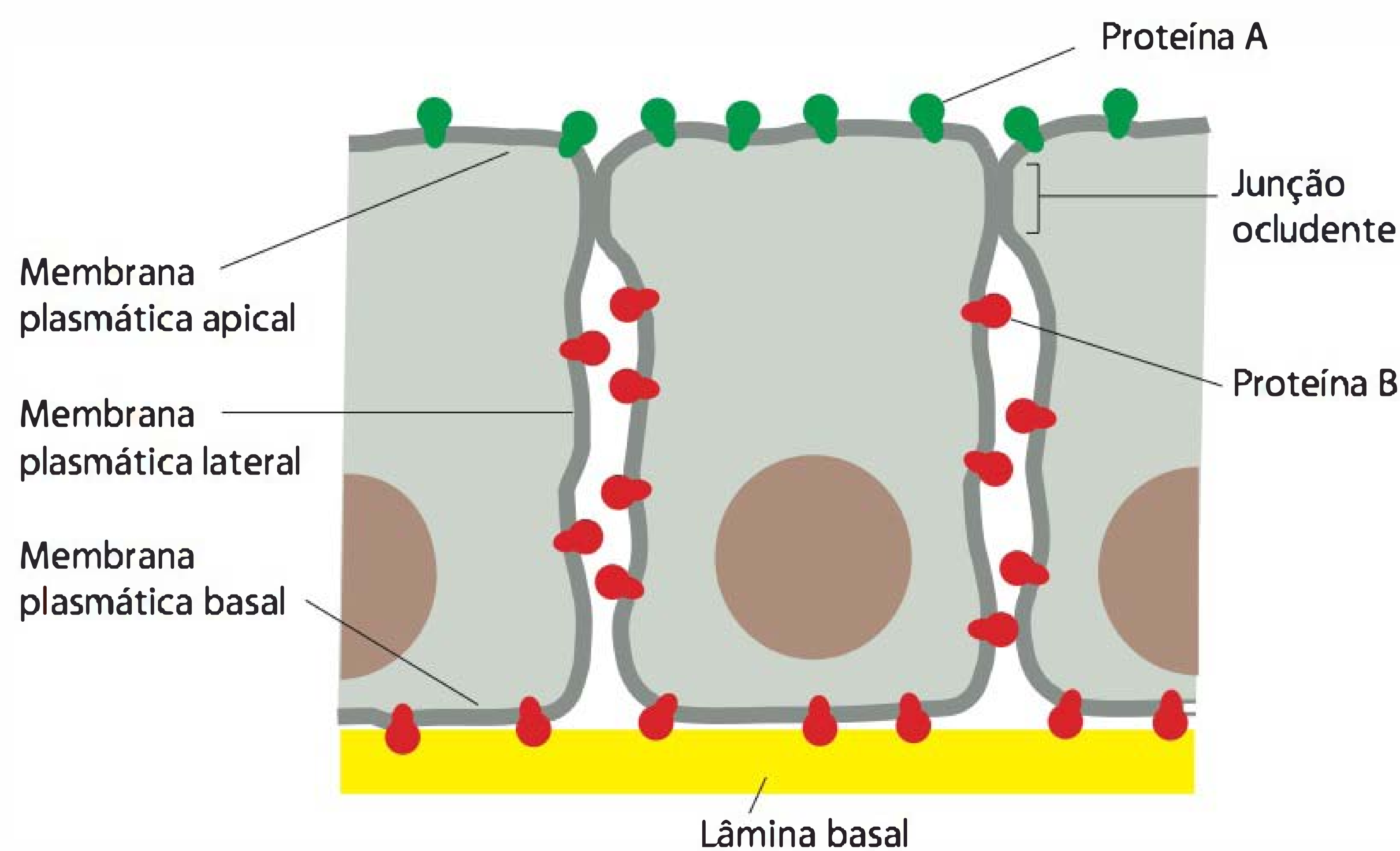


Figura 10-37 Como as moléculas de membrana podem estar restritas a um determinado domínio de membrana. Neste desenho de uma célula epitelial, a proteína A (da membrana apical) e a proteína B (da membrana lateral e basal) podem se difundir lateralmente em seus próprios domínios, mas estão impedidas de entrar em outros domínios, pelo menos parcialmente, por junções celulares especializadas denominadas junções ocludentes. As moléculas de lipídeos da monocamada externa da membrana plasmática (não-citosólica) são igualmente capazes de se difundir entre os dois domínios; entretanto, os lipídeos na monocamada interna (citosólica) são capazes de fazê-lo (não-mostrado). A lâmina basal é um fino tapete de matriz extracelular que separa as camadas epiteliais dos outros tecidos (discutido no Capítulo 19).

partículas de ouro e seguindo seu movimento por vídeomicroscopia. Utilizando-se a localização de uma única partícula, pode-se registrar a via de difusão de uma única molécula de proteína de membrana por um determinado período de tempo. Os resultados obtidos usando-se todas estas técnicas indicaram que as proteínas de membrana plasmática diferem amplamente com relação a suas características de difusão, como veremos a seguir.

As células podem confinar proteínas e lipídeos em domínios específicos em uma membrana

O reconhecimento de que as membranas biológicas são fluidos bidimensionais foi o principal avanço para o entendimento da estrutura e da função das membranas. Entretanto, ficou claro que a descrição da membrana como um grande mar de lipídeos, onde todas as proteínas flutuam livremente, é extremamente simplificada. Muitas células confinam as proteínas de membrana em regiões específicas na bicamada lipídica contínua. Já discutimos como as moléculas de bacteriorrodopsina da membrana púrpura da *Halobacterium* se organizam em grandes cristais bidimensionais nos quais as moléculas de proteínas individuais estão relativamente fixas umas às outras (ver Figura 10-32). Grandes agregados deste tipo difundem-se lentamente.

Em células epiteliais, como aquelas que revestem o intestino ou os túbulos renais, determinadas enzimas e proteínas de transporte da membrana plasmática estão confinadas na superfície apical da célula, enquanto outras estão confinadas na superfície lateral e basal (**Figura 10-37**). Esta distribuição assimétrica das proteínas de membrana frequentemente é essencial para as funções do epitélio, como será discutido no Capítulo 19. A composição de lipídeos desses dois domínios de membrana também é diferente, demonstrando que as células epiteliais podem impedir a difusão dos lipídeos e de moléculas de proteína entre os domínios. Entretanto, experimentos com lipídeos marcados sugerem que somente as moléculas de lipídeos da monocamada externa da membrana estão confinadas desta forma. Acredita-se que as barreiras formadas por um tipo específico de junção intercelular (denominada *junção ocludente*, discutida no Capítulo 19) mantenham a separação das moléculas de proteína e de lipídeos. Claramente, as proteínas de membrana que formam estas junções intercelulares não podem se difundir lateralmente nas membranas que interagem.

Uma célula pode também criar domínios de membrana sem usar as junções intercelulares. O espermatozoide de mamíferos, por exemplo, é uma única célula que consiste em diversas partes distintas funcional e estruturalmente, recobertas por uma membrana plasmática distinta. Quando um espermatozoide é examinado por meio de microscopia de fluorescência com vários anticorpos, cada um reagindo com uma determinada molécula da superfície, observa-se que a membrana consiste em pelo menos três domínios distintos (**Figura 10-38**). Algumas das moléculas da membrana são capazes de se difundir livremente dentro dos limites do seu próprio domínio. A natureza molecular da "barreira" que impede que as moléculas deixem seus domínios não é conhecida. Várias outras células possuem barreiras similares na membrana que restringem a difusão das proteínas de membrana em determinados domínios da membrana. Por exemplo, a membrana plasmática das células nervosas contém um domínio que envolve o corpo celular e os dendritos e outro que envolve o axônio. Neste caso, acredita-se que um cinturão de filamentos de actina fortemente associados com a membrana plasmática na junção corpo celular do axônio forme parte da barreira.

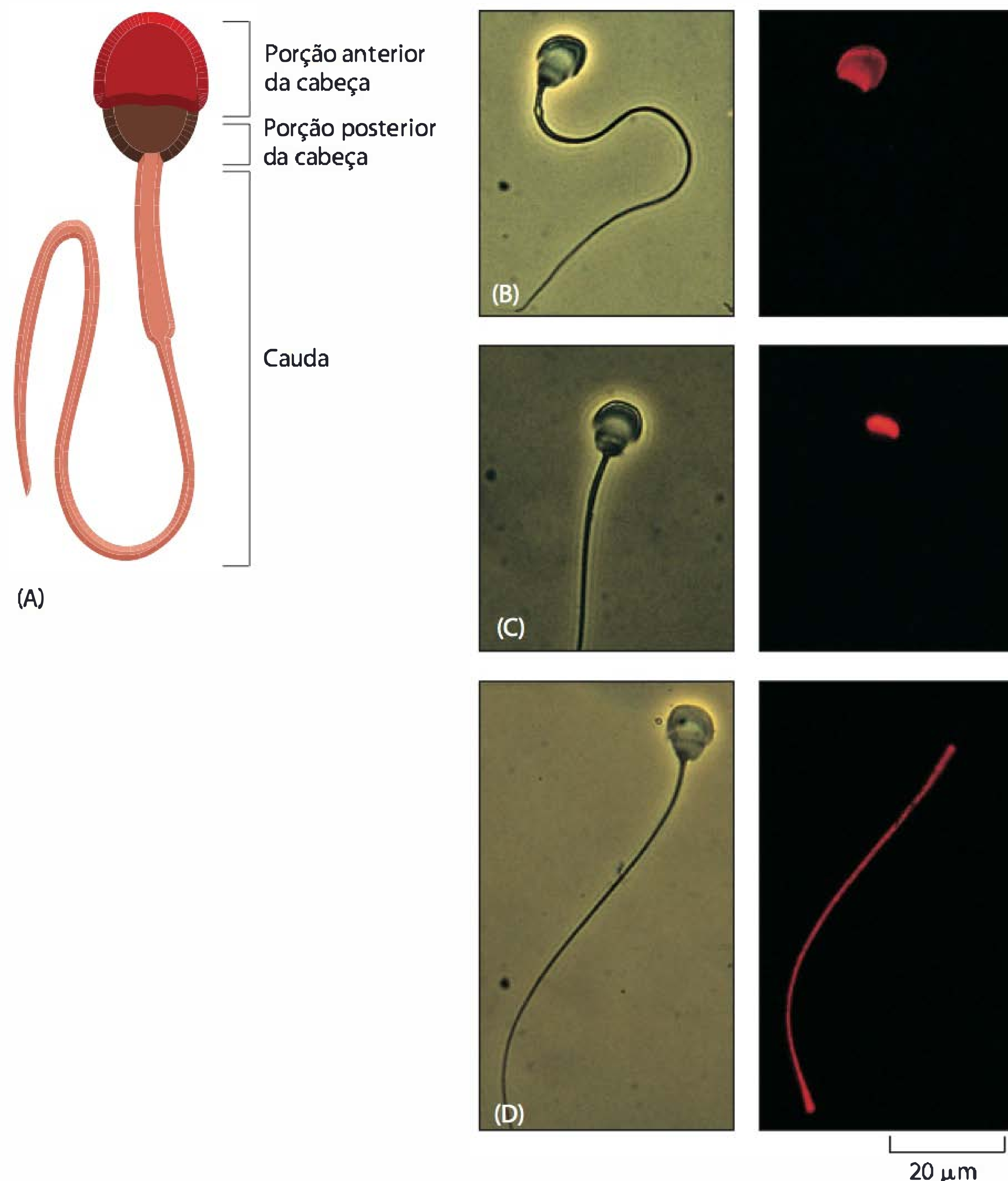


Figura 10-38 Três domínios da membrana plasmática de um esperma de cobaia. (A) Representação esquemática do esperma de cobaia. Nos três pares de micrografias, à *direita* estão as micrografias de contraste de fase e à *direita* a mesma célula é mostrada com coloração de imunofluorescência da superfície celular. Diferentes anticorpos monoclonais marcam seletivamente as moléculas de superfície celular na porção anterior da cabeça (B), na porção posterior da cabeça (C) e na cauda (D). (Micrografias cortesia de Selena Carroll e Diana Myles.)

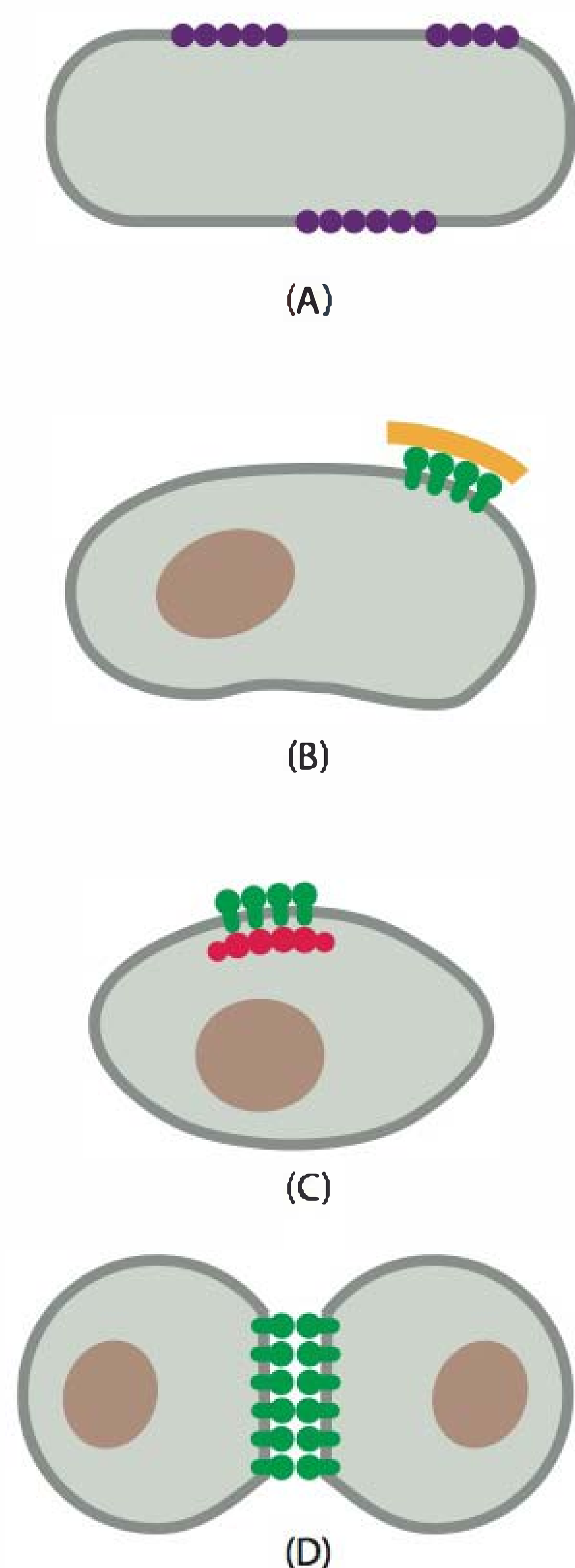


Figura 10-39 Quatro maneiras de restringir a mobilidade lateral de proteínas específicas da membrana plasmática. (A) As proteínas podem se autoagrupar em grande agregados (como observado na bacteriorrodopsina na membrana púrpura da *Halobacterium*); elas podem ser presas por meio de interações com agregados de macromoléculas fora (B) ou dentro da célula (C), ou podem interagir com proteínas na superfície de outra célula (D).

O citoesqueleto cortical proporciona força mecânica e restringe a difusão das proteínas de membrana

Como ilustrado na Figura 10-39B e C, uma maneira comum pela qual a célula restringe a mobilidade lateral de proteínas específicas de membrana é prendê-las a grupos de moléculas dos dois lados da membrana. Por exemplo, a forma bicôncava característica das células sanguíneas vermelhas (eritrócitos) (**Figura 10-40**) é resultante das interações entre as proteínas da membrana plasmática com o *citoesqueleto* adjacente, o qual consiste, principalmente, em uma rede de proteína filamentosa, a **espectrina**. A espectrina é uma longa proteína fina em forma de bastão flexível com cerca de 100 nm de comprimento. Por ser o principal componente do citoesqueleto dos eritrócitos, ela mantém a integridade estrutural e a forma da membrana plasmática, a qual é a única membrana dessas células, pois não possuem núcleo ou organelas. O citoesqueleto de espectrina é rebitado na membrana através de várias proteínas de membrana. O resultado final é uma malha flexível em forma de rede que cobre toda a superfície citosólica da membrana do eritrócito (**Figura 10-41**). Este citoesqueleto composto basicamente por espectrina permite que os eritrócitos suportem a pressão sobre a sua membrana quando passam através de capilares muito finos. Camundongos e seres humanos com anormalidades genéticas na espectrina são anêmicos e possuem eritrócitos esféricos (ao invés de côncavos) e frágeis. A gravidade da anemia aumenta com o grau de deficiência de espectrina.

Uma rede de citoesqueleto análoga, mas mais elaborada e complicada é encontrada abaixo da membrana plasmática da maioria das outras células do nosso organismo. Esta rede, que constitui a região cortical do citoplasma (**córtex**), é rica em filamentos de actina, a qual esá ligada à membrana plasmática de várias formas. O córtex das células nucleadas contém proteínas que são estruturalmente análogas à espectrina e aos outros componentes do citoesqueleto dos eritrócitos. Discutiremos o citoesqueleto cortical das células nucleadas e suas interações com a membrana plasmática no Capítulo 16.

A rede de citoesqueleto cortical subjacente à membrana plasmática não restringe a difusão apenas das proteínas que estão diretamente ancoradas a ele. Devido ao fato de que os *filamentos do citoesqueleto* frequentemente estão justapostos na superfície citosólica da membrana, eles podem formar barreiras mecânicas que impedem a livre difusão das proteí-

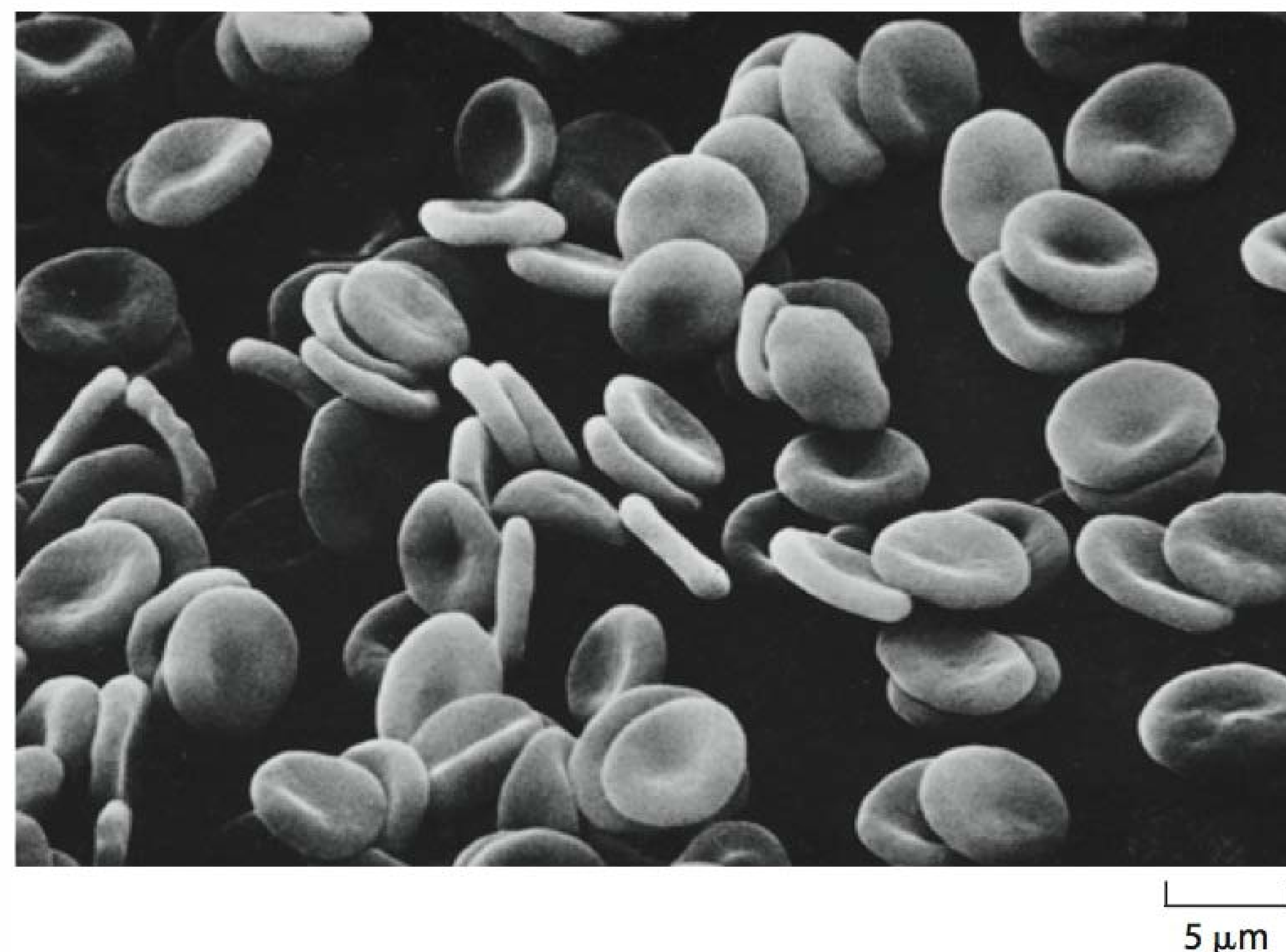
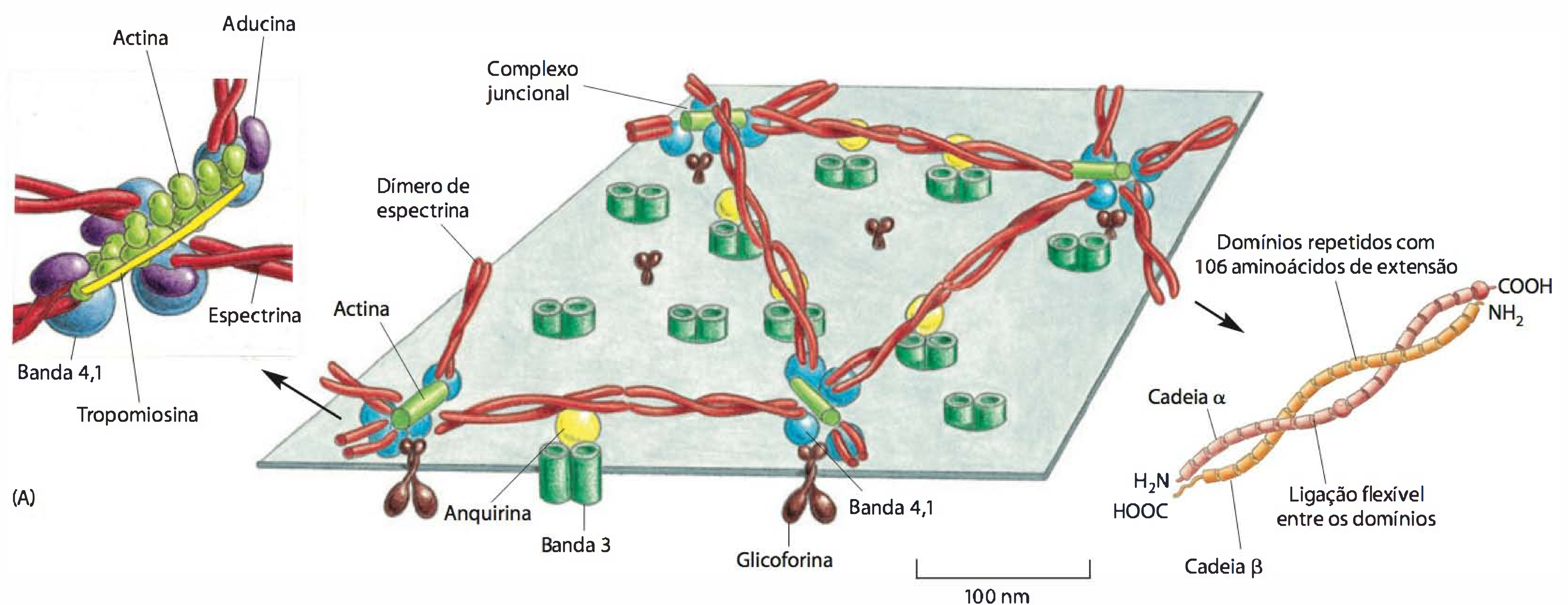


Figura 10-40 Eletromicrografia de varredura de eritrócitos humanos. As células possuem uma forma bicôncava e não possuem núcleo ou organelas. (Cortesia de Bernadette Chailley.)

nas da membrana. Estas barreiras dividem a membrana em pequenos domínios ou currais (**Figura 10-42**), os quais podem ser permanentes, como nos espermatozoides (ver Figura 10-38), ou transitórios. As barreiras podem ser detectadas quando a difusão das proteínas individuais da membrana é seguida em alta velocidade e rastreada por partículas únicas. As proteínas difundem-se rapidamente, mas ficam confinadas em seus currais individuais. Entretanto, ocasionalmente, alterações térmicas fazem com que alguns filamentos corticais



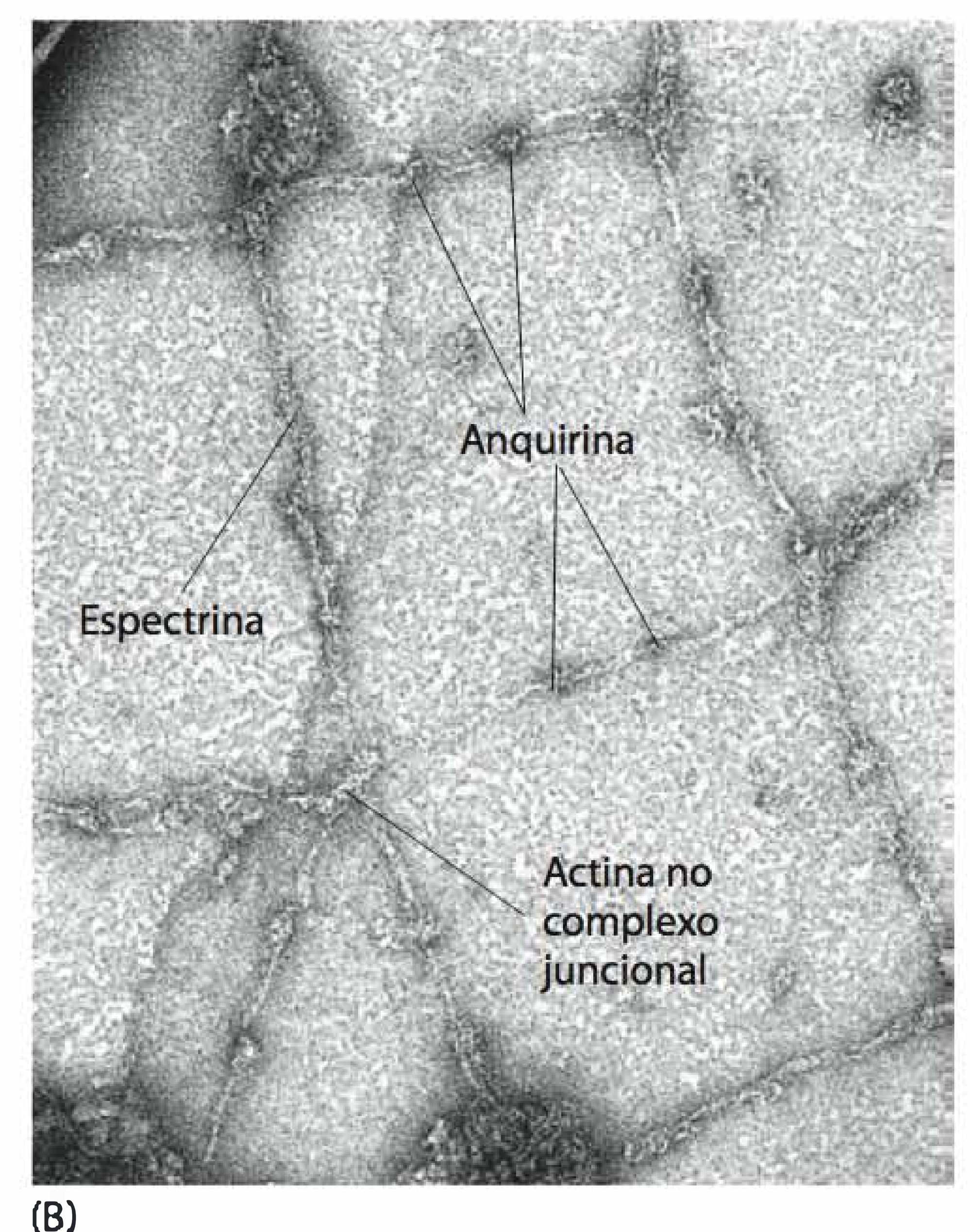


Figura 10-41 Citoesqueleto composto basicamente por espectrina na porção citosólica da membrana plasmática de um eritrócito humano. (A) O arranjo mostrado no desenho foi deduzido, principalmente a partir de estudos sobre as interações de proteínas purificadas *in vitro*. Os dímeros de espectrina (em aumento na figura à *direita*) são unidos por uma rede de "complexos juncionais" (em aumento na figura à *esquerda*). Cada heterodímero de espectrina consiste em duas cadeias antiparalelas polipeptídicas denominadas α e β flexíveis, frouxamente trançadas. As duas cadeias estão ligadas de forma não-covalente uma à outra em múltiplos pontos, incluindo as duas extremidades. Tanto a cadeia α quanto a cadeia β são compostas por domínios repetidos. Os complexos juncionais são compostos por curtos filamentos de actina (contendo 13 monômeros de actina), *banda 4,1*, *aducina* e de uma molécula de *tropomiosina*, que provavelmente determine o comprimento dos filamentos de actina. O citoesqueleto é ligado à membrana por duas proteínas transmembrana, uma proteína de múltiplas passagens denominada *banda 3* e uma proteína de passagem única denominada *glicoforina*. Os tetrâmeros de espectrina ligam-se a algumas proteínas banda 3 por moléculas de anquirina, e as glicoforinas e banda 3 (não-mostrada) pela proteína banda 4,1. (B) Micrografia eletrônica mostrando o citoesqueleto na porção citosólica da membrana de eritrócito após fixação e coloração negativa. A rede de espectrina foi propositalmente esticada para permitir a visualização dos detalhes de sua estrutura. Em células normais, a rede apresenta-se mais compacta e ocupa cerca de um décimo desta área. (B, cortesia de T. Byers e D. Branton, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 82:6153-6157, 1985. Com permissão da National Academy of Sciencies.)

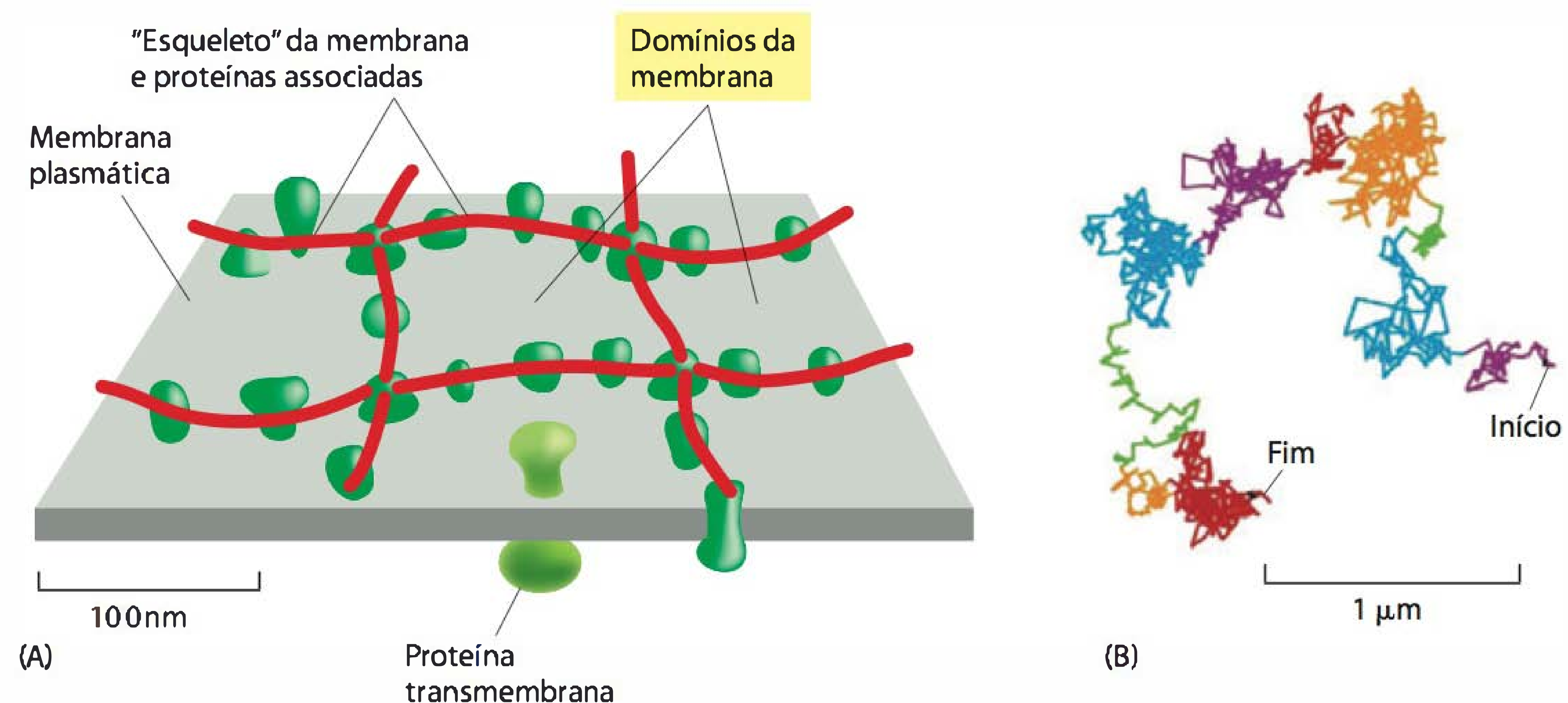


Figura 10-42 Currais das proteínas de membrana por filamentos do citoesqueleto cortical. (A) Como os filamentos do citoesqueleto proporcionam uma barreira de difusão que divide a membrana em pequenos domínios ou currais. (B) A técnica de alta velocidade e o rastreamento de partículas únicas foram usados para avaliar as direções de proteínas de membrana marcadas com um fluoróforo durante determinado tempo. Os traços mostram que a proteína de membrana difunde-se dentro de um domínio de membrana extremamente limitado (apresentado em diferentes cores) e raramente escapam para os domínios adjacentes. (Adaptada de A. Kusumi et al., *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:351-378, 2005. Com permissão da Annual Reviews.)

se desliguem transientemente da membrana, permitindo que a proteína escape para um curral adjacente.

O grau de restrição da proteína transmembrana a um curral depende de sua associação com outras proteínas e do tamanho de seu domínio citoplasmático. Proteínas com grandes domínios citosólicos terão maior dificuldade de passar por essas barreiras. Por exemplo, quando o receptor de superfície celular se liga a sua molécula sinalizadora extracelular, ocorre a formação de grandes complexos de proteínas no domínio citosólico do receptor, fazendo com que fique mais difícil que o receptor escape de seu curral. Acredita-se que o confinamento auxilie na concentração de complexos de sinalização ativados, aumentando a velocidade e a eficácia do processo de sinalização (discutido no Capítulo 15).

Resumo

Enquanto a bicamada lipídica determina a estrutura básica das membranas biológicas, as proteínas são responsáveis pela maioria das funções da membrana, servindo como receptores específicos, enzimas, proteínas de transporte, e assim por diante. Muitas proteínas de membrana atravessam a bicamada lipídica. Algumas dessas proteínas transmembrana são proteínas de passagem única, nas quais a cadeia polipeptídica atravessa a bicamada como uma única hélice α. Outras são proteínas de multiplas passagens, nas quais a cadeia polipeptídica atravessa a bicamada várias vezes, seja como uma série de hélices α seja como folhas β na forma de barril fechado. Todas as proteínas responsáveis pelo transporte de íons e de pequenas moléculas solúveis em água são de múltiplas passagens. Algumas proteínas associadas à membrana não atravessam a bicamada, mas ficam ligadas a um dos lados da membrana. Muitas dessas proteínas estão ligadas por interações não-covalentes com as proteínas transmembrana, mas outras são ligadas por grupamentos lipídicos covalentemente ligados. Na membrana plasmática de todas as células eucarióticas, a maioria das proteínas expostas na superfície celular e algumas moléculas de lipídeos da monocamada externa possuem cadeias de oligossacarídeos covalentemente ligadas a elas. Como as moléculas de lipídeo da bicamada, muitas proteínas de membrana são capazes de se difundir rapidamente no plano da membrana. Entretanto, as células possuem maneiras de imobilizar proteínas específicas da membrana, bem como formas de manter confinadas tanto as proteínas da membrana quanto as moléculas lipídicas, em domínios específicos na bicamada lipídica contínua.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmativas estão corretas? Justifique.

10-1 Embora as moléculas lipídicas sejam livres para se difundirem no plano da bicamada, elas não podem rotar através da bicamada a não ser que enzimas catalisadoras, denominadas translocadoras de fosfolipídeos, estejam presentes na membrana.

10-2 Todos os carboidratos da membrana plasmática posicionam-se para fora da superfície externa da célula e todos os carboidratos da membrana interna posicionam-se para o citosol.

10-3 Embora os domínios de membrana sejam bem conhecidos, não há exemplos até o momento de domínios de membrana que diferem em sua composição de lipídeos.

Discuta as seguintes questões.

10-4 Quando a bicamada lipídica é rompida, por que ela não se recupera formando uma hemimicela protegendo suas extremidades, como mostra a **Figura Q10-1**?

10-5 A margarina é produzida com óleo vegetal por um processo químico. Você acredita que este processo converta ácido graxo saturado em ácido graxo insaturado ou vice-versa? Explique sua resposta.

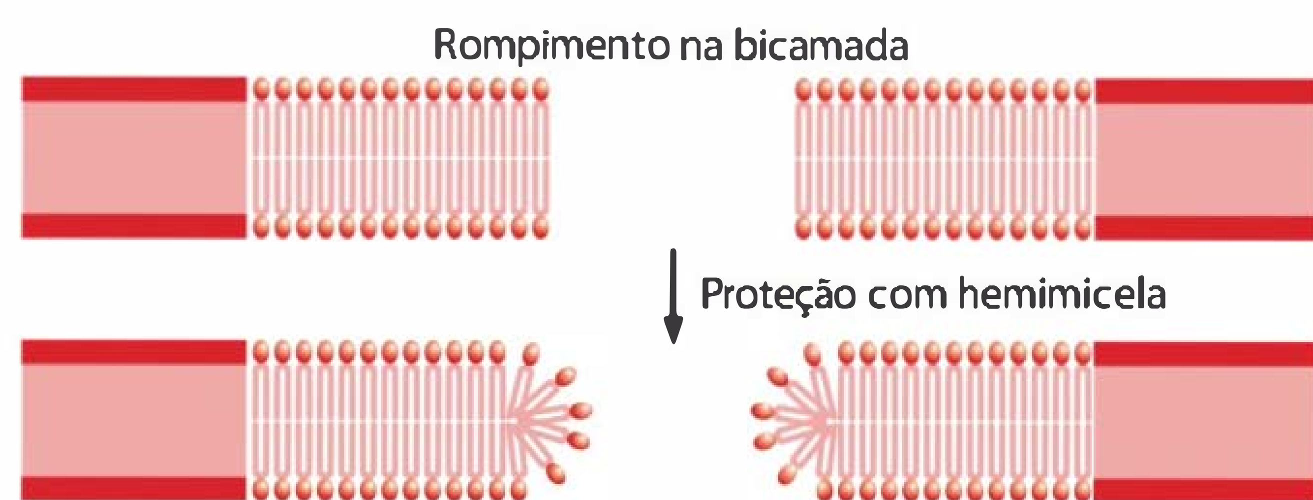


Figura Q10-1 Rompimento da bicamada lipídica fechado com uma possível proteção de "hemimicela" (Questão 10-4).

10-6 Se uma balsa lipídica tipicamente possui 70 nm de diâmetro e cada molécula lipídica possui um diâmetro de 0,5 nm, quantas moléculas lipídicas deverão estar presentes em uma balsa lipídica composta somente por lipídeos? A uma taxa de 50 moléculas lipídicas por molécula de proteína (50% de proteína por massa), quantas proteínas deverão estar presentes em uma balsa lipídica típica? (Despreze a perda de lipídeos da balsa necessária para acomodar as proteínas.)

10-7 Um artigo clássico estudou o comportamento dos lipídeos nas duas monocamadas de uma membrana marcando as moléculas individualmente com grupamentos nitróxidos, os quais são radicais livres estáveis (**Figura Q10-2**). Estes lipídeos com marcadores de rotação podem ser detectados por espectroscopia de ressonância rotacional (ESR, *electron spin-resonance*), uma técnica que não danifica as células vivas. Os lipídeos marcados são colocados em pequenas vesículas lipídicas, as quais são então fusionadas com as células, transferindo o lipídeo marcado para a membrana plasmática.

Os dois fosfolipídeos com marcador de rotação mostrados na Figura Q10-2 foram incorporados na membrana de eritrócitos humanos desta forma. Para determinar se eles foram introduzidos igualmente nas duas monocamadas da bicamada, o ácido ascórbico (vitamina C), o qual é um agente redutor solúvel em água que não atravessa a membrana, foi adicionado ao meio para destruir qualquer radical nitróxido exposto no exterior da célula. O sinal da ESR foi acompanhado como uma função do tempo, na presença e na ausência de ácido ascórbico como indicado na **Figura Q10-3**A e B.

A Por enquanto, ignore a diferença na extensão da perda do sinal da ESR e explique por que o fosfolipídeo 1 reage mais rápido com o ascorbato (Figura Q10-3A) do que o fosfolipídeo 2 (Figura Q10-3B). Observe que o fosfolipídeo 1 atinge um platô em cerca de 15 minutos, enquanto que o fosfolipídeo 2 leva quase uma hora.

B Para investigar a diferença na extensão da perda do sinal da ESR com os dois fosfolipídeos, os experimentos foram repetidos usando-se fantasmas de eritrócitos que foram recuperados tornando-os impermeáveis ao ascorbato (Figura Q10-3C e D). Os fantasmas de eritrócitos recuperados não possuem citoplasma, mas possuem a membrana plasmática intacta. Nestes experimentos, a perda do sinal da ESR para os dois fosfolipídeos foi insignificante na ausência de ascorbato e atingiu o platô em 50% na presença de ascorbato. O que você acha que pode ter causado a diferença na extensão da perda do sinal da ESR nos experimentos com eritrócitos fantasmas (Figura Q10-3C e D) em compação com os eritrócitos normais (Figura Q10-3A e B).

C Os fosfolipídeos foram introduzidos igualmente nas duas monocamadas da membrana dos eritrócitos?

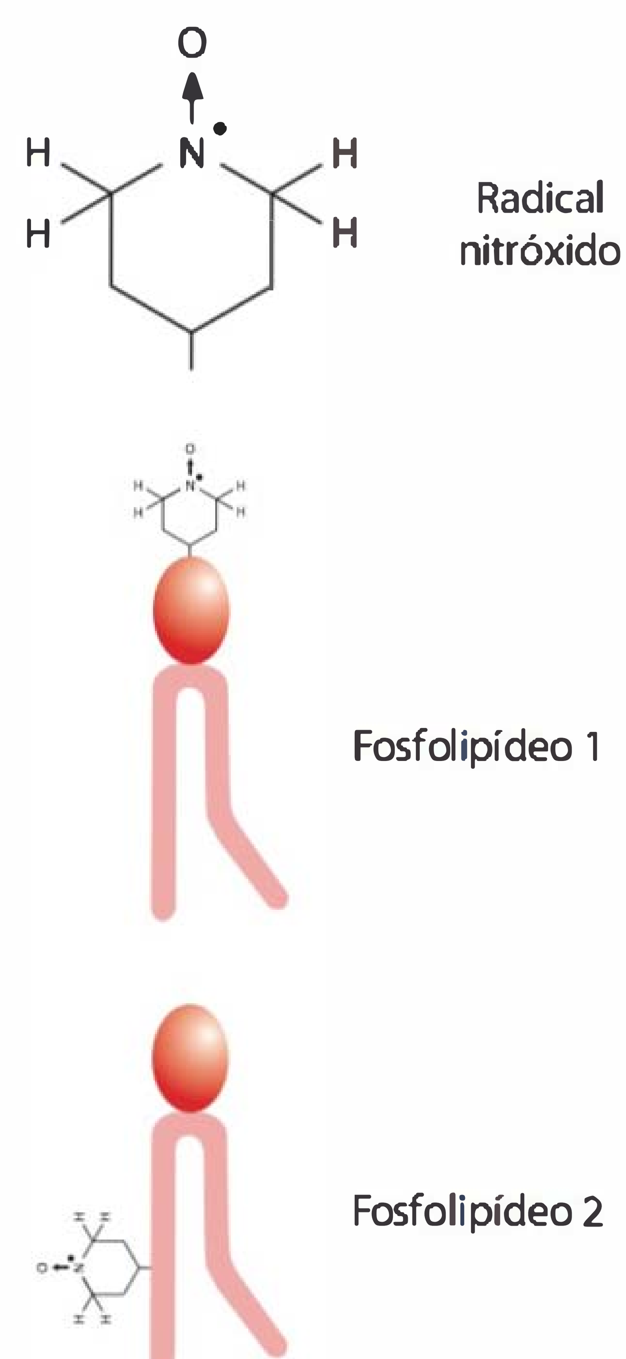


Figura Q10-2 Estruturas de dois lipídeos marcados com nitróxido (Questão 10-7). O radical nitróxido é mostrado no topo e sua posição de ligação aos fosfolipídeos é mostrada na parte inferior.

10-8 Proteínas de membrana monoméricas de passagem única atravessam a membrana como uma única hélice α que possui propriedades químicas características na região da bicamada. Qual das três sequências de 20 aminoácidos descritas abaixo é a candidata mais provável para tal segmento de membrana? Explique a razão da sua escolha. (Veja no final do livro o código de uma letra para os aminoácidos; FAMÍLIA VW é um mnemônico conveniente para os aminoácidos hidrofóbicos.)

A. I T L I Y F G V M A G V I G T I L L I S
B. I T P I Y F G P M A G V I G T P L L I S
C. I T E I Y F G R M A G V I G T D L L I S

10-9 Você está estudando a ligação das proteínas na porção citoplasmática de células cultivadas de neuroblastoma e encontrou um método que fornece uma boa quantidade de vesículas do avesso da membrana plasmática. Infelizmente, sua preparação estava contaminada com quantidades variáveis de vesículas da forma normal. Nada que você tenha tentado evitou este problema. Um amigo sugeriu que você passasse suas vesículas em uma coluna de afinidade constituída por lecitina ligada a contas sólidas. Qual a razão para a sugestão de seu amigo?

10-10 A glicoforina, uma proteína da membrana plasmática dos eritrócitos, existe normalmente como um homodímero unido por interações entre seus domínios transmembrana. Como os domínios transmembrana são hidrofóbicos, como podem se associar entre si tão especificamente?

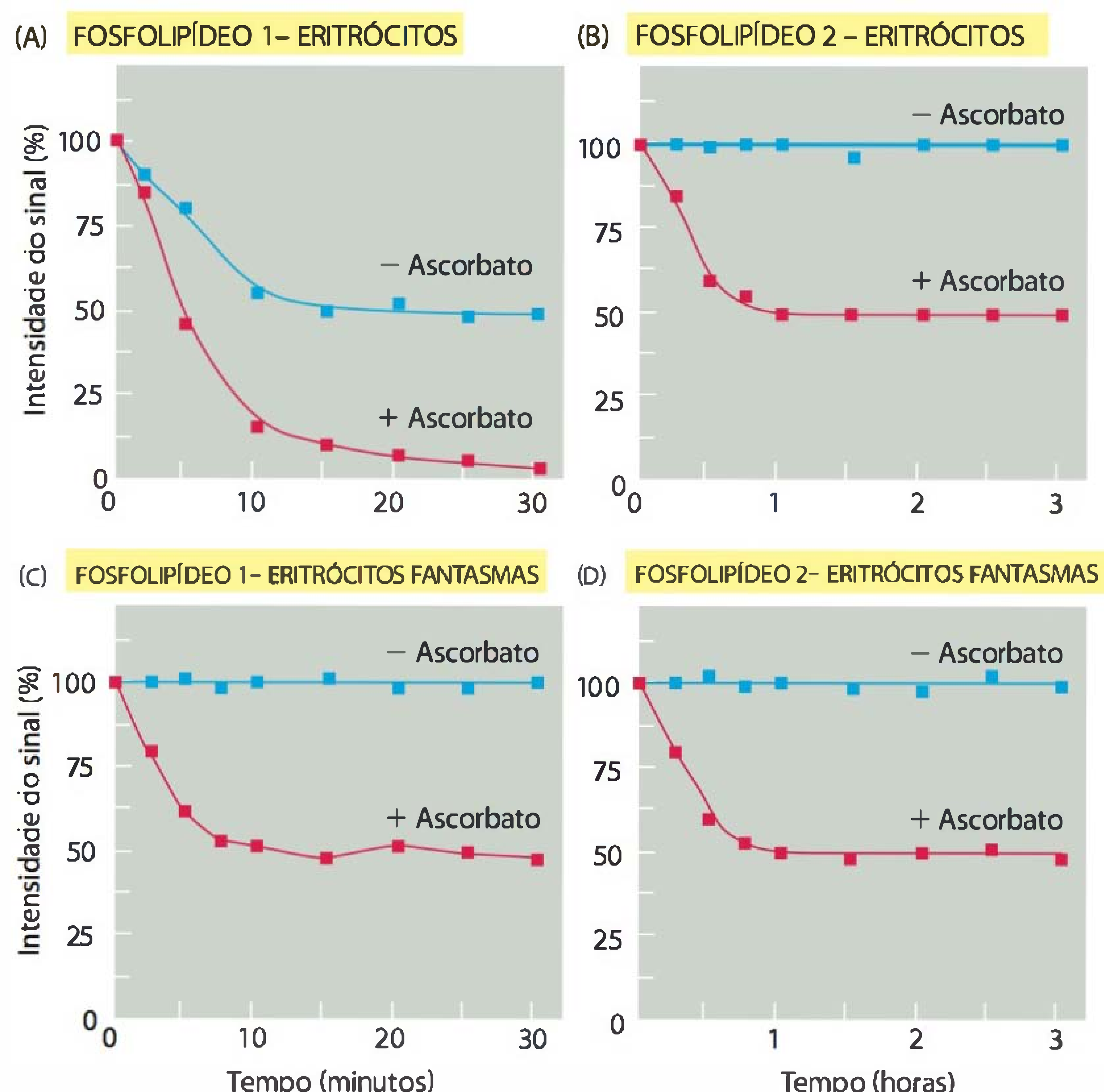


Figura Q10-3 A redução na intensidade do sinal da ESR como uma função do tempo em eritrócitos intactos e eritrócitos fantasmas na presença e na ausência de ascorbato (Questão 10-7). (A e B) Fosfolipídeos 1 e 2 em eritrócitos intactos. (C e D) Fosfolipídeos 1 e 2 em eritrócitos fantasmas.

REFERÊNCIAS

Geral

Bretscher MS (1973) Membrane structure: some general principles. *Science* 181:622–629.

Edidin M (2003) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:414–418.

Jacobson K et al (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441–1442.

Lipowsky R & Sackmann E (eds) (1995) The structure and dynamics of membranes. Amsterdam: Elsevier.

Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.

A bicamada lipídica

Bevers EM, Comfurius P & Zwaal RF (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439:317–330.

Devaux PF (1993) Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr Opin Struct Biol* 3:489–494.

Dowhan W (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu RevBiochem* 66:199–232.

Hakomori Si SI (2002) Inaugural Article: The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:225–232.

Harder T & Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.

Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19–42.

Ichikawa S & Hirabayashi Y (1998) Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8:198–202.

Kornberg RD & McConnell HM (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2564–2568.

Mansilla MC, Cybulski LE & de Mendoza D (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol* 186:6681–6688.

McConnell HM & Radhakrishnan A (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1610:159–73.

Pomorski T & Menon AK (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* 63:2908–2921.

Rothman JE & Lenard J (1977) Membrane asymmetry. *Science* 195:743–53.

Simons K & Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:269–95.

Tanford C (1980) The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley.

van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J* 24:3159–3165.

Proteínas de membrana

Bennett V & Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81:1353–1392.

Bijlmakers MJ & Marsh M (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 13:32–42.

Branden C & Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Bretscher MS & Raff MC (1975) Mammalian plasma membranes. *Nature* 258:43–49.

Buchanan SK (1999) Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 9:455–461.

Chen Y, Lagerholm BC & Jacobson K (2006) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* 39:147–153.

Curranb AR & Engelman DM (2003) Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 13:412

Deisenhofer J & Michel H (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu Rev Cell Biol* 7:1–23.

Drickamer K & Taylor ME (1993) Biology of animal lectins. *Annu RevCell Biol* 9:237–64.

Drickamer K & Taylor ME (1998) Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem Sci* 23:321–324.

Frye LD & Edidin M (1970) The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* 7:319–335.

Helenius A and Simons K (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 415:29–79.

Henderson R & Unwin PN (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257:28–32.

Kyte J & Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105–132.

le Maire M, Champeil P et al (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 1508:86–111.

Lee AG (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1–40.

Marchesi VT, Furthmayr H et al (1976) The red cell membrane. *Annu Rev Biochem* 45:667–698.

Nakada C, Ritchie K & Kusumi A (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5:626–632.

Oesterhelt D (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol* 8:489–500.

Reig N & van der Goot FG (2006) About lipids and toxins. *FEBS Lett* 580:5572–5579.

Reithmeier RAF (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3) *CurrOpin Cell Biol* 7:707–714.

Rodgers W & Glaser M (1993) Distributions of proteins and lipids in the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 32:12591–12598.

Sharon N & Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14:53R–62R.

Sheetz MP (2001) Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:392–396.

Silvius JR (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21:323–348.

Steck TL (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol* 62:1–19.

Subramaniam S (1999) The structure of bacteriorhodopsin: an emerging consensus. *Curr Opin Struct Biol* 9:462–468.

Viel A & Branton D (1996) Spectrin: on the path from structure to function. *CurrOpin Cell Biol* 8:49–55.

Wallin E & von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7:1029–1038.

White SH & Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319–365.

Transporte de Membrana de Pequenas Moléculas e as Propriedades Elétricas das Membranas



Neste capítulo

PRINCÍPIOS DO TRANSPORTE DE MEMBRANA 651

PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS E O TRANSPORTE ATIVO DE MEMBRANA 654

CANAIS IÔNICOS E AS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DAS MEMBRANAS 667

Devido ao seu interior hidrofóbico, a bicamada lipídica das membranas celulares serve como uma barreira à passagem da maioria das moléculas polares. Essa função de barreira permite que a célula mantenha concentrações de solutos no citosol que são diferentes daquelas no fluido extracelular e em cada um dos compartimentos intracelulares envoltos por membranas. No entanto, para fazer uso dessa barreira, as células tiveram que desenvolver meios para transferir moléculas hidrossolúveis específicas e íons através das suas membranas para ingerir nutrientes essenciais, excretar produtos metabólicos e regular concentrações intracelulares de íons. As células utilizam proteínas transmembrana especializadas para transportar íons inorgânicos e pequenas moléculas hidrossolúveis através da bicamada lipídica. As células também podem transferir macromoléculas ou mesmo grandes partículas através de suas membranas, mas os mecanismos envolvidos na maioria desses casos são diferentes daqueles utilizados para transferir pequenas moléculas, sendo discutidos nos Capítulos 12 e 13. A importância do transporte de membrana está indicada pelo grande número de genes, em todos os organismos, que codificam para proteínas de transporte, as quais perfazem entre 15 e 30% das proteínas de membrana em todas as células. Algumas células especializadas de mamíferos dedicam até dois terços do seu consumo total de energia metabólica aos processos de transporte de membrana.

Começamos este capítulo examinando alguns princípios gerais de como pequenas moléculas hidrossolúveis atravessam membranas celulares. Consideramos, então, as duas principais classes de proteínas de membrana que medeiam a transferência: as *proteínas transportadoras*, as quais apresentam partes móveis para carregar moléculas específicas através da membrana, e as *proteínas de canal*, que formam um estreito poro hidrofílico, permitindo principalmente o movimento passivo de pequenos íons inorgânicos. As proteínas transportadoras podem estar acopladas a uma fonte de energia para catalisar o transporte ativo, e uma combinação de permeabilidade passiva seletiva e transporte ativo cria grandes diferenças na composição do citosol se comparada ao fluido extracelular (**Tabela 11-1**) ou ao fluido dentro de organelas envoltas por membranas. Por gerarem diferenças na concentração iônica através da bicamada lipídica, as membranas celulares podem armazenar energia potencial na forma de gradientes eletroquímicos, os quais são utilizados para acionar vários processos de transporte, para enviar sinais elétricos em células eletricamente excitáveis e (nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nas bactérias) para produzir a maior parte do ATP celular. Enfocaremos nossa discussão principalmente no transporte através da membrana plasmática, mas mecanismos similares operam através das outras membranas das células eucarióticas, como discutido em capítulos subsequentes.

Na última parte do capítulo, concentramo-nos principalmente nas funções dos canais iônicos em neurônios (células nervosas). Nessas células, as proteínas de canal atuam em seu maior nível de sofisticação, capacitando as redes de neurônios a realizar todas as admiráveis proezas das quais o cérebro humano é capaz.

PRINCÍPIOS DO TRANSPORTE DE MEMBRANA

Começamos esta seção descrevendo as propriedades de permeabilidade de bicamadas lipídicas sintéticas, livres de proteínas. A seguir, apresentamos alguns dos termos utilizados para descrever as várias formas de transporte de membrana e algumas estratégias para caracterizar as proteínas e os processos envolvidos.

Tabela 11-1 Uma comparação de concentrações de íons no interior e no exterior de uma célula típica de mamífero

Componente	Concentração intracelular (mM)	Concentração extracelular (mM)
Cátions		
Na^+	5–15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0,5	1–2
Ca^{2+}	10^{-4}	1–2
H^+	7×10^{-5} ($10^{-7,2}$ M ou pH 7,2)	4×10^{-5} ($10^{-7,4}$ M ou pH 7,4)
Ânions*		
Cl^-	5–15	110

*A célula deve conter quantidades iguais de cargas positivas e negativas (isto é, ser eletricamente neutra). Assim, além do Cl^-, a célula contém muitos outros ânions não-listados nesta tabela; de fato, a maioria dos constituintes celulares é negativamente carregada (HCO_3^-, PO_4^{3-}, proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos portando fosfatos e grupos carboxila, etc.). As concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} mostradas são para íons livres. Existe um total de cerca de 20 mM de Mg^{2+} e 1 a 2 mM de Ca^{2+} nas células, mas a maior parte está ligada a proteínas e a outras substâncias e, no caso do Ca^{2+}, armazenada no interior de várias organelas.

As bicamadas lipídicas livres de proteínas são fortemente impermeáveis a íons

Se fornecido tempo suficiente, praticamente qualquer molécula difundirá através de uma bicamada lipídica livre de proteínas a favor do seu gradiente de concentração. A taxa em que acontece essa difusão, todavia, varia muito, dependendo em parte do tamanho da molécula, mas, principalmente, da sua solubilidade relativa em lipídeos. Em geral, quanto menores e mais solúveis em lipídeos as moléculas são (ou seja, quanto mais hidrofóbicas ou apolares), mais rapidamente difundirão através da bicamada lipídica. As pequenas moléculas apolares, como O_2 e CO_2, facilmente dissolvem-se em bicamadas lipídicas e, portanto, difundem-se rapidamente através delas. As pequenas moléculas polares sem carga, como água ou ureia, também se difundem através da bicamada, embora muito mais lentamente (**Figura 11-1**). Em contraste, as bicamadas lipídicas são fortemente impermeáveis a moléculas carregadas (íons), não importando o tamanho: a carga e o alto grau de hidratação de tais moléculas as impedem de penetrar a fase hidrocarbônica da bicamada. Assim, as bicamadas sintéticas são 10^9 vezes mais permeáveis à água que a pequenos íons como Na^+ ou K^+ (**Figura 11-2**).

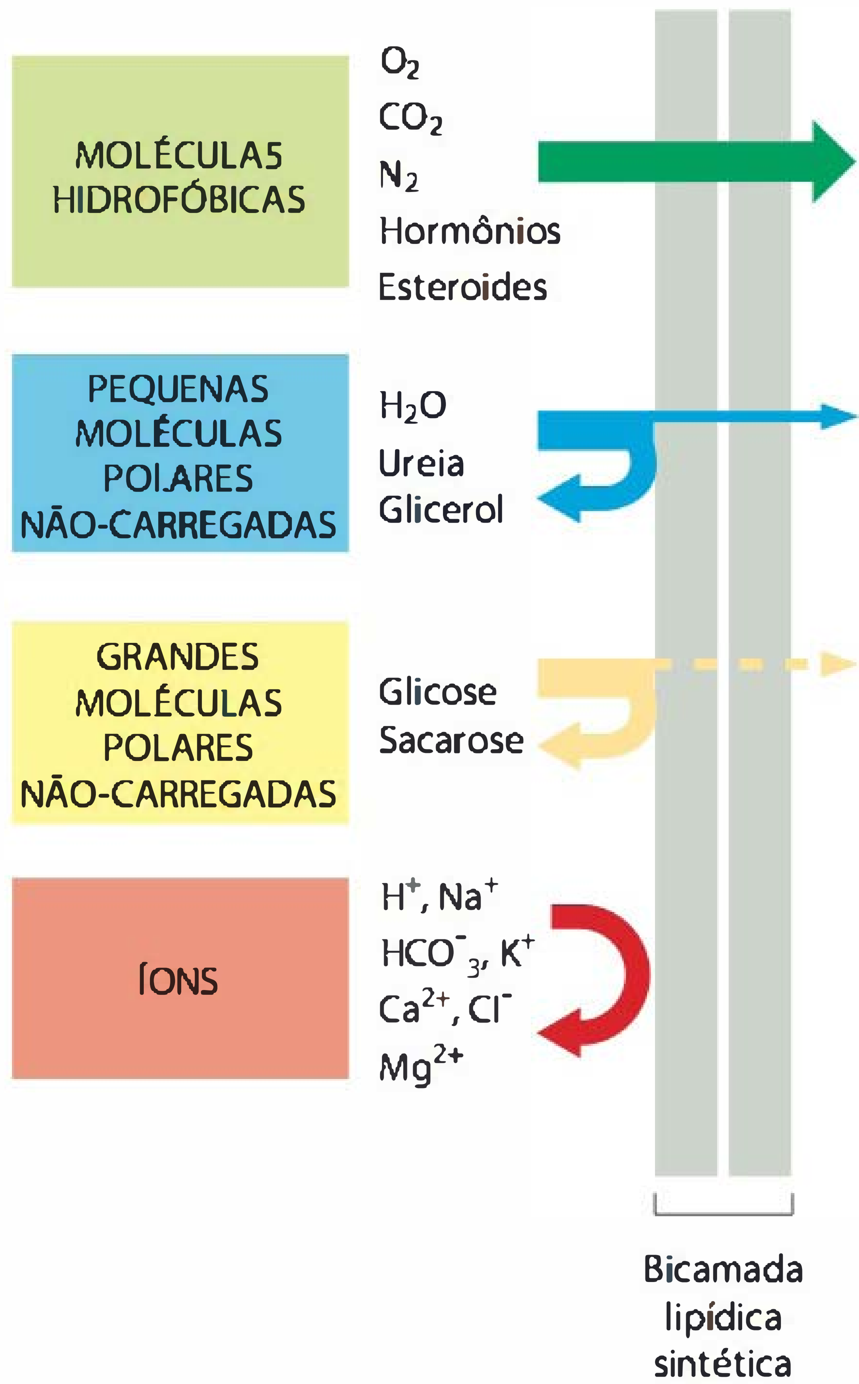


Figura 11-1 Permeabilidade relativa de uma bicamada lipídica sintética a diferentes classes de moléculas. Quanto menor a molécula e, mais importante, quanto menos fortemente ela se associa à água, com mais rapidez a molécula difunde-se através da bicamada.

Existem duas principais classes de proteínas de transporte de membrana: transportadoras e de canal

Como as bicamadas lipídicas sintéticas, as membranas celulares permitem a passagem de água e de moléculas apolares por difusão simples. As membranas celulares, todavia, também devem permitir a passagem de várias moléculas polares, como íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e muitos metabólitos celulares que atravessam bicamadas lipídicas sintéticas, embora muito vagarosamente. **Proteínas de transporte de membrana** especiais são responsáveis pela transferência de tais solutos através das membranas celulares. Essas proteínas ocorrem em muitas formas e em todos os tipos de membranas biológicas. Cada proteína transporta uma classe determinada de moléculas (como íons, açúcares ou aminoácidos) e, muitas vezes, somente certas espécies moleculares de uma classe. A especificidade das proteínas de transporte de membrana foi demonstrada na década de 1950 por estudos que indicaram que bactérias com uma mutação em um único gene eram incapazes de transportar açúcares através da sua membrana plasmática. Hoje sabemos que seres humanos com mutações semelhantes sofrem de vários tipos de doenças hereditárias que afetam o transporte de solutos específicos no rim, no intestino, ou em muitos outros tipos celulares. Os indivíduos com a doença herdada *cistinúria*, por exemplo, são incapazes de transportar certos aminoácidos (incluindo a cistina, o dímero de cisteína ligado por dissulfeto) da urina ou do intestino para o sangue; o acúmulo de cistina resultante na urina leva à formação de cálculos renais de cistina.

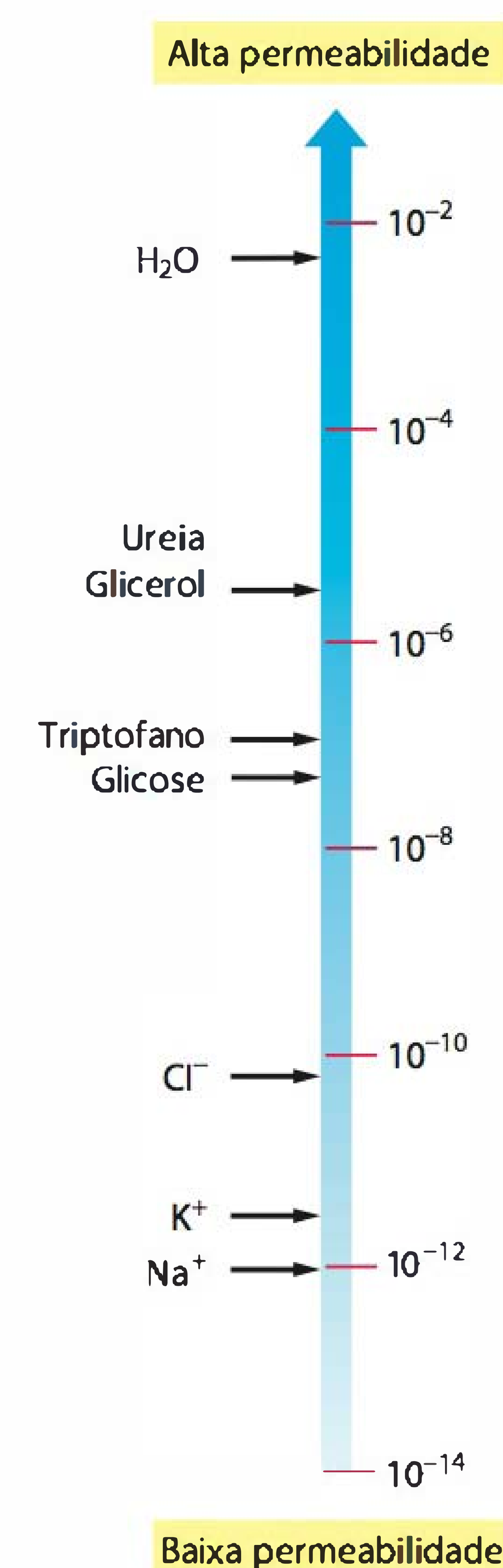


Figura 11-2 Coeficientes de permeabilidade para a passagem de diferentes moléculas através de bicamadas lipídicas sintéticas. A taxa de fluxo de um soluto através da bicamada é diretamente proporcional à diferença na sua concentração em ambos os lados da membrana. A multiplicação desta diferença de concentração (em mol/cm^3) pelo coeficiente de permeabilidade (em cm/seg) dá o fluxo de um soluto em moles por segundo por centímetro quadrado de membrana. Uma diferença de concentração de triptofano de 10^{-4} mol/cm^3 ($10^{-4}/10^{-3}$ L = 0,1 M), por exemplo, pode acarretar um fluxo de 10^{-4} mol/$cm^3 \times 10^{-7}$ cm/seg = 10^{-11} mol/seg por 1 cm^2 de membrana, ou 6 $\times 10^4$ moléculas/seg por 1 μm^2 de membrana.

Todas as proteínas de transporte de membrana que foram estudadas em detalhe são proteínas de membrana de múltiplas passagens – isto é, sua cadeia polipeptídica atravessa múltiplas vezes a bicamada lipídica. Por formarem um caminho proteico contínuo através da membrana, essas proteínas permitem que solutos hidrofílicos específicos atravessem a membrana sem entrar em contato direto com o interior hidrofóbico da bicamada lipídica.

As proteínas transportadoras e as proteínas de canal são as duas principais classes de proteínas de transporte de membrana (**Figura 11-3**). As **proteínas transportadoras** (também chamadas de *permeases*, ou *carreadoras*) ligam o soluto específico a ser transportado e sofrem uma série de mudanças conformacionais para transferir o soluto ligado através da membrana. As **proteínas de canal**, em contraste, interagem muito mais fracamente com o soluto a ser transportado. Elas formam poros aquosos que se estendem através da bicamada lipídica; quando esses poros são abertos, eles permitem que solutos específicos (geralmente íons inorgânicos de tamanho e de carga apropriados) passem através deles e, portanto, cruzem a membrana. Não é surpreendente que o transporte por meio de proteínas de canal ocorra a uma velocidade muito mais rápida do que o transporte mediado por proteínas transportadoras. Apesar de a água poder se difundir através de bicamadas lipídicas sintéticas, todas as células contêm proteínas de canal específicas (denominadas *canais de água* ou *aquaporinas*) que aumentam muito a permeabilidade dessas membranas à água, como discutiremos mais tarde.

O transporte ativo é mediado por proteínas transportadoras acopladas a uma fonte de energia

Todas as proteínas de canal e muitas proteínas transportadoras somente permitem a passagem passiva dos solutos pela membrana ("morro abaixo"), um processo denominado **transporte passivo**, ou **difusão facilitada**. No caso de transporte de uma única molécula sem carga, é simplesmente a diferença na sua concentração nos dois lados da membrana – seu *gradiente de concentração* – que conduz o transporte passivo e determina sua direção (**Figura 11-4**A).

Se o soluto porta uma carga líquida, todavia, tanto seu gradiente de concentração como a diferença de potencial elétrico através da membrana, o *potencial de membrana*, influenciam seu transporte. O gradiente de concentração e o gradiente elétrico podem ser combinados para calcular uma força motriz líquida, o **gradiente eletroquímico**, para cada soluto carregado (Figura 11-4B). Discutiremos gradientes eletroquímicos com mais detalhes no Capítulo 14. De fato, quase todas as membranas plasmáticas apresentam uma diferença de potencial elétrico (gradiente de voltagem) através delas, com o interior geralmente negativo em relação ao exterior. Essa diferença de potencial favorece a entrada de íons carregados positivamente na célula, mas se contrapõe à entrada de íons carregados negativamente.

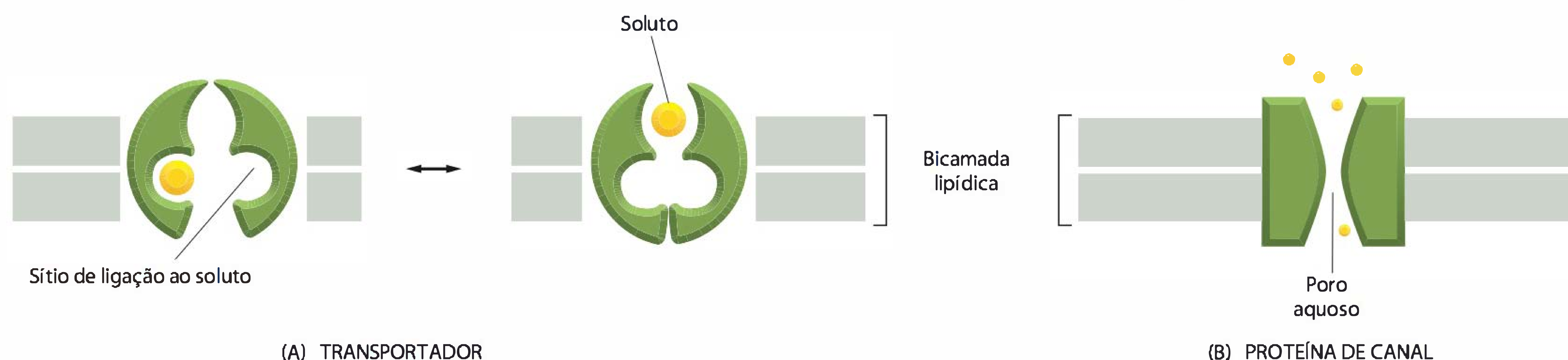


Figura 11-3 Proteínas transportadoras e proteínas de canal. (A) Uma proteína transportadora alterna entre duas conformações, de tal forma que o sítio de ligação ao soluto sequencialmente é acessível em um lado da bicamada e então no outro. (B) Em contraste, uma proteína de canal forma um poro preenchido por água através da bicamada para poder difundir os solutos específicos.

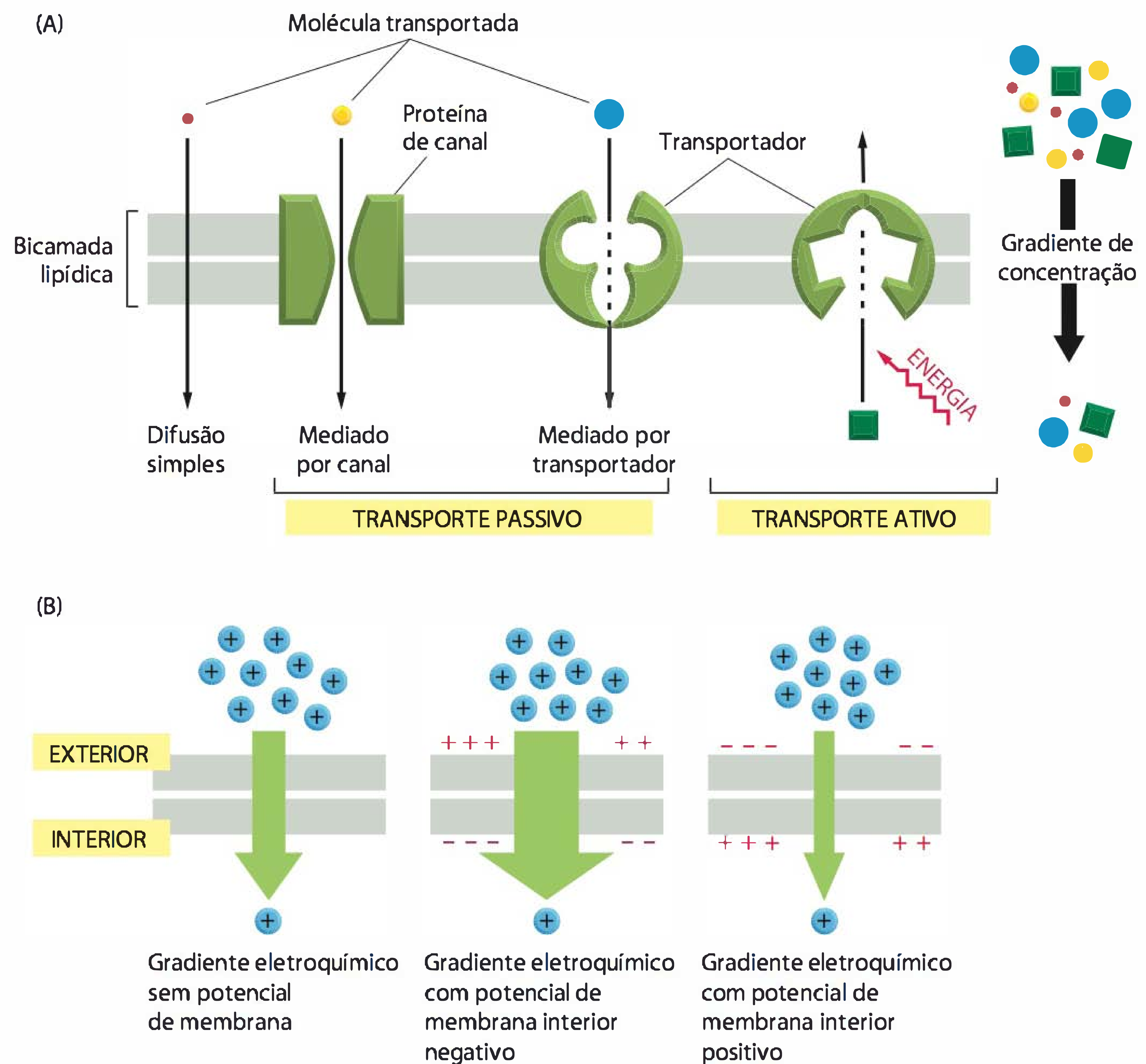


Figura 11-4 Transportes passivo e ativo comparados. (A) O transporte passivo a favor de um gradiente eletroquímico ocorre espontaneamente, por difusão simples através da bicamada lipídica ou por difusão facilitada através de canais e transportadores passivos. Em contraste, o transporte ativo requer um aporte de energia metabólica e é sempre mediado por transportadores que captam energia metabólica para bombear o soluto contra seu gradiente eletroquímico. (B) Um gradiente eletroquímico combina o potencial de membrana e o gradiente de concentração, os quais podem atuar aditivamente para aumentar a força motriz sobre um íon através da membrana (*meio*) ou podem atuar um contra o outro (*direita*).

As células também necessitam de proteínas de transporte que irão bombear ativamente certos solutos através da membrana contra seus gradientes eletroquímicos ("morro acima"); esse processo, conhecido como **transporte ativo**, é mediado por transportadores, os quais também são chamados de *bombas*. No transporte ativo, a atividade bombeadora da proteína transportadora é direcional, porque ela é fortemente acoplada a uma fonte de energia metabólica, como a hidrólise de ATP ou um gradiente de íons, como discutido mais adiante. Assim, o movimento transmembrana de pequenas moléculas mediado por transportadores pode ser ativo ou passivo, enquanto o transporte por proteínas de canal é sempre passivo.

Resumo

As bicamadas lipídicas são altamente impermeáveis à maioria das moléculas polares. Para transportar pequenas moléculas hidrossolúveis para o interior ou para o exterior das células, ou para os compartimentos intracelulares envoltos por membrana, as membranas celulares contêm várias proteínas de transporte, cada qual responsável pela transferência de um soluto ou de uma classe de solutos em particular através da membrana. Existem duas classes de proteínas de transporte de membrana – transportadoras e de canal. Ambas formam caminhos proteicos contínuos através da bicamada lipídica. Enquanto o transporte por transportadores pode ser ativo ou passivo, o fluxo de soluto pelas proteínas de canal é sempre passivo.

PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS E O TRANSPORTE ATIVO DE MEMBRANA

O processo pelo qual uma proteína transportadora transfere uma molécula de soluto através da bicamada lipídica assemelha-se a uma reação enzima-substrato, e, em muitos aspectos, os transportadores comportam-se como enzimas. Em contraste à simples reação enzima-substrato, no entanto, o soluto transportado não é covalentemente modificado pela proteína transportadora, mas é liberado inalterado no outro lado da membrana.

Cada tipo de proteína transportadora tem um ou mais sítios de ligação específicos para seu soluto (substrato). Ela transfere o soluto através da bicamada lipídica por alterações conformacionais reversíveis que expõem alternadamente o sítio de ligação ao soluto, primeiro

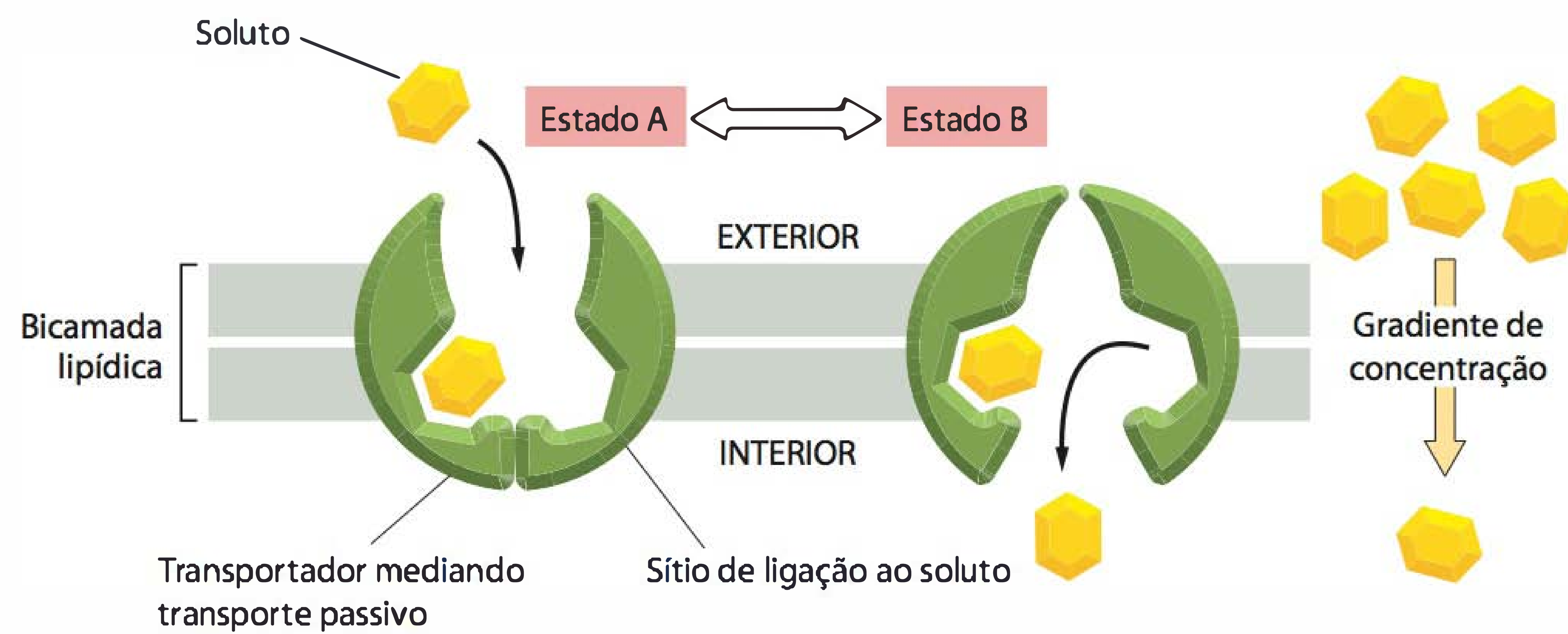


Figura 11-5 Modelo de como uma mudança conformacional na proteína transportadora pode mediar o transporte passivo de um soluto. A proteína transportadora ilustrada pode existir em dois estados conformacionais: no estado A, os sítios de ligação para o soluto estão expostos no exterior da bicamada lipídica; no estado B, os mesmos sítios estão expostos no outro lado da bicamada. A transição entre os dois estados pode ocorrer aleatoriamente. Ela é completamente reversível e não depende do fato de o sítio de ligação ao soluto estar ocupado. Portanto, se a concentração do soluto é maior no exterior da bicamada, mais soluto liga-se à proteína transportadora na conformação A do que na conformação B, e existe um transporte de soluto a favor do seu gradiente de concentração (ou, se o soluto é um íon, a favor do seu gradiente eletroquímico).

em um lado da membrana e, então, no outro. Um modelo esquemático de como uma proteína transportadora parece operar é mostrado na **Figura 11-5**.

Quando o transportador está saturado (ou seja, quando todos os sítios de ligação ao soluto estão ocupados), a velocidade (ou taxa) de transporte é máxima. Essa taxa, referida como $V_{máx}$, é característica do carreador específico e reflete a taxa na qual o carreador pode alternar entre seus dois estados conformacionais. Além disso, cada proteína transportadora tem uma afinidade característica por seu soluto, refletida no K_m da reação, o qual é igual à concentração do soluto quando a taxa de transporte é metade do seu valor máximo (**Figura 11-6**). Como ocorre com as enzimas, a ligação do soluto pode ser bloqueada especificamente por inibidores competitivos (os quais competem pelo mesmo sítio de ligação, podendo ou não ser transportados) ou por inibidores não-competitivos (os quais se ligam em qualquer outra parte e alteram especificamente a estrutura do transportador).

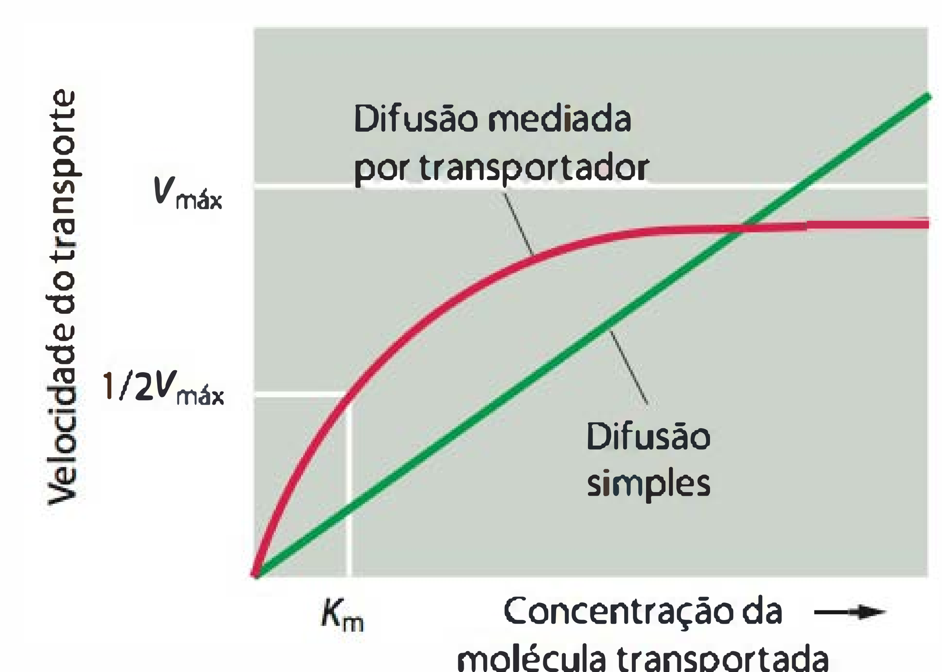
Como discutido a seguir, é necessária somente uma modificação relativamente pequena do modelo mostrado na Figura 11-5 para ligar uma proteína transportadora a uma fonte de energia para bombear um soluto "morro acima" contra seu gradiente eletroquímico. As células realizam tal transporte ativo de três maneiras principais (**Figura 11-7**):

1. Os *transportadores acoplados* acoplam o transporte de um soluto contra o gradiente, através da membrana, ao transporte a favor do gradiente de outro soluto.
2. As *bombas acionadas por ATP* acoplam o transporte contra o gradiente à hidrólise de ATP.
3. As *bombas acionadas por luz*, as quais são encontradas principalmente em bactérias e arquebactérias, acoplam o transporte contra o gradiente a um aporte de energia da luz, como o mediado por bacteriorrodopsina (discutido no Capítulo 10).

Comparações entre sequências de aminoácidos sugerem que, em muitos casos, existem fortes semelhanças na arquitetura molecular entre proteínas transportadoras que medeiam transporte ativo e aquelas que medeiam transporte passivo. Alguns transportadores bacterianos, por exemplo, que utilizam energia armazenada no gradiente de H^+ através da membrana plasmática para sustentar a captação ativa de diversos açúcares, são estruturalmente semelhantes aos transportadores que medeiam o transporte passivo de glicose na maioria das células animais. Isso sugere uma relação evolutiva entre diferentes proteínas transportadoras. Dada a importância de pequenos metabólitos e açúcares como fonte de energia, não é surpreendente que a superfamília de transportadores seja antiga.

Começamos nossa discussão sobre transporte ativo considerando as proteínas transportadoras que são movidas por gradientes de íons. Essas proteínas desempenham um papel essencial no transporte de pequenos metabólitos através de membranas em todas as células. Discutiremos, então, bombas acionadas por ATP, incluindo a bomba de Na^+, encontrada na membrana plasmática de quase todas as células.

Figura 11-6 A cinética da difusão simples e da difusão mediada por transportador. Enquanto a velocidade da difusão simples é sempre proporcional à concentração do soluto, a velocidade da difusão mediada por transportador atinge um valor máximo ($V_{máx}$) quando a proteína transportadora está saturada. A concentração do soluto, quando o transporte está na metade do seu valor máximo, aproxima-se da constante de ligação (K_m) do transportador para o soluto e é análoga ao K_m de uma enzima para o seu substrato. O gráfico aplica-se a um transportador transportando um único soluto; a cinética do transporte acoplado de dois ou mais solutos é mais complexa.



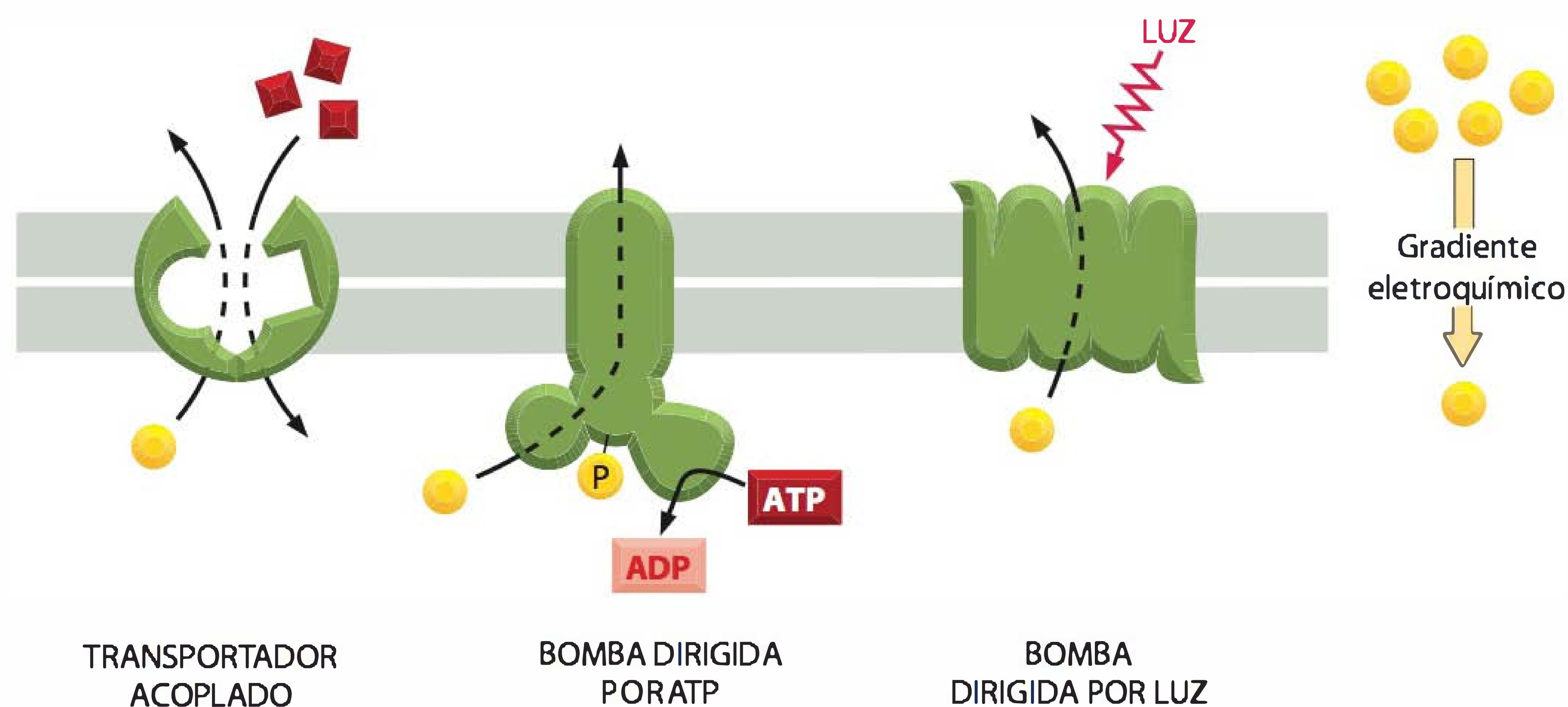


Figura 11-7 Três maneiras de dirigir o transporte ativo. A molécula ativamente transportada é ilustrada em *amarelo*, e a fonte de energia é mostrada em *vermelho*.

O transporte ativo pode ser dirigido por gradientes de íons

Algumas proteínas transportadoras simplesmente transportam um único soluto de um lado ao outro da membrana sob uma taxa determinada por seus $V_{máx}$ e K_m; elas são denominadas **uniportes**. Outras atuam como *transportadores acoplados,* nos quais a transferência de um soluto é estritamente dependente do transporte de um segundo. O transporte acoplado envolve a transferência simultânea de um segundo soluto na mesma direção, realizado pelos **simportes** (também chamados de *cotransportadores*), ou a transferência de um segundo soluto na direção oposta, realizado por **antiportes** (também chamados de *permutadores*) (**Figura 11-8**).

A forte associação entre o transporte de dois solutos permite a esses transportadores acoplados captar a energia armazenada no gradiente eletroquímico de um soluto, tipicamente um íon, para transportar o outro. Dessa forma, a energia livre liberada durante o movimento de um íon inorgânico a favor de um gradiente eletroquímico é utilizada como a força motriz para bombear outros solutos "morro acima", contra seus gradientes eletroquímicos. Esse princípio pode atuar em duas direções: alguns transportadores acoplados atuam como simportes, outros, como antiportes. Na membrana plasmática de células animais, o Na^+ é o íon habitualmente cotransportado cujo gradiente eletroquímico fornece uma grande força motriz para o transporte ativo de uma segunda molécula. O Na^+ que entra na célula durante o transporte é subsequentemente bombeado para fora por uma bomba de Na^+ dirigida por ATP na membrana plasmática (como discutiremos adiante), a qual, por manter o gradiente de Na^+, indiretamente controla o transporte. (Por essa razão, os carreadores dirigidos por íons são considerados mediadores de *transporte ativo secundário*, enquanto os carreadores dirigidos por ATP são ditos mediadores de *transporte ativo primário*.)

As células epiteliais intestinais e renais, por exemplo, contêm uma ampla variedade de sistemas simporte dirigidos pelo gradiente de Na^+ através da membrana plasmática. Cada simporte dirigido por Na^+ atua especificamente na importação de um pequeno grupo de açúcares relacionados ou aminoácidos para dentro da célula. Nesses sistemas, o soluto e o Na^+ ligam-se em diferentes sítios sobre a proteína transportadora. Devido ao fato de que o Na^+ tende a mover-se para o interior da célula a favor do seu gradiente eletroquímico, o açúcar ou o aminoácido é, de certa forma, "arrastado" para dentro da célula com ele. Quanto maior o gradiente eletroquímico para o Na^+, maior a taxa de entrada do soluto; contraria-

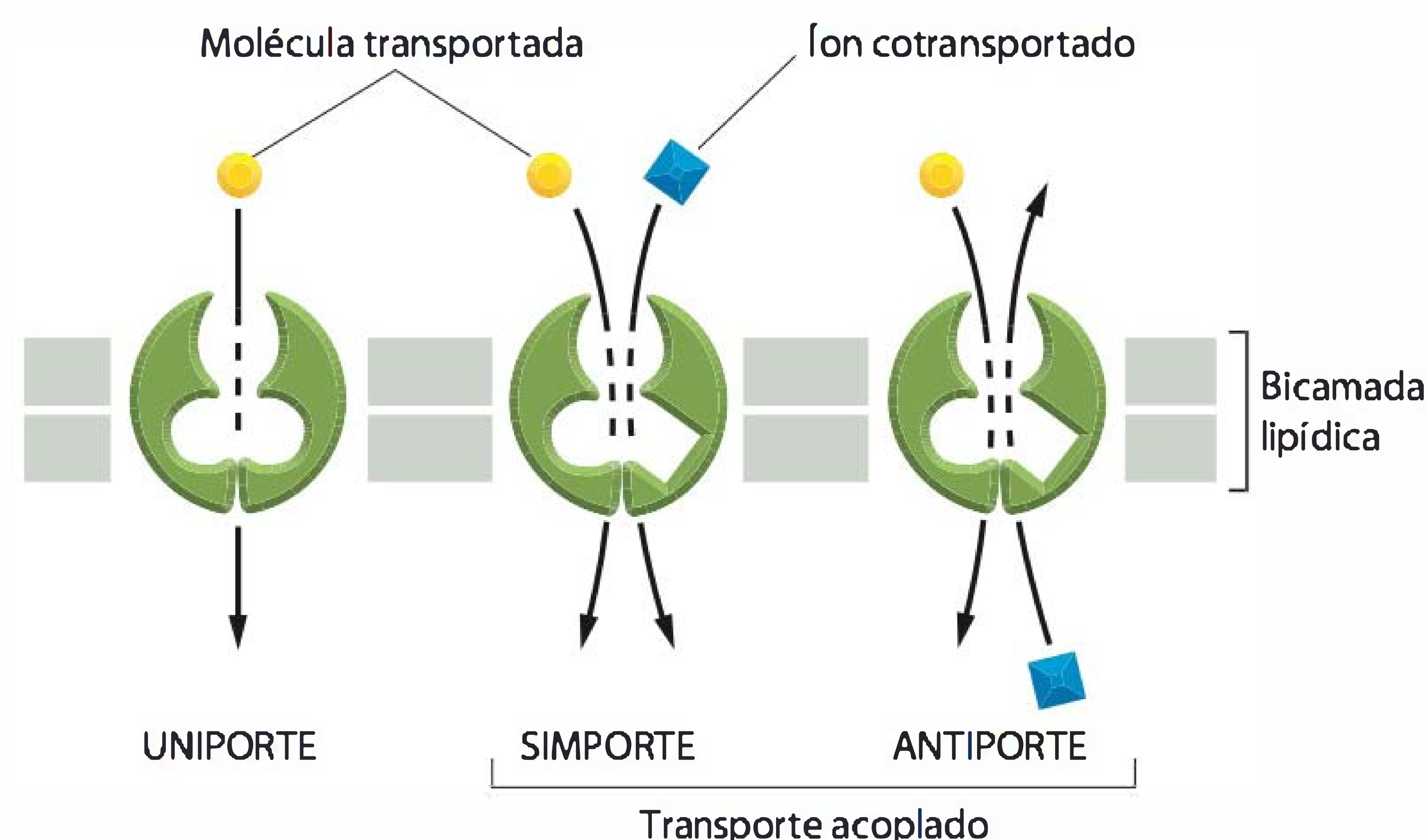


Figura 11-8 Três tipos de movimento mediado por transportador. Este diagrama esquemático mostra proteínas transportadoras atuando como uniportes, simportes e antiportes.

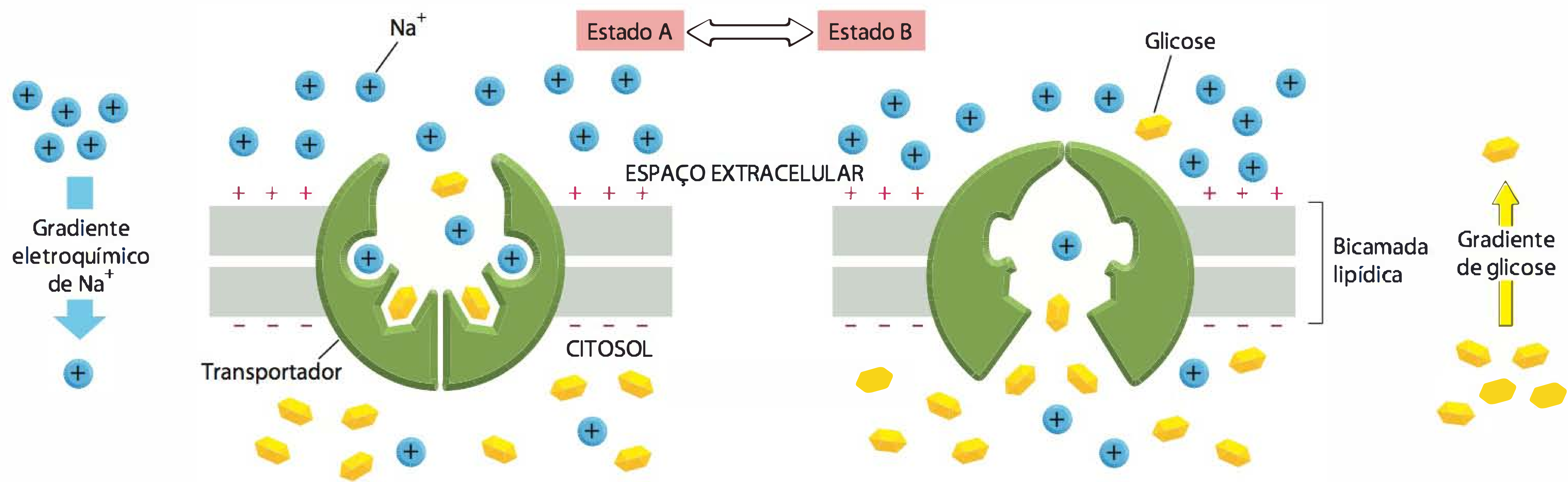


Figura 11-9 **Uma maneira pela qual o transportador de glicose pode ser dirigido por um gradiente de Na^+.** Como no modelo mostrado na Figura 11-5, o transportador oscila entre dois estados alternados, A e B. No estado A, a proteína está aberta para o espaço extracelular; no estado B, ela está aberta para o citosol. A ligação de Na^+ e de glicose é cooperativa – isto é, a ligação de qualquer um dos ligantes induz uma mudança conformacional que aumenta bastante a afinidade da proteína pelo outro ligante. Uma vez que a concentração de Na^+ é muito maior no espaço extracelular do que no citosol, é mais provável que a glicose se ligue ao transportador no estado A. Portanto, é mais frequente o Na^+ e a glicose penetrarem a célula (via uma transição A → B) do que serem retirados (via uma transição B → A). O resultado geral é o transporte líquido de Na^+ e de glicose para dentro da célula. Note que, uma vez que a ligação é cooperativa, se um dos dois solutos não está presente, o outro é incapaz de ligação com o transportador. Assim, o transportador sofre uma mudança conformacional alternando entre os dois estados somente se ambos os solutos, ou nenhum, estão ligados.

mente, se a concentração de Na^+ no fluido extracelular é reduzida, o transporte de soluto diminui (**Figura 11-9**).

Em bactérias e em leveduras, bem como na maioria das organelas envoltas por membranas de células animais, a maioria dos sistemas de transporte ativo dirigidos por gradiente de íons depende dos gradientes de H^+, mais do que dos gradientes de Na^+, refletindo a predominância de bombas de H^+ e a quase ausência de bombas de Na^+ nessas membranas. O gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana plasmática dirige o transporte ativo de diversos açúcares e aminoácidos através da membrana rumo ao interior de células bacterianas. Um simporte dirigido por H^+ bem-estudado é o da **lactose permease**, a qual transporta lactose através da membrana plasmática de *E. coli*. Estudos estruturais e biofísicos da permease e extensas análises de formas mutantes dessa proteína permitiram o desenvolvimento de um modelo detalhado da atuação do simporte. A permease consiste de 12 hélices α transmembrana frouxamente empacotadas. Durante o ciclo de transporte, algumas das hélices sofrem movimentos de deslizamento que causam inclinação. Esses movimentos alternadamente abrem e fecham uma fenda entre as hélices, expondo os sítios de ligação para a lactose e para o H^+ inicialmente em um lado da membrana e então no outro (**Figura 11-10**).

As proteínas transportadoras na membrana plasmática regulam o pH citosólico

A maioria das proteínas opera otimamente em um pH específico. As enzimas lisossomais, por exemplo, funcionam melhor no pH baixo (~5) encontrado nos lisossomos, enquanto as enzimas citosólicas atuam melhor no pH próximo ao neutro (~7,2) encontrado no citosol. É, portanto, fundamental que as células sejam capazes de controlar o pH de seus compartimentos intracelulares.

A maioria das células possui um ou mais tipos de antiportes Na^+-dirigidos na sua membrana plasmática que auxiliam na manutenção do pH citosólico em torno de 7,2. Essas proteínas transportadoras utilizam a energia armazenada no gradiente de Na^+ para bombear para fora o excesso de H^+ que tenha penetrado a célula ou que tenha sido produzido através de reações formadoras de ácido. Dois mecanismos são utilizados: ou o H^+ é transportado diretamente para o exterior celular, ou o HCO_3^- é captado para a célula para neutralizar o H^+ no citosol (de acordo com a reação $HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$). Um dos antiportes que utiliza o primeiro mecanismo é o *permutador Na^+-H^+*, que acopla um influxo de Na^+ a um efluxo de H^+. Outro que utiliza uma combinação dos dois mecanismos é um *permutador Cl^-–HCO_3^- Na^+-dirigido* que acopla um influxo de Na^+ e HCO_3^- a um efluxo de Cl^- e H^+ (de

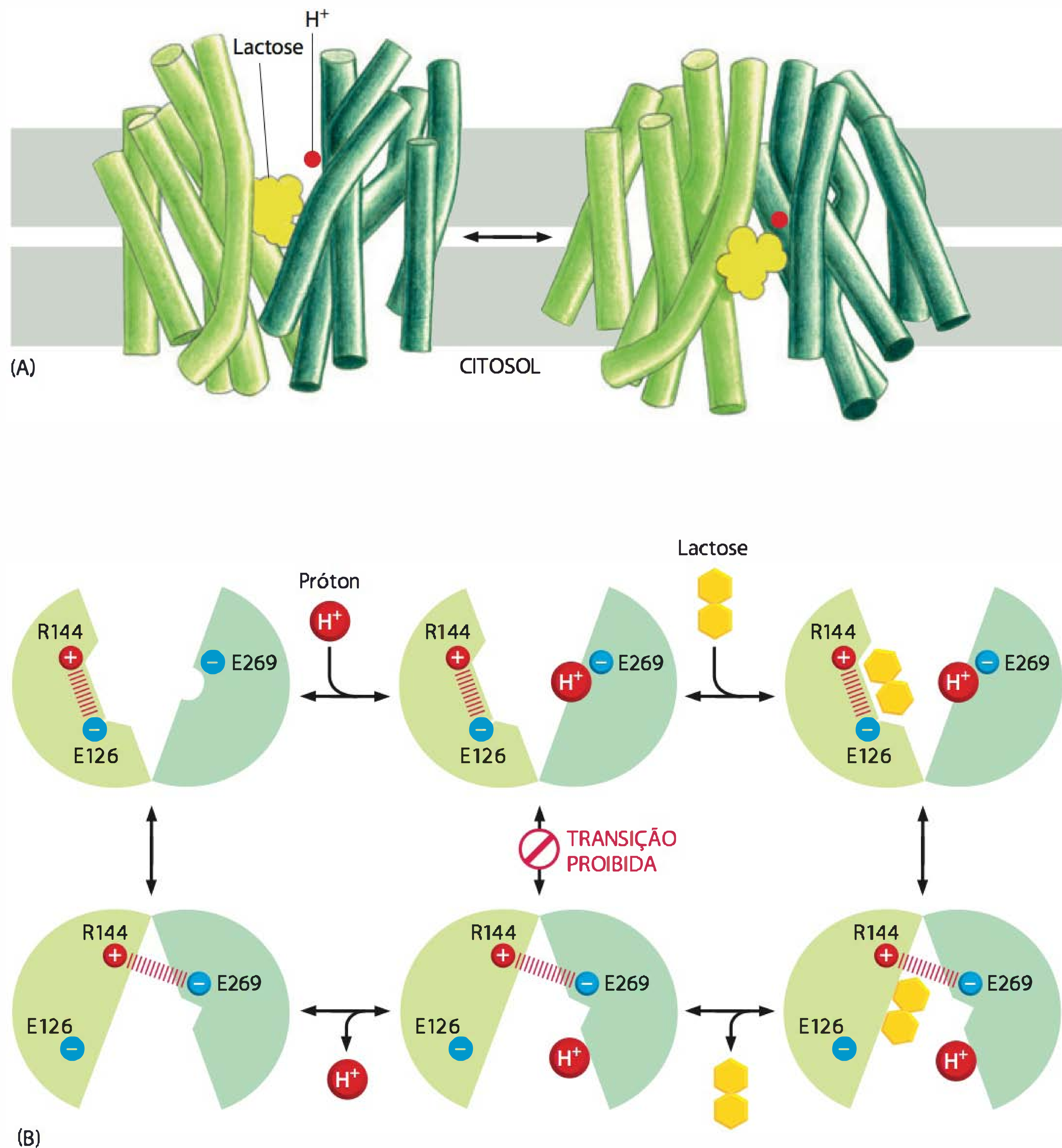


Figura 11-10 Mecanismo molecular de ação da permease lactose bacteriana a partir de sua cristalografia. (A) As 12 hélices transmembrana da permease estão agrupadas em dois lobos, ilustrados em dois tons de *verde*. As alças que conectam as hélices nos lados da membrana são omitidas para maior clareza. Durante o transporte, as hélices deslizam e deitam-se sobre a membrana, expondo sítios de ligação para o dissacarídeo lactose (em *amarelo*) e H^+ para um dos lados da membrana. (B) Em um estado conformacional, os sítios de ligação ao H^+ e à lactose estão acessíveis ao espaço extracelular (*linha superior*); no outro, eles estão expostos ao citosol (*linha inferior*). O carregamento de solutos na região extracelular é favorecido, pois a arginina (R) 144 forma uma ponte com o ácido glutâmico (E) 126, deixando E269 livre para aceitar o H^+. A descarga de solutos na face citosólica é favorecida, porque o R144 forma uma ponte com E269, que desestabiliza a ligação de H^+. Além disso, o sítio de ligação à lactose está parcialmente rompido devido ao rearranjo das hélices. Devido à transição entre os dois estados protonados (centrais) não ocorrer, o H^+ pode apenas ser transportado quando uma lactose também está sendo transportada. Desta forma, o gradiente eletroquímico de H^+ dirige a importação de lactose. (Adaptada de J. Abramson et al., *Science* 301:610-615, 2003. Com permissão de AAAS.)

tal forma que $NaHCO_3$ entra e HCl sai). O permutador Cl^-–HCO_3^- Na^+-dirigido é duas vezes mais eficiente que o permutador Na^+–H^+, pois ele bombeia para fora um H^+ e neutraliza outro, para cada Na^+ que entra na célula. Se o HCO_3^- está disponível, como geralmente é o caso, este antiporte é a proteína transportadora mais importante na regulação do pH citosólico. O pH do interior da célula regula ambos os permutadores; quando o pH citosólico diminui, ambos os permutadores aumentam suas atividades.

Um *permutador Cl^-–HCO_3^- Na^+-independente* ajusta o pH citosólico na direção reversa. Assim como os transportadores Na^+-dependentes, o permutador Cl^-–HCO_3 Na^+- independente é regulado pelo pH, mas a atividade permutadora aumenta com o aumento da alcalinidade citosólica. O movimento de HCO_3^-, nesse caso, normalmente é para fora da célula, a favor do seu gradiente eletroquímico, o que diminui o pH do citosol. Um permutador Cl^-–HCO_3^- Na^+ independente presente na membrana de células sanguíneas vermelhas (denominado proteína banda 3; ver Figura 10-41) facilita a descarga rápida de CO_2 (e de HCO_3^-) assim que as células passam pelos capilares no pulmão.

O pH intracelular não é totalmente regulado por estes transportadores acoplados: bombas de H^+ATP-dirigidas também são usadas para controlar o pH de muitos compartimentos intracelulares. Como discutido no Capítulo 13, bombas de H^+ mantêm o pH baixo nos lisossomos, bem como nos endossomos e nas vesículas secretoras. Essas bombas de H^+ utilizam a energia de hidrólise de ATP para bombear H^+ do citosol para o interior dessas organelas.

Uma distribuição assimétrica de proteínas transportadoras nas células epiteliais está por trás do transporte transcelular de solutos

Em células epiteliais, como aquelas envolvidas na absorção de nutrientes no intestino, as proteínas transportadoras estão distribuídas de maneira não-uniforme na membrana plasmática e, portanto, contribuem para o **transporte transcelular** dos solutos absorvidos. Por meio da

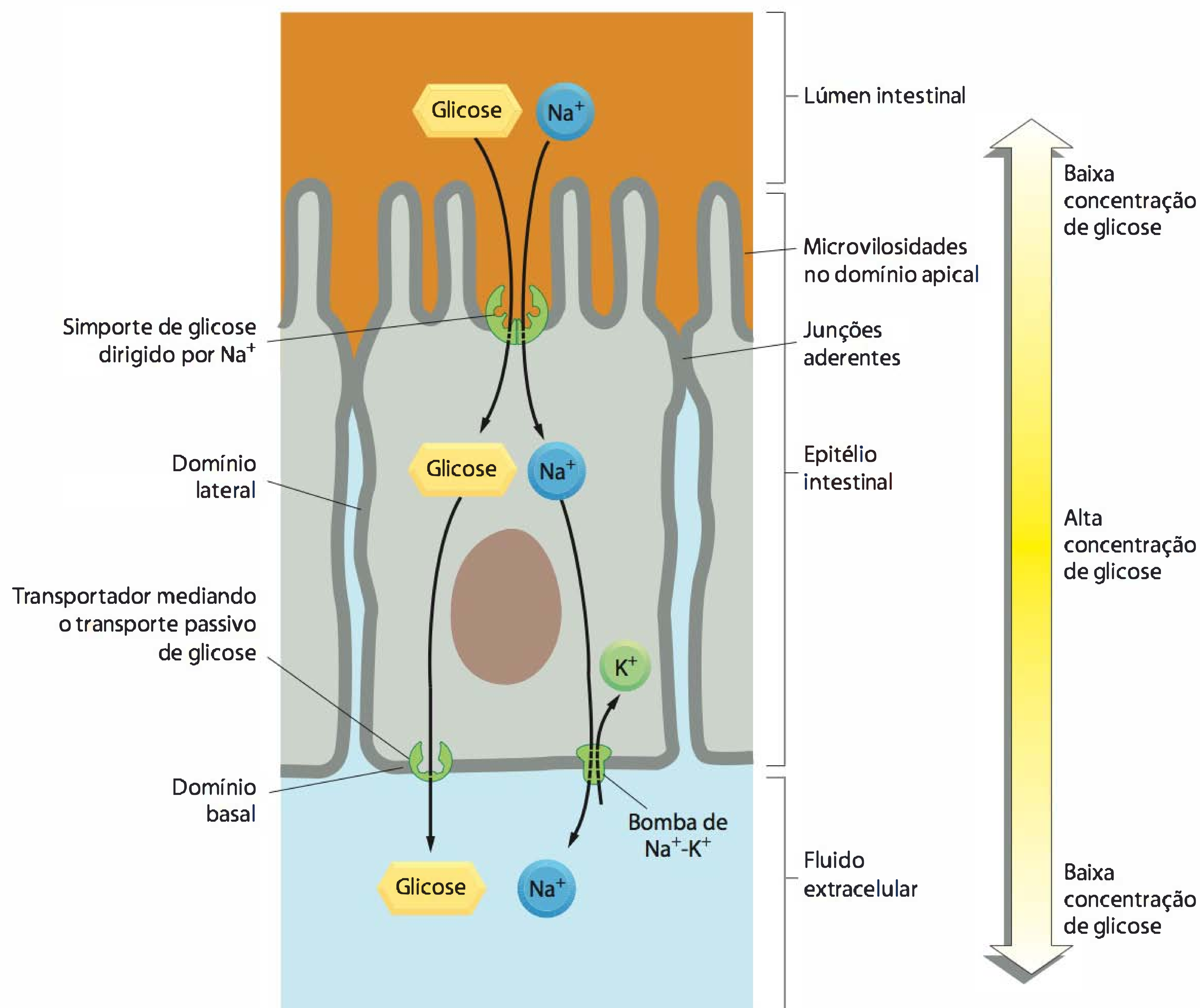


Figura 11-11 Transporte transcelular. O transporte transcelular de glicose através de uma célula epitelial intestinal depende da distribuição não-uniforme das proteínas de transporte na membrana plasmática celular. O processo mostrado aqui resulta no transporte de glicose do lúmen intestinal para o fluido extracelular (a partir de onde passa para o sangue). A glicose é bombeada para a célula através do domínio apical da membrana por um simporte de glicose movido por Na^+. A glicose sai da célula (a favor de seu gradiente de concentração) por transporte passivo mediado por uma proteína diferente transportadora de glicose nos domínios basal e lateral da membrana. O gradiente de Na^+ que dirige o simporte de glicose é mantido por uma bomba de Na^+ nos domínios basal e lateral da membrana plasmática, a qual mantém a concentração interna de Na^+ baixa. As células adjacentes são conectadas por junções aderentes impermeáveis que possuem uma dupla função no processo de transporte ilustrado: elas impedem a passagem de solutos pelo epitélio entre as células, permitindo a manutenção de um gradiente de concentração de glicose através da camada de células, e também servem como barreiras de difusão dentro da membrana plasmática, auxiliando a confinar as várias proteínas transportadoras aos seus respectivos domínios na membrana (ver Figura 10-37).

ação das proteínas transportadoras nestas células, os solutos são transportados pela camada de células epiteliais para o fluido celular a partir de onde chegarão à corrente sanguínea.

Como mostrado na **Figura 11-11**, os simportes Na^+-ligados localizados no domínio apical (de absorção) da membrana plasmática transportam ativamente nutrientes para a célula, formando gradientes de concentração substanciais para esses solutos através da membrana plasmática. As proteínas de transporte Na^+-independentes, no domínio basal e lateral (basolateral), permitem a saída passiva dos nutrientes da célula, a favor desse gradiente de concentração.

Em muitas dessas células epiteliais, a área de membrana plasmática é extremamente aumentada pela formação de milhares de microvilosidades, que se estendem como finas projeções em forma de dedo a partir da superfície apical de cada célula. Tais microvilosidades podem aumentar a área de absorção total de uma célula em mais de 25 vezes, aumentando, portanto, sua capacidade de transporte.

Como vimos, os gradientes de íons desempenham um papel fundamental conduzindo vários processos essenciais de transporte nas células. As bombas de íons que utilizam a energia de hidrólise de ATP são responsáveis, principalmente, pelo estabelecimento e pela manutenção desses gradientes, como discutiremos a seguir.

Existem três classes de bombas acionadas por ATP

As bombas acionadas por ATP frequentemente são denominadas *transportadoras ATPases* pois hidrolisam ATP em ADP e fosfato e usam a energia liberada para bombear íons ou outros solutos através de uma membrana. Existem três principais classes de bombas acionadas por ATP (**Figura 11-12**), e representantes de cada uma dessas classes são encontrados em todas as células de eucariotos e procariotos.

1. **Bombas do tipo P** são estrutural e funcionalmente relacionadas a proteínas transmembrana de múltiplas passagens. Elas são denominadas "tipo P" pois se autofosforilam (do inglês, *phosphorylate*) durante o ciclo de bombeamento. Esta classe inclui diversas bombas de íons que são responsáveis pelo estabelecimento e pela manutenção de gradientes de Na^+, K^+, H^+ e Ca^{2+} através das membranas celulares.
2. **Bombas do tipo F** são proteínas semelhantes a turbinas, construídas a partir de múltiplas subunidades diferentes. Elas são estruturalmente distintas das ATPases

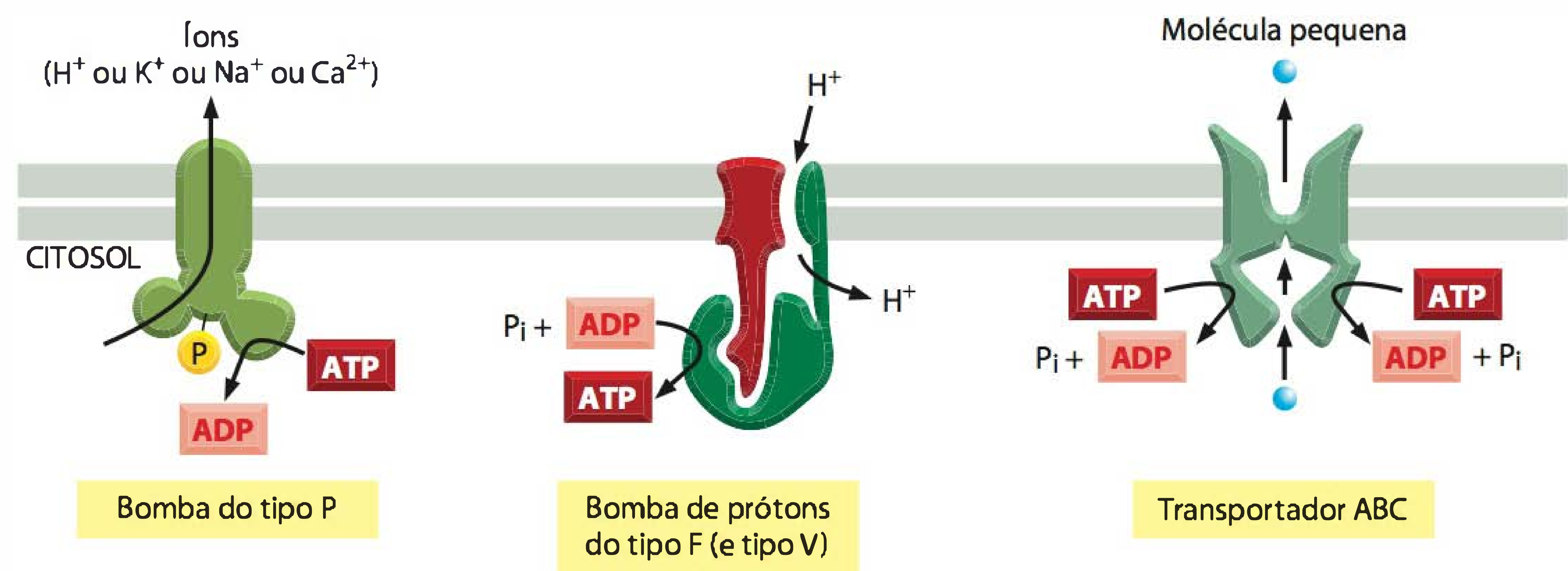


Figura 11-12 Três tipos de bombas dirigidas por ATP. As diferentes estruturas moleculares das bombas são ilustradas aqui. Da mesma forma que uma enzima, as bombas podem atuar de forma reversa: quando os gradientes eletroquímicos de solutos são revertidos e a relação ATP/ADP é baixa, elas podem sintetizar ATP a partir de ADP, como ilustrado para a ATPase do tipo F, que normalmente atua neste sentido.

do tipo P e são encontradas na membrana plasmática de bactérias, na membrana interna de mitocôndrias e na membrana tilacoide dos cloroplastos.

Elas geralmente são referidas como *ATP-sintases,* pois normalmente atuam de forma reversa: em vez de usar a hidrólise de ATP para dirigir o transporte de H^+, usam o gradiente de H^+ através da membrana para direcionar a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato. O gradiente de H^+ é gerado durante os passos do transporte de elétrons na fosforilação oxidativa (nas bactérias aeróbicas e nas mitocôndrias), durante a fotossíntese (nos cloroplastos) ou através de bombas de H^+ ativadas por luz (bacteriorrodopsina) em *Halobacterium*. Discutiremos estas proteínas em detalhes no Capítulo 14.

3. **Os transportadores ABC** bombeiam predominantemente pequenas moléculas através das membranas celulares, em contraste com as ATPases do tipo P, do tipo F ou do tipo V, que transportam exclusivamente íons.

No restante desta seção, discutiremos as bombas do tipo P e os transportadores ABC.

A bomba de Ca^{2+} é a ATPase do tipo P melhor compreendida

As células eucarióticas mantêm concentrações muito baixas de Ca^{2+} livre no seu citosol (~10^{-7} M) em comparação com as concentrações extracelulares de Ca^{2+} muito mais altas (~10^{-3} M). Mesmo um pequeno influxo de Ca^{2+} aumenta significativamente a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, e o fluxo de Ca^{2+} a favor do seu gradiente acentuado de concentração em resposta a sinais extracelulares é uma maneira de transmitir esses sinais rapidamente através da membrana plasmática (discutido no Capítulo 15). A manutenção de um gradiente acentuado de Ca^{2+} é, portanto, importante para a célula. O gradiente de Ca^{2+} é mantido por transportadores de Ca^{2+} na membrana plasmática que bombeiam Ca^{2+} ativamente para fora da célula. Um desses transportadores é uma ATPase de Ca^{2+} do tipo P; o outro é um antiporte (denominado *permutador Na^+-Ca^{2+}*) que é dirigido pelo gradiente eletroquímico de Na^+ existente através da membrana (ver Figura 15-41).

A ATPase transportadora do tipo P melhor conhecida é a **bomba de Ca^{2+}**, ou **ATPase de Ca^{2+}**, na membrana do *retículo sarcoplasmático* (RS) de células musculares esqueléticas. O RS é um tipo especializado de retículo endoplasmático que forma uma rede de sacos tubulares no citoplasma de células musculares e serve como um estoque intracelular de Ca^{2+}. (Quando um potencial de ação despolariza a membrana plasmática da célula muscular, o Ca^{2+} é liberado do RS para o citosol através *de canais de liberação de Ca^{2+}*, estimulando a contração muscular, como discutido no Capítulo 16.) A bomba de Ca^{2+}, que responde por cerca de 90% das proteínas de membrana da organela, é responsável pela movimentação de Ca^{2+} do citosol de volta ao RS. O RS de células não-musculares contém uma bomba de Ca^{2+} semelhante, mas em menores quantidades.

A estrutura tridimensional da bomba de Ca^{2+} RS foi determinada por cristalografia por raios X. Esta estrutura e a análise de uma bomba de H^+ fúngica relacionada forneceram as primeiras visões de uma ATPase transportadora tipo-P, que se acredita que devam possuir estruturas semelhantes. Elas contêm 10 hélices α transmembrana, três das quais revestem um canal central que atravessa a bicamada lipídica. No estado não-fosforilado, duas dessas hélices estão rompidas e formam uma cavidade que é acessível pelo lado citosólico da membrana e liga dois íons Ca^{2+}. A ligação de ATP a um sítio de ligação no mesmo lado da membrana e a subsequente transferência de um grupo terminal fosfato do ATP para um ácido as-

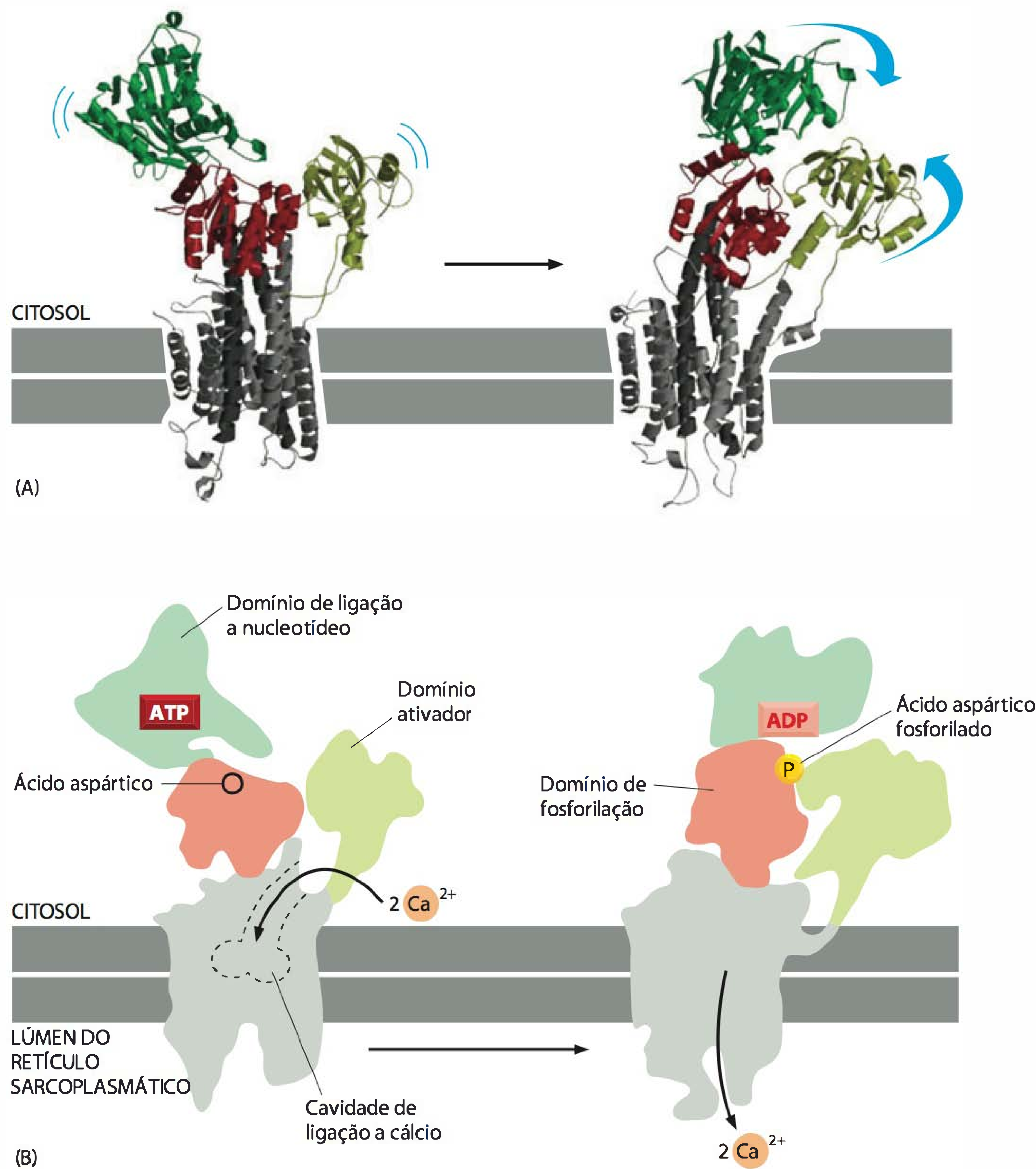


Figura 11-13 Modelo da movimentação de Ca^{2+} pela bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. (A) As estruturas do estado não-fosforilado ligado a Ca^{2+} (*à esquerda*) e do estado fosforilado Ca^{2+}- livre (*à direita*) foram determinadas através de cristalografia por raios X. (B) O modelo ilustrado mostra que a ligação e a hidrólise de ATP desencadeiam drásticas mudanças conformacionais, deixando próximos os domínios de ligação a nucleotídeo e de fosforilação. Essa mudança parece causar uma rotação de 90° do domínio ativador, que leva a um rearranjo das hélices transmembrana. O rearranjo das hélices disrupciona a cavidade de ligação a Ca^{2+} liberando os íons Ca^{2+} no lúmen do RS. (Adaptada de C. Toyoshima et al., *Nature* 405:647-655, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

pártico de um domínio adjacente levam a um drástico rearranjo das hélices transmembrana. O rearranjo desestrutura o sítio de ligação ao Ca^{2+} e libera íons Ca^{2+} no outro lado da membrana, no lúmen do RS (**Figura 11-13**). Uma característica essencial de todas as bombas do tipo P é que a bomba se autofosforila transientemente durante o ciclo de bombeamento.

A bomba Na^+-K^+ da membrana plasmática estabelece o gradiente de Na^+ através da membrana plasmática

A concentração de K^+ tipicamente é de 10 a 30 vezes maior no interior celular do que no exterior, enquanto o contrário é verdadeiro para Na^+ (ver Tabela 11-1, p. 652). Essas diferenças de concentração são mantidas por uma **bomba de Na^+-K^+**, ou **bomba de Na^+**, encontrada na membrana plasmática de praticamente todas as células animais. A bomba opera como um antiporte acionado por ATP, bombeando Na^+ ativamente para fora da célula contra seu acentuado gradiente eletroquímico, e bombeando K^+ para o interior (**Figura 11-14**). Pelo fato de a bomba hidrolisar ATP para bombear Na^+ para fora e K^+ para dentro, ela também é conhecida como uma **Na^+-K^+-ATPase**. Essa bomba pertence à família das ATPases do tipo P e atua de forma bastante similar à bomba de Ca^{2+} (**Figura 11-15**).

Mencionamos anteriormente que o gradiente de Na^+ produzido pela bomba de Na^+-K^+ dirige o transporte da maioria dos nutrientes para células animais e também desempenha um papel fundamental na regulação do pH citosólico. Quase um terço dos requisitos energéticos de uma célula animal típica é consumido no funcionamento dessa bomba, e ela consome ainda mais energia em células nervosas eletricamente ativas que, como veremos, ganham repetidamente pequenas quantidades de Na^+ e perdem pequenas quantidades de K^+ durante a propagação do impulso nervoso.

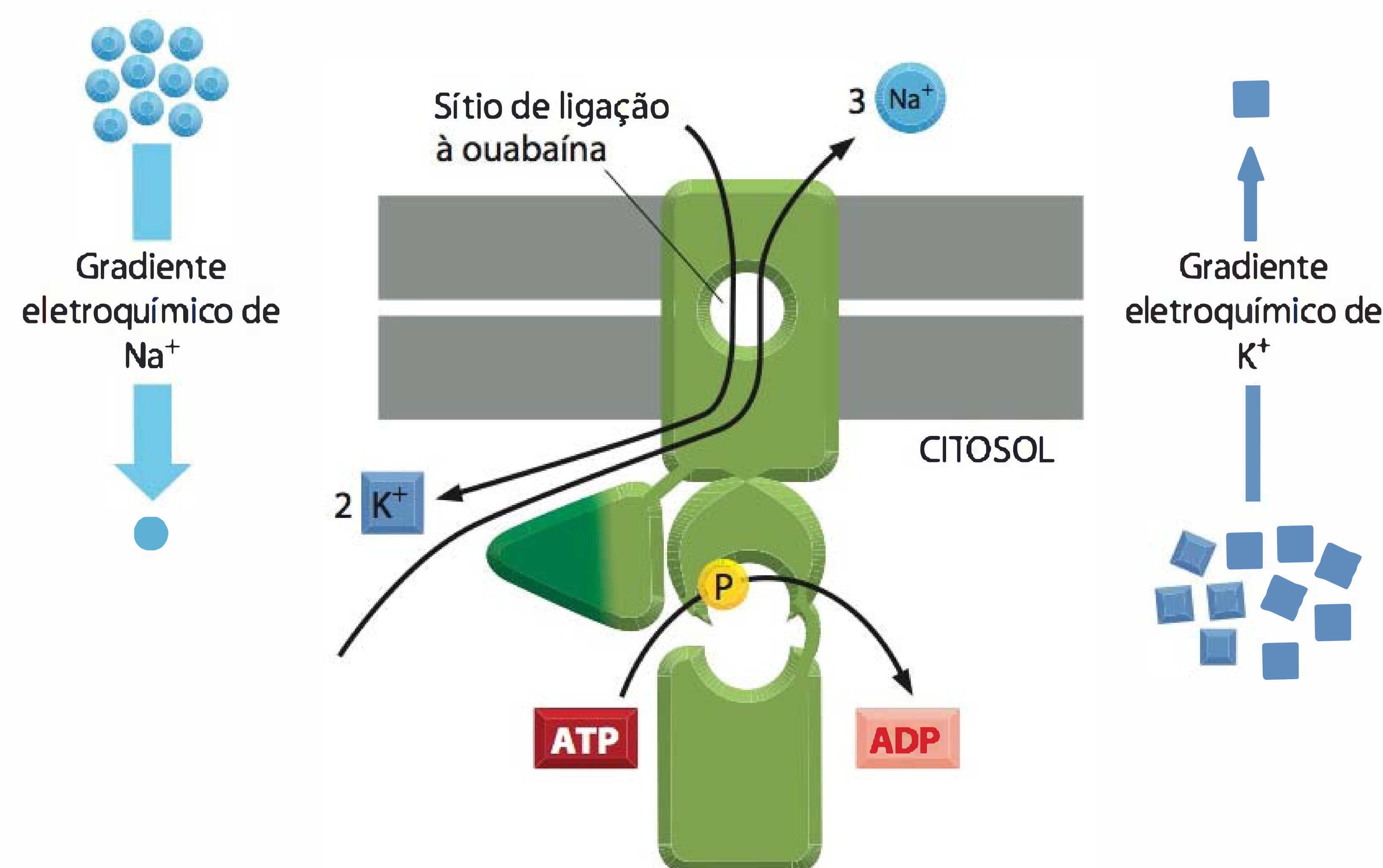


Figura 11-14 Bomba de Na^+-K^+. Essa proteína transportadora bombeia ativamente Na^+ para fora e K^+ para dentro de uma célula contra seus gradientes eletroquímicos. Para cada molécula de ATP hidrolisado dentro da célula, três moléculas de Na^+ são bombeadas para fora, e duas de K^+, para dentro. O inibidor específico ouabaína e o K^+ competem pelo mesmo sítio no lado extracelular da bomba.

Como qualquer enzima, a bomba de Na^+-K^+ pode ser acionada em reverso; neste caso, para produzir ATP. Quando os gradientes de Na^+ e de K^+ são experimentalmente aumentados ao ponto em que a energia armazenada em seus gradientes eletroquímicos é maior que a energia química da hidrólise do ATP, esses íons movem-se a favor dos seus gradientes eletroquímicos, e o ATP é sintetizado a partir de ADP e fosfato pela bomba de Na^+-K^+. Assim, a forma fosforilada da bomba (etapa 2 da Figura 11-15) pode relaxar pela doação de seu grupo fosfato ao ADP (etapa 2 à etapa 1) ou pela mudança da sua conformação (etapa 2 à etapa 3). Se a mudança total na energia livre será utilizada para sintetizar ATP ou para bombear Na^+ para fora da célula dependerá da concentração relativa de ATP, do ADP, do fosfato e dos gradientes eletroquímicos para Na^+ e K^+.

Visto que a bomba de Na^+-K^+ move três íons positivamente carregados para o exterior celular para cada dois que bombeia para dentro, ela é *eletrogênica*. Ela induz uma corrente através da membrana, tendendo a criar um potencial elétrico com o interior celular negativo em relação ao exterior. Esse efeito eletrogênico da bomba, no entanto, raramente contri-

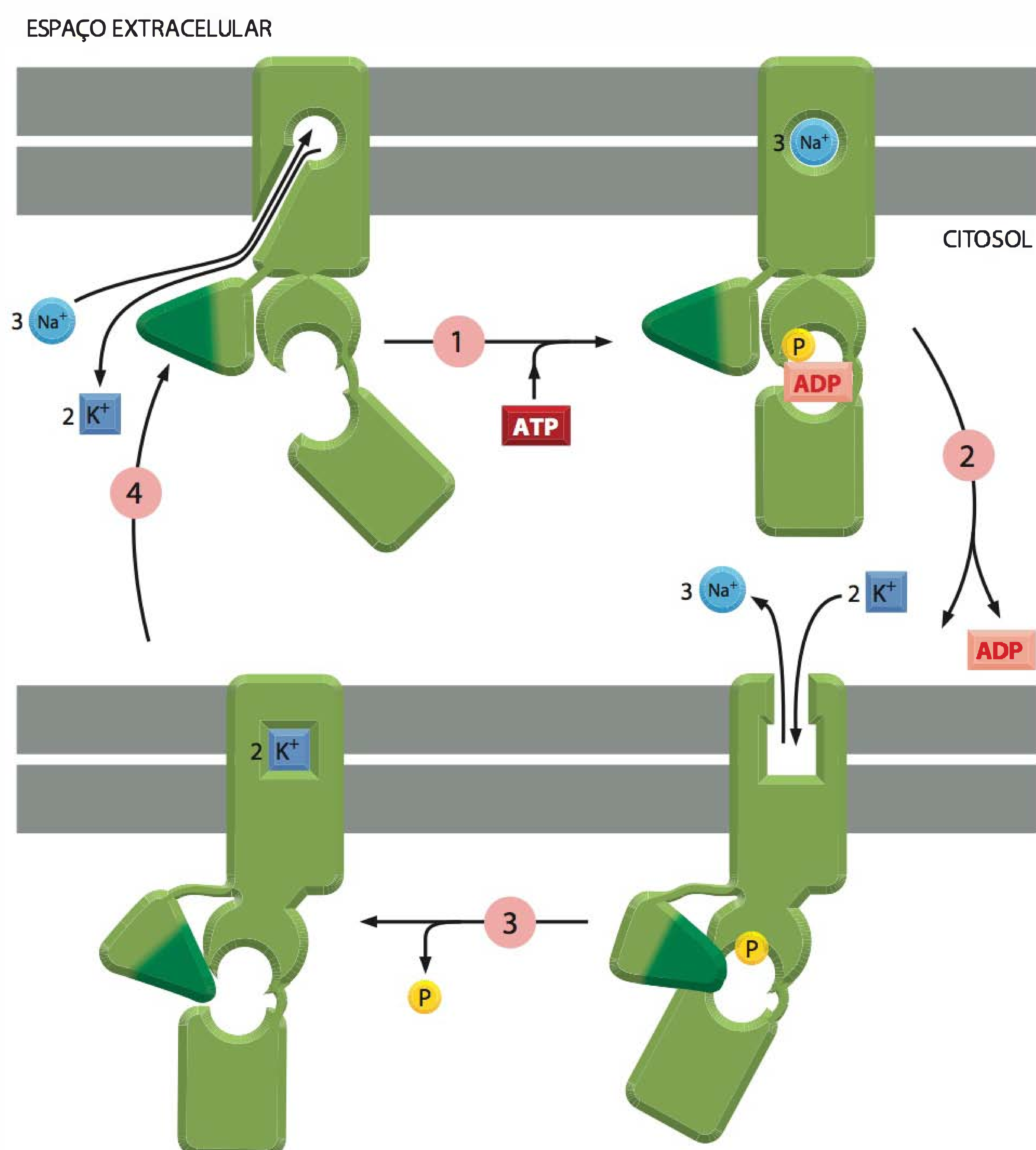


Figura 11-15 Modelo do ciclo de bombeamento da bomba de Na^+-K^+. (1) A ligação de Na^+ intracelular e a subsequente fosforilação da face citoplasmática da bomba por ATP induz, em uma mudança conformacional na proteína que (2) transfere o Na^+ através da membrana e libera esse íon no exterior. (3) Então, a ligação de K^+ na superfície extracelular e a posterior desfosforilação fazem com que a proteína retorne à sua conformação original, o que (4) transfere o K^+ através da membrana e o libera no citosol. Essas mudanças na conformação são análogas às transições A ↔ B mostradas na Figura 11-5, exceto que aqui a fosforilação Na^+-dependente e a desfosforilação K^+-dependente da proteína causam transições conformacionais de maneira ordenada, permitindo à proteína realizar trabalho útil. Embora, para simplificação, seja mostrado somente um sítio de ligação a Na^+ e um a K^+, na bomba real existem três sítios de ligação a Na^+ e dois a K^+.

bui mais do que 10% para o potencial de membrana. Os 90% restantes, como discutiremos adiante, dependem apenas indiretamente da bomba de Na^+-K^+.

Ao contrário, a bomba de Na^+-K^+ tem um papel direto e fundamental na regulação da concentração de soluto dentro da célula e, portanto, auxilia a regular a **osmolaridade** (ou *tonicidade*) do citosol. Todas as células contêm proteínas de canal de água especializadas denominadas *aquaporinas* (discutidas em detalhe na p. 673) em suas membranas plasmáticas para facilitar o fluxo de água através dessas membranas. Dessa forma, a água se move para dentro e para fora das células de acordo com seu gradiente de concentração, um processo denominado *osmose*. Como explicado no **Painel 11-1**, as células contêm uma concentração alta de solutos, incluindo numerosas moléculas orgânicas carregadas negativamente confinadas no interior celular (os assim chamados *ânions fixos*) e seus cátions acompanhantes que são necessários para o balanço de cargas. Isso acaba por criar um grande gradiente osmótico que tende a "arrastar" água para a célula. Nas células animais, esse efeito é contrabalançado por um gradiente osmótico oposto, devido à alta concentração de íons inorgânicos – principalmente Na^+ e Cl^- – no fluido extracelular. A bomba de Na^+-K^+ auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico bombeando para o exterior o Na^+ que flui para dentro a favor do seu acentuado gradiente eletroquímico. O Cl^- é mantido no exterior pelo potencial de membrana.

No caso especial das células vermelhas sanguíneas humanas, que não possuem núcleo e outras organelas, mas possuem uma membrana plasmática que apresenta uma permeabilidade incomum e alta à água, os movimentos osmóticos da água podem influenciar bastante o volume da célula, e a bomba de Na^+-K^+ desempenha um importante papel na manutenção do volume do eritrócito. Se essas células são colocadas em uma *solução hipotônica* (ou seja, uma solução contendo baixa concentração do soluto e, portanto, alta concentração de água), existe um movimento de balanço de água para as células, levando-as a inchar e então romper-se (lise). Contrariamente, se as células são colocadas em uma *solução hipertônica*, elas murcham (**Figura 11-16**). A importância da bomba de Na^+-K^+ no controle do volume das células eritroides é indicada pela observação de que as células incham, e chegam a explodir, se forem tratadas com *ouabaína*, que inibe a bomba de Na^+-K^+. Para a maioria das células animais, no entanto, a osmose e a bomba de Na^+-K^+ desempenham apenas um papel minoritário na regulação do volume celular. Isso ocorre porque a maior parte do citoplasma está sob um estado semelhante a um gel e resiste a grandes alterações em seu volume em resposta a alterações na osmolaridade.

Células não-animais abordam os problemas osmóticos de diferentes formas. As células vegetais e as diversas bactérias evitam o rompimento por uma parede celular semirrígida que envolve suas membranas plasmáticas. Em amebas, o excesso de água que flui osmoticamente para o interior é coletado por vacúolos contráteis que descarregam periodicamente seu conteúdo no exterior (ver Painel 11-1). As bactérias também desenvolveram estratégias que permitem a perda de íons e mesmo de macromoléculas rapidamente quando sujeitas a um choque osmótico.

Os transportadores ABC constituem a maior família de proteínas de transporte de membrana

O último tipo de proteína carreadora que discutiremos é a família dos **transportadores ABC**, assim chamados pois cada membro contém dois cassetes de ligação a ATP (de *ATP-binding cassetes*), ou domínios ATPase, altamente conservados (**Figura 11-17**). A ligação de ATP leva à dimerização dos dois domínios de ligação a ATP, e a hidrólise de ATP leva à sua dissociação. Essas mudanças estruturais nos domínios citosólicos parecem ser transmitidas

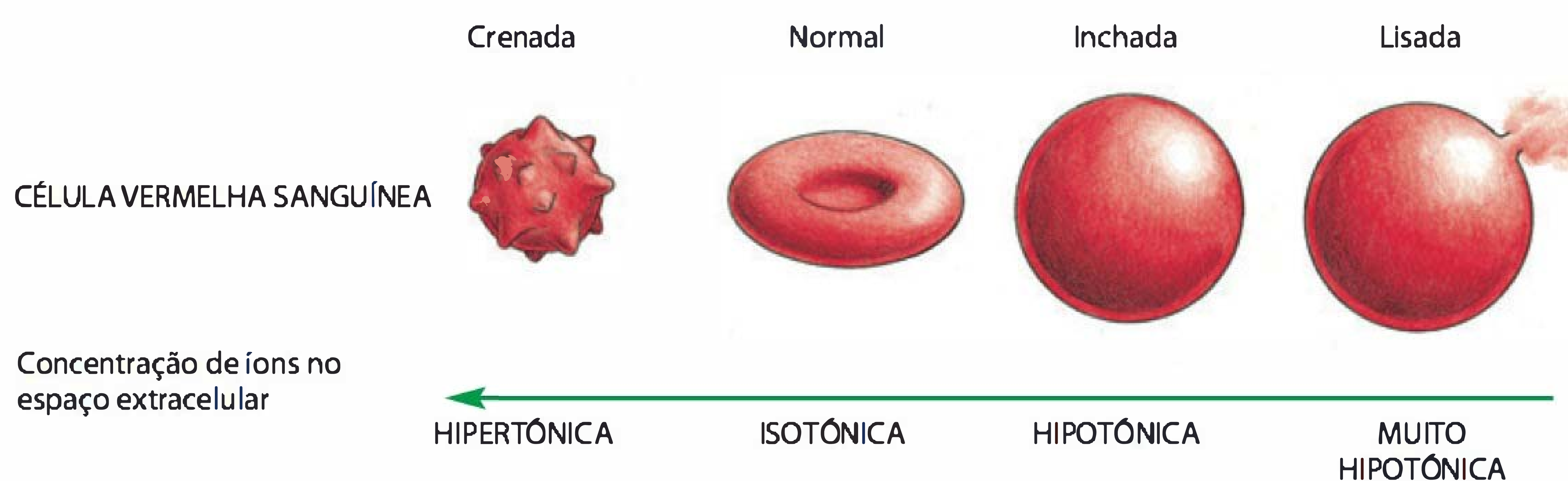
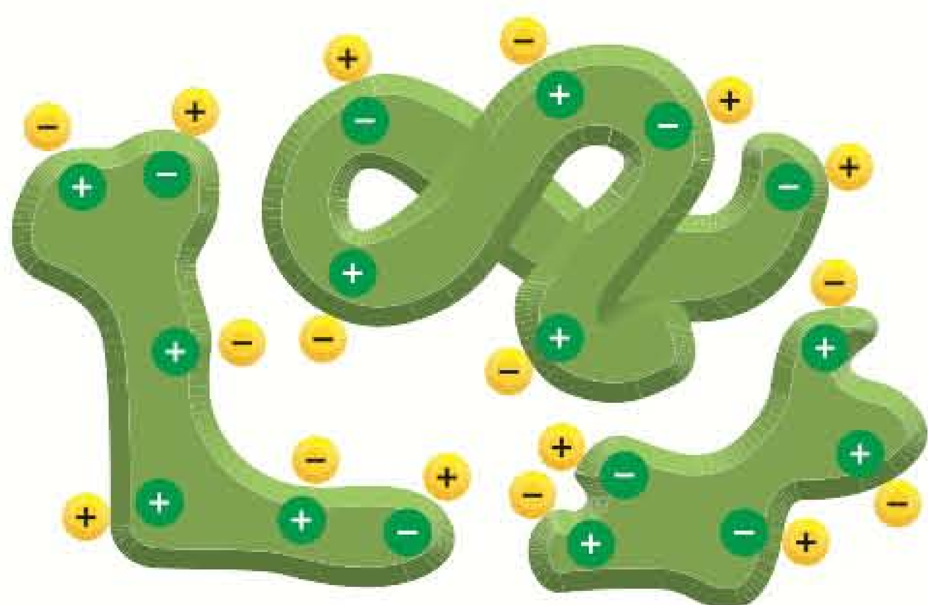
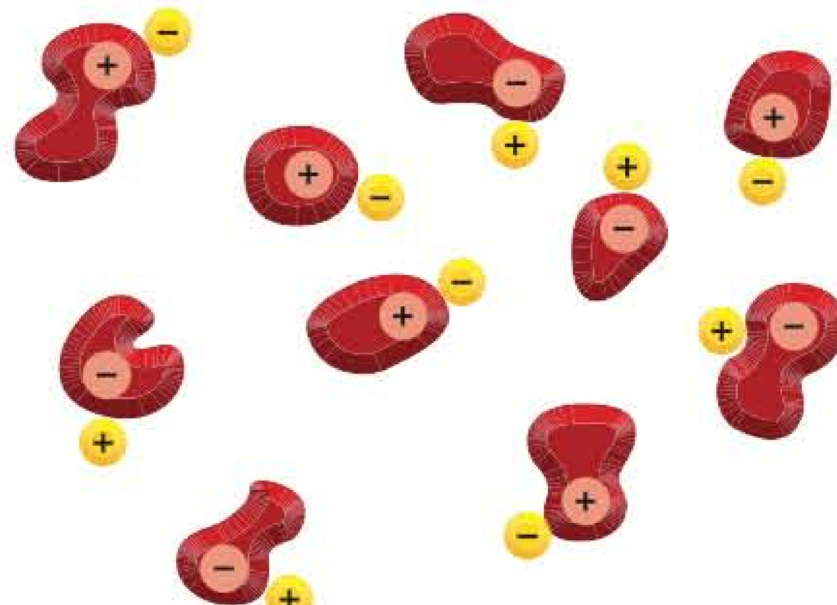
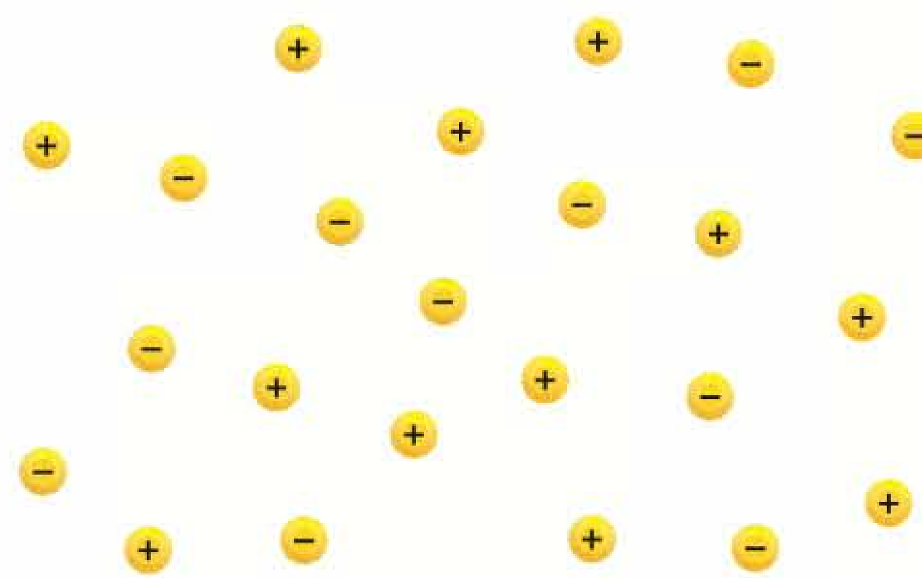


Figura 11-16 Resposta de uma célula vermelha do sangue humano a mudanças na osmolaridade do fluido extracelular. A célula incha ou murcha com o movimento da água para o interior ou para o exterior da célula a favor do seu gradiente de concentração.

FONTES DE OSMOLARIDADE INTRACELULAR



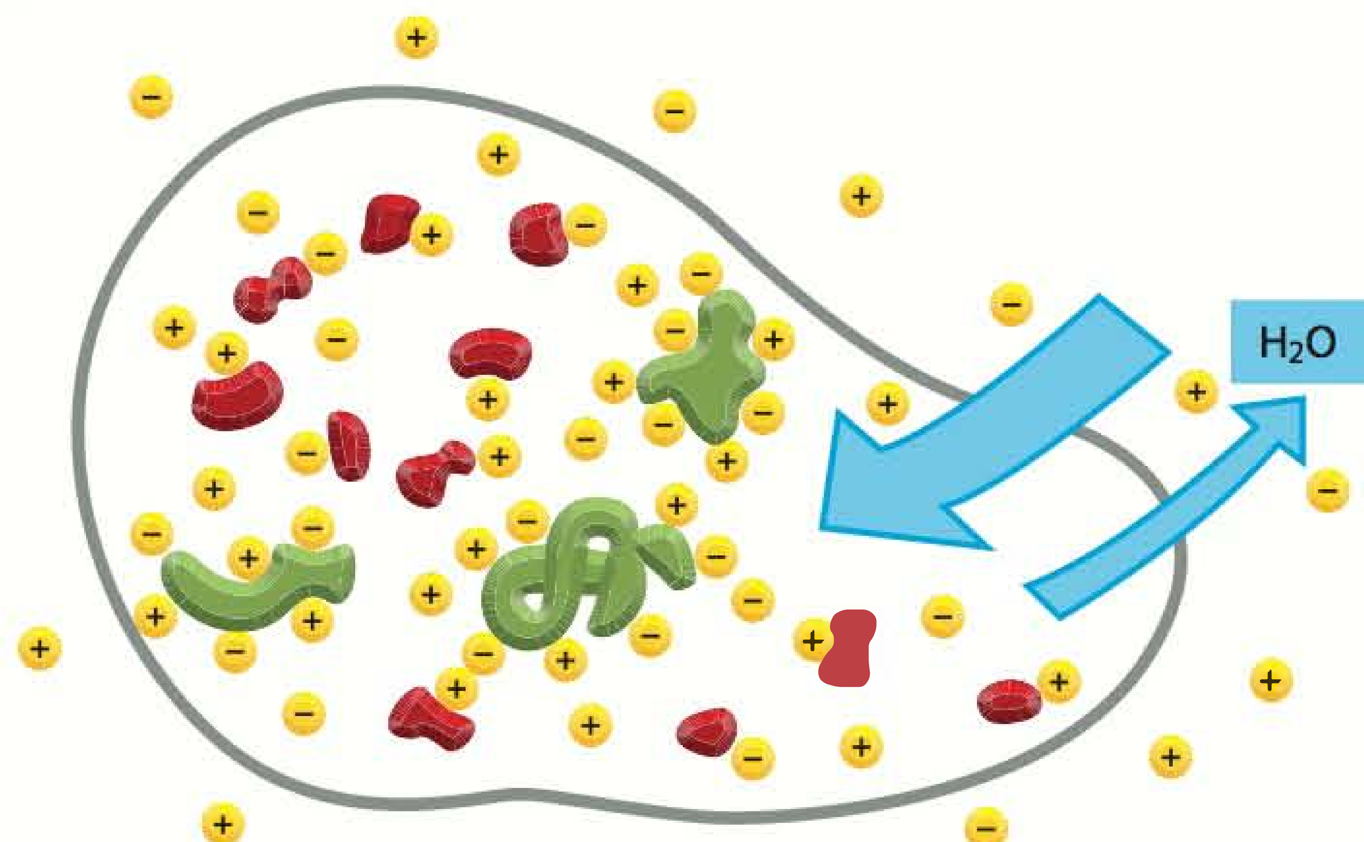




1 As macromoléculas contribuem pouquíssimo à osmolaridade do interior celular, uma vez que, a despeito de seu grande tamanho, cada uma conta somente como uma única molécula e existem relativamente poucas delas comparadas ao número de pequenas moléculas na célula. Todavia, a maioria das macromoléculas biológicas é fortemente carregada e atrai muitos íons inorgânicos de carga oposta. Por causa do seu grande número, esses contra-íons fazem uma contribuição importante à osmolaridade intracelular.

2 Como resultado do transporte ativo e de processos metabólicos, a célula contém uma concentração alta de pequenas moléculas orgânicas, como açúcares, aminoácidos e nucleotídeos, aos quais sua membrana plasmática é impermeável. Pelo fato de a maioria desses metabólitos ser carregada, eles também atraem contra-íons. Os pequenos metabólitos e seus contra-íons fazem uma outra contribuição significativa à osmolaridade intracelular.

3 A osmolaridade do fluido extracelular é em geral devida principalmente a pequenos íons orgânicos, os quais passam vagarosamente à célula através da membrana plasmática. Se não fossem bombeados para fora e se não houvesse outras moléculas no interior celular que interagissem com eles e influenciassem em sua distribuição, finalmente eles entrariam em equilíbrio, com iguais concentrações dentro e fora da célula. Entretanto, a presença de macromoléculas e de metabólitos carregados na célula, atraindo esses íons, desencadeia o efeito Donnan: a concentração total de íons inorgânicos (e, portanto, sua contribuição à osmolaridade) será maior no interior do que no exterior celular no equilíbrio.



O PROBLEMA

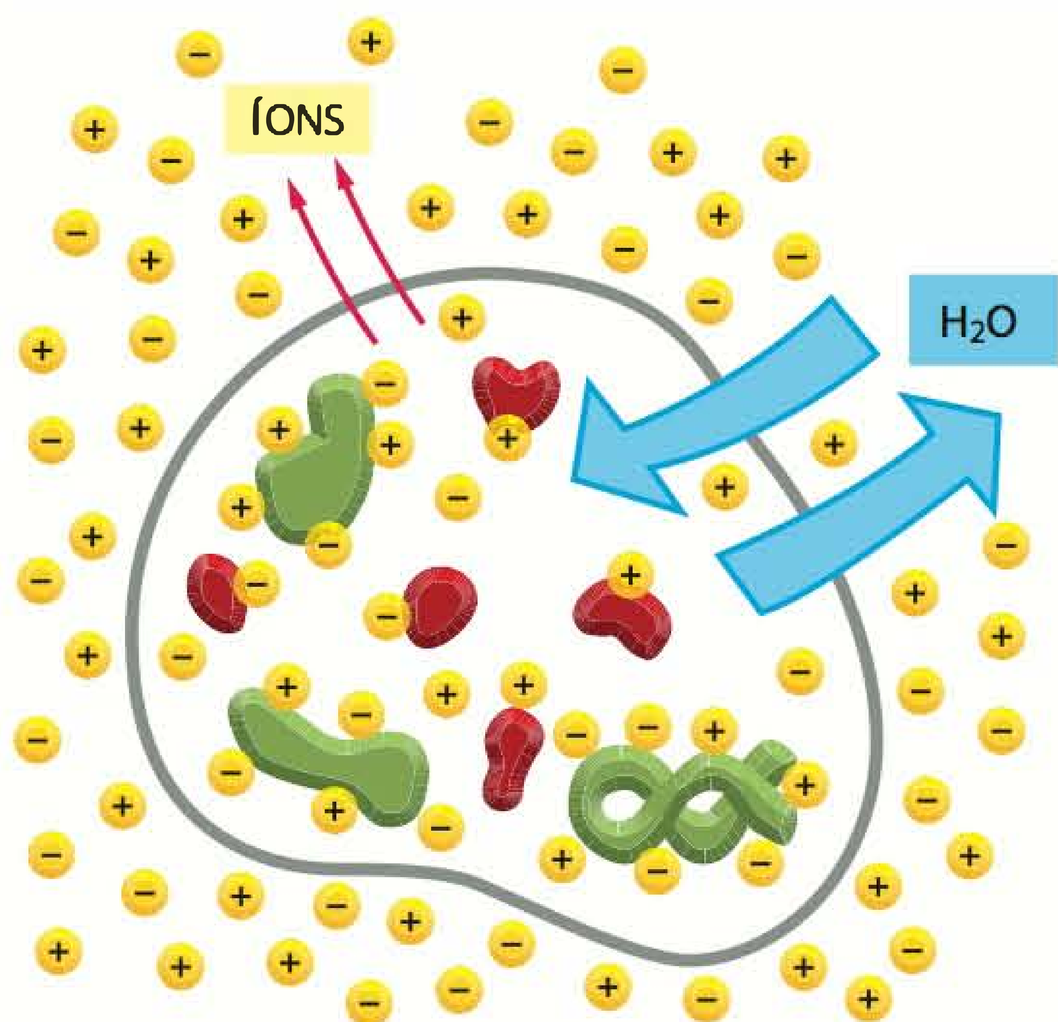
Devido aos fatores acima, uma célula que nada fizer para controlar sua osmolaridade terá uma concentração mais elevada de solutos em seu interior do que em seu exterior. Como resultado, a água terá maior concentração no exterior celular do que no interior. Essa diferença na concentração de água através da membrana plasmática fará com que a água se mova continuamente para a célula por osmose.

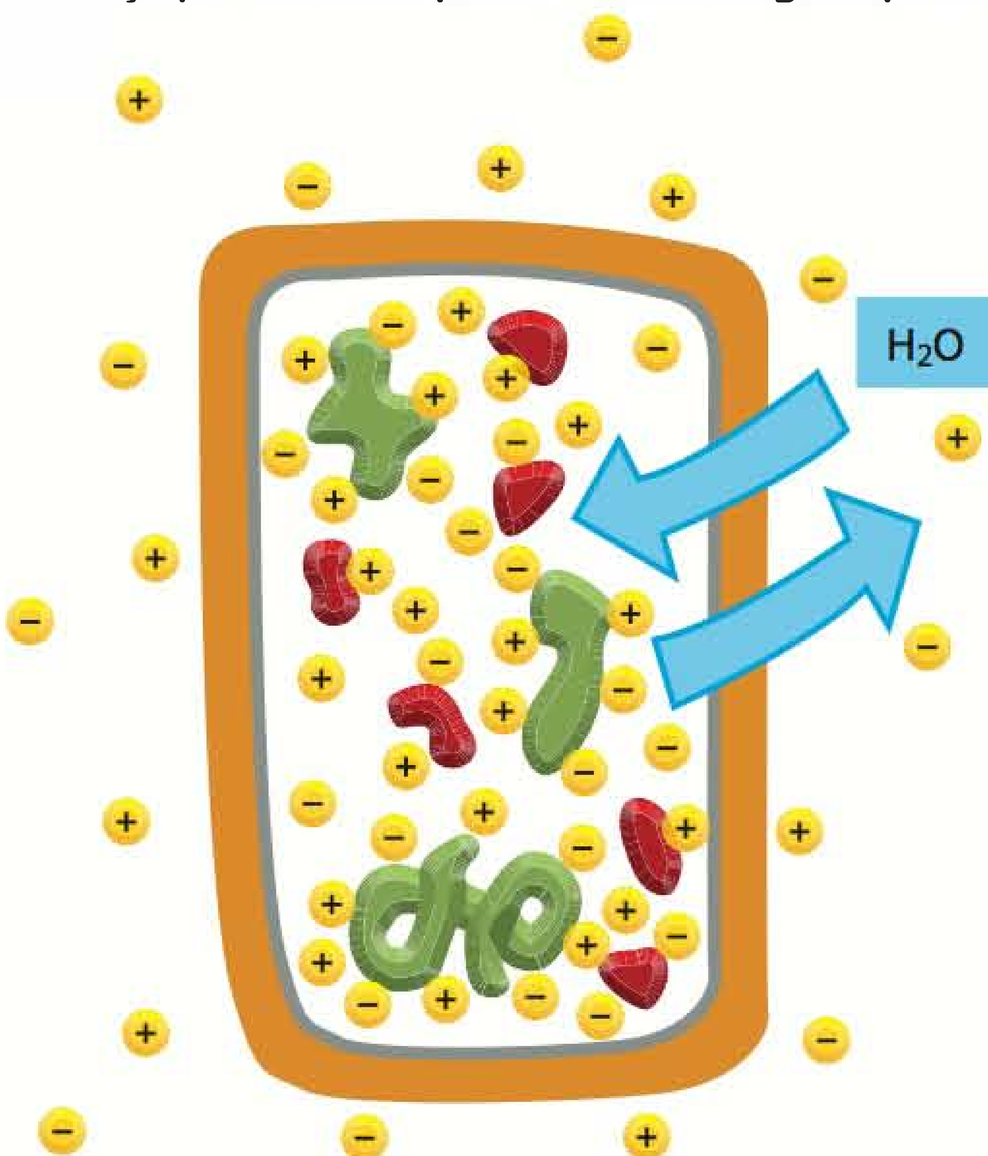
A SOLUÇÃO

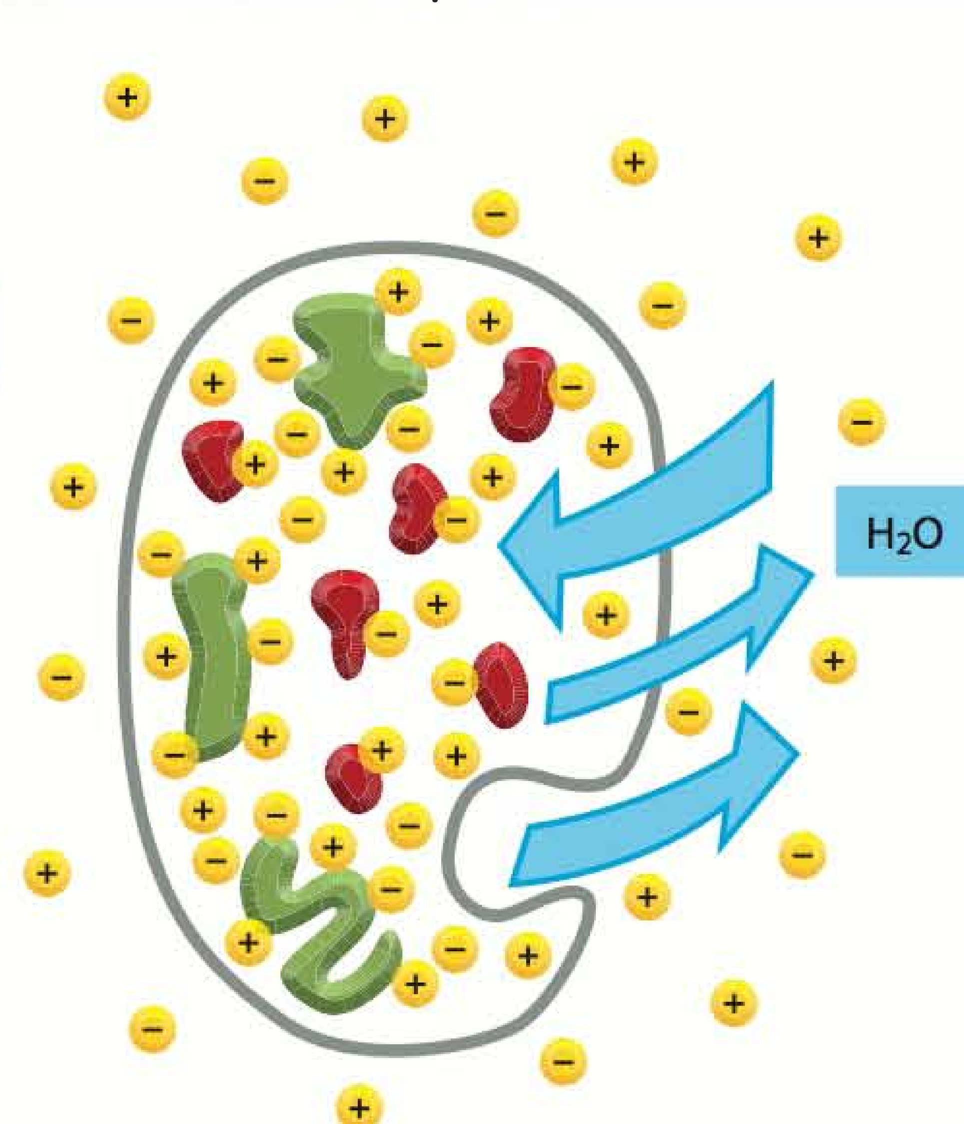
As células de animais e de bactérias controlam sua osmolaridade intracelular bombeando ativamente íons inorgânicos, como Na^+, para o exterior, de tal forma que seu citoplasma contém uma concentração total de íons inorgânicos menor que o fluido extracelular, compensando, portanto, seu excesso de solutos orgânicos.

As células vegetais estão impedidas de inchar pela sua parede rígida e, assim, podem tolerar uma diferença osmótica através das suas membranas plasmáticas: uma pressão interna de turgor é mantida, a qual, em equilíbrio, força para fora a quantidade de água que entra.

Muitos protozoários evitam tornar-se intumescidos com a água, a despeito de uma diferença osmótica através da membrana plasmática, pela extrusão periódica de água a partir de vacúolos contráteis especiais.







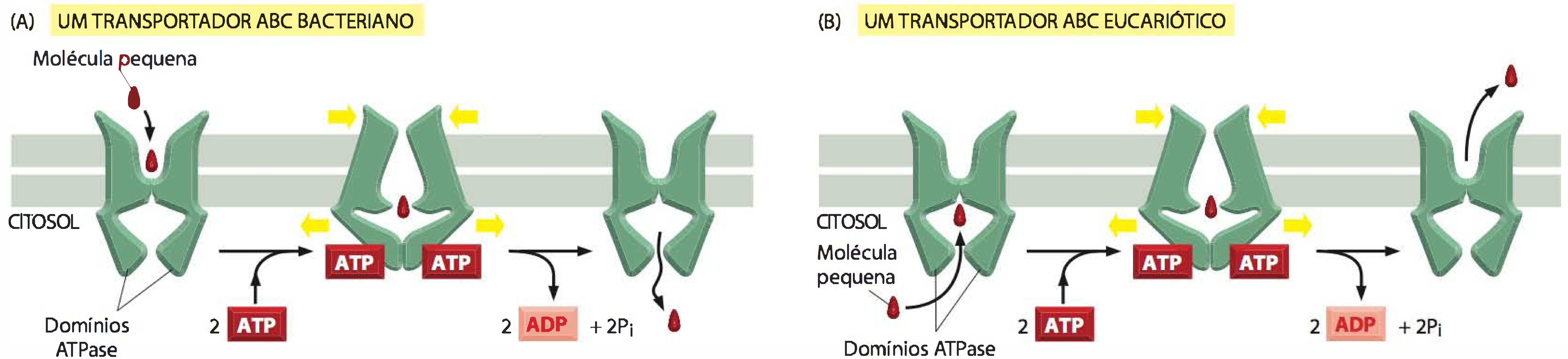


Figura 11-17 Transportadores ABC típicos em procariotos (A) e em eucariotos (B). Os transportadores consistem em múltiplos domínios: tipicamente, dois domínios hidrofóbicos, cada qual construído de segmentos que atravessam a membrana, formam a via para a translocação e determinam a especificidade do substrato, e dois domínios ATPase (também denominados cassetes de ligação a ATP) que se estendem no citosol. Em alguns casos, as duas metades do carreador são formadas por um único polipeptídeo, ao passo que em outros casos elas são formadas a partir de dois ou mais polipeptídeos distintos que se organizam sob uma estrutura similar (ver Figura 10-24). Sem o ATP ligado, o transportador expõe o sítio de ligação ao substrato para o espaço extracelular (em procariotos) ou para o espaço intracelular (em eucariotos ou procariotos). A ligação de ATP induz uma alteração conformacional que expõe a fenda de ligação ao substrato à face oposta; a hidrólise do ATP seguida de dissociação do ADP faz com que o transportador retorne à sua conformação original. A maior parte dos transportadores ABC atua de forma unidirecional. Nas bactérias são encontrados tanto transportadores ABC de importação quanto de exportação, mas nos eucariotos a quase totalidade de carreadores ABC atua na exportação de substâncias a partir do citosol – rumo ao espaço extracelular ou rumo a compartimentos intracelulares ligados a membranas, como o RE ou as mitocôndrias.

aos segmentos transmembrana, induzindo ciclos de alterações conformacionais que, alternadamente, expõem os sítios de ligação ao substrato para um ou outro lado da membrana. Dessa forma, os transportadores ABC utilizam ligação e hidrólise de ATP para transportar pequenas moléculas através da bicamada.

Os transportadores ABC constituem a maior das famílias de proteínas de transporte de membrana e são de grande importância clínica. A primeira dessas proteínas a ser caracterizada foi encontrada em bactérias. Já mencionamos que as membranas plasmáticas de todas as bactérias contêm proteínas transportadoras que utilizam o gradiente de H^+ através da membrana para bombear vários nutrientes para a célula. As bactérias também possuem ATPases transportadoras que utilizam energia da hidrólise de ATP para importar certas moléculas pequenas. Em bactérias como a *E. coli*, que possuem membranas duplas (**Figura 11-18**), as ATPases transportadoras estão localizadas na membrana interna, e existe um mecanismo auxiliar que opera na captura e na liberação de nutrientes para os transportadores (**Figura 11-19**).

Em *E. coli*, 78 genes (o que representa incríveis 5% dos genes bacterianos) codificam para transportadores ABC, e os genomas de animais codificam para um número ainda maior destes genes. Embora se acredite que cada um seja específico para um substrato em particular ou para uma classe de substratos, a variedade de substratos transportados por essa superfamília é enorme e inclui íons inorgânicos, aminoácidos, mono e polissacarídeos, peptídeos e até proteínas. Enquanto os transportadores ABC bacterianos são utilizados tanto para a importação quanto para a exportação, aqueles descritos em eucariotos parecem em sua maioria ser especializados para a exportação.

De fato, os primeiros transportadores ABC eucarióticos identificados foram descobertos por causa da sua habilidade em bombear substâncias hidrofóbicas para fora do citosol. Um desses transportadores é a **proteína de resistência a múltiplas drogas** (**MDR**, *multidrug resistance*), cuja superexpressão em células cancerosas humanas pode tornar as células si-

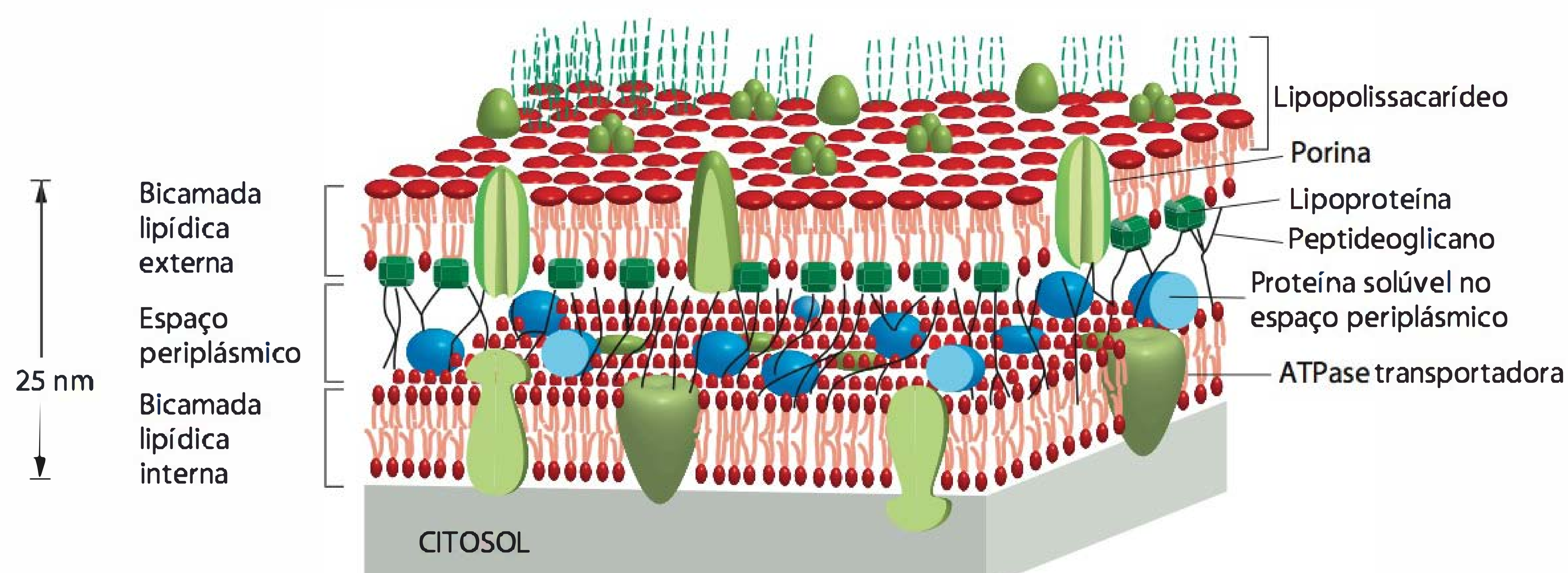


Figura 11-18 Pequena secção da membrana dupla de uma bactéria *E. coli*. A membrana interna é a membrana plasmática celular. Entre as membranas interna e externa da bicamada lipídica está uma camada de peptideoglicano rígido, fortemente poroso, composta de proteína e de polissacarídeo, que constitui a parede celular bacteriana. Ela está aderida a moléculas de lipoproteína na membrana externa e preenche o *espaço periplásmico* (somente uma pequena porção do peptideoglicano é mostrada). Esse espaço contém também vários tipos de moléculas de proteínas solúveis. As linhas tracejadas (mostradas em *verde*) na parte superior representam as cadeias polissacarídicas das moléculas lipopolissacarídicas especiais que formam a monocamada externa da membrana externa; para maior clareza, são mostradas somente umas poucas dessas cadeias. As bactérias com membranas duplas são denominadas *gram-negativas*, pois não retêm o corante azul-escuro utilizado em coloração de Gram. As bactérias com membranas únicas (mas paredes celulares espessas), como estafilococos e estreptococos, retêm o corante azul e, portanto, são denominadas *gram-positivas*; sua membrana única é análoga à membrana interna (plasmática) das bactérias gram-negativas.

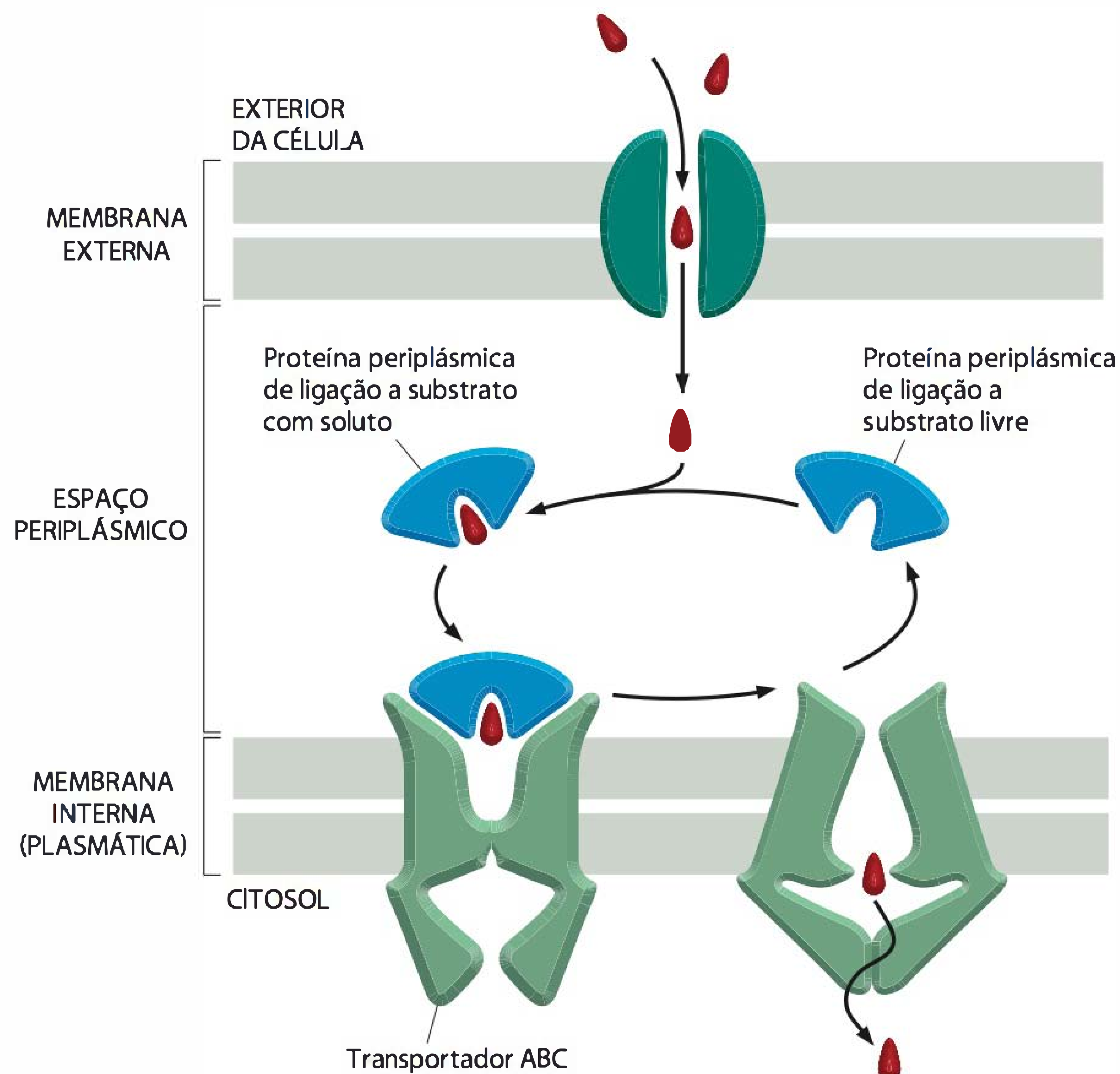


Figura 11-19 O sistema auxiliar de transporte associado a ATPases transportadoras em bactérias com membranas duplas. O soluto difunde-se através de proteínas formadoras de canais (porinas) na membrana externa e liga-se a uma *proteína periplásmica de ligação a substrato*. Como resultado, a proteína de ligação a substrato sofre uma mudança conformacional que a habilita a se ligar a um transportador ABC na membrana plasmática, o qual, então, apanha o soluto e o transfere ativamente através da bicamada em uma reação dirigida por hidrólise de ATP. O peptideoglicano está omitido para simplificação; sua estrutura porosa permite que as proteínas de ligação a substrato e solutos hidrossolúveis movam-se através dele por difusão simples.

simultaneamente resistentes a uma ampla variedade de fármacos citotóxicos quimicamente não-relacionados que são utilizados na quimioterapia para câncer.

O tratamento com qualquer um desses fármacos pode resultar na sobrevivência seletiva e no crescimento exacerbado de células cancerosas que superexpressam a proteína transportadora MDR. Essas células são capazes de bombear eficientemente o fármaco para o exterior da célula e são, portanto, relativamente resistentes aos efeitos tóxicos dos fármacos anticancerígenos. A seleção de células cancerosas resistentes a um fármaco pode, consequentemente, levar à resistência a uma ampla variedade de agentes terapêuticos. Alguns estudos indicam que até 40% dos cânceres humanos desenvolvem resistência a múltiplos fármacos, sendo este um grande obstáculo na batalha contra o câncer.

Um fenômeno relacionado e igualmente sinistro ocorre no protista *Plasmodium falciparum*, que causa a malária. Mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas com esse parasita, que continua a ser uma causa principal de morte, matando mais de um milhão de pessoas a cada ano. O controle da malária é dificultado pelo desenvolvimento de resistência ao fármaco antimalárico *cloroquina*. *P. falciparum* resistentes mostraram ter um gene amplificado que codifica para um transportador ABC que bombeia cloroquina para o exterior de suas células.

Na maioria das células de vertebrados, um transportador ABC na membrana do retículo endoplasmático (RE) transporta ativamente uma ampla variedade de peptídeos, do citosol ao lúmen do RE. Esses peptídeos são produzidos através de degradação proteica nos proteossomos (discutido no Capítulo 6). Eles são transportados a partir do RE para a superfície celular, onde são exibidos para reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos, os quais matam a célula se os fragmentos derivarem de um vírus ou de outros micro-organismos que estejam escondidos no citosol de uma célula infectada (discutido no Capítulo 25).

Ainda outro membro da família ABC é a *proteína reguladora de condutividade transmembrana de fibrose cística* (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), a qual foi descoberta por meio de estudos da doença genética comum *fibrose cística*. Essa doença é causada por uma mutação no gene que codifica CFTR, que atua como um regulador de um canal de Cl^- na membrana plasmática de células epiteliais. A CFTR regula as concentrações iônicas em fluidos extracelulares, especialmente nos pulmões. Um em cada 27 indivíduos caucasianos é portador de um gene que codifica uma forma mutante desta proteína; e em 1 em cada 2.900 pessoas ambas as cópias do gene apresentação mutação, causando a doença. Em contraste a outros transportadores ABC, a ligação e a hidrólise de ATP não dirigem o processo de transporte. Em vez disso, elas controlam a abertura e o fechamento do canal de Cl^-, o qual fornece um conducto passivo para que o Cl^- possa se mover em direção a seu gradiente eletroquímico. Dessa forma, proteínas ABC podem aparentemente atuar tanto como transportadoras como sob a forma de canais.

Resumo

As proteínas transportadoras ligam solutos específicos e os transferem através da bicamada lipídica sofrendo mudanças conformacionais que expõem o sítio de ligação a soluto sequencialmente em um lado da membrana e então em outro. Algumas proteínas transportadoras transportam um único soluto "morro abaixo", enquanto outras podem atuar como bombas para transportar um soluto "morro acima" contra seu gradiente eletroquímico, utilizando energia fornecida pela hidrólise de ATP, por um fluxo a favor do gradiente" de outro soluto (como Na^+ ou H^+), ou pela luz, para dirigir as séries necessárias de mudanças conformacionais de uma maneira ordenada. As proteínas transportadoras pertencem a um pequeno número de famílias. Cada família compreende proteínas de sequências similares de aminoácidos que provavelmente evoluíram a partir de uma proteína ancestral comum e operam por um mecanismo semelhante. A família de ATPases transportadoras do tipo P, que inclui a bomba de Ca^{2+} e a bomba de Na^+-K^+, é um exemplo importante; cada uma dessas ATPases sequencialmente fosforila e desfosforila a si própria durante o ciclo de bombeamento. A superfamília de transportadores ABC é a maior família de proteínas de transporte de membrana e apresenta grande importância clínica. Ela inclui proteínas que são responsáveis pela fibrose cística e pela resistência a fármacos em células cancerosas e em parasitas causadores da malária.

CANAIS IÔNICOS E AS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DAS MEMBRANAS

Diferentemente das proteínas carreadoras, as proteínas de canal formam poros hidrofílicos através das membranas. Uma classe de proteínas de canal encontrada praticamente em todos os animais forma *junções comunicantes* (*gap junctions*) entre duas células adjacentes; cada membrana plasmática contribui igualmente à formação do canal, que conecta o citoplasma das duas células. Esses canais são discutidos no Capítulo 19 e não serão mais considerados aqui. Tanto as junções comunicantes quanto as *porinas*, as proteínas formadoras de canal das membranas externas de bactérias, de mitocôndrias e de cloroplastos (discutido no Capítulo 10), apresentam poros relativamente grandes e permissivos, que seriam desastrosos se conectassem diretamente o interior de uma célula com o espaço extracelular. De fato, muitas toxinas bacterianas fazem exatamente isso para matar outras células (discutido no Capítulo 24).

Em contraste, a maioria das proteínas de canal na membrana plasmática de células animais e vegetais que conectam o citosol ao exterior celular possui, necessariamente, poros estreitos fortemente seletivos que podem abrir e fechar rapidamente. Uma vez que essas proteínas estão envolvidas de modo específico com o transporte de íons inorgânicos, elas são referidas como **canais iônicos**. Para a eficiência do transporte, os canais possuem uma vantagem sobre os carreadores, pois mais de cem milhões de íons podem passar por um canal aberto a cada segundo – uma taxa 10^5 vezes maior que a mais rápida taxa de transporte mediada por qualquer proteína carreadora conhecida. Entretanto, os canais não podem ser acoplados a uma fonte de energia para realizar transporte ativo, logo o transporte que é mediado por eles é sempre passivo ("morro abaixo"). Assim, a função dos canais iônicos é permitir a difusão rápida de íons inorgânicos específicos – principalmente Na^+, K^+, Ca^{2+} ou C^- – a favor dos seus gradientes eletroquímicos através da bicamada lipídica. Como veremos, a habilidade de controlar o fluxo de íons por esses canais é essencial para muitas funções celulares. As células nervosas (neurônios), em particular, são especialistas no uso de canais iônicos, e consideraremos como elas utilizam muitos canais diferentes para receber, conduzir e transmitir sinais.

Os canais iônicos são íon-seletivos e flutuam entre os estados aberto e fechado

Duas propriedades importantes distinguem canais iônicos de simples poros aquosos. Primeiro, eles mostram *seletividade a íons*, permitindo a passagem de alguns íons inorgânicos, mas não de outros. Isso sugere que seus poros devem ser estreitos o suficiente em determinados pontos para forçar os íons permeáveis a um contato íntimo com as paredes do canal de tal forma que somente os íons de tamanho e carga apropriados podem passar. Os íons permeáveis devem perder todas ou a maioria das moléculas de água associadas a eles para passar, geralmente em fila única, através da parte mais estreita do canal, a qual é chamada de *filtro de seletividade*, o que limita sua taxa de passagem (**Figura 11-20**). Assim, quando as

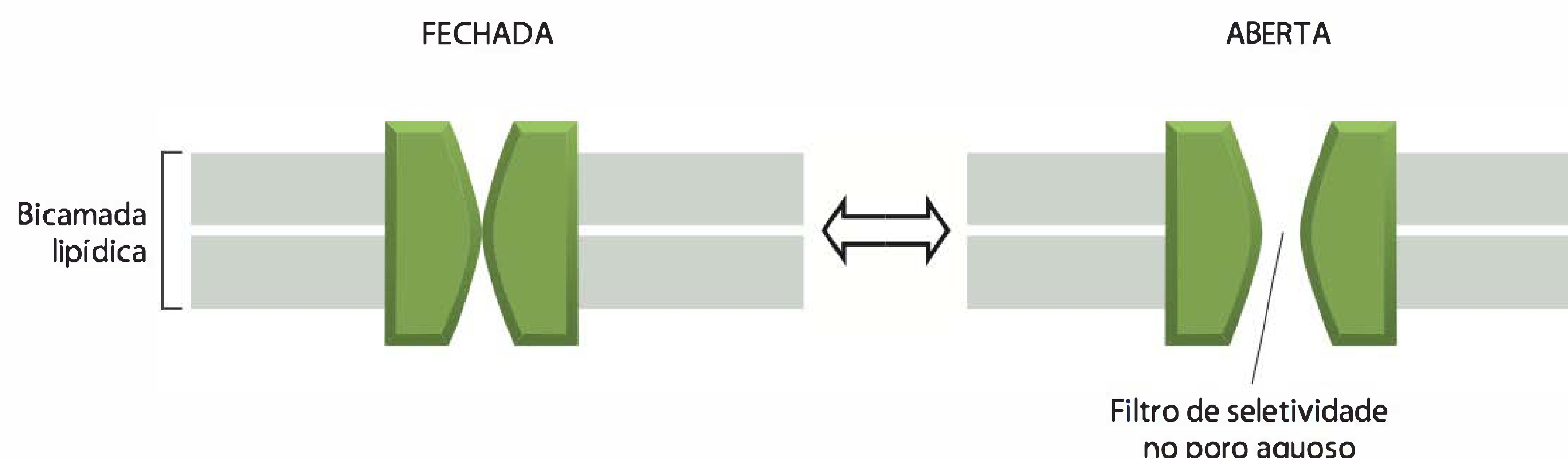


Figura 11-20 Canal iônico típico que flutua entre as conformações aberta e fechada. A proteína de canal mostrada aqui em secção transversal forma um poro hidrofílico através da bicamada lipídica somente no estado conformacional "aberto". Grupos polares parecem revestir a parede do poro, enquanto cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos interagem com a bicamada lipídica (não-mostrado). O poro afunila para dimensões atômicas em uma região (o filtro de seletividade) em que a seletividade iônica do canal é basicamente determinada.

concentrações iônicas são aumentadas, o fluxo de íons através de um canal aumenta proporcionalmente e então estabiliza (saturação) a uma taxa máxima.

A segunda distinção importante entre os canais iônicos e os poros aquosos simples é que os canais iônicos não estão abertos continuamente. Em vez de estarem sempre abertos, eles são *controlados* (*gated*), o que lhes permite abrir por um breve tempo e então fechar novamente (**Figura 11-21**). Além disso, sob estímulo (químico ou elétrico) prolongado, a maioria dos canais passa para um estado fechado "dessensibilizado" ou "inativado", no qual eles estão refratários para posterior abertura até a remoção do estímulo, como discutido adiante. Na maioria dos casos, o canal se abre em resposta a um estímulo específico. Os principais tipos de estímulos conhecidos por causar a abertura de canais iônicos são uma mudança na voltagem através da membrana (*canais controlados por voltagem*), um estresse mecânico (*canais controlados mecanicamente*) ou a ligação de um ligante (*canais controlados por ligante*). O ligante pode ser tanto um mediador extracelular – especificamente um neurotransmissor (*canais controlados por transmissor*) – quanto um mediador intracelular, como um íon (*canais controlados por íons*) ou um nucleotídeo (*canais controlados por nucleotídeos*). A atividade de muitos canais iônicos é regulada, além disso, por fosforilação e desfosforilação de uma proteína; esse tipo de regulação de canal é discutida no Capítulo 15, juntamente com canais iônicos controlados por nucleotídeos.

Mais de 100 tipos de canais iônicos foram descritos até agora, e novos tipos ainda estão sendo adicionados à lista, cada um deles caracterizado pelos íons que conduz, pelo mecanismo através do qual é controlado e por sua abundância e localização celular. Os canais iônicos são responsáveis pela excitabilidade elétrica de células musculares e medeiam a maioria das formas de sinalização elétrica no sistema nervoso. Um único neurônio deve conter, tipicamente, 10 ou mais tipos de canais iônicos localizados em diferentes domínios da sua membrana plasmática. Contudo, os canais iônicos não estão restritos a células excitáveis eletricamente. Eles estão presentes em todas as células animais e são encontrados em células vegetais e micro-organismos: eles propagam a resposta de fechamento de folha da planta mimosa sensitiva, por exemplo, e permitem que o organismo unicelular *Paramecium* reverta sua direção após uma colisão.

Talvez os canais iônicos mais comuns sejam aqueles principalmente permeáveis a K^+. Esses canais são encontrados na membrana plasmática de praticamente todas as cé-

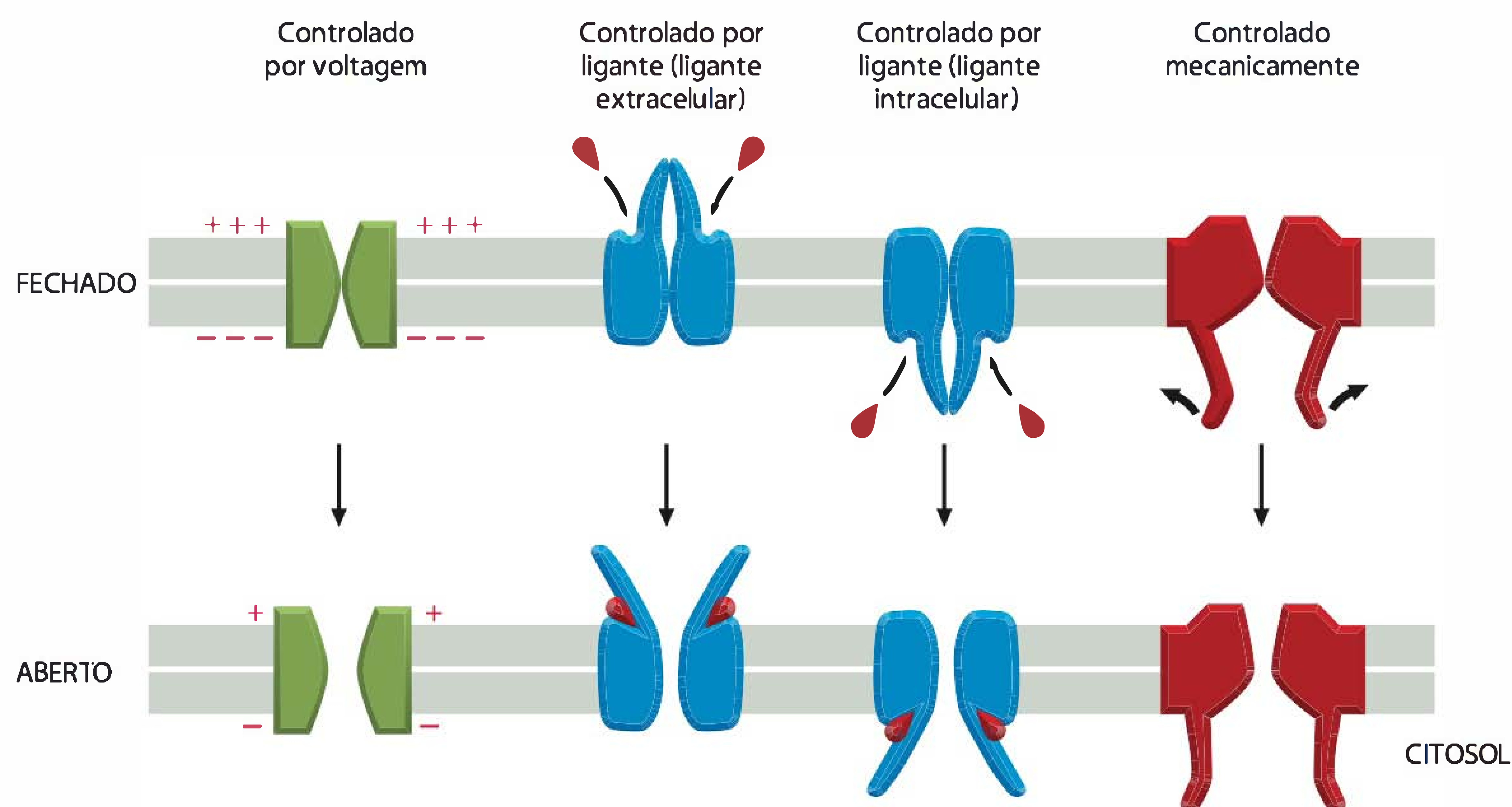


Figura 11-21 Controle de canais iônicos. Esse desenho ilustra diferentes tipos de estímulos que abrem canais iônicos. Os canais controlados mecanicamente em geral apresentam extensões citoplasmáticas que ligam o canal ao citoesqueleto (não-mostrado).

lulas animais. Um importante subconjunto de canais de K^+ está aberto mesmo em células não-estimuladas ou "em repouso", e estes canais são, portanto, algumas vezes denominados **canais de escape de K^+**. Embora esse termo cubra vários tipos diferentes de canais de K^+, dependendo do tipo celular, eles têm um objetivo comum. Por tornarem a membrana plasmática muito mais permeável ao K^+ que a outros íons, eles possuem um papel crucial na manutenção do potencial de membrana através de todas as membranas plasmáticas.

O potencial de membrana em células animais depende principalmente dos canais de escape de K^+ e do gradiente de K^+ através da membrana plasmática

Um **potencial de membrana** origina-se quando existe uma diferença na carga elétrica entre os dois lados de uma membrana devido a um leve excesso de íons positivos sobre os negativos em um lado e a um leve déficit no outro. Tais diferenças de carga podem resultar tanto de bombeamento eletrogênico ativo (ver p. 662) quanto de difusão passiva de íons. Como discutido no Capítulo 14, a maior parte do potencial de membrana de uma mitocôndria é gerada por bombas eletrogênicas de H^+ na membrana mitocondrial interna. As bombas eletrogênicas também geram a maior parte do potencial elétrico através da membrana plasmática em plantas e em fungos. Em células animais típicas, entretanto, os movimentos passivos de íons contribuem com a maior parte do potencial elétrico através da membrana plasmática.

Como explicado anteriormente, a bomba de Na^+-K^+ auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico através da membrana celular animal, por baixar a concentração intracelular de Na^+. Uma vez que existe pouco Na^+ dentro da célula, outros cátions devem ser abundantes nela, para equilibrar a carga associada aos ânions fixos da célula – as moléculas orgânicas carregadas negativamente que estão confinadas no interior celular. A manutenção do equilíbrio é realizada predominantemente pelo K^+, que é bombeado ativamente para dentro da célula pela bomba de Na^+-K^+ e pode, também, mover-se livremente para o interior ou para o exterior pelos *canais de vazamento (ou canais de escape) de K^+* na membrana plasmática. Por causa da presença desses canais, o K^+ quase alcança o equilíbrio, onde uma força elétrica exercida por um excesso de cargas negativas que atraem K^+ para a célula contrabalança a tendência de vazamento de K^+ para fora a favor do seu gradiente de concentração. O potencial de membrana é a manifestação dessa força elétrica, e seu valor de equilíbrio pode ser calculado a partir da magnitude do gradiente de concentração de K^+. A discussão a seguir pode auxiliar a tornar esse mecanismo mais claro.

Suponha que não exista inicialmente um gradiente de voltagem através da membrana plasmática (o potencial de membrana é zero), mas a concentração de K^+ é alta no interior e baixa no exterior celular. O K^+ tenderá a deixar a célula pelos canais de vazamento de K^+, movido pelo seu gradiente de concentração. Como o K^+ move-se para fora, ele deixa para trás uma carga negativa não-equilibrada, criando, portanto, um campo elétrico, ou potencial de membrana, que tenderá a opor-se a mais efluxo de K^+. O efluxo líquido de K^+ termina quando o potencial de membrana atinge um valor no qual essa força elétrica motriz no K^+ equilibra exatamente o efeito do seu gradiente de concentração – ou seja, quando o gradiente eletroquímico é zero para o K^+. Embora os íons Cl^- também se equilibrem através da membrana, o potencial de membrana deixa a maior parte desses íons no exterior celular, pois sua carga é negativa.

A condição de equilíbrio, na qual não existe fluxo líquido de íons através da membrana plasmática, define o **potencial de repouso de membrana** para essa célula idealizada. Uma fórmula simples, mas muito importante, a **equação de Nernst**, expressa quantitativamente a condição de equilíbrio e, como explicado no **Painel 11-2**, torna possível calcular o potencial de repouso de membrana teórico se a razão das concentrações interna e externa é conhecida. Como a membrana plasmática de uma célula real não é exclusivamente permeável a K^+ e Cl^-, entretanto, o real potencial de membrana em repouso não é exatamente igual ao previsto pela equação de Nernst para K^+ ou Cl^-.

O potencial de repouso decai lentamente quando a bomba de Na^+-K^+ para

O número de íons que deve ser movido através da membrana plasmática para gerar o potencial de membrana é pequeno. Assim, pode-se pensar no potencial de membrana como sendo formado de movimentos de carga que praticamente não afetam as *concentrações* de

EQUAÇÃO DE NERNST E FLUXO IÔNICO

O fluxo de qualquer íon por uma proteína de canal da membrana é dirigido pelo gradiente eletroquímico do íon. Esse gradiente representa a combinação de duas influências: o gradiente de voltagem e o gradiente de concentração do íon através da membrana. Quando essas duas influências equilibram uma à outra, o gradiente eletroquímico para o íon é zero e não existe fluxo líquido do íon pelo canal. O gradiente de voltagem (potencial de membrana) no qual esse equilíbrio é atingido é chamado de potencial de equilíbrio para o íon. Ele pode ser calculado a partir da uma equação derivada abaixo, denominada equação de Nernst.

A equação de Nernst é

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

onde

- V = potencial de equilíbrio em volts (potencial interno menos potencial externo)
- C_o e C_i = concentrações externa e interna do íon, respectivamente
- R = constante gasosa (2 cal mol^{-1} K^{-1})
- T = temperatura absoluta (K)
- F = constante de Faraday ($2,3 \times 10^4$ cal V^{-1} mol^{-1})
- z = valência (carga) do íon
- ln = logaritmo na base e

A equação de Nernst é derivada como segue:

A molécula em solução (um soluto) tende a mover-se de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração simplesmente devido a movimentos aleatórios das moléculas, que resultam em seu equilíbrio. Consequentemente, o movimento a favor de um gradiente de concentração é acompanhado por uma mudança favorável de energia livre ($\Delta G < 0$), enquanto o movimento contra o gradiente de concentração é acompanhado por uma mudança desfavorável de energia livre ($\Delta G > 0$). (A energia livre é introduzida no Capítulo 2 e discutida no contexto das reações redox no Painel 14-1, p. 830.)

A mudança de energia livre por mol de soluto movido através da membrana plasmática (ΔG_{conc}) é igual a $-RT \ln C_o / C_i$.

Se o soluto é um íon, o seu deslocamento para uma célula através de uma membrana cujo interior apresenta uma voltagem V em relação ao exterior causará uma mudança adicional de energia livre (por mol de soluto deslocado) de $\Delta G_{volt} = zFV$.

No ponto em que os gradientes de concentração e voltagem estão em equilíbrio,

$$\Delta G_{conc} + \Delta G_{volt} = 0$$

e a distribuição iônica está em equilíbrio através da membrana.

Assim,

$$zFV - RT \ln \frac{C_o}{C_i} = 0$$

e, consequentemente,

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

ou, usando a constante que converte logaritmos naturais à base 10,

$$V = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}.$$

Para um íon univalente,

$$2,3 \frac{RT}{F} = 58 \text{ mV a } 20°C \quad e \quad 61,5 \text{ mV a } 37°C$$

Assim, para tal íon a 37°C,

$$V = +61,5 \text{ mV para } C_o / C_i = 10,$$

enquanto

$$V = 0 \text{ para } C_o / C_i = 1.$$

O potencial de equilíbrio de K^+ (V_K), por exemplo, é

61,5 $\log_{10}([K^+]_o / [K^+]_i)$ millivolts

(−89 mV para uma célula típica onde $[K^+]_o$ = 5 mM e $[K^+]_i$ = 140 mM).

No V_K, não existe fluxo líquido de K^+ através da membrana.

Semelhantemente, quando o potencial de membrana apresenta um valor de

61,5 $\log_{10}([Na^+]_o/[Na^+]_i)$,

o potencial de equilíbrio de Na^+ (V_{Na}),

não existe fluxo líquido de Na^+.

Para qualquer potencial de membrana, V_M, a força líquida que tende a mover um tipo particular de íon para o exterior celular, é proporcional à diferença entre V_M e o potencial de equilíbrio para o íon: portanto,

para K^+ é $V_M - V_K$

e para Na^+ é $V_M - V_{Na}$.

O número de íons que irá formar a camada de cargas adjacente à membrana é extremamente pequeno comparado ao número total no interior celular. Por exemplo, o movimento de 6 mil íons de Na^+ através de 1 μm^2 de membrana carregará carga suficiente para alterar o potencial de membrana em cerca de 100 mV.

Uma vez que existem cerca de 3×10^7 Na^+ em uma célula típica (1 μm^3 de citoplasma), tal movimento de carga irá gerar um efeito insignificante nos gradientes de concentração iônicos através da membrana.

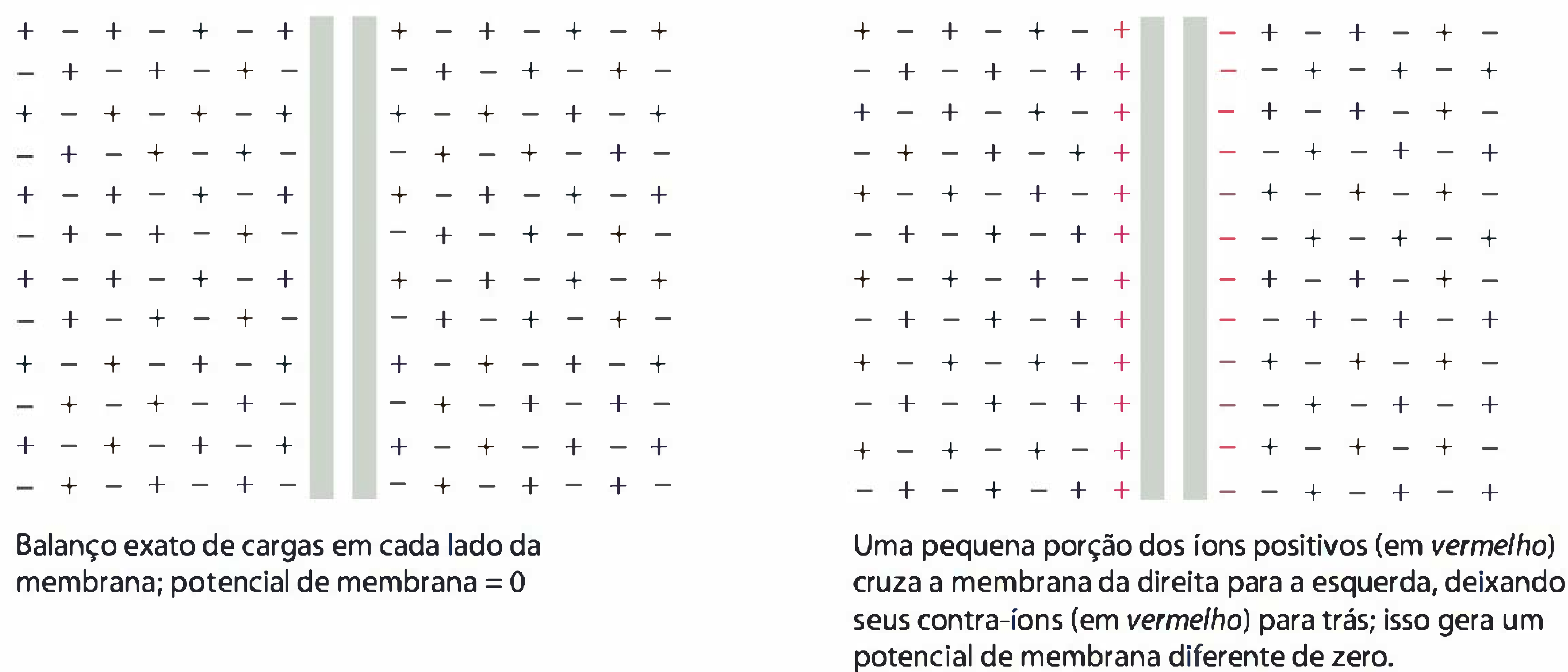


Figura 11-22 Bases iônicas de um potencial de membrana. Um pequeno fluxo de íons conduz carga suficiente para causar uma grande mudança no potencial de membrana. Os íons que dão origem ao potencial de membrana consistem em uma fina camada (< 1 nm) na superfície próxima à membrana, lá mantidos por sua atração elétrica aos seus contra-íons com carga oposta do outro lado da membrana. Para uma célula típica, 1 microcoulomb de carga (6×10^{12} íons monovalentes) por centímetro quadrado de membrana, transferido de um lado a outro da membrana, muda o potencial em aproximadamente 1 V. Isso significa, por exemplo, que em uma célula esférica de 10 μm de diâmetro, o número de íons K^+ que deve fluir para o exterior para alterar o potencial de membrana em 100 mV é somente cerca de 1/100.000 do número total de íons K^+ no citosol.

íons, o que resulta em uma pequena diferença no número de íons positivos e negativos nos dois lados da membrana (**Figura 11-22**). Além disso, esses movimentos de carga geralmente são rápidos, ocorrendo em poucos milissegundos ou menos.

Considere a alteração no potencial de membrana em uma célula real se a bomba de Na^+-K^+ é bruscamente inativada. Imediatamente ocorre uma leve queda no potencial de membrana. Isso se deve ao fato de a bomba ser eletrogênica e, quando ativa, dar uma pequena contribuição direta ao potencial de membrana através do bombeamento para fora de três Na^+ para cada dois K^+ que são bombeados para dentro. Todavia, o desligamento da bomba não elimina o principal componente do potencial de repouso, que é gerado pelo mecanismo de equilíbrio do K^+ mencionado anteriormente. Esse componente do potencial de membrana persiste enquanto a concentração de Na^+ estiver baixa e a de K^+ alta no interior celular – normalmente por muitos minutos. Contudo, a membrana plasmática é um tanto permeável a todos os pequenos íons, incluindo o Na^+. Portanto, sem a bomba de Na^+-K^+, os gradientes de íons gerados pelo bombeamento finalmente diminuirão, e o potencial de membrana estabelecido pelos canais de difusão de K^+ diminuirá também. Conforme o Na^+ entra, o balanço osmótico é perturbado, e a água penetra a célula (ver Painel 11-1, p. 664), e a célula eventualmente assume um novo estado de repouso no qual Na^+, K^+ e Cl^- estão todos em equilíbrio através da membrana. O potencial de membrana nesse estado é muito menor do que era na célula normal com uma bomba de Na^+-K^+ ativa.

O potencial de repouso de uma célula animal varia entre −20 mV e −120 mV, dependendo do organismo e do tipo celular. Embora o gradiente de K^+ tenha sempre uma influência predominante neste potencial, os gradientes de outros íons (e os efeitos de desequilíbrio das bombas de íons) também têm um efeito significativo: quanto mais permeável for a membrana a um determinado íon, mais fortemente o potencial de membrana tende a ser dirigido para o valor de equilíbrio desse íon. Como consequência, mudanças na permeabilidade de uma membrana a íons podem provocar mudanças significativas no potencial de membrana. Esse é um dos princípios-chave que relaciona a excitabilidade elétrica de células às atividades de canais iônicos.

Para compreender como os canais iônicos selecionam seus íons e como são abertos e fechados, é necessário conhecer sua estrutura atômica. O primeiro canal iônico a ser cristalizado e estudado por difração de raios X foi um canal de K^+ bacteriano. Os detalhes da sua estrutura revolucionaram o nosso entendimento sobre os canais iônicos.

A estrutura tridimensional de um canal de K^+ bacteriano mostra como um canal iônico pode funcionar

A notável habilidade dos canais iônicos de combinar seletividade iônica fina e uma alta condutância tem intrigado os cientistas. Os canais de vazamento de K^+, por exemplo, conduzem K^+ 10 mil vezes melhor que Na^+, embora os dois íons sejam esferas sem características distintivas, com diâmetros similares (0,133 nm e 0,095 nm, respectivamente). Uma única substituição de aminoácido no poro de um canal de K^+ de uma célula animal pode resultar em uma perda de seletividade iônica e em morte celular. A seletividade normal pelo K^+ não pode ser explicada pelo tamanho do poro, pois o Na^+ é menor que o K^+. Além disso, a alta velocidade de condutância é incompatível com a possibilidade de o canal ter sítios seletivos de ligação a K^+, com alta afinidade, uma vez que a ligação de íons K^+ em tais sítios tornaria muito lenta sua passagem.

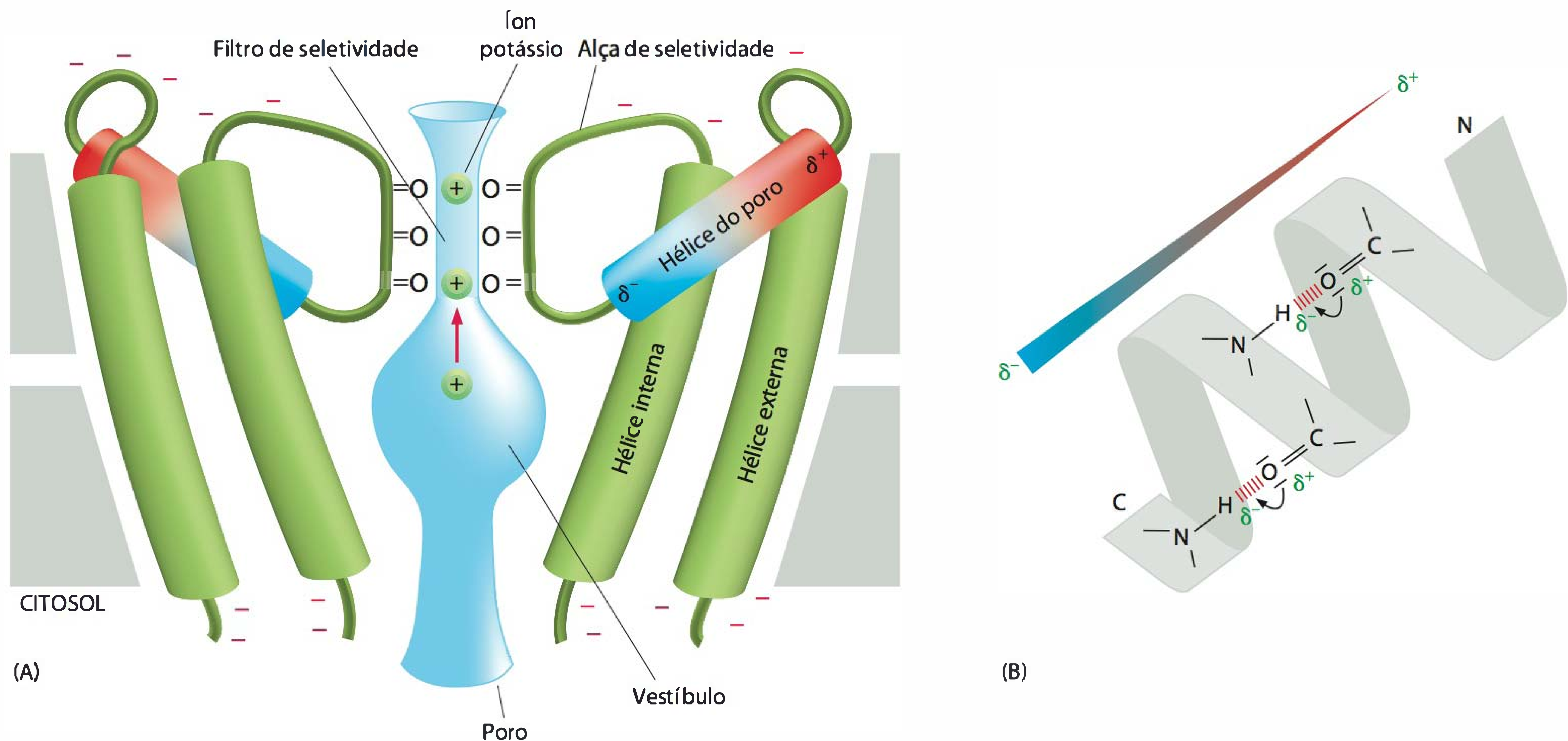


Figura 11-23 Estrutura de um canal de K^+ bacteriano. (A) Duas hélices α transmembrana de apenas duas das quatro subunidades idênticas são mostradas. A partir do lado citosólico, o poro abre-se em um vestíbulo no meio da membrana. O vestíbulo facilita o transporte, permitindo que os íons K^+ permaneçam hidratados, mesmo quando estão a meio caminho de atravessar a membrana. O estreito filtro de seletividade liga o vestíbulo ao exterior celular. Os oxigênios carbonila revestem as paredes do filtro de seletividade e formam sítios temporários de ligação para desidratar os íons K^+. As posições dos íons K^+ no poro foram determinadas por embebição de cristais da proteína de canal em uma solução contendo íons rubídio, que são mais eletrodensos, mas levemente maiores que os íons K^+; a partir de diferenças nos padrões de difração com íons K^+ e com íons rubídio no canal, as posições dos íons puderam ser calculadas. Dois íons K^+ ocupam sítios no filtro de seletividade, enquanto um terceiro íon K^+ está localizado no centro do vestíbulo, onde está estabilizado por interações elétricas com as extremidades das hélices do poro carregadas mais negativamente. As extremidades das quatro hélices do poro (das quais apenas duas estão ilustradas) apontam precisamente para o centro do vestíbulo, guiando os íons K^+ para o filtro de seletividade. Aminoácidos negativamente carregados (indicados por sinais de menos *vermelhos*) estão concentrados próximo à entrada e à saída do canal. (B) Por causa da polaridade das ligações de hidrogênio (em *vermelho*) que ligam voltas adjacentes de hélices α, cada hélice α tem um dipolo elétrico ao longo do seu eixo, com uma extremidade C-terminal mais negativamente carregada (δ^-) e uma extremidade N-terminal mais positivamente carregada (δ^+). (A, adaptada de D. A. Doyle et al., *Science* 280:69-77, 1998. Com permissão de AAAS.)

Este quebra-cabeça foi resolvido quando a estrutura de um *canal de K^+ bacteriano* foi determinada por cristalografia por raios X. O canal é composto de quatro subunidades transmembrana idênticas que, juntas, formam um poro central através da membrana (**Figura 11-23**). Os aminoácidos carregados negativamente concentrados na entrada citosólica do poro parecem atrair cátions e repelir ânions, tornando o canal cátion-seletivo. Cada subunidade contribui com duas hélices α transmembrana que são inclinadas para o exterior na membrana e, juntas, formam um cone, com sua extremidade larga voltada para o exterior da célula, onde íons K^+ deixam o canal. A cadeia polipeptídica que conecta as duas hélices transmembrana forma uma curta hélice α (*hélice α do poro*) e uma alça essencial que forma uma projeção na seção larga do cone para formar o **filtro de seletividade**. As alças de seletividade das quatro subunidades formam um poro curto, estreito e rígido, revestido pelos átomos de oxigênio carbonila dos seus esqueletos polipeptídicos. Uma vez que as alças de seletividade de todos os canais de K^+ conhecidos apresentam sequências semelhantes de aminoácidos, é provável que elas formem estruturas bastante similares. A estrutura cristalina mostra dois íons K^+ em fila única dentro do filtro de seletividade, separados por cerca de 0,8 nm. A repulsão mútua entre os dois íons parece auxiliar a movê-los através do poro rumo ao fluido extracelular.

A estrutura do filtro de seletividade explica a seletividade iônica fina do canal. Um íon K^+ deve perder quase todas as moléculas de água a ele ligadas para que penetre o filtro, onde ele deverá interagir com os oxigênios carbonila que revestem o filtro de seletividade. Os oxigênios estão rigidamente espaçados a uma distância exata para acomodar um íon K^+. Um íon Na^+, ao contrário, não pode entrar no filtro porque os oxigênios carbonila estão demasiadamente afastados para que o íon Na^+ menor consiga compensar o consumo de energia associado com a perda de moléculas de água necessária para a entrada (**Figura 11-24**).

Os estudos estruturais de canais de K^+ e de outros canais também indicaram os princípios gerais de abertura e fechamento desses canais. Esse controle parece envolver o movimento de hélices na membrana de tal forma que elas obstruem (no estado fechado) ou libe-

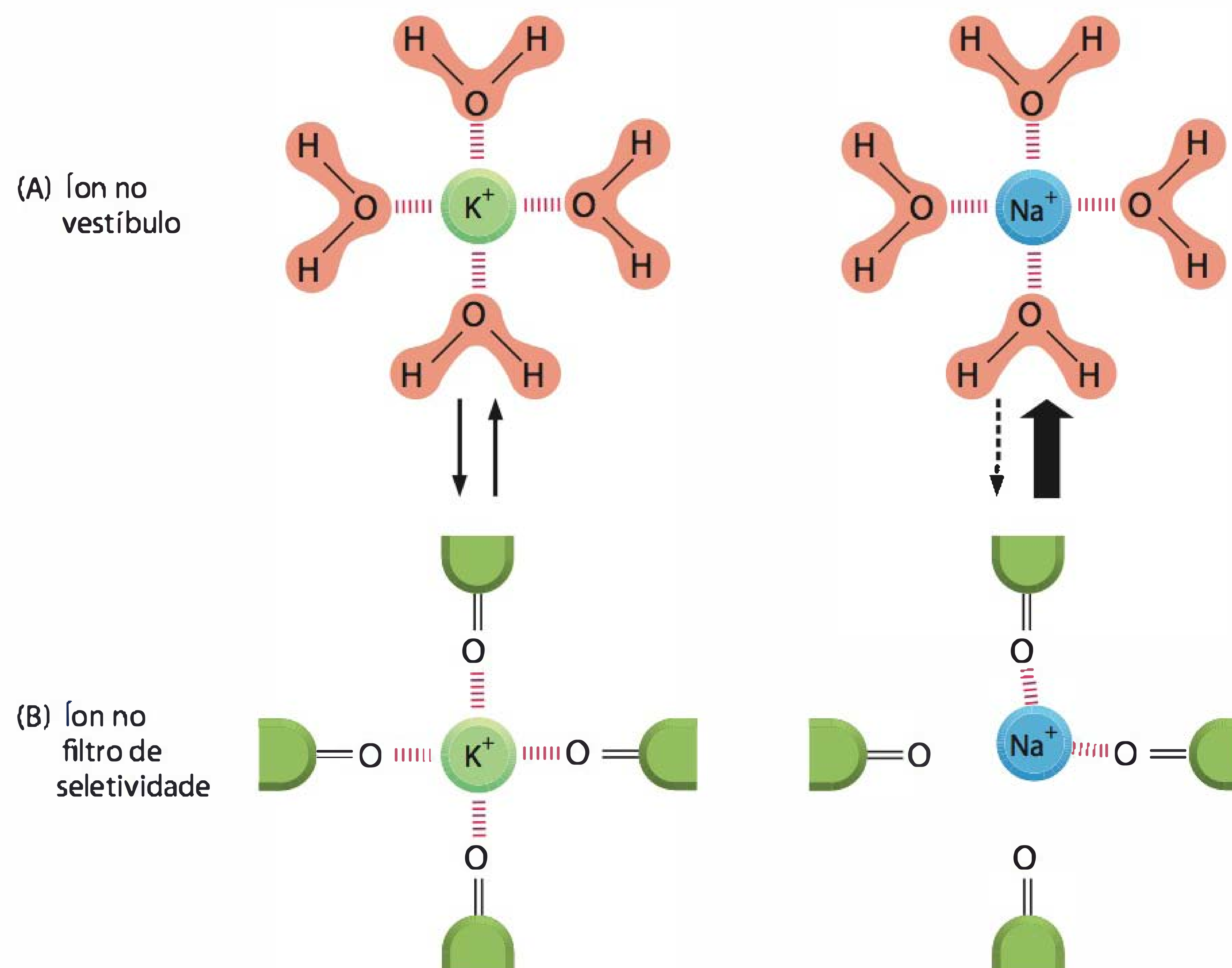


Figura 11-24 Especificidade do filtro de seletividade ao K^+ em um canal de K^+. O desenho mostra íons K^+ e Na^+ no vestíbulo (A) e no filtro de seletividade (B) do poro, visto em secção transversal. No vestíbulo, os íons estão hidratados. No filtro de seletividade, eles estão sem água e os oxigênios carbonila estão precisamente colocados para acomodar um íon K^+ desidratado. A desidratação do íon K^+ requer energia, que é precisamente balanceada pela energia reobtida pela interação do íon com os oxigênios carbonila que servem como substitutos das moléculas de água. Pelo fato de os íons Na^+ serem pequenos demais para interagir com os oxigênios, eles podem entrar no filtro de seletividade somente com grande gasto energético. Portanto, o filtro seleciona íons K^+ com alta especificidade. (Adaptada de D. A. Doyle et al., *Science* 280:69-77, 1998. Com permissão de AAAS.)

ram (no estado aberto) o caminho para a passagem dos íons. Dependendo do tipo particular de canal, acredita-se que as alças sejam capazes de sofrer uma inclinação, uma rotação ou um tombamento durante o processo de controle da abertura. A estrutura de uma canal de K^+ fechado mostra que, através da inclinação das hélices internas, o poro sofre uma constrição semelhante a um diafragma na sua extremidade citosólica (**Figura 11-25**). Embora o poro não se feche completamente, a pequena abertura que permanece é revestida pelas cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos que bloqueiam a entrada dos íons.

A maioria dos canais iônicos é construída a partir de múltiplas subunidades idênticas, cada uma das quais contribuindo para a formação do poro central comum. No entanto, a estrutura de um canal de Cl^- recentemente cristalizada revelou que alguns canais iônicos são construídos de forma bastante distinta. Apesar de a proteína ser um dímero formado a partir de duas subunidades idênticas, cada uma das subunidades possui seu próprio poro através do qual os íons Cl^- podem se mover. No centro da membrana, cadeias laterais de aminoácidos formam um filtro seletivo, o qual apresenta um conceito similar ao de canais de K^+. No entanto, de forma distinta do filtro dos canais de K^+, diferentes regiões da proteína contribuem com cadeias laterais, as quais não estão simetricamente organizadas (**Figura 11-26**).

As aquaporinas são permeáveis à água, mas impermeáveis a íons

Discutimos anteriormente que as células de eucariotos e procariotos possuem **canais de água**, ou **aquaporinas**, inseridos em suas membranas plasmáticas com o intuito de permitir um fluxo fácil de água através da membrana. As aquaporinas são especialmente abundantes nas células que devem transportar água sob taxas particularmente altas, como é o caso das células epiteliais dos rins.

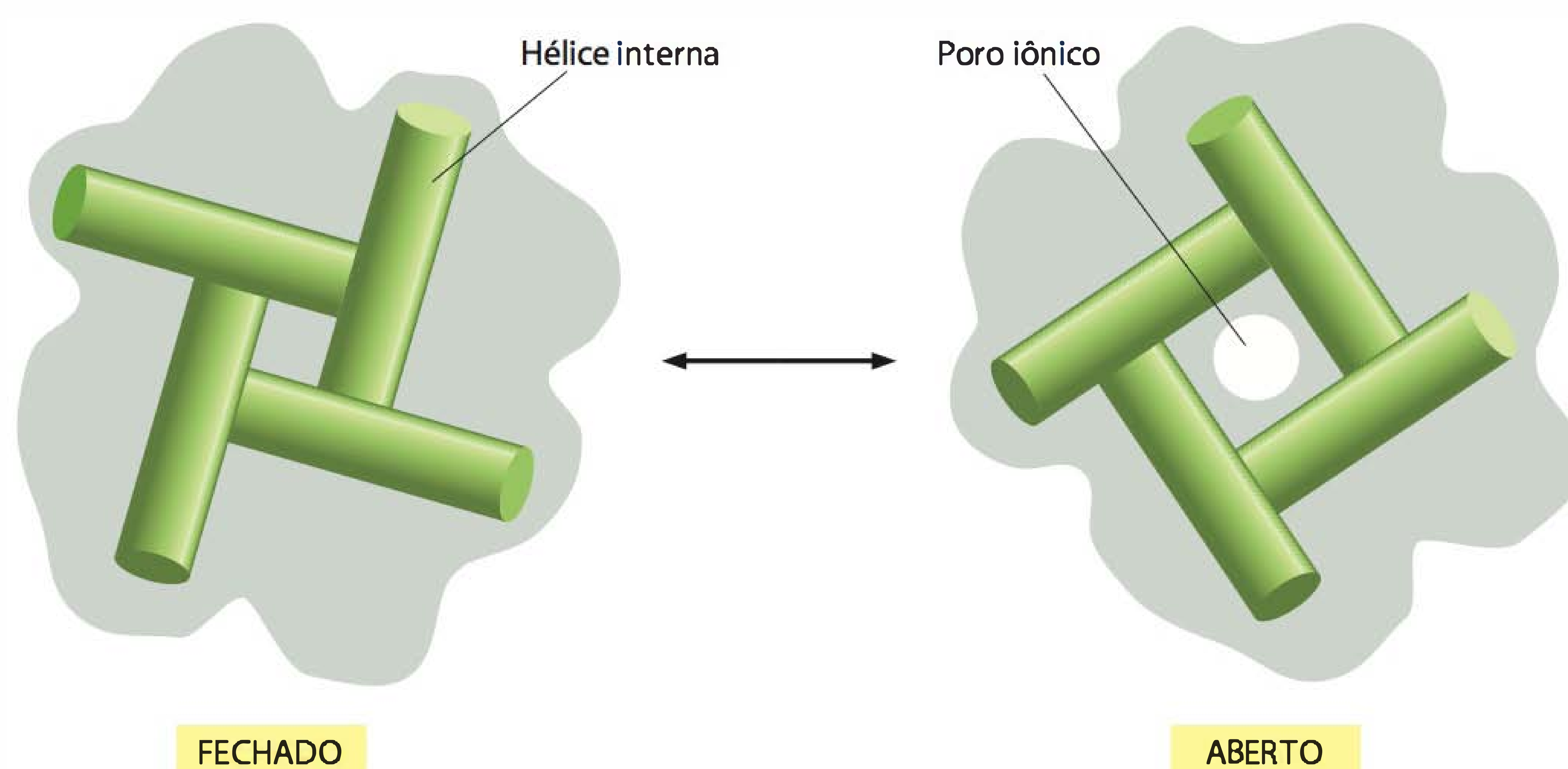


Figura 11-25 Modelo para o controle de um canal de K^+ bacteriano. O canal é visto em secção transversal. Para adotar a conformação fechada, as quatro hélices transmembrana internas que revestem o poro no lado citosólico do filtro de seletividade (ver Figura 11-23) rearranjam-se para fechar a entrada citosólica do canal. (Adaptada de E. Perozo et al., *Science* 285:73-78, 1999. Com permissão de AAAS.)

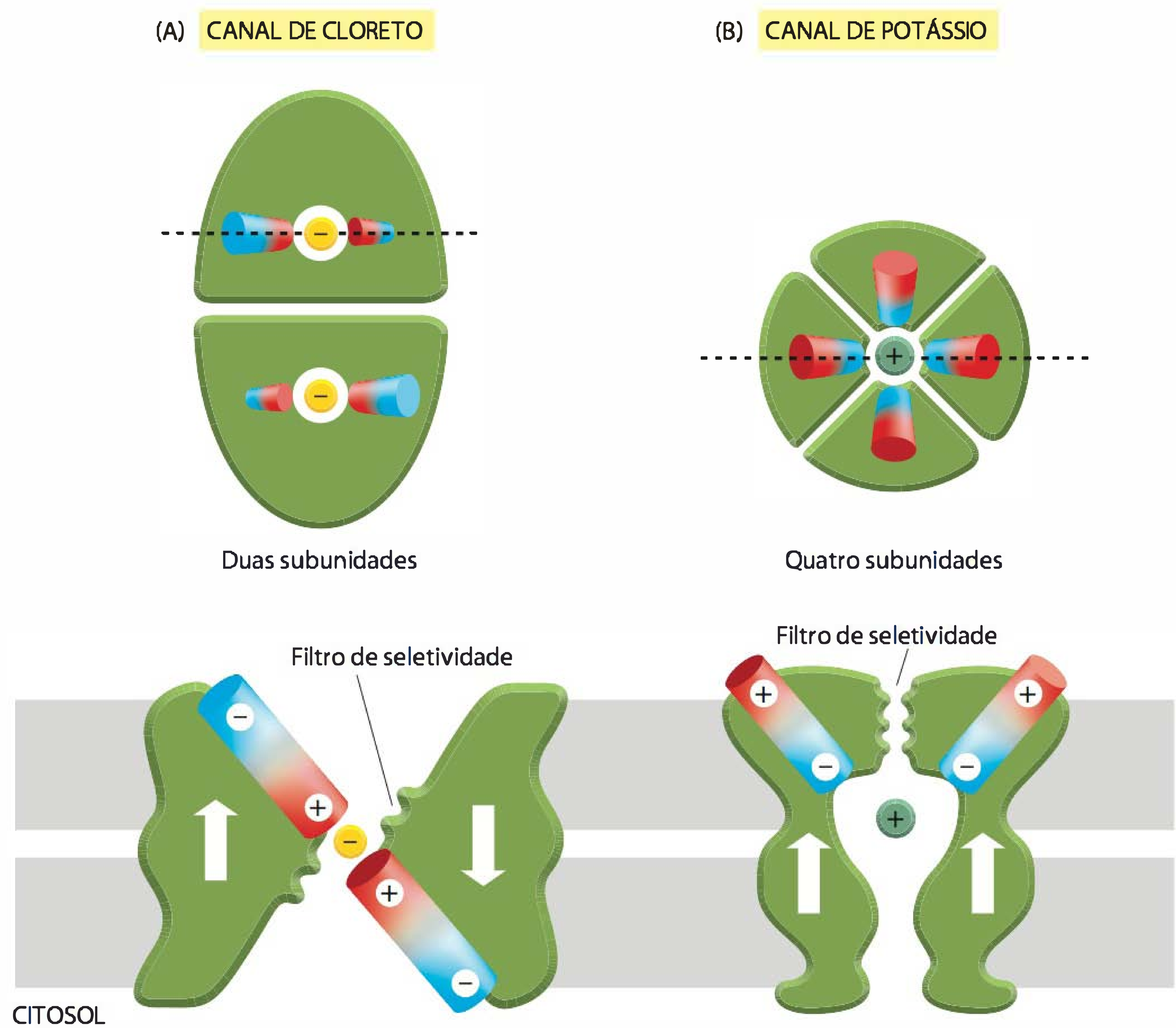


Figura 11-26 Comparação das arquiteturas dos canais de Cl^- e de K^+. (A) O canal de Cl^- é um dímero de "canal duplo" formado a partir de duas subunidades idênticas, cada qual contendo seu próprio poro condutor de íons. O desenho superior é uma visão esquemática da face extracelular do canal, mostrando os dois poros condutores de íons idênticos. O desenho inferior mostra uma secção transversal através de uma subunidade, no interior da membrana. (A *linha preta tracejada* no desenho superior indica o plano de secção.) A subunidade é uma cadeia polipeptídica única que consiste em duas porções, as quais, apesar de similares, atravessam a membrana com orientações opostas (*setas brancas*): cada porção contribui com uma hélice de poro orientada de tal forma que sua extremidade positivamente carregada aponta para o filtro de seletividade posicionado ao centro. Ambos os elementos, o filtro de seletividade e as hélices dipolo, contribuem para a seletividade do canal em relação a íons Cl^- negativamente carregados. (B) Em contraste, o canal de K^+ é um tetrâmero composto a partir de quatro subunidades idênticas, cada uma delas contribuindo para o poro centralmente posicionado. Todas as quatro subunidades apresentam a mesma orientação na membrana (*setas brancas*). Quatro hélices de poro, uma derivada de cada subunidade, apontam suas extremidades negativamente carregadas rumo ao vestíbulo, estabilizando um íon K^+ positivamente carregado (ver também Figura 11-23). (Desenhos inferiores A e B, adaptados de R. Dutzler et al., *Nature* 415:287-294, 2002. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As aquaporinas devem resolver um problema que é o oposto daquele enfrentado pelos canais iônicos. Para evitar a disrupção de gradientes iônicos através das membranas, elas devem permitir a rápida passagem de moléculas de água ao mesmo tempo em que devem impedir completamente a passagem de íons. A estrutura cristalina de uma aquaporina revelou como ela atinge essa incrível seletividade. Os canais possuem um poro estreito que permite que as moléculas de água atravessem em fila única, seguindo o caminho de oxigênios carbonila que revestem um dos lados do poro (**Figura 11-27**A e B). Aminoácidos hidrofóbicos revestem o outro lado do poro. O poro é demasiadamente estreito para que qualquer íon hidratado possa penetrar, e o custo energético de desidratação de um íon é demasiadamente grande, pois a parede hidrofóbica do poro não pode interagir com um íon desidra-

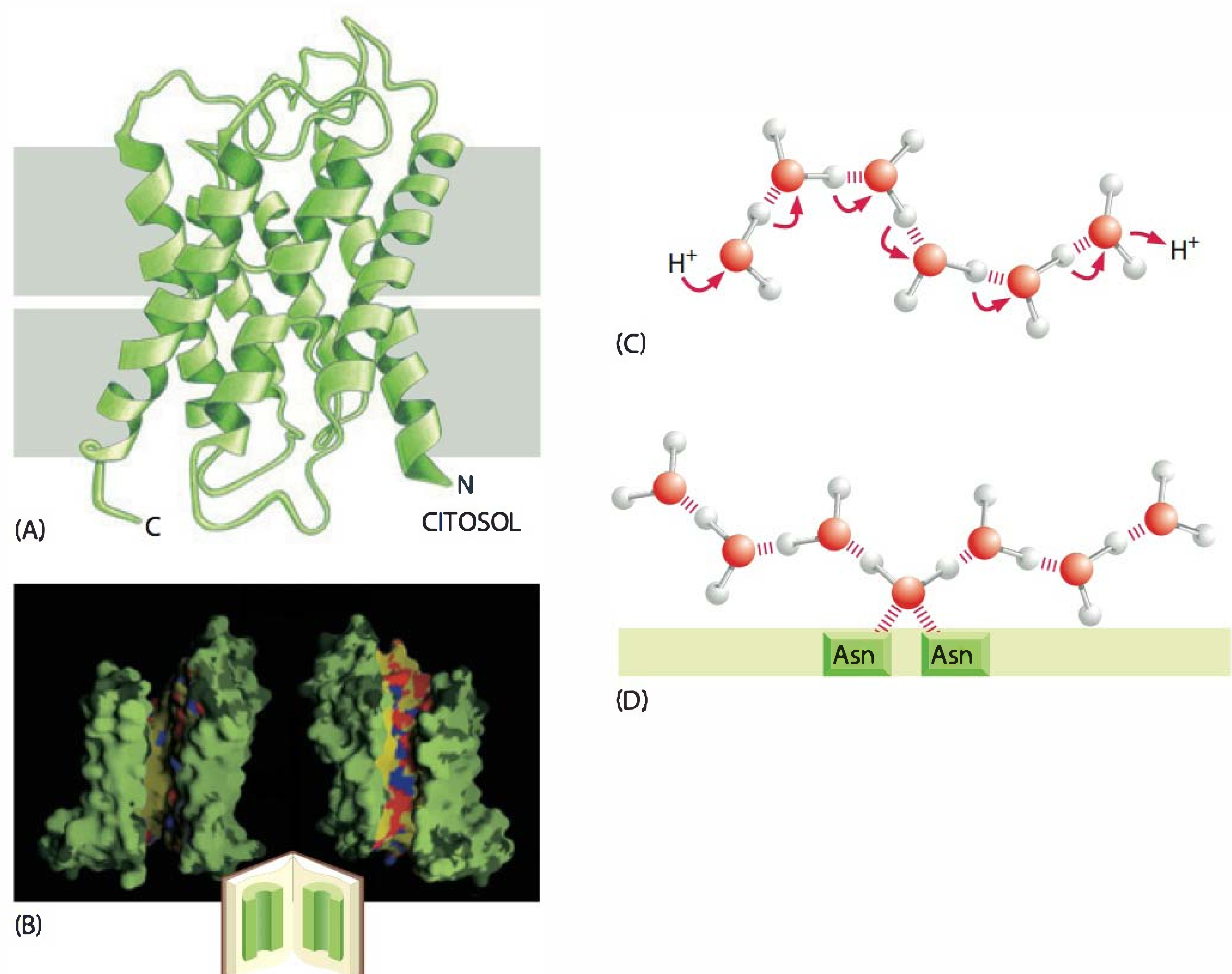


Figura 11-27 Estrutura das aquaporinas. (A) Diagrama de um monômero de aquaporina. Na membrana, as aquaporinas formam tetrâmeros, e cada monômero contém um poro em sua região central (não-mostrado). (B) Modelo de um monômero de aquaporina cortado e aberto como um livro para permitir a visualização do poro interno. Os aminoácidos hidrofílicos que revestem os poros estão coloridos em *vermelho* e *azul*, ao passo que os aminoácidos hidrofóbicos que revestem o poro estão coloridos em *amarelo*. Os aminoácidos que não estão envolvidos na formação do poro estão representados em *verde*. Observe que uma das faces do poro é revestida por aminoácidos hidrofílicos, que fornecem ligações de hidrogênio transientes para as moléculas de água; essas ligações auxiliam no estabelecimento de uma fila linear de moléculas de água que transitam orientadas através da membrana. Em contraste, o outro lado do poro é destituído de tais aminoácidos, fornecendo uma *lateral hidrofóbica* que não permite o estabelecimento de ligações de hidrogênio. (C e D) Um modelo que explica por que as aquaporinas são impermeáveis a H^+. (C) Na água, o H^+ se difunde extremamente rápido por meio de sua passagem de uma molécula de água para a outra. (D) Duas asparaginas estrategicamente posicionadas no centro de cada poro de aquaporina auxiliam a guiar a molécula de água central de tal forma que ambas as valências de seu oxigênio estão ocupadas, impedindo assim a passagem do H^+. (A e B, adaptadas de R. M. Stroud et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:424-431, 2003. Com permissão de Elsevier.)

tado para compensar a perda de água. Este desenho estrutural explica facilmente por que as aquaporinas são incapazes de transportar íons K^+, Na^+, Ca^{2+} ou Cl^-. Para compreender o porquê destes canais serem também impermeáveis a H^+, recorde que a maior parte dos prótons está presente nas células sob a forma de H_3O^+, que se difunde através da água extremamente rápido, usando um mecanismo de revezamento molecular que requer o estabelecimento e a quebra de ligações de hidrogênio entre moléculas adjacentes de água (Figura 11-27C).

As aquaporinas contêm duas asparaginas estrategicamente posicionadas, que se ligam ao átomo de oxigênio central da molécula de água, na fila de moléculas que está atravessando o poro. Visto que ambas as valências deste oxigênio estão indisponíveis para ligação ao hidrogênio, a molécula de água central não pode participar do transporte de revezamento de H^+, e o poro apresenta-se impermeável aos prótons (Figura 11-27C e D).

Alguns canais de água bacterianos similares às aquaporinas também conduzem glicerol e pequenos açúcares, os quais interagem com oxigênios carbonila similarmente posicionados que revestem o poro. Tais contatos transientes estabelecidos pelo soluto com as paredes do poro asseguram a alta especificidade do transporte, sem que haja interferência significativa na velocidade de passagem do soluto. Cada canal individual de aquaporina é capaz de permitir a passagem de 10^9 moléculas de água por segundo.

As células que fazem um uso mais sofisticado de canais são os neurônios. Antes de discutir como estas células usam os canais, faremos uma breve descrição da organização de um neurônio característico.

A função de uma célula nervosa depende de sua estrutura alongada

A tarefa fundamental de um **neurônio**, ou **célula nervosa**, é receber, conduzir e transmitir sinais. Para desempenhar essas funções, os neurônios geralmente são extremamente longos. Uma única célula nervosa humana que se estende da espinha dorsal até um músculo no pé, por exemplo, pode ter mais de 1 m de comprimento. Cada neurônio consiste em um corpo celular (contendo o núcleo) ramificado por várias protuberâncias finas (processos) radiadas para fora dele. Geralmente um longo **axônio** conduz sinais do corpo celular para alvos distantes, e vários **dendritos** curtos e ramificados estendem-se do corpo celular como antenas, fornecendo uma grande área superficial para receber sinais dos axônios de outras células nervosas (**Figura 11-28**), apesar de o próprio corpo celular também receber sinais. O axônio típico divide-se na sua extremidade mais distante em muitas ramificações, passando sua mensagem para muitas células-alvo simultaneamente. Do mesmo modo, o grau de ramificação dos dendritos pode ser muito grande – em alguns casos, suficiente para receber mais de 100 mil sinais de *input* em um único neurônio.

Apesar dos diferentes significados dos sinais transmitidos pelas diferentes classes de neurônios, a forma do sinal é sempre a mesma, consistindo em mudanças no potencial elétrico através da membrana plasmática do neurônio. O sinal se propaga porque um distúrbio elétrico produzido em uma parte da célula é transmitido para outras partes. Tal distúrbio torna-se mais fraco com o aumento da distância da sua fonte, a menos que seja despendida energia para amplificá-lo ao longo da sua trajetória. Em curtas distâncias, essa atenuação não é importante; de fato, muitos neurônios pequenos conduzem seus sinais passivamente, sem amplificação. Para comunicação a longa distância, entretanto, a propagação passiva não é adequada. Assim, os neurônios maiores empregam um mecanismo de sinalização ativa, que é uma das suas características mais marcantes. Um estímulo elétrico que excede

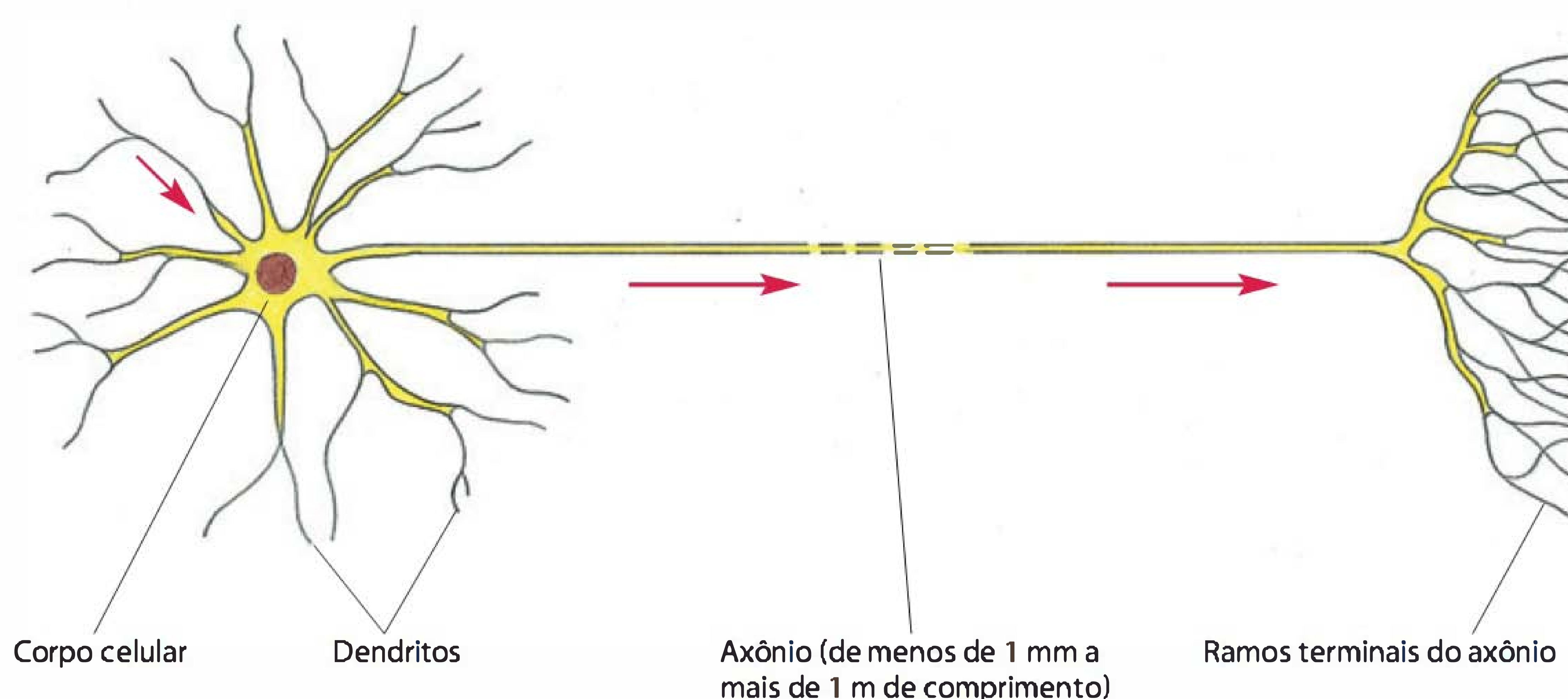


Figura 11-28 Um **neurônio típico de vertebrado.** As setas indicam a direção na qual os sinais são conduzidos. O axônio único conduz sinais para fora do corpo celular, enquanto os múltiplos dendritos (e o corpo celular) recebem sinais dos axônios de outros neurônios. As terminações nervosas findam nos dendritos ou no corpo celular de outros neurônios ou em outros tipos celulares, como células musculares ou glandulares.

uma certa força limiar desencadeia uma explosão de atividade elétrica que é propagada rapidamente ao longo da membrana plasmática do neurônio e é mantida, por amplificação automática, por todo o caminho. Essa onda de excitação elétrica, conhecida como **potencial de ação**, ou *impulso nervoso*, pode carregar uma mensagem, sem atenuação, de uma extremidade à outra de um neurônio a velocidades tão grandes quanto 100 m por segundo ou mais. Os potenciais de ação são a consequência direta das propriedades dos canais de cátions controlados por voltagem, como veremos agora.

Os canais de cátions controlados por voltagem geram potenciais de ação em células eletricamente excitáveis

A membrana plasmática de todas as células eletricamente excitáveis – não somente os neurônios, mas também as células musculares, as endócrinas e os óvulos – contém **canais de cátions controlados por voltagem**, responsáveis pela geração de potenciais de ação. Um potencial de ação é desencadeado por uma *despolarização* da membrana plasmática – ou seja, por uma alteração no potencial de membrana para um valor menos negativo em seu interior. (Veremos adiante como isso pode ser causado pela ação de um neurotransmissor.) Em células nervosas e musculoesqueléticas, um estímulo que cause despolarização o suficiente prontamente provoca a abertura de **canais de Na^+ controlados por voltagem**, permitindo a entrada de uma pequena quantidade de Na^+ na célula a favor do seu gradiente eletroquímico. O influxo de cargas positivas despolariza a membrana ainda mais, abrindo, portanto, mais canais de Na^+, os quais admitem mais íons Na^+, desencadeando mais despolarização. Esse processo de autoamplificação (um exemplo de *retroalimentação positiva*, discutido no Capítulo 15) continua até que, em uma fração de um milissegundo, o potencial elétrico na região local da membrana tenha se deslocado do seu valor de repouso de cerca de −70 mV até quase o potencial de equilíbrio do Na^+, em torno de +50 mV (ver Painel 11-2, p. 670). Nesse ponto, quando a força motriz eletroquímica líquida para o fluxo de Na^+ é quase zero, a célula atingiria um novo estado de repouso, com todos os seus canais de Na^+ permanentemente abertos, se a conformação de abertura do canal fosse estável. A célula é poupada de tal espasmo elétrico permanente por dois mecanismos que atuam em conjunto: a inativação dos canais de Na^+ e a abertura dos canais de K^+ controlados por voltagem.

Os canais de Na^+ possuem um mecanismo automático de inativação, que fecha rapidamente os canais, mesmo que a membrana ainda esteja despolarizada. Os canais de Na^+ permanecem nesse estado *inativado*, incapazes de reabrir, até após o retorno do potencial de membrana a seu valor negativo inicial. O ciclo completo desde o estímulo inicial até o retorno ao estado de repouso original leva poucos milissegundos. O canal de Na^+ pode, portanto, existir em três estados distintos – fechado, aberto e inativado. A **Figura 11-29** ilustra como as alterações de estado contribuem para o aumento e a diminuição do potencial de ação.

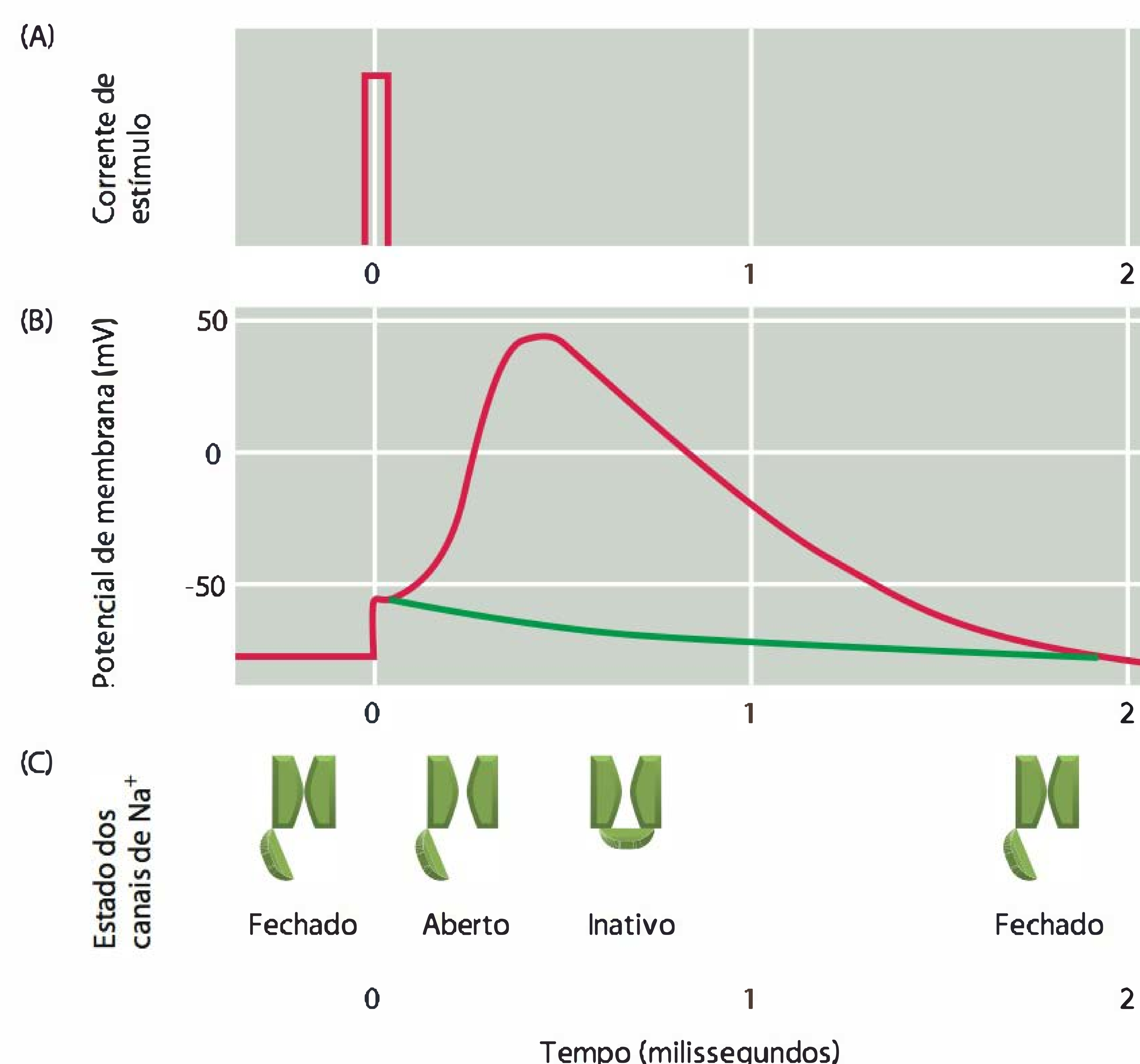
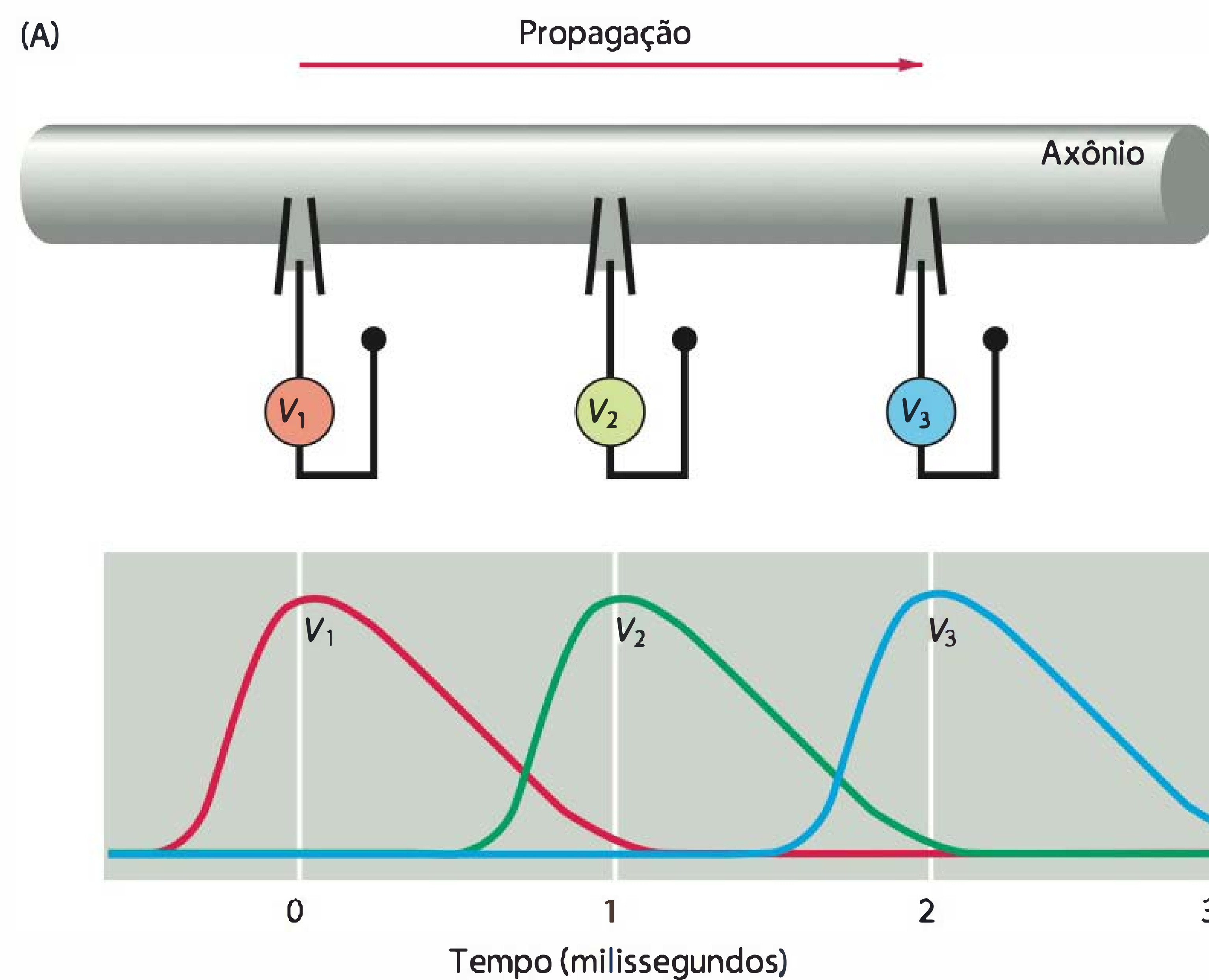
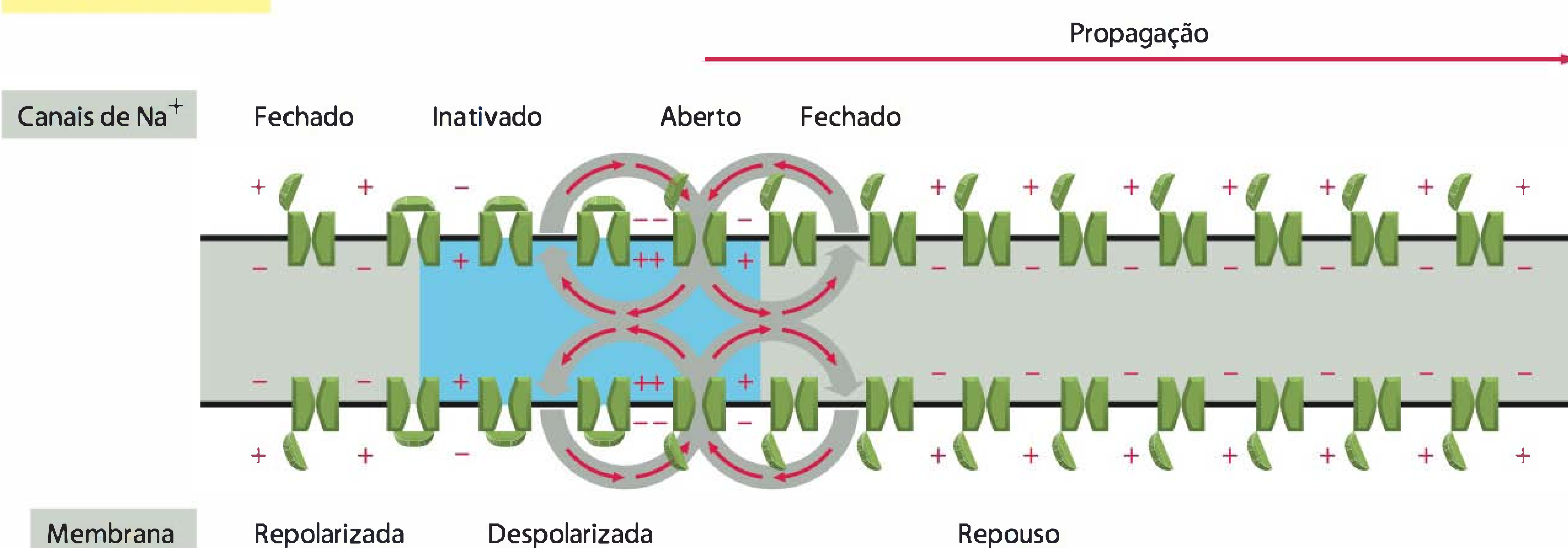


Figura 11-29 Potencial de ação. (A) Um potencial de ação é desencadeado por um breve pulso de corrente, que (B) despolariza parcialmente a membrana, como mostrado no mapa do potencial de membrana *versus* o tempo. A *curva verde* mostra como o potencial de membrana poderia simplesmente retornar ao valor de repouso após o estímulo inicial de despolarização se não existissem canais de Na^+ controlados por voltagem na membrana; esse retorno relativamente lento do potencial de membrana ao seu valor inicial de −70 mV na ausência de canais de Na^+ abertos ocorre por causa do efluxo de K^+ pelos canais de K^+ controlados por voltagem, que abrem em resposta à despolarização da membrana e fazem com que ela volte ao potencial de equilíbrio de K^+. A *curva vermelha* mostra o curso do potencial de ação que é causado pela abertura e subsequente inativação dos canais dos Na^+ controlados por voltagem, cujo estado é mostrado em (C). A membrana não pode desencadear um segundo potencial de ação até que os canais de Na^+ tenham retornado à conformação fechada; até que isso ocorra, a membrana é refratária ao estímulo.



(B)



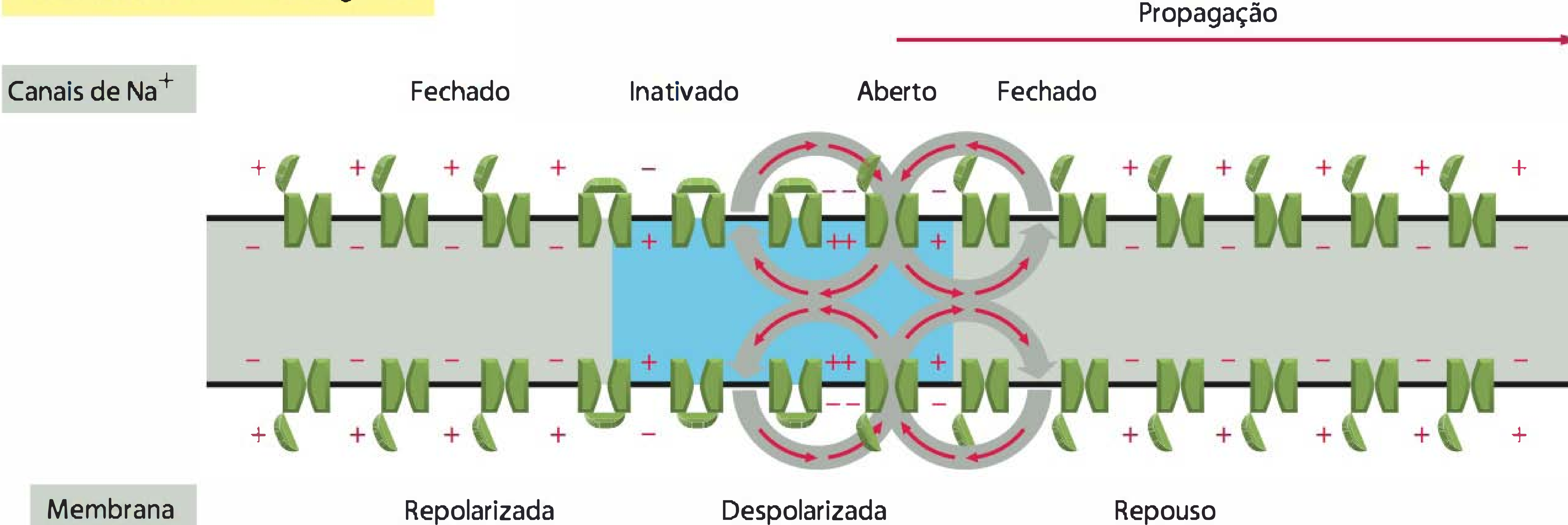


Figura 11-30 Propagação de um potencial de ação ao longo de um axônio. (A) As voltagens que podem ser registradas a partir de um conjunto de eletrodos intracelulares colocados em intervalos ao longo do axônio. (B) As mudanças nos canais de Na^+ e o fluxo da corrente (*setas laranja*) que dão início à perturbação propagável do potencial de membrana. A região do axônio com uma membrana despolarizada está sombreada em *azul*. Note que um potencial de ação somente pode propagar-se a partir do sítio de despolarização para longe, pois a inativação do canal de Na^+ impede que a despolarização propague para trás.

A descrição anterior de um potencial de ação aplica-se apenas a uma região pequena da membrana plasmática. A despolarização autoamplificante da região, entretanto, é suficiente para despolarizar regiões vizinhas da membrana, que, então, passam pelo mesmo ciclo. Dessa forma, o potencial de ação propaga-se como uma onda que viaja a partir do sítio inicial de despolarização para envolver a membrana plasmática inteira, como ilustrado na **Figura 11-30**.

Na maioria das células nervosas, os **canais de K^+ controlados por voltagem** fornecem um segundo mecanismo para auxiliar no retorno mais rápido do potencial negativo original da membrana plasmática ativada, deixando-a pronta para transmitir um segundo impulso. Esses canais abrem em resposta à despolarização da membrana de forma muito similar aos

canais de Na^+, mas com uma cinética um pouco mais lenta; por essa razão, são algumas vezes denominados *canais de K^+ tardios* (ou *retardados*). Quando os canais de K^+ abrem, o efluxo de K^+ rapidamente sobrepuja o influxo transiente de Na^+ e rapidamente induz a membrana a retornar ao potencial de equilíbrio de K^+, mesmo antes que a inativação dos canais de Na^+ esteja completa.

Assim como o canal de Na^+, os canais de K^+ controlados por voltagem podem ser inativados automaticamente. Os estudos em mutantes de canais de K^+ controlados por voltagem mostram que os 20 aminoácidos da região N-terminal da proteína de canal são necessários para a rápida inativação do canal. Se essa região é alterada, a cinética da inativação do canal é modificada e, se a região for removida, a inativação não ocorre. Surpreendentemente, no último caso, a inativação pode ser restaurada por exposição da face citoplasmática da membrana plasmática a um pequeno peptídeo sintético correspondente à região aminoterminal perdida. Esses dados sugerem que a região aminoterminal de cada subunidade do canal de K^+ atua como uma tampa que obstrui a extremidade citoplasmática do poro tão logo ele abre, inativando, assim, o canal (**Figura 11-31**). Um mecanismo semelhante parece operar na rápida inativação dos canais de Na^+ controlados por voltagem (discutido adiante), embora um segmento diferente da proteína pareça estar envolvido.

O mecanismo eletroquímico do potencial de ação foi primeiramente estabelecido por uma famosa série de experimentos realizados nos anos de 1940 e 1950. Uma vez que as técnicas para estudar os eventos elétricos em pequenas células ainda não tinham sido desenvolvidas, os experimentos utilizaram o neurônio gigante da lula. Apesar de terem ocorrido muitos avanços nas técnicas desde então, a lógica da análise original continua servindo como modelo para os trabalhos de hoje. O **Painel 11-3** resume alguns dos experimentos-chave originais.

A mielinização aumenta a velocidade e a eficácia da propagação do potencial de ação em células nervosas

Os axônios de muitos neurônios de vertebrados são envolvidos por uma **bainha de mielina**, que aumenta muito a velocidade na qual um axônio pode conduzir um potencial de ação. A importância da mielinização é demonstrada pela doença desmielinizante *esclerose múltipla*, na qual as bainhas de mielina em algumas regiões do sistema nervoso central são destruídas pelo sistema imune; onde isso ocorre, a propagação do impulso nervoso é extremamente reduzida, geralmente levando a consequências neurológicas graves.

A mielina é formada por células de apoio especializadas denominadas **células da glia**. As **células de Schwann** mielinizam axônios em nervos periféricos, e os **oligodendrócitos** mielinizam axônios no sistema nervoso central. Essas células da glia depositam camada sobre camada de sua própria membrana plasmática em uma espiral justa em torno do axônio (**Figura 11-32**A e B), envolvendo a membrana do axônio de tal forma que pouca corrente

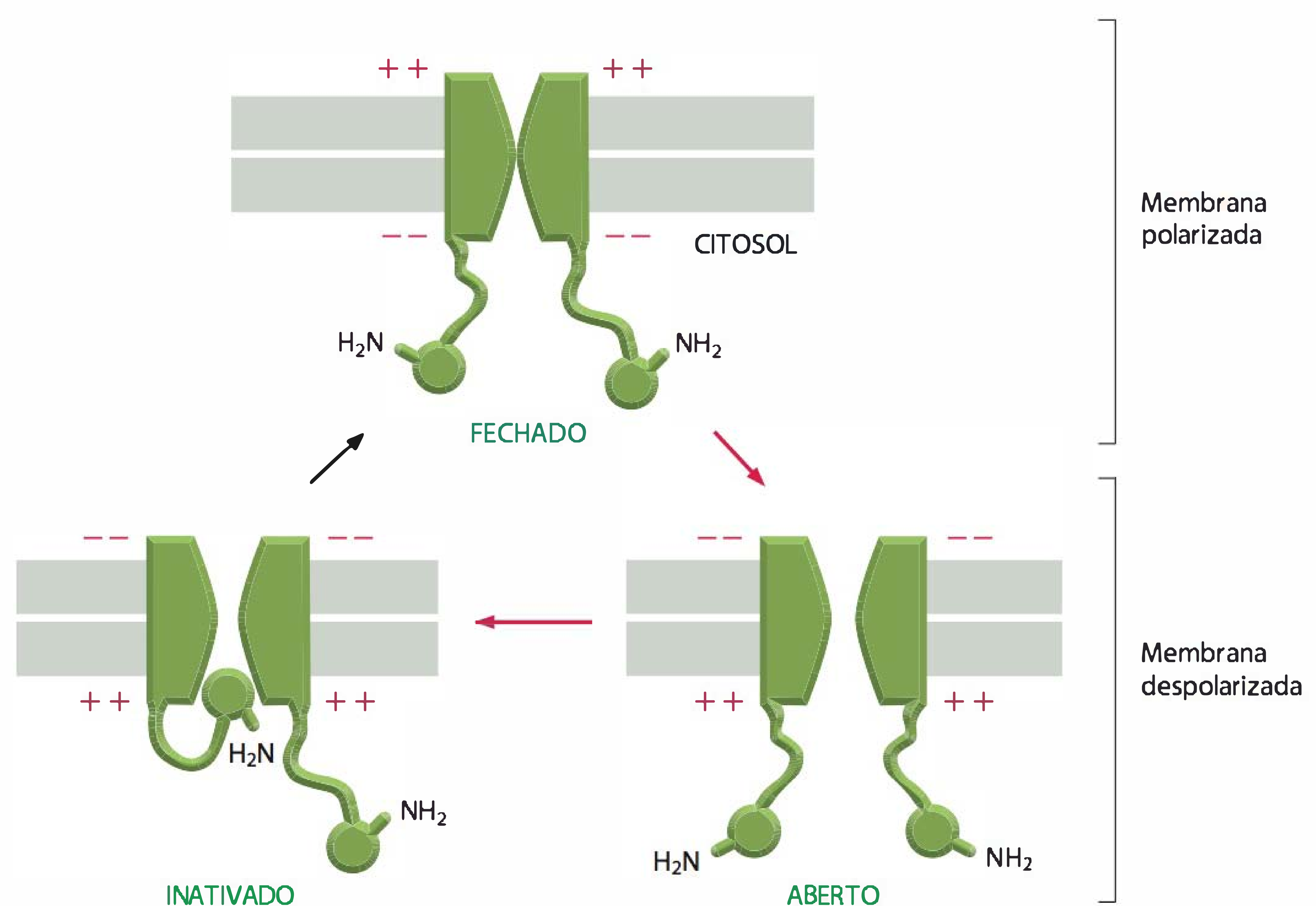
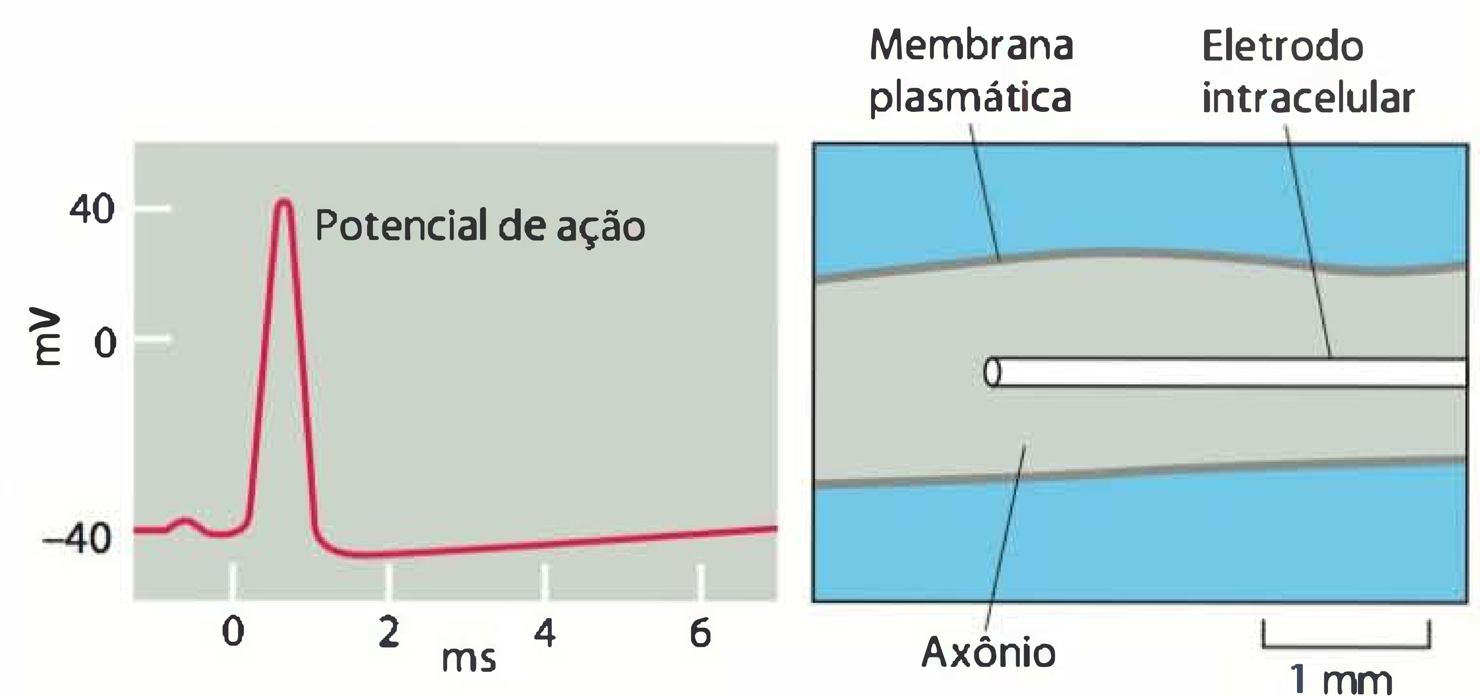


Figura 11-31 Modelo de "bola e corrente" da rápida inativação de um canal de K^+ controlado por voltagem. Quando o potencial de membrana é despolarizado, o canal abre-se e começa a conduzir íons. Se a despolarização é mantida, o canal aberto adota uma conformação inativa, na qual o poro está obliterado por uma "bola" de 20 aminoácidos da região N-terminal, ligada ao canal por um segmento de cadeia polipeptídica desenovelada que serve como uma "corrente". Para simplificar, somente duas bolas são mostradas; de fato, existem quatro, uma de cada subunidade. Um mecanismo semelhante, utilizando um segmento diferente da cadeia polipeptídica, parece operar na inativação do canal de Na^+. As forças internas estabilizam cada estado contra pequenos distúrbios, mas uma colisão suficientemente violenta com outras moléculas pode causar uma troca do canal de um desses estados para outro. O estado de menor energia depende do potencial de membrana, pois as diferentes conformações possuem distribuição diferente de cargas. Quando a membrana está em repouso (fortemente polarizada), a conformação fechada apresenta a menor energia livre sendo, portanto, mais estável; quando a membrana é despolarizada, a energia da conformação aberta é menor, assim o canal apresenta alta probabilidade de abrir. No entanto, a energia livre da conformação *inativada* é ainda menor; portanto, após um período aleatoriamente variável gasto no estado aberto, o canal torna-se inativado. Assim, a conformação aberta corresponde a um estado metaestável que pode existir apenas temporariamente. As *setas vermelhas* indicam a sequência após uma rápida despolarização. A *seta preta* indica o retorno à conformação original como o menor estado de energia, após a repolarização da membrana.

1. Os potenciais de ação são registrados com um eletrodo intracelular.

O axônio gigante da lula tem cerca de 0,5 a 1 mm de diâmetro e vários centímetros de comprimento. Um eletrodo na forma de um tubo capilar de vidro contendo uma solução condutora pode ser colocado no eixo do axônio, de tal forma que sua extremidade fique mergulhada profundamente no citoplasma. Com sua ajuda, pode-se medir a diferença de voltagem entre o interior e o exterior do axônio – ou seja, o potencial de membrana – à medida que um potencial de ação atravessa o eletrodo. O potencial de ação é desencadeado por um breve estímulo elétrico em uma extremidade do axônio. Não importa qual extremidade, pois a excitação pode propagar-se em ambas as direções; e não importa a intensidade do estímulo, contanto que ele exceda um certo limiar: o potencial de ação é total ou nenhum.

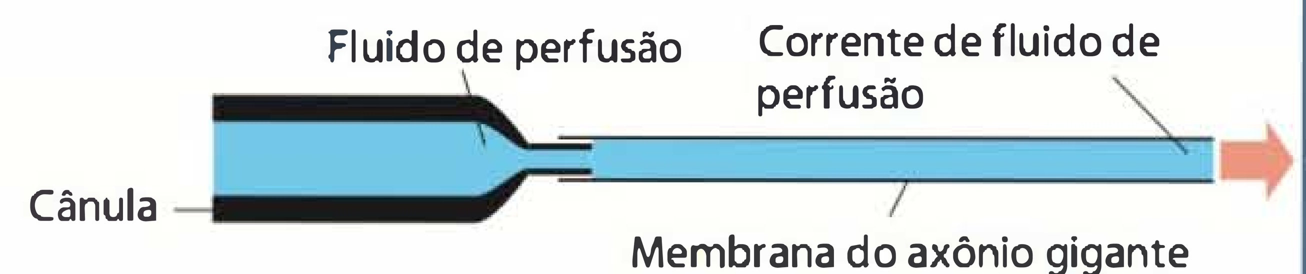


2. Os potenciais de ação dependem somente da membrana plasmática neuronal e de gradientes de Na^+ e de K^+ através dela.

Os três íons mais abundantes, tanto no interior como no exterior do axônio, são Na^+, K^+ e Cl^-. Como em outras células, a bomba de Na^+-K^+ mantém um gradiente de concentração: a concentração do Na^+ é cerca de nove vezes menor no interior do axônio do que no exterior, enquanto a concentração de K^+ é cerca de 20 vezes maior no interior do que no exterior. Que íons são importantes para o potencial de ação?

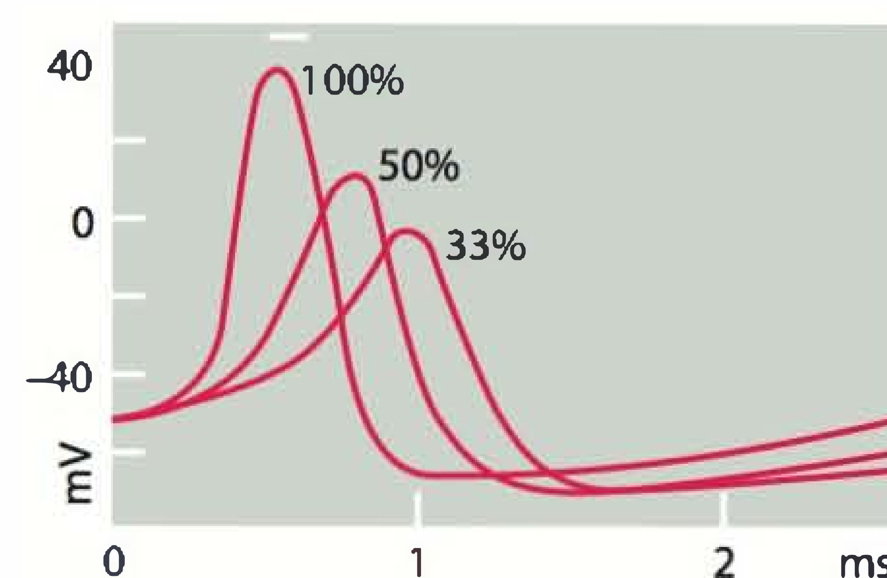
O axônio gigante da lula é tão grande e robusto que é possível extrair seu citoplasma, como creme dental de um tubo, e então preenchê-lo com solução artificial pura de Na^+, K^+ e Cl2 ou SO_4^{2-}. Notavelmente, se (e somente se) as concentrações internas e externas de Na^+ e de K^+ aproximarem-se daquelas encontradas naturalmente, o axônio ainda propagará potencial de ação da forma normal. Portanto, a parte da célula importante para a sinalização elétrica deve ser a membrana plasmática; os íons importantes são Na^+ e K^+; e uma fonte suficiente de energia livre para gerar o potencial de ação deve ser provida pelos seus gradientes de concentração através da membrana, pois todas as outras fontes de energia metabólica foram presumivelmente removidas pela perfusão.





3. A membrana é predominantemente permeável ao K^+, em repouso, e torna-se temporariamente permeável ao Na^+ durante o potencial de ação.

O potencial de membrana em repouso está próximo ao potencial de equilíbrio para o K^+. Quando a concentração externa de K^+ é alterada, o potencial de repouso altera-se aproximadamente de acordo com a equação de Nernst para o K^+ (ver Painel 11-2). No repouso, portanto, a membrana é predominantemente permeável ao K^+: os canais permeáveis a K^+ fornecem a principal via iônica através da membrana. Se a concentração externa de Na^+ varia, não existe efeito no potencial de repouso. Todavia, a altura do pico do potencial de ação altera-se aproximadamente de acordo com a equação de Nernst para o Na^+. Durante o potencial de ação, portanto, a membrana parece ser principalmente permeável ao Na^+: os canais de Na^+ abrem. Como resultado do potencial de ação, o potencial de membrana reverte para um valor negativo que depende da concentração externa de K^+ e está ainda mais próximo do potencial de equilíbrio do K^+ do que o potencial de repouso: a membrana perdeu a maior parte da sua permeabilidade ao Na^+ e tornou-se ainda mais permeável ao K^+ do que antes – ou seja, os canais de Na^+ fecharam, e canais adicionais de K^+ abriram.

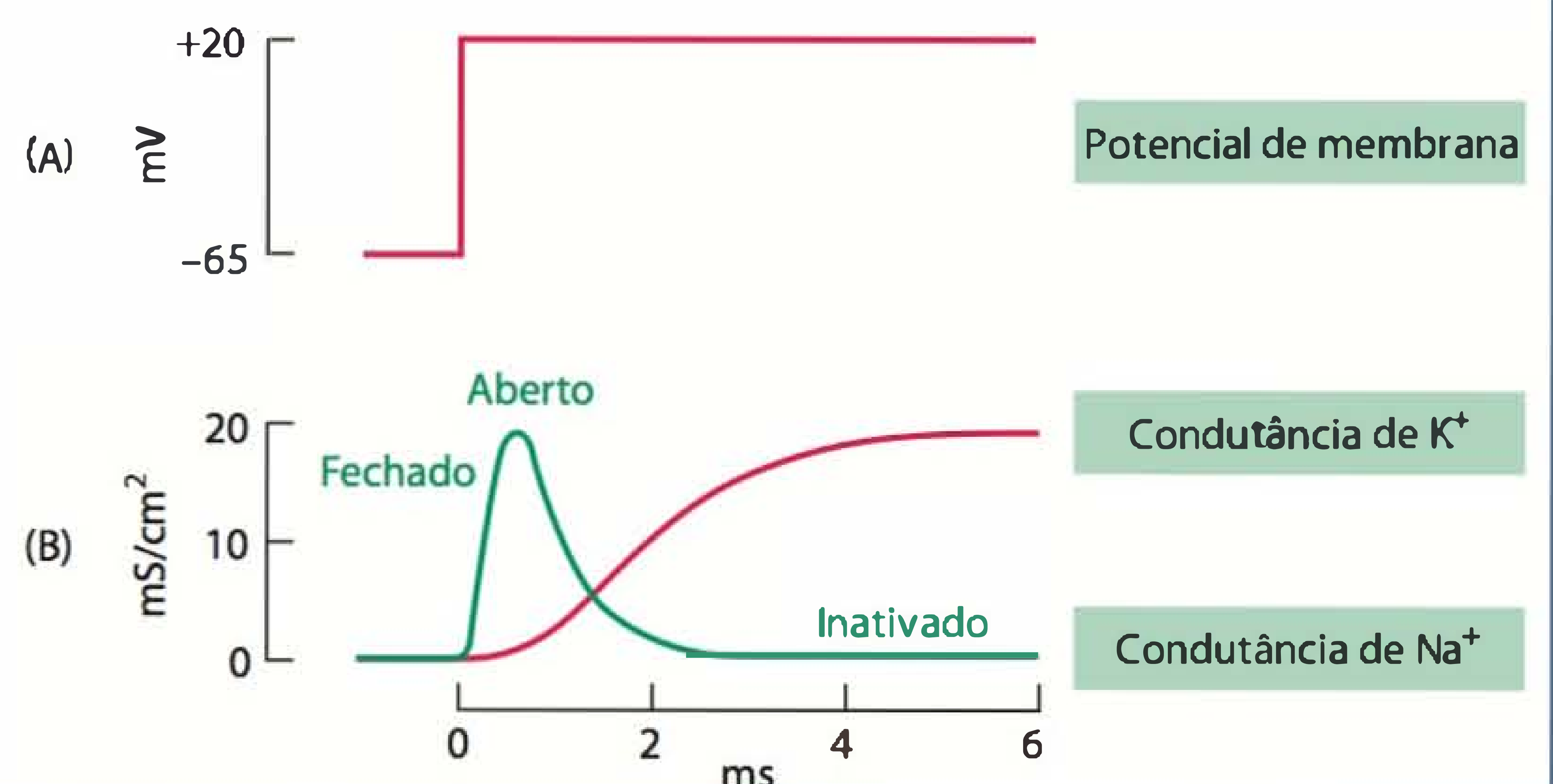


A forma do potencial de ação quando o meio externo contém 100, 50 ou 33% da concentração normal de Na^+.

4. O grampeamento de voltagem revela como o potencial de membrana controla a abertura e o fechamento dos canais iônicos.

O potencial de membrana pode ser mantido constante ("voltagem grampeada") por todo o axônio pela passagem de uma corrente adequada através de um fio de metal nu inserido ao longo do eixo do axônio, enquanto monitora-se o potencial de membrana com outro eletrodo intracelular. Quando a membrana é subitamente alterada a partir do potencial de repouso e mantida em um estado despolarizado (A), os canais de Na^+ rapidamente se abrem, até que a permeabilidade da membrana ao Na^+ seja muito maior que a permeabilidade ao K^+; então, eles podem fechar novamente de forma espontânea, embora o potencial de membrana esteja grampeado e inalterado. Os canais de K^+ também se abrem, mas com certo atraso; portanto, a permeabilidade ao K^+ aumenta conforme a permeabilidade ao Na^+ decresce (B). Se o experimento for agora prontamente repetido, retornando a membrana brevemente ao potencial de repouso e então despolarizando-a rapidamente outra vez, a resposta é diferente: a despolarização prolongada faz com que os canais de Na^+ entrem em estado inativado, de modo que a segunda despolarização não causa elevação e queda semelhantes à primeira. A recuperação desse estado requer um período relativamente longo – cerca de 10 milissegundos – gasto no potencial de membrana repolarizado (repouso).

Em um axônio normal não-grampeado, uma invasão de Na^+ pelos canais de Na^+ abertos produz o pico do potencial de ação; a inativação dos canais de Na^+ e a abertura dos canais de K^+ fazem com que a membrana retorne rapidamente para o potencial de repouso.



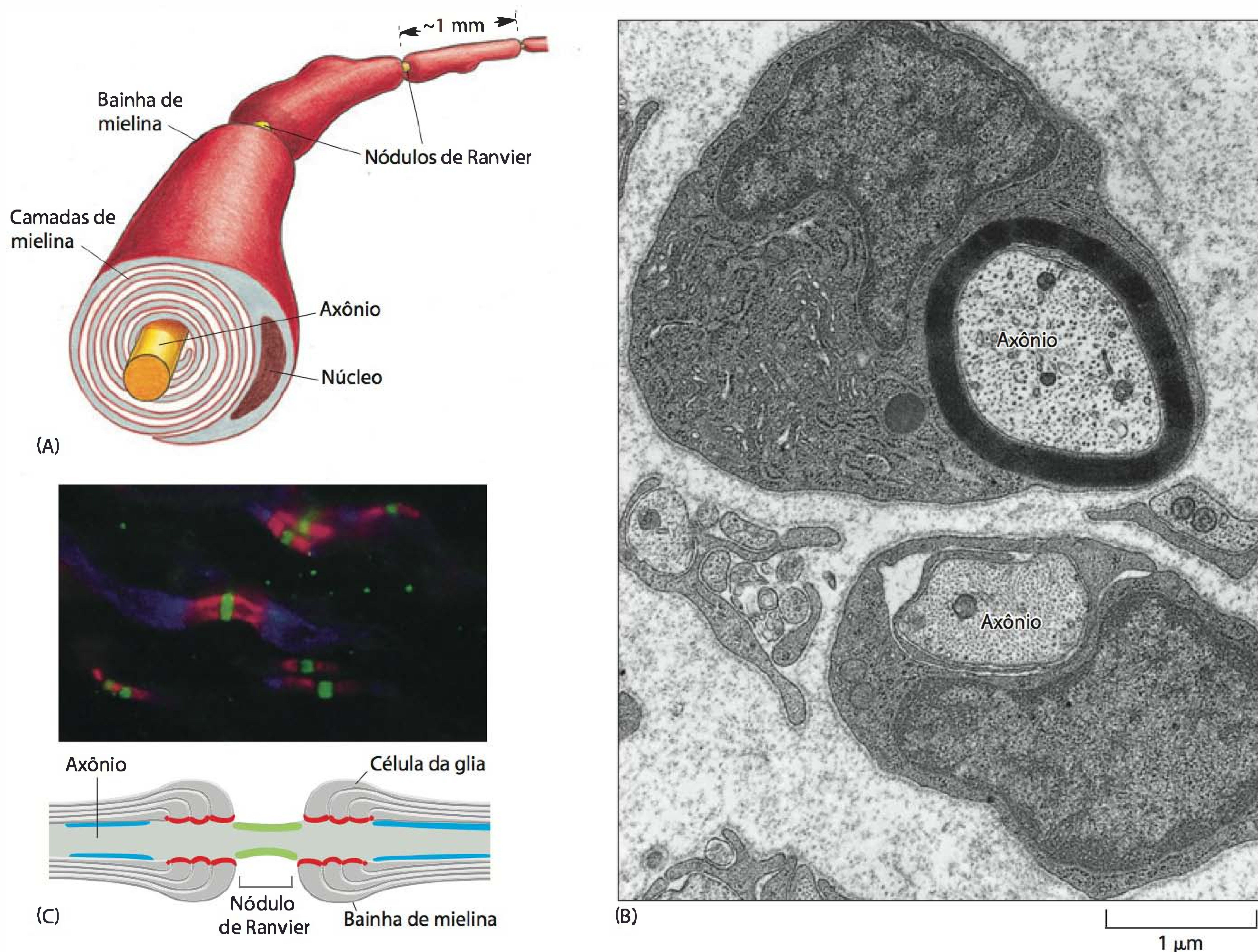


Figura 11-32 Mielinização. (A) Um axônio mielinizado de um nervo periférico. Cada célula de Schwann envolve sua membrana plasmática concentricamente em torno do axônio para formar um segmento de bainha de mielina de cerca de 1 mm de comprimento. Para maior clareza, as camadas de mielina neste desenho não estão mostradas compactadas tão fortemente como são na realidade (ver parte B). (B) Uma microfotografia eletrônica de uma secção de um nervo da perna de um rato jovem. Duas células de Schwann podem ser vistas: uma próxima à região inferior apenas iniciando a mielinização do seu axônio; a outra, acima desta, com a bainha de mielina quase madura. (C) Microfotografia de fluorescência e diagrama de um axônio mielinizado individual separado a partir de um nervo. São detectadas três proteínas através de coloração com anticorpos. Os canais de Na^+ controlados por voltagem (corados em *verde*) estão concentrados na membrana do axônio, nos nódulos de Ranvier. Uma proteína extracelular denominada *Caspr* (corada em *vermelho*) marca a extremidade de cada bainha de mielina. Caspr se organiza nas junções onde a membrana plasmática da célula da glia se encontra intimamente com o axônio formando uma vedação elétrica. Canais de K^+ controlados por voltagem (corados em *azul*) estão localizados nas regiões da membrana plasmática do axônio próximas aos nódulos. (B, de Cedric S. Raine, em Mielina [P. Morell, ed.]. New York: Plenum, 1976; C, de M. N. Rasband e P. Shrager, *J. Physiol.* 525:63-73, 2000. Com permissão de Blackwell Publishing.)

pode vazar através dela. A bainha de mielina é interrompida em espaçamento regular nos *nódulos de Ranvier*, onde estão concentrados quase todos os canais de Na^+ do axônio (ver Figura 11-32C). Uma vez que as porções embainhadas da membrana do axônio possuem excelentes propriedades condutoras (em outras palavras, elas comportam-se eletricamente de forma muito semelhante a cabos telegráficos submersos bem-desenhados), uma despolarização da membrana em um nódulo quase que imediatamente propaga-se passivamente ao outro nódulo. Assim, um potencial de ação se propaga ao longo de um axônio mielinizado saltando de um nódulo a outro, um processo denominado *condução saltatória*. Esse tipo de condução apresenta duas vantagens principais: os potenciais de ação viajam mais rápido e a energia metabólica é conservada porque a excitação ativa é confinada às pequenas regiões da membrana plasmática do axônio nos nódulos de Ranvier.

A análise eletrofisiológica de regiões grampeadas indica que os canais individuais controlados abrem de maneira tudo-ou-nada

A membrana plasmática de células neuronais e musculoesqueléticas contém muitos milhares de canais de Na^+ controlados por voltagem, e a corrente que cruza a membrana é o somatório das correntes que fluem através de todos esses canais. Esse agregado de corren-

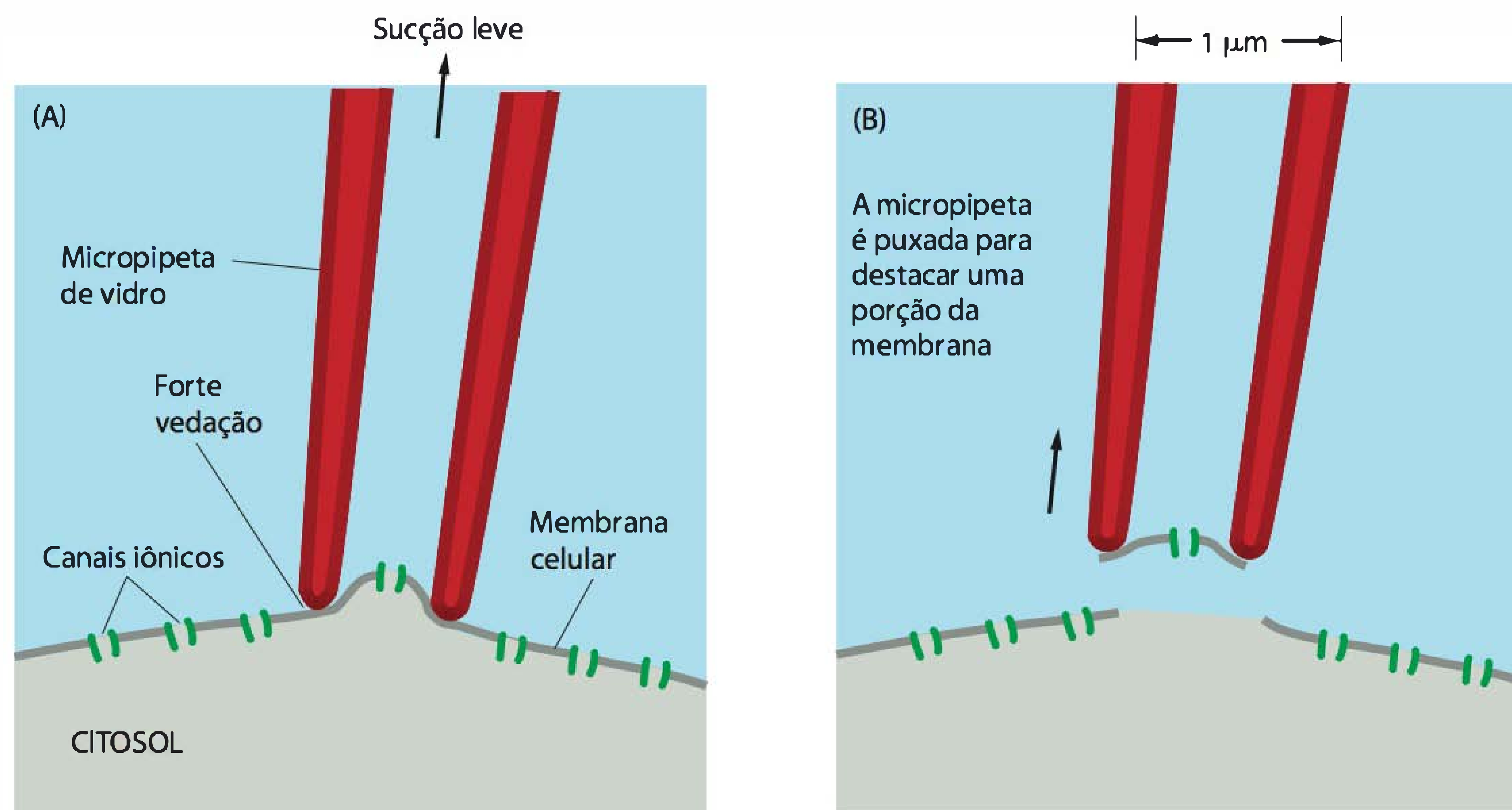


Figura 11-33 Técnica de registro de região grampeada (*patch-clamp*). Devido a uma vedação extremamente forte entre a micropipeta e a membrana, a corrente pode entrar ou sair da micropipeta somente passando pelos canais na *região* (*patch*) da membrana que cobre a ponta da pipeta. O termo *grampo* (*clamp*) é utilizado porque um dispositivo eletrônico é empregado para manter, ou "grampear", o potencial de membrana em um valor fixo enquanto registra a corrente iônica por canais individuais. O registro das correntes por esses canais pode ser feito com a região da membrana ainda aderida ao restante da célula como em (A) ou destacada como em (B). A vantagem da região destacada é a facilidade de se alterar a composição da solução em qualquer um dos lados da membrana para testar o efeito de vários solutos no comportamento do canal. Uma porção destacada também pode ser produzida com orientação oposta, de forma tal que a superfície citoplasmática da membrana fique voltada para o interior da pipeta.

tes pode ser registrado com um microeletrodo intracelular, como ilustrado na Figura 11-30. Notavelmente, no entanto, também é possível registrar a corrente fluindo através de canais individuais. A **análise de regiões grampeadas** (*patch-clamp*), um método desenvolvido nas décadas de 1970 e 1980, revolucionou o estudo dos canais iônicos, permitindo a análise do transporte através de uma única molécula de proteína de canal em uma pequena região da membrana cobrindo a abertura de uma micropipeta (**Figura 11-33**). Por meio dessa técnica simples, mas eficaz, podem ser estudadas as propriedades detalhadas dos canais iônicos em qualquer tipo de célula. Esse trabalho levou à descoberta de que mesmo as células que não são excitáveis eletricamente em geral possuem uma ampla variedade de canais iônicos controlados em sua membrana plasmática. Muitas dessas células, como as leveduras, são pequenas demais para serem investigadas pelo método tradicional de eletrofisiologia pela implantação de um microeletrodo intracelular.

Os registros de *patch-clamp* indicam que os canais individuais de Na^+ controlados por voltagem abrem de modo tudo-ou-nada. Os canais abrem e fecham de forma aleatória, mas quando aberto, o canal tem sempre a mesma grande condutância, permitindo que mais de mil íons passem a cada milissegundo. Portanto, o agregado de correntes que passa pela membrana de uma célula inteira não indica o *grau* de abertura de um canal individual típico, mas sim o *número total* de canais na membrana que estão abertos em um dado momento (**Figura 11-34**).

O fenômeno de controle por voltagem pode ser entendido em termos de princípios físicos simples. O interior de um neurônio ou de uma célula muscular em repouso está com potencial elétrico de cerca de 50 a 100 mV mais negativo que o meio externo. Embora essa diferença de potencial pareça pequena, ela existe através de uma membrana plasmática de

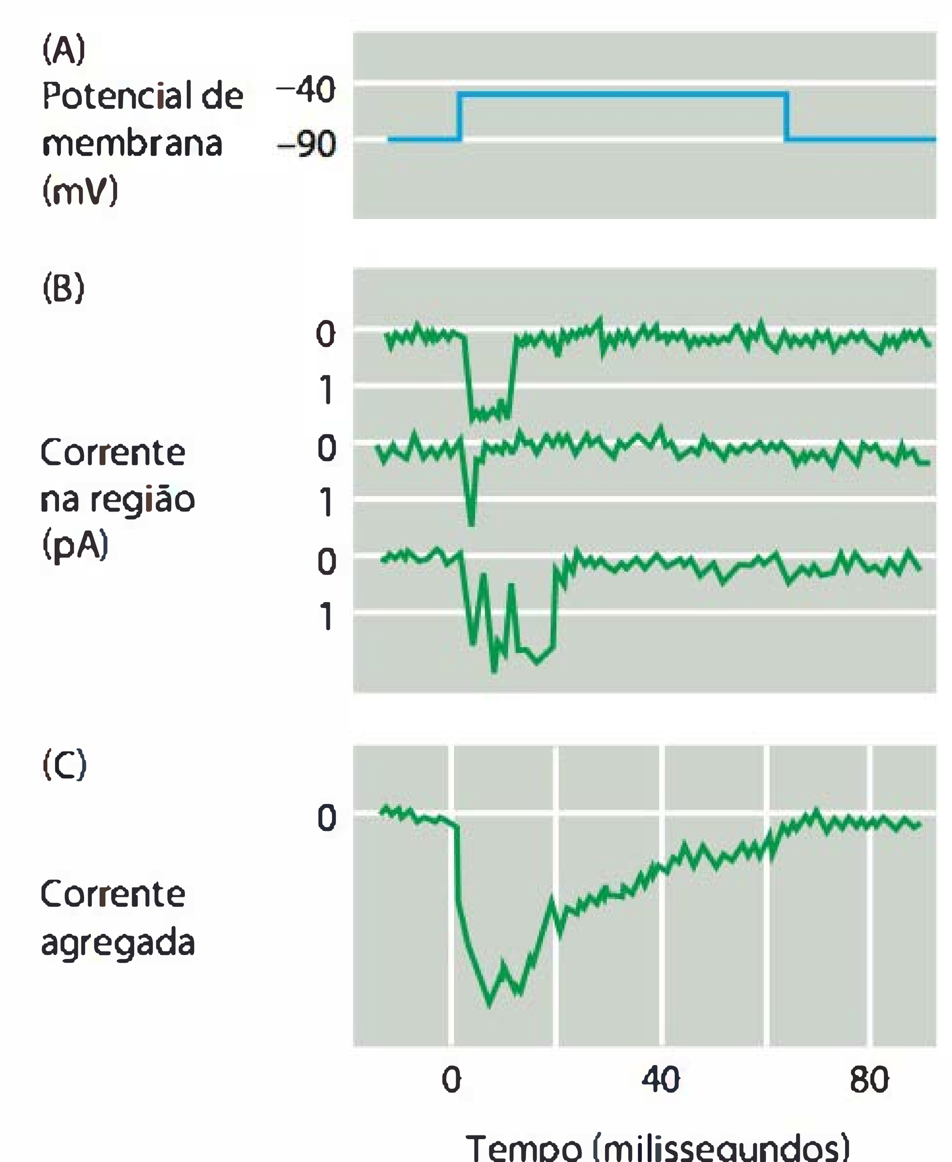


Figura 11-34 Medidas de regiões grampeadas para um canal de Na^+ controlado por voltagem isolado. Uma diminuta região da membrana plasmática foi destacada de uma célula muscular embrionária de rato, como na Figura 11-33. (A) A membrana foi despolarizada por uma alteração abrupta do potencial. (B) Três registros de correntes de três experimentos realizados na mesma porção de membrana. Cada grande ciclo de corrente em (B) representa a abertura e o fechamento de um único canal. Uma comparação de três registros mostra que, enquanto a duração de abertura e fechamento do canal varia muito, a taxa do fluxo de corrente em um canal aberto é praticamente constante. As flutuações menores nos registros de correntes são, de modo geral, originárias de interferência elétrica no equipamento de registro. A corrente é medida em picoamperes (pA). Por convenção, o potencial elétrico no exterior da célula é definido como igual a zero. (C) A soma das correntes medidas em 144 repetições do mesmo experimento. Essa corrente agregada é equivalente à corrente normal de Na^+ que poderia ser observada fluindo por uma região de membrana relativamente grande contendo 144 canais. Uma comparação de (B) e (C) mostra que a cinética das correntes agregadas reflete a probabilidade de que qualquer canal individual esteja no estado aberto; essa probabilidade diminui com o tempo, à medida que os canais adotam sua conformação inativa na membrana despolarizada. (Dados de J. Patlak e R. Horn, *J. Gen Physiol.* 79:333-351, 1982. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

somente 5 nm de espessura, de tal maneira que o gradiente de voltagem resultante é de cerca de 100.000 V/cm. As proteínas na membrana estão, portanto, sujeitas a um grande campo elétrico que pode afetar profundamente sua conformação. Essas proteínas, como todas as outras, apresentam um grande número de grupos carregados e de pontes polarizadas entre seus diversos átomos. Portanto, o campo elétrico exerce forças na estrutura molecular. Para muitas proteínas de membrana, os efeitos das alterações no campo elétrico da membrana provavelmente sejam insignificantes, mas os canais iônicos controlados por voltagem podem adotar conformações alternativas, cuja estabilidade depende da intensidade do campo. Os canais controlados por voltagem de Na^+, K^+ e Ca^{2+}, por exemplo, possuem aminoácidos característicos carregados positivamente em um dos seus segmentos transmembrana que respondem à despolarização movimentando-se para fora, desencadeando mudanças conformacionais que abrem o canal. Cada conformação pode "alternar" para outra conformação se for suficientemente "sacudida" pelos movimentos térmicos aleatórios do meio circundante, e é a estabilidade relativa das conformações fechada, aberta e inativada em relação à alternância que é alterada por mudanças no potencial de membrana (ver legenda da Figura 11-31).

Os canais de cátions controlados por voltagem são evolutiva e estruturalmente relacionados

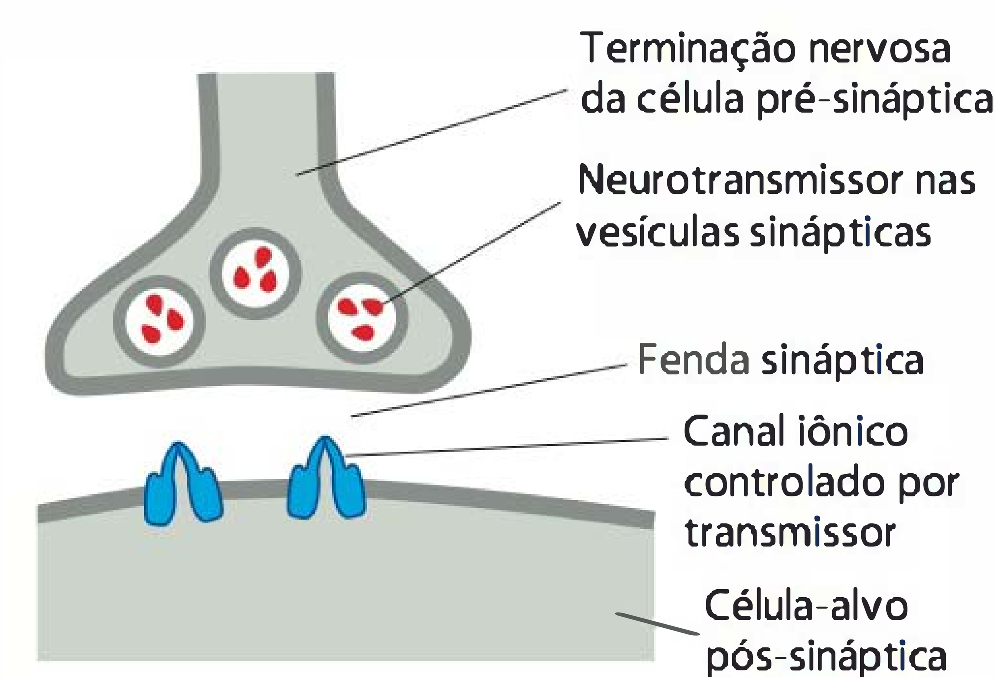
Os canais de Na^+ não constituem o único tipo de canal catiônico controlado por voltagem que pode gerar um potencial de ação. Os potenciais de ação em algumas células musculares, óvulos e células endócrinas, por exemplo, dependem *de canais de Ca^{2+} controlados por voltagem* em vez de canais de Na^+.

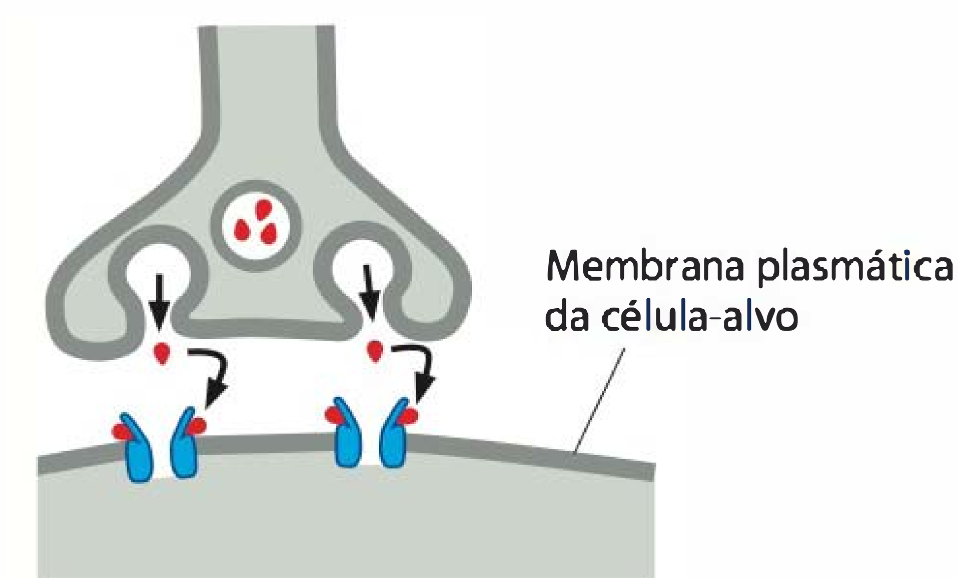
Existe uma surpreendente diversidade estrutural e funcional dentro das três classes de canais controlados por voltagem (canais de Na^+, de K^+ e de Ca^{2+}), gerada tanto por múltiplos genes como por *splicing* alternativo de transcritos de RNA produzidos a partir de um mesmo gene. No entanto, as sequências de aminoácidos dos canais de Na^+, de K^+ e de Ca^{2+} conhecidos mostram fortes semelhanças, sugerindo que eles pertençam a uma grande superfamília de proteínas evolutiva e estruturalmente relacionadas e que compartilhem muitos princípios estruturais. Enquanto a levedura unicelular *S. cerevisiae* contém um único gene que codifica para um canal de K^+ controlado por voltagem, o genoma do verme *C. elegans* contém 68 genes que codificam diferentes, embora relacionados, canais de K^+. Essa complexidade indica que mesmo um sistema nervoso simples, composto de somente 302 neurônios, utiliza um grande número de canais iônicos diferentes para computar suas respostas.

Os humanos que herdam genes mutantes codificando para proteínas de canais iônicos podem sofrer de diversas doenças neuronais, musculares, cardíacas ou que afetam o cérebro, dependendo do tipo de célula que normalmente conteriam o canal expresso pelo gene mutante. As mutações em genes que codificam canais de Na^+ controlados por voltagem em células musculoesqueléticas, por exemplo, podem causar *miotonia*, uma condição na qual o relaxamento muscular após uma contração voluntária é fortemente retardado, causando espasmos musculares dolorosos. Em alguns casos, isso ocorre devido a uma falha na inativação dos canais; como resultado, a entrada de Na^+ persiste após o término do potencial de ação e reinicia repetidamente a despolarização da membrana e a contração muscular. De modo similar, mutações que afetam canais de Na^+ ou de K^+ no cérebro podem causar *epilepsia*, na qual disparos excessivos e sincronizados de grandes grupos de células nervosas causam crise epiléptica (convulsões ou desmaios).

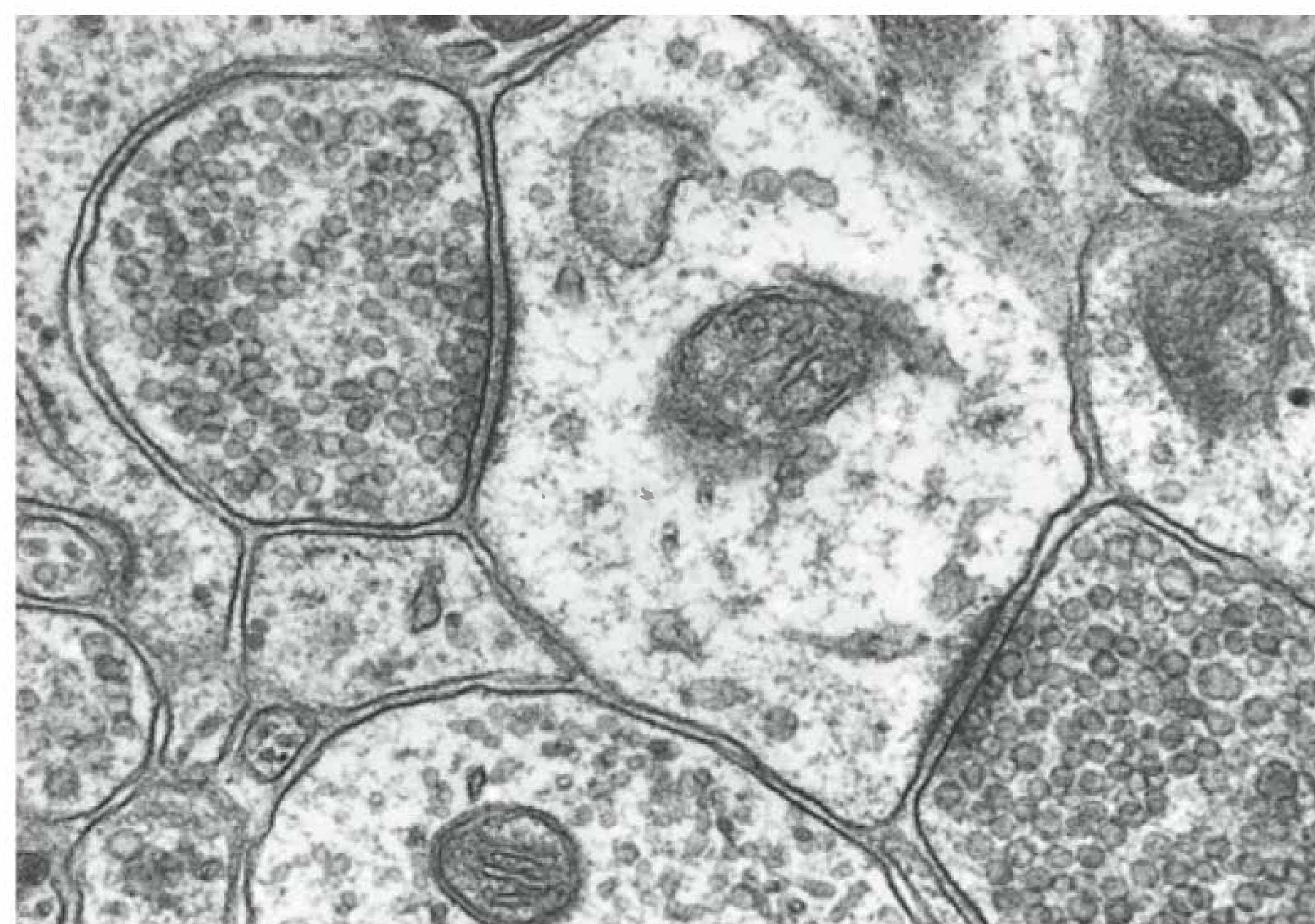
Os canais iônicos controlados por transmissor convertem sinais químicos em sinais elétricos nas sinapses químicas

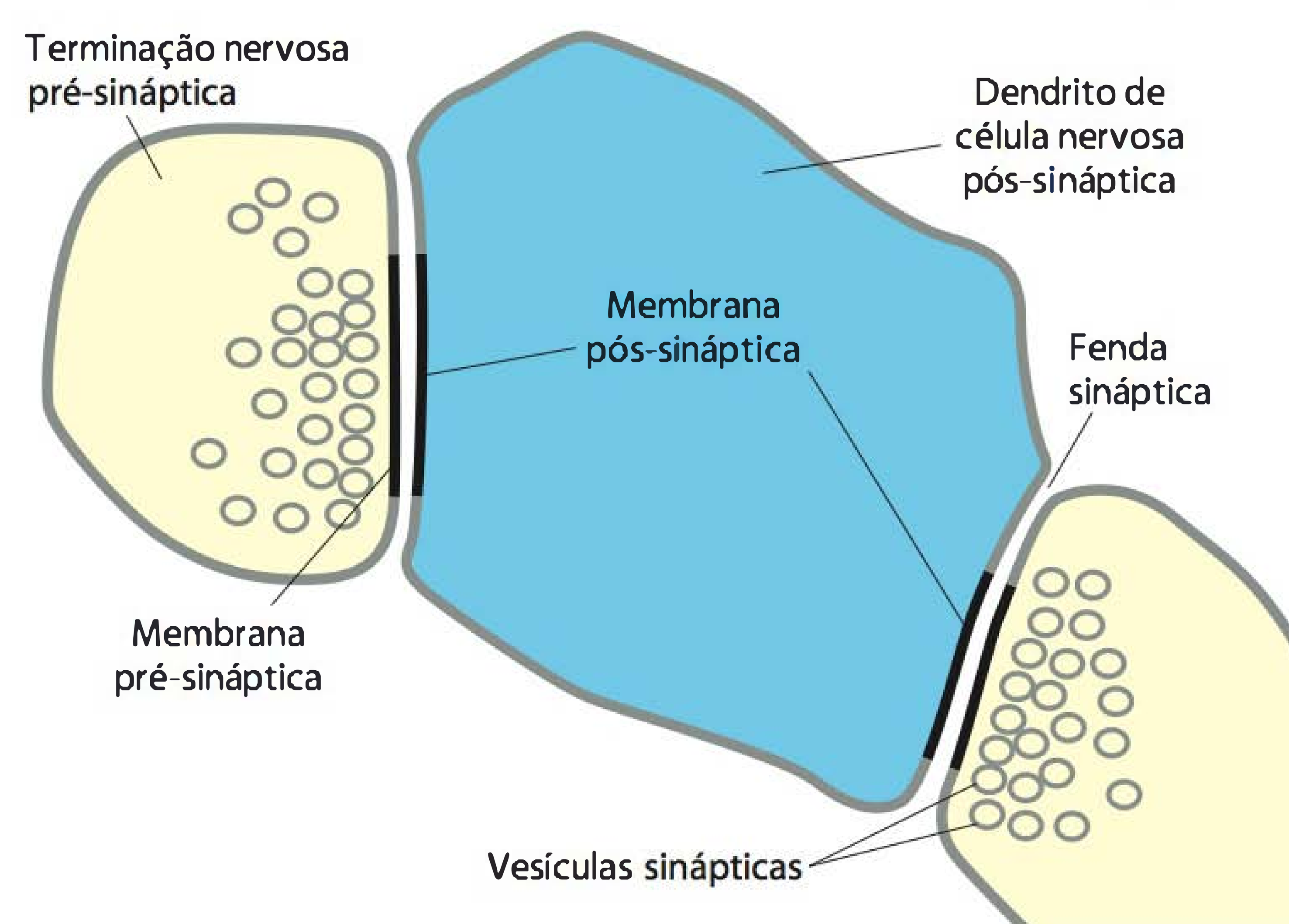
Os sinais neuronais são transmitidos de uma célula a outra em sítios especializados de contato conhecidos como **sinapses**. O mecanismo normal de transmissão é indireto. As células são isoladas eletricamente uma da outra, a célula *pré-sináptica* sendo separada da célula *pós-sináptica* por uma estreita *fenda sináptica*. Uma mudança de potencial elétrico na célula pré-sináptica desencadeia a liberação por ela mesma de pequenas moléculas sinalizadoras conhecidas como **neurotransmissores**, que estão armazenadas em vesículas sinápticas envoltas por membrana e são liberadas por exocitose. O neurotransmissor difunde rapidamente através da fenda sináptica e provoca uma mudança elétrica na célula pós-sináptica por ligação a canais iônicos controlados por transmissor (**Figura 11-35**) e abertura desses canais. Após a secreção do neurotransmissor, ele é rapidamente removido: é destruído por enzimas





(A)





(B)

Figura 11-35 Sinapse química. (A) Quando um potencial de ação atinge a terminação nervosa na célula pré-sináptica, ele estimula a liberação de neurotransmissor pela terminação nervosa. As moléculas do neurotransmissor estão contidas em vesículas sinápticas e são liberadas ao exterior celular quando as vesículas fundem-se com a membrana plasmática da terminação nervosa. O neurotransmissor liberado liga e abre canais iônicos controlados por transmissor concentrados na membrana plasmática da célula-alvo pós-sináptica na sinapse. Os fluxos iônicos resultantes alteram o potencial de membrana da célula-alvo transmitindo, assim, um sinal a partir do nervo excitado. (B) Microfotografia eletrônica de uma fina secção de duas sinapses terminais nervosas em um dendrito de uma célula pós-sináptica. (B, cortesia de Cedric Raine.)

específicas na fenda sináptica, ou é captado pelas terminações nervosas que o liberaram ou pelas células da glia circundantes. A recaptação é mediada por uma ampla variedade de proteínas transportadoras de neurotransmissores dependentes de Na^+; dessa forma, os neurotransmissores são reciclados, permitindo às células manterem altas taxas de liberação. A rápida remoção garante precisão espacial e temporal de sinalização em uma sinapse. Esse mecanismo diminui as chances de um transmissor influenciar células vizinhas e limpa a fenda sináptica antes do próximo pulso de neurotransmissor ser liberado, de tal forma que o tempo dos eventos repetidos de sinalização rápida pode ser exatamente comunicado à célula pós-sináptica. Como veremos, a sinalização através destas *sinapses químicas* é muito mais versátil e adaptável que o acoplamento elétrico direto por junções comunicantes nas *sinapses elétricas* (discutido no Capítulo 19), as quais também são utilizadas pelos neurônios, mas em extensão muito menor.

Os **canais iônicos controlados por transmissor** são especializados em converter rapidamente os sinais químicos extracelulares em sinais elétricos, nas sinapses químicas. Os canais estão concentrados na membrana plasmática da célula pós-sináptica na região de sinapse e abrem-se transientemente em resposta à ligação de moléculas neurotransmissoras, produzindo, dessa maneira, uma breve mudança de permeabilidade na membrana (ver Figura 11-35A). Diferentemente dos canais controlados por voltagem responsáveis por potenciais de ação, os canais controlados por transmissor são relativamente insensíveis ao potencial de membrana e, portanto, não podem produzir uma excitação autoamplificável. Em vez disso, eles produzem mudanças de permeabilidade local e, portanto, mudanças de potencial de membrana, graduadas de acordo com a quantidade de neurotransmissor liberado na sinapse e o tempo de persistência nela. Um potencial de ação pode ser desencadeado a partir desse sítio somente se o potencial local de membrana despolarizar o necessário para abrir um número suficiente de canais de cátions controlados por voltagem que estejam presentes na membrana dessa mesma célula-alvo.

As sinapses químicas podem ser excitatórias ou inibitórias

Os canais iônicos controlados por transmissor diferem entre si de várias formas importantes. Primeiro, como receptores, eles apresentam um sítio de ligação altamente seletivo para o neurotransmissor liberado a partir da terminação nervosa pré-sináptica. Segundo, como canais, eles são seletivos ao tipo de íon que cruza a membrana plasmática; isso determina a natureza da resposta pós-sináptica. Os **neurotransmissores excitatórios** abrem canais de cátions, induzindo um influxo de Na^+ que despolariza a membrana pós-sináptica rumo a um limiar de potencial para ativar um potencial de ação. Em contraste, os **neurotransmissores inibitórios** abrem canais de Cl^- ou canais de K^+, suprimindo a ativação por dificultar que a influência excitatória despolarize a membrana pós-sináptica. Muitos transmissores podem ser excitatórios ou inibitórios, dependendo de onde são liberados, de quais receptores ligam e de quais condições iônicas encontram. A *acetilcolina*, por exemplo, pode excitar ou inibir, dependendo do tipo de receptores de acetilcolina aos quais se liga. Geralmente, entretanto, a acetilcolina, o *glutamato* e a *serotonina* são usados como transmissores excitatórios, e o *ácido γ-aminobutírico* (*GABA*) e a *glicina* são usados como transmissores inibitórios. O glutamato, por exemplo, medeia a maior parte da sinalização excitatória no cérebro dos vertebrados.

Discutimos como a abertura dos canais de cátions despolariza a membrana. O efeito da abertura de canais de Cl^- pode ser entendido como segue. A concentração de Cl^- é muito maior no exterior celular de que no interior (ver Tabela 11-1, p. 652), mas seu influxo é contraposto pelo potencial de membrana. De fato, para muitos neurônios, o potencial de equilíbrio para o Cl^- é próximo ao potencial de repouso – ou ainda mais negativo. Por essa razão, a abertura de canais de Cl^- tende a tamponar o potencial de membrana; conforme a membrana inicia a despolarizar, mais íons Cl^- carregados negativamente entram na célula e neutralizam o efeito. Assim, a abertura de canais de Cl^- torna mais difícil a despolarização da membrana e, consequentemente, a excitação celular. A abertura de canais de K^+ tem efeito semelhante. A importância de neurotransmissores inibitórios é demonstrada pelo efeito de toxinas que bloqueiam sua ação: a estricnina, por exemplo, liga-se a receptores de glicina e bloqueia a sua ação, causando espasmos musculares, convulsões e morte.

Entretanto, nem toda a sinalização química no sistema nervoso opera por canais iônicos controlados por ligante. Muitas das moléculas sinalizadoras que são secretadas pelas terminações nervosas, incluindo uma ampla variedade de neuropeptídeos, ligam-se a receptores que apenas indiretamente regulam canais iônicos. Esses assim chamados *receptores acoplados à proteína G* e *receptores acoplados à enzima* são discutidos em detalhes no Capítulo 15. Enquanto a sinalização mediada por neurotransmissores excitatórios e inibitórios que liga canais iônicos controlados por transmissor geralmente é imediata, simples e breve, a sinalização mediada por ligante que liga receptores acoplados à proteína G e receptores acoplados à enzima tende a ser mais lenta, mais complexa e com consequências mais duradouras.

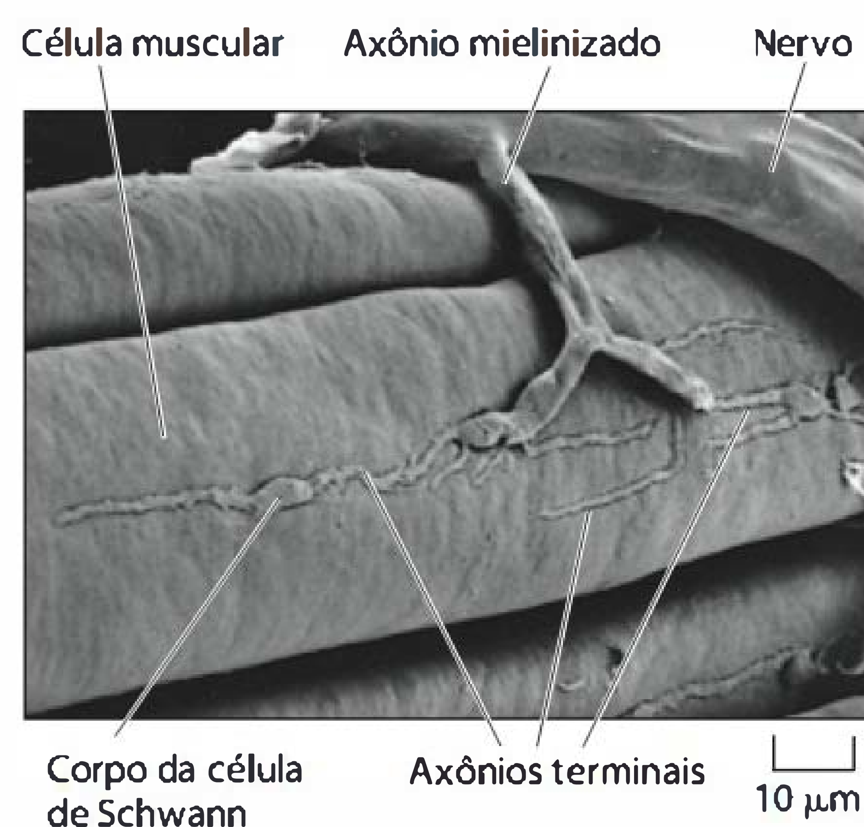


Figura 11-36 Microfotografia eletrônica de varredura de baixo aumento de uma junção neuromuscular em rã. É mostrada a terminação de um único axônio em uma célula musculoesquelética. (De J. Desaki e Y. Uehara, *J. Neurocytol.* 10:101-110, 1981. Com permissão de Kluwer Academic Publishers.)

Os receptores de acetilcolina nas junções neuromusculares são canais catiônicos controlados por transmissor

O exemplo melhor estudado de um canal iônico controlado por transmissor é o *receptor de acetilcolina* das células musculoesqueléticas. Esse canal é transientemente aberto pela liberação de acetilcolina pela terminação nervosa na **junção neuromuscular** – a sinapse química especializada entre um neurônio motor e uma célula musculoesquelética (**Figura 11-36**). Essa sinapse foi intensivamente investigada porque é facilmente acessível a estudos eletrofisiológicos, diferentemente da maioria das sinapses no sistema nervoso central.

O **receptor de acetilcolina** tem um lugar especial na história dos canais iônicos. Foi o primeiro canal iônico a ser purificado, o primeiro a ter sua sequência completa de aminoácidos determinada, o primeiro a ser reconstituído funcionalmente em bicamadas lipídicas sintéticas e o primeiro para o qual foi registrado o sinal elétrico de um único canal aberto. Seu gene também foi o primeiro gene de canal iônico a ser clonado e sequenciado, e sua estrutura tridimensional já foi determinada, embora com resolução moderada. Existiram pelo menos duas razões para o rápido progresso na purificação e na caracterização desse receptor. Primeiro, uma rara fonte, rica em receptores de acetilcolina, existe nos ór-

gãos elétricos de peixes elétricos e de raias (esses órgãos são músculos modificados com a função de aplicar uma forte descarga elétrica na presa). Segundo, certas neurotoxinas (como a *α-bungarotoxina*), no veneno de determinadas cobras, ligam-se com alta afinidade ($K_a = 10^9$ litros/mole) e especificidade ao receptor, portanto, podem ser utilizadas para sua purificação por meio de cromatografia de afinidade. A α-bungarotoxina fluorescente ou radiomarcada também pode ser utilizada para localizar e contar os receptores de acetilcolina. Dessa forma, mostrou-se que os receptores são densamente empacotados na membrana plasmática da célula muscular em uma junção neuromuscular (cerca de 20 mil receptores por μm^2), com relativamente poucos receptores em outros locais na mesma membrana.

O receptor de acetilcolina do músculo esquelético é composto de cinco polipeptídeos transmembrana, dois de um tipo, e três outros, codificados por quatro genes separados. Os quatro genes apresentam sequências altamente similares, significando que evoluíram de um único gene ancestral. Cada um dos dois polipeptídeos idênticos no pentâmero contribui com um dos dois sítios para ligação à acetilcolina que estão alojados em subunidades adjacentes. Quando duas moléculas de acetilcolina ligam-se ao complexo pentamérico, elas induzem uma mudança conformacional: as hélices que revestem o poro giram para disrupcionar um anel de aminoácidos hidrofóbicos que bloqueia o fluxo iônico no estado fechado. Com o ligante ligado, o canal continua alternando entre estado aberto e fechado, mas com uma probabilidade de 90% de permanecer no estado aberto. Esse estado continua até a concentração de acetilcolina ser diminuída suficientemente pela hidrólise de uma enzima específica (*acetilcolinesterase*), localizada na junção neuromuscular. Uma vez livre de seu neurotransmissor, o receptor de acetilcolina reverte ao seu estado inicial de repouso. Se a presença de acetilcolina persiste por um período de tempo prolongado, como resultado de estimulação nervosa excessiva, o canal é inativado (**Figura 11-37**).

A forma geral do receptor de acetilcolina e o arranjo provável de suas subunidades foram determinados por microscopia eletrônica (**Figura 11-38**). As cinco subunidades estão arranjadas em um anel, formando um canal transmembrana preenchido por água, que consiste em um estreito poro na bicamada lipídica, o qual se amplia em vestíbulos em ambas as extremidades. Os grupos de aminoácidos carregados negativamente em ambas as extremidades do poro auxiliam na exclusão de íons negativos e favorecem a passagem de íons positivos com menos de 0,65 nm de diâmetro. O tráfego normal consiste principalmente em Na^+ e de K^+, junto com algum Ca^{2+}. Assim, diferentemente dos canais catiônicos controlados por voltagem, como o canal de K^+ discutido anteriormente, existe pouca seletividade entre cátions, e as contribuições relativas dos diferentes cátions à corrente do canal dependem principalmente das suas concentrações e das forças motrizes eletroquímicas. Quando a membrana celular muscular está em potencial de repouso, a força diretriz líquida para o K^+ é próxima de zero, uma vez que o gradiente de voltagem está quase em equilíbrio com o gradiente de concentração do K^+ através da membrana (ver Painel 11-2, p. 70). Para o Na^+, em contraste, os gradientes de voltagem e de concentração atuam na mesma direção, para conduzir o íon à célula. (Isso também ocorre com o Ca^{2+}, mas a concentração extracelular do Ca^{2+} é tão mais baixa do que a do Na^+, que o Ca^{2+} contribui pouco para a corrente total

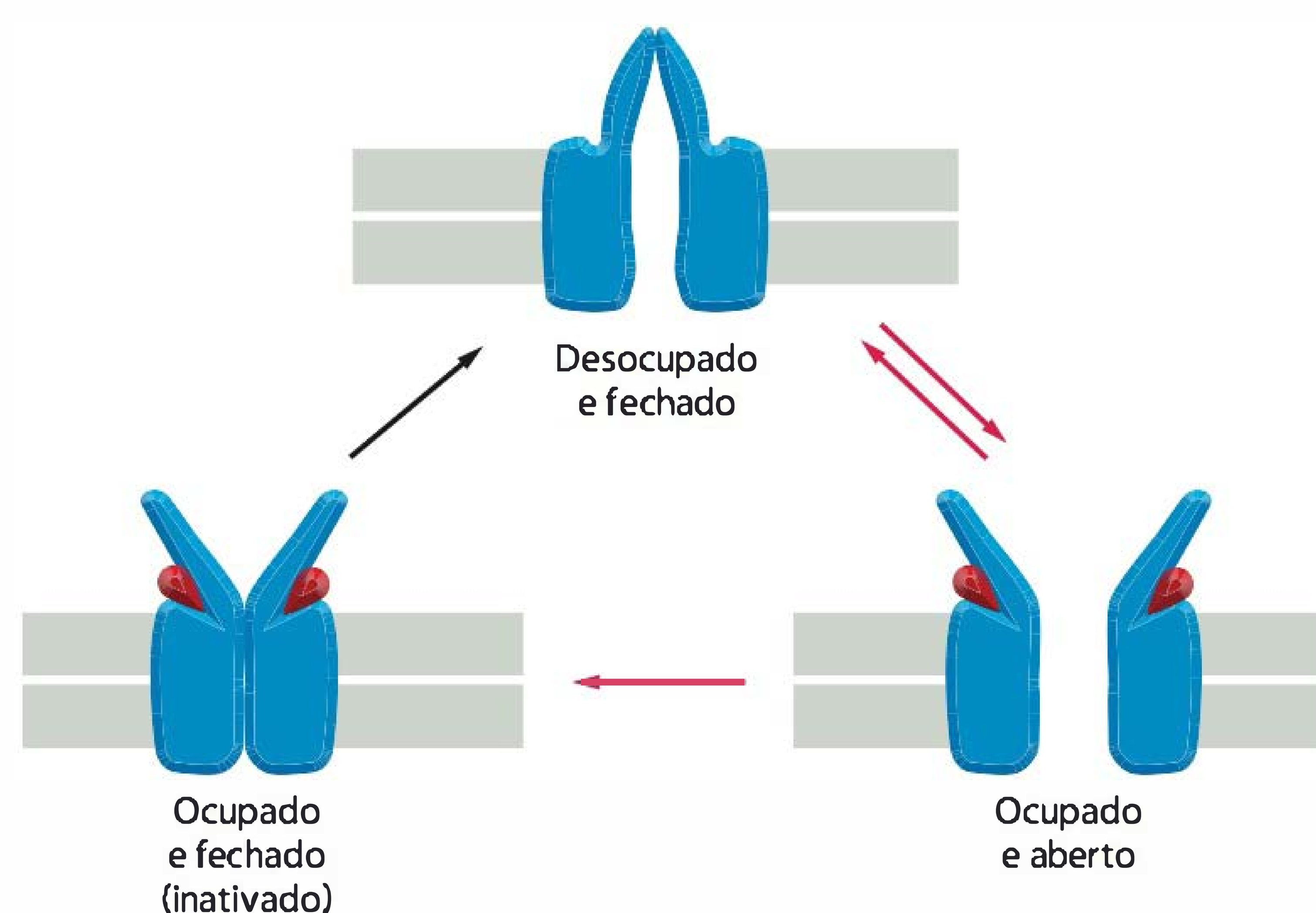


Figura 11-37 Três conformações do receptor de acetilcolina. A ligação de duas moléculas de acetilcolina abre esse canal iônico controlado por transmissor. Ele apresenta, então, alta probabilidade de permanecer aberto até a acetilcolina ser hidrolisada. Na presença persistente de acetilcolina, no entanto, o canal inativa-se (dessensibiliza). Normalmente, a acetilcolina é rapidamente hidrolisada, e o canal fecha-se dentro de cerca de 1 milissegundo, bem antes de ocorrer uma dessensibilização significativa. A dessensibilização aconteceria após cerca de 20 milissegundos, na presença continuada de acetilcolina.

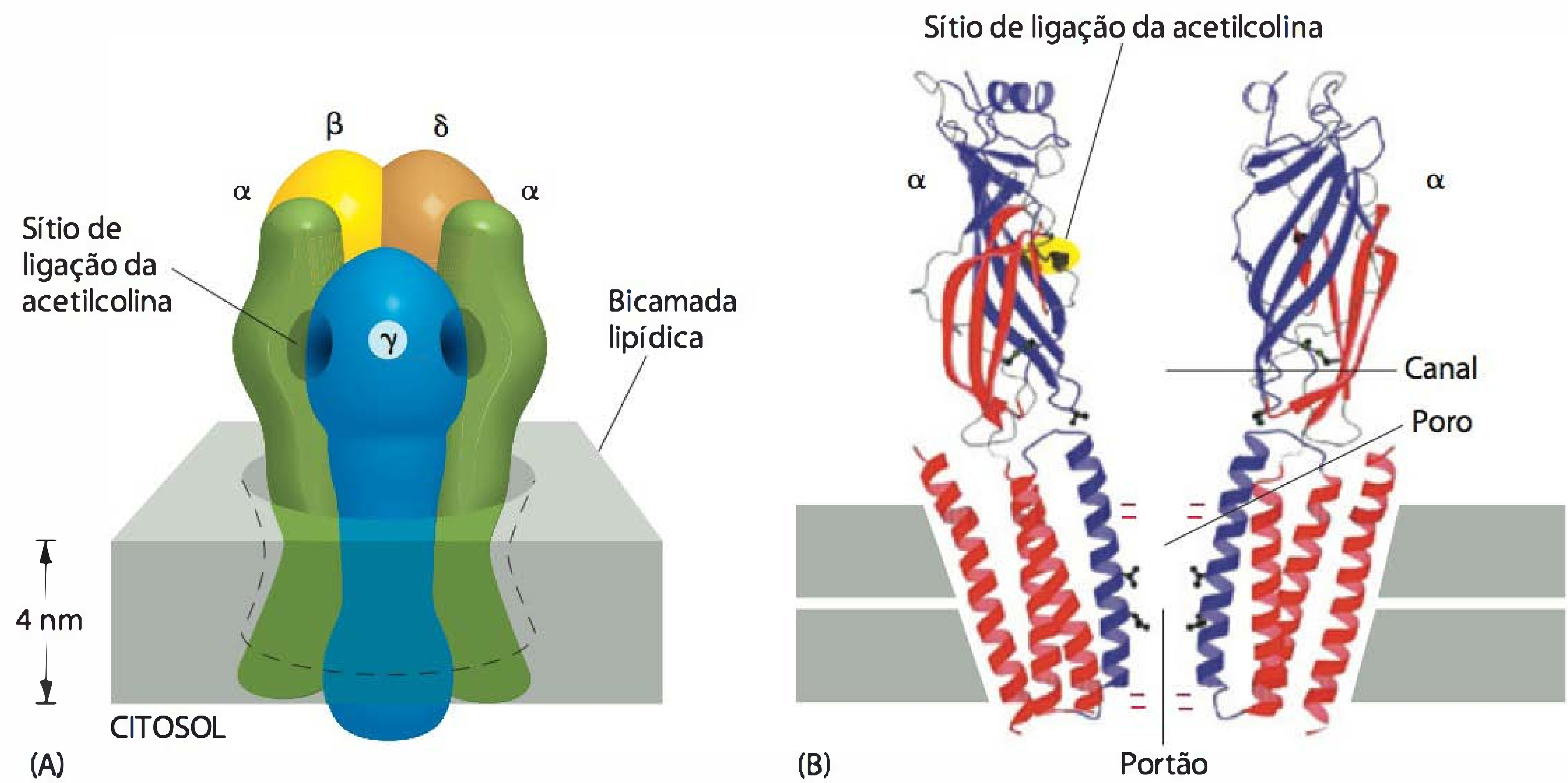


Figura 11-38 Modelo para a estrutura do receptor de acetilcolina. (A) Cinco subunidades homólogas (α, α, β, γ, δ) se combinam para formar um poro aquoso transmembrana. O poro é revestido por um anel de cinco hélices α transmembrana, cada uma sendo a contribuição de uma das subunidades. Na conformação fechada, o poro parece estar obstruído pelas cadeias laterais hidrofóbicas de cinco leucinas, uma de cada hélice α, formando um portão próximo à região mediana da bicamada lipídica. As cadeias laterais das extremidades do poro carregadas negativamente fazem com que somente íons carregados positivamente passem pelo canal. (B) Ambas as subunidades α contribuem com um sítio de ligação à acetilcolina alojado entre as subunidades adjacentes; quando a acetilcolina liga-se em ambos os sítios, o canal sofre uma mudança conformacional que abre o portão, provavelmente por causar rotação das hélices que contêm as leucinas, dirigindo-as para o exterior. Na estrutura desenhada (*à direita*), as partes do canal que se movem em resposta à ligação de AChR para abrir o poro estão coloridas em *azul*. (Adaptada de N. Unwin, *Cell* 72[Suppl.]:31-41, 1993. Com permissão de Elsevier.)

de entrada.) Portanto, a abertura de canais de receptores de acetilcolina leva a um grande influxo líquido de Na^+ (uma taxa no pico de cerca de 30 mil íons por canal a cada milissegundo). Esse influxo induz despolarização na membrana que sinaliza ao músculo para contrair, como discutido a seguir.

Os canais iônicos controlados por transmissor são os principais alvos para os fármacos psicoativos

Os canais iônicos que abrem diretamente em resposta aos neurotransmissores acetilcolina, serotonina, GABA e glicina contêm subunidades que são semelhantes quanto à estrutura e provavelmente formem poros transmembrana da mesma maneira, embora suas especificidades de ligação ao neurotransmissor e as seletividades a íons sejam distintas. Esses canais são construídos a partir de subunidades polipeptídicas homólogas, que provavelmente se associarão sob a forma de um pentâmero semelhante ao receptor de acetilcolina. Os canais iônicos controlados por glutamato são montados a partir de uma família diferente de subunidades e parecem formar tetrâmeros, como os canais de K^+ discutidos anteriormente.

Para cada classe de canais iônicos controlados por transmissor, existem formas alternativas de cada tipo de subunidade, codificadas por diferentes genes ou geradas por *splicing* alternativo de RNA do mesmo produto gênico. Esses genes combinam em diferentes variações para formar um conjunto extremamente diverso de subtipos distintos de canais, com diferentes afinidades a ligantes, diferentes condutâncias de canal, diferentes taxas de abertura e de fechamento e diferentes sensibilidades a fármacos e a toxinas. Os neurônios de vertebrados, por exemplo, apresentam canais iônicos controlados por acetilcolina que diferem daqueles de células musculares, sendo formados, geralmente, por duas subunidades de um tipo e três de outro; no entanto, existem pelos menos nove genes codificadores para diferentes versões do segundo tipo de subunidade, o que é ainda acrescido de maior diversidade devido ao *splicing* alternativo de RNA. Os subconjuntos de neurônios sensíveis à acetilcolina que realizam diferentes funções no cérebro expressam diferentes combinações dessas subunidades. É isso que, em princípio, e de certa forma na prática, torna possível criar fármacos voltados contra grupos de neurônios ou de sinapses estritamente definidos, influenciando, por conseguinte, funções cerebrais específicas.

De fato, os canais iônicos controlados por transmissor têm sido, há bastante tempo, importantes alvos para fármacos. Um cirurgião, por exemplo, pode fazer os músculos relaxarem durante uma cirurgia bloqueando os receptores de acetilcolina nas células musculares esqueléticas com *curare*, um fármaco de uma planta originalmente utilizada em flechas envenenadas pelos índios da América do Sul. A maioria dos fármacos usados no tratamento da insônia, da ansiedade, da depressão e da esquizofrenia exerce seus efeitos nas sinapses químicas, e muitos deles atuam pela ligação a canais controlados por transmissor. Tanto os barbitúricos quanto os tranquilizantes, como Valium e Librium, por exemplo, ligam-se a receptores GABA, potencializando a ação inibitória de GABA, permitindo que concentrações mais baixas desse neurotransmissor abram canais de Cl^-. A nova biologia molecular dos canais iônicos, ao revelar sua diversidade e os detalhes da sua estrutura, trouxe a esperança

do desenvolvimento de uma nova geração de fármacos psicoativos que atuarão ainda mais seletivamente para aliviar os efeitos desastrosos de doenças mentais.

Além dos canais iônicos, muitos outros componentes da maquinaria de sinalização sináptica são alvos potenciais para fármacos psicoativos. Como discutido antes, muitos neurotransmissores, após serem liberados, são removidos da fenda sináptica por reabsorção pelos transportadores dirigidos por Na^+. A inibição de tais transportadores prolonga o efeito do neurotransmissor e reforça a transmissão sináptica. Muitos fármacos antidepressivos, como o Prozac, atuam inibindo a captação de serotonina; outros inibem a captação tanto de serotonina quanto de norepinefrina.

Os canais iônicos são os componentes moleculares básicos a partir dos quais são construídos os dispositivos neuronais para sinalização e computação. Para se ter uma ideia da sofisticação das funções desses dispositivos, apresentamos vários exemplos que demonstram como grupos de canais iônicos trabalham em conjunto na comunicação sináptica entre células eletricamente excitáveis.

A transmissão neuromuscular envolve a ativação sequencial de cinco conjuntos diferentes de canais iônicos

A importância dos canais iônicos para células eletricamente excitáveis pode ser ilustrada acompanhando-se o processo pelo qual um impulso nervoso estimula a contração de uma célula muscular. Essa resposta aparentemente simples requer a ativação sequencial de, pelo menos, cinco conjuntos diferentes de canais iônicos em um intervalo de poucos milissegundos (**Figura 11-39**).

1. O processo é iniciado quando o impulso nervoso atinge a terminação nervosa e despolariza a membrana plasmática da terminação. A despolarização abre temporariamente canais de Ca^{2+} controlados por voltagem nessa membrana. Como a concentração de Ca^{2+} no exterior celular é mais de mil vezes maior que a concentração de Ca^{2+} livre no interior, o Ca^{2+} flui para a terminação nervosa. O aumento na concentração de Ca^{2+} no citosol da terminação nervosa desencadeia a liberação localizada de acetilcolina na fenda sináptica.
2. A acetilcolina liberada liga-se a receptores de acetilcolina na membrana plasmática da célula muscular, abrindo temporariamente os canais catiônicos associados. O influxo de Na^+ resultante induz uma despolarização localizada de membrana.
3. A despolarização local da membrana plasmática da célula muscular abre canais de Na^+ controlados por voltagem nessa membrana, permitindo a entrada de mais Na^+, que despolariza ainda mais a membrana. Em consequência, os canais de Na^+ controlados por voltagem adjacentes abrem-se, e é provocada uma despolarização autopropagada (um potencial de ação) que se espalha, envolvendo a membrana plasmática inteira (ver Figura 11-30).

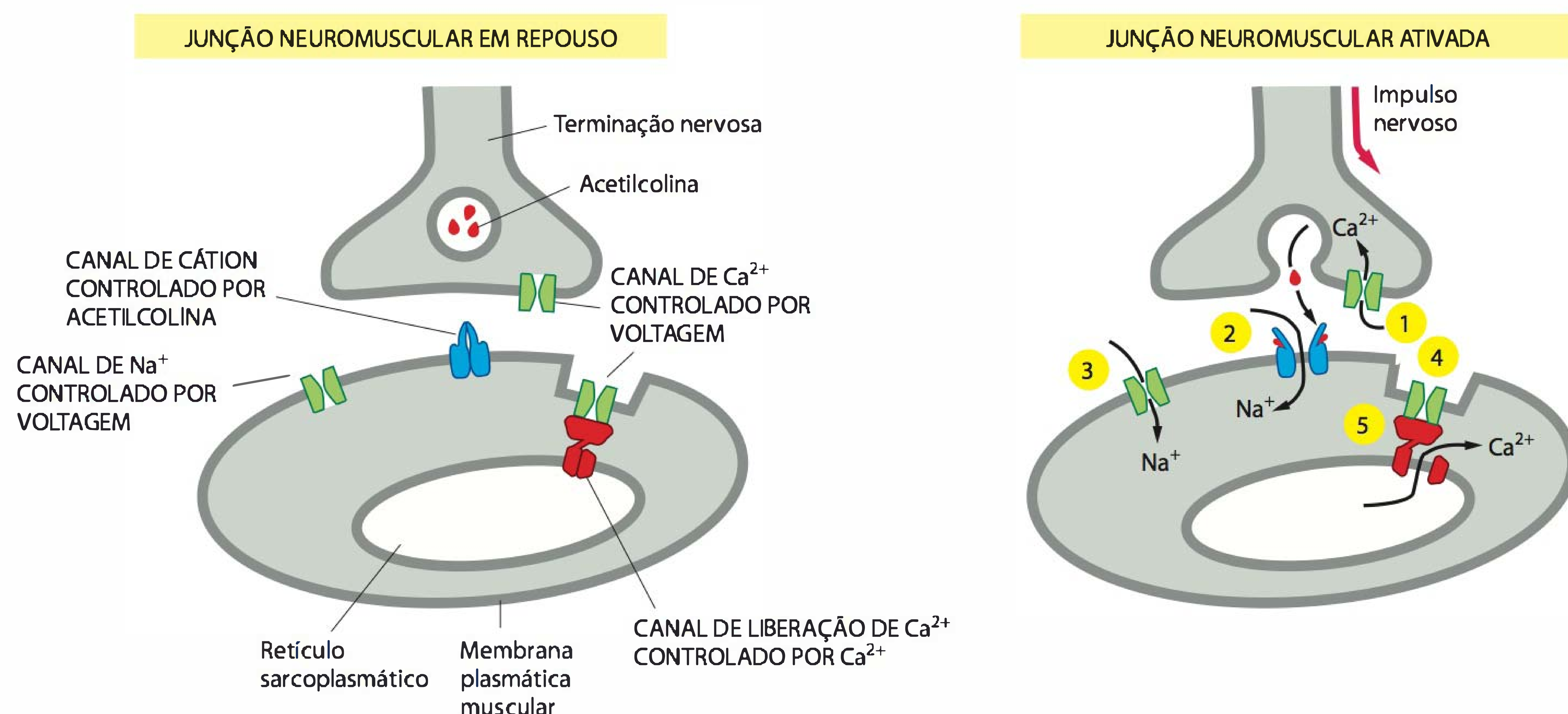


Figura 11-39 Sistema de canais iônicos em uma junção neuromuscular. Esses canais iônicos controlados são essenciais para o estímulo da contração muscular por um impulso nervoso. Os vários canais estão numerados na sequência na qual são ativados, como descrito no texto.

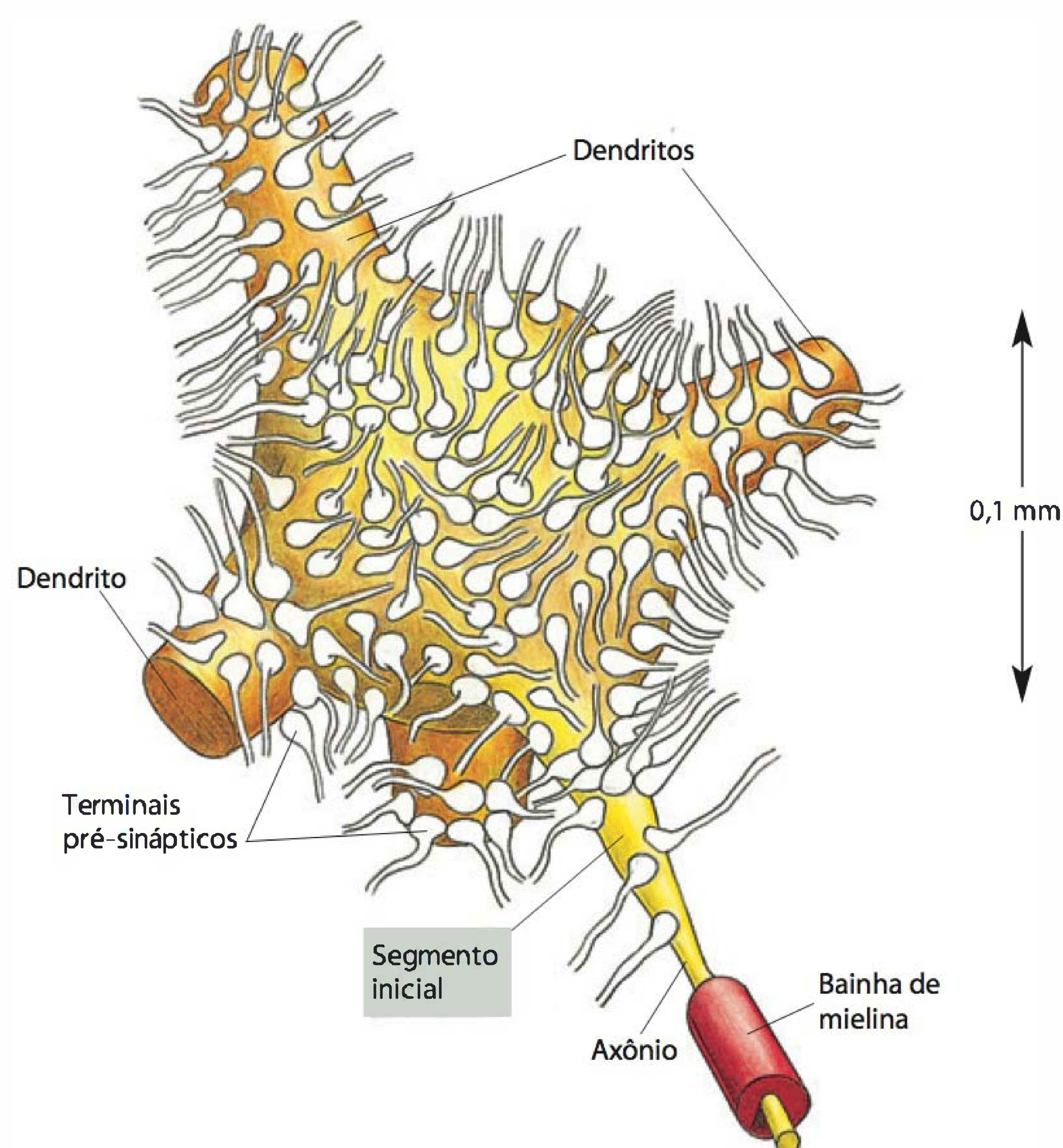
4. A despolarização generalizada da membrana plasmática da célula muscular ativa canais de Ca^{2+} controlados por voltagem em regiões especializadas (os túbulos transversos [T] – discutidos no Capítulo 16) desta membrana.
5. Essa ativação, por sua vez, provoca a abertura transiente de *canais de liberação de* Ca^{2+} localizados em uma região adjacente à membrana do RS e a liberação do Ca^{2+} armazenado no RS para o citosol. As membranas dos túbulos T e do RS são intimamente apostas com os dois tipos de canais unidos formando uma estrutura especializada (ver Figura 16-77). É esse aumento repentino na concentração de Ca^{2+} citosólico que provoca a contração das miofibrilas na célula muscular.

Se a ativação da contração muscular por um neurônio motor é complexa, uma interconexão de canais iônicos ainda mais sofisticada é necessária para um neurônio integrar um grande número de sinais recebidos nas sinapses e computar uma resposta apropriada, como discutiremos a seguir.

Os neurônios individuais são aparelhos de computação complexos

No sistema nervoso central, um único neurônio pode receber informação de milhares de outros neurônios e pode, por sua vez, formar sinapses com milhares de outras células. Vários milhares de terminações nervosas, por exemplo, realizam sinapses em um neurônio motor típico na medula espinal; seus dendritos e seu corpo celular são quase completamente cobertos por elas (**Figura 11-40**). Algumas dessas sinapses transmitem sinais do cérebro ou da medula espinal; outras trazem informações sensoriais dos músculos ou da pele. O neurônio motor deve combinar a informação recebida de todas essas fontes e reagir disparando potenciais de ação ao longo do seu axônio ou permanecendo em repouso.

Das muitas sinapses em um neurônio, algumas tendem a excitá-lo, outras, a inibi-lo. O neurotransmissor liberado em uma sinapse excitatória causa uma pequena despolarização na membrana pós-sináptica denominada *potencial excitatório pós-sináptico* (*PSP excitatório, de excitatory postsynaptic potential*), enquanto o neurotransmissor liberado na sinapse inibitória geralmente causa uma pequena hiperpolarização denominada *PPS inibitório*. A membrana dos dendritos e do corpo celular da maioria dos neurônios contém relativamente baixa densidade de canais de Na^{+} controlados por voltagem, e um PSP excitatório individual geralmente é muito pequeno para induzir um potencial de ação. Em vez disso, cada sinal que chega é refletido em um PSP local de magnitude graduada, que decresce com a distân-



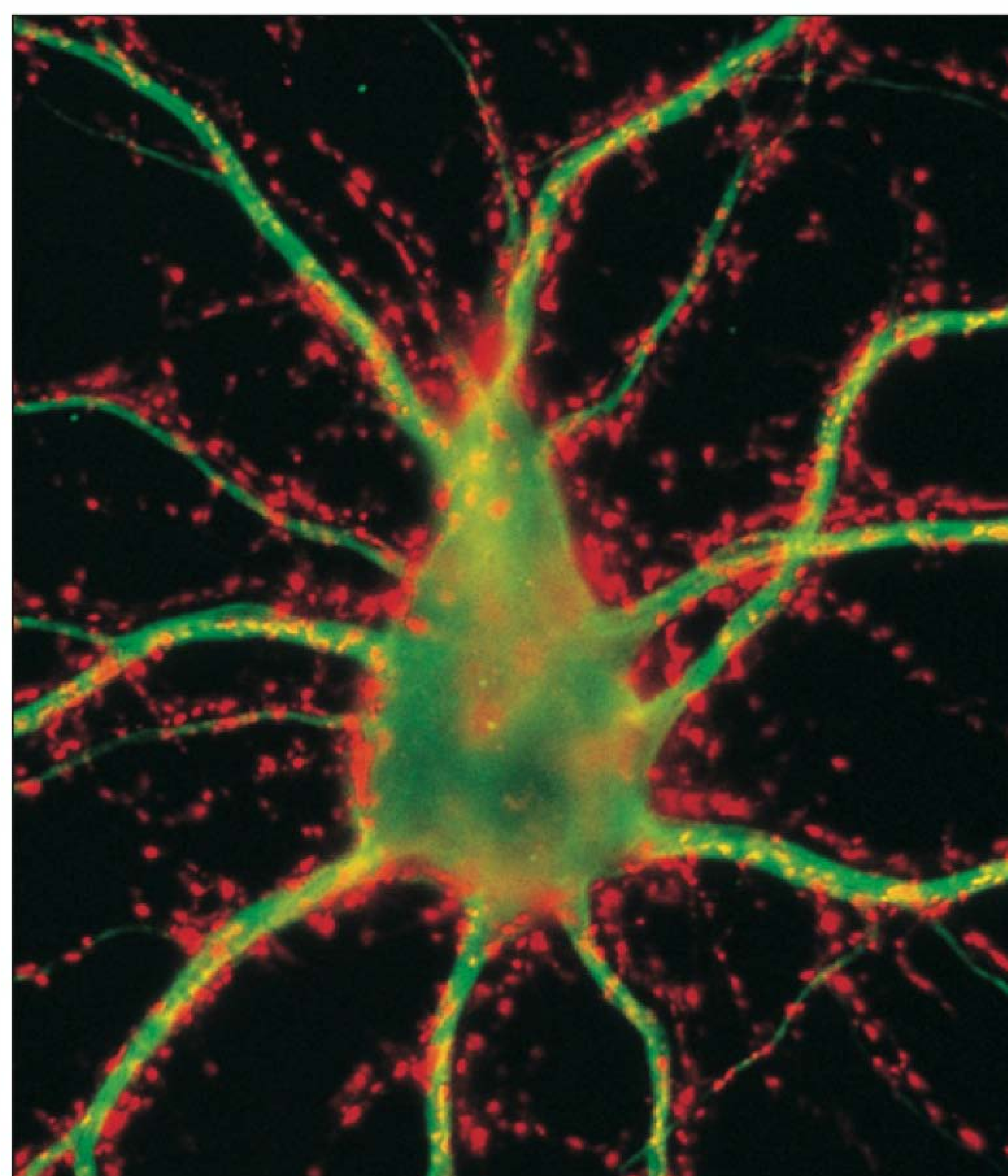


Figura 11-40 Corpo celular de um neurônio motor na medula espinal. (A) Milhares de terminações nervosas formam sinapses no corpo celular e nos dendritos. Elas trazem sinais de outras partes do organismo para controlar os pulsos de potenciais de ação ao longo do axônio único dessa grande célula. (B) Microfotografia mostrando um corpo celular nervoso e seus dendritos corados com um anticorpo fluorescente que reconhece uma proteína do citoesqueleto (*verde*). Milhares de terminações de axônios (*vermelho*) de outras células nervosas (não-visíveis) fazem sinapse no corpo celular e nos dendritos; elas estão coradas com um anticorpo fluorescente que reconhece uma proteína nas vesículas sinápticas. (B, cortesia de Olaf Mundigl e Pietro de Camilli.)

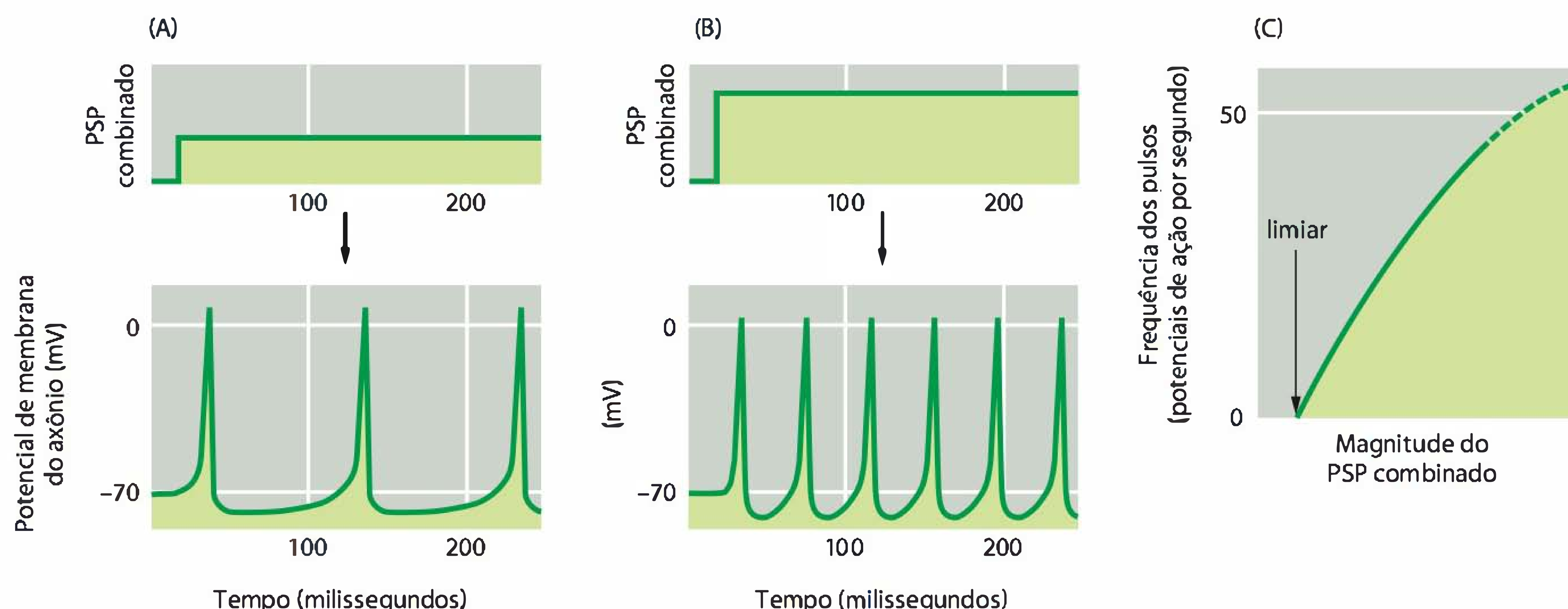


Figura 11-41 A magnitude do potencial pós-sináptico combinado (PSP) é refletida na frequência de pulsos de potencial de ação. Quando potenciais de ação sucessivos chegam a uma mesma sinapse, cada PSP produzido é adicionado ao precedente para a produção de um PSP combinado maior. Uma comparação de (A) e (B) mostra como a frequência de pulsos de um axônio aumenta com um aumento no PSP combinado, enquanto (C) resume a relação geral.

cia do sítio da sinapse. Se os sinais chegam simultaneamente em várias sinapses na mesma região da árvore dendrítica, o PSP total na região será aproximadamente a soma de PSPs individuais, com PSPs inibitórios contribuindo negativamente no somatório. Os PSPs de cada região vizinha espalham-se passivamente e convergem no corpo celular. Para transmissões a grandes distâncias, a magnitude combinada do PSP é então traduzida, ou *codificada*, em uma frequência de pulsos de potenciais de ação (**Figura 11-41**). Essa codificação é alcançada por um conjunto especial de canais iônicos controlados que estão presentes em alta densidade na base do axônio, adjacentes ao corpo celular, em uma região conhecida como *segmento inicial*, ou *cone axonal* (ver Figura 11-40).

A computação neuronal requer uma combinação de pelo menos três tipos de canais de K^+

Vimos que a intensidade do estímulo recebido por um neurônio é codificada para transmissão a longa distância pela frequência dos potenciais de ação que os neurônios disparam: quanto mais forte o estímulo, maior a frequência dos potenciais de ação. Os potenciais de ação são iniciados no **segmento inicial**, uma região característica de cada neurônio onde são numerosos os canais de Na^+ controlados por voltagem. Contudo, para desempenhar esta função especial de codificação, a membrana do cone axonal também contém pelo menos quatro outras classes de canais iônicos – três seletivos para K^+ e um seletivo para Ca^{2+}. As três variedades de canais de K^+ apresentam propriedades diferentes; vamos nos referir a esses canais como os *tardios*, os *precoces* (ou de *rápida inativação*) e os *canais de* K^+ *ativados por* Ca^{2+}.

Para entender a necessidade de múltiplos tipos de canais, consideraremos primeiro o que poderia acontecer se os únicos canais iônicos controlados por voltagem presentes na célula nervosa fossem os canais de Na^+. Abaixo de um certo limiar de estimulação sináptica, a despolarização da membrana do cone axonal seria insuficiente para gerar um potencial de ação. Com estimulação gradualmente crescente, o limiar seria ultrapassado, os canais de Na^+ abririam, e um potencial de ação dispararia. O potencial de ação terminaria da forma usual, por inativação dos canais de Na^+. Antes que outro potencial de ação pudesse disparar, esses canais teriam que se recuperar de sua inativação. No entanto, isso exigiria um retorno da voltagem de membrana para um valor bastante negativo, o qual não ocorreria enquanto o forte estímulo despolarizante (dos PSPs) fosse mantido. Um tipo adicional de canal é necessário, portanto, para repolarizar a membrana após cada potencial de ação, a fim de preparar a célula para um novo pulso.

Essa tarefa é realizada pelos **canais de** K^+ **tardios**, discutidos previamente em relação à propagação do potencial de ação (ver p. 677). Eles são controlados por voltagem, mas, em função da sua cinética mais lenta, eles abrem somente durante a fase de declínio do potencial de ação, quando os canais de Na^+ estão inativos. Sua abertura permite um efluxo de K^+, que faz a membrana retornar ao potencial de equilíbrio do K^+, o qual é tão negativo que os canais de Na^+ rapidamente se recuperam do estado inativado. A repolarização da membra-

na também causa o fechamento dos canais de K^+ tardios. O cone axonal, agora, está reajustado, de modo que o estímulo despolarizante dos sinais sinápticos recebidos pode disparar outro potencial de ação. Dessa forma, a estimulação sustentada dos dendritos e do corpo celular leva a pulsos repetitivos do axônio.

Entretanto, a simples emissão de pulsos repetitivos, *per se*, não é suficiente. A frequência dos pulsos tem que refletir a intensidade do estímulo, e um sistema simples de canais de Na^+ e de canais de K^+ tardios é inadequado para esse propósito. Abaixo de um certo limiar de estimulação estável, a célula não pulsará; acima desse nível limiar, ela subitamente começará a pulsar sob frequência relativamente rápida. Os **canais de K^+ de rápida inativação** (ou precoces) resolvem o problema. Eles também são controlados por voltagem e abrem quando a membrana é despolarizada, mas suas sensibilidades de voltagem específica e cinética de inativação são tais que eles atuam para reduzir a taxa de pulsação em níveis de estimulação que estão pouco acima do limiar requisitado para ativação. Assim, eles eliminam a descontinuidade na relação entre a taxa de pulsos e a intensidade do estímulo. O resultado é uma taxa de pulsos proporcional à força do estímulo despolarizante em uma faixa muito ampla (ver Figura 11-41C).

Geralmente, o processo de codificação também é modulado pelos outros dois tipos de canais iônicos no cone axonal que foram mencionados no início, os canais de Ca^{2+} controlados por voltagem e os canais de K^+ ativados por Ca^{2+}. Eles atuam em conjunto para diminuir a resposta da célula a uma estimulação prolongada constante – um processo denominado **adaptação**. Esses canais de Ca^{2+} são semelhantes aos canais de Ca^{2+} que medeiam a liberação de neurotransmissor das terminações dos axônios pré-sinápticos; eles abrem quando um potencial de ação é disparado, permitindo a entrada transiente de Ca^{2+} no cone axonal.

O **canal de K^+ ativado por Ca^{2+}** é tanto estrutural quanto funcionalmente diferente de qualquer tipo de canal anteriormente descrito. Ele abre em resposta a um aumento na concentração de Ca^{2+} na face citosólica da membrana celular nervosa. Suponha que um forte estímulo despolarizante é aplicado por um longo período, gerando uma longa série de potenciais de ação. Cada potencial de ação permite um breve influxo de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem, de tal forma que a concentração de Ca^{2+} intracelular atinge, gradualmente, um nível alto o suficiente para abrir os canais de K^+ ativados por Ca^{2+}. Devido ao fato de o resultante aumento da permeabilidade da membrana ao K^+ tornar a membrana mais difícil de despolarizar, ela aumenta o espaçamento entre um potencial de ação e o próximo. Dessa forma, um neurônio que é estimulado de modo contínuo por um período prolongado torna-se gradualmente menos responsivo ao estímulo constante.

Tal adaptação, que também pode ocorrer por outros mecanismos, permite que um neurônio – de fato, que o sistema nervoso em geral – reaja sensivelmente a *mudanças*, mesmo que elas ocorram em uma situação de alto *background* de estimulação constante. Essa é uma das estratégias que nos auxilia, por exemplo, a sentir um leve toque no ombro e, no entanto, ignorar a pressão constante de nossas roupas. Discutimos a adaptação como uma característica geral em processos de sinalização celular em mais detalhes no Capítulo 15.

Outros neurônios realizam computações diferentes, reagindo aos sinais sinápticos recebidos de inúmeras formas, refletindo as diferentes associações e arranjos de membros de várias famílias de canais iônicos que residem nas suas membranas. Existem várias centenas de genes que codificam canais iônicos no genoma humano, dos quais cerca de 150 representam canais controlados por voltagem. Um outro nível de complexidade é introduzido pelo *splicing* alternativo de RNAs e pela montagem de canais através da combinação de diferentes subunidades. A multiplicidade de canais iônicos permite a existência de uma grande variedade de diferentes tipos de neurônios, cujo comportamento elétrico é projetado especificamente para realizar as tarefas específicas que eles precisam executar.

Uma das propriedades fundamentais do sistema nervoso é a sua capacidade de aprender e lembrar, que parece depender das mudanças a longo prazo em sinapses específicas. Encerraremos este capítulo considerando um tipo extraordinário de canal iônico que, aparentemente, tem um papel especial em algumas formas de aprendizagem e de memória. Ele está localizado em diversas sinapses no sistema nervoso central, onde é controlado tanto por voltagem quanto pelo neurotransmissor excitatório glutamato. Ele também é o sítio de ação do fármaco psicoativo fenciclidina, conhecido como "pó-de-anjo".

A potencialização de longo termo no hipocampo de mamíferos depende da entrada de Ca^{2+} pelos canais receptores NMDA

Praticamente todos os animais podem aprender, mas os mamíferos parecem aprender excepcionalmente bem (ou assim gostamos de pensar). No cérebro de um mamífero, a região

denominada *hipocampo* apresenta um papel especial no aprendizado. Quando ela é destruída em ambos os lados do cérebro, a capacidade de formar novas memórias é praticamente perdida, embora a memória previamente estabelecida permaneça. Correspondentemente, algumas sinapses no hipocampo mostram marcadas alterações funcionais com uso repetido: enquanto potenciais de ação isolados ocasionais nas células pré-sinápticas não deixam traço duradouro, uma curta sequência de pulsos repetitivos causa **potencialização de longo termo (LTP,** *long-term potentiation*), de tal modo que os potenciais de ação isolados subsequentes nas células pré-sinápticas evocam uma resposta aumentada nas células pós-sinápticas. O efeito dura horas, dias ou semanas, de acordo com o número e a intensidade das sequências de pulsos repetitivos. Somente as sinapses que foram ativadas exibem LTP; as sinapses que permaneceram em repouso na mesma célula pós-sináptica não são afetadas. Entretanto, enquanto a célula está recebendo uma sequência de estimulação repetitiva via um conjunto de sinapses, se um potencial de ação isolado é liberado em *outra* sinapse na sua superfície, a última sinapse também sofrerá LTP, mesmo considerando-se que um potencial de ação único liberado no mesmo local em um outro momento não tenha deixado efeito duradouro.

A regra fundamental em tais sinapses parece ser que a LTP *ocorre em qualquer ocasião quando uma célula pré-sináptica pulsa (uma ou mais vezes) em um momento em que a membrana pós-sináptica está fortemente despolarizada* (quer por pulsos repetitivos recentes da mesma célula pré-sináptica, quer por outras formas). Essa regra reflete o comportamento de uma classe particular de canais iônicos na membrana pós-sináptica. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, e os canais iônicos controlados por glutamato são os mais comuns de todos os canais controlados por neurotransmissor no cérebro. No hipocampo, como em outras partes, a maioria das correntes despolarizantes responsáveis por PSPs excitatórios é realizada por canais iônicos controlados por glutamato, denominados **receptores AMPA**, que operam da forma-padrão. Mas a corrente possui, além disso, um segundo e mais intrigante componente, que é mediado por uma subclasse separada de canais iônicos controlados por glutamato, conhecidos como **receptores NMDA**, assim chamados porque são seletivamente ativados pelo análogo artificial de glutamato N-metil-D-aspartato. Os canais receptores NMDA são duplamente controlados, abrindo somente quando duas condições são simultaneamente satisfeitas: o glutamato deve estar ligado ao receptor, e a membrana deve estar fortemente despolarizada. A segunda condição é necessária para a liberação do Mg^{2+} que, normalmente, bloqueia o canal em repouso. Isso significa que os receptores NMDA normalmente são ativados somente quando os receptores AMPA também são ativados e despolarizam a membrana. Os receptores NMDA essenciais para a LTP. Quando estão seletivamente bloqueados com um inibidor específico, ou em animais transgênicos nocautes para esse gene, a LTP não ocorre, embora a transmissão sináptica regular continue. Esses animais apresentam déficits específicos nas suas capacidades de aprendizado, mas comportam-se quase normalmente quanto a outros aspectos.

Como os receptores NMDA medeiam tal efeito extraordinário? A resposta é que esses canais, quando abertos, são fortemente permeáveis ao Ca^{2+}, que atua como um mediador intracelular na célula pós-sináptica, acionando uma cascata de mudanças que são responsáveis pela LTP. Assim, a LTP é evitada quando os níveis de Ca^{2+} são mantidos artificialmente baixos na célula pós-sináptica, pela injeção do quelante de Ca^{2+} EGTA nesta célula, e pode ser induzida aumentando artificialmente os níveis de Ca^{2+} intracelular. Entre as mudanças a longo termo que aumentam a sensibilidade da célula pós-sináptica ao glutamato está a inserção de novos receptores AMPA na membrana plasmática (**Figura 11-42**). As evidências também indicam que podem ocorrer alterações na célula pré-sináptica, de modo que ela libera mais glutamato que o normal, quando é ativada subsequentemente.

Se as sinapses expressassem apenas a LTP, elas rapidamente ficariam saturadas e, assim, teriam um valor limitado como aparelhagem de estoque de informação. Na verdade, as sinapses também exibem uma **depressão de longo termo (LTD**, *long-term depression*), que surpreendentemente também necessita de ativação de receptores NMDA e aumento nos níveis de Ca^{2+}. Como o Ca^{2+} induz efeitos opostos em uma mesma sinapse? A verdade é que esse controle bidirecional da intensidade sináptica depende da magnitude da elevação dos níveis de Ca^{2+}: altos níveis de Ca^{2+} ativam proteína-cinases e LTP, ao passo que níveis moderados de Ca^{2+} ativam proteína-fosfatases e LTD.

Existem evidências que os receptores NMDA têm um papel importante no aprendizado e em fenômenos relacionados em outras partes do cérebro, bem como no hipocampo. No Capítulo 21 veremos, além disso, que os receptores NMDA têm um papel fundamental no ajuste de padrões anatômicos de conexões sinápticas à luz da experiência durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

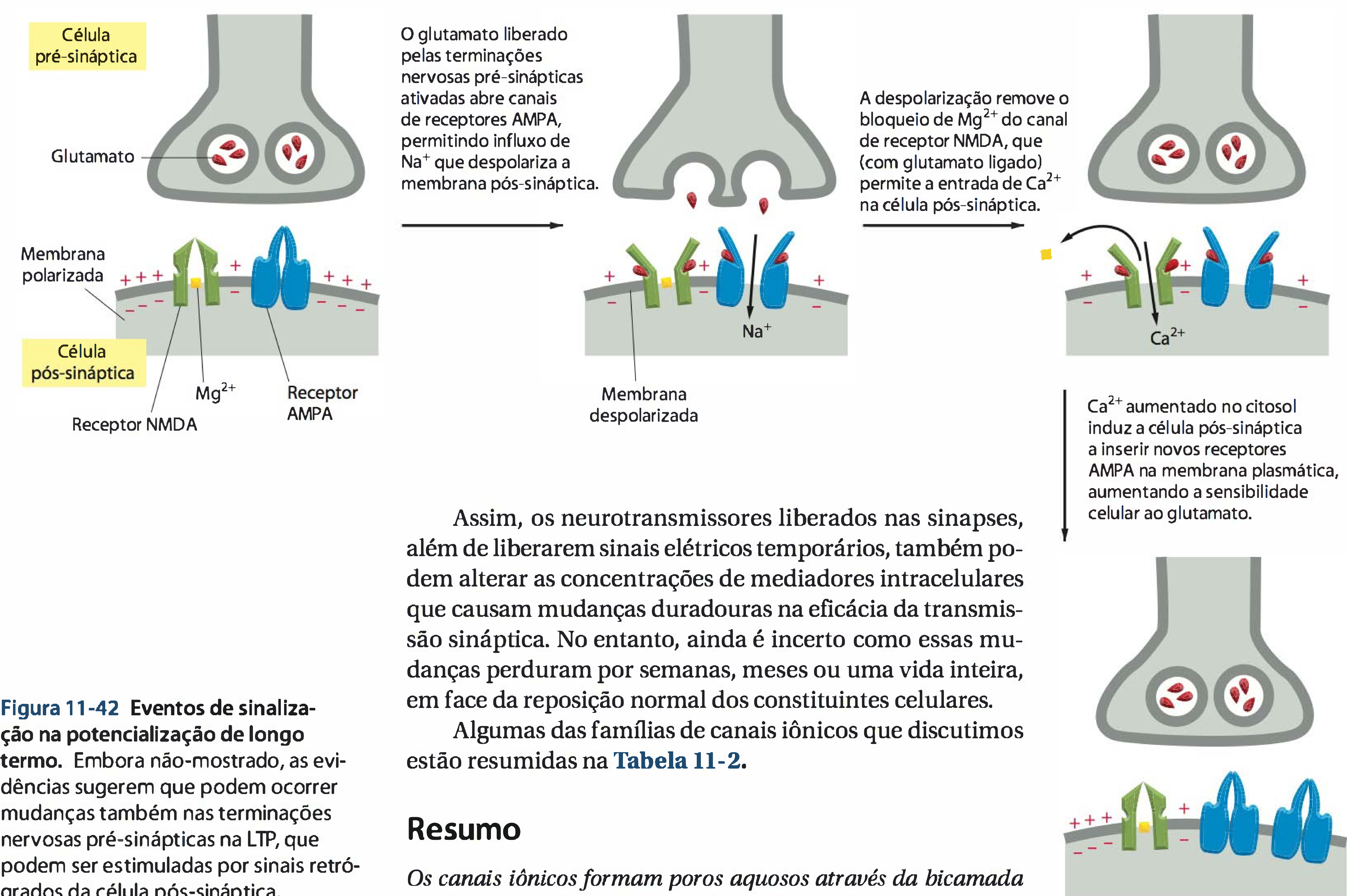


Figura 11-42 Eventos de sinalização na potencialização de longo termo. Embora não-mostrado, as evidências sugerem que podem ocorrer mudanças também nas terminações nervosas pré-sinápticas na LTP, que podem ser estimuladas por sinais retrógrados da célula pós-sináptica.

Assim, os neurotransmissores liberados nas sinapses, além de liberarem sinais elétricos temporários, também podem alterar as concentrações de mediadores intracelulares que causam mudanças duradouras na eficácia da transmissão sináptica. No entanto, ainda é incerto como essas mudanças perduram por semanas, meses ou uma vida inteira, em face da reposição normal dos constituintes celulares.

Algumas das famílias de canais iônicos que discutimos estão resumidas na **Tabela 11-2**.

Resumo

Os canais iônicos formam poros aquosos através da bicamada lipídica e permitem que os íons inorgânicos de tamanho e carga apropriados cruzem a membrana a favor de seus gradientes eletroquímicos, em taxas em torno de mil vezes maiores que aquelas atingidas por qualquer transportador conhecido. Os canais são "controlados" e em geral abrem temporariamente em resposta a uma perturbação específica na membrana, como uma mudança no potencial de membrana (canais controlados por voltagem) ou uma ligação de um neurotransmissor (canais controlados por transmissor).

Os canais permeáveis seletivos a K^+ *apresentam um papel importante na determinação do potencial de repouso da membrana através da membrana plasmática, na maioria das células animais. Os canais catiônicos controlados por voltagem são responsáveis pela geração de potenciais de ação de autoamplificação em células eletricamente excitáveis, como as células neuronais e as células musculoesqueléticas. Os canais iônicos controlados por transmissor convertem sinais químicos em sinais elétricos nas sinapses químicas. Os neurotransmissores excitatórios, como a acetilcolina e o glutamato, abrem canais catiônicos controlados por transmissor e, portanto, despolarizam a membrana pós-sináptica rumo a um limiar, para disparar um potencial de ação. Os neurotransmissores inibitórios, como o GABA e a glicina, abrem canais de* K^+ *ou* Cl^- *controlados por transmissor e suprimem os pulsos mantendo a membrana pós-sináptica polarizada. Uma subclasse de canais iônicos controlados por glutamato, denominados canais receptores NMDA, é composta por membros fortemente permeáveis ao* Ca^{2+}*, o qual pode acionar as mudanças de longo termo nas sinapses, como a LTP e a LTD, que aparentemente estão envolvidas em algumas formas de aprendizado e de memória.*

Tabela 11-2 Algumas famílias de canais iônicos

Tipo de canal	Exemplo representativo	
Canais catiônicos controlados por voltagem	Canais de Na^+ controlados por voltagem	
	Canais de K^+ controlados por voltagem (incluindo tardio e precoce)	
	Canais de Ca^{2+} controlados por voltagem	
Canais iônicos controlados por transmissores	Canais catiônicos controlados por acetilcolina	Excitatório
	Canais de Ca^{2+} controlados por glutamato	Excitatório
	Canais catiônicos controlados por serotonina	Excitatório
	Canais de Cl^- controlados por GABA	Inibitório
	Canais de Cl^- controlados por glicina	Inibitório

Os canais iônicos atuam em conjunto de formas complexas para controlar o comportamento de células eletricamente excitáveis. Um neurônio típico, por exemplo, recebe milhares de sinais excitatórios e inibitórios, os quais se combinam por um somatório espacial e temporal para produzir um potencial pós-sináptico (PSP) no corpo celular. A magnitude do PSP é traduzida na taxa de pulsos de potenciais de ação por uma mistura de canais catiônicos na membrana do cone axonal.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

11-1 O transporte mediado por transportadores pode ser tanto ativo quanto passivo, ao passo que o transporte mediado por canais é sempre passivo.

11-2 Os transportadores sofrem saturação em altas concentrações das moléculas a serem transportadas quando seus sítios de ligação estão ocupados; os canais, por outro lado, não se ligam aos íons que transportam e, dessa forma, o fluxo de íons através de canais não sofre saturação.

11-3 O potencial de membrana é gerado a partir de movimentos de carga que mantêm as concentrações iônicas praticamente inalteradas e que ocasionam apenas discrepâncias muito pequenas no número de íons positivos e negativos entre os dois lados da membrana.

Discuta as seguintes questões.

11-4 Ordene de acordo com a capacidade de difusão através de uma bicamada lipídica, começando pela molécula que atravessa a bicamada mais facilmente: Ca^{2+}, CO_2, etanol, glicose, RNA e H_2O. Justifique seu ordenamento.

11-5 Como é possível que algumas moléculas estejam em equilíbrio através de uma membrana biológica apesar de não estarem sob a mesma concentração nos dois lados da membrana?

11-6 Os transportadores iônicos estão "ligados" uns aos outros – não fisicamente, mas como consequência de suas funções. Por exemplo, as células podem aumentar o pH interno, quando ele se torna demasiadamente ácido, através da troca de Na^+ externo por H^+ interno, usando um antiporte Na^+-H^+. A alteração de Na^+ interno é então reorganizada através da atuação da bomba de Na^+-K^+.

A. Esses transportadores podem, atuando em conjunto, normalizar tanto a concentração de H^+ quanto a de Na^+ no interior de uma célula?

B. Pode a ação conjunta dessas duas bombas provocar um desequilíbrio na concentração de K^+ ou no potencial de membrana? Justifique sua resposta.

11-7 As microvilosidades aumentam a área de superfície das células intestinais, levando a uma absorção de nutrientes mais eficiente. As microvilosidades são ilustradas em perfil e em secção transversal na **Figura Q11-1**. A partir das dimensões dadas na figura, estime o aumento na área de superfície devido à presença de microvilosidades (relativo à porção de membrana plasmática que está em contato com o lúmen do intestino) em comparação à superfície correspondente se a célula apresentasse uma membrana plasmática "plana".

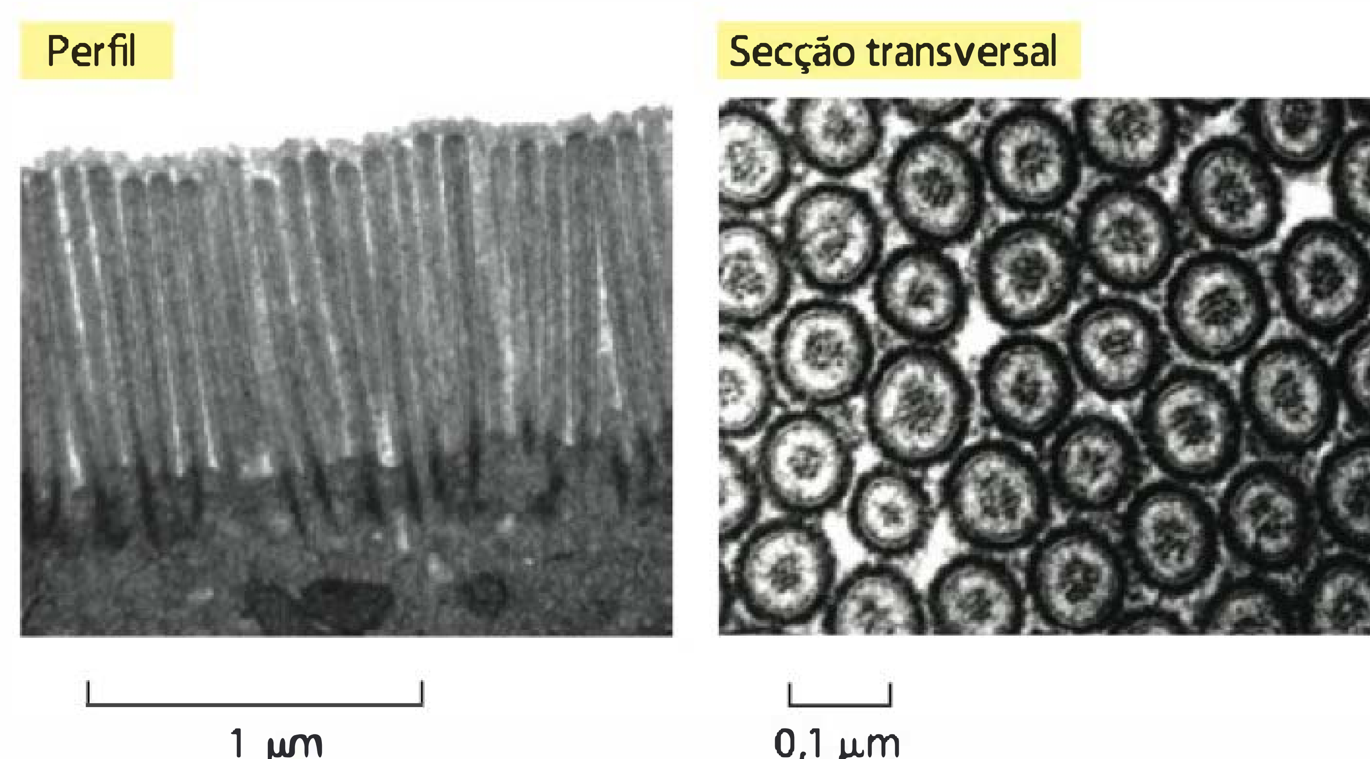


Figura Q11-1 As microvilosidades de células epiteliais intestinais em perfil e em secção transversal (Questão 11-7). (Painel da esquerda, de Rippel Electron Microscope Facility, Dartmouth College; Painel da direita, de David Burgess.)

11-8 De acordo com as leis do movimento de Newton, um íon exposto a um campo elétrico no vácuo sofrerá uma aceleração constante referente à força motriz elétrica, semelhante à aceleração referente à gravidade, de um corpo em queda no vácuo. Na água, no entanto, um íon se move em velocidade constante dentro de um campo elétrico. Por que isso acontece?

11-9 O modelo de "bola e corrente" que permite a rápida inativação de canais de K^+ controlados por voltagem foi elegantemente confirmado no canal de K^+ *shaker* (ou de tremor) de *Drosophila melanogaster*. (O canal de K^+ *shaker* de *Drosophila melanogaster* recebeu este nome a partir da forma mutante que apresenta comportamento excitável – mesmo moscas anestesiadas permanecem com tremores.) A deleção dos aminoácidos N-terminais do canal *shaker* normal dá origem a um canal que abre em resposta à despolarização da membrana, mas que permanece aberto em vez de fechar rapidamente como sua versão normal. Um peptídeo (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQ) que corresponde à porção N-terminal deletada pode inativar a abertura do canal se usado em concentração de 100 μM.

A concentração de peptídeo livre (100 μM) necessária para inativar o canal defeituoso de K^+ é, de alguma forma, semelhante à concentração local do peptídeo ligado à molécula (modelo de "bola e corrente") que normalmente existe no canal? Assuma que a estrutura de "bola e corrente" pode explorar um hemisfério (volume = $[2/3]\pi r^3$) com um raio de 21,4 nm, ou seja, o comprimento da "cadeia" polipeptídica (**Figura Q11-2**). Calcule a concentração relativa a uma bola neste hemisfério. Compare esse valor com a concentração de peptídeo livre necessária para inativar o canal.

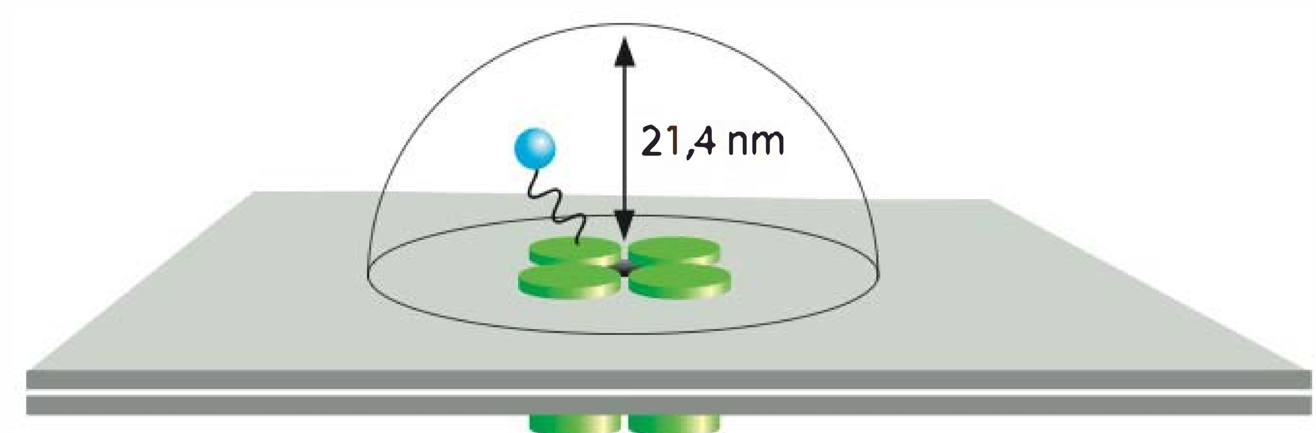


Figura Q11-2 Uma "bola" ligada através de uma "corrente" a um canal de K^+ controlado por voltagem (Questão 11-9).

11-10 O axônio gigante de lula ocupa uma posição especial na história de nossa compreensão dos potenciais de membrana celular e ação neuronal. Quando um eletrodo é inserido em um axônio gigante intacto, o potencial de membrana registra −70 mV. Quando o axônio, suspenso em uma solução de água do mar, é estimulado para a condução de impulso nervoso, o potencial de membrana é transientemente alterado de −70 mV para +40 mV.

Para íons univalentes e a 20°C (293K), a equação de Nernst equivale a

$$V = 58\ mV \times \log (C_0/C_i)$$

onde C_0 e C_i correspondem às concentrações externas e internas, respectivamente.

Usando essa equação, calcule o potencial através da membrana em repouso (1) assumindo que ele é devido unicamente ao K^+ e (2) assumindo que ele é devido unicamente ao Na^+. (As concentrações de Na^+ e de K^+ presentes no citoplasma do axônio em água do mar são fornecidas na **Tabela Q11-1**.) Que resultado está mais próximo do potencial de repouso medido? Que resultado está mais próximo do potencial de ação medido? Explique por que seus resultados se aproximam dos potenciais de ação e repouso medidos.

Tabela Q11-1 Composição iônica da água do mar e do citoplasma de um axônio gigante de lula (Questão 11-10)

Íon	Citoplasma	Água do mar
Na^+	65 mM	430 mM
K^+	344 mM	9 mM

REFERÊNCIAS

Geral

Martonosi AN (ed) (1985) The enzymes of Biological membranes, vol 3: Membrane transport. 2nd edn. New York: Penum Press.
Stein WD (1990) Channels, carriers and pumps: An introduction to membrane transport. San Diego: Academic Press

Princípios do transporte de membrana

Al-Awqati Q (1999) One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nature Cell Biol* 1: E201–E202.
Forrest LR & Sansom MS (2000) Membrane simulations: bigger and better? *CurrOpin Struct Biol* 10:174–181.
Gouaux E and MacKinnon R (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461–1465.
Mitchell P (1977) Vectorial chemiosmotic processes. *Annu Rev Biochem* 46:996–1005.
Tanford C (1983) Mechanism of free energy coupling in active transport. *Annu Rev Biochem* 52:379–409.

Proteínas carreadoras e o transporte ativo de membrana

Almers W & Stirling C (1984) Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J Membr Biol* 77:169–186.
Baldwin SA & Henderson PJ (1989) Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol* 51:459–471.
Borst P & Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537–592.
Carafoli E & Brini M (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *CurrOpin Chem Biol* 4:152–161.
Dean M, Rzhetsky A et al (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156–1166.
Doige CA & Ames GF (1993) ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 47:291–319.
Gadsby DC, Vergani P & Csanady L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440:477–83.
Higgins CF (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446:749–57.
Kaback HR, Sahin-Toth M et al (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:610–620.
Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:282–295.
Lodish HF (1986) Anion-exchange and glucose transport proteins: structure, function, and distribution. *Harvey Lect* 82:19–46.
Pedersen PL & Carafoli E (1987) Ion motive ATPases. 1. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12:146–150.
Romero MF & Boron WF (1999) Electrogenic Na^+/HCO_3^- cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61:699–723.
Saier MH, Jr (2000) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol* 182:5029–5035.
Scarborough GA (2003) Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends Biochem Sci* 28:581–584.
Stein WD (2002) Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells. *Int RevCytol* 215:231–258.

Canais iônicos e as propriedades elétricas das membranas

Armstrong C (1998) The vision of the pore. *Science* 280:56–57.
Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nature Rev Neurosci* 3:115–21.
Choe S, Kreusch A & Pfaffinger PJ (1999) Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends Biochem Sci* 24:345–349.
Franks NP & Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607–614.
Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294:1024–30.
Hille B (2001) Ionic Channels of Excitable Membranes, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer.
Hucho F, Tsetlin VI & Machold J (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 239:539–557.
Hodgkin AL & Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500–544.
Hodgkin AL & Huxley AF (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:449–472.
Jessell TM & Kandel ER (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell–cell communication. *Cell* 72[Suppl]:1–30.
Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM (2000) Principles of Neural Science, 4th ed. New York: McGraw-Hill.
Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Rev Neurosci* 3:102–114.
Katz B (1966) Nerve, Muscle and Synapse. New York: McGraw-Hill.
King LS, Kozono D & Agre P (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:687–698.
MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* 555:62–65.
Malenka RC & Nicoll RA (1999) Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285:1870–1874.
Moss SJ & Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Rev Neurosci* 2:240–250.
Neher E and Sakmann B (1992)The patch clamp technique. *Sci Am* 266:44–51.
Nicholls JG, Fuchs PA, Martin AR & Wallace BG (2000) From Neuron to Brain, 4th ed. Sunderland, MA: Sinauer.
Numa S (1987) A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect* 83:121–165.
Scannevin RH & Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nature Rev Neurosci* 1:133–141.
Seeburg PH (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359–365.
Snyder SH (1996) Drugs and the Brain. New York: WH Freeman/ Scientific American Books.
Stevens CF (2004) Presynaptic function. *CurrOpin Neurobiol* 14:341–345.
Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV et al (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431–438.
Unwin N (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555:91–95.

Compartimentos Intracelulares e Endereçamento de Proteínas

12

Neste capítulo

COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS CÉLULAS 695

TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE O NÚCLEO E O CITOSOL 704

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS PARA MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS 713

PEROXISSOMOS 721

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO 723

Diferentemente de uma bactéria, que geralmente consiste em um único compartimento intracelular envolto por uma membrana plasmática, uma célula eucariótica é subdividida de forma elaborada em compartimentos funcionalmente distintos envoltos por membranas. Cada compartimento, ou **organela**, contém seu próprio conjunto característico de enzimas e outras moléculas especializadas, e um sistema de distribuição complexo transporta produtos específicos de um compartimento a outro. Para entender a célula eucariótica é essencial conhecer como a célula cria e mantém esses compartimentos, o que ocorre em cada um deles e como as moléculas se movem entre eles.

As proteínas conferem características estruturais e propriedades funcionais a cada compartimento. Elas catalisam as reações que ocorrem em cada organela e transportam seletivamente pequenas moléculas para dentro ou para fora de seu interior, ou lúmen. As proteínas também servem como marcadores de superfície organela-específicos que direcionam a entrega de novas proteínas e lipídeos em organelas apropriadas.

Uma célula animal contém cerca de 10 bilhões (10^{10}) de moléculas proteicas de aproximadamente 10 mil tipos, e a síntese de quase todas elas inicia-se no citosol. Cada proteína sintetizada novamente é então entregue especificamente ao compartimento celular que a necessite. O transporte intracelular de proteínas é o tema central deste capítulo e do próximo. Ao acompanhar o tráfego das proteínas de um compartimento a outro, podemos começar a entender o labirinto confuso de membranas intracelulares.

COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS CÉLULAS

Neste breve resumo dos compartimentos celulares e das relações entre eles, organizamos conceitualmente as organelas em um pequeno número de famílias distintas, discutimos como as proteínas são direcionadas a organelas específicas e explicarmos como as proteínas atravessam as membranas das organelas.

Todas as células eucarióticas têm o mesmo conjunto básico de organelas envoltas por membranas

Muitos processos bioquímicos vitais ocorrem dentro das membranas ou em sua superfície. Enzimas aderidas à membrana, por exemplo, catalisam o metabolismo de lipídeos, e tanto a fosforilação oxidativa como a fotossíntese necessitam de uma membrana para acoplar o transporte de H^+ para a síntese de ATP. Além de fornecer um aumento na área de membranas para abrigar reações bioquímicas, os sistemas de membranas intracelulares criam compartimentos fechados que são separados do citosol, provendo a célula de espaços aquosos funcionalmente especializados. Como a bicamada lipídica das membranas de organelas é impermeável a muitas moléculas hidrofílicas, a membrana de cada organela deve conter proteínas de transporte de membrana para a importação e a exportação de metabólitos específicos. Cada membrana de organela deve também ser dotada de um mecanismo para a importação e a incorporação, na organela, de proteínas específicas que a tornam única.

A **Figura 12-1** ilustra os principais compartimentos intracelulares comuns às células eucarióticas. O *núcleo* contém o genoma (além do DNA mitocondrial e de cloroplastos) e é o sítio principal de síntese de DNA e de RNA. O **citoplasma** circundante consiste no citosol e nas organelas citoplasmáticas nele imersas. O **citosol**, que representa um pouco mais da

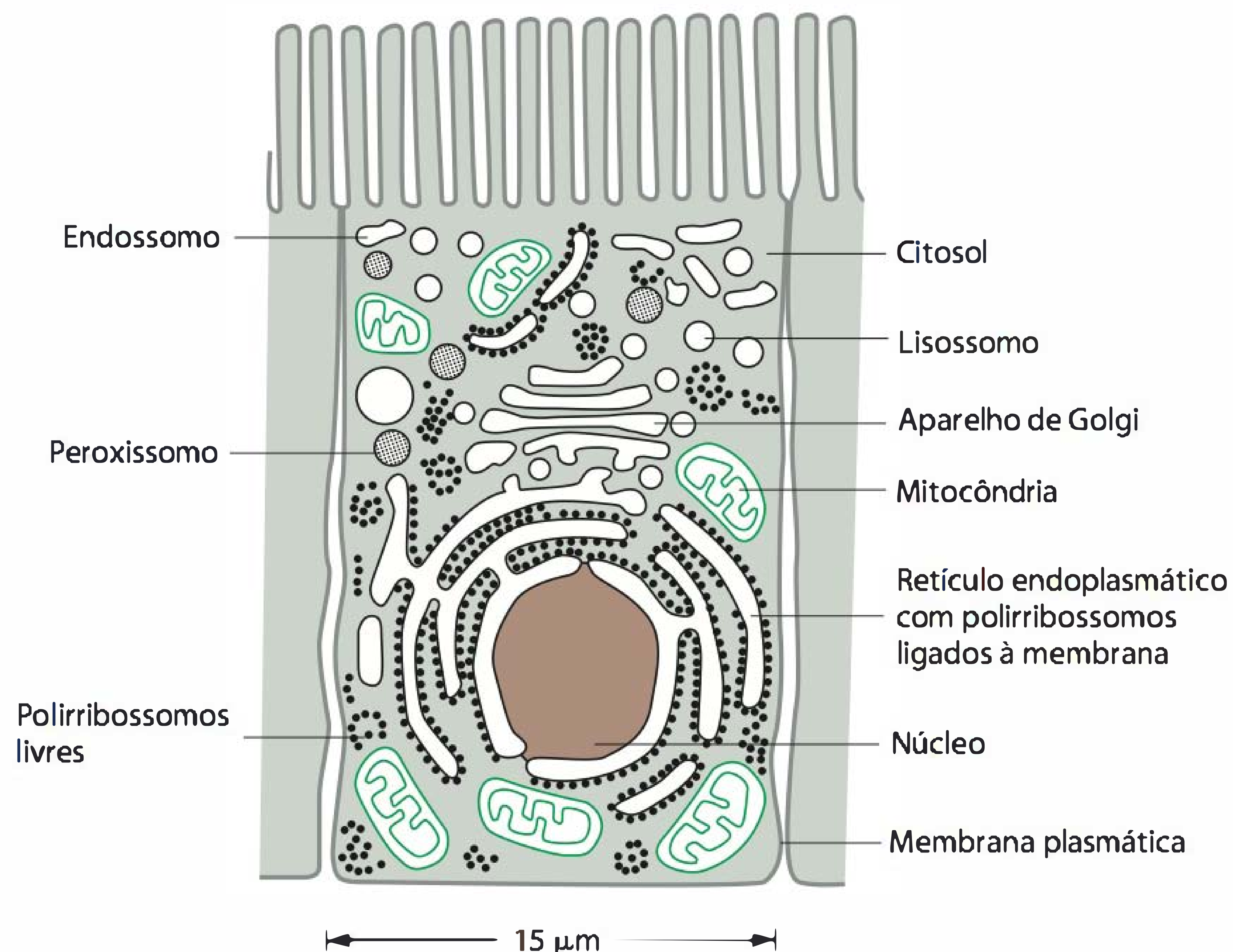


Figura 12-1 Principais compartimentos intracelulares de uma célula animal. O citosol (*cinza*), o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi, o núcleo, a mitocôndria, o endossomo, o lisossomo e o peroxissomo são compartimentos distintos isolados do restante da célula por pelo menos uma membrana seletivamente permeável.

metade do volume total da célula, é o sítio de síntese e de degradação de proteínas. Ele também desempenha a maior parte do metabolismo intermediário da célula – isto é, as muitas reações pelas quais algumas pequenas moléculas são degradadas e outras são sintetizadas para fornecer os blocos de construção das macromoléculas (discutido no Capítulo 2).

Cerca de metade da área total de membrana em uma célula eucariótica envolve os espaços labirínticos do *retículo endoplasmático* (RE). O *RE rugoso* tem muitos ribossomos aderidos a sua superfície citosólica; eles são encarregados da síntese de proteínas solúveis e integrais de membrana, a maioria das quais está destinada para secreção ao exterior da célula ou para outras organelas. Veremos que, enquanto as proteínas são translocadas para outras organelas somente após completada sua síntese, elas são translocadas para o RE à medida que são sintetizadas. Esse fato explica por que o RE é a única organela que tem ribossomos nela aderidos. O RE também produz a maioria dos lipídeos para o restante da célula e funciona como reserva de íons Ca^{2+}. Regiões do RE que não possuem ribossomos aderidos são chamadas de *RE liso*. O RE envia muitas de suas proteínas e lipídeos ao *aparelho de Golgi*, o qual consiste em pilhas organizadas de compartimentos discoides chamados de *cisternas de Golgi*. O aparelho de Golgi recebe lipídeos e proteínas do RE e os envia para vários destinos, com frequência modificando-os covalentemente durante *a via*.

As *mitocôndrias* e os *cloroplastos* (em plantas) geram a maior parte do ATP utilizado pelas células para dirigir as reações que necessitam de entrada de energia livre; os cloroplastos são uma versão especializada dos *plastídeos*, os quais também podem ter outras funções em células vegetais, como o armazenamento de alimento ou de moléculas de pigmentos. Os *lisossomos* contêm enzimas digestivas que degradam organelas intracelulares mortas, bem como macromoléculas e partículas englobadas do exterior da célula por endocitose. A caminho dos lisossomos, o material endocitado deve passar primeiramente por uma série de organelas chamadas de *endossomos*. Finalmente, os *peroxissomos* são pequenos compartimentos vesiculares que contêm enzimas utilizadas em várias reações oxidativas.

Em geral, cada organela envolta por membrana realiza o mesmo conjunto de funções básicas em todos os tipos celulares. Contudo, para servir a funções especializadas nas células, estas organelas variam em abundância e podem ter propriedades adicionais que diferem de um tipo celular para outro.

Em média, os compartimentos envoltos por membranas, juntos, ocupam quase metade do volume celular (**Tabela 12-1**), e uma grande quantidade de membrana intracelular é necessária para compô-los. Em células do fígado e do pâncreas, por exemplo, o RE tem uma área total de superfície de membrana que é, respectivamente, 25 vezes e 12 vezes a da membrana plasmática (**Tabela 12-2**). Em termos de sua área e de sua massa, a membrana plasmática constitui apenas uma pequena parte da maioria das células eucarióticas, e organelas são empacotadas de forma compacta no citosol (**Figura 12-2**).

Tabela 12-1 Volumes relativos ocupados pelos principais compartimentos intracelulares em uma célula do fígado (hepatócito)

Compartimento intracelular	Percentual do volume celular total
Citosol	54
Mitocôndria	22
Cisternas do RE rugoso	9
Cisternas do RE liso mais cisterna de Golgi	6
Núcleo	6
Peroxissomos	1
Lisossomos	1
Endossomos	1

As organelas envoltas por membrana geralmente têm posições características no citosol. Na maioria das células, por exemplo, o aparelho de Golgi está localizado próximo ao núcleo, enquanto a rede de túbulos do RE estende-se do núcleo por todo o citosol. Essas distribuições características dependem das interações das organelas com o citoesqueleto. A localização de ambos, RE e aparelho de Golgi, por exemplo, depende do conjunto intacto de microtúbulos; se os microtúbulos forem despolimerizados experimentalmente com um fármaco, o aparelho de Golgi fragmenta-se e é disperso pela célula, e a rede de RE colapsa para o centro da célula (discutido no Capítulo 16).

A origem evolutiva explica a relação topológica das organelas

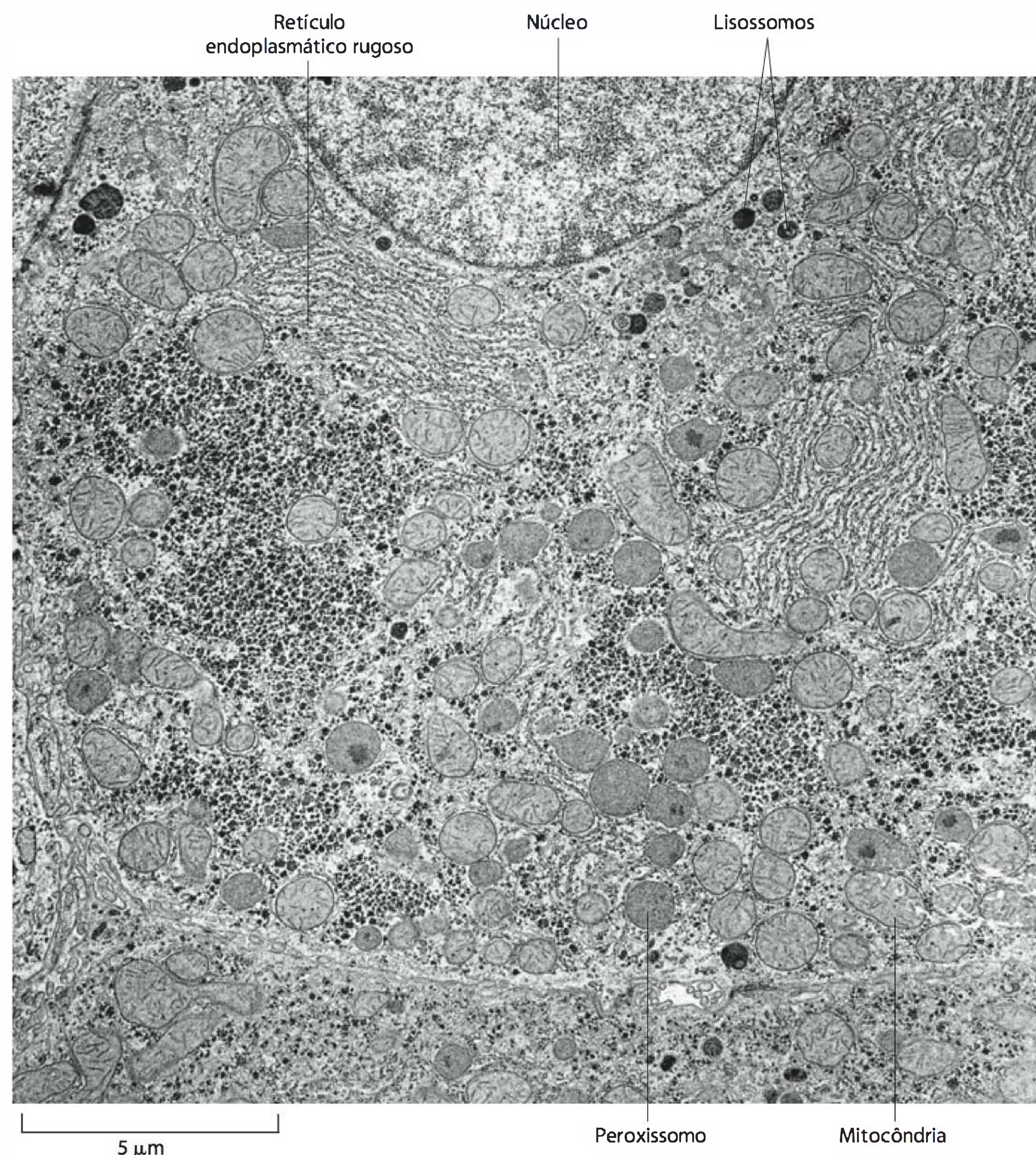
Para entender a relação entre os compartimentos das células, é interessante entender como eles teriam evoluído. Os precursores das primeiras células eucarióticas são organismos simples semelhantes a bactérias, que geralmente possuem membrana plasmática, mas não membranas internas. Em tais células, a membrana plasmática realiza todas as funções dependentes de membrana, incluindo o bombeamento de íons, a síntese de ATP, a secreção de proteína e a síntese de lipídeos. As células eucarióticas atuais típicas são de 10 a 30 vezes maiores em dimensão linear e de 1.000 a 10.000 vezes maiores em volume do que uma bactéria típica, como a *E. coli*. A profusão de membranas internas pode ser vista, em parte, como uma adaptação a esse aumento de tamanho: a célula eucariótica tem uma razão muito

Tabela 12-2 Quantidades relativas de tipos de membranas em dois tipos de células eucarióticas

Tipode membrana	Percentual da membrana celular total	
	Hepatócito do fígado*	Celula exócrina pancreática*
Membrana plasmática	2	5
Membrana do RE rugoso	35	60
Membrana do RE liso	16	<1
Membrana do aparelho de Golgi	7	10
Mitocôndria		
Membrana externa	7	4
Membrana interna	32	17
Núcleo		
Membrana interna	0,2	0,7
Membrana das vesículas secretoras	Não-determinado	3
Membrana do lisossomo	0,4	Não-determinado
Membrana do peroxissomo	0,4	Não-determinado
Membrana do endossomo	0,4	Não-determinado

*Essas duas células são de tamanhos muito diferentes: um hepatócito médio tem volume de cerca de 5.000 μm^3 em comparação com 1.000 μm^3 da célula pancreática exócrina. As áreas de membrana celular total são estimadas em aproximadamente 110.000 μm^2 e 13.000 μm^2, respectivamente.

Figura 12-2 Micrografia eletrônica de parte de uma célula do fígado vista em secção transversal. Exemplos da maioria dos principais compartimentos intracelulares estão indicados. (Cortesia de Daniel S. Friend.)



menor de área de superfície em relação ao volume, e sua área de membrana plasmática é, presumivelmente, pequena para sustentar as muitas funções vitais para as quais as membranas são necessárias. O extenso sistema interno de membranas de uma célula eucariótica ameniza esse desequilíbrio.

A evolução de membranas internas, evidentemente, acompanhou a especialização da função da membrana. Considere, por exemplo, a geração de *vesículas tilacoidais* em cloroplastos. Essas vesículas se formam durante o desenvolvimento dos cloroplastos a partir dos proplastídeos em folhas verdes de plantas, pequenas organelas precursoras que estão presentes em todas as células vegetais imaturas. Essas organelas estão envoltas por uma membrana dupla e desenvolvem-se de acordo com as necessidades das células diferenciadas: originam cloroplastos em células foliares, por exemplo, mas em organelas que armazenam amido, gordura ou pigmentos em outros tipos celulares (**Figura 12-3**A). Quando elas se convertem em cloroplastos, são formadas regiões especializadas da membrana por invaginações a partir da membrana interna do proplastídeo. As vesículas assim geradas constituem um novo compartimento especializado, o *tilacoide*, que abriga toda a maquinaria fotossintética do cloroplasto (Figura 12-3B).

Outros compartimentos de células eucarióticas podem ter sido originados de maneira conceitualmente similar (**Figura 12-4**). A invaginação da membrana plasmática para formar membranas intracelulares especializadas, por exemplo, pode gerar organelas com um interior que é topologicamente equivalente ao exterior da célula. Veremos que esta relação topológica é mantida para todas as organelas envolvidas em vias secretoras e endocíticas, incluindo o RE, o aparelho de Golgi, os endossomos e os lisossomos. Portanto, pode-se pensar em todas essas organelas como membros da mesma família. Como discutiremos em detalhes no capítulo seguinte, seus interiores comunicam-se extensivamente um com o outro e

com o exterior da célula via *vesículas de transporte*, que se desprendem de uma organela e se fundem com outra (**Figura 12-5**).

Como descrito no Capítulo 14, as mitocôndrias e os plastídeos diferem das outras organelas envoltas por membranas por conter seus próprios genomas. A natureza desses genomas e a estreita semelhança das proteínas dessas organelas com aquelas de algumas bactérias atuais sugerem fortemente que as mitocôndrias e os plastídeos evoluíram a partir de bactérias que foram engolfadas por outras células com as quais inicialmente viviam em simbiose (discutido nos Capítulos 1 e 14). De acordo com o esquema hipotético mostrado na Figura 12-4B, a membrana interna das mitocôndrias e dos plastídeos corresponde à membrana plasmática original da bactéria, enquanto o lúmen dessas organelas evoluiu a partir do citosol bacteriano. Como pode ser esperado desta origem endocítica, essas duas organelas são envoltas por uma membrana dupla e permanecem isoladas do extenso tráfego vesicular que conecta os interiores da maioria das outras organelas envoltas por membrana umas com as outras e com o exterior da célula.

O esquema evolutivo descrito anteriormente agrupa os compartimentos intracelulares das células eucarióticas em quatro famílias distintas: (1) o núcleo e o citosol, os quais se comunicam através dos *complexos de poro nuclear* e são, assim, topologicamente contínuos (embora funcionalmente distintos); (2) todas as organelas envolvidas em vias secretoras e endocíticas – incluindo o RE, o aparelho de Golgi, os endossomos, os lisossomos, as numerosas classes de intermediários de transporte, como vesículas de transporte que se movem entre elas, e, possivelmente, os peroxissomos; (3) as mitocôndrias e (4) os plastídeos (somente em plantas).

As proteínas podem mover-se entre os compartimentos de diferentes maneiras

A síntese de todas as proteínas começa em ribossomos no citosol, exceto as poucas proteínas que são sintetizadas nos ribossomos das mitocôndrias e dos plastídeos. Seu subsequente destino depende da sua sequência de aminoácidos, a qual pode conter **sinais de endereçamento** que direcionam seu envio a locais fora do citosol. Muitas proteínas não possuem um sinal de endereçamento e, consequentemente, permanecem no citosol como residentes permanentes. Muitas outras, todavia, apresentam sinais de endereçamento específicos, que direcionam seu transporte do citosol ao núcleo, ao RE, às mitocôndrias, aos plastídeos ou aos peroxissomos; os sinais de endereçamento também podem orientar o transporte de proteínas do RE a outros destinos na célula.

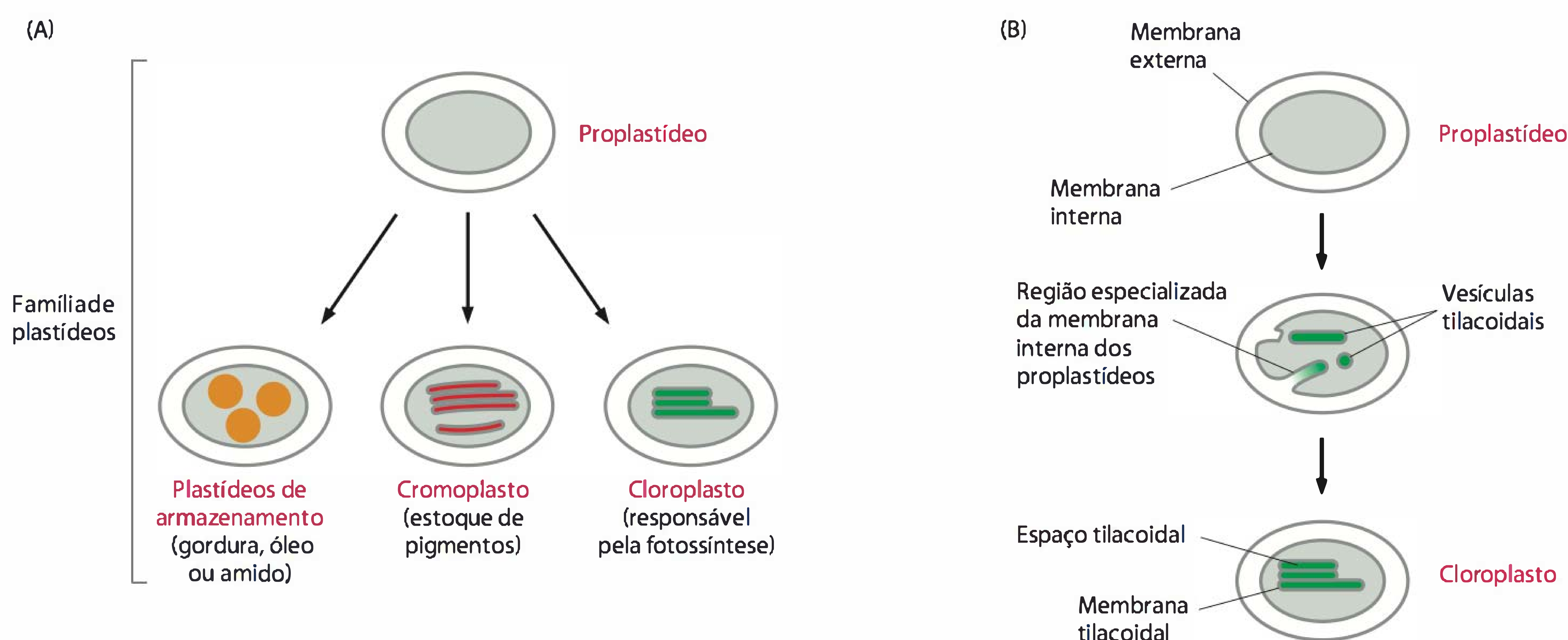


Figura 12-3 Desenvolvimento de plastídeos. (A) Os proplastídeos são herdados com o citoplasma das células-ovo vegetais. À medida que as células vegetais imaturas diferenciam-se, os proplastídeos desenvolvem-se de acordo com as necessidades da célula especializada: podem formar cloroplastos (em células de folha verde), plastídeos de armazenamento que acumulam amido (p. ex., em tubérculos de batata) ou óleo e gotas de lipídeo (p. ex., em sementes oleaginosas) ou cromoplastos que contêm pigmentos (p. ex., pétalas de flores). (B) Desenvolvimento de um tilacoide. À medida que os cloroplastos se desenvolvem, partes da membrana especializada a partir da membrana interna do proplastídeo invaginam-se para formar vesículas tilacoidais que, então, se desenvolvem em tilacoides maduros. A membrana tilacoidal forma um compartimento separado, o espaço tilacoidal, estrutural e funcionalmente distinto do restante dos cloroplastos. Os tilacoides podem crescer e dividir-se autonomamente com a proliferação dos cloroplastos.

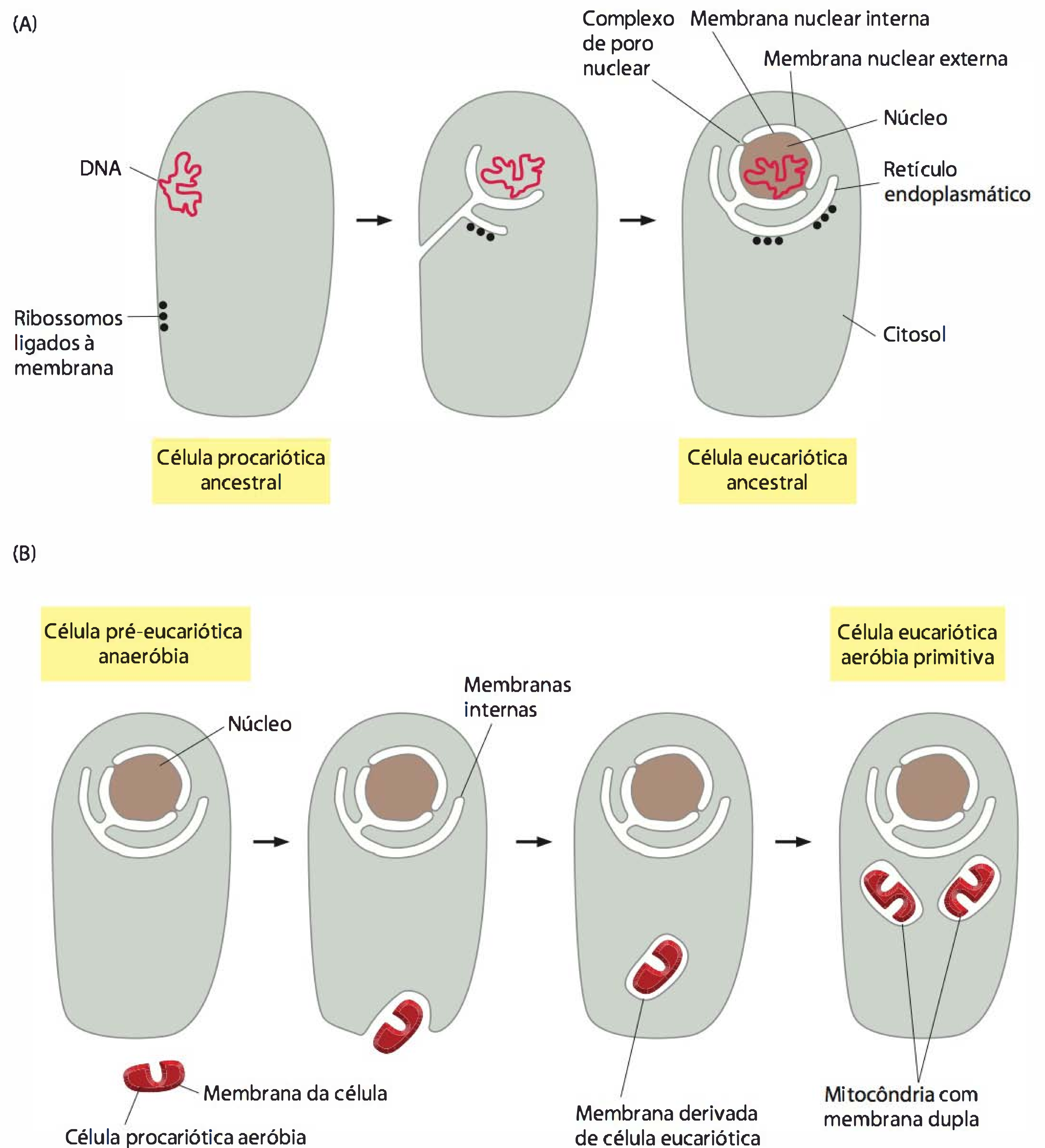


Figura 12-4 Esquemas hipotéticos para a origem evolutiva de algumas organelas. As origens das mitocôndrias, dos cloroplastos, do RE e do núcleo celular poderiam explicar as relações topológicas desses compartimentos intracelulares das células eucarióticas.

(A) Uma possível via para a evolução do núcleo celular e do RE. Em algumas bactérias, a molécula de DNA única que compreende o cromossomo bacteriano é aderida a uma invaginação da membrana plasmática. Tal invaginação em uma célula procariótica ancestral poderia ter-se rearranjado para formar um envelope em torno do DNA, ainda permitindo o acesso do DNA ao citosol da célula (como ocorre com o DNA para dirigir a síntese de proteínas). Presume-se que este envelope, finalmente, pode ter se separado completamente da membrana plasmática, originando um compartimento nuclear envolto por uma membrana dupla.

Como ilustrado, canais de comunicação chamados de complexos de poro nuclear (NPCs, *nuclear pore complexes*) penetram o envelope nuclear. Devido ao fato de ser envolto por duas membranas que são contínuas nos locais em que são permeadas por esses NPCs, o compartimento nuclear é topologicamente equivalente ao citosol; de fato, durante a mitose, o conteúdo nuclear mistura-se com o citosol. O lúmen do RE é contínuo com o espaço entre as membranas nucleares interna e externa e topologicamente equivalente ao espaço extracelular (Figura 12-5).

(B) As mitocôndrias (e os plastídeos) parecem ter-se originado quando uma bactéria foi engolfada por uma grande célula eucariótica. Isso poderia explicar por que elas contêm seus próprios genomas e por que os lúmens dessas organelas permanecem isolados do tráfego de membranas que interconecta os lúmens de muitos outros compartimentos intracelulares.

Para entender os princípios gerais pelos quais os sinais de endereçamento operam, é importante distinguir três caminhos fundamentalmente diferentes pelos quais as proteínas se movem de um compartimento a outro. Esses três mecanismos são descritos a seguir, e seus sítios de ação na célula estão esquematizados na **Figura 12-6**. Os primeiros dois mecanismos são discutidos neste capítulo, enquanto o terceiro (*setas verdes* na Figura 12-6) será apresentado no Capítulo 13.

1. No **transporte mediado**, as proteínas se movimentam entre o citosol e o núcleo (os quais são topologicamente equivalentes), por meio dos complexos de poro nuclear no envelope nuclear. Os complexos de poro nuclear atuam como mediadores seletivos que transportam ativamente macromoléculas específicas e complexos macromoleculares, embora também permitam a difusão livre de moléculas menores.

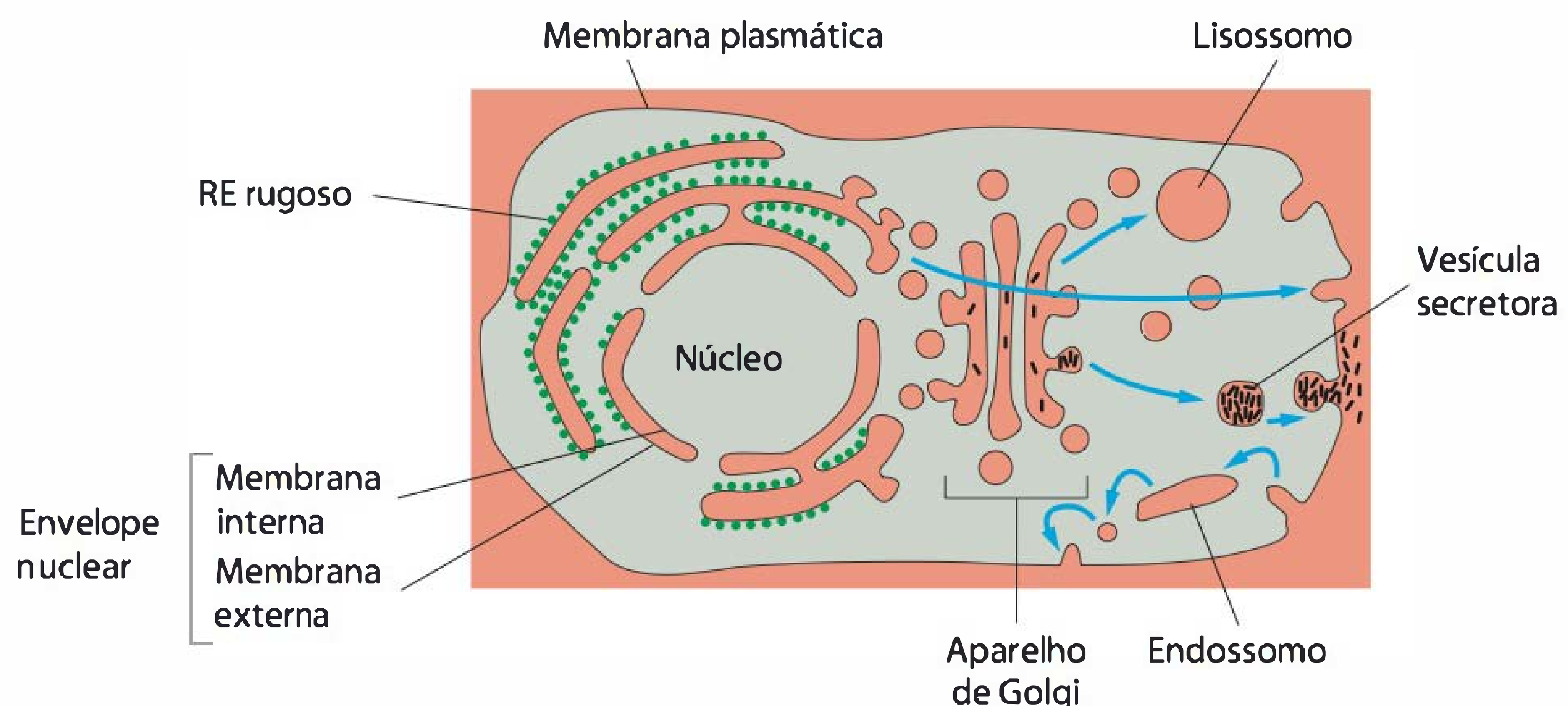


Figura 12-5 Relações topológicas entre compartimentos das vias secretora e endocítica em uma célula eucariótica. Os espaços topologicamente equivalentes são mostrados *em vermelho*. Em princípio, os ciclos de formação de membrana e fusão permitem ao lúmen de qualquer organela comunicar-se um com o outro e com o exterior celular por vias de vesículas de transporte. As *setas azuis* indicam a extensa rede de vias de tráfego para o exterior e para o interior (discutido no Capítulo 13). Algumas organelas, mais particularmente as mitocôndrias e (em células vegetais) os plastídeos, não estão envolvidas nesta comunicação e estão isoladas do tráfego entre as organelas aqui mostradas.

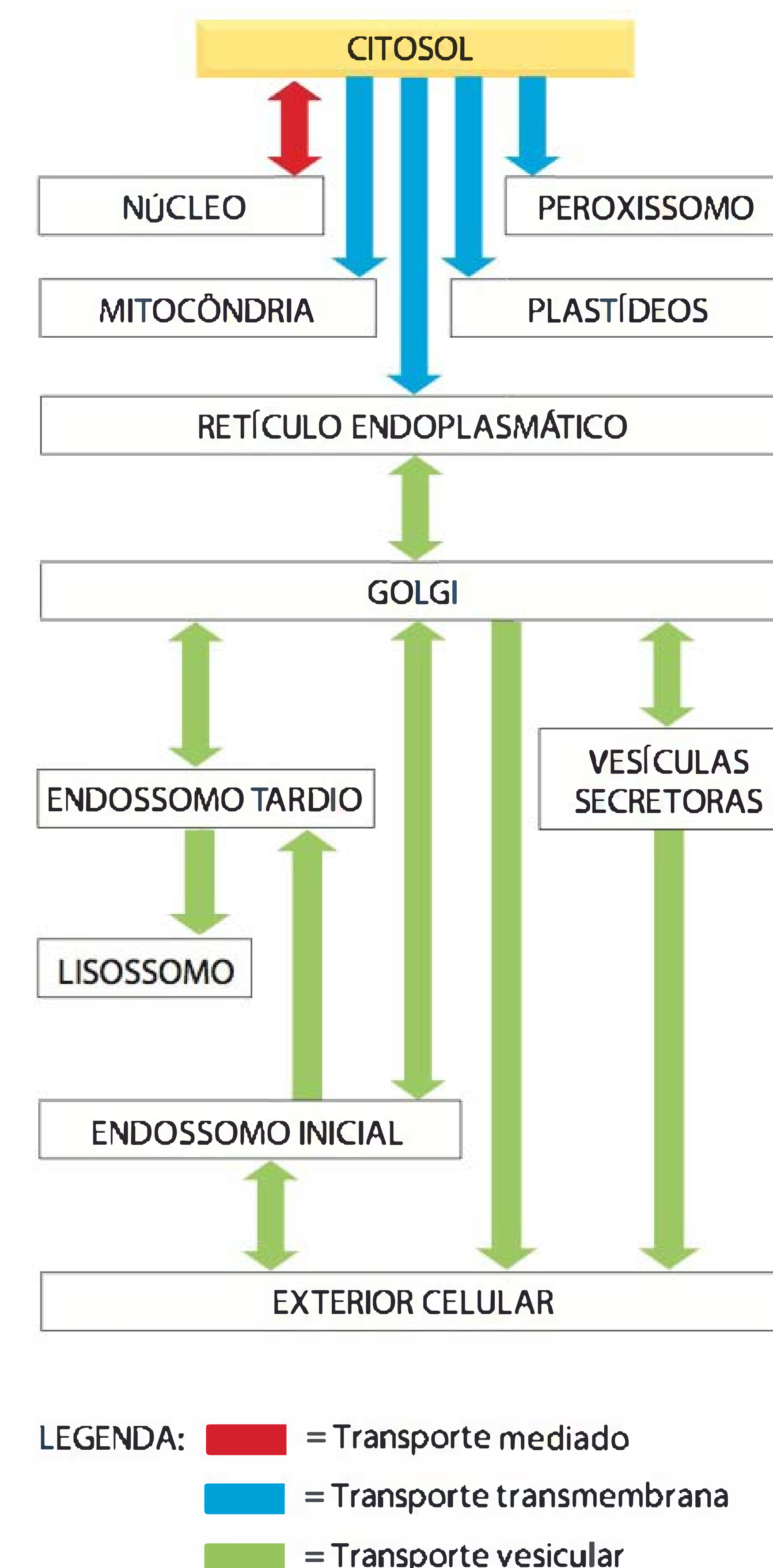


Figura 12-6 Um mapa simplificado do tráfego de proteínas. As proteínas podem mover-se de um compartimento a outro por transporte mediado (*vermelho*), por transporte transmembrana (*azul*) ou por transporte vesicular (*verde*). Os sinais que direcionam o movimento de uma dada proteína através do sistema e, portanto, determinam sua localização final na célula estão contidos na sequência de aminoácidos de cada proteína. A jornada começa com a síntese de uma proteína em um ribossomo no citosol e termina quando a proteína alcança seu destino final. Em cada estação intermediária (*retângulos*), uma decisão é tomada quanto à retenção da proteína naquele compartimento, ou à continuação do seu transporte. Em princípio, pode ser necessário um sinal para a retenção no compartimento ou para a saída dele.

Iremos nos referir a esta figura frequentemente como um guia neste capítulo e no próximo, destacando em cor a via particular sendo discutida.

2. No **transporte transmembrana**, *proteínas translocadoras* transmembrana transportam diretamente proteínas específicas através da membrana a partir do citosol para um espaço que é topologicamente distinto. A molécula de proteína transportada geralmente deve desdobrar-se para passar pelo transportador. O transporte inicial das proteínas selecionadas do citosol para o lúmen do RE ou para a mitocôndria, por exemplo, ocorre dessa forma.
3. No **transporte vesicular**, os intermediários de transporte contidos em membrana – que podem ser pequenas vesículas esféricas ou fragmentos organelares maiores de forma irregular – transportam proteínas de um compartimento a outro. As vesículas e os fragmentos de transporte são carregados com uma leva de moléculas derivadas do lúmen de um compartimento à medida que se desprendem da sua membrana; o conteúdo é descarregado em um segundo compartimento por fusão com a membrana que o envolve (**Figura 12-7**). A transferência de proteínas solúveis do RE ao aparelho de Golgi, por exemplo, ocorre dessa maneira. Devido ao fato de as proteínas transportadas não cruzarem uma membrana, o transporte vesicular pode mover proteínas somente entre compartimentos topologicamente equivalentes (ver Figura 12-5).

Cada maneira de transferência de proteínas normalmente é guiada por sinais de endereçamento na proteína transportada que são reconhecidos pelas *proteínas receptoras* complementares. Se uma proteína grande deve ser importada pelo núcleo, por exemplo, ela deve possuir um sinal de endereçamento que é reconhecido por proteínas receptoras que a guiam através do complexo de poro nuclear. Se uma proteína deve ser transferida diretamente através da membrana, ela deve ter um sinal de endereçamento que é reconhecido pelo translocador na membrana a ser cruzada. Da mesma forma, se uma proteína deve ser carregada em um certo tipo de vesícula ou retida em certas organelas, um receptor complementar na membrana apropriada deve reconhecer seu sinal de endereçamento.

As sequências-sinal direcionam proteínas aos destinos celulares corretos

Muitos sinais de endereçamento em proteínas residem em uma extensão de sequência de aminoácidos, tipicamente com 15 – 60 resíduos de comprimento. Essas **sequências-sinal** frequentemente são encontradas na região N-terminal; **peptidases-sinal** especializadas removem a sequência-sinal da proteína finalizada uma vez que o processo de endereçamento tenha sido completado. Sequências-sinal também podem ser extensões internas de aminoácidos, as quais permanecem como parte da proteína. Em alguns casos, sinais de endereçamento são compostos de múltiplas sequências de aminoácidos que formam um arranjo específico tridimensional de átomos na superfície proteica, chamado de **região-sinal** (*patch signal*).

Cada sequência-sinal especifica um destino particular na célula. As proteínas destinadas para transferência ao RE geralmente possuem uma sequência-sinal na sua região N-ter-

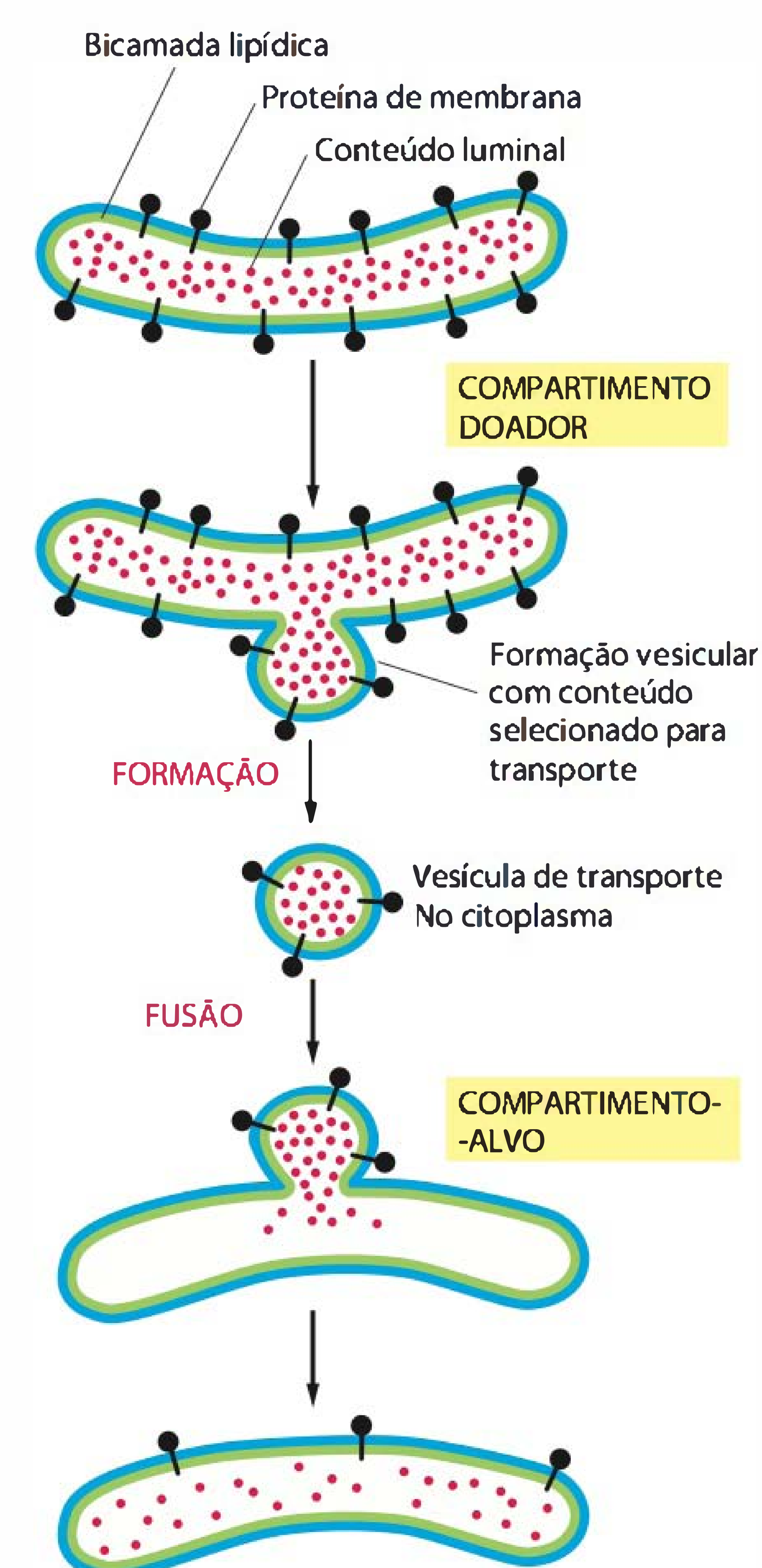


Figura 12-7 Formação e fusão de vesículas durante o transporte vesicular. As vesículas de transporte formam-se em um compartimento (doador) e fundem-se com outro (alvo). No processo, os componentes solúveis (*pontos vermelhos*) são transferidos de lúmen para lúmen. Note que a membrana também é transferida e que a orientação original tanto de proteínas como de lipídeos da membrana do compartimento doador é preservada na membrana do compartimento-alvo. Assim, as proteínas de membrana retêm sua orientação assimétrica, com os mesmos domínios sempre orientados para o citosol.

minal, a qual inclui como característica uma sequência composta de cerca de 5 a 10 aminoácidos hidrofóbicos. Muitas dessas proteínas passarão do RE para o aparelho de Golgi, mas aquelas com uma sequência-sinal específica de quatro aminoácidos na sua região C-terminal são reconhecidas como residentes no RE e retornam a ele. As proteínas destinadas às mitocôndrias têm sequências-sinal de ainda outro tipo, nas quais aminoácidos carregados positivamente se alternam com aminoácidos hidrofóbicos. Finalmente, muitas proteínas destinadas aos peroxissomos têm um peptídeo-sinal de três aminoácidos característicos na sua região C-terminal.

A **Tabela 12-3** apresenta algumas sequências-sinal específicas. Experimentos nos quais o peptídeo é transferido de uma proteína para outra por técnicas de engenharia genética têm demonstrado a importância de cada uma dessas sequências para a proteína-alvo. Posicionar a região N-terminal da sequência-sinal do RE no início de uma proteína citosólica, por exemplo, causa o redirecionamento da proteína ao RE. As sequências-sinal são, por conseguinte, tanto necessárias como suficientes para o endereçamento de proteínas. Embora suas sequências de aminoácidos possam variar muito, as sequências-sinal de todas as proteínas que têm o mesmo destino são funcionalmente intercambiáveis; propriedades físicas, como a hidrofobicidade, geralmente parecem ser mais importantes no processo de reconhecimento de sinal do que a exata sequência de aminoácidos.

Sequências-sinal são reconhecidas por receptores de endereçamento complementares que guiam proteínas ao seu destino apropriado, onde os receptores descarregam suas cargas. Os receptores funcionam cataliticamente: depois de completar uma rodada de entrega, eles retornam ao seu ponto de origem para serem reutilizados. Muitos receptores de endereçamento reconhecem classes de proteínas mais do que proteínas específicas. Eles podem, portanto, ser vistos como sistemas de transporte públicos, dedicados à entrega de diferentes componentes à sua localização correta dentro da célula.

O **Painel 12-1** descreve as principais maneiras de estudar como as proteínas são dirigidas do citosol ao compartimento específico e os mecanismos de sua translocação através das membranas.

A maioria das organelas não pode ser construída *de novo*: elas necessitam de informação na própria organela

Quando uma célula se reproduz por divisão, ela tem que duplicar suas organelas. Em geral, as células realizam esta tarefa com um aumento das organelas existentes por incorporação de novas moléculas; as organelas aumentadas, então, dividem-se e são distribuídas às duas células-filhas. Assim, cada célula-filha herda de sua mãe um conjunto completo de membranas celulares especializadas. Essa herança é essencial, uma vez que a célula não produz tais membranas do zero. Se o RE fosse completamente removido da célula, por exemplo, como a célula poderia reconstruí-lo? Como discutiremos mais adiante, as proteínas de membrana que definem o RE e realizam muitas das suas funções são produto do RE. Um novo RE não pode ser feito sem um RE já existente ou, pelo menos, sem uma membrana que contenha

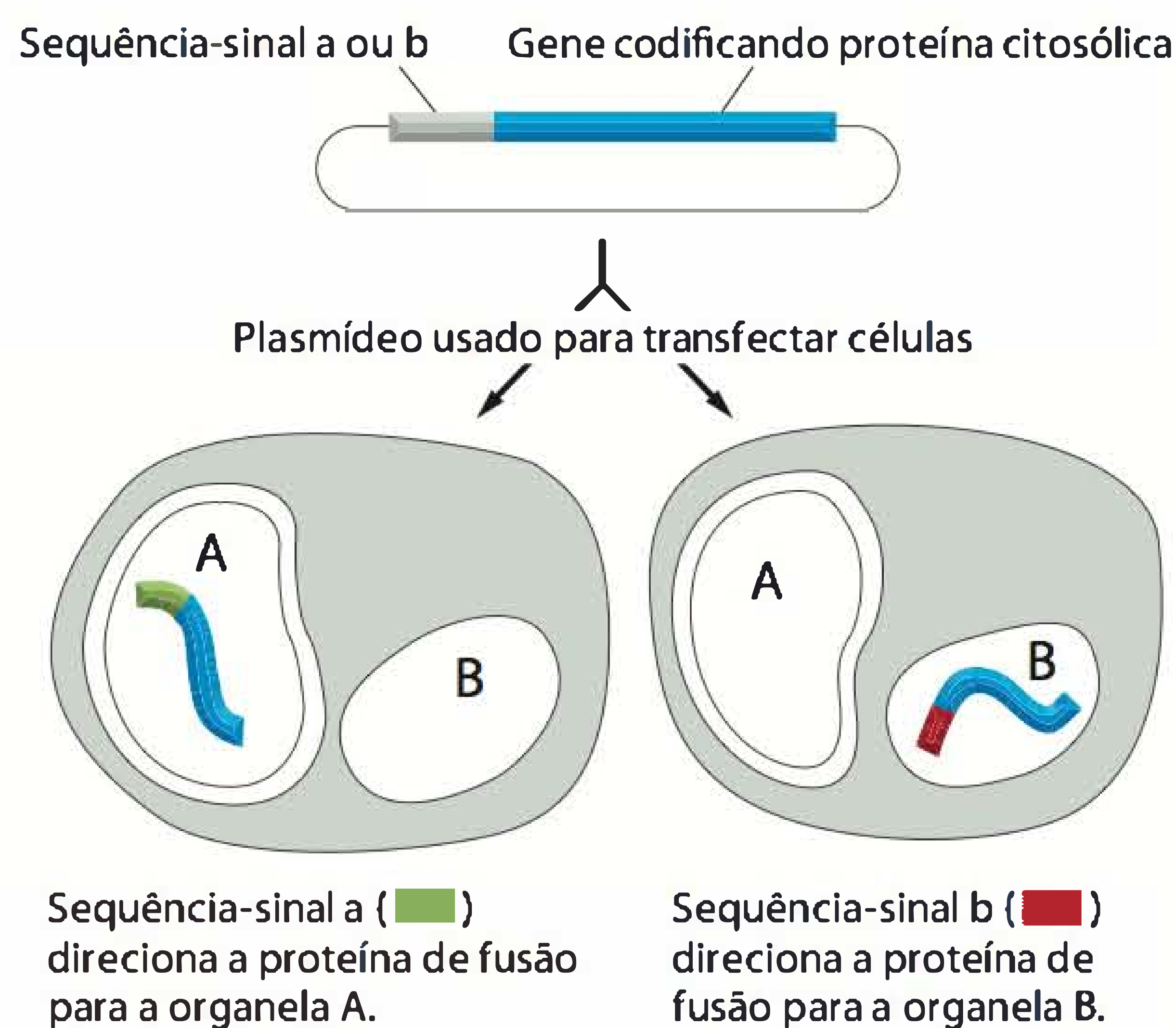
Tabela 12-3 Algumas sequências-sinal típicas

Função da sequência-sinal	Exemplo de sequência-sinal
Importar para o núcleo	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Exportar do núcleo	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
Importar para a mitocôndria	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Importar para o plastídeo	$^{+}H_3N$-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Importar para os peroxissomos	-Ser-Lys-Leu-COO^{-}
Importar para o RE	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Retornar ao RE	-Lys-Asp -Glu -Leu-COO^{-}

Alguns aspectos característicos das diferentes classes de sequências-sinal estão destacados em cor. Quando sua importância para a função da sequência-sinal é conhecida, os aminoácidos carregados positivamente são mostrados em *vermelho*, e os carregados negativamente, em *verde*. Do mesmo modo, os aminoácidos hidrofóbicos importantes são mostrados em *branco*, e os aminoácidos hidroxilados, em *azul*. $^{+}H_3N$ indica a região N-terminal de uma proteína; COO^{-} indica a região C-terminal.

UMA ABORDAGEM DE TRANSFECÇÃO PARA DEFINIR SEQUÊNCIAS- SINAL

Uma maneira de mostrar que a sequência-sinal é necessária e suficiente para enviar uma proteína ao compartimento intracelular específico é criar uma proteína de fusão na qual a sequência-sinal é ligada, por técnicas de engenharia genética, à proteína que normalmente é residente no citosol. Após o DNA complementar (cDNA) codificante dessa proteína ser transfectado nas células, a localização da proteína de fusão é determinada por imunocoloração ou por fracionamento celular.



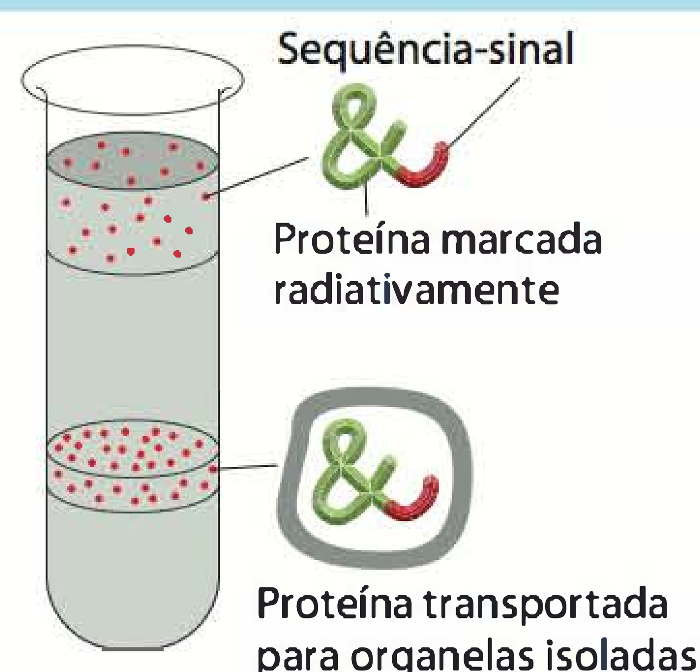
Alterando a sequência-sinal por meio de mutação sítio-dirigida, pode-se determinar quais características estruturais são importantes para sua função.

UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA PARA ESTUDAR O MECANISMO DE TRANSLOCAÇÃO DE PROTEÍNAS

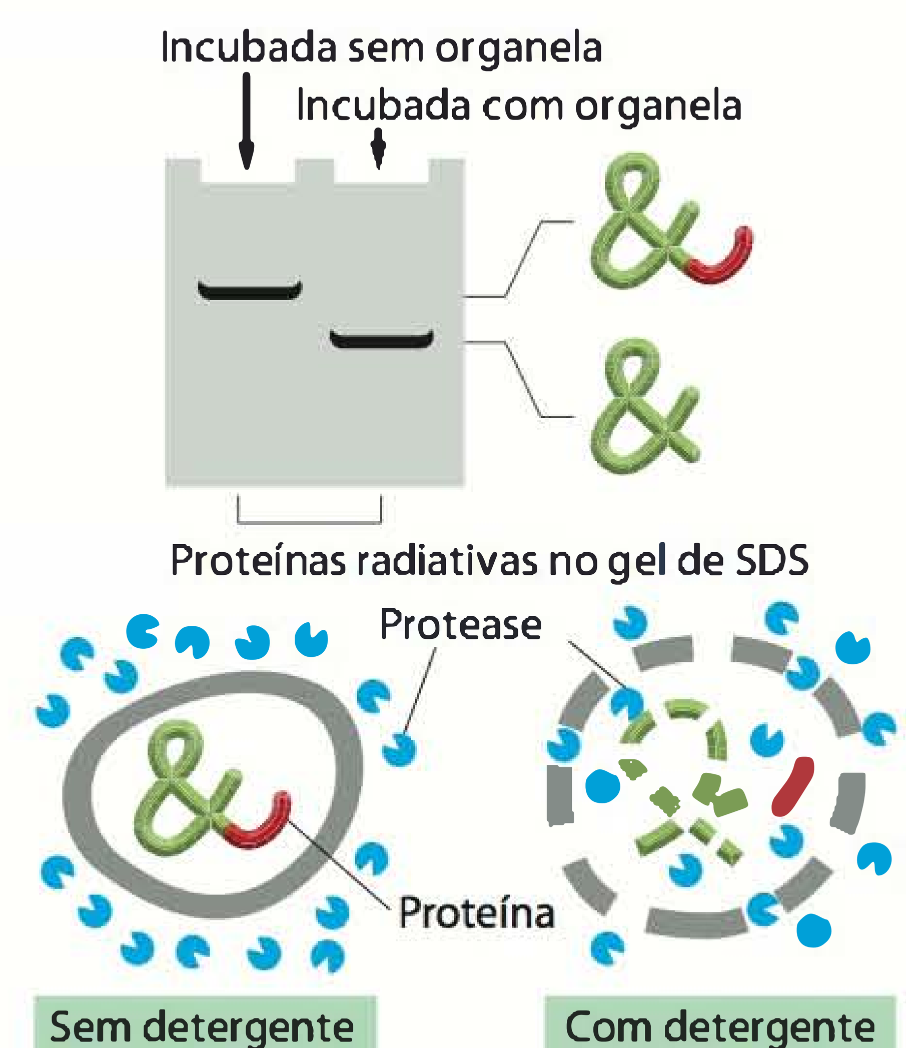
Nesta abordagem, uma proteína marcada contendo uma sequência-sinal específica é transportada para organelas isoladas *in vitro*. A proteína marcada normalmente é produzida por tradução livre de célula de um RNA mensageiro (mRNA) purificado que codifica a proteína; os aminoácidos radiativos são usados para marcar a proteína recém-sintetizada de maneira que ela possa ser distinguida das muitas outras proteínas que estão presentes no sistema de tradução *in vitro*.

Três métodos normalmente são utilizados para testar se a proteína marcada foi translocada para a organela:

1. A proteína marcada cofraciona com a organela durante a centrifugação.



2. A sequência-sinal é removida por uma protease específica que está presente na organela.

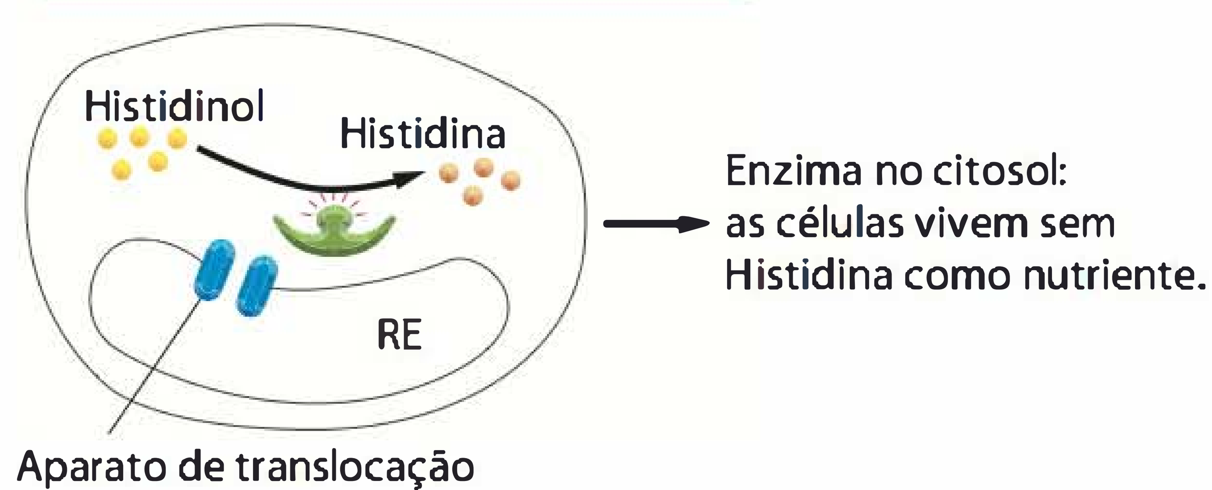


A proteína é protegida da digestão quando são adicionadas proteases ao meio de incubação, mas é suscetível se um detergente é primeiramente adicionado para a ruptura da membrana da organela.

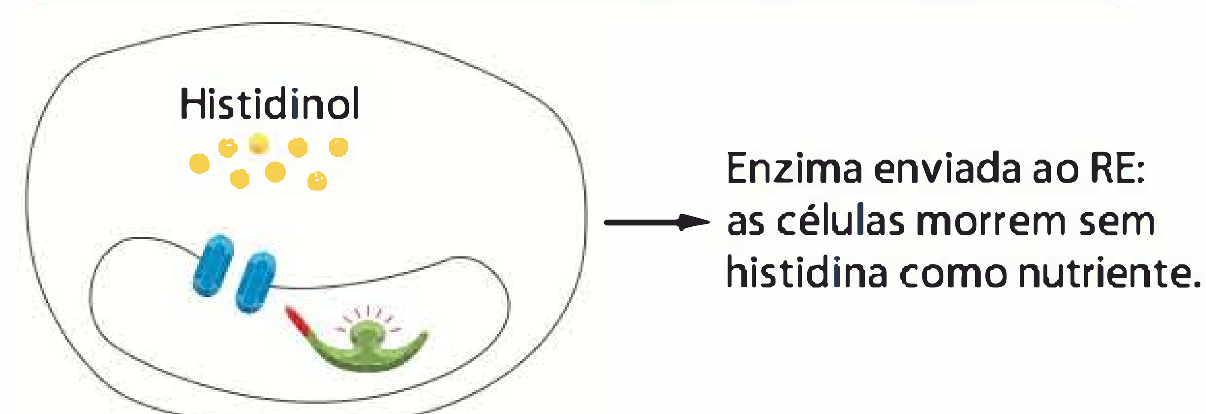
Explorando tais ensaios *in vitro*, pode-se determinar quais componentes (proteínas, ATP, GTP, etc.) são necessários ao processo de translocação.

ABORDAGENS GENÉTICAS PARA ESTUDAR O MECANISMO DE TRANSLOCAÇÃO DE PROTEÍNAS

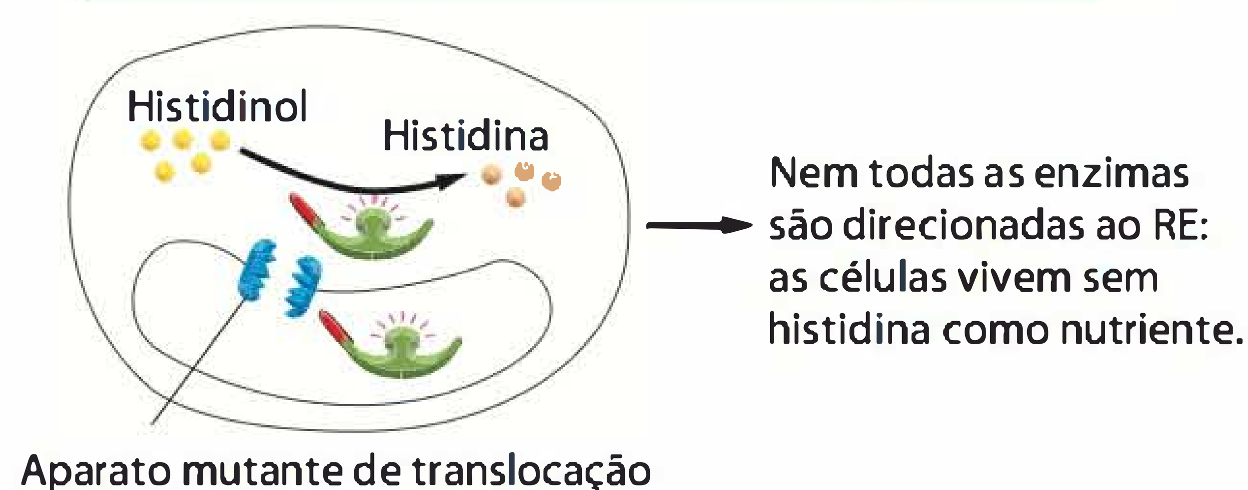
Célula do tipo selvagem de levedura



Célula de levedura modificada por engenharia genética



Célula mutante modificada por engenharia genética



As células de levedura com mutações nos genes que codificam componentes da maquinaria de transporte têm sido úteis para estudos de translocação de proteínas. Devido ao fato de as células mutantes não sobreviverem por não translocarem proteínas através de suas membranas, a solução é planejar uma estratégia que permita a ocorrência de mutações fracas, que causem somente um defeito parcial no translocamento da proteína a ser isolada.

Uma estratégia experimental utiliza a engenharia genética para desenvolver células de levedura especiais. A enzima histidinol-desidrogenase, por exemplo, normalmente é encontrada no citosol, onde é necessária para produzir o aminoácido essencial histidina a partir do seu precursor histidinol. Uma cepa de levedura é construída na qual o gene para histidinol-desidrogenase é substituído por um gene que codifica uma proteína de fusão com uma sequência-sinal adicionada, que direciona erroneamente a enzima ao RE. Quando tais células crescem sem histidina, elas morrem, porque toda a histidinol-desidrogenase é sequestrada para o RE, onde não tem utilidade. As células com uma mutação que inativa parcialmente o mecanismo de transporte de proteínas do citosol ao RE, no entanto, sobrevivem, porque histidinol-desidrogenase suficiente ficará retida no citosol para produzir histidina.

Frequentemente, obtém-se uma célula na qual a proteína mutante permanece parcialmente funcional em temperaturas normais, mas é completamente inativada em altas temperaturas. Uma célula portando tal mutação sensível à temperatura morre em altas temperaturas, com ou sem histidina, pois não pode transportar proteínas ao RE. Dessa forma, pode-se identificar o gene normal que foi mutado transfectando as células mutantes com um vetor plasmidial de levedura no qual fragmentos aleatórios de DNA genômico de levedura foram clonados: o fragmento de DNA específico que resgata as células mutantes quando crescidas em altas temperaturas pode codificar a versão selvagem do gene mutante.

especificamente as proteínas translocadoras requeridas para importar proteínas selecionadas do citosol ao RE (incluindo os próprios translocadores específicos do RE). O mesmo é verdade para mitocôndrias e plastídeos (ver Figura 12-6).

Portanto, parece que a informação necessária à construção de organelas não reside exclusivamente no DNA que especifica as proteínas das organelas. A informação na forma de, pelo menos, uma proteína distinta preexistente na membrana da organela também é necessária, e essa informação é passada da célula parental à progênie na forma da própria organela. Provavelmente, tal informação seja essencial à propagação da organização da célula em compartimentos, assim como a informação no DNA é essencial à propagação dos nucleotídeos e das sequências de aminoácidos da célula.

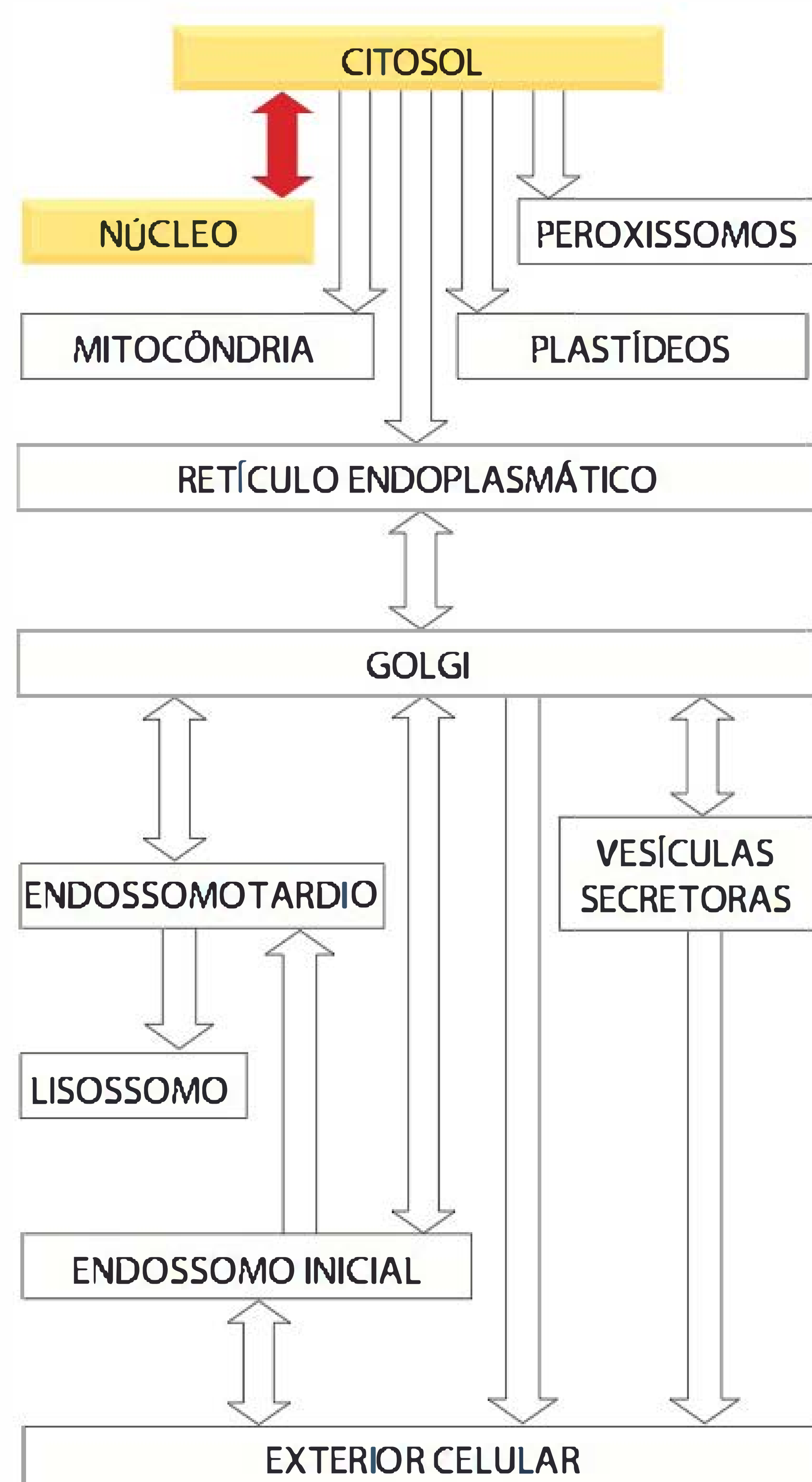
Como discutido em maiores detalhes no Capítulo 13, todavia, o RE produz um fluxo constante de vesículas de membrana que incorporam somente um conjunto de proteínas específicas e, em consequência, possuem composição diferente do próprio RE. Da mesma forma, a membrana plasmática constantemente produz vesículas endocíticas especializadas. Assim, algumas organelas podem formar-se de outras organelas e não precisam ser herdadas no processo de divisão celular.

Resumo

As células eucarióticas contêm membranas intracelulares que encerram quase metade do volume total celular em compartimentos intracelulares separados chamados de organelas. Os principais tipos de organelas presentes em todas as células eucarióticas são o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi, o núcleo, as mitocôndrias, os lisossomos, os endossomos e os peroxissomos; as células vegetais também contêm plastídeos, como cloroplastos. Cada organela contém um conjunto distinto de proteínas responsáveis pela mediação de suas funções exclusivas.

Cada proteína organelar recém-sintetizada deve encontrar seu caminho a partir de um ribossomo no citosol, onde a proteína é sintetizada, até a organela onde exercerá sua função. A proteína segue uma via específica, guiada por sinais de endereçamento em sua sequência de aminoácidos, que funcionam como sequências-sinal, ou regiões-sinal. Sinais de endereçamento são reconhecidos por receptores de endereçamento complementares que entregam a proteína à organela-alvo apropriada. As proteínas com função citosólica não contêm sinais de endereçamento e permanecem no citosol após serem sintetizadas.

Durante a divisão celular, as organelas como o RE e as mitocôndrias são distribuídas intactas a cada célula-filha. Essas organelas contêm informações necessárias a sua montagem, e então não podem ser feitas de novo.



TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE O NÚCLEO E O CITOSOL

O **envelope nuclear** encerra o DNA e define o *compartimento nuclear*. Esse envelope consiste em duas membranas concêntricas, penetradas por complexos de poro nuclear (**Figura 12-8**). Embora as membranas interna e externa sejam contínuas, elas mantêm composições proteicas distintas. A **membrana nuclear interna** contém proteínas específicas que atuam como locais de ancoramento para a cromatina e para a *lâmina nuclear*, uma malha proteica que dá suporte estrutural a esta membrana. A membrana interna é circundada pela **membrana nuclear externa**, a qual é contínua com a membrana do RE. Assim como a membrana do RE (discutida mais adiante), a membrana nuclear externa apresenta ribossomos envolvidos na síntese de proteínas. As proteínas sintetizadas nesses ribossomos são transportadas para o espaço entre as membranas nucleares interna e externa (o *espaço perinuclear*), o qual é contínuo com o lúmen do RE.

O tráfego bidirecional ocorre continuamente entre o citosol e o núcleo. As muitas proteínas com função nuclear – incluindo histonas, DNA e RNA-polimerases, proteínas reguladoras de genes e proteínas de processamento de RNA – são seletivamente importadas do citosol, onde são sintetizadas para o compartimento nuclear. Ao mesmo tempo, os RNAs transportadores (tRNAs) e os mRNAs são sintetizados no compartimento nuclear e, então, exportados para o citosol. Assim como o processo de importação, o processo de exportação é

seletivo; os mRNAs, por exemplo, são exportados somente após sofrerem modificação apropriada pelas reações de processamento de RNA no núcleo. Em alguns casos, o processo de transporte é complexo. As proteínas ribossomais, por exemplo, são sintetizadas no citosol e importadas para o núcleo, onde se ligam ao RNA ribossomal (rRNA) recém-transcrito, formando partículas. Essas partículas são então exportadas para o citosol, onde são ligadas aos ribossomos. Cada um desses passos requer transporte seletivo através do envelope nuclear.

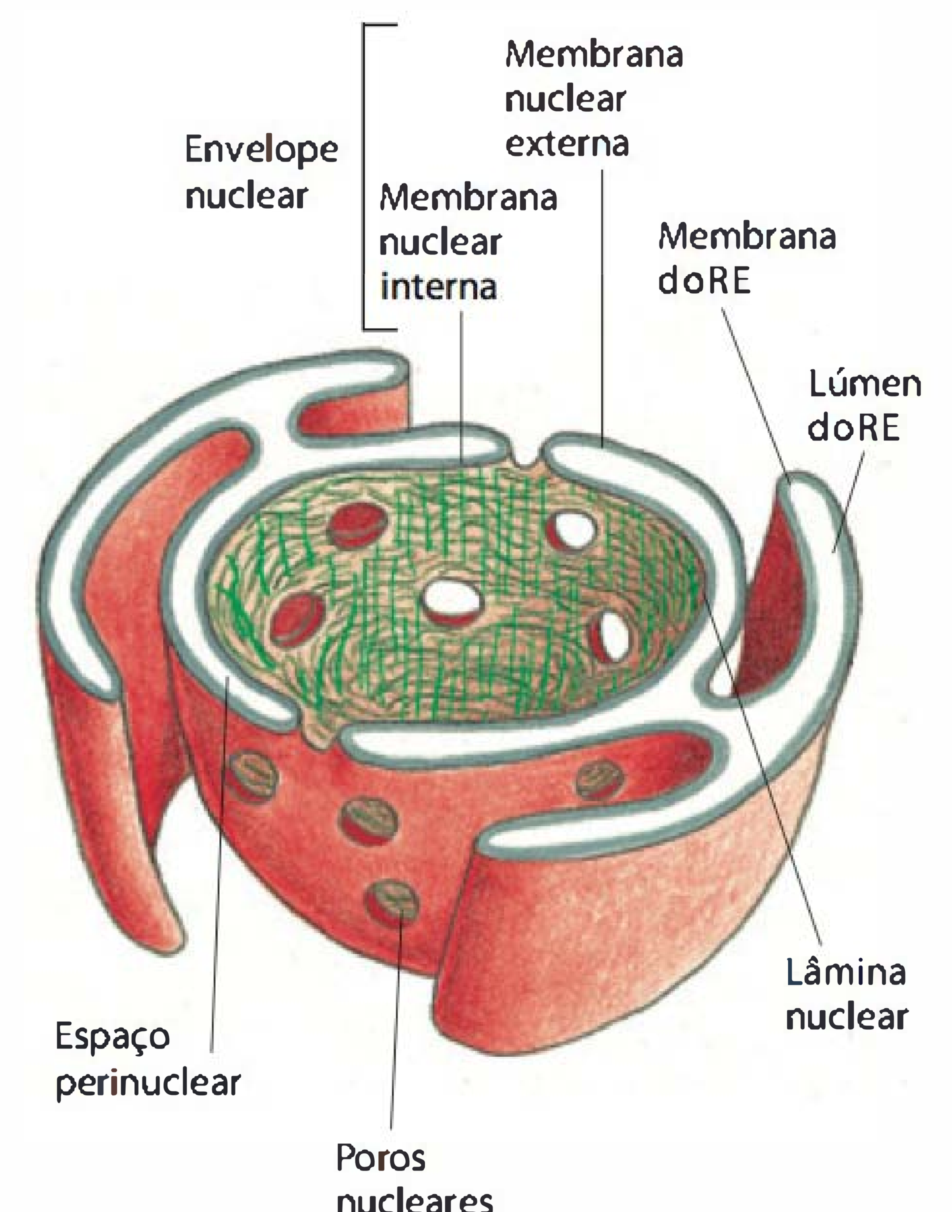


Figura 12-8 Envelope nuclear. O envelope de membrana dupla é penetrado por poros nos quais NPCs são posicionados, e é contínuo com o retículo endoplasmático. Os ribossomos, que normalmente estão aderidos à superfície citosólica da membrana do RE e da membrana nuclear externa, não são mostrados. A lâmina nuclear é uma malha fibrosa logo abaixo da membrana interna.

Os complexos de poro nuclear perfuram o envelope nuclear

Grandes estruturas elaboradas conhecidas como **complexos de poro nuclear (NPCs)** perfuram o envelope nuclear de todos os eucariotos. Em células animais, cada NPC tem uma massa molecular estimada em torno de 125 milhões de dáltons e é composto por aproximadamente 30 **proteínas NPC** diferentes, ou *nucleoporinas*, que estão presentes em múltiplas cópias e arranjadas em clara simetria octogonal (**Figura 12-9**).

O envelope nuclear de uma célula de mamífero típica contém de 3 a 4 mil NPCs, e o tráfego total que passa através de cada NPC é enorme: cada NPC pode transportar até 500 macromoléculas por segundo e em ambas as direções ao mesmo tempo. Não se sabe como o fluxo bidirecional de macromoléculas é coordenado para evitar congestão e colisões.

Cada NPC contém um ou mais canais aquosos, através dos quais pequenas moléculas solúveis em água podem difundir-se passivamente. O tamanho efetivo desses canais foi determinado pela injeção no citosol de moléculas marcadas solúveis em água e de diferentes tamanhos e, então, pela medida de sua taxa de difusão para o núcleo. Pequenas moléculas (5 mil dáltons ou menos) difundem-se tão rapidamente que o envelope nuclear pode ser considerado livremente permeável a elas. Proteínas grandes, entretanto, atravessam NPCs muito mais lentamente; quanto maior a proteína, mais lentamente ela passa através do NPC. Proteínas maiores que 60 mil dáltons podem entrar apenas por difusão passiva. O tamanho limite para difusão livre é resultado da estrutura do NPC (**Figura 12-10**). Muitas proteínas NPC que alinham o poro central contêm extensas regiões não-estruturadas, que formam um emaranhamento desorganizado (como algas marinhas no fundo do oceano), bloqueando a abertura central do NPC para a passagem de grandes macromoléculas, mas deixando pequenas aberturas para permitir a difusão de pequenas moléculas.

Uma vez que muitas proteínas celulares são demasiadamente grandes para passar por difusão através dos NPCs, o compartimento nuclear e o citosol podem manter complementos diferentes de proteínas. Os ribossomos citosólicos maduros, por exemplo, possuem cerca de 30 nm de diâmetro e, assim, não podem difundir-se através dos canais de NPC, confinando a síntese de proteína ao citosol. Contudo, como o núcleo exporta subunidades ribossomais recém-sintetizadas ou importa grandes moléculas, como DNA e RNA-polimerases, que possuem subunidades de 100 a 200 mil dáltons? Como discutiremos a seguir, essas e muitas outras proteínas e moléculas de RNA ligam-se a proteínas receptoras específicas que transportam grandes moléculas ativamente através dos NPCs.

Sinais de localização nuclear direcionam as proteínas nucleares ao núcleo

Quando as proteínas são extraídas experimentalmente do núcleo e reintroduzidas no citosol, mesmo aquelas muito grandes se reacumulam eficientemente no núcleo. Sinais de endereçamento chamados de **sinais de localização nuclear** são responsáveis pela seletividade desse processo nuclear de importação. Os sinais foram definidos precisamente em numerosas proteínas nucleares utilizando técnicas de DNA recombinante, bem como para proteínas que entram apenas transientemente no núcleo (**Figura 12-11**). Em muitas proteínas, os sinais consistem em uma ou duas sequências curtas ricas em aminoácidos carregados positivamente, lisina e arginina (ver Tabela 12-3, p. 702), com a sequência exata variando para diferentes proteínas nucleares. Outras proteínas nucleares contêm diferentes sinais, alguns dos quais ainda não foram caracterizados.

Os sinais de localização nuclear podem estar localizados praticamente em qualquer lugar na sequência de aminoácidos e, supostamente, formam alças ou regiões na superfície da proteína. Muitos funcionam mesmo quando estão ligados como curtos peptídeos a cadeias

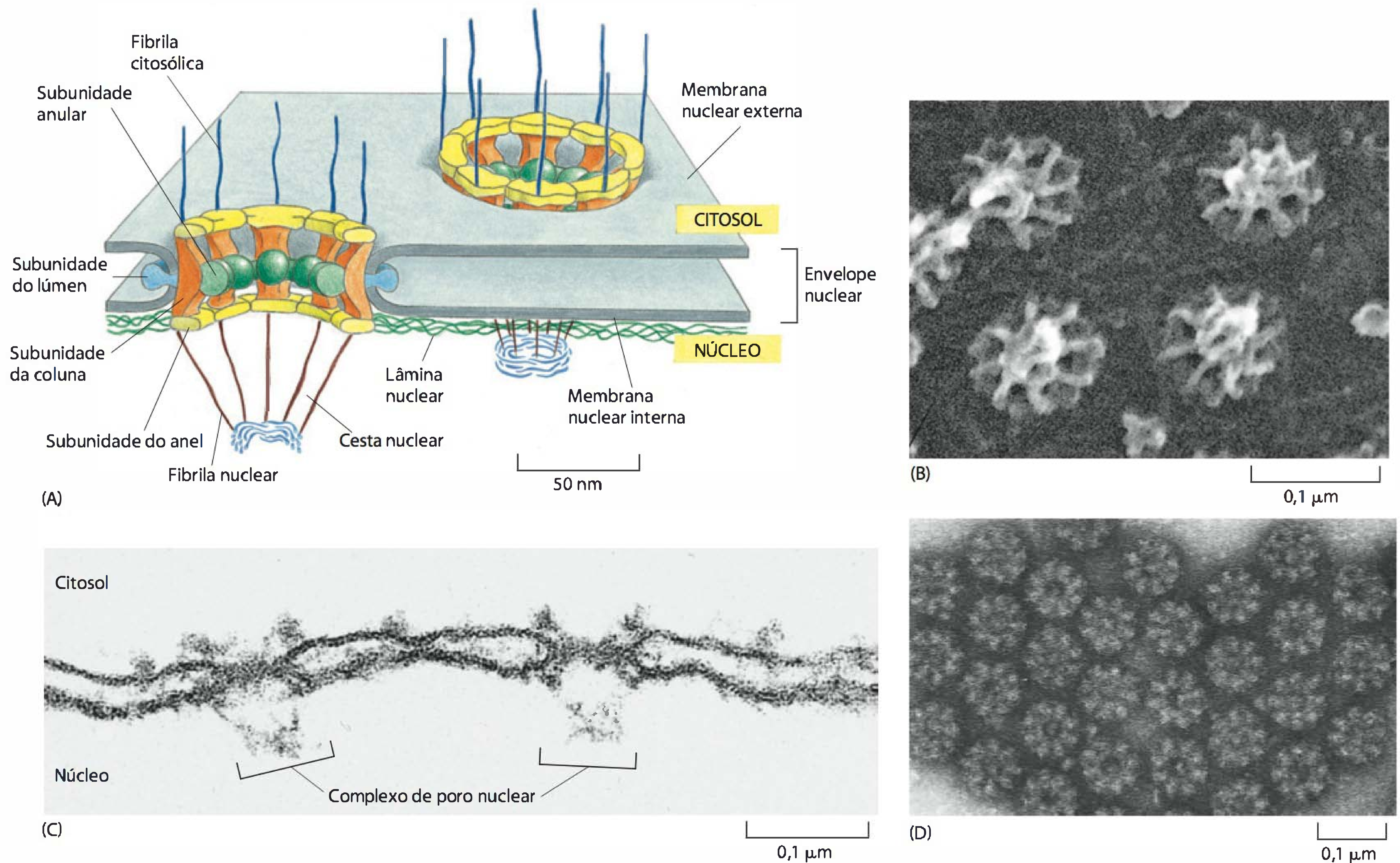


Figura 12-9 Arranjo dos NPCs no envelope nuclear. (A) Uma pequena região do envelope nuclear. Em secção transversal, um NPC parece ter quatro blocos estruturais de construção: subunidades da coluna, que formam a maior parte da parede do poro; subunidades anulares, que são centralmente localizadas; subunidades do lúmen, que contêm proteínas transmembrana que ancoram o complexo à membrana nuclear, e subunidades do anel, que formam as faces citosólica e nuclear do complexo. Além disso, as fibrilas projetam-se em ambos os lados, citosólico e nuclear, do NPC. No lado nuclear, as fibrilas convergem para formar estruturas do tipo cesta. Os estudos de localização utilizando técnicas de microscopia imunoeletrônica mostram que as proteínas que formam o interior do NPC estão simetricamente orientadas ao longo do envelope nuclear de tal maneira que os lados citosólico e nuclear parecem idênticos. Em contraste, as proteínas que formam as fibrilas são diferentes em cada um dos lados citosólico e nuclear do NPC. A simetria da oitava dobra rotacional e da segunda dobra transversal do centro do NPC explica como a enorme estrutura pode ser formada a partir de apenas cerca de 30 diferentes proteínas: muitas dessas proteínas estão presentes em 16 cópias (ou múltiplos de 16). Domínios desorganizados de proteínas internas (não-mostrado) são encontrados por estenderem-se ao longo do centro dos NPCs, bloqueando a difusão passiva de grandes macromoléculas. (B) Uma micrografia eletrônica de varredura do lado nuclear do envelope nuclear de um oócito (ver também Figura 9-55). (C) Uma micrografia eletrônica mostrando uma vista lateral de dois NPCs (*colchetes*); note que as membranas nucleares interna e externa são contínuas à margem do poro. (D) Uma micrografia eletrônica mostrando uma vista frontal dos NPCs corados negativamente. A membrana foi removida por extração com detergente. Note que alguns NPCs contêm materiais nos seus centros, que poderiam ser macromoléculas em trânsito através dos NPCs. (B, de M. W. Goldberg e T. D. Allen, *J. Cell Biol.* 119:1429-1440, 1992. Com permissão de The Rockefeller University Press; C, cortesia de Werner Franke e Ulrich Scheer; D, cortesia de Ron Milligan.)

laterais de lisina na superfície da proteína citosólica, sugerindo que a localização exata do sinal dentro da sequência de aminoácidos de uma proteína nuclear não é importante. Além disso, contanto que uma das subunidades da proteína de um complexo multicomponente exponha um sinal de localização nuclear, o complexo pode ser importado para o núcleo.

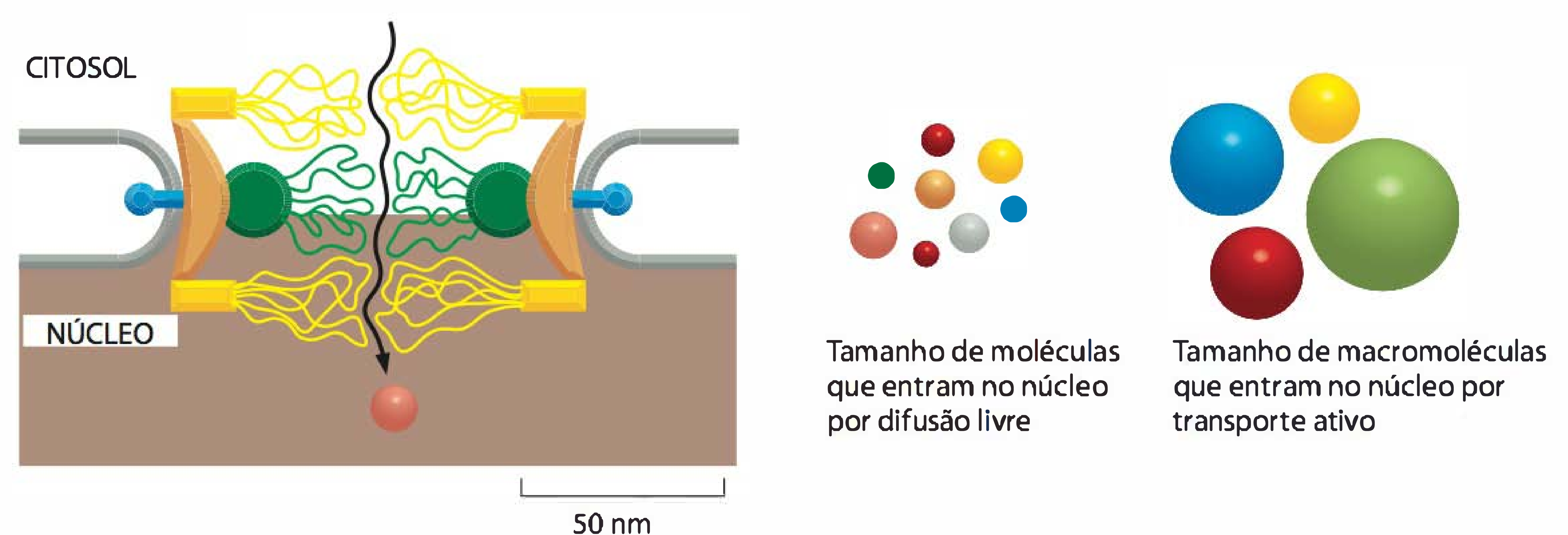


Figura 12-10 Modelo para barreira de difusão controlado do NPC. O esquema mostra uma vista lateral de um NPC. Regiões não-estruturadas de proteínas alinham-se no poro central formando uma malha emaranhada, que bloqueia a difusão passiva de grandes macromoléculas. Durante o transporte ativo, entretanto, mesmo partículas de até 39 nm de diâmetro podem passar através de NPCs.

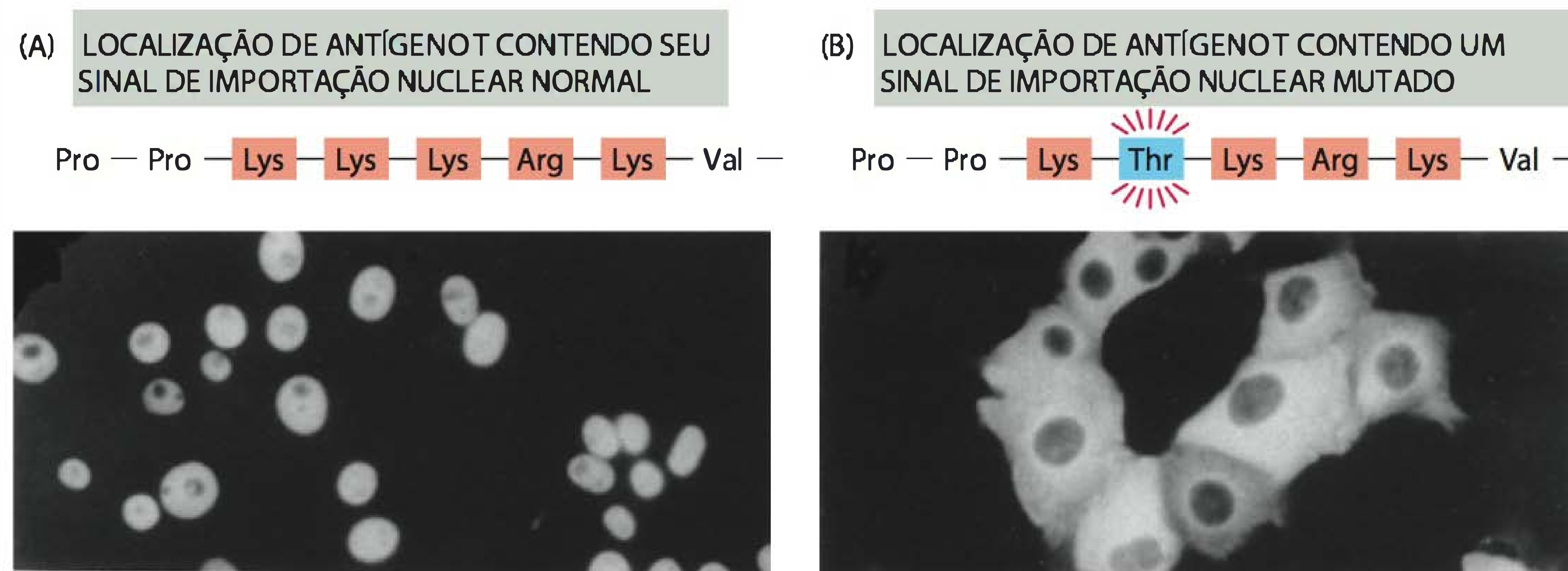


Figura 12-11 Função de um sinal de localização nuclear. Micrografias de imunofluorescência mostrando a localização celular do antígeno T do vírus SV40 contendo ou não uma pequena sequência que serve como um sinal de localização nuclear. (A) A proteína antígeno T normal contém a sequência rica em lisina indicada e é importada ao seu sítio de ação no núcleo, como indicado por imunofluorescência com anticorpos contra o antígeno T. (B) Antígeno T com um sinal de localização nuclear alterado (uma treonina no lugar de uma lisina) permanece no citosol. (De D. Kalderon, B. Roberts, W. Richardson e A. Smith, *Cell* 39:499-509, 1984. Com permissão de Elsevier.)

O transporte de proteínas nucleares através dos NPCs pode ser diretamente visualizado envolvendo-se partículas de ouro com um sinal de localização nuclear, injetando-se as partículas no citosol e, então, acompanhando-se seu destino por microscopia eletrônica (**Figura 12-12**). O transporte começa quando as partículas se ligam a fibrilas do tipo tentáculos que se estendem da margem do NPC para o citoplasma, e então continuam até o centro do NPC. Provavelmente, as regiões não-estruturadas das proteínas NPC formam uma barreira de difusão para grandes moléculas (mencionado anteriormente) que são empurradas, permitindo que as partículas cobertas com ouro passem.

O transporte macromolecular pelos NPCs é fundamentalmente diferente do transporte de proteínas pelas membranas das outras organelas, pois ocorre por um grande poro aquoso, em vez de utilizar uma proteína transportadora abrangendo uma ou mais bicamadas lipídicas. Por essa razão, as proteínas nucleares podem ser transportadas para o núcleo através de um NPC quando estão em conformação completamente enovelada. Da mesma forma, uma subunidade ribossomal recentemente formada é transportada para fora do núcleo como uma partícula já montada. Em contraste, as proteínas devem ser extensivamente desenoveladas durante seu transporte para a maioria das outras organelas, como discutiremos mais adiante. No microscópio eletrônico, entretanto, as partículas muito grandes atravessando o NPC parecem comprimir-se à medida que passam pelo poro, indicando que devem sofrer reestruturação durante o transporte. A exportação de alguns mRNAs de grande tamanho foi extensivamente estudada, como discutido no Capítulo 6 (ver Figura 6-39).

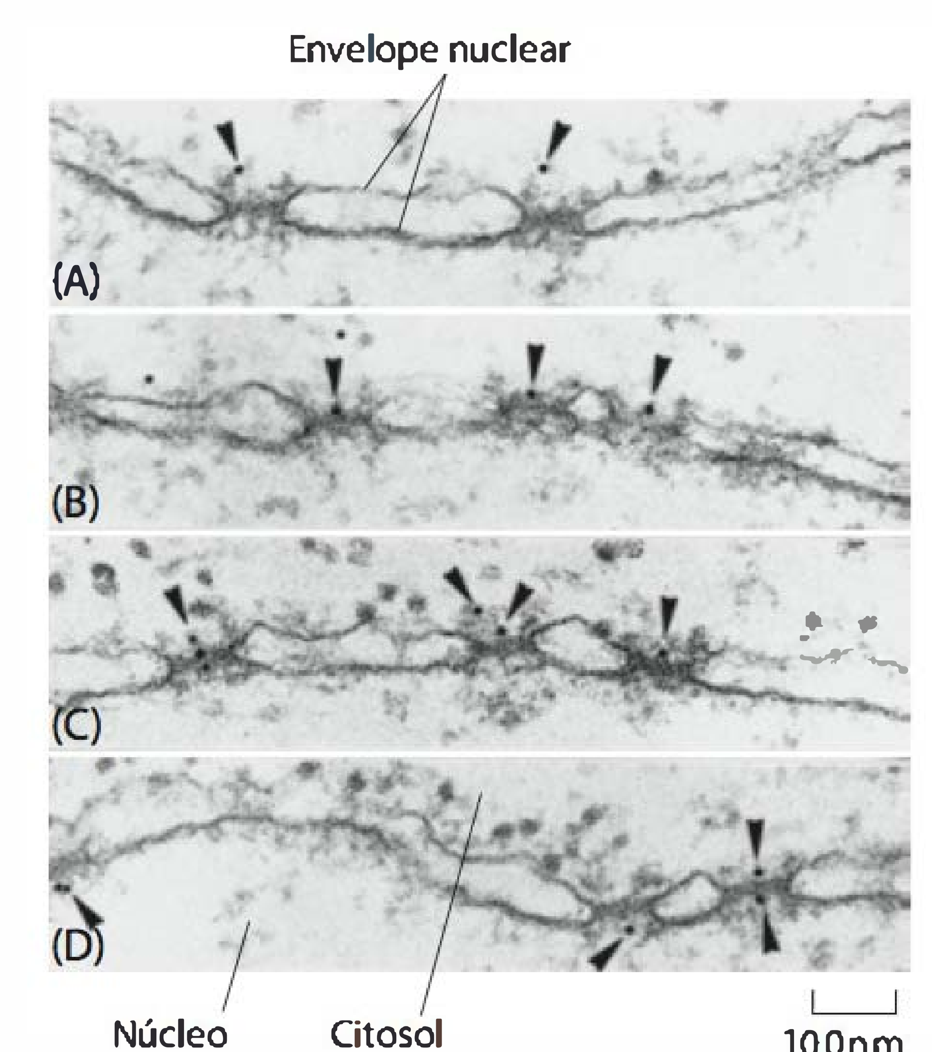


Figura 12-12 Visualização da importação ativa através dos NPCs. Essa série de micrografias eletrônicas mostra esferas coloidais de ouro (*setas*) envoltas por peptídeos contendo sinais de localização nuclear penetrando o núcleo pelos NPCs. As partículas de ouro foram injetadas em células vivas, as quais foram fixadas e preparadas para micrografia eletrônica em vários tempos após a injeção. (A) Nos momentos iniciais, as partículas de ouro são visualizadas nas proximidades das fibrilas citosólicas dos NPCs. (B, C) Elas migram ao centro dos NPCs, onde são primeiro vistas exclusivamente na face citosólica. (D) Elas então localizam-se na face nuclear. Essas partículas de ouro são muito maiores em diâmetro do que o canal de difusão no NPC e são importadas por transporte ativo. (De N. Panté e U. Aebi, *Science* 273:1729-1732, 1996. Com permissão de AAAS.)

Os receptores de importação nuclear ligam-se tanto a sinais de localização nuclear como a proteínas NPC

Para iniciar o transporte nuclear, a maioria dos sinais de localização nuclear deve ser reconhecida por **receptores de importação nuclear**, codificados por uma família de genes relacionados. Cada membro da família codifica uma proteína receptora especializada no transporte de um grupo de proteínas de carga – aquelas que contêm sinais de localização nuclear aos quais o receptor pode se ligar (**Figura 12-13**A).

Os receptores de importação são proteínas citosólicas solúveis que se ligam tanto a sinais de localização nuclear na proteína a ser transportada, quanto a proteínas NPC, algumas das quais formam as fibrilas do NPC que se estendem ao citosol. Essas fibrilas, assim como muitas outras proteínas NPC que se alinham ao centro do NPC e contribuem para a barreira de difusão, incluem um grande número de pequenas repetições de aminoácidos que contêm fenilalanina e glicina, sendo, portanto, chamadas de *repetições FG* (denominadas pelo código de aminoácidos de uma letra, discutido no Capítulo 3). As repetições FG servem como sítios de ligação para os receptores de importação. Acredita-se que elas revestem a região dos NPCs percorrida pelos receptores de importação e suas cargas proteicas ligadas. Esses complexos receptor-carga movem-se ao longo do caminho por sucessivos eventos de ligação, dissociação e então religação a sequências repetidas FG adjacentes. Dessa maneira, os complexos saltam de uma proteína NPC para outra para atravessar o interior emaranhado do NPC. Uma vez no núcleo, os receptores de importação dissociam-se da sua carga e retornam ao citosol.

Os receptores de importação nuclear nem sempre se ligam diretamente a proteínas nucleares. As proteínas adaptadoras adicionais, algumas vezes, formam pontes entre os receptores de importação e os sinais de localização nuclear nas proteínas a serem transportadas (Figura 12-13B). Algumas proteínas adaptadoras são estruturalmente relacionadas aos receptores de importação nuclear, sugerindo uma origem evolutiva comum. O uso de uma variedade dife-

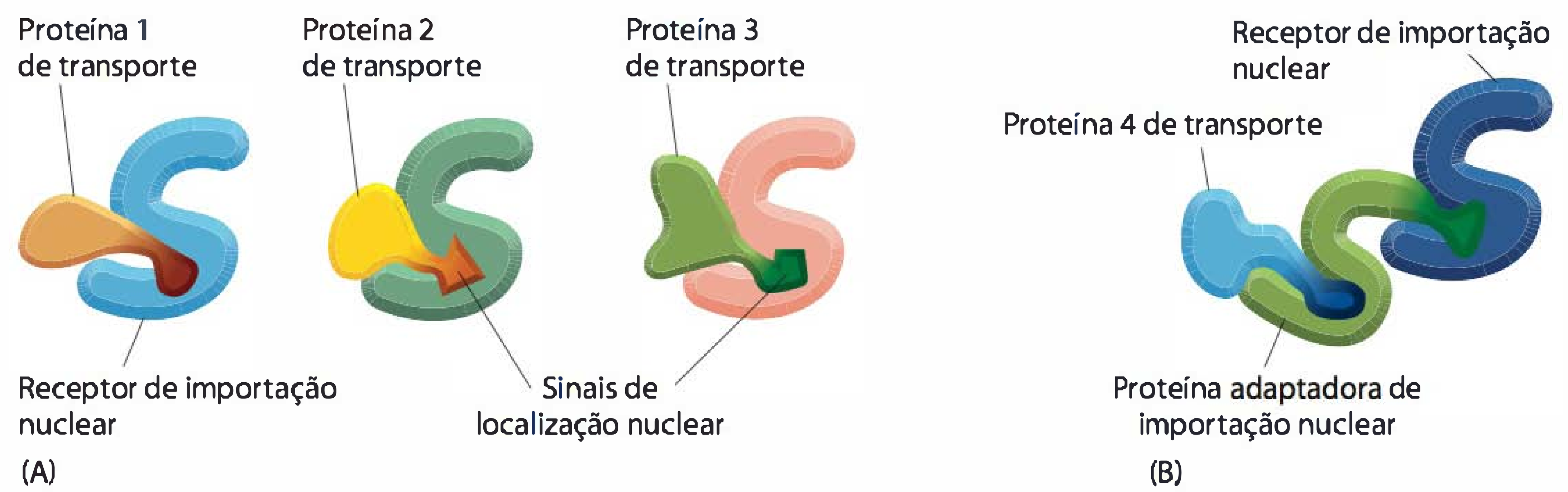


Figura 12-13 Receptores de importação nuclear. (A) Muitos receptores de importação nuclear ligam-se tanto a proteínas NPC quanto a sinais de localização nuclear nas proteínas por eles transportadas. As proteínas transportadas 1, 2 e 3, neste exemplo, contêm diferentes sinais de localização nuclear, causando ligação a diferentes receptores de importação nuclear. (B) A proteína transportada 4 requer uma proteína adaptadora para ligação ao seu receptor de importação nuclear. Os adaptadores são estruturalmente relacionados aos receptores de importação nuclear e reconhecem sinais de localização nuclear nas proteínas transportadas. Eles também contêm um sinal de localização nuclear que os liga a um receptor de importação.

rente de receptores de importação e de adaptadores permite que a célula reconheça o amplo repertório de sinais de localização nuclear exibidos pelas proteínas nucleares.

A exportação nuclear funciona como a importação nuclear, mas de modo inverso

A exportação de grandes moléculas do núcleo, como novas subunidades ribossomais e moléculas de RNA, também ocorre por meio de NPCs e também depende de um sistema seletivo de transporte. O sistema de transporte utiliza os **sinais de exportação nuclear** das macromoléculas a serem transportadas, bem como os **receptores de exportação nuclear** complementares. Esses receptores ligam-se tanto ao sinal de exportação quanto às proteínas NPC para guiar sua carga através do NPC ao citosol.

Muitos receptores de exportação nuclear são estruturalmente relacionados aos receptores de importação nuclear e são codificados pela mesma família de genes dos **receptores de transporte nuclear**, ou *carioferinas*. Em levedura existem 14 genes que codificam membros dessa família; nas células animais, o número é significativamente maior. Com base apenas na sequência de aminoácidos, frequentemente não é possível distinguir se um membro da família atua como um receptor de importação ou de exportação nuclear. Como poderia ser esperado, portanto, os sistemas de transporte de importação e de exportação funcionam de modo similar, mas em direções opostas: os receptores de importação ligam suas moléculas de transporte no citosol, liberam-nas no núcleo e são então exportados ao citosol para serem reutilizados, enquanto os receptores de exportação funcionam de modo inverso.

A GTPase Ran impõe a direcionalidade no transporte através dos NPCs

A importação de proteínas nucleares através do NPC concentra proteínas específicas no núcleo, aumentando, portanto, a ordem na célula. A célula obtém a energia necessária para esse processo por meio da hidrólise do GTP pela GTPase **Ran** monomérica. A Ran é encontrada tanto no citosol quanto no núcleo e é necessária para os sistemas nucleares de importação e exportação.

Assim como outras GTPases, a Ran é um interruptor molecular que pode existir em dois estados conformacionais, dependendo se o GDP ou o GTP está ligado (discutido no Capítulo 3). A conversão entre os dois estados é desencadeada por duas proteínas reguladoras Ran-específicas: uma *proteína ativadora de GTPase* (*GAP*, *GTPase-activating protein*) citosólica, que aciona a hidrólise de GTP e, assim, converte Ran-GTP em Ran-GDP, e um *fator de troca de guanina* (*GEF*, *guanine exchange factor*) nuclear, que promove a troca de GTP para GDP e, assim, converte Ran-GDP em Ran-GTP. Devido ao fato de *Ran-GAP* estar localizada no citosol e *Ran-GEF* estar no núcleo, o citosol contém principalmente Ran-GDP, e o núcleo, Ran-GTP (**Figura 12-14**).

Esse gradiente das duas formas conformacionais de Ran dirige o transporte nuclear na direção apropriada (**Figura 12-15**). O acoplamento de receptores de importação nuclear para repetições FG no lado citosólico do NPC, por exemplo, ocorre somente quando esses receptores estão ligados a uma carga proteica apropriada. Os receptores de importação com sua carga ligada saltam, então, de repetições FG em repetições FG. Se atingirem o lado nuclear do complexo de poro, Ran-GTP liga-se a eles, e se chegarem carregados com moléculas transportadoras, a ligação de Ran-GTP faz com que os receptores de importação liberem sua carga (**Figura 12-16**). Como Ran-GDP no citosol não se liga a receptores de transporte, o descarregamento ocorre apenas no lado nuclear do NPC. Dessa maneira, a localização nuclear de Ran-GTP cria a direcionalidade.

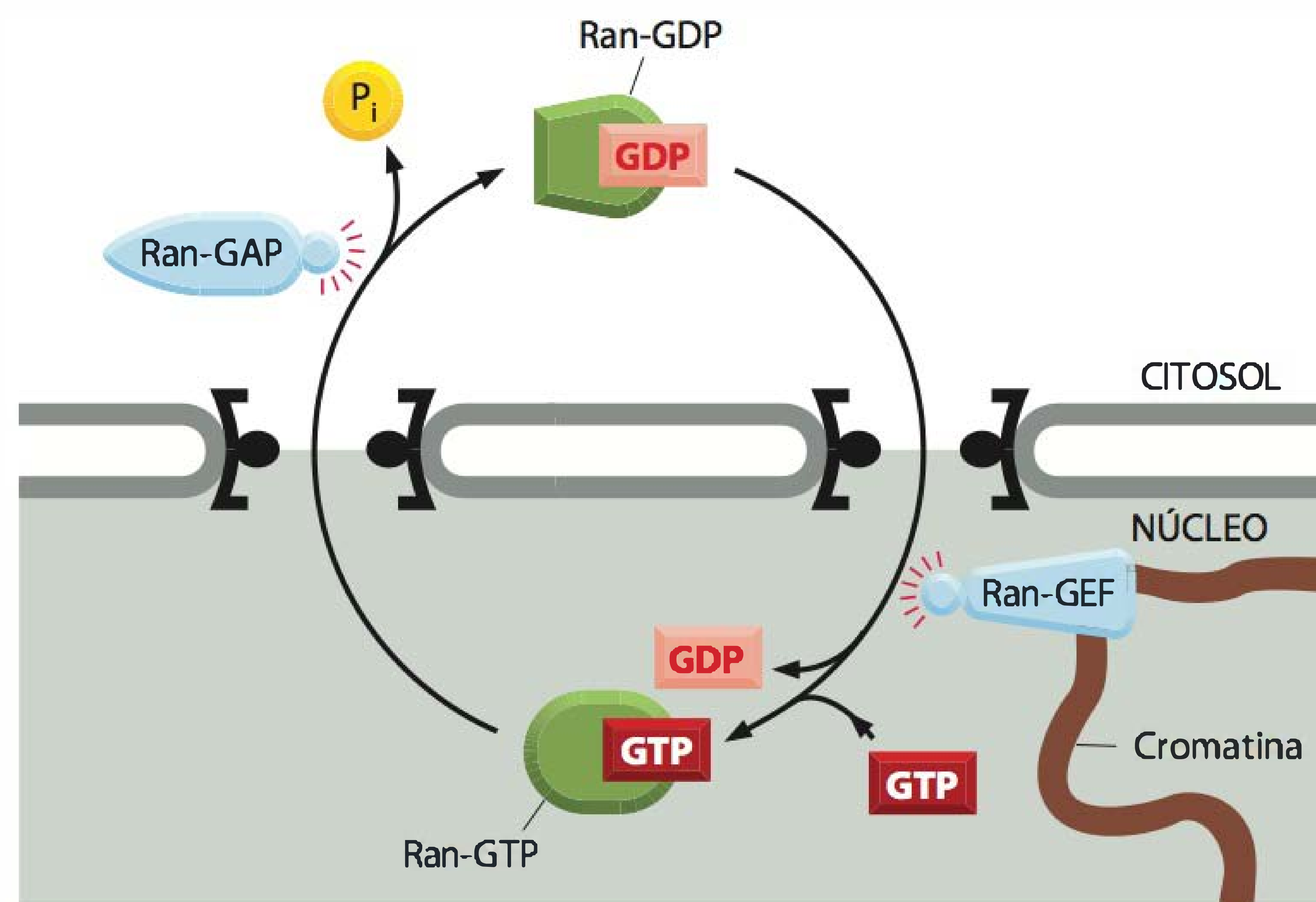


Figura 12-14 Compartimentalização de Ran-GDP e de Ran-GTP. A localização de Ran-GDP no citosol e de Ran-GTP no núcleo resulta da localização das duas proteínas reguladoras Ran: a proteína Ran ativadora de GTPase (Ran-GAP) está localizada no citosol, e o fator de troca de guanina Ran (Ran-GEF) está ligado à cromatina, e é, portanto, encontrado no núcleo.

Após descarregar sua carga no núcleo, o receptor de importação vazio com Ran-GTP ligada é transportado de volta ao citosol através do complexo de poro do citosol. Lá, Ran-GAP estimula Ran-GTP a hidrolisar seu GTP ligado, convertendo-a em Ran-GDP. O receptor de importação está pronto então para outro ciclo de importação nuclear.

A exportação nuclear ocorre por um mecanismo semelhante, exceto que Ran-GTP no núcleo promove a ligação da carga ao receptor de exportação e a dissociação dele. Uma vez que os receptores de exportação movem-se através do poro para o citosol, sua Ran-GTP encontra Ran-GAP e hidrolisa seu GTP. Como resultado, o receptor de exportação libera sua carga e Ran-GDP no citosol. Os receptores de exportação livres retornam ao núcleo para completar o ciclo (ver Figura 12-15).

O transporte através de NPCs pode ser regulado pelo controle do acesso à maquinaria de transporte

Algumas proteínas, como aquelas que se ligam a mRNAs recém-sintetizados no núcleo, contêm tanto sinais de localização nuclear quanto sinais de exportação nuclear. Essas proteínas trafegam continuamente entre o núcleo e o citosol. As velocidades relativas da sua importação e exportação determinam a localização de equilíbrio dinâmico (*steady-state*) dessas *proteínas transportadoras*. Se a velocidade de importação excede a velocidade de exportação, uma proteína estará situada principalmente no núcleo. Contrariamente, se a velocidade de exportação excede a velocidade de importação, uma proteína estará situada principalmente no citosol. Assim, alterando a velocidade de importação e a de exportação, ou ambas, a localização de uma proteína pode mudar.

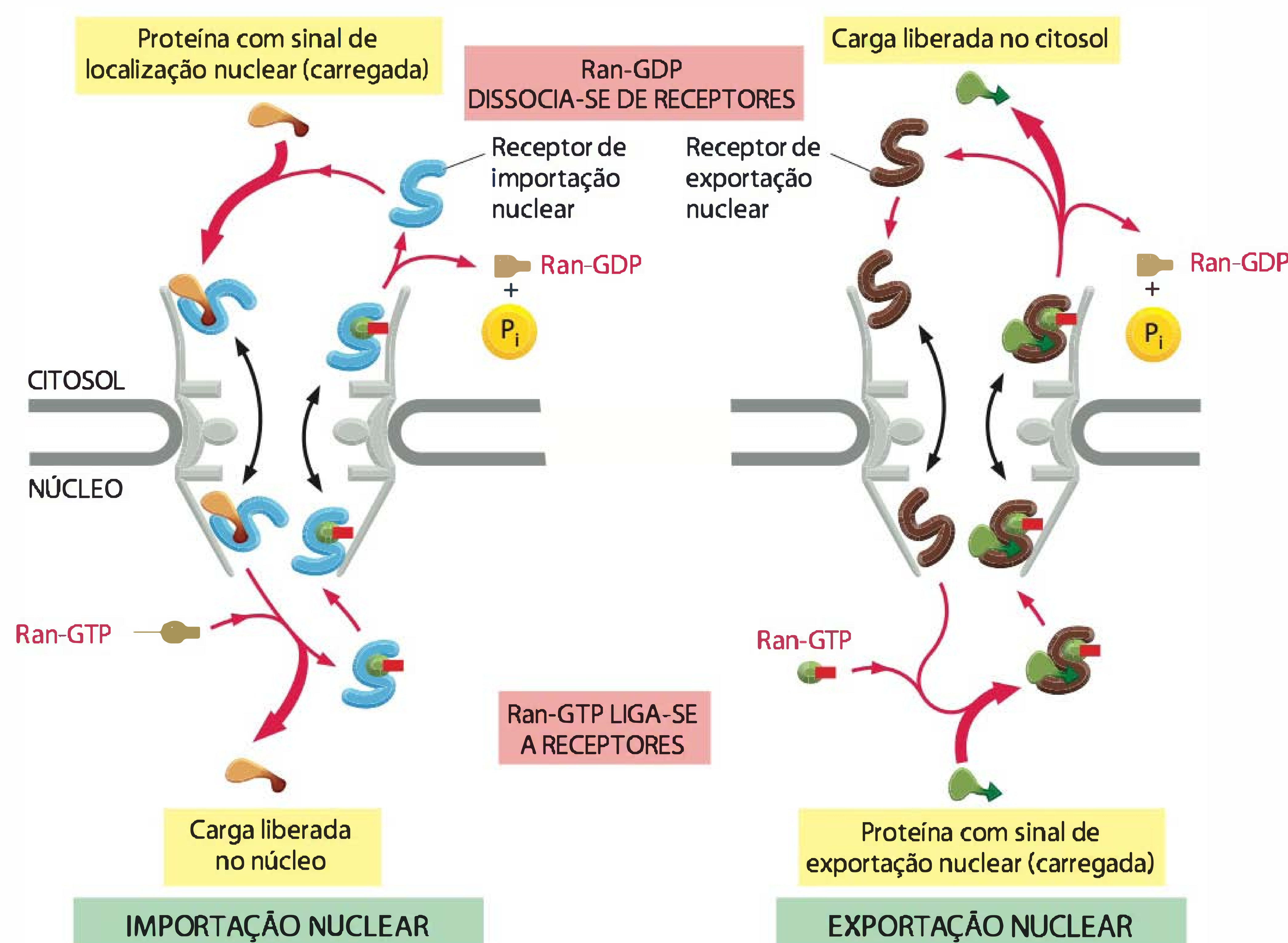


Figura12-1S Modeloexplicando como a hidrólise de GTP por Ran no citosol fornece direcionalidade para o transporte nuclear. O movimento de receptores de transporte nuclear carregados através do complexo de poro pode ocorrer por difusão guiada ao longo das repetições FG presentes nas proteínas NPC. A localização diferencial de Ran-GTP no núcleo e de Ran-GDP no citosol propicia direcionalidade (*setas vermelhas*) tanto para a importação nuclear (*esquerda*), quanto para a exportação nuclear (*direita*). A hidrólise de GTP para produzir Ran-GDP é mediada por Ran-GAP no lado citosólico do NPC (ver Figura 12-14).

Ran-GDP é importada para o núcleo por seu próprio receptor de importação, que é específico para a conformação de Ran ligada a GDP. O receptor Ran-GDP não é relacionado estruturalmente à principal família de receptores de transporte nuclear. Entretanto, ele também liga-se a repetições FG em proteínas NPC e salta através do NPC.

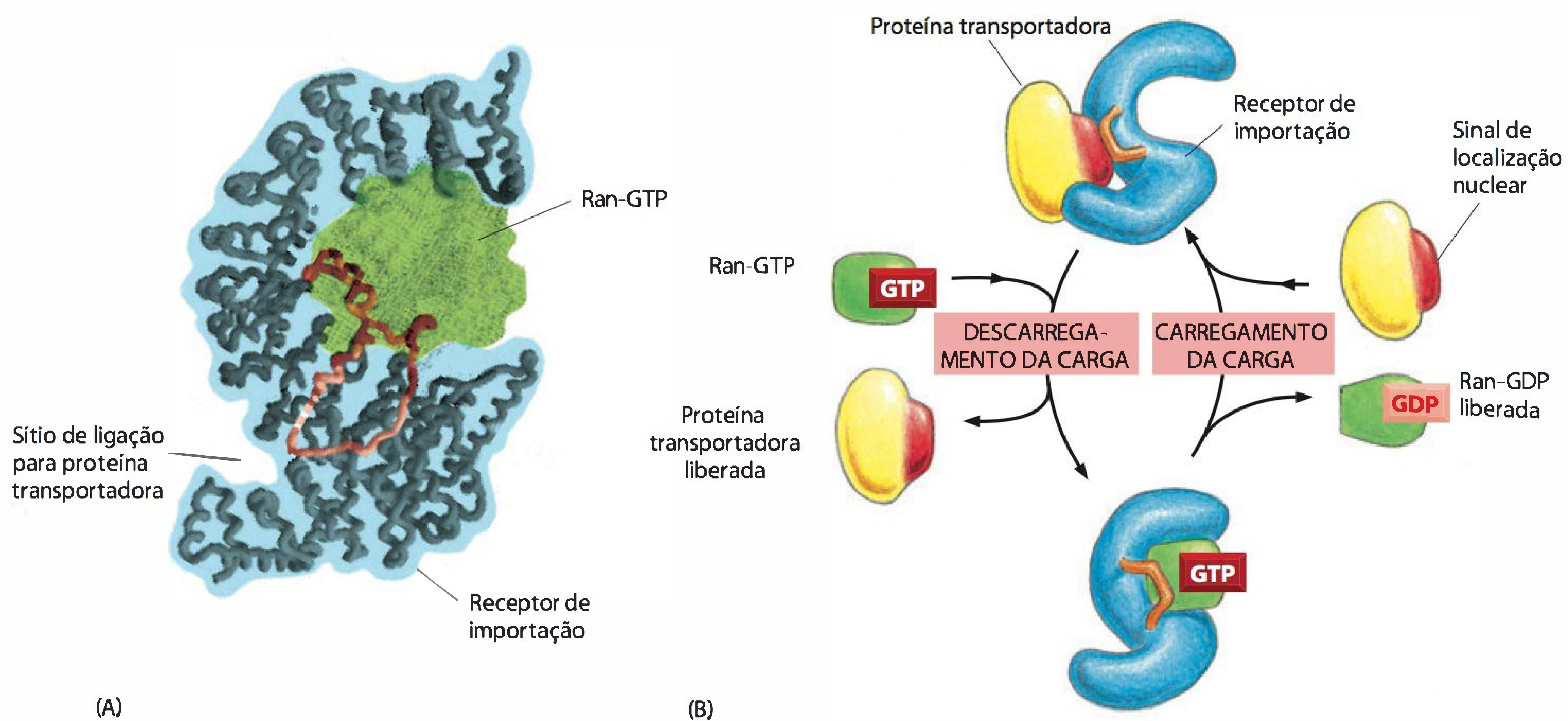


Figura 12-16 Como a ligação de Ran-GTP pode causar a liberação da carga proteica pelos receptores de importação nuclear. (A) A estrutura dos receptores de transporte nuclear com Ran-GTP. Os receptores são compostos de motivos hélices α repetidos que se dispõem em grandes arcos ou espirais em forma de caracol, que podem adotar múltiplas conformações em resposta à ligação de proteínas transportadas e Ran-GTP. As proteínas transportadas e a Ran-GTP ligam-se a diferentes regiões nas faces internas dos arcos. A Ran-GTP cobre parcialmente uma alça conservada (*vermelho*) do receptor, a qual, no estado Ran livre do receptor, parece ser importante para a ligação da carga. (B) Ciclo de carregamento no citosol e descarregamento no núcleo de um receptor de importação nuclear. (A, adaptada de Y. M. Chook e G. Blobel, *Nature* 399:230-237, 1999. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Algumas proteínas transportadoras movem-se continuamente para dentro e para fora do núcleo. Em outros casos, no entanto, o transporte é fortemente controlado. Como discutido no Capítulo 7, as células controlam a atividade de algumas proteínas reguladoras de genes por meio da sua retenção fora do compartimento nuclear, até que sejam necessárias no núcleo (**Figura 12-17**). Em muitos casos, esse controle depende da regulação da localização nuclear e de sinais de exportação; estes podem ser ligados ou desligados, geralmente por fosforilação de aminoácidos adjacentes à sequência-sinal (**Figura 12-18**).

Outras proteínas reguladoras de genes estão ligadas a proteínas citosólicas inibitórias que os ancoram no citosol (por meio de interações com o citoesqueleto ou com organelas específicas), ou mascaram seus sinais de localização nuclear de tal modo que são incapazes de interagir com receptores de importação nuclear. Quando a célula recebe um estímulo apropriado, a proteína reguladora de genes é liberada de sua âncora citosólica e transportada para dentro do núcleo. Um exemplo importante é a proteína reguladora de gene latente que controla a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol. A proteína é sintetizada e armazenada em uma forma inativa como uma proteína transmembrana no RE. Na falta de colesterol, a célula ativa proteases específicas que clivam a proteína, liberando seu domínio citosólico. Esse domínio é então importado ao núcleo, onde ativa a transcrição de genes necessários à importação e à síntese do colesterol.

Como discutido em detalhe no Capítulo 6, células controlam a exportação de mRNA do núcleo de maneira similar. Proteínas que guiam o mRNA para fora do núcleo carregam o RNA até que a transcrição e o *splicing* prossigam. Até entrarem no citosol, as proteínas são descarregadas e rapidamente retornam ao núcleo. Outros RNAs, tais como o pequeno RNA nuclear (snRNA, *small nuclear RNA*) e o tRNA, são exportados por diferentes receptores de exportação nuclear.

Durante a mitose, o envelope nuclear é desmontado

A **lâmina nuclear**, localizada no lado nuclear da membrana interna do núcleo, é uma malha de subunidades proteicas interconectadas chamadas de **laminas nucleares**. As laminas são uma classe especial de proteínas filamentosas intermediárias (discutido no Capítulo 16) que polimerizam em uma rede bidimensional (**Figura 12-19**). A lâmina nuclear dá forma e estabilidade ao envelope nuclear, ao qual está ancorada por adesão aos NPCs e a proteínas

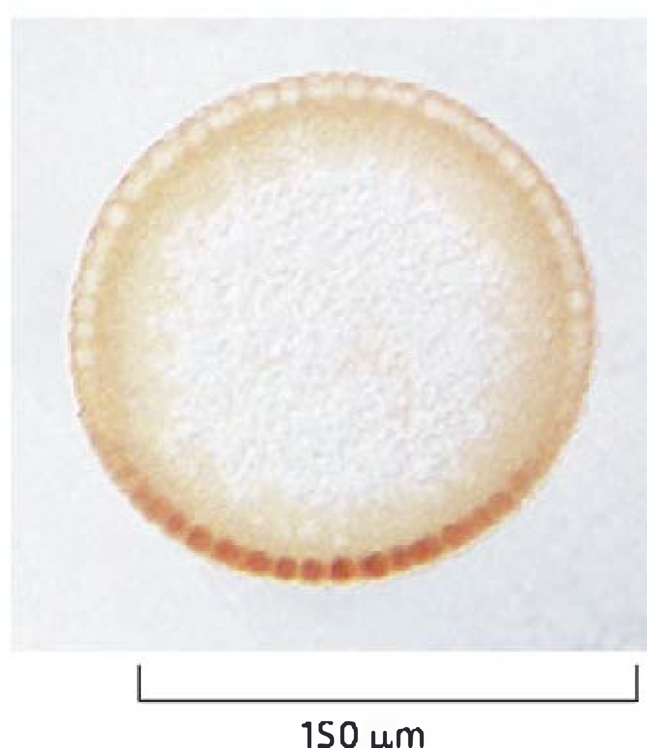


Figura 12-17 Controle do transporte nuclear no embrião da mosca. A proteína reguladora do gene *dorsal* é expressa uniformemente no embrião primário de *Drosophila*, que é mostrado em secção transversal. A proteína foi corada com um anticorpo acoplado a uma enzima que produz uma coloração marrom. A proteína é ativa apenas em células do lado ventral (*abaixo*) do embrião, onde é encontrada nos núcleos. (Cortesia de Siegfried Roth.)

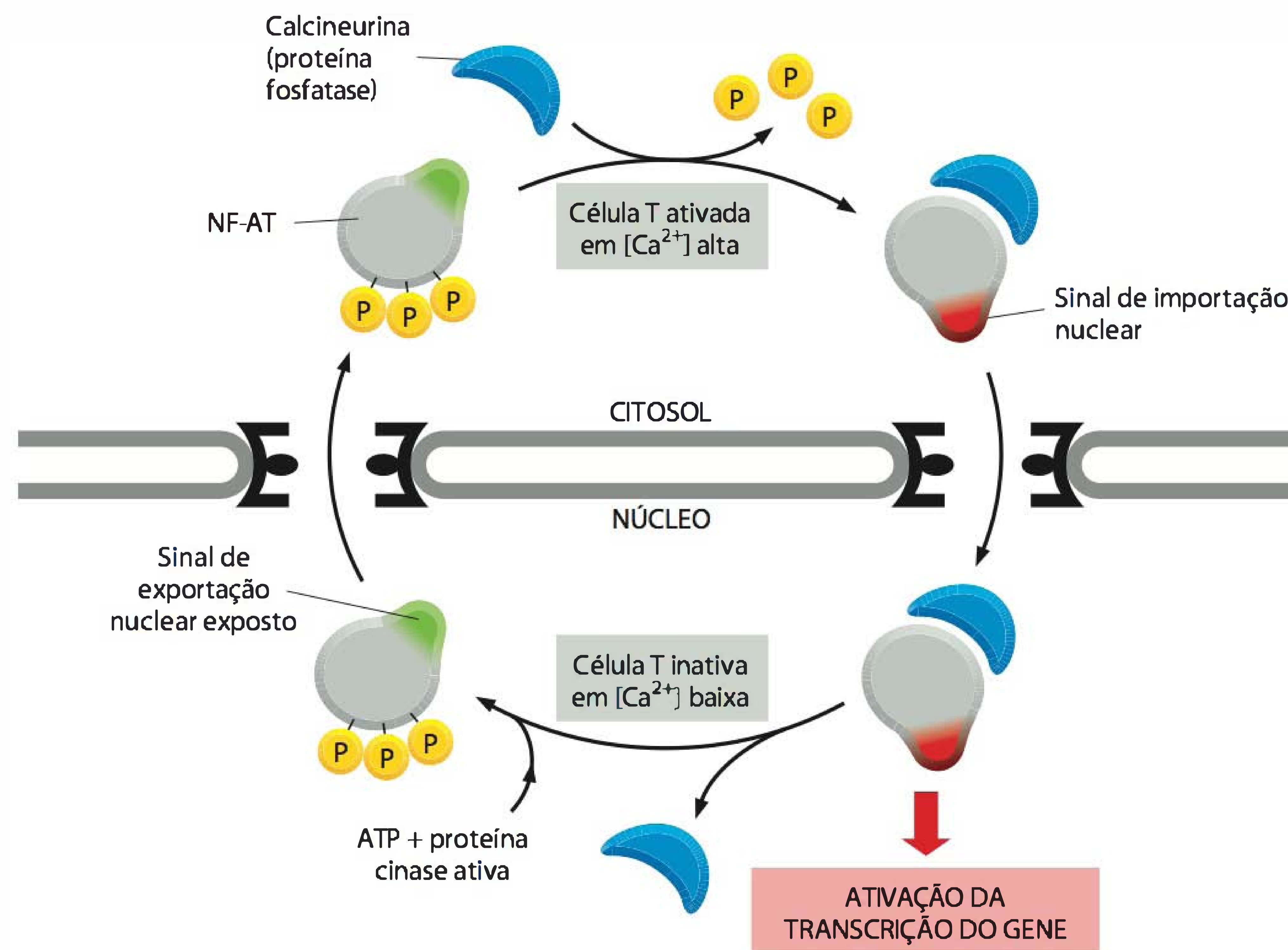


Figura 12-18 Controle de importação nuclear durante ativação de células T. O fator nuclear de células T ativadas (NF-AT, *nuclear factor of activated T cells*) é uma proteína reguladora de genes que, na célula T inativa, é encontrada no citosol em um estado fosforilado. Quando as células T são ativadas por um antígeno (discutido no Capítulo 25), a concentração de Ca^{2+} intracelular aumenta. Em altas concentrações de Ca^{2+}, a proteína fosfatase, calcineurina, liga-se ao NF-AT. A ligação de calcineurina desfosforila o NF-AT, expondo sinais de importação nuclear, e bloqueia um sinal de exportação nuclear. O complexo de NF-AT ligado à calcineurina é então importado ao núcleo, onde o NF-AT ativa a transcrição de numerosos genes necessários à ativação da célula T.

O desligamento da resposta ocorre quando os níveis de Ca^{2+} diminuem, liberando NF-AT da calcineurina. A refosforilação de NF-AT inativa o sinal de importação nuclear e reexpõe o sinal de exportação nuclear de NF-AT, levando-o a localizar-se novamente no citosol. Alguns dos mais potentes fármacos imunossupressores, como ciclosporina A e FK506, inibem a habilidade da calcineurina de desfosforilar NF-AT; esses fármacos, portanto, bloqueiam o acúmulo nuclear de NF-AT.

integrais de membrana da membrana nuclear interna. A lâmina também interage diretamente com a cromatina, que, por sua vez, interage com proteínas integrais de membrana da membrana nuclear interna. Juntamente com a lâmina, essas proteínas de membrana interna fornecem ligações estruturais entre o DNA e o envelope nuclear.

Quando um núcleo desagrega-se durante a mitose, a lâmina nuclear despolimeriza-se. A desagregação é, pelo menos parcialmente, uma consequência da fosforilação direta das laminas nucleares pelas cinases dependentes de ciclina (Cdks, *cyclin-dependent kinases*) que são ativadas no início da mitose (discutido no Capítulo 16). Ao mesmo tempo, as proteínas da membrana nuclear interna são fosforiladas, e os NPCs desmontam-se e se dispersam pelo citosol. Durante esse processo, algumas proteínas NPCs encontram-se ligadas a receptores de importação nuclear, os quais desempenham uma importante parte na montagem de NPCs no fim da mitose. As proteínas de membrana do envelope nuclear – não mais ligadas aos complexos de poro, lâmina ou cromatina – difundem-se pela membrana do RE. A proteína motora dineína, que se move ao longo dos microtúbulos (discutido no Capítulo 17), participa ativamente no rompimento do envelope nuclear. Juntos, esses eventos quebram as barreiras que normalmente separam o núcleo e o citosol, e as proteínas nucleares que não estão aderidas a membranas ou cromossomos misturam-se completamente com o citosol da célula em divisão (**Figura 12-20**).

Em etapas posteriores da mitose, o envelope nuclear reagrega-se na superfície dos cromossomos. Além do seu papel crucial no transporte nuclear, Ran-GTPase também atua como um marcador de posição para a cromatina durante a divisão celular, quando os componentes citosólicos e nucleares se misturam. Porque Ran-GEF permanece ligada à cromatina quando o envelope nuclear é rompido, moléculas Ran próximas à cromatina estão principalmente em sua conformação ligada a GTP. Em contraste, moléculas Ran mais distantes têm uma alta probabilidade de encontrar Ran-GAP, as quais estão distribuídas pelo citosol; essas moléculas Ran estão principalmente na sua conformação ligada a GDP.

A cromatina em células mitóticas é circundada por uma nuvem de Ran-GTP. Essa nuvem desloca localizadamente receptores de importação nuclear de proteínas NPC, os quais começam o processo de agregação de NPCs ligados à superfície do cromossomo. Ao mesmo tempo, proteínas da membrana interna nuclear e laminas desfosforiladas ligam-se à cromatina. Membranas do RE envolvem grupos de cromossomos e continuam a se fusionar até que formem um firme envelope nuclear. Durante esse processo, os NPCs iniciam ativamente a reimportação de proteínas que contêm sinais de localização nuclear. Uma vez que o envelope nuclear inicialmente está próximo à superfície dos cromossomos, o núcleo recém-formado exclui todas as proteínas, exceto aquelas inicialmente ligadas aos cromossomos mitóticos e aquelas que são seletivamente importadas através dos NPCs. Desse modo, todas as outras grandes proteínas são mantidas fora do núcleo recém-montado.

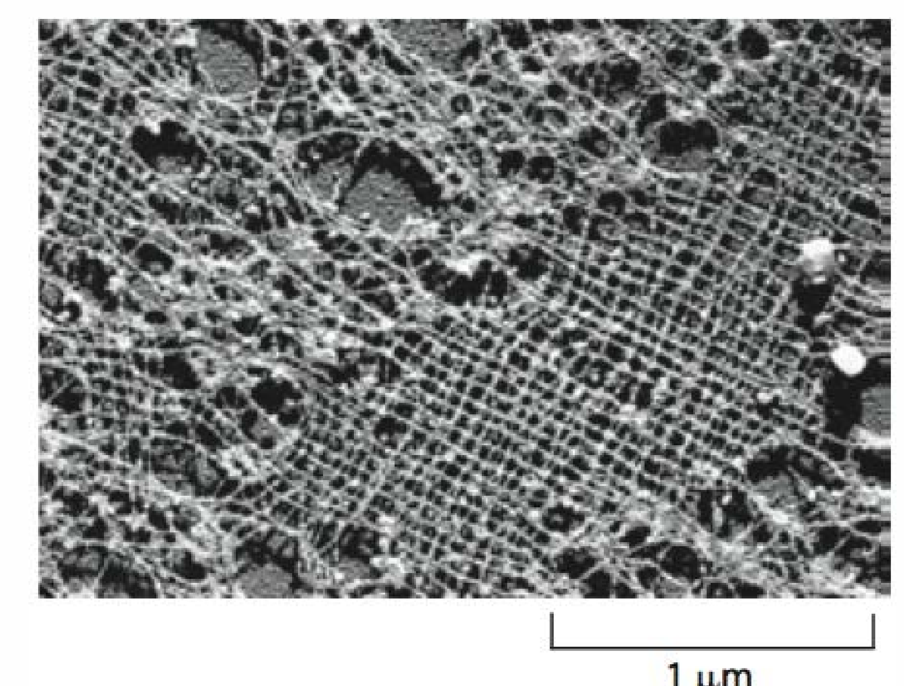


Figura 12-19 Lâmina nuclear. Uma micrografia eletrônica de uma porção da lâmina nuclear em um oócito de *Xenopus* preparado por criofratura e por sombreamento metálico. A lâmina é formada por uma rede regular de filamentos intermediários especializados. (Cortesia de Ueli Aebi.)

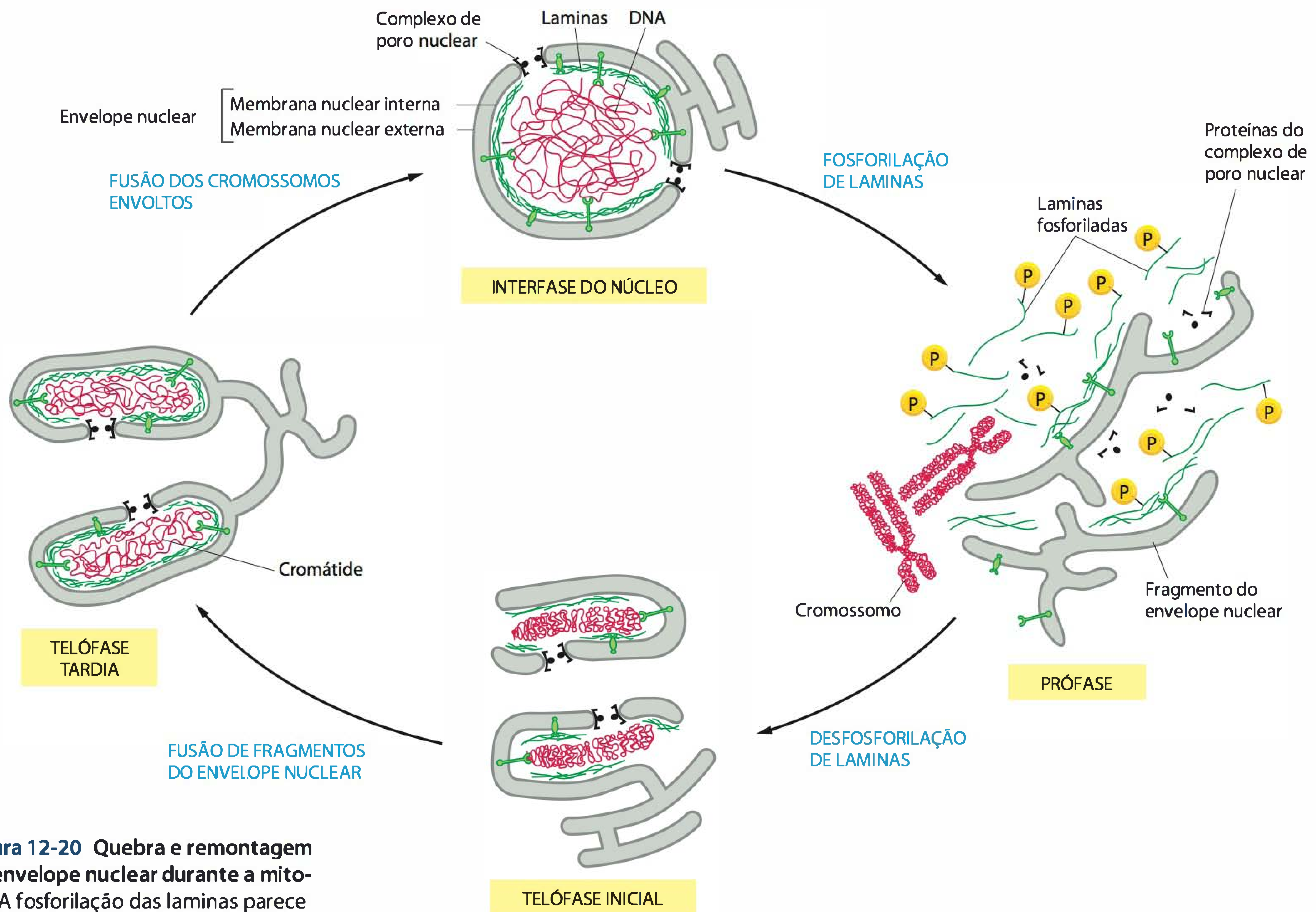


Figura 12-20 Quebra e remontagem do envelope nuclear durante a mitose. A fosforilação das laminas parece desencadear a desagregação da lâmina nuclear, causando quebra do envelope nuclear. A desfosforilação da lamina parece auxiliar na reversão do processo. Uma fosforilação análoga e um ciclo de desfosforilação ocorrem para algumas nucleoporinas e proteínas da membrana nuclear interna, e algumas dessas desfosforilações estão também envolvidas no processo de remontagem mostrado.

Como indicado, o envelope nuclear inicialmente remonta-se ao redor de cromátides descondensadas individuais. Finalmente, com o progresso da descondensação, essas estruturas fusionam-se para formar um núcleo completo único.

Os sinais de localização nuclear não são retirados após o transporte ao núcleo, provavelmente pela necessidade das proteínas nucleares serem importadas repetidamente a cada divisão celular. Em contraste, uma vez que uma molécula de proteína tenha sido importada para qualquer uma das outras organelas envoltas por membranas, ela é transmitida de geração a geração dentro daquele compartimento e não mais precisa ser translocada novamente; a sequência-sinal nessas moléculas geralmente é removida após a translocação da proteína.

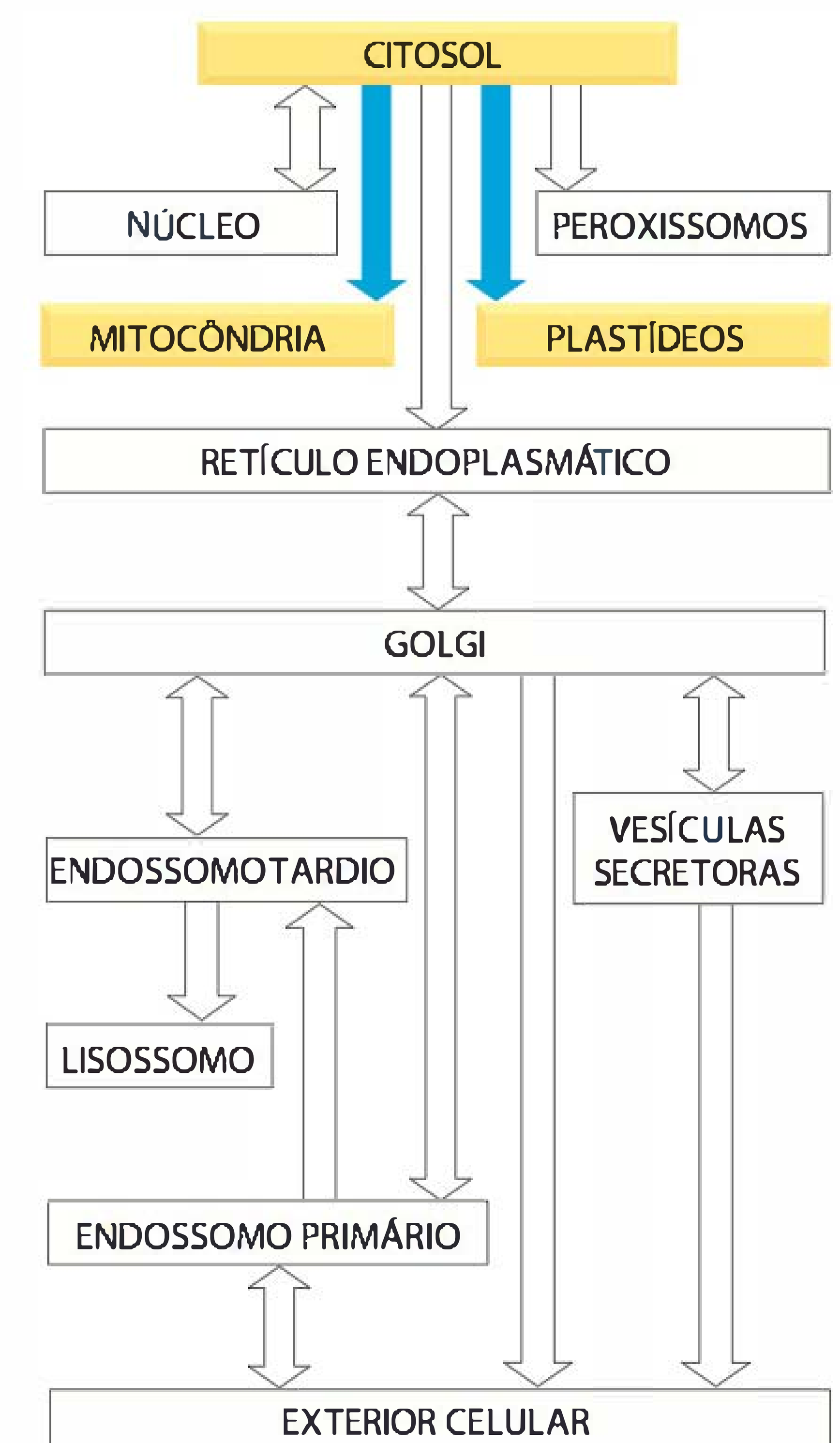
Como discutido no Capítulo 17, a nuvem de Ran-GTP ao redor da cromatina também é importante na montagem do eixo mitótico nas células em divisão.

Resumo

O envelope nuclear consiste em uma membrana nuclear interna e uma externa. A membrana externa é contínua com a membrana do RE, e o espaço entre ela e a membrana interna é contínuo com o lúmen do RE. As moléculas de RNA, que são sintetizadas no núcleo, e as subunidades ribossomais, que nele são montadas, são exportadas ao citosol; em contraste, todas as proteínas com função no núcleo são sintetizadas no citosol e então importadas. O extenso tráfego de materiais entre o núcleo e o citosol ocorre através dos complexos de poro nuclear (NPCs), os quais constituem uma passagem direta pelo envelope nuclear. Pequenas moléculas se difundem passivamente através dos NPCs, mas grandes macromoléculas são ativamente transportadas.

As proteínas contendo sinais de localização nuclear são ativamente transportadas para dentro pelos NPCs, enquanto as moléculas de RNA e as subunidades ribossomais recém-sintetizadas contêm sinais de exportação nuclear que direcionam seu transporte ativo para fora, por meio de NPCs. Algumas proteínas, incluindo os receptores de importação e de exportação nuclear, trafegam continuamente entre o citosol e o núcleo. A Ran-GTPase confere energia livre e direcionalidade para o transporte nuclear. Células regulam o transporte de proteínas nucleares e moléculas de RNA pelos NPCs controlando o acesso dessas moléculas à maquinaria de transporte. Como os sinais de localização nuclear não são removidos, as proteínas nucleares podem ser repetidamente importadas, como é necessário toda vez que o núcleo se reorganiza após a mitose.

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS PARA MITOCÔNDRIAS E CLOROPLASTOS



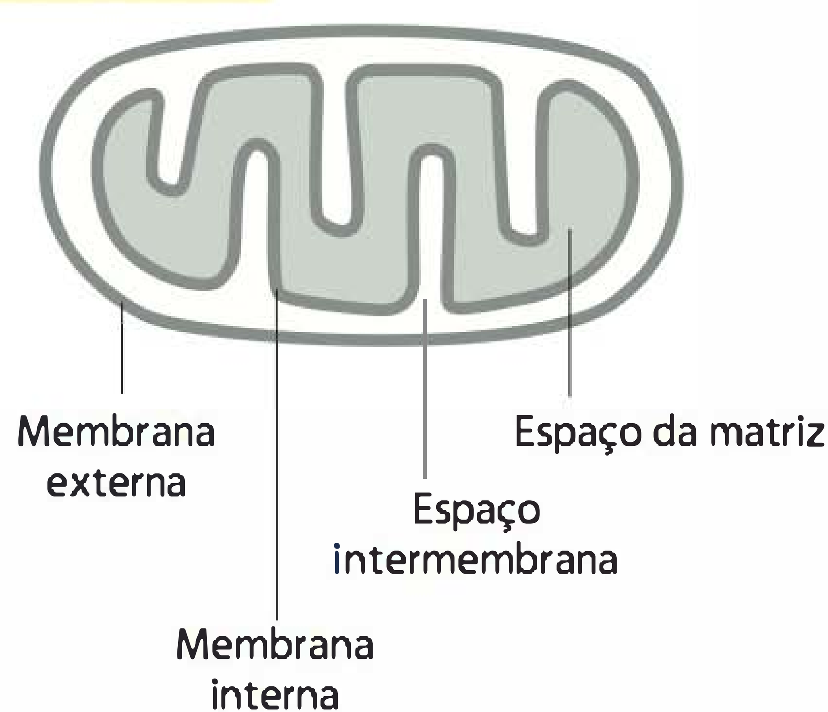
As mitocôndrias e os cloroplastos são organelas envoltas por membrana dupla (discutido no Capítulo 14). Eles especializaram-se na síntese de ATP, utilizando energia oriunda do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, e da fotossíntese nos cloroplastos. Embora ambas as organelas contenham seu próprio DNA, os ribossomos e outros componentes necessários à síntese de proteínas, a maioria das suas proteínas é codificada no núcleo celular e importada do citosol. Cada proteína importada deve atingir o subcompartimento organelar específico no qual exerce sua função.

Existem dois subcompartimentos na mitocôndria: o **espaço** interno **da matriz** e o **espaço intermembranas**. Esses compartimentos são formados pelas duas membranas mitocondriais concêntricas: a **membrana interna**, que envolve o espaço da matriz e forma extensas invaginações, as *cristas*, e a **membrana externa**, que está em contato com o citosol (**Figura 12-21**A). Os cloroplastos apresentam os mesmos dois subcompartimentos, além de um subcompartimento adicional, o *espaço tilacoidal*, que é rodeado pela *membrana tilacoidal* (Figura 12-21B). Cada um dos subcompartimentos nas mitocôndrias e nos cloroplastos contém um conjunto distinto de proteínas.

Novas mitocôndrias e cloroplastos são produzidos pelo crescimento de organelas preexistentes, seguido de fissão (discutido no Capítulo 14). Seu crescimento depende principalmente da importação de proteínas do citosol. Isto requer que as proteínas sejam translocadas através de várias membranas sucessivas e terminem no local apropriado. O processo de movimento de proteínas através de membranas frequentemente é chamado de *translocação de proteínas*. Esta seção explica como isso ocorre.

A translocação para dentro da mitocôndria depende de sequências-sinal e de translocadores de proteína

As proteínas importadas para a **mitocôndria** geralmente são captadas do citosol dentro de segundos ou minutos após sua liberação pelos ribossomos. Assim, em contraste com a translocação de proteínas para o RE descrita anteriormente, as proteínas mitocondriais são primeiro completamente sintetizadas como **proteínas precursoras mitocondriais** no citosol e, então, translocadas para a mitocôndria, por um mecanismo *pós-traducional*. Uma ou mais sequências-sinal dirigem todas as proteínas precursoras mitocondriais para o seu subcompartimento mitocondrial apropriado. Muitas proteínas que entram no espaço da matriz possuem uma sequência-sinal na sua região N-terminal que é rapidamente removida por uma peptidase, após a importação. Outras, incluindo todas as membranas externas e muitas membranas internas e proteínas do espaço intermembranas, têm uma sequência-sinal interna que não é removida. Ambas as sequências-sinal são necessárias e suficientes para a localização correta das proteínas: quando técnicas de engenharia genética são usadas para ligar esses sinais a proteínas citosólicas, esses sinais dirigirem a proteína ao subcompartimento mitocondrial correto.



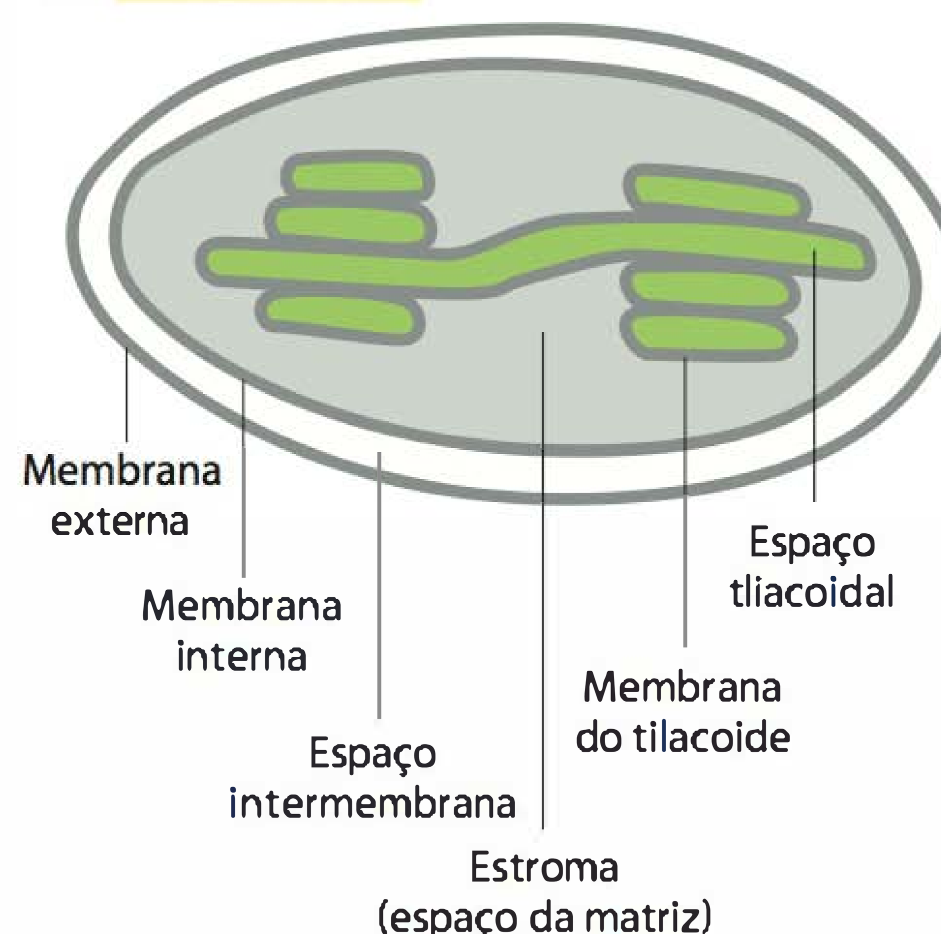


Figura 12-21 Subcompartimentos de mitocôndrias e de cloroplastos. Em contraste com as cristas mitocondriais (A), os tilacoides dos cloroplastos (B) não estão conectados a sua membrana interna e, por conseguinte, formam um compartimento com um espaço interno separado (ver Figura 12-3).

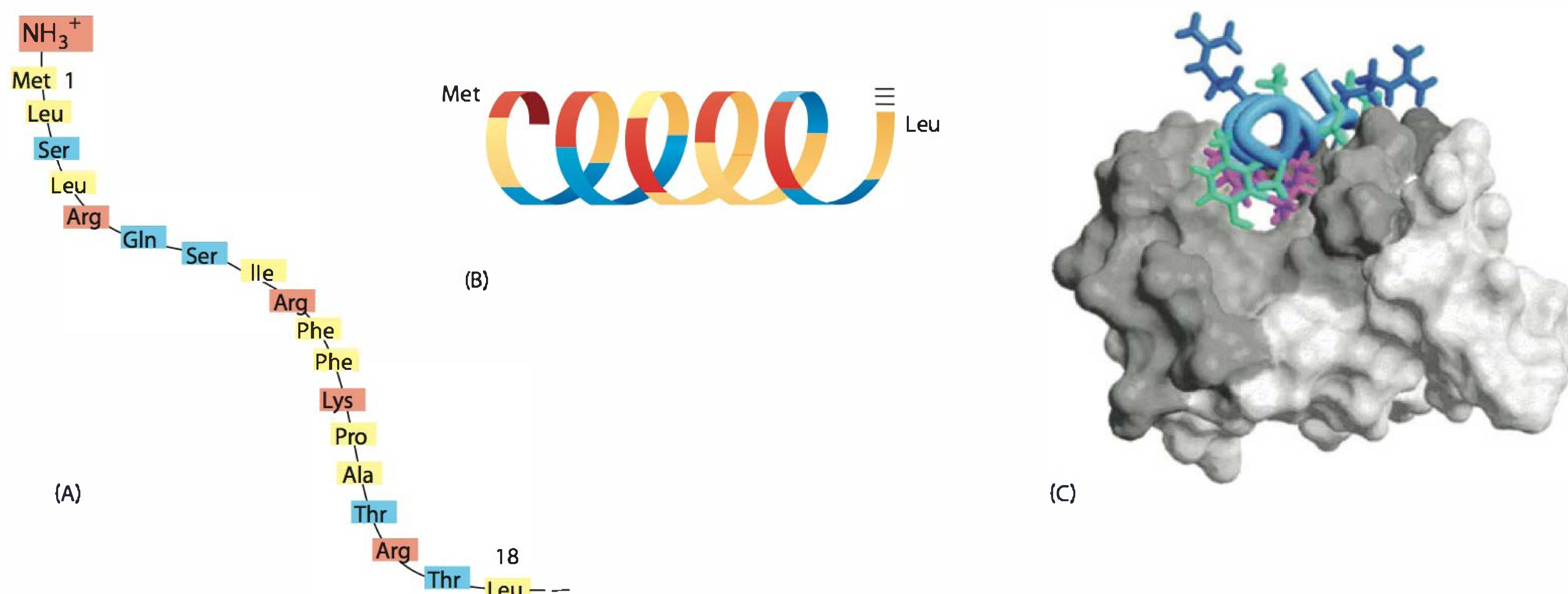


Figura 12-22 Sequência-sinal para importação de proteínas mitocondriais. A citocromo-oxidase é um grande complexo multiproteico localizado na membrana mitocondrial interna, onde atua como enzima final na cadeia de transporte de elétrons (discutido no Capítulo 14). (A) Os primeiros 18 aminoácidos do precursor da subunidade IV dessa enzima servem como uma sequência-sinal para importação da subunidade na mitocôndria. (B) Quando a sequência-sinal é enovelada como uma hélice α, os resíduos carregados positivamente (*vermelho*) são vistos agrupados em uma das faces da hélice, enquanto os resíduos apolares (*amarelo*) são agrupados predominantemente na face oposta. Aminoácidos com cadeias laterais polares não-carregadas estão marcados em *azul*. Sequências-sinal que dirigem proteínas para o espaço da matriz sempre têm o potencial de formar tais hélices α anfifílicas, que são reconhecidas por proteínas receptoras específicas na superfície mitocondrial. (C) A estrutura da sequência-sinal da álcool-desidrogenase, outra enzima da matriz mitocondrial, ligada a um importante receptor, foi determinada por NMR. A hélice α anfifílica liga-se com sua face hidrofóbica a uma fenda hidrofílica no receptor. (C, adaptada de Y. Abe et al., *Cell* 100:551-560, 2000. Com permissão de Elsevier.)

Sequências-sinal que direcionam proteínas precursoras para dentro do espaço da matriz mitocondrial são melhor entendidas. Elas formam uma hélice α anfifílica, na qual resíduos carregados positivamente se agrupam em um lado da hélice, enquanto resíduos hidrofóbicos não-carregados se agrupam no lado oposto. Proteínas receptoras específicas que iniciam a translocação de proteínas reconhecem essa configuração além da sequência precisa de aminoácidos da sequência-sinal (**Figura 12-22**).

Complexos proteicos com multissubunidades atuam como **translocadores de proteínas** fazendo a mediação da translocação de proteínas através das membranas mitocondriais. O **complexo TOM** transfere proteínas através da membrana externa, e dois **complexos TIM** (TIM23 e TIM22) transferem proteínas através da membrana interna (**Figura 12-23**). (TOM e TIM representam translocases das membranas mitocondriais externa e interna, respectivamente.) Esses complexos contêm alguns componentes que atuam como receptores para proteínas precursoras mitocondriais, e outros componentes que formam os canais de translocação.

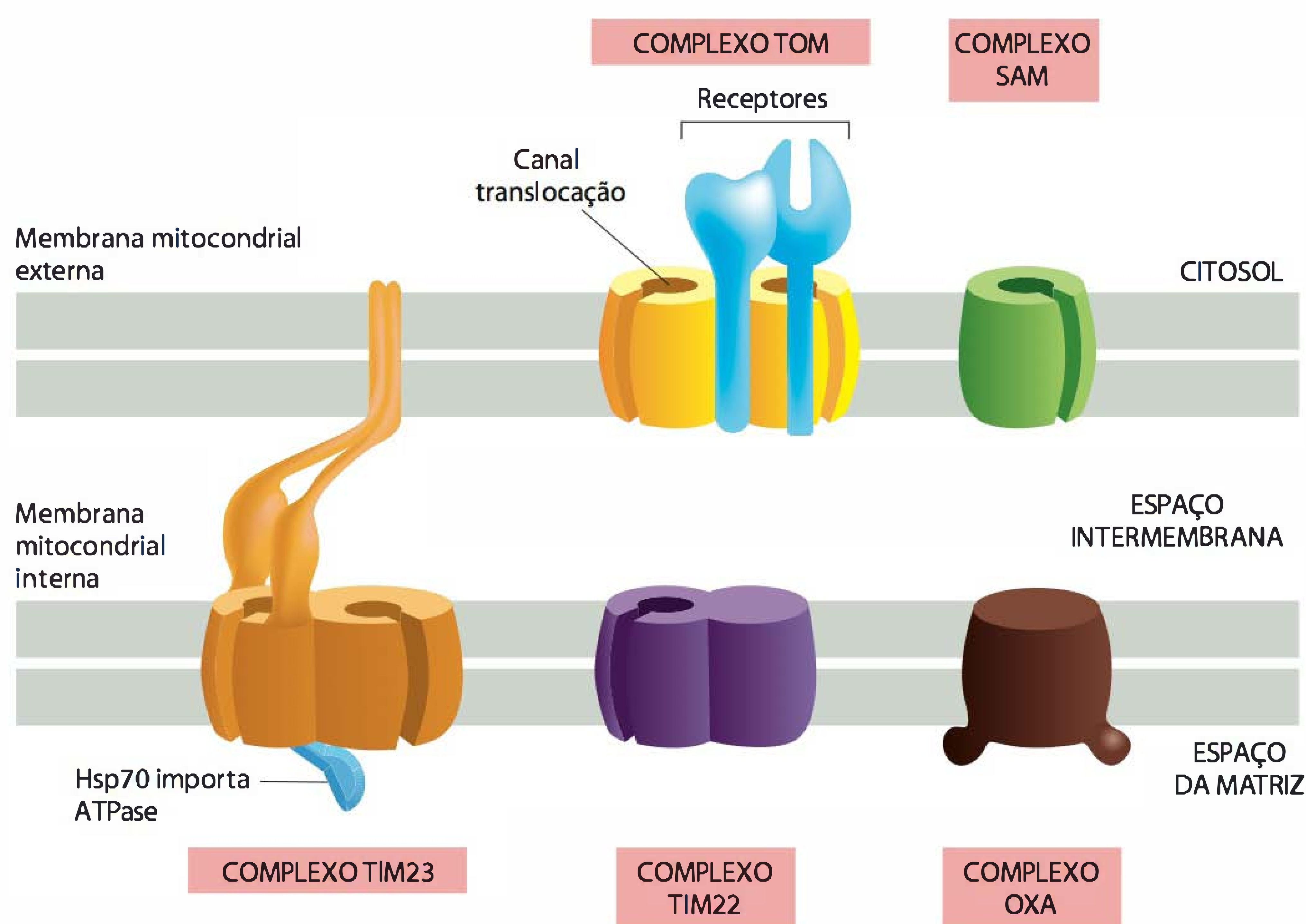


Figura 12-23 Proteínas translocadoras nas membranas mitocondriais. Os complexos TOM, TIM, SAM e OXA são agregados de proteínas multiméricas de membrana que catalisam o transporte de proteínas através das membranas mitocondriais. Os componentes proteicos dos complexos TIM22 e TIM23 que revestem o canal de importação são estruturalmente relacionados, sugerindo uma origem evolutiva comum de ambos os complexos TIM. Como indicado, um dos componentes centrais do complexo TIM23 contém uma extensão hélice α hidrofóbica que é inserida na membrana mitocondrial externa; o complexo é, portanto, incomum uma vez que abrange duas membranas simultaneamente.

No lado da matriz, o complexo TIM23 está ligado a um complexo proteico contendo Hsp70 mitocondrial, a qual atua como um importador de ATPase usando a hidrólise de ATP para empurrar proteínas através do poro.

O complexo TOM é necessário à importação de todas as proteínas mitocondriais codificadas no núcleo. Ele transporta inicialmente sua sequência-sinal para o espaço intermembrana e auxilia na inserção de proteínas transmembrana na membrana externa. Proteínas Barril β, particularmente abundantes na membrana externa, são então atravessadas por translocadores adicionais, o **complexo SAM**, que auxilia no dobramento correto na membrana externa. O complexo TIM23 transporta algumas dessas proteínas para o espaço da matriz e auxilia na inserção de proteínas transmembrana na membrana interna. O complexo TIM22 medeia a inserção de uma subclasse de proteínas da membrana interna, incluindo a proteína transportadora que transporta ADP, ATP e fosfato para dentro e fora da mitocôndria. Ainda, um terceiro translocador de proteína na membrana mitocondrial interna, o **complexo OXA**, medeia a inserção de proteínas da membrana interna que são sintetizadas no interior das mitocôndrias. Ele também auxilia na inserção de algumas proteínas de membrana interna importadas que são, inicialmente, transportadas para o espaço da matriz por outros complexos.

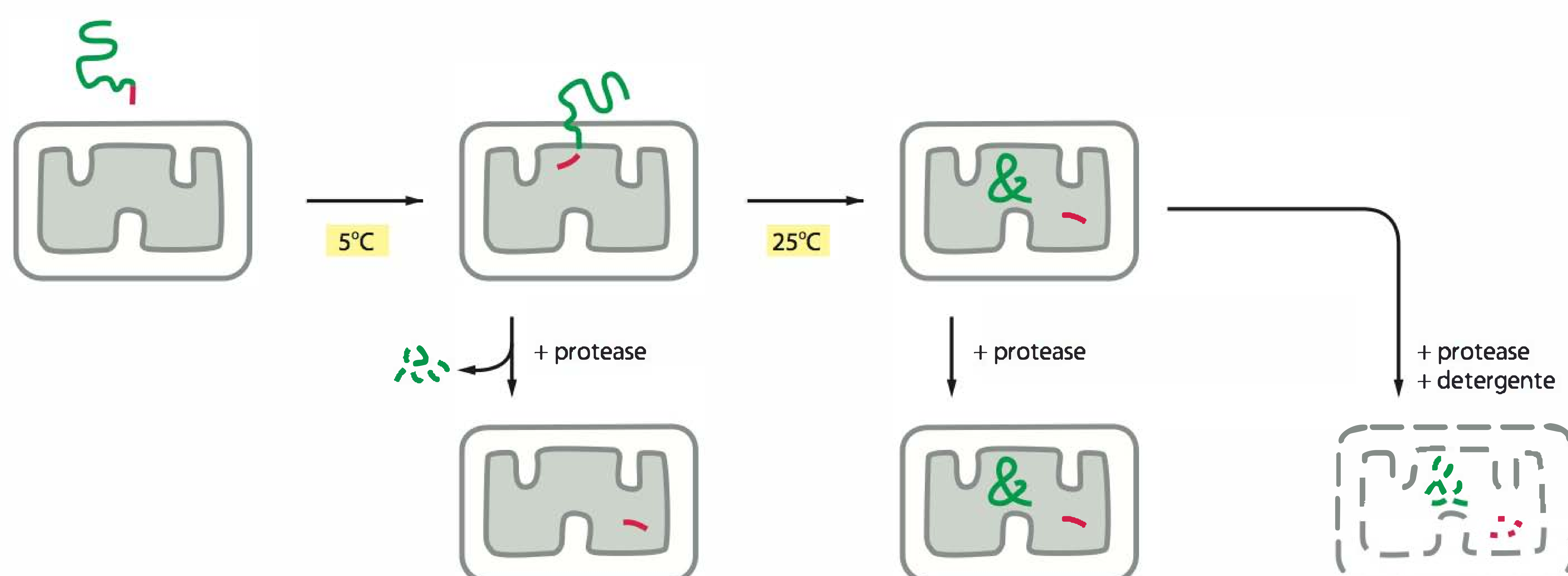
As proteínas precursoras mitocondriais são importadas como cadeias polipeptídicas desenoveladas

Quase tudo o que conhecemos sobre mecanismos moleculares de importação de proteínas nas mitocôndrias foi obtido a partir de análises de sistemas de transporte reconstituídos livres de células, nos quais as mitocôndrias purificadas em um tubo teste importam proteínas precursoras mitocondriais radiativas. Trocando as condições de incubação, é possível estabelecer os requisitos bioquímicos para o transporte.

As proteínas precursoras mitocondriais não se enovelam em sua estrutura nativa logo depois de serem sintetizadas; em vez disso, elas permanecem desenoveladas por meio de interações com outras proteínas no citosol. Algumas dessas proteínas são *proteínas chaperonas* gerais pertencentes à *família Hsp70* (discutido no Capítulo 6), enquanto outras são dedicadas a proteínas precursoras mitocondriais e ligam-se diretamente em suas sequências-sinal. Todas essas proteínas de interação auxiliam na prevenção de agregação ou no enovelamento espontâneo das proteínas precursoras, antes da sua interação com o complexo TOM na membrana mitocondrial externa. Como um passo inicial no processo de importação, os receptores de importação do complexo TOM ligam-se a sequências-sinal de proteínas precursoras mitocondriais. As proteínas de interação são, então, removidas e a cadeia polipeptídica desenovelada é encaminhada – primeiro a sequência-sinal – para o canal de translocação.

Em princípio, uma proteína pode atingir o espaço da matriz mitocondrial cruzando as duas membranas, uma de cada vez, ou ambas de uma só vez. Para distinguir entre essas duas possibilidades, um sistema de importação mitocondrial livre de células foi resfriado a uma baixa temperatura, imobilizando as proteínas em uma etapa intermediária no processo de translocação. O resultado é que proteínas que se acumularam não tinham sua sequência-sinal N-terminal, indicando que sua região N-terminal deveria estar no espaço da matriz onde a peptidase-sinal está localizada, mas maior parte da proteína pode sofrer ataque de fora da mitocôndria por enzimas proteolíticas adicionadas externamente (**Figura 12-24**). Claramente, as proteínas precursoras podem atravessar ambas as membranas mitocondriais de uma só vez para entrar na matriz (**Figura 12-25**). Acredita-se que o complexo TOM primeiramente transporta o sinal de localização mitocondrial através da membrana externa para

Figura 12-24 Proteínas efêmeras atravessando as membranas mitocondriais interna e externa durante sua translocação para o espaço da matriz. Quando mitocôndrias isoladas são incubadas com uma proteína precursora a 5°C, o precursor é translocado somente parcialmente através das membranas mitocondriais. A sequência-sinal N-terminal (*vermelho*) é clivada no espaço da matriz; mas a maior parte da cadeia polipeptídica permanece fora da mitocôndria, onde é acessível a enzimas proteolíticas. Sob aquecimento a 25°C, a translocação é completada. Uma vez no interior da mitocôndria, a cadeia polipeptídica está protegida das enzimas proteolíticas adicionadas externamente. Como controle, quando são adicionados detergentes para desagregar as membranas mitocondriais, as proteínas importadas podem ser prontamente digeridas pelo mesmo tratamento com protease.



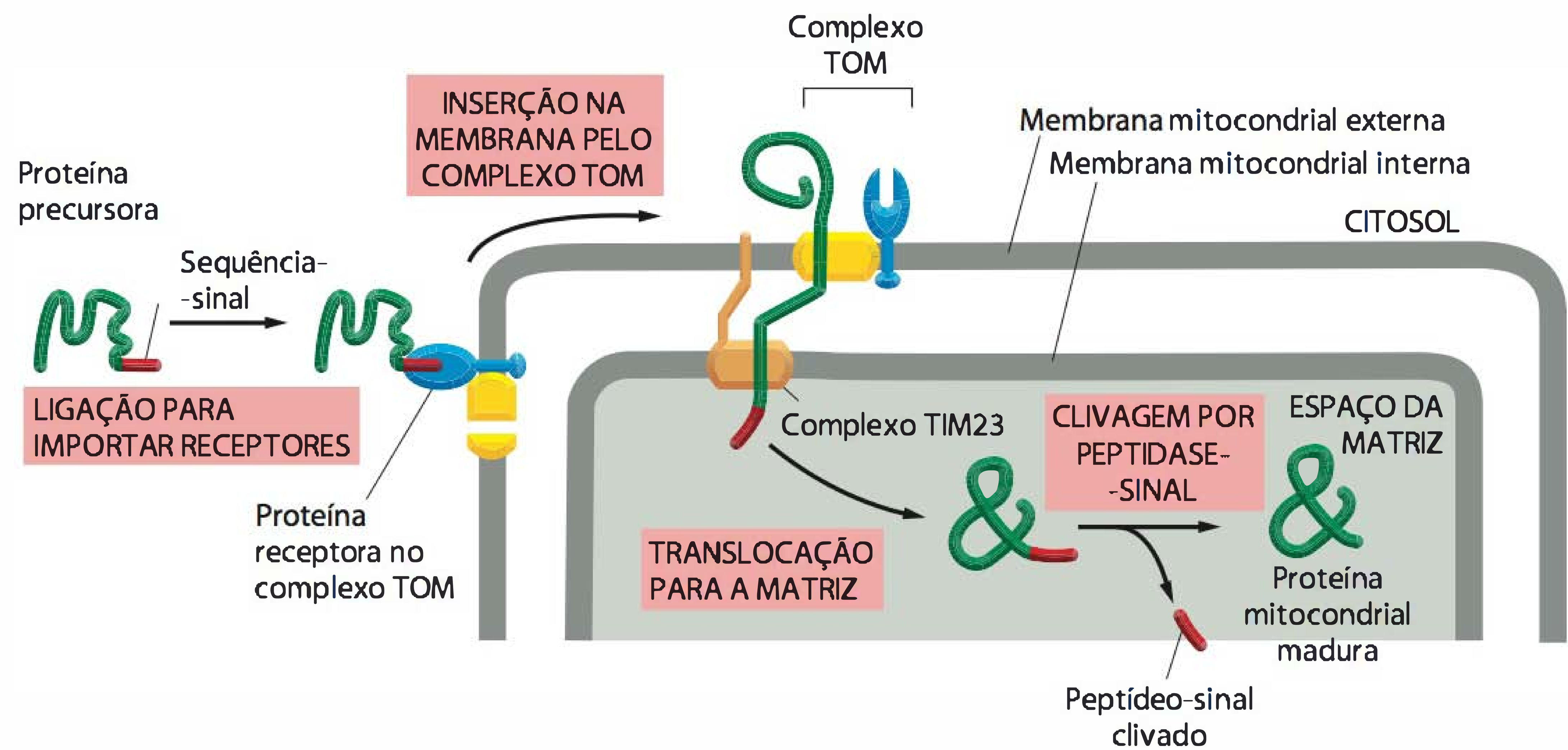


Figura 12-25 Importação de proteína pelas mitocôndrias. A sequência-sinal N-terminal da proteína precursora mitocondrial é reconhecida por receptores do complexo TOM. A proteína é então translocada através do complexo TIM23, atravessando transientemente ambas as membranas mitocondriais. A sequência-sinal é clivada por uma peptidase-sinal no espaço da matriz, para formar a proteína madura. A sequência-sinal livre é então rapidamente degradada (não-mostrado).

o espaço intermembrana, onde liga-se ao complexo TIM, abrindo o canal no complexo. A cadeia polipeptídica entra então no espaço da matriz ou insere-se na membrana interna.

Embora as funções dos complexos TOM e TIM geralmente sejam acopladas, para transportar proteínas através de ambas as membranas ao mesmo tempo, os dois tipos de proteínas translocadoras podem atuar independentemente. Em membranas externas isoladas, por exemplo, o complexo TOM pode translocar a sequência-sinal das proteínas precursoras através da membrana. Da mesma forma, as mitocôndrias com membranas externas desagregadas experimentalmente e, portanto, com o complexo TIM23 exposto na sua superfície importam proteínas precursoras para o espaço da matriz com eficiência.

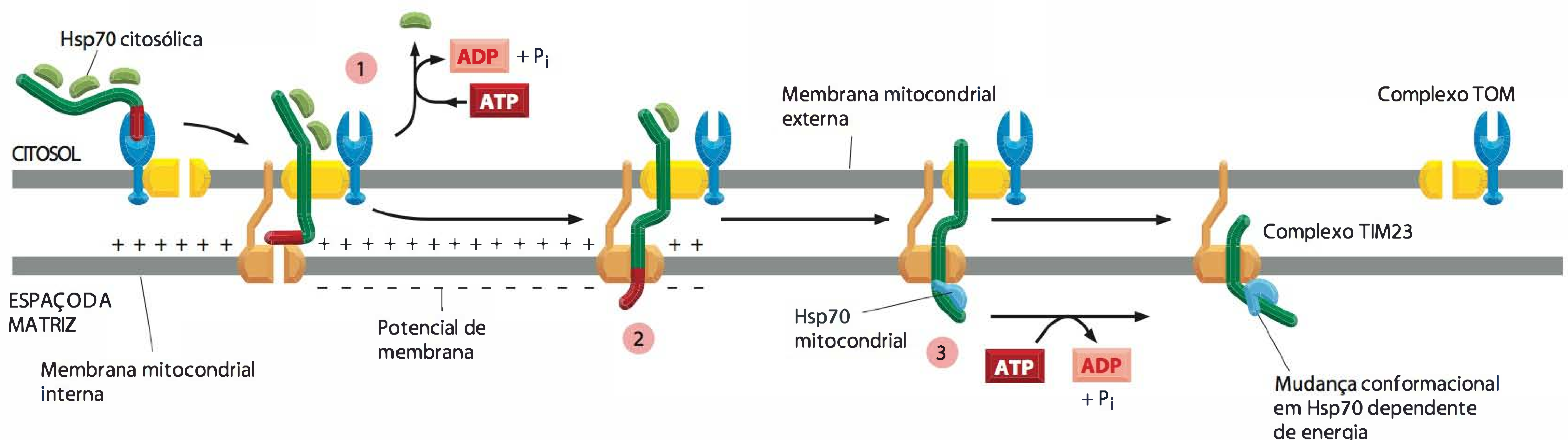
A hidrólise de ATP e um potencial de membrana dirigem a importação de proteína para o espaço da matriz

O transporte direcional requer energia que, na maioria dos sistemas biológicos, é suprida pela hidrólise de ATP. A importação de proteína para a mitocôndria é sustentada pela hidrólise de ATP em dois sítios diferentes, um fora da mitocôndria e um no espaço da matriz (**Figura 12-26**). Além disso, outra fonte de energia para importação de proteína é necessária, que é um potencial de membrana através da membrana mitocondrial interna.

A primeira demanda de energia ocorre no estágio inicial do processo de translocação, quando a proteína precursora desenovelada, associada a proteínas chaperonas, interage com os receptores de importação do complexo TOM. Como discutido no Capítulo 6, a ligação e a liberação de polipeptídeos recém-sintetizados das proteínas chaperonas da família Hsp70 necessita da hidrólise do ATP. A necessidade de Hsp70 e de ATP no citosol pode ser contornada se a proteína precursora for desenovelada artificialmente, antes de ser adicionada às mitocôndrias purificadas.

Uma vez que a sequência-sinal tenha passado pelo complexo TOM e se ligado a um dos complexos TIM, a continuidade do transporte pelos canais de transporte TIM necessita de um potencial de membrana, o qual é um componente de eletricidade do gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana interna (ver a Figura 11-4). O bombeamento de H^+ da

Figura 12-26 Papel da energia na importação de proteína para o espaço da matriz mitocondrial. (1) *Hsp70 citosólica* ligada é liberada da proteína em uma etapa que depende da hidrólise de ATP. Após inserção inicial da sequência-sinal e de uma porção adjacente da cadeia polipeptídica no complexo TOM, a sequência-sinal interage com um complexo TIM. (2) A sequência-sinal é então translocada para o espaço da matriz em um processo que necessita de um potencial de membrana através da membrana interna. (3) A proteína *Hsp70 mitocondrial*, que é parte de um importante complexo ATPase, liga-se a regiões da cadeia polipeptídica à medida que elas se expõem no espaço da matriz, "puxando" a proteína através do canal de translocação.



matriz para o espaço intermembrana, dirigido pelo processo de transporte de elétrons na membrana interna (discutido no Capítulo 14), mantém o gradiente eletroquímico. A energia do gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana interna não é utilizada somente como suporte auxiliar à maior parte da síntese de ATP celular; ela também é usada para dirigir a translocação de sequências-sinal carregadas positivamente através dos complexos TIM por eletroforese.

As proteínas **Hsp70 mitocondriais** também têm um papel crucial no processo de importação. Mitocôndrias contendo formas mutantes da proteína falham em importar proteínas precursoras. A Hsp70 é parte de uma proteína com multissubunidades agregadas que está ligada ao lado da matriz do complexo TIM23 e age como um motor para puxar proteínas precursoras para o espaço da matriz. Como os "primos" citosólicos, as Hsp70 mitocondriais têm uma alta afinidade por cadeias polipeptídicas desenoveladas e ligam-se firmemente a uma proteína importada assim que ela emerge do translocador TIM no espaço da matriz. A Hsp70 então libera a proteína em um passo dependente de ATP. Acredita-se que esse ciclo de ligação dirigido por energia e a sua subsequente liberação forneçam a força motriz necessária para que a importação da proteína seja completada depois que esta tenha sido inicialmente inserida no complexo TIM23 (ver Figura 12-26).

Após a interação inicial com Hsp70 mitocondriais, muitas proteínas importadas da matriz são passadas para uma outra proteína chaperona, *Hsp60 mitocondrial*. Como discutido no Capítulo 6, as proteínas Hsp60 auxiliam cadeias polipeptídicas desenoveladas a se enovelarem pela sua ligação e liberação através de ciclos de hidrólise de ATP.

Bactérias e mitocôndrias usam mecanismos similares para inserir porinas em suas membranas externas

A membrana mitocondrial externa, como a membrana externa de bactérias gram-negativas (ver Figura 11-18), contém abundantes proteínas formadoras de poros chamadas de porinas e são livremente permeáveis a íons inorgânicos e metabólitos (mas não a muitas proteínas). Porinas são proteínas do tipo barril β (ver Figura 10-26) e são primeiro importadas por meio do complexo TOM (**Figura 12-27**). Em contraste com outras proteínas de membrana externa, que são ancoradas na membrana através de regiões hélice α, o complexo TOM não pode integrar porinas na bicamada lipídica. Ao invés disso, as porinas são primeiro transportadas para o espaço intermembrana, onde elas ligam-se transientemente a proteínas chaperonas especializadas, que as mantêm não-agregadas. Ambas ligam-se então ao complexo SAM na membrana externa, inserindo a proteína na membrana externa, auxiliando o seu enovelamento apropriado.

Uma das subunidades centrais do complexo SAM é homóloga à proteína de membrana externa bacteriana que auxilia a inserir proteínas barril β na membrana externa do espaço periplasmático bacteriano (o equivalente topológico do espaço intermembrana na mitocôndria). Essa via conservada da inserção de proteínas barril β é uma evidência adicional à origem endossimbiótica das mitocôndrias.

O transporte para a membrana mitocondrial interna e o espaço intermembrana ocorre por meio de algumas vias

O mesmo mecanismo que transporta as proteínas para a matriz, usando os transportadores TOM e TIM23 (ver Figura 12-25), também faz a mediação do transporte inicial de muitas proteínas destinadas à membrana mitocondrial interna ou ao espaço intermembrana. Na

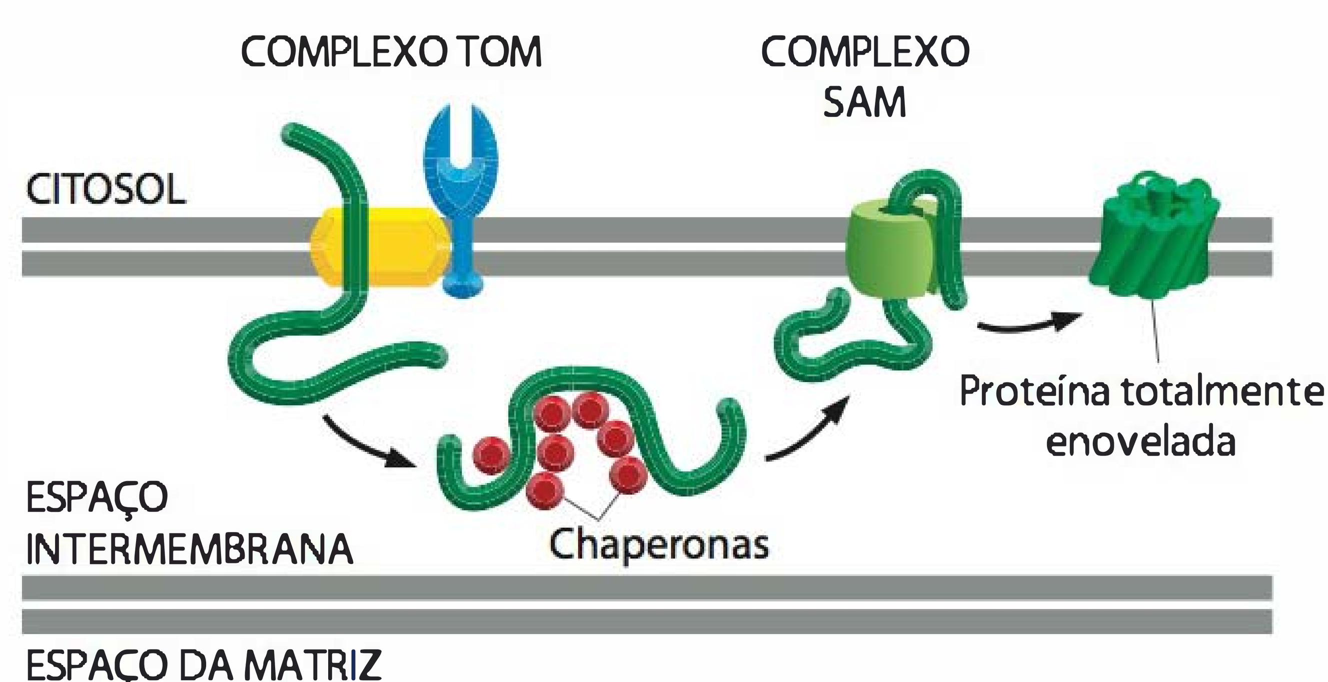


Figura 12-27 Integração de porinas na membrana mitocondrial externa. Após a translocação por meio do complexo TOM, proteínas barril β ligam-se a chaperonas do espaço intermembrana. O complexo SAM insere então cadeias polipeptídicas desenoveladas na membrana externa.

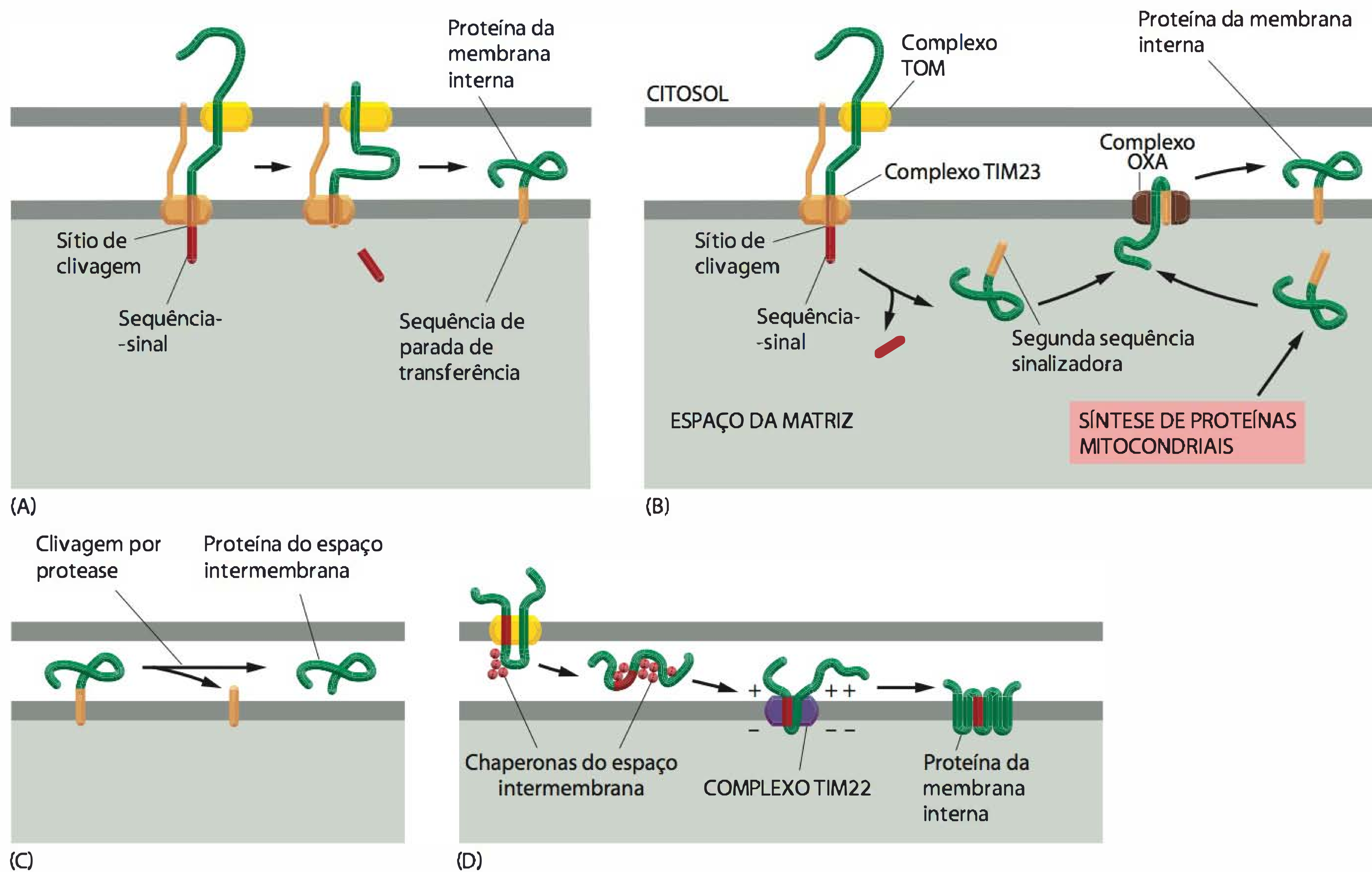


Figura 12-28 Importação de proteínas do citosol para a membrana mitocondrial interna ou para o espaço intermembrana. (A) A sequência-sinal N-terminal (*vermelho*) inicia a importação para o espaço da matriz (ver Figura 12-25). Uma sequência hidrofóbica (*laranja*) que direciona o sinal para a matriz liga-se ao translocador TIM23 na membrana interna e interrompe a translocação. O restante da proteína é impelido para o espaço intermembrana através do translocador TOM na membrana externa, e a sequência hidrofóbica é liberada para a membrana interna. (B) Uma segunda via de integração de proteínas na membrana interna primeiro entrega a proteína completa no espaço da matriz. A clivagem da sequência-sinal (*vermelho*) usada para a translocação inicial expõe uma sequência-sinal hidrofóbica adjacente (*laranja*) no novo N-terminal. Esse sinal dirige então a proteína para a membrana interna, usando a mesma via dependente de OXA, que insere proteínas que são codificadas pelo genoma de mitocôndrias e traduzidas no espaço da matriz. (C) Algumas proteínas solúveis do espaço intermembrana também podem utilizar as vias mostradas em (A) e (B) antes de serem liberadas no espaço intermembrana por uma segunda peptidase-sinal, que tem seu sítio ativo no espaço intermembrana e remove a sequência-sinal hidrofóbica. (D) Transportadores de metabólitos contêm sequências-sinal internas e enrolam-se no complexo TOM como uma alça. Eles ligam-se então a chaperonas no espaço intermembrana, guiando as proteínas ao complexo TIM22. O complexo TIM22 é especializado na inserção de proteínas de membrana interna em multipassos.

via de translocação mais comum, apenas a sequência-sinal na região N-terminal da proteína transportada realmente entra no espaço da matriz (**Figura 12-28**A). Uma sequência hidrofóbica de aminoácidos, colocada estrategicamente após a sequência- sinal N-terminal, atua como uma *sequência de parada*, prevenindo a translocação adicional através da membrana interna. O complexo TOM puxa o restante da proteína através da membrana externa no espaço intermembrana; a sequência-sinal é clivada na matriz; e a sequência hidrofóbica, liberada de TIM23, permanece ancorada na membrana interna.

Em outra via de transporte para a membrana interna ou o espaço intermembrana, o complexo TIM23 inicialmente transloca a proteína inteira para o espaço da matriz (Figura 12-28B). Uma vez que a sequência-sinal N-terminal foi removida pela peptidase-sinal da matriz, a sequência hidrofóbica permanece exposta no novo N-terminal. Essa sequência-sinal N-terminal guia a proteína para o complexo OXA, que insere a proteína na membrana interna (ver Figura 12-23). Como mencionado anteriormente, o complexo OXA é primeiramente utilizado para inserir proteínas codificadas e traduzidas na mitocôndria na membrana interna, e apenas poucas proteínas importadas usam essa via. Os translocadores fortemente relacionados ao complexo OXA são encontrados nas membranas plasmáticas de bactérias e em membranas tilacoides de cloroplastos, onde parecem auxiliar na inserção de proteínas de membrana por um mecanismo similar.

Muitas proteínas que usam essas vias para a membrana interna permanecem ancoradas nas vias por meio de suas sequências-sinal hidrofóbicas (ver Figura 12-28A e B). Outras, entretanto, são liberadas no espaço intermembrana por uma protease que remove a âncora da membrana (Figura 12-28C). Muitas dessas proteínas clivadas permanecem ligadas na superfície externa da membrana interna como subunidades periféricas de complexos proteicos que também contêm proteínas transmembrana.

As mitocôndrias são o principal sítio de síntese de ATP na célula, mas também contêm muitas enzimas metabólicas, como as do ciclo do ácido cítrico. Assim, além de proteínas, as mitocôndrias também devem transportar pequenos metabólitos através de suas membranas. Enquanto a membrana externa contém porinas que tornam a membrana livremente permeável a pequenas moléculas, a membrana interna não as contém. Em vez disso, o transporte de um grande número de pequenas moléculas através da membrana interna é mediado por uma família de proteínas transportadoras metabólito-específicas. Em células de levedura, essas proteínas transportadoras compreendem uma família de 35 proteínas diferentes, das quais as mais abundantes são aquelas que transportam ADP e ATP ou fosfato. Essas proteínas transportadoras da membrana interna são proteínas transmembrana de múltiplas passagens, que não apresentam sequências-sinal cliváveis na sua região N-terminal, mas em vez disso contêm sequências-sinal internas. Elas atravessam o complexo TOM na membrana externa e são guiadas por chaperonas do espaço intermembrana ao complexo TIM22, que as insere na membrana interna por meio de um processo que necessita de um potencial de membrana, mas não de Hsp70 ou ATP mitocondriais (Figura 12-28D). A partição energeticamente favorável das regiões hidrofóbicas transmembrana na membrana interna provavelmente auxilie a dirigir esse processo.

Duas sequências-sinal direcionam proteínas para a membrana tilacoidal em cloroplastos

O transporte de proteínas para **cloroplastos** assemelha-se ao transporte para mitocôndrias. Ambos os processos ocorrem pós-traducionalmente, utilizam complexos de translocação separados em cada membrana, necessitam de energia e usam sequências-sinal N-terminais anfifílicas que são removidas após a utilização. Com exceção de algumas moléculas chaperonas, no entanto, os componentes proteicos que formam os complexos de translocação são diferentes. Além disso, enquanto as mitocôndrias utilizam o gradiente eletroquímico de H^+ através da sua membrana interna para dirigir o transporte, os cloroplastos, que apresentam um gradiente eletroquímico de H^+ através de suas membranas tilacoidais, mas não em sua membrana interna, utilizam a hidrólise de GTP e de ATP para importação através da sua membrana dupla. As similaridades funcionais podem, portanto, ser resultado de evolução convergente, refletindo as necessidades comuns para a translocação através do sistema de membrana dupla.

Embora as sequências-sinal para a importação em cloroplastos assemelhem-se superficialmente àquelas para a importação em mitocôndrias, tanto as mitocôndrias como os cloroplastos estão presentes nas mesmas células vegetais e, assim, as proteínas devem escolher entre essas organelas apropriadamente. Em plantas, por exemplo, uma enzima bacteriana pode ser direcionada especificamente para mitocôndrias, se ela for ligada, de forma experimental, a uma sequência-sinal N-terminal de uma proteína mitocondrial; a mesma enzima, unida a uma sequência-sinal N-terminal de uma proteína de cloroplasto, acumula-se em cloroplastos. As diferentes sequências-sinal podem, portanto, ser distinguidas pelos receptores de importação em cada organela.

Os cloroplastos apresentam um compartimento extra envolto por membranas, o **tilacoide**. Muitas proteínas de cloroplastos, incluindo as subunidades proteicas do sistema fotossintético e da ATP-sintase (discutido no Capítulo 14), são localizadas na membrana tilacoidal. Assim como os precursores de algumas proteínas mitocondriais, essas proteínas precursoras são transportadas do citosol ao seu destino final em duas etapas. Primeiro, elas passam através da membrana dupla nos sítios especiais de contato para dentro do espaço da matriz (chamado de **estroma** nos cloroplastos) e então elas são translocadas para dentro da membrana tilacoidal ou para dentro do espaço do tilacoide (**Figura 12-29**A). Os precursores dessas proteínas possuem uma sequência-sinal tilacoidal hidrofóbica seguindo a sequência-sinal N-terminal do cloroplasto. Após a sequência-sinal N-terminal ter sido utilizada para importar a proteína no estroma, ela é removida por uma peptidase-sinal do estroma,

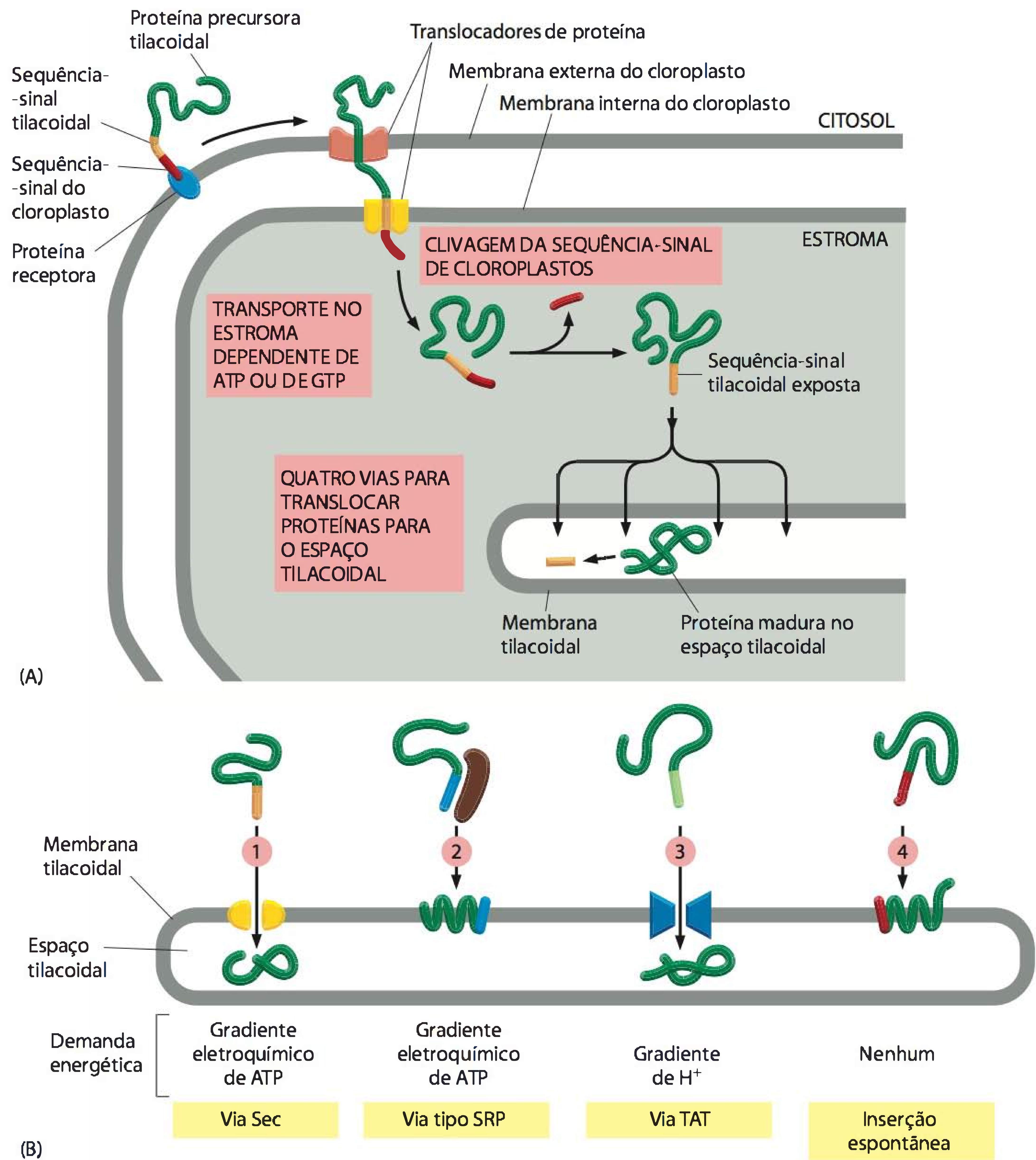


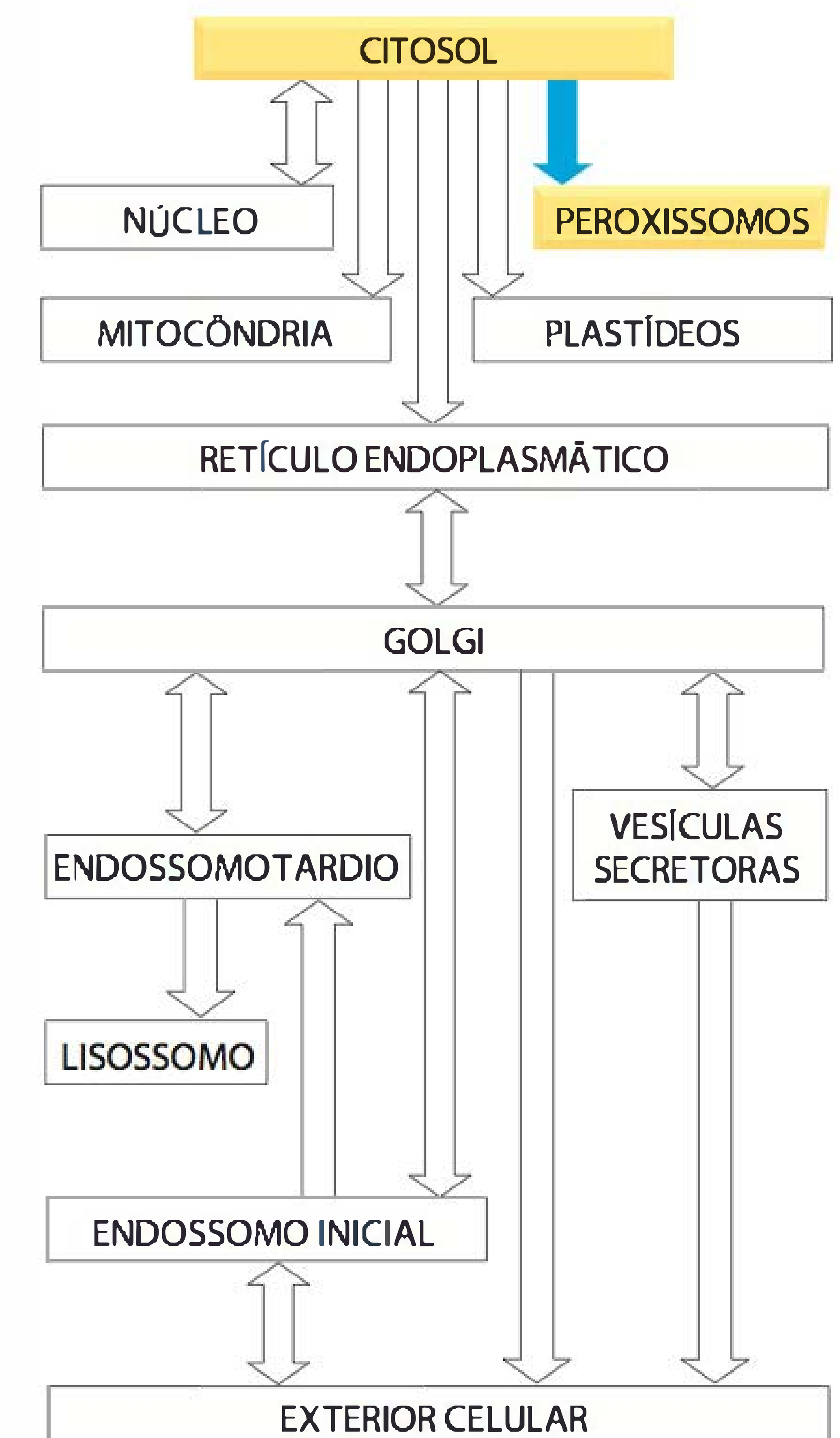
Figura 12-29 Translocação de uma proteína precursora no espaço tilacoidal de cloroplastos. (A) A proteína precursora contém uma sequência-sinal cloroplastídica N-terminal (*vermelho*) imediatamente seguida de uma sequência-sinal tilacoidal (*laranja*). A sequência-sinal cloroplastídica inicia a translocação ao estroma por meio de um sítio de contato da membrana por um mecanismo similar àquele utilizado para a translocação de proteínas precursoras mitocondriais ao espaço da matriz. A sequência-sinal é clivada, revelando a sequência-sinal tilacoidal, que inicia a translocação através da membrana tilacoidal. (B) A translocação para o espaço tilacoidal, ou membrana tilacoidal, pode ocorrer por uma de pelo menos quatro vias: (1) uma *via Sec*, assim chamada porque utiliza componentes que são homólogos de proteínas Sec, que medeiam a translocação de proteínas através da membrana plasmática bacteriana (discutido adiante), (2) uma *via do tipo SRP*, assim denominada porque utiliza uma partícula de reconhecimento de sinal homóloga de cloroplasto, ou SRP (do inglês, *signal recognition particle*) (discutido adiante), (3) uma *via TAT* (translocação de duas argininas, de *twin arginine translocation*), assim chamada porque duas argininas são críticas nas sequências-sinal que dirigem proteínas nessa via, a qual depende de um gradiente de H^+ através da membrana tilacoidal, e (4) uma *via de inserção espontânea*, que parece não necessitar de translocador de proteínas.

expondo a sequência-sinal tilacoidal que inicia, então, o transporte através da membrana do tilacoide. Existem pelo menos quatro vias pelas quais as proteínas atravessam ou tornam-se integradas na membrana tilacoidal, diferenciadas pelas suas necessidades por diferentes chaperonas do estroma ou pela fonte de energia utilizada (Figura 12-29B).

Resumo

Embora as mitocôndrias e os cloroplastos tenham seus próprios sistemas genéticos, eles produzem somente uma pequena porção de suas proteínas. As duas organelas importam do citosol a maioria das suas proteínas utilizando mecanismos semelhantes. Em ambos os casos, as proteínas são importadas no estado desenovelado através de ambas as membranas externa e interna simultaneamente para o espaço da matriz ou estroma. A hidrólise de ATP e um gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana interna dirigem a translocação para a mitocôndria, enquanto a translocação em cloroplastos é dirigida somente pela hidrólise de GTP e de ATP. As proteínas chaperonas da família Hsp70 citosólica mantêm as proteínas precursoras em um estado desenovelado, e um segundo conjunto de proteínas Hsp70 no espaço da matriz ou no estroma puxa a cadeia polipeptídica importada para a organela. Somente as proteínas que contêm uma sequência-sinal específica são translocadas. A sequência-sinal geralmente está localizada na região N-terminal e é clivada após ser importada ou internalizada e retida. Os transportes para a membrana interna algumas vezes usam uma segunda sequência-sinal hidrofóbica que é revelada quando a primeira sequência-sinal é removida. Em cloroplastos, a importação do estroma para o tilacoide pode ocorrer por várias vias, diferindo-se pelas chaperonas e pela fonte de energia usadas.

PEROXISSOMOS



Os **peroxissomos** diferem das mitocôndrias e dos cloroplastos em muitos aspectos. Mais notavelmente, eles são envolvidos por uma única membrana e não possuem DNA ou ribossomos. Por não serem dotados de genoma, todas as suas proteínas são codificadas no núcleo. Os peroxissomos obtêm muitas das suas proteínas por importação seletiva do citosol, embora algumas delas entrem na membrana dos peroxissomos por meio do RE.

Uma vez que não discutiremos os peroxissomos em outro local, consideraremos algumas das funções dessa família distinta de organelas, antes de discutir sua biossíntese. Todas as células eucarióticas possuem peroxissomos. Eles contêm enzimas oxidativas, como *catalase* e *urato-oxidase*, em concentrações tão elevadas que, em algumas células, os peroxissomos salientam-se em micrografias eletrônicas por causa da presença de um núcleo cristaloide (**Figura 12-30**).

Assim como as mitocôndrias, os peroxissomos são os principais sítios de utilização de oxigênio. Uma hipótese é que os peroxissomos sejam um vestígio de uma organela ancestral que realizava todo o metabolismo de oxigênio nos ancestrais primitivos das células eucarióticas. Quando o oxigênio produzido por bactérias fotossintéticas começou a se acumular na atmosfera, ele pode ter sido fortemente tóxico à maioria das células. Os peroxissomos podem ter servido para reduzir a concentração de oxigênio intracelular, enquanto também utilizavam sua reatividade química para fazer reações oxidativas úteis. De acordo com esse ponto de vista, o desenvolvimento posterior das mitocôndrias tornou os peroxissomos bastante obsoletos, porque muitas das mesmas reações – as quais foram inicialmente conduzidas nos peroxissomos sem produção de energia – foram agora acopladas com a formação de ATP, por meio da fosforilação oxidativa. As reações oxidativas realizadas pelos peroxissomos nas células atuais seriam, portanto, aquelas cujas funções importantes não foram incorporadas pelas mitocôndrias.

Os peroxissomos utilizam oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio para realizar reações oxidativas

Os peroxissomos são assim denominados porque possuem, geralmente, uma ou mais enzimas que utilizam oxigênio molecular para remover átomos de hidrogênio de substratos orgânicos específicos (designados aqui como R) em uma reação oxidativa que produz *peróxido de hidrogênio* (H_2O_2):



$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

A *catalase* utiliza o H_2O_2 gerado por outras enzimas na organela para oxidar uma variedade de outros substratos – incluindo fenóis, ácido fórmico, formaldeído e álcool – pela reação "peroxidativa": $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$. Esse tipo de reação oxidativa é particularmente importante nas células do fígado e do rim, nas quais os peroxissomos destoxificam várias moléculas tóxicas que entram na corrente sanguínea. Cerca de 25% do etanol que bebemos é oxidado a acetaldeído dessa forma. Além disso, quando um excesso de H_2O_2 acumula-se na célula, a catalase o converte em H_2O por meio da reação:



$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

A principal função das reações oxidativas realizadas nos peroxissomos é a quebra de moléculas de ácido graxo. O processo denominado *oxidação β* encurta as cadeias alquil dos ácidos graxos sequencialmente em blocos de dois átomos de carbono por vez, dessa forma convertendo os ácidos graxos em acetil-CoA (Acetil-coenzima A). Os peroxissomos exportam então acetil-CoA ao citosol para reutilizá-la em reações biossintéticas. Nas células de mamíferos, a oxidação β ocorre nas mitocôndrias e nos peroxissomos; em leveduras e nas células vegetais, entretanto, essa reação essencial ocorre exclusivamente nos peroxissomos.

Uma função biossintética essencial dos peroxissomos animais é catalisar as primeiras reações na formação de *plasmalogênios*, que são a classe mais abundante de fosfolipídeos na mielina (**Figura 12-31**). A deficiência de plasmalogênios causa anomalias profundas na mielinização dos axônios das células nervosas, sendo esta uma das razões por que muitas desordens peroxissomais levam a doenças neurológicas.

Os peroxissomos são organelas de grande diversidade e, mesmo em vários tipos celulares de um único organismo, podem conter diferentes conjuntos de enzimas. Eles também podem adaptar-se de forma notável a mudanças de condições. As células de levedura crescidas em açúcar, por exemplo, têm peroxissomos pequenos. Contudo, quando algumas leve-

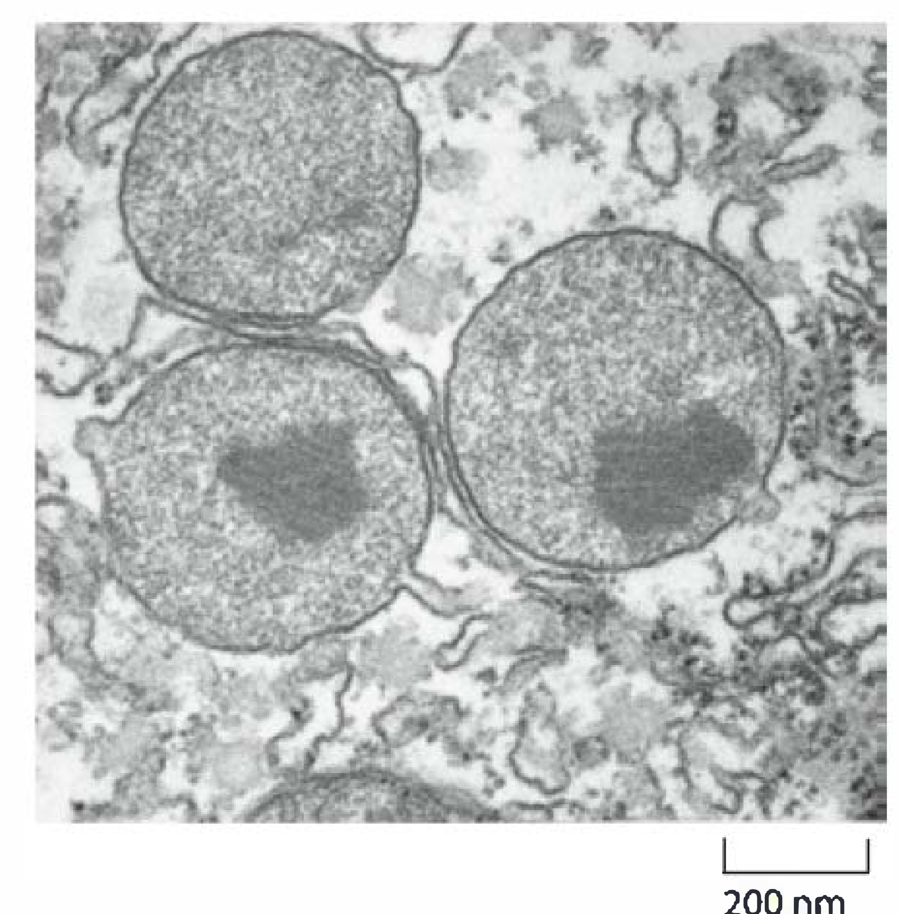


Figura 12-30 Micrografia eletrônica de três peroxissomos em uma célula de fígado de rato. As inclusões paracristalinas eletrodensas são compostas da enzima urato-oxidase. (Cortesia de Daniel S.Friend.)

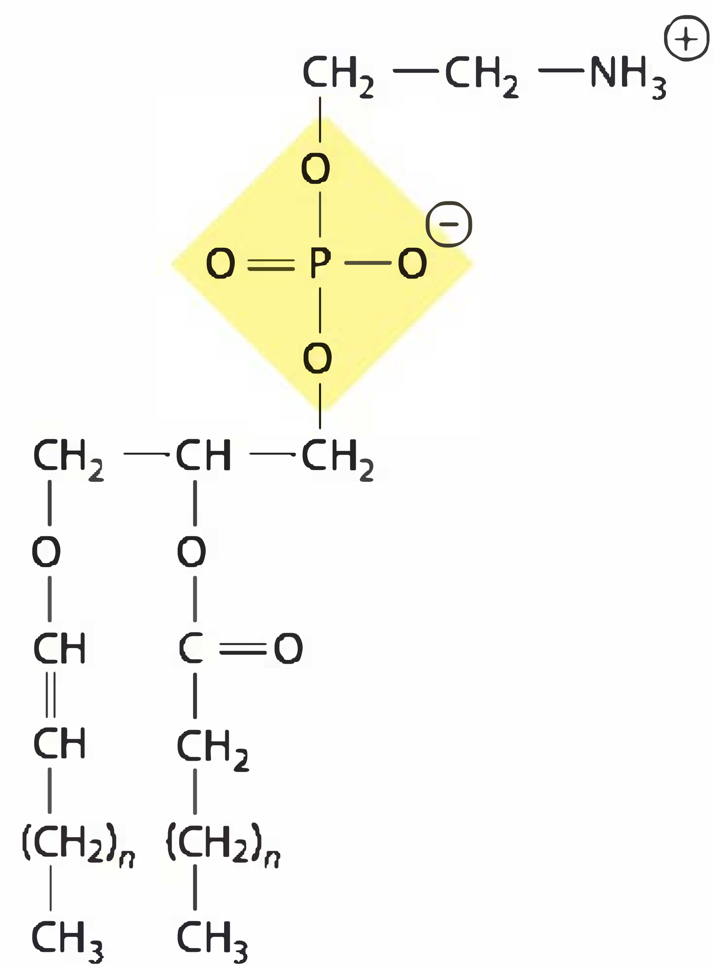


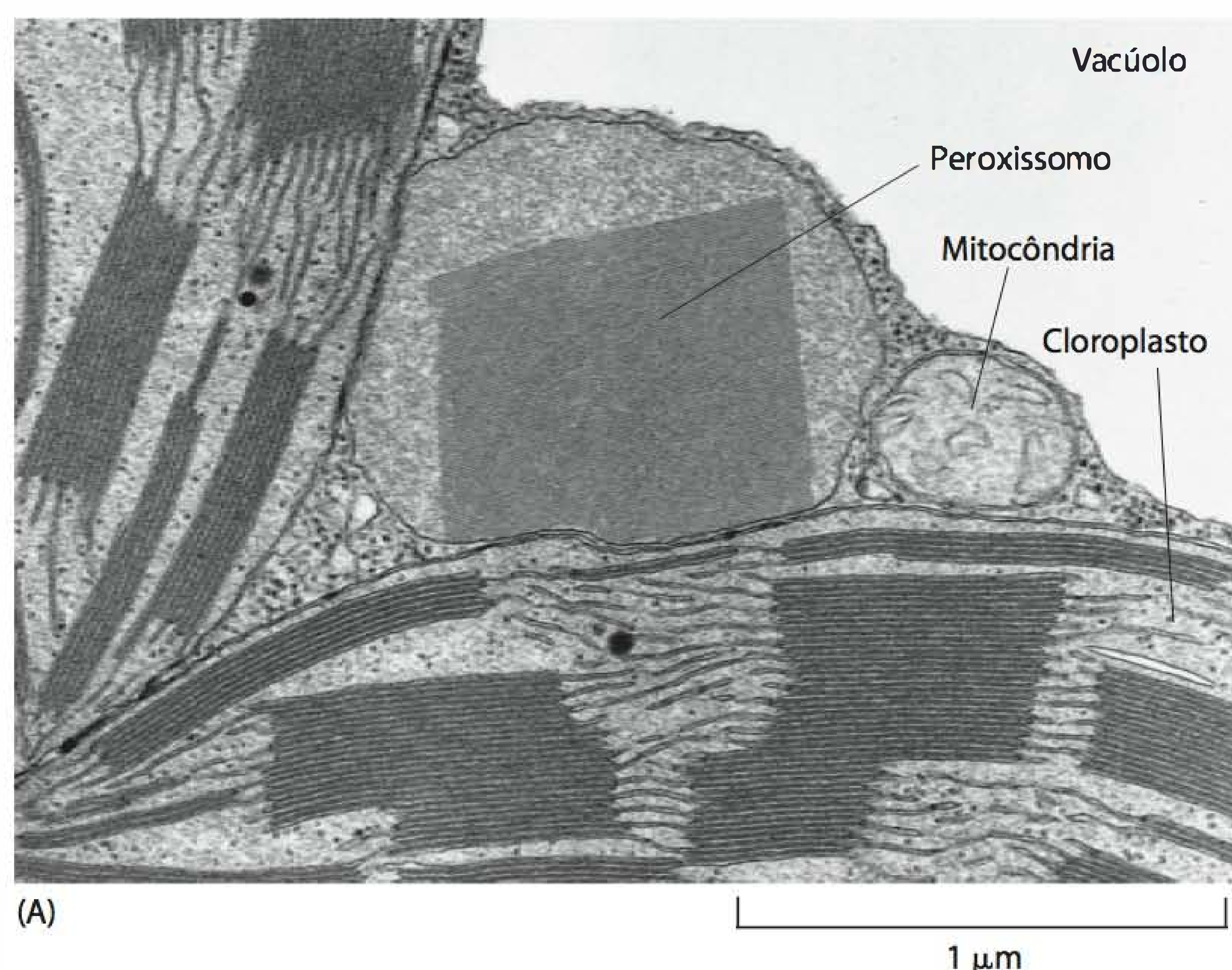
Figura 12-31 Estrutura de um plasmalogênio. Os plasmalogênios são bastante abundantes nas bainhas de mielina que envolvem os axônios das células nervosas. Eles correspondem a cerca de 80 a 90% dos fosfolipídeos da membrana de mielina. Além de um grupo da cabeça de etanolamina e um ácido graxo de cadeia longa ligado ao mesmo esqueleto glicerol fosfato utilizado para fosfolipídeos, os plasmalogênios contêm um álcool graxo pouco comum que está ligado por uma ligação éter (*parte inferior à esquerda*).

duras crescem em metanol, elas desenvolvem peroxissomos grandes que oxidam o metanol; e quando crescem em ácidos graxos, desenvolvem grandes peroxissomos que quebram ácidos graxos à acetil-CoA por oxidação β.

Os peroxissomos são importantes também em plantas. Dois tipos de peroxissomos de plantas têm sido extensivamente estudados. Um tipo está presente nas folhas, onde participa na *fotorrespiração* (discutido no Capítulo 14) (**Figura 12-32A**). O outro tipo de peroxissomo está presente em sementes em germinação, nas quais convertem os ácidos graxos armazenados em sementes oleaginosas em açúcares necessários ao crescimento da planta jovem. Pelo fato dessa conversão de gorduras em açúcares ser realizada por uma série de reações conhecidas como o *ciclo glioxilato*, esses peroxissomos também são chamados de *glioxissomos* (Figura 12-32B). No ciclo glioxilato, duas moléculas de acetil-CoA produzidas por quebra do ácido graxo no peroxissomo são utilizadas para a síntese de ácido succínico, que é liberado do peroxissomo e convertido em glicose no citosol. O ciclo glioxilato não ocorre em células animais; portanto, os animais são incapazes de converter ácidos graxos de gorduras em carboidratos.

Uma sequência-sinal curta direciona a importação de proteínas aos peroxissomos

Uma sequência específica de três aminoácidos (Ser-Lys-Leu) localizados na região C-terminal de muitas proteínas dos peroxissomos atua como um sinal de importação (ver Tabela 12-3, p. 702). Outras proteínas peroxissomais contêm uma sequência-sinal próxima à região N-terminal. Se uma dessas sequências está ligada a uma proteína citosólica, a proteína é importada para peroxissomos. O processo de importação ainda é pouco entendido, embora saiba-se do envolvimento de proteínas receptoras solúveis no citosol que reconhecem os sinais-alvo, assim como de proteínas de acoplamento na superfície citosólica dos peroxissomos. Pelo menos 23 proteínas distintas, chamadas de **peroxinas**, participam no processo de importação, que é movido por hidrólise de ATP. Um complexo de pelo menos seis diferentes peroxinas forma um translocador de membrana. As proteínas oligoméricas não necessitam se desenovelar para serem importadas pelos peroxissomos, indicando que o mecanismo é distinto daquele utilizado pelas mitocôndrias e pelos cloroplastos. Ao menos um receptor de importação solúvel, a peroxina Pex5, acompanha sua carga até o interior dos peroxissomos e, após a liberação da carga, retorna ao citosol. Esses aspectos de importação de proteínas peroxissomais assemelham-se ao transporte de proteínas para o núcleo.



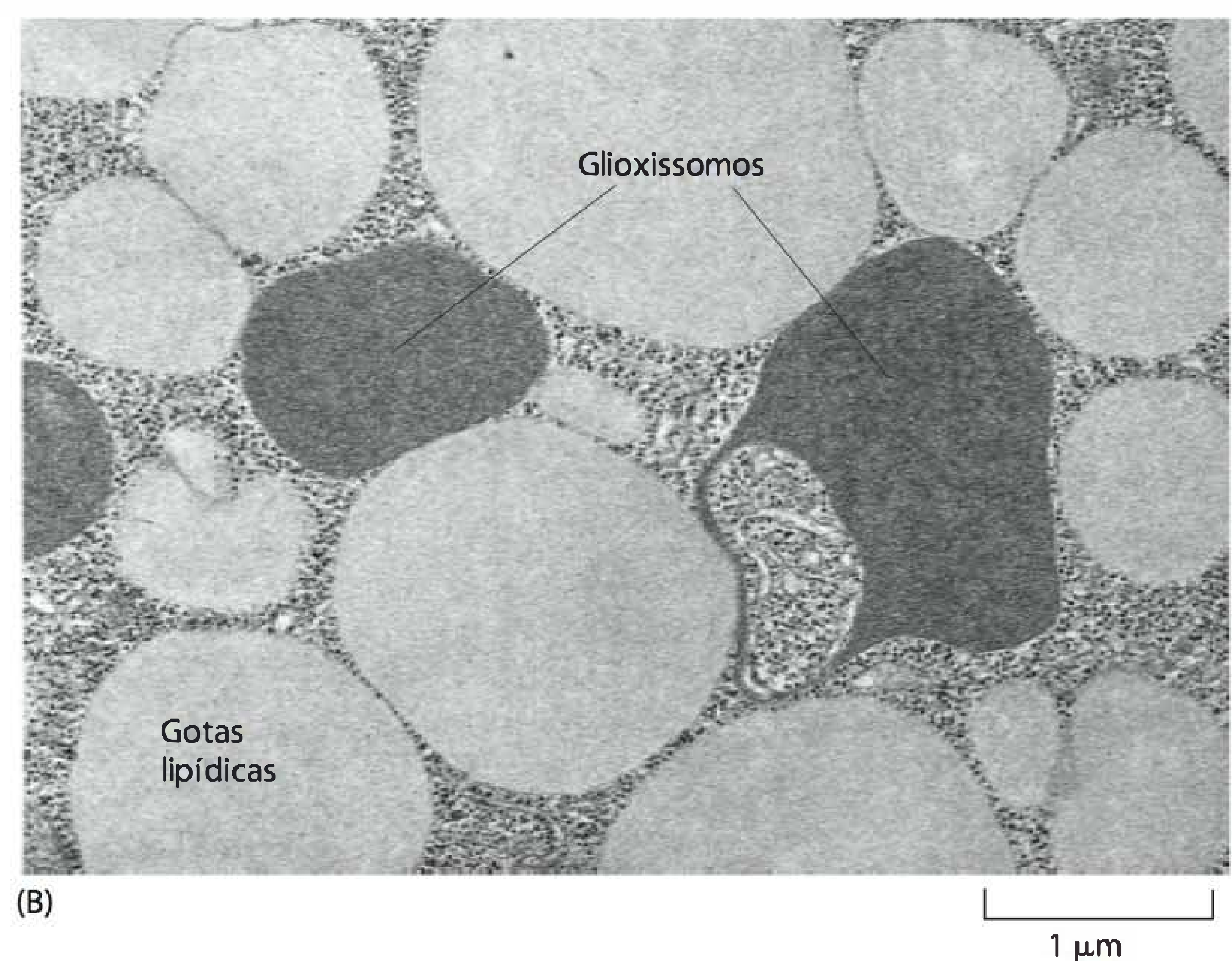


Figura 12-32 Micrografias eletrônicas de dois tipos de peroxissomos encontrados em células vegetais. (A) Um peroxissomo com um núcleo paracristalino em uma célula do mesófilo de folha de tabaco. Sua próxima associação com cloroplastos parece facilitar a troca de materiais entre essas organelas durante a fotorrespiração. (B) Peroxissomos em uma célula cotiledonar armazenadora de gordura de semente de tomate, quatro dias após a germinação. Aqui, os peroxissomos (glioxissomos) estão associados a gotas de lipídeos que armazenam gordura, refletindo seu papel central na mobilização de gorduras e na gliconeogênese durante a germinação de sementes. (A, De S. E. Frederick e E. H. Newcomb, *J. Cell Biol.* 43:343-353, 1969. Com permissão de The Rockefeller Press; B, de W.P. Wergin, P. J. Gruber e E. H. Newcomb, *J. Ultrastruct. Res.* 30:533-557, 1970. Com permissão da Academic Press.)

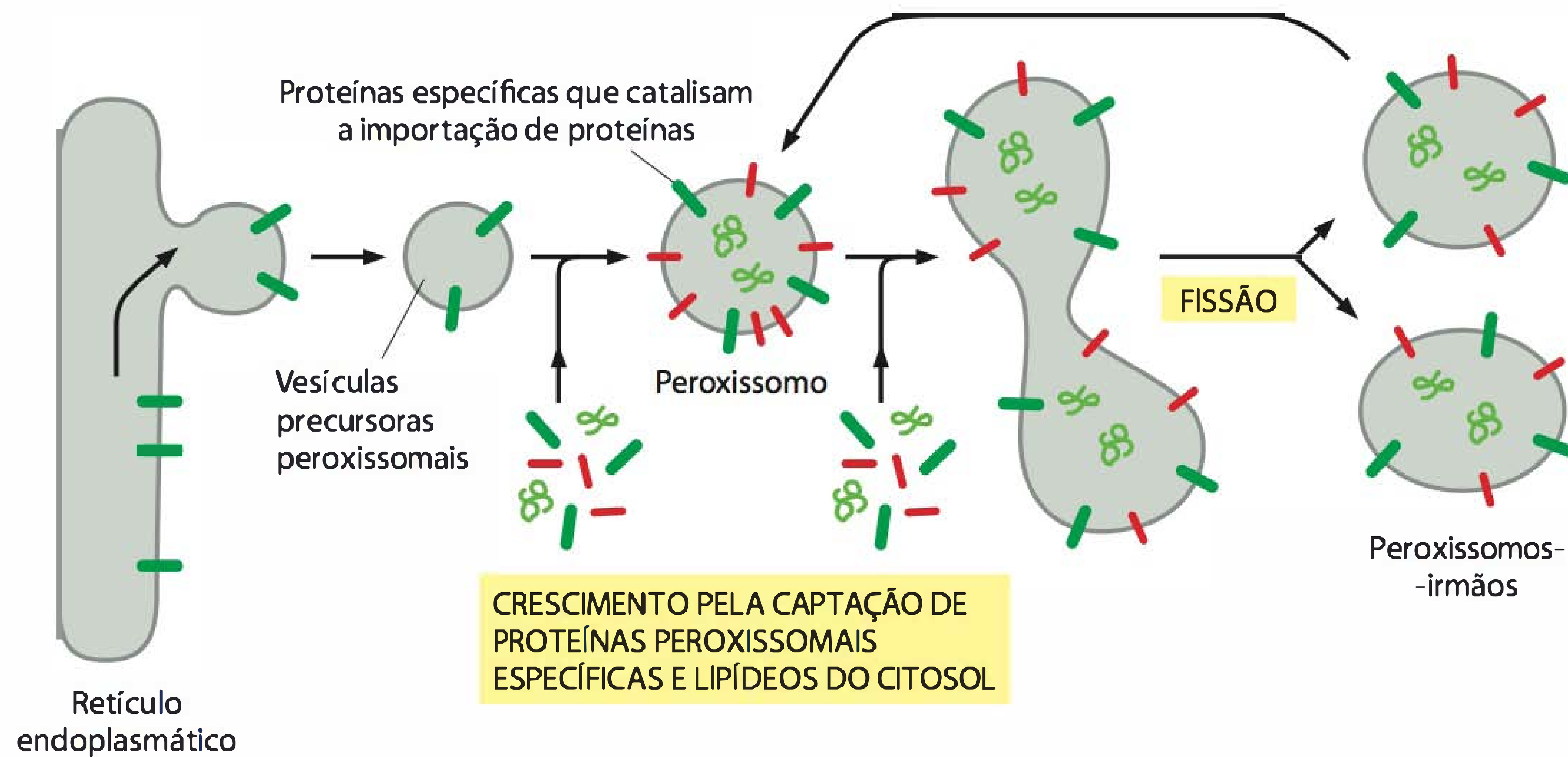


Figura 12-33 Um modelo explica como os peroxissomos proliferam e como novos podem se formar. Acredita-se que vesículas precursoras do peroxissomo originaram-se do RE. A maquinaria que dirige a reação de proliferação e que seleciona apenas proteínas peroxissomais para empacotar nessas vesículas – e não proteínas do RE ou proteínas destinadas a outras localizações na célula – ainda é desconhecida. Vesículas precursoras de peroxissomos podem então fusionar-se com outras ou com peroxissomos preexistentes. Membranas de peroxissomos contêm proteínas receptoras importantes. Ribossomos citosólicos sintetizam proteínas peroxissomais, incluindo novas cópias do receptor de importação, e então as importam para a organela. Provavelmente, os lipídeos necessários ao crescimento também sejam importados, embora alguns possam derivar-se diretamente do RE na membrana de vesículas precursoras de peroxissomos. (Discutiremos mais adiante o transporte de lipídeos feito no RE através do citosol para outras organelas.)

A importância dos peroxissomos e desse processo de importação está demonstrada na *síndrome de Zellweger*, uma doença humana herdada na qual um defeito na importação de proteínas para os peroxissomos leva a uma deficiência peroxissomal grave. Esses indivíduos, cujas células contêm peroxissomos "vazios", apresentam graves anomalias no cérebro, no fígado e nos rins, e morrem logo após o nascimento. Uma variante dessa doença foi mostrada como resultante de uma mutação no gene que codifica uma proteína integral de membrana do peroxissomo, a peroxina Pex2, envolvida na importação de proteínas. Uma doença peroxissomal herdada moderada é causada por um receptor defectivo para o sinal N-terminal de importação.

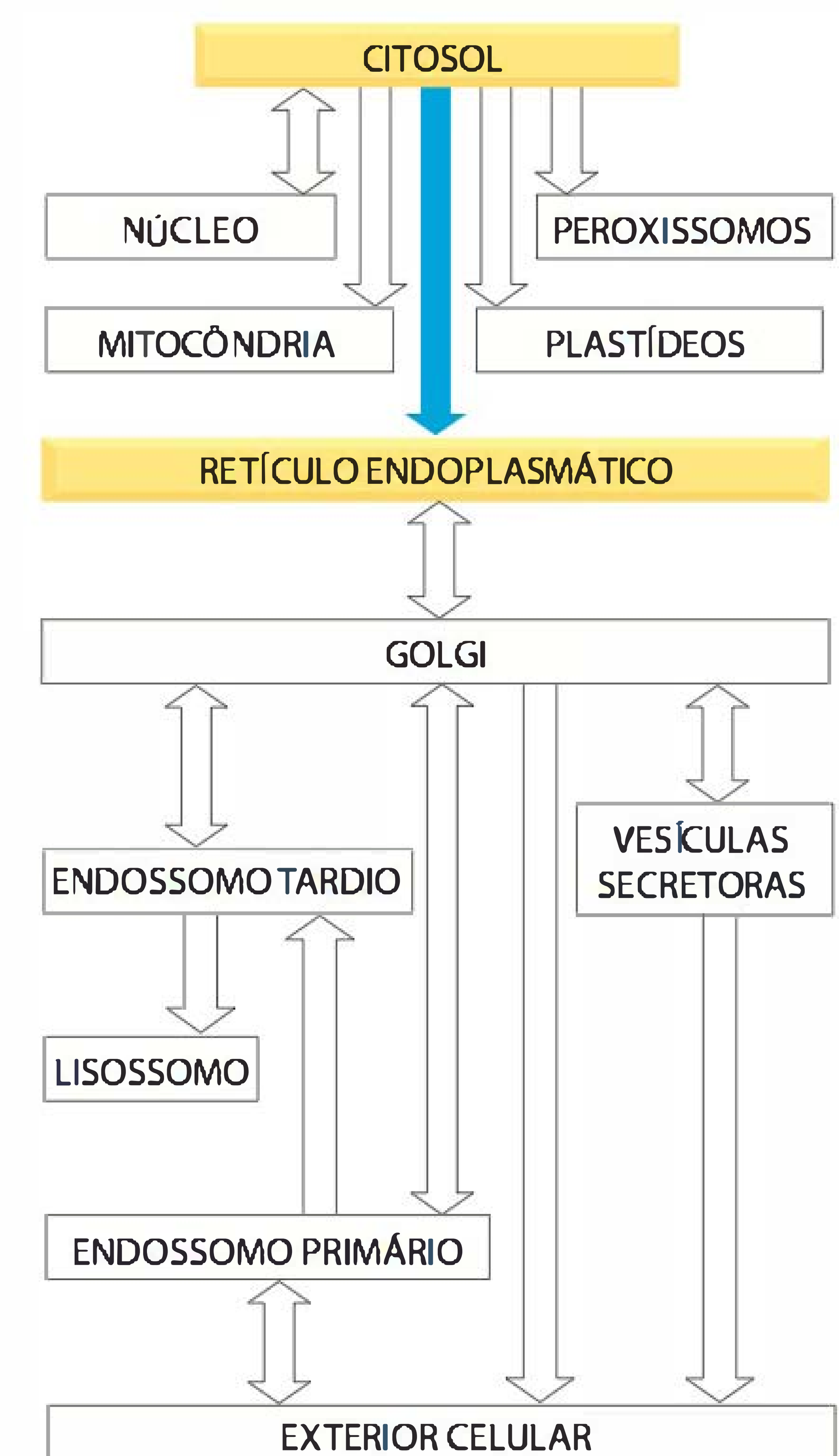
Há muito se discute se novos peroxissomos originam-se de outros preexistentes por crescimento e fissão da organela – e então se replicam de uma maneira autônoma, como mencionado anteriormente para mitocôndria e plastídeos – ou derivam-se como um compartimento especializado do RE. Aspectos de ambos os pontos de vista podem ser verdadeiros (**Figura 12-33**). A maioria das proteínas de membrana peroxissomais é sintetizada no citosol e então inserida na membrana de peroxissomos preexistentes, ainda que outras sejam primeiramente integradas na membrana do RE, de onde podem originar-se vesículas precursoras peroxissomais especializadas. Novas vesículas precursoras podem então fusionar-se umas às outras e começar a importação de proteínas peroxissomais adicionais, usando sua própria maquinaria de importação para tornar-se peroxissomos maduros, os quais podem entrar no ciclo de crescimento e fissão.

Resumo

Peroxissomos são especializados em promover reações de oxidação usando oxigênio molecular. Eles geram peróxido de hidrogênio, que é empregado em reações oxidativas – e contém catalases para destruir o excesso. Como mitocôndrias e plastídeos, os peroxissomos são organelas autorreplicativas. Pelo fato de não conterem DNA ou ribossomos, portanto, toda sua proteína é codificada no núcleo da célula. Algumas dessas proteínas são transportadas para os peroxissomos por meio do RE, mas a maioria é sintetizada no citosol. Uma sequência específica de três aminoácidos próxima à região C-terminal de muitas proteínas citosólicas funciona como um sinal de importação peroxissomal. O mecanismo de importação de proteínas difere daquele de mitocôndrias e cloroplastos, no qual mesmo proteínas oligoméricas são importadas do citosol sem estarem desenoveladas.

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Todas as células eucarióticas possuem um **retículo endoplasmático (RE)**. Sua membrana tipicamente constitui mais que a metade da membrana total de uma célula animal (ver Tabela 12-2, p. 697). O RE está organizado em um labirinto de túbulos ramificados e de vesículas achatadas que se estendem através do citosol (**Figura 12-34**). Os túbulos e as vesículas interconectam-se, e suas membranas são contínuas com a membrana nuclear externa. Dessa forma, o RE e as membranas nucleares formam uma folha contínua envolvendo o espaço interno único, chamado de **lúmen do RE** ou *espaço cisternal do RE*, que geralmente ocupa mais de 10% do volume celular total (ver Tabela 12-1, p. 697).



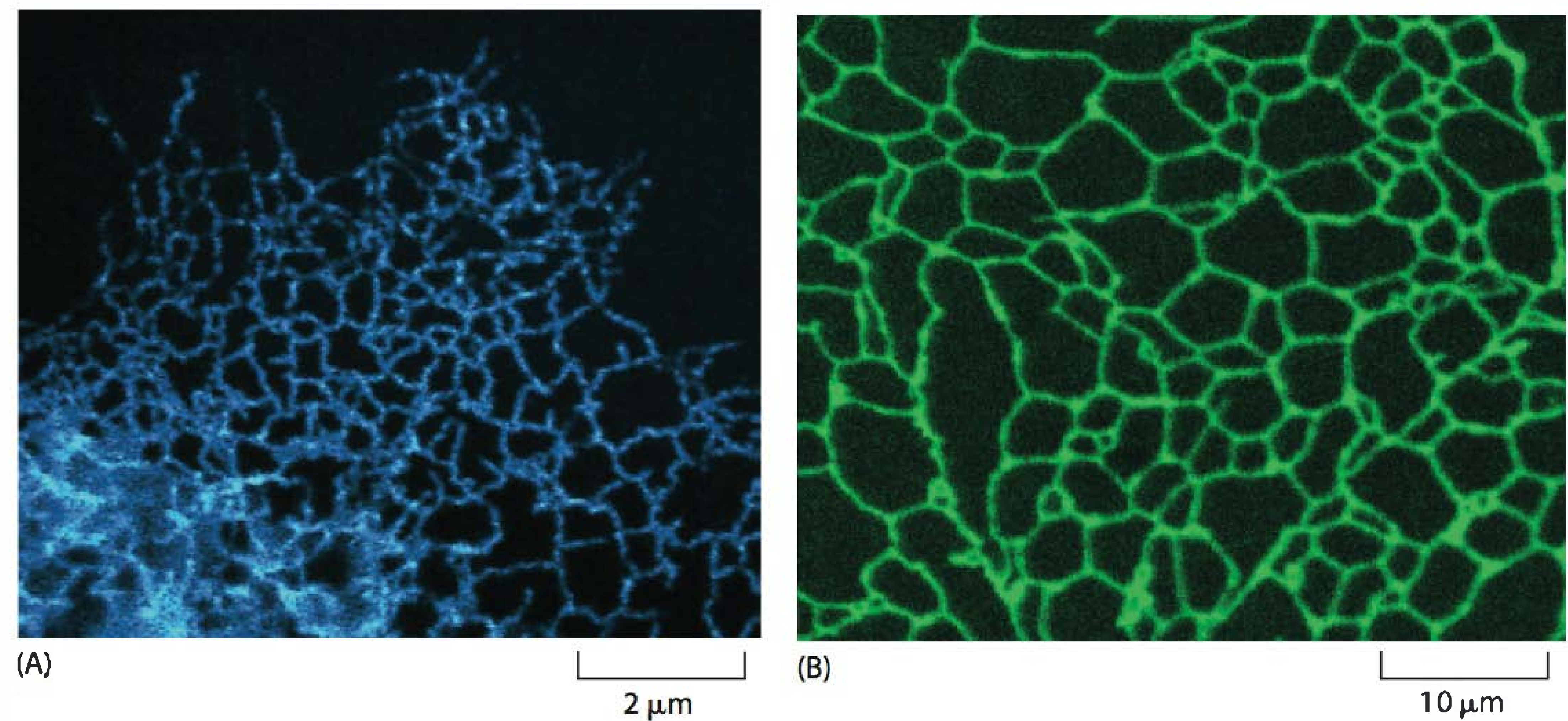


Figura 12-34 Micrografias fluorescentes do retículo endoplasmático. (A) Parte da rede do RE em uma cultura de células de mamífero, corada com um anticorpo que reconhece uma proteína retida no RE. O RE estende-se como uma rede através de todo o citosol, de tal forma que todas as regiões do citosol estão próximas a alguma porção da membrana do RE. (B) Parte de uma rede do RE em uma célula vegetal viva geneticamente modificada para expressar uma proteína fluorescente no RE. (A, cortesia de Hugh Pelham; B, cortesia de Petra Boevink e Chris Hawes.)

O RE tem um papel central na biossíntese de lipídeos e de proteínas, servindo também como fonte de armazenamento intracelular de Ca^{2+}, que é usado em muitas células na sinalização de respostas (discutido no Capítulo 15). A membrana do RE é o sítio de produção de todas as proteínas transmembrana e lipídeos para a maioria das organelas celulares, incluindo o próprio RE, o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos, as vesículas secretoras e a membrana plasmática. A membrana do RE também produz a maioria dos lipídeos para membranas mitocondriais e peroxissomais. Além disso, quase todas as proteínas que serão secretadas para o exterior celular – acompanhadas daquelas destinadas ao lúmen do RE, ao aparelho de Golgi ou aos lisossomos – são destinadas inicialmente ao lúmen do RE.

O retículo endoplasmático é estrutural e funcionalmente diverso

Enquanto as várias funções do RE são essenciais para cada célula, suas importâncias relativas variam muito entre tipos celulares individuais. Para encontrar demandas funcionais diferentes, regiões diferentes de RE tornam-se altamente especializadas. Observa-se tal especialização funcional como mudanças dramáticas na estrutura do RE, e diferentes tipos celulares podem, portanto, possuir caracteristicamente diversos tipos de membrana do RE. Uma das especializações mais notáveis é o *RE rugoso*.

Células de mamíferos começam a importação de proteínas para o RE antes da síntese completa da cadeia polipeptídica – isto é, a importação é um processo **cotraducional** (**Figura 12-35**A). Em contraste, a importação de proteínas nas mitocôndrias, nos cloroplastos, no núcleo e nos peroxissomos é um processo **pós-traducional** (Figura 12-35B). No transporte cotraducional, o ribossomo que está sintetizando a proteína está diretamente aderido à membrana do RE, permitindo que uma ponta da proteína seja translocada para o RE enquanto o resto da cadeia polipeptídica está sendo montado. Esses ribossomos ligados à membrana cobrem a superfície do RE, criando regiões denominadas **retículo endoplasmático rugoso**, ou **RE rugoso** (**Figura 12-36**A).

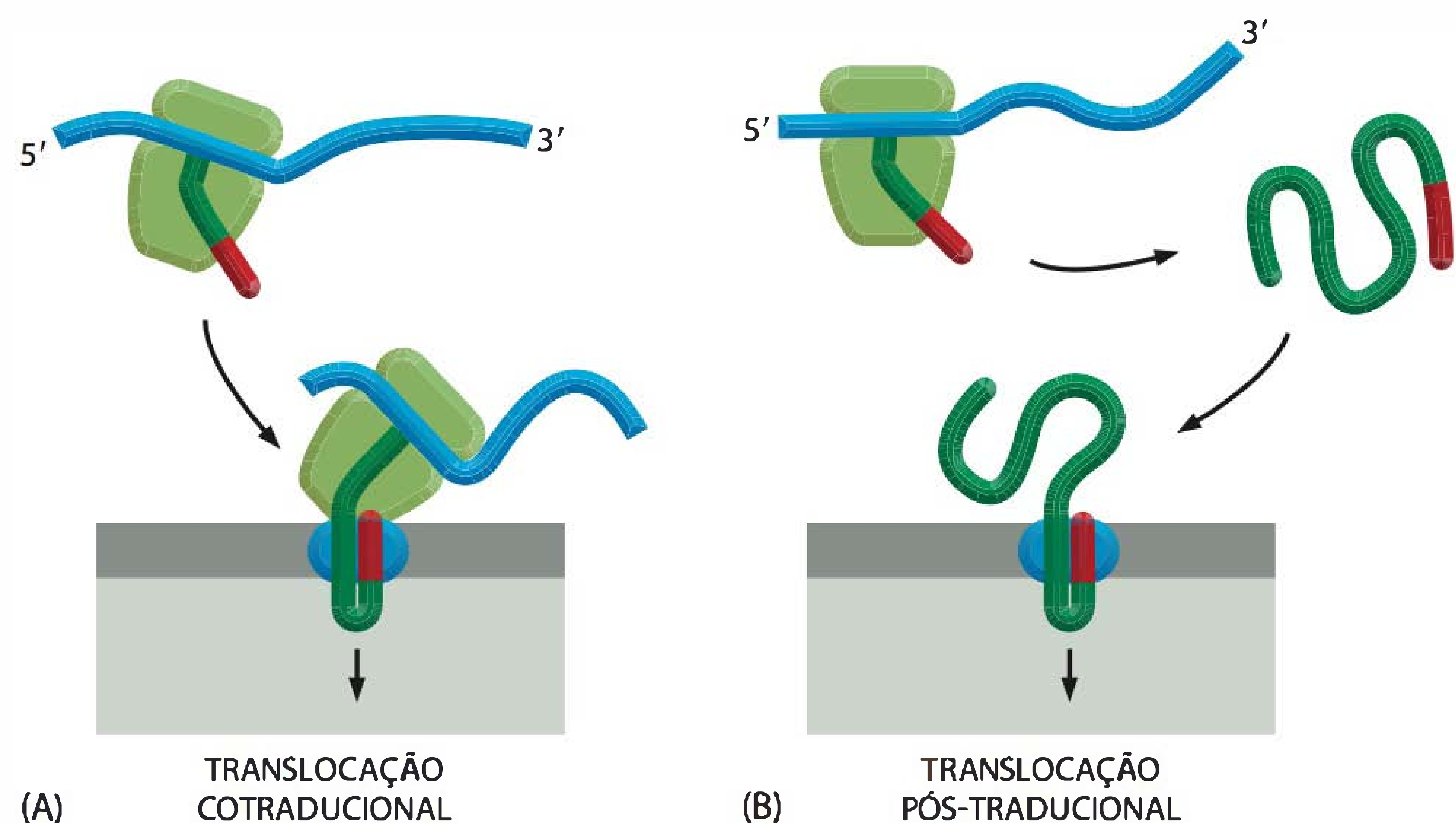
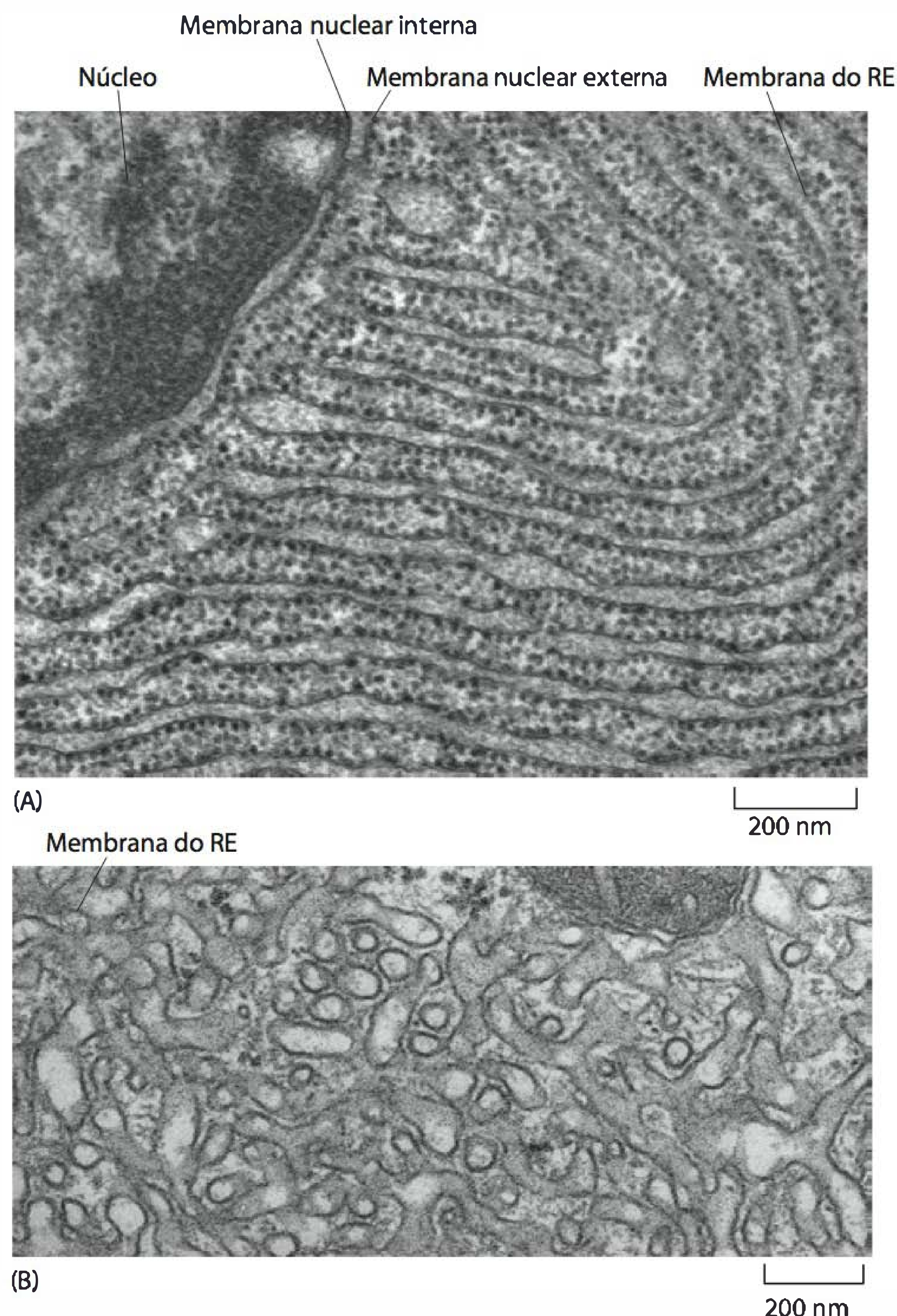


Figura 12-35 Translocação de proteínas cotraducional e pós-traducional. (A) Os ribossomos ligam-se à membrana do RE durante a translocação cotraducional. (B) Em contraste, os ribossomos completam a síntese de proteínas e as liberam antes da translocação pós-traducional.



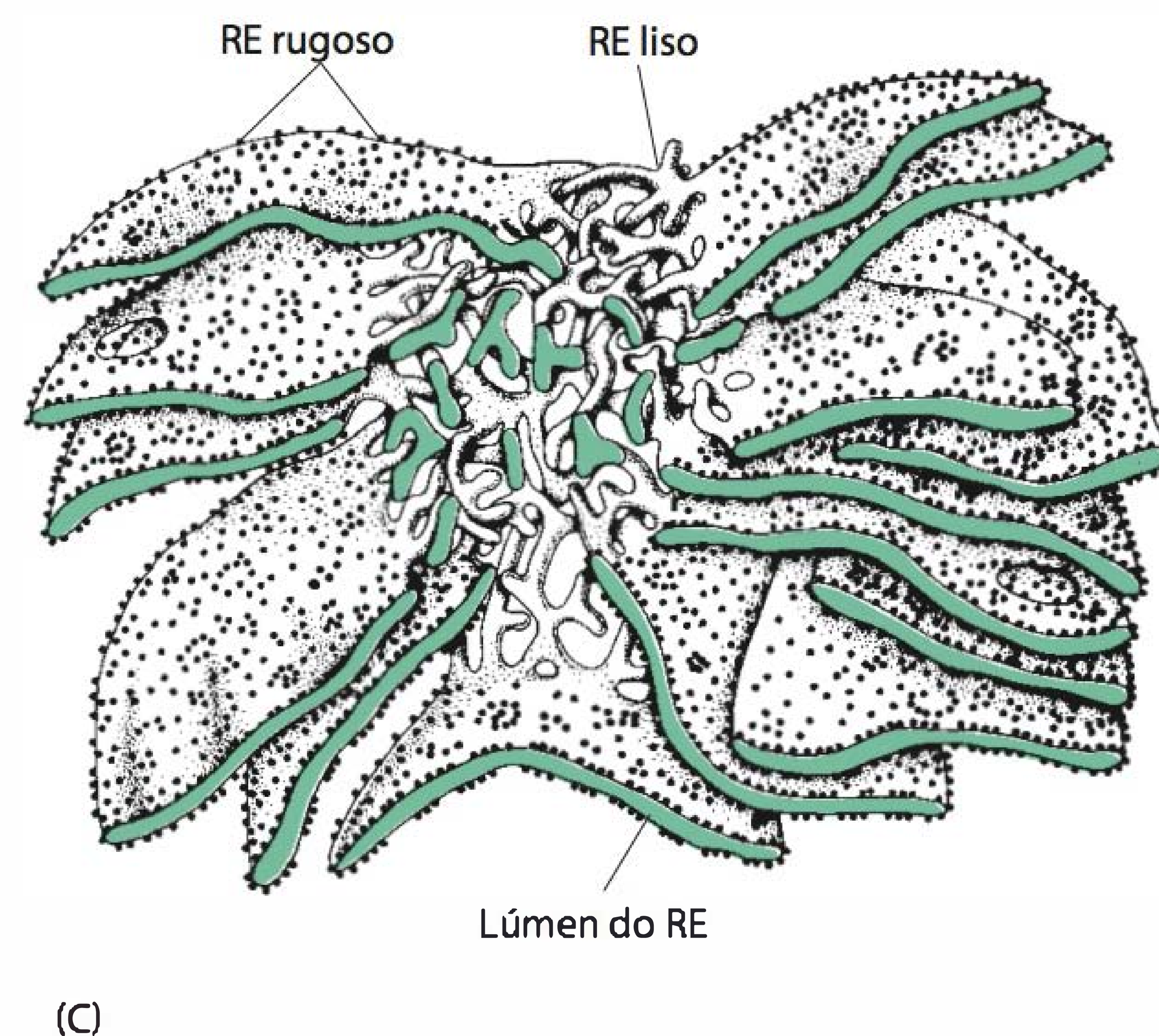


Figura 12-36 RE rugoso e liso. (A) Uma micrografia eletrônica de um RE rugoso em uma célula pancreática exócrina que diariamente produz e secreta grandes quantidades de enzimas digestivas. O citosol está preenchido com camadas empacotadas de membranas de RE ornadas com ribossomos. Em cima e à esquerda está mostrada uma porção do núcleo e seu envelope nuclear; note que a membrana nuclear externa, que é contínua com o RE, também está ornada com ribossomos. (B) RE liso abundante em uma célula secretora de hormônio esteroide. Esta micrografia eletrônica é de uma célula de Leydig secretora de testosterona em testículo humano. (C) Uma reconstrução tridimensional de uma região do RE liso e RE rugoso em uma célula de fígado. O RE rugoso forma pilhas orientadas de cisternas achatadas, cada uma possuindo um espaço luminal de 20 a 30 nm. A membrana do RE liso está connectada a estas cisternas e forma uma fina rede de túbulos de 30 a 60 nm de diâmetro. (A, cortesia de Lelio Orci; B, cortesia de Daniel S. Friend; C, de R. V. Krsti, Ultraestrutura da Célula de Mamífero. New York: Springer-Verlag, 1979.)

As regiões do RE que não possuem os ribossomos aderidos à membrana são denominadas **retículo endoplasmático liso**, ou **RE liso**. A grande maioria das células possui regiões limitadas de RE liso, e o RE é com frequência parcialmente liso e parcialmente rugoso. Áreas de RE liso a partir das quais vesículas carregando proteínas recém-sintetizadas e lipídeos se desprendem para transporte até o aparelho de Golgi são chamadas de *RE transicional*. Elas são proeminentes, por exemplo, em células que se especializam no metabolismo de lipídeos, como células que sintetizam hormônios esteroides a partir do colesterol; o RE liso expandido acomoda as enzimas necessárias à síntese do colesterol e o modificam a fim de formar os hormônios (Figura 12-36B).

O principal tipo celular no fígado, o *hepatócito*, também possui um RE liso abundante. Ele é o principal sítio de produção de *partículas de lipoproteína*, que carregam lipídeos às outras partes do corpo via corrente sanguínea. As enzimas que sintetizam os componentes lipídicos das lipoproteínas estão localizadas na membrana do RE liso, a qual também contém enzimas que catalisam uma série de reações para destoxificar substâncias lipossolúveis e vários compostos danosos produzidos pelo metabolismo. As *reações de destoxificação* mais extensivamente estudadas são realizadas pela família de enzimas *citocromo P450*, que catalisam uma série de reações nas quais substâncias insolúveis em água, ou metabólitos que, de outra forma, poderiam ser acumulados em níveis tóxicos nas membranas celulares, são transformadas em solúveis em água o suficiente para deixarem a célula e serem excretadas na urina. Uma vez que o RE rugoso sozinho não pode conter quantidades suficientes dessas e de outras enzimas necessárias, uma grande porção de membrana em um hepatócito normalmente consiste em RE liso (Figura 12-36C; ver Tabela 12-2).

Outra função crucial do RE na maioria das células eucarióticas é sequestrar Ca^{2+} do citosol. A liberação de Ca^{2+} do RE para o citosol e sua subsequente recaptação estão envolvidas em muitas respostas rápidas a sinais extracelulares, como discutido no Capítulo 15. A bomba de Ca^{2+} transporta Ca^{2+} do citosol para o lúmen do RE. O armazenamento de Ca^{2+} no lúmen do RE é facilitado pelas altas concentrações de proteínas que se ligam a Ca^{2+} lá existentes. As

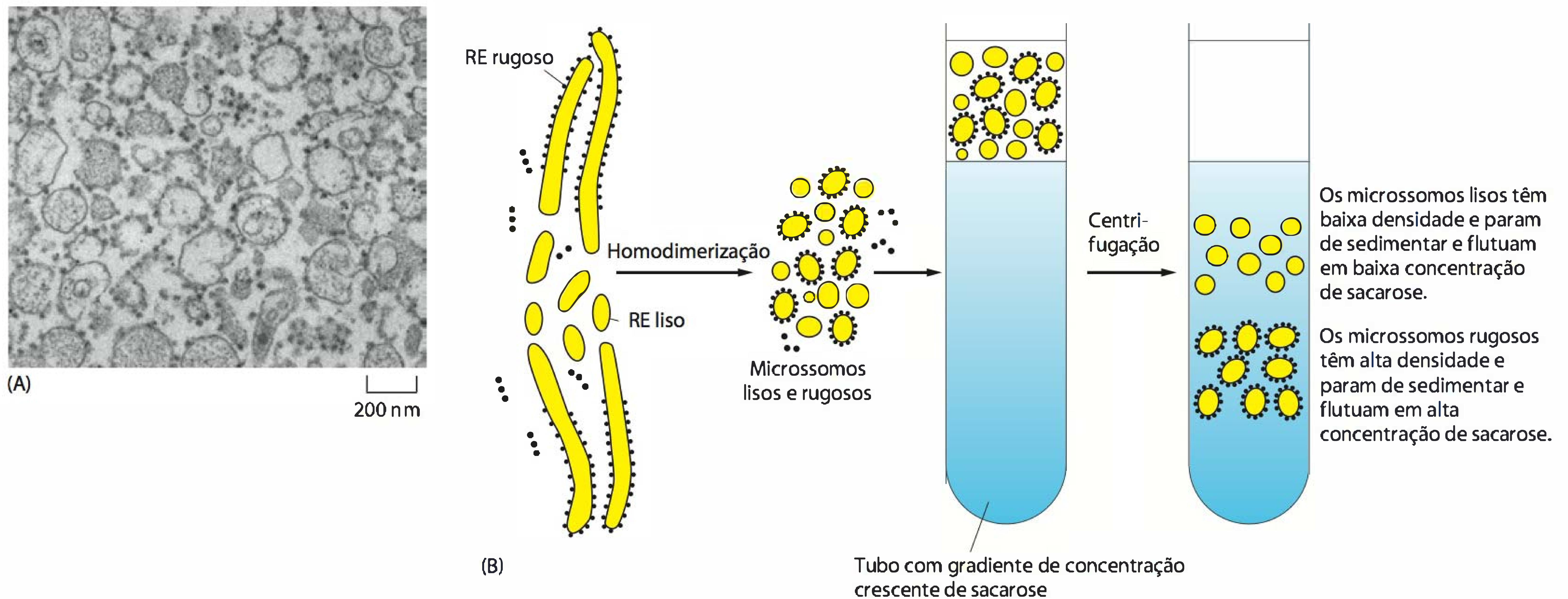


Figura 12-37 Isolamento dos microssomos rugosos e lisos do RE. (A) Uma micrografia eletrônica de secção fina de uma fração purificada do RE rugoso revela abundância de vesículas contendo ribossomos. (B) Quando sedimentados por meio de um gradiente de sacarose, os dois tipos de microssomos separam-se um do outro, de acordo com suas diferentes densidades. (A, cortesia de George Palade.)

células musculares possuem um abundante RE liso modificado, denominado *retículo sarcoplasmático*. A liberação e a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático disparam uma contração e o relaxamento, respectivamente, das miofibrilas, durante cada movimento da contração muscular (discutido no Capítulo 16).

Para estudar as funções e a bioquímica do RE, é necessário isolar sua membrana. Isso pode parecer uma tarefa inexequível, porque o RE é entremeado de forma intrincada com outros componentes do citosol. Felizmente, quando os tecidos ou as células são rompidos por homogeneização, o RE quebra-se em fragmentos e recompõe-se na forma de muitas pequenas vesículas (~100 a 200 nm de diâmetro) denominadas **microssomos**. Os microssomos são relativamente fáceis de purificar. Para os bioquímicos, os microssomos representam pequenas versões autênticas do RE, ainda capazes de translocação de proteínas, glicosilação proteica, captação e liberação de Ca^{2+}, e síntese de lipídeos. Os microssomos derivados do RE rugoso são crivados de ribossomos e denominados *microssomos rugosos*. Os ribossomos são sempre encontrados na superfície externa, de tal forma que o interior do microssomo é bioquimicamente equivalente ao lúmen do RE (**Figura 12-37**A).

Muitas vesículas de tamanho similar ao dos microssomos rugosos, mas desprovidas de ribossomos aderidos, também são encontradas nesses homogenados. Tais *microssomos lisos* são derivados, em parte, de porções lisas do RE e, em parte, de fragmentos vesiculados da membrana plasmática, do aparelho de Golgi, dos endossomos e das mitocôndrias (a proporção dependendo do tecido). Assim, enquanto os microssomos rugosos são claramente derivados de porções rugosas do RE, a origem dos "microssomos lisos" não pode ser tão facilmente definida. Os microssomos preparados de células do fígado ou de células do músculo são uma exceção. Devido às grandes quantidades pouco comuns de RE liso ou retículo sarcoplasmático, respectivamente, muitos dos microssomos lisos nos homogenados desses tecidos é derivada do RE liso. Os ribossomos aderidos à membrana tornam os microssomos rugosos mais densos que os microssomos lisos. Como resultado, os microssomos lisos e rugosos podem ser separados uns dos outros por centrifugação de equilíbrio (Figura 12-37B). Microssomos têm sido inestimáveis na elucidação de aspectos moleculares da função do RE, como discutiremos a seguir.

As sequências-sinal foram descobertas primeiro em proteínas importadas para o retículo endoplasmático rugoso

O RE captura proteínas selecionadas do citosol assim que elas são sintetizadas. Essas proteínas são de dois tipos: *proteínas transmembrana*, que são apenas parcialmente translocadas através da membrana do RE e tornam-se "embutidas" na membrana, e *proteínas solúveis em água*, que são totalmente translocadas através da membrana do RE e são liberadas no lúmen do RE. Algumas das proteínas transmembrana funcionam no RE, mas muitas são destinadas à membrana do plasma ou à membrana de outra organela. As proteínas solúveis em água são destinadas tanto à secreção quanto à residência no lúmen de

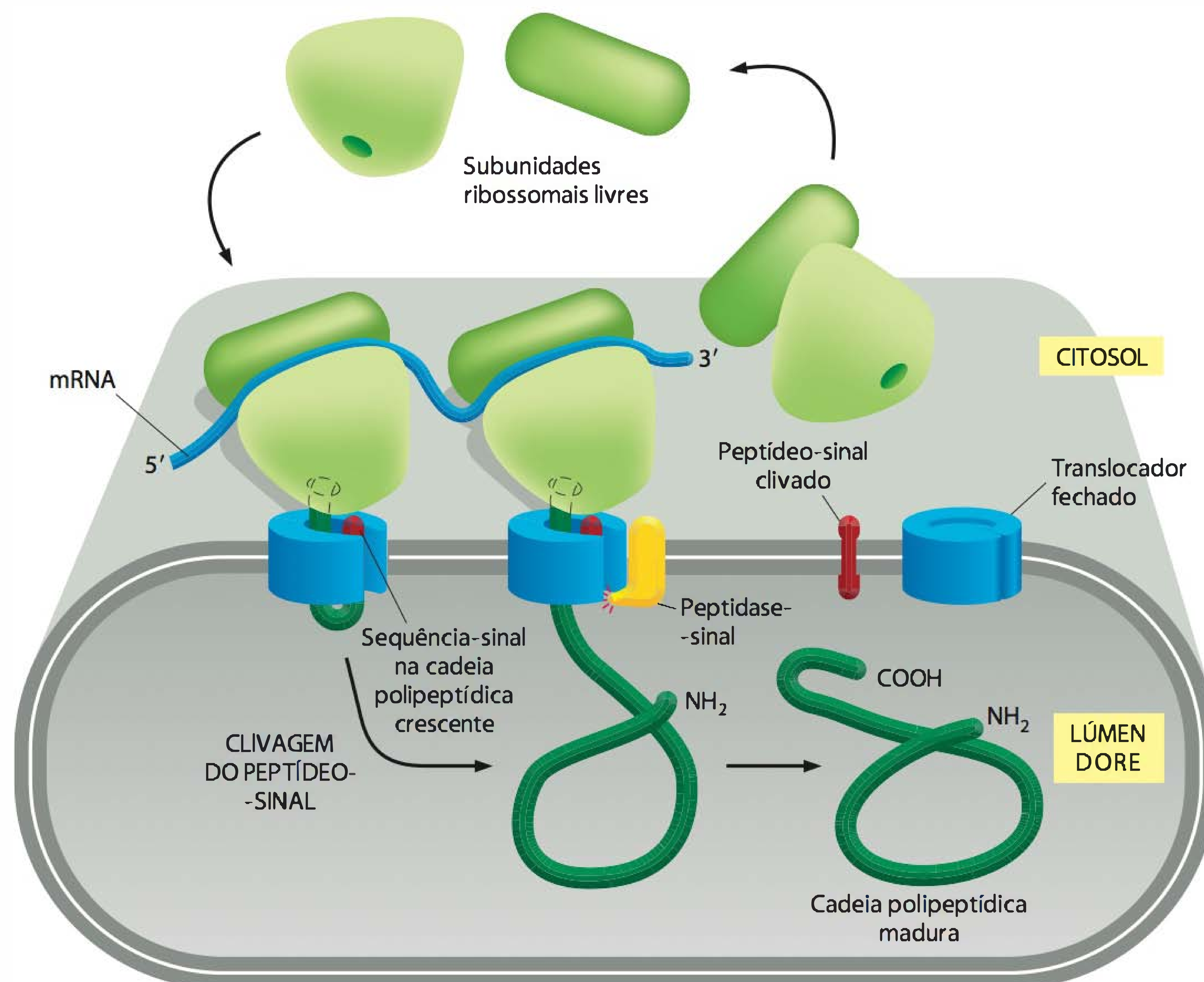


Figura 12-38 Hipótese-sinal. Uma vista simplificada do transporte de proteínas através da membrana do RE, como proposto originalmente. Quando a sequência-sinal do RE emerge dos ribossomos, ela direciona os ribossomos para um translocador na membrana do RE, que forma um poro na membrana através do qual o polipeptídeo é translocado. A sequência-sinal é retirada durante a tradução por uma peptidase-sinal, e a proteína madura é liberada para o lúmen do RE imediatamente após ser sintetizada. O translocador permanece fechado até que o ribossomo tenha se ligado, mantendo a barreira de permeabilidade da membrana do RE em todos os momentos.

uma organela. Todas essas proteínas, apesar do seu subsequente destino, são dirigidas para a membrana do RE por uma **sequência-sinal do RE**, a qual inicia a sua translocação por um mecanismo comum.

As sequências-sinal (e a estratégia de sequência-sinal para endereçamento de proteínas) foram primeiramente descobertas no início dos anos de 1970 em proteínas secretadas translocadas através da membrana do RE como um primeiro passo de sua liberação final da célula. No experimento-chave, o mRNA codificando a proteína secretada foi traduzido por ribossomos *in vitro*. Quando os microssomos foram omitidos desse sistema livre de células, a proteína sintetizada foi levemente maior que a proteína normal secretada, o comprimento extra sendo o *peptídeo-líder* N-terminal. Na presença de microssomos derivados do RE rugoso, todavia, foi produzida uma proteína de tamanho correto. Esses resultados foram explicados pela *hipótese-sinal*, a qual postulou que o líder serve como uma sequência-sinal ao RE, que direciona a proteína secretada para a membrana do RE e é, então, clivada por uma *peptidase-sinal* na membrana do RE, antes de a cadeia polipeptídica ser completada (**Figura 12-38**). Os sistemas livres de células, nos quais as proteínas são importadas para os microssomos, oferecem procedimentos de análise eficazes para identificação, purificação e estudo de vários componentes da maquinaria molecular responsável pelos processos de importação do RE.

Uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP) direciona sequências-sinal do RE para um receptor específico na membrana do RE rugoso

A sequência-sinal do RE é guiada à membrana do RE por, pelo menos, dois componentes: uma **partícula de reconhecimento de sinal** (**SRP**, *signal-recognition particle*), que circula entre a membrana do RE e o citosol e liga-se à sequência-sinal, e um **receptor SRP** na membrana do RE. A SRP é uma partícula complexa, consistindo em seis cadeias polipeptídicas diferentes ligadas a uma única molécula de RNA (**Figura 12-39**). A SRP e seu receptor são encontrados em todas as células, indicando que esse mecanismo de endereçamento proteico desenvolveu-se cedo durante a evolução e tem sido conservado.

As sequências-sinal do RE variam na sequência de aminoácidos, mas cada uma possui oito ou mais aminoácidos apolares no seu centro (ver Tabela 12-3, p. 702). Como a SRP pode ligar-se especificamente a tantas sequências diferentes? A resposta veio da estrutura crista-

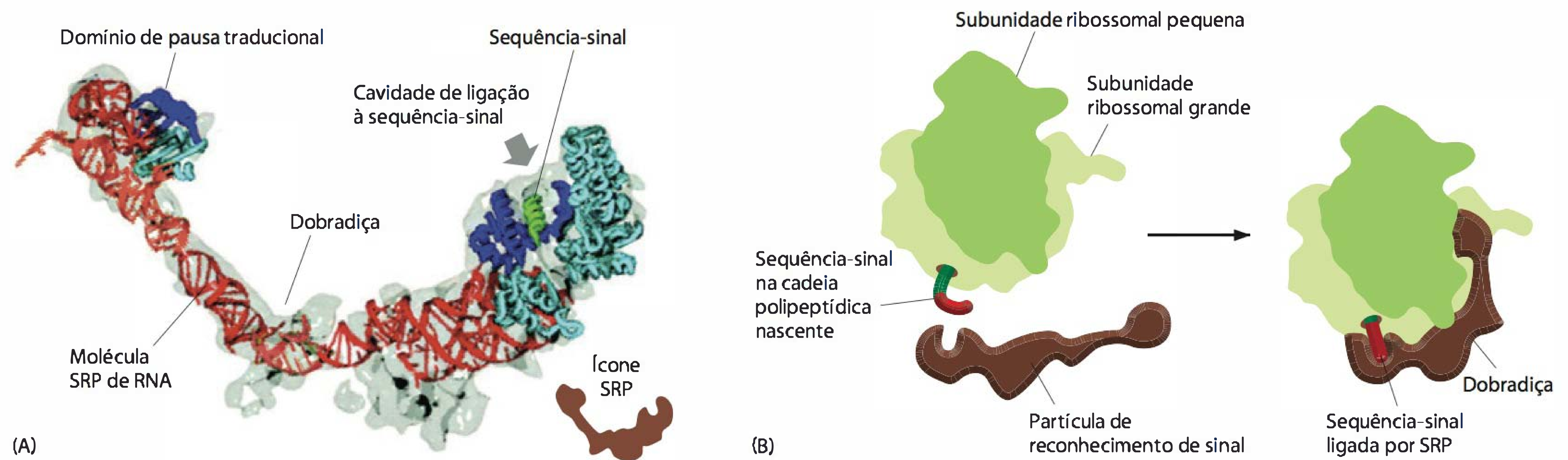


Figura 12-39 Partícula de reconhecimento de sinal (SRP). (A) Uma SRP de mamífero é um complexo alongado contendo seis subunidades proteicas e uma molécula de RNA (mostrada em *vermelho*). O RNA de SRP forma uma estrutura que conecta o domínio de SRP, contendo uma sequência-sinal na cavidade de ligação, ao domínio responsável pela pausa na tradução. O contorno tridimensional de SRP (mostrado em *cinza*) foi determinado por microscopia crioeletrônica. Estruturas de cristal de porções individuais de SRP são adaptadas no envelope e mostradas como pedaços de diagramas. Uma sequência-sinal ligada é mostrada como uma hélice *verde*. (B) SRP ligada ao ribossomo visualizada por microscopia crioeletrônica. A SRP liga-se à subunidade maior do ribossomo de maneira que sua sequência-sinal na cavidade de ligação é posicionada perto do sítio de saída da cadeia nascente e seu domínio de pausa traducional está posicionado na interface entre as subunidades ribossomais, onde interfere com o fator de alongamento. (Adaptada de M. Halic et al., *Nature* 427:808-814, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

lina da proteína SRP, a qual mostra que o sítio de ligação da sequência-sinal é uma grande cavidade hidrofóbica coberta por metioninas. Devido ao fato de as metioninas possuírem cadeias laterais flexíveis não-ramificadas, a cavidade é suficientemente plástica para acomodar sequências-sinal hidrofóbicas de diferentes sequências, tamanhos e formas.

A SRP é uma estrutura alongada que envolve a subunidade ribossomal maior, com uma extremidade ligada à sequência-sinal do RE tão logo o peptídeo tenha emergido do ribossomo, como parte da cadeia polipeptídica recém-formada; a outra extremidade bloqueia o sítio de ligação ao fator de alongamento na interface entre as subunidades maior e menor do ribossomo (Figura 12-39). Esse evento causa uma pausa na síntese proteica tão logo o peptídeo-sinal tenha emergido do ribossomo. A pausa transiente provavelmente dá tempo suficiente ao ribossomo para ligar-se à membrana do RE antes de completar a síntese da cadeia polipeptídica, garantindo, desse modo, que a proteína não seja liberada no citosol. Esse dispositivo de segurança pode ser especialmente importante para hidrolases secretadas e lisossomais que poderiam causar danos ao citosol; entretanto, as células que secretam grandes quantidades de hidrolases tomam a precaução extra de possuir altas concentrações de inibidores de hidrolases no seu citosol. A pausa também assegura que grandes porções de proteína, que poderiam enovelar-se em uma estrutura compacta, não sejam originadas antes de chegarem ao translocador na membrana do RE. Então, em contraste com a importação pós-traducional de proteínas em mitocôndrias e cloroplastos, proteínas chaperonas não são necessárias para capturar proteínas não-enoveladas.

Uma vez formado, o complexo SRP-ribossomo liga-se ao receptor SRP, que é uma proteína integral de membrana inserida na membrana do RE rugoso. Essa interação leva o complexo SRP-ribossomo a um translocador de proteína. A SRP e o receptor SRP são então liberados, e o translocador transfere a cadeia polipeptídica crescente através da membrana (**Figura 12-40**).

Esse processo de transferência cotraducional cria duas populações espacialmente separadas de ribossomos no citosol. **Ribossomos ligados à membrana**, ligados ao lado citosólico da membrana do RE, estão empenhados na síntese de proteínas que estão sendo transportadas simultaneamente para o RE. **Ribossomos livres**, não ligados a membranas, sintetizam todas as outras proteínas codificadas pelo genoma nuclear. Ribossomos ligados à membrana e livres são estrutural e funcionalmente idênticos. Eles são diferentes apenas nas proteínas que estão sendo produzidas por eles em um dado momento.

Visto que muitos ribossomos podem ligar-se a uma única molécula de mRNA, um *polirribossomo* normalmente é formado, o qual se torna ligado à membrana do RE, dire-

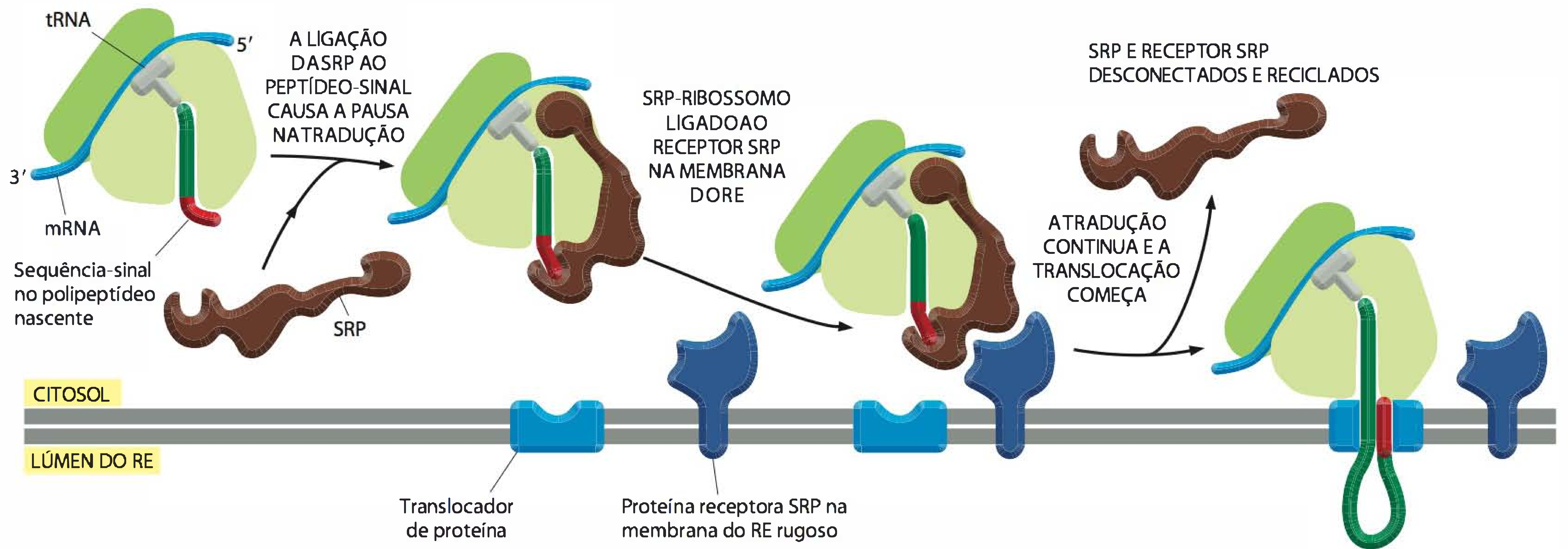


Figura 12-40 Como a sequência-sinal do RE e a SRP direcionam os ribossomos à membrana do RE. A SRP e seu receptor parecem agir em conjunto. A SRP liga-se à sequência-sinal do RE exposta e ao ribossomo, induzindo, portanto, uma pausa na tradução. O receptor SRP na membrana do RE, que é composto de duas cadeias polipeptídicas diferentes, liga-se ao complexo SRP-ribossomo e direciona-o ao translocador. Em uma reação pouco conhecida, a SRP e seu receptor são então liberados, deixando o ribossomo ligado ao translocador na membrana do RE. O translocador insere a cadeia polipeptídica na membrana e a transfere através da bicamada lipídica. Uma vez que uma das proteínas SRP e ambas as cadeias do receptor SRP contêm domínios de ligação a GTP, supõe-se que as mudanças conformacionais que ocorrem durante os ciclos de ligação ao GTP e a hidrólise (discutido no Capítulo 15) garantam que a liberação de SRP ocorra somente após o ribossomo estar adequadamente associado ao translocador na membrana do RE. O translocador é fechado até o ribossomo estar ligado, de tal forma que a barreira de permeabilidade da membrana do RE é mantida o tempo todo.

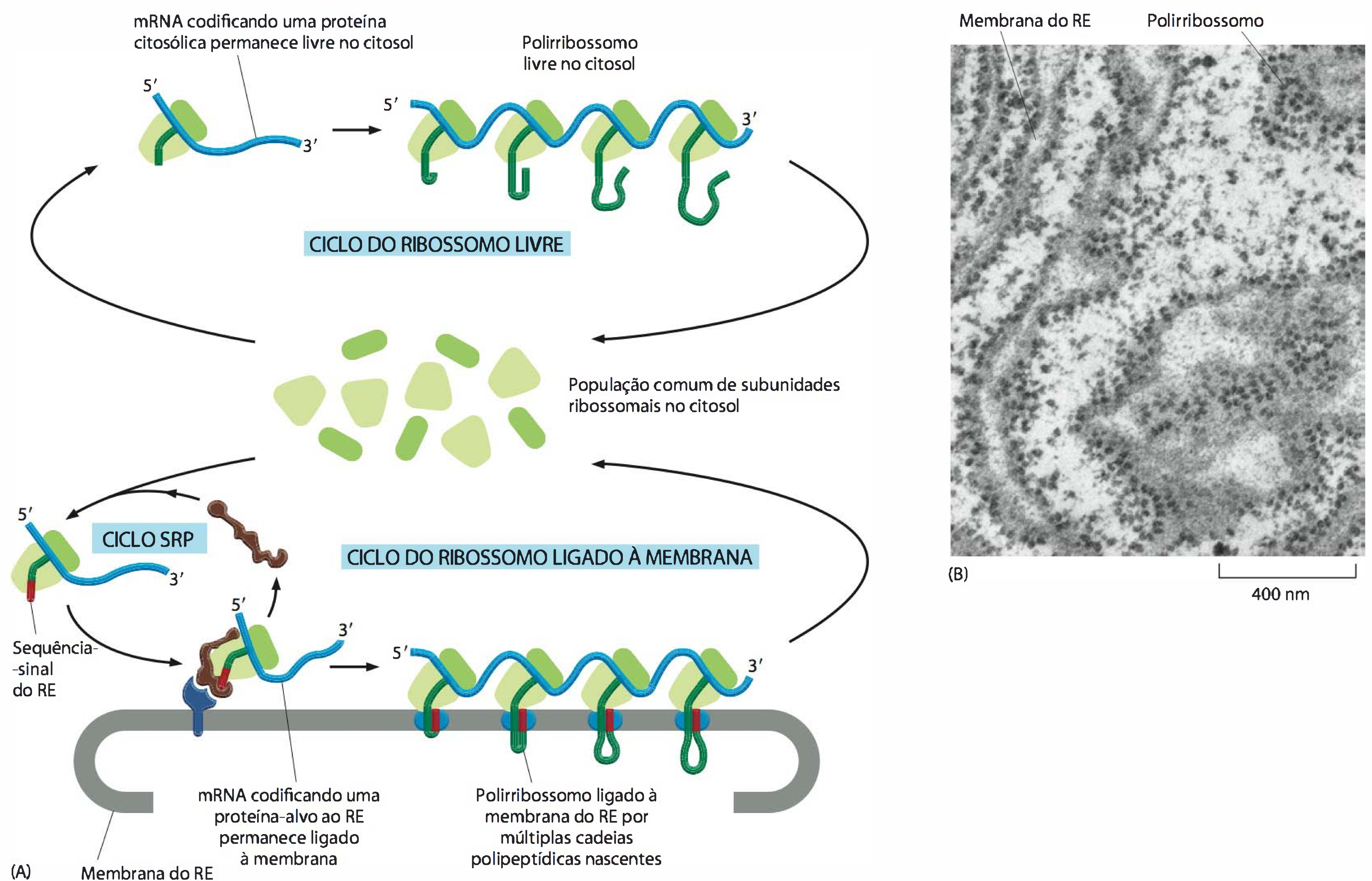


Figura 12-41 Ribossomos livres e ligados à membrana. (A) Uma população comum de ribossomos sintetiza proteínas que permanecem no citosol e aquelas que são transportadas para o RE. A sequência-sinal do RE em uma cadeia polipeptídica recém-formada liga-se à SRP, que direciona ribossomos de tradução à membrana do RE. A molécula de mRNA permanece permanentemente ligada ao RE como parte de um polirribossomo, enquanto os ribossomos que se movimentam ao longo do polirribossomo são reciclados; no fim de cada ciclo de síntese proteica, as subunidades ribossomais são liberadas e reunidas na população comum no citosol. (B) Uma fina secção em micrografia eletrônica de polirribossomos ligados à membrana do RE. O plano da secção em alguns pontos corta o RE rugoso paralelamente à membrana, criando um padrão de roseta dos polirribossomos. (B, cortesia de George Palade.)

cionado pelas sequências-sinal em múltiplas cadeias polipeptídicas crescentes (**Figura 12-41**A). Ribossomos individuais associados a tais moléculas de mRNA podem retornar ao citosol quando acabam a tradução e misturam-se com o *pool* de ribossomos livres. O mRNA, entretanto, permanece ligado à membrana do RE por uma troca de populações ribossomais, cada um mantido transientemente na membrana por translocadores (Figura 12-41B).

A cadeia polipeptídica atravessa um poro aquoso no translocador

Debateu-se longamente se as cadeias polipeptídicas são transferidas através da membrana do RE em contato direto com a bicamada lipídica, ou através de um poro em uma proteína translocadora. O debate se encerrou com a identificação da proteína transportadora, que se mostrou capaz de formar um poro preenchido por água na membrana, pelo qual a cadeia polipeptídica cruza a membrana. O centro do translocador, denominado **complexo Sec61**, consiste em três subunidades que são altamente conservadas desde bactérias até células eucarióticas. Recentemente, a estrutura do complexo Sec61 foi determinada por cristalografia de raios X. A estrutura sugere que as hélices α contribuem para a subunidade maior ao redor do poro central através do qual a cadeia polipeptídica pode atravessar a membrana (**Figura 12-42**). O poro é bloqueado por uma hélice pequena que parece manter o translocador fechado quando está inerte e se move para o lado quando está ocupado passando uma cadeia polipeptídica. Por essa razão, o poro é uma estrutura dinâmica que se abre apenas brevemente quando uma cadeia polipeptídica atravessa a membrana. Em um translocador inerte, é importante manter o poro fechado, deste modo permanecendo a membrana impermeável a íons, como Ca^{2+}, que, por outro lado, poderia escapar do RE.

A estrutura do complexo Sec61 sugere que o poro também pode abrir uma fenda do seu lado. Essa abertura permite a translocação por um acesso lateral à cadeia polipeptídica ao centro hidrofóbico da membrana, um processo que é importante tanto para a liberação do peptídeo-sinal clivado da membrana (ver Figura 12-38) quanto para a integração de proteínas na bicamada, como discutiremos a seguir.

Em células eucarióticas, quatro complexos Sec61 formam um grande translocador que pode ser visualizado nos ribossomos após solubilização com detergente das membranas do RE (**Figura 12-43**). É provável que nem todos os quatro componentes do complexo Sec61 em translocadores eucarióticos participem diretamente no transpore de proteínas. Alguns deles poderiam estar inativos, originando sítios de ligação para o ribossomo e proteínas acessórias que ajudam cadeias polipeptídicas a se enovelarem assim que entram no RE. De acordo com isso, o ribossomo ligado forma uma forte "tampa" com o translocador, com o espaço dentro do ribossomo contínuo com o lúmen do RE, impedindo as moléculas de escaparem do RE. Alternativamente, a estrutura do complexo Sec61 sugere que o poro no translocador poderia formar um diafragma de ajuste fino ao redor da cadeia transportada, prevenindo o escape de outras moléculas.

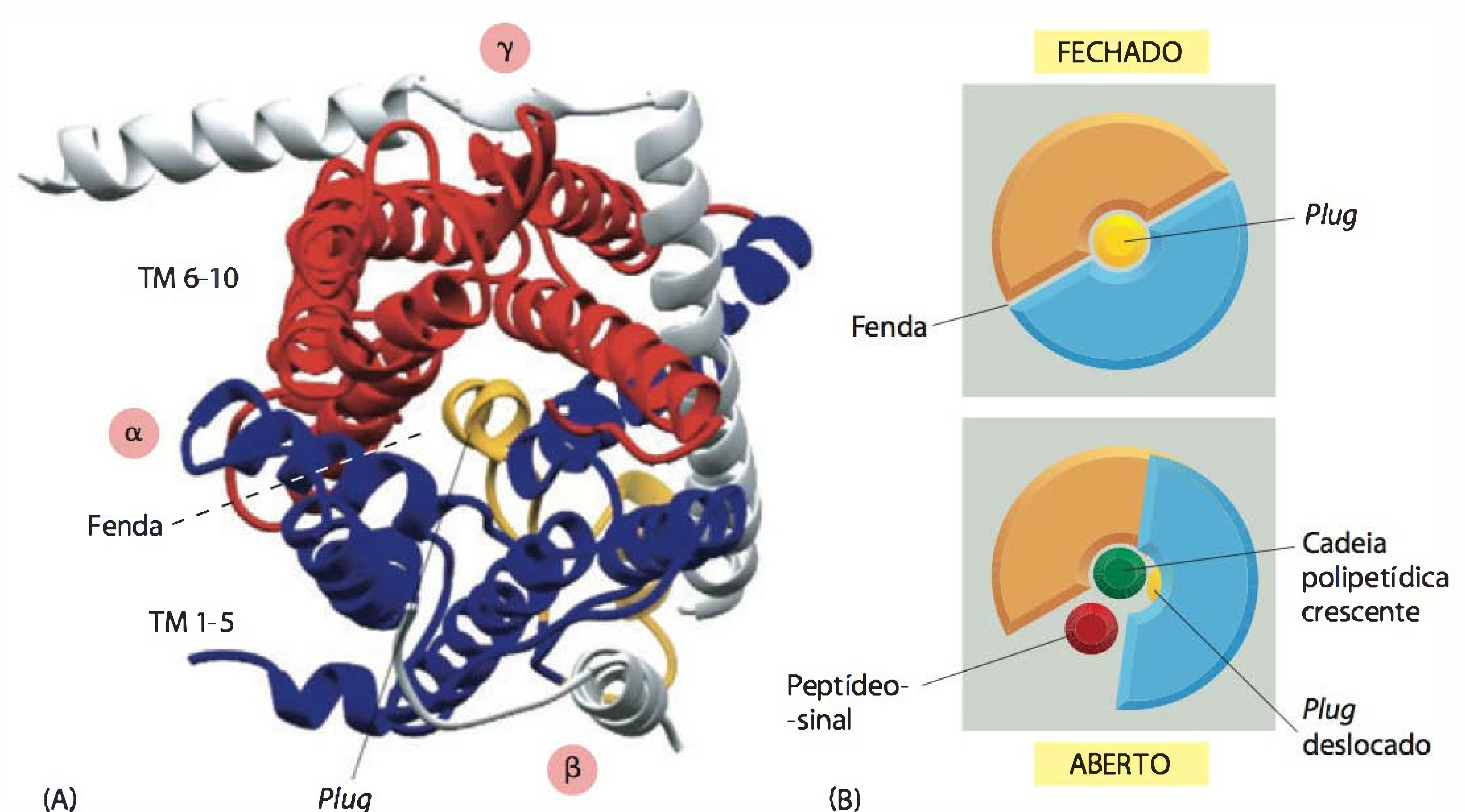


Figura 12-42 Estrutura do complexo Sec61. (A) Uma visão superior da estrutura do complexo Sec61 do *Methanococcus jannaschii* vista do lado do citosol da membrana. A subunidade Sec61α é mostrada em *azul* e *vermelho*; as duas pequenas subunidades γ e β são mostradas em *cinza*. A pequena hélice *amarela* parece formar um *plug* que tampa o poro quando o transportador está fechado. Para abri-lo, o complexo rearranja-se para deslocar o *plug*. Parece que o poro do complexo Sec61 também pode abrir para o lado da fresta. (B) Modelos dos estados aberto e fechado do transportador são mostrados, ilustrando como a sequência-sinal poderia ser liberada na membrana após a abertura da fresta. (A, de B. van der Berg et al., *Nature* 427:36-44, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

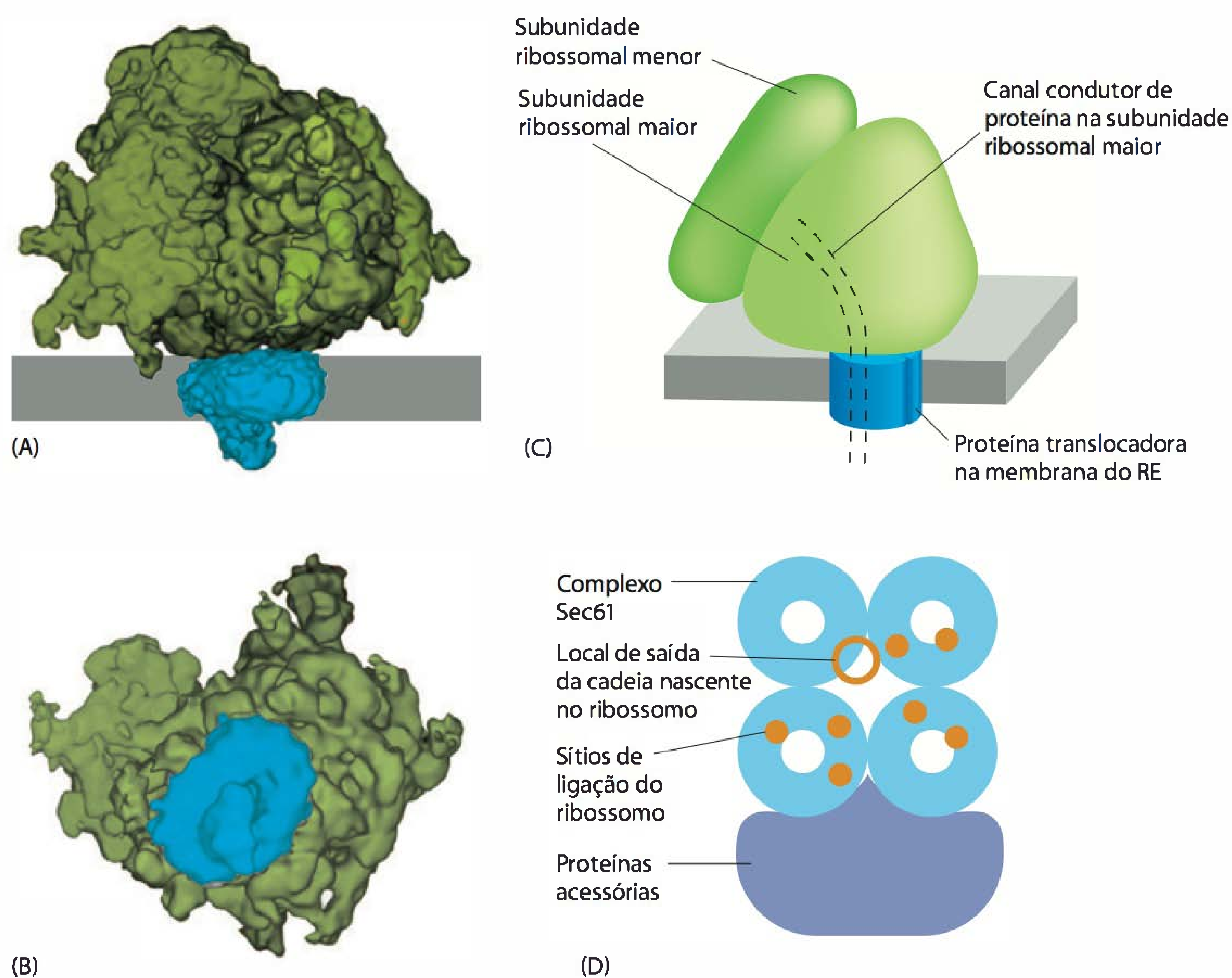


Figura 12-43 Um ribossomo ligado a uma proteína translocadora eucariótica. (A) Uma reconstrução do complexo de imagens de microscopia eletrônica vistas pelo lado. (B) Uma visão do translocador observada do lúmen do RE. Parece que o translocador contém quatro cópias do complexo Sec61. (C) Um desenho esquemático de um ribossomo aderido à membrana, ligado ao translocador com o túnel na subunidade ribossomal maior, pelo qual a cadeia polipeptídica crescente sai do ribossomo (ver Figura 6-70). (D) Um modelo esquemático de como quatro complexos Sec61 e várias proteínas acessórias podem ser arranjados no translocador. Os pontos *vermelhos* indicam sítios de ligação no ribossomo que são vistos em reconstruções de microscopia eletrônica e os *círculos vermelhos* mostram a posição do final do túnel de saída do ribossomo. Não se sabe qual dos quatro complexos Sec61 está participando ativamente no evento de transporte de proteínas. Domínios de proteínas acessórias se estendem através da membrana e formam uma saliência vista do lado (A). (A, B e C adaptadas de J. F. Ménétret et al., *J. Mol. Biol.* 348:445-457, 2005. Com permissão da Academic Press.)

A translocação através da membrana do retículo endoplasmático nem sempre necessita do alongamento da cadeia polipeptídica em andamento

Como vimos, a translocação de proteínas para as mitocôndrias, os cloroplastos e os peroxissomos ocorre pós-traducionalmente depois que a proteína foi sintetizada e liberada no citosol, enquanto a translocação através da membrana do RE ocorre, geralmente, durante a tradução (cotraducionalmente). Esse fato explica por que os ribossomos são ligados ao RE, mas em geral não são ligados a outras organelas.

Algumas proteínas, no entanto, são importadas para o RE após completada sua síntese, demonstrando que o transporte nem sempre requer tradução em andamento. A translocação pós-traducional de proteínas é especialmente comum através da membrana do RE em células de levedura e através da membrana plasmática bacteriana (a qual pensa-se ser evolutivamente relacionada ao RE; ver Figura 12-4). Para atuar no translocamento pós-traducional, o translocador necessita de proteínas acessórias que coloquem a cadeia polipeptídica no poro e sustentem o transporte (**Figura 12-44**). Em bactérias, uma proteína motriz de translocamento, a *ATPase SecA*, liga-se ao lado citosólico do translocador, onde desencadeia mudanças conformacionais cíclicas sustentadas por hidrólise de ATP. A cada vez que um ATP é hidrolisado, uma porção da proteína SecA insere-se no poro do translocador, impelindo um curto segmento da proteína transportada com ela. Como resultado desse mecanismo de catraca, a proteína SecA empurra a cadeia polipeptídica da proteína transportada através da membrana.

As células eucarióticas utilizam um conjunto diferente de proteínas acessórias que se associam ao complexo Sec61. Essas proteínas atravessam a membrana do RE e utilizam um pequeno domínio ao lado do lúmen da membrana do RE para depositar uma proteína chaperona do tipo Hsp70 (denominada *BiP*, de *binding protein*) na cadeia polipeptídica, à medida que esta emerge do poro para o lúmen do RE. O transporte unidirecional é sustentado por ciclos de ligação de BiP e de liberação, como descrito anteriormente para as proteínas Hsp70 mitocondriais, que conduzem proteínas através das membranas mitocondriais.

As proteínas que são transportadas para o RE por um mecanismo pós-traducional são primeiramente liberadas no citosol, onde se ligam a proteínas chaperonas, prevenindo o seu enovelamento por ligação, como discutido anteriormente para as proteínas com destino às mitocôndrias e aos cloroplastos.

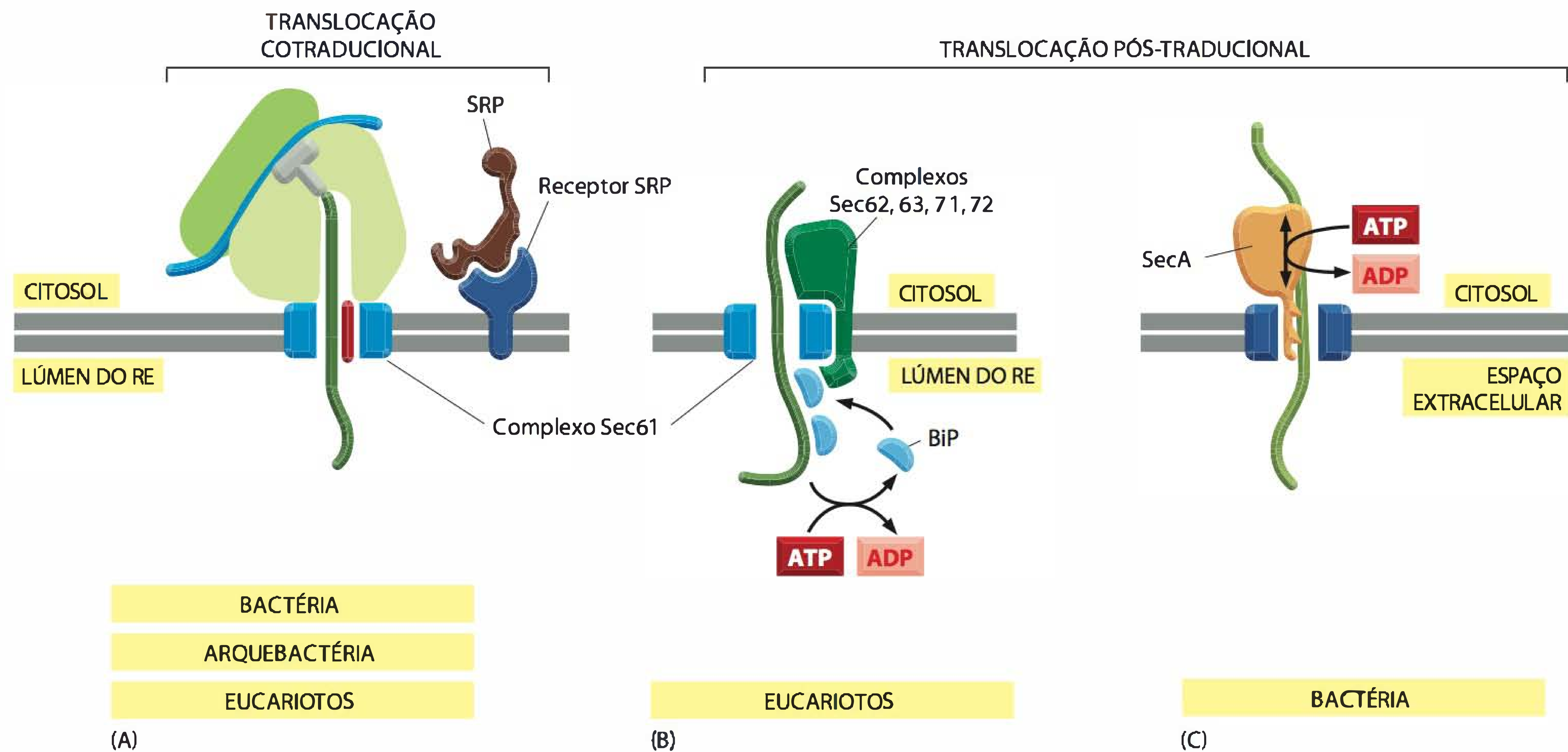


Figura 12-44 Três maneiras pelas quais o translocamento de proteínas pode ser dirigido através de translocadores estruturalmente semelhantes. (A) Translocamento cotradicional. O ribossomo é conduzido à membrana pela SRP e pelo receptor SRP e estabelece uma forte associação com a proteína translocadora Sec61. A cadeia polipeptídica crescente é conduzida através da membrana assim que é sintetizada. Não é necessária energia adicional, uma vez que o único caminho disponível para a cadeia crescente é cruzar a membrana. (B) Translocamento pós-traducional em células eucarióticas. Um complexo adicional composto de proteínas Sec62, Sec63, Sec71 e Sec72 é ligado ao translocador Sec 61 e deposita moléculas BiP na cadeia em translocação assim que emerge no lúmen do RE. Os ciclos de ligação de BiP e de liberação movidos por ATP puxam a proteína para o lúmen, um mecanismo que se assemelha ao modelo de catraca térmica para importação mitocondrial na Figura 12-26. (C) Translocamento pós-traducional em bactérias. A cadeia polipeptídica completa é conduzida do lado citosólico para um translocador na membrana plasmática pela ATPase SecA. As mudanças conformacionais possibilitadas por hidrólise de ATP são responsáveis pelo movimento tipo pistão na SecA, cada ciclo impelindo cerca de 20 aminoácidos da cadeia proteica pelo poro do translocador. A rota Sec utilizada para transporte de proteínas através da membrana tilacoidal em cloroplastos utiliza um mecanismo semelhante (ver Figura 12-29B).

Enquanto o translocador Sec61, a SRP e o receptor SRP são encontrados em todos os organismos, a SecA é encontrada exclusivamente em bactérias, e as proteínas Sec62, Sec63, Sec71 e Sec72, exclusivamente em células eucarióticas. (Adaptada de P. Walter e A. E. Johnson, *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:87-119, 1994. Com permissão de Annual Reviews.)

Em proteínas transmembrana de passagem única, somente uma sequência-sinal interna do retículo endoplasmático permanece na bicamada lipídica como uma hélice α que atravessa a membrana

A sequência-sinal da cadeia polipeptídica crescente parece disparar a abertura do poro na proteína translocadora: depois que a sequência-sinal é liberada da SRP e a cadeia crescente tenha alcançado um tamanho suficiente, a sequência-sinalliga-se a um sítio específico dentro do poro, abrindo dessa maneira o poro. Uma sequência-sinal do RE é então reconhecida duas vezes: primeiro, por uma SRP no citosol e então por um sítio de ligação no poro da proteína translocadora, onde serve como um **sinal de início da transferência** (ou peptídeo de início da transferência) que abre o poro (ilustrado para uma proteína solúvel do RE na **Figura 12-45**). O reconhecimento duplo pode auxiliar assegurando que apenas proteínas apropriadas entrem no lúmen do RE.

Enquanto está ligada ao poro de transporte, a sequência-sinal está em contato não apenas como o complexo Sec61, que forma a parede do poro, mas também com o centro lipídico hidrofóbico da membrana. Isso foi mostrado em experimentos de ligação química, nos quais sequências-sinal e cadeias de hidrocarbono de lipídeos poderiam estar covalentemente unidas. Quando a cadeia polipeptídica nascente cresce o suficiente, uma peptidase-sinal do RE cliva a sequência-sinal, liberando-a do poro na membrana, onde é rapidamente degradada a aminoácidos por proteases na membrana do RE. Para liberar a sequência-sinal na membrana, o translocador abre-se lateralmente. O translocador pode então tomar duas direções: abrir-se para formar um poro através da membrana a fim de deixar porções hidrofílicas de proteínas na bicamada lipídica, e abrir-se lateralmente dentro da membrana para deixar

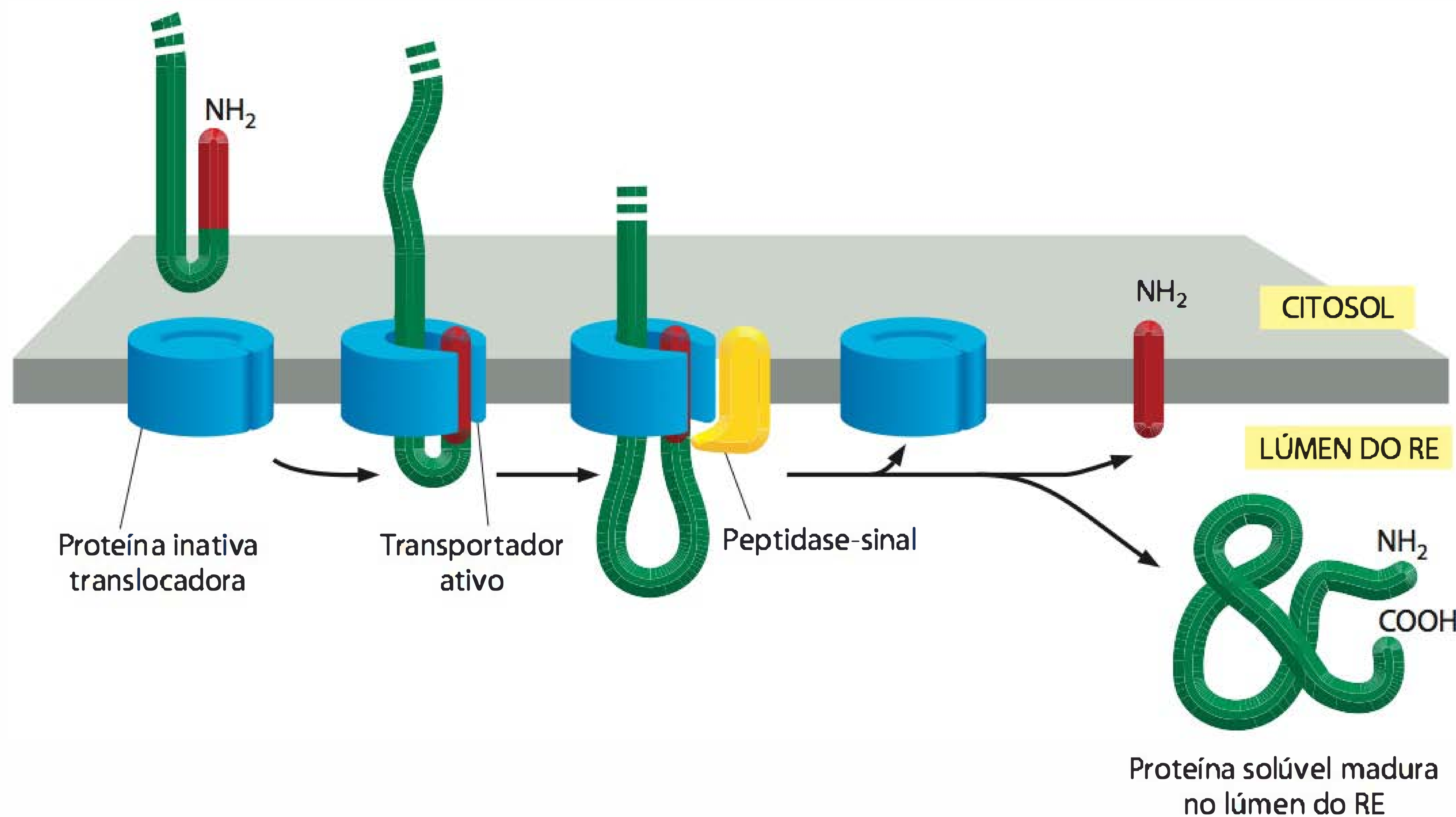


Figura12-45 Modelo ilustrando como a proteína solúvel é translocada através da membrana do RE. Quando há ligação de uma sequência-sinal do RE (que atua como um sinal de início da transferência), o translocador abre seu poro, permitindo a transferência da cadeia polipeptídica através da bicamada lipídica como uma alça. Após completado o transporte da proteína, o poro fecha, mas o translocador abre-se agora lateralmente dentro da bicamada lipídica, permitindo a difusão da sequência-sinal hidrofóbica na bicamada, onde é rapidamente degradada. (Nesta figura e nas três figuras que seguem, os ribossomos foram omitidos para maior clareza.)

porções hidrofóbicas de proteínas na bicamada lipídica. A saída lateral do poro é um passo essencial durante a integração de proteínas de membrana.

A integração de proteínas de membrana necessita que algumas partes da cadeia polipeptídica sejam transportadas através da bicamada lipídica, enquanto outras não necessitam. Apesar dessa complexidade adicional, todos os modos de inserção de proteínas de membrana podem ser considerados como variantes da sequência de eventos descrita anteriormente para transferir uma proteína solúvel no lúmen do RE. Começaremos descrevendo as três maneiras pelas quais as **proteínas transmembrana passagem única** (ver Figura 10-19) são inseridas no RE.

No caso mais simples, uma sequência-sinal N-terminal inicia o translocamento, tal como para uma proteína solúvel, mas um segmento hidrofóbico adicional na cadeia polipeptídica interrompe o processo de transferência antes que a cadeia inteira seja transportada. Esse **sinal de parada da transferência** ancora a proteína na membrana após a sequência-sinal do RE (o sinal de início da transferência) ter sido liberada do translocador e ter sido clivada (**Figura 12-46**). A sequência de parada da transferência é transferida para a bicamada pelo mecanismo de controle lateral e lá permanece como um único segmento hélice α atravessando a membrana, com a região N-terminal da proteína no lado do lúmen da membrana e a região C-terminal no lado citosólico.

Nos outros dois casos, a sequência-sinal é interna, em vez de ser na extremidade N-terminal da proteína. Assim como as sequências-sinal N-terminais do RE, a SRP também se liga a

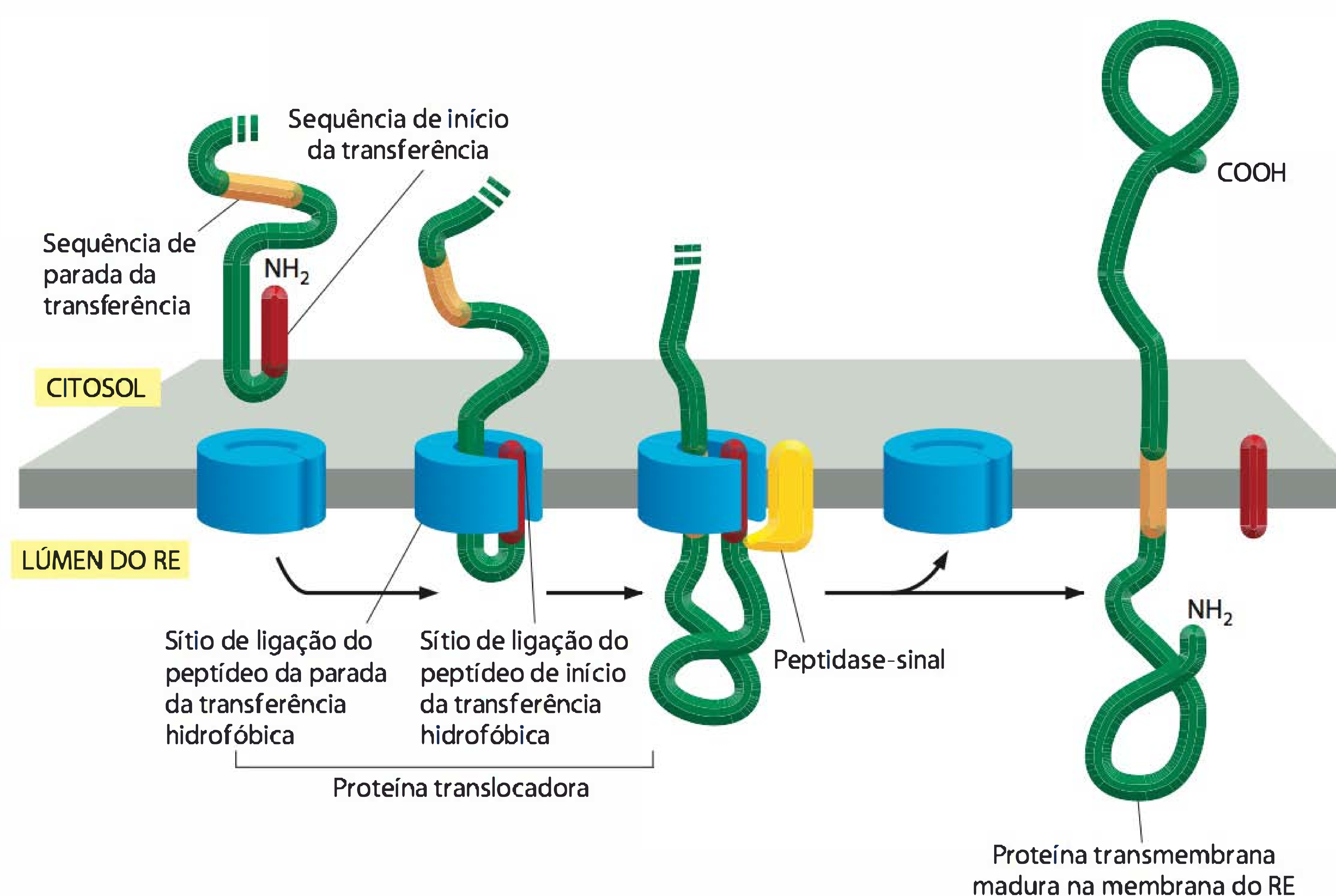


Figura 12-46 Como uma proteína transmembrana de passagem única, com a sequência-sinal do RE clivada, é integrada na membrana do RE. Nessa proteína hipotética, o processo de translocamento cotraducional é iniciado por uma sequência-sinal N-terminal do RE (*vermelho*) que atua como um sinal de início da transferência, como na Figura 12-45. Além dessa sequência de início da transferência, entretanto, a proteína também contém uma sequência de parada da transferência (*laranja*). Quando a sequência de parada da transferência penetra o translocador e interage com um sítio de ligação, o translocador modifica sua conformação e descarrega a proteína lateralmente na bicamada lipídica.

uma sequência-sinal interna. A SRP liga-se ao ribossomo sintetizando a proteína à membrana do RE e servindo como um sinal de início da transferência que inicia a translocação da proteína. Após a liberação do translocador, a sequência interna de início da transferência permanece na bicamada lipídica como uma hélice α que atravessa a membrana uma única vez.

As sequências internas de início da transferência podem ligar-se ao aparato de transporte em uma de duas orientações; por sua vez, essa orientação da sequência de início de transferência determina qual segmento da proteína (aquele que precede ou o que segue a sequência de início da transferência) é movido através da membrana para o lúmen do RE. Em um caso, a proteína de membrana resultante tem sua região C-terminal no lado do lúmen (Rota A na **Figura 12-17**), enquanto no outro, a região N-terminal está situada ao lado do lúmen (Via B na Figura 12-47). A orientação da sequência de início da transferência depende da distribuição dos aminoácidos carregados adjacentes, como descrito na legenda da figura.

As combinações de sinais de início e de parada da transferência determinam a topologia das proteínas transmembrana de múltiplas passagens

Em **proteínas transmembrana de múltiplas passagens**, a cadeia polipeptídica desliza para trás e para a frente repetidamente através da bicamada lipídica (ver Figura 10-19). Acredita-se que uma sequência-sinal interna sirva como um sinal de início da transferência nessas proteínas para iniciar o transporte, o qual continua até atingir a sequência de parada da transferência. Em proteínas transmembrana de passagem dupla, por exemplo, o polipeptídeo pode ser liberado na bicamada (**Figura 12-48**). Em proteínas de múltiplas passagens

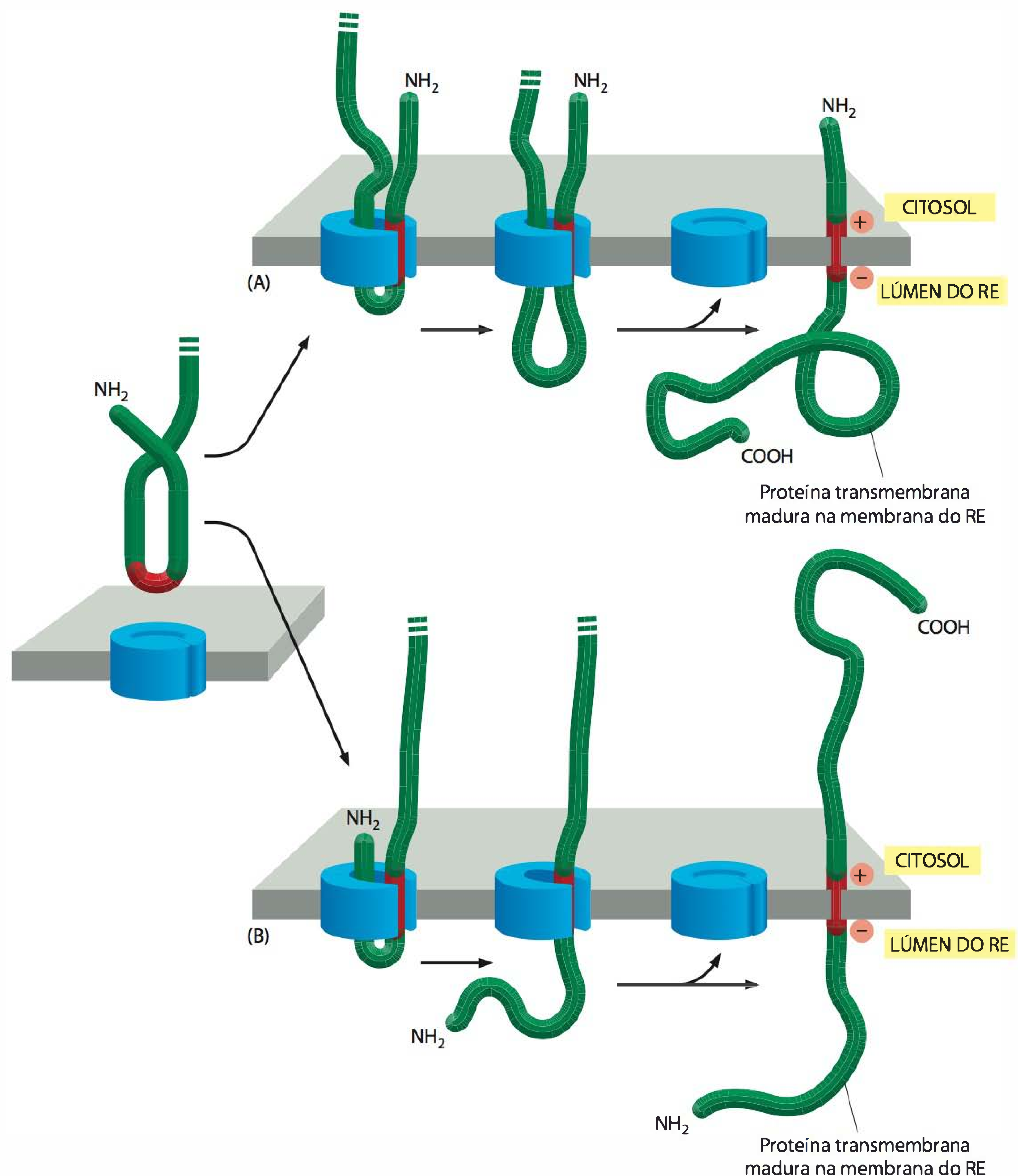


Figura 12-47 Integração de uma proteína de membrana de passagem única com uma sequência-sinal interna na membrana do RE. Uma sequência-sinal do RE interna que atua como um sinal de início da transferência pode ligar-se ao translocador em uma das duas vias diferentes, levando a uma proteína de membrana que possui tanto seu C-terminal (via A) quanto seu N-terminal (via B) no lúmen do RE. Proteínas são direcionadas às duas vias por características na cadeia polipeptídica que flanqueia a sequência interna de início da transferência: se existem mais aminoácidos carregados positivamente imediatamente *antes* do núcleo hidrofóbico da sequência de início da transferência do que após esta região, a proteína de membrana é inserida no translocador na orientação mostrada na via A, enquanto que, se existem mais aminoácidos carregados positivamente imediatamente *após* o núcleo hidrofóbico da sequência de início da transferência do que antes dessa região, a proteína de membrana é inserida no translocador na orientação mostrada na via B. Devido ao fato de o transporte não poder iniciar antes que uma sequência de início da transferência apareça na superfície do ribossomo, o transporte da porção N-terminal da proteína mostrada em (B) somente pode ocorrer após ela ter sido completamente sintetizada. Note que existem duas formas para inserir uma proteína transmembrana de passagem única cuja região N-terminal esteja localizada no lúmen do RE: aquela mostrada na Figura 12-46 e esta mostrada aqui em (B).

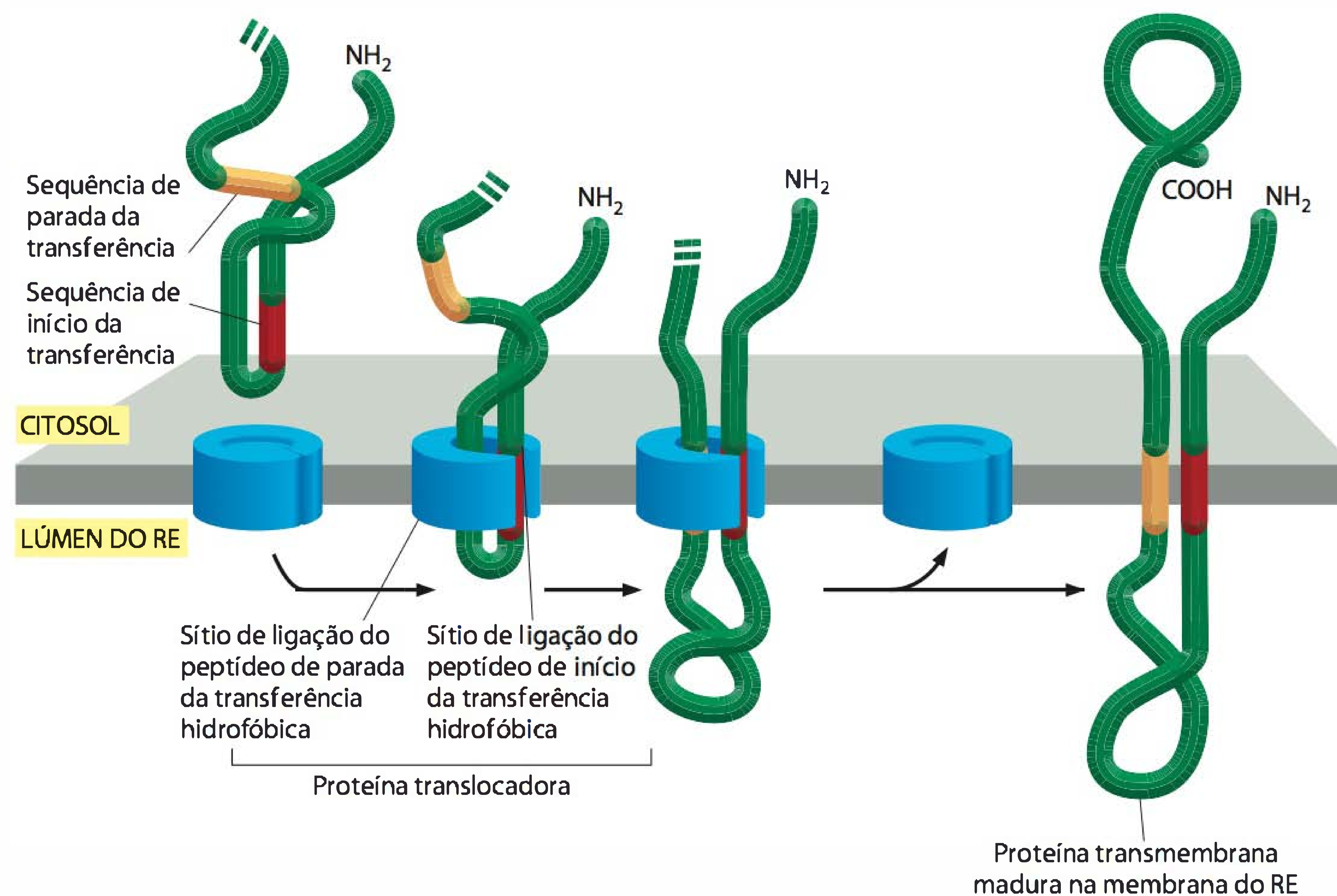


Figura 12-48 Integração de uma proteína de membrana de dupla passagem com uma sequência-sinal interna na membrana do RE. Nessa proteína, uma sequência-sinal interna do RE atua como um sinal de início da transferência (como na Figura 12-47) e inicia a transferência da porção C-terminal da proteína. No mesmo ponto, após uma sequência de parada da transferência ter penetrado o translocador, este libera a sequência lateralmente na membrana.

mais complexas, nas quais muitas hélices α hidrofóbicas atravessam a bicamada, uma segunda sequência de início da transferência reinicia o translocamento mais adiante na cadeia polipeptídica, até a próxima sequência de parada do transporte induzir a liberação do polipeptídeo, e assim por diante, para posteriores sequências de início e de parada da transferência (**Figura 12-49**).

Se uma dada sequência-sinal hidrofóbica atua como uma sequência de início ou de parada da transferência, isso depende da sua localização na cadeia polipeptídica, uma vez que sua função pode ser ativada pela mudança da sua localização na proteína, utilizando técnicas de DNA recombinante. Assim, a distinção entre sequências de início e de parada da transferência resulta, principalmente, da sua ordem relativa na cadeia polipeptídica crescente. Parece que a SRP inicia procurando por segmentos hidrofóbicos na região N-terminal de uma cadeia polipeptídica desenovelada e procede em direção à região C-terminal, na direção em que a proteína é sintetizada. Reconhecendo o primeiro segmento hidrofóbico apropriado para emergir do ribossomo, a SRP ajusta a "matriz de leitura": se a translocação é iniciada, o próximo segmento hidrofóbico apropriado é reconhecido como uma sequência de parada da transferência, induzindo a região intermediária da cadeia polipeptídica a passar pela membrana. Um processo de varredura semelhante continua até que todas as regiões hidrofóbicas da proteína tenham sido inseridas na membrana.

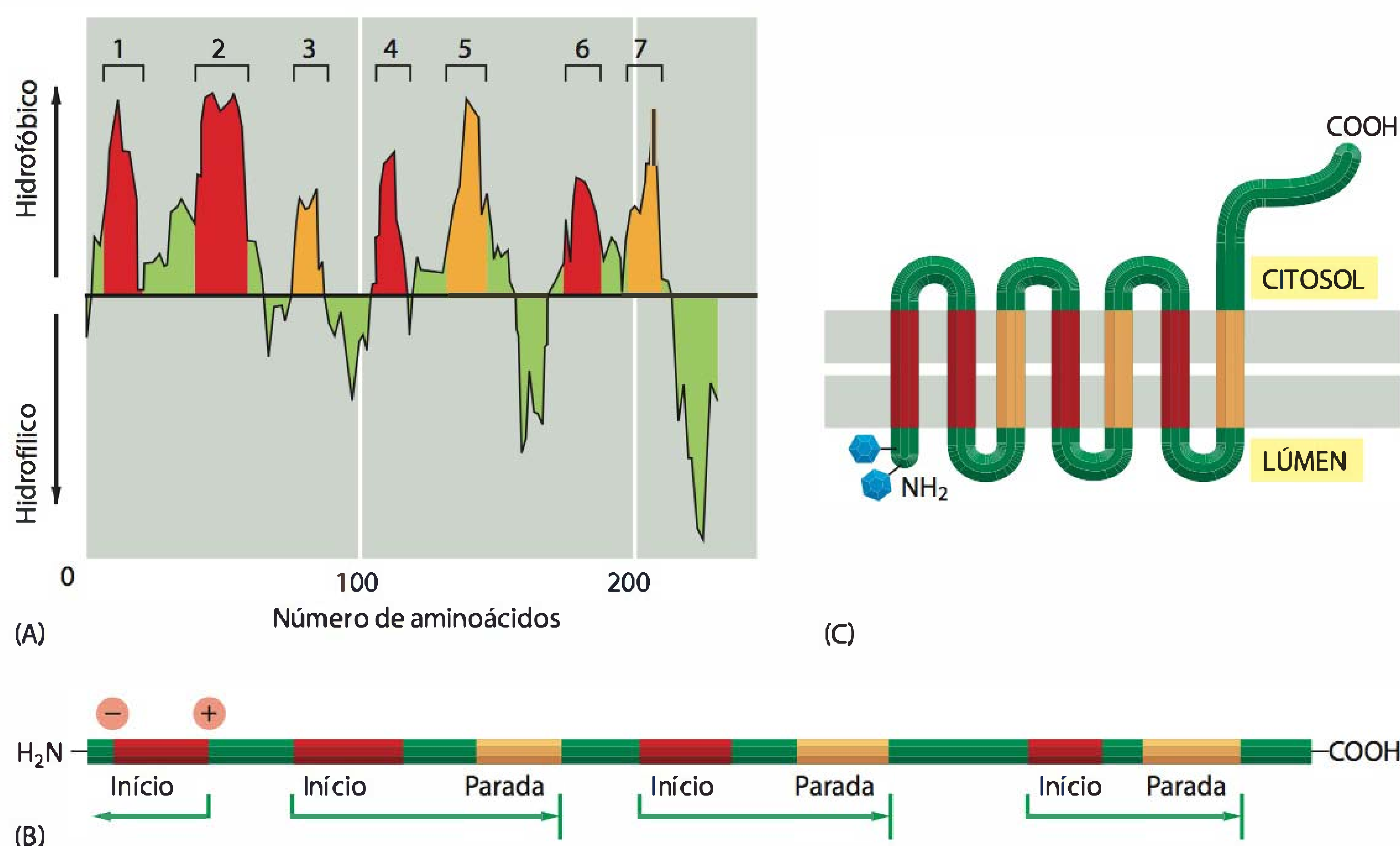


Figura 12-49 Inserção da proteína de membrana de múltiplas passagens rodopsina na membrana do RE. As rodopsinas são as proteínas sensíveis à luz nos bastonetes receptores na retina dos mamíferos (discutido no Capítulo 15). (A) Um mapa de hidrofobicidade identifica sete regiões hidrofóbicas curtas na rodopsina. (B) A região hidrofóbica mais próxima da região N-terminal serve como uma sequência de início da transferência que induz a porção anterior à região N-terminal da proteína a passar através da membrana do RE. As sequências hidrofóbicas subsequentes funcionam alternadamente como sequências de início e de parada da transferência. (C) A rodopsina integrada final tem sua região N-terminal localizada no lúmen do RE e sua região C-terminal localizada no citosol. Os *hexágonos azuis* representam oligossacarídeos ligados covalentemente. As setas indicam as porções da proteína que são inseridas no translocador.

Uma vez que as proteínas de membrana sempre estão inseridas no lado citosólico do RE dessa maneira programada, todas as cópias da mesma cadeia polipeptídica terão a mesma orientação na bicamada lipídica. Esse mecanismo gera uma assimetria na membrana do RE, na qual os domínios proteicos expostos em um dos lados são diferentes dos domínios expostos do outro. Essa assimetria é mantida durante os muitos eventos de brotamento e de fusão que transportam as proteínas sintetizadas no RE a outras membranas celulares (discutido no Capítulo 13). Assim, a maneira que uma proteína recém-sintetizada é inserida na membrana do RE determina a orientação da proteína em todas as outras membranas.

Quando as proteínas são dissociadas de uma membrana e, então, reconstituídas em vesículas lipídicas artificiais, geralmente ocorre uma mistura aleatória de proteínas com orientações com o lado correto para fora e com o lado interno para fora. Assim, a assimetria proteica observada em membranas celulares parece não ser uma propriedade inerente à proteína, mas resulta somente do processo pelo qual as proteínas passam do citosol à membrana do RE.

As cadeias polipeptídicas transportadas enovelam-se e são montadas no lúmen do retículo endoplasmático rugoso

Muitas das proteínas no lúmen do RE estão em trânsito, *en route* a outros destinos; outras, entretanto, residem lá normalmente e estão presentes em altas concentrações. Essas **proteínas residentes no RE** contêm um **sinal de retenção no RE** de quatro aminoácidos na sua região C-terminal que são responsáveis pela retenção da proteína no RE (ver Tabela 12-3; discutido no Capítulo 13). Algumas dessas proteínas atuam cataliticamente para auxiliar as muitas proteínas que são transportadas para o RE a enovelar-se e montar-se corretamente.

Uma importante proteína residente no RE é a *proteína dissulfeto-isomerase* (*PDI*), que catalisa a oxidação de grupos sulfidrila (SH) livres nas cisteínas para formar ligações dissulfeto (S-S). Quase todas as cisteínas nos domínios proteicos expostos no espaço extracelular ou no lúmen das organelas em vias secretoras e endocíticas são ligadas por ligações dissulfeto. Ao contrário, as ligações dissulfeto são formadas muito raramente apenas em domínios expostos ao citosol, em função da existência de um ambiente redutor no local.

Outra proteína residente no RE é a proteína chaperona **BiP**. Já discutimos como a BiP atua para puxar proteínas pós-traducionalmente para o RE por meio do translocador do RE. Como outras chaperonas, a BiP reconhece proteínas enoveladas incorretamente, bem como subunidades proteicas que ainda não se agregaram aos seus complexos oligoméricos finais. Para isso, ela liga-se à sequência de aminoácidos exposta, que estaria, de modo normal, oculta no interior das cadeias polipeptídicas corretamente enoveladas ou agregadas. Um exemplo de sítio de ligação BiP é um segmento alternado de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que estariam, normalmente, ocultos em uma folha β. A BiP ligada impede a agregação da proteína e auxilia na manutenção da proteína no RE (e, assim, fora do aparelho de Golgi e das etapas posteriores da via secretora). Como a família de proteínas Hsp70, que se liga a proteínas desenoveladas no citosol e facilita sua importação para mitocôndrias e cloroplastos, a BiP hidrolisa ATP para fornecer a energia necessária ao transporte de proteínas pós-traducionalmente no RE. Isso auxilia também essas e outras proteínas no enovelamento.

A maioria das proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso é glicosilada pela adição de um oligossacarídeo comum ligado ao *N*

A adição covalente de açúcares às proteínas é uma das principais funções biossintéticas do RE. Cerca da metade das proteínas eucarióticas é glicosilada. A maioria das proteínas solúveis e das proteínas ligadas à membrana que é sintetizada no RE – incluindo aquelas destinadas ao transporte ao aparelho de Golgi, aos lisossomos, à membrana plasmática ou ao espaço extracelular – são **glicoproteínas**. Em contraste, pouquíssimas proteínas no citosol são glicosiladas e aquelas que o são portam uma modificação muito mais simples de açúcar, na qual um único grupo *N*-acetilglicosamina é adicionado a um resíduo de serina ou de treonina da proteína.

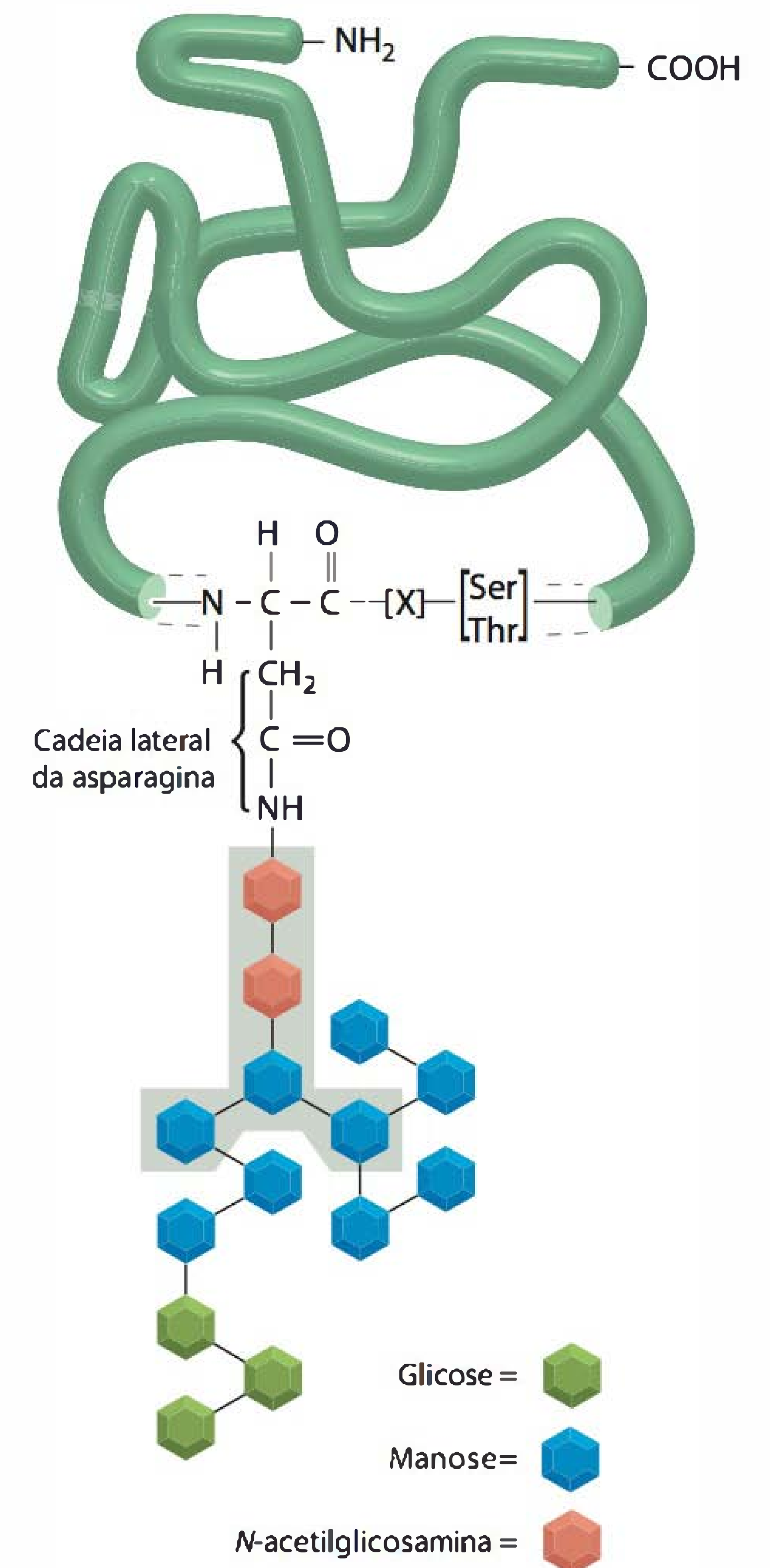


Figura 12-50 Oligossacarídeo precursor ligado à asparagina ("ligado ao *N*") que é adicionado à maioria das proteínas na membrana do RE rugoso. Os cinco açúcares na *caixa cinza* formam a "região central" desse oligossacarídeo. Para muitas glicoproteínas, somente os açúcares centrais sobrevivem ao extenso processo de acabamento com oligossacarídeos que ocorre no aparelho de Golgi. Somente as asparaginas nas sequências Asn-X-Ser e Asn-X-Thr (onde X é qualquer aminoácido, exceto prolina) são glicosiladas. Essas duas sequências ocorrem com muito menos frequência em glicoproteínas do que em proteínas citosólicas não-glicosiladas; tem existido pressão seletiva contra essas sequências durante a evolução das proteínas, provavelmente porque a glicosilação em tão poucos sítios interferiria no enovelamento da proteína.

Um importante avanço no entendimento do processo de **glicosilação de proteínas** foi a descoberta de que um *oligossacarídeo precursor* pré-formado (composto de *N*-acetilglicosamina, manose e glicose, contendo um total de 14 açúcares) é transferido *en bloc* para proteínas no RE. Esse oligossacarídeo é transferido ao grupo NH_2 da cadeia lateral de um aminoácido asparagina na proteína, sendo por isso considerado *ligado ao N* ou *ligado à asparagina* (**Figura 12-50**). A transferência é catalisada por uma enzima ligada à membrana, uma *oligossacaril-transferase*, que tem seu sítio ativo exposto no lado do lúmen da membrana do RE; esse fato explica por que as proteínas citosólicas não são glicosiladas dessa forma. O oligossacarídeo precursor é retido na membrana do RE por uma molécula lipídica especial chamada de **dolicol**, sendo transferido à asparagina-alvo em uma única etapa enzimática, imediatamente após a emergência do aminoácido para o lúmen, durante o translocamento da proteína (**Figura 12-51**). Uma cópia da oligossacaril-transferase é associada a cada proteína translocadora, permitindo a ela procurar e glicosilar as cadeias polipeptídicas que entram eficientemente.

O oligossacarídeo precursor é ligado ao lipídeo dolicol por uma ligação pirofosfato de alta energia, que providencia a energia de ativação para conduzir a reação de glicosilação ilustrada na Figura 12-51. O oligossacarídeo precursor inteiro é construído açúcar por açúcar nessa molécula de lipídeo ligada à membrana, antes da sua transferência à

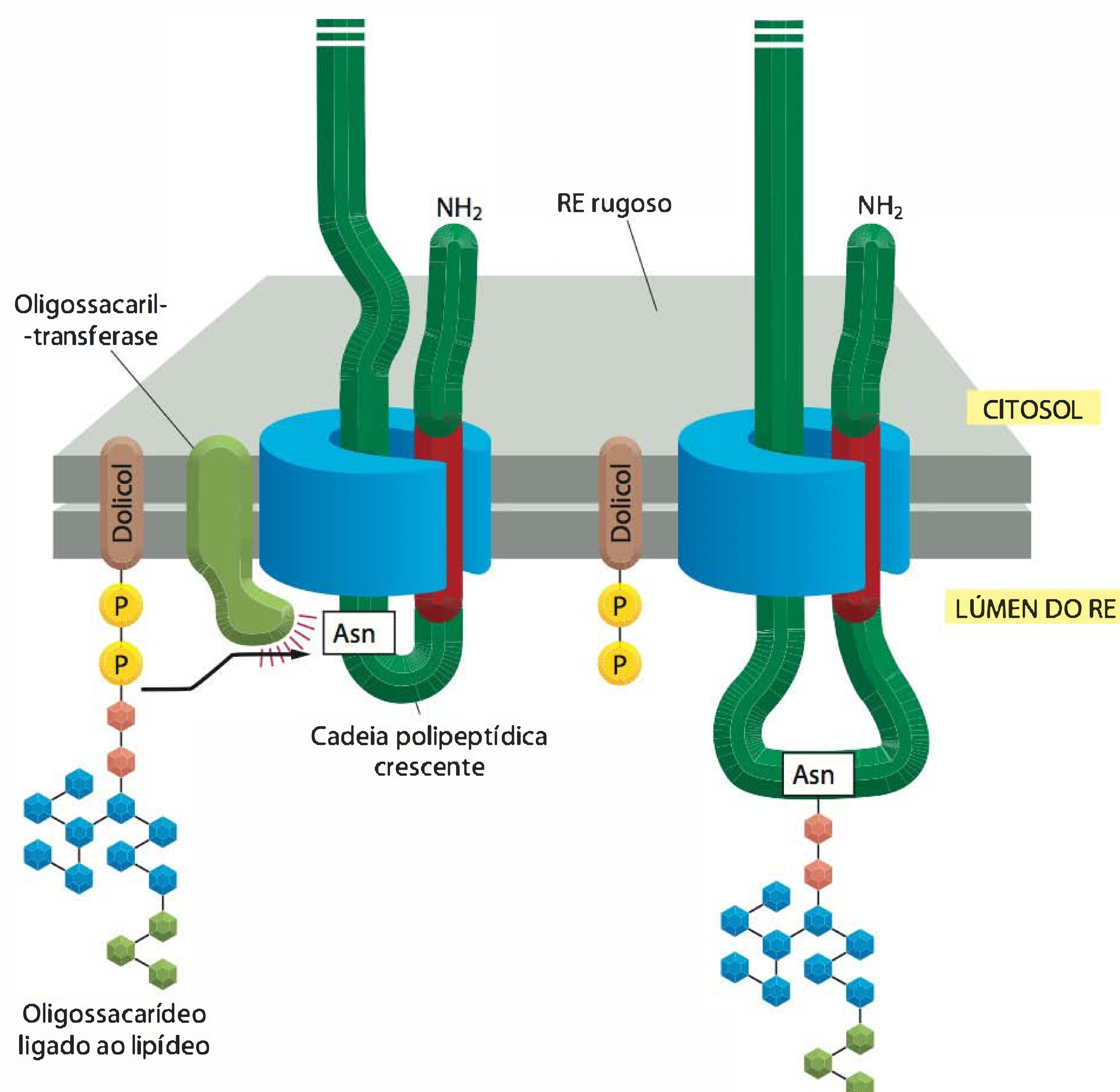


Figura 12-51 Glicosilação da proteína no RE rugoso. Quase tão logo a cadeia polipeptídica penetre o lúmen do RE, ela é glicosilada no aminoácido asparagina-alvo. O oligossacarídeo precursor mostrado na Figura 12-50 é transferido à asparagina como uma unidade intacta em uma reação catalisada por uma enzima *oligossacaril-transferase* ligada à membrana. Como ocorre com a peptidase-sinal, uma cópia dessa enzima é associada com cada proteína translocadora na membrana do RE. (O ribossomo não é mostrado.)

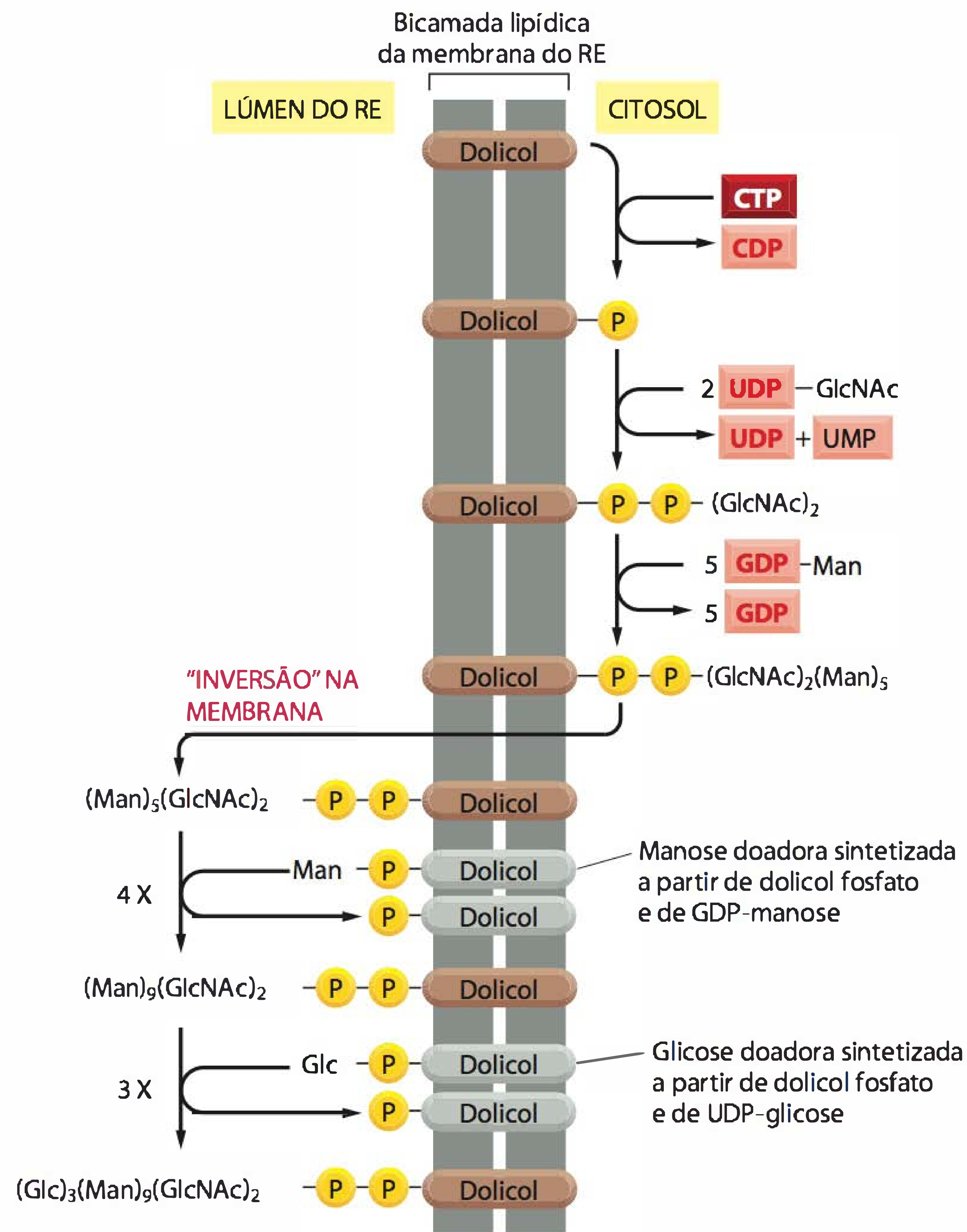


Figura 12-52 Síntese de oligossacarídeo precursor ligado a lipídeo na membrana do RE rugoso. O oligossacarídeo é montado açúcar por açúcar no carregador lipídeo dolicol (um poli-isoprenoide; ver Painel 2-5, p. 114–115). O dolicol é longo e muito hidrofóbico: suas 22 unidades de cinco carbonos podem atravessar mais de três vezes a espessura de uma bicamada lipídica. Assim, o oligossacarídeo aderido é firmemente ancorado na membrana. O primeiro açúcar é ligado ao dolicol por uma ponte pirofosfato. Essa ponte de alta energia ativa o oligossacarídeo para sua eventual transferência do lipídeo para uma cadeia lateral da asparagina de um polipeptídeo nascente no lado do lúmen do RE rugoso. Como indicado, a síntese do oligossacarídeo inicia no lado citosólico da membrana do RE e continua na face do lúmen após o lipídeo intermediário $(Man)_5(GlcNAc)_2$ ser invertido através da bicamada por uma proteína translocadora. Todas as reações subsequentes de transferência de glicosil no lado do lúmen do RE envolvem transferência de dolicol-P-glicose e dolicol-P-manose; esses monossacarídeos ativados ligados a lipídeo são sintetizados a partir de dolicol fosfato e de UDP-glicose ou de GDP-manose (quando apropriado) no lado citosólico do RE e parecem, então, ser invertidos através da membrana do RE. GlcNAc = *N*-acetilglicosamina; Man = manose; Glc = glicose.

proteína. Os açúcares são primeiramente ativados no citosol pela formação de *intermediários de nucleotídeo-açúcar*, que então doam seu açúcar (direta ou indiretamente) ao lipídeo, em uma sequência ordenada. Ao longo deste processo, o oligossacarídeo ligado ao lipídeo é movido do lado citosólico para o lado do lúmen da membrana do RE (**Figura 12-52**).

Toda a diversidade de estruturas de oligossacarídeos ligados ao *N* em glicoproteínas maduras resulta da modificação tardia do oligossacarídeo precursor original. Enquanto ainda no RE, três glicoses (ver Figura 12-50) e uma manose são rapidamente removidas dos oligossacarídeos da maioria das glicoproteínas. Retornaremos à importância da retirada rápida de glicoses. Essa "poda" ou "processamento" do oligossacarídeo continua no aparelho de Golgi e é discutido no Capítulo 13.

Os oligossacarídeos ligados ao *N* são de longe os mais comuns encontrados nas glicoproteínas. Menos frequentemente, os oligossacarídeos são ligados ao grupo hidroxila na cadeia lateral dos aminoácidos serina, treonina ou hidroxilisina. Esses *oligossacarídeos ligados ao O* são formados no aparelho de Golgi.

Os oligossacarídeos são utilizados como "rótulos" para marcar o estado de enovelamento da proteína

Tem sido longamente debatido por que a glicosilação é uma modificação comum das proteínas que entram no RE. Uma observação particularmente intrigante reside no fato de que algumas proteínas necessitam de glicosilação ligada ao *N* para o enovelamento adequado no RE, ainda que a localização precisa dos oligossacarídeos aderidos na superfície da proteína não pareça ser importante. Um indício para o papel da glicosilação no enovelamento da proteína deriva de estudos de duas proteínas chaperonas do RE que são denominadas **calnexina** e **calreticulina**, pois necessitam de Ca^{2+} para suas atividades. Essas chaperonas são *lectinas* que se ligam a oligossacarídeos nas proteínas que não estão completamente enove-

ladas e as retêm no RE. Como outras chaperonas, elas impedem que as proteínas enoveladas incompletamente sofram agregação irreversível. Ambas, calnexina e calreticulina, também promovem a associação de proteínas incompletamente enoveladas com outra chaperona do RE, que se liga a cisteínas que ainda não formaram ligações dissulfeto.

A calnexina e a calreticulina reconhecem oligossacarídeos ligados ao *N* que contêm uma única glicose terminal e, portanto, ligam-se a proteínas somente após a remoção, por glicosidases do RE, de duas das três glicoses que são inicialmente ligadas. Quando a terceira glicose é removida, a proteína dissocia-se da sua chaperona e pode deixar o RE.

Como, então, a calnexina e a calreticulina distinguem proteínas enoveladas das incompletamente enoveladas? A resposta está, ainda, em outra enzima do RE, a glicosil-transferase, que continua adicionando uma glicose àqueles oligossacarídeos que perderam sua última glicose. Ela adiciona a glicose, entretanto, somente a oligossacarídeos que estão associados a proteínas desenoveladas. Assim, uma proteína desenovelada sofre ciclos contínuos de retirada de glicose (por glicosidase) e de adição (pela glicosil-transferase) e mantém uma afinidade por calnexina e calreticulina, até alcançar seu estado de completo enovelamento (**Figura 12-53**).

As proteínas enoveladas inadequadamente são exportadas do RE e degradadas no citosol

A despeito de todo o auxílio das chaperonas, muitas moléculas proteicas (mais de 80% em algumas proteínas) transportadas para o RE falham na tentativa de alcançar seu enovelamento adequado ou seu estado oligomérico. Tais proteínas são exportadas de volta do RE para o citosol, onde são degradadas. O mecanismo de retrotranslocação, também chamado de *deslocamento*, ainda é desconhecido, mas é provável que seja similar a outros métodos pós-traducionais de translocação. Por exemplo, como a translocação para mitocôndrias ou cloroplastos, proteínas chaperonas provavelmente sejam necessárias para manter a cadeia polipeptídica em um estado desenovelado antes e durante o transporte. De maneira semelhante, a fonte de energia é necessária para dar direcionalidade ao transporte e para puxar a proteína para o citosol. Finalmente, o translocador, possivelmente composto de alguns dos mesmos componentes que são utilizados para o transporte direto para o RE (como Sec61), presumivelmente seja necessário.

Selecionar proteínas do RE para a degradação é um processo desafiador. Proteínas mal-enoveladas ou subunidades de proteínas não-agregadas poderiam ser degradadas, mas

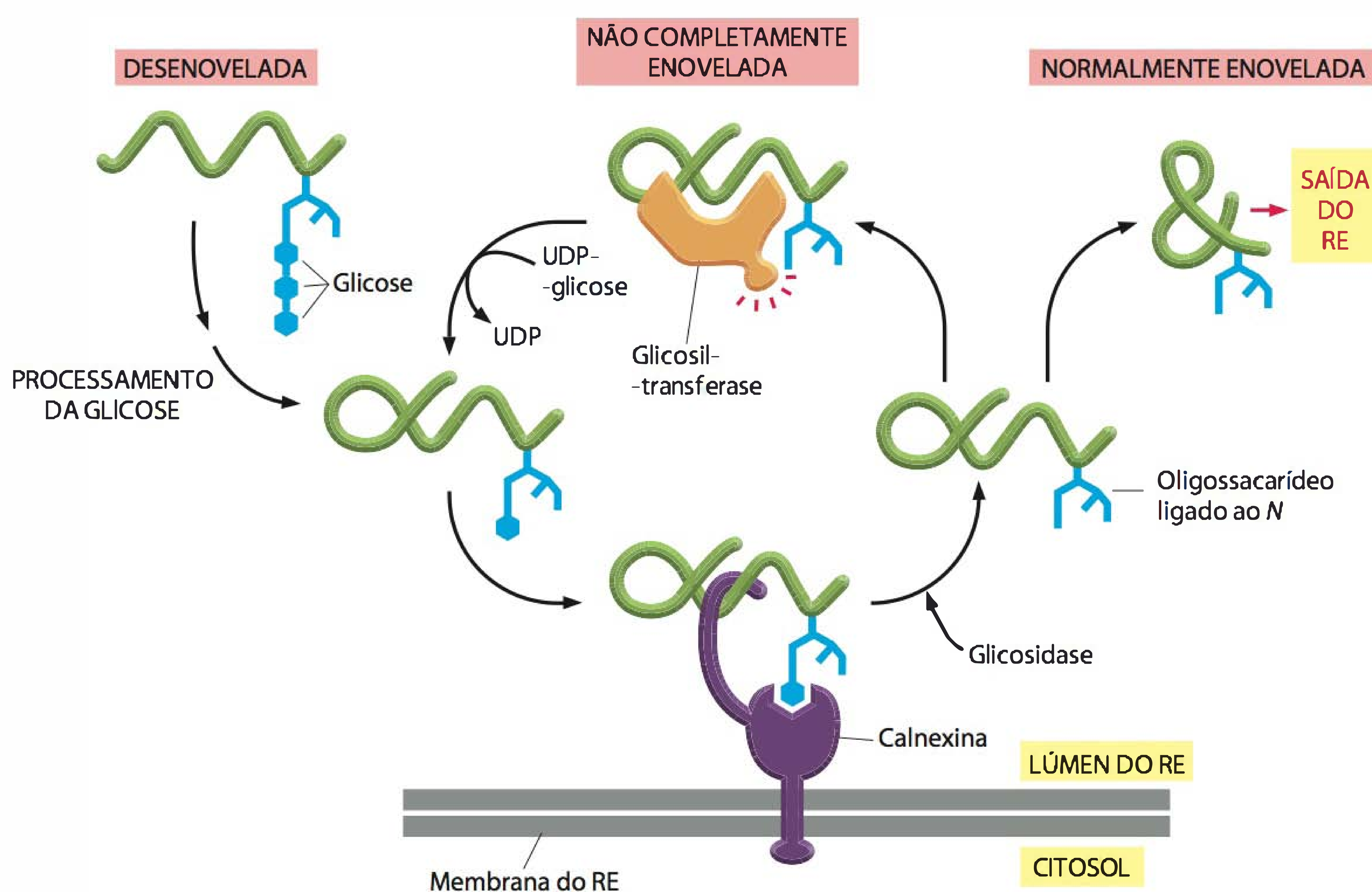


Figura 12-53 Papel da glicosilação ligada ao *N* no enovelamento da proteína do RE. A proteína chaperona ligada à membrana do RE, calnexina, liga-se a proteínas enoveladas incompletamente contendo uma glicose terminal nos oligossacarídeos ligados ao *N*, mantendo a proteína no RE. A remoção da glicose terminal por uma glicosidase libera a proteína da calnexina. Uma glicosil-transferase é a enzima fundamental que determina se a proteína está enovelada adequadamente ou não: se a proteína ainda está incompletamente enovelada, a enzima transfere uma nova glicose da UDP-glicose para o oligossacarídeo ligado ao *N*, renovando a afinidade da proteína por calnexina e retendo-a no RE. O ciclo se repete, até a proteína ter se enovelado completamente. A calreticulina atua de modo semelhante, exceto que é uma proteína solúvel residente no RE. Outra chaperona do RE, a ERp57 (não-mostrada), colabora com a calnexina e a calreticulina na retenção de proteínas enoveladas incompletamente no RE.

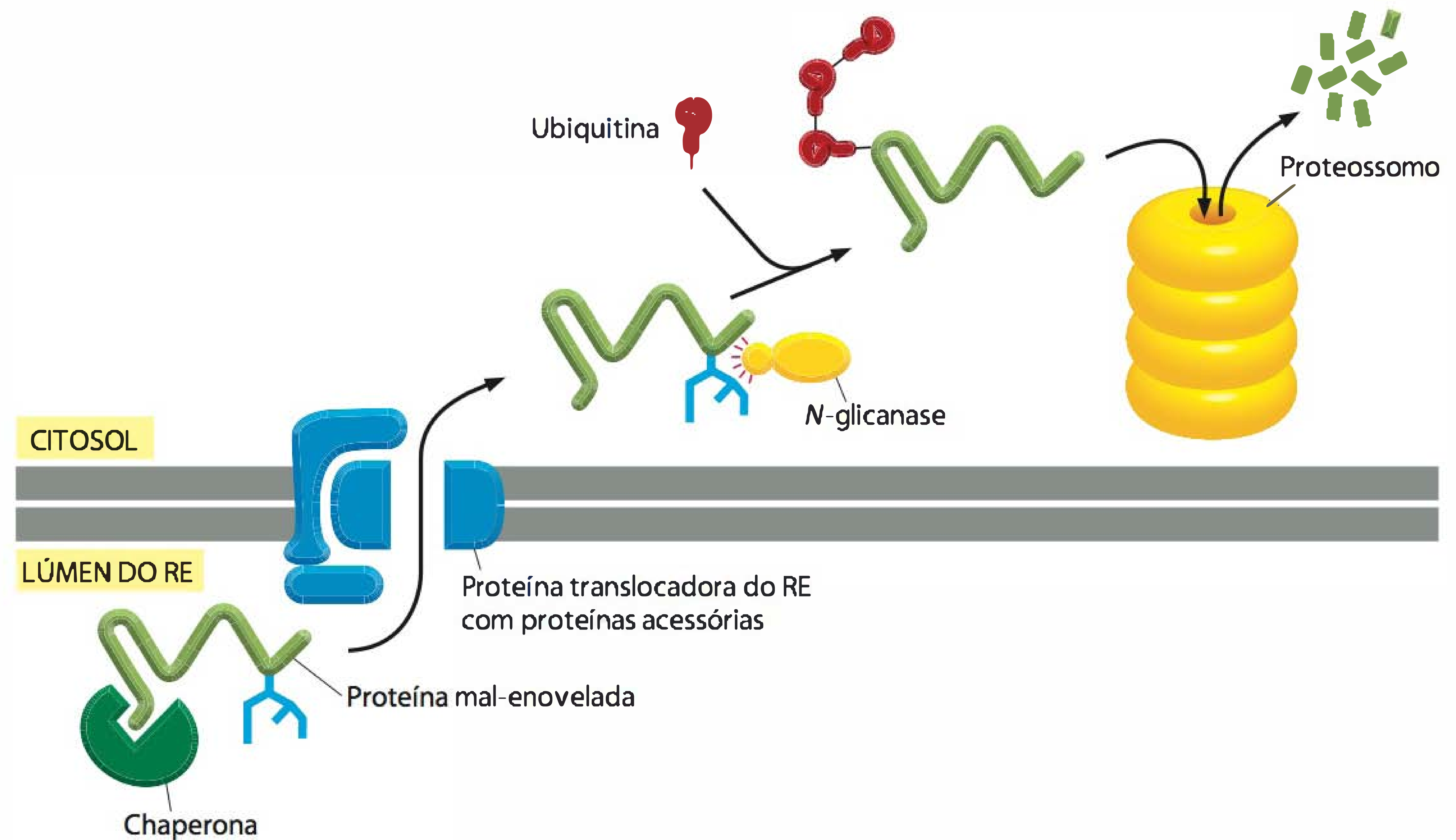


Figura 12-54 Exportação e degradação de proteínas do RE mal-enoveladas. As proteínas solúveis mal-enoveladas no lúmen do RE são translocadas de volta para o citosol, onde são desglicosiladas, ubiquitinadas e degradadas em proteossomos. As proteínas de membrana mal-enoveladas seguem uma via similar, sendo exportadas através do mesmo tipo de translocador que medeia sua importação; as proteínas acessórias associadas ao translocador permitem que ele opere na direção da exportação.

intermediários enovelados de proteínas recém-sintetizadas não deveriam ser degradados. Os oligossacarídeos *N*-ligados auxiliam a fazer essa distinção, o que serve como cronômetro da medida de quanto tempo uma proteína deve permanecer no RE. O processamento lento de uma manose particular no centro do oligossacarídeo por uma enzima (uma manosidase) no RE parece criar uma nova estrutura de oligossacarídeo que é reconhecida pelo aparato de retrotranslocação. Proteínas que se enovelam e saem do RE mais rápido que a ação da manosidase escapariam, então, da degradação.

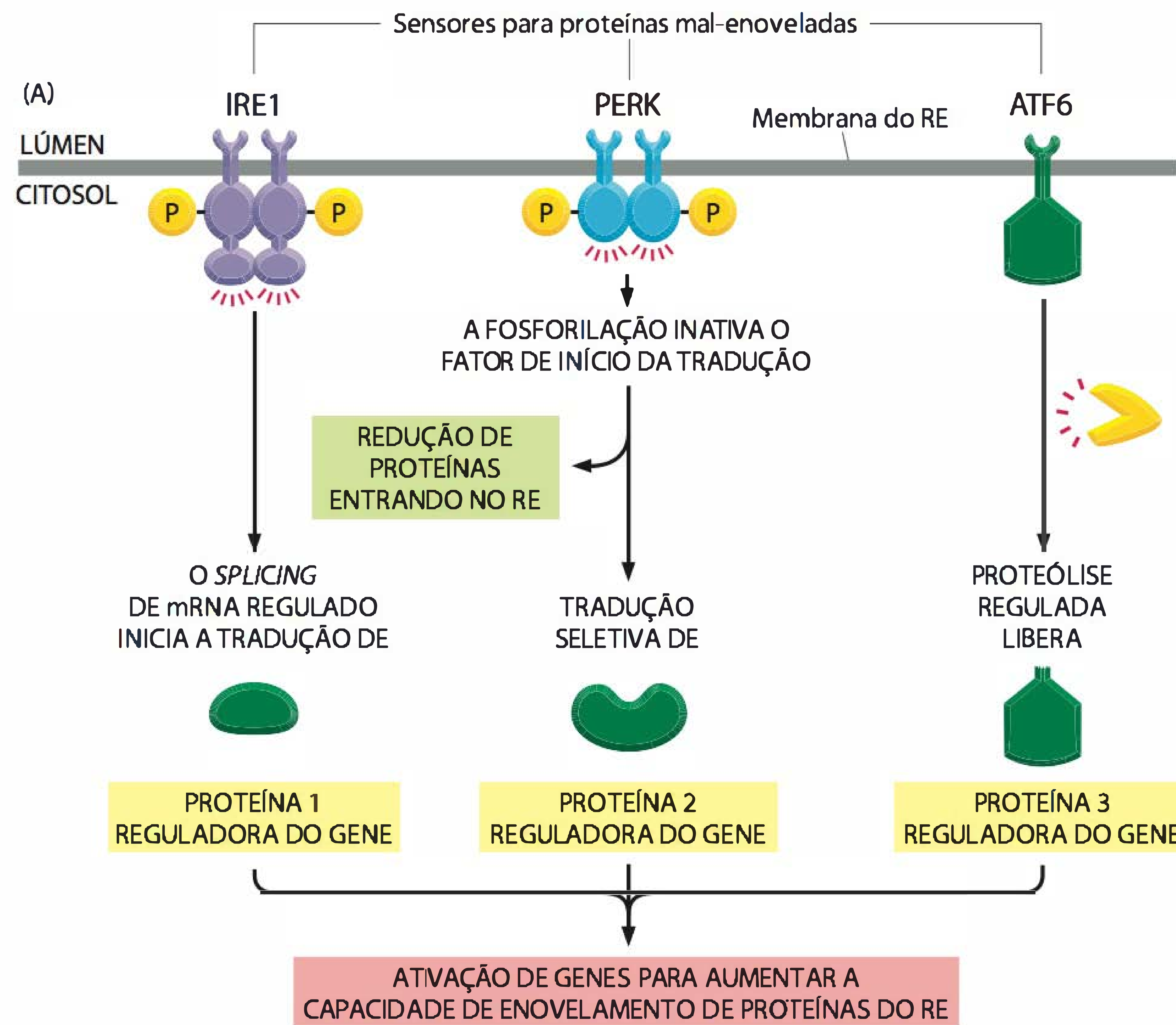
Uma vez que a proteína mal-enovelada tenha sido retrotranslocada para o citosol, uma *N*-glicanase remove suas cadeias oligossacarídicas *en bloc*. O polipeptídeo desglicosilado é rapidamente ubiquitinado pelas enzimas conjugadas à ubiquitina ligadas ao RE e é, então, enviado aos proteossomos (discutido no Capítulo 6), onde é degradado (**Figura 12-54**).

As proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático ativam uma resposta de proteína desenovelada

As células monitoram cuidadosamente a quantidade de proteínas mal-enoveladas contidas em vários compartimentos. Um acúmulo dessas proteínas no citosol, por exemplo, desencadeia uma *resposta ao choque térmico* (*heat-shock response*, dicutido no Capítulo 6), que estimula a transcrição de genes que codificam para chaperonas citosólicas que auxiliam no reenovelamento das proteínas. De modo similar, um acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE desencadeia uma **resposta de proteína desenovelada**, a qual inclui uma transcrição aumentada de genes que codificam para chaperonas do RE e enzimas envolvidas na degradação de proteínas do RE.

Como as proteínas mal-enoveladas no citosol ou no RE sinalizam ao núcleo? Existem três vias paralelas que executam a resposta de proteína desenovelada (**Figura 12-55**A). A primeira via, inicialmente descoberta em células de levedura, é notável. Uma proteína-cinase transmembrana no RE é ativada por proteínas mal-enoveladas, que induzem a sua oligomerização e autofosforilação. (Alguns receptores de superfície na membrana plasmática são ativados de forma similar, como discutido no Capítulo 15.) A oligomerização da cinase do RE leva à ativação de um domínio de endorribonuclease contido na mesma molécula. Essa nuclease cliva uma molécula de RNA citosólica específica em duas posições, excisando um íntron. Os éxons separados são então unidos por uma RNA-ligase, gerando um mRNA processado, que é traduzido nos ribossomos para produzir uma proteína reguladora de genes. A proteína migra ao núcleo e ativa a transcrição de genes codificadores de proteínas que medeiam a resposta de proteína desenovelada (Figura 12-55B).

Proteínas mal-enoveladas também ativam uma segunda cinase transmembrana no RE, que inibe um fator de início da tradução pela sua fosforilação e redução da síntese de novas proteínas na célula. Uma consequência da redução da tradução de proteínas é a redução



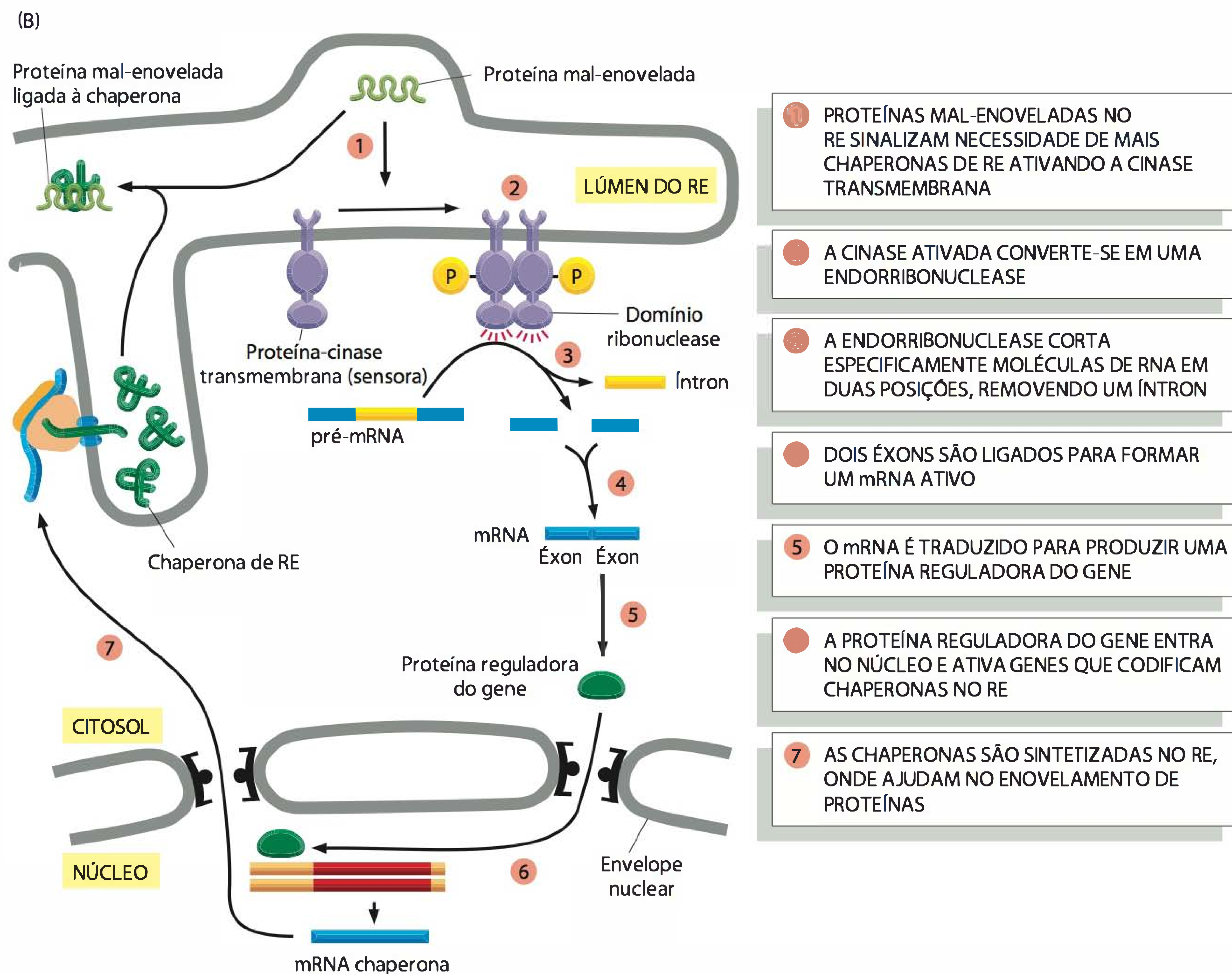


Figura 12-55 A resposta de proteína desenovelada. (A) Por três vias de sinalização intracelular, o acúmulo de proteínas mal-enoveladas no lúmen do RE sinaliza ao núcleo para ativar a transcrição de genes que codificam para proteínas que auxiliam a célula a conter a abundância de proteínas mal-enoveladas no RE. (B) O *splicing* do mRNA regulado é a chave reguladora na Via 1 de resposta de proteína desenovelada.

do fluxo de proteínas no RE, limitando então o carregamento de proteínas que necessitam ser enoveladas lá. Algumas proteínas, entretanto, são preferencialmente traduzidas quando fatores de início da tradução são escassos (ver p. 490), e um desses é uma proteína regulado-

ra do gene que auxilia a ativação da transcrição de genes que codificam proteínas ativas na resposta a proteínas mal-enoveladas.

Finalmente, uma terceira proteína reguladora do gene é inicialmente sintetizada como uma proteína integral da membrana do RE. Por ser covalentemente ligada à membrana, ela não pode ativar a transcrição de genes no núcleo. Quando proteínas mal-enoveladas acumulam-se no RE, a proteína transmembrana é transportada para o aparelho de Golgi, onde encontra proteases que clivam seus domínios citosólicos, que podem agora migrar para o núcleo e ajudar a ativar a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta a proteínas mal-enoveladas. A importância relativa de cada uma dessas três vias diverge nos tipos celulares diferentes, permitindo a cada tipo celular escolher a resposta a proteínas mal-enoveladas a sua necessidade particular.

Algumas proteínas de membrana adquirem uma âncora de glicosilfosfatidilinositol ligada covalentemente

Como discutido no Capítulo 10, várias enzimas citosólicas catalisam a adição covalente de uma única cadeia de ácido graxo ou grupo prenil a proteínas selecionadas. Um processo relacionado é catalisado por enzimas do RE, que ligam covalentemente uma **âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI**, *glycosylphosphat, dyl-inositol*) à região C-terminal de algumas proteínas de membrana com destino à membrana plasmática. Essa ligação é formada no lúmen do RE, onde, ao mesmo tempo, o segmento transmembrana da proteína é clivado (**Figura 12-56**). Um grande número de proteínas da membrana plasmática é modificado dessa forma. Uma vez que são aderidas ao exterior da membrana plasmática somente pelas suas âncoras de GPI, elas podem, em princípio, ser liberadas das células na forma solúvel, em resposta a sinais que ativam uma fosfolipase específica na membrana plasmática. Os tripanossomos parasitas, por exemplo, utilizam esse mecanismo para liberar seu revestimento de proteínas de superfície GPI-ancoradas, se atacados pelo sistema imune. As âncoras de GPI também são usadas para direcionar proteínas de membrana plasmáti-

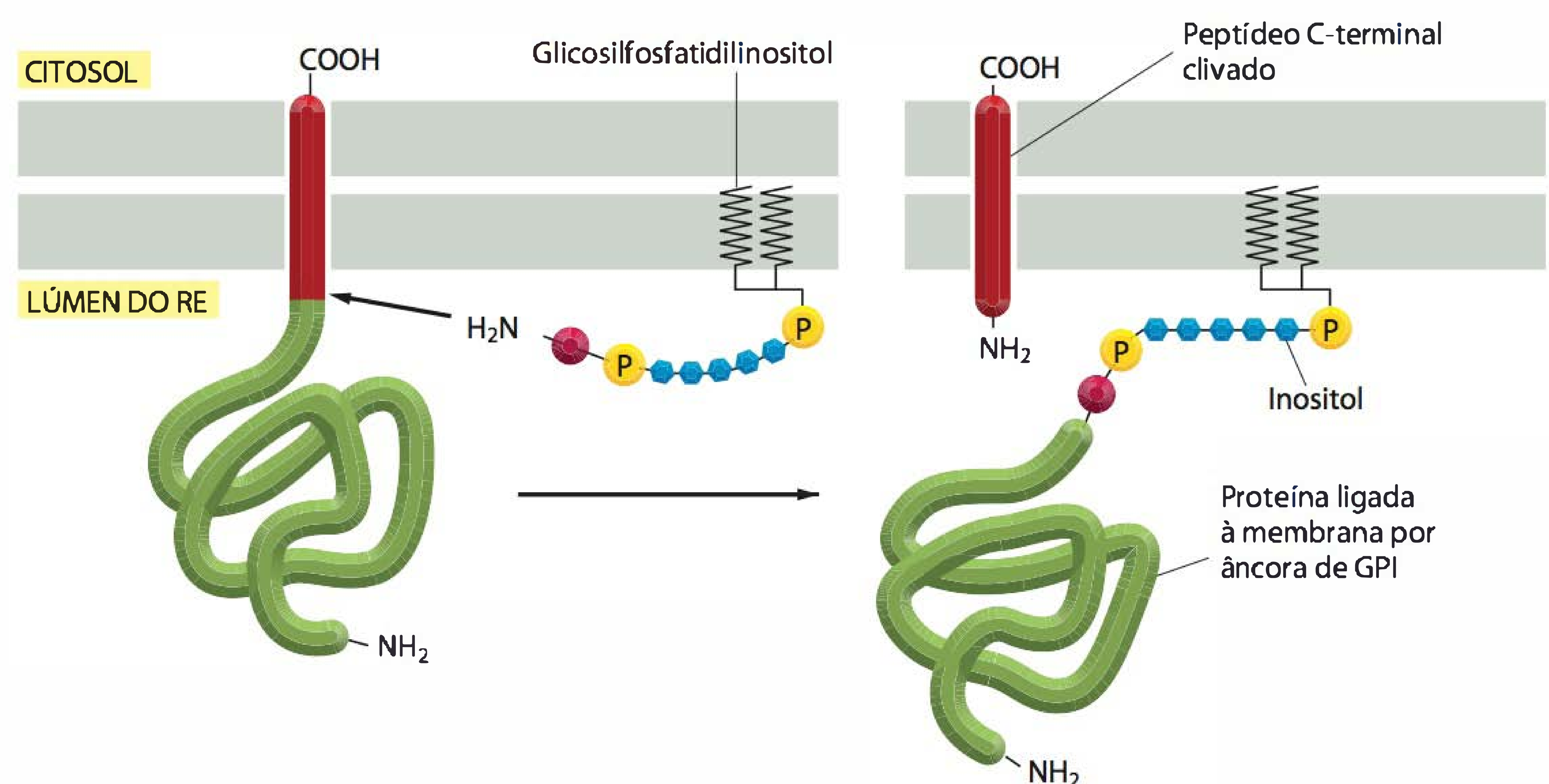


Figura 12-56 Adesão de uma âncora de GPI a uma proteína no RE. Imediatamente após o término da síntese de proteína, a proteína precursora permanece ancorada na membrana do RE por uma sequência hidrofóbica C-terminal de 15 a 20 aminoácidos; o restante da proteína está no lúmen do RE. Em um intervalo de menos de um minuto, uma enzima no RE excisa a proteína da sua região C-terminal ligada à membrana e, simultaneamente, adere a sua nova região C-terminal a um grupo amino em uma GPI intermediária pré-sintetizada. A cadeia de açúcar contém um inositol aderido ao lipídeo do qual a âncora de GPI deriva seu nome. Ela é seguida por uma glicosamina e três manoses. A manose terminal liga-se a uma fosfoetanolamina que fornece o grupo amino para a ligação da proteína. O sinal que especifica essa modificação está contido na sequência hidrofóbica C-terminal e em uns poucos aminoácidos adjacentes a ela no lado do lúmen da membrana do RE; se esse sinal é adicionado a outras proteínas, elas também modificam-se dessa forma. Devido ao fato de a âncora de lipídeo estar covalentemente ligada, a proteína permanece aderida à membrana, com todos os seus aminoácidos expostos inicialmente no lúmen do RE e, eventualmente, no exterior celular.

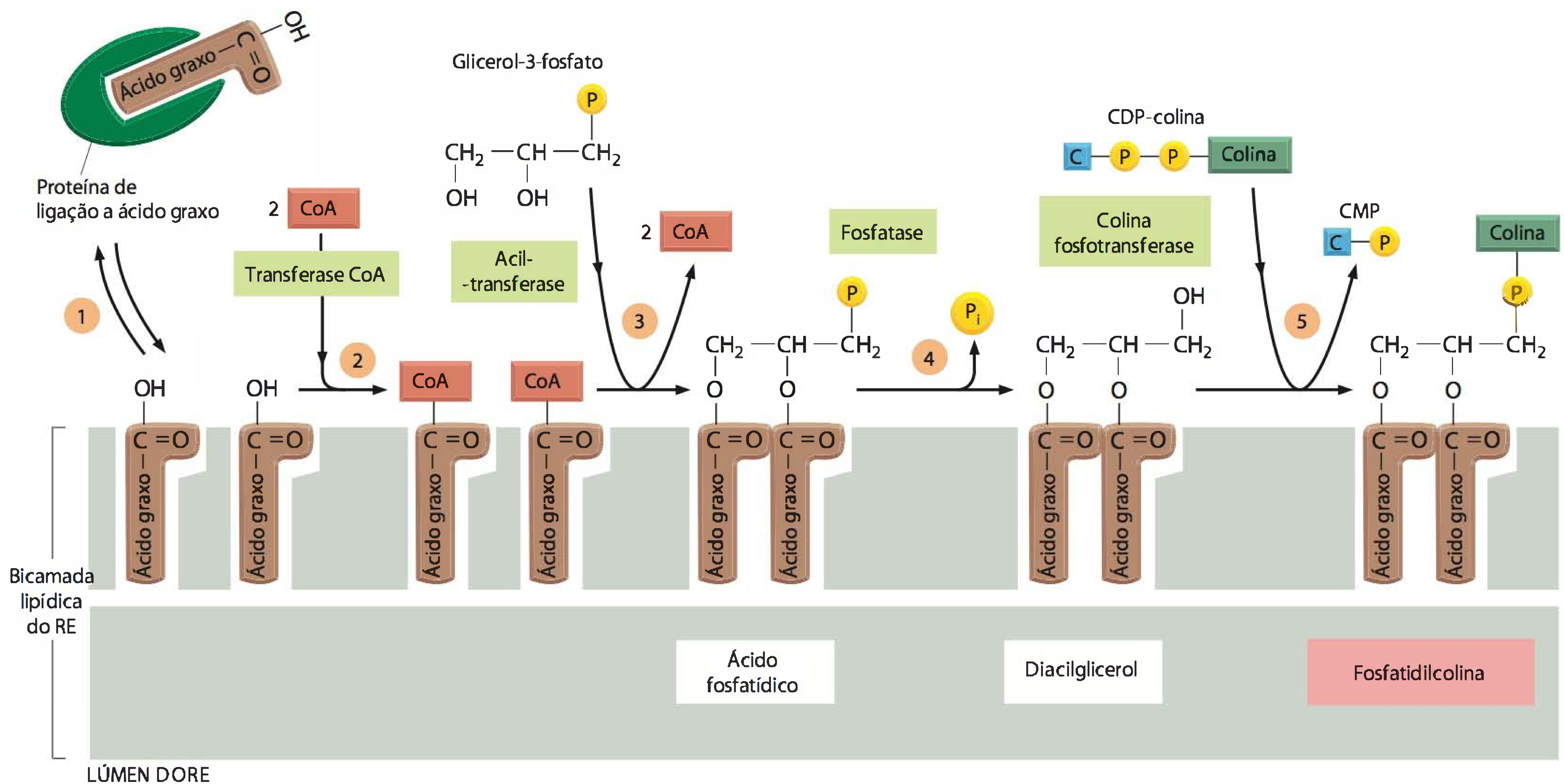


Figura 12-S7 Síntese de fosfatidilcolina. Como ilustrado, esse fosfolipídeo é sintetizado a partir de glicerol-3-fosfato, citidina-difosfocolina (CDP-colina) e ácidos graxos entregues ao RE por proteínas ligadas a ácidos graxos.

ca para *placas lipídicas* e, assim, segregar as proteínas de outras proteínas de membrana, como discutido no Capítulo 13.

A maioria das bicamadas lipídicas é montada no retículo endoplasmático

A membrana do RE sintetiza quase todas as principais classes de lipídeos, incluindo fosfolipídeos e colesterol necessários à produção de novas membranas celulares. O principal fosfolipídeo sintetizado é a *fosfatidilcolina* (também chamada de *lecitina*), que pode ser formada em três etapas a partir de colina, de dois ácidos graxos e de glicerol fosfato (**Figura 12-57**). Cada etapa é catalisada por enzimas na membrana do RE que têm seus sítios ativos voltados para o citosol, onde são encontrados todos os metabólitos necessários. Assim, a síntese de fosfolipídeos ocorre exclusivamente na lâmina citosólica da membrana do RE. Devido ao fato de os ácidos graxos não serem solúveis em água, eles são conduzidos dos seus sítios de síntese ao RE por proteínas de ligação a ácidos graxos no citosol. Depois de chegarem na membrana do RE e serem ativadas com coenzima A (CoA), acil-transferases adicionam dois ácidos graxos sucessivamente ao glicerol fosfato para produzir ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico é suficientemente insolúvel em água para permanecer na bicamada lipídica, e não pode ser extraído dela por proteínas de ligação a ácidos graxos. Esse é então o primeiro passo para que a bicamada lipídica seja aumentada. As etapas posteriores determinam o grupo da cabeça de uma molécula de lipídeo recém-formada e, portanto, a natureza química da bicamada, mas não resultam em crescimento líquido da membrana. Os dois outros fosfolipídeos principais de membrana – fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina –, bem como o fosfolipídeo menor fosfatidilinositol (PI), são todos sintetizados dessa maneira.

Pelo fato de a síntese lipídica ocorrer na metade citosólica da bicamada do RE, existe a necessidade de um mecanismo que transfira algumas das moléculas fosfolipídicas recém-formadas à lâmina do lúmen da bicamada. Nas bicamadas lipídicas sintéticas não existe um mecanismo de transferência de moléculas recém-sintetizadas para o lúmen. No RE, todavia, os fosfolipídeos equilibram-se através da membrana em minutos, o que é quase

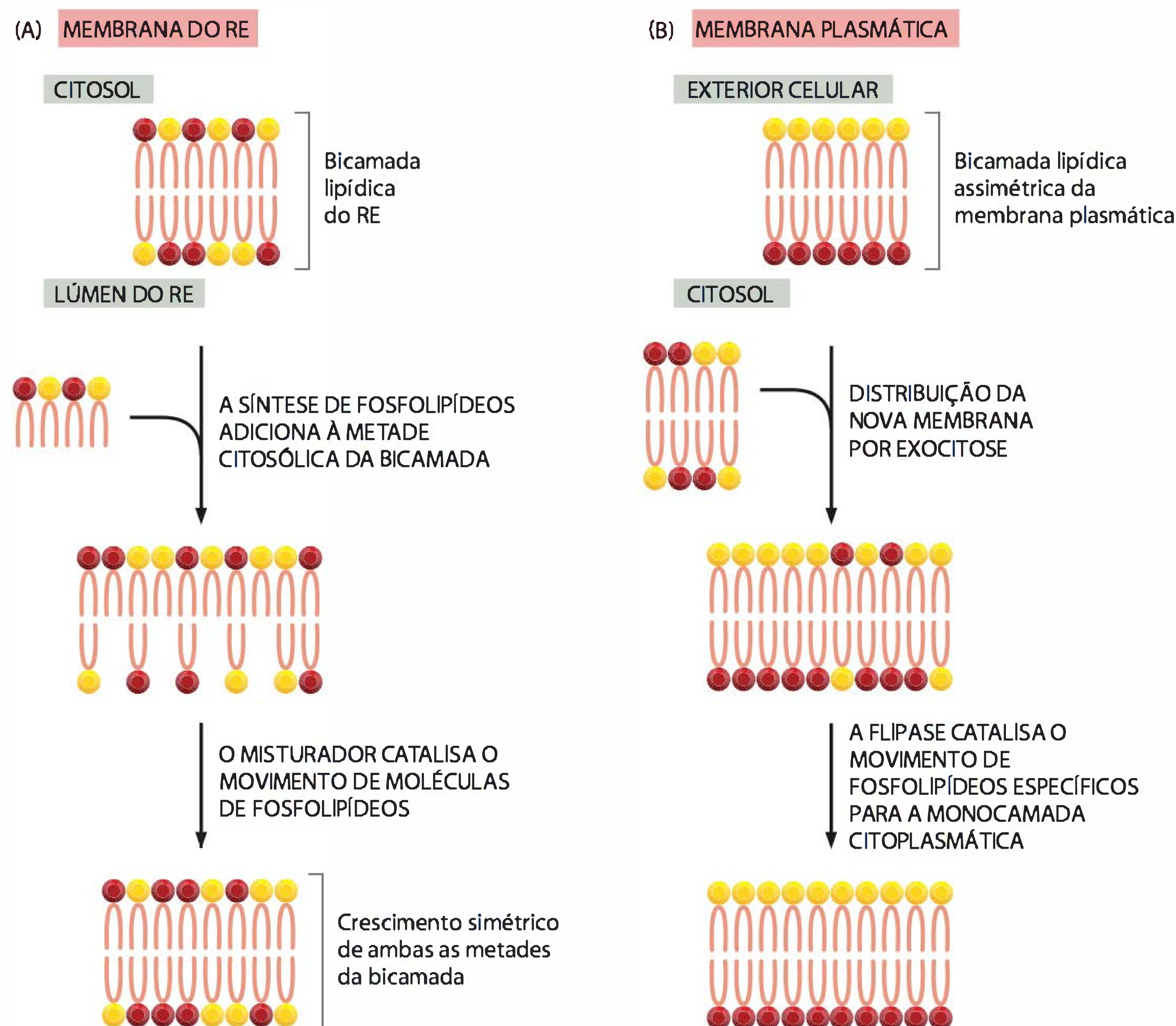


Figura 12-58 Papel dos translocadores de fosfolipídeos na síntese da bicamada lipídica. (A) Uma vez que novas moléculas de lipídeos são adicionadas somente à metade citosólica da bicamada, e que as moléculas de lipídeos não se movem espontaneamente de uma monocamada à outra, o translocador de fosfolipídeo ligado à membrana (chamado de "misturador") é necessário para transferir moléculas de lipídeo da metade citosólica à metade do lúmen, de modo que a membrana desenvolva-se como uma bicamada. O "misturador" não é específico para grupos da cabeça de fosfolipídeo em particular e, portanto, equilibra os diferentes fosfolipídeos entre as duas monocamadas. (B) Alimentada pela hidrólise de ATP, uma flipase grupo da cabeça-específica na membrana plasmática move ativamente fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina direcionalmente da lâmina extracelular à lâmina citosólica, criando a assimetria característica da bicamada lipídica da membrana plasmática de células animais (ver Figura 10-16).

cem mil vezes mais rápido que o "*flip-flop*" (retorno) espontâneo. Esse movimento transbicamada rápido é mediado por um translocador de fosfolipídeos pobremente caracterizado, denominado *embaralhador* (*scramblase*) que equilibra fosfolipídeos entre as duas lâminas da bicamada lipídica (**Figura 12-58**). Assim, os diferentes tipos de fosfolipídeos parecem ser igualmente distribuídos entre as duas lâminas da membrana do RE.

A membrana plasmática contém um tipo diferente de translocador fosfolipídico que pertence à família de transportadores de absorção do tipo P (discutido no Capítulo 11). Essas *flipases* removem especificamente fosfolipídeos contendo grupos amino livres (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina – ver Figura 10-3) da lâmina extracelular e utilizam a energia de hidrólise de ATP para movê-los direcionalmente à lâmina citosólica. A membrana plasmática, portanto, apresenta uma composição fosfolipídica altamente assimétrica, que é ativamente mantida por flipases (ver Figura 10-16). A membrana plasmática também contém um misturador, mas, em contraste com o misturador do RE, que é sempre ativo, a enzima da membrana plasmática é regulada e ativada apenas em algumas situações, como em apoptose e em plaquetas ativadas, onde age para cancelar a assimetria lipídica; a exposição resultante de fosfatidilserina na superfície de células apoptóticas serve como um sinal para células fagocíticas ingerirem e degradarem a célula morta.

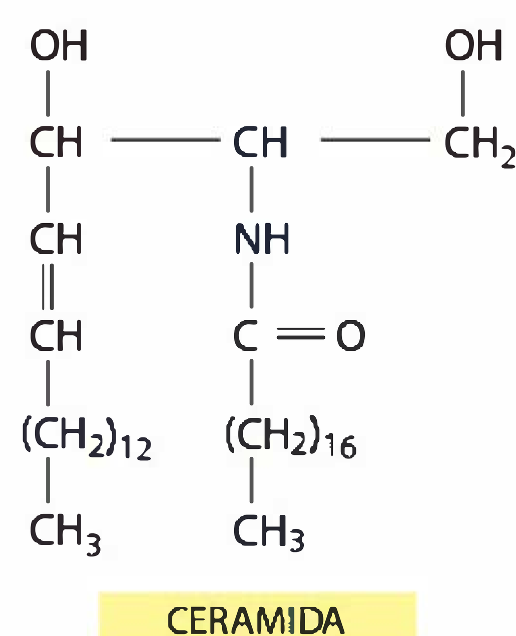


Figura 12-59 A estrutura da ceramida.

O RE também produz colesterol e ceramida (**Figura 12-59**). A *ceramida* é sintetizada pela condensação do aminoácido serina com um ácido graxo para formar o amino álcool *esfingosina* (ver Figura 10-3); um segundo ácido graxo é então adicionado para formar a

ceramida. A ceramida é exportada ao aparelho de Golgi, onde serve como um precursor para a síntese de dois tipos de lipídeos: as cadeias oligossacarídicas são adicionadas para formar *glicoesfingolipídeos* (glicolipídeos; ver Figura 10-18), e os grupos da cabeça de fosfocolina são transferidos da fosfatidilcolina a outras moléculas de ceramida para formar *esfingomielina* (discutido no Capítulo 10). Assim, ambos, glicolipídeos e esfingomielina, são produzidos tardiamente no processo de síntese de membrana. Pelo fato de que são produzidos por enzimas expostas ao lúmen do Golgi e não são substratos para transportadores de lipídeos, são encontrados exclusivamente na lâmina não-citosólica da bicamada lipídica que os contém.

Como discutido no Capítulo 13, a membrana plasmática e as membranas do aparelho de Golgi, os lisossomos e os endossomos fazem parte de um sistema de membranas que se comunica com o RE por meio do transporte de vesículas que transferem proteínas e lipídeos. As mitocôndrias e os plastídeos, todavia, não pertencem a esse sistema e requerem, portanto, mecanismos diferentes para a importação de proteínas e de lipídeos para o crescimento. Já vimos que a maioria das proteínas nessas organelas é importada do citosol. Embora as mitocôndrias modifiquem alguns dos lipídeos que importam, não sintetizam lipídeos *de novo*; antes, seus lipídeos devem ser importados do RE, ainda que direta ou indiretamente, por meio de outras membranas celulares. Em ambos os casos, são necessários mecanismos especiais para a transferência. Os detalhes de como a distribuição dos lipídeos entre diferentes membranas é catalisada e regulada não são conhecidos. Proteínas carreadoras solúveis em água chamadas de *proteínas de troca de fosfolipídeos* (ou *proteínas de transferência de fosfolipídeos*) transferem moléculas individuais de fosfolipídeos entre as membranas, funcionando como proteínas de ligação a ácidos graxos que guiam ácidos graxos através do citosol. Além disso, mitocôndrias frequentemente são vistas em justaposição com as membranas do RE, em micrografias eletrônicas, e podem existir mecanismos específicos de transferência de lipídeos que operam entre membranas adjacentes.

Resumo

A extensa rede do RE serve como uma fábrica para a produção de quase todos os lipídeos das células. Além disso, a maior porção da síntese de proteínas celulares ocorre na superfície citosólica do RE: todas as proteínas destinadas à secreção e todas aquelas destinadas ao próprio RE, o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos e a membrana plasmática são importadas, primeiramente, do citosol para o RE. No lúmen do RE, as proteínas enovelam-se e oligomerizam-se; ligações dissulfeto são formadas, e oligossacarídeos N-ligados são adicionados. A glicosilação N-ligada é utilizada para indicar o grau do enovelamento proteico, de tal modo que as proteínas deixam o RE somente quando estão adequadamente enoveladas. As proteínas que se enovelam ou oligomerizam corretamente são transportadas de volta ao citosol, onde são desglicosiladas, ubiquitinadas e degradadas em proteossomos. Se as proteínas mal-enoveladas acumulam-se extensivamente no RE, elas desencadeiam uma resposta de proteína desenovelada, que ativa genes apropriados no núcleo, para auxiliar o RE a contornar o problema.

Somente as proteínas que portam uma sequência-sinal especial do RE são importadas para ele. A sequência-sinal é reconhecida por uma partícula de reconhecimento de sinalização (SRP), que liga a cadeia polipeptídica crescente e um ribossomo e os direciona a uma proteína receptora na superfície citosólica da membrana do RE rugoso. Essa ligação à membrana do RE inicia o processo de transporte por forçar uma alça da cadeia polipeptídica através da membrana do RE, pelo poro hidrofílico, em uma proteína translocadora transmembrana. As proteínas solúveis – destinadas ao lúmen do RE para secreção ou transferência ao lúmen de outras organelas – passam completamente para o lúmen do RE. As proteínas transmembrana destinadas ao RE ou a outras membranas celulares são transportadas parcialmente através da membrana do RE e permanecem ancoradas lá por uma ou mais regiões de hélice α em sua cadeia polipeptídica que atravessam a membrana. Essas porções hidrofóbicas da proteína podem atuar como sinais de início ou de parada da transferência durante o processo de translocamento. Quando um polipeptídeo contém múltiplos sinais alternantes de início e de parada da transferência, ele passará múltiplas vezes para trás e para a frente através da bicamada como uma proteína transmembrana de múltiplas passagens.

A assimetria da inserção da proteína e da glicosilação no RE estabelece a lateralidade das membranas de todas as outras organelas que o RE supre com proteínas de membrana.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

12-1 Assim como o lúmen do RE, o interior do núcleo é topologicamente equivalente ao exterior celular.

12-2 Ribossomos ligados à membrana ou livres, que são estrutural e funcionalmente idênticos, diferem apenas em proteínas sintetizadas em um determinado momento.

12-3 Para evitar a inevitável aglomeração que poderia ocorrer se um tráfego de duas vias passasse em um único poro, complexos do poro nuclear especializados fazem a mediação da importação, enquanto outros fazem a mediação da exportação.

12-4 Peroxissomos são encontrados em apenas poucos tipos especializados de células eucarióticas.

12-5 Em proteínas transmembrana de múltiplas passagens, segmentos transmembrana ímpares (contando da região N-terminal) agem como sinais de início da transferência e os segmentos pares agem como sinais de parada da transferência.

Discuta as seguintes questões.

12-6 Qual o destino de uma proteína sem sinal de saída?

12-7 Imagine que você tenha modificado geneticamente um conjunto de genes, cada um codificando uma proteína com um par de sequências-sinal conflitantes que especificam para diferentes compartimentos. Se os genes foram expressos em uma célula, decida que sinal poderia ser usado nas seguintes combinações. Justifique.

A. Sinais de importação para o núcleo e importação para o RE.
B. Sinais de importação para peroxissomos e importação para o RE.
C. Sinais de importação para mitocôndrias e retenção no RE.
D. Sinais de importação para o núcleo e exportação do núcleo.

12-8 O RE rugoso é o local de síntese de muitas classes diferentes de proteínas de membrana. Algumas dessas proteínas permanecem no RE, enquanto outras são distribuídas para compartimentos como o aparelho de Golgi, os lisossomos e a membrana plasmática. Uma medida da dificuldade do problema da distribuição é o grau de "purificação" que deve ser alcançado durante o transporte do RE. As proteínas ligadas à membrana plasmática entre todas as proteínas da membrana do RE são comuns ou raras?

Uma simples consideração permite responder a essa questão. Em um crescimento celular típico que está se dividindo uma vez a cada 24 horas, o equivalente de uma nova membrana plasmática deve transitar no RE a cada dia. Se a membrana do RE é 20 vezes a área de uma membrana plasmática, qual é a razão das proteínas da membrana plasmática com relação a outras proteínas de membrana no RE? (Assuma que todas as proteínas nas suas vias da membrana plasmática permanecem no RE por 30 minutos em média antes de saírem, e que a razão entre proteínas e lipídeos no RE e membranas do plasma é a mesma.)

12-9 Antes dos complexos do poro nuclear serem bem entendidos, não estava claro se proteínas nucleares difundiam-se passivamente para o núcleo e acumulavam-se lá pela ligação a "residentes" do núcleo, como cromossomos, ou eram ativamente transportadas e acumuladas apesar da sua afinidade por componentes nucleares.

Um experimento clássico que resolve esse problema usou muitas formas de nucleoplasmina radiativa, que é uma proteína pentamérica grande, envolvida na agregação da cromatina. Nesse experimento, tanto a proteína intacta quanto cabeças, caudas, ou cabeças com uma única cauda de nucleoplasmina, foram injetadas no citoplasma de um oócito ou núcleo de um sapo (**Figura Q12-1**). Todas as formas de nucleoplasmina, exceto cabeças, acumulam-se no núcleo quando injetadas no citoplasma, e todas as formas foram retidas no núcleo quando injetadas nele.

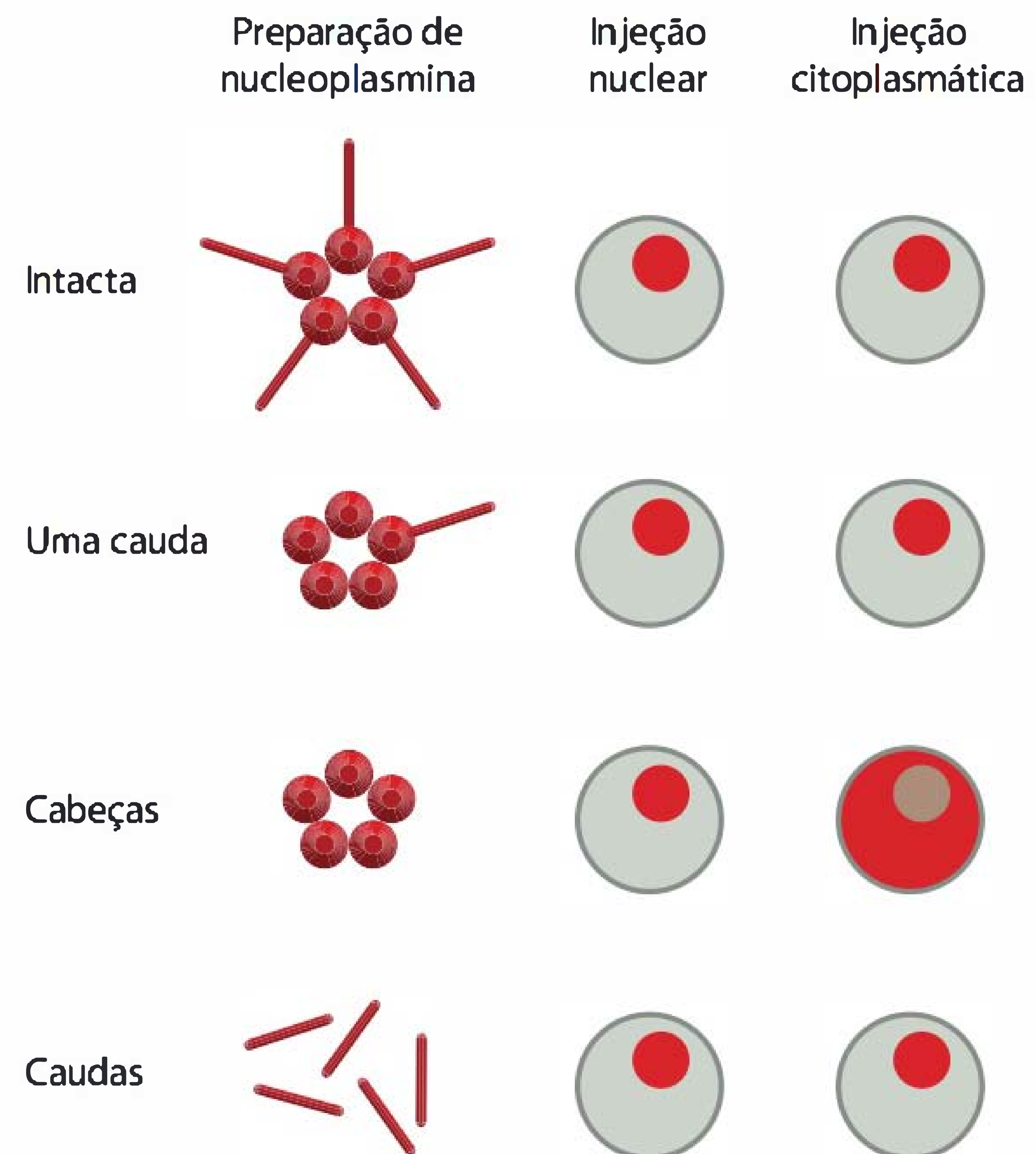


Figura Q12-1 Localização celular da injeção de nucleoplasmina e componentes de nucleoplasmina (Questão 12-9). Diagramas esquemáticos de autorradiografias mostram o citoplasma e o núcleo com a localização da nucleoplasmina indicada pelas áreas *vermelhas*.

A. Que porção da molécula de nucleoplasmina é responsável pela localização no núcleo?
B. Como esses experimentos distinguem entre transporte ativo, no qual um sinal de localização nuclear dispara o transporte pelo complexo do poro nuclear, e difusão passiva, na qual o sítio de ligação para um componente nuclear permite o acúmulo no núcleo?

12-10 Assumindo que 32 milhões de octâmeros de histonas são necessários para empacotar o genoma humano, como muitas moléculas de histonas devem ser transportadas, por segundo, por complexo do poro, em células cujo núcleo contém 3 mil poros nucleares e estão se dividindo uma vez por dia?

12-11 Estruturas de Ran-GDP e Ran-GTP (na verdade Ran-GppNp, um análogo estável do GTP) são notavelmente diferentes, como mostrado na **Figura Q12-2**. Não surpreendentemente, Ran-GDP liga-se a um conjunto diferente de proteínas daquelas de Ran-GTP.

Para o entendimento da entrada de Ran no núcleo de células permeabilizadas, você liga um marcador fluorescente vermelho a uma cisteína da cadeia lateral de Ran para torná-lo visível. Esse Ran modificado auxilia a visualização da entrada normal no núcleo. Ran-GDP fluorescente é capturado pelo núcleo apenas se o

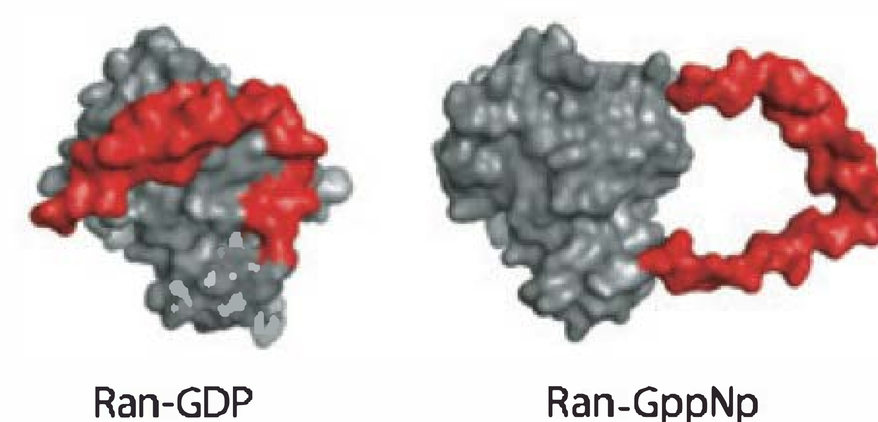


Figura Q12-2 Estruturas de Ran-GDP e Ran-GppNp (Questão 12-11). As *porções vermelhas* das estruturas mostram o segmento de Ran que difere mais dramaticamente quando GDP ou o análogo GTP está ligado.

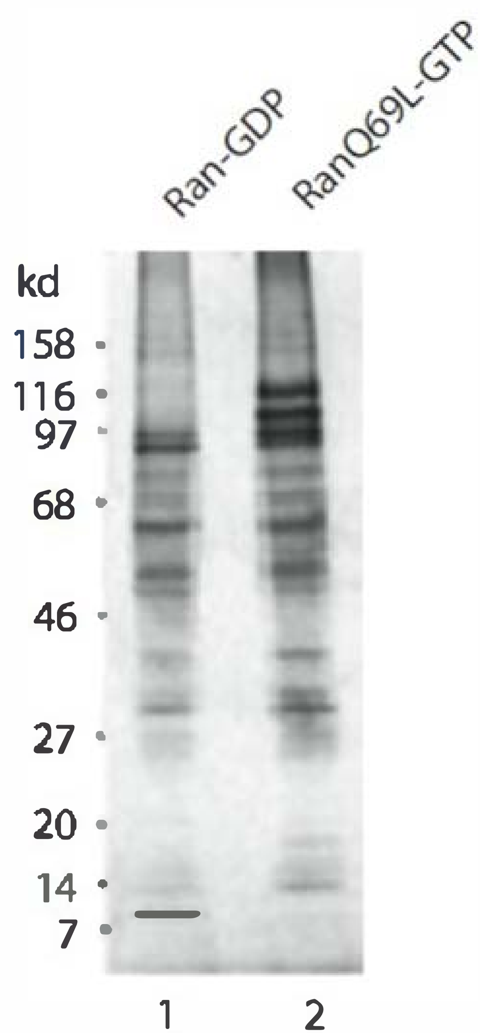


Figura Q12-3 Proteínas eluídas de colunas de afinidade (Questão 12-11) de Ran-GDP (linha 1) e RanQ69L-GTP (linha 2). Os pesos moleculares do marcador são mostrados à *esquerda*. (De K. Ribbeck et.al., *EMBO J.* 17:6587-6598, 1998. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

conteúdo do citoplasma é adicionado, enquanto uma forma mutante, RanQ69L-GTP, que não é hábil em hidrolisar GTP, não é capturada na presença ou ausência do conteúdo citoplasmático. Para identificar a proteína citoplasmática que é crucial para a captura de Ran-GDP, você constrói colunas de afinidade com Ran-GDP ou RanQ69L-GTP e passa o citoplasma por essa coluna. Após a passagem do citoplasma por uma coluna Ran-GDP, não ocorre a entrada de Ran-GDP no núcleo, enquanto o citoplasma passado pela coluna RanQ69L-GTP retém esta atividade. Você elui as proteínas ligadas em cada coluna e analisa as amostras em gel de poliacrilamida-SDS, verificando diferenças que poderiam identificar o fator que é requerido para a absorção nuclear de Ran (**Figura Q12-3**).

A. Por que você usa RanQ69L-GTP ao invés de Ran-GDP nesses experimentos? Poderia Ran-GppNp no lugar de RanQ69L-GTP ter obtido a mesma resposta?

B. Quais das muitas proteínas eluídas das duas colunas diferentes de afinidade são os prováveis candidatos para ser o fator que promove a importação nuclear de Ran-GDP?

C. A que outra proteína, ou proteínas, você acha que o fator de importação de Ran-GDP poderia se ligar com o objetivo de realizar sua função?

D. Como você poderia confirmar que o fator que foi identificado é necessário para promover a entrada nuclear de Ran?

12-12 Componentes do complexo TIM, proteínas translocadoras multissubunidade na membrana interna da mitocôndria, são muito menos abundantes do que aqueles do complexo TOM. Eles foram inicialmente identificados pelo uso de "truques" genéticos. O gene *Ura3* de levedura, cujo produto normalmente é localizado no citosol, onde é essencial para a síntese de uracila, foi modificado para carregar um sinal de importação para a matriz mitocondrial. Uma população de células carregando o gene *Ura3* modificado foi então cultivada na ausência de uracila. Muitas células morreram, mas as raras células que cresceram mostraram um defeito para a importação mitocondrial. Explique como essa seleção identifica células com defeitos nos componentes necessários para a importação mitocondrial. Por que células normais com o gene *Ura3* modificado não cresceram na ausência de uracila? Por que células que são defectivas para a importação mitocondrial crescem na ausência de uracila?

12-13 Se a enzima diidrofolato-redutase (DHFR), que normalmente está localizada no citosol, foi modificada geneticamente para carregar uma sequência-alvo mitocondrial na sua porção N-terminal, ela é eficientemente importada para a mitocôndria. Se a DHFR modificada é primeiro incubada com metotrexato, que se liga fortemente ao sítio ativo, a enzima permanece no citosol. Como você supõe que a ligação do metotrexato interfere na importação mitocondrial?

12-14 Por que a mitocôndria necessita de um translocador especial para importar proteínas através da membrana externa? Suas membranas externas possuem grandes poros formados por porinas.

12-15 A catalase, uma enzima normalmente encontrada em peroxissomos, está presente em quantidades normais na célula que não possui peroxissomos visíveis. É possível determinar a localização da catalase em tais células usando microscopia de imunofluorescência com anticorpos específicos para catalase. Micrografias de fluorescência de células normais e células deficientes em peroxissomos são mostradas na **Figura Q12-4**. Onde a catalase está localizada em células sem peroxissomos (Figura Q12-4B)? Por que a catalase aparece como pequenos pontos de fluorescência em células normais (Figura Q12-4A)?

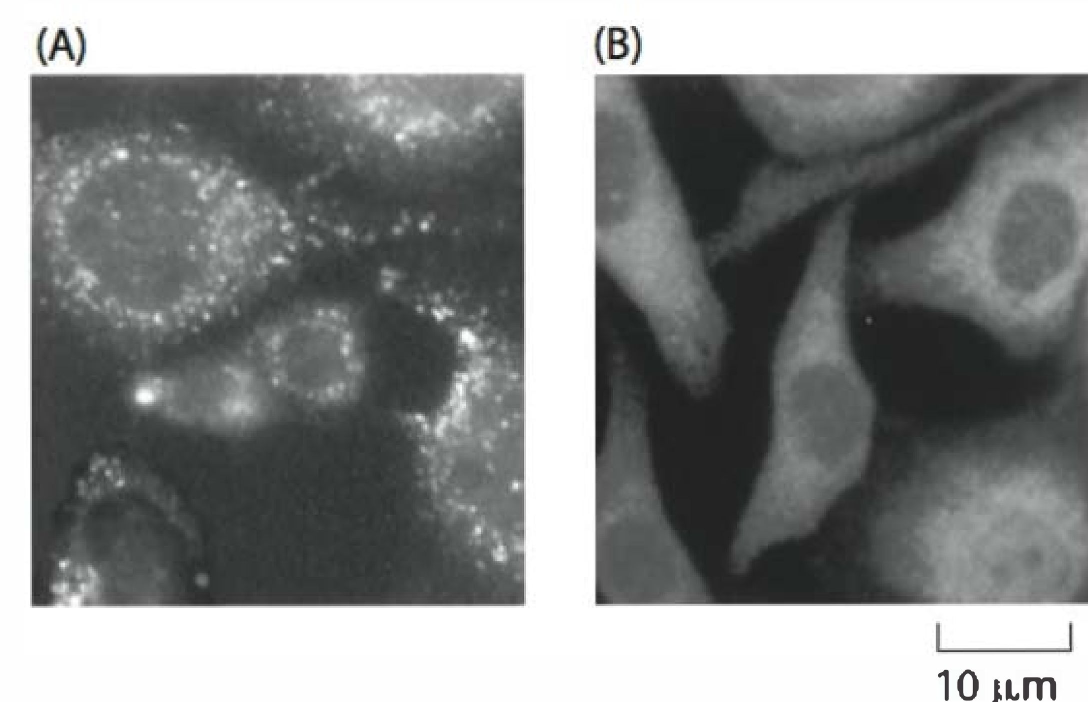


Figura Q12-4 Localização da catalase em células determinada por microscopia de imunofluorescência (Questão 12-15). (A) Células normais. (B) Células deficientes em peroxissomos. As células reagiram com anticorpos específicos para a catalase, foram lavadas e então coradas com um segundo anticorpo marcado, que é específico para o anticorpo catalase-específico. Os dois painéis estão na mesma magnificação. (De N. Kinoshita et al., *J. Biol. Chem.* 273:24122-24130, 1998. Com permissão da American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

12-16 Examine a proteína transmembrana de múltiplas passagens mostrada na **Figura Q12-5**. Qual seria o efeito se o primeiro segmento hidrofóbico transmembrana fosse convertido em um segmento hidrofílico? Esboce a disposição da proteína modificada na membrana do RE.

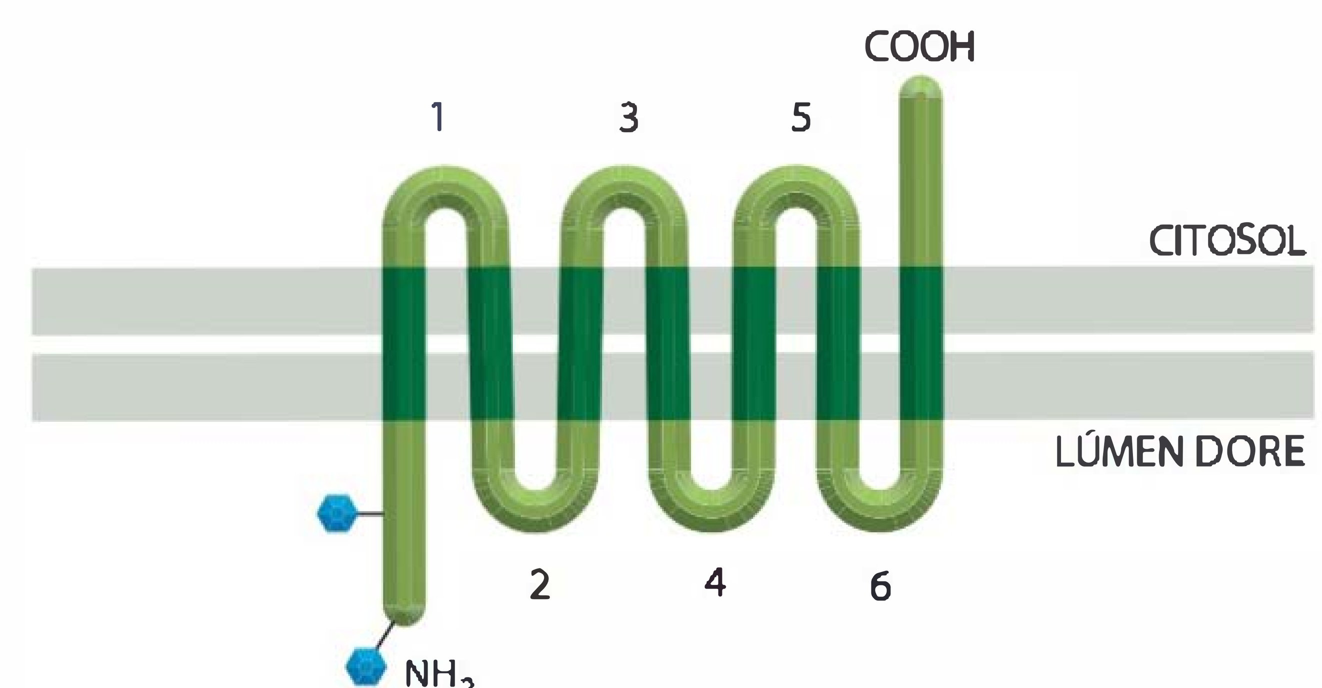


Figura Q12-5 Disposição de uma proteína transmembrana de múltiplas passagens na membrana do RE (Questão 12-16). Os *Hexágonos* representam oligossacarídeos ligados covalentemente.

12-17 Todos os novos fosfolipídeos são adicionados ao lado citoplasmático da membrana do RE, ainda que essa membrana tenha uma distribuição simétrica de diferentes fosfolipídeos em seus dois lados. Ao contrário, a membrana do plasma, que recebe todos os seus componentes de membrana do RE, tem uma distribuição muito assimétrica dos fosfolipídeos nos dois lados da bicamada lipídica. Como essa simetria é gerada na membrana do RE, e como a assimetria é gerada na membrana plasmática?

REFERÊNCIAS

Geral

Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347–358.

Compartimentalização das células

Blobel G (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1496–1500.

De Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395–403.

Schatz G & Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519–1526.

Warren G & Wickner W (1996) Organelle inheritance. *Cell* 84:395–400.

Transporte de moléculas entre o núcleo e o citosol

Adam SA & Gerace L (1991) Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* 66:837–847.

Bednenko J, Cingolani G & Gerace L (2003) Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic* 4:127–135.

Chook YM & Blobel G (2001) Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11:703–715.

Cole CN & Scarcelli JJ (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18:299–306.

Fahrenkrog B, Koser J & Aebi U (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* 29:175–182.

Görlich D & Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607–660.

Hetzer MW, Walther TC & Mattaj IW (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:347–380.

Komeili A & O'Shea EK (2000) Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 12:355–360.

Kuersten S, Ohno M & Mattaj IW (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11:497–503.

Tran EJ & Wente SR (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125:1041–1053.

Weis K (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* 14:328–335.

O transporte de proteínas para mitocôndrias e cloroplastos

Jarvis P & Robinson C (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* 14:R1064–R1077.

Kessler F & Schnell DJ (2004) Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol* 14:334–338.

Koehler CM, Merchant S & Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* 24:428–432.

Mokranjac D & Neupert W (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 33:1019–1023.

Prakash S & Matouschek A (2004) Protein unfolding in the cell. *Trends Biochem Sci* 29:593–600.

Soll J & Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:198–208.

Truscott KN, Brandner K & Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13:R326–R337.

Peroxissomos

Fujiki Y (2000) Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* 476:42–46.

Lazarow PB (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15:489–497.

van der Zand A, Braakman I & Tabak HF (2006) The return of the peroxisome. *J Cell Sci* 119:989–994.

Retículo endoplasmático

Adelman MR, Sabatini DD et al (1973) Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. *J Cell Biol* 56:206–229.

Bernales S, Papa FR & Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:487–508.

Bishop WR & Bell RM (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* 4:579–610.

Blobel G & Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67:835–851.

Borgese N, Mok W & Sabatini DD (1974) Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol* 88:559–580.

Daleke DL (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44:233–242.

Deshaies RJ, Sanders SL & Schekman R (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349:806–808.

Ellgaard L & Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:181–191.

Ferguson MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112:2799–2809.

Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10:465–472.

Görlich D, Prehn S et al (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71:489–503.

Helenius J & Aebi M (2002) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 13:171–178.

Johnson AE & van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:799–842.

Keenan RJ, Freymann DM & Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70:755–775.

Kostova Z & Wolf DH (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* 22:2309–2317.

Levine T & Loewen C (2006) Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* 18:371–378.

Marciniak SJ & Ron D (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86:1133–1149.

Milstein C, Brownlee GG et al (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol* 239:117–120.

Römisch K (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:435–456.

Simon SM & Blobel G (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65:371–380.

Staehelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11:1151–1165.

Trombetta ES & Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:649–676.

Tsai B, Ye Y & Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:246–255.

Shibata Y, Voeltz GK & Rapoport TA (2006) Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126:435–439

White SH & von Heijne G (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* 14:397–404.

Yan A & Lennarz WJ (2005) Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem* 280:3121–3124.

Tráfego Intracelular de Vesículas

13

Toda célula deve alimentar-se, comunicar-se com o mundo que a circunda e responder rapidamente às mudanças em seu ambiente. Para auxiliar no cumprimento dessas tarefas, as células ajustam continuadamente a composição de sua membrana plasmática, em respostas rápidas às necessidades. Elas utilizam um elaborado sistema interno de membrana para adicionar e remover proteínas de superfície celular, como receptores, canais iônicos e transportadores. Por meio do processo de *exocitose*, a *via biossintética-secretora* entrega proteínas recém-sintetizadas, carboidratos e lipídeos para a membrana plasmática ou para o espaço extracelular. Pelo processo inverso de *endocitose* (**Figura 13-1**), as células removem componentes da membrana plasmática e os entregam a compartimentos internos denominados *endossomos*, de onde eles podem ser reciclados para as mesmas regiões ou para regiões diferentes da membrana plasmática, ou podem ser entregues aos lisossomos para degradação. As células podem utilizar a endocitose para capturar nutrientes importantes como vitaminas, lipídeos, colesterol e ferro; estes são absorvidos junto com as macromoléculas às quais eles se ligam e são então liberados no citosol, onde são utilizados vários processos biossintéticos.

O espaço interior, ou *lúmen*, de cada compartimento definido por membranas ao longo das vias biossintética-secretora e endocítica é topologicamente equivalente ao lúmen da maioria dos compartimentos envoltos por membrana e ao exterior celular. As proteínas podem viajar neste espaço sem ter de atravessar a membrana, sendo transferidas de um compartimento a outro por meio de numerosos pacotes de transporte inclusos em membranas. Alguns destes pacotes são pequenas *vesículas* esféricas, enquanto outros são vesículas maiores e irregulares, ou túbulos formados a partir do compartimento doador. Utilizaremos o termo **vesícula transportadora** para todas as formas desses pacotes.

Dentro de uma célula eucariótica, as vesículas continuamente brotam de uma membrana e se fundem com outra, carregando componentes de membrana e de moléculas solúveis, os quais são referidos como **carga** (**Figura 13-2**). Esse tráfego de membranas fiui ao longo de vias definidas e altamente organizadas, que permitem que a célula secrete, alimente-se e remodele sua membrana plasmática. A via biossintética-secretora direciona-se para fora, a partir do retículo endoplasmático (RE), passando pelo aparelho de Golgi e pela superfície celular, com uma via lateral levando aos lisossomos, enquanto a via endocítica direciona-se para dentro, a partir da membrana plasmática. Em cada caso, o fluxo de membranas entre compartimentos é equilibrado, com vias de captação equilibrando o fluxo em direção oposta, trazendo membranas e proteínas selecionadas de volta ao compartimento de origem (**Figura 13-3**).

Para executar a sua função, cada vesícula transportadora que brota de um compartimento deve ser seletiva. Ela deve captar apenas as proteínas apropriadas e deve se fusionar somente com a membrana-alvo apropriada. Uma vesícula que carrega uma carga do aparelho de Golgi para a membrana plasmática, por exemplo, deve excluir as proteínas que devem permanecer no aparelho de Golgi e deve se fusionar somente com a membrana plasmática e não com qualquer outra organela.

Iniciaremos este capítulo considerando os mecanismos moleculares de brotamento e de fusão que fundamentam todo o transporte. Discutiremos, então, o problema fundamental de como, no âmbito deste transporte, as diferenças entre compartimentos são mantidas. Finalmente, iremos considerar a função do aparelho de Golgi, dos lisossomos, das vesículas secretoras e dos endossomos, à medida que traçamos as vias que conectam essas organelas.

Neste capítulo

OS MECANISMOS MOLECULARES DO TRANSPORTE DE MEMBRANAS E A MANUTENÇÃO DA DIVERSIDADE DE COMPARTIMENTOS 750

TRANSPORTE A PARTIR DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO ATRAVÉS DO APARELHO DE GOLGI 766

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA OS LISOSSOMOS 799

TRANSPORTE PARA O INTERIOR DA CÉLULA A PARTIR DA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSE 787

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA O EXTERIOR DA CÉLULA: EXOCITOSE 799

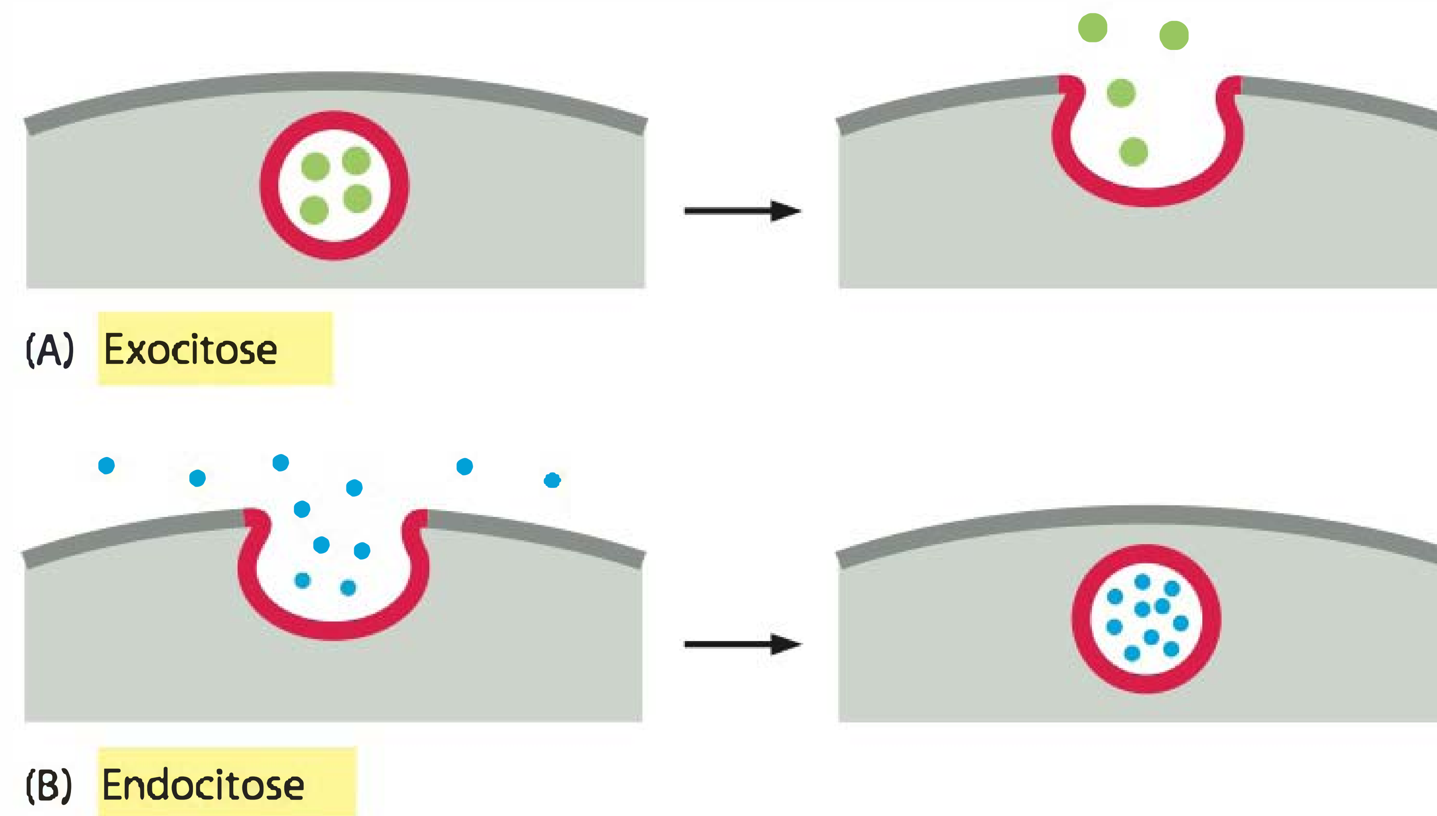


Figura 13-1 Exocitose e endocitose. (A) Na exocitose, uma vesícula de transporte fusiona-se à membrana plasmática. Seu conteúdo é liberado dentro do espaço extracelular, enquanto a membrana da vesícula (*vermelho*) torna-se contínua com a membrana plasmática. (B) Na endocitose, um fragmento da membrana plasmática (*vermelho*) é internalizado, formando uma vesícula de transporte. Seu conteúdo é derivado do espaço extracelular.

OS MECANISMOS MOLECULARES DO TRANSPORTE DE MEMBRANAS E A MANUTENÇÃO DA DIVERSIDADE DE COMPARTIMENTOS

O transporte vesicular medeia uma troca contínua de componentes entre os dez ou mais compartimentos definidos por membranas quimicamente distintos que, coletivamente, constituem as vias biossintética-secretora e endocítica. Na presença dessa troca massiva, como cada compartimento pode manter o seu caráter especializado? Para responder a essa questão, deveremos considerar primeiro o que define o caráter de um compartimento. Acima de tudo, é a composição da membrana circundante: marcadores moleculares expostos na superfície citosólica da membrana servem como sinais de orientação para o tráfego que se aproxima e asseguram que as vesículas transportadoras fundam-se somente com o compartimento correto. Muitos marcadores de membrana, entretanto, são encontrados em mais de uma organela e, assim, é a combinação específica de moléculas marcadoras que atribui a cada organela o seu endereço molecular único.

Como esses marcadores de membrana são mantidos em altas concentrações em um compartimento e em baixas concentrações em outro? Para responder a essa questão, necessitamos considerar como porções das membranas, enriquecidas ou destituídas de componentes específicos, desprendem-se de um compartimento e se transferem para outro. O **Painel 13-1** resume algumas das estratégias genéticas e bioquímicas básicas utilizadas para estudar a maquinaria molecular envolvida no transporte vesicular.

Começamos este capítulo discutindo como as células segregam proteínas em domínios de membrana separados, ao agregar um revestimento proteico (ou capa proteica) especial na face citosólica da membrana doadora. Consideramos como este revestimento forma-se, do que ele é feito e como é utilizado para extrair componentes específicos de uma membra-

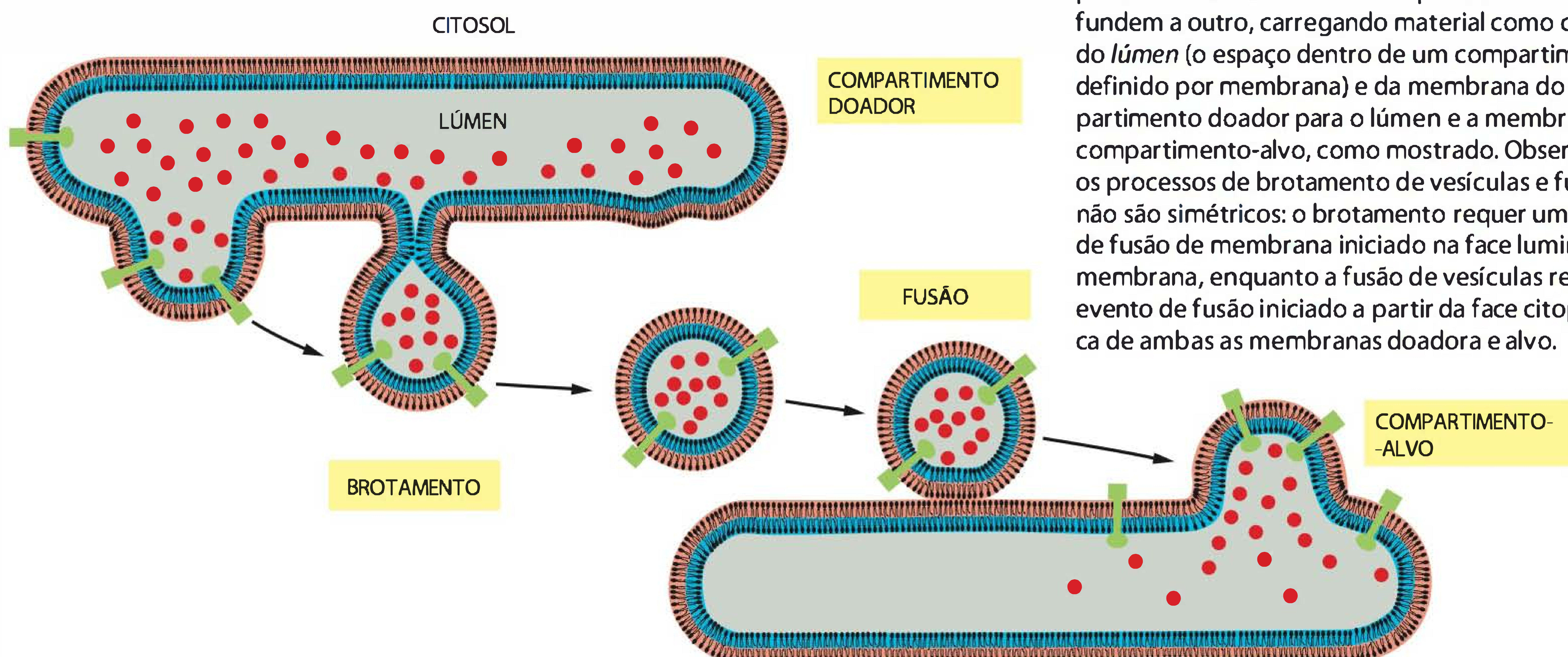


Figura 13-2 Transporte vesicular. Vesículas transportadoras brotam de um compartimento e se fundem a outro, carregando material como carga do *lúmen* (o espaço dentro de um compartimento definido por membrana) e da membrana do compartimento doador para o lúmen e a membrana do compartimento-alvo, como mostrado. Observe que os processos de brotamento de vesículas e fusão não são simétricos: o brotamento requer um evento de fusão de membrana iniciado na face luminal da membrana, enquanto a fusão de vesículas requer um evento de fusão iniciado a partir da face citoplasmática de ambas as membranas doadora e alvo.

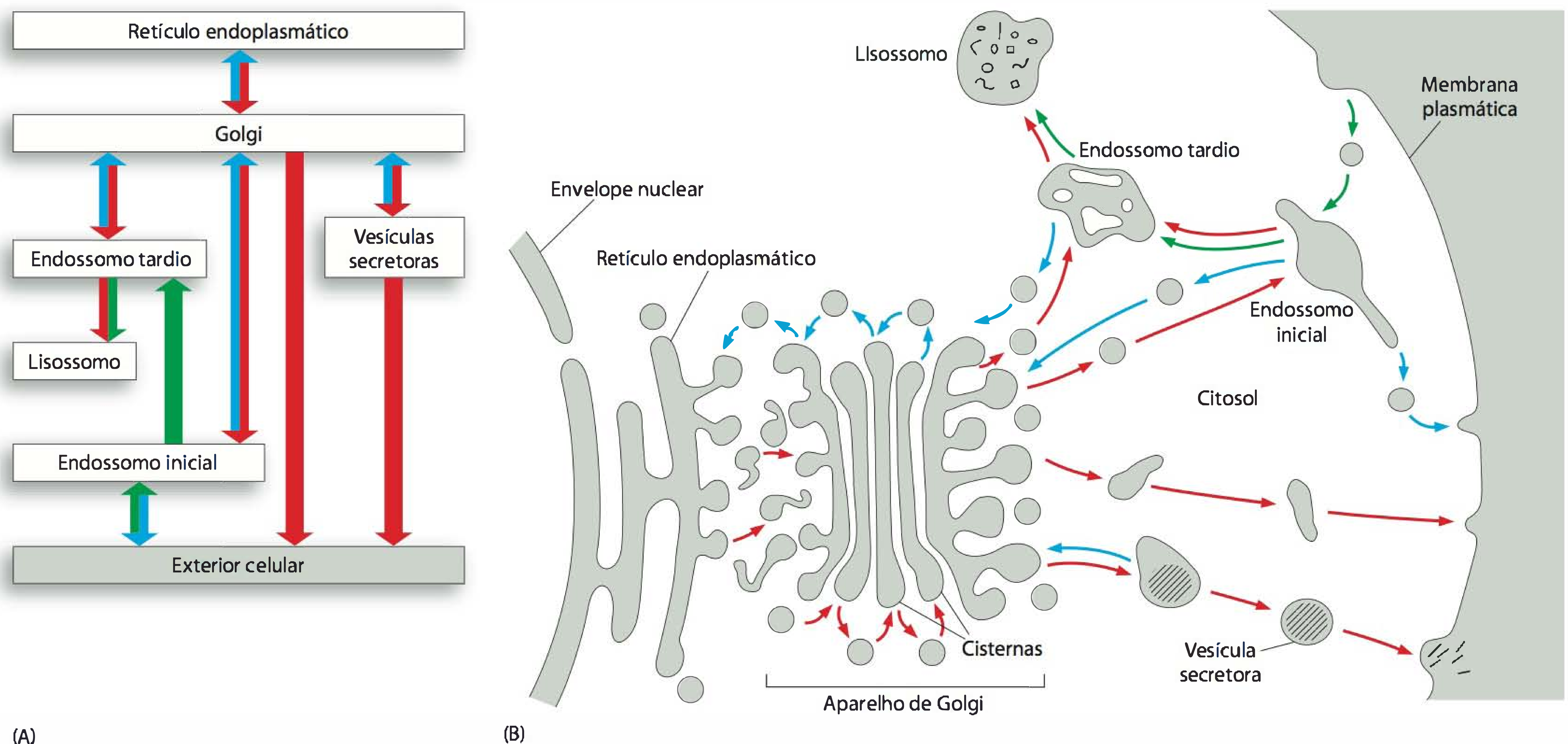


Figura 13-3 "Mapa" das vias biossintética-secretora e endocítica. (A) Neste diagrama, o qual foi introduzido no Capítulo 12, as vias endocítica e biossintética-secretora estão ilustradas com setas *verdes* e *vermelhas*, respectivamente. Além disso, setas *azuis* indicam vias de recuperação para o fluxo retrógrado de componentes selecionados. (B) Os compartimentos intracelulares da célula eucariótica envolvidos no transporte vesicular. O lúmen de cada compartimento definido por membrana é topologicamente equivalente ao lado externo da célula. Todos os compartimentos mostrados comunicam-se uns com os outros e com o lado externo da célula por meio de vesículas de transporte. Na via biossintética-secretora (*setas vermelhas*), as moléculas proteicas são transportadas do RE para a membrana plasmática ou (via endossomos) para os lisossomos. Na via endocítica (*setas verdes*), as moléculas são ingeridas em vesículas derivadas da membrana plasmática e entregues para endossomos iniciais, e então (via endossomos tardios) para os lisossomos. Muitas moléculas endocitadas são retiradas dos endossomos iniciais, retornando para a superfície celular para reutilização; à semelhança, algumas moléculas são retiradas dos endossomos iniciais e tardios e retornadas para o aparelho de Golgi, e algumas são retiradas do aparelho de Golgi e retornadas para o RE. Todas essas vias de recuperação estão representadas por *setas azuis*, como na parte (A).

na e entregá-los a outro compartimento. Finalmente, discutimos como as vesículas de transporte ancoram-se na membrana-alvo apropriada e se fundem a ela para entregar o conteúdo para a sua organela-alvo.

Existem vários tipos de vesículas revestidas

A maioria das vesículas de transporte forma-se a partir de regiões revestidas e especializadas das membranas. Elas brotam como **vesículas revestidas** que possuem grades distintas de proteínas cobrindo as suas superfícies citosólicas. Antes de as vesículas fusionarem-se com uma membrana-alvo, o revestimento é descartado como requisito para permitir que as duas superfícies citosólicas das membranas interajam diretamente e se fundam.

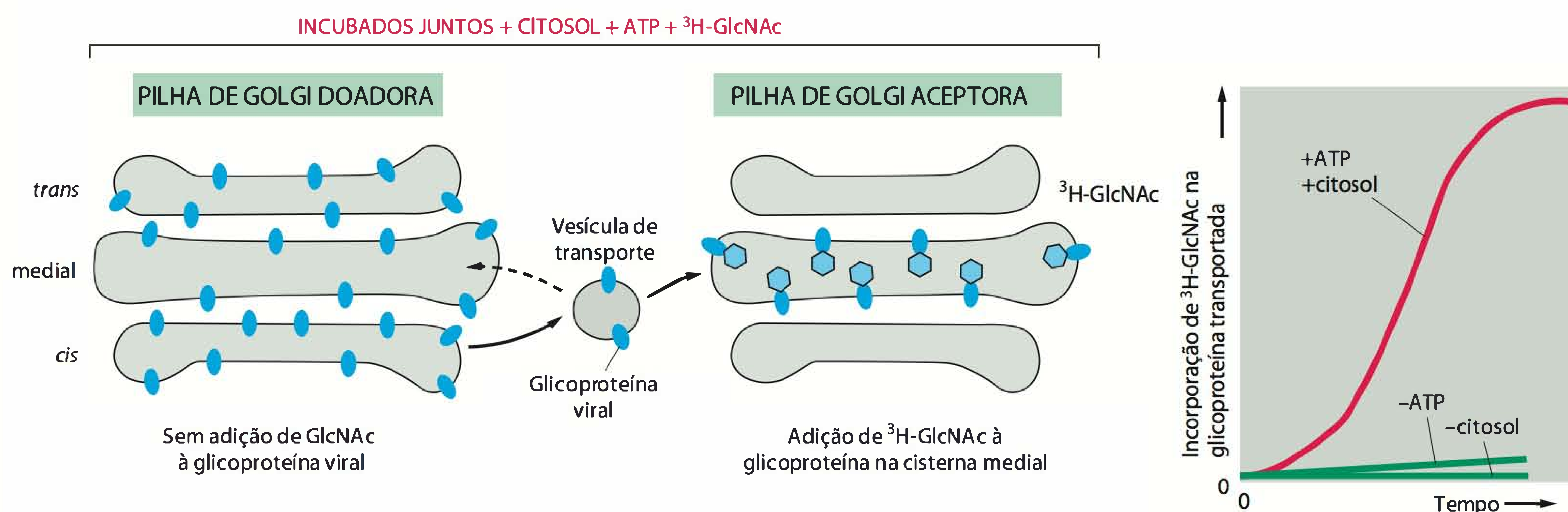
O revestimento desempenha duas funções principais. Primeiro, ele concentra proteínas específicas de membrana em uma região especializada da membrana que, então, dá origem à membrana vesicular. Desta forma, seleciona as moléculas apropriadas para transporte. Segundo, o revestimento modela a vesícula em formação. As proteínas do revestimento agregam-se em grades curvadas semelhantes a cestas, deformando a região da membrana e, consequentemente, dando forma à vesícula. Isso pode explicar por que as vesículas com o mesmo tipo de revestimento possuem tamanho e forma relativamente uniformes.

Existem três tipos bem-caracterizados de vesículas revestidas, distintas entre si pelas proteínas do revestimento: *vesículas revestidas de clatrina*, *revestidas de COPI* e *revestidas de COPII* (**Figura 13-4**). Cada tipo é utilizado para etapas diferentes de transporte. As vesículas revestidas de clatrina, por exemplo, medeiam o transporte a partir do aparelho de Golgi e da membrana plasmática, ao passo que as vesículas revestidas de COPI e COPII medeiam, mais frequentemente, o transporte a partir do RE e das cisternas de Golgi (**Figura 13-5**). Há, no entanto, uma variedade muito maior do que essa pequena lista sugere. Como discutiremos a seguir, há pelo menos três tipos de vesículas revestidas de clatrina, cada uma delas espe-

SISTEMAS LIVRES DE CÉLULAS PARA O ESTUDO DE COMPONENTES E MECANISMOS DO TRANSPORTE VESICULAR

O transporte vesicular pode ser reconstituído em sistemas livres de células. Isso foi obtido pela primeira vez para as pilhas de Golgi. Quando as pilhas de Golgi são isoladas das células e incubadas com citosol e com ATP como fonte de energia, as vesículas de transporte brotam das suas bordas e parecem transportar proteínas entre cisternas. Ao acompanhar o processamento progressivo de oligossacarídeos sobre uma glicoproteína, conforme esta se move de um compartimento de Golgi a outro, é possível acompanhar o processo do transporte vesicular.

Para acompanhar o transporte, duas populações distintas de pilhas de Golgi são incubadas em conjunto. A população "doadora" é isolada de células mutantes que não dispõem da enzima *N*-acetilglicosamina-transferase I (GlcNAc) e que foram infectadas por um vírus; devido à mutação, a principal glicoproteína viral não é modificada com GlcNAc no aparelho de Golgi das células mutantes. As pilhas de Golgi "aceptoras" são isoladas de células do tipo selvagem não-infectadas que, portanto, possuem uma cópia correta da GlcNAc-transferase I, mas não possuem a glicoproteína viral. Na mistura das pilhas de Golgi, a glicoproteína viral adquire GlcNAc, indicando que ela deve ter sido transportada entre pilhas de Golgi – presumivelmente por meio de vesículas que brotam do compartimento *cis* do Golgi doador e se fundem com o compartimento medial do Golgi aceptor ou por fusão homotípica entre as cisternas de duas pilhas de Golgi. Essa glicosilação dependente de transporte é monitorada pela medida da transferência de ^{3}H-GlcNAc da UDP-^{3}H-GlcNAc para a glicoproteína viral. O transporte ocorre somente quando são adicionados ATP e citosol. Pelo fracionamento do citosol, um número de proteínas citosólicas específicas foi identificado como necessário para o brotamento e a fusão das vesículas.



Sistemas similares livres de células têm sido utilizados para estudar o transporte da rede Golgi medial para a *trans*, da rede Golgi *trans* para a membrana plasmática, dos endossomos para os lisossomos, da rede Golgi *trans* para os endossomos tardios e para estudar a fusão homotípica entre compartmentos semelhantes – tais como endossomos e vesículas secretoras imaturas.

ABORDAGENS GENÉTICAS PARA O ESTUDO DO TRANSPORTE VESICULAR

Os estudos genéticos de células mutantes de leveduras defectivas na secreção permitiram identificar mais de 25 genes envolvidos na via secretora. Muitos dos genes mutantes codificam proteínas *sensíveis à temperatura*. Estas proteínas funcionam normalmente a 25ºC, mas, quando as células mutantes (A-I) são transferidas para uma temperatura elevada, como 35ºC, algumas falham em transportar proteínas do RE para o aparelho de Golgi, outras falham no transporte entre cisternas de Golgi, e, ainda, outras falham no transporte do aparelho de Golgi para o vacúolo (o lisossomo de leveduras) ou para a membrana plasmática.

Uma vez que uma proteína necessária à secreção é identificada dessa maneira, um fenômeno chamado de *supressão multicópia* pode ser utilizado para identificar genes que codificam proteínas que interagem com ela. Sob altas temperaturas, uma proteína mutante sensível à temperatura apresenta, com frequência, uma afinidade muito baixa pelas proteínas que normalmente interagem e se ligam a ela. Se as proteínas que interagem são produzidas em concentrações muito mais altas do que o normal, entretanto, ocorrem ligações suficientes para suprimir o defeito. Para criar um modelo experimental no qual altas concentrações como esta estejam presentes, células mutantes de leveduras (com uma mutação de sensibilidade à temperatura em um gene envolvido no transporte vesicular) são transfectadas por vetores plasmidiais de leveduras dentro dos quais foram clonados fragmentos aleatórios de DNA genômico de leveduras. Como estes plasmídeos são mantidos nas células em um alto número de cópias, as células que carregam genes intactos produzirão o produto gênico normal em grande quantidade, permitindo que algumas células sobrevivam sob altas temperaturas. Os fragmentos de DNA relevantes, os quais presumivelmente codificam as proteínas que provavelmente interagem com a proteína mutante original, podem então ser isolados dos clones celulares sobreviventes.

As abordagens genética e bioquímica complementam uma à outra, e muitas proteínas envolvidas no transporte vesicular foram identificadas independentemente por estudos bioquímicos de sistemas mamíferos livres de células e por estudos genéticos em leveduras.

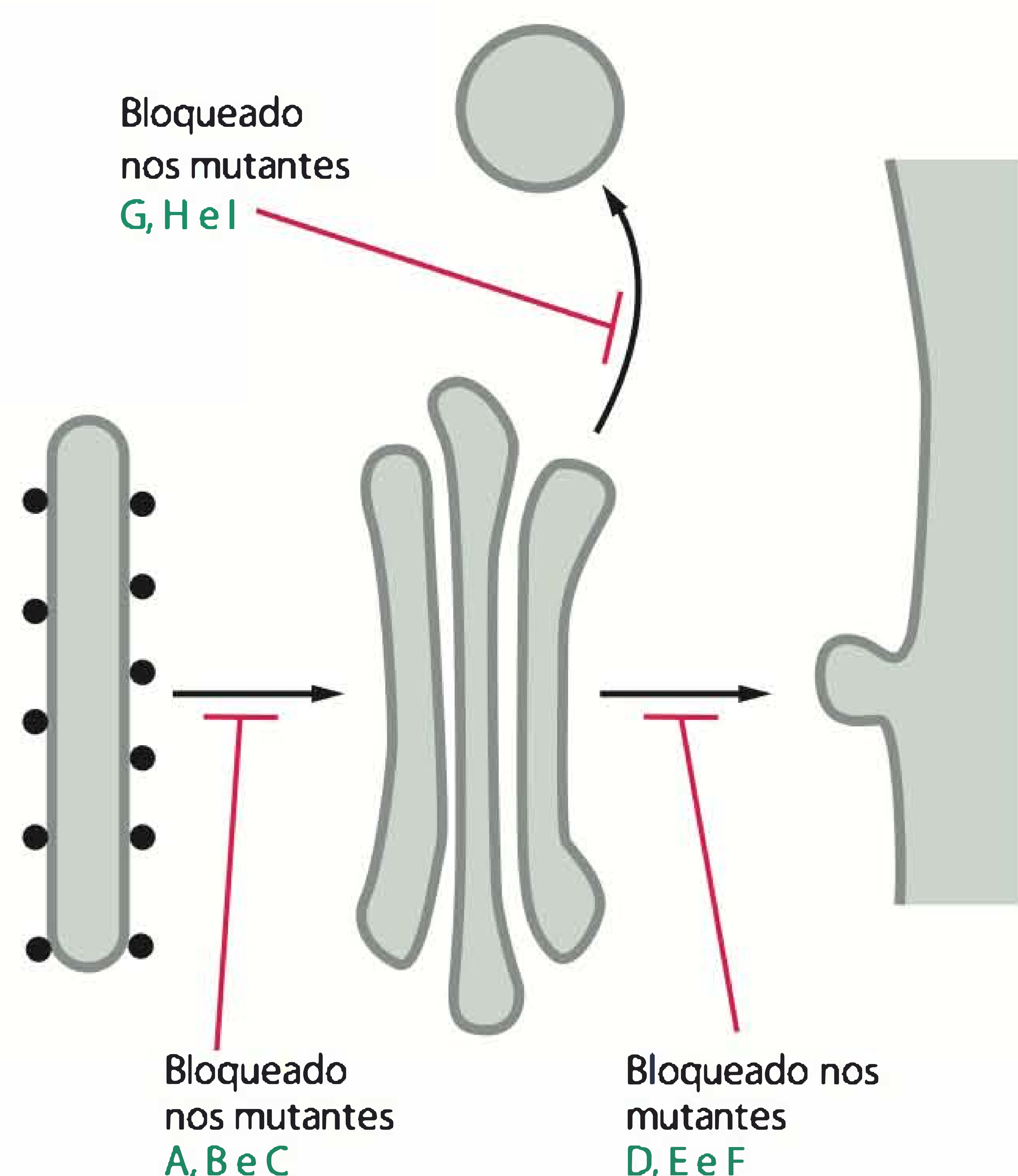
AS PROTEÍNAS DE FUSÃO COM GFP REVOLUCIONARAM O ESTUDO DO TRANSPORTE INTRACELULAR

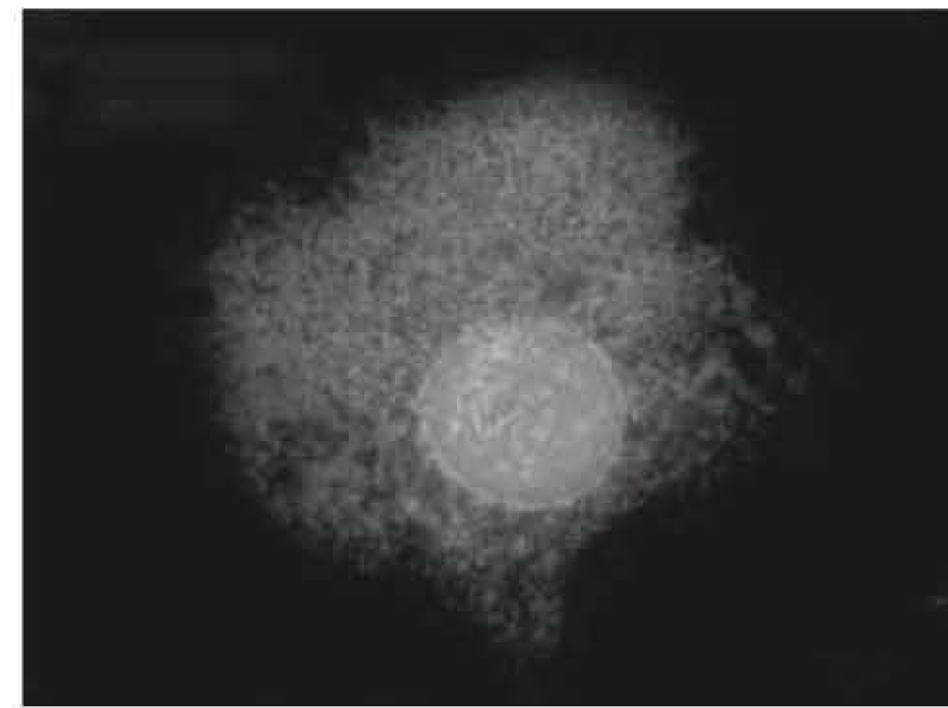
Uma maneira de acompanhar os possíveis caminhos de uma proteína em células vivas ocorre por meio da construção de proteínas de fusão, nas quais a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) é anexada por técnicas de engenharia genética à proteína de interesse. Quando um DNA complementar (cDNA) que codifica tal proteína de fusão é expresso em uma célula, a proteína é prontamente visível em um microscópio de fluorescência, de forma que ela pode ser acompanhada em células vivas em tempo real. Felizmente, para a maioria das proteínas estudadas, a adição de GFP não perturba a função da proteína.

As proteínas de fusão com a GFP são amplamente utilizadas para estudar a localização e o movimento das proteínas nas células. A GFP fusionada a proteínas que navegam para dentro e para fora do núcleo, por exemplo, facilita estudos de transporte nuclear e a sua regulação. A GFP fusionada a proteínas mitocondriais ou ao aparelho de Golgi é usada para estudar o comportamento dessas organelas. A GFP fusionada a proteínas da membrana plasmática permite medir a cinética dos seus movimentos a partir do RE ao longo da via secretora.

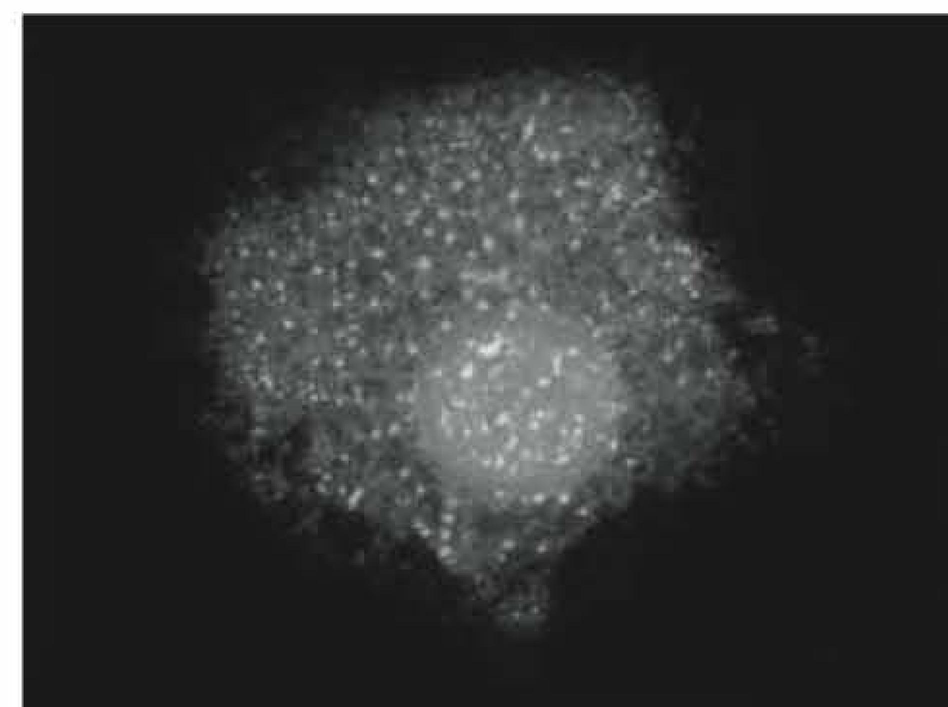
O estudo das proteínas de fusão com a GFP frequentemente é combinado a técnicas de FRAP e FLIP (discutidas no Capítulo 10), nas quais a GFP em regiões selecionadas da célula é excitada por uma forte luz *laser*. O grau de difusão das proteínas de fusão à GFP não-excitadas na área pode então ser determinado para fornecer medidas da difusão de proteínas ou do transporte na célula. Dessa maneira, por exemplo, foi determinado que muitas enzimas de Golgi reciclam entre o aparelho de Golgi e o RE.

(A-D, cortesia de. Jennifer Lippincott-Schwartz Lab.)

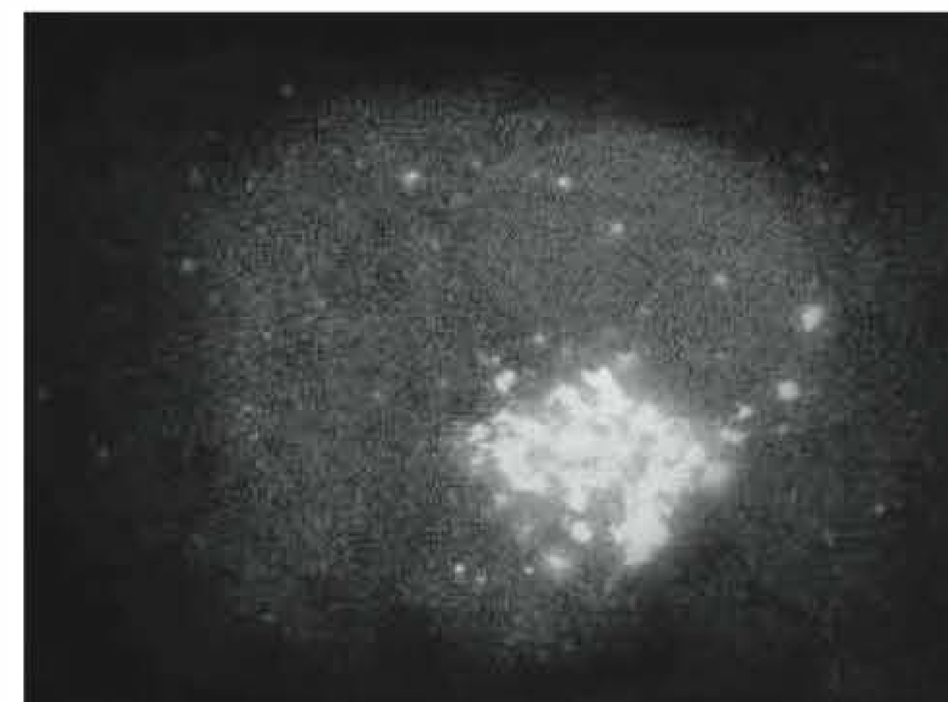




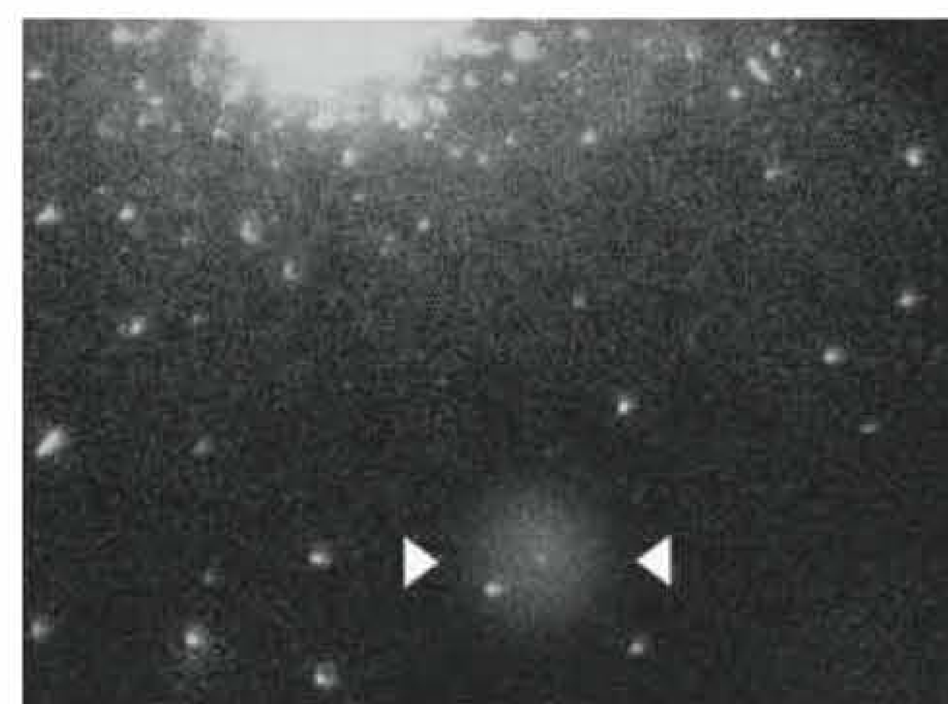
(A) Neste experimento, células em cultura expressam uma proteína de fusão consistindo em GFP fusionada à proteína de capsídeo do vírus da estomatite vesicular. A proteína viral é uma proteína integral de membrana que normalmente se move ao longo da via secretora a partir do RE para a superfície da célula, onde o vírus seria montado se a célula expressasse os outros componentes virais. A proteína viral contém uma mutação que permite a exportação do RE somente sob temperatura ambiente. Portanto, sob as altas temperaturas apresentadas, a proteína de fusão marca o RE.



(B) Conforme a temperatura é reduzida, a proteína de fusão com a GFP acumula-se rapidamente nos sítios de saída do RE.



(C) A proteína de fusão então se move para o aparelho de Golgi.



(D) Finalmente, a proteína de fusão é entregue para a membrana plasmática, difundindo-se dentro dela (as setas sinalizam o evento de fusão). A partir de tais estudos, as cinéticas de cada etapa da via puderam ser determinadas.

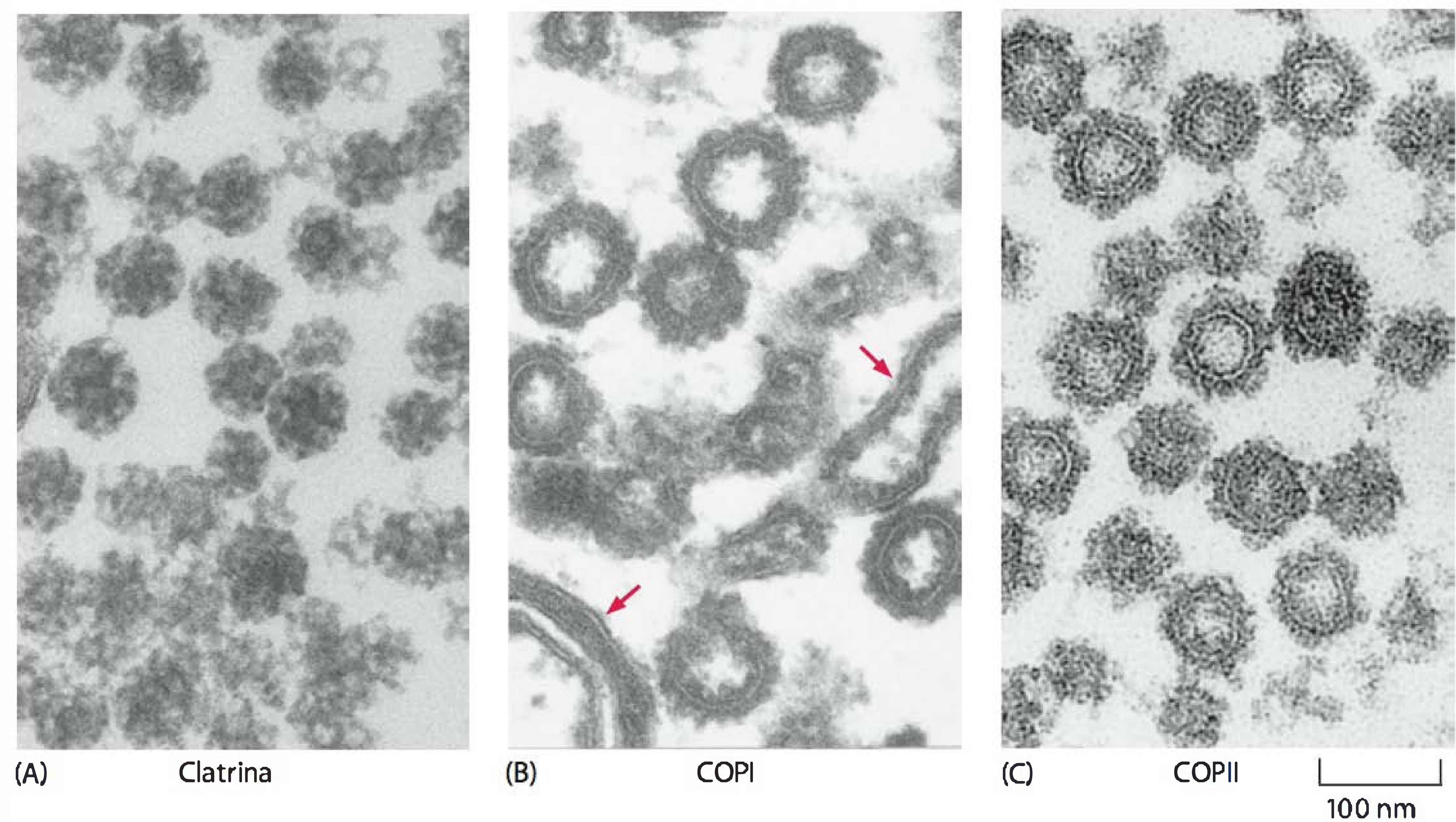


Figura 13-4 Micrografia eletrônica de vesículas revestidas de clatrina, COPI e COPII. Todas são apresentadas como micrografias eletrônicas na mesma escala. (A) Vesículas revestidas de clatrina. (B) Cisternas de Golgi (*setas*) de um sistema livre de células no qual vesículas revestidas de COPI brotam no tubo de ensaio. (C) Vesículas revestidas de COPII. (A e B, retiradas de L. Orci, B. Glick e J. Rothman, *Cell* 46:171-184, 1986. Com permissão de Elsevier; C, cortesia de Charles Barlowe e Lelio Orci.)

cializada para uma etapa diferente de transporte, e as vesículas revestidas de COPI e COPII podem ser igualmente diversas.

A montagem do revestimento de clatrina direciona a formação de vesículas

As **vesículas revestidas de clatrina**, as primeiras vesículas revestidas a serem descobertas, transportam material provindo da membrana plasmática e entre os compartimentos endossômicos e de Golgi. As **vesículas revestidas de COPI** e **COPII** transportam material no início da via secretora: vesículas revestidas de COPII brotam do RE e vesículas revestidas de COPI brotam do aparelho de Golgi (ver Figura 13-5). Discutiremos as vesículas revestidas de clatrina primeiro, já que fornecem um bom exemplo de como as vesículas se formam.

O principal componente proteico das vesículas revestidas de clatrina é a própria **clatrina**. Cada subunidade de clatrina consiste em três cadeias polipeptídicas grandes e três pequenas que, juntas, formam uma estrutura de três pernas chamada de *trisquélion*. Os trisquélions de clatrina estruturam-se em uma rede convexa de hexágonos e pentágonos semelhantes a um cesto, para formar fossas revestidas na superfície citosólica das membranas (**Figura 13-6**). Sob condições apropriadas, os trisquélions isolados espontaneamente autoestruturam-se em típicas gaiolas poliédricas em um tubo de ensaio, mesmo na ausência das vesículas de membrana que, normalmente, esses cestos circundam (**Figura 13-7**). Portanto, a geometria da gaiola de clatrina é determinada apenas pelo trisquélion de clatrina.

As **proteínas adaptadoras**, outro componente principal de revestimento das vesículas revestidas de clatrina, formam uma discreta segunda camada do revestimento, posicionada entre a grade de clatrina e a membrana. Elas ligam o revestimento de clatrina à membra-

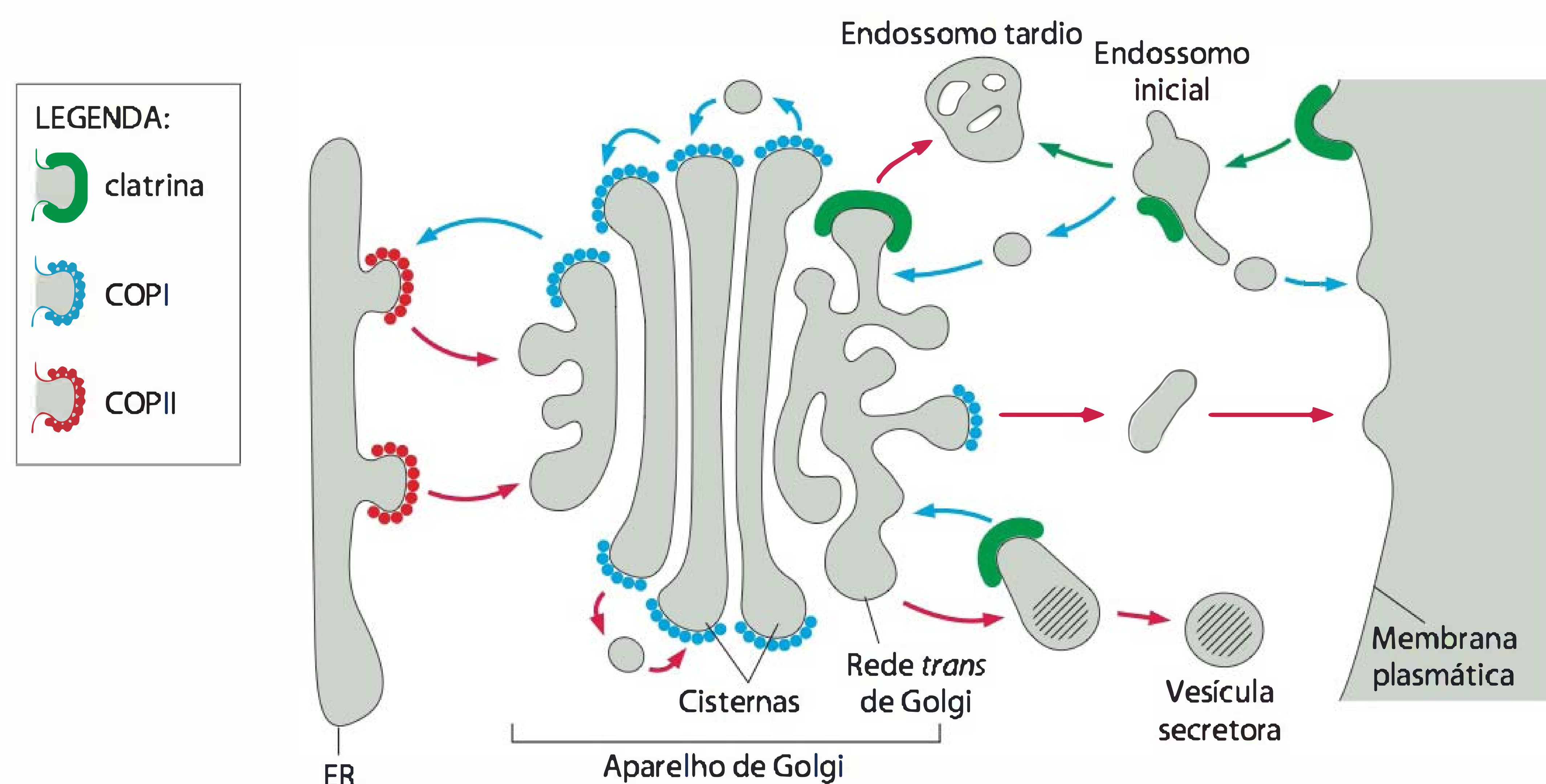


Figura 13-5 Utilização de diferentes revestimentos no tráfego vesicular. Diferentes proteínas de revestimento selecionam diferentes cargas e dão forma às vesículas de transporte que medeiam as várias etapas das vias biossintética-secretora e endocítica. Quando os mesmos revestimentos funcionam em diferentes locais da célula, eles normalmente incorporam diferentes subunidades proteicas que modificam as suas propriedades (não-mostrado). Muitas células diferenciadas possuem vias adicionais além daquelas representadas aqui, incluindo uma via de classificação/distribuição a partir da rede *trans* de Golgi até a superfície apical em células epiteliais, e uma via especializada de reciclagem para proteínas de vesículas sinápticas nas sinapses de neurônios.

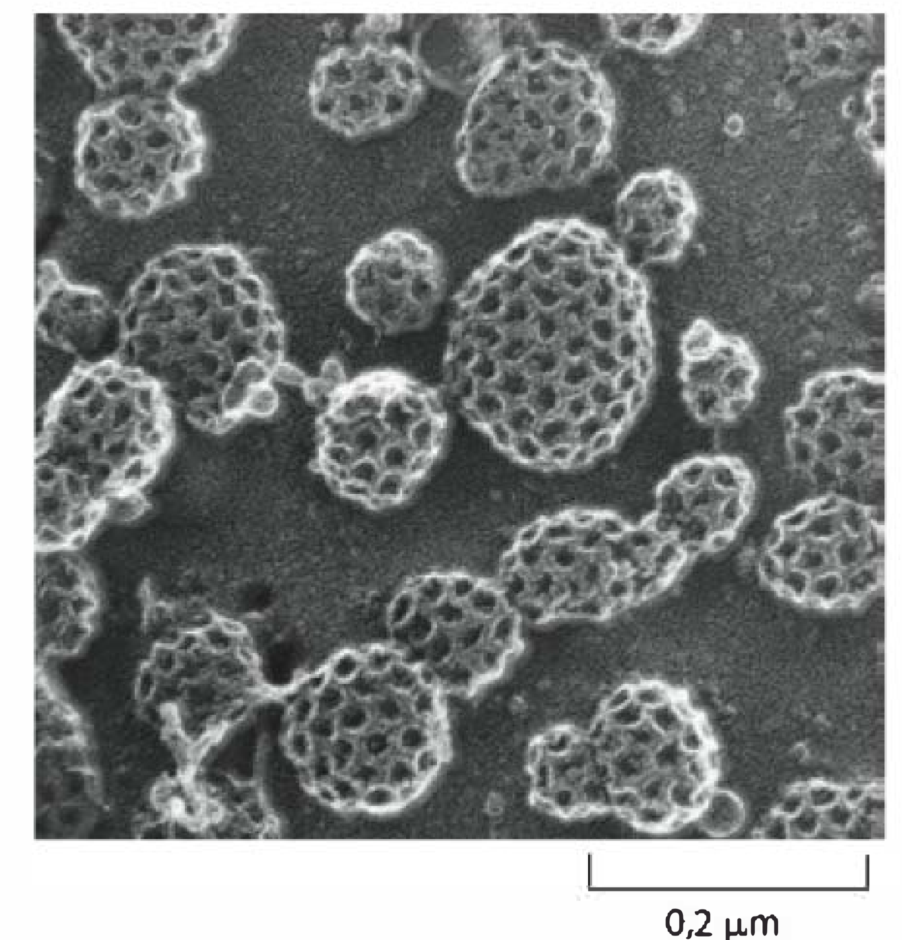


Figura 13-6 Fossas e vesículas revestidas de clatrina. Esta micrografia eletrônica instantânea mostra numerosas fossas e vesículas revestidas de clatrina na superfície interna da membrana plasmática de fibroblastos cultivados. As células foram rapidamente congeladas em hélio líquido, fraturadas e reveladas por ácido para expor a superfície citoplasmática da membrana plasmática. (De J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560-583, 1980. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

na e aprisionam várias proteínas transmembrana, incluindo os receptores transmembrana que capturam moléculas-carga solúveis para dentro das vesículas – os chamados *receptores de carga*. Dessa maneira, um conjunto selecionado de proteínas de membrana, juntamente com proteínas solúveis que interagem com elas, é empacotado dentro de cada vesícula de transporte revestida de clatrina recém-formada (**Figura 13-8**).

Existem vários tipos de proteínas adaptadoras. A melhor caracterizada possui quatro subunidades proteicas diferentes; outras são proteínas de uma única cadeia. Cada tipo de proteína adaptadora é específico para um conjunto diferente de receptores de carga, e seu uso leva à formação de distintas vesículas revestidas de clatrina. As vesículas revestidas de clatrina que brotam de diferentes membranas utilizam diferentes proteínas adaptadoras e, portanto, empacotam diferentes receptores e moléculas-carga.

A montagem sequencial de complexos adaptadores e revestimentos de clatrina na superfície da membrana gera forças que resultam na formação de uma vesícula revestida de clatrina. As interações laterais entre complexos adaptadores e entre moléculas de clatrina auxiliam na formação da vesícula.

Nem todos os revestimentos formam estruturas semelhantes a cestas

Nem todos as revestimentos são regulares e universais como os exemplos de clatrina e COP sugerem. Alguns revestimentos podem ser mais bem-descritos como montagens de proteínas especializadas que formam fragmentos dedicados a proteínas-carga específicas. Um exemplo é um revestimento denominado **retrômero**, o qual é montado sobre os endossomos e forma vesículas que devolvem *receptores de hidrolase ácida*, como o *receptor de manose-6-fosfato*, ao aparelho de Golgi (**Figura 13-9**). Mais adiante discutiremos o importante papel desses receptores na entrega de enzimas a novos lisossomos.

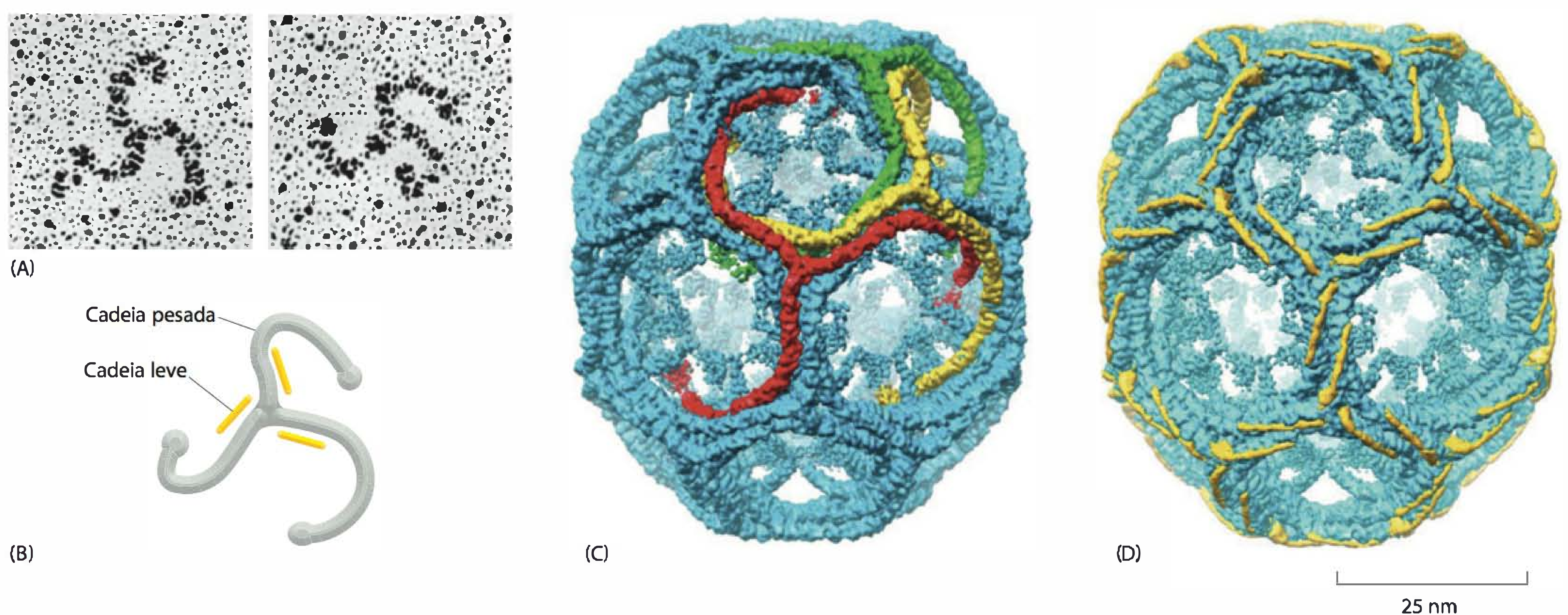


Figura 13-7 Estrutura de um revestimento de clatrina. (A) Micrografias eletrônicas de trisquélions de clatrina sombreados por platina. Cada trisquélion é composto de três cadeias pesadas e três cadeias leves de clatrina, como mostrado em (B). (C e D) Uma micrografia eletrônica de congelamento obtida de um revestimento de clatrina composto de 36 trisquélions organizados em uma rede de 12 pentágonos e 6 hexágonos, com cadeias pesadas (C) e cadeias leves (D) destacadas. As pernas entrelaçadas dos trisquélions de clatrina formam uma concha externa na qual os domínios *N*-terminais dos trisquélions sobressaem para formar uma camada interna visível pelas aberturas. É a camada interna que faz contato com as proteínas adaptadoras mostradas na Figura 13-8. Embora o revestimento apresentado seja muito pequeno para circundar uma vesícula de membrana, os revestimentos de clatrina sobre as vesículas são construídos de uma forma semelhante a partir de 12 pentágonos e um número maior de hexágonos, assemelhando-se à arquitetura de uma bola de futebol. (A, de E. Ungewickell e D. Branton, *Nature* 289:420-422, 1981; C e D, de A. Fontin et al., *Nature* 432:573-579, 2004. Todos com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

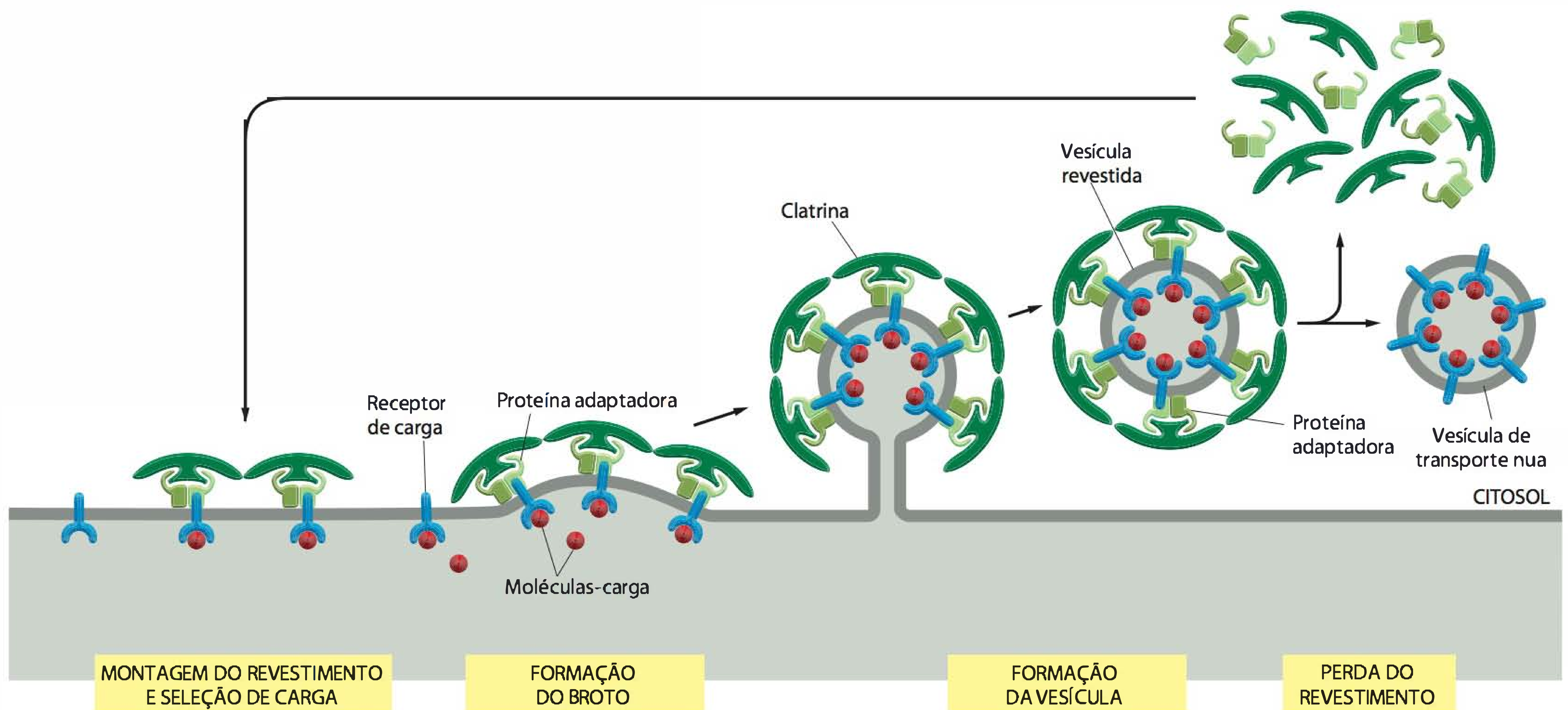


Figura 13-8 Montagem e desmontagem de um revestimento de clatrina. A montagem do revestimento introduz uma curvatura para dentro da membrana, a qual leva, por sua vez, à formação de brotos revestidos de tamanhos uniformes. As proteínas adaptadoras ligam trisquélions de clatrina e receptores de carga ligados à membrana, mediando, assim, o recrutamento seletivo de moléculas de membrana e carga para dentro da vesícula. O revestimento das vesículas de clatrina é rapidamente removido logo após a formação da vesícula.

O retrômero é um complexo multiproteico montado no revestimento de membranas endossômicas somente quando:

1. ele pode ligar-se às caudas citoplasmáticas dos receptores de carga,
2. ele pode interagir diretamente com uma bicamada fosfolipídica curvada e
3. ele pode ligar-se a um lipídeo fosfatidilinositol fosforilado (um *fosfoinositídeo*), o qual atua como um marcador endossomal, como discutiremos a seguir.

Como esses três requerimentos devem ocorrer simultaneamente, acredita-se que o retrômero atue como um *detector de coincidência* e somente estabeleça-se em tempo e local corretos. Uma vez dimerizado, estabiliza a curvatura da membrana, o que facilita a ligação de retrômeros adicionais que estão nas proximidades. A montagem cooperativa do retrômero leva, então, à formação e ao brotamento de uma vesícula de transporte, a qual entrega sua carga ao aparelho de Golgi.

As proteínas adaptadoras encontradas na clatrina também se ligam a fosfoinositídeos, os quais não só possuem uma função mais importante, como têm utilização muito mais abrangente como marcadores moleculares para identidade de compartimento. Isso auxilia no controle dos eventos de tráfegos de membrana, como discutiremos a seguir.

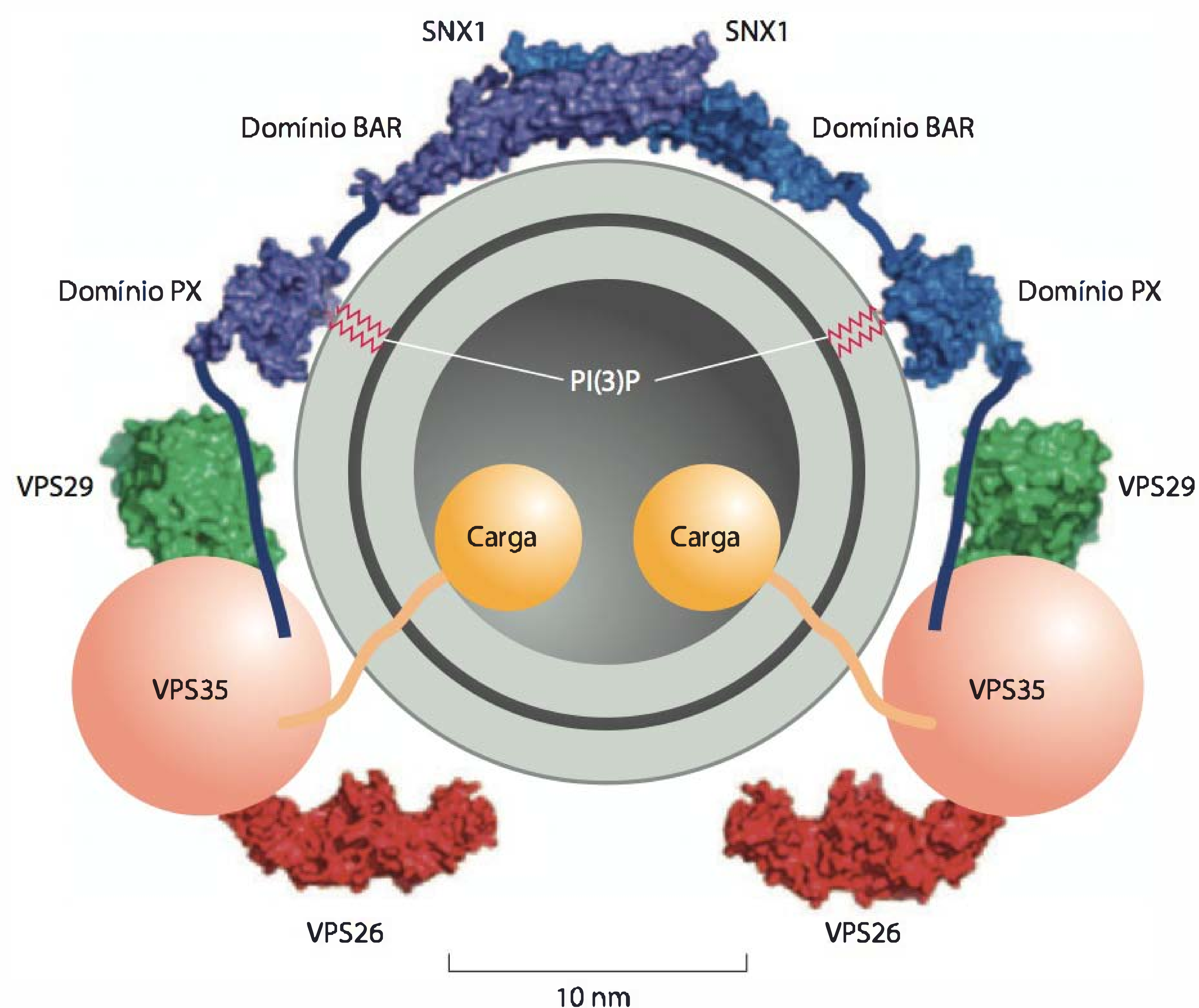


Figura 13-9 Modelo para a montagem do retrômero sobre membranas endossômicas. As quatro unidades do retrômero, SNX1, VPS29, VPS35 e VPS26, formam domínios de revestimento sobre as membranas do endossomo que capturam moléculas-carga, incluindo proteínas transmembrana, como os receptores de hidrolase ácida, para vesículas que as retornam à rede *trans* de Golgi. A VPS35 liga-se às caudas citoplasmáticas das proteínas transmembrana de carga. A proteína SNX1 contém diferentes módulos proteicos: um *domínio PX*, o qual se liga à fosfatidilinositol PI(3)P, e um *domínio BAR*, o qual medeia a dimerização e o acoplamento às membranas altamente curvadas. Ambos os domínios PX e BAR são módulos proteicos encontrados em muitas proteínas, onde desempenham funções similares. À exceção de PI(3)P, a qual está aumentada para ser visualizada, a membrana e os outros componentes estão representados, aproximadamente, em escala. (Adaptada de J. S. Bonifacino e R. Rojas, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:568-579, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

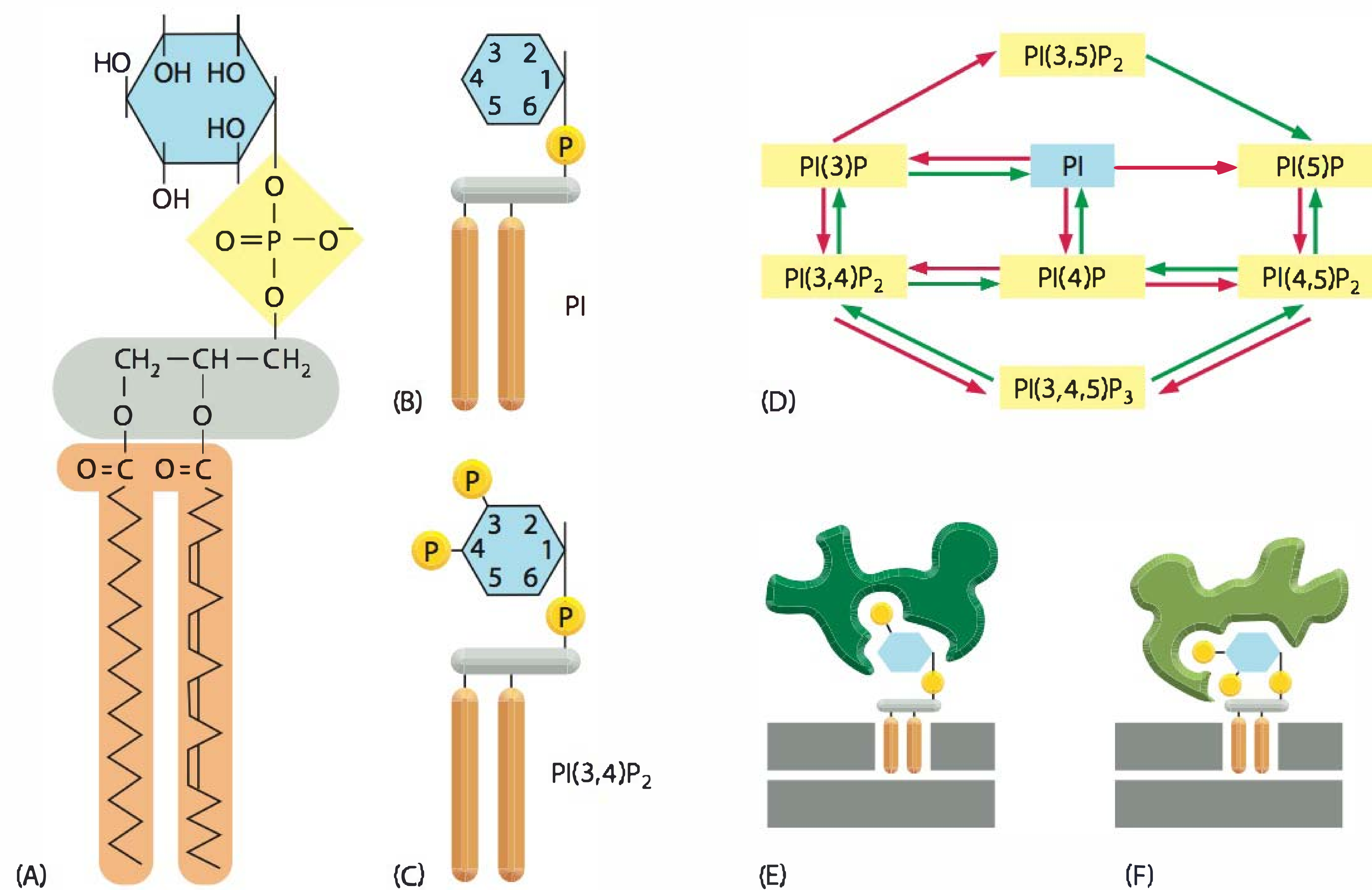


Figura 13-10 Fosfatidilinositol (PI) e **fosfoinositídeos (PIPs).** (A, B) A estrutura do PI mostra os grupos hidroxila livres no açúcar inositol, os quais podem, em princípio, ser modificados. (C) A fosforilação de um, dois ou três dos grupos hidroxila do PI, por PI ou PIP-cinases, produz uma variedade de espécies de PIP. Elas são designadas de acordo com a posição do anel (entre parênteses) e o número de grupos fosfato (subscrito) adicionados ao PI. O PI(3,4)P_2está representado. (D) As células animais possuem várias PI e PIP- cinases e um número similar de PIP-fosfatases, as quais estão localizadas em diferentes organelas, onde são reguladas para catalisar a produção de determinados PIPs. As setas *vermelha* e *verde* representam as reações da cinase e da fosfatase, respectivamente. (E, F) Os grupos de cabeça de fosfoinositídeos são reconhecidos por domínios de proteínas que discriminam as diferentes formas. Dessa maneira, grupos selecionados de proteínas portando tais domínios são recrutados às regiões da membrana nas quais estes fosfoinositídeos estejam presentes. PI(3)P e PI(4,5)P_2 estão mostrados. (D, modificada de M. A. de Matteis e A. Godi, *Nat. Cell Biol.* 6:487-492, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os fosfoinositídeos marcam organelas e domínios de membrana

Embora os fosfolipídeos de inositol tipicamente incluam menos de 10% do total de fosfolipídeos de uma membrana, eles possuem importantes funções reguladoras. Eles podem sofrer rápidos ciclos de fosforilação e de desfosforilação nas posições 3′, 4′ e 5′ de seus grupos de açúcar inositol para produzir vários tipos de **fosfoinositídeos** (**PIPs**, *phosphoinositides*). A interconversão de fosfatidilinositol (PI, *phosphatidylinositol*) e PIPs é altamente compartimentalizada: diferentes organelas das vias endocítica e biossintética-secretora possuem conjuntos distintos de PI, PIP-cinases e PIP-fosfatases (**Figura 13-10**). A distribuição, a regulação e o balanço local dessas enzimas determina o estado constante da distribuição de cada espécie de PIP. Como consequência, a distribuição dos PIPs varia de organela para organela e, frequentemente, dentro de uma membrana contínua de uma região para outra, definindo, deste modo, domínios de membrana especializados.

Muitas proteínas envolvidas em diferentes etapas do transporte vesicular contêm domínios que se ligam com alta especificidade aos grupos de cabeça de determinados PIPs, distinguindo uma forma fosforilada de outra. O controle local de PI e PIP-cinases pode, então, ser utilizados para controlar rapidamente a ligação de proteínas a uma membrana ou domínio de membrana. A produção de um tipo particular de PIP recruta proteínas portadores de domínios de ligação a PIP. As proteínas de ligação a PIP auxiliam, então, na regulação da formação vesicular e outras etapas no transporte de membrana (**Figura 13-11**). A mesma estratégia é amplamente utilizada para recrutar proteínas de sinalização intracelular específicas à membrana plasmática, em resposta aos sinais extracelulares (discutido no Capítulo 15).

Proteínas citoplasmáticas regulam a liberação e a remoção do revestimento das vesículas

À medida que um broto revestido de clatrina cresce, as proteínas citoplasmáticas solúveis, incluindo a **dinamina**, montam-se como um anel ao redor do pescoço de cada broto (**Figura 13-12**). A dinamina contém um domínio de ligação a PI(4,5)P_2, o qual ancora a proteína à membrana, e um domínio de GTPase que regula a frequência na qual as vesículas se liberam da membrana. No processo de se separarem (liberar), as duas lâminas não-citosólicas da membrana são aproximadas intimamente e se fundem, selando a terminação da vesícula em formação. Para executar essa tarefa, a dinamina recruta outras proteínas para o pescoço da vesícula em brotamento. Essas proteínas, conjuntamente à dinamina, auxiliam no dobramento da membrana de forma direta, distorcendo localmente a estrutura da bicamada, ou trocando a composição lipídica, ou, ainda, por ambos os processos.

Uma vez que a vesícula é liberada da membrana, o revestimento de clatrina é rapidamente perdido. Uma PIP-fosfatase que é coempacotada em vesículas revestidas de clatrina

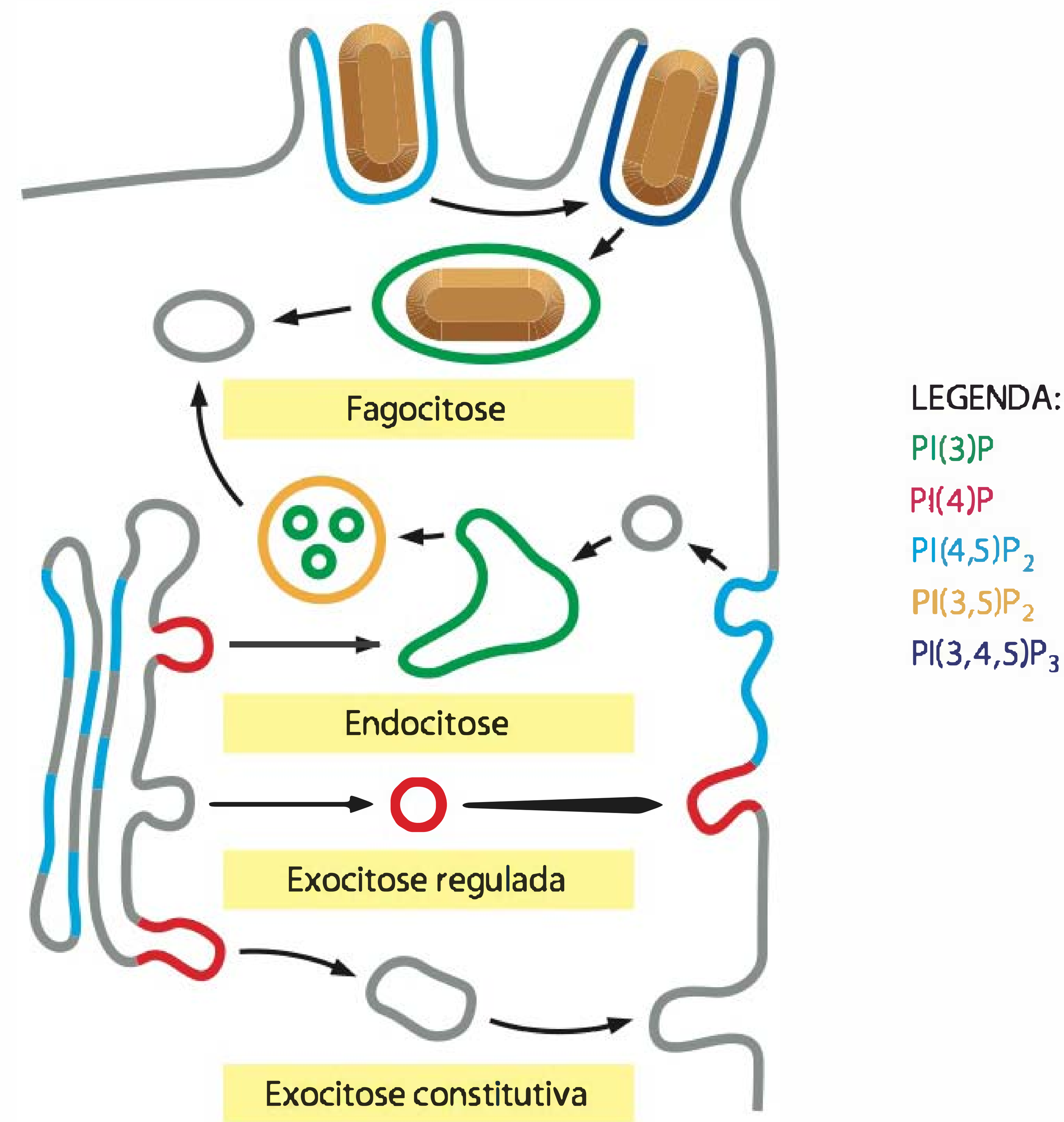


Figura 13-11 Localização intracelular dos fosfoinositídeos. Diferentes tipos de PIPs estão localizados em diferentes membranas e domínios de membranas, onde eles estão frequentemente associados a eventos de transporte vesicular. A membrana das vesículas secretoras, por exemplo, contém PI(4)P. Quando as vesículas fusionam-se à membrana plasmática, uma PI 5-cinase localizada lá converte o PI(4)P em PI(4,5)P_2. O PI(4,5)P_2, por sua vez, auxilia no recrutamento de proteínas adaptadoras, as quais iniciam a formação de uma fossa revestida de clatrina, como na primeira etapa da endocitose mediada por clatrina. Uma vez que a vesícula revestida por clatrina destaca-se da membrana plasmática, uma PI(5)P-fosfatase hidrolisa PI(4,5)P_2, o que enfraquece a ligação das proteínas adaptadoras, promovendo a remoção do revestimento da vesícula. Discutiremos fagocitose e a distinção entre exocitose regulada e constitutiva mais adiante neste capítulo. (Modificada de M. A. de Matteis e A. Godi, *Nat. Cell Biol* 6:487-492, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

esgota os PI(4,5)P_2 da membrana, o que enfraquece a ligação das proteínas adaptadoras. Além disso, uma proteína chaperona da família Hsp70 opera como uma ATPase de remoção do revestimento, utilizando a energia da hidrólise de ATP para removê-lo. Acredita-se que a *auxilina*, uma outra proteína de vesícula, ative a ATPase. Como o broto revestido persiste muito mais tempo do que o revestimento sobre a vesícula, os mecanismos adicionais de controle devem, de alguma forma, impedir a remoção do revestimento antes de a vesícula ter sido formada (discutido a seguir).

GTPases monoméricas controlam a montagem do revestimento

Para assegurar que o tráfego de membranas em direção a uma organela e em sentido contrário seja equilibrado, as proteínas de revestimento devem estruturar-se somente quando e onde elas são necessárias. As *GTPases recrutadoras de revestimento*, por exemplo, controlam a montagem dos revestimentos de clatrina sobre os endossomos e dos revestimentos de COPI e COPII sobre as membranas de Golgi e RE.

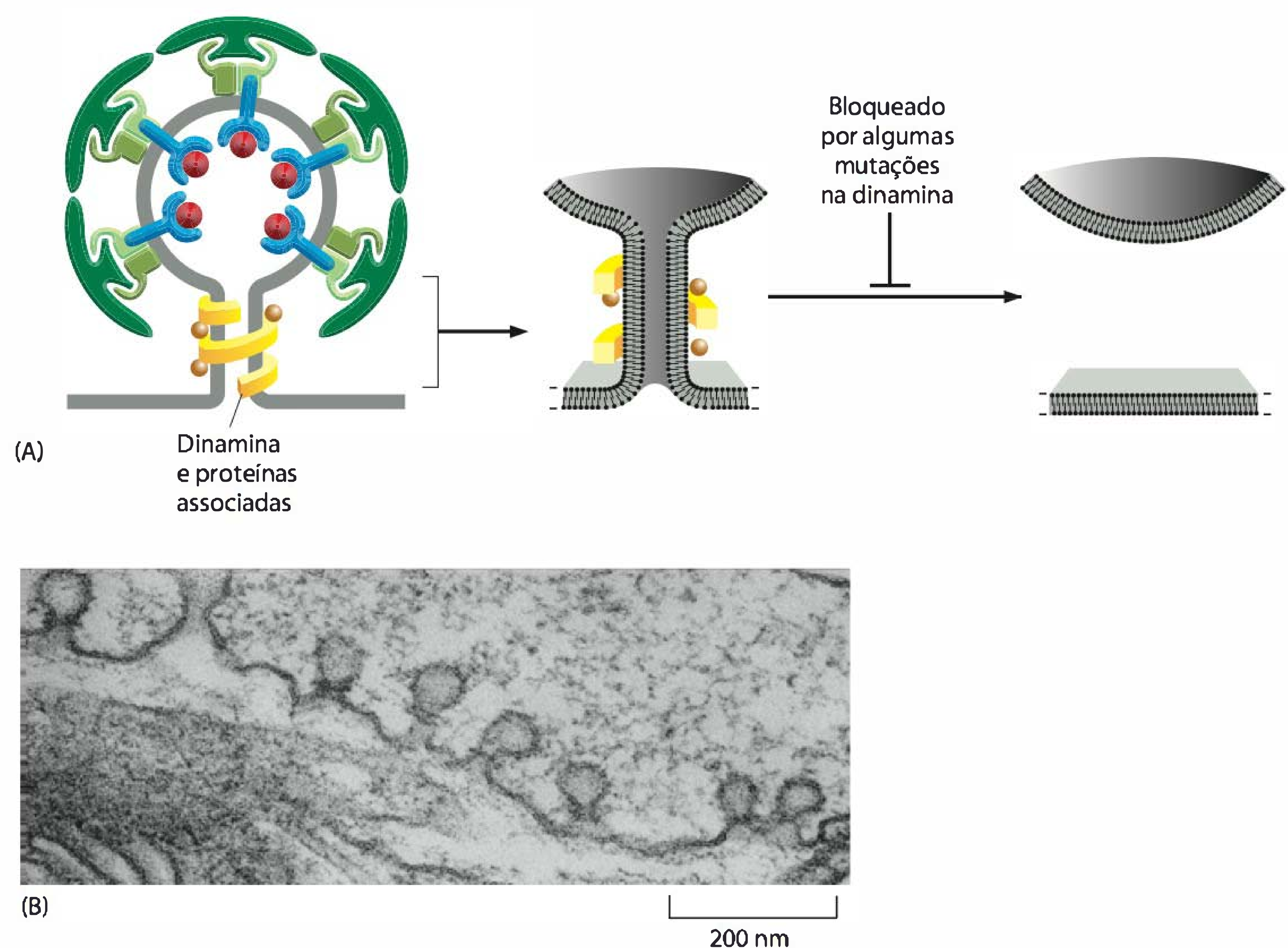


Figura 13-12 O papel da dinamina em liberar as vesículas revestidas de clatrina. (A) A dinamina liga-se a um broto em formação na membrana e se estabelece em um anel ao redor do pescoço do brotamento. Acredita-se que o anel de dinamina seja um molde que recruta outras proteínas para o pescoço da vesícula, as quais, juntamente com a dinamina, desestabilizam a membrana, de forma que as lâminas não-citoplasmáticas das bicamadas lipídicas se fundam. A vesícula recém-formada então se libera da membrana. Mutações específicas no gene codificador da dinamina podem aumentar ou bloquear o processo de liberação. (B) A dinamina foi descoberta como a proteína defectiva dos mutantes *shibire* da *Drosophila*. Estas moscas mutantes tornam-se paralisadas porque a endocitose mediada por clatrina cessa e a membrana de vesículas sinápticas falha em se reciclar, bloqueando a liberação de neurotransmissores. Formam-se fossas revestidas de clatrina profundamente invaginadas nas células nervosas das moscas, com um anel estruturado nos seus pescoços, como mostrado nesta micrografia eletrônica de microcortes. O processo então cessa, pois não ocorre a fusão de membranas. (B, retirada de J. H. Koenig e K. Ikeda, *J. Neurosci.* 9:3844-3860, 1989. Com permissão da Society of Neuroscience).

Muitas etapas do transporte vesicular dependem de várias proteínas ligantes de GTP que controlam os aspectos espaciais e temporais da troca de membranas. Como discutido no Capítulo 3, grandes famílias de proteínas de ligação ao GTP regulam diversos processos nas células. Estas proteínas atuam como interruptores moleculares que mudam entre um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP. Duas classes de proteínas regulam a mudança: os *fatores de troca de nucleotídeos de guanina* (*GEFs, guanine nucleotide-exchange factors*) ativam as proteínas pela catálise da troca de GDP por GTP, e as *proteínas ativadoras de GTPase* (GAPs, *GTPase-activating proteins*) inativam as proteínas ao desencadear a hidrólise do GTP ligado em GDP (ver Figura 3-71). Embora tanto as proteínas de ligação ao GTP monoméricas (GTPases monoméricas) como as proteínas GTP triméricas (proteínas G) tenham papéis essenciais no transporte vesicular, as funções das GTPases monoméricas são mais bem conhecidas e focaremos nossa discussão nelas a partir daqui.

As **GTPases recrutadoras de revestimento** são membros de uma família de GTPases monoméricas. Elas incluem as **proteínas Arf**, responsáveis pela montagem dos revestimentos de COPI e de clatrina das membranas de Golgi, e a **proteína Sar1**, a qual é responsável pela montagem do revestimento de COPII nas membranas do RE. As GTPases recrutadoras do revestimento normalmente são encontradas em altas concentrações no citosol em um estado inativo, ligado a GDP. Quando uma vesícula revestida de COPII está para brotar da membrana do RE, um GEF específico, embebido na membrana do RE, liga-se à Sar1 citosólica, fazendo com que a Sar1 libere GDP e ligue GTP no lugar dele. (Lembre que GTP está presente em uma concentração muito mais alta no citosol do que GDP e, portanto, a Sar1 irá ligar-se a ele espontaneamente, quando o GDP for liberado.) No seu estado ligado a GTP, a Sar1 expõe uma cauda hidrofóbica, a qual se insere na bicamada lipídica da membrana do RE. A Sar1 fortemente ligada agora recruta subunidades de proteínas do revestimento para a membrana do RE, para iniciar o brotamento (**Figura 13-13**). Outros GEFs e GTPases recrutadoras do revestimento operam de forma semelhante em outras membranas.

Algumas subunidades proteicas do revestimento também interagem, embora mais fracamente, com os grupos polares das cabeças de certas moléculas lipídicas, em particular com

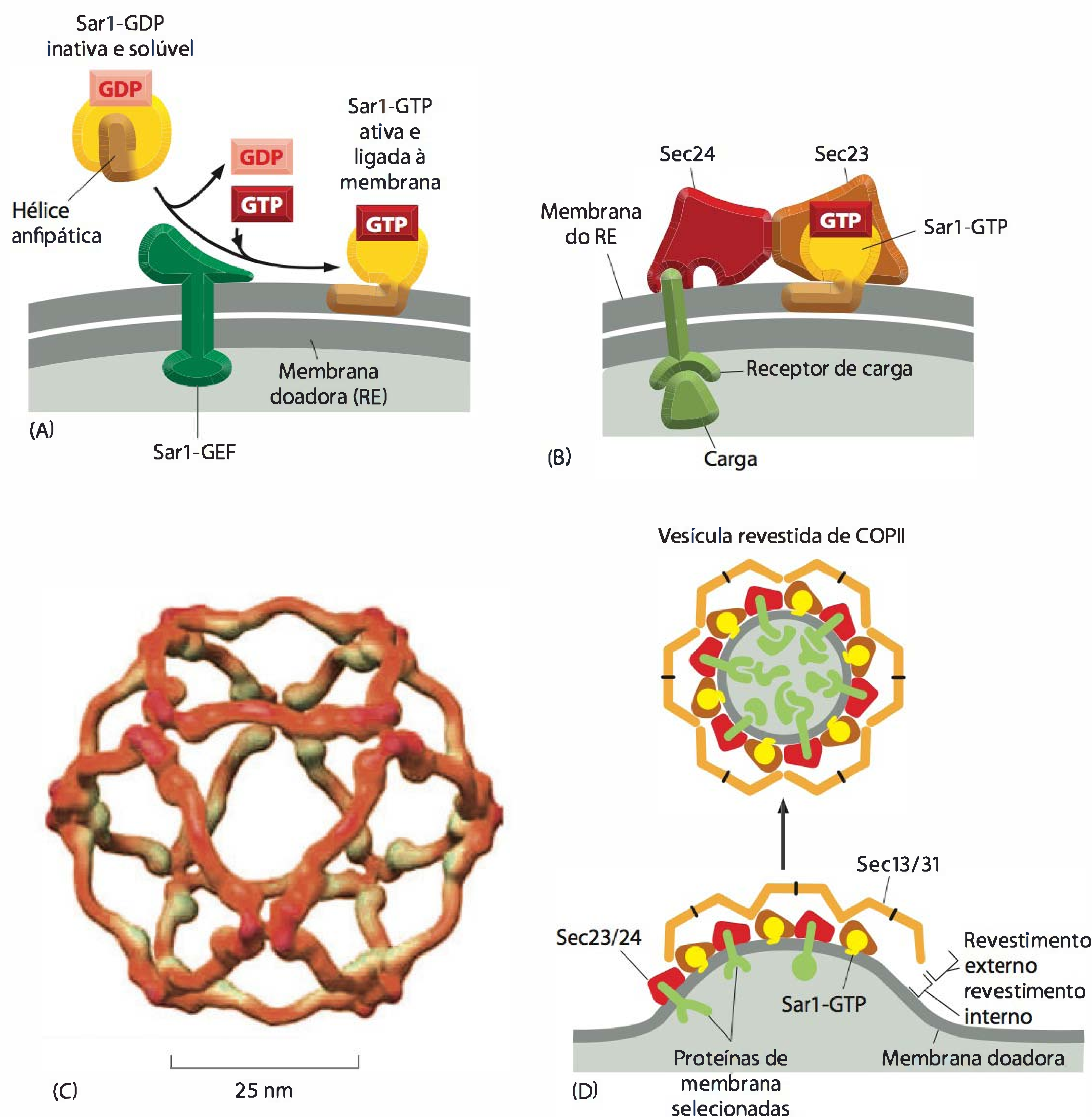


Figura 13-13 Formação de vesículas revestidas de COPII. (A) A proteína Sar1 é uma GTPase recrutadora de revestimento. Quando inativa, a Sar1-GDP solúvel liga-se a uma Sar1-GEF na membrana do RE, determinando que a Sar1 libere o seu GDP e ligue GTP. A Sar1-GEF (também chamada de Sec12) foi descoberta como um dos mutantes sensíveis à temperatura que bloqueiam o transporte do RE para o Golgi (ver Painel 13-1). Uma mudança conformacional desencadeada pelo GTP em Sar1 expõe uma hélice anfipática, a qual se insere na camada citoplasmática da membrana do RE, iniciando o processo de curvatura da membrana. (B) A Sar1 ligada a GTP liga-se a um complexo de duas subunidades de proteínas COPII, denominado Sec23/Sec24. A estrutura cristalográfica das proteínas Sec23/Sec24 unidas com Sar1 predizem como a hélice anfifílica de Sar1 ancora o complexo à membrana. A Sec24 possui vários sítios de ligação diferentes para caudas citoplasmáticas de proteínas-carga. Toda a superfície do complexo que se fixa à membrana é suavemente curvada para adequar-se ao diâmetro das vesículas revestidas de COPII. (C) Um complexo de duas proteínas de revestimento COPII adicionais, denominado Sec13/31, forma a camada externa do revestimento. À semelhança da clatrina, a Sec13/31, sozinha, pode montar-se em gaiolas simétricas com dimensões apropriadas para abrigar uma vesícula revestida de COPII. (D) A Sar1-GTP ativa, ligada à membrana, recruta subunidades de COPII para a membrana. Isso faz a membrana formar um broto, que inclui proteínas selecionadas de membrana. Um evento subsequente de fusão de membranas libera a vesícula revestida. Acredita-se que outras vesículas revestidas formem-se de maneira semelhante. A GTPase recrutadora Arf também possui uma hélice anfifílica regulada, mas, em contraste à Sar1, a hélice também contém uma cadeia de ácido graxo anexa que contribui para sua hidrofobicidade. Como em Sar1, a hélice anfifílica regulada encontra-se retraída no estado ligado a GDP e exposta quando ligada a GTP. Como discutiremos mais adiante, as *Rab GTPases* regulam suas fixações a membranas de modo similar (ver Figura 13-14). (C, modificada de S. M. Stagg et al., *Nature* 439:234-238, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

ácido fosfatídico e fosfoinositídeos, bem como com as caudas citoplasmáticas de algumas proteínas de membrana que elas recrutam para o brotamento. Juntas, essas interações proteína-proteína e proteína-lipídeo ligam fortemente o revestimento à membrana, determinando uma deformação da membrana em um broto, o qual se libera como uma vesícula revestida.

As GTPases recrutadoras de revestimento também exercem um papel na desmontagem do revestimento. A hidrólise do GTP ligado em GDP determina que a GTPase modifique a sua conformação de modo que a sua cauda hidrofóbica solte-se da membrana, fazendo com que o revestimento da vesícula se desmonte. Embora não se saiba o que desencadeia o processo de hidrólise de GTP, tem sido proposto que as GTPases trabalhem como temporizadores (*timers*), hidrolisando GTP em uma razão lenta, porém previsível. Os revestimentos de COPII, por exemplo, aceleram a hidrólise de GTP por Sar1, consequentemente desencadeando a desmontagem do revestimento algum tempo depois de a montagem ter iniciado. Assim, uma vesícula completamente formada será produzida quando a formação de um broto ocorrer mais rapidamente do que o processo programado de desmontagem; de outra maneira, a desmontagem será desencadeada antes de a vesícula ser liberada, e o processo deverá ser iniciado novamente em local e tempo mais apropriados.

Nem todas as vesículas de revestimento são esféricas

Embora os brotamentos de vesículas nos vários locais da célula tenham muitas similaridades, cada membrana celular possui seus próprios desafios especiais. A membrana plasmática, por exemplo, é comparativamente plana e firme, devido a sua composição lipídica rica em colesterol e ao citoesqueleto cortical subjacente. Logo, os revestimentos de clatrina devem produzir uma força considerável para introduzir curvatura, especialmente no pescoço do broto, onde a dinamina e suas proteínas associadas facilitam as curvaturas pronunciadas necessárias ao processo de destacamento. Ao contrário, o brotamento vesicular a partir de muitas membranas intracelulares ocorre preferencialmente em regiões onde as membranas já estão curvadas, como as bordas das cisternas de Golgi ou as extremidades da membrana dos túbulos.

As vesículas de transporte ocorrem em vários tamanhos e formas. Quando células vivas são modificadas por engenharia genética para expressar componentes fluorescentes de membrana, observa-se ao microscópio de fluorescência que os endossomos e a rede de Golgi *trans* continuamente enviam túbulos para fora. As proteínas de revestimento estruturam-se sobre os túbulos e auxiliam a recrutar cargas específicas. Os túbulos, então, recolhem-se ou destacam-se com o auxílio de proteínas semelhantes à dinamina e, assim, podem servir como vesículas de transporte. Dependendo da eficiência relativa da tubulação e do processo de liberação, vesículas de tamanhos e formas diferentes são produzidas. Portanto, o transporte vesicular não ocorre necessariamente apenas através de vesículas esféricas de tamanho uniforme, mas pode envolver porções maiores de uma organela doadora.

Os túbulos têm uma razão superfície/volume muito mais alta do que as organelas a partir das quais eles se formam. Portanto, eles são relativamente enriquecidos em proteínas de membrana em relação às proteínas-carga solúveis. Como discutiremos mais tarde, essa propriedade dos túbulos é utilizada para classificar as proteínas nos endossomos.

As proteínas Rab guiam o transporte para a vesícula

Para assegurar que o tráfego de membranas siga de uma maneira ordenada, as vesículas de transporte devem ser altamente seletivas para reconhecer a membrana-alvo correta com a qual irão se fundir. Devido à diversidade e à quantidade de sistemas de membranas no citoplasma, uma vesícula irá, provavelmente, encontrar muitas membranas-alvo potenciais antes de encontrar a correta. A especificidade em direcionamento é assegurada porque todas as vesículas de transporte exibem marcadores de superfície que as identificam de acordo com as suas origens e os seus tipos de carga, enquanto as membranas-alvo exibem receptores complementares que reconhecem os marcadores apropriados. Esse processo crucial depende de dois tipos de proteínas: as *proteínas Rab* direcionam a vesícula aos locais específicos na membrana-alvo correta e, então, as proteínas *SNARE* medeiam a fusão das bicamadas lipídicas.

As **proteínas Rab** parecem ter um papel central na especificidade do transporte vesicular. Como as GTPases de recrutamento de revestimento discutidas anteriormente (ver Figura 13-13), elas também são GTPases monoméricas. Com mais de 60 membros conhecidos, elas compõem a maior subfamília de GTPases. Cada proteína Rab associa-se com uma ou mais organelas das vias biossintética-secretora ou endocítica, e cada uma dessas organelas possui, pelo

Tabela 13-1 Localizações subcelulares de algumas proteínas Rab

Proteína	Organela
Rab1	RE e complexo de Golgi
Rab2	Rede *cis* de Golgi
Rab3A	Vesículas sinápticas, grânulos de secreção
Rab4/Rab11	Endossomos iniciais
Rab5A	Membrana plasmática, vesículas revestidas de clatrina
Rab5C	Endossomos iniciais
Rab6	Cisternas medial e *trans* de Golgi
Rab7	Endossomos tardios
RabB	Vesículas secretoras (basolaterais)
Rab9	Endossomos tardios, rede *trans* de Golgi

menos, uma proteína Rab em sua superfície citosólica (**Tabela 13-1**). Sua distribuição altamente seletiva sobre estes sistemas de membrana torna as proteínas Rab um marcador molecular ideal para identificar cada tipo de membrana e guiar o tráfego de vesículas entre elas. As proteínas Rab podem atuar nas vesículas de transporte, nas membranas-alvo, ou em ambos.

À semelhança das GTPases de recrutamento de revestimento, as proteínas Rab ciclam entre a membrana e o citosol e regulam a montagem reversível dos complexos proteicos da membrana. Em seu estado ligado a GDP, elas são inativas e ligadas à outra proteína (*inibidor de dissociação Rab-GDP* ou *GDI*) que as mantêm solúveis no citosol, enquanto em seu estado ligado a GTP elas são ativas e fortemente associadas à membrana de uma organela ou vesícula de transporte. Membranas ligadas a Rab-GEFs ativam proteínas Rab tanto no transporte de vesículas, quanto nas membranas-alvo, já que as moléculas Rab normalmente são requeridas em ambos os lados. Uma vez em seu estado ligado a GDP e ligado à membrana, por meio de uma âncora lipídica hidrofóbica, as proteínas Rab ligam-se a outras proteínas, denominadas **efetores de Rab**, as quais facilitam o transporte vesicular, o apresamento e a fusão da membrana (**Figura 13-14**). A hidrólise de GTP determina a concentração de Rab ativa e, consequentemente, a concentração de seus efetores na membrana.

Em contraste à estrutura altamente conservada das proteínas Rab, as estruturas das efetoras de Rab variam significativamente. Alguns efetores de Rab, por exemplo, são *proteínas motoras* que propulsionam as vesículas ao longo de filamentos de actina ou de microtúbulos para os seus alvos apropriados. Outros são *proteínas de apresamento*, algumas das quais possuem longos domínios filiformes que servem como linhas de pesca, os quais podem se estender para ligar duas membranas que estão a mais de 200 nm de distância; outras proteínas de apresamento são grandes complexos que ligam duas membranas que estão mais próximas. Os efetores de Rab também podem interagir com SNAREs, acoplando, então, o apresamento da membrana à fusão.

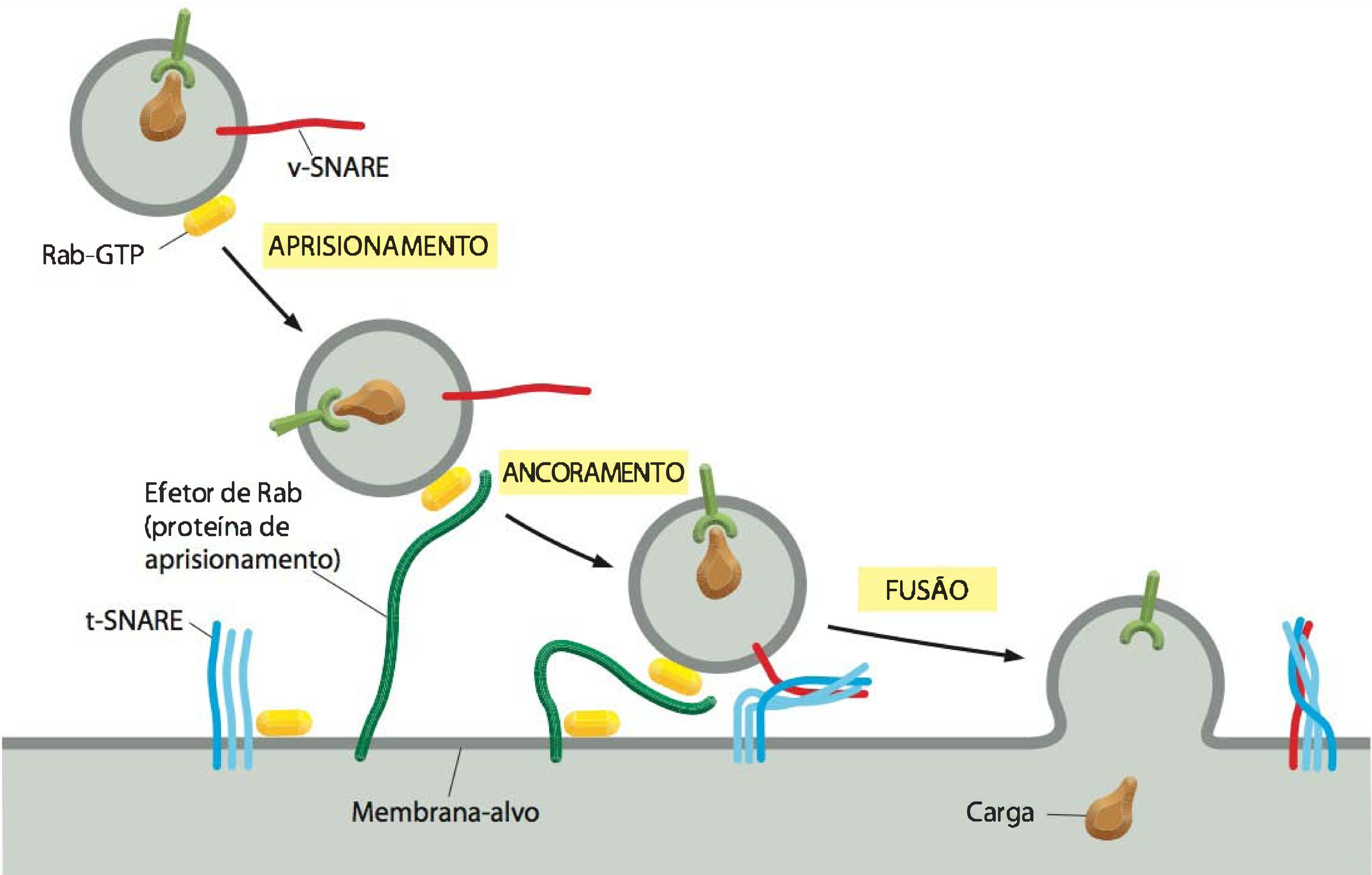


Figura 13-14 Aprisionamento de uma vesícula à membrana-alvo. As proteínas efetoras de Rab interagem via proteínas Rab ativas (Rab-GTPs, *amarelo*), localizadas na membrana-alvo, na membrana da vesícula ou em ambas, para estabelecer a primeira conexão entre duas membranas que irão se fundir. No exemplo mostrado aqui, o efetor de Rab é uma proteína filamentosa de aprisionamento (*verde*). A seguir, proteínas SNARE sobre as duas membranas (*vermelho* e *azul*) pareiam para ancorar a vesícula à membrana-alvo e catalisar a fusão de duas bicamadas lipídicas justapostas.

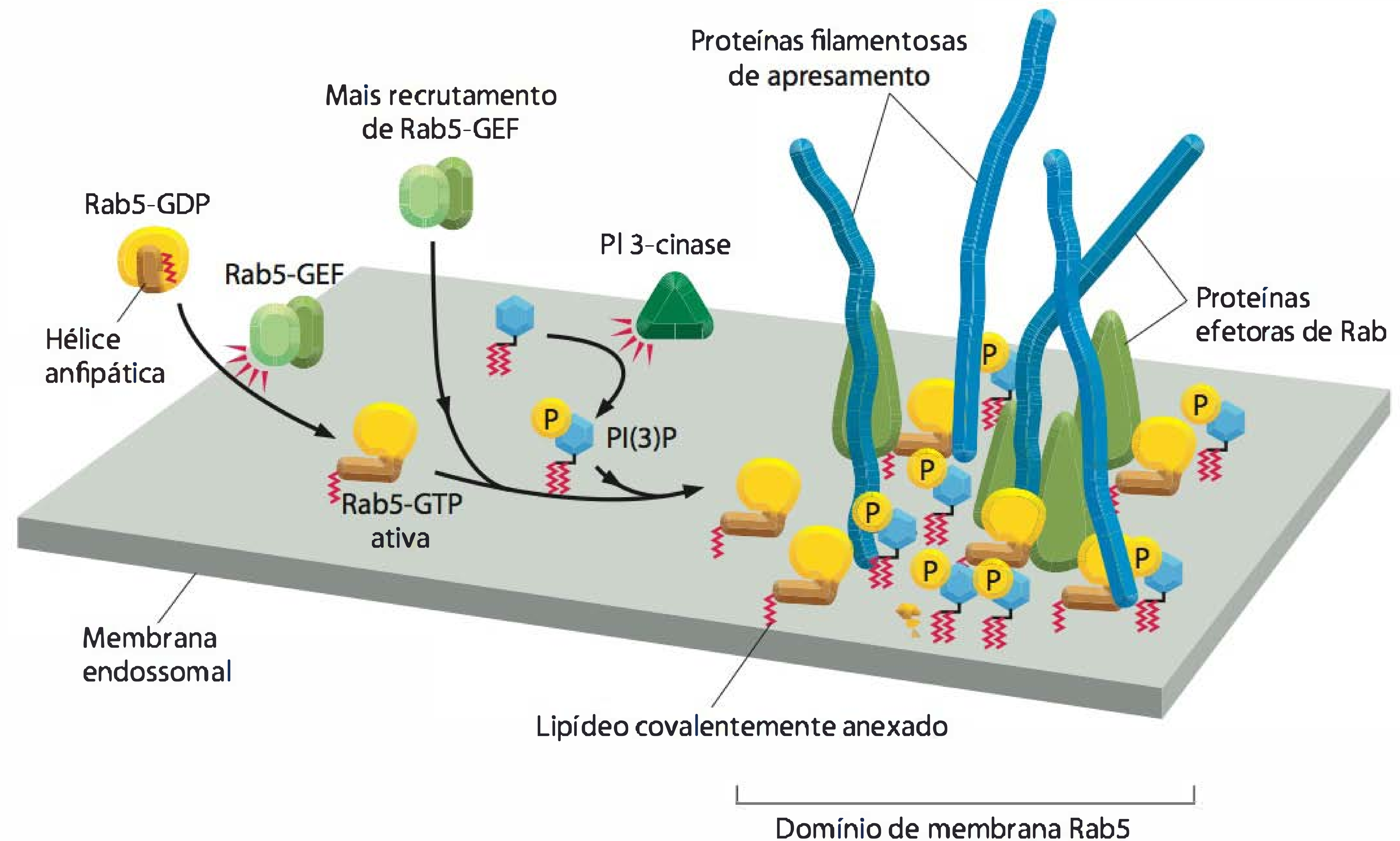


Figura 13-15 Formação de um domínio Rab5 na membrana endossomal. Uma GEF Rab5-específica na membrana endossomal liga-se à proteína Rab5 e a induz a trocar GDP por GTP. A ligação a GTP altera a conformação da proteína Rab, expondo uma hélice anfifílica e um grupo lipídico covalentemente anexado, os quais, juntos, ancoram Rab-GTP à membrana. A forma ativa de Rab5 ativa a PI 3-cinase, a qual converte PI em PI(3)P. Em conjunto, PI(3)P e Rab5 ativa ligam uma variedade de proteínas efetoras de Rab que contêm sítios de ligação a PI(3)P, incluindo proteínas filamentosas de apresamento que capturam vesículas revestidas de clatrina que chegam da membrana plasmática. A Rab5 ativa também recruta mais Rab5-GEF, otimizando a montagem do domínio Rab5 na membrana.

Acredita-se que ciclos controlados de hidrólise de GTP e trocas de GDP--GTP regulem o tamanho e a atividade de tais domínios Rab dinamicamente. Ao contrário das SNAREs, proteínas integrais da membrana, o ciclo GDP/GTP, acoplado ao ciclo de translocação membrana/citosol, confere à maquinaria Rab a capacidade de sofrer montagem e desmontagem na membrana. Por exemplo, durante o transporte de endossomos inicias para tardios, Rab5 pode ser movida e substituída por Rab7, designando a carga à degradação. (Adaptada de M. Zerial e H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:107-117, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As mesmas proteínas Rab podem ligar-se a múltiplos efetores. A montagem das proteínas Rab e de seus efetores sobre uma membrana é cooperativa e resulta na formação de fragmentos grandes e especializados. Rab5, por exemplo, agrega-se a membranas endossomais e medeia a captura de vesículas revestidas de clatrina oriundas da membrana plasmática. Ela recruta proteínas de apresamento para capturar as vesículas que entram. Inicialmente, Rab5-GEF recruta Rab5 ao endossomo e a converte em sua forma ativa ligada a GTP, a qual se torna ancorada à membrana (**Figura 13-15**). A Rab5 ativa recruta mais Rab5-GEF ao endossomo, de modo a estimular o recrutamento de mais Rab5 para o mesmo local. Além disso, a forma ativa de Rab5 ativa a PI 3-cinase, a qual converte, de forma localizada, PI em PI(3)P, que, por sua vez, se liga a alguns dos efetores de Rab. Esse tipo de retroalimentação positiva otimiza o processo de montagem e auxilia a estabelecer domínios de membrana funcionalmente distintos, dentro de uma membrana contínua.

As membranas endossomais são um exemplo muito ilustrativo de como diferentes proteínas Rab e seus efetores ajudam a criar múltiplos domínios de membrana especializados, cada um preenchendo um conjunto particular de funções. Logo, enquanto domínios Rab5 recebem vesículas oriundas da membrana plasmática, acredita-se que domínios distintos Rab11 e Rab4 na mesma membrana organizem o brotamento e a reciclagem de vesículas que retornam proteínas do endossomo para a membrana plasmática. Uma vez montados, estes domínios coexistem na mesma membrana, mesmo por períodos prolongados.

As SNAREs fazem a mediação da fusão de membranas

Uma vez que uma vesícula de transporte tenha sido ancorada a sua membrana-alvo, ela descarrega a sua carga pela fusão de membranas. A fusão requer a aproximação das bicamadas das duas membranas a 1,5 nm uma da outra de forma que possam se juntar. Quando as membranas estão de tal forma apostas, os lipídeos podem fluir da bicamada de uma para a da outra. Para esta abordagem íntima, a água deve ser deslocada da superfície hidrofílica da membrana – um processo energeticamente muito desfavorável. Parece provável que *proteínas de fusão* especializadas, capazes de superar essa barreira energética, catalisem todas as fusões de membranas nas células. Já discutimos o papel da dinamina em uma tarefa relacionada, durante o brotamento de vesículas revestidas de clatrina (ver Figura 13-12).

As **proteínas SNARE** (também chamadas de **SNAREs**, para abreviar) catalisam as reações de fusão das membranas no transporte vesicular. Elas também fornecem um adicional de especificidade no processo de transporte ao auxiliar a garantir que somente moléculas--alvo corretamente marcadas fusionem. Existem, pelo menos, 35 SNAREs diferentes em cada célula animal, cada uma associada a uma organela particular, nas vias biossintética-secretora ou endocítica. Estas proteínas transmembrana existem como conjuntos complementares – com as **v-SNAREs** geralmente encontradas nas membranas das vesículas e as **t-SNAREs** geralmente encontradas nas membranas-alvo (ver Figura 13-14). A v-SNARE trata-se de uma cadeia polipeptídica única, enquanto a t-SNARE é composta de duas ou três proteínas (**Figura 13-16**). As v-SNAREs e as t-SNAREs possuem domínios helicoidais característicos

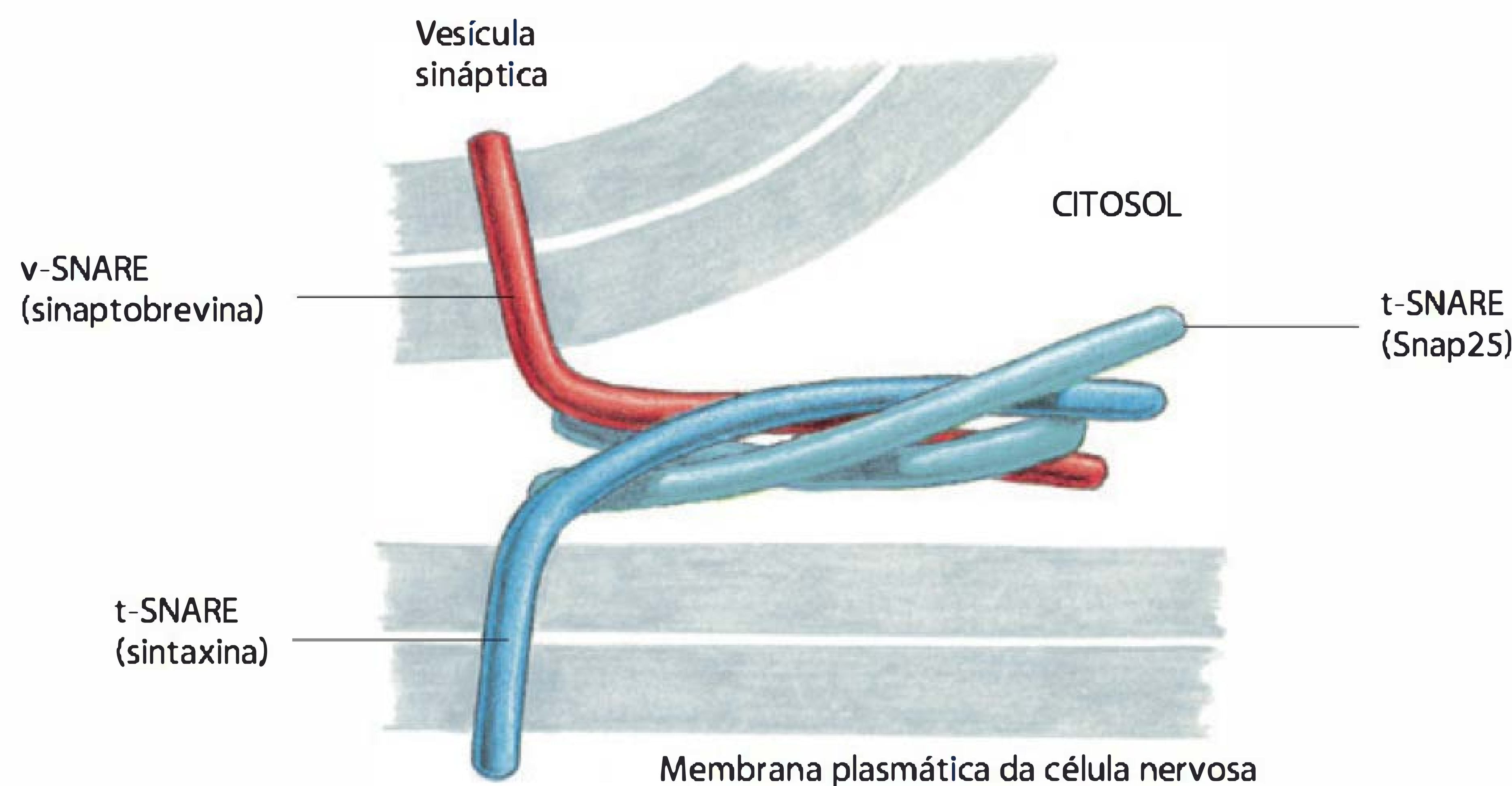


Figura 13-16 Estrutura de um complexo trans-SNARE. As SNAREs responsáveis pela ancoragem de vesículas sinápticas nas membranas plasmáticas de terminações nervosas consistem em três proteínas. A v-SNARE *sinaptobrevina* e a t-SNARE *sintaxina* são proteínas transmembrana, cada uma contribuindo com uma hélice α para o complexo. A t-SNARE *Snap25* é uma proteína periférica de membrana que contribui com duas hélices α para o feixe de quatro hélices α. Elas são conectadas por uma alça (omitida na figura) localizada paralelamente à membrana e que possui cadeias de ácidos graxos para ancorá-la. Os complexos trans-SNAREs consistem sempre em quatro hélices α firmemente entrelaçadas, três pertencentes a t-SNAREs e uma pertencente a uma v-SNARE. As t-SNAREs são compostas de múltiplas cadeias, uma das quais é sempre uma proteína transmembrana que contribui com uma hélice, e uma ou duas cadeias leves adicionais, que podem ou não ser proteínas transmembrana e que contribuem com as duas hélices remanescentes para o feixe de quatro hélices do complexo trans-SNAREs. A estrutura cristalina de um complexo estável das quatro hélices α entrelaçadas fornecidas por estas proteínas está modelada aqui no contexto das proteínas inteiras. As hélices α estão representadas na forma de bastões, para simplificar. (Adaptada de R. B. Sutton et al., *Nature* 395:347-353, 1998. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

e, quando uma v-SNARE interage com uma t-SNARE, os domínios helicoidais de uma envolvem os domínios da outra para formar um estável feixe de quatro hélices. Os *complexos trans-SNARE* resultantes prendem as duas membranas juntas.

As SNAREs têm sido melhor caracterizadas nos neurônios, onde medeiam a ancoragem e a fusão das vesículas sinápticas na membrana plasmática das terminações nervosas, no processo de liberação de neurotransmissores. As bactérias que causam tétano e botulismo secretam poderosas neurotoxinas proteolíticas que adentram neurônios específicos e clivam proteínas SNARE nas terminações nervosas. Dessa forma, as toxinas bloqueiam as transmissões sinápticas, frequentemente levando à morte.

Acredita-se que os complexos trans-SNARE catalisem a fusão de membranas ao utilizar a energia liberada quando as hélices entrelaçadas enovelam-se para aproximar as faces das membranas, enquanto expelem as moléculas de água para fora da interface (**Figura 13-17**). Quando os lipossomos contendo v-SNAREs purificadas são misturados a lipossomos contendo as t-SNAREs complementares, as suas membranas fundem-se, embora lentamente. Na célula, outras proteínas recrutadas para o sítio de fusão, presumivelmente efetores de Rab, cooperam com as SNAREs para iniciar a fusão.

A fusão nem sempre ocorre imediatamente após o pareamento de v-SNAREs e t-SNAREs. Como discutiremos mais tarde, no processo de exocitose regulada, a fusão é retardada até que a secreção seja desencadeada por um sinal extracelular específico. Nesse caso, um influxo localizado de Ca^{2+} desencadeia o processo de fusão, provavelmente por liberar proteínas inibidoras que previnam o fechamento completo dos complexos trans-SNARE.

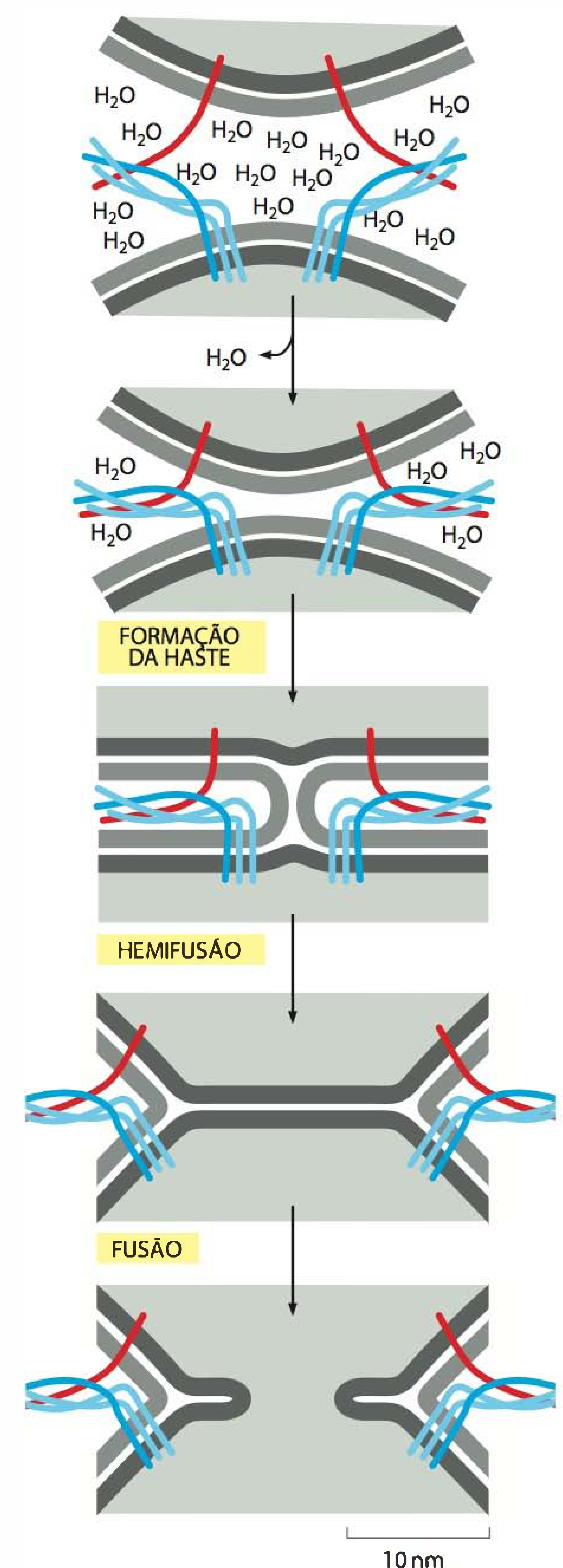


Figura 13-17 Modelo de como as proteínas SNARE podem catalisar fusões de membrana. A fusão de bicamadas ocorre em múltiplas etapas. Um forte pareamento de v-SNAREs e t-SNAREs força as bicamadas lipídicas a se justaporem intimamente e expele as moléculas de água da interface. Os lipídeos das duas lâminas participantes, então, fluem entre as membranas para formar uma haste conectora. A seguir, os lipídeos das duas outras lâminas entram em contato, formando uma nova bicamada, a qual amplia a zona de fusão (*hemifusão*, ou meia-fusão). A ruptura da nova bicamada completa a reação de fusão.

As proteínas Rab, as quais podem regular a disponibilidade das proteínas SNARE, exercem uma atividade adicional de controle. As t-SNAREs em membranas-alvo frequentemente são associadas a proteínas inibitórias que devem ser liberadas antes que a t-SNARE possa funcionar. As proteínas Rab e seus efetores desencadeiam a liberação de tais proteínas inibidoras de SNARE. Dessa forma, as proteínas SNARE são concentradas e ativadas no local correto da membrana, onde proteínas de apresamento capturam as vesículas que entram. As proteínas Rab, então, aceleram o processo pelo qual as proteínas SNARE apropriadas de duas membranas se encontram.

Para o transporte vesicular operar normalmente, as vesículas de transporte devem incorporar as proteínas SNARE e Rab apropriadas. Não surpreendentemente, portanto, muitas vesículas de transporte serão formadas somente se incorporarem o complemento correto das proteínas SNARE e Rab de suas membranas. Como esse processo de controle crucial opera durante o brotamento da vesícula ainda permanece um mistério.

As SNAREs em interação necessitam ser afastadas antes que possam funcionar novamente

A maioria das proteínas SNARE nas células já participou de turnos múltiplos de direcionamento de membranas e está, algumas vezes, presente em uma membrana como complexos estáveis com SNAREs parceiras. Os complexos devem ser desmontados antes que as SNAREs possam mediar novos turnos de transporte. Uma proteína crucial, chamada de **NSF**, circula entre as membranas e o citosol e catalisa o processo de desmontagem. Trata-se de uma ATPase que utiliza energia da hidrólise de ATP para desemaranhar a interação entrelaçada dos domínios helicoidais das proteínas SNARE (**Figura 13-18**). A condição de reativação das SNAREs mediada por NSF, pela desmontagem dos complexos de SNAREs, ajuda a prevenir que as membranas não se fundam indiscriminadamente: se as t-SNAREs de uma membrana-alvo estivessem sempre ativas, então qualquer membrana contendo as v-SNAREs apropriadas iria fusionar-se sempre que as duas membranas realizassem contato. Não se sabe como a atividade de NSF é controlada de forma que a maquinaria de SNARE seja ativada em tempo e local corretos, mas os efetores de Rab são prováveis candidatos a cumprir um papel nesse processo.

As proteínas de fusão virais e as SNAREs podem utilizar mecanismos de fusão semelhantes

A fusão de membranas é importante em outros processos, além do transporte vesicular. As membranas plasmáticas de um espermatozoide e de um óvulo fusionam-se durante a fertilização (discutido no Capítulo 21) e os mioblastos fusionam-se um com o outro, durante o desenvolvimento de fibras musculares multinucleadas (discutido no Capítulo 22). Do mesmo modo, as mitocôndrias se fundem e fragmentam de maneira dinâmica (discutido no Capítulo 14). Todas as fusões de membranas celulares necessitam de proteínas especiais e estão sujeitas a controles restritos, os quais asseguram que somente as membranas apropriadas se fundam. Os controles são cruciais para a manutenção da identidade das células e da individualidade de cada tipo de compartimento intracelular.

As fusões de membranas catalisadas por proteínas virais de fusão são as mais conhecidas. Essas proteínas desempenham um papel crucial ao permitir a entrada dos vírus envelopados (os quais possuem um revestimento com base em uma bicamada lipídica) nas células que infectam (discutido nos Capítulos 5 e 24). Por exemplo, os vírus – como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que causa a AIDS – ligam receptores da superfície celular e, então, as membranas viral e plasmática fundem-se (**Figura 13-19**). Esse evento de fusão

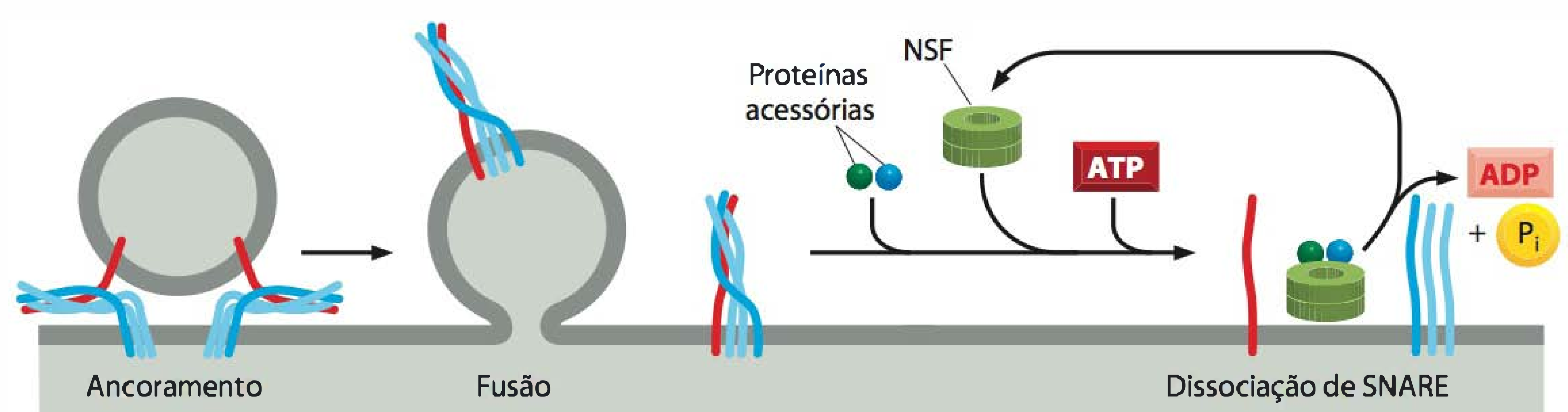


Figura 13-18 Dissociação de pares de SNARE por NSF após um ciclo de fusão da membrana. Após v-SNARE e t-SNARE terem mediado a fusão de uma vesícula de transporte sobre a membrana-alvo, NSF se liga ao complexo SNARE e, com a ajuda de duas proteínas acessórias, hidroliza ATP para dissociar as SNARES.

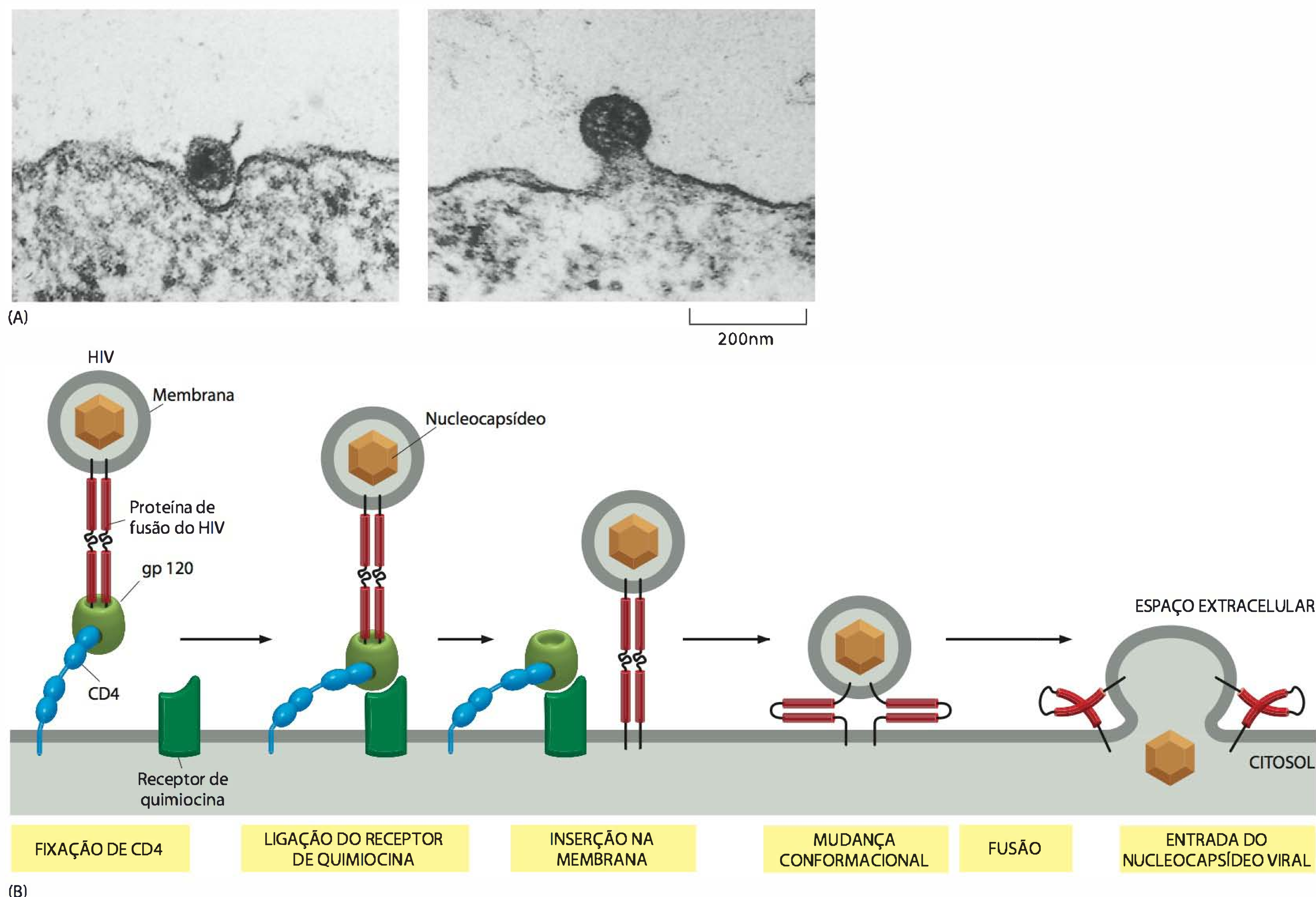


Figura 13-19 Entrada de vírus envelopados em células. (A) Micrografias eletrônicas mostram como o HIV entra em uma célula pela fusão da sua membrana com a membrana plasmática da célula. (B) Um modelo para o processo de fusão. O HIV liga-se primeiro à proteína CD4 na superfície da célula-alvo. A proteína viral gp120, a qual está ligada à proteína de fusão do HIV, medeia esta interação. Uma segunda proteína de superfície celular na célula-alvo, que normalmente serve como receptor para quimiocinas (discutidas nos Capítulos 24 e 25), agora interage com gp120. Essa interação libera a proteína de fusão do HIV da gp120, permitindo que o peptídeo de fusão hidrofóbico previamente escondido se insira na membrana plasmática da célula-alvo. A proteína de fusão, que é um trímero (não-representado), ancora-se temporariamente como uma proteína integral de membrana em duas membranas opostas. A proteína de fusão, então, espontaneamente rearranja-se, colapsando em um feixe fortemente compactado de seis hélices. A energia liberada por esse rearranjo em cópias múltiplas da proteína de fusão é utilizada para aproximar as duas membranas, superando a barreira de alta energia de ativação que normalmente previne a fusão de membranas. Assim, como uma ratoeira, a proteína de fusão do HIV contém um reservatório de energia potencial, o qual é liberado e aproveitado para realizar força mecânica. (A, de B. S. Stein et al., *Cell* 49:659-668, 1987. Com permissão de Elsevier; B, adaptada de um desenho de Wayne Hendrickson.)

permite que o ácido nucleico viral entre no citosol, onde é replicado. Outros vírus, tais como o vírus da gripe (vírus Influenza), entram primeiro na célula por endocitose mediada por receptores (discutido mais tarde) e são entregues aos endossomos; o baixo pH dos endossomos ativa uma proteína de fusão do envelope viral, que catalisa a fusão das membranas viral e endossômica, liberando o ácido nucleico viral no citosol.

As estruturas tridimensionais das proteínas de fusão do vírus do HIV e da gripe permitem uma boa compreensão a respeito dos mecanismos moleculares das fusões de membranas catalisadas por estas proteínas. A exposição da proteína de fusão do vírus do HIV a receptores na membrana-alvo celular, ou a exposição da proteína de fusão do vírus da gripe a baixo pH, revela regiões hidrofóbicas anteriormente escondidas. Estas regiões, chamadas de *peptídeos de fusão*, inserem-se diretamente no centro hidrofóbico da bicamada lipídica da membrana-alvo. Assim, as proteínas virais de fusão tornam-se, de forma transiente, proteínas integrais de membrana em duas bicamadas lipídicas separadas. Os rearranjos estruturais nas proteínas de fusão, então, trazem as duas bicamadas lipídicas para uma aposição muito íntima e as desestabilizam, de forma que as bicamadas se fundem (ver Figura 13-19). Logo, as proteínas de fusão virais e as SNAREs promovem fusão de bicamadas lipídicas de maneiras similares.

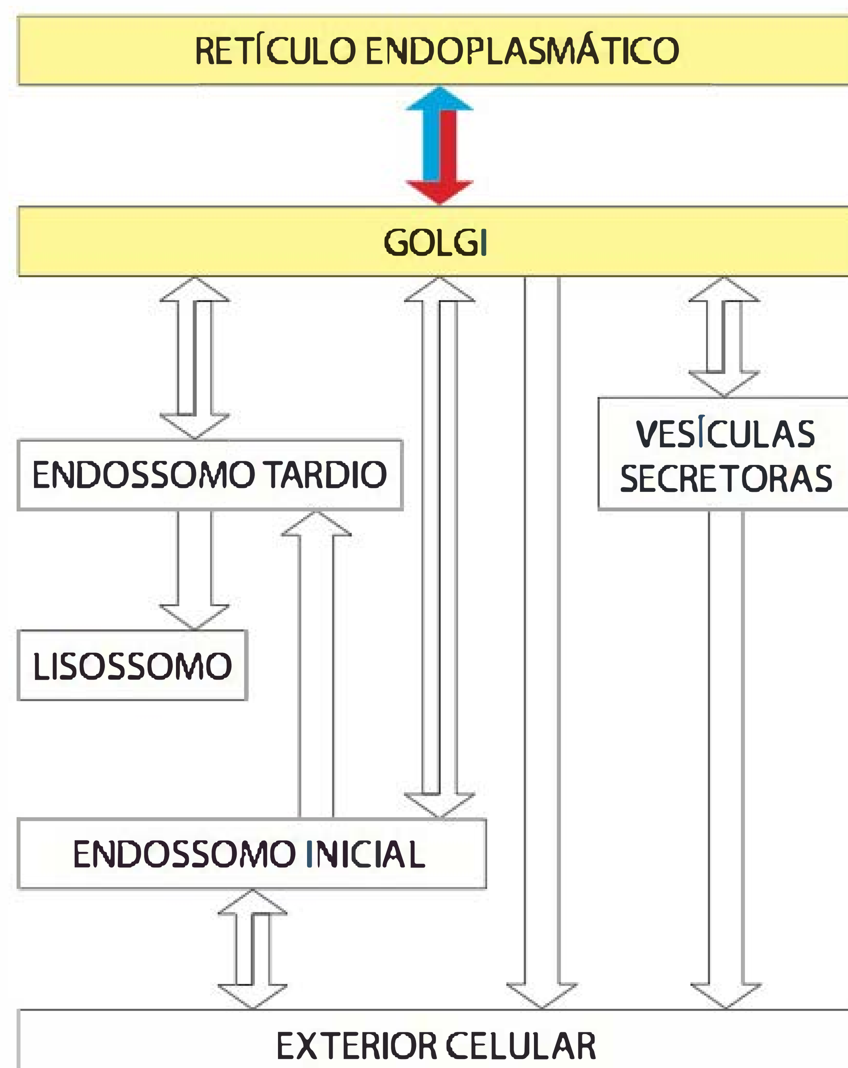
Resumo

O transporte dirigido e seletivo de componentes de membranas específicas de um compartimento de uma célula eucariótica para outro mantém as diferenças entre estes compartimentos. As vesículas de transporte, que podem ser esféricas, tubulares, ou de formas irregulares, brotam a partir de regiões revestidas especiais da membrana doadora. A montagem do revestimento auxilia a coletar membranas específicas e moléculas-carga solúveis para o transporte e para a formação da vesícula.

Existem vários tipos de vesículas revestidas. As melhor caracterizadas são aquelas revestidas de clatrina, as quais medeiam o transporte a partir da membrana plasmática e da rede trans de Golgi, e as revestidas de COPI e COPII, as quais medeiam o transporte entre as cisternas de Golgi e entre o RE e o aparelho de Golgi. Nas vesículas revestidas de clatrina, as proteínas adaptadoras ligam a clatrina à membrana da vesícula e também aprisionam moléculas específicas de carga para empacotamento dentro da vesícula. O revestimento é rapidamente removido após o brotamento, o que é necessário para a vesícula fundir-se a sua membrana-alvo apropriada.

A síntese local de fosfoinositídeos cria sítios de ligação que desencadeiam a montagem do revestimento e o brotamento da vesícula. Além disso, as GTPases monoméricas auxiliam a regular várias das etapas do transporte vesicular, incluindo o brotamento de vesículas e a ancoragem. As GTPases de recrutamento de revestimento, incluindo Sar1 e as proteínas Arf, regulam a montagem e a desmontagem do revestimento. Uma grande família de proteínas Rab funciona como GTPases de direcionamento de vesículas. As proteínas Rab são recrutadas às vesículas de transporte e membranas-alvo. A montagem e desmontagem das proteínas Rab e seus efetores, em domínios de membrana especializados, são controladas dinamicamente pela ligação e hidrólise de GTP. Proteínas Rab ativas recrutam efetores de Rab, como as proteínas motoras, as quais transportam as vesículas sobre filamentos de actina ou microtúbulos, e as proteínas filamentosas de apresamento, as quais ajudam a garantir que as vesículas entreguem seus conteúdos apenas ao compartimento delimitado por membrana correto. As proteínas complementares v-SNARE, no transporte de vesículas, e as t-SNARE, na membrana-alvo, formam complexos trans-SNAREs estáveis, o que força as duas membranas em aposição íntima, de forma que suas bicamadas lipídicas possam fusionar-se.

TRANSPORTE A PARTIR DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO ATRAVÉS DO APARELHO DE GOLGI



Como discutido no Capítulo 12, as proteínas recém-sintetizadas atravessam a membrana do RE, a partir do citosol, para entrar na via biossintética-secretora. Durante o seu transporte subsequente, do RE para o aparelho de Golgi e do aparelho de Golgi para a superfície celular ou outro local, estas proteínas passam através de uma série de compartimentos, onde são sucessivamente modificadas. A transferência de um compartimento para o próximo envolve um equilíbrio delicado entre vias de progressão e de retrocesso (recuperação). Algumas vesículas de transporte selecionam moléculas-carga e as movem para o próximo compartimento da via, enquanto outras recolhem proteínas perdidas e as levam de volta ao compartimento anterior, onde elas normalmente funcionam. Assim, a via a partir do RE para a superfície celular envolve muitas etapas de classificação nas quais as proteínas de membrana e as proteínas solúveis do lúmen são continuamente selecionadas para empacotamento e transporte – em vesículas ou fragmentos de organelas que brotam do RE e do aparelho de Golgi.

Nesta seção, iremos focar principalmente o **aparelho de Golgi** (também chamado de **complexo de Golgi**). É um dos principais sítios de síntese de carboidratos, bem como uma estação de classificação e de destinação para produtos do RE. A célula produz muitos polissacarídeos no aparelho de Golgi, incluindo a pectina e a hemicelulose da parede celular de vegetais, e a maioria dos glicosaminoglicanos da matriz extracelular de animais (discutido no Capítulo 19). O aparelho de Golgi, porém, também se posiciona na saída da via que parte do RE, e uma grande proporção dos carboidratos que são aí produzidos é conectada como cadeias laterais de oligossacarídeos em muitas proteínas e lipídeos que o RE envia. Um subconjunto desses oligossacarídeos serve como rótulos para direcionar proteínas específicas a vesículas que, então, as transportam para os lisossomos. No entanto, uma vez que as proteínas e os lipídeos em sua maioria tenham adquirido os seus oligossacarídeos apropriados no aparelho de Golgi, são reconhecidos de outras maneiras para serem levados, pelas vesículas de transporte, aos seus diferentes destinos.

As proteínas deixam o retículo endoplasmático em vesículas de transporte revestidas de COPII

Para iniciar a sua jornada ao longo da via biossintética-secretora, as proteínas que entraram no RE e que são destinadas ao aparelho de Golgi, ou mais além, são primeiro empacotadas em pequenas vesículas de transporte revestidas de COPII. Essas vesículas de transporte brotam a partir de regiões especializadas do RE chamadas de *sítios de saída do RE*, cujas membranas não possuem ribossomos ligados. A maioria das células animais possui sítios de saída dispersos por toda a rede do RE.

Originalmente, acreditava-se que todas as proteínas que não estivessem atreladas ao RE entrassem em vesículas de transporte, como um padrão. Entretanto, hoje está claro que o empacotamento em vesículas de transporte que deixam o RE normalmente é um processo seletivo. Muitas proteínas de membrana são recrutadas ativamente para dentro de tais vesículas, onde elas tornam-se concentradas. Acredita-se que estas proteínas-carga exibam sinais de saída (transporte) em suas superfícies citosólicas que são reconhecidos por componentes do revestimento de COPII (**Figura 13-20**); estes componentes do revestimento atuam como receptores de carga e são reciclados de volta para o RE depois de terem entregado suas cargas ao aparelho de Golgi. As proteínas-carga solúveis no lúmen do RE, ao contrário, possuem sinais de saída que as fixam nos receptores de carga trasmembrana, os quais, por sua vez, ligam-se aos componentes do revestimento de COPII através dos sinais de saída de suas caudas citoplasmáticas. A uma taxa muito mais baixa, as proteínas sem esses sinais também podem entrar nas vesículas de transporte, de forma que mesmo as proteínas que normalmente atuam no RE (as chamadas *proteínas residentes no RE*) lentamente dele escapam e são entregues ao aparelho de Golgi. Do mesmo modo, as proteínas de secreção produzidas em altas concentrações devem deixar o RE sem o auxílio de sinais de saída ou receptores de carga.

Os sinais de saída que direcionam proteínas solúveis para fora do RE para serem transportadas para o Golgi (ou além) não são bem-conhecidos. Algumas proteínas transmembrana que servem como receptores de carga para empacotar algumas proteínas de secreção dentro de vesículas revestidas de COPII são lectinas que se ligam a oligossacarídeos. A lectina ERGIC53, por exemplo, liga-se à manose e, acredita-se, reconhece este açúcar em dois fatores de coagulação secretados (Fator V e Fator VIII), consequentemente empacotando estas proteínas em vesículas de transporte no RE. O papel da ERGIC53 no transporte de proteínas foi identificado porque os humanos que têm deficiência desta proteína, devido a uma mutação herdada, apresentam níveis séricos mais baixos dos Fatores V e VIII e, portanto, sangram excessivamente.

Somente proteínas que são apropriadamente dobradas e montadas podem deixar o retículo endoplasmático

Para sair do RE, as proteínas devem ser dobradas apropriadamente e, se são subunidades de complexos proteicos multiméricos, elas podem precisar ser completamente montadas.

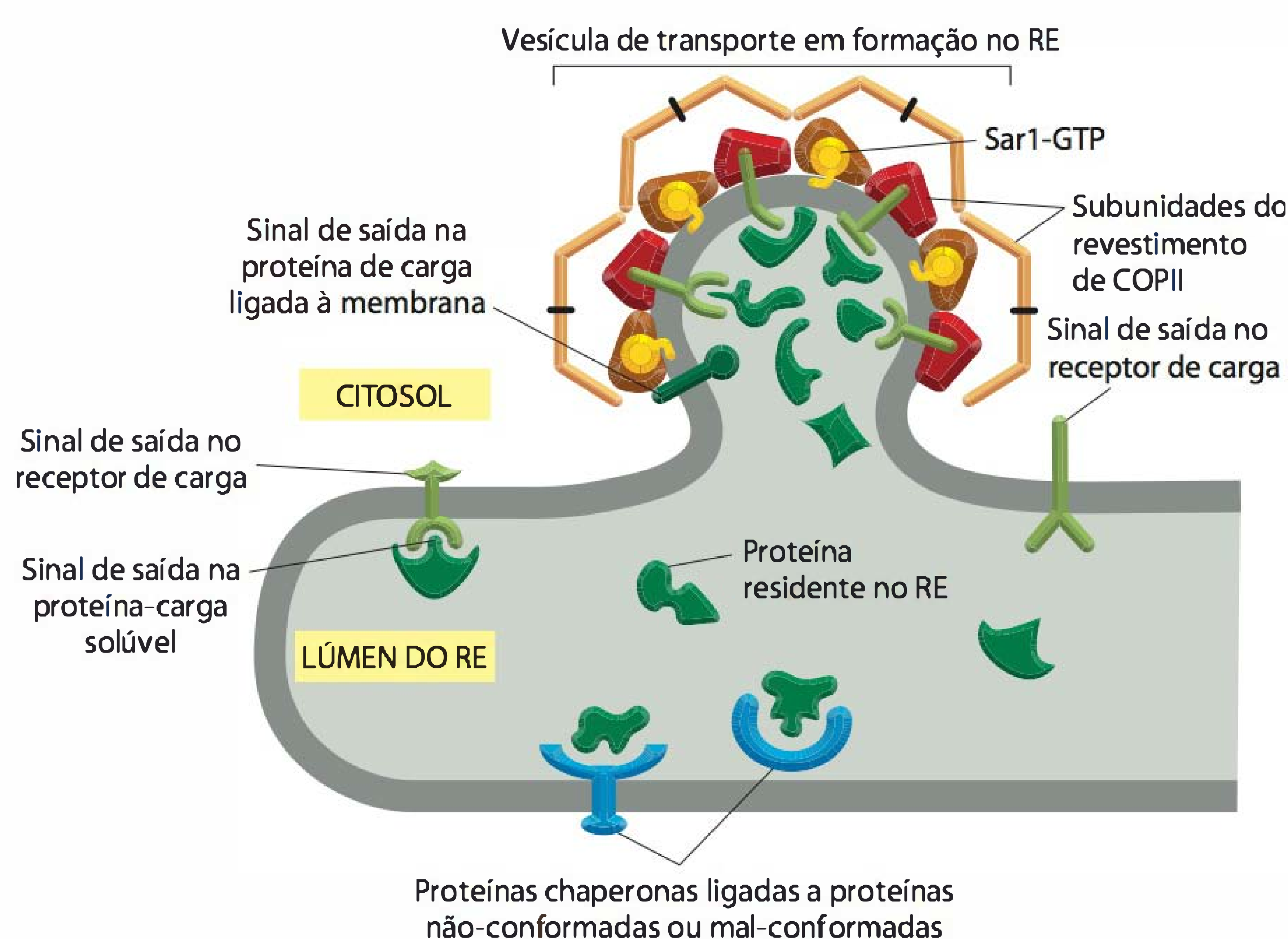


Figura 13-20 Recrutamento de moléculas-carga para dentro de vesículas de transporte do RE. Pela ligação direta ou indireta ao revestimento de COPII, as proteínas de membrana e solúveis de carga, respectivamente, são concentradas nas vesículas de transporte, conforme deixam o RE. As proteínas de membrana são empacotadas em vesículas de transporte em brotamento por meio de interações dos sinais de saída de suas caudas citosólicas com o revestimento de COPII. Algumas das proteínas de membrana aprisionadas pelo revestimento atuam, em contrapartida, como receptoras de carga, ligando proteínas solúveis no lúmen e auxiliando a empacotá-las dentro das vesículas. Uma típica vesícula de transporte de 50 nm contém cerca de 200 proteínas de membrana, as quais podem ser de muitos tipos diferentes. Como indicado, as proteínas não-dobradas ou incompletamente montadas são ligadas a chaperonas e, consequentemente, retidas no compartimento do RE.

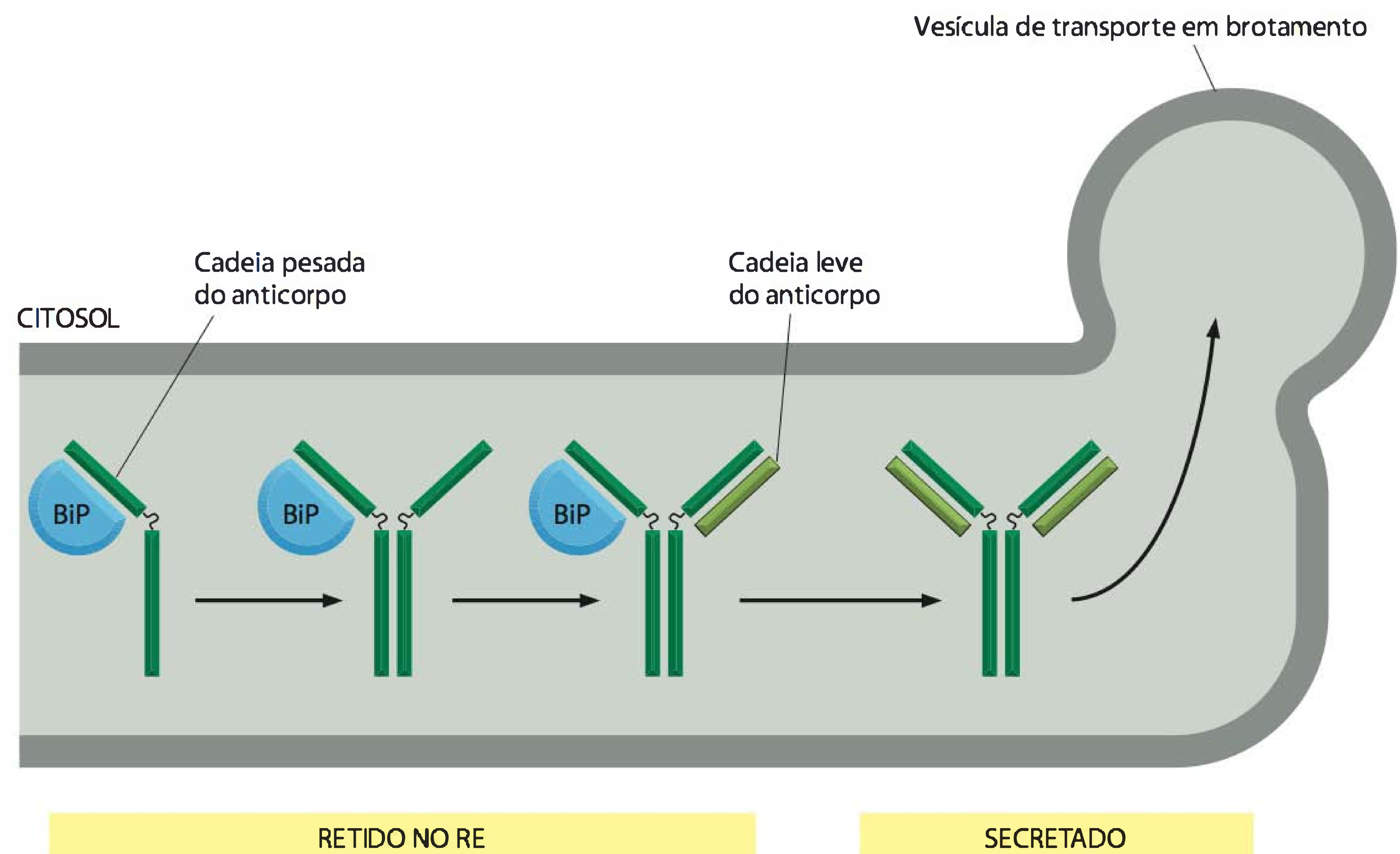


Figura 13-21 Retenção de moléculas de anticorpos incompletamente montados no RE. Os anticorpos são constituídos de duas cadeias pesadas e de duas cadeias leves (discutido no Capítulo 25), as quais são montadas no RE. Acredita-se que a chaperona BiP ligue-se a todas as moléculas de anticorpos incompletamente montadas e encubra os sinais de saída. Logo, somente anticorpos completamente montados deixam o RE e são secretados.

Aquelas que forem dobradas incorretamente ou montadas de forma incompleta permanecem no RE, onde são ligadas a chaperonas (discutido no Capítulo 6), como *BiP* ou *calnexina*. As chaperonas podem encobrir os sinais de saída ou, de alguma forma, ancorar as proteínas no RE (**Figura 13-21**). Tais proteínas deficientes são, eventualmente, transportadas de volta ao citosol, onde são degradadas por proteassomos (discutidos nos Capítulos 6 e 12). Esta etapa de controle de qualidade é importante, uma vez que proteínas inadequadamente dobradas ou montadas poderiam potencialmente interferir com as funções das proteínas normais caso fossem transportadas adiante. Existe uma surpreendente quantidade de ações corretivas. Mais de 90% das subunidades de receptores de células T recém-sintetizadas (discutidas no Capítulo 25) e do receptor de acetilcolina (discutido no Capítulo 11), por exemplo, normalmente são degradados sem sequer atingir a superfície celular onde funcionam. Portanto, a célula deve produzir um grande excesso de muitas moléculas proteicas para selecionar as poucas que se conformam, montam e funcionam apropriadamente.

O processo de degradação contínua de uma porção das proteínas do RE também resulta em um sistema de advertência inicial para alertar o sistema imune quando um vírus infecta as células. Utilizando transportadores especializados do tipo ABC, o RE importa fragmentos peptídicos de proteínas virais produzidos por proteases no proteassomo. Os peptídeos estrangeiros são carregados em proteínas MHC de classe I no lúmen do RE e, então, transportados para a superfície celular. Os linfócitos T reconhecem os peptídeos como antígenos não-próprios e matam as células infectadas (discutido no Capítulo 25).

Algumas vezes, entretanto, existem prejuízos ligados à precisão deste mecanismo de controle. As mutações predominantes que causam a fibrose cística, uma doença herdável comum, produzem uma proteína de membrana plasmática para o transporte de Cl^- levemente mal-formada. Embora a proteína mutante pudesse funcionar de forma perfeitamente normal se alcançasse a membrana plasmática, ela é retida no RE. A doença devastadora resulta, então, não das mutações que inativam a proteína, mas porque a proteína ativa é descartada antes que seja capaz de alcançar a membrana plasmática.

O transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi é mediado por agrupamentos tubulares de vesículas

Depois que as vesículas de transporte brotam do sítio de saída do RE e perdem os seus revestimentos, elas começam a se fundir umas às outras. Essa fusão de membranas a partir do mesmo compartimento é chamada de *fusão homotípica*, para distingui-la da *fusão heterotípica*, na qual uma membrana proveniente de um compartimento fusiona-se à membrana de um compartimento diferente. Assim como a fusão heterotípica, a homotípica requer um conjunto de SNAREs pareáveis. Nesse caso, entretanto, a interação é simétrica, com ambas as membranas contribuindo com v-SNAREs e t-SNAREs (**Figura 13-22**).

As estruturas formadas quando as vesículas derivadas do RE fundem-se umas às outras são chamadas de *agrupamentos tubulares de vesículas*, de acordo com sua aparência

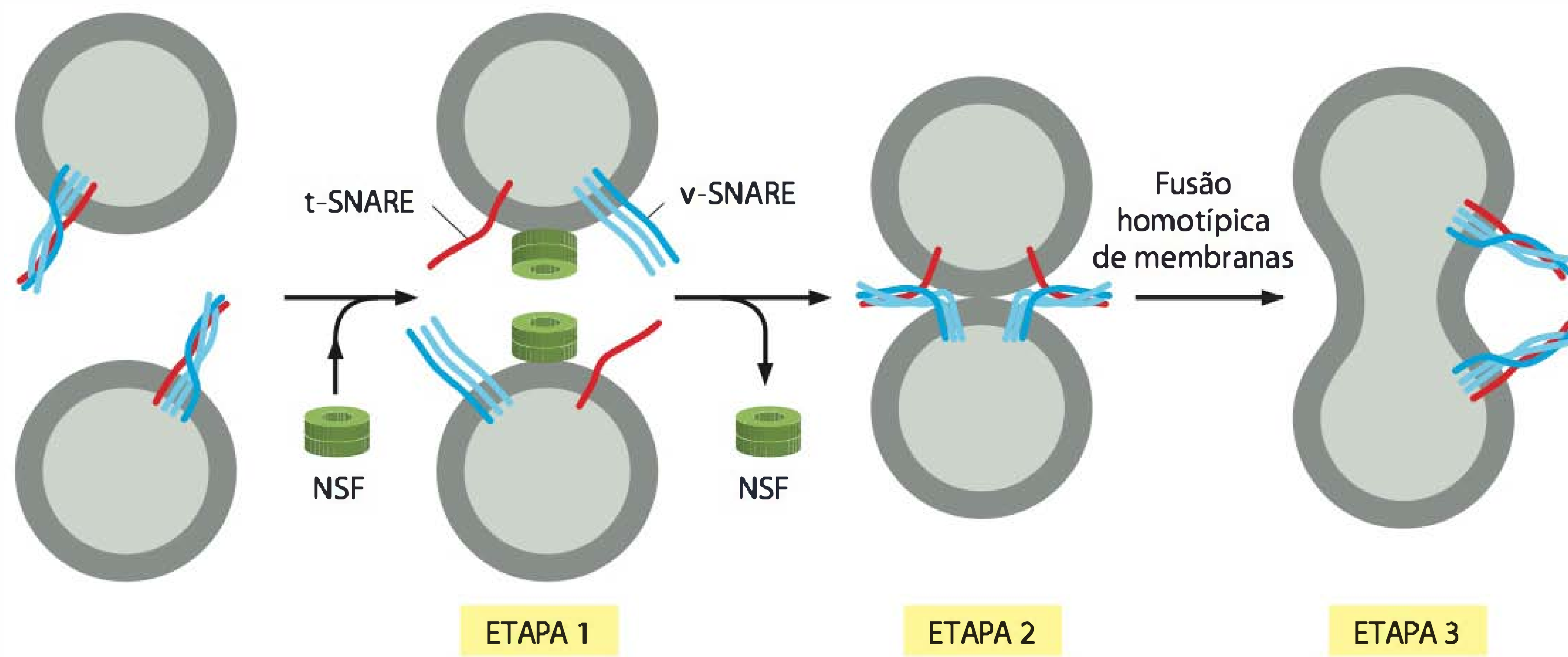


Figura 13-22 Fusão homotípica de membranas. Na etapa 1, NSF afasta os pares idênticos de v-SNAREs e de t-SNAREs de ambas as membranas (ver Figura 13-18). Nas etapas 2 e 3, o par separado de SNAREs de membranas adjacentes e idênticas interage, o que leva à fusão de membranas e à formação de um compartimento contínuo chamado de agrupamento tubular de vesículas. Subsequentemente, o compartimento cresce ainda mais pela fusão homotípica com vesículas do mesmo tipo de membrana, exibindo SNAREs pareáveis. A fusão homotípica não está restrita à formação de agrupamentos tubulares de vesículas; em um processo semelhante, os endossomos fundem-se para gerar grandes endossomos. As proteínas Rab auxiliam a regular a extensão da fusão homotípica e, assim, o tamanho dos compartimentos em uma célula (não-mostrado).

ondulada observada ao microscópio eletrônico (**Figura 13-23**A). Esses agrupamentos constituem um novo compartimento separado do RE e que não possui muitas das proteínas que funcionam no RE. Eles são gerados continuamente e funcionam como pacotes de transporte que trazem material do RE para o aparelho de Golgi. Os agrupamentos duram relativamente pouco tempo, pois se movem ao longo de microtúbulos para o aparelho de Golgi, onde se fusionam para entregar os seus conteúdos (Figura 13-23B).

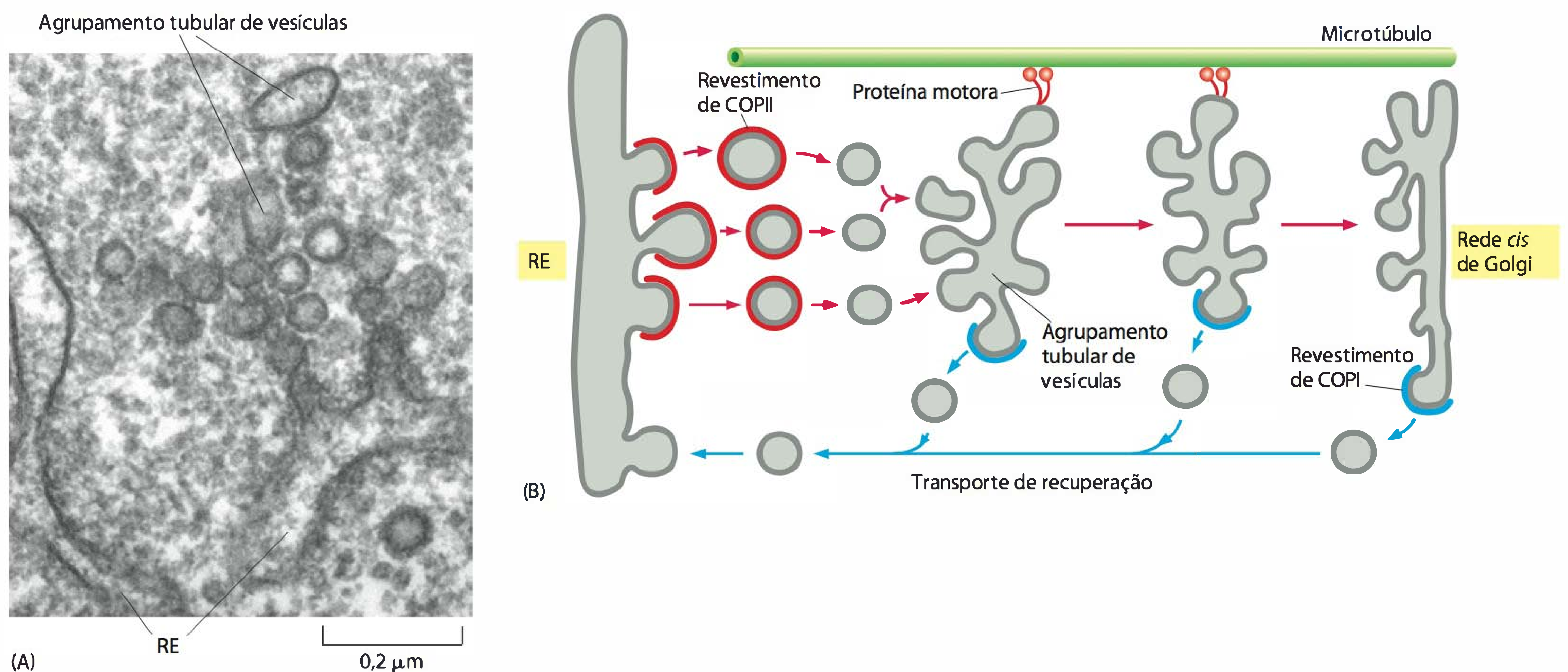
Tão logo os agrupamentos tubulares de vesículas se formam, as vesículas derivadas deles próprios começam a brotar. Diferentemente das vesículas revestidas de COPII que brotam do RE, essas vesículas são revestidas de COPI. Elas carregam de volta ao RE as proteínas residentes que escaparam, bem como as proteínas que participaram da reação de brotamento do RE que estão sendo devolvidas. Este processo de recuperação demonstra os mecanismos de controle especiais que regulam as reações de montagem de revestimento. A montagem do revestimento de COPI inicia segundos depois que os revestimentos de COPII tenham sido removidos. Ainda permanece um mistério como esta troca de montagem de revestimentos é controlada.

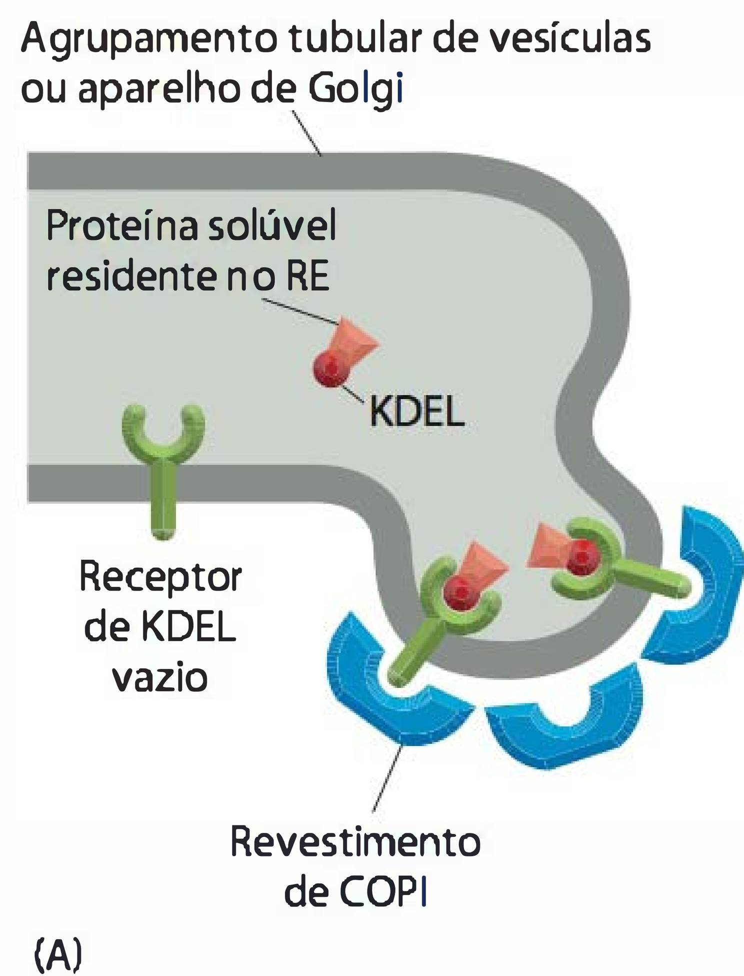
O *transporte de recuperação* (ou *retrógrado*) continua à medida que os agrupamentos tubulares de vesículas movem-se para o aparelho de Golgi. Assim, os agrupamentos amadurecem de maneira contínua e gradual, modificando as suas composições à medida que as proteínas são devolvidas para o RE. Um processo de recuperação semelhante continua a partir do aparelho de Golgi depois que os agrupamentos tubulares de vesículas entregam as suas cargas.

A via de recuperação para o retículo endoplasmático utiliza sinais de direcionamento

A via de recuperação para trazer proteínas que escaparam de volta ao RE depende dos *sinais de recuperação do RE*. As proteínas de membranas residentes no RE, por exemplo, contêm

Figura 13-23 Agrupamentos tubulares de vesículas. (A) Uma secção micrográfica eletrônica de agrupamentos tubulares de vesículas formados a partir da membrana do RE. Muitas das estruturas semelhantes a vesículas vistas na micrografia são secções transversais de túbulos que se estendem acima e abaixo do plano desta secção fina e estão interconectados. (B) Os agrupamentos tubulares de vesículas movem-se ao longo de microtúbulos para carregar proteínas do RE para o aparelho de Golgi. Os revestimentos de COPI medeiam o brotamento de vesículas que retornam para o RE a partir desses agrupamentos. Como indicado, os revestimentos rapidamente desmontam-se após as vesículas terem se formado. (A, cortesia de William Balch.)





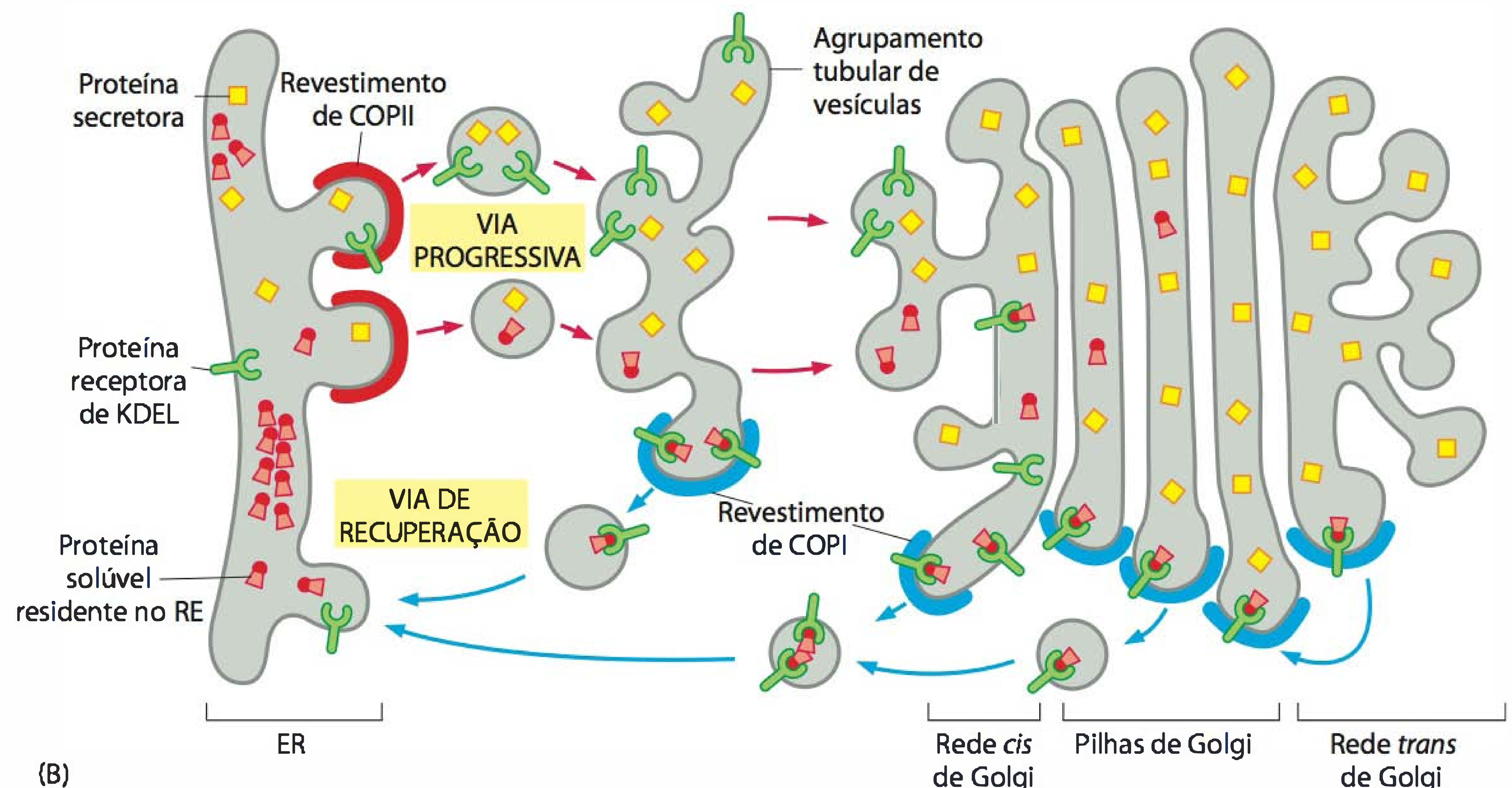


Figura 13-24 Modelo para a recuperação de proteínas solúveis residentes no RE. As proteínas residentes que escapam do RE são recuperadas para este compartimento pelo transporte vesicular. (A) O receptor de KDEL, presente em agrupamentos tubulares de vesículas e no aparelho de Golgi, captura as proteínas solúveis residentes no RE, e as carrega, em vesículas transportadoras revestidas de COPI, de volta ao RE. Ao ligar seus ligantes neste ambiente, o receptor de KDEL deve modificar a sua conformação de forma a facilitar o seu recrutamento em vesículas revestidas de COPI. (B) A recuperação das proteínas do RE inicia em agrupamentos tubulares de vesículas e continua a partir de todas as partes do aparelho de Golgi. No ambiente do RE, as proteínas do RE dissociam-se do receptor de KDEL, o qual é, então, devolvido ao aparelho de Golgi para reutilização.

sinais que se ligam diretamente aos revestimentos de COPI e são, assim, empacotados dentro das vesículas de transporte revestidas de COPI para a entrega retrógrada ao RE. O sinal melhor caracterizado deste tipo consiste em duas lisinas, seguidas por quaisquer outros dois aminoácidos, na extremidade C-terminal das proteínas de membranas do RE. Esse sinal é chamado de *sequência KKXX*, de acordo com o código de aminoácidos de uma letra.

As proteínas solúveis residentes no RE, como BiP, também contêm um curto sinal de recuperação nas suas extremidades C-terminais, mas este é diferente: ele consiste em uma sequência de Lys-Asp-Glu-Leu ou semelhante. Se este sinal (chamado de *sequência KDEL*) for removido da BiP por engenharia genética, a proteína será lentamente secretada da célula. Se o sinal for transferido para uma proteína que normalmente seria secretada, a proteína será, agora, eficientemente retornada para o RE, onde irá acumular-se.

De forma distinta dos sinais de recuperação das proteínas de membrana do RE, que podem interagir diretamente com o revestimento de COPI, as proteínas solúveis, residentes no RE, devem ligar proteínas receptoras especializadas, como o *receptor de KDEL* – uma proteína transmembrana que atravessa múltiplas vezes a membrana e que se liga à sequência KDEL, empacotando qualquer proteína que exiba essa sequência em vesículas de transporte retrógrado revestidas de COPI (**Figura 13-24**). Para executar essa tarefa, o próprio receptor de KDEL deve circular entre o RE e o aparelho de Golgi, e a sua afinidade por sequências KDEL deve ser diferente nesses dois compartimentos. O receptor deve ter uma alta afinidade pela sequência KDEL nos agrupamentos tubulares das vesículas e do aparelho de Golgi, de forma a capturar proteínas residentes no RE que escaparam e que estejam presentes nesses compartimentos em baixas concentrações. Ele deve ter uma baixa afinidade pela sequência KDEL no RE, entretanto, para descarregar a carga, apesar da altíssima concentração de proteínas residentes no RE que contêm KDEL.

Como a afinidade do receptor de KDEL pode modificar-se, dependendo do compartimento onde ele reside? A resposta não é conhecida, mas deve estar relacionada às diferentes condições iônicas e de pH estabelecidas nos diferentes compartimentos, reguladas pelos transportadores de suas membranas. Como discutiremos mais tarde, tais interações proteína-proteína sensíveis a pH formam a base para muitas das etapas de classificação na célula.

A maioria das proteínas de membrana que funcionam na interface entre o RE e o aparelho de Golgi, incluindo as v-SNAREs e as t-SNAREs e alguns receptores de carga, entra na via de recuperação para o RE. Enquanto a reciclagem de algumas dessas proteínas é mediada por sinais, como descrito há pouco, nenhum sinal específico parece ser necessário para outras proteínas. Portanto, enquanto os sinais de recuperação aumentam a eficiência do processo de recuperação, algumas proteínas – incluindo algumas enzimas do Golgi – entram aleatoriamente nas vesículas em brotamento destinadas ao RE e são devolvidas para o RE a uma taxa mais baixa. Muitas enzimas do Golgi circulam constantemente entre o RE e o Golgi, mas as suas taxas de retorno ao RE são suficientemente lentas para permitir que a maior parte dessas proteínas se encontre no aparelho de Golgi.

Muitas proteínas são seletivamente retidas nos compartimentos em que atuam

A via de recuperação de KDEL explica apenas parcialmente como as proteínas residentes no RE são mantidas no RE. Como esperado, as células que expressam proteínas residentes no RE geneticamente modificadas, das quais a sequência KDEL foi experimentalmente removida, secretam essas proteínas. Contudo, a taxa de secreção é muito mais lenta do que em uma proteína secretora normal. Parece que as proteínas residentes são ancoradas ao RE por um mecanismo independente dos seus sinais KDEL, e somente as proteínas que escapam à retenção são capturadas e devolvidas por meio do receptor de KDEL. Um mecanismo de retenção sugere que as proteínas residentes ligam-se umas às outras formando, assim, complexos muito grandes para entrar nas vesículas de transporte. Como as proteínas residentes estão presentes no RE em concentrações muito altas (estimadas em milimolar), seriam suficientes interações de afinidades relativamente baixas para manter a maioria das proteínas presa em tais complexos.

A agregação de proteínas que funcionam no mesmo compartimento – denominado *reconhecimento de parentes* – é um mecanismo geral que os compartimentos utilizam para organizar e reter as suas proteínas residentes. As enzimas do Golgi que funcionam juntas, por exemplo, também ligam umas às outras e são, consequentemente, impedidas de entrar em vesículas de transporte que deixam o aparelho de Golgi.

O aparelho de Golgi consiste em uma série ordenada de compartimentos

Devido a sua estrutura grande e regular, o aparelho de Golgi foi uma das primeiras organelas descritas pelos pioneiros microscopistas ópticos. Ele consiste em uma coleção de compartimentos achatados definidos por membranas, chamados de *cisternas*, assemelhando-se, de certa forma, a uma pilha de panquecas. Cada uma dessas pilhas de Golgi normalmente consiste em 4 a 6 cisternas (**Figura 13-25**), embora alguns flagelados unicelulares possam ter até 60. Em células animais, muitas pilhas estão ligadas por conexões tubulares entre cisternas corres-

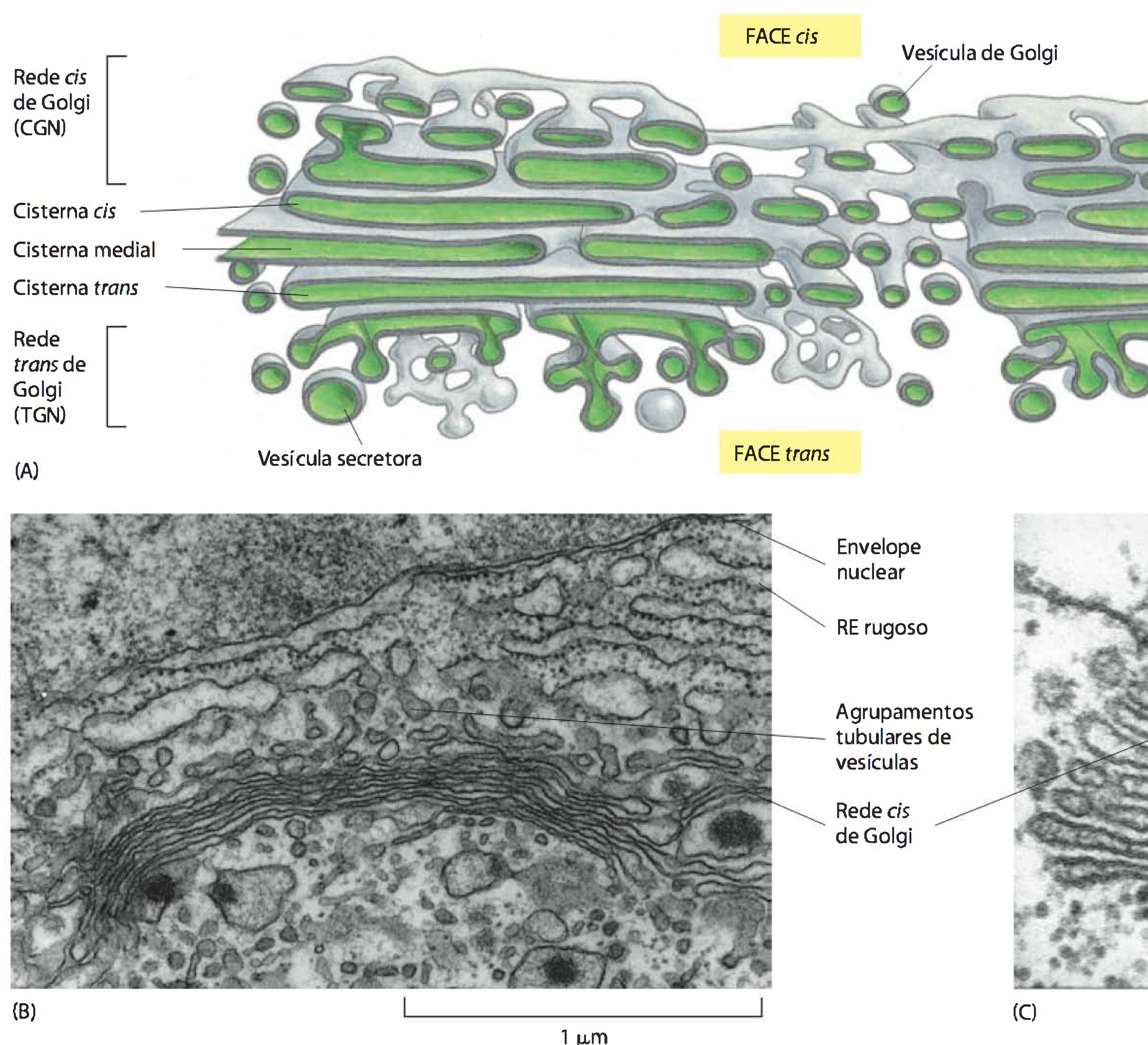


Figura 13-25 O aparelho de Golgi. (A) Reconstrução tridimensional a partir de micrografias eletrônicas do aparelho de Golgi em uma célula secretora animal. A face *cis* das pilhas de Golgi é aquela mais próxima ao RE. (B) Uma micrografia eletrônica de secção delgada enfatizando a zona de transição entre o RE e o aparelho de Golgi em uma célula animal. (C) Uma micrografia eletrônica de um aparelho de Golgi de uma célula vegetal (a alga verde *Chlamydomonas*) vista em secção transversal. Em células vegetais, o aparelho de Golgi geralmente é mais distinto e mais claramente separado das outras membranas intracelulares do que nas células animais. (A, redesenhada a partir de A. Rambourg e Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200, 1990. Com permissão de Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; B, cortesia de Brij J. Gupta; C, cortesia de George Palade.)

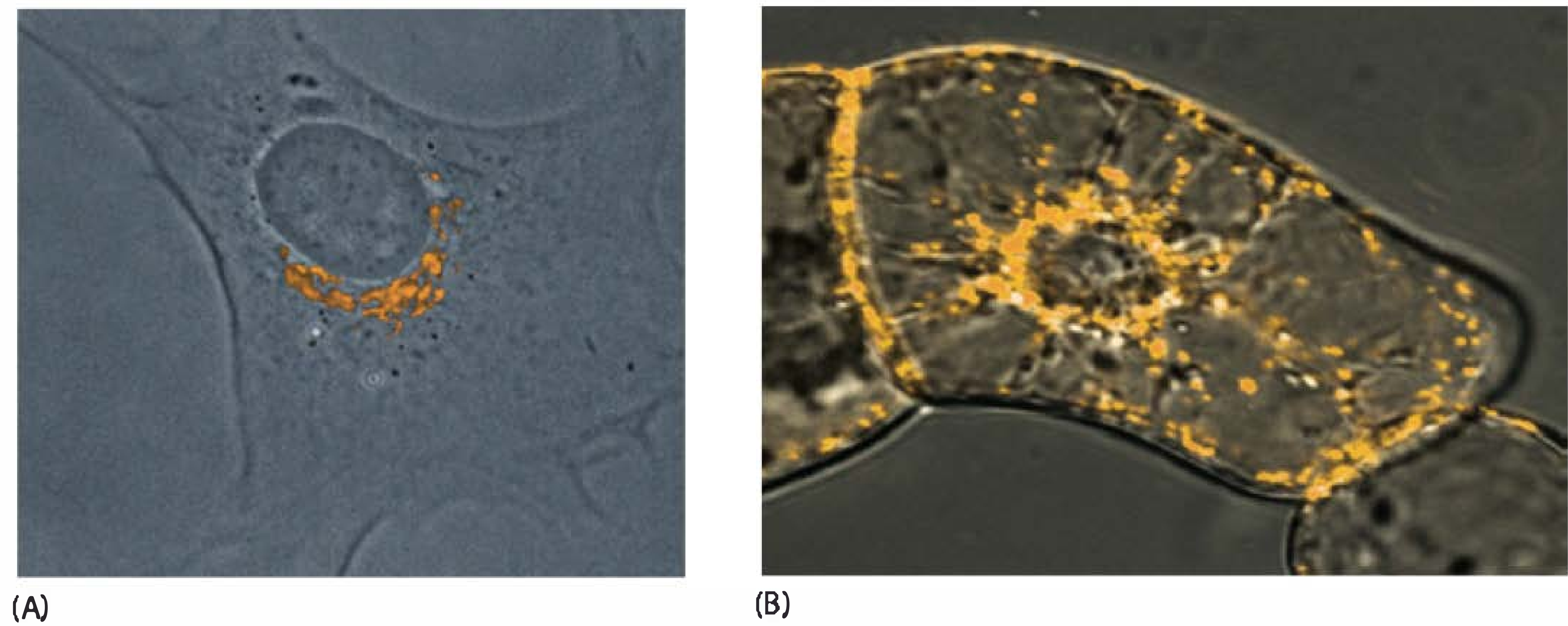


Figura 13-26 Localização do aparelho de Golgi em células animais e vegetais. (A) O aparelho de Golgi em um fibroblasto cultivado com um anticorpo fluorescente que reconhece uma proteína residente no Golgi (*vermelho*). O aparelho de Golgi está polarizado na direção na qual a célula estava movendo-se antes da fixação. (B) O aparelho de Golgi de uma célula vegetal que está expressando uma proteína de fusão constituída de uma enzima residente no Golgi fusionada à proteína de fluorescência verde. Os pontos *laranja* brilhantes (coloração falsa) são as pilhas de Golgi. (A, cortesia de John Henley e Mark McNiven; B, cortesia de Chris Hawes.)

pondentes, formando assim um único complexo normalmente localizado próximo ao núcleo celular e junto ao centrossomo (**Figura 13-26**A). Essa localização depende dos microtúbulos. Se os microtúbulos forem experimentalmente despolarizados, o aparelho de Golgi reorganiza-se em pilhas individuais encontradas espalhadas pelo citoplasma, adjacentes aos sítios de saída do RE. Em algumas células, incluindo a maioria das células vegetais, centenas de pilhas individuais de Golgi normalmente estão dispersas pelo citoplasma (Figura 13-26B).

Durante a sua passagem através do aparelho de Golgi, as moléculas transportadas sofrem uma série ordenada de modificações covalentes. Cada pilha de Golgi possui duas faces distintas: uma **face *cis*** (ou face de entrada) e uma **face *trans*** (ou face de saída). Ambas as faces, *cis* e *trans*, estão intimamente associadas a compartimentos especiais, cada um composto de uma rede interconectada de estruturas tubulares e de cisternas: a **rede *cis* de Golgi** (**CGN**, *cis Golgi network*) (também chamada de compartimento intermediário) e a **rede *trans* de Golgi** (**TGN**, *trans Golgi network*), respectivamente. A CGN trata-se de uma coleção de agrupamentos tubulares de vesículas provenientes do RE. As proteínas e os lipídeos entram na rede *cis* de Golgi e saem da rede *trans* de Golgi com destino à superfície celular ou a outro compartimento. Ambas as redes são importantes para a distribuição de proteínas: as proteínas que entram na CGN podem ir adiante no aparelho de Golgi, ou serem devolvidas para o RE. Semelhantemente, as proteínas saindo da TGN podem ir adiante e serem distribuídas de acordo com seus destinos seguintes: os lisossomos, as vesículas secretoras ou a superfície celular. Elas também podem ser devolvidas para um compartimento anterior.

Como descrito no Capítulo 12, um único tipo de *oligossacarídeo N-ligado* (ligado ao aminoácido asparagina) está conectado *en bloc* a muitas proteínas no RE e é depois aparado, enquanto as proteínas permanecem no RE. Novas modificações e adições ocorrem no aparelho de Golgi, dependendo da proteína. Os intermediários de oligossacarídeos criados pelas reações de aparamento servem para auxiliar no dobramento de proteínas e no transporte de proteínas dobradas inadequadamente ao citosol para degradação. Logo, eles possuem um papel importante no controle de qualidade de proteínas que saem do RE. Uma vez que estas funções no RE tenham sido cumpridas, a célula está livre para reprojetar os oligossacarídeos para novas funções. Isso acontece no aparelho de Golgi, o qual produz as estruturas heterogêneas de oligossacarídeos vistas nas proteínas maduras. Chegando na CGN, as proteínas atravessam a rede *cis* de Golgi antes de entrar no primeiro dos compartimentos de processamento do Golgi (as cisternas *cis* de Golgi). Elas, então, movimentam-se para o próximo compartimento (as cisternas mediais) e, finalmente, para as cisternas *trans*, onde a glicosilação é completada. Acredita-se que o lúmen das cisternas *trans* seja contínuo à TGN, local onde as proteínas são segregadas em diferentes pacotes de transporte e expedidas para seus destinos finais.

As etapas de processamento de oligossacarídeos ocorrem em uma sequência correspondentemente organizada nas pilhas de Golgi, com cada cisterna contendo uma abundância característica de enzimas de processamento. As proteínas são modificadas em estágios sucessivos, à medida que se movem de cisterna a cisterna através das pilhas, de forma que as pilhas formam uma unidade de processamento de múltiplos estágios. Essa compartimentalização pode parecer desnecessária, uma vez que cada enzima de processamento de oligossacarídeo pode aceitar uma glicoproteína como substrato somente depois que ela foi adequadamente processada pela enzima precedente. Contudo, está claro que o processamento ocorre em uma sequência tanto espacial como bioquímica: as enzimas que catalisam etapas iniciais do processamento estão concentradas nas cisternas posicionadas próximas à face *cis* das pilhas de Golgi, enquanto as enzimas que catalisam as etapas finais do processamento estão concentradas em cisternas posicionadas próximas à face *trans*.

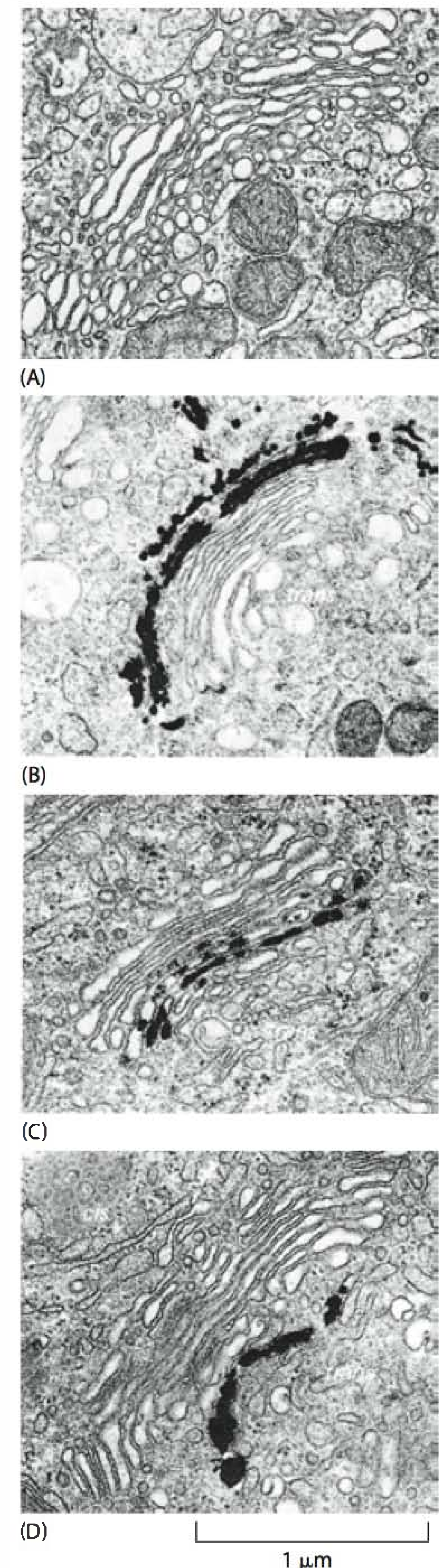


Figura 13-27 Compartimentalização molecular do aparelho de Golgi. Uma série de micrografias eletrônicas mostra o aparelho de Golgi não-corado (A), corado com ósmio (B) que, preferencialmente, é reduzido pelas cisternas do compartimento *cis*, e corado (C e D) para revelar a localização de uma enzima específica. A enzima nucleosídeo difosfatase, é encontrada nas cisternas *trans* de Golgi (C), enquanto a fosfatase ácida é encontrada na rede *trans* de Golgi (D). Observe que, normalmente, mais do que uma cisterna é corada. Acredita-se, portanto, que as enzimas estejam mais altamente enriquecidas do que precisamente localizadas em uma cisterna específica. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

Pesquisadores descobriram as diferenças funcionais entre as subdivisões *cis*, medial e *trans* do aparelho de Golgi por meio da localização das enzimas envolvidas no processamento de oligossacarídeos *N*-ligados em regiões distintas da organela, tanto por fracionamento físico da organela como por marcação com anticorpos das enzimas em secções para microscopia eletrônica. Foi observado que a remoção de resíduos de manose e a adição de *N*-acetilglicosamina, por exemplo, ocorrem no compartimento medial, enquanto a adição de galactose e ácido siálico ocorre no compartimento *trans* e na rede *trans* de Golgi (**Figura 13-27**). A **Figura 13-28** resume a compartimentalização funcional do aparelho de Golgi.

O aparelho de Golgi é especialmente proeminente nas células que são especializadas para secreção de glicoproteínas, como células-cálice do epitélio intestinal, que secretam grandes quantidades de muco rico em polissacarídeos para o intestino (**Figura 13-29**). Em tais células, vesículas grandes incomuns são encontradas na face *trans* do aparelho de Golgi, que está de frente para o domínio da membrana plasmática onde a secreção ocorre.

As cadeias de oligossacarídeos são processadas no aparelho de Golgi

Enquanto o lúmen do RE é preenchido por proteínas residentes no lúmen solúveis e enzimas, as proteínas residentes no aparelho de Golgi estão todas ligadas à membrana. No aparelho de Golgi, as reações enzimáticas parecem ocorrer inteiramente na superfície da membrana. Todas as glicosidases e glicosil-transferases do Golgi são proteínas transmembrana de passagem única, muitas das quais são organizadas em complexos multienzimáticos. Logo, as duas organelas sintetizadoras da via biossintética-secretora, o RE e o aparelho de Golgi, são organizadas de formas fundamentalmente distintas.

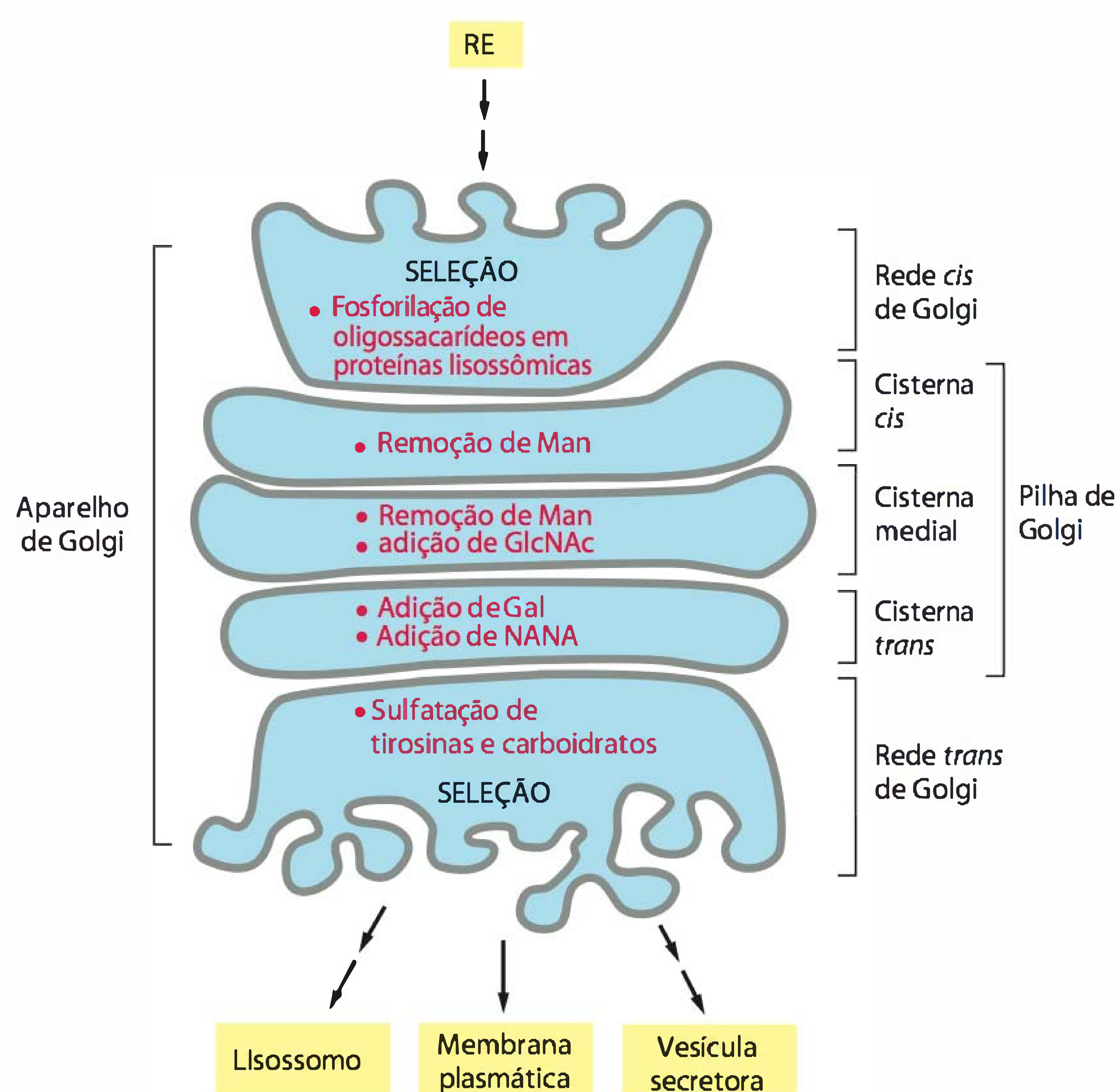


Figura 13-28 Processamento de oligossacarídeos nos compartimentos de Golgi. A localização de cada etapa de processamento apresentada foi determinada por uma combinação de técnicas, incluindo subfracionamento bioquímico das membranas do aparelho de Golgi e microscopia eletrônica após coloração com anticorpos específicos para algumas das enzimas de processamento. As enzimas de processamento não estão restritas a uma cisterna em particular; ao contrário, sua distribuição é gradual ao longo das pilhas – de tal forma que as enzimas que atuem em etapas iniciais estejam presentes principalmente em cisternas *cis* de Golgi e as que atuam mais tarde estejam presentes principalmente nas cisternas *trans* de Golgi.

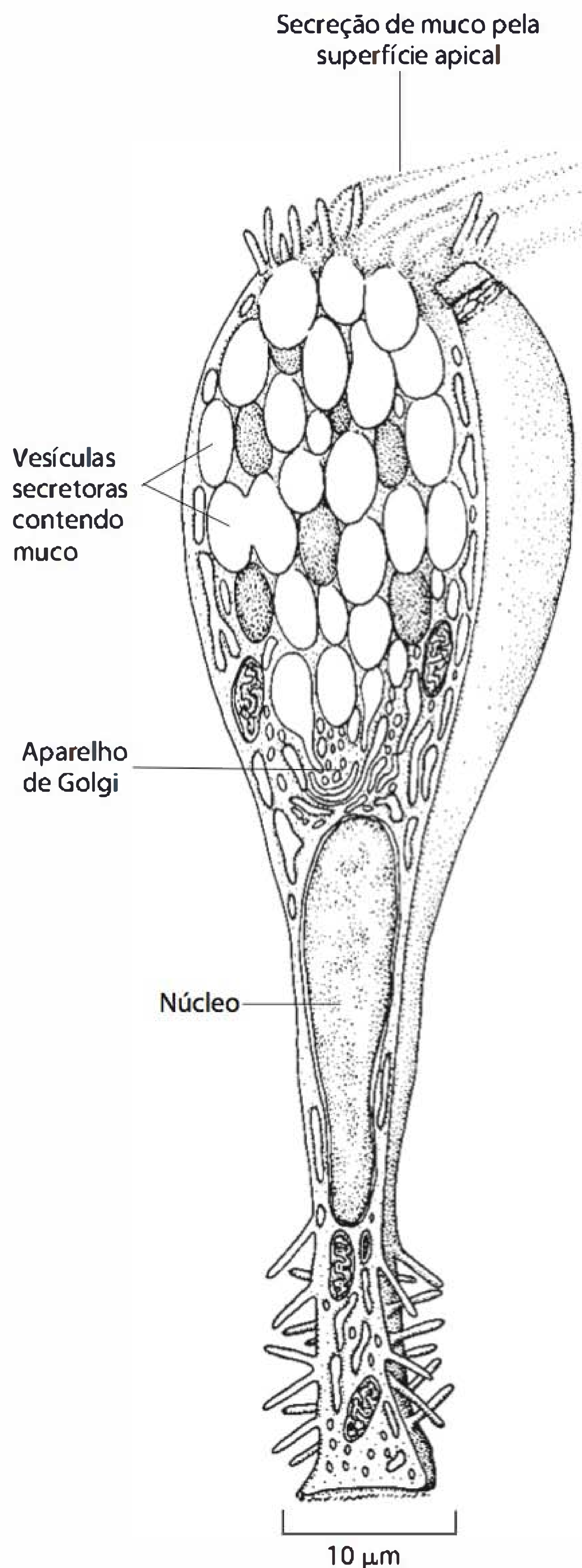


Figura 13-29 Célula-cálice do intestino delgado. Esta célula é especializada na secreção de muco, uma mistura de glicoproteínas e de proteoglicanos sintetizados no RE e no aparelho de Golgi. Assim como todas as células epiteliais, as células-cálice são altamente polarizadas, com o domínio apical da membrana plasmática voltado para o lúmen do intestino e o domínio basolateral voltado para a lâmina basal. O aparelho de Golgi também é altamente polarizado, o que facilita a descarga do muco por exocitose, pelo domínio apical da membrana plasmática. (Com base em R. V. Krstic, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. New York: Springer-Verlag, 1984. Com permissão de Springer-Verlag.)

Duas amplas classes de oligossacarídeos *N*-ligados, os **oligossacarídeos complexos** e os **oligossacarídeos ricos em manose**, são encontradas anexadas às glicoproteínas de mamíferos (**Figura 13-30**). Algumas vezes, ambos os tipos encontram-se anexados (em diferentes locais) à mesma cadeia polipeptídica.

Os oligossacarídeos complexos são gerados quando os oligossacarídeos *N*-ligados originais, adicionados no RE, sofrem desbaste e adição de novos açúcares. Ao contrário, os oligossacarídeos ricos em manose são desbastados, mas não sofrem a adição de novos açúcares no aparelho de Golgi. Eles contêm apenas duas *N*-acetilglicosaminas e muitos resíduos de manose, com frequência aproximando-se do número originalmente presente no oligossacarídeo precursor ligado a lipídeos adicionado no RE. Os oligossacarídeos complexos podem conter mais do que as duas *N*-acetilglicosaminas originais, bem como um número variável de resíduos de galactose e de ácido siálico e, em alguns casos, de fucose. O ácido siálico é de importância especial, porque é o único açúcar em glicoproteínas que sustenta uma carga negativa. O que determina se um dado oligossacarídeo deve permanecer rico em manose ou

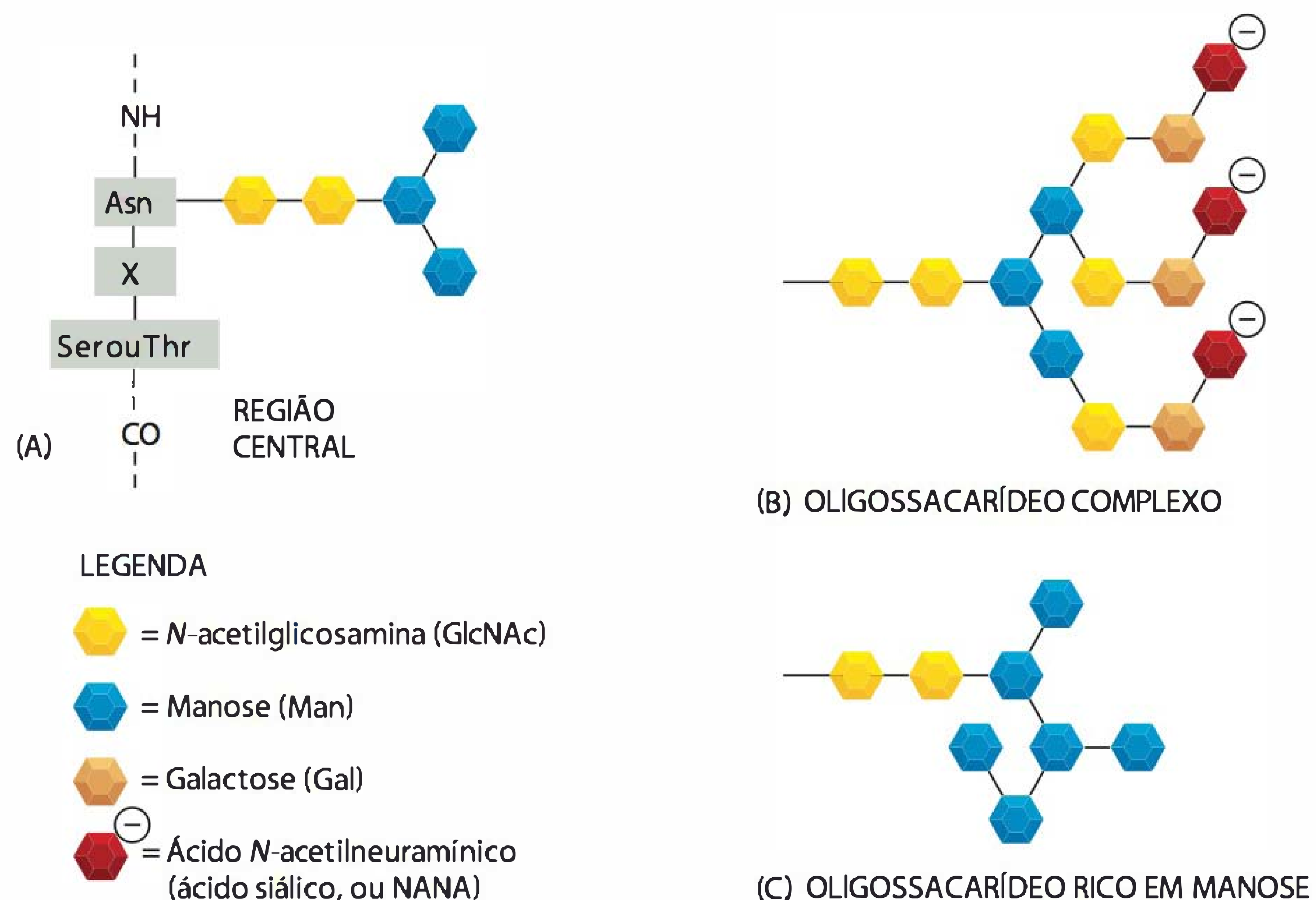


Figura 13-30 As duas principais classes de oligossacarídeos ligados à asparagina (*N*-ligados) encontradas em glicoproteínas maduras. (A) Ambos os oligossacarídeos complexos e ricos em manose compartilham uma *região central* derivada do oligossacarídeo *N*-ligado original adicionado no RE (ver Figura 12-50) e contendo tipicamente duas *N*-acetilglicosaminas (GlcNAc) e três manoses (Man). (B) Cada oligossacarídeo complexo consiste em uma *região central*, juntamente com uma região terminal que contém um número variável de cópias de uma unidade trissacarídica especial (*N-acetilglicosamina-galactose-ácido siálico*) ligada às manoses centrais. Frequentemente, a região terminal é truncada e contém somente GlcNAc e galactose (Gal), ou somente GlcNAc. Além disso, um resíduo de fucose pode ser adicionado, normalmente à GlcNAc central anexada à asparagina (Asn). Assim, embora as etapas de processamento e de posterior adição de açúcares sejam rigidamente ordenadas, os oligossacarídeos complexos podem ser heterogêneos. Além disso, embora o oligossacarídeo complexo apresentado tenha três ramificações terminais, duas ou quatro ramificações também são comuns, dependendo da glicoproteína e da célula onde são produzidos. (C) Os oligossacarídeos ricos em manose não são desbastados totalmente até a região central e contêm resíduos adicionais de manose. Os oligossacarídeos híbridos (não-mostrados) com uma ramificação de Man e uma ramificação de GlcNAc e Gal também são encontrados (não-mostrado).

Os três aminoácidos indicados em (A) constituem a sequência reconhecida pela enzima oligossacarídeo-transferase que adiciona o oligossacarídeo inicial à proteína.

Ser = serina; Thr = treonina; X = qualquer aminoácido, exceto prolina.

ser processado depende principalmente de sua posição na proteína. Se o oligossacarídeo for acessível às proteínas processadoras no aparelho de Golgi, é provável que ele seja convertido a uma forma complexa; se ele estiver inacessível devido ao fato dos seus açúcares estarem firmemente presos à superfície proteica, é provável que permaneça na forma rica em manose. O processamento que gera cadeias de oligossacarídeos complexos segue a via altamente ordenada apresentada na **Figura 13-31**.

Além destas trivialidades no processamento de oligossacarídeos que são compartilhadas pela maioria das células, os produtos de modificações de carboidratos conduzidos no aparelho de Golgi são altamente complexos e deram origem a um novo campo chamado de glicobiologia. O genoma humano, por exemplo, codifica centenas de glicosil-transferases de Golgi diferentes, as quais são expressas diferentemente de um tipo de célula para outro, resultando em uma variedade de formas glicosiladas de uma determinada proteína ou lipídeo, em diferentes tipos celulares e em vários estágios de diferenciação, dependendo do espectro de enzimas expressas pela célula. A complexidade das modificações não está limitada aos oligossacarídeos *N*-ligados, mas também ocorre em *açúcares O-ligados*, como discutiremos a seguir.

Os proteoglicanos são montados no aparelho de Golgi

Além das alterações de oligossacarídeos *N*-ligados às proteínas que passam através das cisternas de Golgi *en route* do RE para os seus destinos finais, muitas proteínas são também modificadas de outras maneiras. Algumas proteínas possuem açúcares adicionados aos grupos OH das cadeias laterais de serinas e de treoninas selecionadas. Esta **glicosilação *O*-ligada** (ver **Figura 13-32**), como a extensão das cadeias oligossacarídicas *N*-ligadas, é catalisada por uma série de enzimas do tipo glicosil-transferases que utilizam os açúcares nucleotídeos

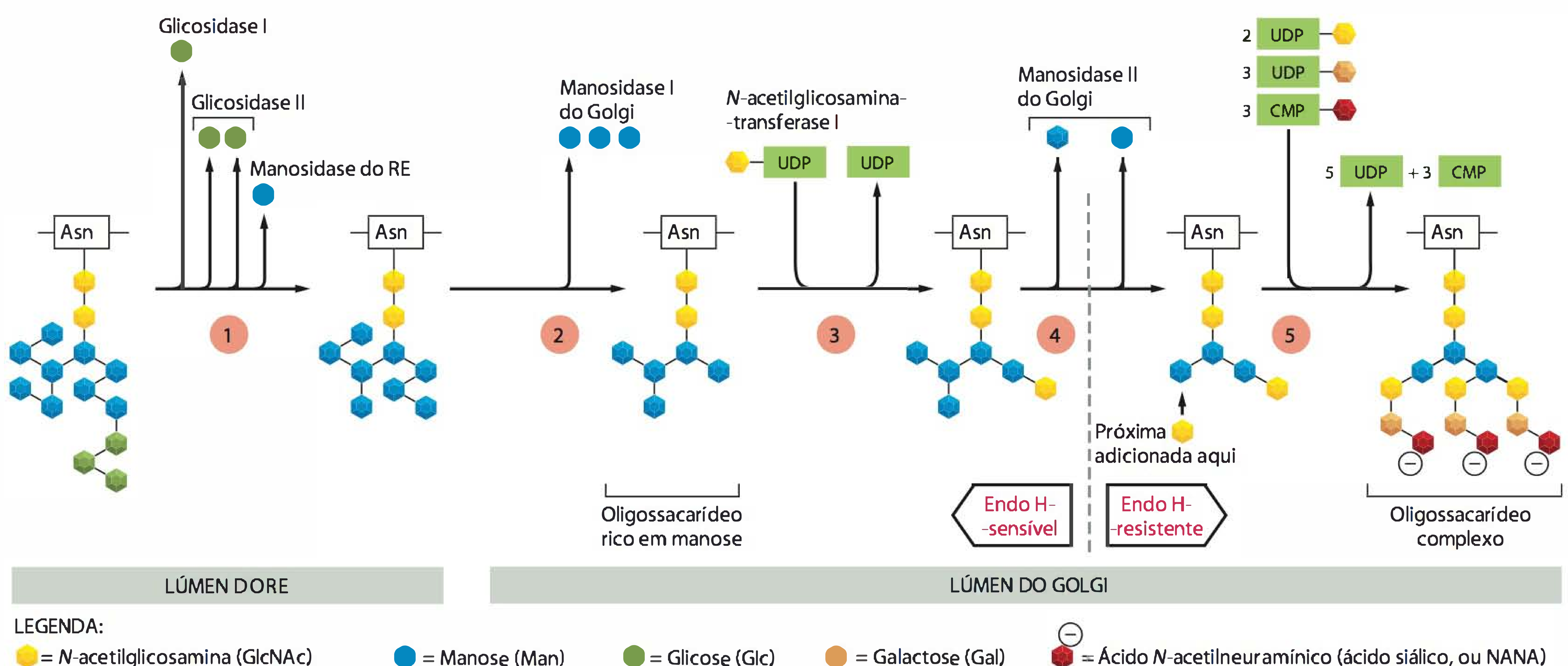


Figura 13-31 Processamento de oligossacarídeos no RE e no aparelho de Golgi. A via de processamento é altamente ordenada, de forma que cada etapa representada é dependente da etapa anterior. Etapa 1: o processamento inicia no RE com a remoção das glicoses dos oligossacarídeos inicialmente transferidos às proteínas. Então, uma manosidase da membrana do RE remove manoses específicas. Etapa 2: as etapas restantes ocorrem nas pilhas de Golgi, onde a manosidase I de Golgi remove, inicialmente, três manoses adicionais. Etapa 3: a *N*-acetilglicosamina-transferase adiciona, então, uma *N*-acetilglicosamina. Etapa 4: a manosidase II remove duas manoses adicionais. Isso resulta em um núcleo central de três manoses presentes em um oligossacarídeo complexo. Nesse estágio, a ligação entre as duas *N*-acetilglicosaminas do núcleo torna-se resistente ao ataque de endoglicosidases (*Endo H*) altamente específicas. Uma vez que todas as últimas estruturas da via também são Endo H-resistentes, o tratamento com esta enzima é amplamente utilizado para distinguir oligossacarídeos complexos de oligossacarídeos ricos em manoses. Etapa 5: finalmente, como representado na Figura 13-30, as *N*-acetilglicosaminas, as galactoses e os ácidos siálicos adicionais são acrescentados. Essas etapas finais da síntese de um oligossacarídeo complexo ocorrem nos compartimentos das cisternas do aparelho de Golgi. Três tipos de enzimas glicosil-transferases atuam sequencialmente, utilizando substratos de açúcares ativados pela ligação ao nucleotídeo indicado. As membranas das cisternas de Golgi contêm proteínas carreadoras específicas que permitem que cada açúcar-nucleotídeo entre, em troca dos fosfatos de nucleosídeo liberados após a anexação do açúcar à proteína na face luminal.

Observe que, como uma organela biossintética, o aparelho de Golgi difere fundamentalmente do RE: todos os açúcares são montados dentro do lúmen provindo de nucleotídeos de açúcar. Ao contrário, no RE, o oligossacarídeo precursor N-ligado é montado em parte no citosol e em parte no lúmen, e todas as reações luminais utilizam açúcares ligados a dolicol como seus substratos (ver Figura 12-52).

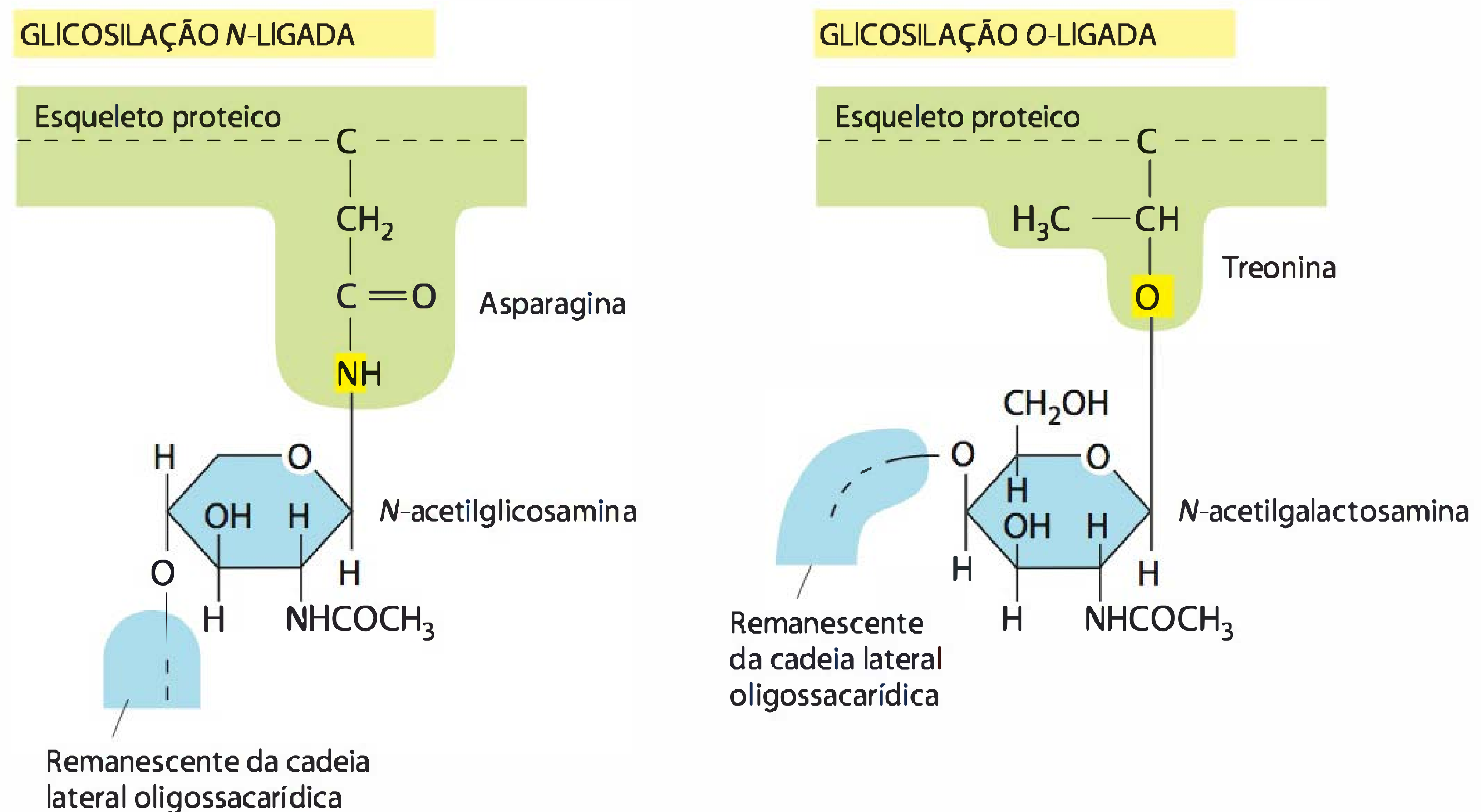


Figura 13-32 Glicosilação *N*-ligada e O-ligada. Em cada caso, apenas um único grupo açúcar, o qual é anexado diretamente à proteína, está representado.

do lúmen do aparelho de Golgi para adicionar um resíduo de açúcar de cada vez a uma proteína. Em geral, a *N*-acetilglicosamina é adicionada primeiro, seguida por um número variável de resíduos adicionais de açúcares, variando de apenas alguns poucos a até 10 ou mais.

O aparelho de Golgi confere a glicosilação *O*-ligada mais forte de todas as *mucinas*, as glicoproteínas das secreções de muco (ver Figura 13-29), e das *proteínas-núcleo de proteoglicanos*, as quais são nele modificadas para produzir proteoglicanos. Como discutido no Capítulo 19, esse processo envolve a polimerização de uma ou de mais *cadeias de glicosaminoglicanos* (longos polímeros não-ramificados compostos de unidades dissacarídicas repetidas; ver Figura 19-58) por intermédio de uma ligação de xilose sobre serinas da proteína-núcleo. Muitos proteoglicanos são secretados e se tornam componentes da matriz extracelular, enquanto outros permanecem ancorados à membrana plasmática. Outros, ainda, formam um componente principal de materiais viscosos, como o muco secretado para formar um revestimento protetor sobre muitos epitélios.

Os açúcares incorporados em glicosaminoglicanos são fortemente sulfatados no aparelho de Golgi logo após a produção desses polímeros, somando-se, assim, uma porção significativa da sua característica carga amplamente negativa. Alguns resíduos de tirosina das proteínas também se tornam sulfatados logo após a sua saída do aparelho de Golgi. Em ambos os casos, a sulfatação depende do doador de sulfatos 3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato (PAPS, *3′-phosphoadenosine-5′-phosphosulfate*) (**Figura 13-33**), o qual é transportado do citosol ao lúmen da rede *trans* de Golgi.

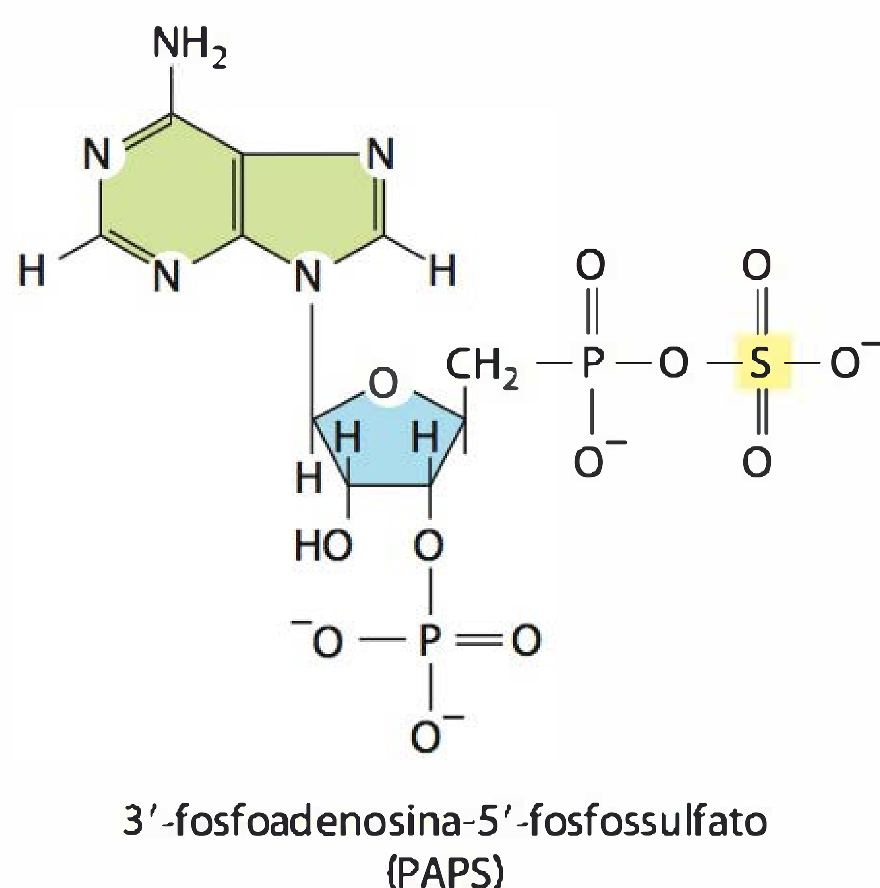


Figura 13-33 A estrutura do PAPS.

Qual é o propósito da glicosilação?

Há uma diferença importante entre a construção de um oligossacarídeo e a síntese de outra macromolécula, como DNA, RNA ou proteína. Enquanto os ácidos nucleicos e as proteínas são copiados a partir de um molde em uma série repetitiva de etapas idênticas utilizando a mesma enzima ou um conjunto de enzimas, os carboidratos complexos requerem uma enzima diferente para cada etapa, em que cada produto é reconhecido como um substrato exclusivo para a próxima enzima da série. A vasta abundância de glicoproteínas e as vias complexas que evoluíram para sintetizá-las sugerem que os oligossacarídeos existentes em glicoproteínas e em glicoesfingolipídeos possuam funções muito importantes.

A glicosilação *N*-ligada, por exemplo, é prevalente em todos os eucariotos, incluindo leveduras. Oligossacarídeos *N*-ligados também ocorrem em uma forma muito similar em proteínas de parede arqueais, sugerindo que toda a maquinaria necessária para sua síntese seja evolutivamente antiga. A glicosilação *N*-ligada promove o dobramento das proteínas de duas maneiras. Primeiro, ela possui um papel direto ao produzir intermediários de conformação mais solúveis, prevenindo, portanto, sua agregação. Segundo, as modificações sequenciais do oligossacarídeo *N*-ligado estabelecem um “glico-código” que marca a progressão do dobramento de proteínas e medeia a ligação da proteína a chaperonas (discutido no Capítulo 12) e lectinas – por exemplo, para direcionar o transporte do RE para o Golgi. Como discutiremos mais tarde, as lectinas também participam na distribuição de proteínas na rede *trans* de Golgi.

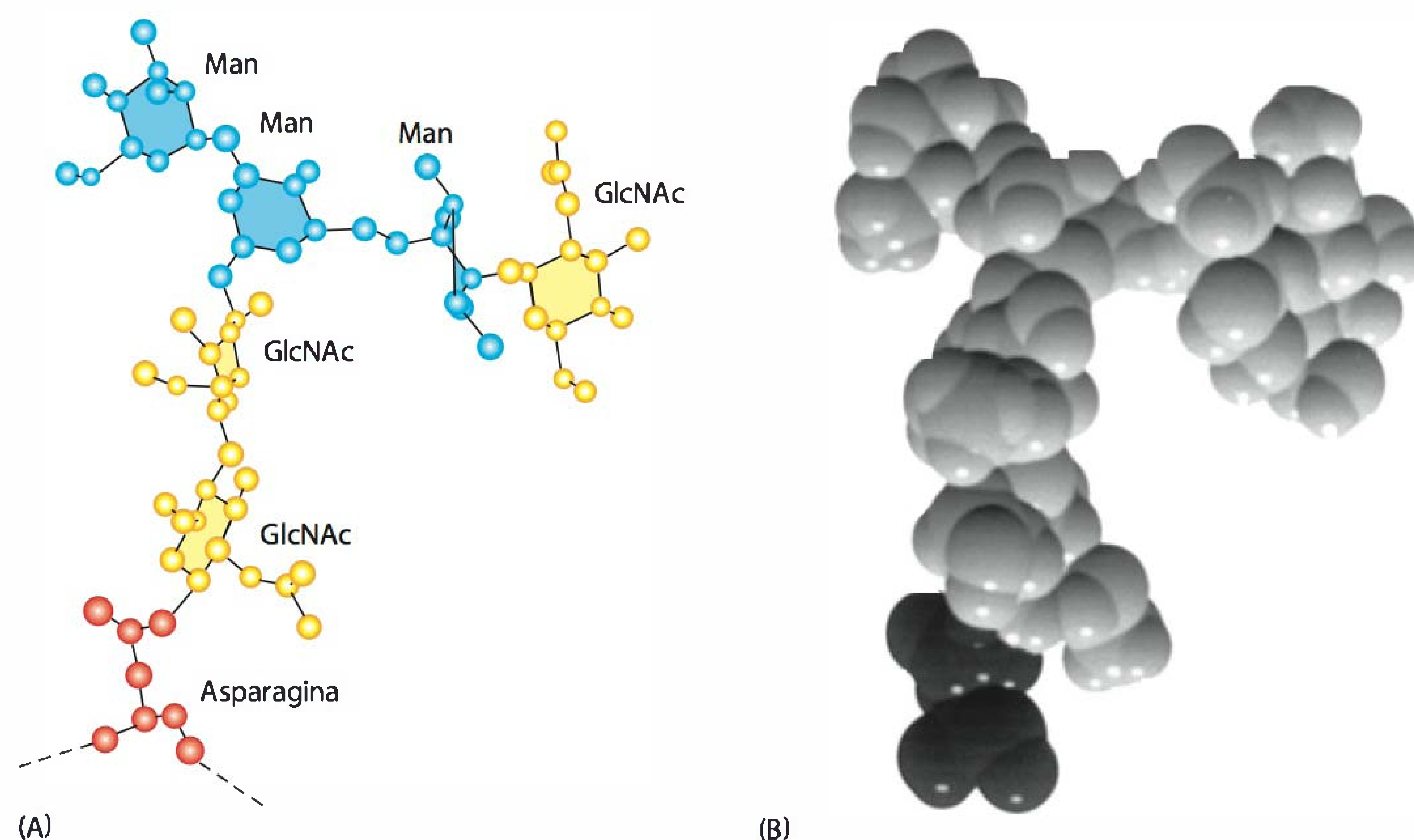


Figura 13-34 Estrutura tridimensional de um pequeno oligossacarídeo *N*-ligado. A estrutura foi determinada pela análise cristalográfica por raios X de uma glicoproteína. Este oligossacarídeo contém somente seis resíduos de açúcar, enquanto há 14 resíduos de açúcar no oligossacarídeo *N*-ligado que inicialmente é transferido às proteínas no RE (ver Figuras 12-50 e 12-51). (A) Um modelo do arcabouço mostrando todos os átomos, exceto os hidrogênios. (B) Um modelo de preenchimento espacial, com a asparagina indicada por átomos escuros. (B, cortesia de Richard Feldmann.)

Como as cadeias de açúcares têm flexibilidade limitada, mesmo um pequeno oligossacarídeo *N*-ligado sobressai-se da superfície de uma glicoproteína (**Figura 13-34**) e pode, assim, limitar a aproximação de outras macromoléculas à superfície proteica. Dessa maneira, por exemplo, a presença de oligossacarídeos tende a tornar uma glicoproteína mais resistente à digestão por proteases. Pode ser que os oligossacarídeos de proteínas das superfícies celulares proporcionassem às células eucarióticas ancestrais, originalmente, um revestimento protetor. Comparado à rígida parede celular das bactérias, um revestimento mucoso possui a vantagem de deixar a célula com liberdade de modificar seu formato e se mover.

Desde então, as cadeias de açúcares têm se modificado para servir a outros propósitos também. O revestimento mucoso das células pulmonares e intestinais, por exemplo, protege contra muitos patógenos. O reconhecimento de cadeias de açúcar pelas *lectinas*, no espaço extracelular, é importante em muitos processos de desenvolvimento e no reconhecimento célula-célula: as *selectinas*, por exemplo, são lectinas que funcionam nos processos de adesão célula-célula, durante a migração dos linfócitos, como discutido no Capítulo 19. A presença de oligossacarídeos pode modificar as propriedades antigênicas de uma proteína, tomando a glicosilação um importante fator na produção de proteínas com finalidades farmacêuticas.

A glicosilação pode, também, ter importantes papéis de regulação. A sinalização por meio do receptor Notch de superfície celular, por exemplo, determina o destino celular apropriado no desenvolvimento. Notch é uma proteína transmembrana *O*-glicosilada pela adição de uma única fucose a algumas serinas, treoninas e hidroxilisinas. Alguns tipos celulares expressam uma glicosil-transferase adicional que adiciona uma *N*-acetilglicosamina a cada uma destas fucoses no aparelho de Golgi. Essa adição modifica a especificidade do receptor Notch para proteínas-sinal de superfície celular que ativam o receptor.

O transporte através do aparelho de Golgi deve ocorrer pelo transporte vesicular ou pela maturação das cisternas

É ainda incerto como o aparelho de Golgi alcança e mantém a sua estrutura polarizada e como as moléculas movem-se de uma cisterna a outra. Uma evidência funcional a partir de ensaios de transporte *in vitro* e a descoberta de vesículas de transporte em abundância na vizinhança das cisternas de Golgi levaram, inicialmente, à ideia de que estas vesículas transportam proteínas entre as cisternas, brotando de uma cisterna e se fusionando à próxima. De acordo com esse **modelo de transporte vesicular**, o aparelho de Golgi é uma estrutura relativamente estática, com as suas enzimas mantidas no lugar, enquanto as moléculas em trânsito são movidas através das cisternas em sequência, carregadas por vesículas de transporte (**Figura 13-35**A). O fluxo retrógrado recupera as proteínas que escaparam do RE e do Golgi e as devolve para os compartimentos precedentes. O fluxo direcionado é obtido à medida que as moléculas-carga que se movem em progressão são seletivamente empacotadas em vesículas de movimento progressivo. Embora ambos os tipos de vesículas provavelmente sejam revestidos de COPI, os revestimentos devem conter proteínas adaptadoras diferentes para conferir seletividade no empacotamento das moléculas-carga. Alternativamente, as ve-

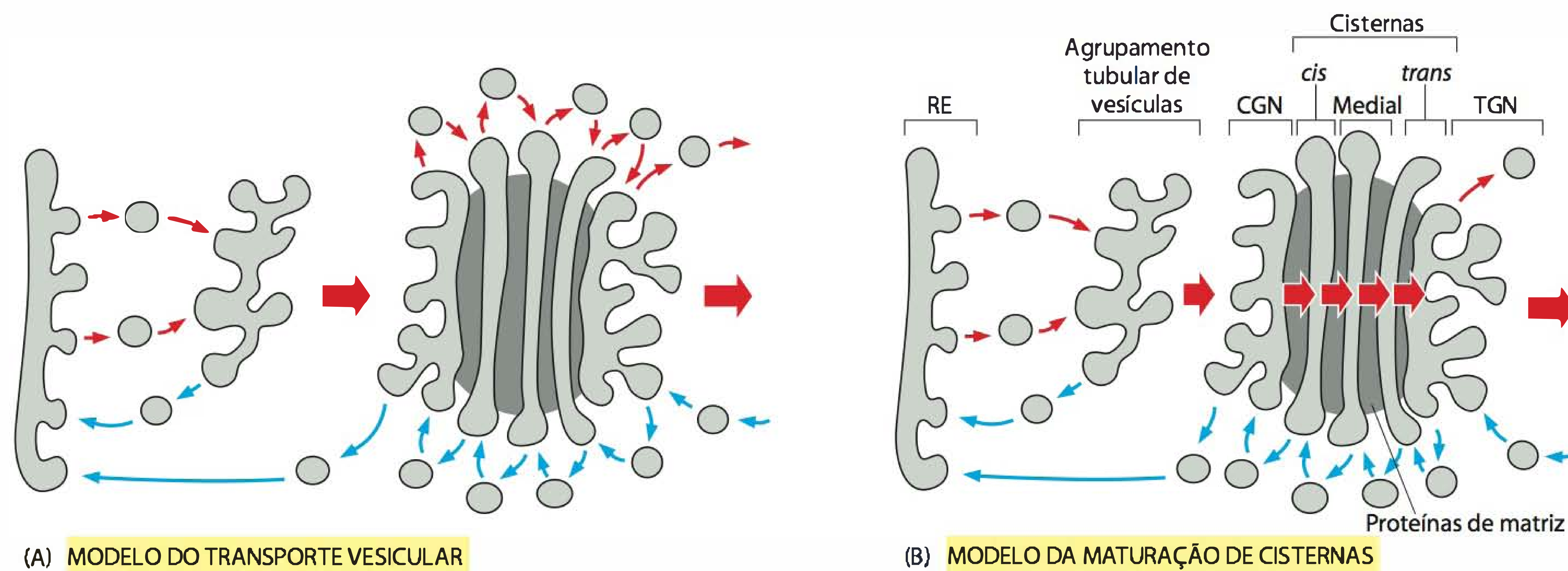


Figura 13-35 Dois possíveis modelos para explicar a organização do aparelho de Golgi e o transporte de proteínas de uma cisterna para outra. É provável que o transporte através do aparelho de Golgi na direção progressiva (*setas vermelhas*) envolva elementos de ambos os modelos. (A) No modelo do transporte vesicular, as cisternas de Golgi são organelas estáticas que contêm um complemento característico de enzimas residentes. A passagem de moléculas através do Golgi é obtida pelo movimento progressivo de vesículas de transporte, as quais brotam de uma cisterna e se fundem com a próxima, em uma direção de *cis* para *trans*. (B) De acordo com o modelo alternativo da maturação de cisternas, cada cisterna de Golgi amadurece à medida que migra através de uma pilha. Em cada estágio, as proteínas residentes no Golgi que são carregadas adiante em uma cisterna são levadas de volta para um compartimento anterior em vesículas revestidas de COPI. Quando uma cisterna recém-formada move-se para uma posição medial, por exemplo, as enzimas "descartadas" do Golgi *cis* seriam extraídas e transportadas de volta para uma nova cisterna *cis* posicionada atrás. De forma semelhante, as enzimas em posição medial seriam recebidas pelo transporte retrógrado das cisternas localizadas logo à frente. Dessa maneira, uma cisterna *cis* maturaria, tornando-se uma cisterna medial, à medida que se movesse.

sículas de transporte que navegam entre as cisternas de Golgi poderiam não ser, de forma alguma, direcionadas, transportando material de carga aleatoriamente para a frente e para trás; o fluxo direcional ocorreria devido à entrada contínua nas cisternas *cis* e à saída nas cisternas *trans*.

Uma hipótese diferente, chamada de **modelo da maturação de cisternas**, coloca o Golgi como uma estrutura dinâmica na qual as próprias cisternas se moveriam. Os agrupamentos tubulares de vesículas que chegariam a partir do RE fusionariam uns aos outros para se tornarem a rede *cis* de Golgi. De acordo com este modelo, esta rede, então, maturaria progressivamente para se tornar as cisternas *cis*, depois as mediais e assim por diante. Portanto, na face *cis* de uma pilha de Golgi, novas cisternas *cis* iriam continuamente formar-se e, então, migrar através das pilhas, à medida que amadurecessem (Figura 13-35B). Este modelo é sustentado pelas observações microscópicas que demonstram que grandes estruturas, como os fusos de colágeno em fibroblastos e escamas em certas algas – os quais são muito maiores para se enquadrarem em vesículas clássicas de transporte –, movem-se progressivamente através das pilhas de Golgi.

No modelo da maturação de cisternas, a distribuição característica das enzimas de Golgi é explicada pelo fluxo retrógrado. Tudo se move continuamente à frente com as cisternas em maturação, incluindo as enzimas de processamento que pertencem a regiões iniciais do aparelho de Golgi. No entanto, as vesículas revestidas de COPI em brotamento continuamente coletam as enzimas apropriadas, sendo quase a totalidade delas proteínas de membrana, e as carregam de volta a cisternas iniciais, onde elas funcionam. Uma cisterna *cis* recém-formada receberia, portanto, seu complemento normal de enzimas residentes primariamente a partir de cisternas localizadas à frente dela e transferiria este complemento para a próxima cisterna *cis* que se formasse.

Como discutiremos mais tarde, quando uma cisterna finalmente chega a se tornar parte da rede *trans* de Golgi, vários tipos de vesículas revestidas brotam a partir deste local até a rede desaparecer, para ser substituída por uma cisterna em maturação posicionada logo atrás. Ao mesmo tempo, outras vesículas de transporte estão continuamente recuperando membranas de compartimentos posicionados após o Golgi e devolvendo essas membranas à rede *trans* de Golgi.

Os modelos de transporte vesicular e de maturação de cisternas não são mutuamente exclusivos. De fato, as evidências sugerem que o transporte deve ocorrer por uma combinação dos dois mecanismos, nos quais alguma carga é elevada rapidamente adiante em vesículas de transporte, enquanto outras cargas avançam mais lentamente, à medida que o aparelho de Golgi constantemente se renova, por meio da maturação de cisternas.

As proteínas da matriz do Golgi auxiliam a organizar a pilha do Golgi

A arquitetura única do aparelho de Golgi depende tanto do citoesqueleto de microtúbulos, como já mencionado, como de proteínas citoplasmáticas da matriz do Golgi, as quais formam um arcabouço entre cisternas adjacentes e conferem às pilhas de Golgi a sua integridade estrutural. Algumas das proteínas da matriz formam longos filamentos conectados que, acredita-se, auxiliam a reter as vesículas de transporte do Golgi próximas à organela. Quando a célula se prepara para a divisão, as proteína-cinases mitóticas fosforilam as pro-

teínas da matriz do Golgi, determinando a fragmentação do aparelho de Golgi e a dispersão por todo o citosol. Os fragmentos do Golgi são então distribuídos equitativamente entre as duas células-filha, onde as proteínas da matriz são desfosforiladas, levando à remontagem do aparelho de Golgi.

Nitidamente, as proteínas da matriz do Golgi podem realizar a remontagem das pilhas apropriadamente localizadas próximas ao centrossomo, mesmo quando as proteínas das membranas do Golgi são experimentalmente impedidas de deixar o RE. Essa observação sugere que as proteínas da matriz são amplamente responsáveis tanto pela estrutura como pela localização do aparelho de Golgi.

Resumo

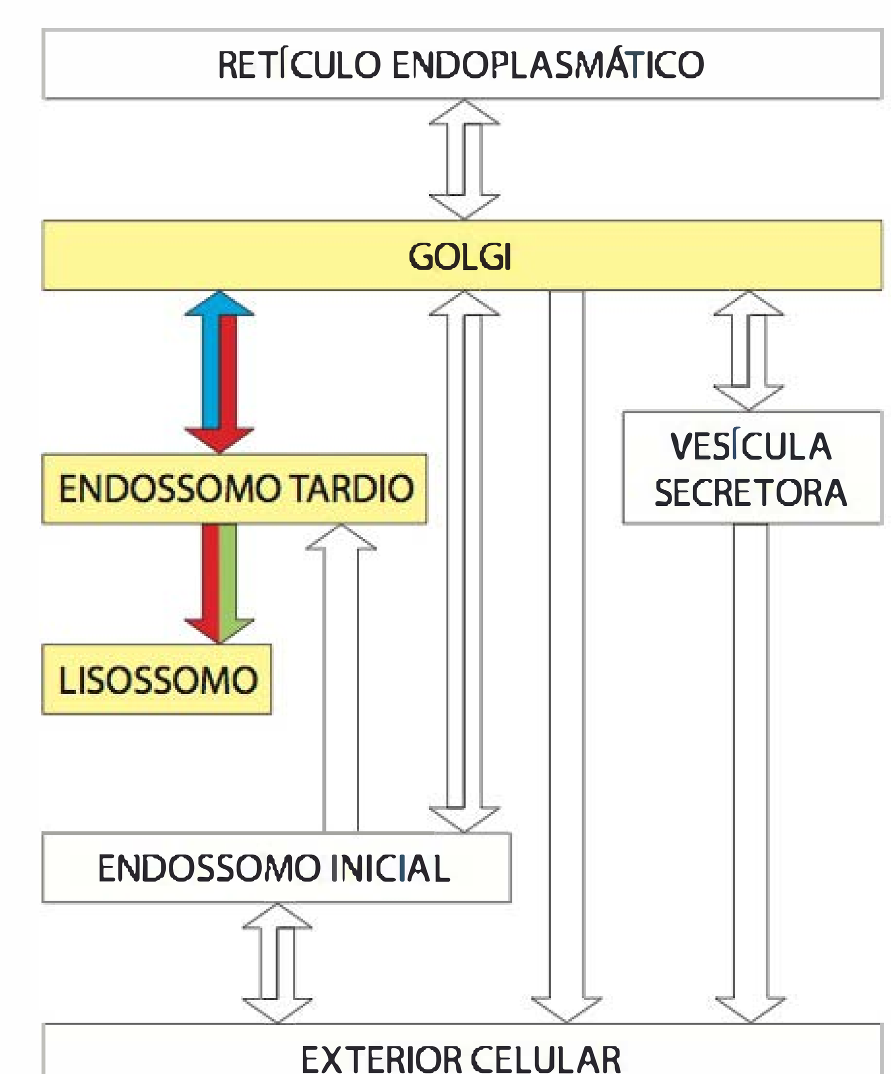
As proteínas corretamente enoveladas e montadas no RE são empacotadas em vesículas revestidas de COPII que se destacam da membrana do RE. Imediatamente após, o revestimento é removido, e as vesículas fundem-se umas às outras para formar agrupamentos tubulares de vesículas. Os agrupamentos então se movem sobre linhas de microtúbulos para o aparelho de Golgi, onde se fusionam uns aos outros para formar a rede cis de Golgi. Qualquer proteína residente no RE que escape é devolvida ao RE a partir dos agrupamentos tubulares de vesículas e do aparelho de Golgi pelo transporte retrógrado em vesículas revestidas de COPI.

O aparelho de Golgi, diferentemente do RE, contém muitos açúcares-nucleotídeos, os quais são utilizados por várias enzimas glicosil-transferases para realizar reações de glicosilação sobre moléculas de lipídeos e de proteínas à medida que estas passam através do aparelho de Golgi. As manoses dos oligossacarídeos N-ligados que são adicionados às proteínas no RE são, frequentemente, removidas no início e, sequencialmente, outros açúcares são adicionados. Além disso, o aparelho de Golgi é o local no qual ocorre a glicosilação O-ligada e onde as cadeias de glicosaminoglicanos são adicionadas a proteínas-núcleo para formar proteoglicanos. A sulfatação de açúcares em proteoglicanos e de tirosinas selecionadas de proteínas também ocorre em um compartimento tardio do Golgi.

O aparelho de Golgi distribui as várias proteínas e os lipídeos que recebe do RE e, então, os distribui para a membrana plasmática, os lisossomos e as vesículas secretoras. Ele é uma estrutura polarizada que consiste em uma pilha ou mais de cisternas em forma de discos, cada pilha organizada como uma série de pelo menos três compartimentos funcionalmente distintos, denominados de cisternas cis, medial *e* trans. *As cisternas* cis *e* trans *são conectadas a estações especiais de seleção, chamadas de rede cis de Golgi e rede trans de Golgi, respectivamente. As proteínas e os lipídeos movem-se através das pilhas de Golgi em uma direção de cis para trans. Esse movimento deve ocorrer por transporte vesicular, pela maturação progressiva das cisternas cis que migram continuamente através das pilhas, ou, mais provavelmente, por uma combinação dos dois mecanismos. Acredita--se que as enzimas que funcionam em cada região particular das pilhas sejam ali mantidas pelo contínuo transporte vesicular retrógrado, a partir de cisternas mais distantes. As novas proteínas concluídas terminam na rede trans de Golgi, a qual as empacota em vesículas de transporte para despachá-las a seus destinos específicos na célula.*

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA OS LISOSSOMOS

Todas as proteínas que passam através do aparelho de Golgi, exceto aquelas que são lá retidas como residentes permanentes, são classificadas na rede *trans* de Golgi, de acordo com seus destinos finais. O mecanismo de classificação (seleção e distribuição) é especialmente bem-conhecido para as proteínas destinadas ao lúmen dos lisossomos; nesta seção, consideraremos este processo de transporte seletivo. Iniciaremos com uma breve apresentação da estrutura e da função dos lisossomos.



Os lisossomos são os principais sítios de digestão intracelular

Os **lisossomos** são compartimentos definidos por membranas preenchidos por enzimas hidrolíticas que controlam a digestão intracelular de macromoléculas. Eles contêm cerca de 40 tipos de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases. Todas são **hidrolases ácidas**. Para uma ótima atividade, elas precisam ser ativadas por clivagem proteolítica e requerem um ambiente ácido, o qual é

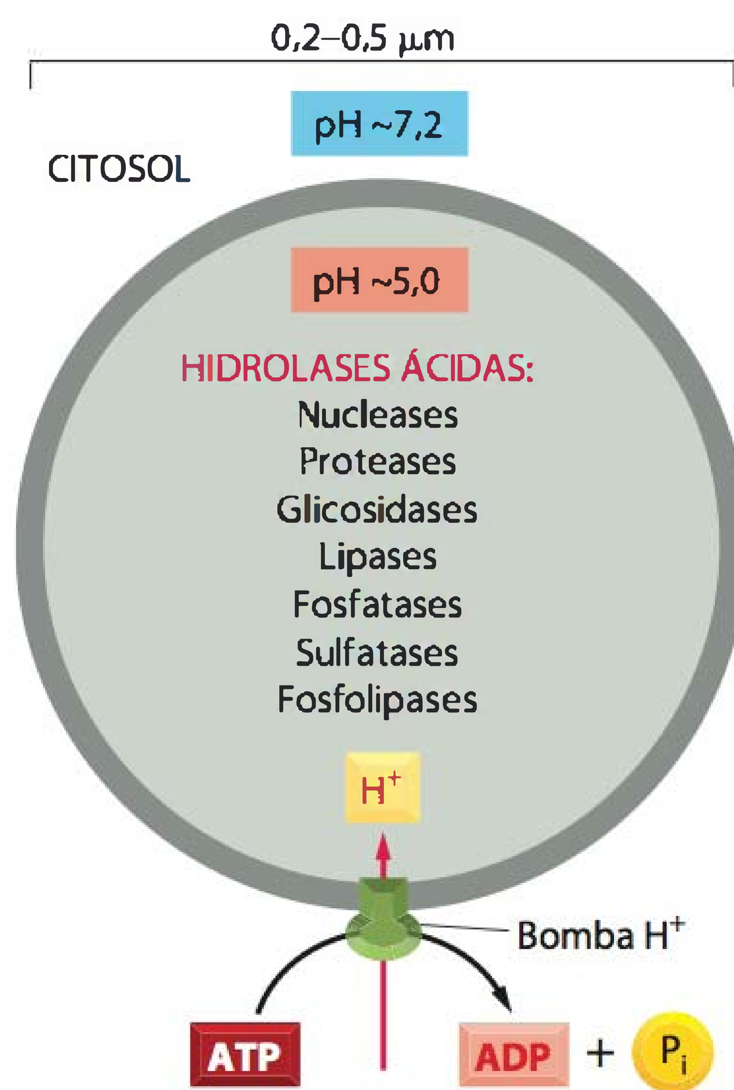


Figura 13-36 Lisossomos. As hidrolases ácidas são enzimas hidrolíticas ativadas sob condições ácidas. A ATPase do tipo V da membrana bombeia H^+ para dentro do lisossomo, mantendo seu lúmen em um pH ácido.

fornecido pelos lisossomos que mantêm um pH em torno de 4,5 a 5,0 no seu interior. Dessa maneira, os conteúdos do citosol são duplamente protegidos contra o ataque do sistema digestivo da própria célula: a membrana dos lisossomos normalmente mantém as enzimas digestivas fora do citosol, mas, mesmo que haja algum vazamento, elas causarão poucos danos, porque o pH citosólico é de aproximadamente 7,2.

Assim como todas as outras organelas intracelulares, os lisossomos não apenas contêm uma coleção única de enzimas, mas também uma membrana circundante única. A maioria das proteínas lisossômicas de membrana é, de forma pouco comum, altamente glicosilada, o que auxilia a protegê-las das proteases lisossômicas do lúmen. O transporte de proteínas através dessa membrana permite que os produtos finais da digestão de macromoléculas – como aminoácidos, açúcares e nucleotídeos – sejam transferidos para o citosol, de onde podem ser excretados ou reutilizados pela célula.

Uma *H^+ ATPase vacuolar* da membrana lisossômica utiliza a energia da hidrólise de ATP para bombear H^+ para dentro do lisossomo, mantendo, assim, o lúmen em seu pH ácido (**Figura 13-36**). A bomba lisossomal H^+ pertence à família das ATPases do tipo V e possui uma arquitetura similar às ATP-sintases de mitocôndrias e cloroplastos (ATPases do tipo F), as quais convertem a energia estocada em gradientes de H^+ em ATP (ver Figura 11-12). Diferentemente destas enzimas, no entanto, a H^+ ATPase vacuolar trabalha exclusivamente ao contrário, bombeando H^+ para dentro da organela. ATPases semelhantes ou idênticas às do tipo V acidificam todas as organelas endocíticas e exocíticas, incluindo os lisossomos, os endossomos, os compartimentos selecionados do aparelho de Golgi e muitas vesículas de transporte e de secreção. Além de prover um ambiente de baixo pH, o qual é adequado às reações que ocorrem no lúmen da organela, o gradiente de H^+ fornece a fonte de energia que conduz o transporte de pequenos metabólitos através da membrana da organela.

Os lisossomos são heterogêneos

Os lisossomos foram inicialmente descobertos pelo fracionamento bioquímico de extratos celulares; somente mais tarde eles foram observados de forma clara em microscópios eletrônicos. Embora extraordinariamente diversos em formatos e tamanhos, podem ser identificados como membros de uma única família de organelas pela coloração com anticorpos específicos. Podem também ser identificados por histoquímica, utilizando o precipitado produzido pela ação de uma hidrolase sobre o seu substrato para indicar quais organelas contêm hidrolases (**Figura 13-37**). Por esses critérios, os lisossomos foram encontrados em todas as células eucarióticas.

A heterogeneidade da morfologia lisossômica contrasta com a relativa uniformidade das estruturas da maioria das outras organelas celulares. A diversidade reflete a ampla variedade de funções digestivas mediadas pelas hidrolases ácidas, incluindo a quebra de restos intra e extracelulares, a destruição de microrganismos fagocitados e a produção de nutrientes para a célula. A diversidade morfológica dos lisossomos, no entanto, também revela como os lisossomos formam-se: os endossomos tardios contêm material proveniente tanto da membrana plasmática, por endocitose, quanto hidrolases lisossomais recém-sintetizadas, e eles, portanto, já possuem uma semelhança com os lisossomos. Os endossomos tardios fusionam-se a endossomos preexistentes para formar estruturas que, algumas vezes, são referidas como *endolisossomos*, os quais então se fundem uns aos outros (**Figura 13-38**). Quando a maior parte do material endocitado dentro de um lisossomo é digerida de modo que somente resíduos resistentes ou de digestão lenta permanecem, estas organelas tornam-se endossomos "clássicos". Estes endossomos são relativamente densos, circulares e pequenos, mas podem entrar no ciclo novamente, ao fusionarem-se com endossomos tar-

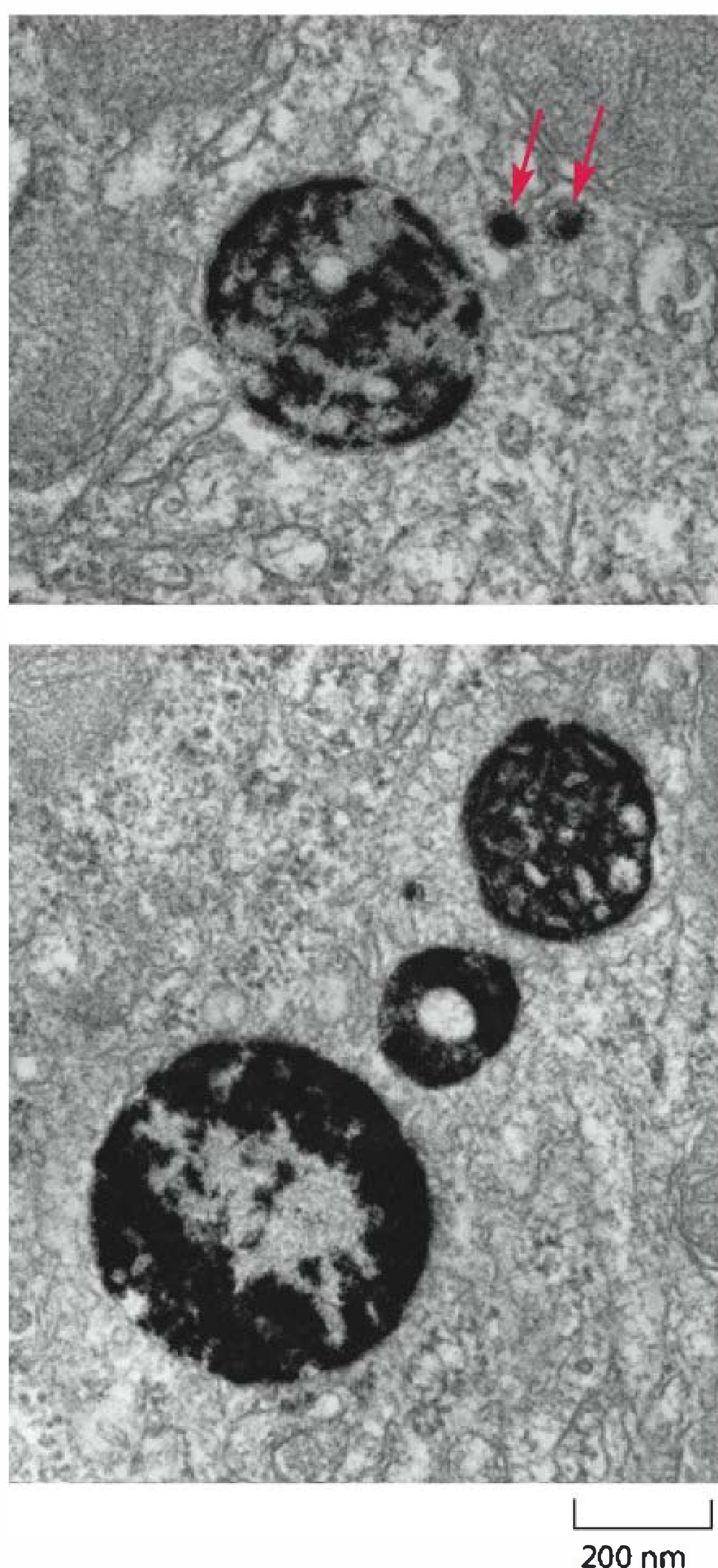


Figura 13-37 Visualização histoquímica de lisossomos. Estas micrografias eletrônicas mostram duas secções de uma célula corada para revelar a localização de fosfatase ácida, uma enzima marcadora dos lisossomos. As organelas definidas por membranas maiores, contendo precipitados densos de fosfato de chumbo, são os lisossomos. As suas morfologias diversas refletem as variações de quantidade e de natureza do material que estão digerindo. Os precipitados são produzidos quando o tecido fixado por glutaraldeído (para fixar as enzimas no lugar) é incubado com um substrato para fosfatase na presença de íons de chumbo. Duas pequenas vesículas que, acredita-se, estejam carregando hidrolases ácidas do aparelho de Golgi estão indicadas por *setas vermelhas* no quadro superior. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

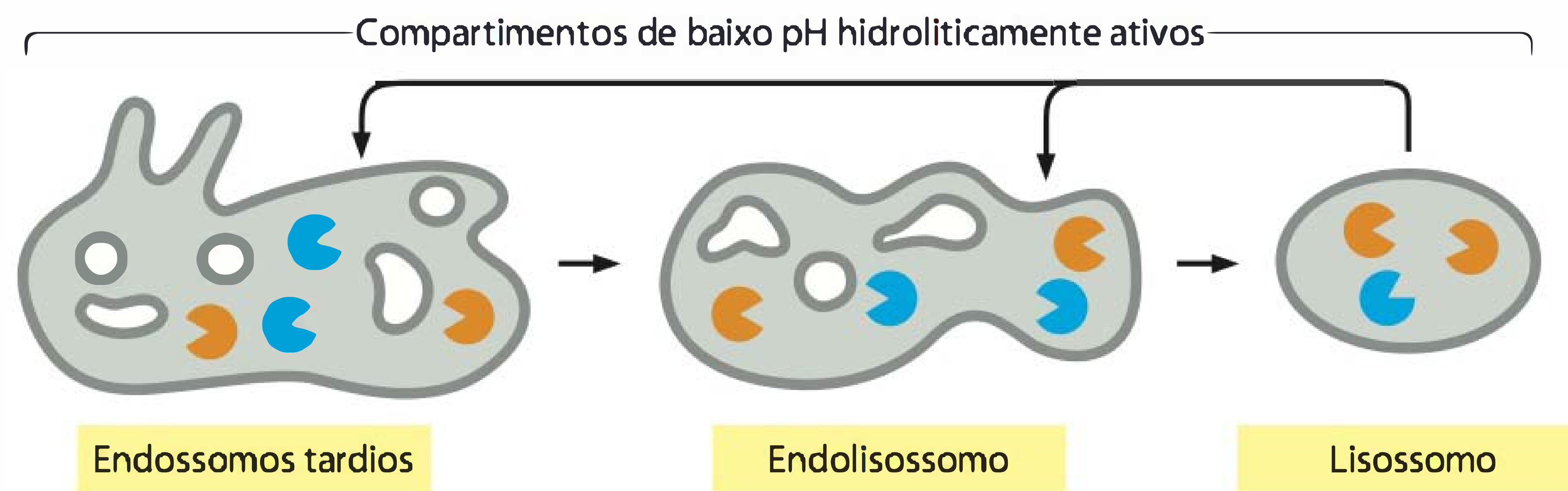


Figura 13-38 Modelo para a maturação lisossomal. A heterogeneidade morfológica dos lisossomos reflete, em parte, a natureza diferente dos materiais entregados à organela, bem como os diferentes estágios no ciclo de maturação representado aqui.

dios ou endolisossomos. Logo, não existe uma distinção real entre endossomos tardios e endolisossomos: eles são idênticos, com exceção de que se encontram em estágios diferentes do ciclo de maturação. Por essa razão, os lisossomos são, algumas vezes, vistos como uma coleção heterogênea de organelas distintas, cuja característica em comum é o alto conteúdo de enzimas hidrolíticas. É particularmente difícil aplicar uma definição mais precisa do que esta para células vegetais, como veremos a seguir.

Os vacúolos de vegetais e de fungos são nitidamente lisossomos versáteis

A maioria das células vegetais e fúngicas (incluindo leveduras) contém uma ou mais vesículas muito grandes e preenchidas de fluido, denominadas **vacúolos**. Eles ocupam tipicamente mais de 30% do volume celular, chegando a até 90% em alguns tipos celulares (**Figura 13-39**). Os vacúolos são relacionados aos lisossomos das células animais, contendo várias enzimas hidrolíticas, mas as suas funções são nitidamente diversas. O vacúolo vegetal atua como uma organela de estocagem para os nutrientes e para os subprodutos celulares, como um compartimento degradador, como uma forma econômica de aumentar o tamanho celular (**Figura 13-40**) e como um controlador da *pressão de turgescência* (a pressão osmótica que empurra para fora a parede celular e impede que a planta murche). A mesma célula pode ter vacúolos diferentes com funções distintas, como digestão e estocagem.

O vacúolo é importante como um instrumento de homeostase, permitindo que as células vegetais suportem grandes variações do ambiente. Quando o pH do ambiente diminui, por exemplo, o fluxo de H^+ para o citosol é balanceado, pelo menos em parte, por um transporte aumentado de H^+ para o vacúolo de forma a manter constante o pH do citosol. De forma semelhante, muitas células vegetais mantêm uma pressão de turgescência praticamente constante em face das amplas variações de tonicidade dos fluidos dos seus ambientes próximos.

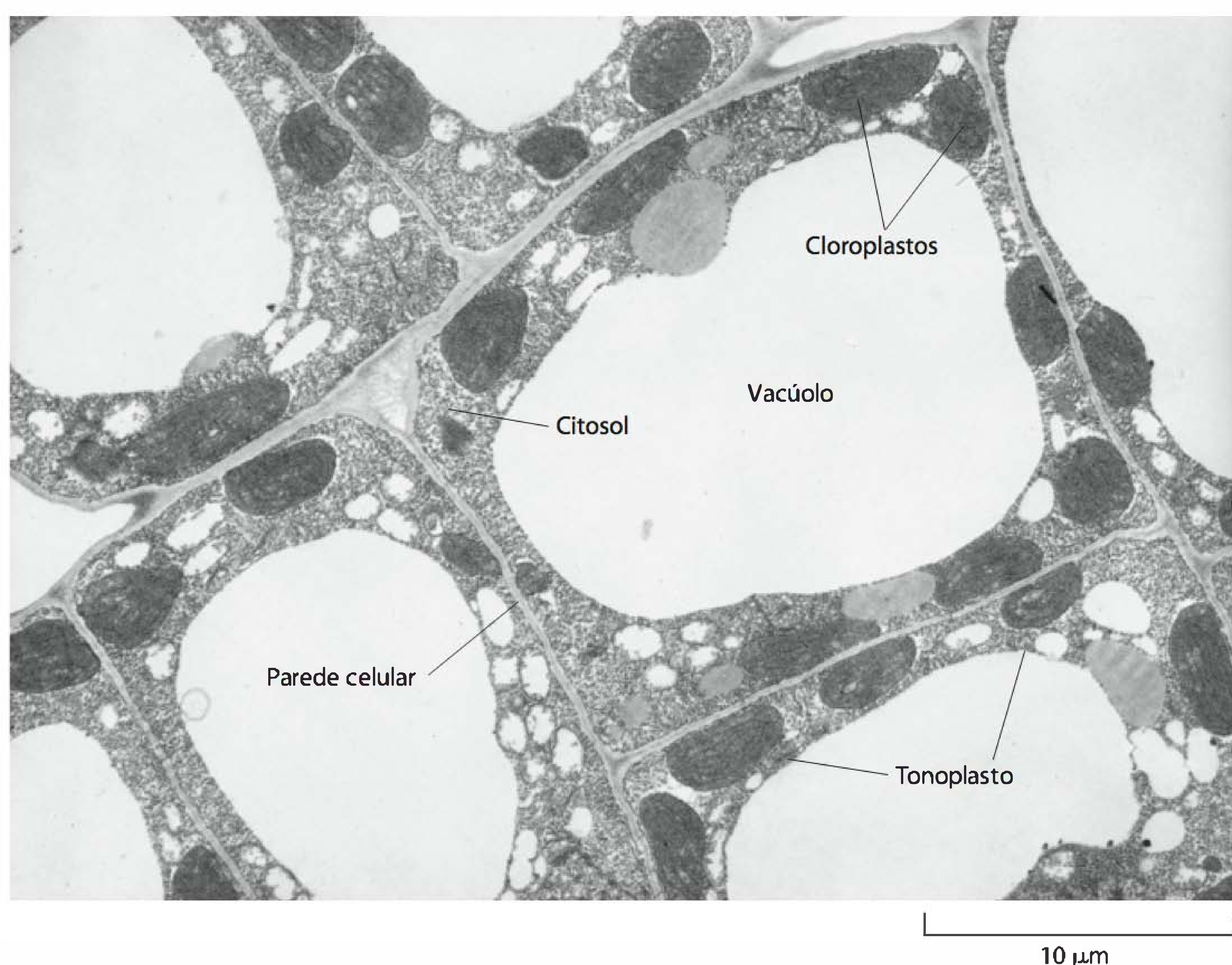


Figura 13-39 Vacúolo de células vegetais. Esta micrografia eletrônica de células de uma folha jovem de tabaco mostra o citosol como uma camada fina, contendo cloroplastos, pressionados contra a parede celular pelo enorme vacúolo. A membrana do vacúolo é chamada de tonoplasto. (Cortesia de J. Burgess.)

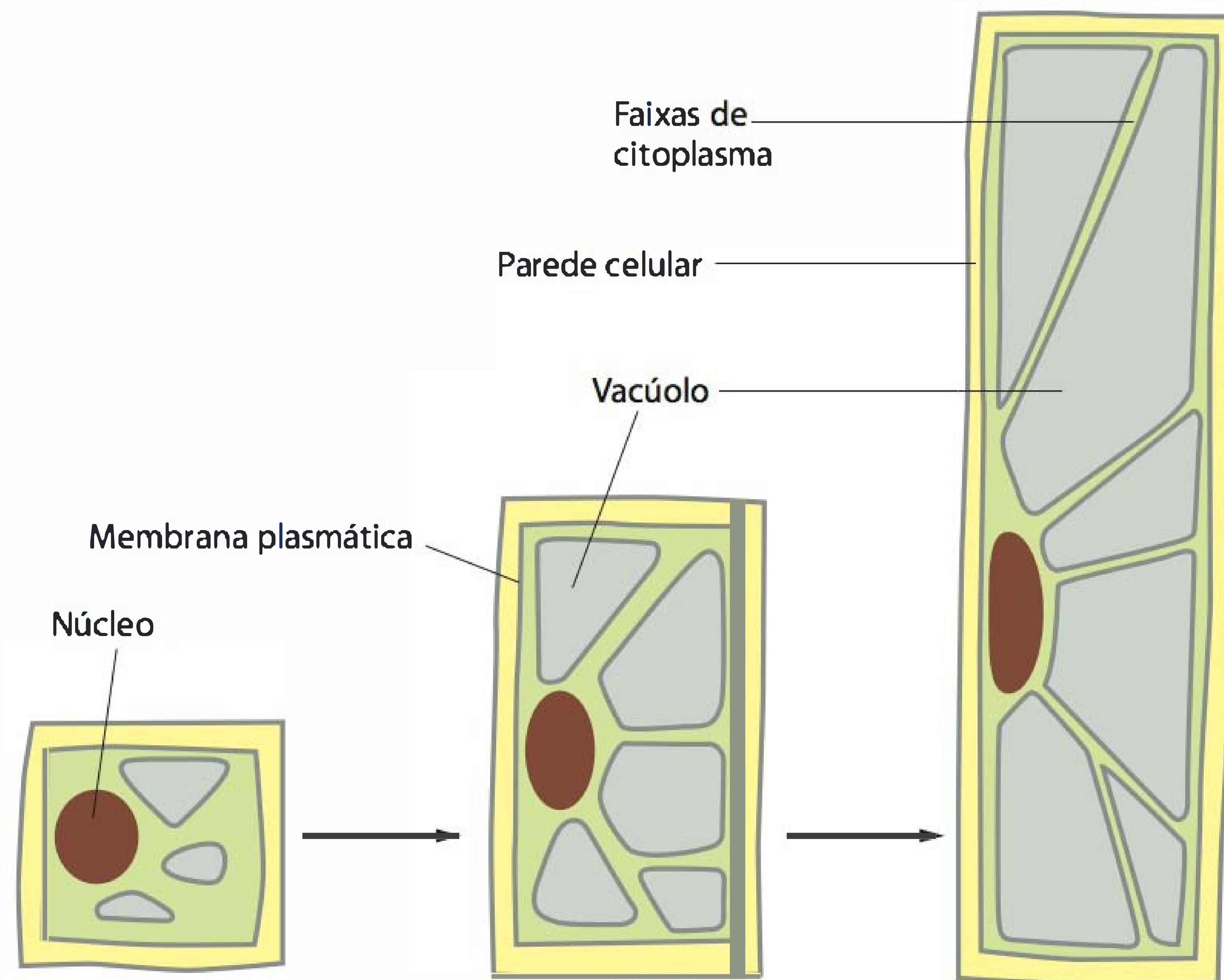


Figura 13-40 Função do vacúolo no controle do tamanho das células vegetais. Uma célula vegetal pode alcançar um grande aumento do volume celular, sem aumentar o volume do citosol. Os estreitamentos localizados da parede celular orientam o alargamento celular dirigido pela turgescência que acompanha a captação de água para dentro do vacúolo em expansão. O citosol acaba sendo confinado a uma camada fina periférica, a qual é conectada à região nuclear por faixas de citosol estabilizadas por fusos de filamentos de actina (não-representados).

Isso é alcançado pela mudança da pressão osmótica do citosol e do vacúolo – em parte pelo controle da quebra e da ressíntese de polímeros, como polifosfatos, no vacúolo, e em parte pela alteração da razão de transporte de açúcares, de aminoácidos e de outros metabólitos através da membrana plasmática e da membrana vacuolar. A pressão de turgescência regula a atividade de distintos transportadores em cada membrana para controlar estes fluxos.

As substâncias estocadas nos vacúolos vegetais frequentemente são colhidas para o consumo humano: em diferentes espécies, elas variam desde a borracha, o ópio até o aroma do alho. Muitos produtos estocados possuem uma função metabólica. As proteínas, por exemplo, podem ser preservadas por anos nos vacúolos de células de estocagem de muitas sementes, como as de ervilhas e de feijões. Quando as sementes germinam, estas proteínas são hidrolisadas, e os aminoácidos resultantes fornecem o suprimento alimentar para o desenvolvimento dos embriões. Os pigmentos do tipo antocianinas estocados nos vacúolos colorem as pétalas de muitas flores para atrair insetos polinizadores, enquanto as moléculas tóxicas liberadas dos vacúolos, quando uma planta é consumida ou danificada, promovem uma forma de defesa contra predadores.

Múltiplas vias levam materiais aos lisossomos

Os lisossomos normalmente são locais de encontro em que várias correntes de tráfego intracelular convergem. A via que leva para fora do RE pelo aparelho de Golgi entrega a maioria das enzimas digestivas, enquanto as substâncias que devem ser digeridas alimentam os lisossomos por pelo menos três vias, dependendo das suas fontes.

A melhor estudada dessas vias para a degradação nos lisossomos é aquela seguida pelas macromoléculas captadas do fluido extracelular pela *endocitose*. Como discutido em maior detalhe mais adiante, as moléculas endocitadas inicialmente são entregues em vesículas para organelas intracelulares pequenas e de formatos irregulares, chamadas de *endossomos iniciais*. Algumas dessas moléculas ingeridas são seletivamente retidas e recicladas para a membrana plasmática, enquanto outras seguem para os *endossomos tardios*. O interior dos endossomos tardios é levemente ácido (pH ~6), e este é o local onde se inicia a digestão hidrolítica das moléculas endocitadas. Como discutido anteriormente, os lisossomos maduros formam-se a partir dos endossomos tardios, acompanhados por uma redução ainda maior do pH interno. Conforme os lisossomos amadurecem, as proteínas das membranas endossômicas são seletivamente captadas do lisossomo em desenvolvimento por vesículas de transporte que devolvem essas proteínas aos endossomos ou à TGN.

Todos os tipos celulares utilizam uma segunda via de degradação nos lisossomos para o descarte de partes obsoletas da própria célula – um processo chamado de **autofagia**. Em uma célula hepática, por exemplo, uma mitocôndria-padrão tem um tempo de vida de cerca de 10 dias, e imagens de microscopia eletrônica de células normais revelam lisossomos contendo (e, presumivelmente, digerindo) mitocôndrias e outras organelas. O processo parece iniciar-se com a incorporação de uma organela por membranas de origem desconhecida, criando um *autofagossomo*, o qual se funde com um lisossomo (ou

um endossomo tardio). O processo é altamente regulado, e o componente celular selecionado pode, de alguma forma, ser marcado para a destruição lisossômica durante a remodelagem celular. Por exemplo, o RE liso que se prolifera em uma célula hepática em resposta ao fenobarbital (discutido no Capítulo 12) é removido seletivamente por autofagia após a remoção do fármaco.

Similarmente, outras organelas obsoletas, incluindo peroxissomos ou mitocôndrias senescentes, podem ser marcadas seletivamente para degradação por autofagia. Sob condições de baixa disponibilidade de nutrientes, grandes porções do citosol são capturadas de forma não-seletiva em autofagossomos. Os metabólitos derivados da digestão do material capturado auxiliam na sobrevivência da célula quando os nutrientes externos são limitantes.

Além de manter as funções básicas da célula no balanço e no descarte de partes obsoletas, a autofagia também possui um importante papel no desenvolvimento e na saúde. Ela auxilia a reestruturar células em diferenciação ao descartar partes não mais necessárias e também ajuda na defesa contra vírus e bactérias invasores. A autofagia é o único mecanismo apropriado para remover organelas inteiras ou grandes agregados proteicos, o que nenhum outro mecanismo, como a degradação proteossômica, é capaz de fazer.

Ainda se sabe pouco sobre os eventos que levam à formação de autofagossomos, ou como o processo de autofagia é controlado e as organelas específicas marcadas. Mais de 25 tipos diferentes de proteínas que participam do processo já foram identificados em levedura e células animais. A autofagia pode ser dividida em quatro etapas gerais: (1) nucleação e extensão de uma membrana delimitante em uma estrutura de forma crescente que engolfa uma porção do citoplasma, (2) fechamento do autofagossomo em um compartimento limitado por membrana dupla, (3) fusão do novo compartimento com lisossomos e (4) digestão da membrana interna do autofagossomo e de seu conteúdo (**Figura 13-41**). Muitos mistérios ainda precisam ser desvendados, incluindo a identificação do sistema de membrana a partir do qual as vesículas autofagossômicas se formam e como algumas organelas-alvo podem ser engolfadas tão seletivamente.

Como discutiremos mais tarde, a terceira via que traz materiais para a degradação nos lisossomos é encontrada principalmente em células especializadas na *fagocitose* de grandes partículas e microrganismos. Tais fagócitos profissionais (macrófagos e neutrófilos em vertebrados) engolfam objetos para formar um *fagossomo*, que é então convertido em um lisossomo da maneira descrita para o autofagossomo. As três vias estão resumidas na **Figura 13-42**.

Um receptor de manose-6-fosfato reconhece proteínas lisossômicas na rede *trans* de Golgi

Consideraremos agora a via que leva hidrolases lisossômicas e proteínas de membrana aos lisossomos. Ambas as classes de proteínas são sintetizadas no RE rugoso e transportadas através do aparelho de Golgi para a TGN. As vesículas de transporte que entregam essas proteínas aos endossomos tardios (que mais tarde formarão os lisossomos) brotam da TGN. As vesículas incorporam as proteínas lisossômicas e excluem as várias outras proteínas que devem ser empacotadas em diferentes vesículas de transporte para destiná-las a outros locais.

Como as proteínas lisossômicas são reconhecidas e selecionadas na TGN com a precisão necessária? Quanto às hidrolases lisossômicas, a resposta é conhecida. Elas carregam uma marca única na forma de grupos de *manose-6-fosfato (M6P, mannose 6-phosphate)*, os

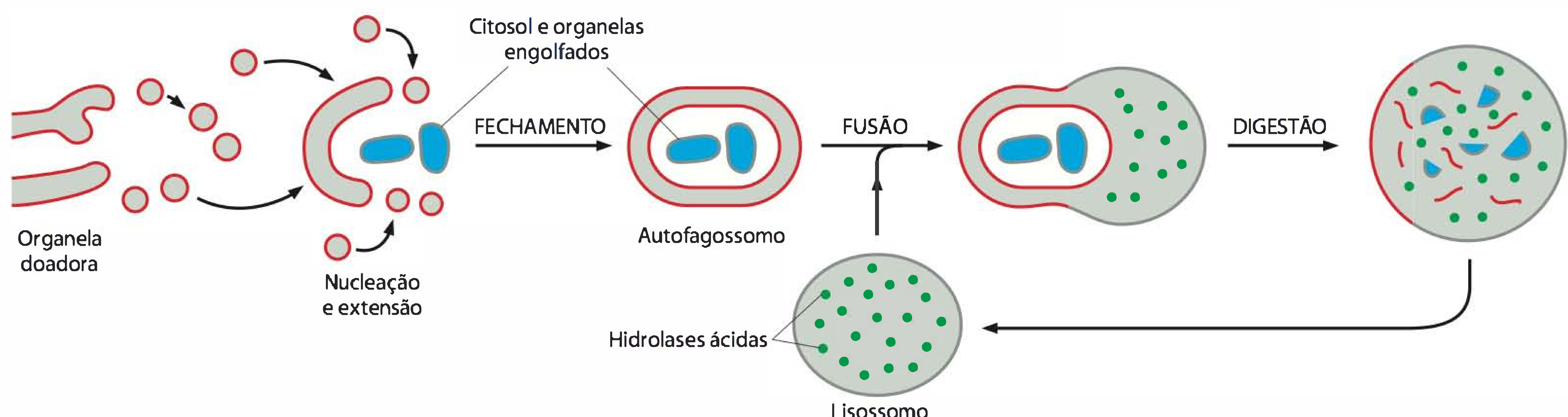


Figura 13-41 Modelo de autofagia. Após o evento de nucleação no citoplasma, uma membrana autofagossômica cresce pela fusão de vesículas de origem desconhecida, estendendo suas margens. Eventualmente, um evento de fusão fecha o autofagossomo, sequestrando a porção do citoplasma da célula em uma membrana dupla. Então, o autofagossomo fusiona-se a lisossomos portadores das hidrolases ácidas que digerem seu conteúdo.

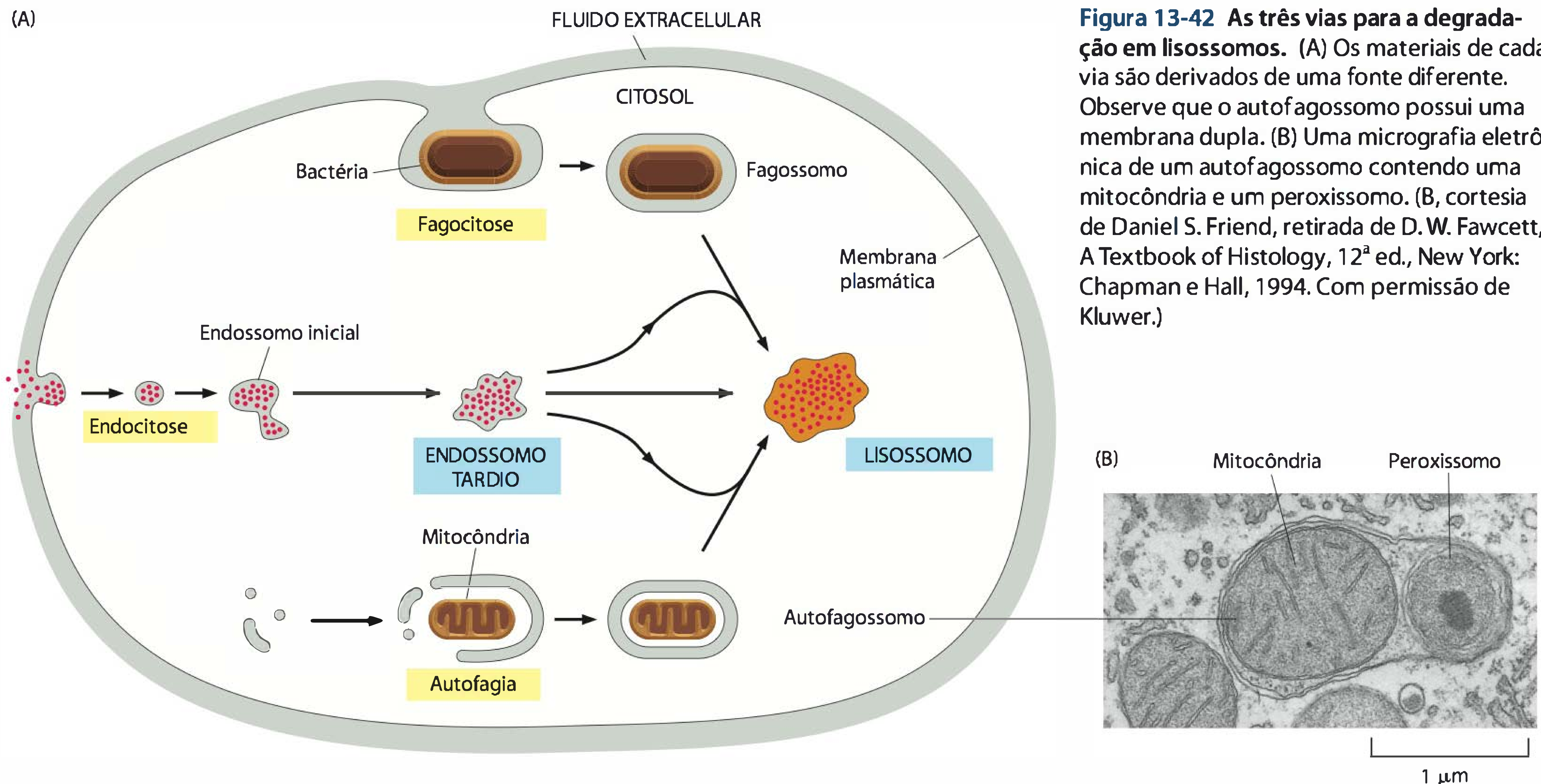


Figura 13-42 As três vias para a degradação em lisossomos. (A) Os materiais de cada via são derivados de uma fonte diferente. Observe que o autofagossomo possui uma membrana dupla. (B) Uma micrografia eletrônica de um autofagossomo contendo uma mitocôndria e um peroxissomo. (B, cortesia de Daniel S. Friend, retirada de D. W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12ª ed., New York: Chapman e Hall, 1994. Com permissão de Kluwer.)

quais são exclusivamente adicionados aos oligossacarídeos *N*-ligados dessas enzimas lisossômicas solúveis, à medida que elas passam através do lúmen da rede *cis* de Golgi (**Figura 13-43**). As **proteínas receptoras de M6P** transmembrana, as quais estão presentes na TGN, reconhecem os grupos M6P. As proteínas receptoras ligam-se às hidrolases lisossômicas, no lado do lúmen da membrana, e às proteínas adaptadoras de revestimentos de clatrina em montagem, no lado citosólico. Dessa maneira, elas auxiliam a empacotar as hidrolases em vesículas revestidas de clatrina que brotam da TGN. As vesículas soltam seu revestimento e entregam os seus conteúdos aos endossomos iniciais.

O receptor de M6P navega entre membranas específicas

A proteína receptora de M6P liga o seu oligossacarídeo específico em pH 6,5 a 6,7 na TGN e o libera em pH 6, o pH do interior dos endossomos tardios. Assim, à medida que o valor do pH diminui durante a maturação endossômica, as hidrolases lisossomais dissociam-se dos receptores de M6P e começam a digerir o material endocitado. Uma fosfatase ácida remove o grupo fosfato da manose, destruindo o sinal de classificação e contribuindo para a liberação das hidrolases lisossomais dos receptores de M6P. Quando as enzimas ligadas são liberadas, os receptores de M6P são recuperados em vesículas de transporte revestidas de retrômero que brotam dos endossomos; os receptores são, então, devolvidos às membranas da TGN para reutilização (**Figura 13-44**). O transporte em qualquer das direções requer peptídeos-sinal na cauda citoplasmática do receptor de M6P que, especificamente, transporta essa proteína para os endossomos tardios, ou de volta ao aparelho de Golgi. Os sinais são reconhecidos pelo complexo retrômero (ver Figura 13-9), o qual recruta os receptores de M6P para dentro de vesículas nos lisossomos. A reciclagem do receptor de M6P parece muito com a reciclagem do receptor de KDEL, discutido anteriormente, embora difira no tipo de vesículas revestidas que medeia o transporte.

Nem todas as moléculas de hidrolase que são dirigidas por M6P aos lisossomos chegam aos seus destinos apropriados. Algumas escapam ao processo de empacotamento normal na rede *trans* de Golgi e são transportadas, "de forma-padrão", à superfície celular, onde são secretadas no fluido extracelular. Alguns receptores de M6P, entretanto, também seguem para a membrana plasmática, onde recapturam as hidrolases lisossômicas que escaparam e as devolvem, por *endocitose mediada por receptores*, aos lisossomos, por intermédio dos endossomos iniciais e tardios. Como as hidrolases lisossômicas necessitam de um ambiente ácido para funcionar, elas não podem causar muitos danos quando no fluido extracelular, já que este possui um pH neutro de 7,4.

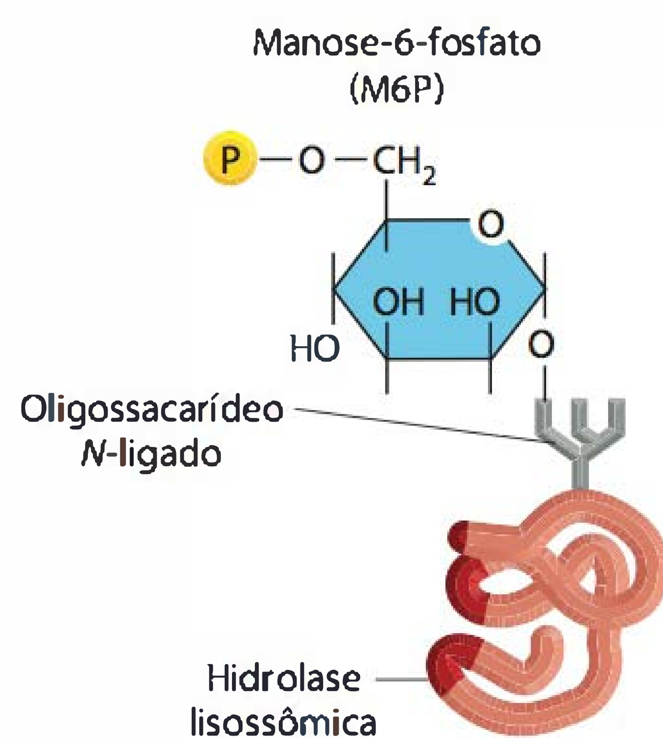


Figura 13-43 A estrutura da manose-6-fosfato em uma hidrolase lisossômica.

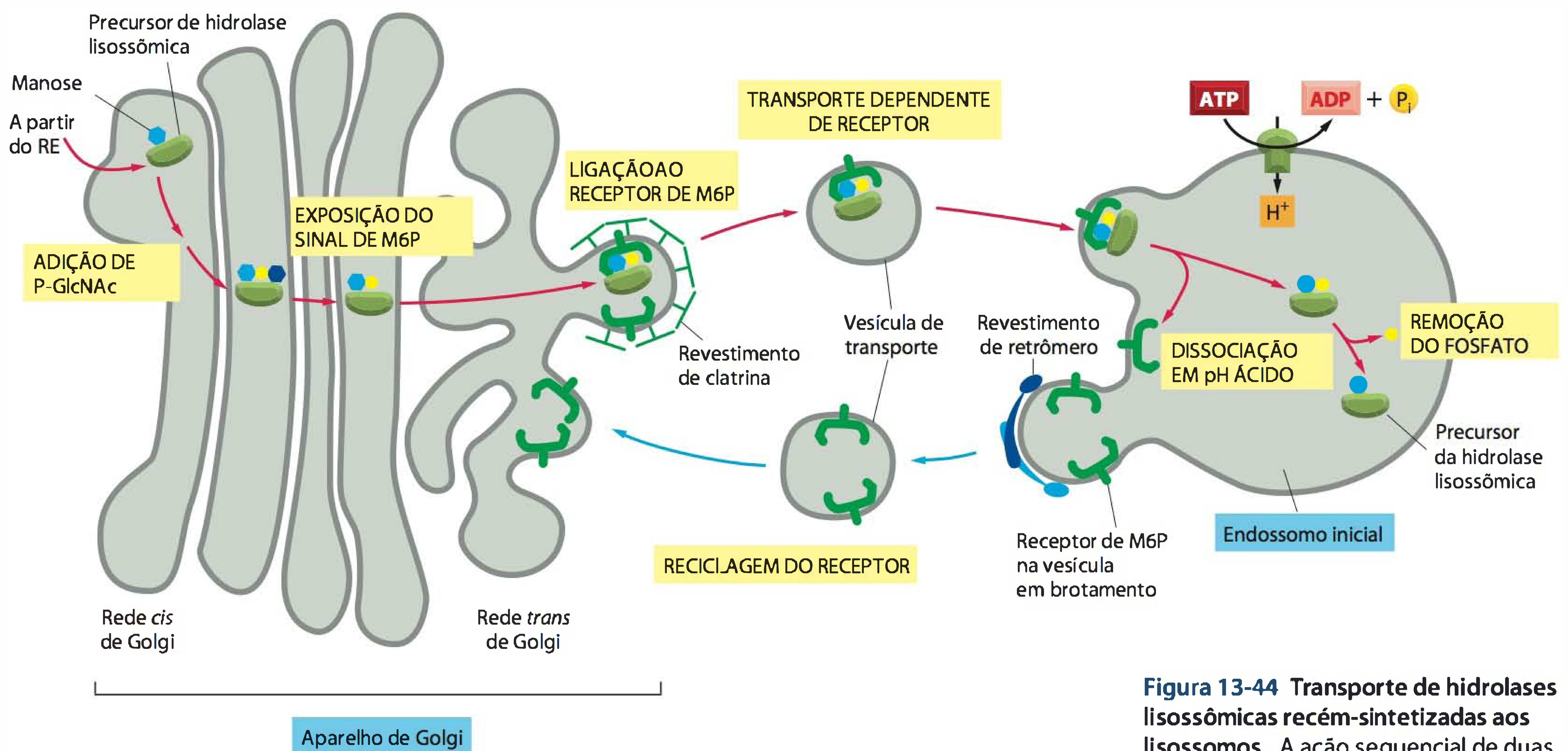


Figura 13-44 Transporte de hidrolases lisossômicas recém-sintetizadas aos lisossomos. A ação sequencial de duas enzimas nas redes *cis* e *trans* de Golgi adiciona grupos de manose-6-fosfato (M6P) aos precursores das enzimas lisossômicas (ver Figura 13-45). Eles são então segregados de todos os outros tipos de proteínas na TGN, porque as proteínas adaptadoras monoméricas do revestimento de clatrina ligam-se aos receptores de M6P, os quais, por sua vez, ligam as hidrolases lisossômicas modificadas. As vesículas revestidas de clatrina produzidas brotam da TGN, soltam seu revestimento e se fundem com os endossomos tardios. No pH baixo do endossomo, as hidrolases dissociam-se dos receptores de M6P, e os receptores vazios são reciclados, em vesículas revestidas de retrômero, ao aparelho de Golgi para novos ciclos de transporte. Nos endossomos, o fosfato é removido dos açúcares manose anexados às hidrolases, impedindo que estas sejam devolvidas ao aparelho de Golgi com o receptor.

Uma região-sinal da cadeia polipeptídica das hidrolases fornece a chave para a adição de M6P

O sistema de classificação que segrega as hidrolases lisossômicas e as despacha para os endossomos tardios funciona porque os grupos de M6P são adicionados somente às glicoproteínas apropriadas no aparelho de Golgi. Isto requer o reconhecimento específico das hidrolases pelas enzimas do Golgi responsáveis pela adição de M6P. Uma vez que todas as glicoproteínas deixam o RE com cadeias idênticas de oligossacarídeos *N*-ligados, o sinal para a adição das unidades de M6P aos oligossacarídeos deve estar em algum lugar da cadeia polipeptídica de cada hidrolase. Experimentos de engenharia genética revelaram que o sinal de reconhecimento é um agrupamento de aminoácidos vizinhos em cada uma das superfícies proteicas, conhecido como *região-sinal* (*signal patch*).

Duas enzimas atuam sequencialmente para catalisar a adição dos grupos de M6P às hidrolases lisossômicas. A primeira é uma GlcNAc-fosfotransferase na rede *cis* de Golgi que, especificamente, liga a hidrolase e adiciona GlcNAc-fosfato a um ou dois resíduos de manose de cada cadeia oligossacarídica (**Figura 13-45**). Uma segunda enzima na rede *trans* de Golgi, então, remove o resíduo de GlcNAc, deixando para trás uma marca de M6P nova. Uma vez que a maioria das hidrolases lisossômicas contém múltiplos oligossacarídeos, elas necessitam de muitos resíduos de M6P, fornecendo um sinal de alta afinidade para o receptor de M6P.

Os defeitos na GlcNAc-fosfotransferase causam uma doença de armazenamento nos lisossomos em humanos

Os defeitos genéticos que afetam uma ou mais hidrolases lisossômicas causam diversas **doenças de armazenamento nos lisossomos**. O defeito resulta do acúmulo dos substratos não-digeridos nos lisossomos, com sérias consequências patológicas, mais frequentemente no sistema nervoso. Na maioria dos casos, há uma mutação em um gene estrutural que codifica uma hidrolase lisossômica específica. Isso ocorre na *Doença de Hurler*, por exemplo, na qual uma enzima requerida para a quebra de glicosaminoglicanos está defectiva ou ausente. A forma mais grave das doenças de estocagem lisossômica é uma desordem muito rara chamada de *doença da inclusão celular* (*inclusion-cell disease* ou *I-cell disease*). Nessa doença, quase todas as enzimas hidrolíticas estão ausentes dos lisossomos de fibroblastos, e os seus substratos não-digeridos se acumulam nos lisossomos, o que, consequentemente, forma grandes *inclusões* nas células dos pacientes.

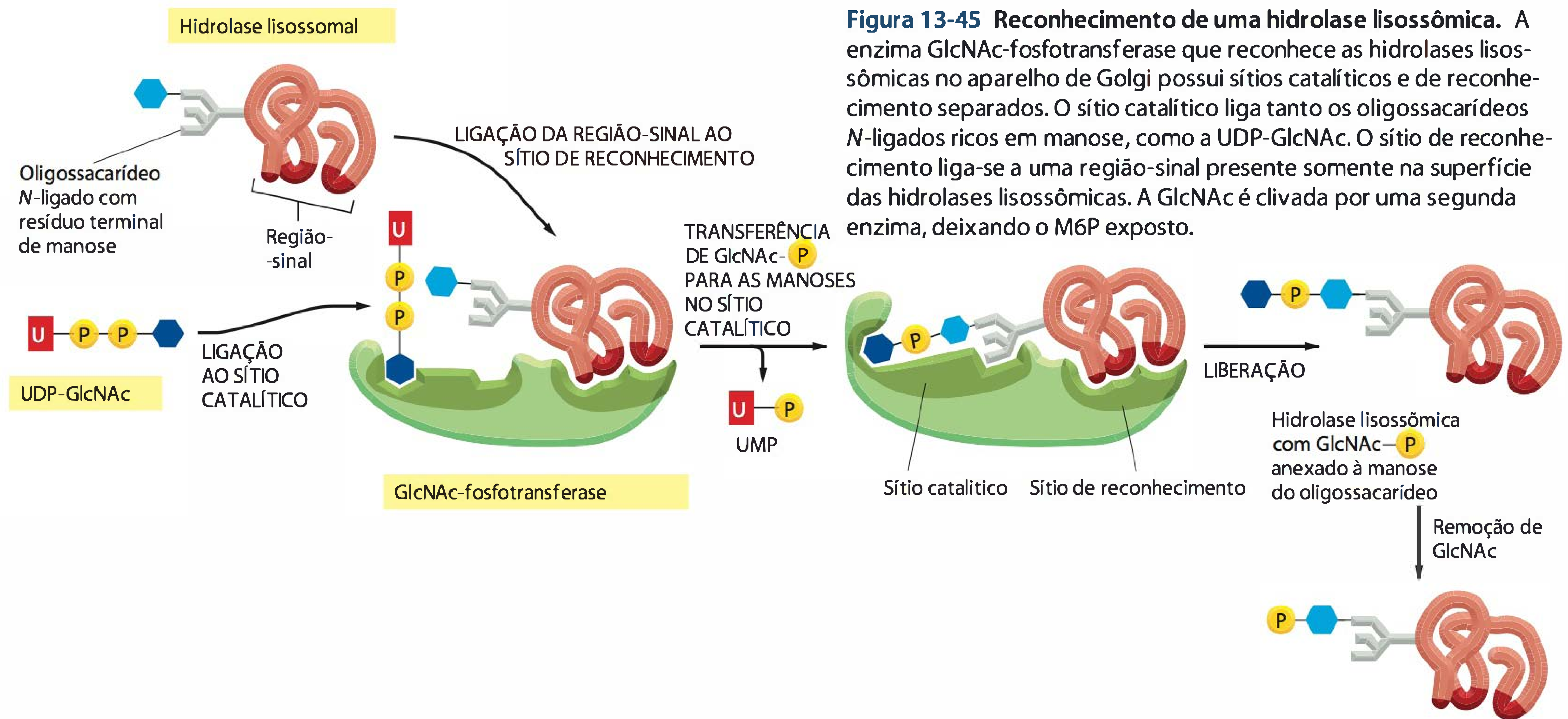


Figura 13-45 Reconhecimento de uma hidrolase lisossômica. A enzima GlcNAc-fosfotransferase que reconhece as hidrolases lisossômicas no aparelho de Golgi possui sítios catalíticos e de reconhecimento separados. O sítio catalítico liga tanto os oligossacarídeos *N*-ligados ricos em manose, como a UDP-GlcNAc. O sítio de reconhecimento liga-se a uma região-sinal presente somente na superfície das hidrolases lisossômicas. A GlcNAc é clivada por uma segunda enzima, deixando o M6P exposto.

A doença da inclusão celular é causada por um único defeito gênico e, como a maioria das deficiências enzimáticas genéticas, é recessiva – ou seja, é observável apenas em indivíduos em que ambas as cópias do gene são defectivas. Em pacientes portadores da doença da inclusão celular, todas as hidrolases ausentes nos lisossomos são encontradas no sangue. Como elas não são corretamente classificadas no aparelho de Golgi, as hidrolases são secretadas, em vez de serem transportadas para os lisossomos. O erro na classificação foi atribuído a uma GlcNAc-fosfotransferase defectiva ou ausente. Como as enzimas lisossômicas não são fosforiladas na rede *cis* de Golgi, elas não são segregadas pelos receptores de M6P para dentro das vesículas de transporte apropriadas na TGN. Em vez disso, elas são levadas à superfície celular e secretadas pela via-padrão.

Na doença da inclusão celular, os lisossomos de alguns tipos celulares, como os hepatócitos, contêm um complemento normal de enzimas lisossômicas, o que significa que há uma outra via para direcionar as hidrolases para os lisossomos que é utilizada por certos tipos celulares, porém não por outros. A natureza dessa via M6P-independente é desconhecida. De forma semelhante, as proteínas de membrana dos lisossomos são distribuídas a partir da TGN para os endossomos tardios por uma via M6P-independente em todas as células, e, portanto, elas comportam-se de forma normal na doença da inclusão celular. Estas proteínas de membrana saem da TGN em vesículas revestidas de clatrina distintas daquelas que transportam as hidrolases direcionadas por M6P e utilizam proteínas adaptadoras diferentes.

Não está claro por que as células necessitam de mais de uma via de distribuição para construir lisossomos, embora não seja surpreendente que diferentes mecanismos sejam responsáveis pelas proteínas lisossômicas solúveis e ligadas a membranas, especialmente porque as proteínas de membranas – diferentemente do receptor de M6P – são residentes nos lisossomos e, portanto, não necessitam ser devolvidas à TGN.

Alguns lisossomos devem sofrer exocitose

O direcionamento de materiais para os lisossomos não é, necessariamente, o fim da via. A *secreção lisossômica* do conteúdo não-digerido permite a todas as células eliminar os restos indigeríveis. Para a maioria das células, esta parece ser uma via de menor importância, utilizada somente quando as células estão estressadas. Alguns tipos celulares, entretanto, contêm lisossomos especializados que adquiriram a maquinaria necessária para a fusão com a membrana plasmática. Os *melanócitos* da pele, por exemplo, produzem e estocam pigmentos em seus lisossomos. Estes *melanossomos* que contêm pigmentos liberam os seus conteúdos no espaço extracelular por exocitose. O pigmento é, então, capturado por queratinócitos, levando à pigmentação normal da célula. Em algumas desordens genéticas, esse processo de transferência é bloqueado, levando a defeitos na exocitose melanossômica, determinando formas de hipopigmentação (albinismo).

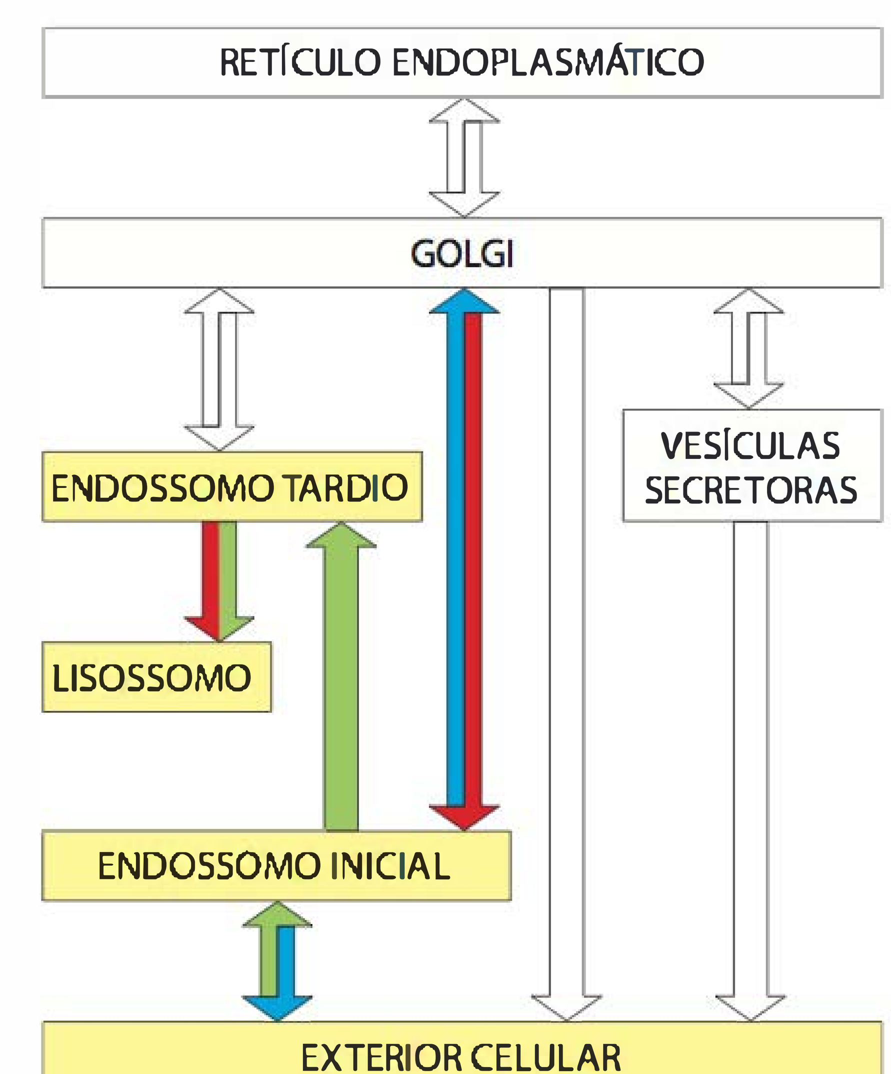
Resumo

Os lisossomos são especializados na digestão intracelular de macromoléculas. Eles contêm proteínas de membrana únicas e uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas que melhor operam em pH 5, o pH interno dos lisossomos. Este pH baixo é mantido por uma bomba de H^+ dirigida por ATP da membrana lisossômica. As proteínas lisossômicas recém-sintetizadas são transferidas para o lúmen do RE, transportadas através do aparelho de Golgi e, então, levadas da rede trans *de Golgi para os endossomos tardios por meio de vesículas de transporte revestidas de clatrina.*

As hidrolases lisossômicas contêm oligossacarídeos N-ligados que são covalentemente modificados de uma maneira única na rede cis *de Golgi, de forma que os resíduos de manose sejam fosforilados. Os grupos de manose-6-fosfato (M6P) são reconhecidos por uma proteína receptora de M6P na rede* trans *de Golgi, a qual segrega as hidrolases e auxilia a empacotá-las em vesículas de transporte em brotamento para entregar os seus conteúdos aos endossomos tardios (as organelas que irão maturar em lisossomos). Os receptores de M6P navegam de um lado para outro entre a rede* trans *de Golgi e esses endossomos. O baixo pH dos endossomos tardios dissocia as hidrolases lisossômicas desses receptores, tornando unidirecional o transporte delas. Um sistema de transporte à parte utiliza vesículas de transporte revestidas de clatrina para entregar proteínas de membrana residentes nos lisossomos provenientes da rede* trans *de Golgi.*

TRANSPORTE PARA O INTERIOR DA CÉLULA A PARTIR DA MEMBRANA PLASMÁTICA: ENDOCITOSE

As vias que levam para dentro da célula, da sua superfície para os lisossomos, iniciam com o processo de **endocitose**, pelo qual a célula capta macromoléculas, substâncias particuladas e, em casos especializados, até outras células. Nesse processo, o material a ser ingerido é progressivamente circundado por uma pequena porção da membrana plasmática, a qual primeiro invagina-se e, então, projeta-se para fora para formar uma *vesícula endocítica* que contém a substância ou a partícula ingerida. Dois principais tipos de endocitose são distinguíveis, com base no tamanho das vesículas endocíticas formadas. Na *fagocitose* ("o comer celular"), ocorre a ingestão de grandes partículas, como microrganismos ou células mortas, por meio de grandes vesículas chamadas de *fagossomos* (geralmente > 250 nm de diâmetro). Na *pinocitose* ("o beber celular"), ocorre a ingestão de fluidos e de solutos por meio de pequenas *vesículas pinocíticas* (com cerca de 100 nm de diâmetro). A maioria das células eucarióticas está continuamente ingerindo fluidos e solutos pela pinocitose; grandes partículas são mais eficientemente ingeridas por células fagocíticas especializadas.



As células fagocíticas especializadas podem ingerir grandes partículas

A **fagocitose** é uma forma especial de endocitose pela qual grandes partículas, como microrganismos e células mortas, são ingeridas por meio de grandes vesículas endocíticas chamadas de **fagossomos**. Nos protozoários, a fagocitose é uma forma de alimentação: grandes partículas capturadas por fagossomos terminam nos lisossomos, e os produtos dos processos digestivos subsequentes passam para o citosol para serem utilizados como alimento. Entretanto, poucas células em organismos multicelulares são capazes de ingerir eficientemente tais partículas grandes. No intestino dos animais, por exemplo, as partículas de alimento são quebradas extracelularmente, e os produtos da hidrólise são importados pelas células.

Para a maioria dos animais, a fagocitose é importante para outros propósitos, além da nutrição, sendo executada principalmente por outras células especializadas – chamadas de *fagócitos profissionais*. Nos mamíferos, duas classes de células brancas sanguíneas atuam como fagócitos profissionais – **macrófagos** e **neutrófilos**. Estas células desenvolvem-se a partir das células-tronco hematopoiéticas (discutidas no Capítulo 23) e defendem-nos contra a infecção pela ingestão de microrganismos invasores. Os macrófagos também realizam uma função importante na absorção de células senescentes e de células que morreram por apoptose (discutido no Capítulo 18). Em termos quantitativos, a última função é, de longe, a mais importante: os macrófagos fagocitam mais de 10^{11} células vermelhas senescentes em cada pessoa todos os dias, por exemplo.

Enquanto as vesículas endocíticas envolvidas na pinocitose são pequenas e uniformes, os fagossomos possuem diâmetros que são determinados pelo tamanho da partícula a ser ingerida e podem ser quase tão grandes quanto a própria célula fagocítica (**Figura 13-46**).

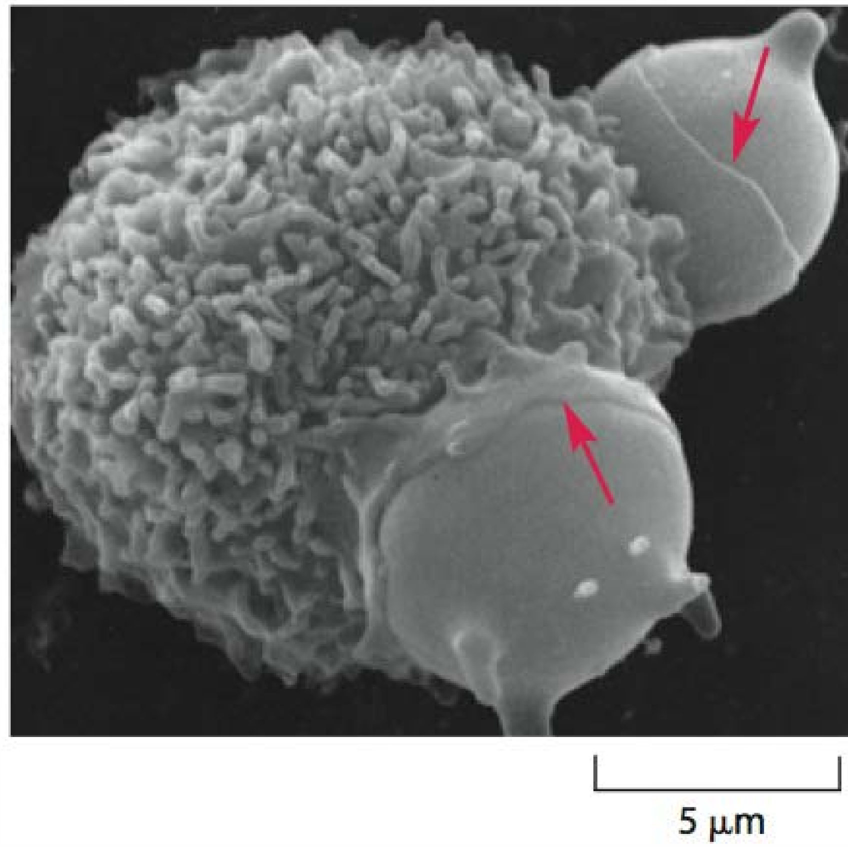
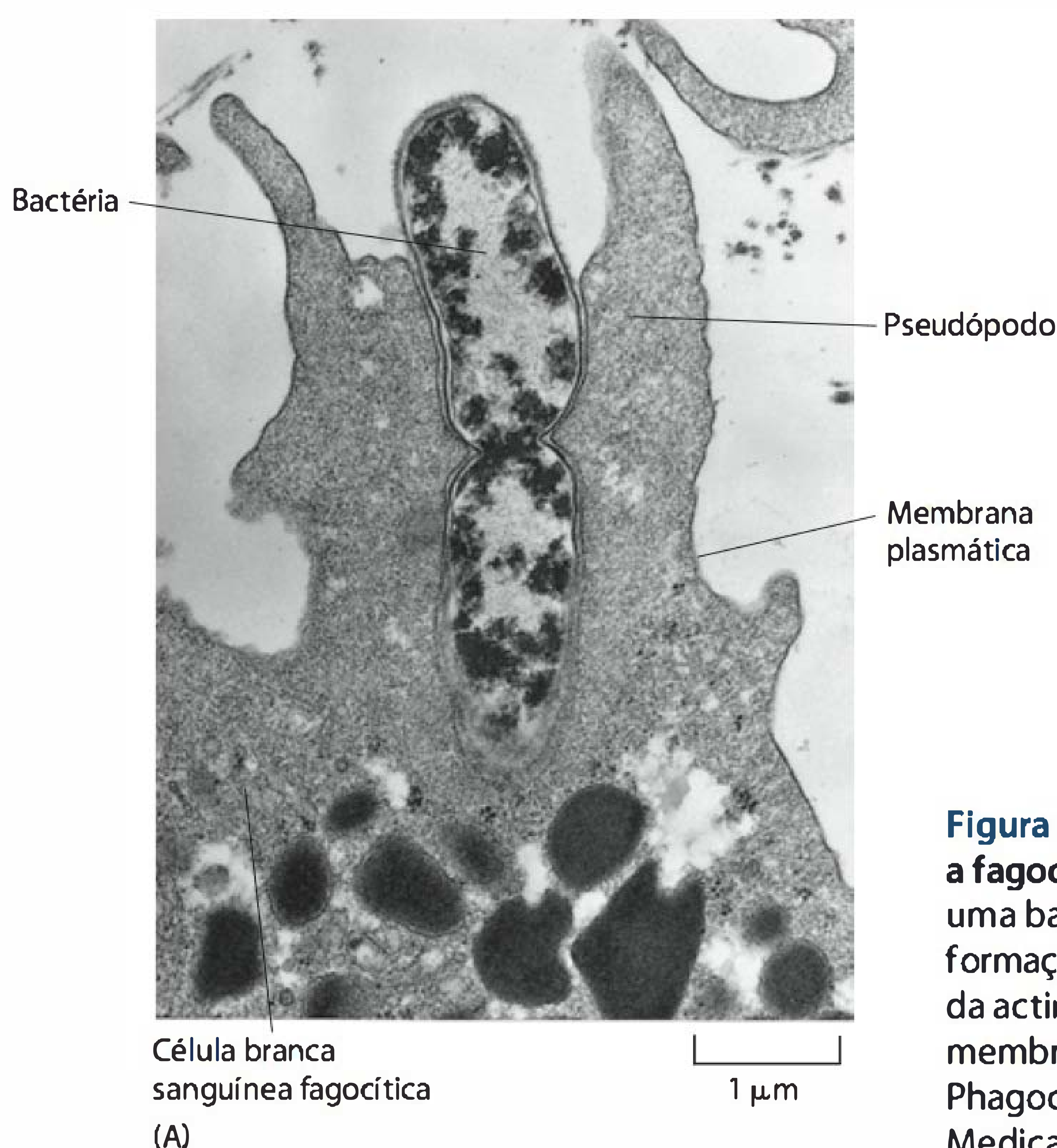


Figura 13-46 Fagocitose por um macrófago. Uma micrografia eletrônica de varredura de um macrófago de camundongo fagocitando duas células vermelhas sanguíneas quimicamente alteradas. As *setas vermelhas* apontam para as bordas de finos processos (pseudópodos) do macrófago que estão estendendo-se como colares para engolfar as células vermelhas. (Cortesia de Jean Paul Revel.)

Os fagossomos fundem-se com os lisossomos dentro da célula, e o material ingerido é, então, degradado. Qualquer substância indigerível permanecerá nos lisossomos, formando *corpos residuais*, os quais podem ser excretados das células por exocitose, como discutido anteriormente. Alguns dos componentes da membrana plasmática internalizados nunca alcançam o lisossomo, pois são impedidos de entrar no fagossomo por vesículas de transporte que os devolvem à membrana plasmática.

Para serem fagocitadas, as partículas devem, primeiramente, ser ligadas à superfície do fagócito. Entretanto, nem todas as partículas que se ligam serão ingeridas. Os fagócitos têm vários tipos de receptores de superfície especializados que estão funcionalmente ligados à maquinaria fagocítica da célula. A fagocitose é um processo desencadeado, isto é, requer a ativação de receptores capazes de transmitir sinais para o interior celular e iniciar a resposta. Em contraste, a pinocitose é um processo constitutivo. Este ocorre continuamente, indiferente às necessidades da célula. Os desencadeadores melhor caracterizados são os anticorpos, os quais nos protegem ao ligarem-se à superfície de microrganismos infecciosos para formar um revestimento no qual a região da cauda de cada anticorpo, chamada de região Fc, fica exposta para o exterior (discutido no Capítulo 25). Esse revestimento de anticorpos é reconhecido por *receptores de Fc* específicos da superfície de macrófagos e de neutrófilos, cujas ligações induzem a célula fagocítica a estender pseudópodos que engolfam a partícula e que se fundem nas extremidades para formar um fagossomo (**Figura 13-47**A). A polimerização localizada da actina, iniciada por GTPases da família Rho e seus ativadores Rho-GEFs (discutido nos Capítulos 15 e 16), forma seus pseudópodos. Uma Rho-GTPase ativa aciona a atividade de cinase das PI-cinases locais, e a polimerização de actina inicial ocorre em resposta a um acúmulo de PI(4,5)P_2 na membrana (ver Figura 13-11). Para lacrar o fagossomo e completar seu engolfamento, a actina é despolimerizada quando sua base como PI(4,5)P_2 é submetida a uma PI 3-cinase, que a converte para PI(3,4,5)P_3, o qual é requerido para o fechamento do fagossomo e pode também contribuir para remodelar a rede de actina, auxiliando a direcionar a invaginação do fagossomo em formação (Figura 13-47B). Dessa forma, a geração e o consumo ordenados de fosfoinositídeos específicos guia as etapas sequenciais na formação dos fagossomos.

Muitas outras classes de receptores capazes de promover a fagocitose foram caracterizadas. Algumas reconhecem os componentes do *complemento* que colaboram com os anticorpos em direcionar os micróbios para a destruição (discutido no Capítulo 24). Outras reconhecem diretamente os oligossacarídeos da superfície de certos microrganismos. Outras, ainda, reconhecem as células que morreram por apoptose. As células apoptóticas perdem a distribuição assimétrica de fosfolipídeos nas suas membranas plasmáticas. Como consequência, a fosfatidilserina carregada negativamente, a qual normalmente é confinada à lâmina citosólica da bicamada lipídica, passa a ser exposta no lado externo da célula, onde ajuda a desencadear a fagocitose da célula morta.



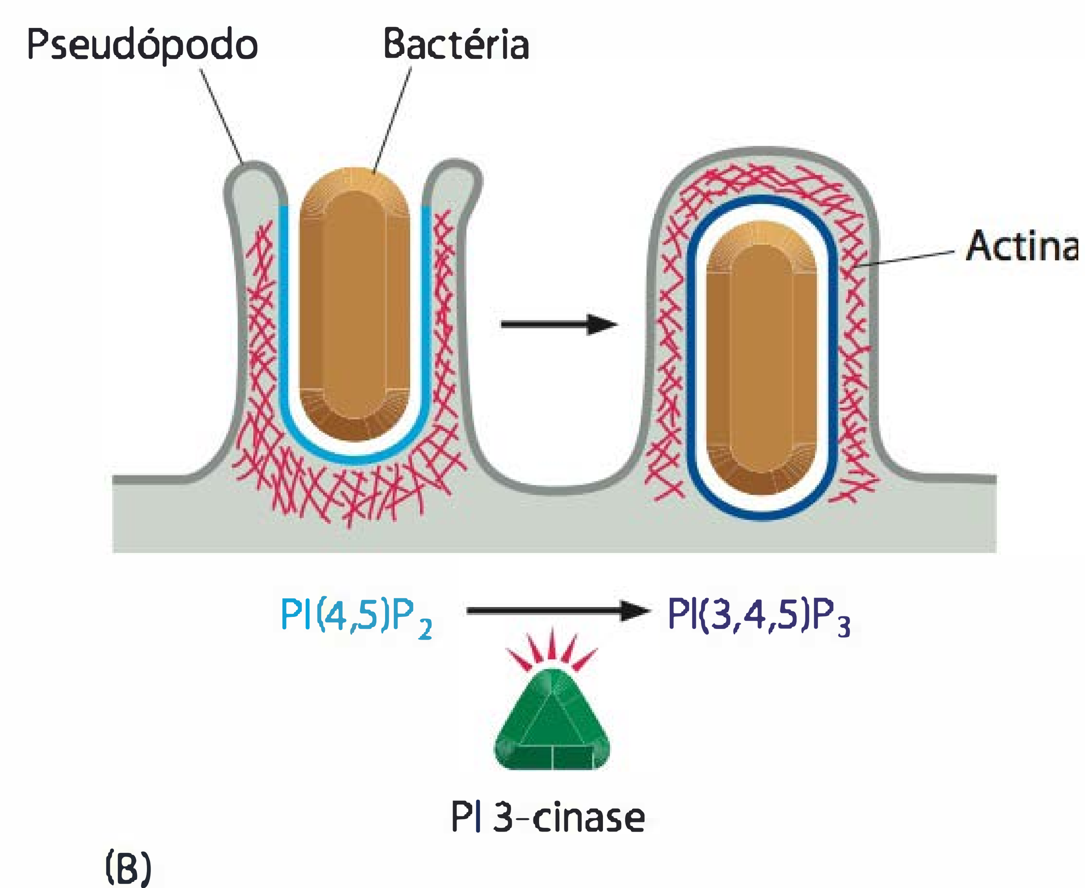


Figura 13-47 Neutrófilo remodelando a membrana plasmática durante a fagocitose. (A) Uma micrografia eletrônica de um neutrófilo fagocitando uma bactéria em processo de divisão. (B) A extensão do pseudópodo e a formação do fagossomo são guiadas pela polimerização e reorganização da actina, a qual responde ao acúmulo de fosfoinositídeos específicos na membrana do fagossomo em formação. (A, Cortesia de Dorothy F. Bainton, Phagocytic Mechanisms in Health and Disease. New York: Intercontinental Medical Book Corporation, 1971.)

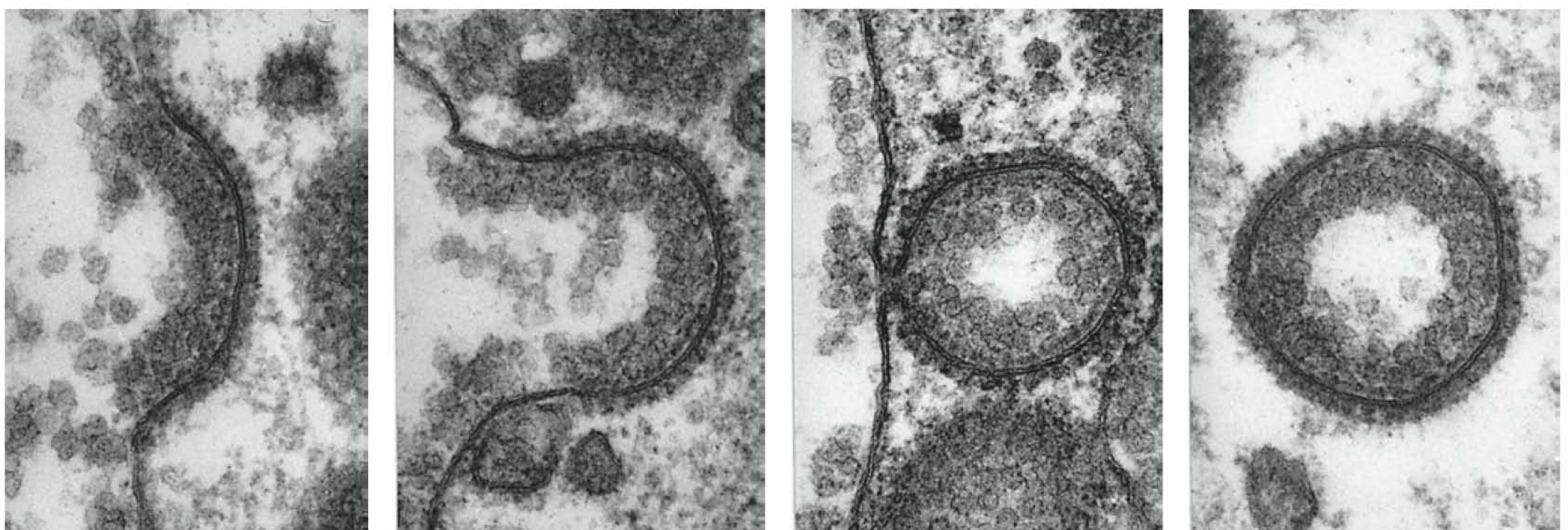
Nitidamente, os macrófagos também irão fagocitar várias partículas inanimadas – como vidro, esferas de látex ou fibras de asbesto – e não fagocitarão células animais vivas. Parece que as células animais vivas exibem sinais do tipo "não me coma" na forma de proteínas de superfície celular que ligam receptores de inibição da superfície dos macrófagos. Os receptores de inibição recrutam tirosina-fosfatases que antagonizam os eventos intracelulares de sinalização requeridos para iniciar a fagocitose, inibindo localmente o processo fagocítico. Assim, a fagocitose, como vários outros processos celulares, depende de um equilíbrio entre os sinais positivos que ativam o processo e os sinais negativos que o inibem. Acredita-se que as células apoptóticas possam tanto ganhar sinais do tipo "coma-me" (como a fosfatidilserina exposta extracelularmente), como perder seus sinais "não me coma", levando rapidamente a sua fagocitose pelos macrófagos.

As vesículas pinocíticas formam-se a partir de fossas revestidas da membrana plasmática

Potencialmente, todas as células eucarióticas ingerem continuamente pequenos pedaços das suas membranas plasmáticas na forma de minúsculas vesículas pinocíticas (endocíticas), as quais retornam mais tarde à superfície celular. A taxa a que a membrana plasmática é internalizada neste processo de **pinocitose** varia entre os tipos celulares, mas em geral é surpreendentemente alta. Um macrófago, por exemplo, ingere 25% do seu próprio volume em fluidos, a cada hora. Isso significa que ele deve ingerir 3% da sua membrana plasmática a cada minuto, ou 100% em cerca de meia hora. Os fibroblastos endocitam a uma razão mais baixa (1% por minuto), enquanto algumas amebas ingerem as suas membranas plasmáticas ainda mais rapidamente. Uma vez que a área superficial e o volume celulares permanecem imutáveis durante esse processo, está claro que a mesma quantidade de membrana que está sendo removida pela endocitose está sendo adicionada à superfície celular pelo processo contrário de *exocitose*. Nesse sentido, a endocitose e a exocitose são processos interligados, que constituem o *ciclo endocítico-exocítico*. O acoplamento entre exocitose e endocitose é particularmente preciso em estruturas especializadas caracterizadas por uma alta rotatividade da membrana, como na sinapse neuronal.

A parte endocítica do ciclo, de modo geral, inicia com as **fossas revestidas de clatrina**. Essas regiões especializadas normalmente ocupam cerca de 2% da área total da membrana plasmática. O tempo de vida de uma fossa revestida de clatrina é curto: dentro de um minuto ou pouco mais após ter sido formada, ela invagina-se na célula e destaca-se para formar uma vesícula revestida de clatrina (**Figura 13-48**). Foi estimado que cerca de 2.500 vesículas revestidas de clatrina deixam a membrana plasmática de um fibroblasto cultivado a cada minuto. As vesículas revestidas são ainda mais transitórias do que as fossas revestidas: dentro de segundos desde que foram formadas, elas perdem os seus revestimentos e são capazes de fundirem-se com endossomos iniciais. Uma vez que o fluido extracelular é aprisionado nas fossas revestidas de clatrina, conforme elas invaginam-se para formar as vesículas revestidas, qualquer substância dissolvida no fluido extracelular é internalizada – um processo denominado *endocitose de fase fluida*.

Figura 13-48 Formação de vesículas revestidas de clatrina a partir da membrana plasmática. Estas micrografias eletrônicas ilustram a sequência provável de eventos da formação de uma vesícula revestida de clatrina a partir de uma fossa revestida. As fossas e as vesículas revestidas de clatrina representadas são maiores do que aquelas observáveis em células de tamanhos normais. Elas estão envolvidas na captação de partículas lipoproteicas para dentro de um oócito de galinha muito grande, para formar a gema. As partículas lipoproteicas ligadas aos seus receptores fixados à membrana podem ser vistas como uma camada densa e embaralhada na superfície extracelular da membrana plasmática – que representa a superfície interna da vesícula. (Cortesia de M. M. Perry e A. B. Gilbert, *J. Cell Sci*. 39:257-272, 1979. Com permissão de The Company of Biologists.)



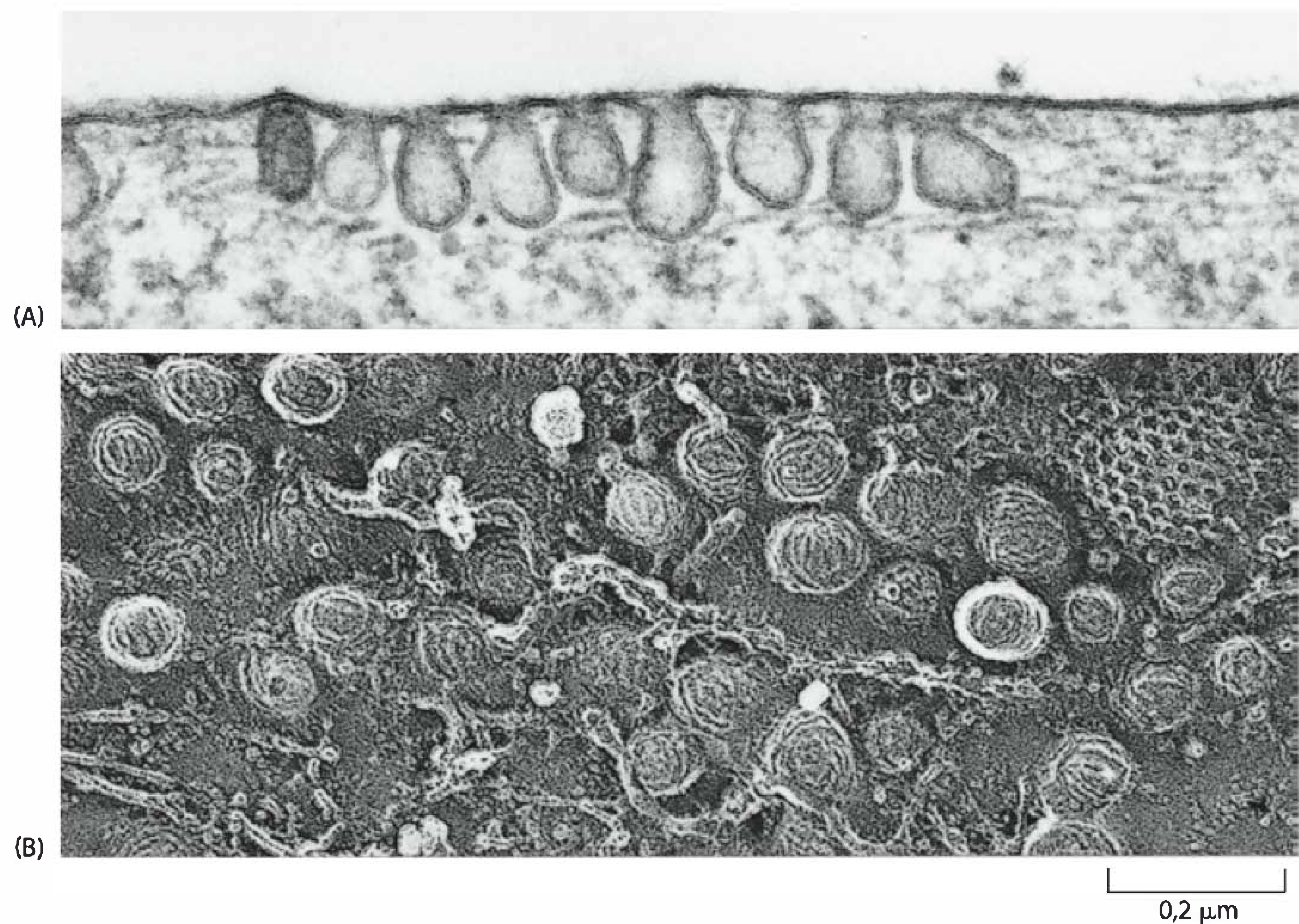


Figura 13-49 Cavéolos na membrana plasmática de um fibroblasto. (A) Esta micrografia eletrônica mostra uma membrana plasmática com uma densidade muito alta de cavéolos. Observe que nenhum revestimento citosólico é visível. (B) A imagem de microscopia eletrônica por congelamento rápido em corante ácido demonstra a textura característica de "couve-flor" da face citosólica da membrana caveolar. Acredita-se que a textura regular seja o resultado da agregação de caveolinas na membrana. Uma fossa revestida de clatrina também está visível na região superior, à direita. (Cortesia de R. G. W. Anderson, de K. G. Rothberg et al., *Cell* 68:673-682, 1992. Com permissão de Elsevier.)

Nem todas as vesículas pinocíticas são revestidas de clatrina

Além das fossas e das vesículas revestidas de clatrina, há outros mecanismos menos conhecidos pelos quais as células podem formar vesículas pinocíticas. Uma dessas maneiras inicia nos **cavéolos** (*caveolae*, do latim para "pequenas cavidades"), originalmente reconhecidos pelas suas habilidades em transportar moléculas através das células endoteliais, as quais formam a camada interna dos vasos sanguíneos. Os cavéolos estão presentes na membrana plasmática da maioria dos tipos celulares e, em alguns desses tipos, eles aparecem em microscopia eletrônica como frascos profundamente invaginados (**Figura 13-49**). Acredita-se que eles se formem a partir de microdomínios de membrana, ou balsas lipídicas (*lipid rafts*), regiões da membrana plasmática especialmente ricas em colesterol, em glicoesfingolipídeos e em proteínas de membrana ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*) (ver Figura 10-14). As principais proteínas estruturais dos cavéolos são as **caveolinas**, as quais compõem uma família de proteínas integrais de membrana incomuns, as quais inserem, cada uma, uma alça hidrofóbica no lado citosólico da membrana, mas que não se estende através da membrana.

Em contraste a vesículas revestidas de clatrina, COPI ou COPII, acredita-se que os cavéolos invaginem-se e coletem proteínas-carga devido à composição lipídica da membrana caveolar e não à montagem de um revestimento proteico citosólico. As caveolinas podem estabilizar esses domínios de plataformas, dentro dos quais determinadas proteínas de membrana plasmática se dividem. Os cavéolos destacam-se da membrana plasmática utilizando dinamina e podem entregar os seus conteúdos para compartimentos semelhantes a endossomos (chamados de *caveossomos*) ou para a membrana plasmática do lado oposto em uma célula polarizada (em um processo chamado de *transcitose*, o qual será discutido mais adiante). Como as caveolinas são proteínas integrais de membrana, elas não se dissociam da vesícula após a endocitose; ao invés disso, são entregues aos compartimentos-alvo, onde são então mantidas como domínios discretos de membrana. Alguns vírus animais, como o SV40 e o papiloma vírus (causador das verrugas) também entram nas células em vesículas derivadas de cavéolos. Esses vírus são primeiramente entregues a um compartimento semelhante ao endossomo e são, então, movidos de lá em vesículas de transporte especializadas até o RE. O genoma viral sai do RE através da membrana e vai para o citosol, de onde ele é importado para o núcleo para iniciar o ciclo infeccioso.

Vesículas endocíticas também podem brotar a partir de domínios-balsas livres de caveolina na membrana plasmática e liberar sua carga aos caveossomos. As moléculas que entram na célula através dos caveossomos evitam os endossomos e lisossomos, e por isso estão protegidas da exposição a pHs baixos e hidrolases lisossomais; não se sabe como elas se movem dos caveossomos para outros destinos na célula.

As células utilizam endocitose mediada por receptores para importar macromoléculas extracelulares selecionadas

Na maioria das células animais, as fossas e as vesículas revestidas de clatrina fornecem uma via eficiente de captação de macromoléculas específicas do fluido extracelular. Neste processo, chamado de **endocitose mediada por receptores**, as macromoléculas ligam-se às proteínas receptoras transmembrana complementares, acumulam-se em fossas revestidas e, então, entram na célula como complexos receptor-macromolécula em vesículas revestidas de clatrina (ver Figura 13-48). Como os ligantes são seletivamente capturados pelos receptores, a endocitose mediada por receptores fornece um mecanismo seletivo de concentração que aumenta a eficiência de internalização de determinados ligantes em mais de cem vezes. Assim, mesmo componentes raros do fluido extracelular podem ser especificamente captados em grandes quantidades, sem um grande volume correspondente de fluido extracelular. Um exemplo bastante conhecido e fisiologicamente importante é o processo pelo qual as células de mamíferos capturam colesterol.

Muitas células animais capturam o colesterol por meio da endocitose mediada por receptores e, dessa maneira, conseguem a maior parte do colesterol necessário para produzir novas membranas. Caso a captação seja bloqueada, o colesterol irá acumular-se no sangue e poderá contribuir para a formação das *placas ateroscleróticas* nas paredes dos vasos sanguíneos (artérias), de depósitos de lipídeos e de tecidos fibrosos, que podem causar derrames e ataques cardíacos pelo bloqueio do fluxo sanguíneo. De fato, foi pelo estudo dos humanos com uma forte predisposição genética à *aterosclerose* que o mecanismo da endocitose mediada por receptores foi pela primeira vez revelado de forma clara.

A maior parte do colesterol é transportada no sangue como colesteril-ésteres, na forma de partículas lipoproteicas conhecidas como **lipoproteínas de baixa densidade** (**LDLs**, *low-density lipoproteins*) (**Figura 13-50**). Quando uma célula necessita de colesterol para a síntese de membranas, ela produz proteínas receptoras transmembrana para LDL e as insere na membrana plasmática. Uma vez na membrana plasmática, os *receptores de LDL* difundem-se até que se associem a fossas revestidas de clatrina em processo de formação (**Figura 13-51**A). Uma vez que as fossas revestidas constantemente destacam-se para formar vesículas revestidas, quaisquer partículas de LDL ligadas aos receptores de LDL das fossas revestidas serão rapidamente internalizadas em vesículas revestidas. Após perderem seus revestimentos de clatrina, as vesículas entregam seus conteúdos para os endossomos iniciais, os quais estão localizados próximos à periferia da célula. Quando as LDLs e seus receptores encontrarem o pH baixo dos endossomos, elas serão liberadas dos seus receptores e entregues aos lisossomos por meio dos endossomos tardios. Nos lisossomos, os colesteril-ésteres das partículas de LDL serão hidrolisados em colesterol livre, o qual estará, agora, disponível na célula para a síntese de novas membranas. Se uma quantidade muito grande de colesterol livre acumular-se internamente, a célula silenciará tanto a sua própria produção de colesterol como a síntese das proteínas receptoras de LDL, de forma a cessar a fabricação e a importação de colesterol.

Esta via regulada para a captação de colesterol é interrompida em indivíduos que herdam genes defectivos codificadores das proteínas receptoras de LDL. Os altos níveis de co-

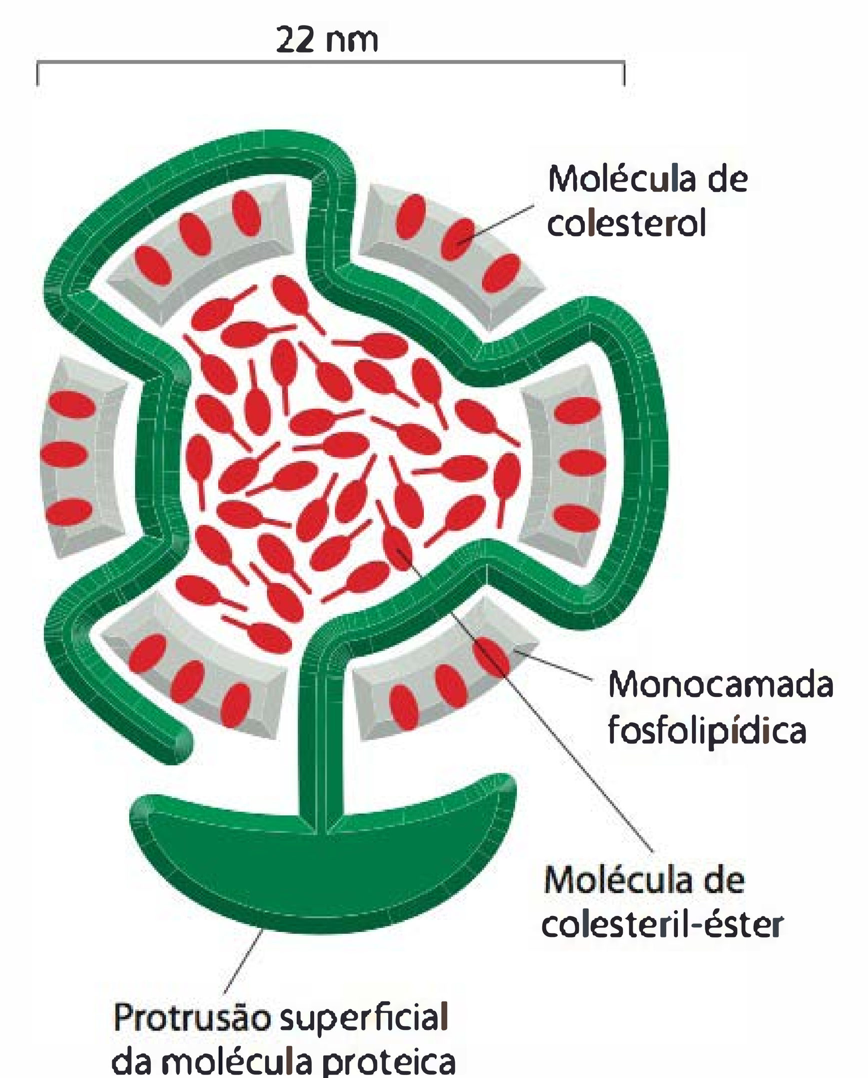


Figura 13-50 Partícula de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Cada partícula esférica tem uma massa de 3 × 10^6 dáltons. Ela contém um núcleo de cerca de 1.500 moléculas de colesterol esterificadas a ácidos graxos de longas cadeias, circundado por uma monocamada lipídica composta por cerca de 800 fosfolipídeos e 500 moléculas não-esterificadas de colesterol. Uma única molécula proteica de 500 mil dáltons organiza a partícula e medeia a ligação específica de LDL às proteínas receptoras de superfície.

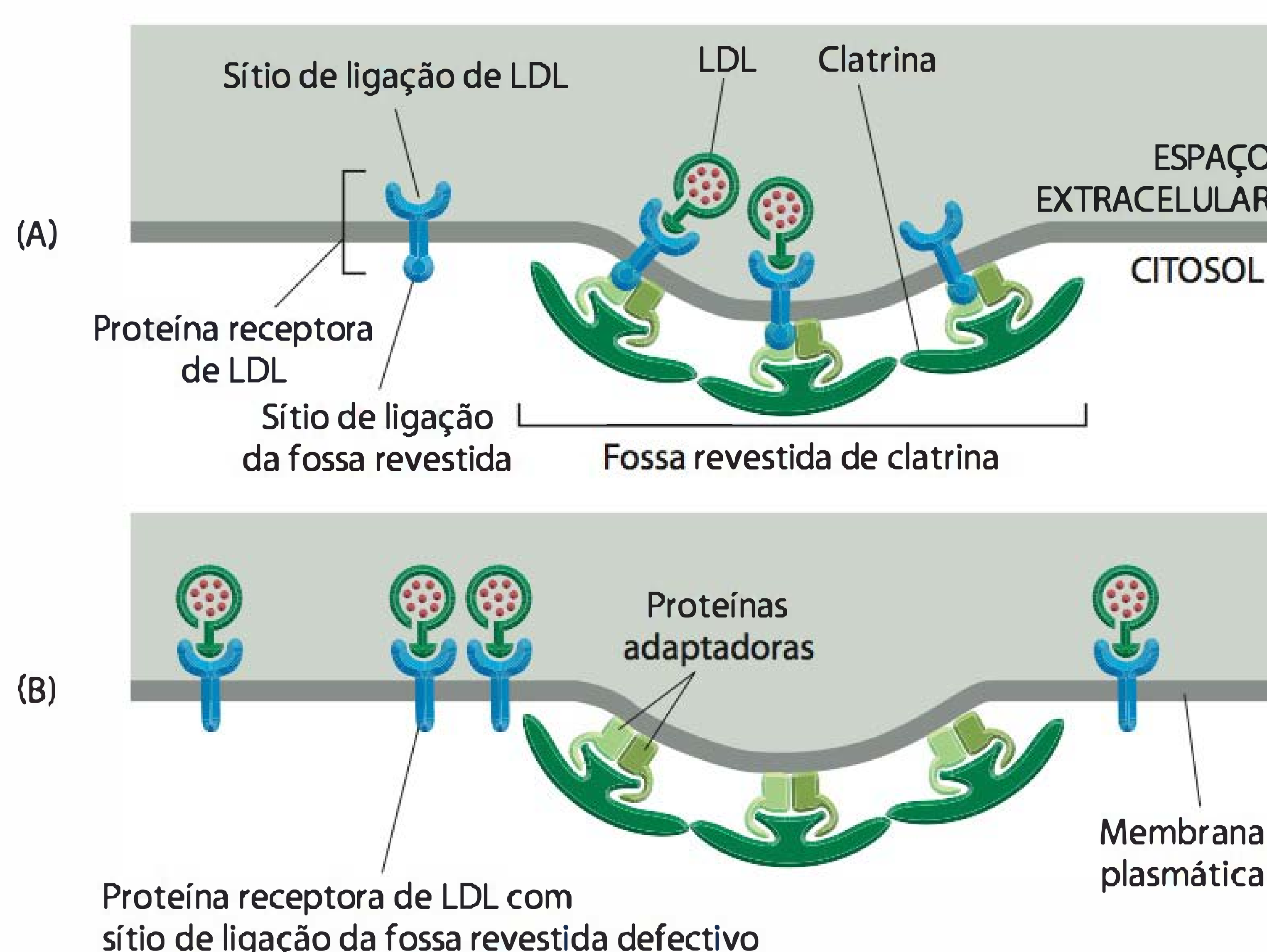


Figura 13-51 Receptores de LDL normal e mutante. (A) Proteínas receptoras de LDL ligando uma fossa revestida na membrana plasmática de uma célula normal. O receptor humano de LDL é uma glicoproteína transmembrana de passagem única pela membrana composta de cerca de 840 aminoácidos, dos quais apenas 50 estão do lado citoplasmático da membrana. (B) Uma célula mutante na qual as proteínas receptoras de LDL são anormais e perderam o sítio no domínio citoplasmático que as capacita a ligarem-se às adaptinas das fossas revestidas de clatrina. Tais células ligam LDL, mas não podem ingeri-la. Na maioria das populações humanas, 1 em cada 500 indivíduos herda um gene defectivo de receptor de LDL e, como resultado, apresenta um risco aumentado de ataque cardíaco causado por aterosclerose.

lesterol sanguíneo resultantes predispõem estes indivíduos a desenvolverem aterosclerose prematuramente, e muitos morrem ainda jovens de ataques cardíacos provocados por uma doença da artéria coronária, se não forem tratados com fármacos que baixem o nível de colesterol no sangue. Em alguns casos, o receptor está totalmente ausente. Em outros, os receptores são defectivos no sítio extracelular de ligação à LDL ou no sítio intracelular de ligação que anexa o receptor ao revestimento de clatrina das fossas revestidas (ver Figura 13-51B). No último caso, números normais de proteínas receptoras de ligação à LDL estão presentes, mas elas falham em localizar-se nas regiões da membrana plasmática revestidas de clatrina. Embora a LDL ligue-se à superfície das células mutantes, ela não é internalizada, o que demonstra diretamente a importância das fossas revestidas de clatrina na endocitose de colesterol mediada por receptores.

Sabe-se que mais de 25 receptores diferentes participam na endocitose mediada por receptores de diversos tipos de moléculas. Todos eles, aparentemente, utilizam vias de internalização dependentes de clatrina e são guiados para dentro das fossas revestidas de clatrina pelos sinais em suas caudas citoplasmáticas que se ligam às proteínas adaptadoras no revestimento de clatrina. Muitos desses receptores, assim como o receptor de LDL, entram nas fossas revestidas indiferentemente de estarem ou não ligados aos seus ligantes específicos. Outros entram, de preferência, quando ligados a um ligante específico, sugerindo que uma mudança conformacional induzida pelo ligante é necessária para que eles ativem a sequência-sinal que os guia para dentro das fossas. Uma vez que a maioria das proteínas da membrana plasmática não é capaz de se concentrar nas fossas revestidas de clatrina, as fossas devem funcionar como filtros moleculares, preferindo coletar certas membranas de plasma (receptoras) em vez de outras.

Estudos de microscopia eletrônica de células cultivadas, expostas simultaneamente a diferentes ligantes marcados, demonstram que muitos tipos de receptores podem agrupar-se na mesma fossa revestida, enquanto alguns outros receptores agrupam-se em fossas revestidas de clatrina diferentes. A membrana plasmática de uma fossa revestida de clatrina pode acomodar, provavelmente, até 1.000 receptores variados. Embora todos os complexos receptor-ligante que utilizam essa via endocítica sejam, aparentemente, entregues ao mesmo compartimento endossômico, os destinos subsequentes das moléculas endocitadas variam, como discutiremos a seguir.

Os materiais endocitados que não são retirados dos endossomos terminam nos lisossomos

Os compartimentos endossômicos de uma célula podem ser complexos. Eles podem se tornar visíveis à microscopia eletrônica pela adição de moléculas traçadoras facilmente detectáveis, tais como a enzima peroxidases, ao meio extracelular. As células são deixadas por vários intervalos de tempo para que captem as moléculas por endocitose. A distribuição das moléculas após a sua captura revela os compartimentos endossômicos como um conjunto de tubos heterogêneos definidos por membranas que se estendem da periferia das células para a região perinuclear, onde frequentemente estão próximos ao aparelho de Golgi. Dois conjuntos sequenciais de endossomos podem ser facilmente distinguidos em tais experimentos de marcação. A molécula traçadora aparece dentro de um minuto ou pouco mais nos **endossomos iniciais**, imediatamente abaixo da membrana plasmática. Após 5 a 15 minutos, ela move-se para os **endossomos tardios**, próximos ao aparelho de Golgi e ao núcleo. Os endossomos inicial e tardio diferenciam-se em suas composições proteicas. A transição dos endossomos iniciais para os tardios é acompanhada pela liberação de Rab5 e pela ligação de Rab7, por exemplo.

Como mencionado anteriormente, uma H^+ ATPase vacuolar da membrana endossômica bombeia H^+ para o lúmen a partir do citosol, mantendo o lúmen dos compartimentos endossômicos ácido (pH ~6). Em geral, os endossomos tardios são mais ácidos do que os endossomos iniciais. Este ambiente ácido tem um papel crucial na função dessas organelas.

Já vimos que os materiais endocitados que alcançam os endossomos tardios se misturam com as hidrolases ácidas recém-sintetizadas e, por fim, são degradados nos lisossomos. Muitas moléculas, entretanto, são especificamente desviadas desta jornada rumo à destruição. Elas são, ao contrário, recicladas dos endossomos iniciais de volta para a membrana plasmática por meio das vesículas de transporte. Somente as moléculas que não são retiradas dos endossomos dessa maneira são entregues aos lisossomos para degradação. Em-

bora uma moderada digestão possa iniciar nos endossomos iniciais, muitas hidrolases são sintetizadas e lá entregues como pró-enzimas, chamadas de *zimógenas*, as quais contêm domínios inibitórios extras na região N-terminal, o que mantém a hidrolase inativa até que esses domínios sejam removidos proteoliticamente. As hidrolases são ativadas quando os endossomos tardios tornam-se endolisossomos, como resultado da fusão de endossomos preexistentes, os quais contêm um suplemento abundante de hidrolases ativas, que digerem os domínios inibitórios das enzimas recém-sintetizadas. Além disso, o pH dos endossomos iniciais não é baixo o suficiente para ativar as hidrolases lisossomais de maneira ótima. Dessa forma, as células podem recuperar a maioria das proteínas de membrana dos endossomos iniciais e reciclá-las de volta à membrana plasmática.

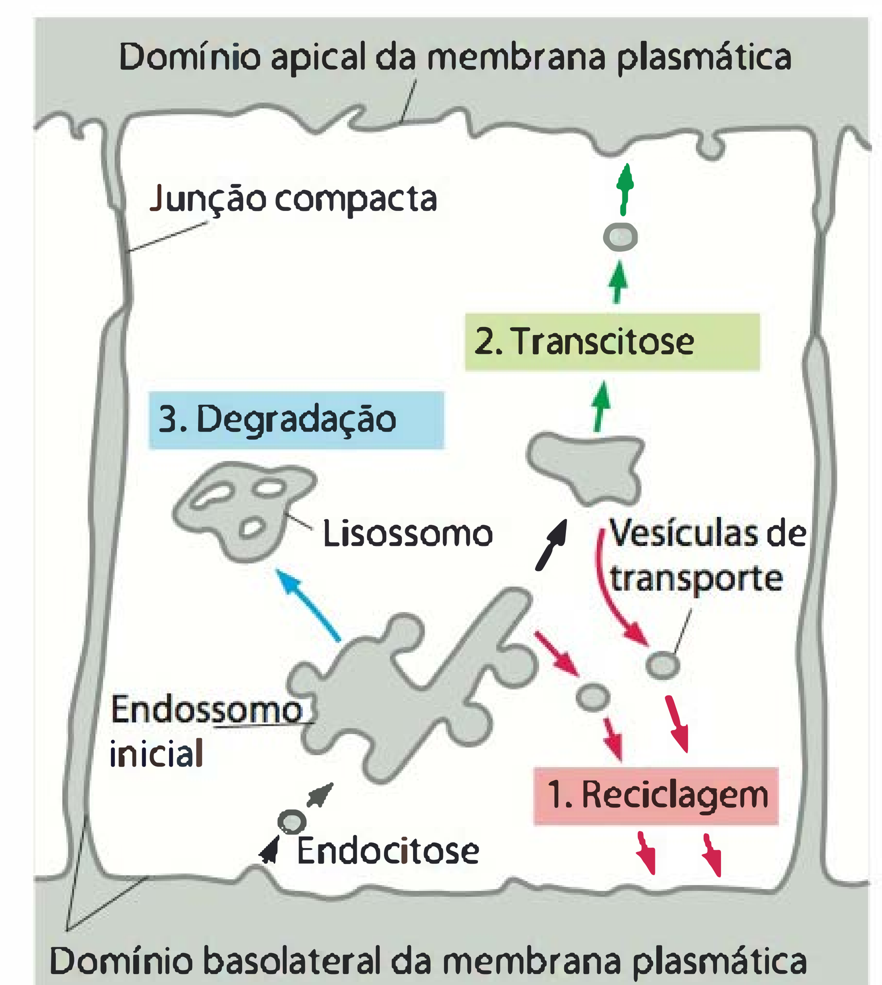


Figura 13-52 Destinos possíveis das proteínas receptoras transmembrana que foram endocitadas. Três vias a partir do compartimento endossômico em uma célula epitelial estão representadas. Os receptores recuperados são devolvidos (1) para o mesmo domínio da membrana plasmática de onde vieram (*reciclagem*) ou (2) para um domínio diferente da membrana plasmática (*transcitose*). (3) Os receptores que não são especificamente recuperados dos endossomos seguem a via do compartimento endossômico para os lisossomos, onde são degradados (*degradação*). A formação de agregados oligoméricos na membrana endossômica pode ser um dos sinais que guiam os receptores para a via de degradação. Se o ligante que foi endocitado com o seu receptor mantiver-se ligado ao receptor no ambiente ácido do endossomo, ele seguirá a mesma via do seu receptor; caso contrário, ele é entregue aos lisossomos.

As proteínas específicas são removidas dos endossomos iniciais e devolvidas para a membrana plasmática

Os endossomos iniciais formam um compartimento que atua como a principal estação de distribuição da via endocítica, assim como as redes *cis* e *trans* de Golgi executam esta função na via biossintética-secretora. No ambiente levemente ácido dos endossomos iniciais, muitas proteínas receptoras internalizadas modificam as suas conformações e liberam os seus ligantes, como já discutido para os receptores de M6P. Aqueles ligantes endocitados que se dissociam dos seus receptores nos endossomos iniciais são comumente condenados à destruição nos lisossomos, juntamente com outros conteúdos solúveis dos endossomos. Alguns outros ligantes endocitados, entretanto, permanecem ligados aos seus receptores e, assim, compartilham o destino dos receptores.

O destino das proteínas receptoras – e de quaisquer ligantes que permaneçam a elas ligados – varia conforme o tipo específico de receptor. (1) A maioria dos receptores é reciclada e devolvida para o mesmo domínio da membrana plasmática de onde veio; (2) alguns receptores seguem para um domínio diferente da membrana plasmática, mediando, assim, um processo chamado de *transcitose*; e (3) alguns progridem para os lisossomos, onde são degradados (**Figura 13-52**).

O receptor de LDL segue pela primeira via. Ele se dissocia da sua LDL ligante no endossomo inicial e é reciclado para a membrana plasmática para reutilização, deixando a LDL descartada para ser carregada para os lisossomos (**Figura 13-53**). As vesículas de reciclagem brotam a partir de túbulos estreitos e longos que se estendem dos endossomos iniciais. É como se a geometria desses túbulos ajudasse no processo de distribuição: como os túbulos

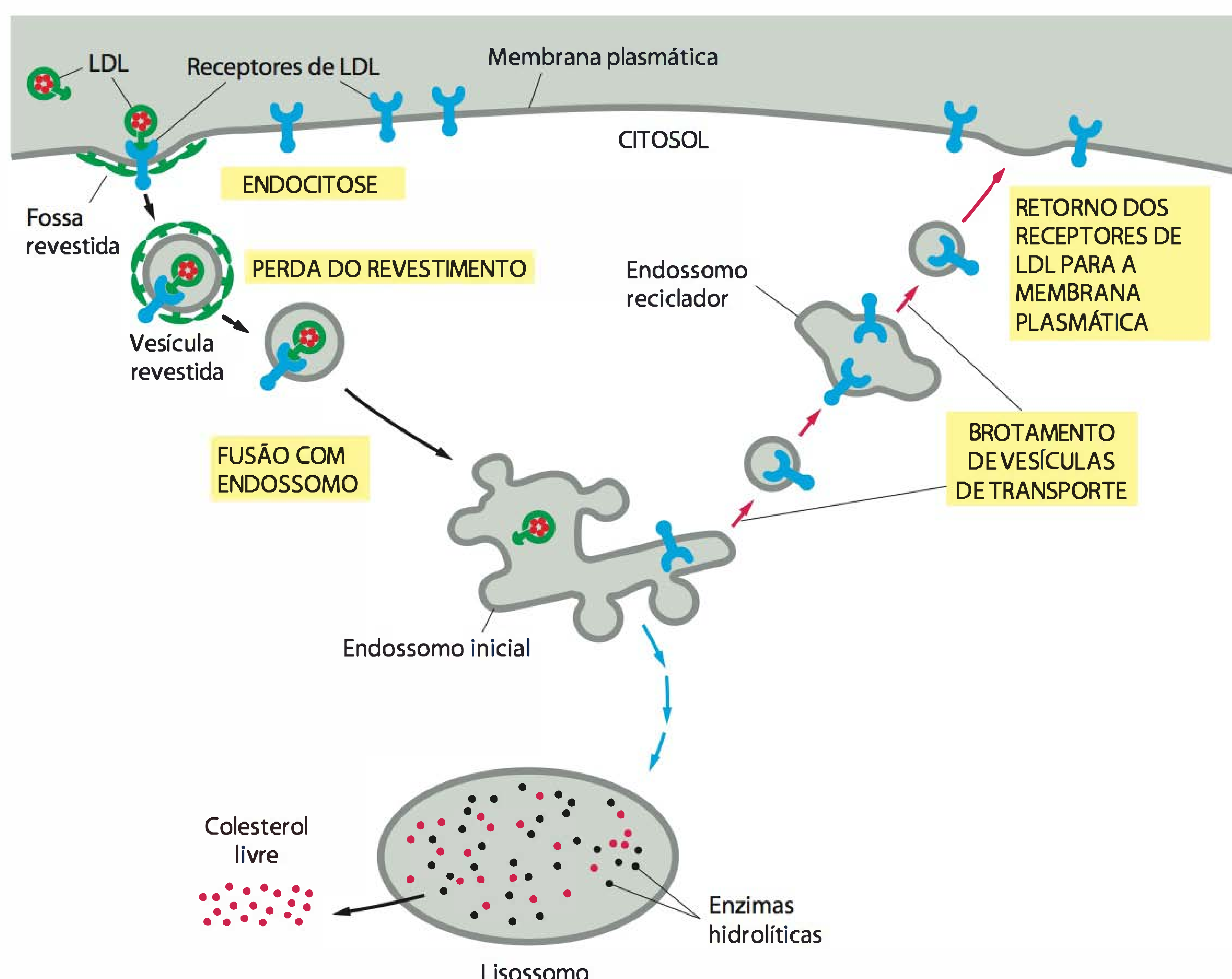


Figura 13-53 Endocitose de LDL mediada por receptores. Observe que a LDL dissocia-se dos seus receptores no ambiente ácido dos endossomos iniciais. Após várias etapas (mostradas na Figura 13-55), a LDL termina nos lisossomos, onde é degradada para liberar colesterol livre. Em contraste, as proteínas receptoras de LDL são devolvidas para a membrana plasmática por meio de vesículas de transporte revestidas de clatrina que brotam da região tubular do endossomo inicial, como representado. Para simplificar, somente um receptor de LDL entrando na célula e voltando à membrana plasmática está ilustrado. Independentemente de estar ou não ocupado, um receptor de LDL, tipicamente, realiza um turno de viagem para dentro da célula e retorna à membrana plasmática a cada 10 minutos, totalizando várias centenas de viagens no seu período de vida de 20 horas.

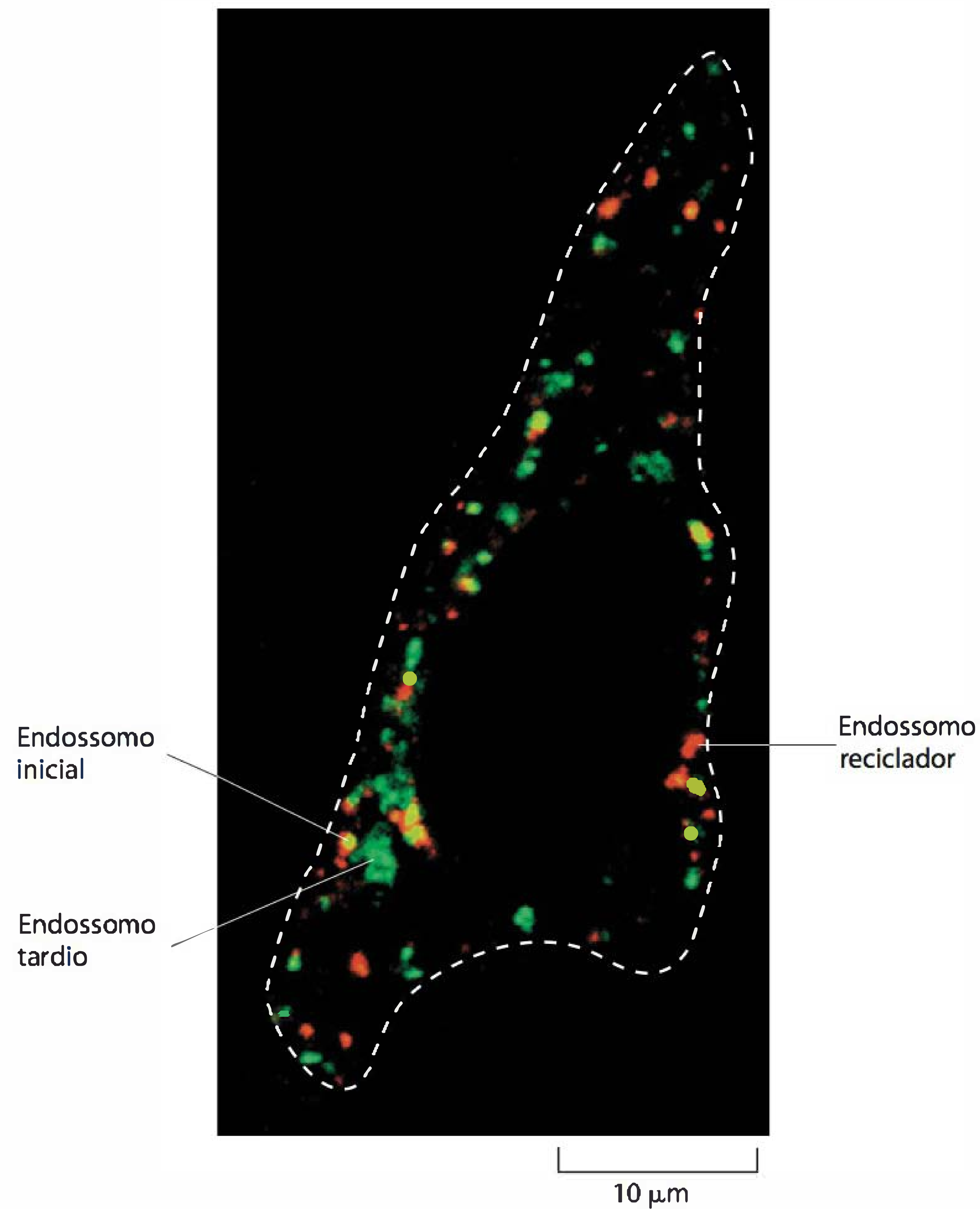


Figura 13-54 Distribuição das proteínas de membrana na via endocítica. Os receptores de transferrina medeiam a captação de nutrientes e circulam constitutivamente entre os endossomos e a membrana plasmática. Em contraste, os receptores de opioides são receptores de sinalização que – após a interação com o ligante – são regulados negativamente pela endocitose seguida da degradação nos lisossomos; eles são ativados por narcóticos como a morfina e a heroína, bem como por peptídeos endógenos denominados encefalinas e endorfinas. A endocitose de ambos os tipos de receptores inicia-se nas fossas revestidas de clatrina. Os receptores são, então, entregues aos endossomos iniciais, onde suas jornadas se separam: os receptores de transferrina são encaminhados aos endossomos de reciclagem, enquanto os receptores de opioides são enviados aos endossomos tardios. A micrografia mostra os dois receptores marcados com diferentes corantes fluorescentes 30 minutos após a endocitose (os receptores de transferrina estão marcados em *vermelho* e os receptores de opioides estão marcados em *verde*). Neste momento, alguns endossomos iniciais ainda contêm ambos os receptores e são visualizados em *amarelo*, devido ao resultado da sobreposição das luzes vermelha e verde emitida pelos corantes fluorescentes. Em contraste, os endossomos recicladores e tardios são seletivamente enriquecidos em receptores de transferrina ou de opioides, respectivamente – aparecendo, assim, como estruturas distintas vermelhas e verdes. (Cortesia de Mark von Zastrow.)

possuem uma grande área de membrana circundando um pequeno volume, as proteínas de membrana tendem a se acumular neste local. As vesículas de transporte que trazem de volta materiais para a membrana plasmática iniciam o brotamento a partir dos túbulos, porém as porções tubulares dos endossomos iniciais também se destacam e se fundem umas às outras para formar os *endossomos de reciclagem*, os quais servem como uma estação de orientação do tráfego entre os endossomos iniciais e a membrana plasmática. Essa via de reciclagem opera continuadamente, compensando a endocitose contínua que ocorre na membrana plasmática.

O **receptor de transferrina** segue uma via de reciclagem semelhante a do receptor de LDL, mas ao contrário deste ele também recicla o seu ligante. A transferrina é uma proteína solúvel que carrega ferro no sangue. Os receptores de transferrina da superfície celular entregam transferrina com o seu ferro ligado para os endossomos iniciais por meio da endocitose mediada por receptores. O baixo pH do endossomo induz a transferrina a liberar o seu ferro ligado, mas a própria transferrina, livre do átomo de ferro (chamada de apotransferrina), permanece ligada ao seu receptor. O complexo receptor-apotransferrina entra nas extensões tubulares do endossomo inicial e, desses locais, é reciclado de volta à membrana plasmática (**Figura 13-54**). Quando a apotransferrina retorna ao pH neutro do fluido extracelular, ela dissocia-se do receptor e torna-se livre para captar mais átomos de ferro e iniciar o ciclo novamente. Portanto, a transferrina navega para dentro e para fora, entre o fluido extracelular e o compartimento endossômico, evitando os lisossomos e entregando para o interior celular o ferro de que as células necessitam para crescer e proliferar.

A segunda via que os receptores endocitados podem seguir a partir dos endossomos é tomada por vários receptores de sinalização, incluindo os receptores de opioides (ver Figura 13-54) e os receptores que ligam o *fator de crescimento epidérmico* (*EGF, epidermal growth factor*). O EGF é uma pequena proteína-sinal extracelular que estimula a divisão das células epidérmicas e de várias outras. Diferentemente dos receptores de LDL, os receptores de EGF acumulam-se nas fossas revestidas de clatrina, e a maioria deles não recicla, mas é degradada nos lisossomos, juntamente com o EGF ingerido. A ligação de EGF, portanto, ativa vias intracelulares de sinalização e, então, leva a uma redução da concentração de receptores de EGF na superfície celular, um processo chamado de *regulação negativa de receptores* que reduz, subsequentemente, a sensitividade celular ao EGF (ver Figura 15-29).

A endocitose dependente de clatrina e mediada por receptores é altamente regulada. Os receptores são, primeiramente, modificados covalentemente com a pequena proteína ubiquitina. Porém, ao contrário da *poliubiquitinização*, que adiciona uma cadeia de ubiquitinas que tipicamente marca uma proteína para degradação nos proteossomos (discutido no Capítulo 6), a marcação com ubiquitina para classificação dentro da via endocítica dependente de clatrina adiciona uma ou mais moléculas de ubiquitina avulsas à proteína – processo denominado *monoubiquitinização* ou *multiubiquitinização*, respectivamente. Proteínas que se ligam à ubiquitina a reconhecem e auxiliam a guiar os receptores modificados para dentro das fossas revestidas de clatrina. Após a entrega aos endossomos, outras proteínas ligantes de ubiquitina a reconhecem e auxiliam a mediar as etapas de classificação.

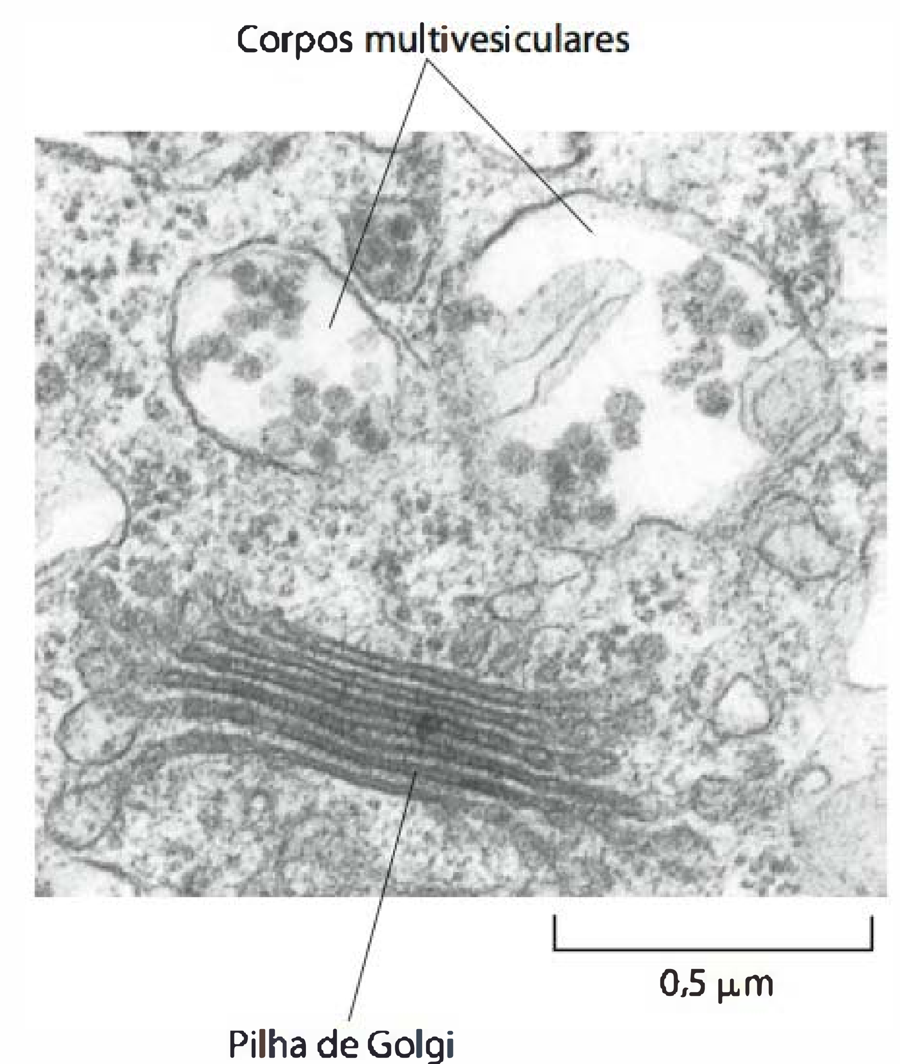


Figura 13-55 Micrografia eletrônica de um corpo multivesicular em uma célula vegetal. A grande quantidade de membranas internas será entregue ao vacúolo, o equivalente vegetal aos lisossomos, para digestão.

Os corpos multivesiculares formam-se na via para os endossomos tardios

Como afirmado anteriormente, muitas das moléculas endocitadas movem-se dos compartimentos endossômicos iniciais para os tardios. Nesse processo, os endossomos iniciais migram lentamente ao longo dos microtúbulos em direção ao interior celular, perdendo membranas de túbulos e vesículas que são reciclados para a membrana plasmática e para a TGN. Ao mesmo tempo, os endossomos migrantes englobam grandes quantidades de membranas invaginadas e de vesículas brotadas internamente e são, assim, chamados de **corpos multivesiculares** (**Figura 13-55**). Os corpos multivesiculares eventualmente fundem-se com um compartimento endossômico tardio ou entre si para se tornarem endossomos tardios. Ao final dessa via, os endossomos tardios são convertidos em endolisossomos e lisossomos como resultado das suas fusões com lisossomos preexistentes e das suas acidificações progressivas (**Figura 13-56**).

Os corpos multivesiculares carregam aquelas proteínas de membrana endocitadas que serão degradadas. Como parte deste processo de seleção de proteínas, as proteínas específicas – por exemplo, o receptor de EGF ocupado, antes descrito – seletivamente integram as membranas invaginadas dos corpos multivesiculares. Dessa maneira, os receptores, bem como quaisquer proteínas-sinal firmemente ligadas a eles, tornam-se completamente acessíveis às proteínas digestivas que irão degradá-los (**Figura 13-57**). Além das proteínas de membrana endocitadas, os corpos multivesiculares também contêm o conteúdo solúvel dos endossomos iniciais destinados aos endossomos tardios e à digestão nos lisossomos.

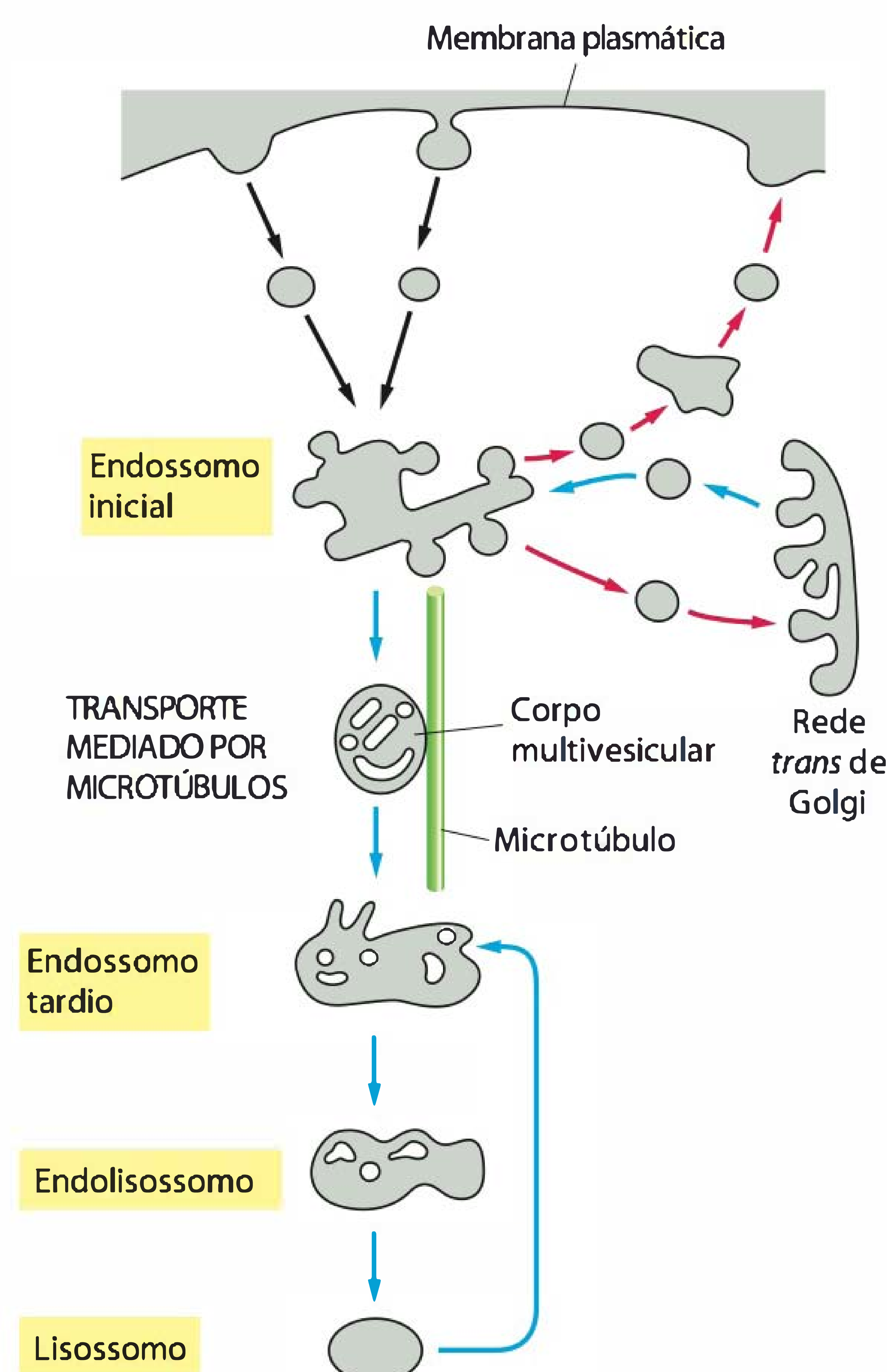


Figura 13-56 Detalhes da via endocítica da membrana plasmática para os lisossomos. A maturação dos endossomos iniciais para os tardios ocorre por meio da formação de corpos multivesiculares, os quais contêm grandes quantidades de membranas invaginadas e vesículas internas (daí os seus nomes). Estes corpos movem-se para dentro ao longo de microtúbulos, desprendendo continuadamente vesículas de transporte que reciclam componentes para a membrana plasmática. Os corpos multivesiculares gradualmente convertem-se em endossomos tardios pela fusão entre si, ou pela fusão a endossomos tardios preexistentes. Os endossomos tardios não são mais capazes de enviar vesículas à membrana plasmática.

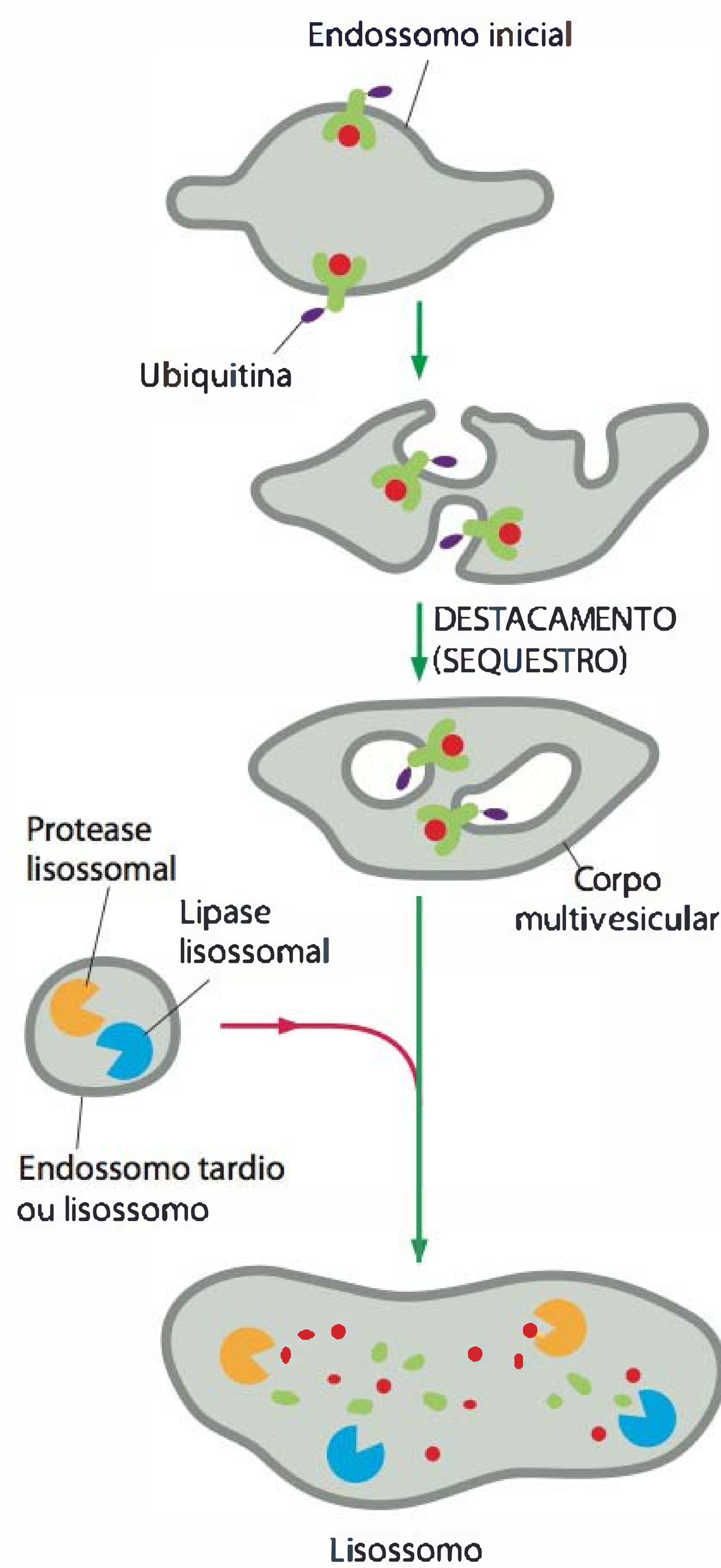


Figura 13-57 Sequestro de proteínas endocitadas para as membranas internas dos corpos multivesiculares. Inevitavelmente, todas as membranas internas produzidas pelas invaginações mostradas serão digeridas por proteases e por lipases nos lisossomos. A invaginação é essencial para atingir a completa digestão das proteínas de membrana endocitadas: como a membrana externa de um corpo multivesicular se torna contínua à membrana lisossômica, por exemplo, as hidrolases lisossômicas não podem digerir os domínios citosólicos das proteínas transmembranas, como o receptor de EGF aqui representado, se a proteína não estiver localizada nas vesículas internas.

A classificação dentro das vesículas internas de um corpo multivesicular requer uma ou múltiplas marcas de ubiquitina, as quais são adicionadas aos domínios citosólicos das proteínas de membrana. Inicialmente, essas marcas auxiliam a guiar as proteínas para dentro de vesículas revestidas de clatrina. Uma vez que as proteínas são entregues à membrana endossômica, as ubiquitinas são reconhecidas novamente, dessa vez por uma série de complexos proteicos citosólicos, denominados *ESCRT-0*, *-I*, *-II* e *-III*, os quais se ligam sequencialmente, conduzindo a carga ubiquitinizada de um complexo para o seguinte, e por fim mediando o processo de classificação dentro das vesículas internas dos corpos multivesiculares (**Figura 13-58**). A invaginação da membrana em corpos multivesiculares também depende de uma lipídeo-cinase que fosforila fosfatidilinositol para produzir PI(3)P, o qual serve como um sítio de ancoragem adicional para os complexos ESCRT; estes complexos requerem tanto PI(3)P como a presença das proteínas-carga ubiquitinizadas para se ligarem à membrana

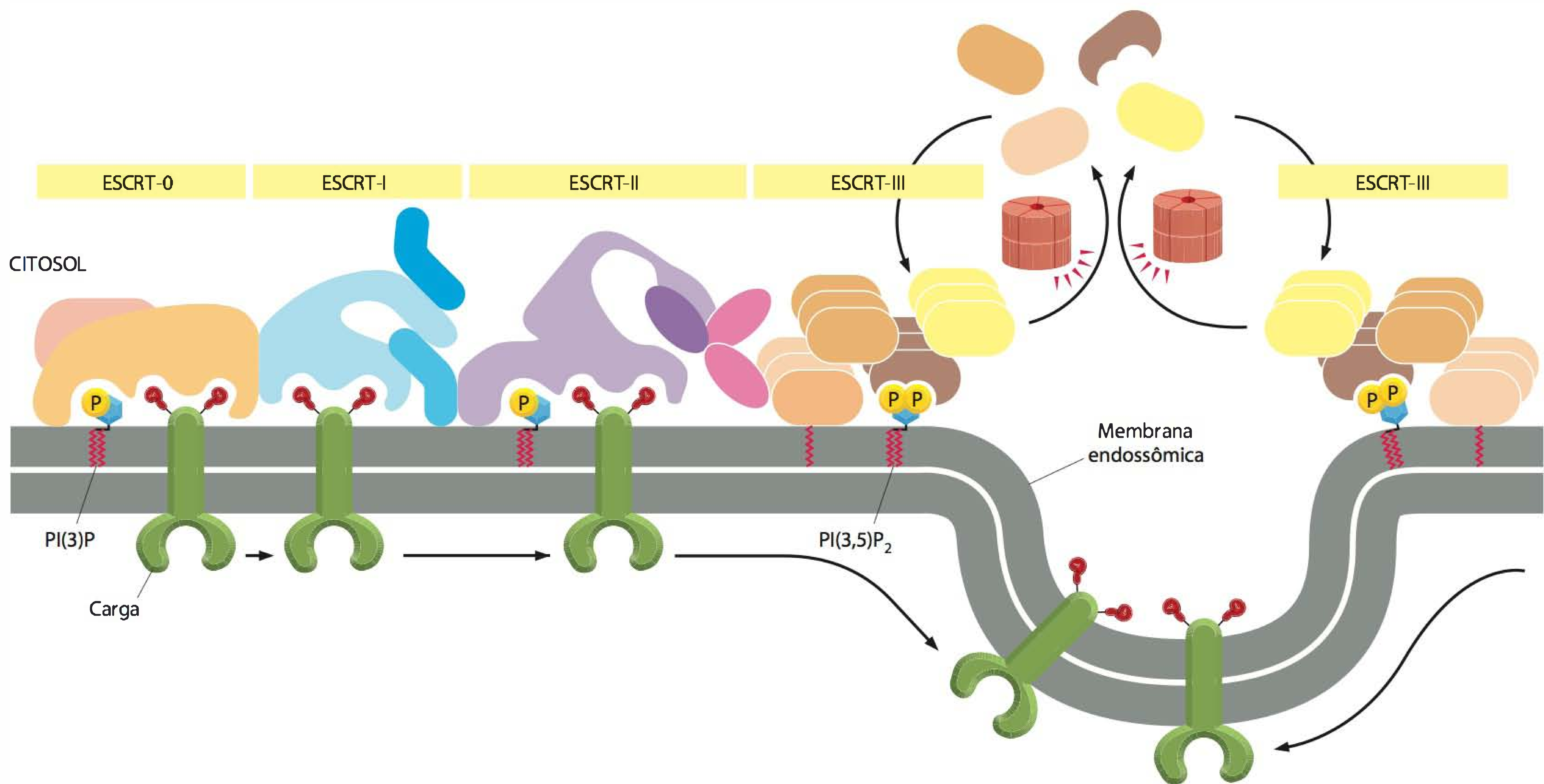


Figura 13-58 Classificação de proteínas de membrana endocitadas em vesículas internas de um corpo multivesicular. Uma série de eventos de ligação de complexos transfere sequencialmente as proteínas-carga ubiquitinizadas de um complexo ESCRT para o seguinte, eventualmente concentrando--as em áreas da membrana que irão brotar do citosol para dentro do lúmen do endossomo para formar as vesículas internas do corpo multivesicular. Os complexos ESCRT são solúveis no citosol e são recrutados à membrana conforme necessário. Primeiro o ESCRT-0 liga-se à ubiquitina anexada à proteína-carga e aos grupos de cabeça PI(3)P. O ESCRT-0 dissocia-se da membrana, conduzindo a proteína-carga ubiquitinizada para o complexo ESCRT-I; a seguir, este último dissocia-se, conduzindo a proteína-carga para o complexo ESCRT-II, que finalmente dissocia-se, e o complexo ESCRT-III é montado sobre a membrana. Ao contrário de ESCRT-0, -I e -II, o ESCRT-III não se liga à carga ubiquitinizada diretamente. Ao invés disso, acredita-se que sua montagem em estruturas multiméricas expansivas confina as moléculas-carga dentro de áreas especializadas da membrana que, então, invaginam, deixando os componentes ESCRT na superfície endossômica. Uma AAA-ATPase (cilindros *vermelhos*) então desmonta os complexos ESCRT-III, de modo que eles podem ser reutilizados.

endossômica. Uma segunda PI-cinase adiciona outro grupo fosfato ao PI(3)P, produzindo $PI(3,5)P_2$, o qual é requerido por ESCRT-III para formar grandes montagens multiméricas sobre a membrana. Não se sabe como a montagem dos complexos ESCRT acaba guiando os processos de invaginação e destacamento necessários para formar as vesículas internas, mas os complexos ESCRT não fazem parte das membranas invaginantes.

Células mutantes com a função de ESCRT comprometida mostram defeitos na sinalização. Em tais células, os receptores ativados não podem ser regulados negativamente por endocitose e empacotados em corpos multivesiculares, mediando, portanto, uma sinalização prolongada, a qual pode levar a uma proliferação celular descontrolada e ao câncer.

A mesma maquinaria ESCRT que orienta o brotamento interno da membrana endossômica para formar corpos multivesiculares também é utilizada pelo HIV, ebola e outros vírus envelopados, para brotar da membrana plasmática para o espaço extracelular. Estes dois processos são topologicamente equivalentes, já que ambos envolvem brotamento a partir da superfície citosólica da membrana (**Figura 13-59**).

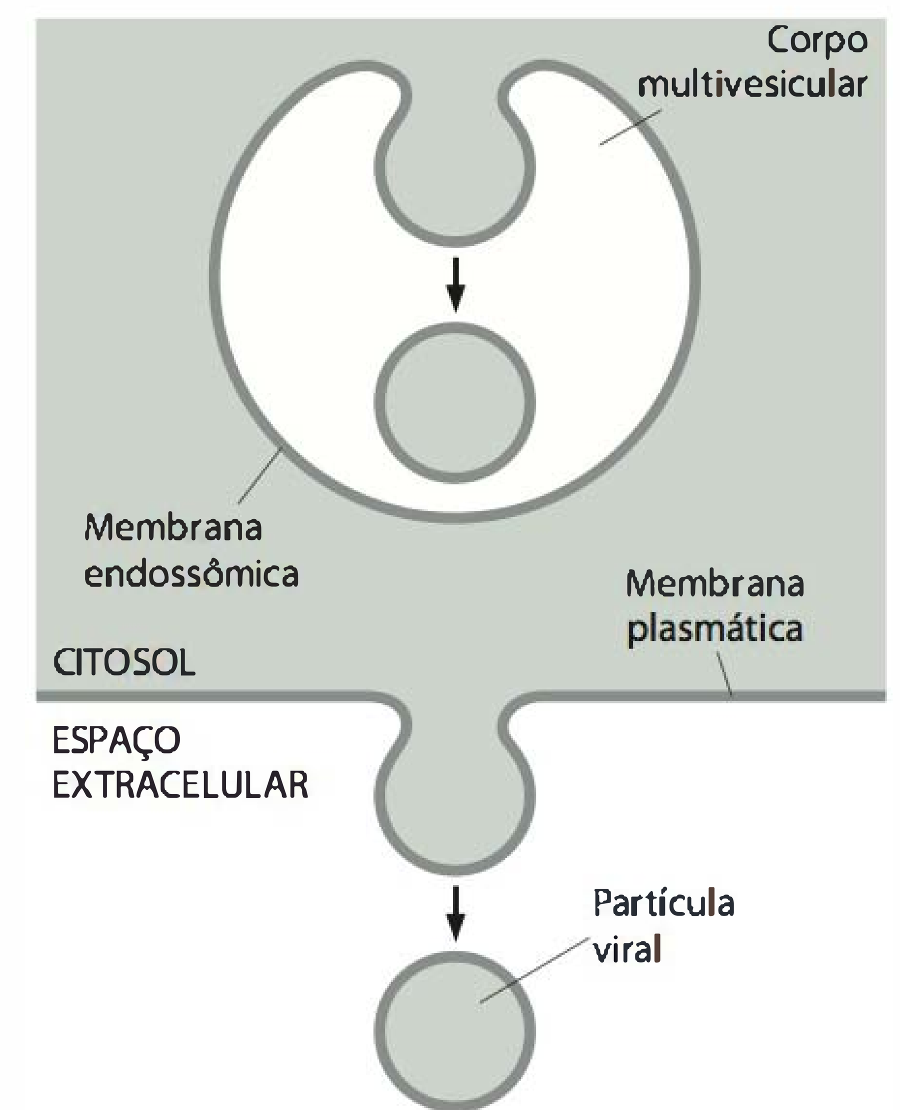


Figura 13-59 Complexos ESCRT na formação do corpo multivesicular e no brotamento de vírus. Nos dois processos topologicamente equivalentes indicados pelas setas, os complexos ESCRT moldam a membrana em brotos que se soltam do citosol.

A transcitose transfere macromoléculas através de camadas de células epiteliais

Alguns receptores da superfície de células epiteliais transferem macromoléculas específicas de um espaço extracelular para outro por **transcitose** (**Figura 13-60**). Esses receptores são endocitados e, então, seguem uma via que parte dos endossomos para um domínio diferente da membrana plasmática (ver Figura 13-52). Um rato recém-nascido, por exemplo, obtém anticorpos a partir do leite materno (os quais auxiliam a protegê-lo contra infecções) transportando-os através do epitélio dos seus intestinos. O lúmen do intestino é ácido e, sob esse baixo pH, os anticorpos do leite se ligam aos receptores específicos da superfície apical (absorvente) das células do epitélio intestinal. Os complexos receptor-anticorpo são internalizados por meio de fossas revestidas de clatrina e de vesículas, sendo entregues aos endossomos iniciais. Os complexos permanecem intactos e são recuperados em vesículas

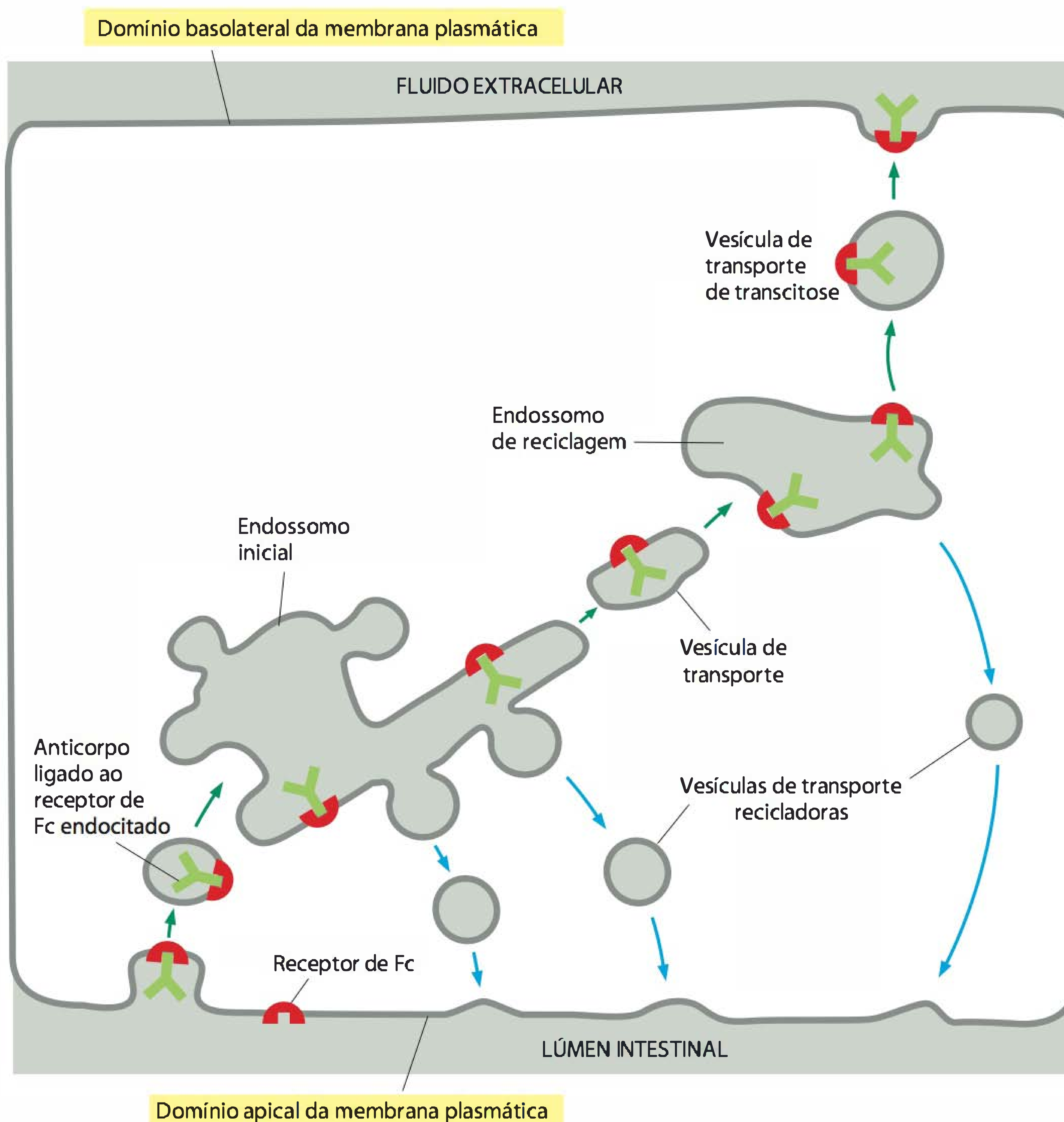


Figura 13-60 Papel dos endossomos de reciclagem na transcitose. Os endossomos de reciclagem formam uma estação de direcionamento na via transcitótica. No exemplo aqui representado, um receptor de anticorpo sobre uma célula do epitélio intestinal liga o anticorpo e é endocitado, inevitavelmente carregando o anticorpo para a membrana plasmática basolateral em contato com a matriz extracelular que é permeada por vasos sanguíneos. O receptor é chamado de receptor de Fc porque ele se liga à parte Fc do anticorpo (discutido no Capítulo 25).

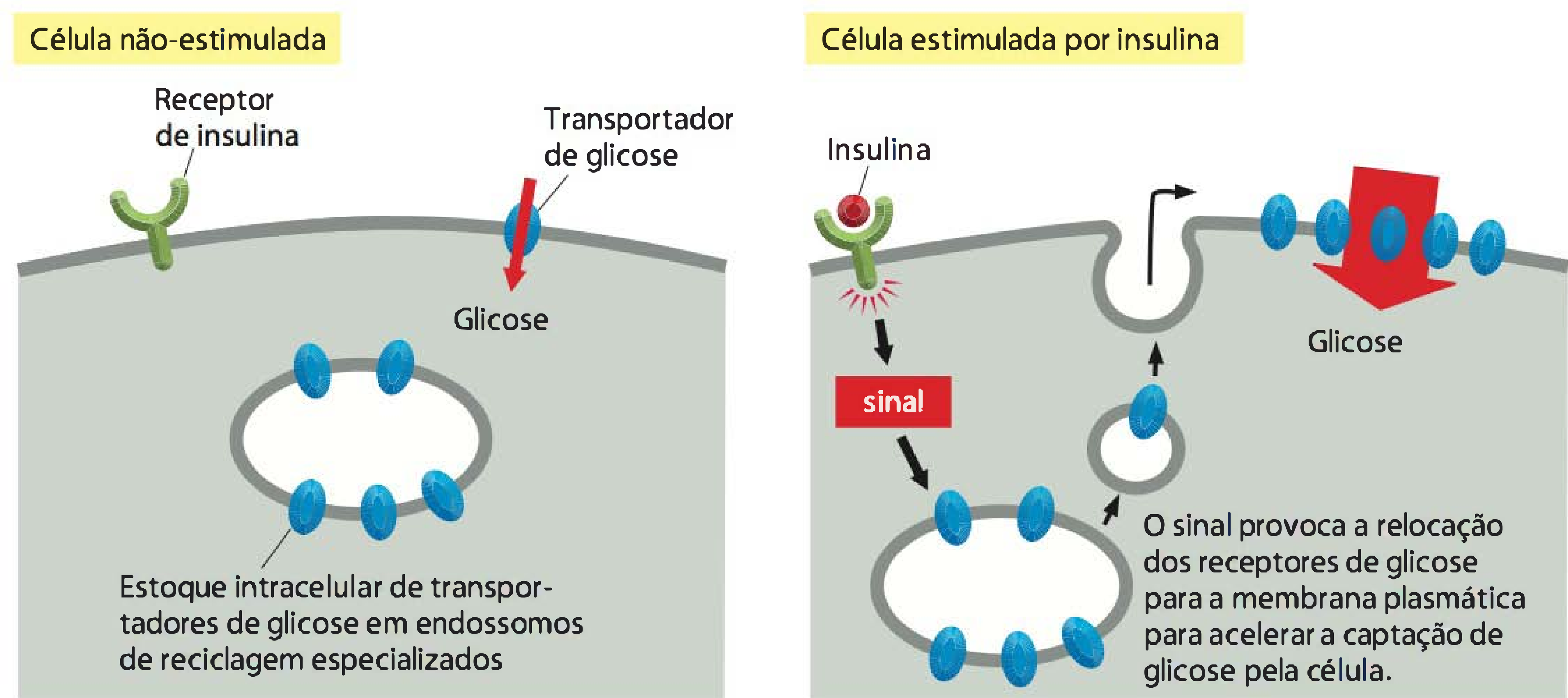


Figura 13-61 Armazenamento de proteínas da membrana plasmática em endossomos recicladores. Os endossomos de reciclagem podem servir como locais de armazenamento intracelular para proteínas especializadas da membrana plasmática, possibilitando que estas sejam mobilizadas, quando necessário. No exemplo aqui representado, a ligação da insulina ao seu receptor desencadeia uma via de sinalização que causa a rápida inserção de transportadores de glicose na membrana plasmática de uma célula adiposa ou muscular, aumentando muito a captação de glicose.

de transporte que brotam de um endossomo inicial e, subsequentemente, fusionam-se com o domínio basolateral da membrana plasmática. Ao serem expostos ao pH neutro do fluido extracelular que banha a superfície basolateral das células, os anticorpos dissociam-se dos seus receptores e acabam por entrar na corrente sanguínea dos recém-nascidos.

A via transcitótica do endossomo inicial para a membrana plasmática não é direta. Primeiro, os receptores movem-se do endossomo inicial para um compartimento endossômico intermediário, o **endossomo de reciclagem** (ou endossomo reciclador) descrito previamente (ver Figura 13-60). A variedade de vias que diferentes receptores seguem a partir dos endossomos implica que, além dos sítios de ligação para os seus ligantes e dos sítios de ligação às fossas revestidas, muitos receptores também possuem sinais de distribuição que os guiam para o tipo apropriado de vesícula de transporte, saindo do endossomo e, consequentemente, dirigindo-se para a membrana-alvo apropriada da célula.

Uma propriedade única de um endossomo de reciclagem é que as células podem regular a saída das proteínas de membrana do compartimento. Assim, as células podem ajustar o fluxo de proteínas através da via transcitótica de acordo com a necessidade. Embora o mecanismo seja desconhecido, essa regulação permite aos endossomos de reciclagem executar um papel importante no ajuste da concentração de proteínas específicas da membrana plasmática. As células adiposas e musculares, por exemplo, contêm grandes estoques intracelulares dos transportadores de glicose que são responsáveis pela captação de glicose através da membrana plasmática. Essas proteínas são estocadas em endossomos de reciclagem especializados até que a célula seja estimulada pelo hormônio *insulina* a aumentar a razão de captação de glicose. Em resposta ao sinal da insulina, as vesículas de transporte brotam rapidamente do endossomo de reciclagem e entregam grandes quantidades de transportadores de glicose para a membrana plasmática, consequentemente aumentando bastante a razão de captação de glicose para dentro da célula (**Figura 13-61**).

As células epiteliais possuem dois compartimentos endossômicos iniciais distintos, mas possuem um compartimento endossômico tardio comum

Em células epiteliais polarizadas, a endocitose ocorre tanto a partir do *domínio basolateral* quanto do *domínio apical* da membrana plasmática. O material endocitado a partir de qualquer dos dois domínios entra, primeiro, em um compartimento endossômico inicial que é único àquele domínio. Esse arranjo permite que os receptores endocitados sejam reciclados de volta ao seu domínio original na membrana, a menos que contenham sinais que os marquem para a transcitose para o outro domínio. As moléculas endocitadas a partir de qualquer dos domínios da membrana plasmática e que não sejam recuperadas a partir dos endossomos iniciais terminam em um compartimento endossômico tardio comum, próximo ao centro celular, e acabam sendo degradadas nos lisossomos (**Figura 13-62**).

O fato de as células conterem alguns poucos compartimentos endossômicos conectados, ou muitos compartimentos separados, parece depender do tipo celular e do estado fisiológico da célula. Assim como muitas outras organelas definidas por membranas, os endossomos do mesmo tipo podem fusionar-se prontamente uns com os outros (um exemplo de fusão homeótica, discutida anteriormente) para criar grandes e contínuos endossomos.

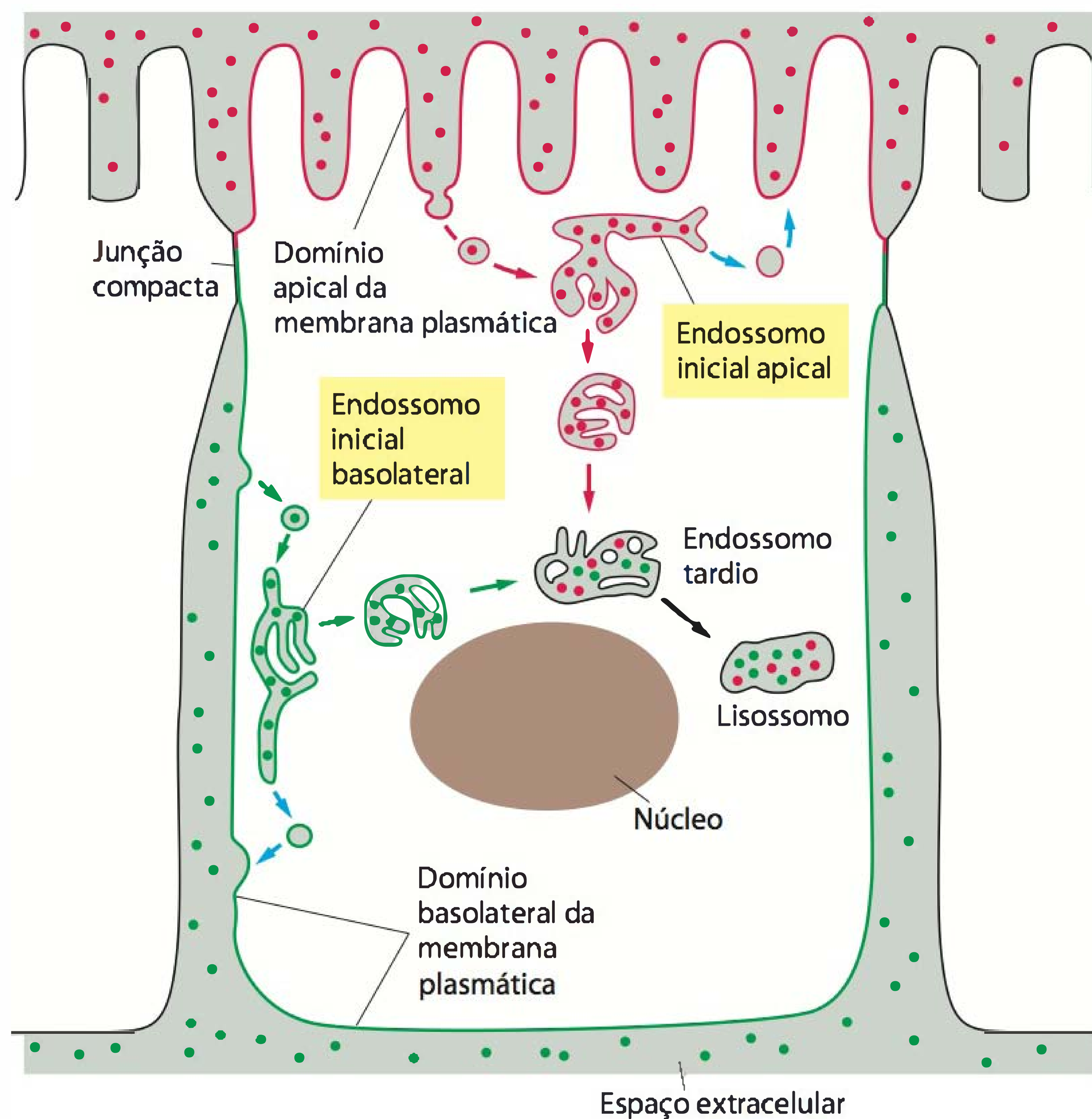


Figura 13-62 Os dois compartimentos endossômicos iniciais distintos em uma célula epitelial. Os domínios basolateral e apical da membrana plasmática comunicam-se com compartimentos endossômicos iniciais separados. No entanto, as moléculas endocitadas provenientes de ambos os domínios que não contenham sinais para a reciclagem ou para a transcitose encontram-se em um compartimento endossômico tardio comum, antes de serem digeridas nos lisossomos.

Resumo

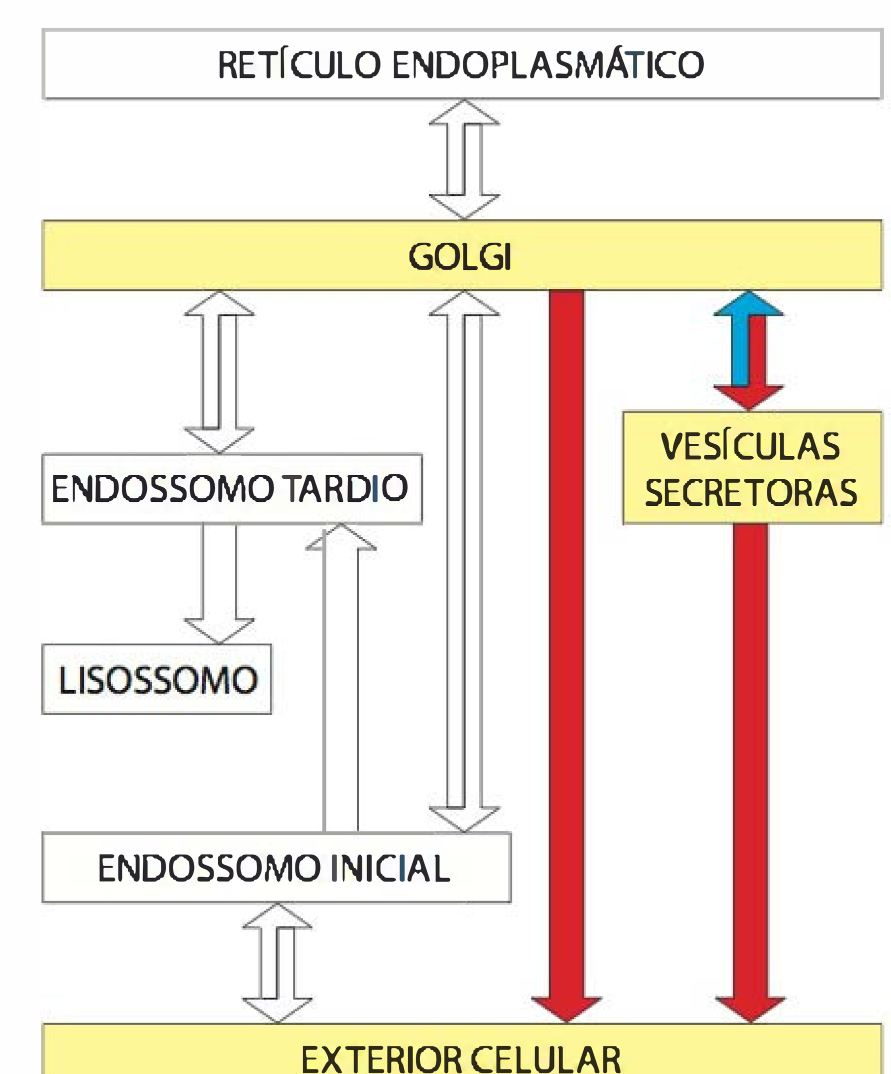
As células ingerem fluidos, moléculas e partículas por endocitose, pela qual as regiões localizadas da membrana plasmática invaginam-se e destacam-se para formar vesículas endocíticas. Muitas das moléculas e das partículas endocitadas terminam em lisossomos, onde serão degradadas. A endocitose ocorre constitutivamente, ou como uma resposta desencadeada por sinais extracelulares. A endocitose é tão extensa em muitas células que uma grande fração da membrana plasmática é internalizada a cada hora. As células permanecem com o mesmo tamanho porque a maior parte dos componentes da membrana plasmática (proteínas e lipídeos) que é endocitada é continuamente devolvida para a superfície celular por exocitose. Este ciclo endocítico-exocítico de grande escala é mediado principalmente por fossas e por vesículas revestidas de clatrina.

Muitos receptores de superfície celular que ligam macromoléculas extracelulares específicas são marcados com ubiquitina, a qual os guia até as fossas revestidas de clatrina. Como resultado, eles e seus ligantes são internalizados eficientemente em vesículas revestidas de clatrina, um processo chamado de endocitose mediada por receptores. As vesículas endocíticas revestidas rapidamente perdem seus revestimentos de clatrina e fusionam-se com endossomos iniciais.

A maioria dos ligantes dissocia-se dos seus receptores no ambiente ácido do endossomo e, fatalmente, termina nos lisossomos, enquanto a maior parte dos receptores é reciclada por meio das vesículas de transporte de volta para a superfície celular para reutilização. Os complexos receptor-ligante, porém, podem seguir outras vias a partir do compartimento endossômico. Em alguns casos, tanto o receptor como o seu ligante terminam sendo degradados nos lisossomos, resultando em uma regulação negativa do receptor; nesses casos, os receptores marcados com ubiquitina recrutam vários complexos ESCRT, os quais guiam a invaginação e o destacamento das vesículas de membrana endossômica para formar os corpos multivesiculares. Em outros casos, ambos são transferidos para um domínio diferente da membrana plasmática e, consequentemente, o ligante é liberado por exocitose em uma superfície da célula diferente daquela de onde ele se originou, um processo chamado de transcitose. A via de transcitose inclui endossomos de reciclagem, onde as proteínas endocitadas da membrana plasmática podem ser estocadas até que sejam necessárias.

TRANSPORTE A PARTIR DA REDE *TRANS* DE GOLGI PARA O EXTERIOR DA CÉLULA: EXOCITOSE

Tendo considerado o sistema digestivo interno da célula e os vários tipos de tráfego de internalização de membranas que convergem para os lisossomos, retornaremos agora ao aparelho de Golgi e examinaremos as vias secretoras que levam para fora, para o exterior celular.



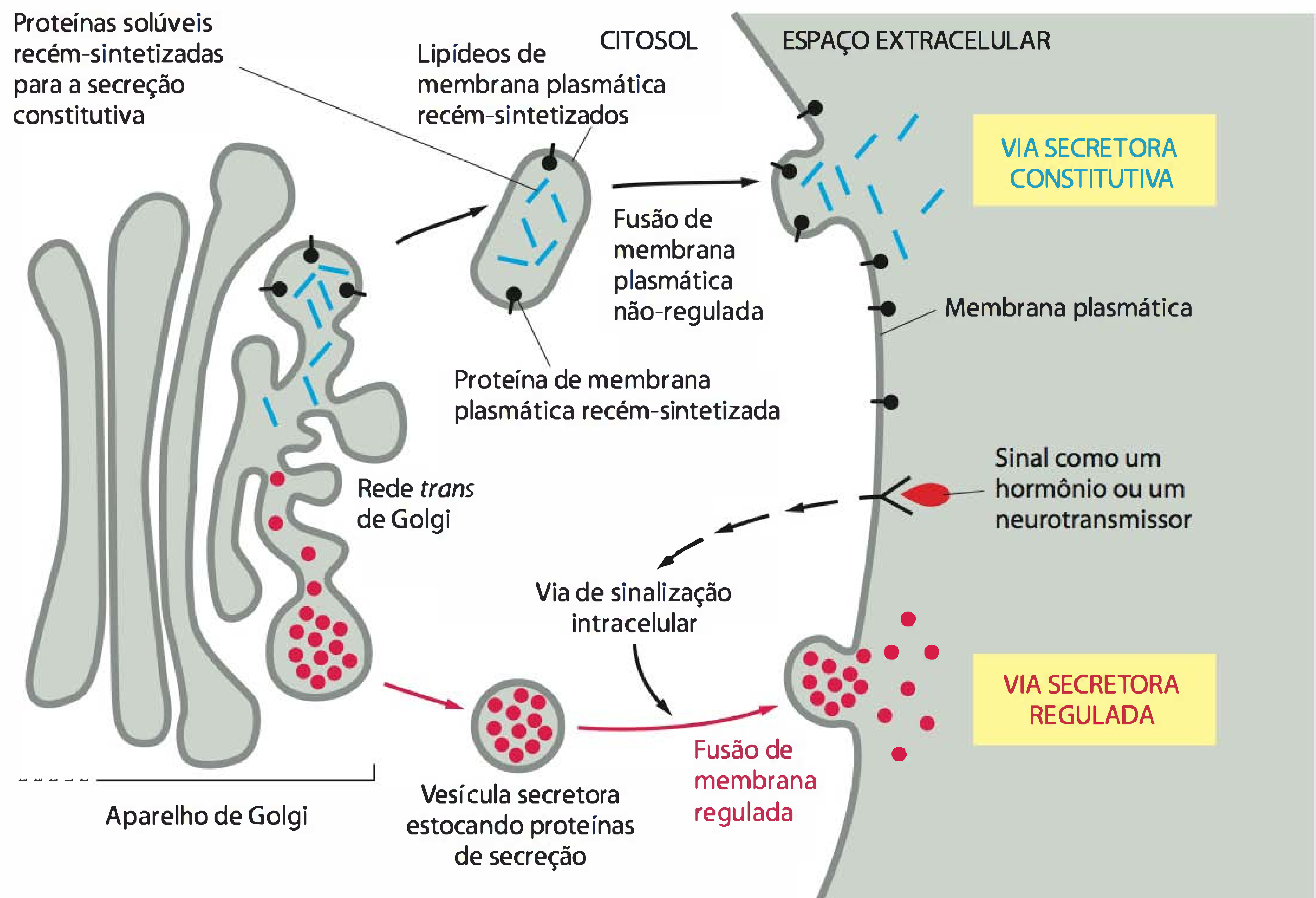


Figura 13-63 As vias secretoras constitutiva e regulada. As duas vias divergem na rede *trans* de Golgi. A via secretora constitutiva opera em todas as células. Muitas proteínas solúveis são continuamente secretadas da célula por esta via, a qual também fornece lipídeos e proteínas recém-sintetizados para a membrana plasmática. As células secretoras especializadas também possuem uma via secretora regulada, pela qual proteínas selecionadas na rede *trans* de Golgi são distribuídas em vesículas secretoras, onde as proteínas são concentradas e estocadas até que um sinal extracelular estimule as suas secreções. A secreção regulada de pequenas moléculas, como a histamina, ocorre por uma via semelhante; essas moléculas são transportadas ativamente do citosol para dentro de vesículas secretoras pré-formadas. Lá, elas frequentemente são complexadas a macromoléculas específicas (proteoglicanos, para a histamina), de forma que possam ser estocadas em altas concentrações, sem gerar uma pressão osmótica excessivamente alta.

Normalmente, as vesículas de transporte destinadas à membrana plasmática deixam a TGN em um fluxo constante, como túbulos de formato irregular. As proteínas e os lipídeos de membrana nessas vesículas fornecem novos componentes para a membrana plasmática da célula, enquanto as proteínas solúveis dentro das vesículas são secretadas para o espaço extracelular. A fusão das vesículas com a membrana plasmática é chamada de **exocitose**. Dessa maneira, por exemplo, as células produzem e secretam a maior parte dos proteoglicanos e das glicoproteínas da *matriz extracelular*, a qual é discutida no Capítulo 19.

Todas as células necessitam dessa **via secretora constitutiva**, a qual opera continuadamente. As células secretoras especializadas, entretanto, seguem uma segunda via secretora pela qual proteínas solúveis e outras substâncias são inicialmente estocadas em *vesículas secretoras* para liberação posterior. Esta é a **via secretora regulada**, encontrada principalmente em células especializadas para a secreção de produtos de necessidade urgente – como hormônios, neurotransmissores ou enzimas digestivas (**Figura 13-63**). Nesta seção, consideraremos o papel do aparelho de Golgi em ambas as vias secretoras e compararemos os dois mecanismos de secreção.

Muitas proteínas e lipídeos parecem ser automaticamente levados do aparelho de Golgi à superfície celular

Uma célula com capacidade de secreção regulada deve separar pelo menos três classes de proteínas antes que estas deixem a rede *trans* de Golgi – aquelas destinadas aos lisossomos (via endossomos tardios), aquelas destinadas às vesículas secretoras e aquelas destinadas à entrega imediata para a superfície celular (**Figura 13-64**). Já observamos que as proteínas destinadas aos lisossomos são marcadas para o empacotamento em vesículas de partida específicas (com manose-6-fosfato no caso das hidrolases lisossômicas), e sinais análogos direcionam as *proteínas secretoras* para dentro das vesículas secretoras. A via secretora constitutiva não-seletiva transporta a maior parte das outras proteínas diretamente à superfície celular. Como a entrada nesta via não requer um sinal definido, ela também é chamada de **via-padrão**. Assim, em uma célula não-polarizada, como uma célula branca sanguínea ou um fibroblasto, parece que qualquer proteína no lúmen do aparelho de Golgi é automaticamente carregada pela via constitutiva para a superfície celular, a menos que ela seja especificamente devolvida ao RE, retida como uma proteína residente do próprio aparelho de Golgi, ou selecionada para as vias que levam à secreção regulada, ou aos lisossomos. Em células polarizadas, onde diferentes produtos devem ser entregues a domínios diferentes da superfície celular, veremos que as opções são mais complexas.

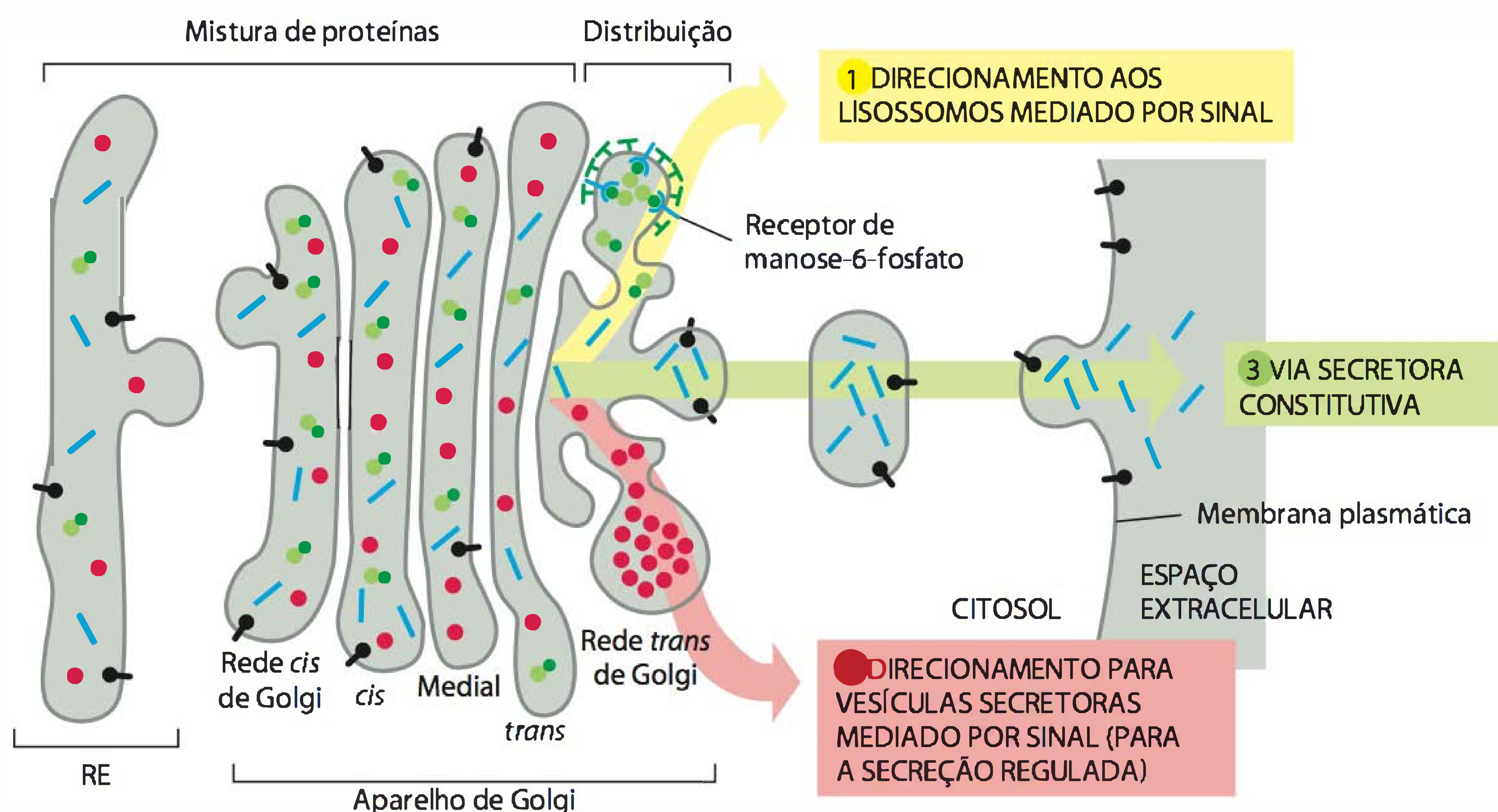


Figura 13-64 As três vias de distribuição de proteínas na rede *trans* de Golgi mais conhecidas. (1) Proteínas com a marca de manose-6-fosfato (M6P) são direcionadas aos lisossomos (via endossomos) em vesículas de transporte revestidas de clatrina (ver Figura 13-44). (2) As proteínas com sinais que as direcionam a vesículas secretoras são concentradas em tais vesículas como parte de uma via secretora regulada que está presente somente em células secretoras especializadas. (3) Em células não-polarizadas, uma via secretora constitutiva entrega proteínas sem características especiais à superfície celular. Em células polarizadas como as epiteliais, entretanto, as proteínas secretadas e as da membrana plasmática são seletivamente direcionadas para o domínio apical ou para o domínio basolateral da membrana plasmática e, assim, pelo menos uma dessas duas vias deve ser mediada por um sinal específico, como discutiremos mais adiante.

As vesículas secretoras brotam da rede *trans* de Golgi

As células especializadas para secretar alguns dos seus produtos rapidamente, quando necessário, concentram e estocam estes produtos em **vesículas secretoras** (frequentemente chamadas de *grânulos secretores* ou *vesículas de núcleos densos* porque possuem a região central densa, quando visualizadas ao microscópio eletrônico). As vesículas secretoras formam-se a partir da rede *trans* de Golgi e liberam os seus conteúdos ao exterior celular por exocitose, em resposta a sinais específicos. O produto secretado pode ser uma pequena molécula (como a histidina) ou uma proteína (como um hormônio ou uma enzima digestiva).

As proteínas destinadas às vesículas secretoras (chamadas de *proteínas de secreção* ou *secretoras*) são empacotadas em vesículas apropriadas na rede *trans* de Golgi por um mecanismo que, acredita-se, envolva uma agregação seletiva das proteínas secretoras. Podem ser detectados grumos de material agregado e denso, por microscopia eletrônica, no lúmen da rede *trans* de Golgi. O sinal que direciona as proteínas secretoras para tais agregados não é conhecido, mas acredita-se que seja composto por regiões sinalizadoras comuns em proteínas dessa classe. Quando um gene codificador de uma proteína secretora é transferido para uma célula secretora que normalmente não produzia a proteína, a proteína estranha é empacotada de forma apropriada em vesículas de secreção. Essa observação mostra que, embora as proteínas que uma célula em particular expressa e empacota em vesículas secretoras sejam diferentes, todas contêm sinais de distribuição comuns, os quais funcionam de forma apropriada mesmo quando as proteínas são expressas em células que não as produzem normalmente.

Não está claro como os agregados de proteínas secretoras são segregados para dentro das vesículas secretoras. As vesículas secretoras possuem proteínas típicas em suas membranas, algumas das quais devem servir como receptores para proteínas agregadas na rede *trans* de Golgi. Os agregados são muito grandes, entretanto, para que cada molécula da proteína secretora seja ligada pelo seu próprio receptor de carga, como proposto para o transporte de enzimas lisossômicas. A captação dos agregados em vesículas secretoras deve, portanto, assemelhar-se mais à captação de partículas por fagocitose na superfície celular, onde a membrana plasmática engolfa grandes estruturas.

Inicialmente, a maior parte da membrana das vesículas secretoras que deixam a rede *trans* de Golgi está frouxamente ligada ao redor dos grumos de proteínas secretoras agregadas. Morfologicamente, estas **vesículas secretoras imaturas** assemelham-se a cisternas dilatadas de *trans* de Golgi que se destacaram das pilhas de Golgi. À medida que as vesículas amadurecem, os seus conteúdos tornam-se concentrados (**Figura 13-65**A), provavelmente como resultado da retirada contínua de membranas que são recicladas de volta aos endossomos tardios e TGN e da progressiva acidificação do lúmen das vesículas que resulta da concentração progressiva de bombas de H^+ dependentes de ATP nas membranas das vesículas. Lembre que as ATPases do tipo V acidificam todas as organelas endocíticas e exocíticas (ver Figura 13-36). O grau de concentração de proteínas durante a formação e a maturação das

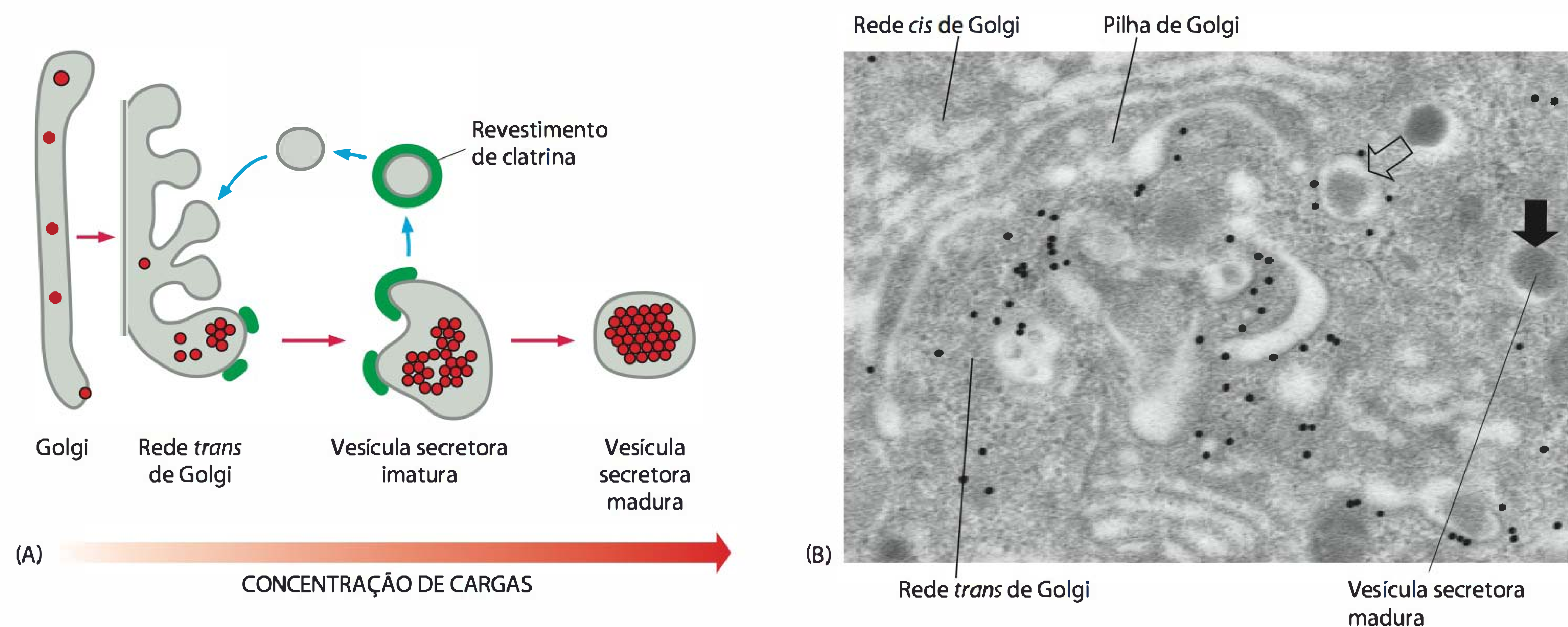


Figura 13-65 Formação de vesículas secretoras. (A) As proteínas de secreção são segregadas e altamente concentradas, nas vesículas secretoras, por dois mecanismos. Primeiro, elas agregam-se no ambiente iônico da rede *trans* de Golgi; frequentemente, os agregados tornam-se mais condensados à medida que as vesículas secretoras amadurecem e os seus lúmens tornam-se mais ácidos. Segundo, o excesso de membranas e o conteúdo luminal presente em vesículas secretoras imaturas são recuperados em vesículas revestidas de clatrina à medida que as vesículas secretoras amadurecem. (B) Esta micrografia eletrônica mostra vesículas secretoras da rede *trans* de Golgi em uma célula β secretora de insulina do pâncreas. Um anticorpo conjugado a esferas de ouro (*pontos pretos*) foi utilizado para localizar as moléculas de clatrina. As vesículas secretoras imaturas (*setas vazadas*), as quais contêm a proteína precursora de insulina (pró-insulina), contêm regiões de clatrina. Os revestimentos de clatrina não são mais vistos sobre as vesículas secretoras maduras, as quais possuem um núcleo altamente condensado (*seta sólida*). (Cortesia de Lelio Orci.)

vesículas de secreção é pequeno, se comparado com a concentração total de 200 a 400 vezes que ocorre após elas deixarem o RE. As proteínas secretoras e de membranas se tornam concentradas à medida que se movem do RE através do aparelho de Golgi, devido ao extenso e retrógrado processo de recuperação mediado de vesículas de transporte revestidas de COPI que as excluem (ver Figura 13-24).

A reciclagem de membranas é importante para o retorno de componentes ao aparelho de Golgi, bem como para a concentração dos conteúdos das vesículas secretoras. As vesículas que medeiam essa reciclagem originam-se como brotações revestidas de clatrina da superfície das vesículas secretoras imaturas, frequentemente sendo vistas mesmo sobre vesículas secretoras em brotamento que não se destacaram ainda das pilhas de Golgi (ver Figura 13-65B).

Devido ao fato de as vesículas secretoras maduras finais estarem tão densamente cheias de conteúdo é que a célula secretora pode expelir grandes quantidades de material por exocitose assim que for estimulada a fazê-lo (**Figura 13-66**).

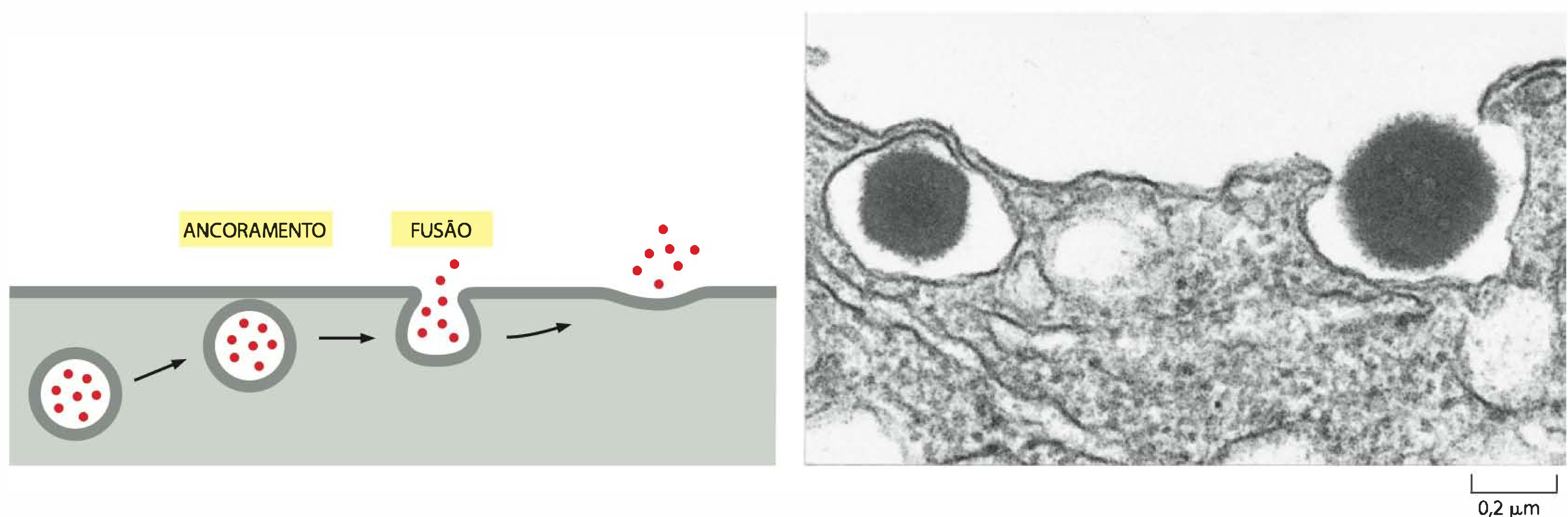


Figura 13-66 Exocitose de vesículas secretoras. A micrografia eletrônica mostra a liberação de insulina a partir de uma vesícula secretora de uma célula β pancreática. (Cortesia de Lelio Orci, de L. Orci, J.-D. Vassali e A. Perrelet, *Sci. Am.* 256:85-94, 1988. Com permissão da Scientific American.)

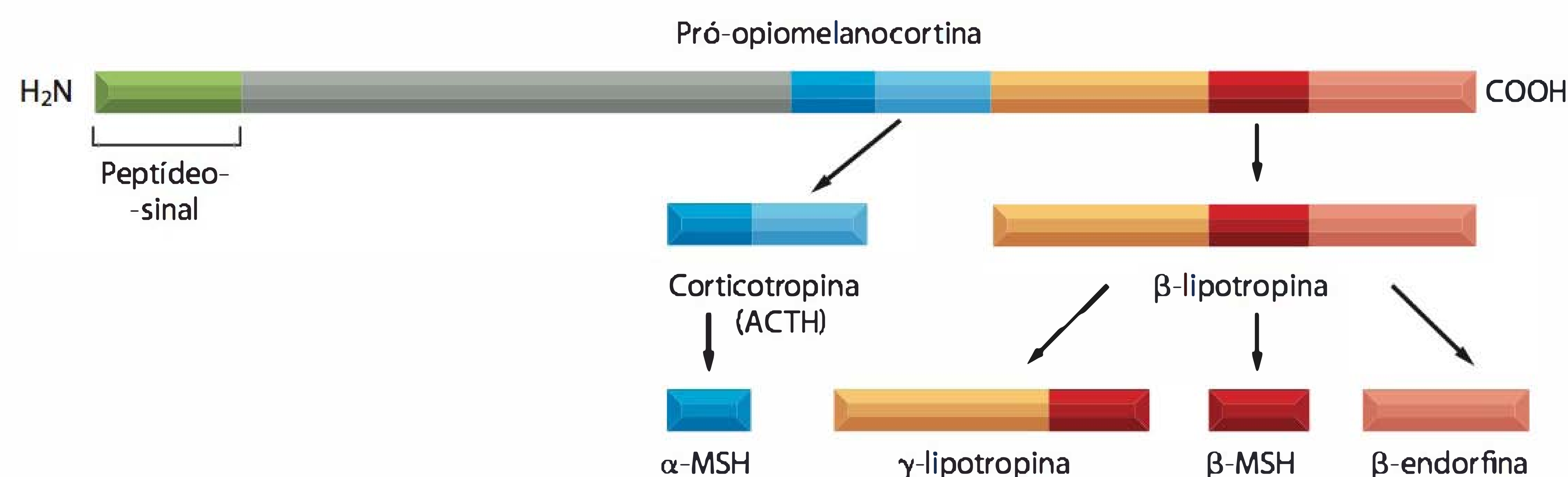


Figura 13-67 Vias alternativas de processamento para o pró-hormônio pró-opiomelanocortina. As clivagens iniciais são produzidas por proteases que cortam próximo a pares de aminoácidos positivamente carregados (pares Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys ou Arg-Arg). As reações de desbaste, então, geram os produtos finais secretados. Diferentes tipos celulares produzem diferentes concentrações das enzimas individuais de processamento, de forma que o mesmo pró-hormônio precursor é clivado para produzir distintos hormônios peptídicos. No lobo anterior da glândula pituitária, por exemplo, somente a corticotropina (ACTH) e a β-lipotropina são produzidas a partir da pró-opiomelanocortina, enquanto no lobo intermediário da pituitária há a produção, principalmente, de hormônio estimulante de α-melanócitos (α-MSH), γ-lipotropina, β-MSH e β-endorfina.

As proteínas frequentemente são processadas proteoliticamente durante a formação das vesículas secretoras

A concentração não é o único processo a que estão sujeitas as proteínas secretoras à medida que as vesículas secretoras amadurecem. Muitos hormônios polipeptídicos e neuropeptídicos, bem como muitas enzimas hidrolíticas, são sintetizados como proteínas precursoras inativas. A proteólise é necessária para liberar as moléculas ativas desses precursores. As clivagens iniciam na rede *trans* de Golgi e continuam dentro das vesículas secretoras e, algumas vezes, no fluido extracelular, após a secreção ter ocorrido. Muitos polipeptídeos secretados possuem, por exemplo, um *pró-peptídeo* N-terminal que é clivado para fornecer a proteína madura. Essas proteínas são, assim, sintetizadas como *pré-pró-proteínas*, sendo que o *pré-peptídeo* consiste no peptídeo-sinal para RE que é anteriormente clivado no RE rugoso (ver Figura 12-38). Em outros casos, as moléculas peptídeo-sinalizadoras são produzidas como *poliproteínas* que contêm múltiplas cópias da mesma sequência de aminoácidos. Em casos ainda mais complexos, uma variedade de moléculas peptídeo-sinalizadoras é sintetizada como parte de uma única poliproteína, atuando como um precursor para múltiplos produtos finais, os quais são individualmente clivados a partir da cadeia polipeptídica inicial. A mesma poliproteína pode ser processada de várias maneiras para produzir diferentes peptídeos em diferentes tipos celulares (**Figura 13-67**).

Por que o processamento proteolítico é tão comum na via secretora? Alguns dos peptídeos produzidos desta maneira, como as *encefalinas* (neuropeptídeos de cinco aminoácidos com atividades semelhantes às da morfina), são, sem sombra de dúvida, muito pequenos nas suas formas maduras para serem transportados para o lúmen do RE à medida que são traduzidos, ou para que sejam incluídos os sinais necessários para o empacotamento em vesículas secretoras. Além disso, para as enzimas hidrolíticas secretadas – ou qualquer outra proteína cuja atividade possa ser danosa à célula que a produza – o retardamento da ativação da proteína, até que esta atinja a vesícula secretora, ou até que tenha sido secretada, apresenta uma vantagem clara: evita que ela atue prematuramente dentro da célula em que foi sintetizada.

As vesículas secretoras esperam próximas à membrana plasmática até que sejam sinalizadas para liberar os seus conteúdos

Uma vez carregadas, as vesículas secretoras devem chegar ao sítio de secreção, o qual localiza-se, em algumas células, longe do aparelho de Golgi. As células nervosas representam o exemplo mais extremo. As proteínas secretoras, como os peptídeos neurotransmissores (neuropeptídeos) que devem ser liberados nas terminações nervosas no final dos axônios, são produzidas e empacotadas em vesículas no corpo celular, onde os ribossomos, o RE e o aparelho de Golgi estão localizados. Elas devem, então, viajar ao longo do axônio para as terminações nervosas, que podem estar a mais de 1 metro de distância. Como discutido no Capítulo 16, as proteínas motoras propulsionam as vesículas ao longo dos microtúbulos axônicos, cuja orientação uniforme guia as vesículas na direção apropriada. Os microtúbulos também guiam as vesículas à superfície celular para a exocitose constitutiva.

Enquanto as vesículas contendo materiais para a liberação constitutiva fusionam-se com a membrana plasmática uma vez que chegam a ela, as vesículas secretoras da via regulada esperam junto à membrana plasmática até que a célula receba um sinal para secretar e, então, ocorre a fusão. O sinal é, frequentemente, um mensageiro químico, como um hormônio, que liga receptores da superfície celular. A resultante ativação dos receptores gera sinais

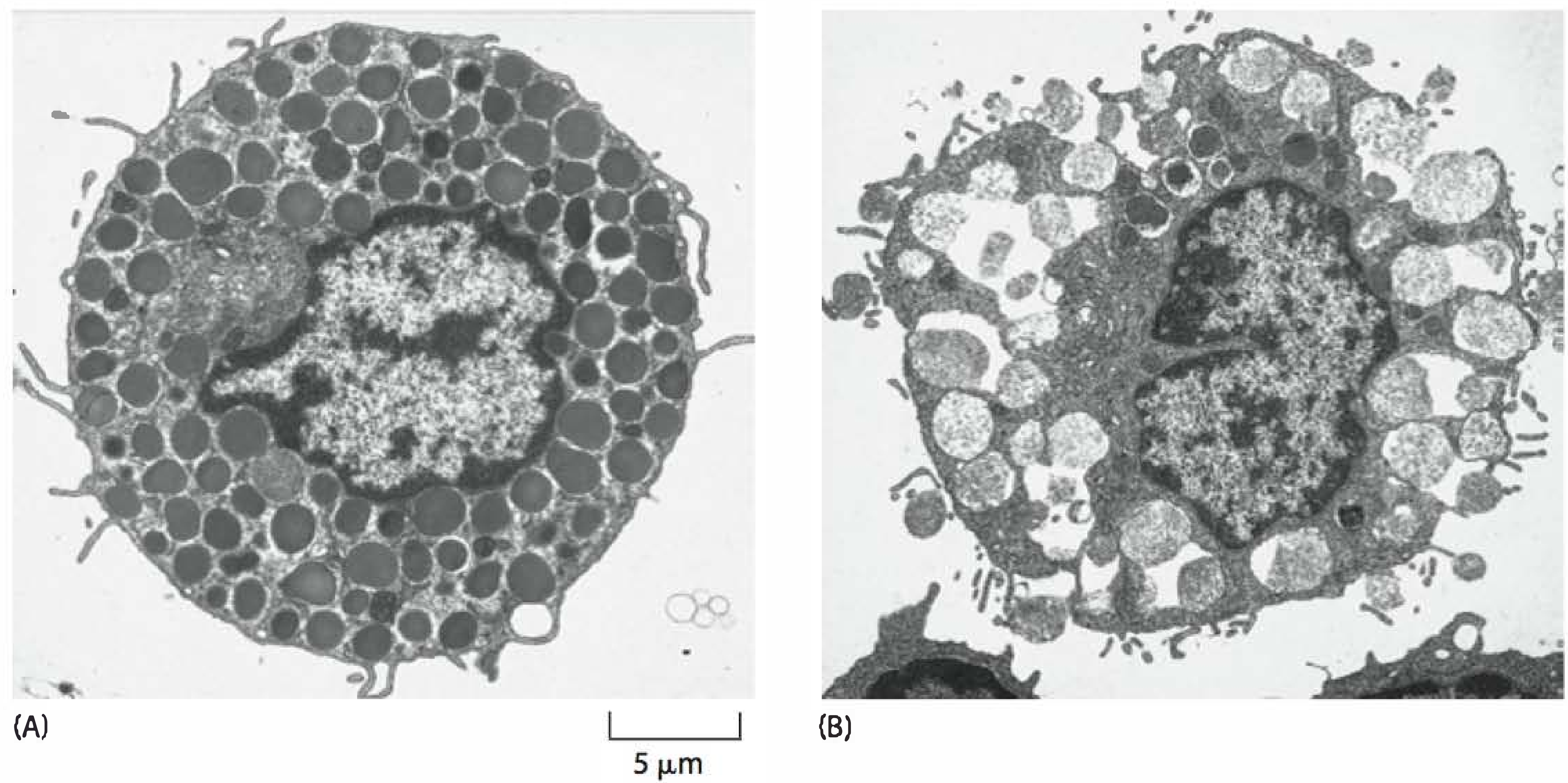


Figura 13-68 Micrografias eletrônicas da exocitose em mastócitos de ratos. (A) Um mastócito não-estimulado. (B) Esta célula foi ativada para secretar a histamina estocada por um estimulante solúvel extracelular. As vesículas de secreção contendo histamina são escuras, enquanto aquelas que liberaram os seus conteúdos são claras. O material remanescente nas vesículas gastas consiste em uma rede de proteoglicanos sobre a qual as histaminas estavam ligadas. Uma vez que uma vesícula secretora tenha fusionado com a membrana plasmática, a membrana da vesícula secretora frequentemente serve como alvo para que outras vesículas secretoras se fusionem. Portanto, a célula em (B) contém várias cavidades grandes alinhadas pelas membranas fusionadas das várias vesículas secretoras utilizadas, que estão, agora, contínuas à membrana plasmática. Esta continuidade nem sempre é aparente em um corte transversal da célula. (De D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts e M. Raff, *J. Exp. Med.* 142:391-402, 1975. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

intracelulares, frequentemente incluindo um aumento transitório da concentração de Ca^{2+} livre no citosol. Nas terminações nervosas, o sinal inicial para a exocitose normalmente é uma excitação elétrica (um potencial de ação) disparada por um transmissor químico que se liga a receptores em outros locais da mesma superfície celular. Quando o potencial de ação alcança as terminações nervosas, ele causa um influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} controlados por voltagem. A ligação dos íons de Ca^{2+} a sensores específicos desencadeia, então, a fusão das vesículas secretoras (chamadas de vesículas sinápticas) à membrana plasmática e a liberação dos seus conteúdos ao espaço extracelular (ver Figura 11-35).

A velocidade da liberação dos transmissores (levando apenas milissegundos) indica que as proteínas que medeiam a reação de fusão não sofrem rearranjos complexos de múltiplas etapas. Após as vesículas terem atracado à membrana plasmática pré-sináptica, elas sofrem uma etapa de inicialização, a qual as prepara para a fusão rápida. As SNAREs devem estar parcialmente pareadas, porém as suas hélices não devem estar totalmente enoveladas no fuso final de quatro hélices requerido para a fusão (ver Figura 13-18). Acredita-se que outras proteínas impeçam que as SNAREs completem a reação de fusão, até que o influxo de Ca^{2+} libere este bloqueio. Em uma sinapse típica, somente algumas poucas vesículas atracadas parecem estar prontas para a exocitose. O uso de somente algumas poucas vesículas de cada vez permite que cada sinapse dispare várias vezes em rápida sucessão. A cada disparo, novas vesículas sinápticas ficam prontas para substituir aquelas que se fusionaram e liberaram os seus conteúdos.

A exocitose regulada pode ser uma resposta localizada da membrana plasmática e do seu citoplasma subjacente

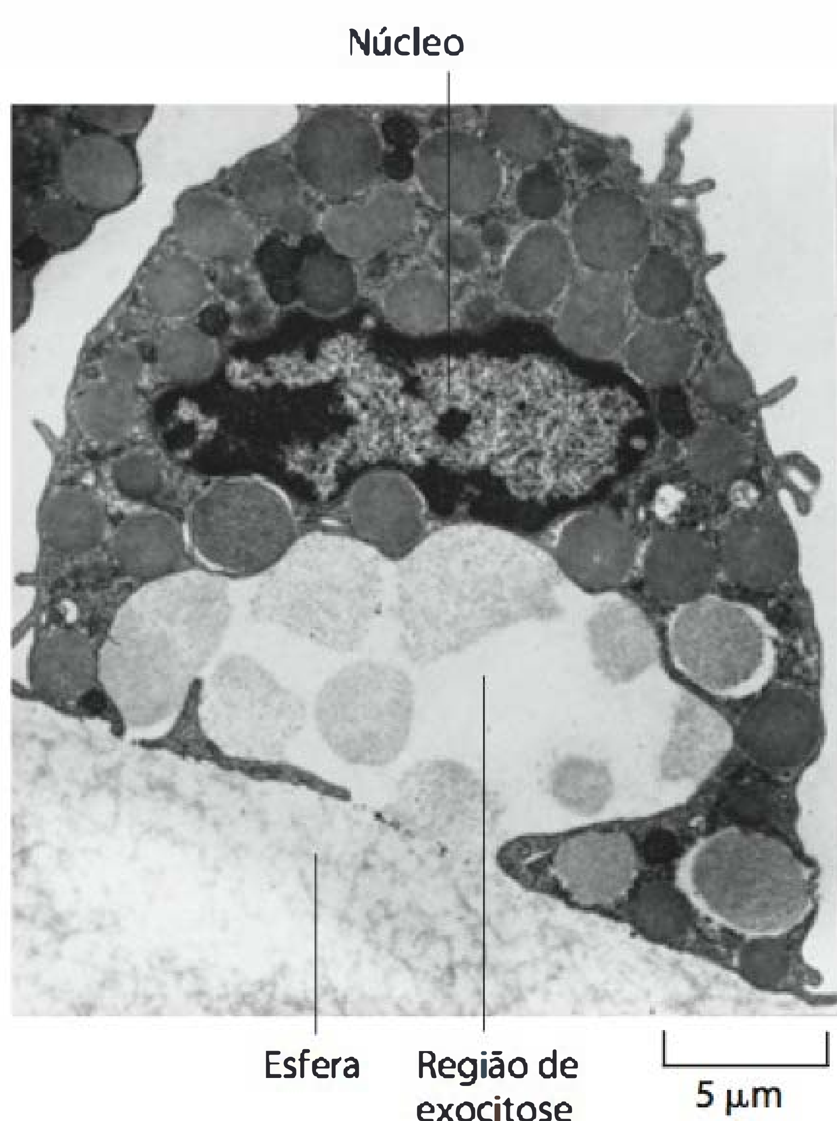


Figura 13-69 A exocitose é uma resposta localizada. Esta micrografia eletrônica mostra um mastócito que foi ativado para secretar histamina por um estimulante acoplado a uma grande esfera sólida. A exocitose ocorreu somente na região da célula que está em contato com a esfera. (De D. Lawson, C. Fewtrell e M. Raff, *J. Cell Biol.*79: 394-400, 1978. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

A histamina é uma pequena molécula secretada por *mastócitos*. Ela é liberada pela via regulada em resposta a ligantes específicos que ligam receptores da superfície celular dos mastócitos (ver Figura 25-27). A histamina é responsável por muitos dos sintomas desagradáveis que acompanham as reações alérgicas, como o prurido e os espirros. Quando os mastócitos são incubados em um fluido contendo um estimulante solúvel, uma exocitose massiva ocorre por toda a superfície celular (**Figura 13-68**). No entanto, se o ligante estimulante é artificialmente anexado a uma esfera sólida, de forma que ele possa interagir somente com uma região localizada da superfície celular dos mastócitos, a exocitose será restrita à região na qual a célula realiza contato com a esfera (**Figura 13-69**).

Esse experimento mostra que os segmentos individuais da membrana plasmática podem operar independentemente na exocitose regulada. Como resultado, o mastócito, de modo diferente da célula nervosa, não responde como um todo quando é estimulado; a ativação de receptores, os sinais intracelulares resultantes e a subsequente exocitose estão localizados na região particular da célula que foi excitada. Tal exocitose localizada permite a um linfócito assassino, por exemplo, entregar as proteínas que induzem a morte de uma única célula-alvo infectada de forma precisa, sem ameaçar as células normais vizinhas (ver Figura 25-46).

Os componentes de membrana das vesículas secretoras são rapidamente removidos da membrana plasmática

Quando uma vesícula secretora funde-se à membrana plasmática, o seu conteúdo é descarregado da célula por exocitose, e a sua membrana torna-se parte da membrana plasmática. Embora isso devesse aumentar muito a área superficial da membrana plasmática, tal fato ocorre apenas de forma transitória, porque os componentes de membrana são removidos da superfície, por endocitose, de maneira quase tão rápida quanto são adicionados pela exocitose, um processo reminiscente do ciclo de exocitose-endocitose discutido anteriormente. Após suas remoções da membrana plasmática, as proteínas das membranas das vesículas secretoras são recicladas ou transportadas aos lisossomos para degradação. A quantidade de membrana de vesículas secretoras que é temporariamente adicionada à membrana plasmática pode ser enorme: em uma célula pancreática acinaciforme que descarrega enzimas digestivas para o lúmen intestinal, cerca de 900 μm^2 de membrana de vesículas são inseridos na membrana plasmática apical (cuja área é de somente 30 μm^2) quando a célula é estimulada a secretar.

O controle do tráfego de membranas realiza, portanto, um papel principal na manutenção da composição das várias membranas da célula. Para manter cada compartimento definido por membranas nas vias secretora e endocítica em um tamanho constante, o balanço entre os fluxos progressivo e retrógrado de membranas necessita ser precisamente regulado. Para que as células cresçam, o fluxo progressivo deve ser maior do que o fluxo retrógrado, de forma que a membrana possa aumentar em área. Para que as células mantenham um tamanho constante, os fluxos progressivo e retrógrado devem ser equivalentes. Ainda sabemos pouco acerca dos mecanismos que coordenam esses fluxos.

Alguns eventos de exocitose regulada servem para aumentar a membrana plasmática

Uma importante tarefa da exocitose regulada é entregar mais membrana para aumentar a área de superfície da membrana plasmática de uma célula, quando essa necessidade aparece. Um exemplo espetacular é a expansão da membrana que ocorre durante o processo de celularização no embrião de uma mosca, o qual inicialmente se trata de uma única célula contendo aproximadamente 6.000 núcleos circundados por uma única membrana plasmática. Dentro de algumas dezenas de minutos, o embrião é convertido no mesmo número de células. Este processo de celularização requer uma vasta quantidade de membrana plasmática nova, a qual é adicionada por uma cuidadosa e orquestrada fusão de vesículas que acaba por formar as membranas plasmáticas que delimitam as células separadas. Eventos similares de fusão de vesículas são necessários para aumentar a membrana plasmática nos sulcos de clivagem de outras células animais e vegetais durante a *citocinese*, o processo pelo qual as duas células-filhas se separam após a mitose (discutido no Capítulo 17).

Muitas células, especialmente aquelas sujeitas a estresse mecânico, frequentemente experimentam pequenas rupturas em suas membranas plasmáticas durante suas vidas. Em um surpreendente processo possivelmente envolvido na fusão homotípica vesícula-vesícula e na exocitose, um segmento temporário da superfície celular é rapidamente modelado a partir de fontes de membrana interna localmente disponíveis, como os lisossomos. Além de proporcionar uma barreira de emergência contra vazamentos, o segmento também auxilia a reduzir a tensão da membrana sobre a área injuriada, permitindo que a bicamada "normal" aproxime-se para restaurar a continuidade e selar a ruptura. No reparo da injúria, a fusão e a exocitose de vesículas são desencadeadas pelo aumento repentino de Ca^{2+}, o qual é abundante no espaço extracelular e vai rapidamente para dentro das células logo que a membrana é perfurada. A **Figura 13-70** mostra três exemplos nos quais a exocitose regulada leva à expansão da membrana plasmática.

As células polarizadas direcionam as proteínas da rede *trans* de Golgi para o domínio apropriado da membrana plasmática

A maioria das células nos tecidos é *polarizada* e possui dois (e algumas vezes mais) domínios distintos de membrana plasmática que são alvos de diferentes tipos de vesículas. Isso

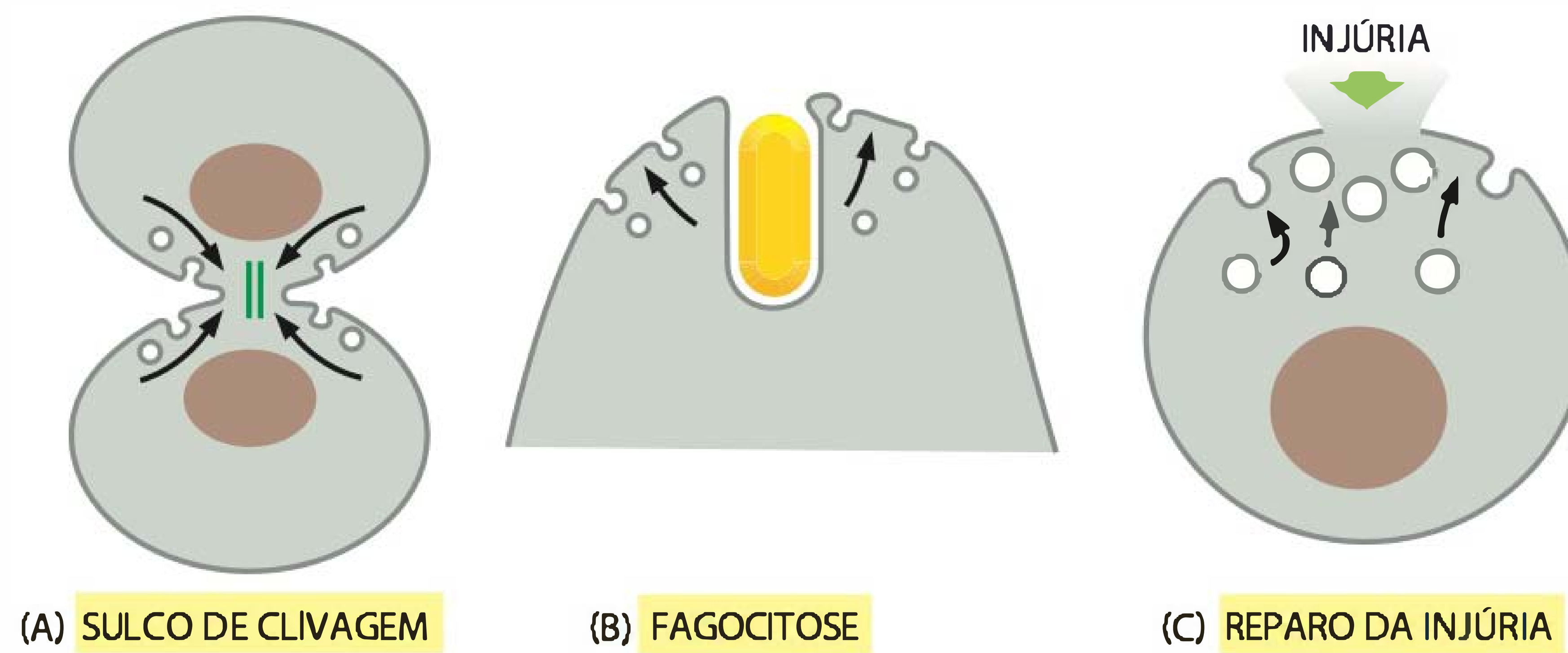


Figura 13-70 Três exemplos de exocitose regulada que levam ao aumento da membrana plasmática. (A, B) Acredita-se que as vesículas que se fundem com a membrana plasmática durante a citocinese e a fagocitose sejam derivadas dos endossomos, ao passo que (C) aquelas envolvidas no reparo de injúrias sejam derivadas dos lisossomos. O reparo de injúrias na membrana plasmática é muito importante em células sujeitas a estresses mecânicos, como as células nervosas.

levanta o problema genérico de como é organizada a entrega de membranas do aparelho de Golgi de forma a manter as diferenças entre um domínio superficial celular e outro. Uma célula epitelial típica possui um *domínio apical* que está voltado para a cavidade interna ou para o mundo externo e, frequentemente, tem características especializadas, como cílios, ou uma borda em escova de microvilosidades; ela também possui um *domínio basolateral*, que cobre o resto da célula. Os dois domínios estão separados por um anel de *junções compactas* (ver Figura 19-24), que previne as proteínas e os lipídeos (da lâmina externa da bicamada lipídica) de se difundirem entre os dois domínios, de maneira que as composições de ambos permaneçam diferentes.

Uma célula nervosa é outro exemplo de célula polarizada. A membrana plasmática do seu axônio e das suas terminações nervosas é especializada em sinalizar para outras células, enquanto a membrana plasmática do seu corpo celular e dos dendritos é especializada em receber sinais de outras células nervosas. Os dois domínios têm composições proteicas distintas. Estudos do tráfego de proteínas em células nervosas em cultura sugerem que, quanto ao transporte vesicular da rede *trans* de Golgi para a superfície celular, a membrana plasmática do corpo e dos dendritos da célula nervosa assemelha-se à membrana basolateral de uma célula epitelial polarizada, enquanto a membrana plasmática do axônio e das terminações nervosas assemelha-se à membrana apical de tal célula (**Figura 13-71**). Assim, algumas das proteínas que são direcionadas para um domínio específico na célula epitelial também são direcionadas ao domínio correspondente de células nervosas.

Diferentes estratégias guiam lipídeos e proteínas de membrana seletivamente aos domínios corretos da membrana plasmática

Em princípio, as diferenças entre os domínios da membrana plasmática não precisam depender da entrega direcionada dos componentes apropriados de membrana. Ao contrário, os componentes de membrana poderiam ser entregues a todas as regiões da superfície celular indiscriminadamente, para então serem seletivamente estabilizados em algumas localizações e seletivamente eliminados de outras. Embora essa estratégia de entrega aleatória seguida da retenção ou da remoção seletivas pareça ser utilizada em certos casos, as entregas frequentemente são direcionadas de forma específica para o domínio de membrana apropriado. As células epiteliais, por exemplo, geralmente secretam um conjunto de produtos – como enzimas digestivas ou muco em células intestinais – pelas suas superfícies apicais e um outro conjunto de produtos – como componentes da lâmina basal – pelas superfícies basolaterais. Assim, as células devem ser dotadas de maneiras de direcionar vesículas que carreguem diferentes cargas para os diferentes domínios da membrana plasmática.

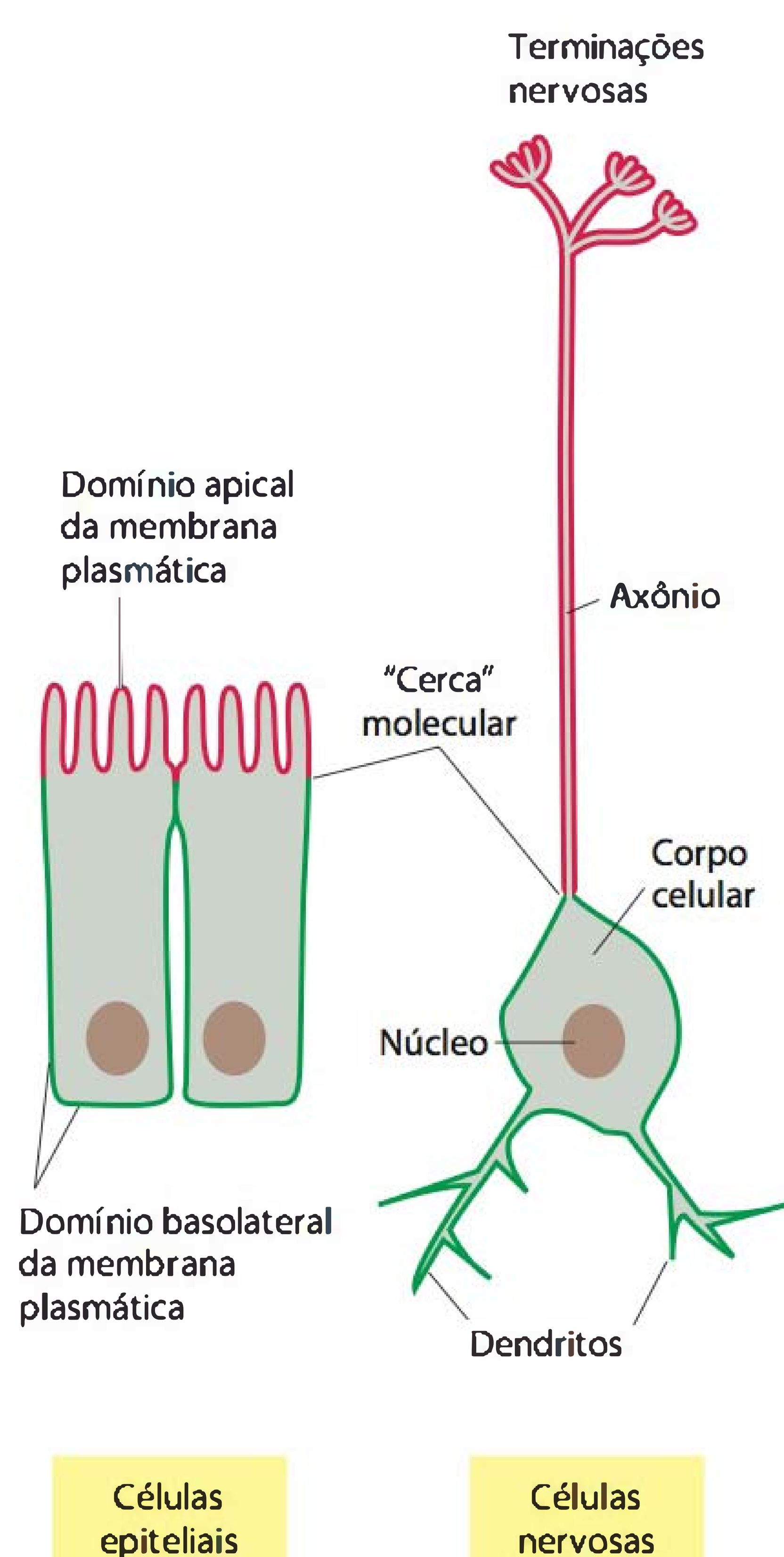


Figura 13-71 Comparação entre dois tipos de células polarizadas. Em termos de mecanismos utilizados para direcionar proteínas, a membrana plasmática do corpo e dos dendritos da célula nervosa assemelha-se à membrana plasmática basolateral de uma célula epitelial polarizada, enquanto a membrana plasmática do axônio e das terminações nervosas assemelha-se ao domínio apical de uma célula epitelial. Os diferentes domínios de membrana de ambas as células, epitelial e nervosa, estão separados por uma barreira molecular, consistindo em uma malha ou em uma rede de proteínas de membrana intimamente associada ao citoesqueleto de actina interno; esta barreira – chamada de junção compacta na célula epitelial e de estreito axônico em neurônios – impede as proteínas de membrana de se difundirem entre os dois domínios distintos.

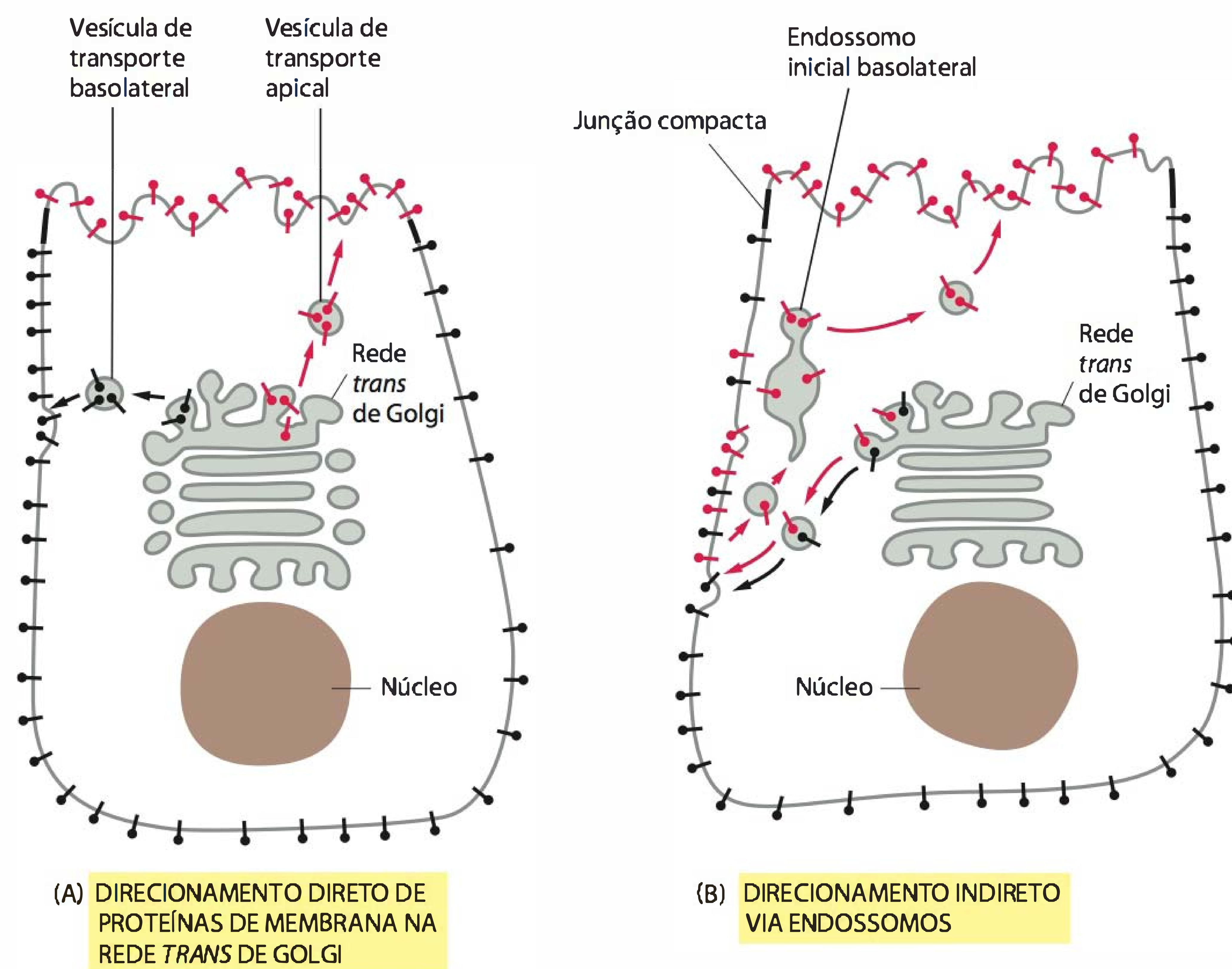


Figura 13-72 Duas vias de distribuição de proteínas de membrana em uma célula epitelial polarizada. As proteínas recém-sintetizadas podem alcançar os seus domínios apropriados da membrana plasmática por (A) uma via direta e específica ou (B) uma via indireta. Na via indireta, uma proteína é retirada do domínio inapropriado da membrana plasmática por endocitose e transportada para o domínio correto por meio de endossomos iniciais – isto é, por transcitose. A via indireta é utilizada em hepatócitos (fígado) para entregar proteínas ao domínio apical que alinha ductos biliares. Entretanto, em outros casos, é utilizada a via direta, como no caso do mecanismo dependente das plataformas lipídicas nas células epiteliais, descrito no texto.

Ao examinar-se células epiteliais polarizadas em cultura, descobriu-se que as proteínas do RE destinadas aos diferentes domínios viajam juntas até que atinjam a TGN. Nesse local, elas são separadas e despachadas em vesículas secretoras ou de transporte para o domínio apropriado da membrana plasmática (**Figura 13-72**).

A membrana plasmática apical da maioria das células epiteliais é altamente enriquecida em glicoesfingolipídeos, os quais ajudam a proteger esta superfície exposta contra danos – por exemplo, das enzimas digestivas e do baixo pH em locais como o intestino e o estômago, respectivamente. Similarmente, as proteínas de membrana plasmática que são ligadas à bicamada lipídica por uma âncora de GPI (discutido no Capítulo 12) são encontradas predominantemente na membrana plasmática apical. Se técnicas de DNA recombinante fossem utilizadas para anexar GPI à proteína que normalmente seria entregue à superfície basolateral, ao invés disso, a proteína seria entregue à superfície apical. Acredita-se que as proteínas ancoradas por GPI sejam direcionadas à membrana apical porque se associam a esfingolipídeos em plataformas de lipídeos que se formam na membrana da TGN. Como discutido no Capítulo 10, as plataformas de lipídeos formam-se na TGN e na membrana plasmática quando glicoesfingolipídeos e colesterol se autoassociam em microagregados (ver Figura 10-14). Tendo selecionado um único conjunto de moléculas-carga, as plataformas, então, brotam da rede *trans* de Golgi em vesículas de transporte destinadas à membrana plasmática apical. Logo, de maneira similar à divisão seletiva de algumas proteínas de membrana em domínios lipídicos especializados nos cavéolos da membrana plasmática, os domínios lipídicos também participam no direcionamento das proteínas na TGN.

As proteínas de membrana destinadas à membrana basolateral contêm sinais de distribuição em suas caudas citoplasmáticas. Quando presentes em um contexto estrutural apropriado, esses aminoácidos são reconhecidos por proteínas de revestimento que os empacotam em vesículas de transporte apropriadas na TGN. Os mesmos sinais basolaterais que são reconhecidos na TGN também funcionam nos endossomos, para redirecionar as proteínas de volta à membrana plasmática basolateral, após elas terem sido endocitadas.

As vesículas sinápticas podem formar-se diretamente a partir de vesículas endocíticas

As células nervosas (e algumas células endócrinas) contêm dois tipos de vesículas secretoras. Assim como para as células secretoras, essas células empacotam proteínas e peptídeos em

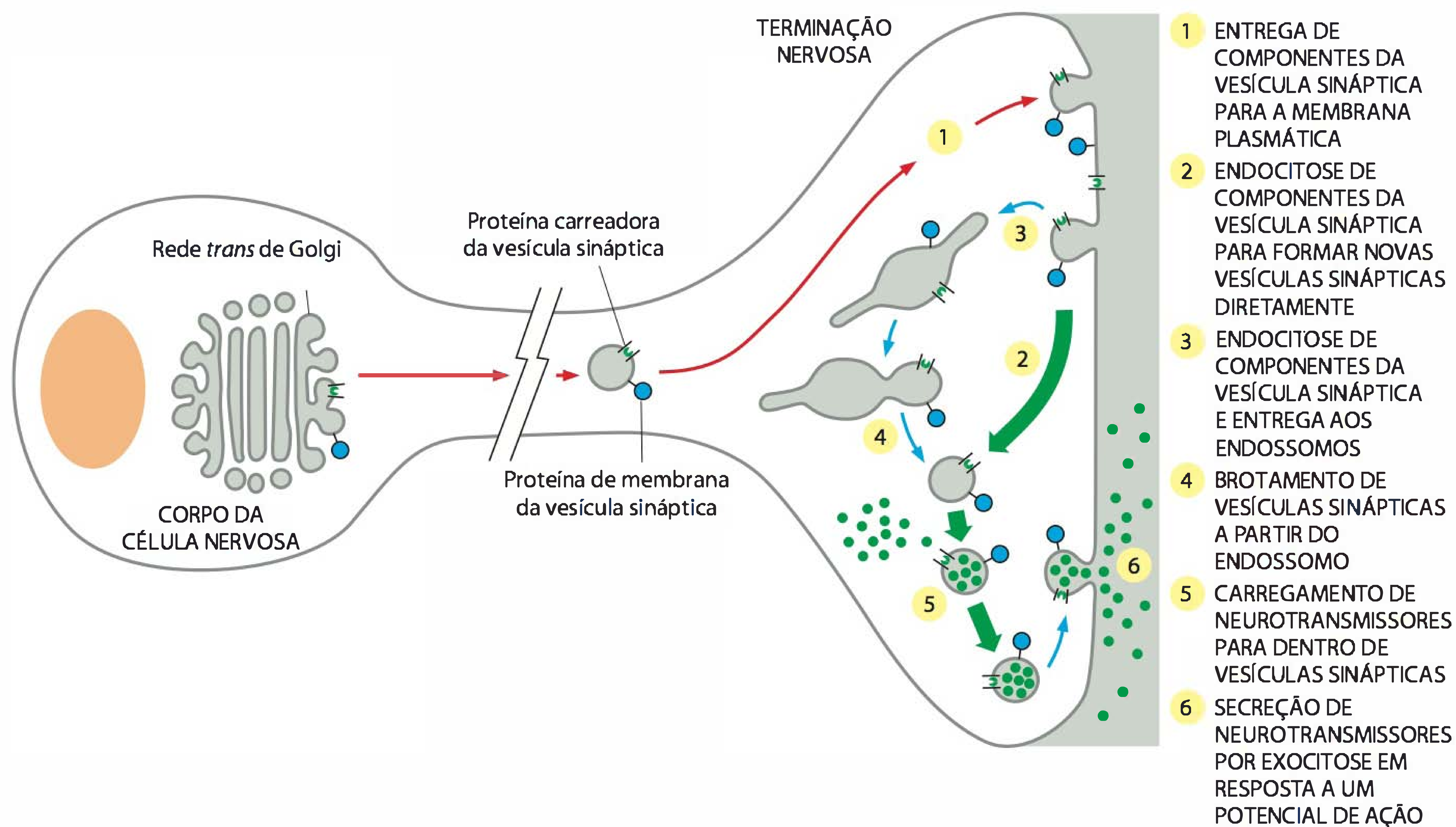


Figura 13-73 Formação de vesículas sinápticas. Estas vesículas minúsculas e uniformes são encontradas somente nas células nervosas e em algumas células endócrinas, onde elas estocam e secretam pequenas moléculas neurotransmissoras. A importação de neurotransmissores diretamente para dentro das pequenas vesículas endocíticas que se formam a partir da membrana plasmática é mediada por proteínas carreadoras de membrana que funcionam como antiportos, sendo dirigidas por um gradiente de H^+ mantido por bombas de prótons na membrana da vesícula.

vesículas secretoras de núcleos densos da maneira padrão para a liberação pela via secretora regulada. Adicionalmente, entretanto, elas fazem uso de uma outra classe especializada de minúsculas (~50 nm de diâmetro) vesículas secretoras chamadas de **vesículas sinápticas**, as quais são geradas de uma forma diferente. Nas células nervosas, essas vesículas estocam pequenas moléculas neurotransmissoras, como acetilcolina, glutamato, glicina e ácido γ-aminobutírico (GABA, *γ-aminobutyric acid*), que medeiam a rápida sinalização de célula a célula nas sinapses químicas. Como discutido anteriormente, as vesículas são induzidas a liberar seus conteúdos dentro de uma fração de milissegundo, quando um potencial de ação atinge uma terminação nervosa. Alguns neurônios disparam mais de mil vezes por segundo, liberando neurotransmissores a cada vez. Esta rápida liberação é possível graças ao fato de algumas vesículas estarem atracadas e iniciadas para a fusão, que irá ocorrer somente quando um potencial de ação causar um influxo de Ca^{2+} para dentro da terminação nervosa.

Somente uma pequena proporção das vesículas sinápticas das terminações nervosas funde-se à membrana plasmática em resposta a cada potencial de ação. Porém, para que a terminação nervosa responda de modo rápido e repetitivo, as vesículas necessitam ser repostas muito rapidamente após suas descargas. Portanto, a maioria das vesículas sinápticas não é gerada a partir da membrana de Golgi no corpo da célula nervosa, mas pela reciclagem local da membrana plasmática nas terminações nervosas. Acredita-se que os componentes de membrana das vesículas sinápticas sejam inicialmente entregues à membrana plasmática pela via secretora constitutiva e, então, retirados por endocitose. Mas, ao invés de se fusionarem com endossomos, a maioria das vesículas endocíticas é imediatamente preenchida com neurotransmissores para se tornarem vesículas sinápticas.

Os componentes de membrana de uma vesícula sináptica incluem proteínas transportadoras especializadas na captação de neurotransmissores a partir do citosol, onde as pequenas moléculas neurotransmissoras que medeiam a rápida sinalização sináptica são sintetizadas. Uma vez preenchidas com neurotransmissores, as vesículas retornam à membrana plasmática, onde aguardam até que a célula seja estimulada. Após terem liberado os seus conteúdos, os seus componentes de membrana são retirados da mesma maneira e utilizados novamente (**Figura 13-73**).

Como as vesículas sinápticas são abundantes e relativamente uniformes em tamanho, elas podem ser purificadas em grandes números e, consequentemente, são as organelas melhor caracterizadas da célula. Meticulosas análises de proteômica quantitativa identificaram todos os componentes de uma vesícula sináptica (**Figura 13-74**).

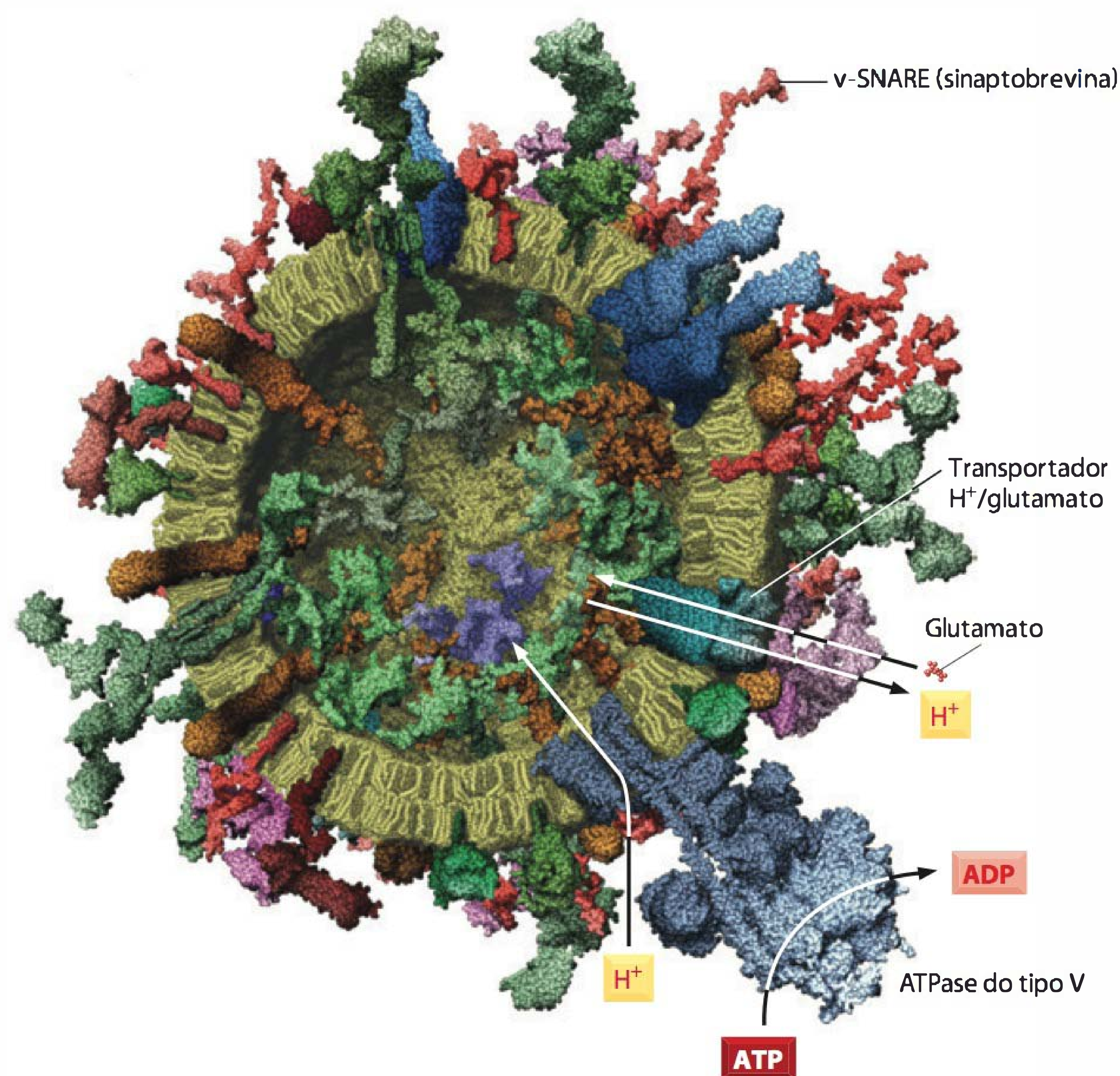


Figura 13-74 Modelo em escala de uma vesícula sináptica. A ilustração mostra uma secção através de uma vesícula sináptica, na qual proteínas e lipídeos estão desenhados em escala, com base nas suas estequiometrias conhecidas e também em suas estruturas conhecidas ou aproximadas. Apenas 70% das proteínas de membrana que estima-se estarem presentes na membrana estão representadas; um modelo completo iria, portanto, mostrar uma membrana ainda mais aglomerada do que esta figura sugere. Cada membrana de vesícula sináptica contém 7.000 moléculas de fosfolipídeos e 5.700 moléculas de colesterol. Cada uma também contém próximo a 50 moléculas de proteínas integrais de membrana, as quais variam largamente em sua abundância relativa e juntas contribuem para cerca de 600 hélices α transmembrana. A v-SNARE sinaptobrevina é a proteína mais abundante na vesícula (~70 cópias/vesícula). Devido a sua estrutura filamentosa, ela se estende da densa floresta de domínios proteicos citosólicos, os quais quase cobrem completamente a superfície das vesículas. Em contraste, a ATPase do tipo V, que utiliza a hidrólise de ATP para bombear H^+ para o lúmen da vesícula, está presente em 1 a 2 cópias por vesícula. O gradiente de H^+ fornece a energia para a importação dos neurotransmissores por um antiporte H^+/neurotransmissor, o qual carrega cada vesícula com 1.800 moléculas de neurotransmissores, como o glutamato, um dos quais está representado em escala. (Adaptada de S. Takamori et al., *Cell*, 127:831-846, 2006. Com permissão de Elsevier.)

Resumo

As células podem secretar proteínas por exocitose de maneira constitutiva ou regulada. Enquanto as vias reguladas operam somente em células secretoras especializadas, a via secretora constitutiva opera em todas as células eucarióticas, sendo caracterizada por um contínuo transporte vesicular da TGN para a membrana plasmática. Nas vias reguladas, as moléculas são estocadas tanto em vesículas secretoras como em vesículas sinápticas, as quais não se fundem à membrana plasmática para liberar os seus conteúdos até que um sinal apropriado seja recebido. As vesículas secretoras contendo proteínas para secreção brotam da rede trans *de Golgi. As proteínas secretoras que elas contêm tornam-se concentradas durante a formação e a maturação das vesículas secretoras. As vesículas sinápticas, confinadas às células nervosas e a algumas células endócrinas, formam-se a partir de vesículas endocíticas e de endossomos e são responsáveis pela secreção regulada de pequenas moléculas neurotransmissoras.*

As proteínas são entregues da TGN para a membrana plasmática pela via constitutiva a menos que sejam desviadas para outras vias ou retidas no aparelho de Golgi. Em células polarizadas, as vias de transporte da TGN para a membrana plasmática operam seletivamente para assegurar que diferentes conjuntos de proteínas de membrana, proteínas secretadas e lipídeos sejam entregues a diferentes domínios da membrana plasmática.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmativas estão corretas? Justifique.

13-1 Em todos os eventos envolvendo fusão de uma vesícula à membrana-alvo, a lâmina citosólica da vesícula e as bicamadas-alvo sempre fundem-se juntas, como o fazem as lâminas que não estão em contato com o citosol.

13-2 Existe uma exigência rigorosa para a saída de uma proteína do RE: ela deve estar conformada corretamente.

13-3 Todas as glicoproteínas e glicolipídeos das membranas intracelulares possuem suas cadeias de oligossacarídeos voltadas para o lúmen, e todas aquelas da membrana plasmática possuem suas cadeias de oligossacarídeos voltadas para o exterior celular.

13-4 Durante a transcitose, as vesículas que se formam a partir de fossas revestidas na superfície apical fundem-se com a membrana plasmática da superfície basolateral e, dessa forma, transportam moléculas através do epitélio.

Discuta as seguintes questões.

13-5 Em uma célula que não se divide, como as células do fígado, por que o fluxo de membrana entre os compartimentos deve ser balanceado, de modo que as vias de recuperação e de saída sejam equivalentes? Você esperaria o mesmo fluxo balanceado em uma célula epitelial do intestino, a qual está se dividindo ativamente?

13-6 As leveduras e muitos outros organismos fazem um único tipo de cadeia pesada de clatrina e um único tipo de cadeia leve de clatrina; logo, eles produzem um único tipo de revestimento de clatrina. Como é que, então, um único revestimento de clatrina pode ser utilizado para três vias diferentes de transporte – Golgi para endossomos tardios, membrana plasmática para endossomos iniciais e vesículas secretoras imaturas para Golgi – que envolvem diferentes proteínas-carga especializadas?

13-7 Como pode ser verdade que pares complementares de SNAREs específicas marquem exclusivamente as vesículas e suas membranas-alvo? Após a fusão da vesícula, a membrana-alvo irá conter uma mistura de t-SNAREs e v-SNAREs. Inicialmente, essas SNAREs serão fortemente ligadas umas às outras, mas a NSF pode separá-las, reativando-as. O que você supõe que previna as membranas-alvo de acumularem uma população de v-SNAREs igual ou maior que as suas populações de t-SNAREs?

13-8 Os vírus são oportunistas insuperáveis – uma consequência inevitável dos seus pequenos genomas. Sempre que possível, eles fazem uso das maquinarias da célula para cumprir as etapas envolvidas na sua própria reprodução. Muitos vírus diferentes possuem revestimento de membrana. Estes assim chamados vírus envelopados ganham acesso ao citosol ao fusionarem-se à membrana plasmática. O que você supõe ser o motivo para cada um destes vírus codificar sua própria proteína de fusão especial, ao invés de fazer uso das SNAREs de uma célula?

13-9 Para que ocorra a fusão de uma vesícula com sua membrana-alvo, as membranas devem ser aproximadas a uma distância de 1,5 nm, de modo que as duas bicamadas possam se juntar (**Figura Q13-1**). Assumindo que as porções relevantes de duas membranas no local de fusão sejam regiões circulares de 1,5 nm de diâmetro, calcule o número de moléculas de água que poderiam permanecer entre as membranas. (A água é 55,5 M e o volume de um cilindro é $\pi r^2 h$.) Dado que um fosfolipídeo ocupa em média uma área de 0,2 nm^2 de superfície da membrana, quantos fosfolipídeos deveriam estar presentes em cada uma das monocamadas opostas no local da fusão? Há moléculas de água suficientes para se ligarem aos grupos de cabeça hidrofílicos deste número de fosfolipídeos? (Estima-se que 10 a 12 moléculas de água estejam normalmente associadas a cada grupo de cabeça de fosfolipídeo, na superfície exposta da membrana.)

13-10 As SNAREs existem como parceiros complementares que conduzem as fusões de membrana entre vesículas apropriadas e suas membranas-alvo. Dessa forma, uma vesícula com uma variedade particular de v-SNARE irá fusionar-se somente com a membrana que carregar a t-SNARE complementar. Em alguns casos, no entanto, fusões de membranas idênticas (fusões homotípicas) são conhecidas. Por exemplo, quando uma célula de levedura forma um broto, as vesículas derivadas do vacúolo da célula-mãe movem-se para dentro do broto para formar um novo vacúolo. Essas vesículas carregam tanto v-SNAREs, quanto t-SNAREs. Os dois tipos de SNAREs são essenciais para esse evento de fusão homotípica?

Para testar essa circunstância, você desenvolveu um engenhoso ensaio para fusão de vesículas vacuolares. Você prepara vesículas de duas linhagens mutantes diferentes de leveduras: a linhagem B é defectiva no gene que codifica a fosfatase alcalina nuclear (Pase, *phosphatase*); a linhagem A é defectiva na protease que converte o precursor da fosfatase alcalina (pró-Pase) em sua forma ativa (Pase) (**Figura Q13-2**A). Nenhuma das linhagens possui fosfatase alcalina ativa, porém, quando os extratos das linhagens são misturados, a fusão de vesículas produz uma fosfatase alcalina ativa, a qual pode ser facilmente mensurada (Figura Q13-2).

Agora você deleta os genes codificantes da v-SNARE vacuolar, da t-SNARE, ou de ambas em cada uma das duas linhagens de levedura. Você prepara vesículas vacuolares de cada uma e as testa quanto à capacidade de fusão, pela medida da atividade da fosfatase alcalina (Figura Q13-2B).

O que estes dados revelam sobre as necessidades das v-SNAREs e t-SNAREs na fusão de vesículas vacuolares? É importante qual tipo de SNARE está em que vesícula?

13-11 Se você fosse remover o sinal de recuperação para o RE da proteína dissulfeto-isomerase (PDI, *protein disulfide isomerase*), a qual normalmente é uma proteína solúvel residente no lúmen do RE, onde você esperaria que a PDI modificada iria localizar-se?

13-12 O receptor de KDEL deve ir e voltar entre o RE e o aparelho de Golgi para cumprir sua tarefa de assegurar que proteínas solúveis do RE fiquem retidas no lúmen do RE. Em qual compartimento o receptor de KDEL liga seus ligantes mais fortemente? Em qual compartimento ele liga seus ligantes mais fracamente? O que se supõe ser a base para suas afinidades diferentes de ligação nos dois compartimentos? Se você fosse projetar o sistema, em qual compartimento você teria a maior concentração de receptores de KDEL? Você diria que o receptor de KDEL, o qual é uma proteína transmembrana, possuiria, ele mesmo, um sinal de recuperação para RE?

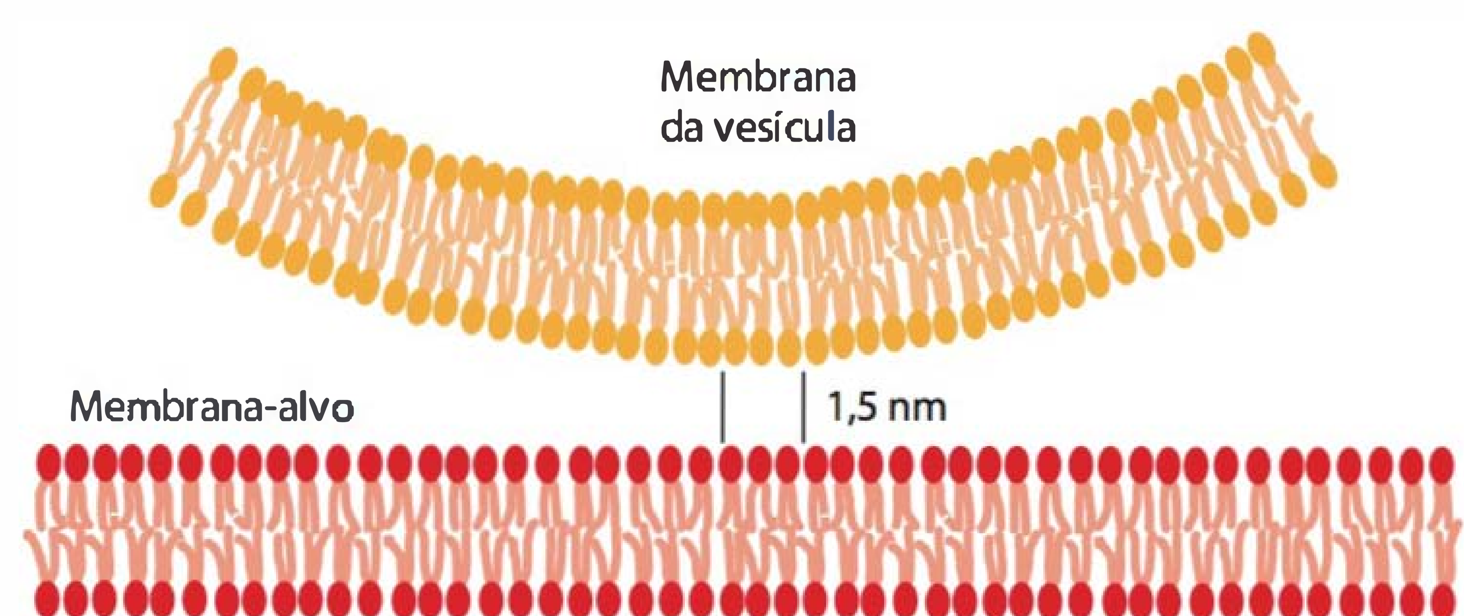
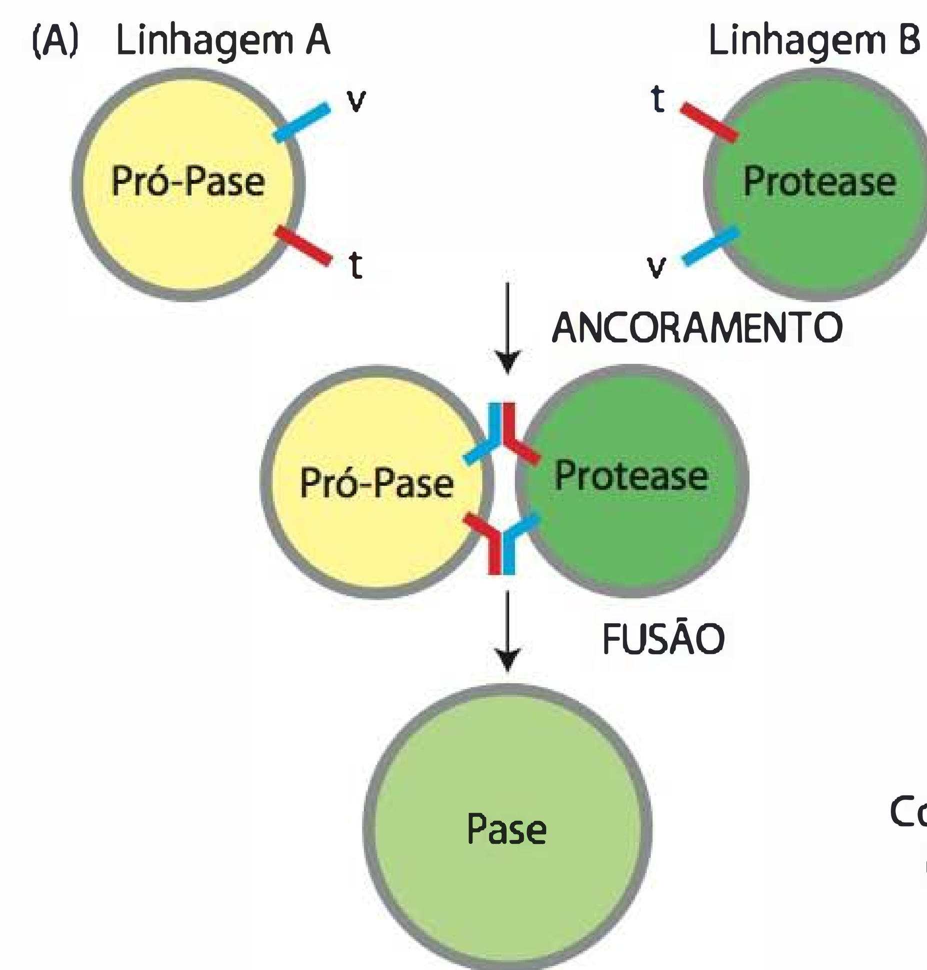


Figura Q13-1 Aproximação de uma vesícula e sua membrana-alvo em preparação para fusão (Questão 13-9).



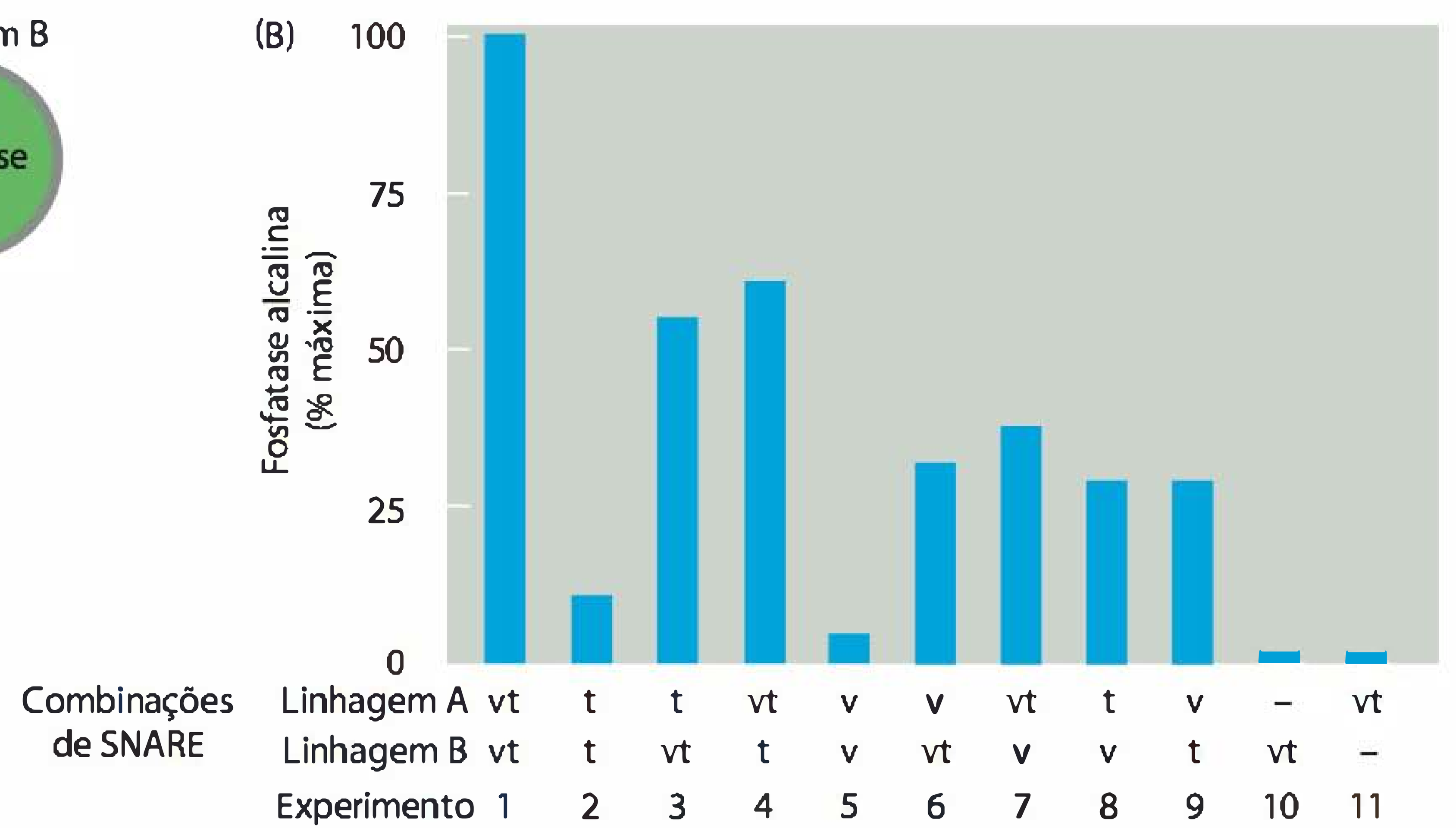


Figura Q13-2 Condições das SNAREs para fusão de vesículas (Questão 13-10). (A) Esquema para medir a fusão de vesículas vacuolares. (B) Resultados das fusões de vesículas com diferentes combinações de v-SNAREs e t-SNAREs. As SNAREs presentes nas vesículas das duas linhagens estão indicadas como v (v-SNARE) e t (t-SNARE).

13-13 Como o baixo pH dos lisossomos protege o resto da célula das enzimas lisossômicas no caso de rupturas dos lisossomos?

13-14 Os melanossomos são lisossomos especializados que armazenam pigmentos para a liberação eventual por exocitose. Várias células, como células da pele e do cabelo, capturam, então, o pigmento, o qual contribui para a sua pigmentação característica. Mutantes de camundongo que possuem melanossomos defectivos frequentemente possuem cores pálidas ou incomuns de pelagem. Um destes camundongos de cor clara, o camundongo *Mocha* (**Figura Q13-3**), possui um defeito no gene codificador da AP3, uma das subunidades do complexo adaptador proteico, o qual está associado ao brotamento de vesículas revestidas a partir da rede *trans* de Golgi. Como a perda de AP3 pode causar um defeito nos melanossomos?



Figura Q13-3 Um camundongo normal e um camundongo *Mocha* (Questão 13-14). Além de sua cor clara de pelagem, o camundongo *Mocha* possui um privado senso de equilíbrio. (Cortesia de Margit Burmeister.)

13-15 Pacientes com a síndrome de Hunter ou com a síndrome de Hurler raramente vivem além de suas adolescências. Esses pacientes acumulam glicosaminoglicanos nos lisossomos devido à falta de enzimas lisossômicas específicas necessárias a sua degradação. Quando células dos pacientes com as duas síndromes são fusionadas, os glicosaminoglicanos são degradados apropriadamente, indicando que as células são deficientes em diferentes enzimas de degradação. Mesmo que as células tenham sido cultivadas juntas por pouco tempo, elas ainda corrigem os defeitos uma da outra. O mais surpreendente é que o meio de cultura das células Hurler corrige o defeito das células Hunter (e vice-versa). Os fatores corretivos no meio são inativados pelo tratamento com proteases, pelo tratamento com periodato, o qual destrói carboidratos, e pelo tratamento com fosfatase alcalina, a qual remove fosfatos.

A. O que você supõe que sejam os fatores corretivos? Começando com as células do paciente doador, descreva a via pela qual os fatores alcançam o meio e subsequentemente entram nas células receptoras para corrigir os defeitos lisossômicos.

B. Por que você acredita que os tratamentos com protease, periodato e fosfatase alcalina inativam os fatores corretivos?

C. Você esperaria que um tipo similar de esquema de correção funcionasse para enzimas citosólicas mutantes?

13-16 Um macrófago ingere o equivalente a 100% de sua membrana plasmática a cada meia hora por endocitose. Qual é a taxa na qual a membrana é retornada por exocitose?

13-17 As células capturam moléculas extracelulares por endocitose mediada por receptores e por endocitose de fase fluida. Um artigo clássico comparou a eficiência destas duas vias incubando células humanas por vários períodos e em um intervalo de concentrações, com o EGF marcado com ^{125}I, para medir a endocitose mediada por receptores, ou com a peroxidase de rábano silvestre (HRP, *horseradish peroxidase*), para medir a endocitose de fase fluida. Tanto o EGF quanto a HRP foram encontrados em vesículas pequenas com raio interno de 20 nm. A absorção de HRP foi linear (**Figura Q13-4A**), enquanto a de EGF foi inicialmente linear, mas alcançou um platô em altas concentrações (Figura Q13-4B).

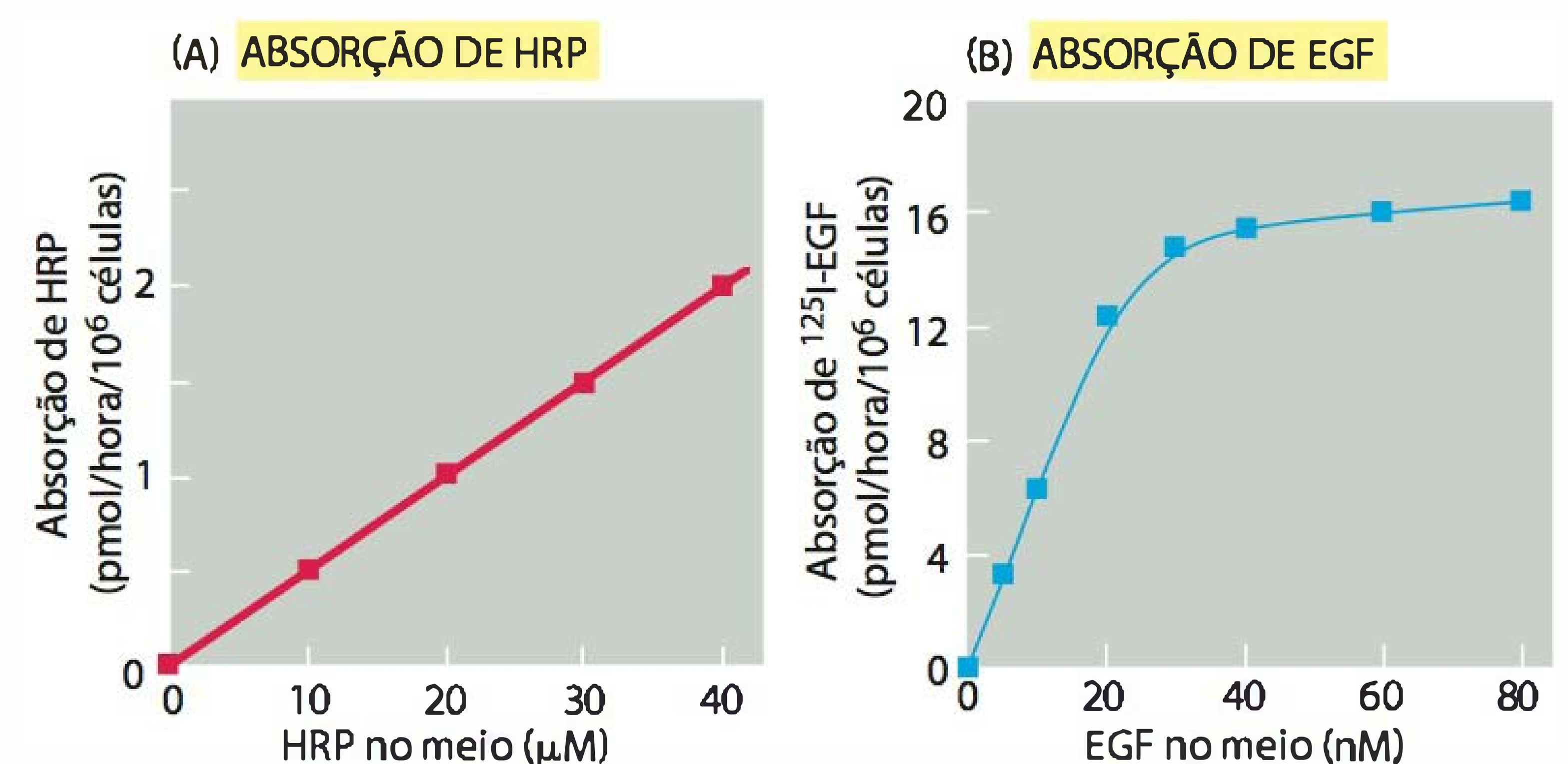


Figura Q13-4 Absorção de HRP e EGF como uma função de suas concentrações no meio (Questão 13-17).

A. Explique por que os formatos das curvas na Figura Q13-4 são diferentes para HRP e EGF.

B. Das curvas na Figura Q13-4, estime a diferença nas taxas de absorção para HRP e EGF quando ambos estão presentes a 40 nM. Qual seria a diferença se ambos estivessem presentes a 40 μM?

C. Calcule o número médio de moléculas de HRP que são capturadas por cada vesícula endocítica (raio de 20 nm) quando o meio contém HRP a 40 μM. (O volume da esfera é $[4/3]\pi r^3$.)

D. Os cientistas que realizaram estes experimentos disseram, à época, "estes cálculos claramente ilustram como as células podem internalizar EGF por endocitose ao passo que excluem quase tudo, exceto quantidades insignificantes de fluido extracelular". O que você acha que eles quiseram expressar?

REFERÊNCIAS

Gerais

Bonifacino JS & Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153–66.

Mellman I & Warren G (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100:99–112.

Pelham HR (1999) The Croonian Lecture 1999. Intracellular membrane traffic: getting proteins sorted. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1471–1478.

Rothman JE & Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227–234.

Schekman RW (1994) Regulation of membrane traffic in the secretory pathway. *Harvey Lect* 90:41–57.

Os mecanismos moleculares do transporte de membranas e a manutenção da diversidade de compartimentos

Di Paolo G & De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657.

Grosshans BL, Ortiz D & Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11821–11827.

Gurkan C, Stagg SM & Balch WE (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:727–738.

Jahn R & Scheller RH (2006) SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:631–643.

Kirchhausen T (2000) Three ways to make a vesicle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1:187–198.

McNew JA, Parlati F, Sollner T & Rothman JE (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407:153–159.

Pfeffer SR (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature Cell Biol* 1:E17–E22.

Robinson MS & Bonifacino JS (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13:444–453.

Seaman MN (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* 15:68–75.

Springer S, Spang A & Schekman RW (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* 97:145–148.

Transporte a partir do retículo endoplasmático através do aparelho de Golgi

Bannykh SI, Nishimura N & Balch WE (1998) Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* 8:21–25.

Ellgaard L & Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:181–191.

Farquhar MG & Palade GE (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 8:2–10.

Glick BS (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 12:450–456.

Ladinsky MS, Mastronarde DN et al (1999) Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* 144:1135–1149.

Lee MC, Miller EA, Goldberg J et al (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87–123.

Pelham HR & Rothman JE (2000) The debate about transport in the Golgi—two sides of the same coin? *Cell* 102:713–719.

Warren G & Malhotra V (1998) The organisation of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 10:493–498.

Wells L & Hart GW (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* 546:154–158.

Zeuschner D, Geerts WJ & Klumperman J (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nature Cell Biol* 8:377–383.

Transporte a partir da rede *trans* de Golgi para os lisossomos

Andrews NW (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* 10:316–321.

de Duve C (2005) The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biol* 7:847–849.

Kornfeld S & Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5:483–525.

Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463–477.

Noda T, Suzuki K & Ohsumi Y (2002) Yeast autophagosomes: *de novo* formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12:231–235.

Futerman AH & van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:554–565.

Peters C & von Figura K (1994) Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett* 346:108–114.

Rouille Y, Rohn W & Hoflack B (2000) Targeting of lysosomal proteins. *Semin Cell Dev Biol* 11:165–171.

Transporte para o interior da célula a partir da membrana plasmática: endocitose

Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199–225.

Bonifacino JS & Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395–447.

Brown MS & Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34–47.

Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.

Gruenberg J & Stenmark H (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:317–323.

Hicke L (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106:527–530.

Katzmann DJ, Odorizzi G & Emr S (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:893–905.

Maxfield FR & McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:121–132.

Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575–625.

Pelkmans L & Helenius A (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:414–422.

Tjelle TE, Lovdal T et al (2000) Phagosome dynamics and function. *BioEssays* 22:255–263.

Yeung T, Ozdamar B & Grinstein S (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 18:429–437.

Transporte a partir da rede *trans* de Golgi para o exterior da célula: exocitose

Burgess TL & Kelly RB (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3:243–293.

Dietrich C, Volovyk ZN & Jacobson K (2001) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10642–10647.

Martin TF (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 7:271–276.

Mostov K, Su T et al (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature Cell Biol* 5:287–293.

Murthy VN & De Camilli P (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701–728.

Schuck S & Simons K (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117(Pt 25):5955–5964.

Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.

Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547.

Tooze SA (1998) Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1404:231–244.

Traub LM & Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* 9:527–533.

Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloropastos

14

Neste capítulo

A MITOCÔNDRIA 815

AS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS E SUAS BOMBAS DE PRÓTONS 827

OS CLOROPLASTOS E A FOTOSSÍNTESE 840

OS SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCÔNDRIAS E DE PLASTÍDEOS 855

A EVOLUÇÃO DAS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS 870

Por meio de um conjunto de reações que ocorrem no citosol, a energia derivada da oxidação parcial de moléculas de carboidratos ricas em energia é utilizada para formar Trifosfato de Adenosina (ATP, *Adenosine Triphosphate*), a moeda corrente de energia química das células (discutido no Capítulo 2). Um método mais eficiente de geração de energia, porém, surgiu muito cedo na história da vida. Esse processo tem como base as membranas e permite que as células adquiram energia a partir de uma grande variedade de fontes. Por exemplo, as membranas desempenham papel central na conversão da energia luminosa em energia de ligações químicas na fotossíntese, assim como na respiração aeróbia, a qual nos permite utilizar oxigênio para produzir grandes quantidades de ATP a partir de moléculas alimentares.

A membrana utilizada pelos procariotos para produzir ATP é a membrana plasmática. Nas células eucarióticas, porém, ela é reservada aos processos de transporte descritos no Capítulo 11. Ao invés dela, as membranas especializadas presentes no interior de *organelas conversoras de energia* são empregadas para a produção da maior parte do ATP. As organelas delimitadas por membranas são as **mitocôndrias**, presentes nas células de praticamente todos os organismos eucarióticos (incluindo fungos, animais e vegetais), e os **plastídeos** – principalmente os **cloroplastos** – os quais ocorrem somente em vegetais. Em micrografias eletrônicas, a característica morfológica mais marcante de mitocôndrias e de cloroplastos é a enorme quantidade de membranas internas que essas organelas contêm. Essas membranas internas proveem a rede de trabalho de um conjunto elaborado de processos de transporte de elétrons que produz a maior parte do ATP celular.

A via comum utilizada por mitocôndrias, cloroplastos e procariotos para mobilizar energia para seus propósitos biológicos é operada por um processo conhecido como **acoplamento quimiosmótico** – refletindo uma ligação entre as reações de formação de ligações químicas que geram ATP ("quimi") e os processos de transporte através de membranas ("osmótico"). Os processos de acoplamento ocorrem em dois estágios interligados, ambos desempenhados por complexos proteicos embebidos em uma membrana:

Estágio 1. Os elétrons de alta energia (derivados da oxidação de moléculas alimentares, da ação da luz solar ou de outras fontes discutidas mais tarde) são transferidos ao longo de uma série de carreadores de elétrons embebidos na membrana. Essas transferências de elétrons liberam energia que é utilizada para bombear prótons (H^+, derivados da água que é ubíqua nas células) através da membrana e, assim, gerar um *gradiente eletroquímico de prótons*. Como discutido no Capítulo 11, um gradiente de íons através de uma membrana é uma forma de energia estocada, que pode ser fornecida para realizar trabalho útil quando há a permissão para o refluxo através da membrana a favor do seu gradiente eletroquímico.

Estágio 2. Ocorre refluxo de H^+ em favor do gradiente eletroquímico através de uma máquina proteica chamada de *ATP-sintase*, que catalisa a síntese dependente de energia a partir de difosfato de Adesonina (ADP, *adenosine diphosphate*) e de fosfato inorgânico (P_i). Essa enzima ubíqua desempenha o papel de uma turbina, permitindo que o gradiente de prótons direcione a produção de ATP (**Figura 14-1**).

O gradiente eletroquímico de prótons também é utilizado para direcionar outras máquinas proteicas embebidas em membranas (**Figura 14-2**). Nos eucariotos, proteínas especiais acoplam o fluxo favorável de H^+ para o transporte de metabólitos específicos para dentro e fora das organelas. Nas bactérias, o gradiente eletroquímico de prótons direciona mais do que a síntese de ATP e os processos de transporte; como um estoque de energia diretamente utilizável, ele também promove a rotação rápida do flagelo bacteriano, o qual possibilita que a bactéria nade.

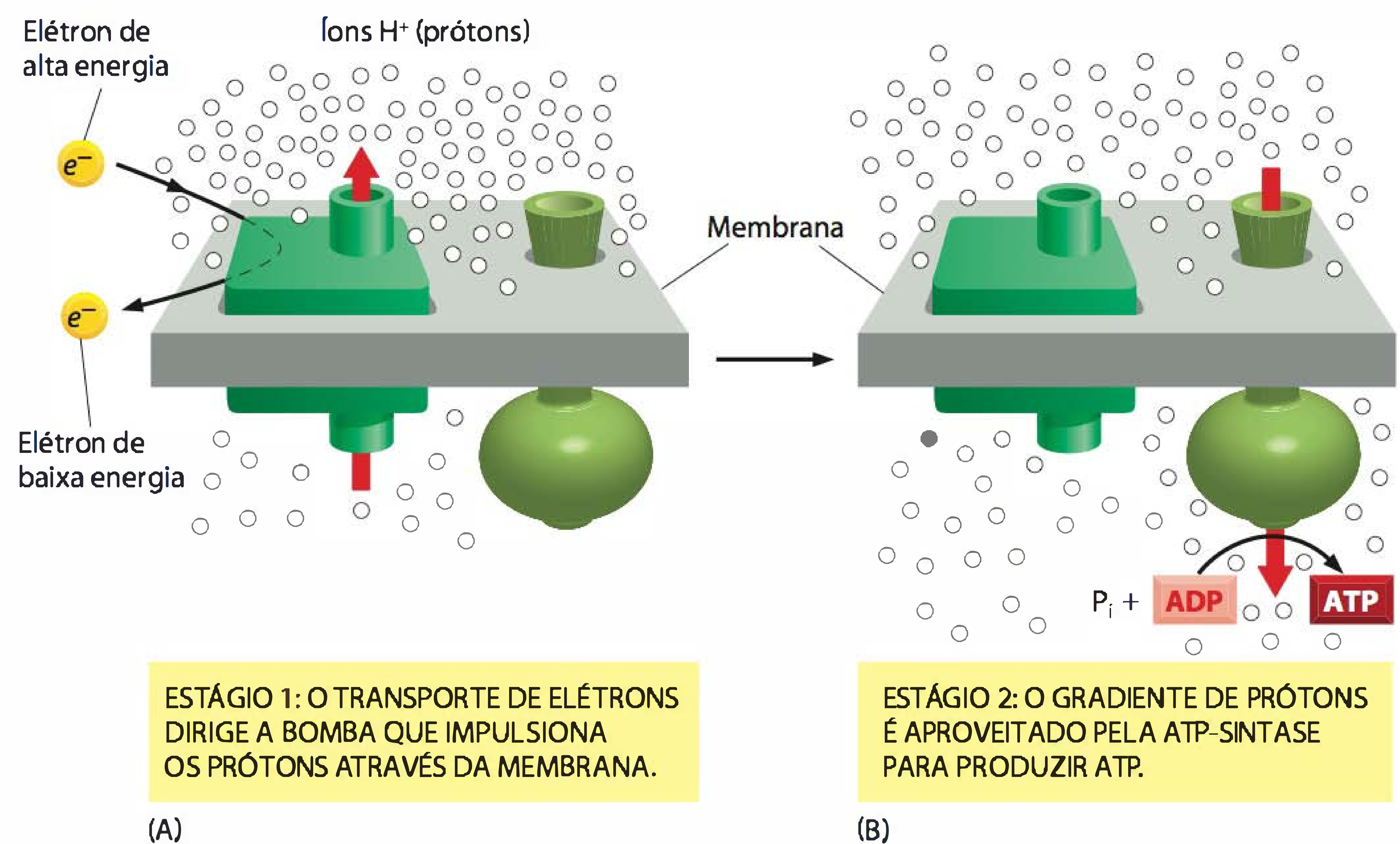


Figura 14-1 Aproveitando energia para a vida. (A) Os requerimentos essenciais para a quimiosmose são uma membrana, na qual estão embebidas uma bomba proteica e uma ATP-sintase, mais uma fonte de elétrons de alta energia (e^-). Os prótons (H^+) apresentados estão livremente disponíveis a partir de moléculas de água. A bomba aproveita a energia da transferência de elétrons (detalhes aqui não-apresentados) para bombear prótons, criando um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana. (B) Esse gradiente serve como energia estocada que pode ser utilizada para promover a síntese de ATP pela enzima ATP-sintase. A *seta vermelha* indica a direção do movimento de prótons em cada estágio.

O conjunto completo de proteínas na membrana, juntamente com as pequenas moléculas envolvidas na sequência ordenada de transferências de elétrons, é chamado de **cadeia transportadora de elétrons**. O mecanismo de transporte de elétrons pode ser comparado a uma célula elétrica que direciona uma corrente através de um conjunto de bombas elétricas. Entretanto, nos sistemas biológicos, os elétrons são carreados entre um sítio e outro não por fios condutores, mas por moléculas difusíveis que podem coletar elétrons de um local e entregá-los em outro. Para as mitocôndrias, o primeiro desses carreadores de elétrons é o NAD^+ (NAD, de nicotinamida adenina dinucleotídeo), que toma dois elétrons (mais um H^+) para se converter em NADH, uma pequena molécula solúvel em água que transporta elétrons dos sítios onde as moléculas alimentares são degradadas para a membrana mitocondrial interna.

Na **Figura 14-3** é possível comparar os processos de transporte de elétrons das mitocôndrias, os quais convertem energia de combustíveis químicos, àqueles dos cloroplastos, que convertem a energia da luz solar. Na mitocôndria, os elétrons – foram liberados de uma molécula de carboidrato alimentar no curso de sua degradação até CO_2 – são transferidos através da membrana por uma cadeia de carreadores de elétrons, finalmente reduzindo o gás oxigênio (O_2) para formar água. A energia livre liberada à medida que os elétrons fluem por esta via, de um estado de alta energia para um estado de baixa energia, é utilizada para direcionar uma série de três bombas de H^+ da membrana mitocondrial interna, sendo a terceira bomba de H^+ da série que catalisa a transferência de elétrons para o O_2 (ver Figura 14-3A).

Embora os cloroplastos possam ser descritos de forma semelhante e vários de seus componentes principais sejam muito semelhantes àqueles da mitocôndria, a membrana cloroplástica contém alguns componentes cruciais não encontrados na membrana mitocondrial. Os mais importantes entre eles são os fotossistemas, nos quais a energia luminosa é captada e ajustada para dirigir a transferência de elétrons, de modo semelhante às fotocélulas feitas pelo homem em painéis solares que absorvem a energia luminosa e a utilizam para produzir uma corrente elétrica. A força eletromotiva gerada pelos fotossistemas cloroplásticos ocasiona a transferência de elétrons na direção oposta àquela das mitocôndrias: os elétrons são capturados da água para produzir O_2 e doados (via NADPH, um composto intimamente relacionado ao NADH) para o CO_2 de forma a sintetizar carboidratos. Portanto, os cloroplastos geram O_2 e carboidratos, enquanto as mitocôndrias os consomem (ver Figura 14-3B).

É amplamente aceito que as organelas conversoras de energia dos eucariotos evoluíram de procariotos engolfados por células eucarióticas primitivas, desenvolvendo-se entre eles

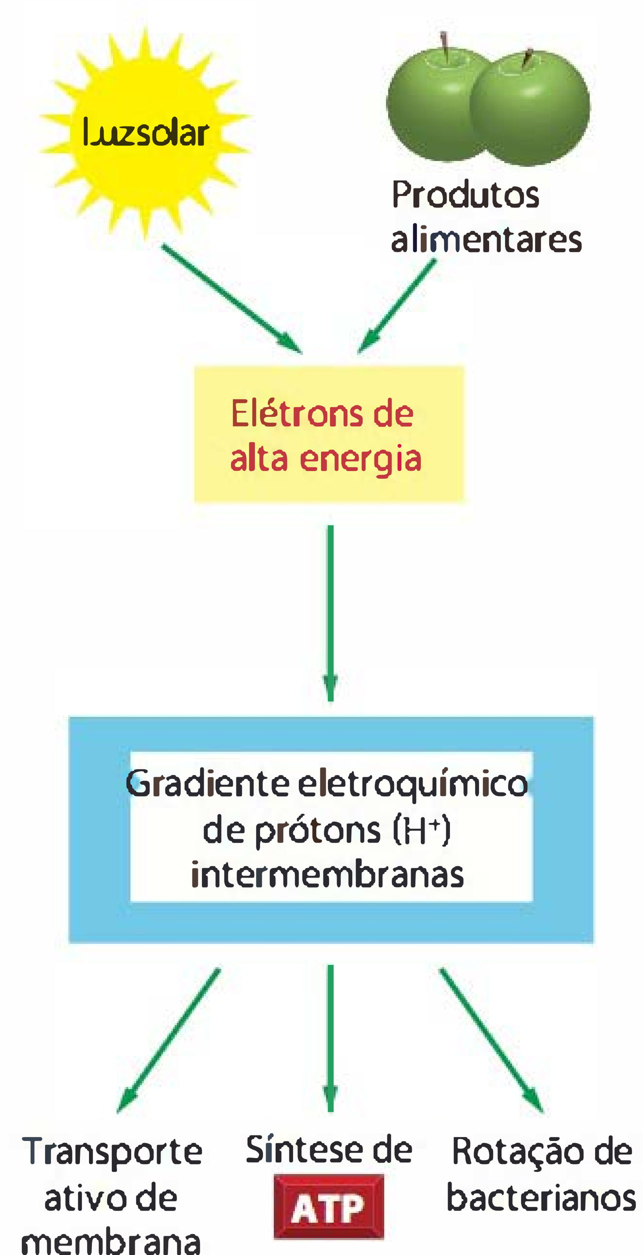


Figura 14-2 Acoplamento quimiosmótico. A energia proveniente da luz solar ou da oxidação de alimentos é primeiramente utilizada para criar um gradiente eletroquímico de prótons através de uma membrana. Esse gradiente serve como um estoque versátil de energia e é utilizado para dirigir uma série de reações nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nas bactérias.

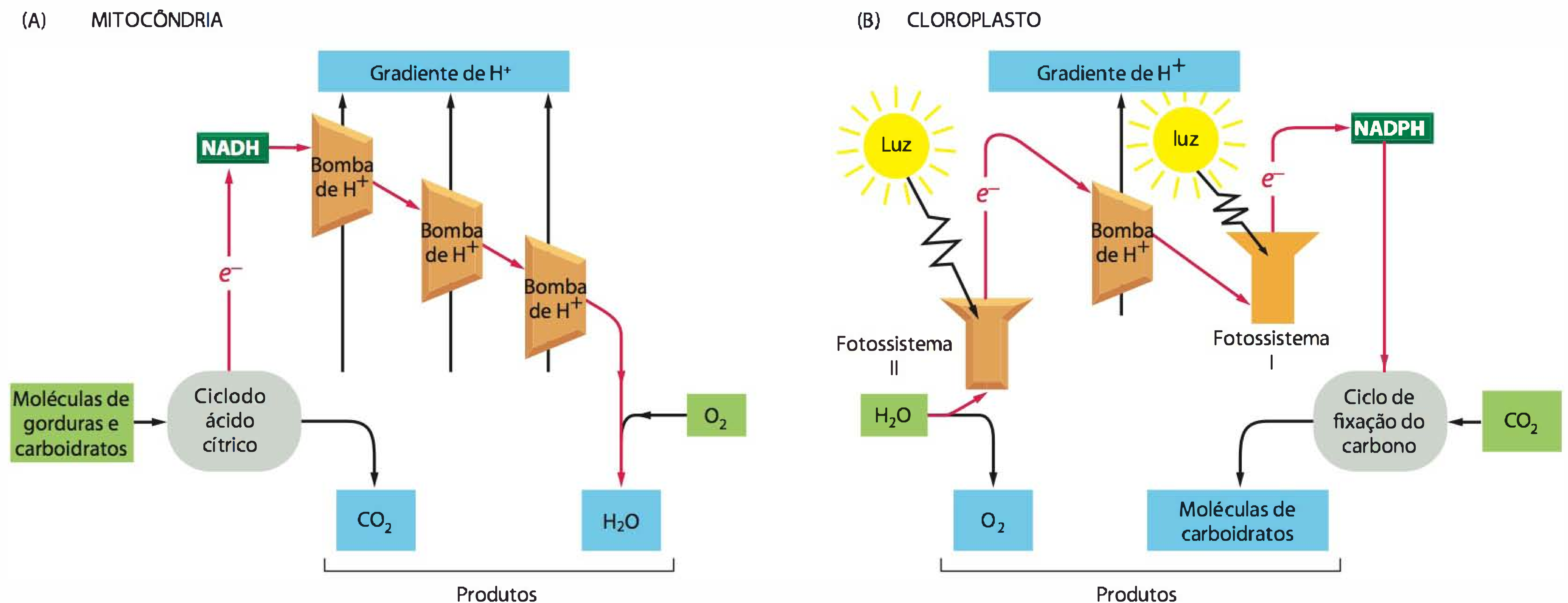


Figura 14-3 Processos de transporte de elétrons. (A) A mitocôndria converte a energia de combustíveis químicos. (B) O cloroplasto converte a energia da luz solar. Os substratos estão em *verde-claro*, os produtos estão em *azul*, e a via de fluxo de elétrons está indicada por *setas vermelhas*. Cada um dos complexos proteicos (*laranja*) está embebido em uma membrana. Note que a força eletromotiva gerada pelos dois fotossistemas cloroplásticos permite ao cloroplasto dirigir a transferência de elétrons de H_2O para os carboidratos, o que se contrapõe à direção de transferência de elétrons na mitocôndria. Assim, enquanto as moléculas de carboidratos e de O_2 são substratos para a mitocôndria, elas são produtos do cloroplasto.

uma relação simbiótica. Isso explicaria por que mitocôndrias e cloroplastos contêm seus próprios DNAs, os quais codificam algumas de suas proteínas. Desde a sua captura pelas células hospedeiras, essas organelas perderam muito dos seus genomas e se tornaram altamente dependentes de proteínas codificadas por genes do núcleo, sintetizadas no citosol e, finalmente, importadas para a organela. Inversamente, as células hospedeiras tornaram-se altamente dependentes das organelas pela grande quantidade de ATP necessária para conduzirem suas biossínteses, seus bombeamentos de íons e seus movimentos; elas também se tornaram dependentes de reações biossintetizantes específicas que ocorrem no interior dessas organelas.

A MITOCÔNDRIA

As **mitocôndrias** ocupam uma porção substancial do volume citoplasmático das células eucarióticas e têm sido essenciais para a evolução de animais complexos. Sem elas, as atuais células animais seriam dependentes da glicólise anaeróbia para produzir todo o seu ATP. Quando a glicose é convertida em piruvato pela glicólise, apenas uma pequena fração de toda a energia livre potencialmente disponível é liberada. Na mitocôndria, o metabolismo dos açúcares é completo: o piruvato é importado para a mitocôndria e oxidado por O_2 a CO_2 e H_2O. Isso permite a produção de 15 vezes mais ATP do que seria fornecido exclusivamente pela glicólise.

As mitocôndrias normalmente são descritas como cilindros rígidos e alongados, com um diâmetro de 0,5 a 1 μm, assemelhando-se a bactérias. As microfilmagens em intervalos de células vivas, entretanto, mostram que as mitocôndrias são organelas notoriamente móveis e plásticas, mudando de maneira constante as suas formas (**Figura 14-4**) e, mesmo, fundindo-se umas às outras e se separando novamente. Pela maneira como se movem pelo citosol, elas com frequência parecem estar associadas a microtúbulos (**Figura 14-5**), os quais possivelmente determinam a orientação e a distribuição peculiar das mitocôndrias nos diferentes tipos celulares. Em algumas células, portanto, elas formam longos filamentos ou cadeias móveis, enquanto, em outras, permanecem fixas em uma posição. Ali, fornecem ATP diretamente aos sítios onde o consumo de ATP é extraordinário – por exemplo, empacotadas entre microfibrilas adjacentes de uma célula muscular cardíaca ou fortemente aderidas ao redor do flagelo dos espermatozoides (**Figura 14-6**).

As mitocôndrias são suficientemente grandes para a visualização ao microscópio óptico e foram primeiramente identificadas durante o século XIX. O verdadeiro progresso para o entendimento de suas funções ocorreu graças aos procedimentos desenvolvidos em 1948

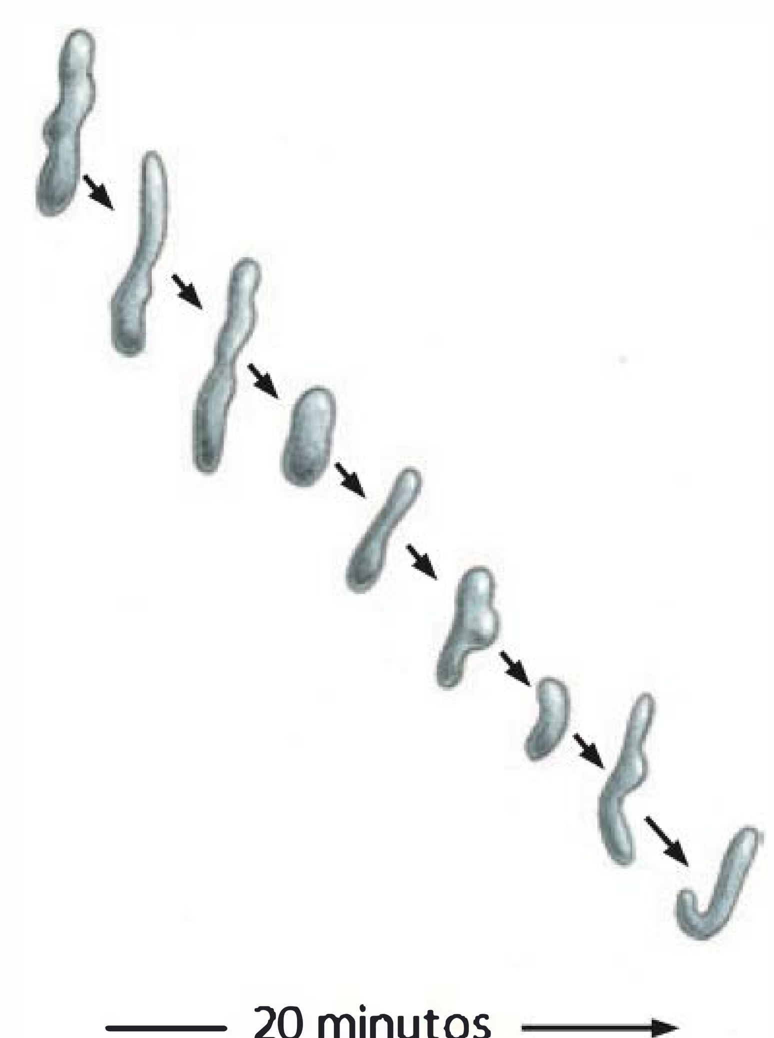


Figura 14-4 A plasticidade mitocondrial. São observadas rápidas mudanças de formato quando uma mitocôndria é visualizada em uma célula viva.

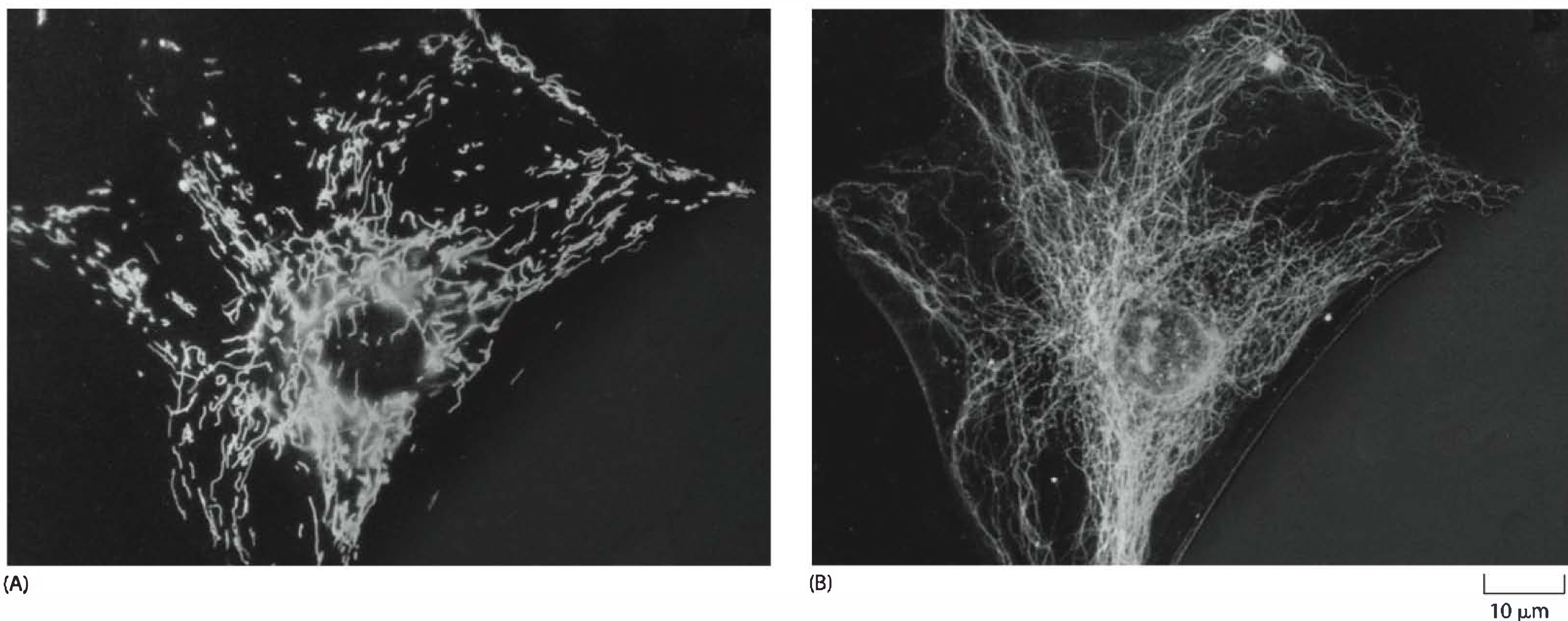


Figura 14-5 Relação entre mitocôndrias e microtúbulos. (A) Microfotografia óptica das cadeias de mitocôndrias alongadas em uma célula viva de mamífero em cultura. A célula foi corada com um corante fluorescente (rodamina 123) que marca especificamente as mitocôndrias em células vivas. (B) Microfotografia por imunofluorescência da mesma célula corada (após a fixação) com anticorpos fluorescentes que se ligam a microtúbulos. Note que as mitocôndrias tendem a se alinhar ao longo dos microtúbulos. (Cortesia de Lan Bo Chen.)

para o isolamento dessas organelas na forma intacta. Por razões técnicas, muitos estudos bioquímicos foram conduzidos com mitocôndrias purificadas do fígado; cada célula hepática contém entre 1.000 e 2.000 mitocôndrias que, grosseiramente, ocupam um quinto do volume celular total.

A mitocôndria contém uma membrana externa, uma membrana interna e dois compartimentos internos

Cada mitocôndria é limitada por duas membranas altamente especializadas com funções vitais para a atividade mitocondrial. Juntas, elas definem dois compartimentos mitocondriais separados: o espaço interno da **matriz** e o **espaço intermembranas**, bem mais estreito. Se as mitocôndrias purificadas forem cuidadosamente rompidas e fracionadas em seus componentes separadamente (**Figura 14-7**), a composição bioquímica de cada uma das duas membranas e dos espaços definidos por elas pode ser determinada. Cada um possui uma coleção única de proteínas. A maior parte de cerca de 1.000 proteínas mitocondriais é codificada no núcleo e importada para a mitocôndria a partir do citoplasma por translocases proteicas especializadas da membrana mitocondrial externa (TOM, *Translocase of the outer membrane*) e interna (TIM, *Translocase of the inner membrane*; discutidas no Capítulo 12).

A **membrana externa** contém várias moléculas de *porinas*, um tipo de proteína transportadora que forma grandes canais aquosos através da bicamada lipídica (discutida no Capítulo 11). Essa membrana, portanto, assemelha-se a um filtro permeável a todas as moléculas de 5.000 dáltons ou menos, incluindo pequenas proteínas. Tais moléculas podem entrar no espaço intermembranas, mas a maioria delas não pode passar através da impermeável

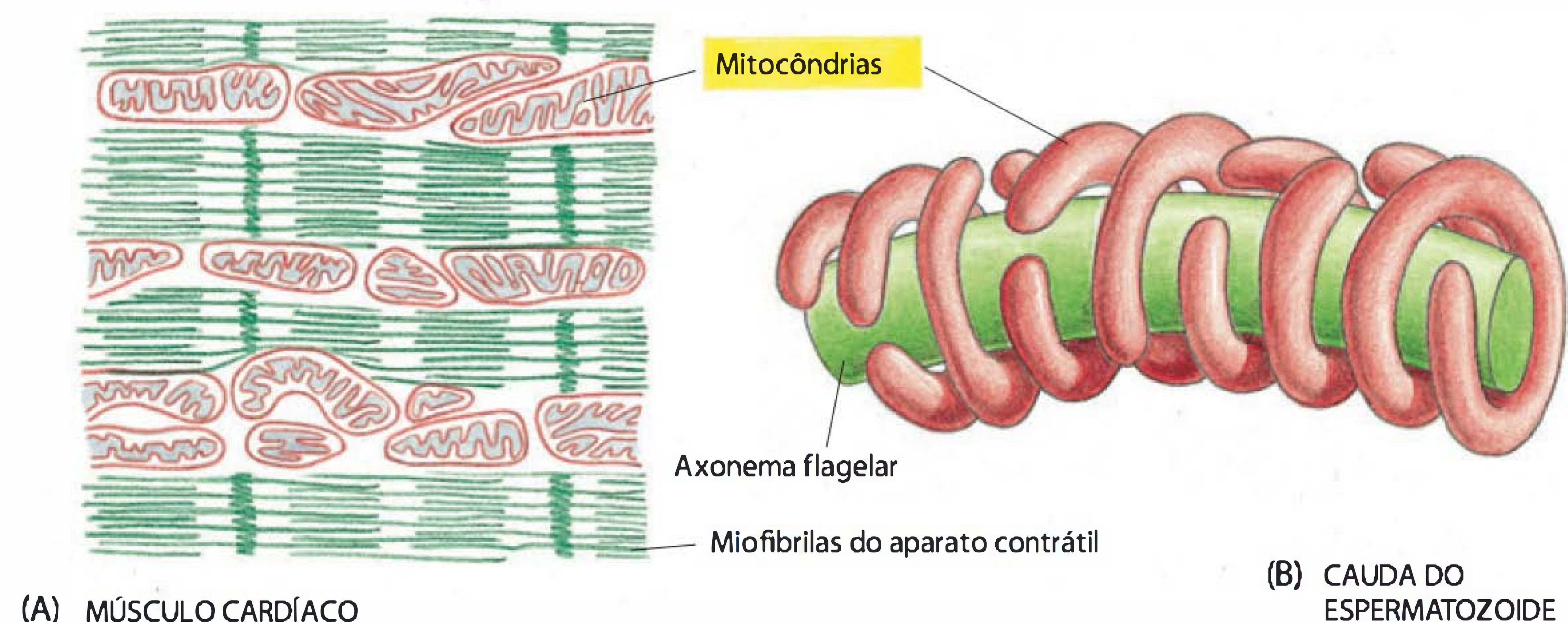


Figura 14-6 Localização das mitocôndrias na proximidade dos sítios de alta utilização de ATP no músculo cardíaco e na cauda de um espermatozoide. O músculo cardíaco (A) na parede do coração é o músculo mais exigido do corpo, e suas contínuas contrações requerem uma fonte confiável de energia. Ele próprio possui um estoque limitado de energia e depende de uma fonte constante de ATP de um número enorme de mitocôndrias alinhadas intimamente às microfibrilas contráteis (ver p. 1031). Durante o desenvolvimento do flagelo da cauda dos espermatozoides (B), os microtúbulos enrolam-se helicoidalmente ao redor do axonema, onde, acredita-se, auxiliam a determinar a localização da mitocôndria na cauda; estes microtúbulos então desaparecem, e as mitocôndrias se fundem umas às outras, criando a estrutura mostrada aqui.

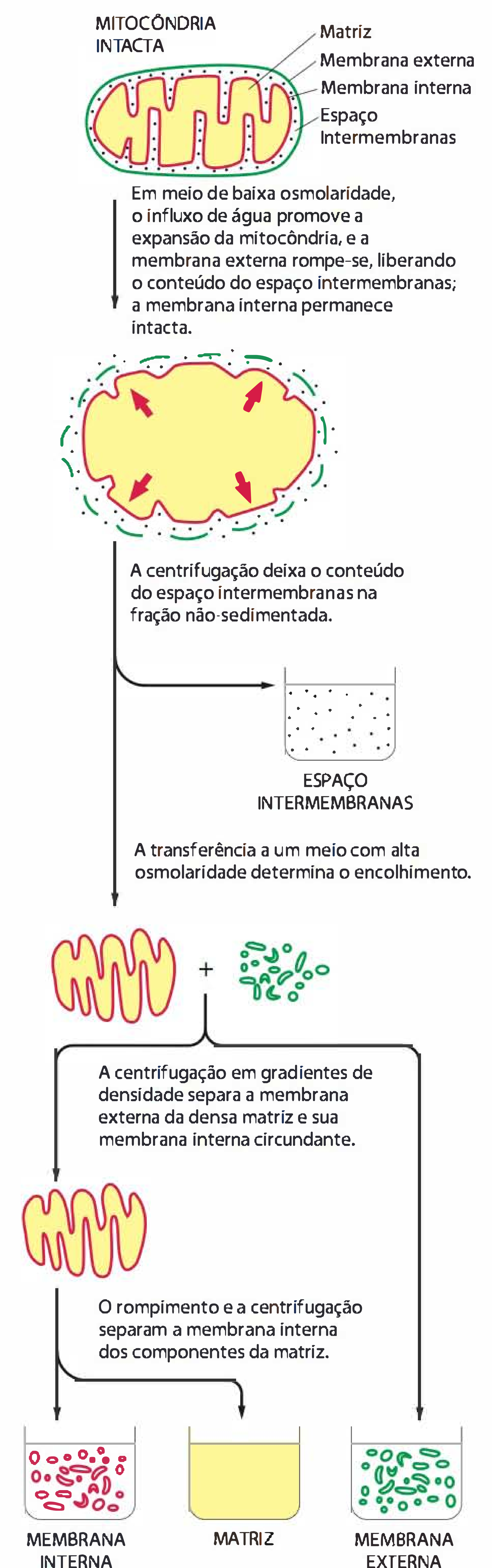


Figura 14-7 Fracionamento bioquímico de mitocôndrias purificadas em seus componentes. Estas técnicas tornaram possível o estudo das diferentes proteínas de cada compartimento mitocondrial. O método apresentado permite o processamento de um grande número de mitocôndrias ao mesmo tempo. Ele baseia-se no fato de que, em meio de baixa força osmótica, a água flui para dentro da mitocôndria e expande muito a matriz (*amarelo*). Enquanto a crista da membrana interna desdobra-se para acomodar a expansão, a membrana externa – que não tem dobras – rompe-se, liberando uma estrutura composta somente da membrana interna e da matriz.

membrana interna. Portanto, enquanto o espaço intermembranas é quimicamente equivalente ao citosol com respeito às pequenas moléculas que este contém, a matriz mitocondrial possui um conjunto de pequenas moléculas altamente selecionadas.

Como explicaremos em detalhe mais tarde, a parte mais funcional da mitocôndria é o espaço da matriz e a **membrana interna** que o circunda. A membrana interna é altamente especializada. Ela contém uma grande proporção do fosfolipídeo "duplo" *cardiolipina*, constituído de quatro ácidos graxos, que deve ajudá-la a tornar-se especialmente impermeável a íons (ver Figura 14-65). Ela também contém uma variedade de proteínas transportadoras que a tornam seletivamente permeável às pequenas moléculas metabolizadas ou requeridas pelas várias enzimas mitocondriais concentradas na matriz. As enzimas da matriz incluem aquelas que metabolizam piruvato e ácidos graxos para produzir acetil-CoA e aquelas que oxidam acetil-CoA no *ciclo do ácido cítrico*. Os principais produtos finais dessa oxidação são o CO_2, o qual é liberado da célula, e o NADH, principal fonte de elétrons para o transporte na **cadeia respiratória** – nome dado à cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. As enzimas da cadeia respiratória estão embebidas na membrana mitocondrial interna e são essenciais para o processo de *fosforilação oxidativa*, o qual gera a maior parte do ATP das células animais.

Como ilustrado pela **Figura 14-8**, a membrana interna geralmente é retorcida, formando uma série de reentrâncias, chamadas de **cristas**, que se projetam para dentro da matriz. Estas pregas aumentam muito a área da membrana interna, tanto que, em uma célula hepática, por exemplo, ela constitui cerca de um terço da membrana celular total. O número de cristas é três vezes maior em mitocôndrias de uma célula muscular cardíaca do que em mitocôndrias de uma célula hepática, presumivelmente devido à grande demanda de ATP das células cardíacas. Há também diferenças substanciais entre as enzimas mitocondriais de diferentes tipos celulares. Contudo, neste capítulo, iremos ignorar em grande parte as diferenças e focalizaremos as enzimas e as propriedades que são comuns a todas as mitocôndrias.

O ciclo do ácido cítrico gera elétrons de alta energia

As mitocôndrias podem utilizar tanto o piruvato como os ácidos graxos como combustível. O piruvato deriva da glicose e de outros açúcares, e os ácidos graxos derivam das gorduras. Ambas as formas de combustível são transportadas através da membrana mitocondrial interna e são, então, convertidas no crucial intermediário metabólico *acetil-CoA* por enzimas localizadas na matriz mitocondrial. Os grupos acetila da acetil-CoA são oxidados na matriz por intermédio do **ciclo do ácido cítrico**, descrito no Capítulo 2. O ciclo converte os átomos de carbono da acetil-CoA em CO_2, que é liberado pela célula como um subproduto. O mais fundamental é que o ciclo gera elétrons de alta energia carregados pelas moléculas carreadoras ativadas NADH e $FADH_2$ (**Figura 14-9**). Esses elétrons de alta energia são, então, transferidos para a membrana mitocondrial interna, onde entram na cadeia transportadora de elétrons; a perda de elétrons por NADH e $FADH_2$ também regenera NAD^+ e FAD que são necessários para o continuado metabolismo oxidativo. Na **Figura 14-10** está apresentada esquematicamente a sequência completa de reações.

Um processo quimiosmótico converte a energia de oxidação em ATP

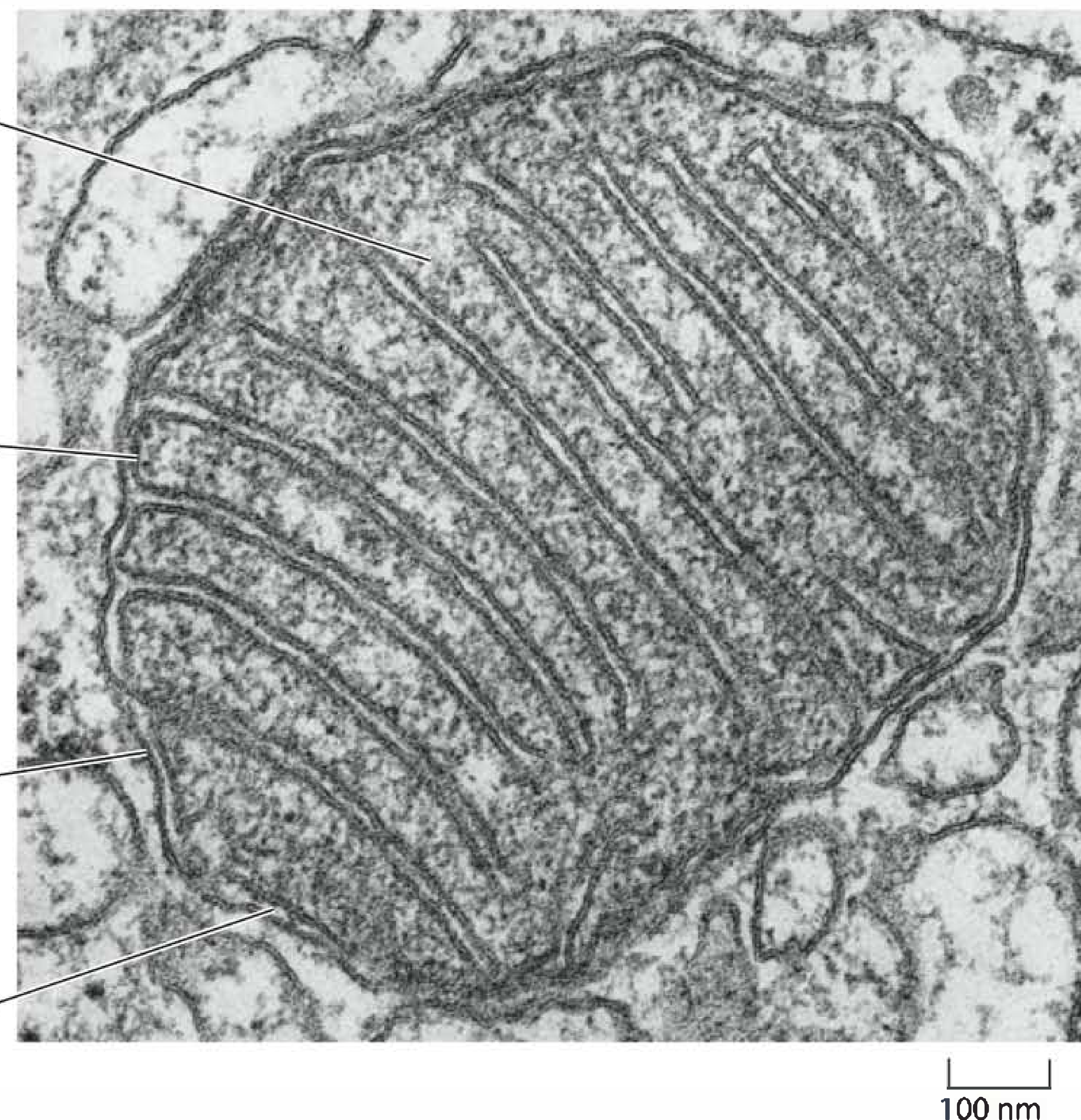
Embora o ciclo do ácido cítrico seja considerado uma parte do metabolismo aeróbio, ele próprio não faz uso do oxigênio. Somente nas reações catabólicas finais que ocorrem na membrana mitocondrial interna é que o oxigênio molecular (O_2) é consumido diretamente. Quase toda a energia disponível pela queima de carboidratos, gorduras e outros produtos

Matriz. Este grande espaço interno contém uma mistura altamente concentrada de centenas de enzimas, incluindo aquelas necessárias à oxidação do piruvato e dos ácidos graxos e ao ciclo do ácido cítrico. A matriz também contém várias cópias idênticas do DNA genômico mitocondrial, dos ribossomos mitocondriais especiais, dos RNAs Transportadores (tRNAs) e de várias enzimas requeridas para a expressão dos genes mitocondriais.

Membrana interna. A membrana interna é dobrada em numerosas cristas que aumentam bastante a sua área superficial total. Ela contém proteínas com três tipos de funções: (1) aquelas que conduzem as reações de oxidação da cadeia respiratória, (2) a ATP-sintase que produz ATP na matriz e (3) proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos para dentro e para fora da matriz. Um gradiente eletroquímico de H+, que direciona a ATP-sintase, é estabelecido através dessa membrana, de forma que ela deve ser impermeável a íons e à maioria das pequenas moléculas carregadas.

Membrana externa. Devido ao fato de conter uma grande proteína formadora de canais (uma porina, VDAC), a membrana externa é permeável a todas as moléculas de 5.000 dáltons ou menos. Outras proteínas existentes nessa membrana incluem as enzimas envolvidas na síntese de lipídeos mitocondriais e as enzimas que convertem substratos lipídicos em formas que possam ser subsequentemente metabolizadas na matriz, receptores importadores de proteínas mitocondriais e a maquinaria enzimática para a divisão e para a fusão da organela.

Espaço intermembranas. Este espaço contém várias enzimas que utilizam o ATP proveniente da matriz para fosforilar outros nucleotídeos.





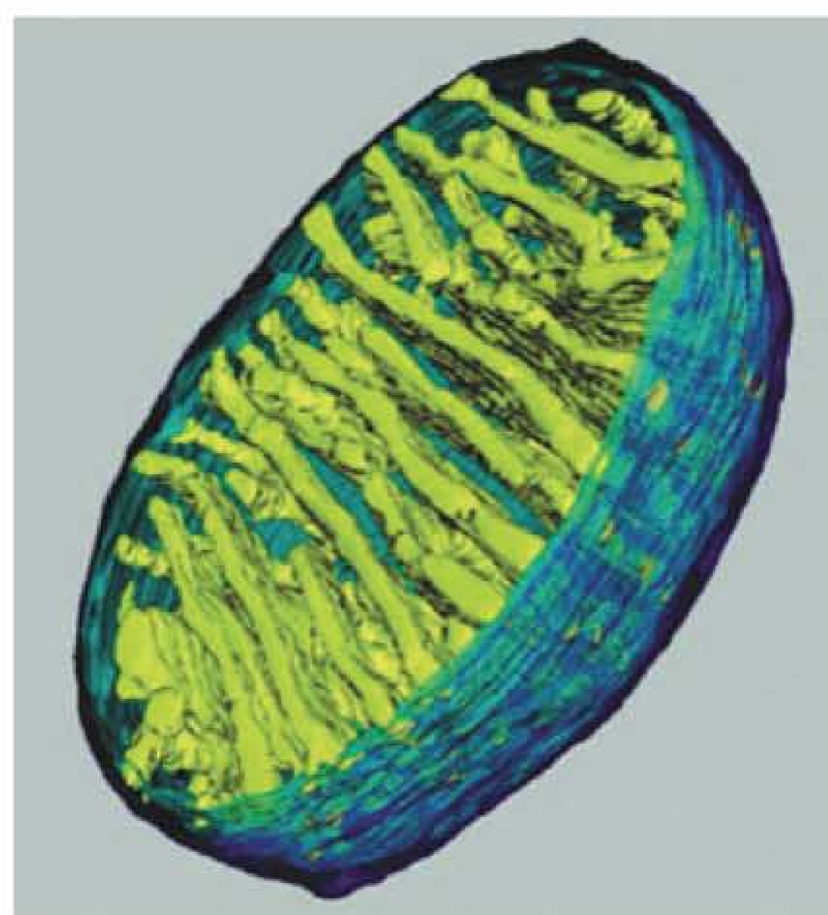


Figura 14-8 Estrutura de uma mitocôndria. No fígado, cerca de 67% de proteínas mitocondriais totais estão localizados na matriz, 21% estão localizados na membrana interna, 6% estão na membrana externa, e 6% estão no espaço intermembranas. Como indicado abaixo, cada uma dessas quatro regiões contém um conjunto especial de proteínas que medeiam funções distintas. (Micrografia maior, cortesia de Daniel S. Friend; micrografia menor e reconstrução tridimensional a partir de T. G. Frey, C. W. Renken e G. A. Perkins, *Biochim. Biophys. Acta* 1555:196-203, 2002. Com permissão de Elsevier.)

alimentares nos estágios iniciais da oxidação é primeiramente salva na forma de elétrons de alta energia removidos dos substratos por NAD^+ e FAD. Esses elétrons, carregados por NADH e $FADH_2$, são então combinados ao O_2 por meio da cadeia respiratória embebida na

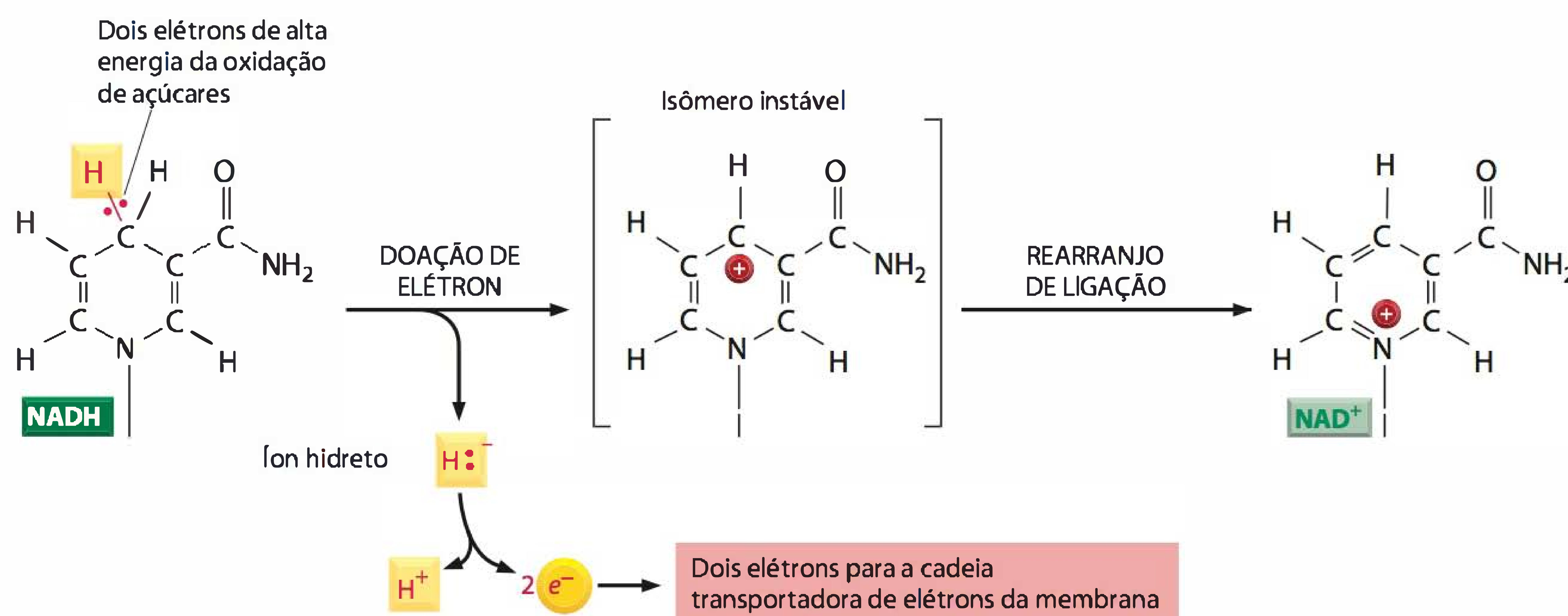


Figura 14-9 Como NADH doa elétrons. Neste diagrama, os elétrons de alta energia estão representados por dois *pontos vermelhos* sobre um átomo de hidrogênio *amarelo*. Um íon hidreto (H^-, um átomo de hidrogênio e um elétron extra) é removido do NADH, sendo convertido em um próton e dois elétrons de alta energia: $H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$. Somente o anel que carrega os elétrons em uma ligação de alta energia é mostrado; para a estrutura completa e a conversão de NAD^+ de volta ao NADH, ver a estrutura do composto intimamente relacionado NADPH na Figura 2-60. Os elétrons também são carregados de uma maneira semelhante por $FADH_2$, cuja estrutura está representada na Figura 2-83.

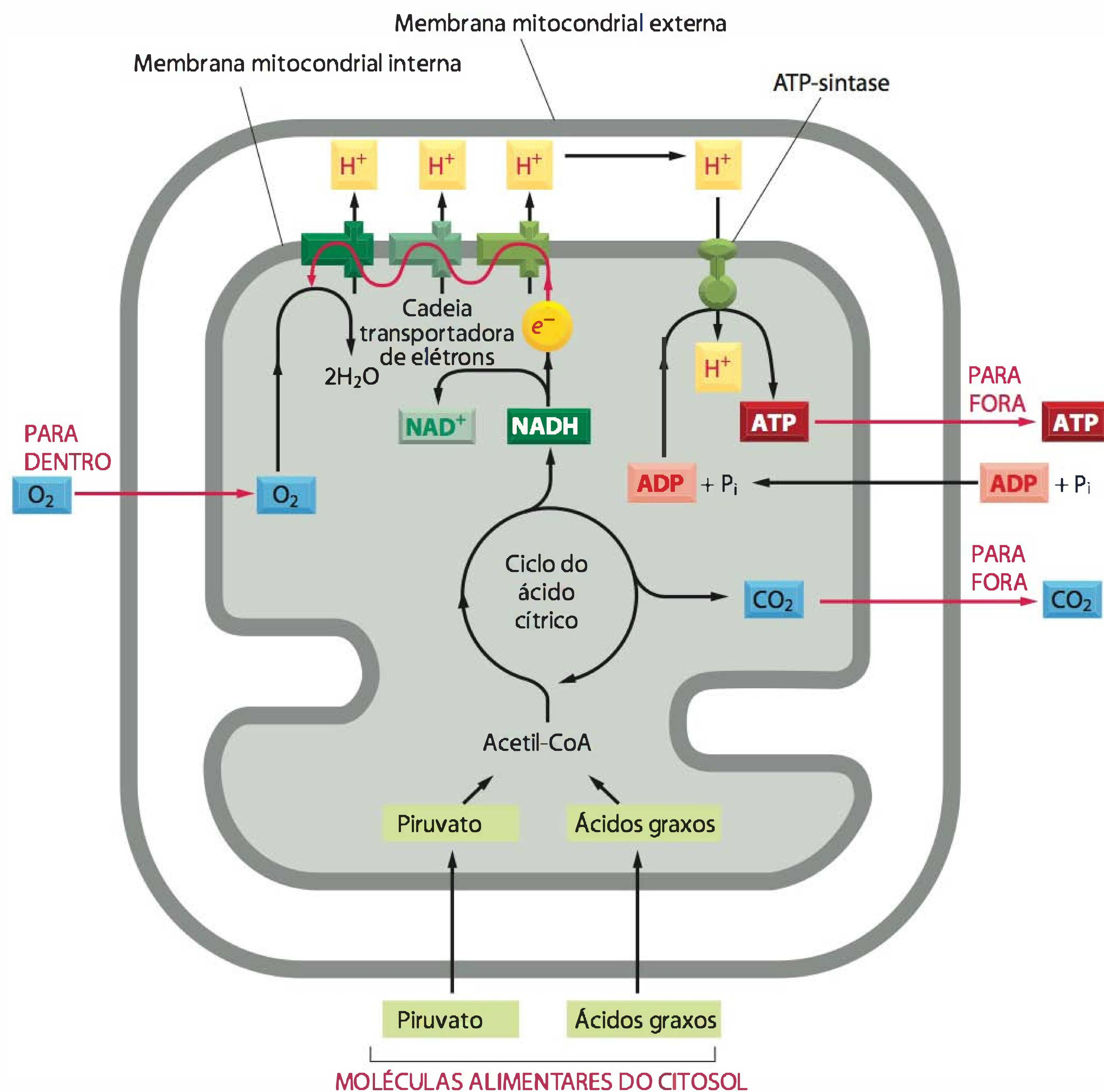


Figura 14-10 Resumo do metabolismo gerador de energia das mitocôndrias. O piruvato e os ácidos graxos entram na mitocôndria (*parte inferior*) e são convertidos em acetil-CoA. A acetil-CoA é, então, metabolizada pelo ciclo do ácido cítrico, o qual reduz NAD^+ em NADH (e FAD em $FADH_2$, não-representado). No processo de fosforilação oxidativa, os elétrons de alta energia do NADH (e do $FADH_2$) são transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons da membrana interna para o oxigênio (O_2). Esse transporte de elétrons gera um gradiente de prótons através da membrana, que é utilizado para direcionar a produção de ATP pela ATP-sintase (ver Figura 14-1). O NADH gerado pela glicólise no citosol também transfere elétrons para a cadeia respiratória (não-representada). Uma vez que o NADH não pode passar através da membrana mitocondrial interna, a transferência de elétrons do NADH citosólico deve estar acoplada indiretamente por meio de um dos vários sistemas "carreadores" que transportam outro composto reduzido para dentro da mitocôndria; depois de ser oxidado, este composto é devolvido ao citosol, onde é reduzido novamente pelo NADH (ver também Figura 14-32).

membrana mitocondrial interna. A membrana interna capta a grande quantidade de energia liberada para promover a conversão de ADP + P_i em ATP. Por essa razão, o termo **fosforilação oxidativa** é usado para descrever esta última série de reações (**Figura 14-11**).

Como mencionado previamente, a geração de ATP pela fosforilação oxidativa na cadeia respiratória depende de um processo quimiosmótico. Quando proposto pela primeira vez, em 1961, esse mecanismo passou a explicar um quebra-cabeça existente há muito tempo na biologia celular. No entanto, a ideia era tão inovadora que se passaram alguns anos até que fossem acumuladas as evidências para que pudesse ser totalmente aceita.

No restante desta seção, veremos rapidamente o tipo de reações que torna a fosforilação oxidativa possível, guardando os detalhes da cadeia respiratória para mais tarde.

O NADH transfere seus elétrons para o oxigênio por meio de três grandes complexos enzimáticos respiratórios

Embora o mecanismo pelo qual a energia é recolhida na cadeia respiratória seja diferente daquele empregado por outras reações catabólicas, o princípio é o mesmo. A reação energeticamente favorável $H_2 + ½\ O_2 \rightarrow H_2O$ é realizada em várias pequenas etapas, de forma que grande parte da energia liberada pode ser convertida em uma forma estocável de energia, em vez de ser perdida para o ambiente como calor. Assim como na formação de ATP e de NADH na glicólise ou no ciclo do ácido cítrico, isso envolve o emprego de uma via indireta para a reação. A cadeia respiratória é singular no que diz respeito à separação dos átomos de hidrogênio em prótons e em elétrons. Os elétrons passam através de uma série de carreadores da membrana mitocondrial interna. Em várias etapas ao longo do caminho, os prótons e os elétrons são transitoriamente recombinados. Contudo, somente quando os elétrons atingem o final dessa cadeia transportadora é que os prótons são permanentemente reassociados, quando utilizados para neutralizar as cargas negativas criadas pela adição final de elétrons ao oxigênio molecular (**Figura 14-12**).

O processo de transporte de elétrons inicia quando o íon hidreto é removido do NADH para regenerar NAD^+ e é convertido em um próton e dois elétrons ($H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$). Os dois elétrons são passados para o primeiro de uma série de mais de 15 carreadores de elétrons diferentes da cadeia respiratória. Os elétrons iniciam com energias muito altas e gradativa-

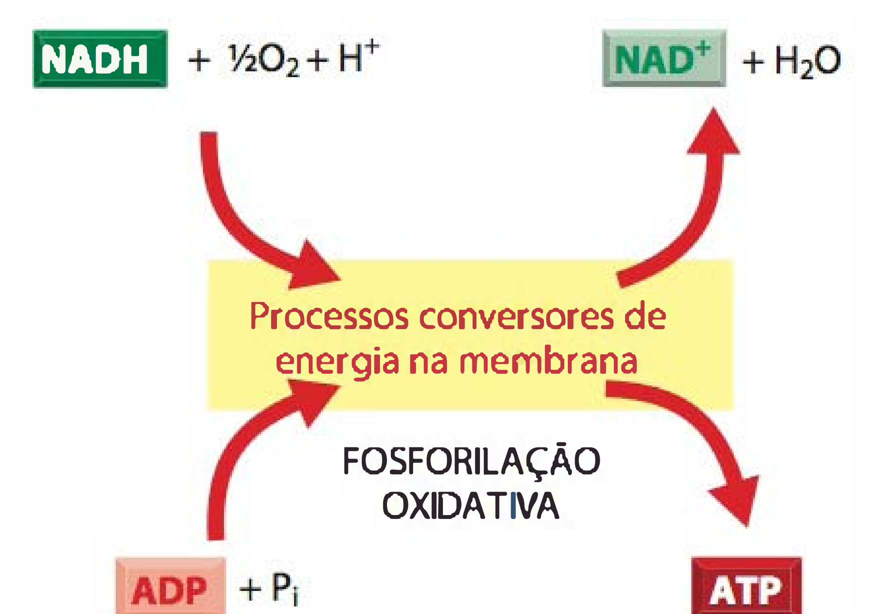


Figura 14-11 A principal conversão de energia catalisada na mitocôndria. Nesse processo de fosforilação oxidativa, a membrana mitocondrial funciona como uma máquina capaz de converter uma forma de ligação química rica em energia em outra, mudando a principal parte da energia de oxidação do NADH (e do $FADH_2$) em energia de ligação do fosfato no ATP.

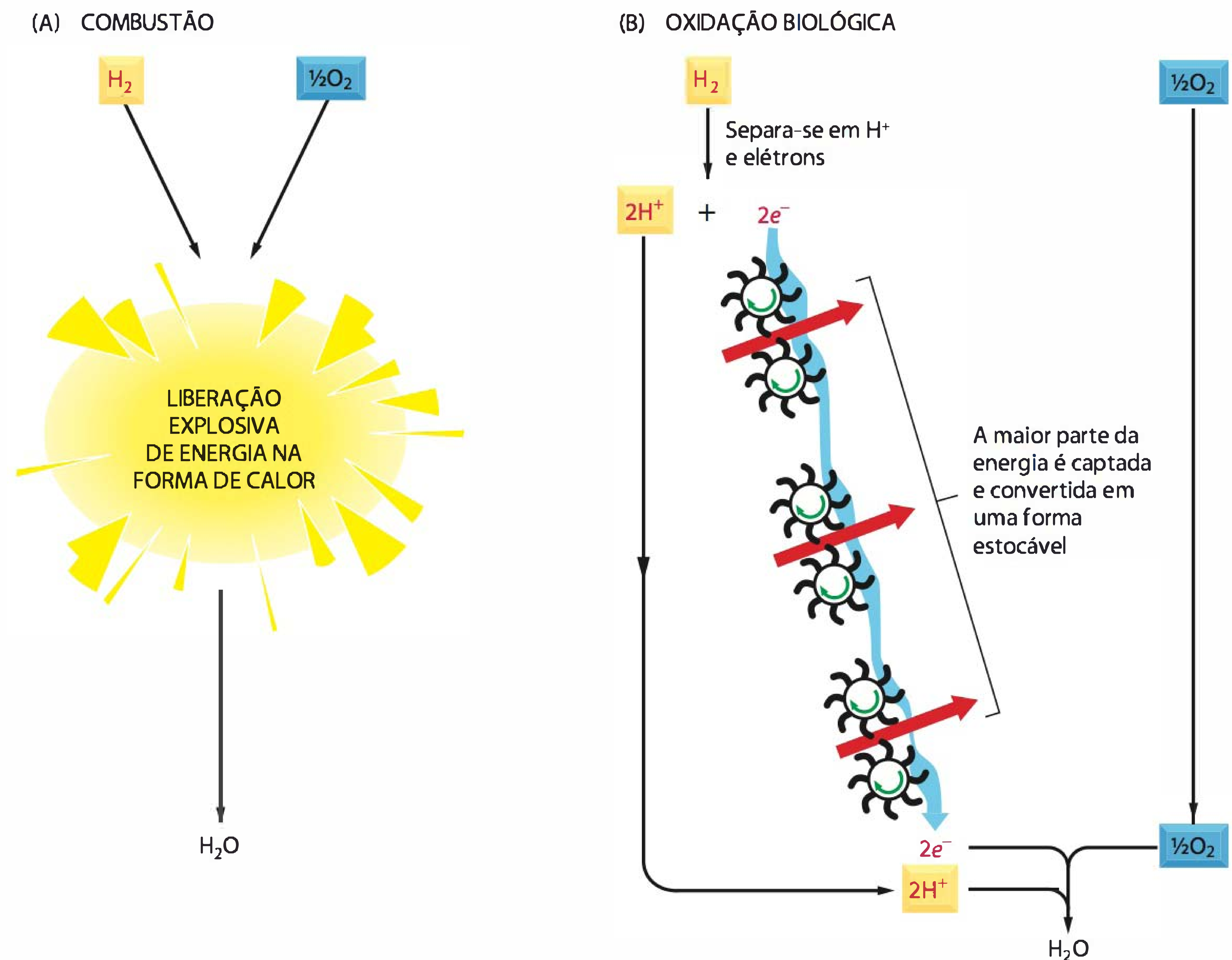


Figura 14-12 Comparação entre as oxidações biológicas e a combustão. (A) A maior parte da energia seria liberada na forma de calor caso o hidrogênio fosse simplesmente queimado. (B) Ao contrário, na oxidação biológica, a maior parte da energia liberada é armazenada em uma forma útil de energia para a célula, por meio da cadeia transportadora de elétrons da membrana mitocondrial interna (cadeia respiratória). O restante da energia de oxidação é liberado como calor pela mitocôndria. Na realidade, os prótons e os elétrons mostrados são removidos dos átomos de hidrogênio que estão covalentemente ligados às moléculas de NADH ou de $FADH_2$.

mente as perdem, à medida que fluem ao longo da cadeia. Na sua maior parte, os elétrons passam de um íon metálico para outro, sendo que cada um destes íons encontra-se fortemente ligado a uma molécula proteica que altera a afinidade eletrônica do íon metálico (discutido em maior detalhe mais tarde). As várias proteínas envolvidas estão agrupadas em três grandes *complexos enzimáticos respiratórios*, cada um contendo proteínas transmembrana que sustentam o complexo junto à membrana mitocondrial interna. Cada complexo da cadeia tem uma afinidade maior para elétrons do que o seu predecessor, e os elétrons fluem sequencialmente de um complexo para o outro até que sejam finalmente transferidos para o oxigênio, o qual tem, entre os componentes da cadeia, a mais alta afinidade pelos elétrons.

À medida que os elétrons movem-se ao longo da cadeia respiratória, a energia é armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna

A íntima associação entre os carreadores de elétrons e as moléculas proteicas torna possível a fosforilação oxidativa. As proteínas guiam os elétrons através da cadeia respiratória de tal forma que eles se movem sequencialmente de um complexo enzimático para outro. A transferência de elétrons está acoplada à captação e à liberação orientada de H^+ e a mudanças alostéricas de bombas proteicas conversoras de energia. O resultado líquido é que a migração energeticamente favorável de elétrons bombeia H^+ através da membrana interna – da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, direcionada pelo fluxo de elétrons energeticamente favorável. Este movimento de H^+ tem duas consequências principais:

1. Ele gera um gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna, com um valor mais alto na matriz do que no citosol, onde o pH geralmente é próximo a 7. (Uma vez que as pequenas moléculas distribuem-se livremente através da membrana externa da mitocôndria, o pH do espaço intermembranas é o mesmo do citosol.)
2. O movimento gera um gradiente de voltagem (*potencial de membrana*) através da membrana mitocondrial interna, com o lado interno negativo e o lado externo positivo (como resultado da expulsão de íons positivos).

O gradiente de pH (ΔpH) dirige H^+ de volta à matriz e OH^- para fora da matriz, reforçando o efeito do potencial de membrana (ΔV), o qual atua atraindo qualquer íon positivo para dentro da matriz e força qualquer íon negativo para fora. Juntos, o ΔpH e o ΔV constituem o **gradiente eletroquímico de prótons** (Figura 14-13). Esse gradiente exerce uma

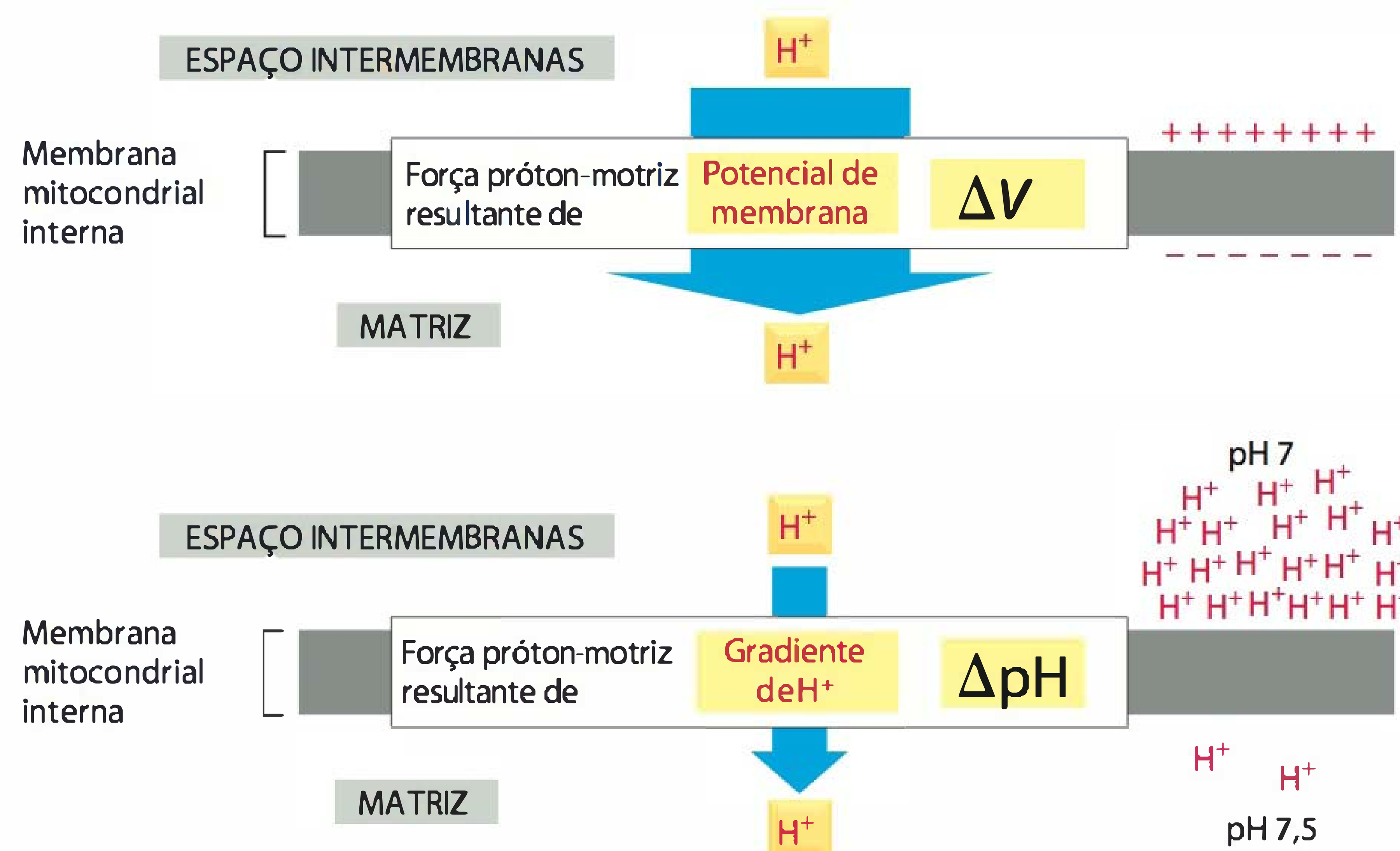


Figura 14-13 Os dois componentes do gradiente eletroquímico de prótons. A força próton-motriz total através da membrana interna consiste em uma força maior, resultante de um potencial de membrana (tradicionalmente designado $\Delta\psi$ por especialistas, mas designado ΔV neste texto), e de uma força menor, resultante de um gradiente de concentração de H^+ (ΔpH). Ambas as forças atuam para dirigir H^+ para dentro da matriz.

força próton-motriz, que pode ser medida em unidades de milivolts (mV). Em uma célula típica, a força próton-motriz através da membrana interna de uma mitocôndria respiratória é de cerca de 180 a 190 mV (negativa internamente), sendo constituída de um potencial de membrana de cerca de 160 a 170 mV e de um gradiente de pH de cerca de 0,3 a 0,5 unidades de pH (cada ΔpH de 1 unidade de pH tem um efeito equivalente a um potencial de membrana de cerca de 60 mV).

O gradiente de prótons direciona a síntese de ATP

O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna é utilizado para direcionar a síntese de ATP no crítico processo de fosforilação oxidativa (**Figura 14-14**). Isso é possível graças à enzima **ATP-sintase** ligada à membrana. Essa enzima cria uma via hidrofílica através da membrana mitocondrial interna que permite aos prótons fluírem a favor do seu gradiente eletroquímico. À medida que os prótons fazem a sua passagem através da ATP-sintase, eles são utilizados para dirigir a reação energeticamente desfavorável entre ADP e P_i para produzir ATP (ver Figura 2-27). A ATP-sintase é de origem antiga; a mesma enzima ocorre nas mitocôndrias de células animais, de cloroplastos de plantas e de algas e na membrana plasmática de bactérias e de arquebactérias.

A estrutura da ATP-sintase está ilustrada na **Figura 14-15**. Também chamada de ATPase F_0F_1, ela é uma proteína de múltiplas subunidades com uma massa de mais de 500.000 dáltons que funciona por catálise rotatória. Uma grande porção enzimática, com o formato de uma cabeça de pirulito e composta de um anel de 6 subunidades, projeta-se para o lado da matriz da membrana mitocondrial interna. Esta cabeça é sustentada no local por meio de um braço alongado que liga a cabeça, prendendo-a a um grupo de proteínas transmembrana que produzem um "dínamo" na membrana. Este dínamo está em contato com um "rotor" formado por um anel de 10 a 14 subunidades proteicas transmembrana idênticas. À medida que os prótons passam através do estreito canal formado no contato dínamo-rotor, o seu movimento promove a rotação do anel do rotor. A rotação também promove a torção de uma haste ligada ao rotor (*azul* na Figura 14-15B), a qual é forçada a girar rapidamente dentro da cabeça do pirulito. Como resultado, a energia do fluxo de prótons a favor do gradiente é convertida em energia mecânica de dois conjuntos de proteínas que realizam atrito

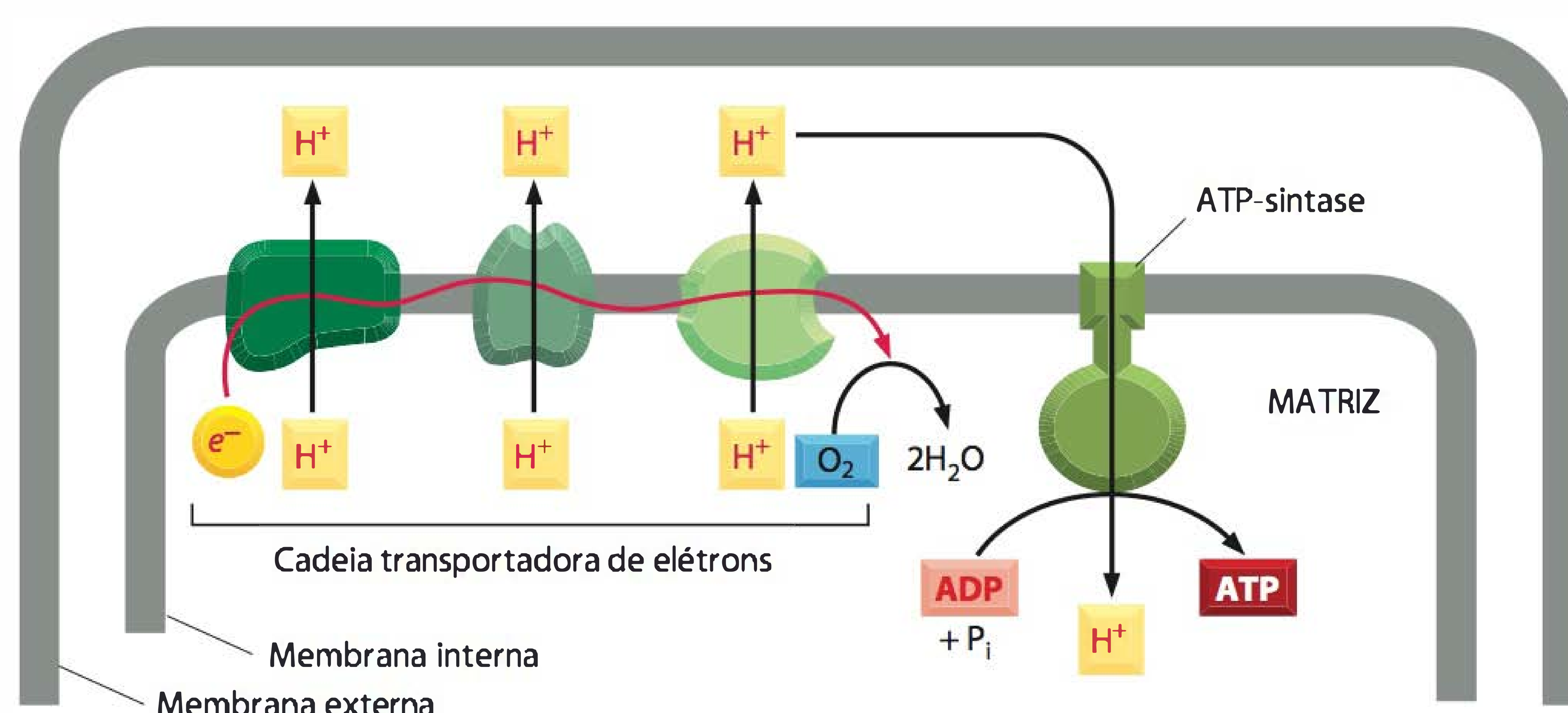


Figura 14-14 Mecanismo geral de fosforilação oxidativa. À medida que um elétron de alta energia passa através da cadeia transportadora de elétrons, parte da energia liberada é utilizada para direcionar os três complexos enzimáticos respiratórios que bombeiam H^+ para fora do espaço da matriz. O gradiente eletroquímico de prótons resultante através da membrana interna direciona H^+ de volta através da ATP-sintase, um complexo proteico transmembrana que utiliza a energia do fluxo de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP e de P_i na matriz.

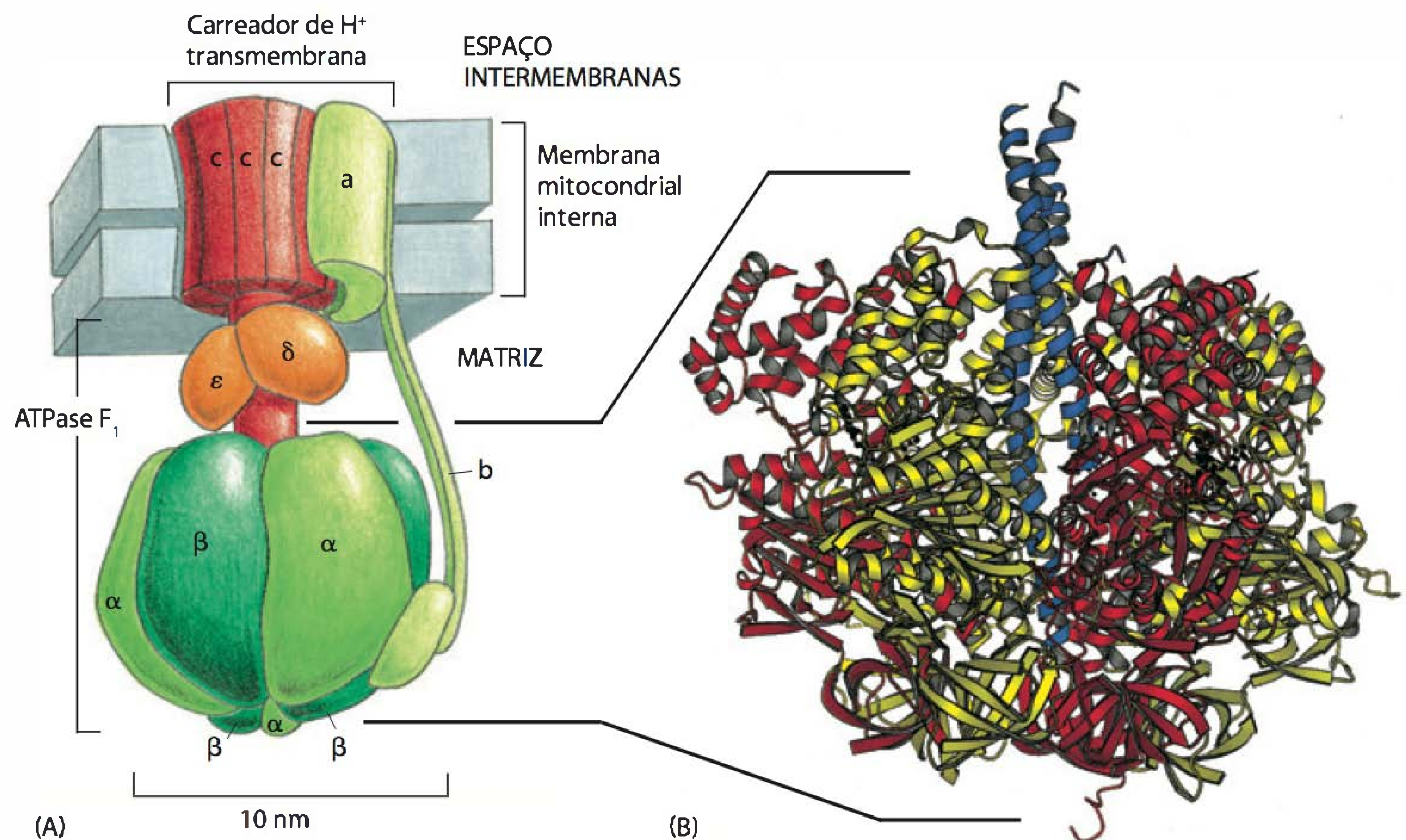


Figura 14-15 ATP-sintase. (A) A enzima é composta de uma porção "cabeça", chamada de ATPase F_1, e de um carreador transmembrana de H^+, chamado de F_0. Ambos são formados de múltiplas subunidades, como indicado. Uma haste rotatória gira com um rotor formado por um anel de 10 a 14 subunidades c na membrana (*vermelho*). O dínamo (*verde*) é formado por subunidades a transmembrana, ligadas a outras subunidades que criam um braço alongado. Este braço firma o dínamo a um anel de 3 subunidades α e 3 subunidades β que formam a cabeça, a qual, semelhantemente, não pode girar. (B) Estrutura tridimensional da ATPase F_1, como determinada por cristalografia por raios X. Esta parte da ATP-sintase tem o nome derivado da sua habilidade de conduzir a reação inversa à síntese de ATP, isto é, a hidrólise de ATP em ADP e P_i, quando destacada da porção transmembrana. (B, cortesia de John Walker, de J. P. Abrahams *et al.*, *Nature* 370:621-628, 1994. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

uma contra a outra: as proteínas da haste giratória empurrando um anel estacionário de proteínas da cabeça.

Três das seis subunidades da cabeça contêm sítios de ligação a ADP e a fosfato inorgânico. Estes são direcionados a formar ATP à medida que a energia mecânica é convertida em energia de ligações químicas por meio das repetidas mudanças de conformação proteica criadas pela haste giratória. Dessa maneira, a ATP-sintase é capaz de produzir mais de 100 moléculas de ATP por segundo, gerando 3 moléculas de ATP por rotação. O número de subunidades translocadoras de prótons no rotor é diferente em diferentes ATP-sintases, sendo que este número determina o número de prótons necessário para passar através desse maravilhoso instrumento de forma a confeccionar cada molécula de ATP (a sua "razão de rotação", a qual geralmente é um número fracionado entre 3 e 5).

O gradiente de prótons direciona o transporte acoplado através da membrana interna

O gradiente eletroquímico de prótons promove outros processos além da síntese de ATP. Nas mitocôndrias, muitas pequenas moléculas com carga, como piruvato, ADP e P_i, são bombeadas para a matriz a partir do citosol, enquanto outras, como ATP, devem ser carreadas na direção oposta. Transportadores que ligam essas moléculas podem acoplar os seus transportes ao fluxo energeticamente favorável de H^+ para a matriz mitocondrial. Portanto, o piruvato e o fosfato inorgânico (P_i), por exemplo, são cotransportados para dentro junto com H^+, à medida que este último move-se para a matriz.

O ADP e o ATP são cotransportados em direção oposta por uma única proteína transportadora. Uma vez que a molécula de ATP possui uma carga negativa a mais do que o ADP, cada troca de nucleotídeos resulta em uma carga negativa total sendo movida para fora da mitocôndria. A diferença de voltagem através da membrana, portanto, direciona este cotransporte ADP-ATP (**Figura 14-16**).

Acabamos de observar como, nas células eucarióticas, o gradiente de prótons é utilizado para dirigir a formação de ATP e o transporte de certos metabólitos através da membrana. Nas bactérias, um gradiente semelhante através da membrana plasmática é utilizado para promover ambos os tipos de processos. Em bactérias capazes de se locomover, este gradiente promove a rápida rotação do flagelo bacteriano, o qual propulsiona a bactéria no ambiente (**Figura 14-17**).

Os gradientes de prótons produzem a maior parte do ATP celular

Como estabelecido anteriormente, a glicólise sozinha produz como resultado líquido 2 moléculas de ATP para cada molécula de glicose metabolizada, o que representa a energia total

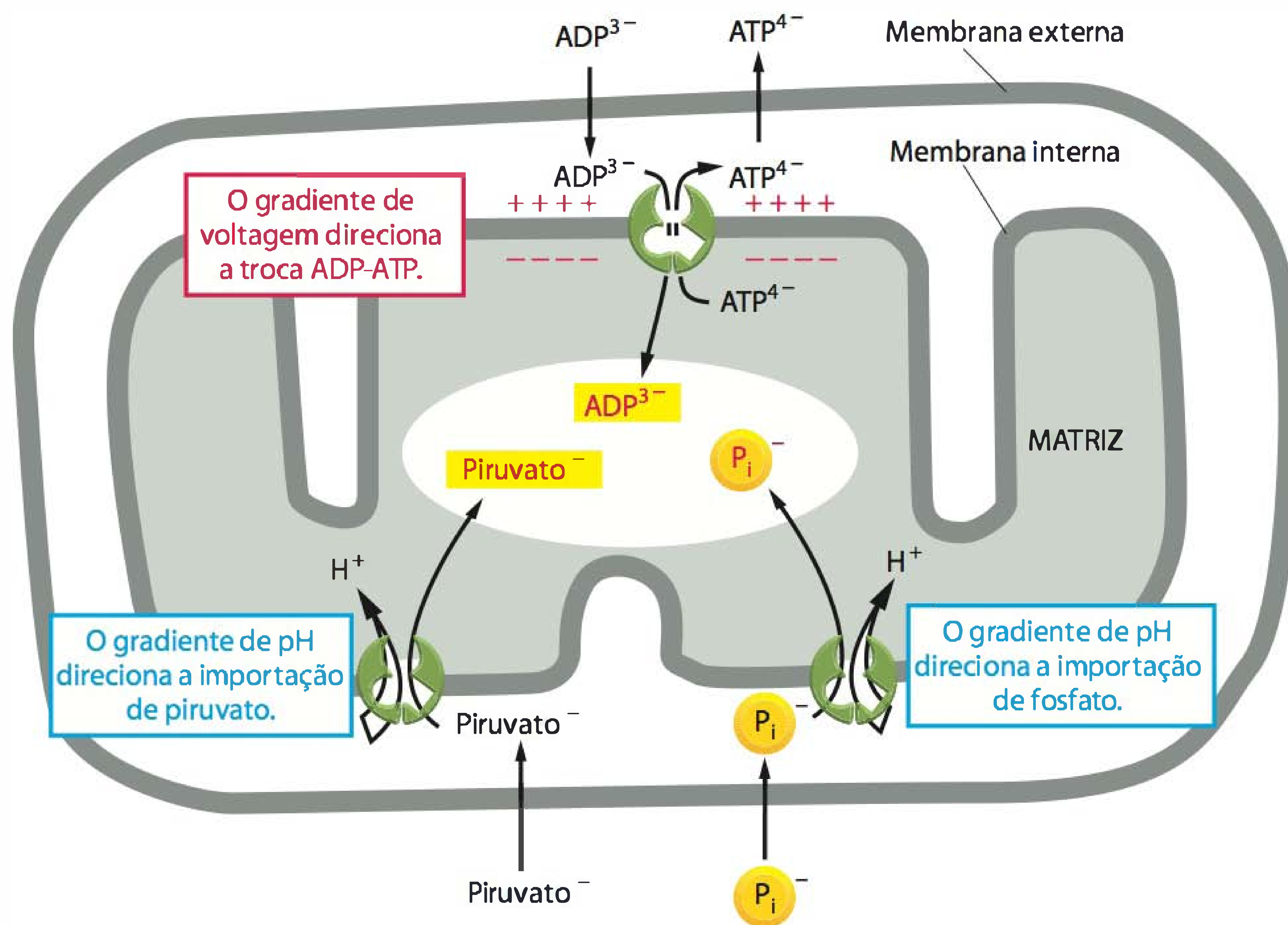


Figura 14-16 Alguns dos processos de transporte ativo promovidos pelo gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. O piruvato, o fosfato inorgânico (P_i) e o ADP são transportados para a matriz, enquanto o ATP é bombeado para fora. A carga sobre cada uma das moléculas transportadas está indicada para comparação com o potencial de membrana, o qual é negativo internamente, como apresentado. A membrana externa é livremente permeável a todos esses compostos. O transporte ativo de moléculas através de membranas por proteínas transportadoras é discutido no Capítulo 11.

fornecida para os processos fermentativos que ocorrem na ausência de O_2 (discutido no Capítulo 2). Durante a fosforilação oxidativa, cada par de elétrons doados pelo NADH produzido nas mitocôndrias fornece energia para a formação de cerca de 2,5 moléculas de ATP, após subtrair-se a energia necessária para realizar o transporte deste ATP para o citosol. A fosforilação oxidativa também produz 1,5 molécula de ATP por cada par de elétrons de $FADH_2$ ou de moléculas de NADH produzidas pela glicólise no citosol. A partir dos produtos fornecidos pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico resumidos na **Tabela 14-1**A, pode-se prontamente calcular que a completa oxidação de uma molécula de glicose – iniciando com a glicólise e terminando com a fosforilação oxidativa – fornece um ganho líquido de cerca de 30 ATPs.

Em conclusão, a grande maioria do ATP produzido a partir da oxidação da glicose em uma célula animal é fornecida por mecanismos quimiosmóticos na membrana mitocondrial. A fosforilação oxidativa na mitocôndria também produz a grande quantidade de ATP a partir do NADH e do $FADH_2$ derivados da oxidação de gorduras (Tabela 14-1B; ver também Figura 2-81).

As mitocôndrias mantêm uma alta razão ATP:ADP nas células

Graças às proteínas carreadoras da membrana mitocondrial interna que realizam trocas de ATP por ADP, as moléculas de ADP produzidas pela hidrólise do ATP no citosol entram

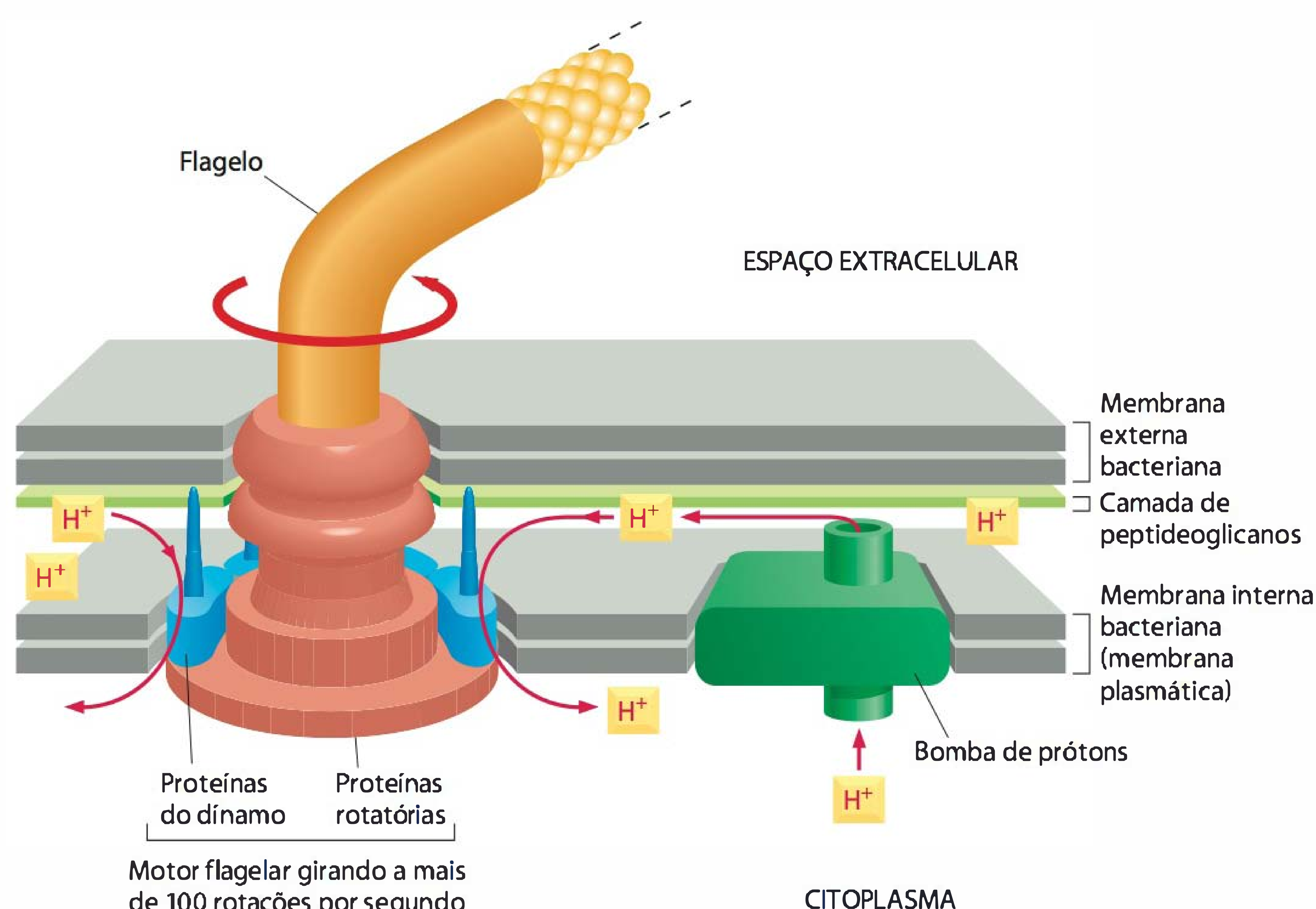


Figura 14-17 A rotação do flagelo bacteriano promovida pelo fluxo de H^+. O flagelo está ligado a uma série de anéis proteicos (*laranja*), os quais estão embebidos nas membranas externa e interna e giram com o flagelo. A rotação é promovida por um fluxo de prótons através de um anel externo de proteínas (o dínamo) por mecanismos semelhantes àqueles utilizados pela ATP-sintase.

Tabela 14-1 Produtos fornecidos a partir da oxidação de açúcares e gorduras

A. PRODUTOS LÍQUIDOS A PARTIR DA OXIDAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE GLICOSE
No citosol (glicólise) 1 glicose → 2 piruvato + 2 NADH + 2 ATP Na mitocôndria (piruvato-desidrogenase e ciclo do ácido cítrico) 2 piruvato → 2 acetil-CoA + 2 NADH 2 acetil-CoA → 6 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP
Resultado líquido na mitocôndria 2 piruvato → 8 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP
B. PRODUTOS LÍQUIDOS A PARTIR DA OXIDAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE PALMITOIL-CoA (FORMA ATIVADA DO PALMITATO, UM ÁCIDO GRAXO)
Na mitocôndria (oxidação de ácidos graxos e ciclo do ácido cítrico) 1 palmitoil-CoA → 8 acetil-CoA + 7 NADH + 7 $FADH_2$ 8 acetil-CoA → 24 NADH + 8 $FADH_2$ + 8 GTP
Resultado líquido na mitocôndria 1 palmitoil-CoA → 31 NADH + 15 $FADH_2$ + 8 GTP

rapidamente nas mitocôndrias para serem recarregadas, enquanto as moléculas de ATP formadas na matriz mitocondrial pela fosforilação oxidativa são rapidamente bombeadas para o citosol, onde são necessárias. Uma típica molécula de ATP no corpo humano é transportada para fora da mitocôndria e retorna a ela (como ADP) para recarregar mais de uma vez por minuto, mantendo a concentração de ATP na célula cerca de 10 vezes mais alta do que a de ADP.

Como discutido no Capítulo 2, as enzimas biossintetizantes frequentemente realizam reações energeticamente desfavoráveis pelo seu acoplamento à hidrólise energeticamente favorável do ATP (ver Figura 2-59). O estoque de ATP é, portanto, utilizado para promover os processos celulares de forma muito semelhante a uma bateria que propulsiona aparelhos elétricos. Se a atividade das mitocôndrias fosse impedida, os níveis de ATP cairiam e a bateria celular terminaria; eventualmente, as reações energeticamente desfavoráveis não poderiam mais ser impulsionadas e a célula morreria. O veneno cianeto, que bloqueia o transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna, causa a morte exatamente por meio desse processo.

Pode parecer que os processos celulares seriam interrompidos somente quando a concentração de ATP atingisse o valor zero; porém, de fato, a vida é ainda mais exigente: ela exige que as células mantenham uma concentração de ATP que seja maior do que as concentrações de ADP e de P_i. Para explicar por que, deveremos considerar alguns princípios elementares da termodinâmica.

Um alto valor negativo de ΔG é necessário para que a hidrólise do ATP seja útil para a célula

No Capítulo 2, foi discutido o conceito de energia livre (G). A variação de energia livre para uma reação, ΔG, determina se esta reação ocorrerá em uma célula. Mostramos na p. 76 que a ΔG para uma dada reação pode ser escrita como a soma de duas partes: a primeira, chamada de *variação de energia livre padrão*, $\Delta G°$, depende das características intrínsecas das moléculas reagentes; a segunda depende das suas concentrações. Para a reação simples A → B,

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[B]}{[A]}$$

onde [A] e [B] denotam as concentrações de A e B, e ln é o logaritmo natural. $\Delta G°$, portanto, iguala-se ao valor de ΔG quando as concentrações molares de A e B são iguais (ln 1 = 0).

No Capítulo 2, o ATP foi descrito como a principal "molécula carreadora ativada" das células. A grande e favorável variação de energia livre (alta ΔG negativa) para a sua hidrólise é utilizada, por meio de *reações acopladas*, para direcionar outras reações químicas que, de outra forma, não ocorreriam (ver p. 79-87). A reação de hidrólise do ATP produz dois produ-

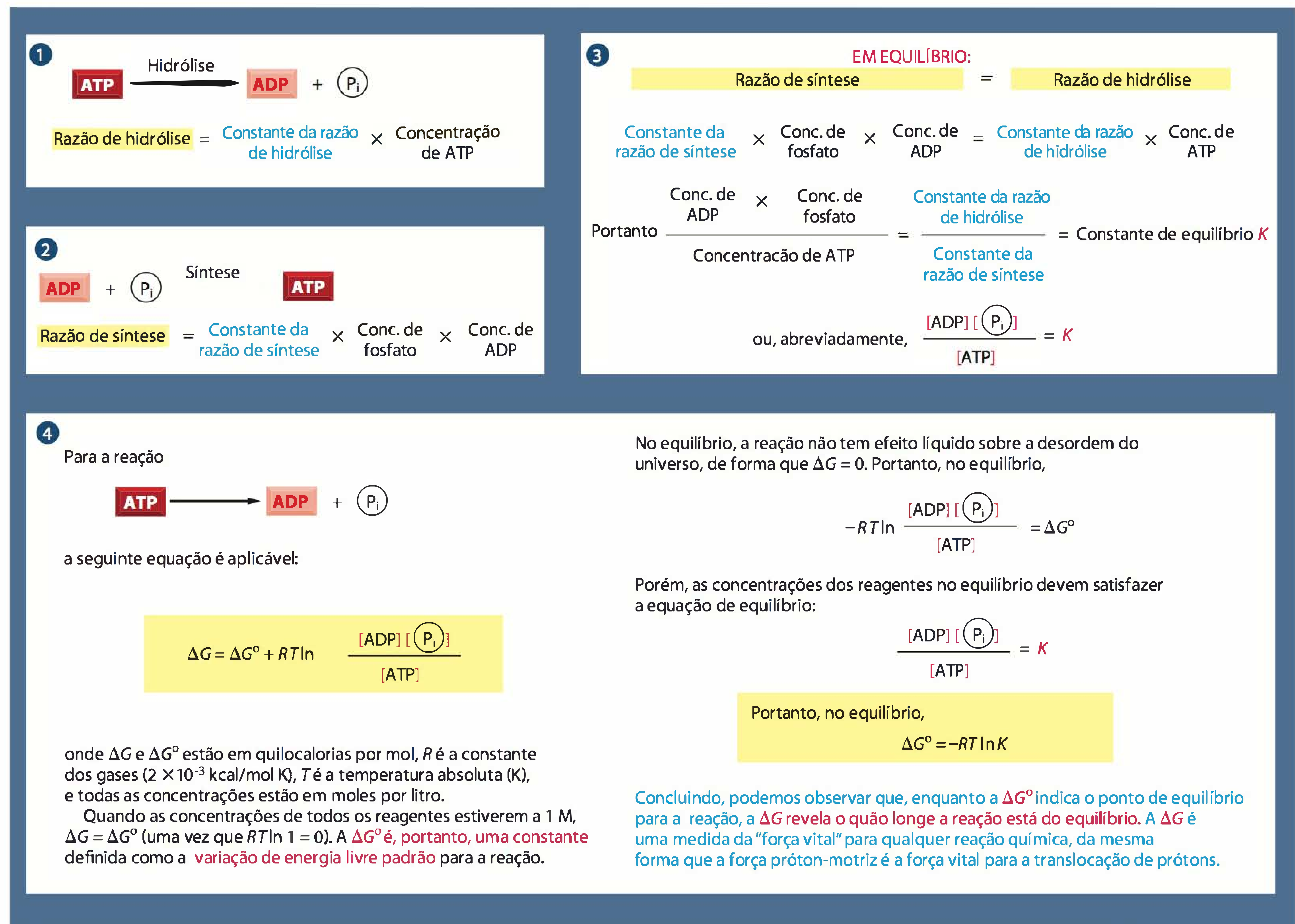


Figura 14-18 Relação básica entre a variação de energia livre e o equilíbrio na reação de hidrólise do ATP. O valor das constantes nos quadros 1 e 2 é determinado a partir de experimentos nos quais o acúmulo de produtos é medido em função do tempo. A constante de equilíbrio aqui apresentada, *K*, está em unidades de moles por litro. (ver Painel 2-7, p. 118-119, para uma discussão sobre a energia livre, e a Figura 3-43, para uma discussão sobre a constante de equilíbrio.)

tos, ADP e P_i; ela é, portanto, uma reação do tipo A → B + C, onde, como descrito na **Figura 14-18**,

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

Quando o ATP é hidrolisado a ADP e P_i, sob as condições que normalmente existem em uma célula, a variação de energia livre é grosseiramente de −11 a −13 kcal/mol (−46 a −54 kJ/mol). Esta ΔG extremamente favorável depende de se ter uma alta concentração de ATP na célula, em comparação às concentrações de ADP e P_i. Quando ATP, ADP e P_i estão presentes na mesma concentração de 1 mol/litro (as assim chamadas "condições ideais"), a ΔG para a hidrólise de ATP é a variação de energia livre padrão ($\Delta G°$), a qual é de apenas −7,3 kcal/mol (−30,5 kJ/mol). Em concentrações muito mais baixas de ATP relativas às concentrações de ADP e de P_i, a ΔG se torna zero. Neste ponto, a razão em que ADP e P_i irão juntar-se para formar ATP será equivalente à razão em que ATP será hidrolisado para formar ADP e P_i. Em outras palavras, quando $\Delta G = 0$, a reação está em *equilíbrio* (ver Figura 14-18).

É a ΔG, e não a $\Delta G°$, que indica o quão distante uma reação está do equilíbrio e determina se ela pode ser usada para direcionar outras reações. Devido ao fato de a conversão eficiente de ADP em ATP nas mitocôndrias manter uma alta concentração de ATP em relação às concentrações de ADP e P_i, a reação de hidrólise do ATP nas células é mantida muito longe do equilíbrio, e a ΔG é, correspondentemente, muito negativa. Sem este desequilíbrio, a hidrólise de ATP não poderia ser usada para propulsionar as reações da célula; por exemplo, muitas reações biossintetizantes se direcionariam para trás, ao invés de transcorrerem para a frente, sob baixas concentrações de ATP.

A ATP-sintase pode funcionar reversamente para hidrolisar ATP e bombear H^+

Além de aproveitar o fluxo de H^+ a favor do gradiente eletroquímico de prótons para produzir ATP, a ATP-sintase pode trabalhar de forma reversa: ela pode utilizar a energia da hidrólise do ATP para bombear H^+ através da membrana mitocondrial interna (**Figura 14-19**). Ela funciona, portanto, como uma *máquina acopladora reversível*, interconvertendo as energias derivadas do gradiente eletroquímico de prótons e das ligações químicas. A sua direção de ação depende do balanço entre o nível do gradiente eletroquímico de prótons e a ΔG local para a hidrólise de ATP, como será explicado agora.

O número exato de prótons necessários para produzir cada molécula de ATP depende do número de subunidades no anel das proteínas transmembrana que formam a base do rotor (ver Figura 14-15). Entretanto, para ilustrar os princípios envolvidos, iremos assumir que uma molécula de ATP é produzida pela ATP-sintase para cada três prótons que a atravessam. Nesse caso, o funcionamento da ATP-sintase na direção da síntese de ATP ou na direção da hidrólise de ATP depende, em cada instante, do equilíbrio exato entre a variação de energia livre favorável para mover os três prótons através da membrana para dentro da matriz mitocondrial ($\Delta G_{3H}+$, que é menor do que zero) e a variação de energia livre desfavorável para a *síntese* de ATP na matriz, $\Delta G_{\text{síntese de ATP}}$ (que é maior do que zero). Como discutido previamente, o valor da $\Delta G_{\text{síntese de ATP}}$ depende da concentração exata dos três reagentes ATP, ADP e P_i na matriz mitocondrial (ver Figura 14-18). O valor da $\Delta G_{3H}+$, por outro lado, é proporcional ao valor da força próton-motriz através da membrana mitocondrial interna. O exemplo seguinte explicará como o balanço entre essas duas variações de energia livre afetam a ATP-sintase.

Como explicado na legenda da Figura 14-19, um único H^+ que se move para a matriz mitocondrial, a favor do seu gradiente eletroquímico de 200 mV, libera 4,6 kcal/mol (19,2 kJ/mol) de energia livre, enquanto o movimento de três prótons libera três vezes mais energia livre ($\Delta G_{3H}+ = -13{,}8$ kcal/mol; $-57{,}7$ kJ/mol). Portanto, se a força próton-motriz permanecer constante em 200 mV, a ATP-sintase sintetizará ATP até que uma determinada razão de ATP a ADP e P_i seja alcançada, onde a $\Delta G_{\text{síntese de ATP}}$ é exatamente igual a $+13{,}8$ kcal/mol (57,7 kJ/mol; aqui, $\Delta G_{\text{síntese de ATP}} + \Delta G_{3H}+ = 0$). Nesse ponto, não haverá a síntese líquida de ATP ou sua hidrólise por parte da ATP-sintase.

Suponha que uma grande quantidade de ATP seja repentinamente hidrolisada no citosol por reações que necessitam de energia, causando uma queda da razão ATP:ADP na matriz. Nesse caso, o valor da $\Delta G_{\text{síntese de ATP}}$ diminuirá (ver Figura 14-18), e a ATP-sintase começará a sintetizar ATP novamente para restaurar a razão ATP:ADP original. Alternativamente, se a força próton-motriz repentinamente diminui e é mantida em um valor constante de 160 mV, a $\Delta G_{3H}+$ irá mudar para $-11{,}0$ kcal/mol (–46 kJ/mol). Como resultado, a ATP-sintase começará a hidrolisar algumas moléculas de ATP da matriz até que o equilíbrio de ATP para ADP e P_i seja alcançado (onde a $\Delta G_{\text{síntese de ATP}} = +11{,}0$ kcal/mol ou +46 kJ/mol), e assim por diante.

A variação de energia livre (ΔG) para a hidrólise do ATP depende das concentrações dos três reagentes ATP, ADP e P_i (ver Figura 14-18); a ΔG para a síntese de ATP é o negativo deste valor. A ΔG para a translocação de prótons através da membrana é proporcional à força pró-

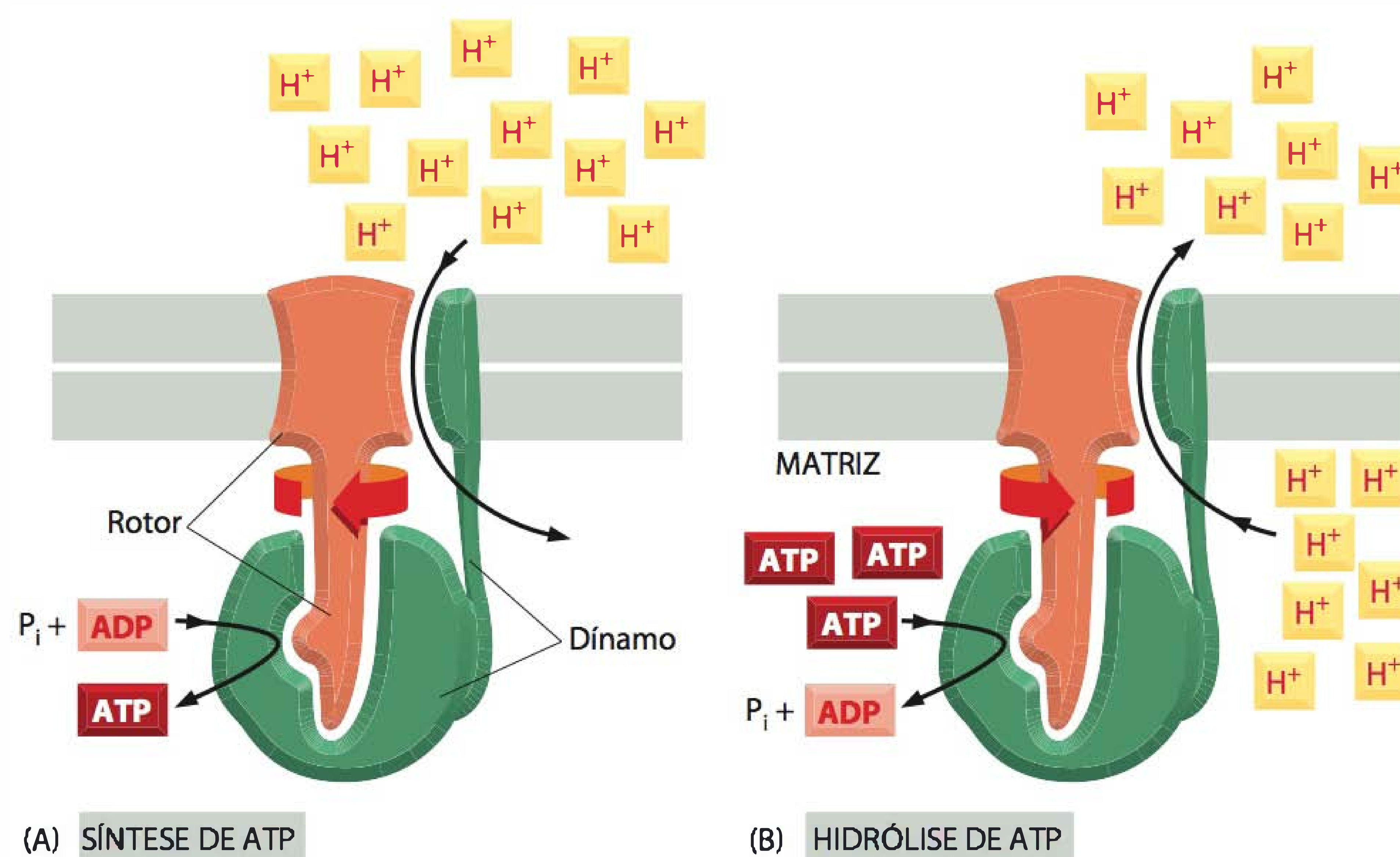


Figura 14-19 A ATP-sintase é uma máquina acopladora reversível que pode converter a energia do gradiente eletroquímico de prótons em energia de ligações químicas, ou vice-versa. A ATP-sintase pode tanto sintetizar ATP, recolhendo a energia da força próton-motriz (A), quanto bombear prótons contra o seu gradiente eletroquímico, pela hidrólise de ATP (B). A direção de operação em um dado momento depende do valor líquido da variação de energia livre (ΔG) para o processo acoplado de translocação de H^+ através da membrana e para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. A medida do torque que a ATP-sintase pode produzir quando hidrolisando ATP revela que a sintase pode bombear 60 vezes mais fortemente do que um motor diesel de igual peso. A variação de energia livre (ΔG) para a hidrólise ATP depende das concentrações dos três reagentes ATP, ADP e P_i (ver Figura 14-18); o ΔG para a síntese de ATP é o negativo deste valor. O ΔG para a translocação de prótons através da membrana é proporcional à força próton-motora. O fator de conversão entre estes é Faraday. Desse modo, $\Delta G_H+ = -0{,}023$ (força próton-motora), onde ΔG_H+ está em kcal/mol e a força próton-motora está em mV. Para um gradiente eletroquímico de prótons (força próton-motora) de 200 mV, $\Delta G_H+ = -4{,}6$ kcal/mol ($-19{,}2$ kJ/mol).

ton-motriz. O fator de conversão entre elas é o *faraday*. Assim, $\Delta G_H+ = -0{,}023$ (força próton-motriz), onde a ΔG_H+ está expressa em kcal/mol e a força próton-motriz está em mV. Para um gradiente eletroquímico de prótons de 200 mV, $\Delta G_H+ = -4{,}6$ kcal/mol ($-19{,}2$ kJ/mol).

Em muitas bactérias, a ATP-sintase é rotineiramente revertida em uma transição entre o metabolismo aeróbio e o anaeróbio, como veremos mais tarde. Adicionalmente, as ATPases do tipo V que acidificam organelas, e que são estruturalmente semelhantes à ATP-sintase, normalmente funcionam de forma reversa (ver Figura 13-36). Outras proteínas transportadoras de membrana que acoplam o movimento de íons à síntese ou à hidrólise de ATP compartilham o mesmo tipo de reversibilidade. Tanto a bomba de Na^+ e K^+ quanto a bomba de Ca^{2+}, descritas no Capítulo 11, por exemplo, hidrolisam ATP e utilizam a energia liberada para bombear íons específicos através de uma membrana. Se qualquer dessas bombas for exposta a um gradiente anormalmente extremo dos íons que transportam, entretanto, elas irão atuar reversamente – sintetizando ATP a partir de ADP e P_i em vez de hidrolisá-lo. Portanto, como a ATP-sintase, tais bombas são capazes de converter a energia eletroquímica armazenada em um gradiente transmembrana de íons diretamente em energia de ligação de fosfato do ATP.

Resumo

A mitocôndria realiza a maior parte das oxidações celulares e produz a massa de ATP das células animais. Uma mitocôndria é definida por duas membranas concêntricas, e o seu principal componente de trabalho é o espaço mais interno (a matriz) e a membrana interna que o circunda. A matriz mitocondrial contém uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e aquelas que oxidam a acetil-CoA em CO_2 através do ciclo do ácido cítrico. Essas reações de oxidação produzem grandes quantidades de NADH (e de $FADH_2$). A cadeia transportadora de elétrons (cadeia respiratória) localizada na membrana mitocondrial interna capta, assim, a energia disponibilizada pela combinação do oxigênio molecular com os elétrons reativos levados pelo NADH e pelo $FADH_2$.

A cadeia respiratória utiliza a energia derivada do transporte de elétrons para bombear H^+ para fora da matriz para criar um gradiente eletroquímico de prótons (H^+) transmembrana, o qual inclui tanto a contribuição de um potencial de membrana como uma diferença de pH. A grande quantidade de energia livre liberada quando o fluxo de H^+ fiui de volta para a matriz (através da membrana interna) fornece a base para a produção de ATP na matriz por uma notável máquina proteica – a ATP-sintase, uma máquina acopladora reversível entre o fiuxo de prótons e a síntese ou hidrólise de ATP. O gradiente eletroquímico transmembrana também promove o transporte ativo de metabólitos selecionados através da membrana mitocondrial interna, incluindo uma eficiente troca ATP-ADP entre a mitocôndria e o citosol que mantém o estoque de ATP celular altamente carregado. A alta razão resultante de ATP em relação aos seus produtos de hidrólise torna a variação de energia livre extremamente favorável, permitindo que essa reação de hidrólise direcione um grande número de processos dependentes de energia da célula.

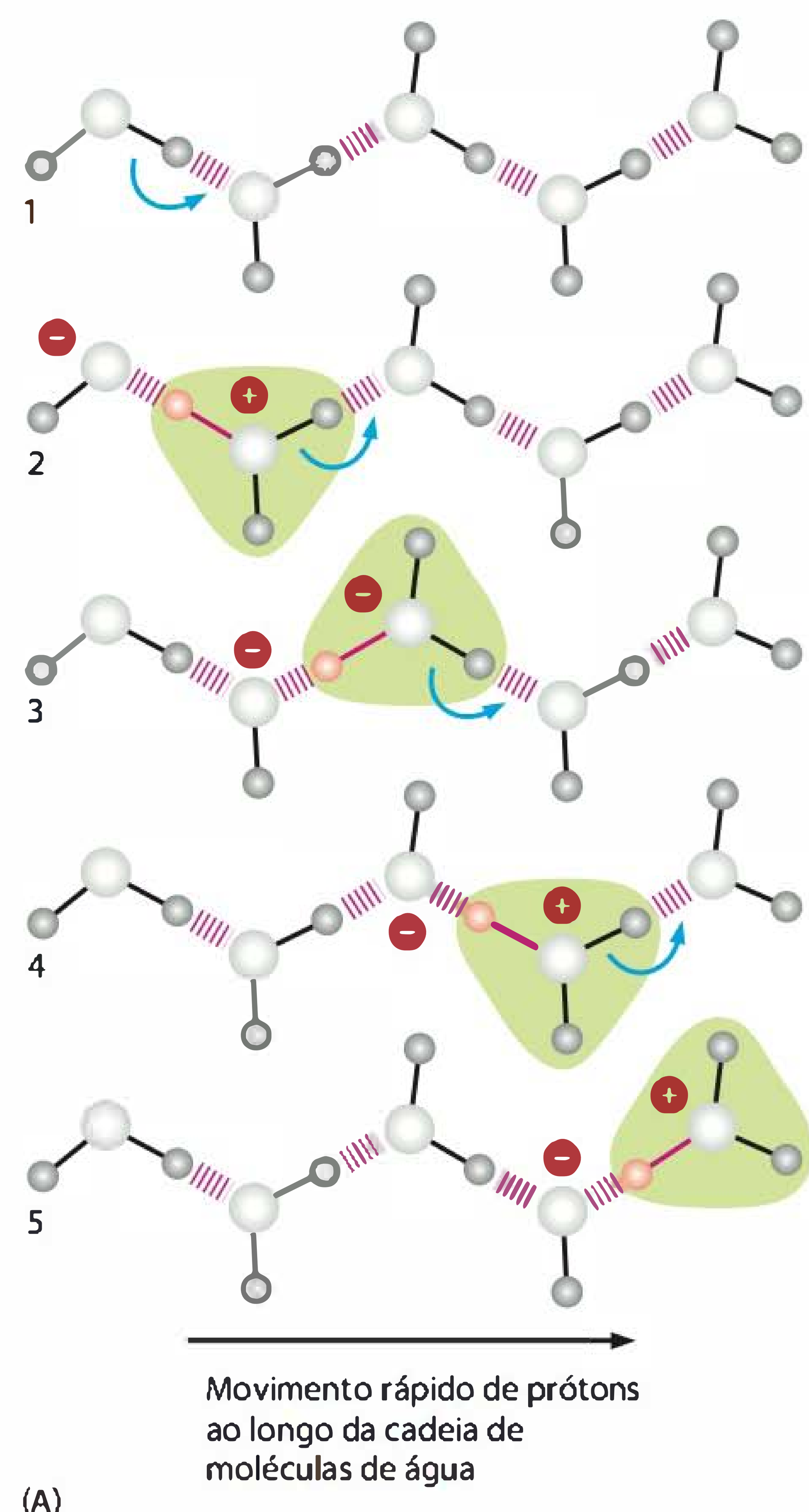
AS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS E SUAS BOMBAS DE PRÓTONS

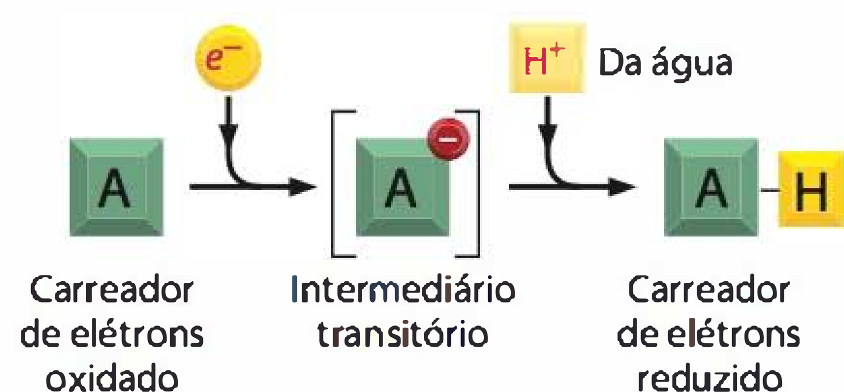
Tendo considerado, em termos gerais, o modo como uma mitocôndria utiliza o transporte de elétrons para criar um gradiente eletroquímico de prótons, necessitamos examinar com maior detalhe os mecanismos que fundamentam os processos de conversão de energia com base em membranas. Fazendo isso, estaremos alcançando um propósito maior. Como enfatizado no início deste capítulo, são empregados mecanismos quimiosmóticos muito similares por mitocôndrias, cloroplastos, arquebactérias e bactérias. De fato, esses mecanismos fundamentam as funções de aproximadamente todos os seres vivos – incluindo seres anaeróbios que derivam toda a sua energia da transferência de elétrons entre duas moléculas inorgânicas.

O objetivo nesta seção é explicar como o processo de transporte de elétrons pode bombear prótons através de uma membrana. Iniciaremos com alguns dos princípios básicos dos quais este processo é dependente.

Os prótons, de forma incomum, movimentam-se facilmente

Embora os prótons assemelhem-se a outros íons positivos como Na^+ e K^+ no seu movimento através das membranas, eles são únicos em outros aspectos. Os átomos de hidrogênio certamente são os tipos mais abundantes de átomos em organismos vivos e estão presentes em





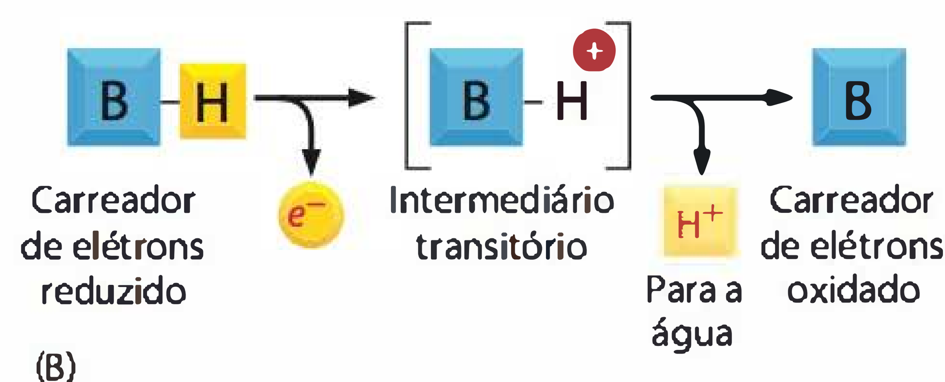


Figura 14-20 Como os prótons se comportam na água. (A) Os prótons movem-se muito rapidamente ao longo de uma cadeia de moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio. Neste diagrama, os saltos dos prótons estão indicados por *setas azuis*, e os íons hidrônio estão indicados pelo *sombreamento verde*. Como discutido no Capítulo 2, prótons nus raramente existem e estão, ao contrário, associados a moléculas de água na forma de íons hidrônio, H_3O^+. Em pH neutro (pH 7), os íons hidrônio estão presentes em uma concentração de 10^{-7} M. Entretanto, para simplificar, frequentemente se faz referência a isso como a concentração de H^+ de 10^{-7} M (ver Painel 2-2, p. 108-109). (B) A transferência de elétrons pode causar a transferência de átomos inteiros de hidrogênio, porque os prótons são prontamente captados da (ou doados pela) água intracelular. Neste exemplo, a molécula A capta um elétron somado a um próton quando ela é reduzida, e B perde um elétron e um próton quando é oxidada.

grande quantidade não somente nas moléculas biológicas que contêm carbono, mas também nas moléculas de água que as cercam. Os prótons na água são altamente mobilizáveis, agitando-se através da rede de ligações de hidrogênio das moléculas de água, pela rápida dissociação de uma dessas moléculas, de forma a associar-se à vizinha, como ilustrado na **Figura 14-20**A. Entende-se que os prótons movem-se através de uma bomba proteica embebida na bicamada lipídica de uma maneira semelhante: eles transferem-se de uma cadeia lateral de um aminoácido a outra, seguindo um canal especial através da proteína.

Os prótons também são especiais com respeito ao transporte de elétrons. Sempre que uma molécula é reduzida pela aquisição de um elétron, o elétron (e^-) traz consigo uma carga negativa. Em muitos casos, esta carga é rapidamente neutralizada pela adição de um próton (H^+) da água, de forma que o efeito líquido da redução é a transferência de um átomo inteiro de hidrogênio, $H^+ + e^-$ (Figura 14-20B). Similarmente, quando uma molécula é oxidada, o átomo de hidrogênio pode ser rapidamente dissociado em seu elétron e próton constituintes, permitindo o elétron seja transferido separadamente para uma molécula capaz de aceitar elétrons, enquanto o próton é transferido para a água. Portanto, em uma membrana na qual os elétrons são transferidos ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons, bombear prótons de um lado para o outro da membrana é, em principio, um problema relativamente simples. Tudo o que é necessário é que um carreador de elétrons esteja acondicionado na membrana, de forma que permita a captação de um próton de um lado da membrana, quando ele recebe o elétron, e a liberação do próton do outro lado da membrana, com a passagem do elétron para a próxima molécula carreadora da cadeia (**Figura 14-21**).

O potencial redox é uma medida das afinidades eletrônicas

Nas reações bioquímicas, quaisquer elétrons removidos de uma molécula são transferidos para outra, de modo que a oxidação de uma molécula determina a redução de outra. De maneira semelhante a qualquer outra reação química, a tendência de tal oxidação-redução, ou **reações redox**, seguir espontaneamente depende da variação de energia livre (ΔG) para a transferência de elétrons, a qual depende, por sua vez, das afinidades relativas das duas moléculas por elétrons.

Como as transferências de elétrons fornecem a maior parte da energia para os organismos vivos, é importante despender um pouco mais de tempo para entendê-las. Muitos leitores já estão familiarizados com ácidos e bases, os quais doam a aceitam prótons (ver Painel 2-2, p. 108-109). Os ácidos e as bases existem em pares conjugados ácido-base, onde o ácido é prontamente convertido na base pela perda de um próton. Por exemplo, o ácido acético (CH_3COOH) é convertido em sua base conjugada (CH_3COO^-) na reação:



$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Exatamente da mesma forma, os pares de compostos como NADH e NAD^+ são chamados de **pares redox**, uma vez que NADH é convertido a NAD^+ pela perda de um elétron na reação:



$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$$

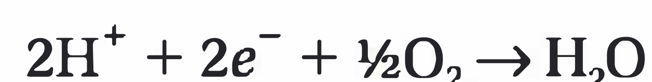
O NADH é um forte doador de prótons: como os seus elétrons são mantidos por uma ligação de alta energia, a variação de energia livre para a passagem dos seus elétrons para a maioria das outras moléculas é favorável (ver Figura 14-9). É difícil formar uma ligação de alta energia. Portanto, o seu par NAD^+ é, necessariamente, um fraco aceptor de elétrons.

A tendência de transferir elétrons em qualquer par redox pode ser medida experimentalmente. Tudo o que se requer é a formação de um circuito elétrico que ligue uma mistura 1:1 (equimolar) de pares redox a um segundo par redox selecionado arbitrariamente como padrão de referência, de forma que a diferença de voltagem possa ser medida entre eles (**Painel 14-1**, p. 830). Essa diferença de voltagem é definida como **potencial redox**; como definido, os elétrons fluirão espontaneamente de um par redox como $NADH/NAD^+$, com um baixo potencial redox (uma baixa afinidade por elétrons), para um par redox como O_2/H_2O, com um alto potencial redox (uma alta afinidade por elétrons). Portanto, o NADH é uma boa molécula para doar elétrons para a cadeia respiratória, enquanto o O_2 é apropriado para atuar como "ralo" de elétrons ao final da via. Como explicado no Painel 14-1, a diferença no potencial redox, $\Delta E_0'$, é uma medida direta da variação de energia livre padrão ($\Delta G°$) para a transferência de um elétron de uma molécula para outra.

As transferências de elétrons liberam grandes quantidades de energia

Como discutido há pouco, os pares de compostos que possuem os potenciais redox mais negativos têm afinidades mais fracas por elétrons e, portanto, contêm carreadores com tendências mais fortes a doar elétrons. Contrariamente, os pares que possuem potenciais redox mais positivos têm afinidades mais fortes para aceitar elétrons. Uma mistura 1:1 de NADH e NAD^+ tem um potencial redox de −320 mV, indicando que o NADH tem uma forte tendência a doar elétrons; uma mistura 1:1 de H_2O e $½O_2$ possui um potencial redox de +820 mV, indicando que o O_2 possui uma forte tendência a aceitar elétrons. A diferença no potencial redox é de 1,14 volt (1.140 mV), o que significa que a transferência de cada elétron do NADH para o O_2 sob condições-padrão é bastante favorável, onde $\Delta G° = -26{,}2$ kcal/mol (110 kJ/mol), ou duas vezes esta quantidade para os dois elétrons transferidos por molécula de NADH (ver Painel 14-1). Se compararmos essa variação de energia livre com aquela para a formação da ligação fosfoanidrídica no ATP, onde $\Delta G° = -7{,}3$ kcal/mol (−30,5 kJ/mol; ver Figura 2-75), veremos que, pela oxidação de uma molécula de NADH, é liberada energia mais do que suficiente para sintetizar várias moléculas de ATP a partir de ADP e de P_i.

Os sistemas vivos certamente poderiam ter desenvolvido enzimas que permitissem ao NADH doar elétrons diretamente para o O_2 para produzir água na reação:



$$2H^+ + 2e^- + ½O_2 \rightarrow H_2O$$

Porém, devido à brusca queda de energia livre, essa reação procederia com uma força quase explosiva, e aproximadamente toda a energia seria liberada na forma de calor. De fato, as células fazem esta reação, mas elas a realizam de maneira muito mais gradual, passando os elétrons de alta energia do NADH para o O_2 através de muitos carreadores da cadeia transportadora de elétrons. Uma vez que cada carreador sucessivo na cadeia mantém os seus elétrons mais firmemente, a reação energeticamente favorável $2H^+ + 2e^- + ½O_2 \rightarrow H_2O$ ocorre em muitas pequenas etapas. Isso permite que cerca da metade da energia liberada seja estocada, em vez de ser perdida no ambiente como calor.

Os métodos espectroscópicos são usados para identificar muitos dos carreadores de elétrons da cadeia respiratória

Muitos dos carreadores de elétrons da cadeia respiratória absorvem a luz visível e mudam de cor quando são oxidados ou reduzidos. Em geral, cada um deles tem um espectro de absorção e uma reatividade distintos o suficiente para permitir um acompanhamento dos seus comportamentos por métodos espectroscópicos, mesmo em preparações brutas. Foi possível, portanto, purificar esses componentes muito antes das suas funções exatas serem conhecidas. Assim, os **citocromos** foram descobertos em 1925 como compostos que sofrem rápida oxidação e redução em organismos vivos tão distintos quanto bactérias, leveduras e insetos. Pela observação de células e de tecidos com um espectroscópio, três tipos de citocromos foram identificados pelos seus distintos espectros de absorção e designados citocromos *a*, *b* e *c*. Essa nomenclatura tem sobrevivido, mesmo que se saiba que as células contêm vários citocromos de cada tipo e que a classificação em tipos não seja funcionalmente importante.

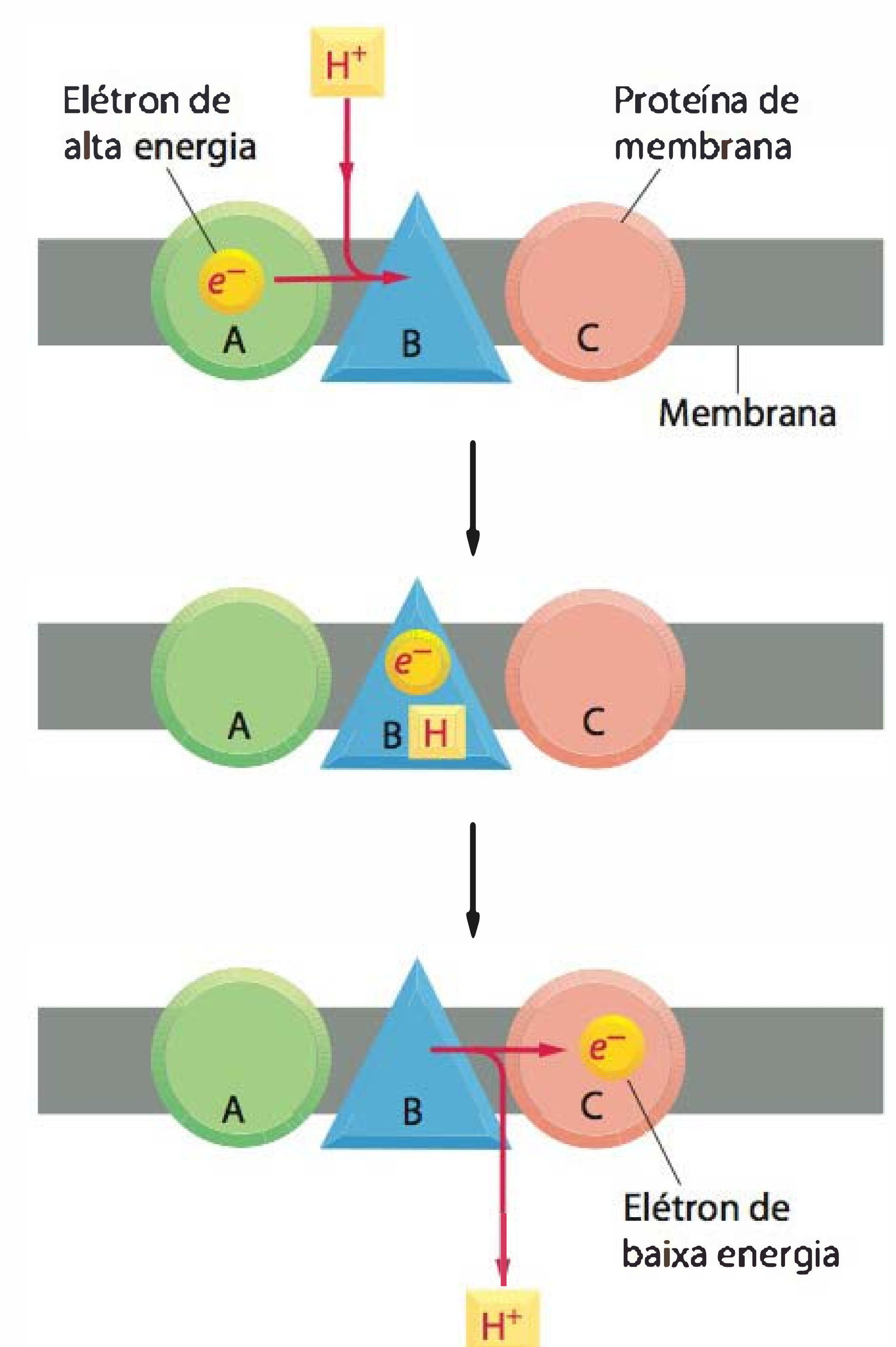
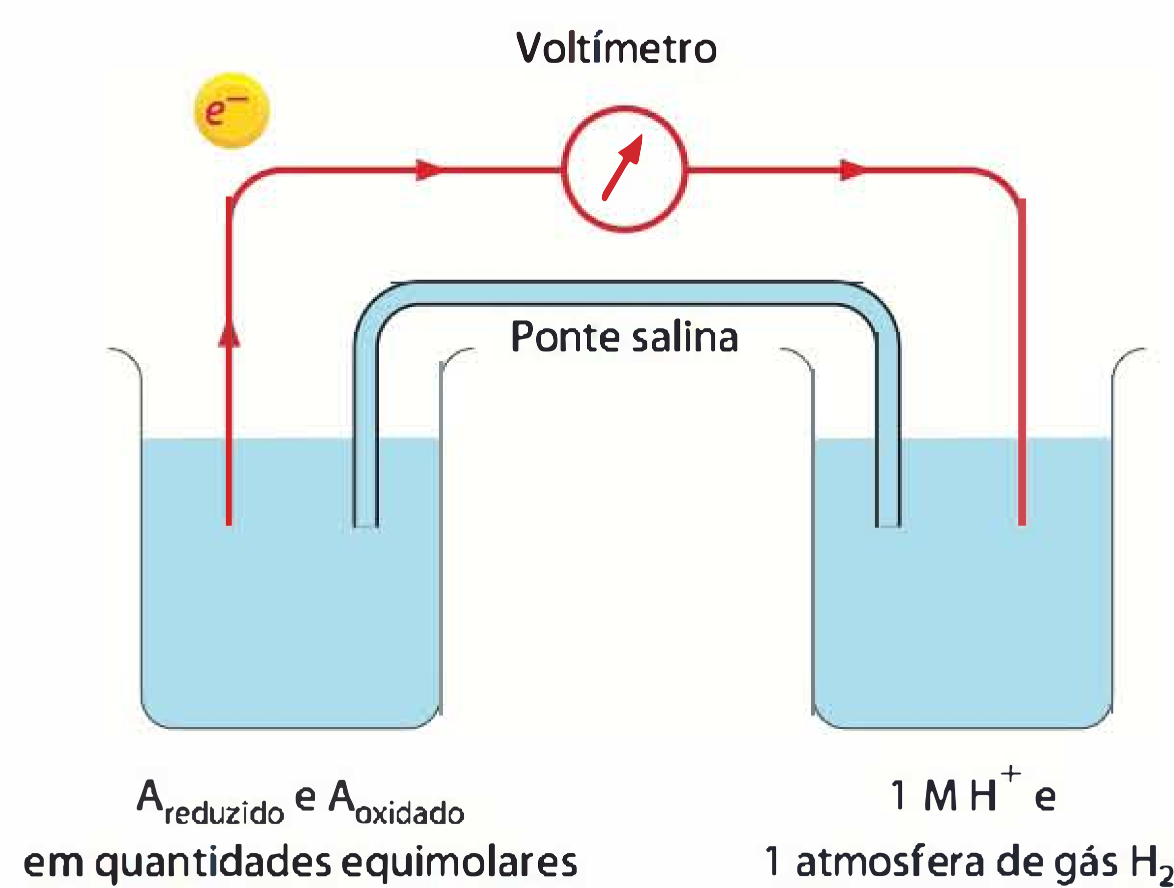


Figura 14-21 Como os prótons podem ser bombeados através de membranas. À medida que um elétron passa através de uma cadeia transportadora de elétrons, ele pode ligar e liberar um próton a cada etapa. Neste diagrama esquemático, o carreador de elétrons B capta um próton (H^+) de um lado da membrana quando aceita um elétron (e^-) do carreador A; ele libera o próton do outro lado da membrana quando doa o seu elétron para o carreador C.

COMO OS POTENCIAIS REDOX SÃO MEDIDOS



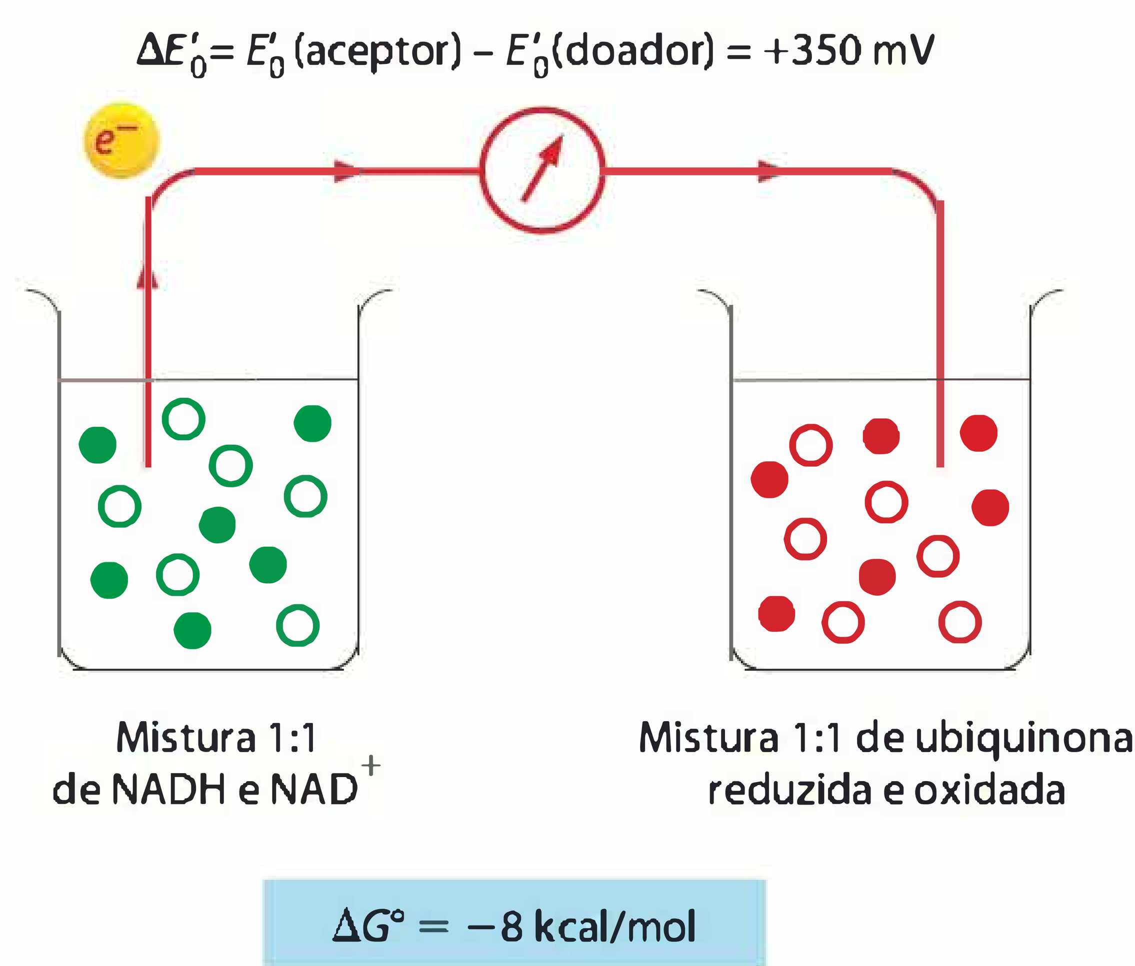
Um frasco de *beaker* (*esquerda*) contém a substância A em uma mistura equimolar dos membros reduzido ($A_{reduzido}$) e oxidado ($A_{oxidado}$) do seu par redox. O outro *beaker* contém o padrão hidrogênio de referência ($2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$), cujo potencial redox é arbitrariamente assumido como sendo zero, por acordo internacional. (Uma ponte salina formada por uma solução concentrada de KCl permite que os íons K^+ e Cl^- movam-se entre os dois *beakers*, como requerido para neutralizar as cargas em cada *beaker* quando os elétrons fluem entre eles.) O cabo metálico (*vermelho*) propicia um caminho livre de resistências para os elétrons, e um voltímetro mede o potencial redox da substância A. Se os elétrons fluem de $A_{reduzido}$ para H^+, como indicado, entende-se que o par redox formado pela substância A possui um potencial redox negativo. Se eles, ao contrário, fluírem do H_2 para $A_{oxidado}$, esse par redox terá um potencial redox positivo.

ALGUNS POTENCIAIS REDOX PADRÃO EM pH 7

Por convenção, o potencial redox para um par redox é designado por *E*. Para condições-padrão, com todos os reagentes a uma concentração de 1 M, incluindo H^+, pode-se determinar o potencial redox padrão, designado E_0. Uma vez que as reações biológicas ocorrem em pH 7, os biólogos utilizam uma condição-padrão diferente, onde $A_{reduzido} = A_{oxidado}$ e $H^+ = 10^{-7}$ M. Esse potencial redox padrão é designado E'_0. Alguns poucos exemplos de relevância especial à fosforilação oxidativa são fornecidos aqui.

Reações redox	Potencial redox E'_0
$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$	−320mV
Ubiquinona reduzida $\rightleftharpoons$ Ubiquinona oxidada $+ 2H^+ + 2e^-$	+30 mV
Citocromo *c* reduzido $\rightleftharpoons$ Citocromo *c* oxidado $+ e^-$	+230 mV
$H_2O \rightleftharpoons ½O_2 + 2H^+ + 2e^-$	+820mV

CÁLCULO DE $\Delta G°$ A PARTIR DE POTENCIAIS REDOX



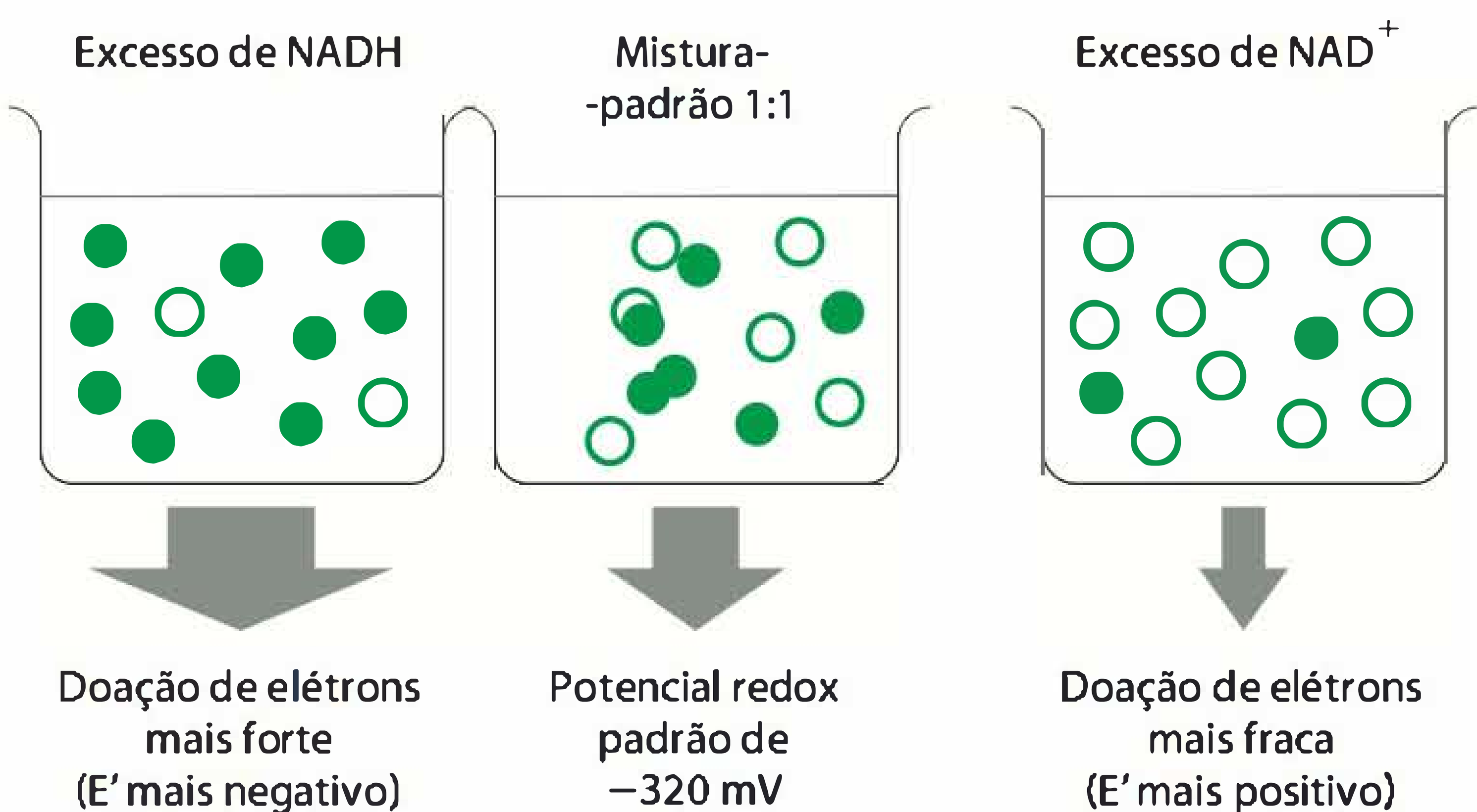
$\Delta G° = -8$ kcal/mol

$\Delta G° = -n(0{,}023)\,\Delta E'_0$, onde *n* é o número de elétrons transferidos por meio de uma variação de potencial redox de $\Delta E'_0$ milivolts (mV)

Exemplo: A transferência de um elétron do NADH para a ubiquinona tem uma $\Delta G°$ favorável de −8 kcal/mol (−33,5 kJ/mol), enquanto a transferência de um elétron da ubiquinona para o oxigênio tem uma $\Delta G°$ ainda mais favorável de −18,2 kcal/mol (−76,1 kJ/mol). O valor da $\Delta G°$ para a transferência de um elétron do NADH para o oxigênio é a soma desses dois valores, −26,2 kcal/mol.

O EFEITO DAS MUDANÇAS DE CONCENTRAÇÃO

A variação real de energia livre para a reação, ΔG, depende da concentração dos reagentes e será, geralmente, diferente da variação de energia livre padrão, $\Delta G°$. Os potenciais redox padrão servem a uma mistura 1:1 do par redox. Por exemplo, o potencial redox padrão de −320 mV ajusta-se para uma mistura 1:1 de NADH e de NAD^+. No entanto, quando há excesso de NADH sobre NAD^+, a transferência de elétrons do NADH para um aceptor de elétrons torna-se mais favorável. Isso se reflete por um potencial redox mais negativo e uma ΔG mais negativa para a transferência de elétrons.



Os citocromos constituem uma família de proteínas coloridas que estão relacionadas à presença de um *grupo heme*, cujo átomo de ferro muda do estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}) quando recebe um elétron. O grupo heme consiste em um *anel de porfirina* com um átomo de ferro fortemente ligado, sustentado por quatro átomos de nitrogênio nos vértices de um quadrado (**Figura 14-22**). Um anel porfirínico relacionado é responsável pela cor vermelha do sangue e pela cor verde das folhas, sendo ligado ao ferro na hemoglobina e ao magnésio na clorofila, respectivamente.

As *proteínas de ferro-enxofre* constituem uma segunda família principal de carreadores de elétrons. Nessas proteínas, dois ou quatro átomos de ferro estão ligados a um número equivalente de átomos de enxofre e a cadeias laterais de cisteínas, formando um **centro de ferro-enxofre** na proteína (**Figura 14-23**). Há mais centros de ferro-enxofre do que citocromos na cadeia respiratória, mas a sua detecção espectroscópica requer a espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR, *electron paramagnetic resonance*), e eles não estão tão bem-caracterizados. Assim como os citocromos, esses centros carregam um elétron de cada vez.

O mais simples dos carreadores de elétrons da cadeia respiratória – e o único que não faz parte de uma proteína – é uma quinona (chamada de *ubiquinona* ou *coenzima Q*). A **quinona (Q)** é uma pequena molécula hidrofóbica livremente móvel na bicamada lipídica e que pode recolher ou doar um ou dois elétrons; sob redução, ela é capaz de recolher um próton do meio junto com cada elétron que carrega (**Figura 14-24**).

Além dos seis grupos heme diferentes ligados a citocromos, dos mais de seis centros de ferro-enxofre e da ubiquinona, há também dois átomos de cobre e uma flavina funcionando como carreadores de elétrons fortemente ligados a proteínas da cadeia respiratória, na via do NADH para o oxigênio. Ao todo, essa via envolve mais de 60 proteínas diferentes.

Como seria esperado, os carreadores de elétrons possuem afinidades por elétrons cada vez mais altas (potenciais redox mais altos) à medida que se movem ao longo da cadeia respiratória. Os potenciais redox foram finamente sintonizados durante a evolução, pela ligação de cada carreador de elétrons em um contexto proteico próprio, o qual pode alterar a sua afinidade normal por elétrons. Entretanto, devido ao fato de os centros de ferro-enxofre possuírem uma afinidade relativamente baixa por elétrons, eles predominam na porção inicial da cadeia respiratória; contrariamente, os citocromos predominam mais adiante na cadeia, quando é necessária uma afinidade mais alta por elétrons.

A ordem individual dos carreadores de elétrons da cadeia foi determinada por sofisticadas medidas espectroscópicas (**Figura 14-25**), e muitas das proteínas foram inicialmente isoladas e caracterizadas individualmente como polipeptídeos. Um avanço principal do entendimento da cadeia respiratória, no entanto, foi a descoberta, mais tarde, de que a maioria das proteínas está organizada em três grandes complexos enzimáticos.

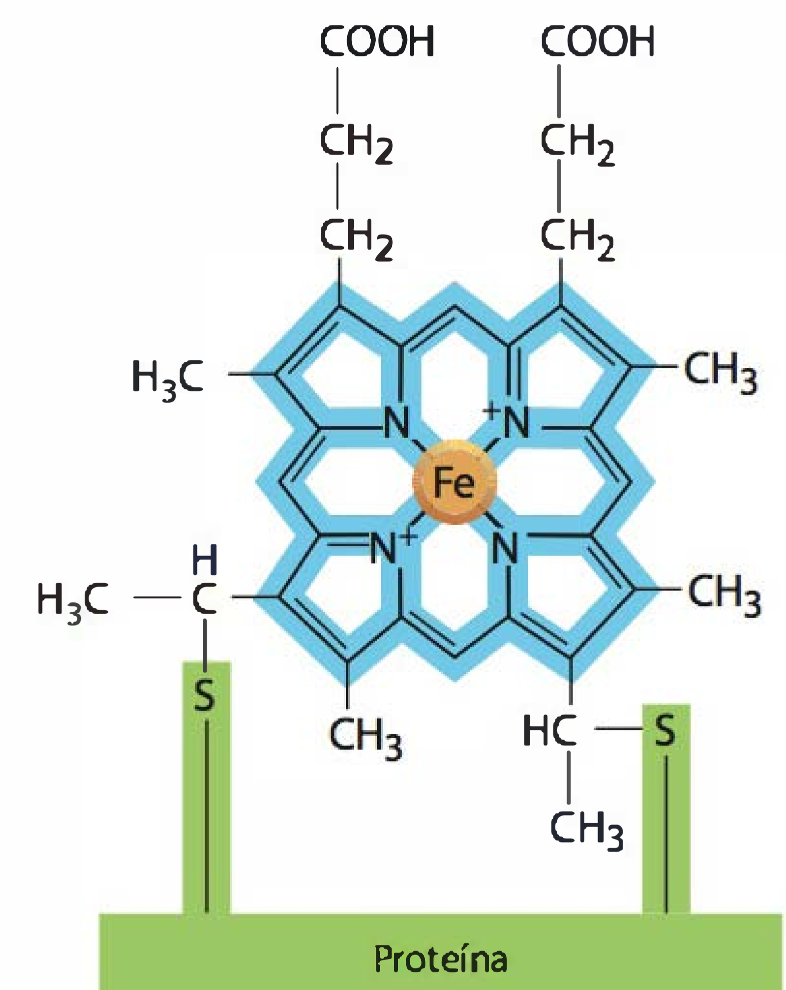


Figura 14-22 Estrutura do grupo heme unido covalentemente ao citocromo *c*. O anel porfirínico está indicado em *azul*. Há cinco citocromos diferentes na cadeia respiratória. Como os grupos heme dos diferentes citocromos têm estruturas levemente distintas e são sustentados por suas respectivas proteínas de maneiras diferentes, cada um dos citocromos tem uma afinidade diferente por um elétron.

A cadeia respiratória inclui três grandes complexos enzimáticos embebidos na membrana interna

As proteínas de membrana são difíceis de purificar na forma de complexos intactos, porque são insolúveis em soluções aquosas, e alguns dos detergentes necessários para solubilizá-las podem destruir as interações proteína-proteína normais. No início da década de 1960, entretanto, pesquisadores descobriram que detergentes iônicos relativamente suaves como o desoxicolato podem solubilizar componentes selecionados da membrana mitocondrial

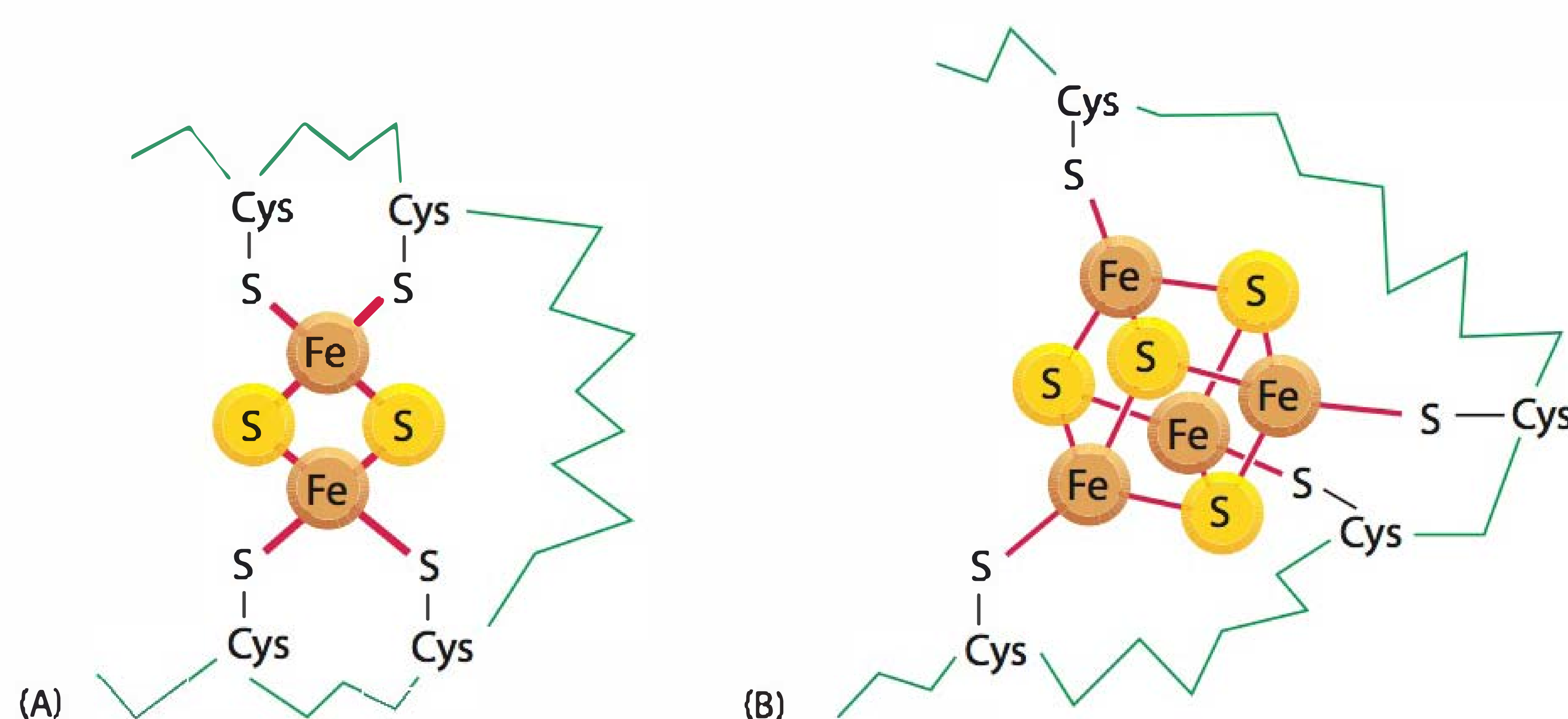


Figura 14-23 Estruturas de dois tipos de centros de ferro-enxofre. (A) Um centro do tipo 2Fe2S. (B) Um centro do tipo 4Fe4S. Embora contenham múltiplos átomos de ferro, cada centro de ferro-enxofre pode carregar somente um elétron de cada vez. Há mais de seis centros de ferro-enxofre diferentes na cadeia respiratória.

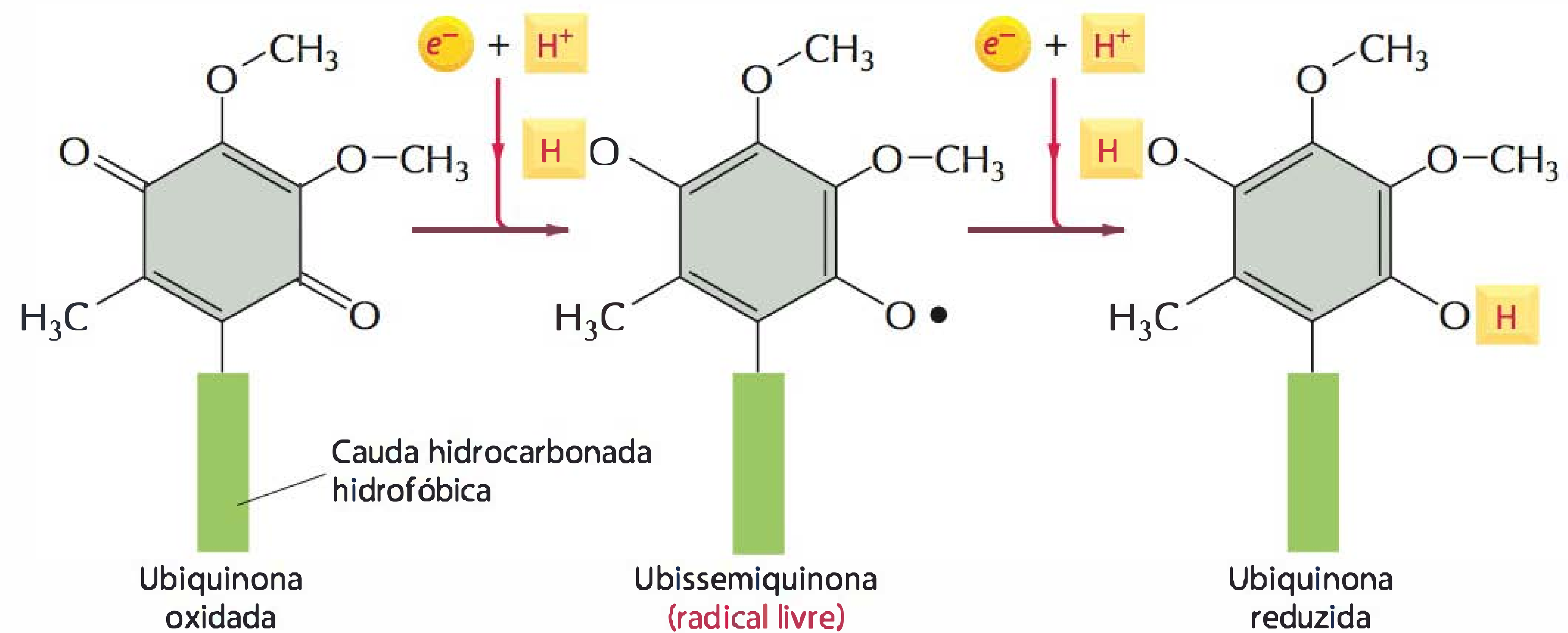


Figura 14-24 Carreadores de elétrons quinonas. A ubiquinona na cadeia respiratória recolhe um H^+ do ambiente aquoso para cada elétron que aceita e pode carregar um ou dois elétrons como parte de um átomo de hidrogênio (*amarelo*). Quando a ubiquinona reduzida doa seus elétrons para o próximo carreador da cadeia, os prótons são liberados. Uma longa cauda hidrofóbica que confina a ubiquinona à membrana consiste em 6 a 10 unidades de isopreno de cinco carbonos, dependendo do organismo. O carreador de elétrons correspondente nas membranas fotossintetizantes de cloroplastos é a plastoquinona, a qual é praticamente idêntica em estrutura. Para simplificar, a ubiquinona e a plastoquinona normalmente serão referidas como quinona (abreviadas por Q) neste capítulo.

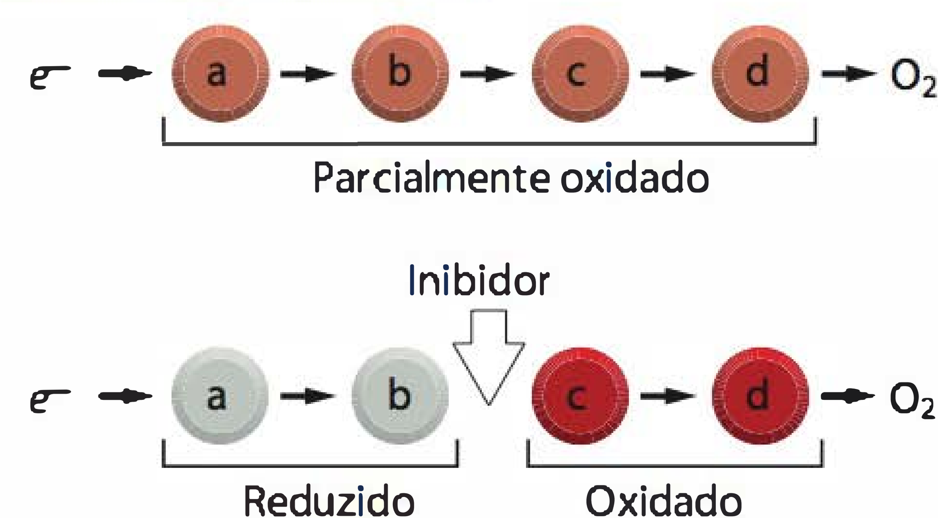
interna em suas formas nativas. Isso permitiu a identificação e a purificação dos três principais **complexos enzimáticos respiratórios** ligados à membrana na via de NADH para o oxigênio. Cada um desses complexos purificados pode ser inserido em vesículas de bicamadas lipídicas para demonstrar que podem bombear prótons através da bicamada à medida que elétrons passam através dela. Na mitocôndria, os três complexos são assimetricamente orientados na membrana interna, estando ligados em série como bombas transportadoras de H^+ dirigidas por elétrons que bombeiam prótons para fora da matriz (**j**):

1. O **complexo da NADH-desidrogenase** (geralmente conhecido como complexo I) é o maior dos complexos enzimáticos respiratórios, contendo mais de 40 cadeias polipeptídicas. Ele aceita elétrons do NADH e os passa por meio de uma flavina e de pelo menos sete centros de ferro-enxofre para a ubiquinona. A ubiquinona, então, transfere seus elétrons para um segundo complexo enzimático respiratório, o complexo do citocromo b-c_1.
2. O **complexo do citocromo b-c_1** contém pelo menos 11 cadeias polipeptídicas diferentes e funciona como um dímero. Cada monômero contém três grupos heme ligados a citocromos e a uma proteína de ferro-enxofre. O complexo aceita elétrons da ubiquinona e os passa para o citocromo *c*, o qual leva estes elétrons para o complexo da citocromo-oxidase.
3. O **complexo da citocromo-oxidase** também funciona como um dímero; cada monômero contém 13 cadeias polipeptídicas diferentes, incluindo dois citocromos e dois átomos de cobre. O complexo aceita um elétron de cada vez do citocromo *c* e passa quatro elétrons de cada vez para o oxigênio.

Os citocromos, os centros de ferro-enxofre e os átomos de cobre podem carregar somente um elétron de cada vez. No entanto, cada NADH doa dois elétrons, e cada molécula de O_2 deve receber quatro elétrons para produzir água. Há vários pontos de coleta e de dispersão de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons nos quais essas mudanças de número de elétrons são acomodadas. O mais óbvio desses pontos é a citocromo-oxidase.

Um centro de ferro-cobre da citocromo-oxidase catalisa a eficiente redução de O_2

Como o oxigênio tem grande afinidade por elétrons, uma grande quantidade de energia livre é liberada quando ele é reduzido para formar água. Portanto, a evolução da respiração celular, na qual o O_2 é convertido em água, permitiu aos organismos aproveitar muito mais



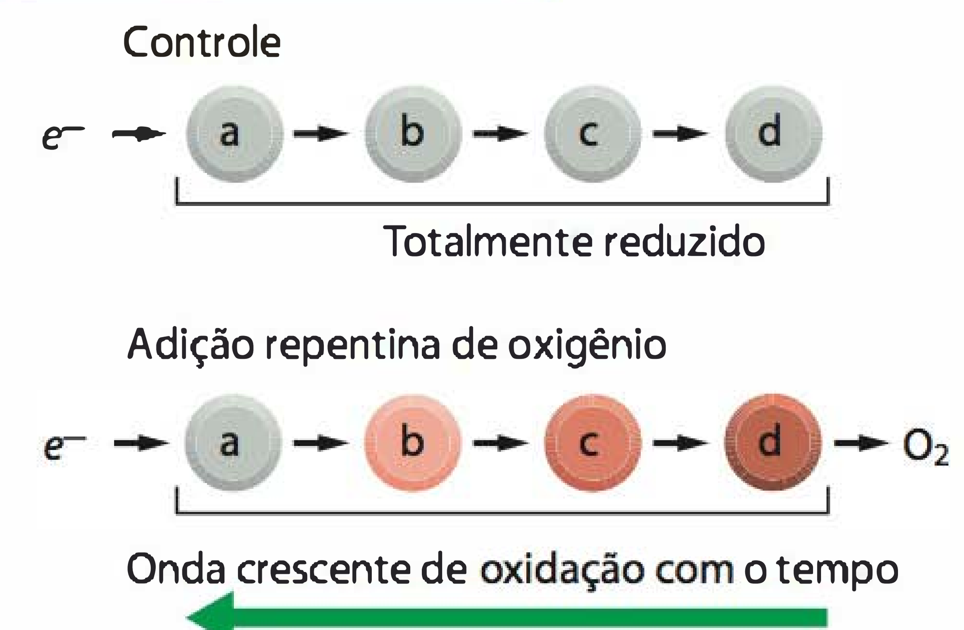


Figura 14-25 Métodos gerais usados para determinar a via dos elétrons através da cadeia transportadora de elétrons. A extensão da oxidação dos carreadores de elétrons a, b, c e d é continuamente monitorada acompanhando-se os seus espectros distintos, os quais diferem nos estados oxidado e reduzido. Nesta esquematização, um grau de oxidação crescente está indicado pelo escurecimento do vermelho. (A) Sob condições normais, nas quais o oxigênio é abundante, todos os carreadores estão em um estado parcialmente oxidado. A adição de um inibidor específico faz com que o carreador anterior torne-se mais oxidado (*vermelho*) e o carreador posterior mais reduzido. (B) Na ausência de oxigênio, todos os carreadores estão nos seus estados completamente reduzidos (*cinza*). A súbita adição de oxigênio converte cada carreador em sua forma parcialmente oxidada, com um tempo de demora que é maior para os carreadores localizados mais anteriormente.

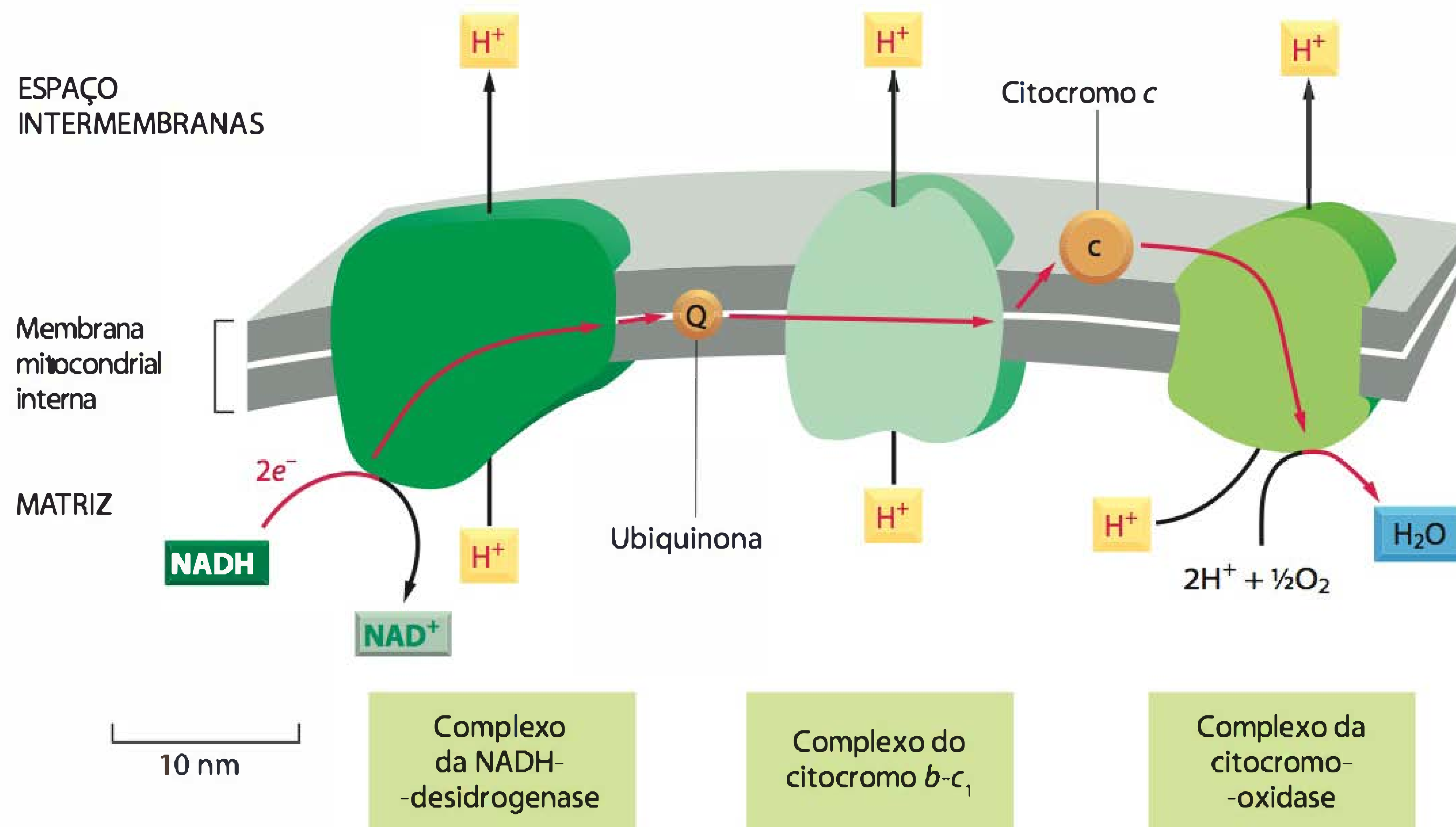


Figura 14-26 Caminho dos elétrons através dos três complexos enzimáticos respiratórios. A forma e o tamanho relativos de cada complexo são mostrados. Durante a transferência de elétrons do NADH para o oxigênio (*linhas vermelhas*), a ubiquinona e o citocromo c servem de carreadores móveis que transportam os elétrons de um complexo para o próximo. Como indicado, os prótons são bombeados através da membrana por cada um dos complexos enzimáticos respiratórios.

energia do que poderia ser obtida pelo metabolismo anaeróbio. Essa é, presumivelmente, a razão pela qual todos os organismos superiores respiram. Para os sistemas biológicos utilizarem O_2 dessa maneira, entretanto, é necessário um processo químico muito sofisticado. Podemos tolerar o O_2 do ar que respiramos porque ele se modifica ao captar o primeiro elétron, permitindo que sua reação inicial nas células seja intimamente controlada por catálises enzimáticas. No entanto, uma vez que uma molécula de O_2 tenha ganhado um elétron para formar um radical superóxido (O_2^-), ela torna-se perigosamente reativa e rapidamente recolherá outros três elétrons adicionais, em qualquer lugar onde possa encontrá-los. A célula só pode utilizar O_2 para a respiração porque a citocromo-oxidase sustenta o oxigênio em um centro bimetálico especial, onde ele permanece preso entre um átomo de ferro ligado a um grupo heme e a um átomo de cobre, até que o oxigênio tenha captado um total de quatro elétrons. Somente então os dois átomos de oxigênio da molécula de oxigênio podem ser seguramente liberados na forma de duas moléculas de água (**Figura 14-27**).

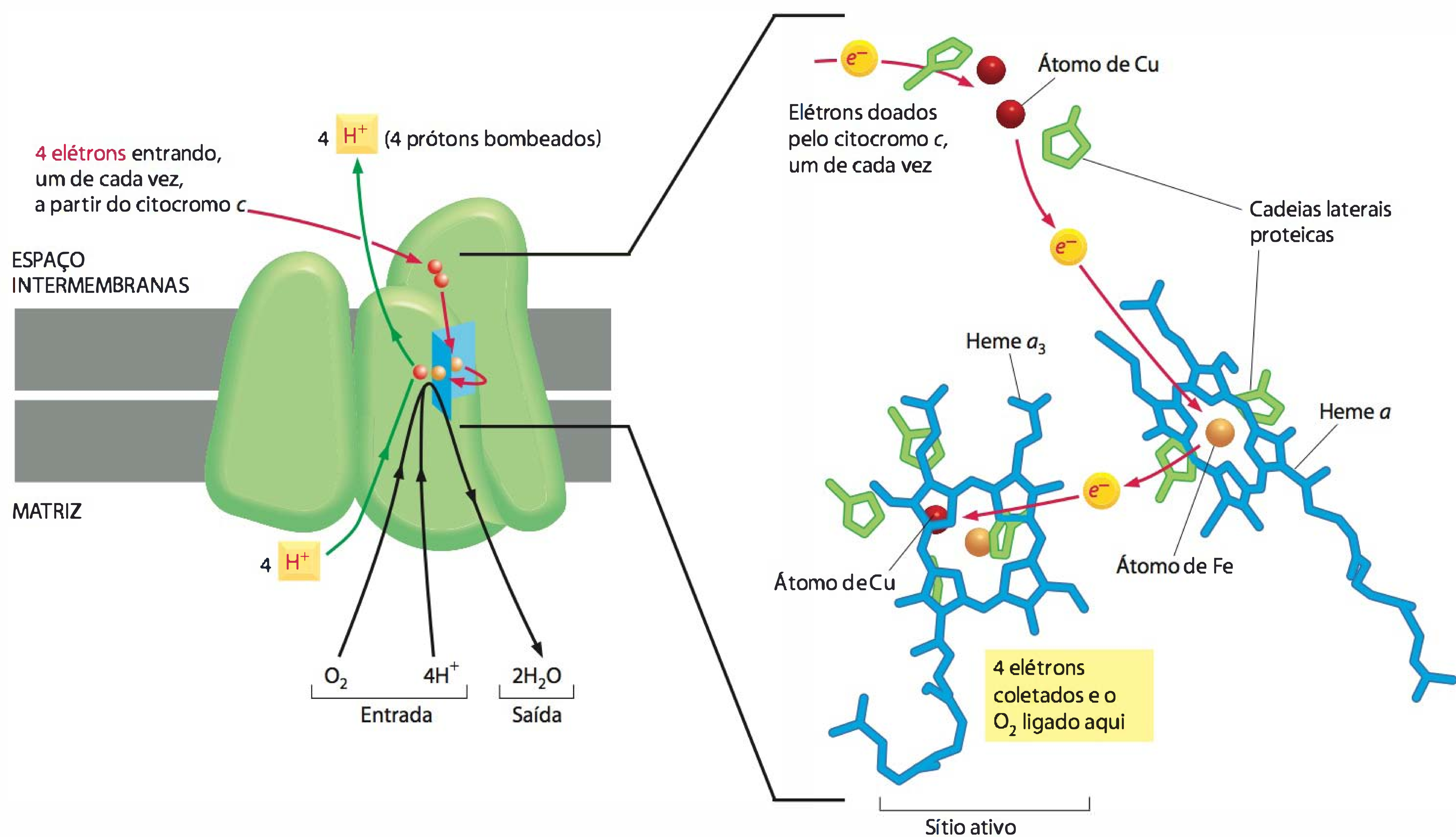


Figura 14-27 Reação do O_2 com elétrons na citocromo-oxidase. Como indicado, o átomo de ferro no grupo heme *a* serve de ponto de alinhamento de elétrons; esse grupo heme alimenta, com quatro elétrons, a molécula de O_2 sustentada no sítio ativo do centro bimetálico, o qual é formado por outro átomo de ferro ligado ao heme e a um átomo de cobre posicionado próximo e opostamente. Note que quatro prótons são bombeados para fora da matriz para cada molécula de O_2 que sofre a reação $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$.

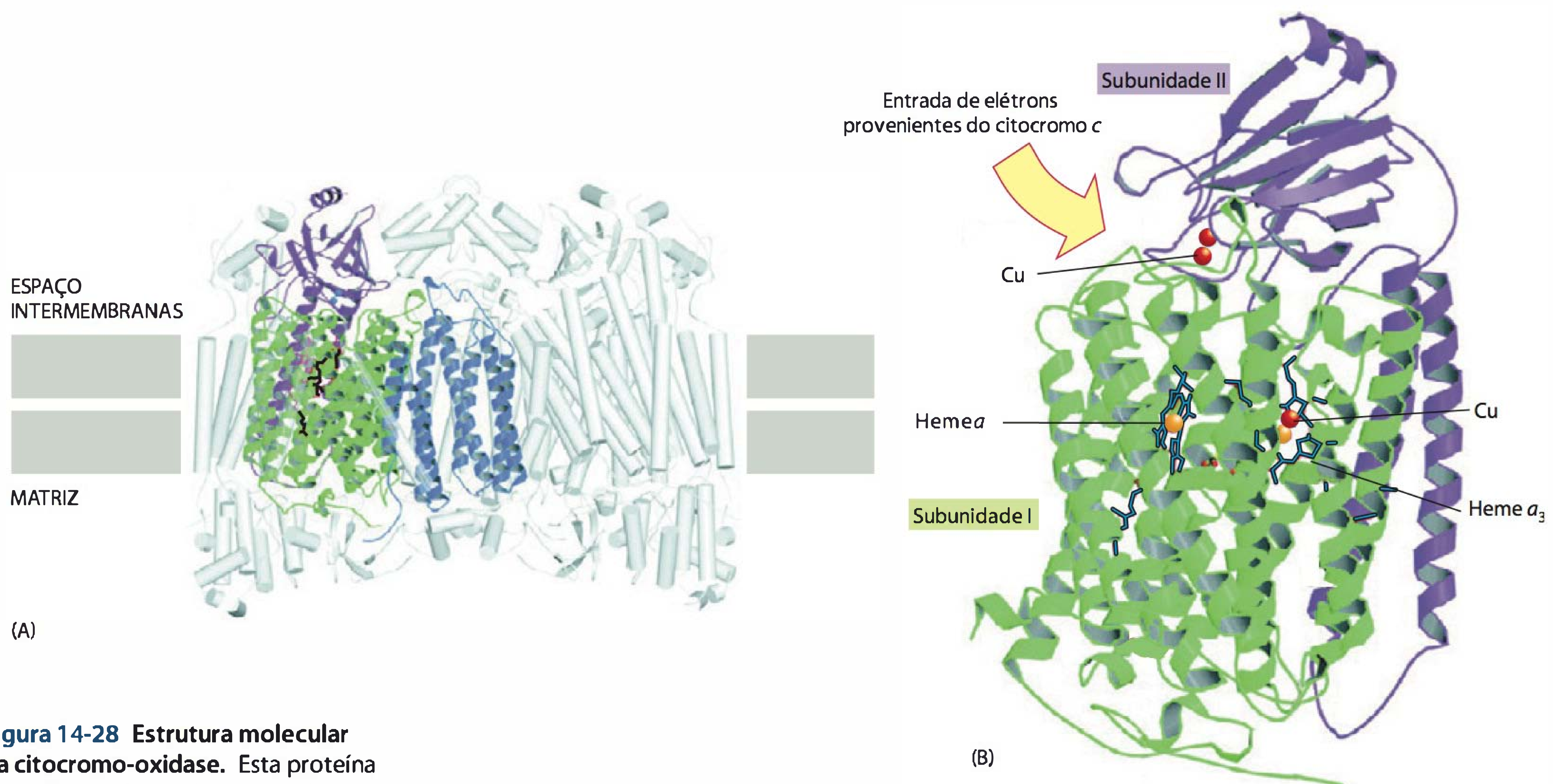


Figura 14-28 Estrutura molecular da citocromo-oxidase. Esta proteína é um dímero formado a partir de um monômero com 13 subunidades proteicas diferentes (massa monomérica de 204.000 dáltons). As três subunidades coloridas são codificadas pelo genoma mitocondrial e formam o centro funcional da enzima. À medida que elétrons passam através desta enzima no caminho para a molécula de O_2 ligada, eles promovem o bombeamento de prótons através da membrana (ver Figura 14-27). (A) A proteína inteira está representada, posicionada na membrana mitocondrial interna. (B) Os carreadores de elétrons estão localizados nas subunidades I e II, como indicado.

Estima-se que a reação da citocromo-oxidase seja responsável por 90% da captação total de oxigênio da maioria das células. Este complexo proteico é, portanto, crucial para toda a forma de vida aeróbia. O cianeto e a azida são extremamente tóxicos, pois ligam-se fortemente aos complexos celulares da citocromo-oxidase para interromper o transporte de elétrons, reduzindo, assim, de forma drástica a produção de ATP.

Embora a citocromo-oxidase de mamíferos contenha 13 subunidades proteicas diferentes, a maioria delas parece ter uma função subsidiária, auxiliando a regular tanto a atividade quanto a montagem das três subunidades que formam a porção principal da enzima. A estrutura completa desse grande complexo enzimático foi determinada por cristalografia por raios X, como ilustrado na **Figura 14-28**. As estruturas com redução atômica, combinadas a estudos mecanísticos do efeito de mutações precisamente ancoradas, introduzidas na enzima por engenharia genética das proteínas de leveduras e de bactérias, estão revelando os mecanismos detalhados desta máquina proteica tão finamente sintonizada.

As transferências de elétrons na membrana mitocondrial interna são mediadas pelo tunelamento de elétrons durante colisões aleatórias

Os dois componentes que carregam elétrons entre os três principais complexos enzimáticos da cadeia respiratória – ubiquinona e citocromo *c* – difundem-se rapidamente no plano da membrana mitocondrial interna. A razão esperada de colisões aleatórias entre esses carreadores móveis e os complexos enzimáticos de difusão mais lenta pode responder pelas razões observadas de transferência de elétrons (cada complexo doa e recebe um elétron entre 5 e 20 milissegundos de cada vez).

A transferência ordenada de elétrons ao longo da cadeia respiratória é realizada inteiramente graças à especificidade das interações funcionais entre os componentes da cadeia: cada carreador de elétrons é capaz de interagir somente com o carreador adjacente na sequência apresentada na Figura 14-26, sem curtos-circuitos.

Nos sistemas biológicos, os elétrons movem-se entre as moléculas que os carregam não somente ao longo de ligações covalentes dentro de uma molécula, mas também por saltos através de espaços tão grandes quanto 2 nm. Os saltos ocorrem por "tunelamento", ou afunilamento eletrônico, uma propriedade mecânico-quântica crítica para os processos que estamos discutindo. A insulação é necessária para prevenir curtos-circuitos que poderiam, de outra forma, ocorrer quando um carreador de elétrons com um potencial redox baixo colidisse com outro carreador com um potencial redox alto. Essa insulação parece ser obtida transportando-se o elétron profundamente para dentro de uma proteína, de forma a prevenir interações por tunelamento com parceiros inapropriados.

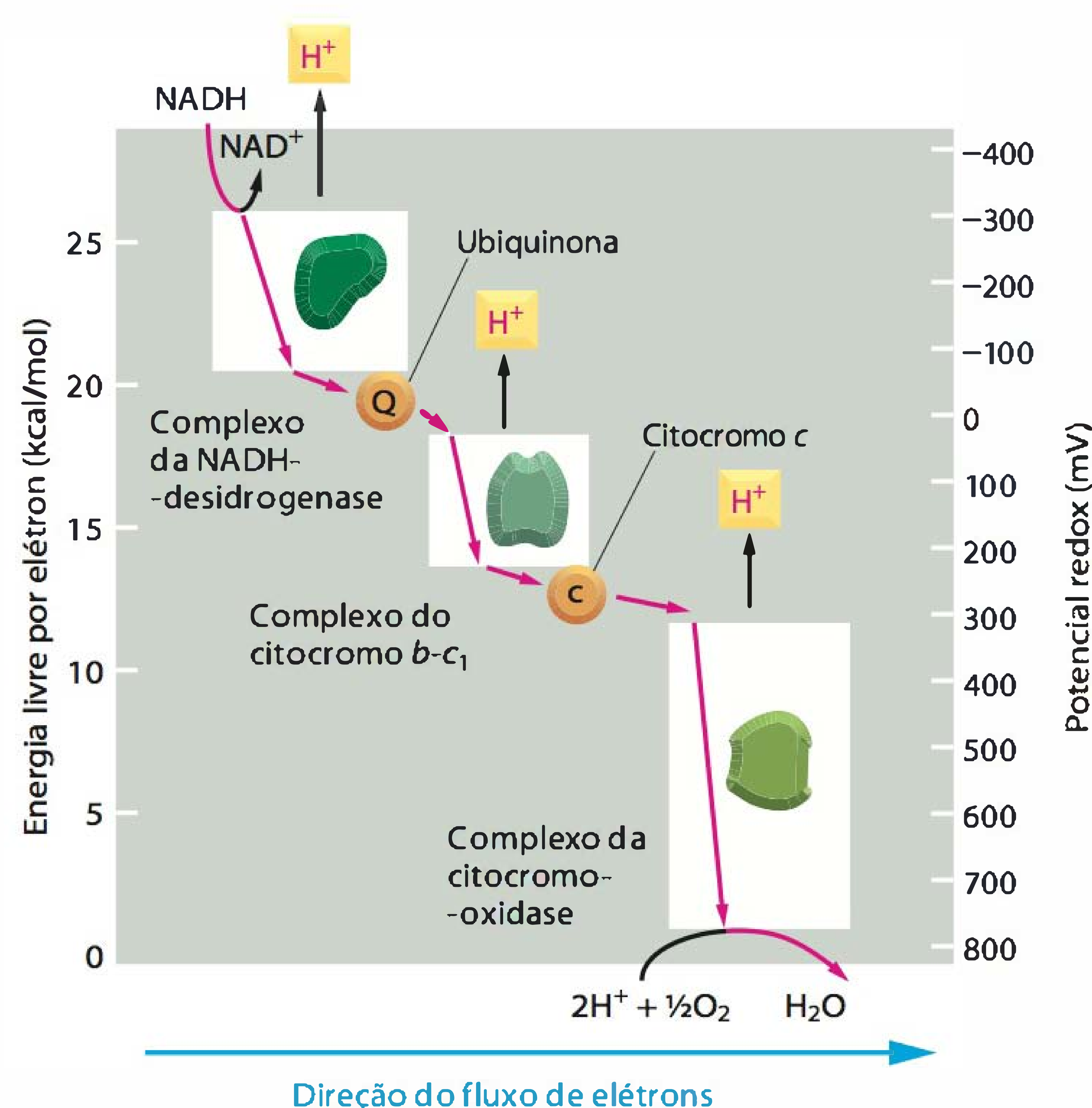


Figura 14-29 Variações de potenciais redox ao longo da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. O potencial redox (designado por E'_0) aumenta à medida que os elétrons fluem através da cadeia respiratória para o oxigênio. A variação de energia livre padrão, ΔG^0, para a transferência de cada um dos dois elétrons doados por uma molécula de NADH pode ser obtida a partir da equação $\Delta G = -n(0{,}023)\ \Delta E'_0$, onde n é o número de elétrons transferido através de uma variação de potencial redox de $\Delta E'_0$ mV. Os elétrons fluem através de um complexo enzimático respiratório ao passar, em sequência, pelos múltiplos carreadores de elétrons de cada complexo. Como indicado, parte da variação de energia livre favorável é aproveitada por cada complexo enzimático para bombear H^+ através da membrana mitocondrial interna. Acredita-se que os complexos da NADH-desidrogenase e do citocromo b-c_1 bombeiem, cada um, dois H^+ por elétron, enquanto o complexo da citocromo-oxidase bombeia apenas um.

Deve-se perceber que o NADH não é a única fonte de elétrons para a cadeia respiratória. A flavina $FADH_2$ também é gerada pela oxidação de ácidos graxos (ver Figura 2-81) e pelo ciclo do ácido cítrico (ver Figura 2-82). Os seus dois elétrons são diretamente passados para a ubiquinona, ultrapassando a NADH-desidrogenase; estes elétrons, portanto, promovem um menor bombeamento de H^+ do que os dois elétrons transportados a partir do NADH.

Será discutido a seguir como as variações do potencial redox de um carreador de elétrons para o próximo são utilizadas para bombear prótons para fora da matriz mitocondrial.

Uma grande queda do potencial redox através de cada um dos três complexos enzimáticos respiratórios fornece a energia para o bombeamento de H^+

Discutimos previamente como o potencial redox reflete as afinidades eletrônicas (ver p. 76). Uma visão geral dos potenciais redox medidos ao longo da cadeia respiratória está apresentada na **Figura 14-29**. Esses potenciais são divididos em três grandes etapas, uma a cada complexo respiratório principal. A variação de potencial redox entre dois carreadores de elétrons quaisquer é diretamente proporcional à energia livre liberada por uma transferência de elétrons entre eles. Cada complexo enzimático atua como uma máquina conversora de energia, aproveitando essa diferença de energia livre para bombear H^+ através da membrana interna e, consequentemente, criar um gradiente eletroquímico de prótons à medida que os elétrons fluem pelo complexo. Essa conversão pode ser demonstrada pela incorporação de cada um dos complexos purificados separadamente em lipossomos: quando um doador e um aceptor de elétrons apropriados são adicionados, de modo que os elétrons possam passar através do complexo, prótons são transportados através da membrana lipossômica.

O bombeamento de H^+ ocorre por mecanismos distintos nos três principais complexos enzimáticos

Alguns complexos enzimáticos respiratórios bombeiam um H^+ por elétron através da membrana mitocondrial interna, enquanto outros bombeiam dois. O mecanismo detalhado pelo qual o transporte de elétrons está acoplado ao bombeamento de H^+ é diferente para os três complexos enzimáticos distintos. No complexo do citocromo b-c_1, as quinonas claramente possuem uma função. Como mencionado previamente, uma quinona recolhe um H^+ do meio aquoso juntamente a cada elétron que carrega e o libera quando o elétron é transferido (ver Figura 14-24). Uma vez que a ubiquinona move-se livremente na bicamada lipídica, ela pode receber elétrons quando está próxima à face interna da membrana e doá-los ao complexo do citocromo b-c_1 próximo à superfície externa, consequentemente transferindo um H^+ através da bicamada para cada elétron transportado. A série complicada de transferências de elétrons que torna possível estas trocas ainda está sendo investigada em nível atômico, com o auxílio do conhecimento da estrutura completa do complexo do citocromo b-c_1 determinada por meio de cristalografia por raios X (**Figura 14-30**).

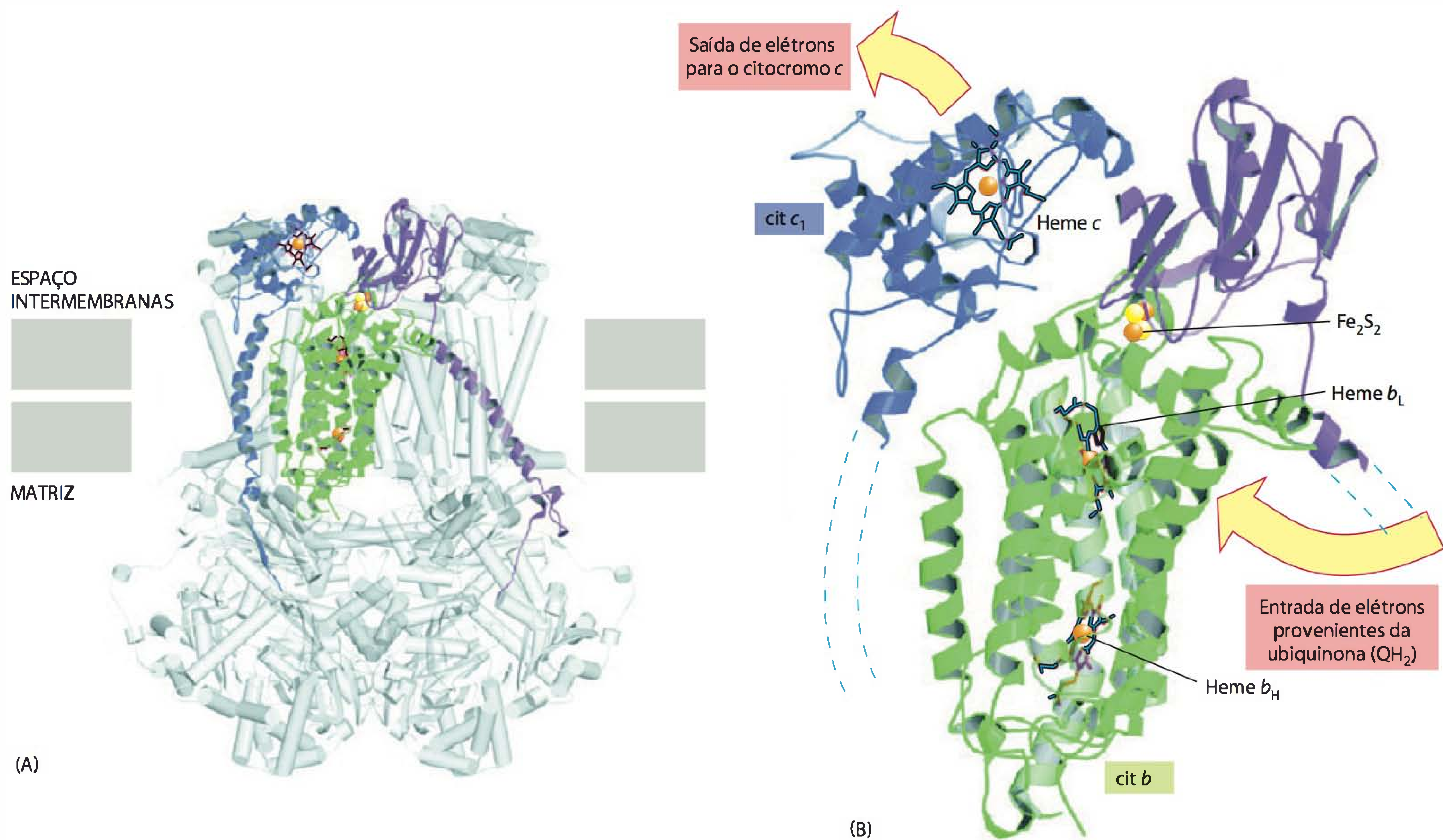


Figura 14-30 Estrutura atômica do citocromo *b*-*c*₁. Esta proteína é um dímero. O monômero de 240.000 dáltons é composto por 11 diferentes moléculas proteicas em mamíferos. As três proteínas coloridas formam o centro funcional da enzima: o citocromo *b* (*verde*), o citocromo c_1 (*azul*) e a proteína Rieske contendo um centro de ferro-enxofre (*roxo*). (A) A interação dessas três proteínas através dos dois monômeros. (B) Os carreadores de elétrons, juntamente com os sítios de entrada e de saída de elétrons. Os elétrons doados inicialmente pela ubiquinona seguem uma via complexa de reações de transferência de elétrons e prótons pelos complexos proteicos que aumentam a estocagem de energia redox. Esse processo, no qual alguns dos elétrons são reciclados para o *pool* da quinona, é conhecido como *ciclo Q*.

O transporte de elétrons determina mudanças alostéricas nas conformações proteicas que também podem bombear H^+, da mesma forma pela qual H^+ é bombeado quando o ATP é hidrolisado pela ATP-sintase na direção inversa. Para ambos os complexos, a NADH-desidrogenase e a citocromo-oxidase, parece provável que o transporte de elétrons direcione mudanças alostéricas ordenadas na conformação das proteínas, o que faz com que uma porção da proteína bombeie H^+ através da membrana mitocondrial interna. Um mecanismo geral para este tipo de bombeamento de H^+ está apresentado na **Figura 14-31**.

Uma vez que tenhamos discutido os mecanismos básicos do transporte de elétrons e do bombeamento de prótons, consideraremos como a cadeia respiratória é regulada de forma a ser plenamente útil às células.

Os ionóforos H^+ desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP

Desde a década de 1940, várias substâncias – como 2,4-dinitrofenol – ficaram conhecidas por atuarem como *agentes desacopladores*, desacoplando o transporte de elétrons da síntese de ATP. A adição desses compostos orgânicos de baixo peso molecular às células interrompe a síntese de ATP pelas mitocôndrias, sem bloquear a captação de oxigênio. Na presença de um agente desacoplador, o transporte de elétrons e o bombeamento de H^+ continuam em um ritmo rápido, porém não há a geração do gradiente de H^+. A explicação para este efeito é tão simples quanto elegante: os agentes desacopladores são ácidos fracos solúveis em lipídeos que atuam como carreadores de H^+ (ionóforos H^+) e fornecem uma via adicional para o fluxo de H^+ através da membrana mitocondrial interna, além da ATP-sintase. Como resultado deste encurtamento de circuito, a força próton-motriz é completamente dissipada e o ATP não pode mais ser sintetizado.

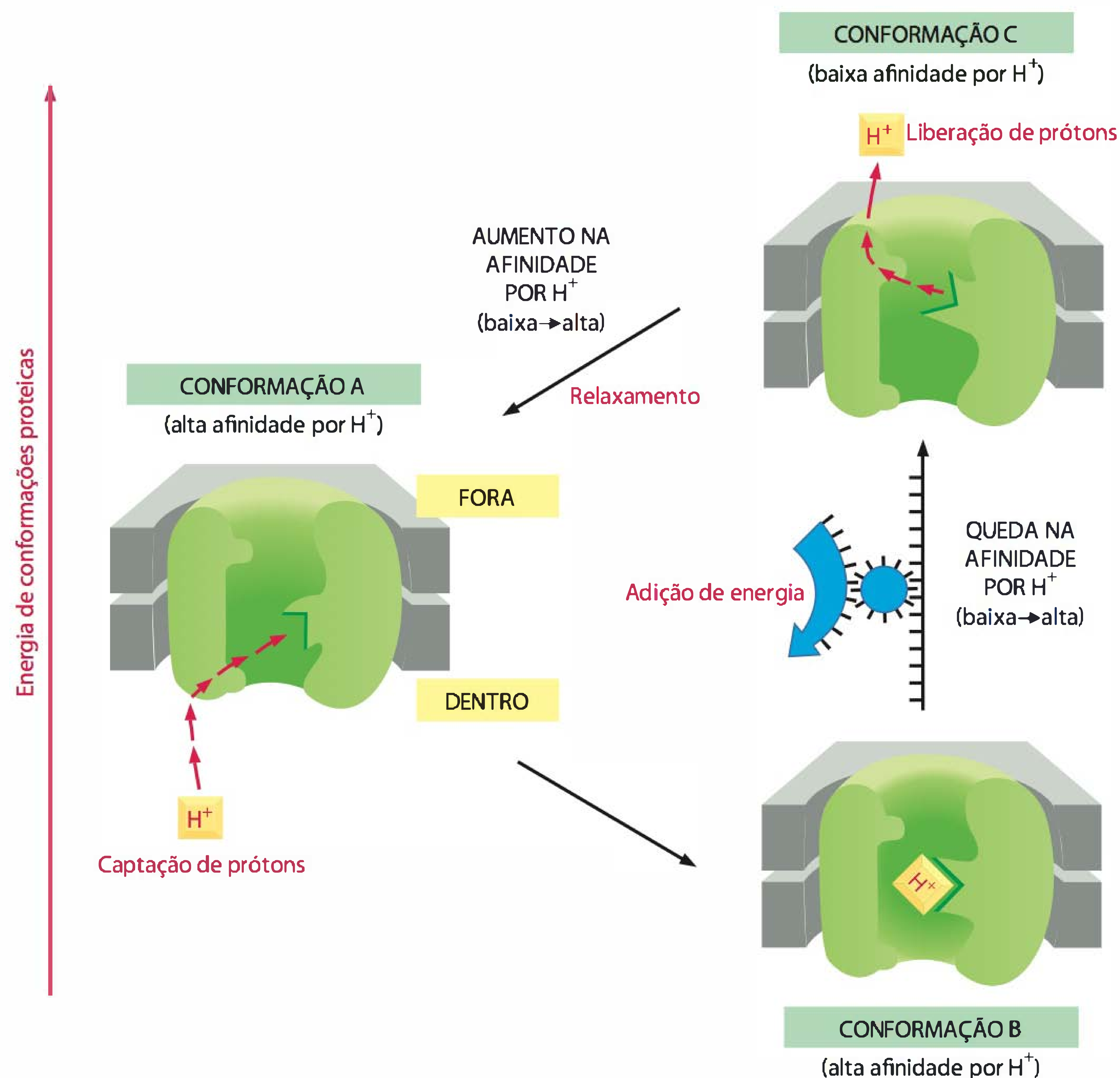


Figura 14-31 Modelo geral para o bombeamento de H^+. Este modelo para o bombeamento de H^+ por uma proteína transmembrana tem como base os mecanismos que, acredita-se, sejam utilizados tanto pela NADH desidrogenase citocromo oxidase como pela bacteriorrodopsina, uma bomba de prótons procariótica dirigida pela luz. A proteína é movida por um ciclo de três conformações: A, B e C. Como indicado pelos seus espaçamentos verticais, estas conformações proteicas possuem diferentes energias. Na conformação A, a proteína tem alta afinidade por H^+, o que faz com que ela capte um H^+ na face interna da membrana. Na conformação C, a proteína tem baixa afinidade por H^+, fazendo com que ela libere um H^+ na face externa da membrana. A transição da conformação B para a conformação C, que libera um H^+, é energeticamente desfavorável e ocorre somente porque essa etapa está acoplada alostericamente a uma reação energeticamente favorável ocorrendo em outro local da proteína (*seta azul*). As outras duas modificações conformacionais, A → B e C → A, levam a estados de mais baixa energia e se processam espontaneamente. Como o ciclo total A → B → C → A libera energia livre, H^+ são bombeados da face interna (a matriz das mitocôndrias) para a face externa (o espaço intermembranas em mitocôndrias). Para a NADH-desidrogenase e a citocromo-oxidase, a energia necessária para a transição B → C é fornecida pelo transporte de elétrons, enquanto para a bacteriorrodopsina, esta energia é fornecida pela luz (ver Figura 10-33). Para outras bombas de prótons, a energia é derivada da hidrólise do ATP. Em todos os casos, pelo menos três conformações distintas são necessárias para criar um processo vetorial de bombeamento, a mesma razão pela qual três conformações são necessárias para criar uma proteína capaz de caminhar em uma única direção ao longo de um filamento (ver Figura 3-77).

O controle respiratório normalmente reprime o fluxo de elétrons através da cadeia

Quando um desacoplador como o dinitrofenol é adicionado às células, as mitocôndrias aumentam substancialmente a sua captação de oxigênio devido ao transporte aumentado de elétrons que reflete a existência de um **controle respiratório**. Acredita-se que o controle atue por meio de uma influência inibitória direta sobre o gradiente eletroquímico de prótons, de acordo com o ritmo do transporte de elétrons. Quando o gradiente sofre um colapso devido a um desacoplador, o transporte de elétrons está livre para transcorrer sem controle, em velocidade máxima. À medida que o gradiente aumenta, o transporte de elétrons torna-se mais difícil, e o processo reduz a velocidade. Além disso, se, de maneira artificial e como experiência, é criado um alto gradiente eletroquímico de prótons através da membrana, o transporte normal de elétrons cessa completamente, e um *fluxo reverso de elétrons* pode ser detectado em algumas seções da cadeia respiratória. Essa observação sugere que o controle respiratório reflete um simples balanço entre a variação de energia livre para o bombeamento de prótons ligado ao transporte de elétrons e a variação de energia livre para o transporte de elétrons – o que significa que a magnitude do gradiente eletroquímico de prótons afeta tanto o ritmo como a direção do transporte de elétrons, da mesma forma que afeta o direcionamento da ATP-sintase (ver Figura 14-19).

O controle respiratório é apenas uma parte do elaborado sistema entrelaçado de controles por retroalimentação (*feedback*) que coordena a velocidade da glicólise, da quebra de ácidos graxos, do ciclo do ácido cítrico e do transporte de elétrons. O ritmo de todos esses processos é ajustado à razão ATP:ADP, aumentando sempre que uma utilização aumentada de ATP determina uma queda desta razão. A ATP-sintase na membrana mitocondrial interna, por exemplo, trabalha mais rápido quando as concentrações de seus substratos ADP e P_i aumentam. À medida que acelera, a enzima deixa mais H^+ fluir para a matriz e, consequentemente, dissipa mais rapidamente o gradiente eletroquímico de prótons. O gradiente em queda, por sua vez, acelera o ritmo do transporte de elétrons.

Controles semelhantes, incluindo a inibição por retroalimentação de várias enzimas-chave pelo ATP, atuam no ajuste da velocidade de produção de NADH em relação à velo-

cidade de utilização do NADH pela cadeia respiratória, e assim por diante. Como um dos resultados de todos esses mecanismos de controle, o corpo oxida gorduras e açúcares de 5 a 10 vezes mais rapidamente durante um período de exercício árduo do que em períodos de repouso.

Os desacopladores naturais convertem as mitocôndrias da gordura marrom em máquinas geradoras de calor

Em algumas células adiposas especializadas, a respiração normalmente é desacoplada da síntese de ATP. Nessas células, conhecidas como células adiposas marrons, a maior parte da energia de oxidação é dissipada preferencialmente na forma de calor e não pela conversão em ATP. As membranas internas das grandes mitocôndrias dessas células contêm uma proteína transportadora especial que permite que os prótons se movam a favor do seu gradiente eletroquímico, sem ativar a ATP-sintase. Como resultado, as células oxidam os seus estoques de gordura em um ritmo rápido e produzem mais calor do que ATP. Os tecidos que contêm a gordura marrom servem, portanto, como "blocos de aquecimento", capazes de reanimar animais em hibernação e proteger contra o frio as áreas sensíveis de recém-nascidos humanos.

A mitocôndria possui muitas funções críticas no metabolismo celular

As células são amplamente compostas de macromoléculas, as quais necessitam constantemente de reparos ou substituições à medida que as células envelhecem. Mesmo em células ou organismos que não estão em fase de crescimento, aquelas moléculas que decaem devem ser substituídas por biossínteses. Ao longo deste capítulo, enfatizamos a função crítica das mitocôndrias na produção do ATP que as células necessitam para se manterem como entidades altamente organizadas em um universo que está sempre se direcionando a uma desordem crescente (discutido no Capítulo 2). Além de ATP, entretanto, a biossíntese no citosol requer um fornecimento constante de poder redutor na forma de NADPH e de esqueletos de carbono. A maior parte das descrições desse tipo de estado biossintetizante afirma que os esqueletos de carbono necessários são provenientes diretamente da degradação de açúcares, enquanto o NADPH é produzido no citosol por uma via paralela para a degradação de açúcares (a via da pentose-fosfato, uma alternativa à glicólise). Porém, sob condições de abundância de matéria alimentar e quando a disponibilidade de ATP é total, as mitocôndrias também geram esqueletos de carbono e NADPH necessários ao crescimento celular. Para esse propósito, o excesso de citrato produzido na matriz mitocondrial pelo ciclo do ácido cítrico é transportado contra seu gradiente eletroquímico para o citosol, onde é metabolizado para produzir tanto NADPH como esqueletos de carbono para as biossínteses. Assim, por exemplo, como parte da resposta celular a sinais de crescimento, grandes quantidades de acetil-CoA são produzidas no citosol a partir do citrato exportado pelas mitocôndrias, acelerando a produção de ácidos graxos e esteróis que constroem novas membranas.

As mitocôndrias também são críticas para o tamponamento do potencial redox no citosol. As células necessitam de suprimentos constantes do aceptor de elétrons NAD^+ para as reações centrais da glicólise que convertem gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato (ver Figura 2-72). Este NAD^+ é convertido em NADH no processo, e o NAD^+ precisa ser regenerado pela transferência dos elétrons de alta energia do NADH em outro local.

Os elétrons do NADH eventualmente serão utilizados para dirigir a fosforilação oxidativa dentro da mitocôndria. Porém, a membrana mitocondrial interna é impermeável ao NADH. Assim, os elétrons são transferidos do NADH para moléculas menores no citosol que, por sua vez, podem mover-se através da membrana mitocondrial interna. Uma vez na matriz, essas moléculas menores transferem os seus elétrons para o NAD^+ para formar NADH mitocondrial, sendo então retornados ao citosol para recarga. Este assim chamado sistema de tráfego de ida e volta ocorre em algumas células especializadas como os músculos de voo de insetos, que particularmente produzem grandes quantidades de ATP pela glicólise aeróbia. Nesse caso, os elétrons de alta energia derivados do gliceraldeído-3-fosfato são passados diretamente à superfície externa da membrana mitocondrial interna, entrando na cadeia transportadora de elétrons de forma mais rápida e direta – porém, com perda de parte da energia útil.

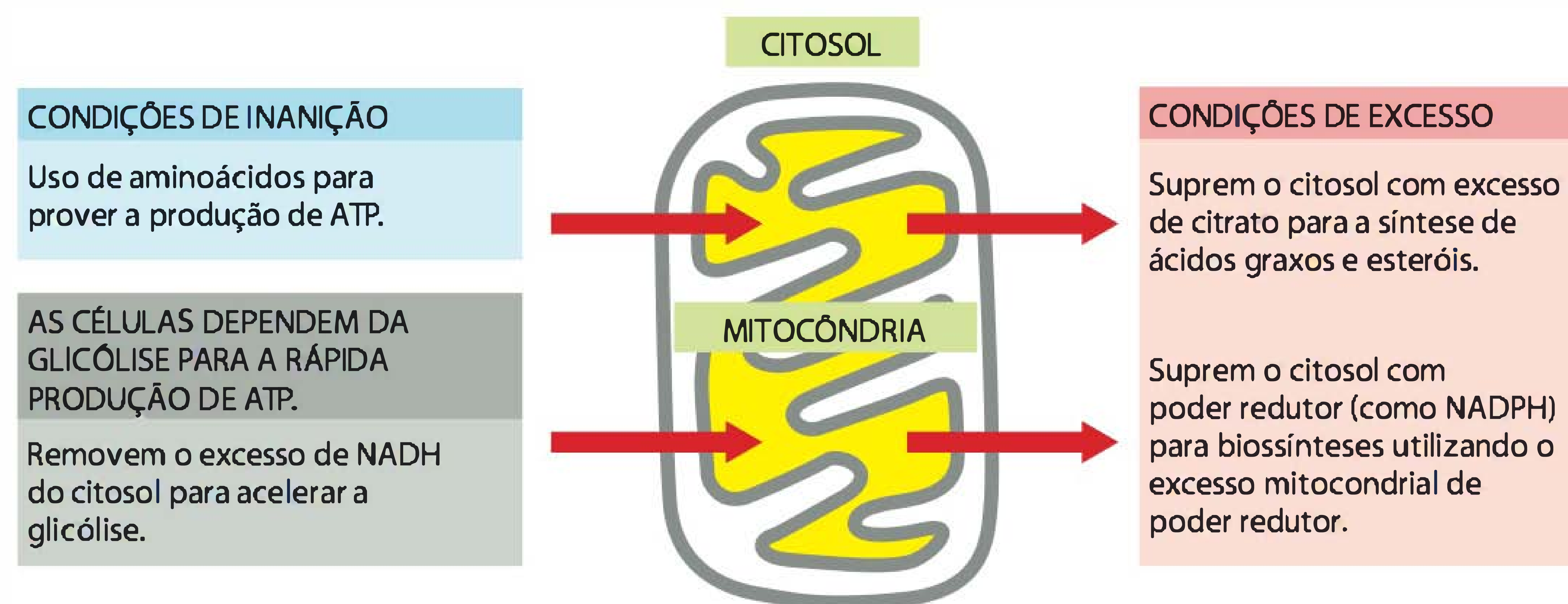


Figura 14-32 As funções críticas das mitocôndrias no metabolismo celular além da produção de ATP. As muitas reações metabólicas essenciais conduzidas pelas mitocôndrias, como aquelas ilustradas aqui, enfatizam a impropriedade da ênfase dada às mitocôndrias como fornos celulares que oxidam piruvato e ácidos graxos para alimentar a fosforilação oxidativa.

Em condições de inanição, proteínas de nosso corpo são degradadas em aminoácidos, e os aminoácidos são importados para as mitocôndrias e oxidados para produzir NADH destinado à produção de ATP. Portanto, ao conduzir diferentes reações sob diferentes condições, a mitocôndria possui muitas funções críticas na manutenção do metabolismo celular (**Figura 14-32**).

As bactérias também exploram mecanismos quimiosmóticos para aproveitar a energia

As bactérias utilizam fontes bastante variadas de energia. Algumas, assim como as células animais, são aeróbias e sintetizam ATP a partir dos açúcares que oxidam a CO_2 e a H_2O pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, por meio de uma cadeia respiratória nas suas membranas plasmáticas, semelhante àquela da membrana mitocondrial interna. Outras são anaeróbias estritas, derivando a sua energia somente pela glicólise (por fermentação) ou, adicionalmente, a partir de uma cadeia transportadora de elétrons que emprega uma outra molécula que não o oxigênio como aceptor final de elétrons. O aceptor alternativo de elétrons pode ser um composto nitrogenado (nitrato ou nitrito), um composto sulfurado (sulfato ou sulfito), ou um composto carbonado (fumarato ou carbonato), por exemplo. Os elétrons são transferidos para esses aceptores por uma série de carreadores de elétrons da membrana plasmática que são comparáveis àqueles das cadeias respiratórias mitocondriais.

Apesar dessa diversidade, a membrana plasmática da vasta maioria das bactérias contém uma ATP-sintase muito semelhante àquela presente em mitocôndrias (e em cloroplastos). Em bactérias que utilizam uma cadeia transportadora de elétrons para captar energia, o transporte de elétrons bombeia H^+ para fora da célula e estabelece, em consequência, uma força próton-motriz que direciona a ATP-sintase para a realização de ATP. Em outras bactérias, a ATP-sintase trabalha reversamente, utilizando o ATP produzido pela glicólise para bombear H^+ e estabelecer um gradiente de prótons através da membrana plasmática. O ATP usado para este processo é gerado nos processos fermentativos (discutidos no Capítulo 2).

Portanto, a maioria das bactérias, incluindo as anaeróbias estritas, mantém um gradiente de prótons através de suas membranas plasmáticas. Este gradiente pode ser aproveitado para dirigir um motor flagelar e é utilizado para bombear Na^+ para fora da bactéria por intermédio do antiporte de Na^+-H^+, que toma o lugar da bomba de Na^+-K^+ das células eucarióticas. Esse gradiente também é usado para o transporte ativo de nutrientes para dentro da bactéria, tal como a maioria dos aminoácidos e muitos açúcares: cada nutriente é dragado para dentro da célula juntamente com um ou mais H^+ por meio de um carreador (simporte) específico (**Figura 14-33**). Em células animais, em contrapartida, a maior parte da importa-

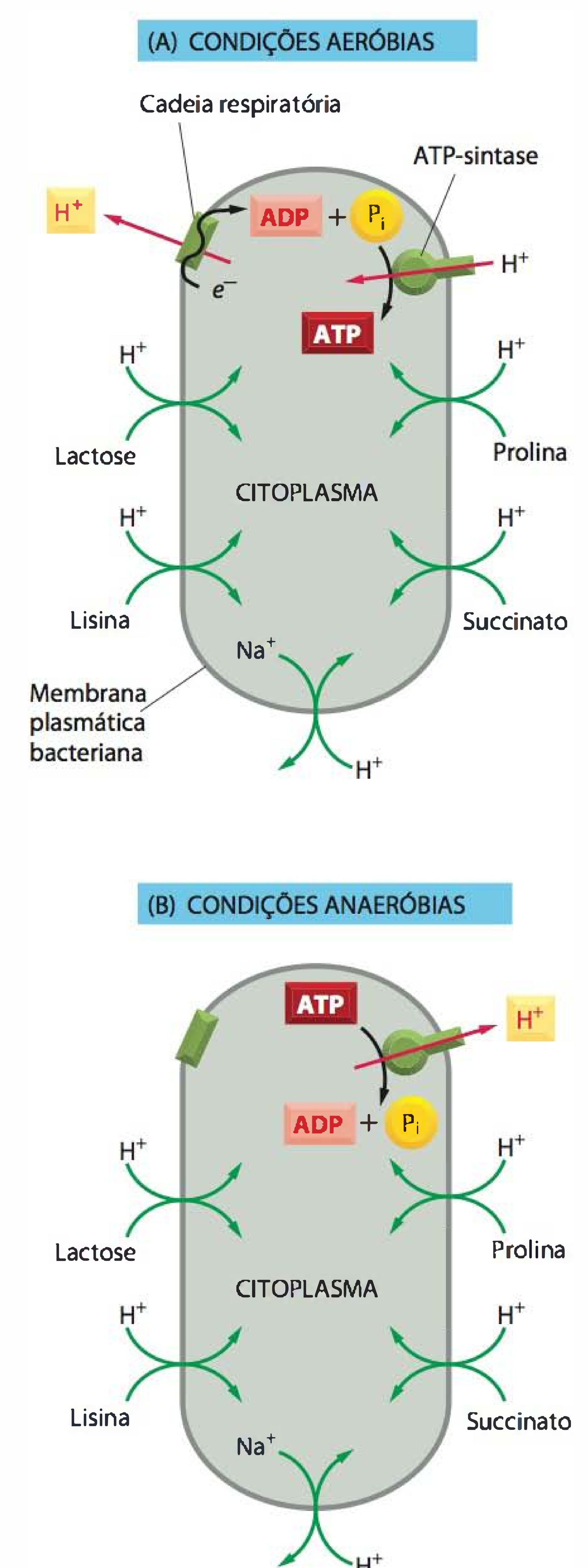


Figura 14-33 A importância do transporte dirigido por H^+ em bactérias. Uma força próton-motriz gerada através da membrana plasmática bombeia nutrientes para dentro da célula e expele Na^+. (A) Em uma bactéria aeróbia, o gradiente eletroquímico de prótons é gerado pela cadeia respiratória, sendo então utilizado tanto para transportar alguns nutrientes para dentro da célula como para produzir ATP. (B) A mesma bactéria multiplicando-se em condições anaeróbias pode derivar o seu ATP da glicólise. Parte desse ATP é hidrolisada pela ATP-sintase para estabelecer um gradiente eletroquímico de prótons que dirige os mesmos processos de transporte que dependem da cadeia respiratória em (A).

ção de nutrientes através da membrana plasmática é direcionada pelo gradiente de Na^+ (alto Na^+ fora, baixo Na^+ dentro) estabelecido pela bomba de Na^+-K^+.

Algumas bactérias incomuns adaptaram-se para viver em ambientes muito alcalinos e, no entanto, devem manter seus citoplasmas em um pH fisiológico. Para essas células, qualquer tentativa em gerar um gradiente eletroquímico de H^+ receberia a oposição de um alto gradiente de concentração de H^+ na direção inversa (H^+ em maior abundância dentro do que fora). Presumivelmente por essa razão, algumas dessas bactérias substituem H^+ por Na^+ em todos os seus mecanismos quimiosmóticos. A cadeia respiratória bombeia Na^+ para fora da célula, os sistemas de transporte e o motor flagelar são dirigidos por um fluxo de Na^+ para dentro, e uma ATP-sintase direcionada por Na^+ sintetiza ATP. A existência de tais tipos de bactérias demonstra que o princípio da quimiosmose é mais fundamental do que a força próton-motriz na qual ela normalmente está embasada.

Resumo

A cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna contém três complexos enzimáticos respiratórios principais através dos quais os elétrons fluem do NADH para o O_2. Cada um desses complexos pode ser purificado, inserido em vesículas lipídicas artificiais e, então, utilizado para demonstrar que é capaz de bombear H^+ quando os elétrons são transportados através dele. Nestes complexos, os elétrons são transferidos ao longo de uma série de carreadores de elétrons ligados à proteína, incluindo centros de hemes e de ferro-enxofre. A energia liberada quando os elétrons se movem para níveis de enegia mais baixos e mais altos é utilizada para dirigir as alterações alostéricas em cada complexo enzimático da respiração que ajuda a bombear os prótons. Os carreadores de elétrons móveis ubiquinona e citocromo c completam a cadeia transportadora de elétrons ao mediar a transferência de elétrons entre os complexos enzimáticos. A via de fluxo dos elétrons é NADH → complexo da NADH-desidrogenase → ubiquinona → complexo do citocromo b-c_1 → citocromo c → complexo da citocromo-oxidase → oxigênio molecular (O_2).

O aclopamento do transporte de elétrons energicamente favorável ao bombeamento de H^+ para fora da matriz cria um gradiente eletroquímico de protóns. Os complexos enzimáticos respiratórios acoplam o transporte de elétrons energeticamente favorável com o bombeamento de H^+ para fora da matriz mitocondrial. Este resultante é aproveitado para sintetizar ATP por outro complexo proteico transmembrana, a ATP-sintase, por meio do qual os H^+ fluem de volta à matriz. A presença universal da ATP-sintase em mitocôndrias, cloroplastos e procariotos comprova a importância central dos mecanismos quimiosmóticos em células.

OS CLOROPLASTOS E A FOTOSSÍNTESE

Todos os animais e a maioria dos micro-organismos dependem da captação contínua de grandes quantidades de compostos orgânicos do ambiente. Estes compostos fornecem tanto os esqueletos de carbonos para a biossíntese quanto a energia metabólica que dirige todos os processos celulares. Acredita-se que os primeiros organismos da Terra primitiva tiveram acesso a uma grande abundância de compostos orgânicos produzidos por processos geoquímicos, mas que a maior parte desses compostos originais foi utilizada há bilhões de anos. Desde aquele tempo, praticamente todos os materiais orgânicos necessários para as células vivas foram produzidos por *organismos fotossintetizantes*, incluindo muitos tipos de bactérias fotossintetizantes.

As bactérias fotossintetizantes mais avançadas são as cianobactérias, que possuem mínimas necessidades nutricionais. Elas utilizam os elétrons da água e a energia da luz solar para converter o CO_2 atmosférico em compostos orgânicos – um processo chamado de ***fixação de carbono***. No curso da separação da água (na reação $nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O)^n + nO_2$), elas liberam na atmosfera o oxigênio necessário para a fosforilação oxidativa. Como veremos nesta seção, considera-se que a evolução das cianobactérias a partir de bactérias fotossintetizantes primitivas foi um pré-requisito para o desenvolvimento de formas de vida aeróbias.

Nos vegetais e nas algas, os quais se desenvolveram muito mais tarde, a fotossíntese ocorre em uma organela intracelular especializada – o **cloroplasto**. Os cloroplastos realizam a fotossíntese durante as horas de luz diurna. Os produtos da fotossíntese são usados diretamente pelas células fotossintetizantes para a biossíntese, sendo também convertidos em

um açúcar de baixo peso molecular (normalmente sacarose) que é exportado para suprir as necessidades metabólicas das outras várias células não-fotossintetizantes do vegetal.

As evidências bioquímicas e genéticas sugerem fortemente que os cloroplastos são descendentes de bactérias fotossintetizantes produtoras de oxigênio que foram endocitadas e que viveram em simbiose com células eucarióticas primitivas. Genericamente, acredita-se também que as mitocôndrias sejam descendentes de bactérias endocitadas. As muitas diferenças entre os cloroplastos e as mitocôndrias refletem os seus ancestrais diferentes, bem como as suas subsequentes divergências evolutivas. Todavia, os mecanismos fundamentais envolvidos na síntese de ATP dirigida pela luz nos cloroplastos são muito semelhantes àqueles já discutidos para a síntese de ATP direcionada pela respiração nas mitocôndrias.

O cloroplasto é um membro da família dos plastídeos de organelas

Os cloroplastos são os mais proeminentes membros da família de organelas dos **plastídeos**. Os plastídeos estão presentes em todas as células vegetais vivas, e cada tipo de célula tem o seu complemento característico. Todos os plastídeos compartilham certas características. Notavelmente, todos os plastídeos de uma espécie particular de vegetal contêm múltiplas cópias de um mesmo genoma relativamente pequeno. Além disso, cada um é circundado por um envelope composto de duas membranas concêntricas.

Como discutido no Capítulo 12 (ver Figura 12-3), todos os plastídeos desenvolvem-se a partir de *proplastídeos*, os quais são organelas relativamente pequenas presentes nas células imaturas dos meristemas vegetais (**Figura 14-34**A). Os proplastídeos se desenvolvem de acordo com as necessidades de cada célula diferenciada, e o tipo que estará presente é determinado em grande parte pelo genoma nuclear. Se uma folha é cultivada no escuro, os seus proplastídeos aumentam e se tornam *etioplastos*, os quais possuem um arranjo semicristalino de membranas internas que contém um precursor amarelo de clorofila, em vez da clorofila. Quando a folha é exposta à luz, os etioplastos rapidamente se desenvolvem em cloroplastos, convertendo esse precursor em clorofila e sintetizando novos pigmentos de membrana, enzimas fotossintetizantes e componentes da cadeia transportadora de elétrons.

Os *leucoplastos* são plastídeos que ocorrem em muitos tecidos epidérmicos e internos que não se tornam verdes e fotossintetizantes. Eles são um pouco maiores do que os proplastídeos. Uma forma comum de leucoplasto é o *amiloplasto* (Figura 14-34B), que acumula o polissacarídeo amido em tecidos de reserva – uma fonte de açúcar para uso futuro. Em algumas plantas, como as batatas, os amiloplastos podem crescer tanto que chegam ao tamanho médio das células animais.

Os plastídeos não são somente sítios para a fotossíntese e para o depósito de materiais de reserva. Os vegetais exploraram os seus plastídeos na compartimentalização celular do

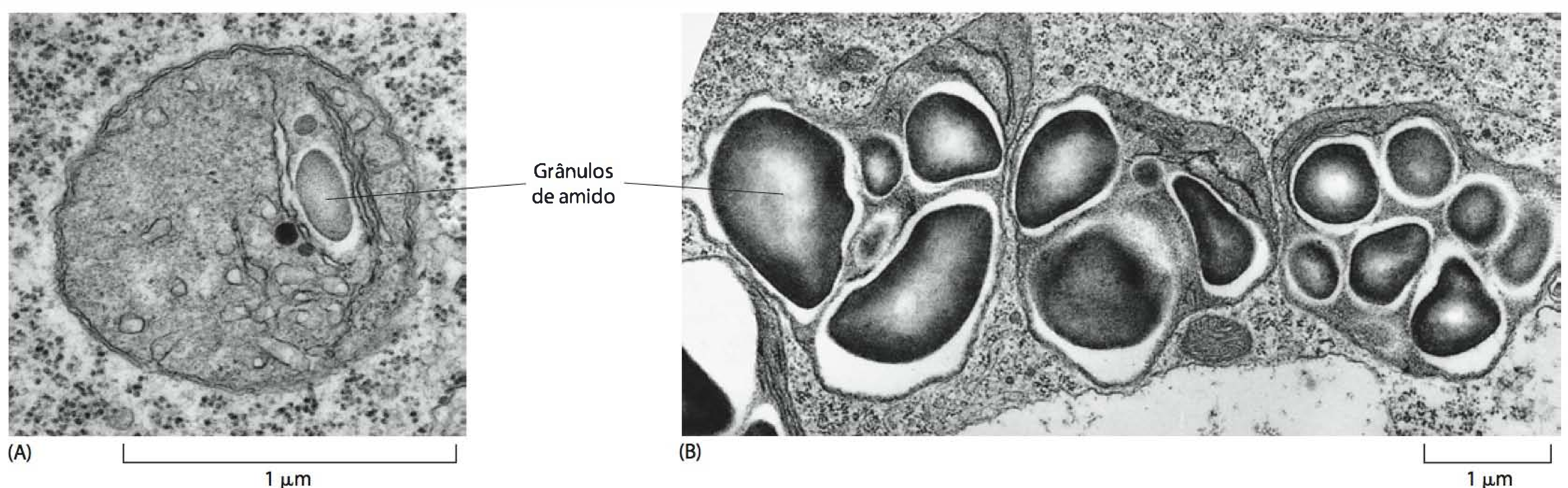


Figura 14-34 Diversidade de plastídeos. (A) Um proplastídeo da célula da região apical da raiz de uma planta de feijão. Note a membrana dupla; a membrana interna dá origem às outras membranas internas relativamente esparsas. (B) Três amiloplastos (uma forma de leucoplasto), ou plastídeos armazenadores de amido, de uma célula da região apical da raiz de soja. (De B. Gunning e M. Steer, Plant Cell Biology: Structure and Function. Sudbury, M. A.: Jones & Bartlett, 1996.)

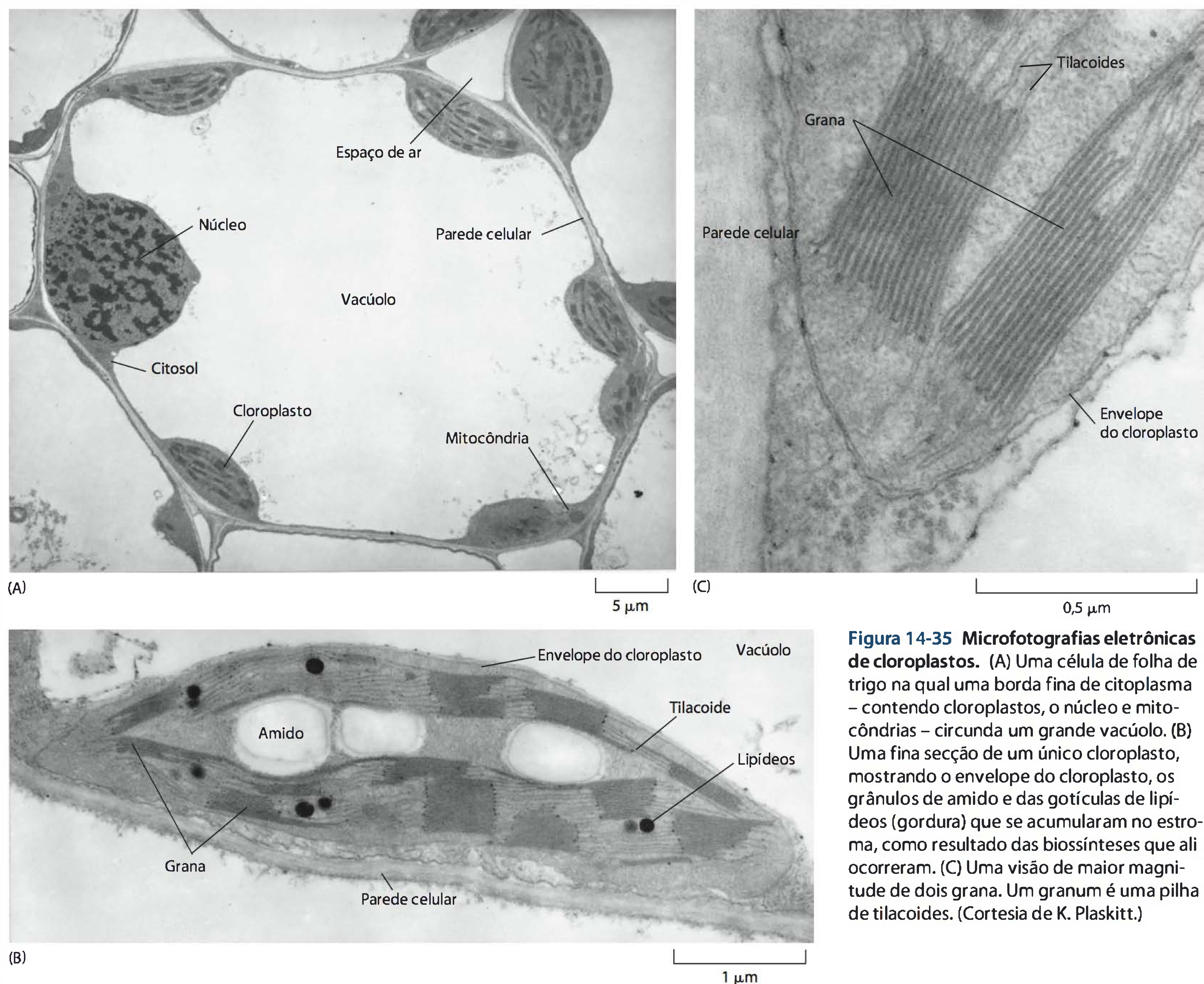


Figura 14-35 Microfotografias eletrônicas de cloroplastos. (A) Uma célula de folha de trigo na qual uma borda fina de citoplasma – contendo cloroplastos, o núcleo e mitocôndrias – circunda um grande vacúolo. (B) Uma fina secção de um único cloroplasto, mostrando o envelope do cloroplasto, os grânulos de amido e das gotículas de lipídeos (gordura) que se acumularam no estroma, como resultado das biossínteses que ali ocorreram. (C) Uma visão de maior magnitude de dois grana. Um granum é uma pilha de tilacoides. (Cortesia de K. Plaskitt.)

metabolismo intermediário. As sínteses de purinas e de pirimidinas da maioria dos aminoácidos e de todos os ácidos graxos dos vegetais ocorrem nos plastídeos, enquanto em células animais esses compostos são produzidos no citosol.

Os cloroplastos lembram as mitocôndrias, mas possuem um compartimento adicional

Os cloroplastos realizam as suas interconversões energéticas por mecanismos quimiosmóticos de maneira muito semelhante àquela utilizada pelas mitocôndrias. Embora muito maiores (**Figura 14-35**A), eles são organizados conforme os mesmos princípios. São dotados de uma membrana externa altamente permeável, uma membrana interna muito menos permeável, na qual proteínas de membrana transportadoras estão embebidas, e um espaço intermembranas muito estreito. Juntas, essas membranas formam o envelope do cloroplasto (Figura 14-35B, C). A membrana interna circunda um grande espaço chamado de **estroma**, que é análogo à matriz mitocondrial e contém várias enzimas metabólicas. De forma semelhante à mitocôndria, o cloroplasto possui seu próprio genoma e sistema genético. O estroma, portanto, também contém um conjunto especial de ribossomos, de RNAs e o DNA cloroplastídico.

Há, entretanto, uma importante diferença entre a organização das mitocôndrias e a dos cloroplastos. A membrana interna dos cloroplastos não é dobrada em cristas e não contém

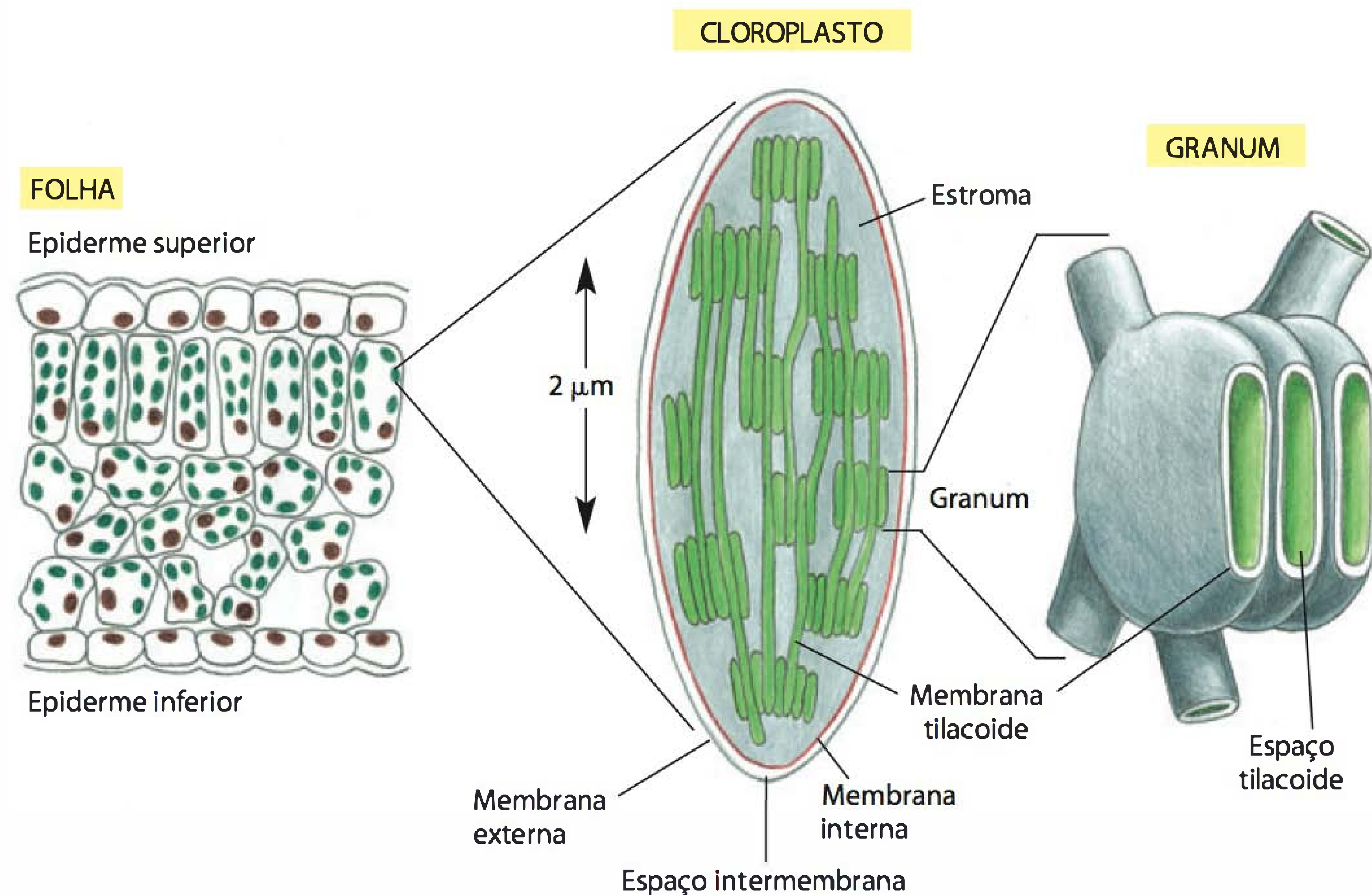


Figura 14-36 O cloroplasto. Esta organela fotossintetizante é dotada de três membranas distintas (a membrana externa, a membrana interna e a membrana tilacoide) que definem três compartimentos internos separados (o espaço intermembranas, o estroma e o espaço tilacoide). A membrana tilacoide contém todos os sistemas geradores de energia do cloroplasto, incluindo sua clorofila. Em microfotografias eletrônicas, esta membrana parece estar dividida em unidades separadas que envolvem vesículas achatadas individuais (ver Figura 14-35), mas que, provavelmente, estão unidas em uma membrana única e altamente dobrada em cada cloroplasto. Como indicado, os tilacoides individuais estão interconectados, uma vez que tendem a se empilhar para formar os grana.

cadeias transportadoras de elétrons. Em vez disso, as cadeias transportadoras de elétrons, os sistemas fotossintetizantes que absorvem luz e uma ATP-sintase estão contidos na *membrana tilacoide*, uma terceira membrana distinta que forma um conjunto de sacos achatados, os *tilacoides* (**Figura 14-36**). Acredita-se que o lúmen de cada tilacoide esteja conectado ao lúmen de outros tilacoides, consequentemente definindo um terceiro compartimento interno chamado de *espaço tilacoide*, que é separado do estroma pela membrana tilacoide que o circunda. As membranas tilacoides interagem umas com as outras para formar várias pilhas locais chamadas de *grana*.

A **Figura 14-37** destaca as similaridades estruturais e as diferenças entre mitocôndrias e cloroplastos. Uma diferença importante é que a cabeça da ATP- sintase, onde o ATP é fabricado, projeta-se da membrana tilacoide para o estroma em um cloroplasto, enquanto que na mitocôndria ela se projeta da membrana mitocondrial interna para a matriz.

Os cloroplastos capturam energia da luz solar e a utilizam para fixar carbono

As muitas reações que ocorrem durante a fotossíntese podem ser agrupadas em duas grandes categorias:

1. Nas reações **fotossintetizantes de transferência de elétrons** (também chamadas de "reações luminosas"), a energia derivada da luz solar energiza um elétron no pig-

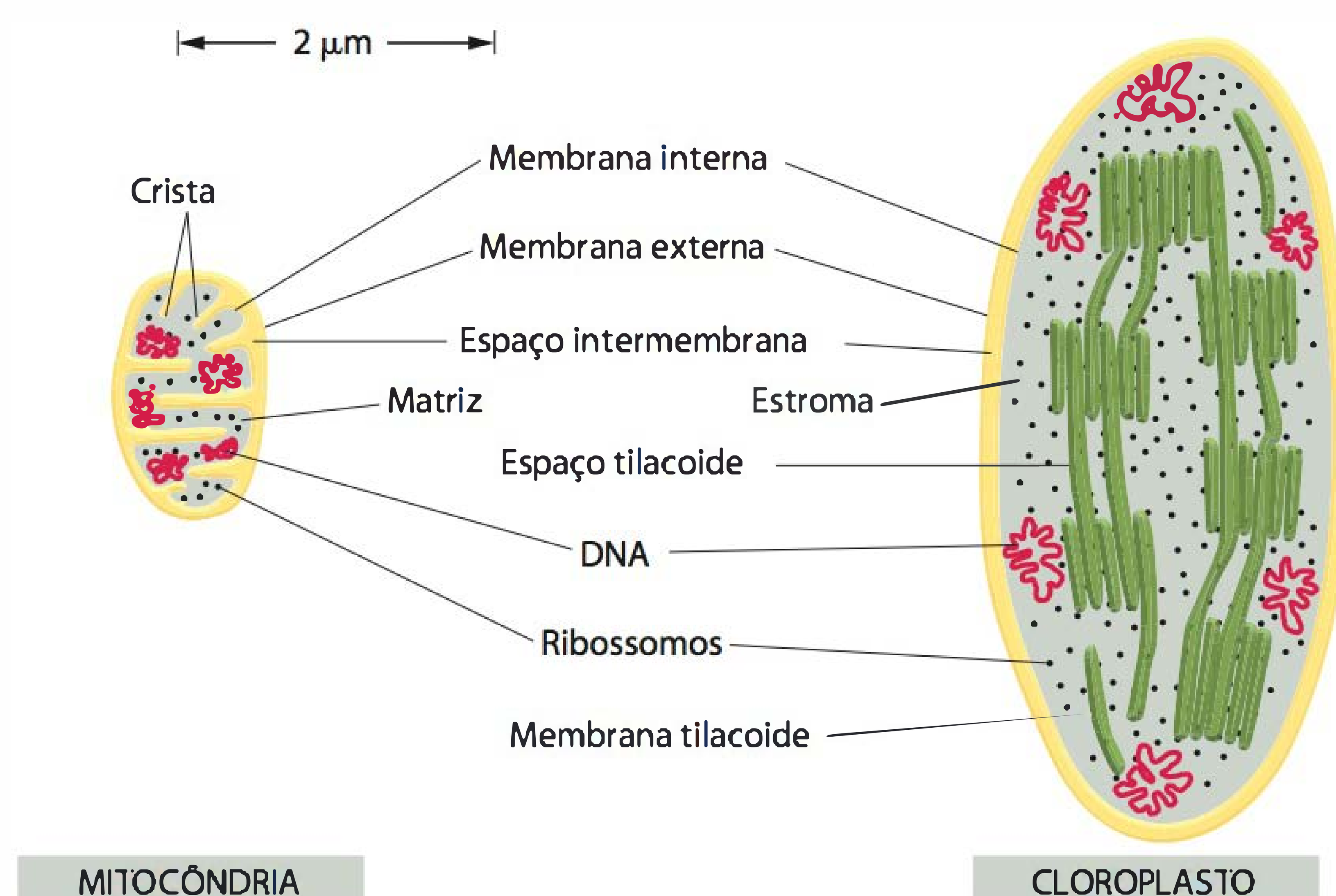


Figura 14-37 Comparação entre uma mitocôndria e um cloroplasto. Um cloroplasto geralmente é muito maior do que uma mitocôndria e, além das membranas externa e interna, é dotado de uma membrana tilacoide circundando um espaço tilacoide. Diferentemente da membrana interna cloroplastídica, a membrana mitocondrial interna é dobrada em cristas para aumentar a área superficial.

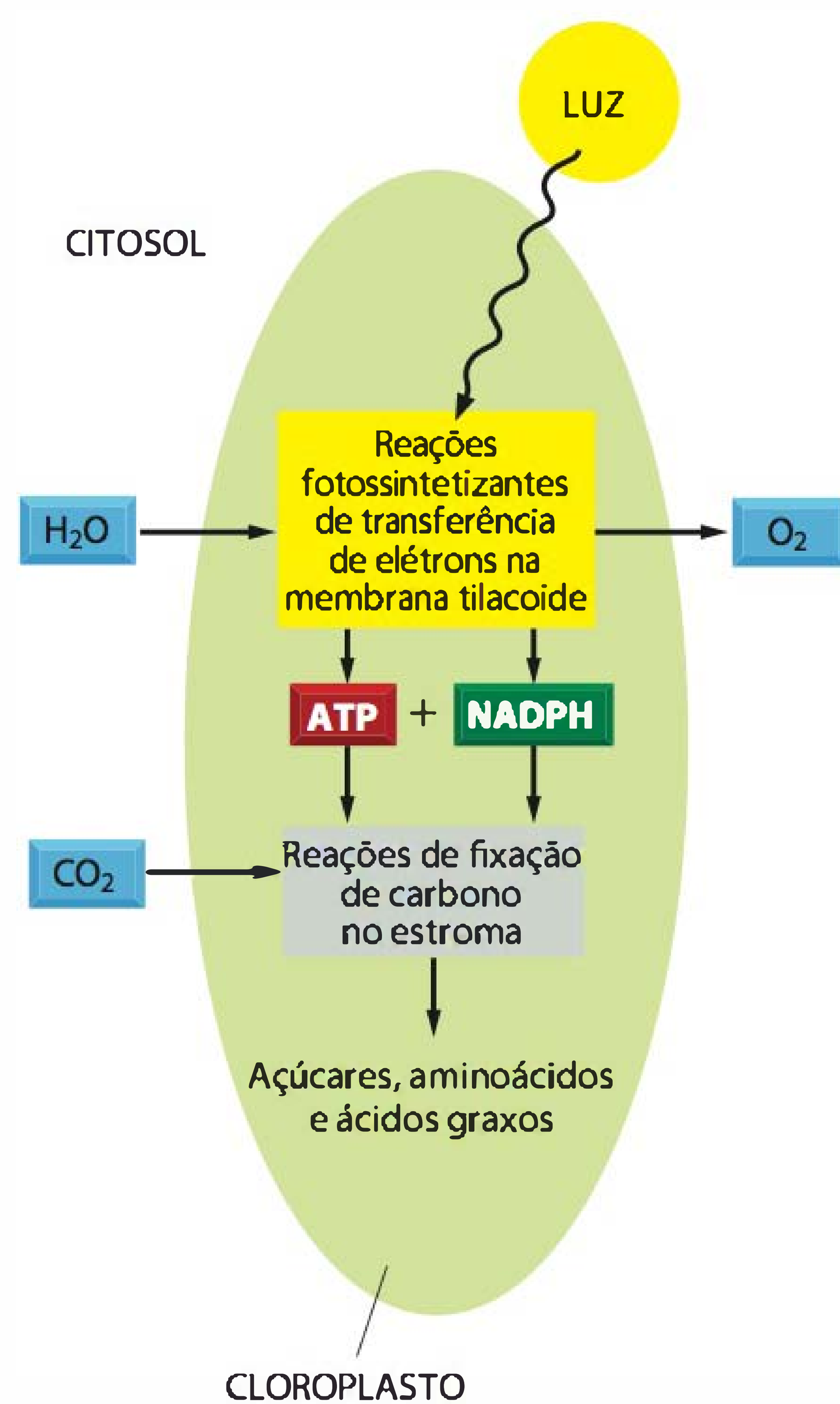


Figura 14-38 Reações de fotossíntese em um cloroplasto. A água é oxidada e o oxigênio é liberado nas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons, enquanto o dióxido de carbono é assimilado (fixado) para produzir açúcares e várias outras moléculas orgânicas nas reações de fixação do carbono.

mento orgânico verde *clorofila*, capacitando-o a se mover ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons na membrana tilacoide de uma maneira muito semelhante ao movimento de elétrons ao longo da cadeia respiratória das mitocôndrias. A clorofila obtém os seus elétrons da água (H_2O), gerando O_2 como subproduto. Durante o processo de transporte de elétrons, o H^+ é bombeado através da membrana tilacoide, e o gradiente eletroquímico de prótons resultante direciona a síntese de ATP no estroma. Como fase final desta série de reações, os elétrons de alta energia são carregados (juntamente com H^+) no $NADP^+$, convertendo-o em NADPH. Todas essas reações estão confinadas ao cloroplasto.

2. Nas **reações de fixação do carbono** (também chamadas de "reações da fase escura"), o ATP e o NADPH produzidos pelas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons servem como fonte de energia e como força redutora, respectivamente, para dirigir a conversão de CO_2 em carboidratos. As reações de fixação do carbono, que iniciam no estroma cloroplastídico e continuam no citosol, produzem sacarose e muitas outras moléculas orgânicas nas folhas do vegetal. A sacarose é exportada para outros tecidos como fonte de moléculas orgânicas e de energia para o crescimento.

Portanto, a formação de ATP, de NADPH e de O_2 (que necessita de energia luminosa diretamente) e a conversão de CO_2 em carboidrato (que requer energia luminosa apenas indiretamente) são processos separados (**Figura 14-38**), embora mecanismos elaborados de retroalimentação interconectem os dois processos. Várias das enzimas cloroplastídicas necessárias à fixação do carbono, por exemplo, são inativadas no escuro e reativadas por processos de transporte de elétrons estimulados pela luz.

A fixação do carbono é catalisada pela ribulose-bifosfato-carboxilase

Vimos anteriormente, neste capítulo, como as células produzem ATP utilizando uma grande quantidade de energia livre que é liberada quando os carboidratos são oxidados a CO_2 e H_2O. A reação inversa, entretanto, na qual CO_2 e H_2O combinam-se para produzir carboidratos, deve, logicamente, ser bastante desfavorável, devendo estar acoplada a outras reações altamente favoráveis para ser propulsionada.

A reação central de **fixação do carbono**, na qual um átomo de carbono inorgânico é convertido em carbono orgânico, está ilustrada na **Figura 14-39**: o CO_2 da atmosfera combina-se ao composto ribulose-1,5-bifosfato de cinco carbonos mais água para resultar em duas moléculas do composto 3-fosfoglicerato de três carbonos. Essa reação de "fixação do carbono", descoberta em 1948, é catalisada no estroma cloroplastídico por uma grande enzima denominada *ribulose-bifosfato-carboxilase*. Uma vez que cada cópia do complexo trabalha muito letargicamente (processando somente cerca de três moléculas de substrato por segundo, enquanto mil moléculas por segundo são processadas por uma enzima típica), muitas enzimas são necessárias. A ribulose-bisfofato-carboxilase frequentemente representa mais de 50% das proteínas cloroplastídicas totais e acredita-se que seja a proteína mais abundante do planeta.

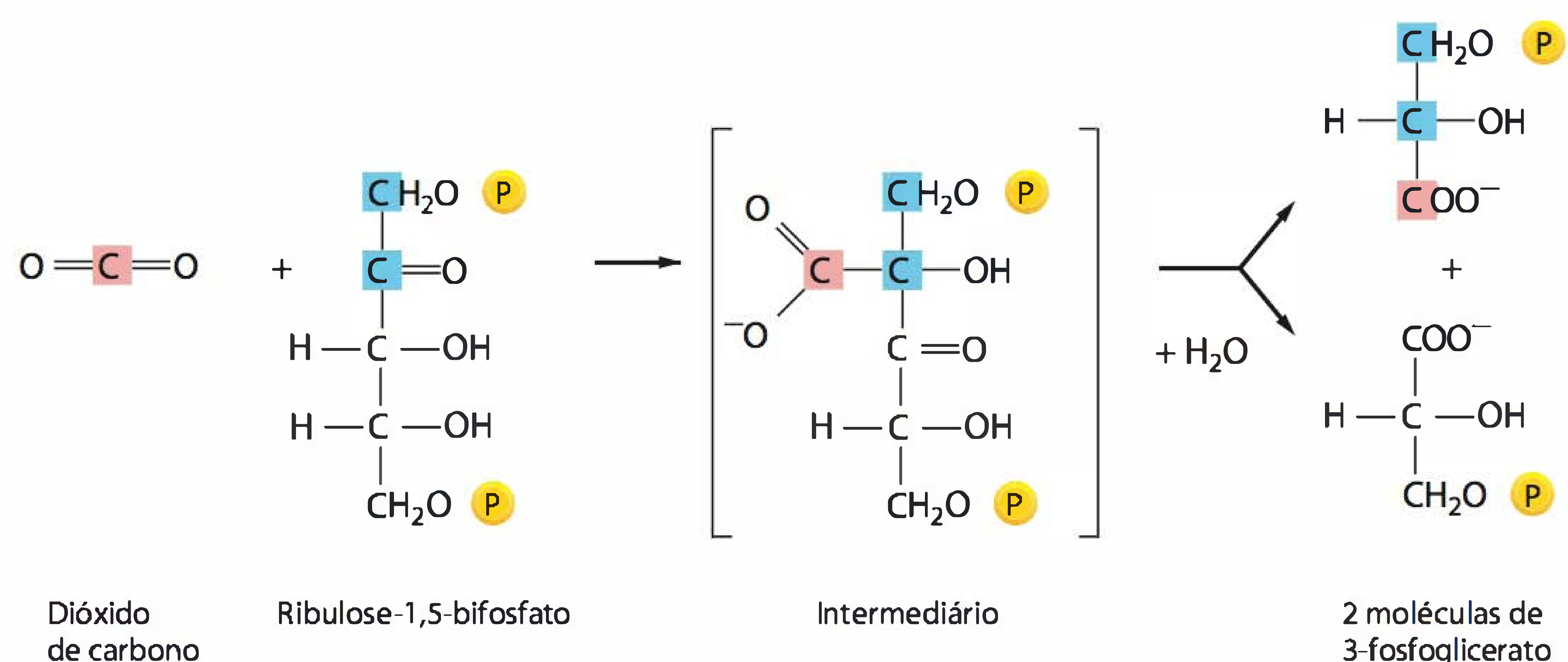


Figura 14-39 Reação inicial de fixação do carbono. Esta reação, na qual o dióxido de carbono é convertido em carbono orgânico, é catalisada no estroma cloroplastídico pela abundante enzima ribulose-bifosfato-carboxilase. O produto é o 3-fosfoglicerato, também um importante intermediário na glicólise. Os dois carbonos sombreados em *azul* são usados para produzir fosfoglicolato quando a enzima adiciona oxigênio em vez de CO_2 (ver o texto).

Três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO_2 que é fixada

Na realidade, a reação de fixação de CO_2 é energeticamente favorável devido à reatividade do composto *ribulose-1,5-bifosfato* rico em energia, sobre o qual cada molécula de CO_2 é adicionada (ver Figura 14-39). A via metabólica elaborada que produz ribulose-1,5-bisfosfato requer tanto NADPH quanto ATP; ela foi elucidada por uma das primeiras e mais bem-sucedidas aplicações de radioisótopos como traçadores em bioquímica. Este **ciclo de fixação do carbono** (também chamado de **ciclo de Calvin**) está resumido na **Figura 14-40**. Ele inicia quando três moléculas de CO_2 são fixadas pela ribulose-bifosfato-carboxilase para produzir seis moléculas de 3-fosfoglicerato (contendo 6 × 3 = 18 átomos de carbono no total: 3 do CO_2 e 15 da ribulose-1,5-bifosfato). Os 18 átomos de carbono, então, sofrem um ciclo de reações que regeneram as três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato utilizadas na etapa inicial de fixação do carbono (contendo 3 × 5 = 15 átomos de carbono). Isso deixa 1 molécula de *gliceraldeído-3-fosfato* (3 átomos de carbono) como ganho líquido.

Um total de três moléculas de ATP e duas moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO_2 convertida em carboidrato. A reação simplificada é:

$$3CO_2 + 9ATP + 6NADPH + \text{água} \rightarrow$$
$$\text{gliceraldeído-3-fosfato} + 8P_i + 9ADP + 6NADP^+$$

Portanto, tanto a *energia de ligação de fosfato* (na forma de ATP) quanto a *força redutora* (na forma NADPH) são necessárias para a formação de moléculas orgânicas a partir de CO_2 e de H_2O. Retornaremos a este importante ponto mais tarde.

O gliceraldeído-3-fosfato produzido nos cloroplastos pelo ciclo de fixação do carbono é um açúcar de três carbonos que serve como intermediário central na glicólise. Grande parte dele é exportada para o citosol onde pode ser convertida em frutose-6-fosfato e em glicose-

Figura 14-40 Ciclo de fixação do carbono, pelo qual se formam moléculas orgânicas a partir de CO_2 e de H_2O. O número de átomos de carbono para cada tipo de molécula está indicado no *retângulo branco*. Há muitos intermediários entre o gliceraldeído-3-fosfato e a ribulose-5-fosfato, mas eles foram omitidos aqui para maior clareza. A entrada de água no ciclo também não está mostrada.

-1-fosfato, pela inversão de várias reações da glicólise (ver Painel 2-8, p. 120-121). A glicose--1-fosfato é então convertida no nucleotídeo-açúcar UDP-glicose, e este combina-se à frutose-6-fosfato para formar sacarose-fosfato, o precursor imediato do dissacarídeo sacarose. A **sacarose** é a principal forma em que o açúcar é transportado entre as células vegetais: assim como a glicose é transportada no sangue de animais, a sacarose é exportada das folhas por meio dos feixes vasculares, fornecendo o carboidrato necessário para o resto do vegetal.

A maior parte do gliceraldeído-3-fosfato que permanece no cloroplasto é convertida em *amido* no estroma. Assim como o glicogênio em células animais, o **amido** é um grande polímero de glicose que serve como carboidrato de reserva (ver Figura 14-34B). A produção de amido é regulada de tal modo que ele é formado e armazenado como grandes grãos, no estroma cloroplastídico, durante os períodos de excessiva capacidade fotossintetizante. Isso ocorre por meio de reações no estroma que são o inverso daquelas da glicólise: elas convertem gliceraldeído-3-fosfato em glicose-1-fosfato, utilizada para produzir o nucleotídeo-açúcar ADP-glicose, o precursor imediato do amido. À noite, o amido é quebrado para auxiliar no suprimento das necessidades metabólicas do vegetal. O amido fornece uma parte importante da dieta de todos os animais que se alimentam de vegetais.

A fixação do carbono em alguns vegetais é compartimentalizada para facilitar o crescimento sob baixas concentrações de CO_2

Embora a ribulose-bifosfato-carboxilase adicione preferencialmente CO_2 à ribulose-1,5-bifosfato, ela pode utilizar O_2 como substrato em lugar de CO_2 e, se a concentração de CO_2 for baixa, essa enzima irá preferencialmente adicionar O_2 à ribulose-1,5-bisfosfato (ver Figura 14-39). Essa é a primeira etapa de uma via chamada de **fotorrespiração**, cujo último efeito é utilizar O_2 e liberar CO_2, sem a produção de estoques de energia útil. Em muitos vegetais, cerca de um terço do CO_2 fixado é perdido novamente como CO_2 devido à fotorrespiração.

A fotorrespiração pode ser uma séria desvantagem para os vegetais sob condições quentes e secas, pois eles fecham os seus estômatos (os poros de trocas gasosas das folhas) para evitar a perda excessiva de água. Isso, por sua vez, determina uma rápida queda dos níveis de CO_2 na folha e, consequentemente, favorece a fotorrespiração. Uma adaptação especial, entretanto, ocorre em muitos vegetais, como o milho e a cana-de-açúcar, os quais vivem em ambientes quentes e secos. Nessas plantas, o ciclo de fixação do carbono ocorre somente em cloroplastos das *células especializadas da bainha*, que contêm toda a ribulose-bisfosfato--carboxilase do vegetal. Essas células estão protegidas do ar e são circundadas por uma camada especializada de *células do mesófilo* que utilizam a energia obtida em seus cloroplastos para "bombear" CO_2 para dentro das células da bainha. Isso suprime a ribulose-bifosfato-carboxilase com uma alta concentração de CO_2, o que reduz em grande escala a fotorrespiração.

A bomba de CO_2 é produzida por um ciclo de reações que inicia no citosol das células do mesófilo. Uma etapa de fixação do CO_2 é catalisada por uma enzima que liga dióxido de carbono (na forma de bicarbonato) e o combina a uma molécula ativada de três carbonos (fosfoenol-piruvato) para produzir uma molécula de quatro carbonos. A molécula de quatro carbonos difunde-se para as células da bainha, onde é quebrada para liberar o CO_2 e gerar uma molécula de três carbonos. O ciclo de bombeamento é completado quando esta molécula de três carbonos é devolvida às células do mesófilo e convertida em sua forma ativada original. Como o CO_2 é inicialmente capturado através da sua conversão em um composto contendo quatro carbonos, os vegetais que bombeiam CO_2 são chamados *plantas* C_4. Todos os outros vegetais são chamados de *plantas* C_3, pois capturam CO_2 diretamente na forma de 3-fosfoglicerato, um composto constituído por três átomos de carbono (**Figura 14-41**).

Assim como qualquer processo vetorial de transporte, o bombeamento de CO_2 para as células da bainha em plantas C_4 custa-lhes energia (ATP é hidrolisado; ver Figura 14-41B). Em ambientes quentes e secos, entretanto, esse custo pode ser muito menor do que a energia perdida pela fotorrespiração nas plantas C_3 e, portanto, as plantas C_4 possuem uma desvantagem. Além disso, como as plantas C_4 podem realizar a fotossíntese sob concentrações baixas de CO_2 dentro da folha, elas precisam abrir menos os seus estômatos e, consequentemente, podem fixar cerca de duas vezes mais carbono por unidade de água perdida do que as plantas C_3. Esse tipo de fixação de carbono evolui independentemente em várias linhagens diferentes de plantas. Embora a maioria das espécies vegetais seja C_3, plantas C_4, como

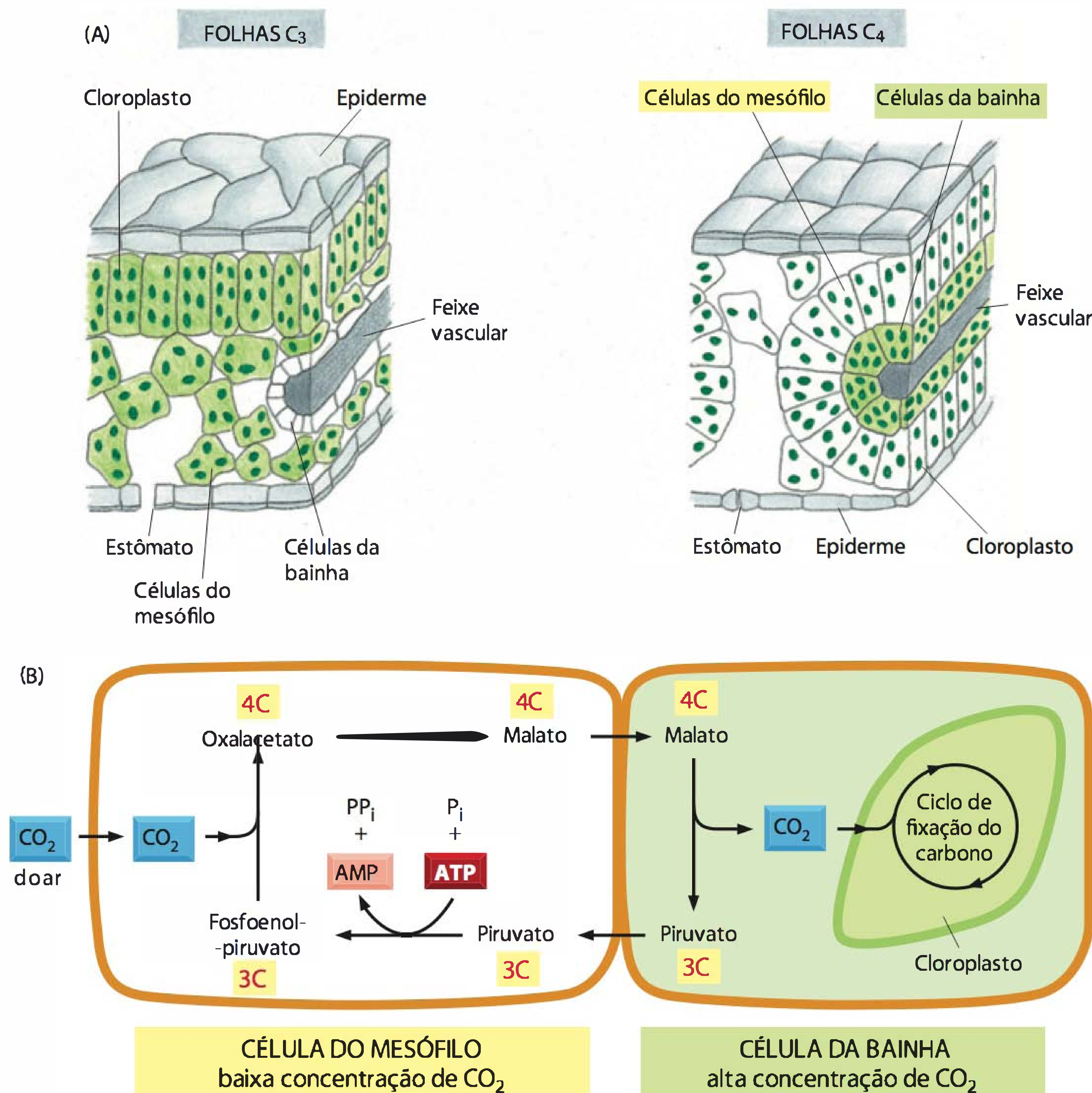


Figura 14-41 Bombeamento de CO_2 em plantas C_4. (A) A comparação da anatomia da folha de uma planta C_3 e de uma planta C_4. As células com citosol *verde* no interior da folha contêm cloroplastos que conduzem o ciclo normal de fixação do carbono. Em plantas C_4, as células do mesófilo estão mais especializadas em bombear CO_2 do que em fixar carbono e, consequentemente, criam uma alta razão CO_2:O_2 nas células da bainha, as quais são as únicas células, nestes vegetais, em que ocorre o ciclo de fixação do carbono. Os feixes vasculares transportam a sacarose fabricada na folha para os outros tecidos. (B) Como o dióxido de carbono é concentrado nas células da bainha pelo acoplamento de energia de ATP em células do mesófilo.

milho e cana-de-açúcar, são muito mais efetivas em converter a luz solar em biomassa do que as plantas C_3, como os cereais. Elas são, portanto, de importância especial na agricultura mundial.

A fotossíntese é dependente da fotoquímica das moléculas de clorofila

Tendo discutido as reações de fixação do carbono, retornaremos agora à questão de como as reações fotossintetizantes de transferência de elétrons do cloroplasto geram o ATP e o NADPH necessários para dirigir a produção de carboidratos a partir de CO_2 e de H_2O. A energia necessária deriva da luz solar absorvida pelas moléculas de **clorofila** (**Figura 14-42**). O processo de conversão de energia inicia quando uma molécula de clorofila é excitada por um quantum de luz (um fóton) e um elétron move-se de um orbital molecular para outro de mais alta energia. Tal molécula excitada é instável e tenderá a retornar ao seu estado original não-excitado. Isso pode ocorrer por uma das três seguintes maneiras:

1. Pela conversão da energia extra em calor (movimentos moleculares) ou por alguma combinação de calor e de luz de comprimento de onda mais longo (fluorescência), o que acontece quando a energia luminosa é absorvida por uma molécula de clorofila isolada em solução.
2. Pela transferência da energia – mas não do elétron – diretamente a uma molécula de clorofila vizinha, por um processo chamado de *transferência de energia ressonante*.
3. Pela transferência dos elétrons de alta energia para uma outra molécula próxima, um *aceptor de elétrons*, e então retornando ao seu estado original pela captura de um elétron de baixa energia de alguma outra molécula, um *doador de elétrons*.

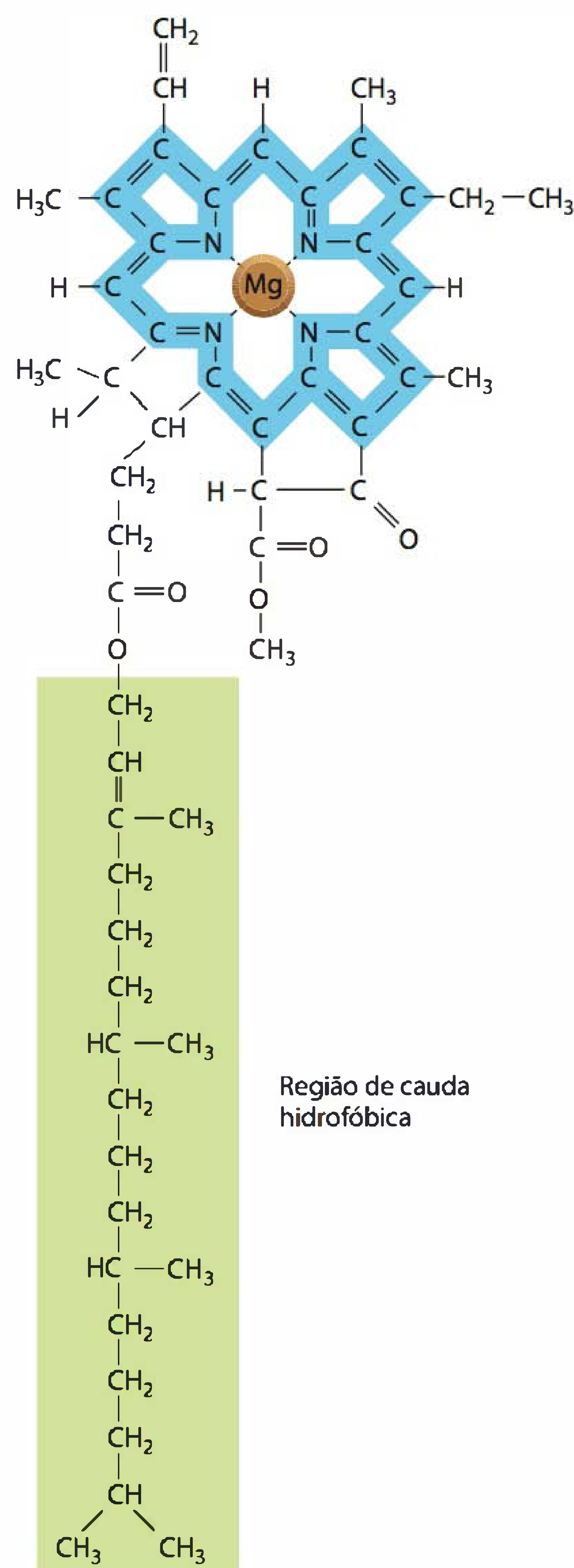


Figura 14-42 A estrutura da clorofila. Um átomo de magnésio é mantido por um anel porfirínico, o qual está relacionado ao anel porfirínico que se liga ao ferro no grupo heme (ver Figura 14-22). Os elétrons estão deslocados sobre as ligações mostradas em *azul*.

No processo de fotossíntese, os últimos dois mecanismos são muito facilitados por dois complexos proteicos diferentes: transferência de energia ressonante por um *complexo da antena* e transferência de elétrons de alta energia por um *centro de reação fotoquímica*. Estes dois tipos de complexos proteicos, atuando em concerto, tornam a maior parte da vida na Terra possível. Descrevemos a seguir como eles funcionam.

Um fotossistema consiste em um centro de reação fotoquímica somado a um complexo da antena

Os amplos complexos multiproteicos chamados de **fotossistemas** catalisam a conversão da energia luminosa capturada das moléculas excitadas de clorofila em formas de energia utilizável. Um fotossistema consiste em dois componentes intimamente ligados: um complexo da antena, constituído de proteínas ligadas a um grande conjunto de moléculas de pigmentos que capturam a energia luminosa e alimentam o centro de reação, e um centro de reação fotoquímica, consistindo em um complexo de proteínas e de moléculas de clorofila que permitem a conversão da energia luminosa em energia química.

O **complexo da antena** é importante para a captação da luz. Nos cloroplastos, ele consiste em vários complexos distintos de proteínas de membrana (conhecidos como complexos de captação de luz); juntas, estas proteínas ligam várias centenas de moléculas de clorofila por centro de reação, orientando-as de forma precisa na membrana tilacoide. O complexo da antena também contém pigmentos acessórios, chamados de *carotenoides*, que protegem as clorofilas da oxidação e podem auxiliar na coleta de luz de outros comprimentos de onda. Quando uma molécula de clorofila do complexo da antena é excitada, a energia é rapidamente transmitida de uma molécula a outra por meio da transferência de energia ressonante até que alcance um par especial de moléculas de clorofila do centro de reação fotoquímica. Cada complexo da antena atua, então, como um funil, coletando energia luminosa e direcionando-a a um sítio específico, no qual ela pode ser efetivamente utilizada (**Figura 14-43**).

O **centro de reação fotoquímica** é um complexo transmembrana proteína-pigmento que se localiza no coração da fotossíntese. Acredita-se que tenha evoluído, há mais de 3 bilhões de anos, de bactérias fotossintetizantes primitivas. O par especial de moléculas de clorofila do centro de reação atua como uma armadilha irreversível para os quantum de excitação, porque seus elétrons excitados são imediatamente transferidos para uma cadeia vizinha de aceptores de elétrons no complexo proteico (**Figura 14-44**). Ao mover o elétron de alta energia rapidamente para longe das clorofilas, o centro de reação fotoquímica o transfere para um ambiente no qual estará muito mais estável. Como consequência, o elétron é posicionado de forma adequada para as reações fotoquímicas subsequentes, as quais necessitam de um maior tempo para se completar e resultam na produção de elétrons de alta energia gerados por luz que alimentam as cadeias transportadoras de elétrons.

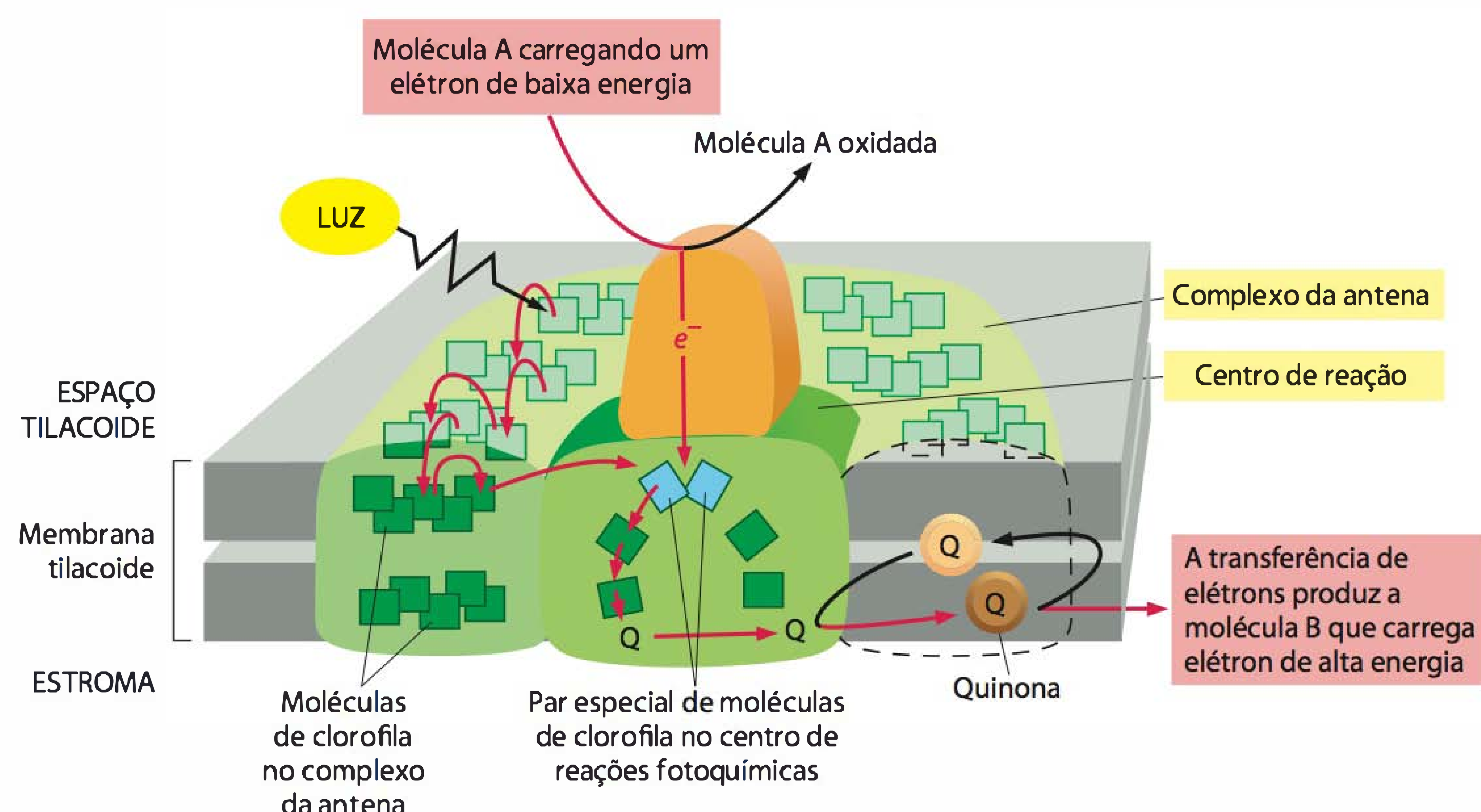


Figura 14-43 O complexo da antena e o centro de reação fotoquímica em um fotossistema. O complexo da antena é um coletor de energia luminosa na forma de elétrons excitados. A energia dos elétrons excitados é direcionada por meio de uma série de transferências de energia ressonante a um par especial de moléculas de clorofila no centro de reação fotoquímica. Este centro produz, então, um elétron de alta energia que pode ser passado rapidamente para a cadeia transportadora de elétrons da membrana tilacoide, por intermédio de uma quinona.

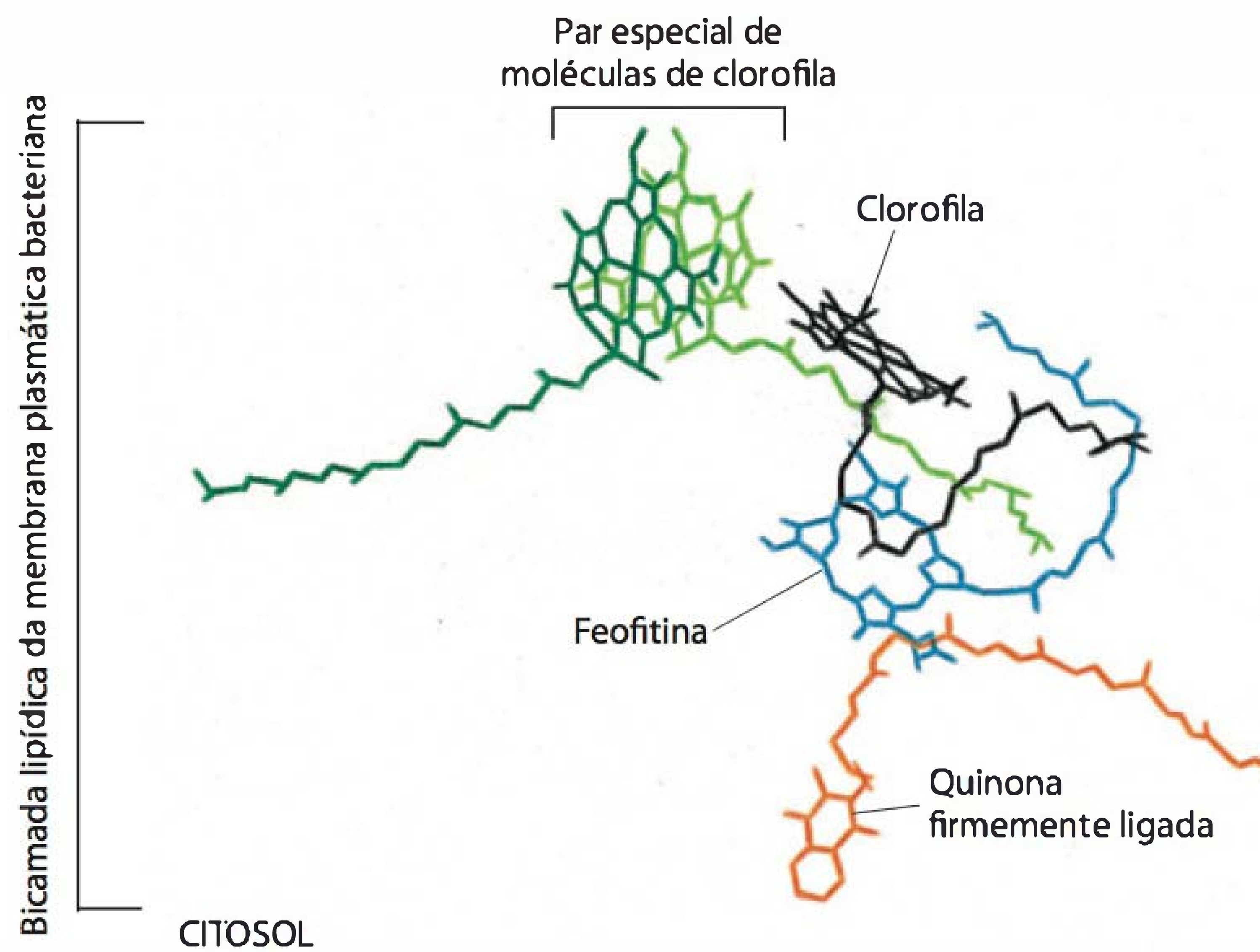


Figura 14-44 Arranjo de carreadores de elétrons em um centro de reação fotoquímica de uma bactéria púrpura. As moléculas dos pigmentos mostrados são sustentadas no interior de uma proteína transmembrana e cercadas pela bicamada lipídica da membrana plasmática bacteriana. Um elétron no par especial de moléculas de clorofila é excitado por ressonância por uma clorofila do complexo da antena; o elétron excitado é então subsequentemente transferido do par especial para a quinona (ver também Figura 14-45). Um arranjo semelhante de carreadores de elétrons está presente nos centros de reação de plantas (ver Figura 14-47).

Em um centro de reação, a energia luminosa capturada pela clorofila cria um doador forte de elétrons a partir de um doador fraco

As transferências de elétrons envolvidas nas reações fotoquímicas recém-apresentadas foram extensivamente analisadas por métodos rápidos de espectroscopia. A **Figura 14-45** ilustra, de modo geral, como a luz fornece a energia necessária para transferir um elétron

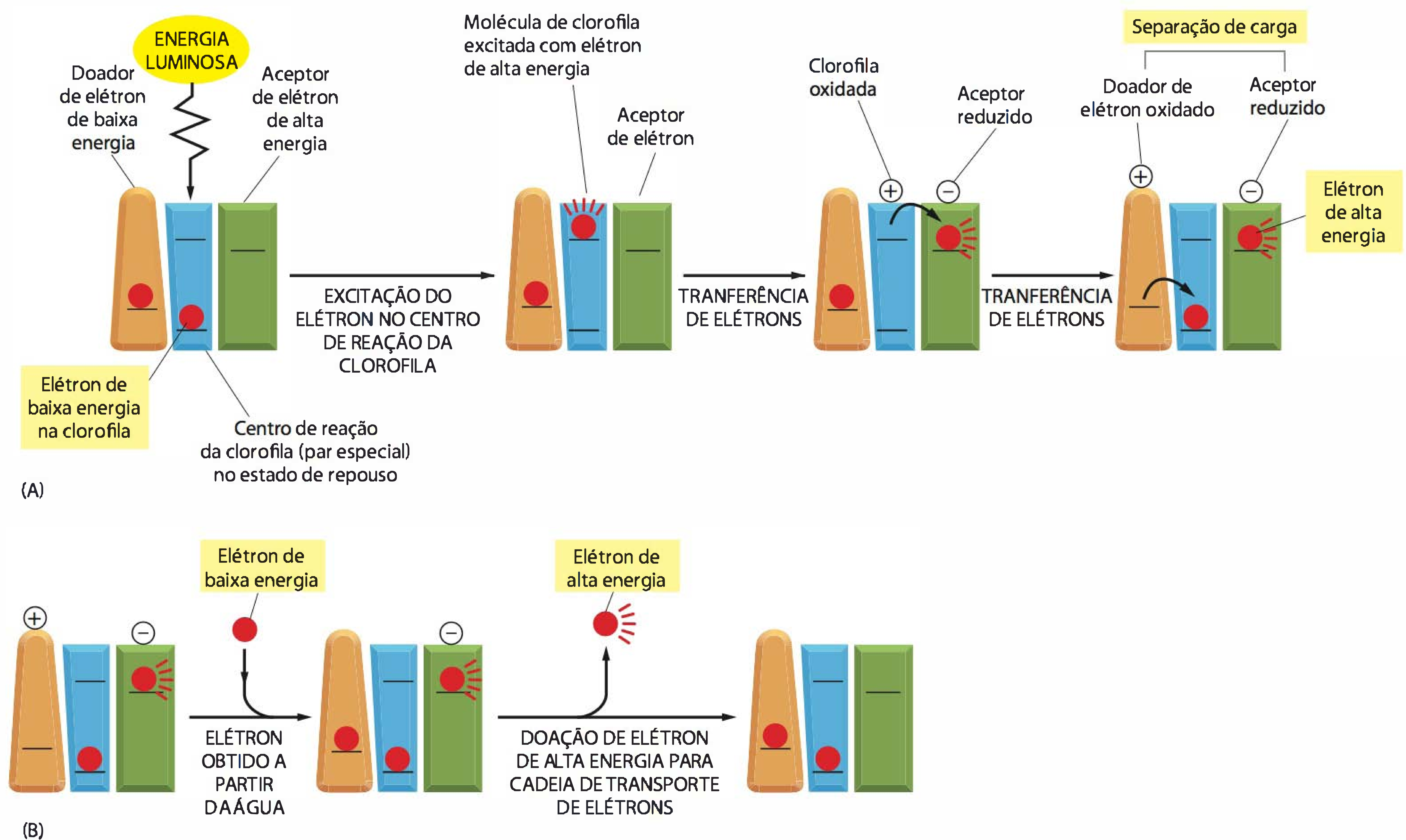


Figura 14-45 Como a energia luminosa é absorvida pelo centro de reação de uma molécula de clorofila. (A) Os eventos iniciais em um centro de reação criam uma separação de carga. Um complexo pigmento-proteína segura uma molécula de clorofila do par especial (*azul*), precisamente posicionado, de modo que tanto o doador potencial de elétrons de baixa energia (*laranja*) como o aceptor potencial de elétrons de alta energia (*verde*) estão imediatamente disponíveis. Quando a luz energiza um elétron na molécula de clorofila (elétron *vermelho*), o elétron excitado é passado imediatamente para o aceptor de elétrons e é, dessa forma, parcialmente estabilizado. A molécula de clorofila positivamente carregada então atrai rapidamente o elétron de baixa energia a partir do doador de elétrons e retorna ao seu estado de repouso, criando uma maior separação de carga que ainda estabiliza o elétron de alta energia. Estas reações necessitam de menos de 10^{-6} segundos para ocorrerem. (B) No estágio final desse processo, que ocorre depois da etapa em (A), o centro de reação fotossintetizante é restaurado para seu estado de repouso original por meio da aquisição de um novo elétron de baixa energia e da transferência do elétron de alta energia derivado da clorofila para uma cadeia transportadora de elétrons na membrana. Como será discutido a seguir, a última fonte de elétrons de baixa energia para o fotossistema II no cloroplasto é a água; como resultado, a luz produz elétrons de alta energia na membrana tilacoide a partir de elétrons de baixa energia na água.

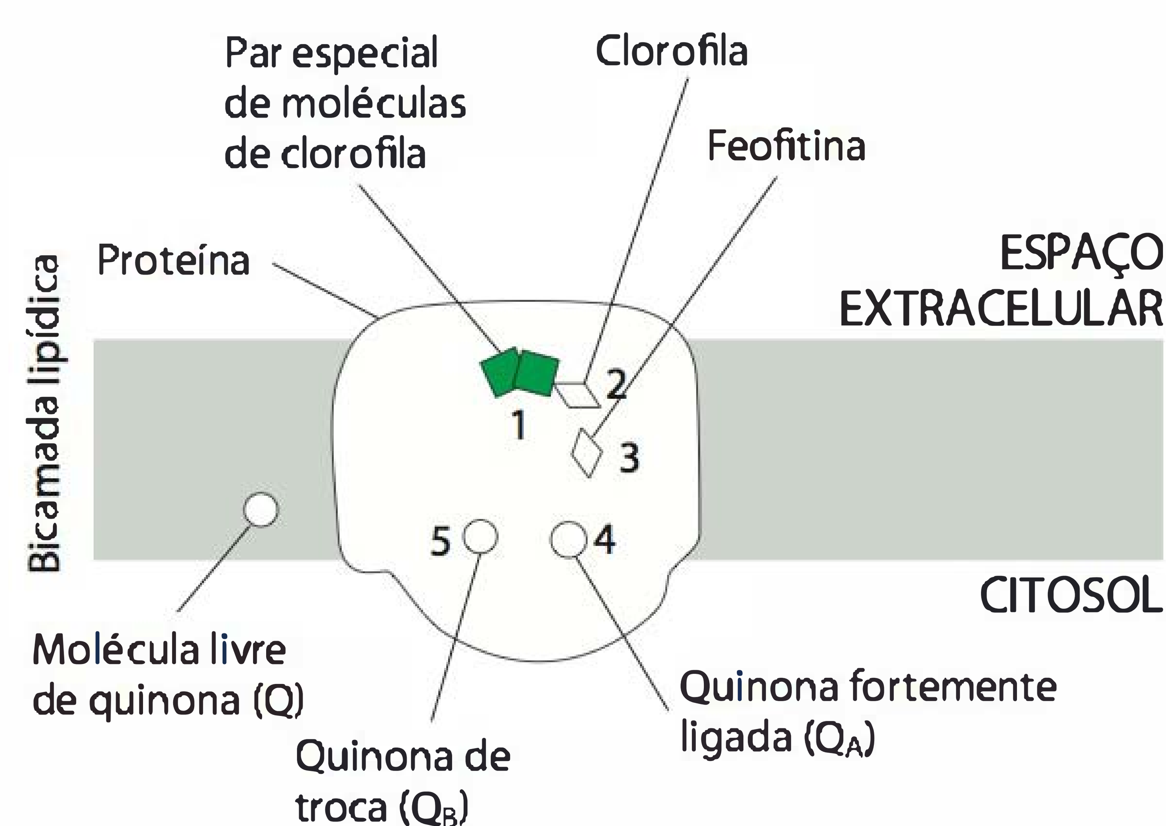
de um doador de elétrons fraco (uma molécula com alta afinidade por elétrons) para uma molécula que é um doador de elétrons forte na sua forma reduzida (uma molécula com uma baixa afinidade por elétrons). A molécula de clorofila que perde um elétron torna-se carregada positivamente, mas ela rapidamente ganha o elétron de volta a partir de um doador de elétrons adjacente para retornar ao seu estado sem carga não-excitado (Figura 14-45A, elétron em *laranja*). Então, em reações mais lentas, o doador de elétrons tem seu elétron perdido substituído, e o elétron de alta energia gerado pela clorofila excitada é transferido para a cadeia transportadora de elétrons (Figura 14-45B). A energia de excitação na clorofila, que normalmente seria perdida na forma de fluorescência ou calor, é utilizada para criar um forte doador de elétrons (uma molécula carregando um elétron de alta energia) onde não havia antes.

O fotossistema de bactérias púrpuras é um pouco mais simples do que os fotossistemas de cloroplastos evolutivamente relacionados e serviu como um bom modelo para o estudo de detalhes das reações. O centro de reação neste fotossistema é um grande complexo proteína-pigmento que pode ser solubilizado por detergente e purificado em sua forma ativa. Em um grande triunfo da análise estrutural, a sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia por raios X (ver Figura 10-34). Essa estrutura, combinada com dados de cinética, fornece a melhor imagem que temos das primeiras reações de transferência de elétrons que sustentam a fotossíntese. A **Figura 14-46** mostra a sequência atual de transferências de elétrons que ocorrem, para comparação com a Figura 14-45A.

Na bactéria púrpura, o elétron utilizado para preencher o espaço vazio deficiente de elétrons criado por uma separação de carga induzida pela luz provém de um fluxo cíclico de elétrons transferidos por um citocromo (veja o *retângulo laranja* na Figura 14-45); o doador de elétrons forte produzido é uma quinona. Um dos dois fotossistemas nos cloroplastos de vegetais superiores produz, de forma semelhante, uma quinona que carrega elétrons de alta energia. Entretanto, como discutiremos a seguir, como a água fornece os elétrons para este fotossistema, a fotossíntese em plantas – diferente daquela na bactéria púrpura – libera grandes quantidades de gás oxigênio.

A fotofosforilação acíclica produz tanto NADPH quanto ATP

A fotossíntese em plantas e em cianobactérias produz ATP e NADPH diretamente por um processo de duas etapas chamado de **fotofosforilação acíclica**. Como dois fotossistemas – chamados de fotossistemas I e II – trabalham em série para energizar um elétron para um estado de energia alto o suficiente, o elétron pode ser transferido por todo o caminho da água até o NADPH. À medida que os elétrons de alta energia passam através dos fotossistemas acoplados para gerar NADPH, parte da sua energia é desviada para a síntese de ATP.



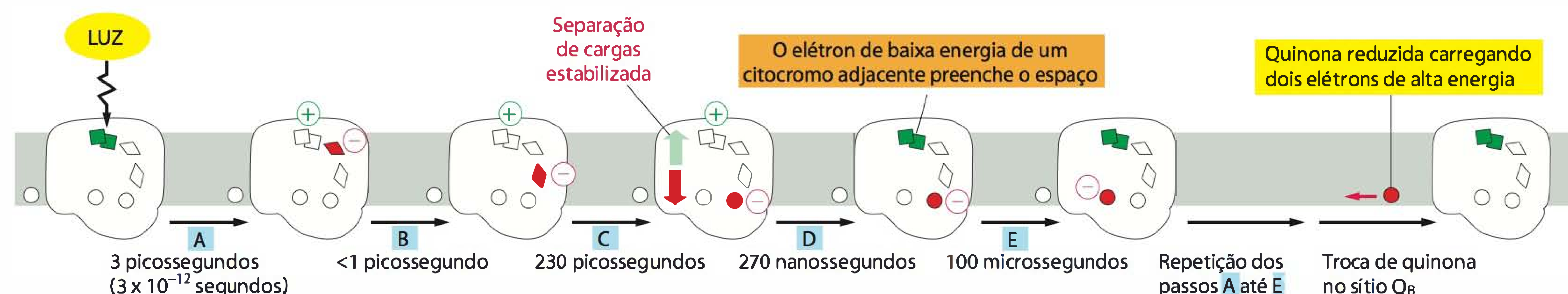


Figura 14-46 Transferências de elétrons que ocorrem no centro de reação fotoquímica de uma bactéria púrpura. Um conjunto semelhante de reações ocorre no fotossistema II evolutivamente relacionado dos vegetais. Acima e à esquerda está um diagrama orientador apresentando as moléculas que transportam elétrons, sendo os mesmos da Figura 14-45 somados a uma quinona de troca (Q_B) e a uma quinona livremente móvel (Q) dissolvida na bicamada lipídica. Os carreadores de elétrons 1 a 5 estão ligados em uma posição específica de uma proteína transmembrana de 596 aminoácidos formada de duas subunidades separadas (ver Figura 10-34). Após a excitação por um fóton de luz, um elétron de alta energia passa de uma molécula de pigmento para outra criando, muito rapidamente, uma *separação de carga estável*, como mostrado nas sequências de etapas A a C, nas quais a molécula de pigmento carregando elétrons de alta energia está colorida em *vermelho*. As etapas D e E então ocorrem progressivamente. Após um segundo fóton ter repetido essa sequência com um segundo elétron, a quinona de troca é liberada na bicamada, carregando dois elétrons de alta energia. Essa quinona rapidamente perde a sua carga ao coletar dois prótons (ver Figura 14-24).

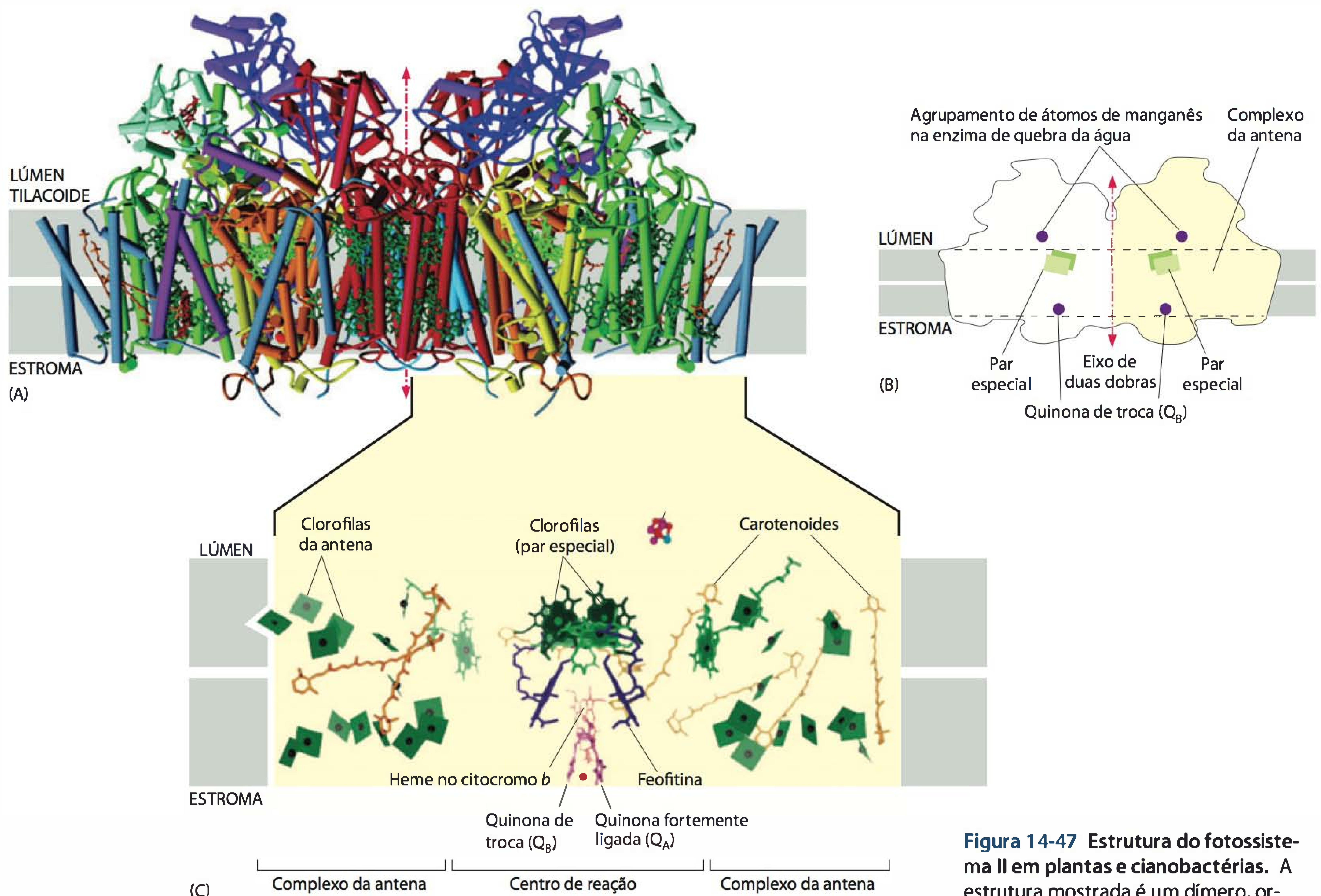


Figura 14-47 Estrutura do fotossistema II em plantas e cianobactérias. A estrutura mostrada é um dímero, organizado ao redor de um eixo de duas dobras (setas *vermelhas pontilhadas*). Cada monômero é composto de 16 subunidades proteicas integrais de membrana mais três subunidades no lúmen, com um total de 36 clorofilas ligadas, 7 carotenoides, duas feofitinas, dois hemes, duas plastoquinonas e um agrupamento de manganês em um centro de quebra da água de evolução de oxigênio. (A) A estrutura tridimensional completa do dímero. (B) Esquema do dímero com algumas características centrais indicadas. (C) Um monômero desenhado para mostrar apenas as moléculas não-proteicas na estrutura, destacando assim os pigmentos ligados à proteína e os carreadores de elétrons; as estruturas em *verde* são as clorofilas. (Adaptada de K. N. Ferreira et al., *Science* 303:1831-1838, 2004. Com permissão de AAAS.)

O primeiro dos dois fotossistemas – chamado, paradoxalmente, de *fotossistema II* por razões históricas – tem a habilidade única de remover elétrons da água. Os oxigênios de duas moléculas de água ligam-se a um agrupamento de quatro átomos de manganês na superfície do lúmen do complexo do centro de reação do fotossistema II (**Figura 14-47**). Este agrupamento permite aos elétrons serem removidos um de cada vez da água, como é necessário para preencher os espaços deficitários de elétrons criados pela luz nas moléculas de clorofila do centro de reação. Tão logo quatro elétrons tenham sido removidos das duas moléculas de água (o que requer quatro quantum de energia luminosa), o O_2 é liberado. O fotossistema II, portanto, catalisa a reação $2H_2O + 4$ fótons $\rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$. Como discutimos em relação à cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, que utiliza O_2 e produz água, o mecanismo assegura que nenhuma molécula de água parcialmente oxidada seja liberada na forma de radicais de oxigênio altamente reativos e perigosos. Essencialmente, todo o oxigênio da atmosfera terrestre foi produzido dessa maneira.

O núcleo do centro de reação do fotossistema II é homólogo ao centro de reação bacteriano recém-descrito e, de forma semelhante, produz fortes doadores de elétrons na forma de moléculas reduzidas de quinona dissolvidas na bicamada lipídica da membrana. As quinonas passam os seus elétrons a uma bomba de H^+ chamada de *complexo do citocromo* b_6-*f*, que se assemelha muito ao complexo do *citocromo* b-c_1 da cadeia respiratória de mitocôndrias. O complexo do citocromo b_6-*f* bombeia H^+ para o espaço tilacoide, através da membrana tilacoide (ou para o citosol, através da membrana plasmática, nas cianobactérias), e o gradiente eletroquímico resultante dirige a síntese de ATP pela ATP-sintase (**Figura 14-48**).

O aceptor final de elétrons nesta cadeia transportadora de elétrons é o segundo fotossistema, o *fotossistema I*, que aceita um elétron no espaço deficiente de elétrons criado pela luz em uma molécula de clorofila do seu centro de reação. Cada elétron que entra no fotossistema I é excitado a um nível muito alto de energia, o que permite que ele seja transferido para o centro de ferro-enxofre da ferredoxina e, então, para o $NADP^+$ de forma a gerar NADPH.

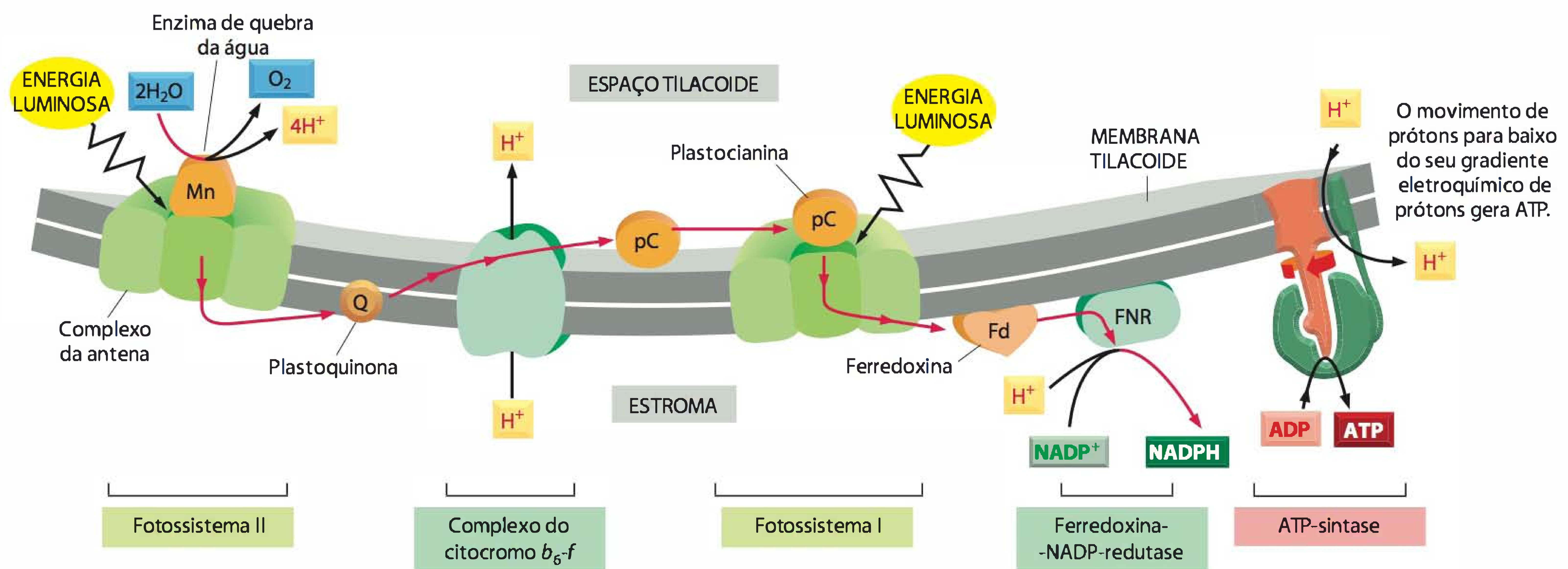


Figura 14-48 Fluxo de elétrons durante a fotossíntese na membrana tilacoide. Os carreadores de elétrons móveis na cadeia são a plastoquinona (que muito se assemelha à ubiquinona das mitocôndrias), a plastocianina (uma pequena proteína que contém cobre) e a ferredoxina (uma pequena proteína que contém um centro de ferro-enxofre). O complexo do citocromo b_6-f assemelha-se ao complexo b-c_1 das mitocôndrias e ao complexo b-c de bactérias (ver Figura 14-73): todos os três complexos aceitam elétrons das quinonas e bombeiam H^+ através da membrana. A liberação de H^+ pela oxidação da água no espaço tilacoide e os H^+ consumidos durante a formação de NADPH no estroma também contribuem para a geração do gradiente eletroquímico de H^+. Como ilustrado, esse gradiente dirige a síntese de ATP pela ATP-sintase presente nesta mesma membrana.

O esquema de fotossíntese recém-discutido é conhecido como *esquema em Z*. Por meio de suas duas etapas de energização de elétrons, cada uma catalisada por um dos fotossistemas, um elétron é transferido da água, a qual normalmente se liga firmemente aos seus elétrons (potencial redox = +820 mV), para o NADPH, que se liga aos seus elétrons mais fracamente (potencial redox = −320 mV) (**Figura 14-49**).

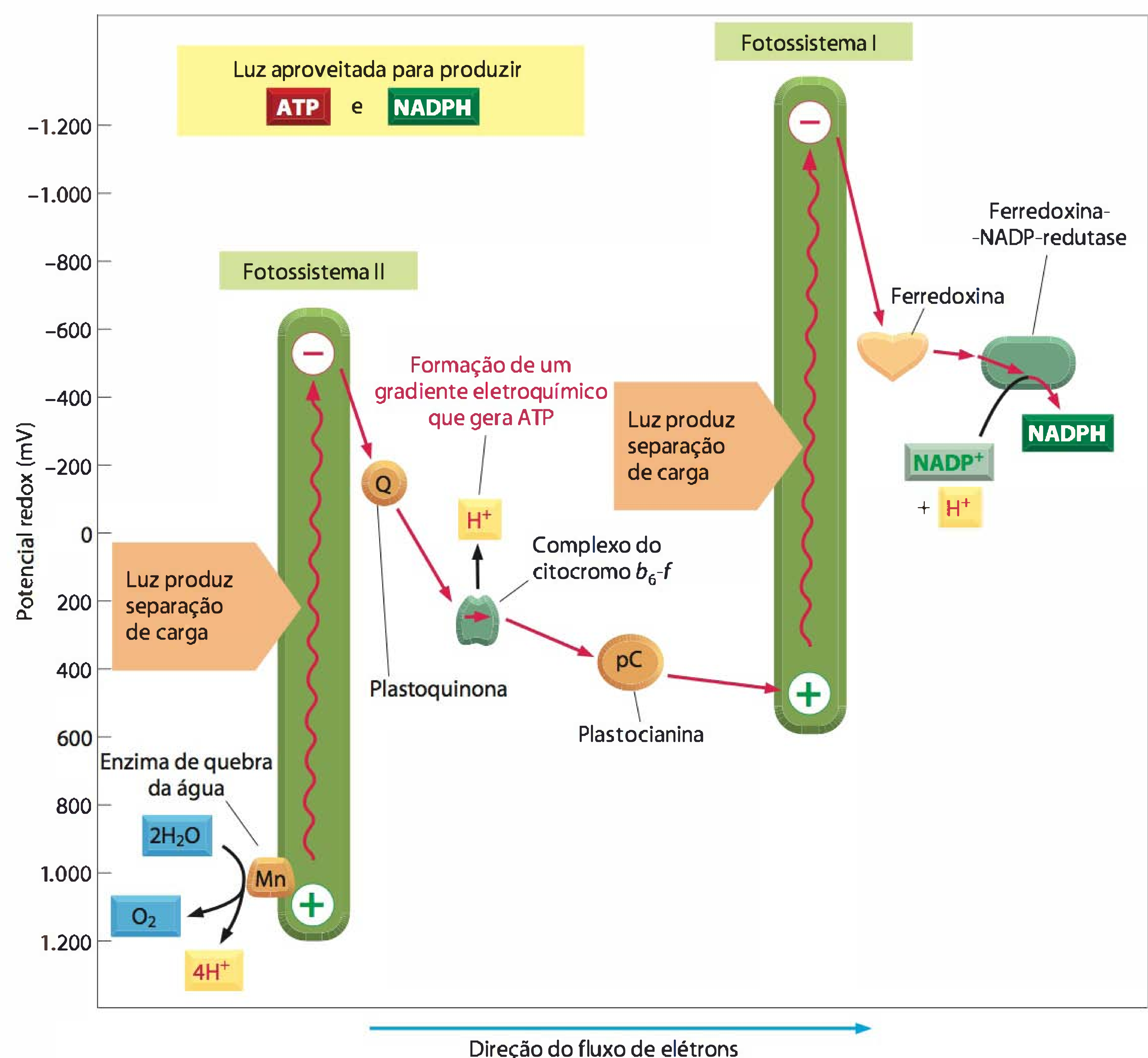


Figura 14-49 Variações do potencial redox durante a fotossíntese. O potencial redox para cada molécula está indicado por sua posição em relação ao eixo vertical. Note que o fotossistema II passa elétrons derivados da água para o fotossistema I. O fluxo líquido de elétrons através dos dois fotossistemas em série vai da água para o $NADP^+$, produzindo NADPH e ATP. O ATP é sintetizado por uma ATP-sintase que aproveita o gradiente eletroquímico de prótons produzido pelos três sítios de atividade de H^+ que estão evidenciados na Figura 14-48. Este esquema em Z para a produção de ATP é chamado de fotofosforilação acíclica, para distinguir do esquema cíclico que utiliza somente o fotossistema I (ver texto).

Não há energia suficiente em um único quantum de luz visível para energizar um elétron de forma tal que ele possa percorrer todo o caminho entre a base do fotossistema II e o topo do fotossistema I, o que provavelmente representa a variação de energia necessária para transferir com eficiência um elétron da água para o $NADP^+$. O uso de dois fotossistemas em série torna a energia de dois quanta de luz disponível para este propósito. Além disso, existe energia sobrando para permitir que a cadeia de transporte de elétrons que interliga os dois fotossistemas bombeie H^+ através da membrana tilacoide (ou através da membrana plasmática de cianobactérias), o que propicia que a ATP-sintase aproveite parte da energia derivada da luz para a produção de ATP.

Os cloroplastos podem produzir ATP pela fotofosforilação cíclica, sem produzir NADPH

No esquema de fotofosforilação acíclica recém-discutido, os elétrons de alta energia que deixam o fotossistema II são aproveitados para gerar ATP e são transferidos para o fotossistema I para dirigir a produção de NADPH. Isso produz pouco mais do que uma molécula de ATP para cada par de elétrons que migra de H_2O para $NADP^+$ gerando uma molécula de NADPH. No entanto, a fixação de carbono requer 1,5 molécula de ATP por molécula de NADPH (ver Figura 14-40). Para produzir ATP extra, os cloroplastos podem converter o fotossistema I em um modo cíclico, de forma que produza ATP ao invés de NADPH. Nesse processo, chamado de *fotofosforilação cíclica*, os elétrons de alta energia do fotossistema I são transferidos para o complexo do citocromo b_6-f em vez de seguirem o seu caminho para o $NADP^+$. A partir do complexo b_6-f, os elétrons são devolvidos ao fotossistema I com uma baixa energia. O único resultado líquido, além da conversão de parte da energia luminosa em calor, é que o H^+ é bombeado através da membrana tilacoide pelo complexo b_6-f para aumentar, assim, o gradiente eletroquímico de prótons que propulsiona a ATP-sintase. (Isso é análogo ao processo cíclico que ocorre nas bactérias púrpuras não-sulfurosas na Figura 14-73, a seguir.)

Em resumo, a fotofosforilação cíclica envolve somente o fotossistema I e produz ATP sem a formação de NADPH ou de O_2. As atividades relativas dos fluxos cíclico e acíclico de elétrons podem ser reguladas pela célula para determinar a quantidade de energia luminosa que é convertida em força redutora (NADPH) e a quantidade que é convertida em altas energias das ligações de fosfato (ATP).

As estruturas dos fotossistemas I e II estão relacionadas e também lembram fotossistemas bacterianos

Os mecanismos de processos celulares fundamentais, como replicação de DNA ou respiração, geralmente revelam-se os mesmos nas células eucarióticas e nas bactérias, mesmo que o número de componentes proteicos envolvidos seja consideravelmente maior nos eucariotos. Os eucariotos evoluíram a partir dos procariotos, e as proteínas adicionais, presumivelmente, foram selecionadas durante a evolução porque forneciam um grau adicional de eficiência e/ou regulação útil à célula.

Os fotossistemas fornecem um exemplo claro desse tipo de evolução. As estruturas atômicas de ambos os fotossistemas eucarióticos foram reveladas por uma combinação de elétrons e por cristalografia por raios X, e a relação íntima do fotossistema I, do fotossistema II e do centro de reação fotoquímica de bactérias púrpuras foi claramente demonstrada por essas análises (**Figura 14-50**).

A força próton-motriz é a mesma nas mitocôndrias e nos cloroplastos

A presença do espaço tilacoide separa um cloroplasto em três compartimentos, diferentemente dos dois compartimentos internos de uma mitocôndria. O efeito final da translocação de H^+ nas duas organelas, entretanto, é semelhante. Como ilustrado na **Figura 14-51**, nos cloroplastos expostos à luz, os H^+ são bombeados do estroma (pH 7,5) para fora, no espaço tilacoide (pH ~4,5), criando um gradiente de 3 unidades de pH. Isso representa uma força próton-motriz de cerca de 180 mV através da membrana tilacoide, que propulsiona a síntese de ATP pela ATP-sintase embebida nessa membrana. A força é

a mesma daquela existente através da membrana mitocondrial interna, mas é quase toda produzida pelo gradiente de pH e não pelo potencial de membrana, como acontece no caso das mitocôndrias.

Para mitocôndrias e cloroplastos, o sítio catalítico da ATP-sintase tem um pH de cerca de 7,5 e está localizado no compartimento maior das organelas (matriz ou estroma), cheio de enzimas solúveis. Consequentemente, é aqui que todo o ATP celular é fabricado (ver Figura 14-51).

As proteínas carreadoras na membrana interna dos cloroplastos controlam as trocas de metabólitos com o citosol

Se os cloroplastos forem isolados de forma a manter intactas as suas membranas internas, pode-se demonstrar que elas são dotadas de uma permeabilidade seletiva, refletindo a presença de proteínas transportadoras específicas. Notavelmente, grande parte do gliceraldeído-3-fosfato produzido pela fixação de CO_2 no estroma cloroplastídico é transportada para fora do cloroplasto por um eficiente sistema de translocação, que faz a troca de açúcares fosfatados de três carbonos por fosfato inorgânico.

O gliceraldeído-3-fosfato normalmente proporciona ao citosol uma abundante fonte de carboidratos, que é usada pela célula como ponto de partida para muitas outras biossínteses, incluindo a produção de sacarose para exportação. Mas isso não é tudo o que esta molécula proporciona. Uma vez que o gliceraldeído-3-fosfato alcança o citosol, ele é imediatamente convertido (como parte da via glicolítica) em 1,3-fosfoglicerato e, então, em 3-fosfoglicerato (ver p. 92), gerando uma molécula de ATP e uma de NADH. (Uma reação de duas etapas muito semelhante, operando no sentido inverso, forma gliceraldeído-3-fosfato no ciclo de

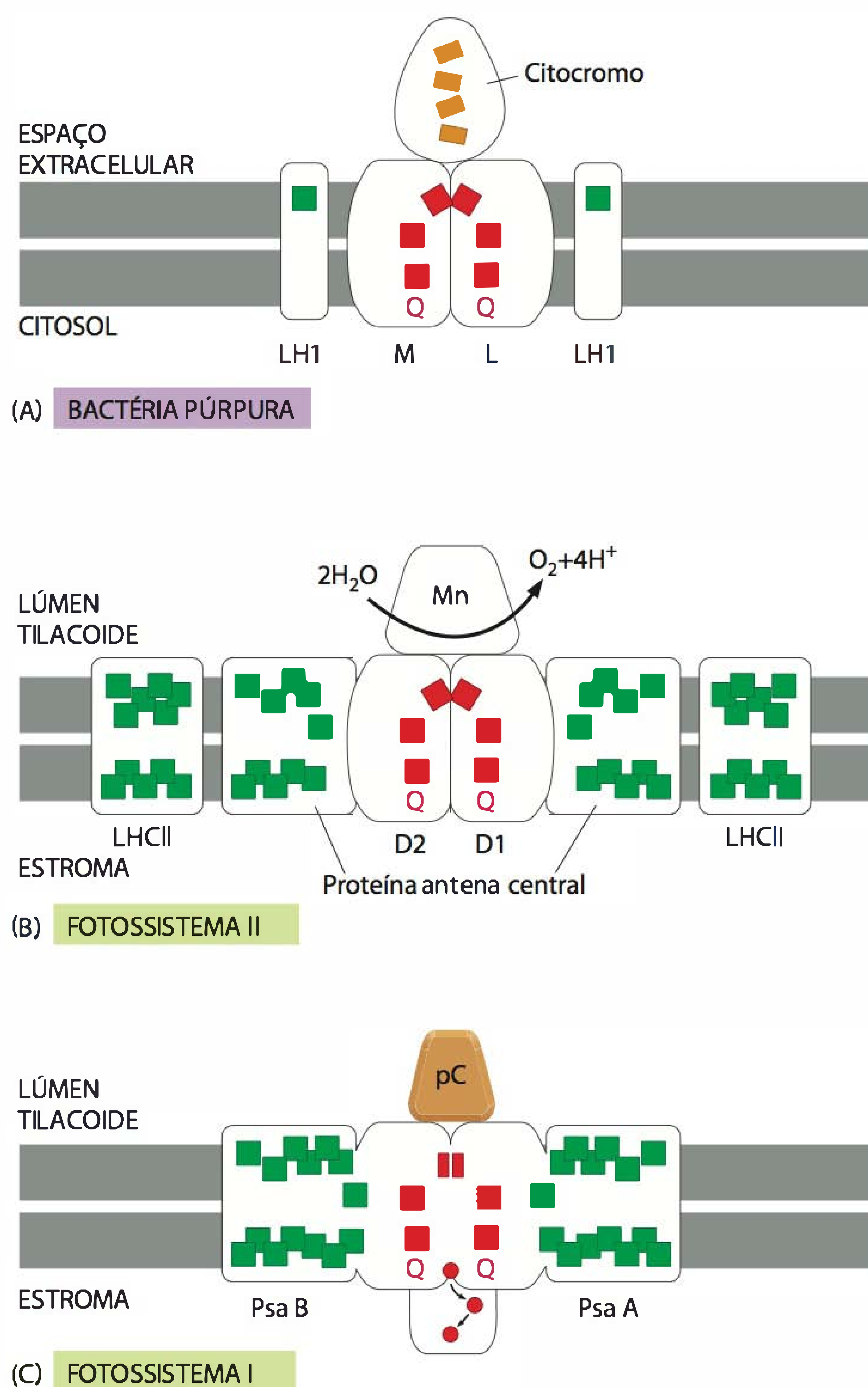


Figura 14-50 Comparação dos três tipos de centros de reação fotossintetizante. Os pigmentos envolvidos na captação de luz estão coloridos em *verde*; aqueles nos eventos fotoquímicos centrais, em *vermelho*. (A) O centro de reação fotoquímica de bactérias púrpuras, cuja estrutura detalhada está ilustrada na Figura 10-34, contém duas subunidades proteicas relacionadas, L e M, que ligam os pigmentos envolvidos no processo central ilustrado na Figura 14-46. Os elétrons de baixa energia servem como alimento para clorofilas excitadas por um citocromo. O LH1 é um complexo proteína-pigmento envolvido na captação de luz. (B) O fotossistema II contém as proteínas D_1 e D_2, homólogas às subunidades L e M em (A). Os elétrons de baixa energia da água servem como alimento para as clorofilas excitadas por um agrupamento manganês. O LHCII é um complexo de captação de luz que alimenta com energia as proteínas do núcleo da antena (ver Figura 14-47). (C) O fotossistema I contém as proteínas Psa A e B, cada uma delas equivalente à fusão das proteínas D_1 ou D_2 a uma proteína antena central do fotossistema II. Os elétrons de baixa energia servem como alimento para as clorofilas excitadas pela plastocianina (pC) fracamente ligada. Como indicado, no fotossistema I, os elétrons de alta energia são passados de uma quinona imóvel (Q) através de uma série de três centros de ferro-enxofre (*círculos vermelhos*). (Modificada de K. Rhee, E. Morris, J. Barber e W. Kühlbrandt, *Nature* 396:283-286, 1998; W. Kühlbrandt, *Nature* 411:896-899, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

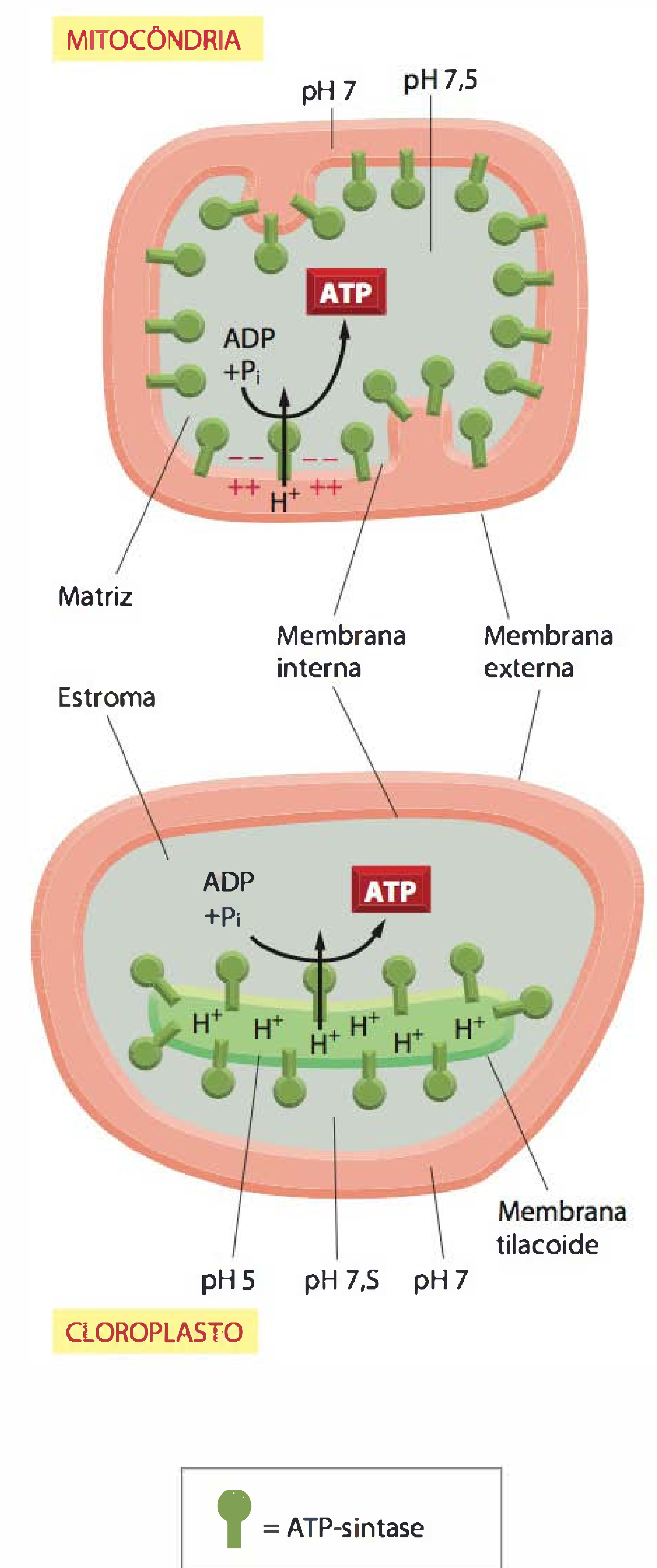


Figura 14-51 **Comparação do fluxo de H^+ e orientação da ATP-sintase em mitocôndrias e em cloroplastos.** Os compartimentos com pH equivalente estão coloridos de modo semelhante. A força próton-motriz através da membrana tilacoide consiste quase que inteiramente em um gradiente de pH; uma alta permeabilidade desta membrana aos íons de Mg^{2+} e de Cl^- permite que o seu fluxo dissipe grande parte do potencial de membrana. As mitocôndrias, presumivelmente, necessitam de um potencial de membrana maior, pois do contrário não poderiam tolerar um pH em torno de 10 na sua matriz, como seria necessário para gerar a força próton-motriz.

fixação do carbono – ver Figura 14-40.) Como resultado, a exportação de gliceraldeído-3--fosfato do cloroplasto fornece não somente a principal fonte de carbono fixado para o resto da célula, mas também a força redutora e o ATP necessários ao metabolismo fora do cloroplasto.

Os cloroplastos também realizam outras biossínteses cruciais

O cloroplasto realiza muitas outras biossínteses, além da fotossíntese. Enzimas no estroma dos cloroplastos produzem todos os ácidos graxos celulares e um bom número de aminoácidos, por exemplo. De forma semelhante, a força redutora de elétrons ativados pela luz dirige a redução de nitrito (NO_2^-) a amônia (NH_3) no cloroplasto; essa amônia fornece ao vegetal o nitrogênio para a síntese de aminoácidos e de nucleotídeos. A importância metabólica do cloroplasto para as plantas e as algas, portanto, estende-se muito além de sua função na fotossíntese.

Resumo

Os cloroplastos e as bactérias fotossintetizantes obtêm elétrons de alta energia por meio de fotossistemas que capturam elétrons excitados quando a luz solar é absorvida pelas moléculas de clorofila. Os fotossistemas são constituídos por um complexo da antena que afunila energia para um centro de reação fotoquímica, onde um complexo precisamente ordenado de proteínas e de pigmentos permite que carreadores de elétrons capturem a energia de um elétron excitado de clorofila. O centro de reação fotoquímica melhor compreendido é aquele presente em bactérias púrpuras fotossintetizantes que contêm apenas um único fotossistema. Em contraste, há dois fotossistemas distintos nos cloroplastos e nas cianobactérias. Os dois fotossistemas normalmente estão ligados em série e transferem elétrons da água para o $NADP^+$ para formar NADPH, com a concomitante produção de um gradiente eletroquímico de prótons transmembrana. Nesses fotossistemas ligados, o oxigênio molecular (O_2) é gerado como produto secundário pela remoção de quatro elétrons de baixa energia de duas moléculas de água especificamente posicionadas. As estruturas tridimensionais detalhadas dos fotossistemas I e II mostram o grau impressionante de homologia com a estrutura dos fotossistemas da bactéria púrpura fotossintetizante, demonstrando um incrível grau de conservação em bilhões de anos de evolução.

Comparados às mitocôndrias, os cloroplastos possuem uma membrana interna adicional (a membrana tilacoide) e um terceiro espaço interno (o espaço tilacoide). Todos os processos de transporte de elétrons ocorrem na membrana tilacoide: para fabricar ATP, H^+ é bombeado para o espaço tilacoide, e um refluxo de H^+ através da ATP-sintase produz o ATP no estroma cloroplastídico. Esse ATP é usado em conjunto com o NADPH feito pela fotossíntese para direcionar um grande número de reações biossintetizantes no estroma cloroplastídico, incluindo as reações de fixação do carbono, mais importantes, que geram carboidratos a partir de CO_2. Juntamente com outros produtos dos cloroplastos, este carboidrato é exportado para o citosol celular, onde – na forma de gliceraldeído-3--fosfato – fornece carbono orgânico, ATP e força redutora para o resto da célula.

OS SISTEMAS GENÉTICOS DE MITOCÔNDRIAS E DE PLASTÍDEOS

A hipótese de que as mitocôndrias e os plastídeos evoluíram de bactérias que foram engolfadas por células ancestrais nucleadas pode explicar por que estes dois tipos de organelas con-

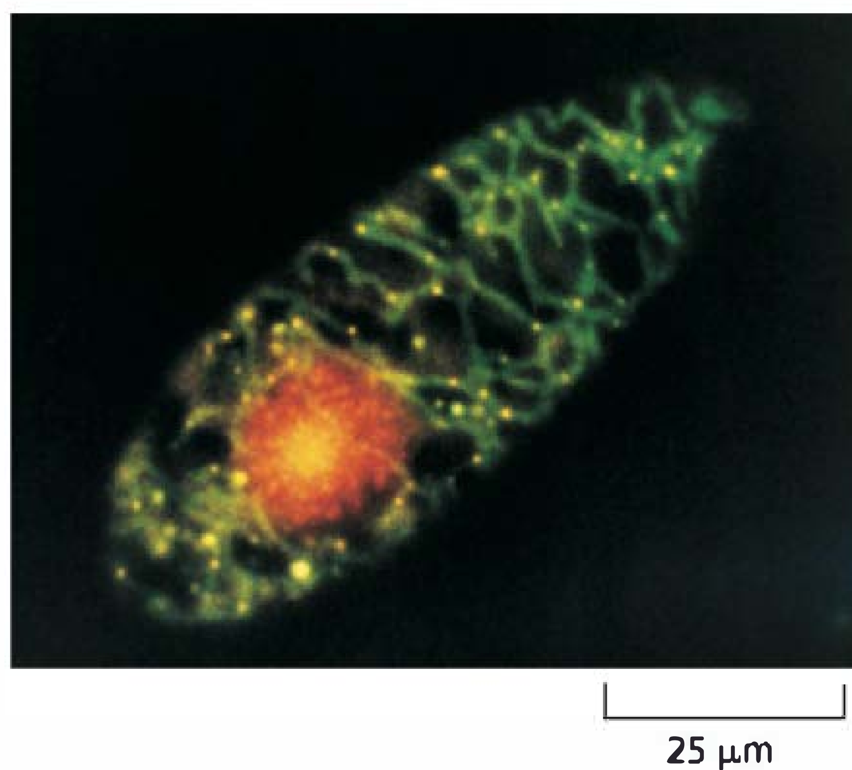


Figura 14-52 DNAs mitocondrial e nuclear marcados com um corante fluorescente. Esta micrografia mostra a distribuição do genoma nuclear (*vermelho*) e dos múltiplos e pequenos genomas mitocondriais (pontos *amarelos* brilhantes) em uma célula de *Euglena gracilis*. Os DNAs estão corados com brometo de etídeo, um corante fluorescente que emite luz vermelha. Além disso, o espaço mitocondrial da matriz está marcado com um corante fluorescente verde que revela as mitocôndrias como uma rede ramificada estendendo-se em todo o citosol. A sobreposição da matriz *verde* e dos DNAs *vermelhos* confere aos genomas mitocondriais a sua cor *amarela*. (Cortesia de Y. Hayashi e K. Ueda, *J. Cell Sci.* 93:565-570, 1989. Com permissão de The Company of Biologists.)

têm os seus próprios genomas e suas próprias maquinarias biossintetizantes para produzir RNA e proteínas. As mitocôndrias e os plastídeos nunca são produzidos do zero; ao contrário, eles surgem pelo crescimento e pela divisão de uma mitocôndria ou de um plastídeo já existente. Em média, cada organela deve duplicar em massa a cada geração celular e, então, ser distribuída para cada célula-filha. Mesmo as células que não sofrem divisão devem repor as organelas que são degradadas como parte de um processo contínuo de renovação de organelas, ou produzir organelas adicionais quando há necessidade. Os processos de crescimento e de proliferação de organelas são complicados, porque as proteínas de mitocôndrias e cloroplastos são codificadas em dois locais: no genoma nuclear e nos genomas separados contidos nas próprias organelas (**Figura 14-52**). No Capítulo 12, discutimos como as proteínas e os lipídeos selecionados são importados pelas mitocôndrias e pelos cloroplastos a partir do citosol. Aqui descreveremos como os genomas das organelas são mantidos e as contribuições que eles fazem à biogênese das organelas.

As mitocôndrias e os cloroplastos contêm sistemas genéticos completos

A biossíntese de mitocôndrias e de plastídeos necessita da contribuição de dois sistemas genéticos separados. A maior parte das proteínas das mitocôndrias e dos cloroplastos é codificada por genes especiais no DNA nuclear. Essas proteínas são importadas para as organelas após terem sido sintetizadas por ribossomos citosólicos. Outras proteínas destas organelas são codificadas pelo DNA da organela e sintetizadas por seus próprios ribossomos, utilizando RNAs mensageiros (mRNAs) produzidos pelas organelas para especificar as sequências de aminoácidos (**Figura 14-53**). O tráfego de proteínas entre o citosol e essas organelas parece ser unidirecional, uma vez que proteínas normalmente não são exportadas das mitocôndrias ou dos cloroplastos para o citosol. Uma exceção ocorre sob condições especiais, quando uma célula está para sofrer apoptose. Conforme será discutido no Capítulo 19, a mitocôndria libera as proteínas do espaço intermembranas (incluindo o citocromo *c*) através da sua membrana externa como parte de uma elaborada via de sinalização desencadeada em células que estão sofrendo morte celular programada.

Os processos de transcrição do DNA das organelas, de síntese proteica e de replicação do DNA (**Figura 14-54**) ocorrem no local em que o genoma está localizado: na matriz de mitocôndrias e no estroma de cloroplastos. Embora as proteínas que medeiam esses processos

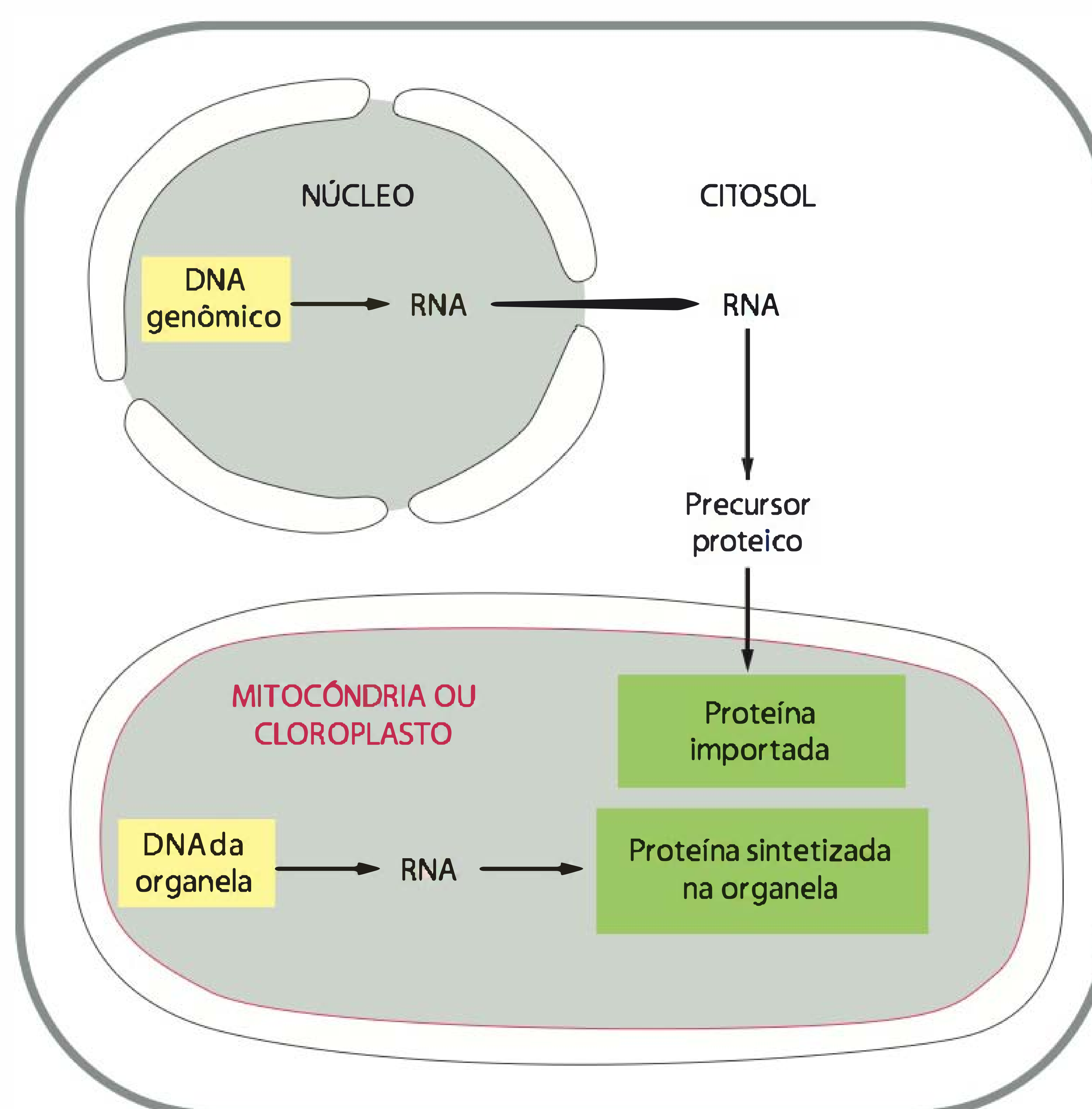


Figura 14-53 Produção de proteínas de mitocôndrias e cloroplastos por dois sistemas genéticos separados. A maior parte das proteínas destas organelas é codificada pelo núcleo e deve ser importada do citosol.

genéticos sejam únicas das organelas, a maioria delas é codificada no genoma nuclear. Isto é ainda mais surpreendente porque a maquinaria de síntese proteica das organelas assemelha-se mais com a de bactérias do que com a de eucariotos. A semelhança é particularmente maior em cloroplastos. Por exemplo, os ribossomos dos cloroplastos são muito semelhantes aos ribossomos de *E. coli*, tanto quanto às suas estruturas como quanto à sensibilidade a vários antibióticos (como cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina e tetraciclina). Além disso, a síntese de proteínas nos cloroplastos inicia com *N*-formil metionina, assim como nas bactérias, e não com metionina, como ocorre no citosol das células eucarióticas. Embora os sistemas genéticos mitocondriais sejam menos semelhantes aos sistemas equivalentes das bactérias atuais do que os sistemas genéticos de cloroplastos, os seus ribossomos também são sensíveis a antibióticos antibacterianos, e a síntese de proteínas nas mitocôndrias também inicia com *N*-formil metionina.



Figura 14-54 Micrografia eletrônica de uma molécula de DNA mitocondrial animal, obtida durante o processo de replicação. O DNA genômico circular foi replicado somente entre os dois pontos marcados pelas setas *vermelhas*. O DNA recém-sintetizado está colorido de *amarelo*. (Cortesia de David A. Clayton.)

O crescimento e a divisão das organelas determinam o número de mitocôndrias e de plastídeos em uma célula

Nas células dos mamíferos, o DNA mitocondrial contribui com menos de 1% do DNA celular total. Em outras células, no entanto, como as folhas das plantas superiores ou os óvulos extremamente grandes dos anfíbios, uma fração muito maior do DNA celular pode estar presente nas mitocôndrias ou nos cloroplastos (**Tabela 14-2**), e grande parte da síntese de RNA e de proteínas ocorre nestas organelas.

As mitocôndrias e os cloroplastos são suficientemente grandes para serem observados por microscopia óptica em células vivas. Por exemplo, as mitocôndrias podem ser visualizadas pela expressão de uma proteína mitocondrial geneticamente modificada, fusionada à proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) em células, ou as células podem ser incubadas com um marcador fluorescente que seja especificamente absorvido pelas mitocôndrias devido ao gradiente eletroquímico através de suas membranas. Essas imagens demonstram que as mitocôndrias em células vivas são dinâmicas – com frequência dividindo-se, fusionando-se e modificando os seus formatos (**Figura 14-55**), conforme mencionado previamente. A divisão (fissão) e a fusão dessas organelas são processos topologicamente complexos, porque as organelas estão circundadas por uma membrana dupla, e a integridade dos compartimentos mitocondriais separados deve ser mantida durante esses processos (**Figura 14-56**).

O número e o formato das mitocôndrias variam muito em diferentes tipos celulares e podem modificar-se no mesmo tipo celular sob diferentes condições fisiológicas, variando de múltiplas organelas esféricas ou cilíndricas para uma única organela com uma estrutura ramificada (ou retículo). O arranjo é controlado pelas taxas relativas de divisão e de fusão mitocondriais, as quais são reguladas por GTPases exclusivas que se localizam nas membranas mitocondriais. Além disso, a massa total de organelas por célula pode ser regulada de acordo com a necessidade. Por exemplo, um grande aumento no número de mitocôndrias

Tabela 14-2 Quantidades relativas de DNA de organelas em alguns tipos de células e tecidos

Organismo	Tecido ou tipo celular	Moléculas de DNA por organela	Organelas por célula	Porcentagem de DNA das organelas em relação ao DNA celular total
DNA MITOCONDRIAL				
Camundongo	fígado	5–10	1.000	1
Levedura*	vegetativo	2–50	1–50	15
Rãs	ovos	5–10	10^7	99
DNA DE CLOROPLASTOS				
Chlamydomonas	vegetativo	B0	1	7
Milho	folhas	0–300**	20–40	0–15**

*A grande variação no número e no tamanho das mitocôndrias por célula, em leveduras, deve-se à fusão e à fissão das mitocôndrias.

**No milho, a quantidade de DNA de cloroplastos diminui acentuadamente nas folhas maduras, após o término das divisões celulares: o DNA dos cloroplastos é degradado, e moléculas estáveis de mRNA se mantêm para prover a síntese de proteínas.

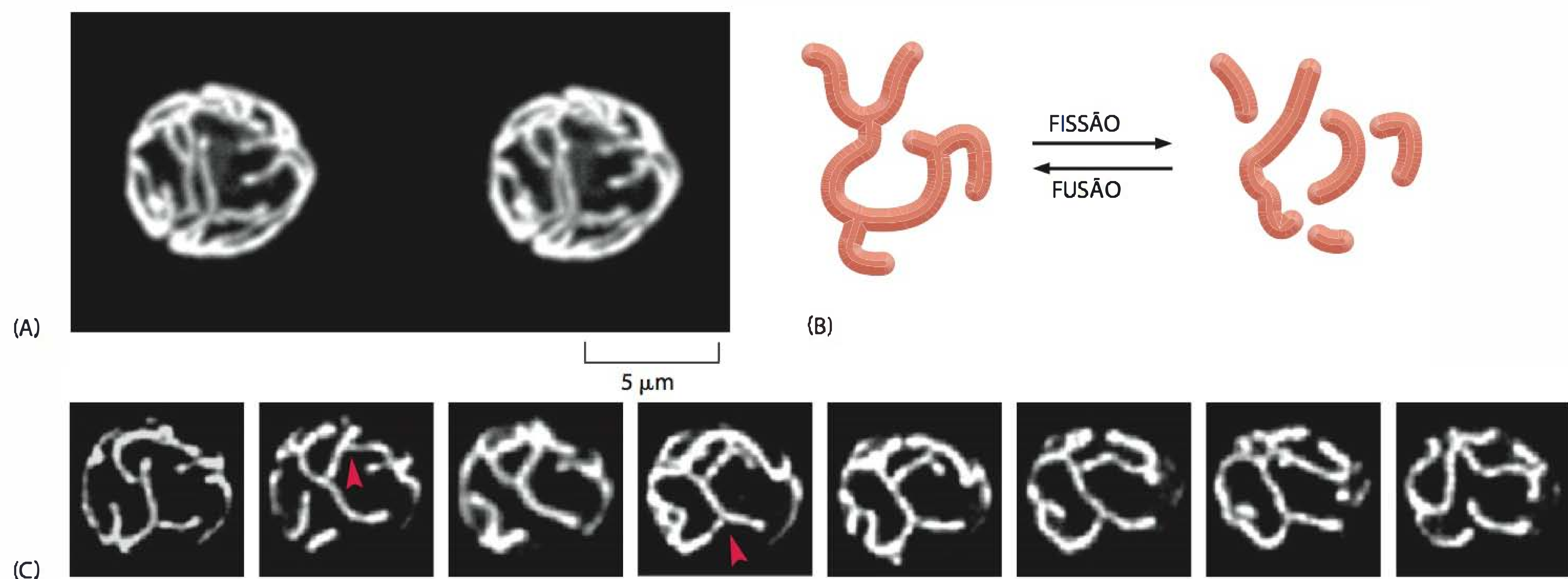


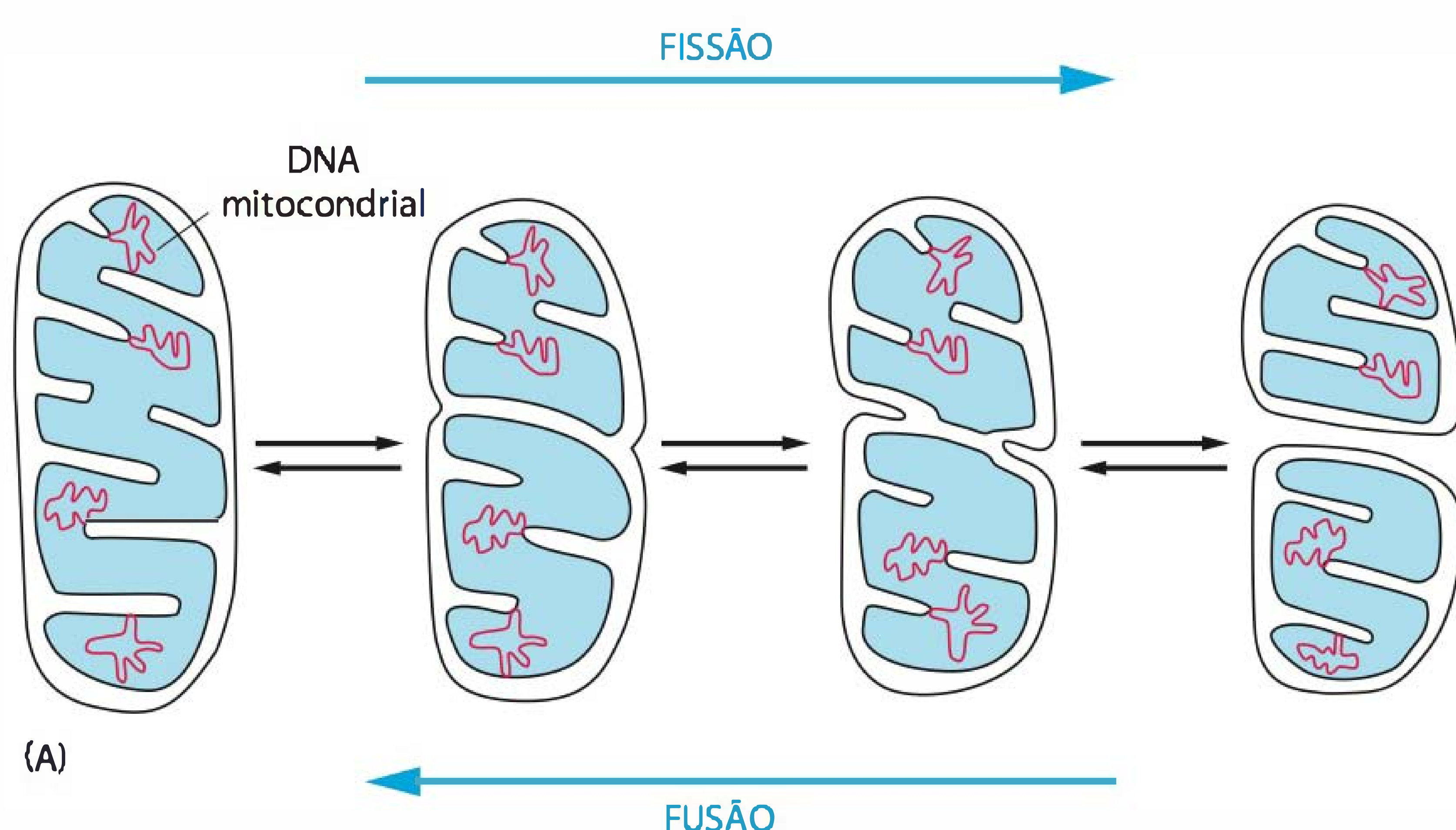
Figura 14-55 O dinâmico retículo mitocondrial. (A) Em células de leveduras, as mitocôndrias formam um retículo contínuo sob a membrana plasmática (par de fotos em estéreo). (B) Um equilíbrio entre fissão e fusão determina o arranjo das mitocôndrias em diferentes células. (C) Microscopia de fluorescência em intervalos mostra o comportamento dinâmico da rede mitocondrial em uma célula de levedura. Além das variações de formatos, a rede é constantemente remodelada por fissão e fusão (*setas vermelhas*). As fotografias foram tiradas em intervalos de três minutos. (A e C, de J. Nunnari et al., *Mol. Biol. Cell* 8:1233-1242, 1997. Com permissão de American Society for Cell Biology.)

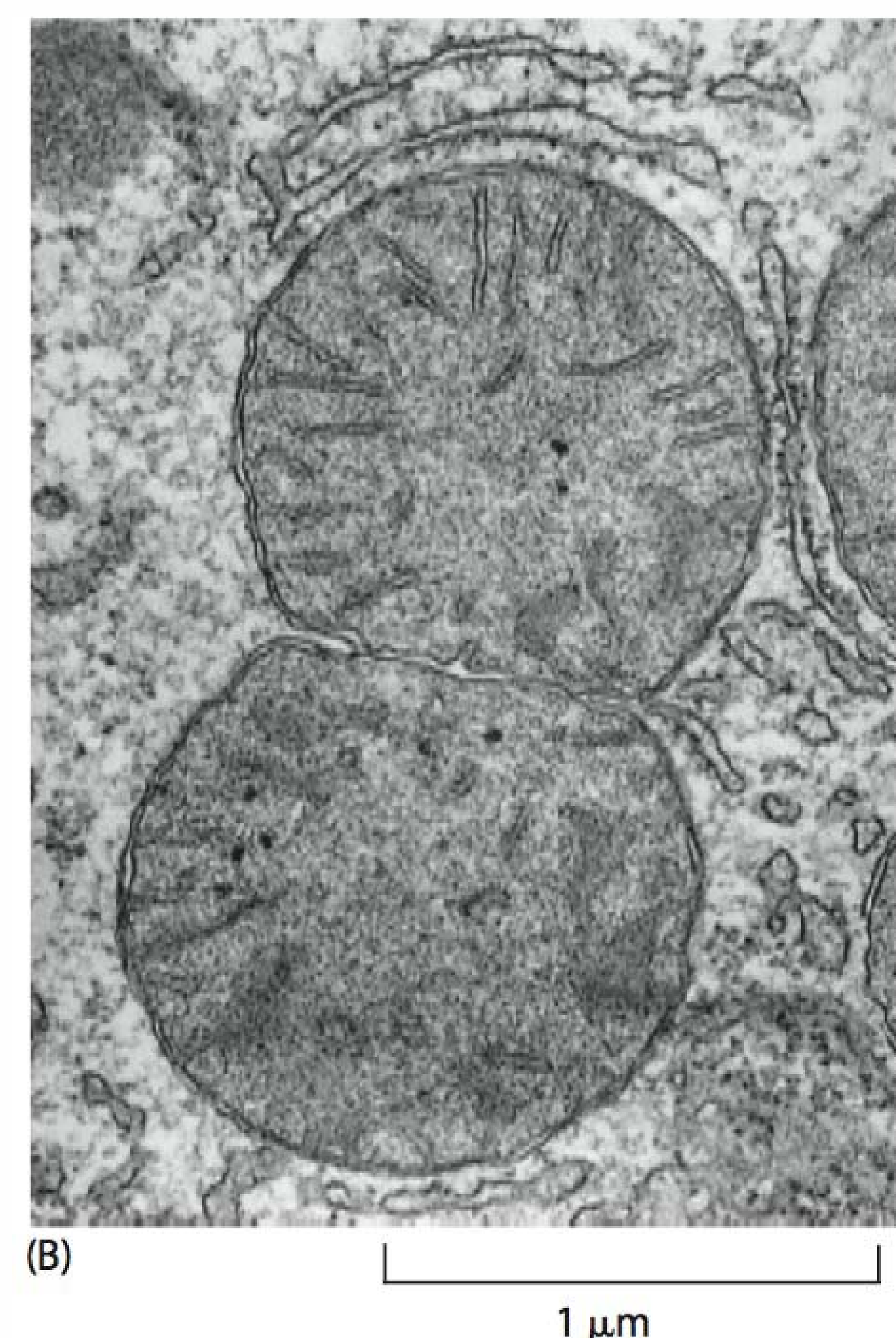
(de 5 a 10 vezes) ocorre quando um músculo esquelético em repouso é estimulado a se contrair repetidamente por um período prolongado.

Pode haver muitas cópias dos genomas mitocondrial e de plastídeos no espaço delimitado por cada membrana interna das organelas. O grau de fragmentação da organela determina quantos destes genomas vão estar presentes em uma única organela; em geral, um único compartimento contém diversos genomas (ver Tabela 14-2). Para a maioria das células, a replicação do DNA das organelas não é limitada à fase S do ciclo celular, quando o DNA nuclear replica-se, mas ocorre ao longo de todo o ciclo celular – fora de fase com a divisão celular. As moléculas individuais de DNA das organelas parecem ser selecionadas aleatoriamente para a replicação, de tal forma que, em um dado ciclo celular, algumas podem se replicar mais de uma vez e outras simplesmente não se replicam. No entanto, sob condições constantes, o processo é regulado de forma a assegurar que o número total de moléculas de DNA das organelas duplique a cada ciclo celular e, assim, mantenha-se uma quantidade constante de DNA para cada tipo celular.

Em circunstâncias especiais, a divisão de organelas pode ser precisamente controlada pela célula. Em algumas algas que contêm somente um ou poucos cloroplastos, por exemplo, cada organela se divide pouco antes da célula, em um plano que é idêntico ao futuro plano de divisão celular.

Figura 14-56 Fissão e fusão mitocondrial. Estes processos envolvem tanto a membrana mitocondrial externa como a interna. (A) Durante a fusão e a fissão, a mitocôndria mantém tanto a sua matriz quanto o seu espaço intermembranas. Acredita-se que as diferentes máquinas de fusão de membranas operem nas membranas externa e interna. O processo de fissão assemelha-se àquele da divisão celular bacteriana (discutido no Capítulo 16). A via apresentada foi postulada a partir de visões estáticas como a mostrada em (B). (B) Uma micrografia eletrônica de uma mitocôndria em divisão em uma célula hepática. (B, cortesia de Daniel S. Friend.)





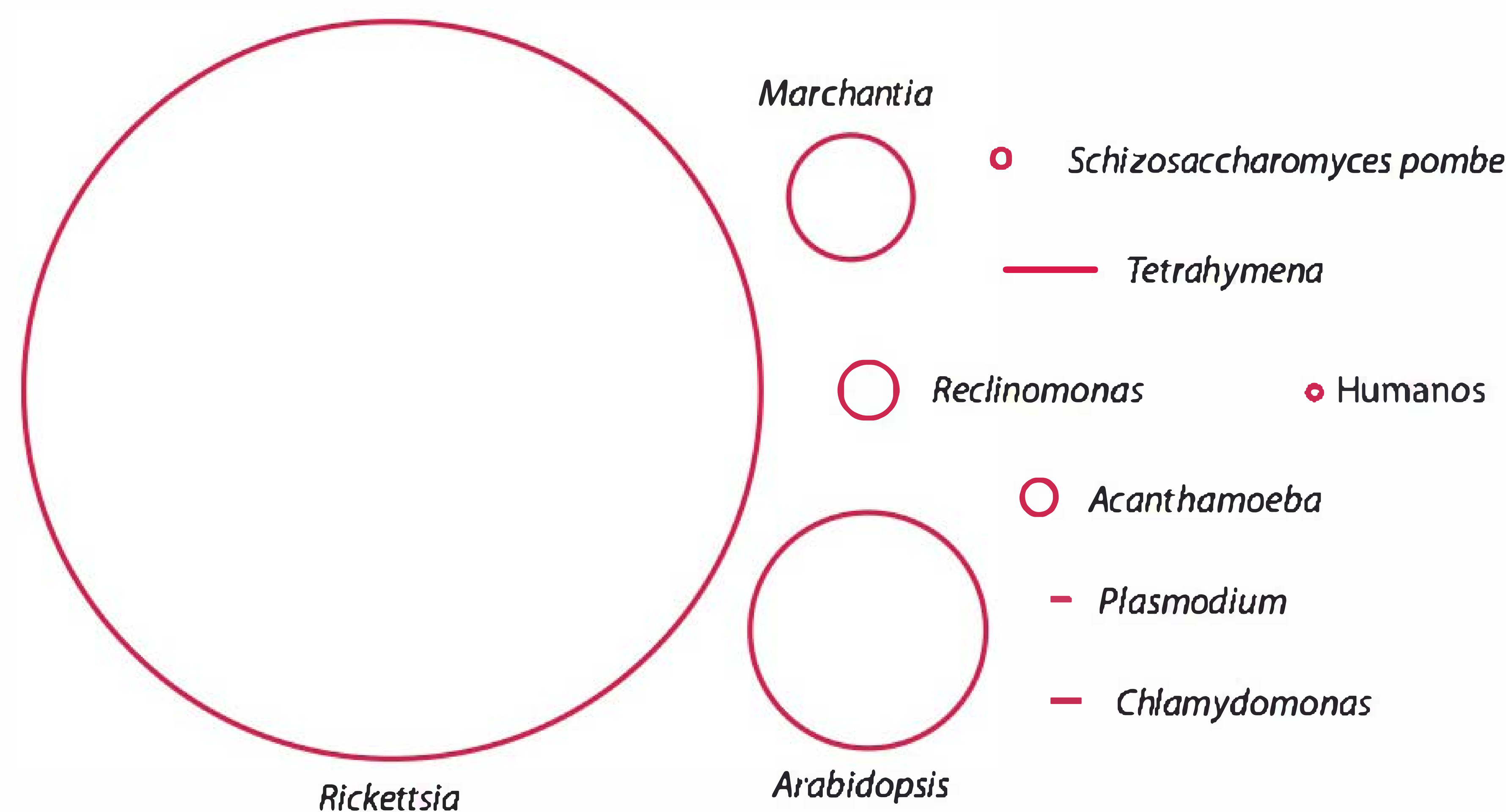


Figura 14-57 Tamanhos variados dos genomas mitocondriais. Foram determinadas as sequências completas de DNA para mais de 200 genomas mitocondriais. Os comprimentos de alguns destes DNAs mitocondriais estão mostrados em escala como círculos para os genomas circulares e como linhas para os genomas lineares. O maior dos círculos representa o genoma de *Rickettsia prowazekii*, uma pequena bactéria patogênica cujo genoma mais se assemelha ao das mitocôndrias. O tamanho dos genomas mitocondriais não se correlaciona bem ao número de proteínas codificadas por eles: enquanto o DNA mitocondrial humano codifica 13 proteínas, o DNA mitocondrial de *Arabidopsis*, 22 vezes maior, codifica somente 32 proteínas – isto é, cerca de 2,5 vezes mais do que o DNA mitocondrial humano. O DNA adicional que é encontrado nas mitocôndrias de *Arabidopsis*, de *Marchantia* e de outros vegetais pode ser "DNA-lixo" (*junk DNA*). O DNA mitocondrial do protozoário *Reclinomonas americana* possui 98 genes, mais do que a mitocôndria de qualquer outro organismo analisado até hoje. (Adaptada de M. W. Gray et al., *Science* 283:1476-1481, 1999. Com permissão da AAAS.)

Os genomas das mitocôndrias e dos cloroplastos possuem diferenças

As múltiplas cópias de DNA mitocondrial e de cloroplastos contidas na matriz ou no estroma dessas organelas normalmente estão distribuídas em vários agrupamentos, chamados de *nucleoides*. Acredita-se que os nucleoides estejam ligados à membrana mitocondrial interna. A estrutura do DNA em nucleoides se assemelha mais àquela observada em bactérias do que à cromatina de eucariotos. Nas bactérias, por exemplo, não há histonas.

A amplitude de tamanhos dos DNAs destas organelas é semelhante à do DNA viral. As moléculas de DNA mitocondrial variam em tamanhos que vão de menos de 6.000 pares de nucleotídeos no *Plasmodium falciparum* (o parasita da malária humana) a mais de 300 mil pares de nucleotídeos em algumas plantas terrestres (**Figura 14-57**). O genoma dos cloroplastos das plantas terrestres varia em tamanhos que vão de 70.000 a 200.000 pares de nucleotídeos. Acreditava-se que os cromossomos dos cloroplastos fossem moléculas circulares de DNA que continham uma única cópia do genoma, mas atualmente sabe-se que tais moléculas estão presentes em grande número na maioria dos cloroplastos na forma de moléculas lineares de DNA compostas por múltiplas cópias do genoma, ligadas pelas suas extremidades. A mistura de estruturas observada nos cromossomos dos cloroplastos é melhor explicada como sendo originada por processos de replicação intimamente relacionados a eventos de recombinação, de forma análoga ao processo de replicação observado em vírus como o da herpes. Tipos similares de mistura podem existir em diversos genomas mitocondriais. No entanto, o genoma mitocondrial é um simples DNA circular de cerca de 16.500 pares de base (menos de 0,001% do tamanho do genoma nuclear) e tem aproximadamente o mesmo tamanho em animais tão distintos quanto a *Drosophila* e o ouriço-do-mar.

As mitocôndrias e os cloroplastos provavelmente evoluíram de bactérias endossimbióticas

O caráter procariótico dos sistemas genéticos das organelas, especialmente marcante em cloroplastos, sugere que as mitocôndrias e os cloroplastos evoluíram de bactérias endocitadas há mais de um bilhão de anos. De acordo com uma versão desta *hipótese endossimbiótica*, as células eucarióticas iniciaram sua existência como organismos anaeróbios, sem mitocôndrias ou cloroplastos, e então estabeleceram uma relação endossimbiótica com uma bactéria cujo sistema de fosforilação oxidativa foi subvertido pelas células para seu próprio uso (**Figura 14-58**). De acordo com essa hipótese, o evento de endocitose que levou ao desenvolvimento das mitocôndrias ocorreu quando o oxigênio entrou na atmosfera em quantidades substanciais, mais de $1,5 \times 10^9$ anos atrás, antes que os animais e as plantas tivessem se separado (ver Figura 14-71). Os cloroplastos parecem ter se derivado mais tarde, a partir da endocitose de um organismo fotossintetizante, produtor de oxigênio, que se assemelha às cianobactérias.

A maioria dos genes codificadores das atuais proteínas de mitocôndrias e de cloroplastos está no núcleo celular. Portanto, uma extensa transferência de genes deve ter ocorrido do DNA das organelas para o DNA nuclear durante a evolução eucariótica. Espera-se que uma

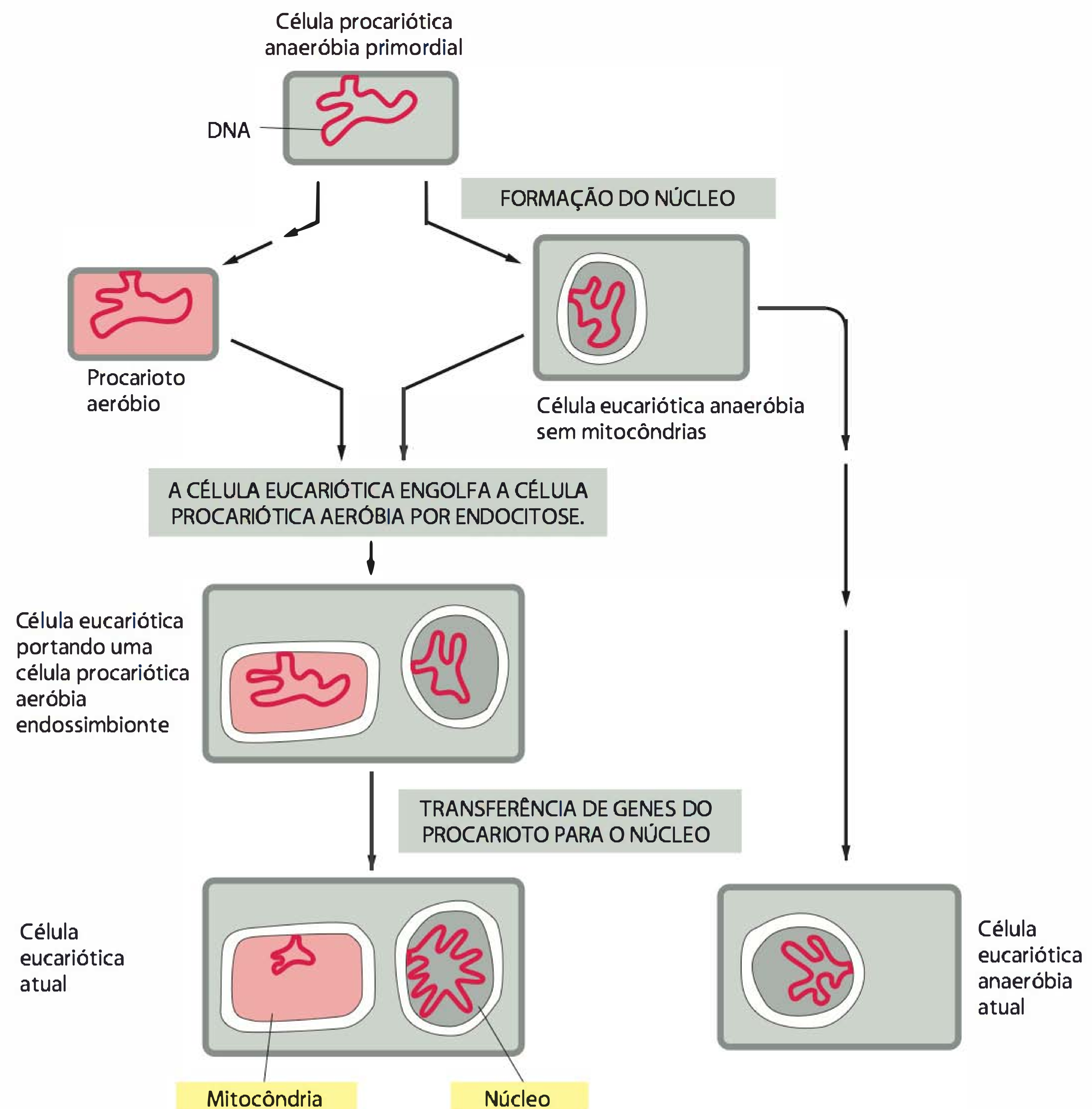


Figura 14-58 Uma possível via evolutiva para a origem das mitocôndrias. Existem eucariotos unicelulares anaeróbios presentes na Terra atualmente e que não apresentam genoma mitocondrial, entre eles o protozoário *Giardia*. No entanto, todos estes organismos parecem conter algum tipo de remanescente de organela delimitada por membrana. Nestes remanescentes, ocorrem reações similares às realizadas nas mitocôndrias, como a produção de centros de ferro-enxofre. Até o presente, não conhecemos nenhum exemplo vivo de uma célula anaeróbia, conforme mostrado na figura, que tenha sido o primeiro organismo a engolfar o precursor da mitocôndria. Por essa e outras razões, hipóteses alternativas foram propostas em que a combinação de uma bactéria e de um organismo do reino Archaea tenha levado ao surgimento das primeiras células eucarióticas e da primeira mitocôndria.

transferência desse tipo bem-sucedida seja um evento raro, pois um gene oriundo do DNA da organela deve ser modificado para se tornar um gene nuclear funcional: ele deve adaptar-se aos requerimentos nucleares e citoplasmáticos de transcrição e de tradução e, também, adquirir uma sequência-sinal, de forma que a proteína codificada possa ser direcionada à organela, após a sua síntese no citosol. Apesar disso, existem evidências de que tais transferências de genes para o núcleo continuem a ocorrer em alguns organismos atualmente.

A transferência gênica explica por que alguns dos genes nucleares codificadores de proteínas mitocondriais e de cloroplastos assemelham-se aos genes bacterianos. A sequência de aminoácidos da enzima mitocondrial *superóxido-dismutase* das galinhas, por exemplo, assemelha-se muito mais à enzima bacteriana correspondente do que às outras enzimas superóxido-dismutases encontradas no citosol da mesma célula eucariótica.

A transferência gênica parece ter sido um processo gradual. Quando os genomas mitocondriais codificadores de diferentes números de proteínas são comparados, emerge um padrão de redução sequencial de funções mitocondriais codificadas (**Figura 14-59**). Os genomas mitocondriais menores e, provavelmente, mais evoluídos, por exemplo, codificam somente algumas poucas proteínas da membrana interna, envolvidas nas reações de transporte de elétrons, além de RNAs ribossômicos (rRNAs) e de tRNAs. Os genomas mitocondriais que permaneceram mais complexos contêm esse mesmo subconjunto de genes, além de outros. Os genomas mais complexos são caracterizados pela presença de muitos genes adicionais, em comparação aos genomas mitocondriais de animais e leveduras. Muitos desses genes codificam componentes do sistema genético mitocondrial, como subunidades da RNA-polimerase e proteínas ribossômicas; esses genes, ao contrário, são encontrados no núcleo celular em organismos que reduziram o conteúdo do seu DNA mitocondrial.

Que tipo de bactéria originou as mitocôndrias? A partir de comparações de sequências, parece provável que as mitocôndrias sejam descendentes de um tipo particular de bactéria púrpura fotossintetizante que perdeu a habilidade de conduzir a fotossíntese, ficando com somente uma cadeia respiratória.

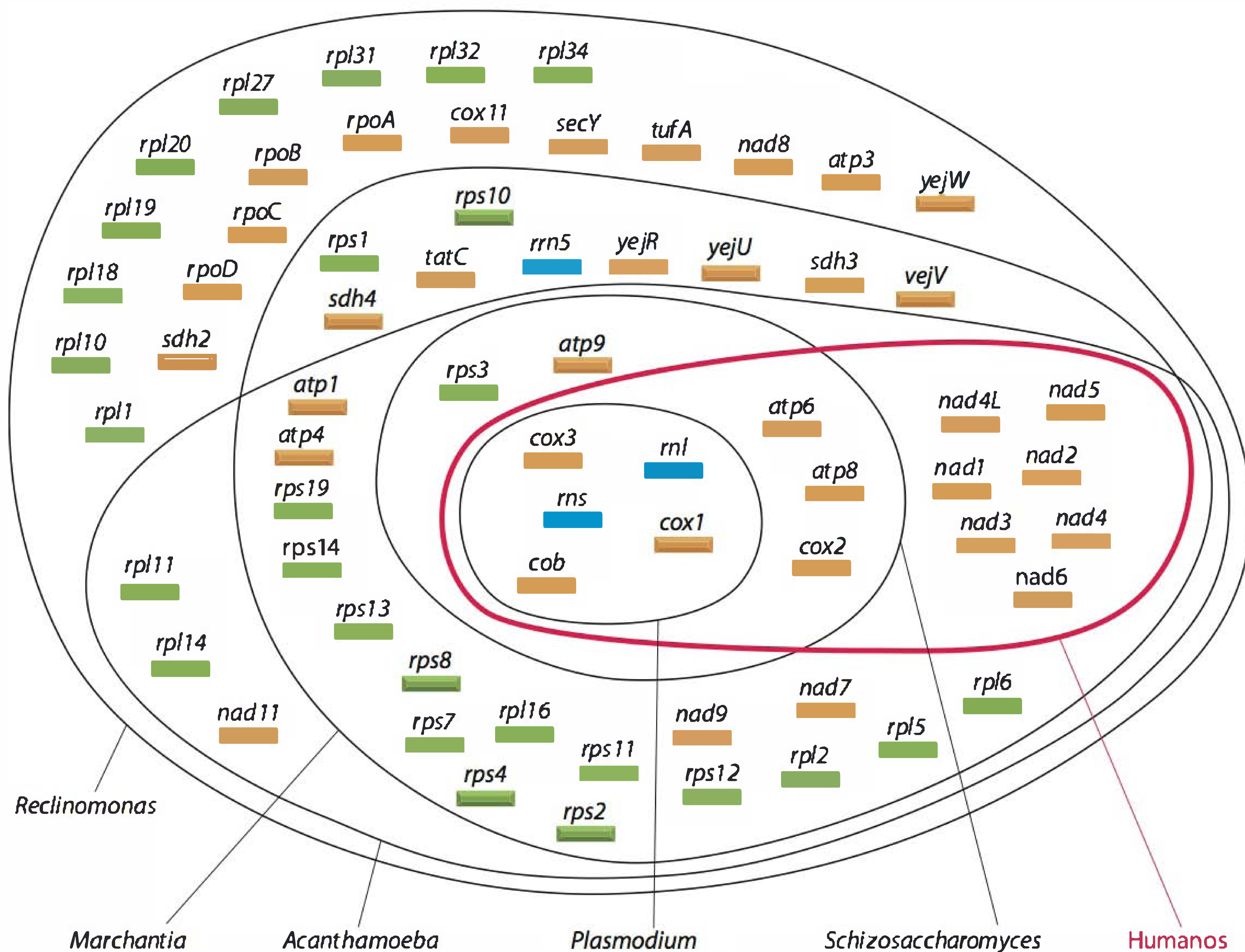


Figura 14-59 Comparação entre genomas mitocondriais. Os genomas mitocondriais menos complexos codificam os subconjuntos de proteínas e de rRNAs que são codificados por genomas mitocondriais maiores. Existem apenas quatro genes presentes em todos os genomas mitocondriais conhecidos; estes genes codificam rRNAs (*rns* e *rnl*), citocromo *b* (*cob*) e uma subunidade da citocromo-oxidase (*cox1*). (Adaptada de M. W. Gray et al., *Science* 283:1476-1481, 1999. Com permissão de AAAS.)

As mitocôndrias utilizam o código degenerado e podem ter uma variante do código genético

O tamanho relativamente pequeno do genoma mitocondrial humano tornou-o um alvo particularmente atrativo para os primeiros projetos de sequenciamento de DNA, e em 1981 pesquisadores publicaram a sequência completa dos seus 16.569 nucleotídeos. Ao se comparar essa sequência com sequências conhecidas de tRNAs mitocondriais e com as sequências parciais de aminoácidos disponíveis de proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial, foi possível localizar todos os genes mitocondriais humanos na molécula de DNA circular (**Figura 14-60**).

Comparado ao genoma nuclear, de cloroplastos e bacteriano, o genoma mitocondrial humano apresenta várias características surpreendentes:

1. *Empacotamento gênico denso*. De modo diferente dos outros genomas, aproximadamente todos os nucleotídeos parecem fazer parte de sequências codificadoras, seja para proteínas ou para um dos rRNAs ou tRNAs. Como as sequências se dispõem diretamente umas após as outras, há pouco espaço disponível para sequências de DNA regulador.
2. *Uso flexível dos códons*. Enquanto 30 ou mais tRNAs especificam aminoácidos no citosol e nos cloroplastos, somente 22 tRNAs são requeridos para a síntese mitocondrial das proteínas. As regras normais do pareamento códon-anticódon são mais

Figura 14-60 Organização do genoma mitocondrial humano. O genoma contém dois genes para rRNA, 22 genes para tRNA e 13 sequências codificadoras de proteínas. O DNA de vários outros genomas mitocondriais de animais também foi completamente sequenciado. A maior parte do DNA mitocondrial de animais codifica precisamente os mesmos genes que em humanos, sendo idêntica a ordem dos genes para animais que vão desde mamíferos até os peixes.

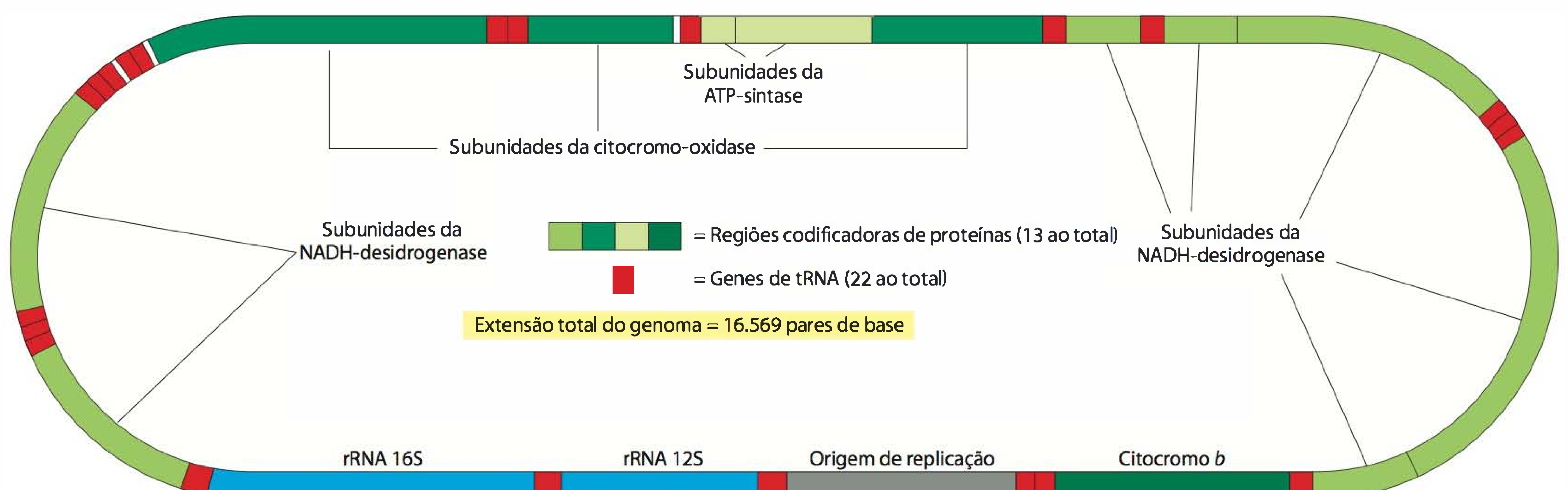


Tabela 14-3 Algumas diferenças entre o código "universal" e o código genético mitocondrial*

Códon	Código "universal"	Código mitocondrial			
		Mamíferos	Invertebrados	Leveduras	Plantas
UGA	DE PARADA	*Trp*	*Trp*	*Trp*	DE PARADA
AUA	Ile	*Met*	*Met*	*Met*	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	*Thr*	Leu
AGA, AGG	Arg	*DE PARADA*	*Ser*	Arg	Arg

**Vermelho* itálico indica que o código difere do código "universal".

flexíveis nas mitocôndrias, de tal forma que muitas moléculas de tRNA reconhecem qualquer um dos quatro nucleotídeos da terceira posição. Tal pareamento "2 de 3" faz com que um tRNA pareie com qualquer um de quatro códons e permite a síntese de proteínas com um número menor de moléculas de tRNA.

3. *Código genético variante*. Talvez de maneira mais surpreendente, a comparação entre as sequências dos genes mitocondriais e as sequências de aminoácidos das proteínas correspondentes indique que o código genético é diferente: 4 dos 64 códons têm "significados" diferentes daqueles mesmos códons em outros genomas (**Tabela 14-3**).

A grande similaridade do código genético em todos os organismos é uma forte evidência de que todas as células evoluíram a partir de um ancestral comum. Como, então, explicar as pequenas diferenças encontradas no código genético das mitocôndrias? Uma pista é encontrada na descoberta de que o código genético mitocondrial é diferente em diferentes organismos. Na mitocôndria com o maior número de genes da Figura 14-59, correspondente ao protozoário *Reclinomonas*, o código genético não apresenta modificações em relação ao código genético padrão do núcleo celular. No entanto, UGA, um códon de terminação para a maioria dos genomas, é lido como triptofano nas mitocôndrias de mamíferos, fungos e invertebrados. De forma semelhante, o códon AGG, que normalmente codifica arginina, é um *códon de terminação* nas mitocôndrias de mamíferos e codifica uma serina nas mitocôndrias de *Drosophila* (ver Tabela 14-3). Tal variação sugere que podem ocorrer modificações aleatórias no código genético das mitocôndrias. Possivelmente, o número surpreendentemente pequeno de proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial permite que uma mudança ocasional no significado de um códon raro seja tolerável, enquanto tal mudança em um genoma grande alteraria a função de muitas proteínas e, assim, destruiria a célula.

As mitocôndrias animais possuem o mais simples sistema genético conhecido

As comparações entre as sequências de DNA de diferentes organismos revelam que, em animais vertebrados (incluindo os humanos), a taxa de substituições de nucleotídeos durante a evolução foi 10 vezes maior no genoma mitocondrial do que no genoma nuclear. Essa diferença provavelmente se deve à fidelidade reduzida dos processos de replicação e ao reparo ineficiente do DNA mitocondrial, ou a ambos. Como somente cerca de 16.500 nucleotídeos de DNA precisam ser replicados e expressos como RNAs e proteínas nas mitocôndrias de células animais, a proporção de erro por nucleotídeo copiado na replicação do DNA, mantido pelo reparo do DNA, transcrito pela RNA-polimerase ou traduzido em proteínas pelos ribossomos mitocondriais pode ser relativamente alta, sem que haja danificação de qualquer um dos poucos produtos gênicos. Isso poderia explicar por que os mecanismos que conduzem esses processos são relativamente simples, quando comparados àqueles usados para os mesmos propósitos em outros locais das células. Com a presença de apenas 22 tRNAs e o tamanho reduzido incomum dos rRNAs (menos de dois terços do tamanho de rRNAs de *E. coli*), por exemplo, seria esperada uma redução na fidelidade da síntese proteica nas mitocôndrias, embora isso ainda não tenha sido testado adequadamente.

A taxa relativamente alta da evolução dos genes mitocondriais torna as comparações das sequências de DNA mitocondrial especialmente úteis para estimar as datas de eventos evolutivos recentes, como as etapas da evolução dos primatas.

Alguns genes de organelas contêm íntrons

O processamento de RNAs precursores desempenha um papel importante nos dois sistemas mitocondriais estudados em maior detalhe – o humano e o de levedura. Nas células humanas, ambas as fitas do DNA mitocondrial são transcritas na mesma proporção, a partir de uma única região promotora em cada fita, produzindo duas moléculas gigantes de RNAs diferentes, cada uma contendo uma cópia completa de uma das fitas do DNA. A transcrição é, portanto, completamente simétrica. Os transcritos produzidos a partir de uma das fitas são extensivamente processados por clivagem catalisada pela enzima nuclease para fornecer os dois rRNAs, a maior parte dos tRNAs e cerca de 10 RNAs contendo caudas de poli-A. Em contraste, o transcrito da outra fita é processado para produzir somente 8 tRNAs e um pequeno RNA com cauda de poli-A; os 90% restantes desse transcrito, aparentemente, não contêm qualquer informação útil (sendo complementares às sequências codificadoras sintetizadas na outra fita) e são degradados. Os RNAs com caudas de poli-A são mRNAs mitocondriais: embora não possuam uma estrutura de quepe em suas terminações 5′, eles contêm a cauda de poli-A na extremidade 3′, adicionada após a transcrição por uma poli-A polimerase mitocondrial.

Diferentemente dos genes mitocondriais humanos, alguns genes mitocondriais de vegetais e de fungos (incluindo leveduras) contêm *íntrons*, os quais devem ser removidos por meio do *splicing* de RNA. Os íntrons também foram encontrados em genes de cloroplastos vegetais. Muitos dos íntrons dos genes de organelas são constituídos por sequências relacionadas de nucleotídeos, capazes de realizar o seu próprio *splicing* nos transcritos de RNA, por intermédio da catálise RNA-dependente (discutido no Capítulo 6), embora essas reações de auto-*splicing* geralmente sejam auxiliadas por proteínas. A presença de íntrons nos genes das organelas é surpreendente, uma vez que íntrons não são comuns nos genes das bactérias cujos ancestrais, acredita-se, deram origem às mitocôndrias e aos cloroplastos vegetais.

Nas leveduras, o mesmo gene mitocondrial pode ter um íntron em uma cepa, mas não em outra. Tais "íntrons opcionais" parecem ser capazes de se mover para dentro e para fora dos genomas, como se fossem elementos de transposição. Em contraste, os íntrons de outros genes mitocondriais de leveduras foram encontrados em uma posição correspondente nas mitocôndrias de *Aspergillus* e de *Neurospora*, implicando que tenham sido herdados de um ancestral comum aos três fungos. É possível que essas sequências de íntrons tenham uma origem ancestral – chegando a um ancestral bacteriano – e que, embora tenham sido perdidas em várias bactérias, foram preferencialmente retidas naqueles genomas de organelas onde o *splicing* de RNA é regulado para auxiliar no controle da expressão gênica.

Os genomas dos cloroplastos dos vegetais superiores contêm cerca de 120 genes

Mais de 20 genomas de cloroplastos foram sequenciados até o presente momento. Mesmo os genomas de plantas de relação distante (como o tabaco e as hepáticas) são altamente similares, e mesmo aqueles de algas verdes são intimamente relacionados (**Figura 14-61**). Os genes dos cloroplastos estão envolvidos em quatro tipos principais de processos: transcrição, tradução, fotossíntese e biossíntese de pequenas moléculas como aminoácidos, ácidos graxos e pigmentos. Os genes dos cloroplastos das plantas também codificam pelo menos 40 proteínas cujas funções ainda não são conhecidas. Paradoxalmente, todas as proteínas conhecidas e codificadas no cloroplasto fazem parte de grandes complexos proteicos que possuem uma ou mais subunidades codificadas no núcleo. Discutiremos as possíveis razões para este paradoxo mais tarde.

As semelhanças entre os genomas de cloroplastos e de bactérias são surpreendentes. As sequências reguladoras básicas, como os promotores de transcrição e os terminadores, são praticamente idênticos nos dois casos. As sequências de aminoácidos das proteínas codificadas nos cloroplastos são claramente reconhecidas como bacterianas, e vários agrupamentos de genes com funções relacionadas (como aqueles que codificam proteínas ribossômicas) estão organizados da mesma maneira nos genomas de cloroplastos, de *E. coli* e de cianobactérias.

Comparações adicionais de um grande número de sequências homólogas de nucleotídeos poderiam permitir o esclarecimento da via evolutiva exata entre bactérias e cloroplastos, porém várias conclusões já podem ser apresentadas:

1. Os cloroplastos de vegetais superiores originaram-se de bactérias fotossintetizantes.

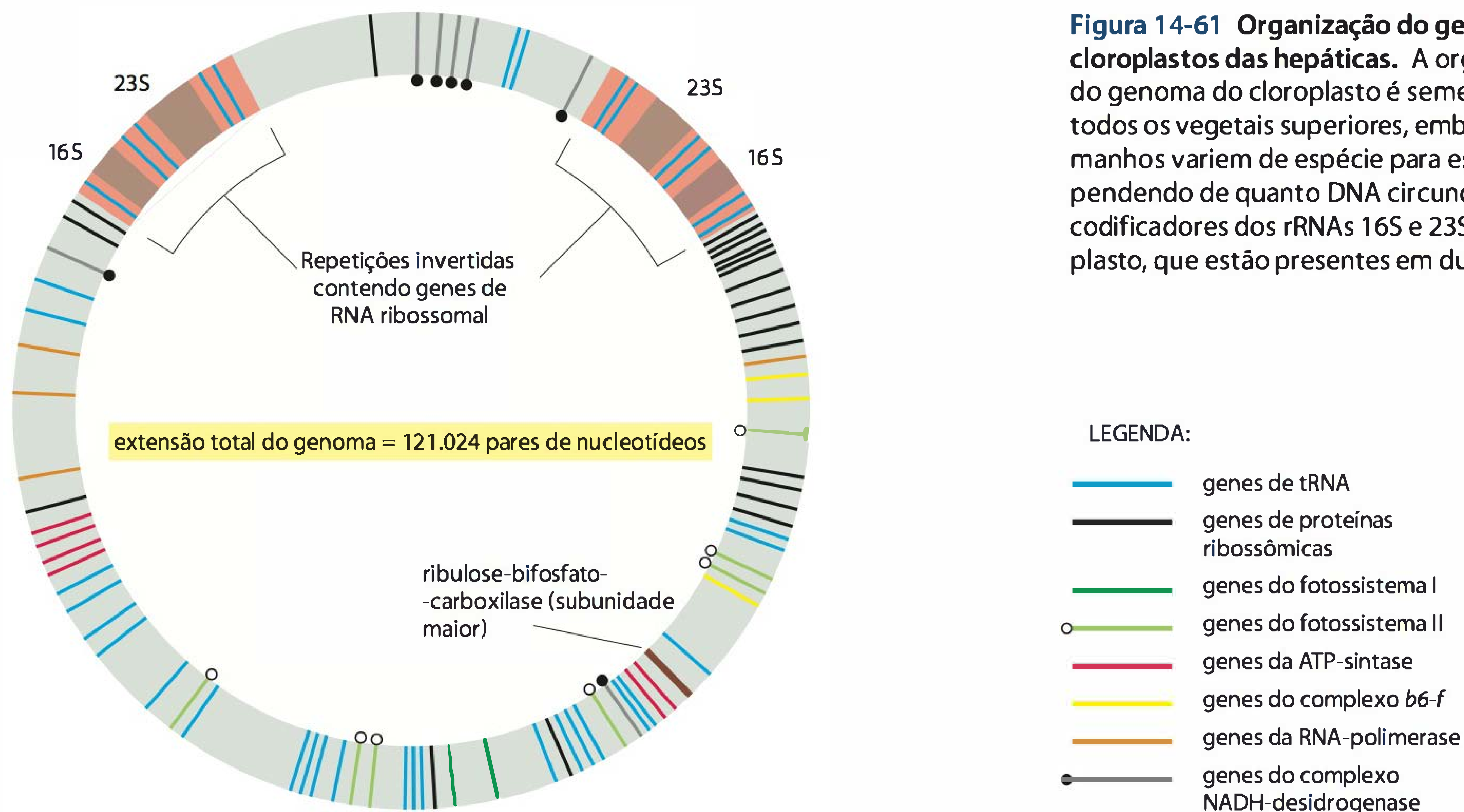


Figura 14-61 Organização do genoma dos cloroplastos das hepáticas. A organização do genoma do cloroplasto é semelhante em todos os vegetais superiores, embora os tamanhos variem de espécie para espécie – dependendo de quanto DNA circunda os genes codificadores dos rRNAs 16S e 23S do cloroplasto, que estão presentes em duas cópias.

2. Muitos dos genes da bactéria original estão hoje presentes no genoma nuclear, onde foram integrados e são mantidos de maneira estável. Em vegetais superiores, por exemplo, dois terços das aproximadamente 60 proteínas ribossômicas são codificados no núcleo da célula, embora os genes tenham uma clara ancestralidade bacteriana e os ribossomos dos cloroplastos retenham as suas propriedades bacterianas originais.

Os genes mitocondriais são herdados por um mecanismo não-mendeliano

Muitos experimentos sobre os mecanismos da biogênese mitocondrial foram realizados com *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padaria). Há várias razões para essa preferência. Em primeiro lugar, quando cresce em meio com glicose, essa levedura possui a habilidade de viver somente às custas da glicólise e pode, então, sobreviver com mitocôndrias defectivas, incapazes de realizar fosforilação oxidativa. Isso torna possível o crescimento de células contendo mutações no DNA mitocondrial ou nuclear, que interfiram drasticamente na função mitocondrial; tais mutações são letais para muitos outros eucariotos. Em segundo lugar, as leveduras são eucariotos unicelulares simples, fáceis de crescer e de caracterizar bioquimicamente. Por fim, essas células de leveduras, de modo geral, reproduzem-se assexuadamente por brotamento, mas também podem se reproduzir sexuadamente. Durante a reprodução sexuada, duas células haploides se fundem para formar um zigoto diploide, o qual pode crescer por mitose, ou se dividir por meiose, para produzir novas células haploides.

A habilidade de controlar a alternação entre reprodução assexuada e sexuada no laboratório facilita as análises genéticas. As mutações em genes mitocondriais não são herdadas de acordo com as regras mendelianas que governam a herança dos genes nucleares. Portanto, muito antes do genoma mitocondrial ser sequenciado, os estudos genéticos revelaram quais dos genes envolvidos nas funções mitocondriais das leveduras estão localizados no núcleo e quais estão nas mitocôndrias. Um exemplo de herança não-mendeliana (citoplasmática) de genes mitocondriais em uma célula haploide de levedura está ilustrado na **Figura 14-62**. Nesse exemplo, acompanhamos a herança de um gene mutante que torna a síntese de proteínas na mitocôndria resistente ao cloranfenicol.

Quando uma célula haploide resistente ao cloranfenicol cruza com uma célula haploide sensível a ele (tipo selvagem), o zigoto diploide resultante conterá uma mistura de mitocôndrias mutantes e do tipo selvagem. As duas redes mitocondriais fundem-se no zigoto,

criando um retículo contínuo que contém os genomas de ambas as células parentais. Quando o zigoto sofre mitose, cópias do DNA mitocondrial mutante e tipo selvagem são segregadas entre as células-filhas diploides. No caso do DNA nuclear, cada célula-filha recebe exatamente duas cópias de cada cromossomo, uma de cada célula parental. Em contraste, no caso do DNA mitocondrial, a célula-filha pode herdar mais cópias do DNA mutante, ou mais cópias do DNA tipo selvagem. Sucessivas divisões mitóticas podem aumentar ainda mais a presença de um dos tipos de DNA, de forma que, subsequentemente, surgirão muitas células contendo DNA mitocondrial de somente um genótipo. Esse processo estocástico é chamado de *segregação mitótica*.

Quando as células diploides que segregaram os seus genomas mitocondriais dessa maneira sofrem meiose para formar quatro células-filhas haploides, cada uma das quatro células-filhas recebe os mesmos genes mitocondriais. Esse tipo de herança é chamado de herança não-mendeliana ou *herança citoplasmática*, para contrastar com a herança mendeliana dos genes nucleares (ver Figura 14-62). Quando ocorre a herança não-mendeliana, ela demonstra que o gene em questão está localizado fora do cromossomo nuclear.

Embora os agrupamentos de moléculas de DNA mitocondrial (nucleoides) sejam relativamente imóveis no retículo mitocondrial devido à ancoragem na membrana interna, certos nucleoides juntam-se de modo ocasional. Isso ocorre com maior frequência em locais onde as duas redes mitocondriais parentais fusionam-se durante a formação do zigoto. Quando diferentes DNAs estão presentes no mesmo nucleoide, a recombinação genética pode ocorrer. Essa recombinação pode resultar em genomas mitocondriais que contêm DNAs de ambas as células parentais e que serão estavelmente herdados após as suas segregações mitóticas.

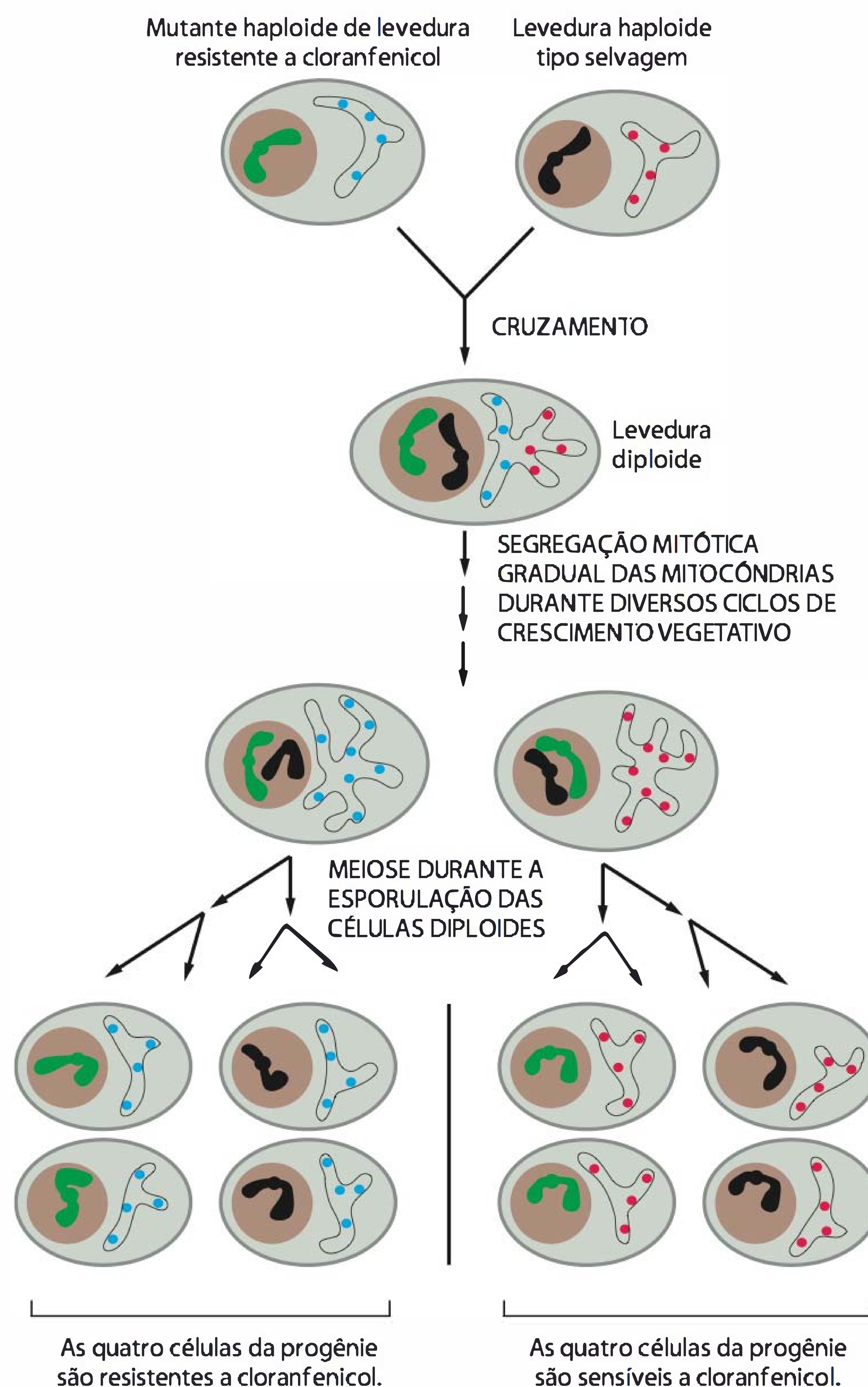


Figura 14-62 Diferenças nos padrões de herança entre os genes mitocondriais e nucleares de leveduras. Nos genes nucleares (herança mendeliana), duas das quatro células resultantes da meiose herdam o gene de uma das células haploides parentais originais (cromossomos *verdes*), e as duas células restantes herdam o gene da outra (cromossomos *pretos*). Em contraste, para os genes mitocondriais (herança não-mendeliana), é possível que as quatro células resultantes da meiose herdem os genes mitocondriais de apenas uma das duas células haploides originais. Neste exemplo, o gene mitocondrial é aquele que, na sua forma mutante (o DNA mitocondrial está indicado por *pontos azuis*), torna a síntese de proteínas na mitocôndria resistente ao cloranfenicol – um inibidor da síntese proteica que atua especificamente sobre os ribossomos semelhantes aos procarióticos, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. As células de leveduras que contêm o gene mutante podem ser detectadas pela sua habilidade de crescer na presença de cloranfenicol em um substrato, como o glicerol, que não pode ser usado para a glicólise. Com a glicólise bloqueada, o ATP deve ser gerado por mitocôndrias funcionais e, portanto, as células que carregam o DNA mitocondrial normal (tipo selvagem, *pontos vermelhos*) não podem se multiplicar.

Os genes das organelas são herdados por herança materna em muitos organismos

As consequências da herança citoplasmática são mais profundas para alguns organismos, incluindo o organismo humano, do que para leveduras. Em leveduras, quando duas células haploides se cruzam, elas são equivalentes em tamanho e contribuem com quantidades equivalentes de DNA mitocondrial para o zigoto (ver Figura 14-62). A herança mitocondrial em leveduras é, portanto, *biparental*: ambas as células progenitoras contribuem igualmente para o total de genes mitocondriais da progênie (embora, como vimos há pouco, a progênie *individual* contenha mitocôndrias de somente uma das células após várias gerações de crescimento vegetativo). Em animais superiores, ao contrário, o óvulo sempre contribui com muito mais citoplasma para o zigoto do que o espermatozoide. Seria esperado, portanto, que a herança mitocondrial em animais superiores fosse quase *uniparental* – ou, mais precisamente, materna. Tal *herança materna* foi demonstrada em animais de laboratório. Quando animais contendo DNA mitocondrial do tipo A foram cruzados com animais contendo o tipo B, a progênie continha somente o tipo materno de DNA mitocondrial. De forma semelhante, seguindo a distribuição das sequências variáveis de DNA mitocondrial em grandes famílias, demonstrou-se que o DNA mitocondrial humano apresenta herança materna.

Em cerca de dois terços das plantas superiores, os cloroplastos do progenitor masculino (contidos nos grãos de pólen) não entram no zigoto, de tal forma que o DNA dos cloroplastos, assim como o DNA mitocondrial, é herdado maternalmente. Em outros vegetais, entretanto, os cloroplastos do pólen entram no zigoto, tornando a herança biparental. Nessas plantas, os cloroplastos defectivos são uma causa de *variegação*: uma mistura de cloroplastos normais e defectivos em um zigoto pode ser selecionada pela segregação mitótica, durante o crescimento e o desenvolvimento vegetal, consequentemente produzindo um padrão de manchas verdes e brancas alternadas nas folhas. As manchas verdes contêm cloroplastos normais, enquanto as manchas brancas contêm cloroplastos defectivos (**Figura 14-63**).

Um ovo humano fertilizado carrega, talvez, 2.000 cópias do genoma mitocondrial humano, todas, com exceção de uma ou duas, herdadas da mãe. Um humano em que todos estes genomas contivessem uma mutação deletéria não sobreviveria. No entanto, algumas mães carregam uma população mista de ambos os genomas mitocondriais, mutantes e normais. Os seus filhos e suas filhas herdam essa mistura de DNAs mitocondriais mutantes e normais e são saudáveis, exceto quando, por acaso, o processo de segregação mitótica resulte em uma maioria de mitocôndrias defectivas em um tecido em especial. Os sistemas muscular e nervoso são mais vulneráveis, pois esses tecidos necessitam de quantidades particularmente grandes de ATP.

Uma doença herdada em humanos, causada por uma mutação no DNA mitocondrial, pode ser reconhecida pela sua passagem das mães afetadas para filhos e filhas, onde as filhas, mas não os filhos, produzem netos com a doença. Como esperado da natureza aleatória da segregação mitótica, os sintomas dessas doenças variam muito entre diferentes membros familiares – incluindo não somente a gravidade e a idade da manifestação, mas também o tipo de tecido afetado.

Considere, por exemplo, a doença herdada *epilepsia mioclônica e das fibras vermelhas gastas* (MERRF, *myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease*), a qual pode ser causada por uma mutação em um dos genes mitocondriais de RNA de transferência (tRNA). Essa doença manifesta-se quando, por acaso, um certo tecido herda uma quantidade limiar de DNAs genômicos de mitocôndrias defectivas. Acima desse limiar, o conjunto de tRNAs defectivos determina um decréscimo na síntese de proteínas mitocondriais necessárias ao transporte de elétrons e a produção de ATP. O resultado pode ser fraqueza muscular e problemas cardíacos (de efeitos sobre o músculo cardíaco), formas de epilepsia ou demência (de efeitos sobre células nervosas) ou outros sintomas. De forma não-surpreendente, uma variabilidade semelhante em fenótipos é encontrada em muitas outras desordens mitocondriais.



Figura 14-63 Uma folha variegada. Nas manchas brancas, as células da planta herdaram cloroplastos defectivos. (Cortesia de John Innes Foundation.)

Os mutantes *petite* de leveduras demonstram a extrema importância do núcleo celular para a biogênese mitocondrial

Os estudos genéticos em leveduras representaram uma parte crucial na análise da biogênese mitocondrial. Um exemplo marcante é dado pelos estudos de mutantes de leveduras que contêm grandes deleções no DNA mitocondrial, de tal modo que toda a síntese proteica mi-

tocondrial é abolida. Como se esperaria, estes mutantes não podem produzir mitocôndrias capazes de realizar a respiração celular. Alguns deles perderam o seu DNA mitocondrial como um todo. Devido ao fato de formarem colônias pequenas pouco comuns ao crescerem em meio com baixas concentrações de glicose, todos os mutantes com tais mitocôndrias defectivas são chamados de *mutantes citoplasmáticos petite*.

Embora os mutantes *petite* não possam sintetizar proteínas em suas mitocôndrias e, consequentemente, não possam produzir mitocôndrias capazes de sintetizar ATP, eles possuem mitocôndrias. Estas mitocôndrias têm uma membrana externa normal e uma membrana interna com cristas pouco desenvolvidas (**Figura 14-64**). Elas contêm praticamente todas as proteínas mitocondriais especificadas pelos genes nucleares e importadas do citosol – incluindo DNA e RNA polimerases, todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico e a maioria das proteínas da membrana interna – demonstrando a importância esmagadora do núcleo para a biogênese das mitocôndrias. Os mutantes *petite* também demonstram que uma organela que se divide por fissões pode se replicar indefinidamente no citoplasma de células eucarióticas proliferativas, mesmo na completa ausência do seu próprio genoma. É possível que os peroxissomos se repliquem dessa maneira (ver Figura 12-33).

Nos cloroplastos, os equivalentes mais próximos aos mutantes mitocondriais *petite* de leveduras são mutantes de algas unicelulares, como *Euglena*. Algas mutantes em que não ocorre a síntese de proteínas dos cloroplastos ainda apresentam cloroplastos e são perfeitamente viáveis, se substratos oxidáveis lhes são fornecidos. Se o amadurecimento dos cloroplastos é bloqueado em vegetais superiores, entretanto, seja pelo crescimento das plantas no escuro, seja porque o DNA dos cloroplastos é defectivo ou ausente, esses vegetais morrem.

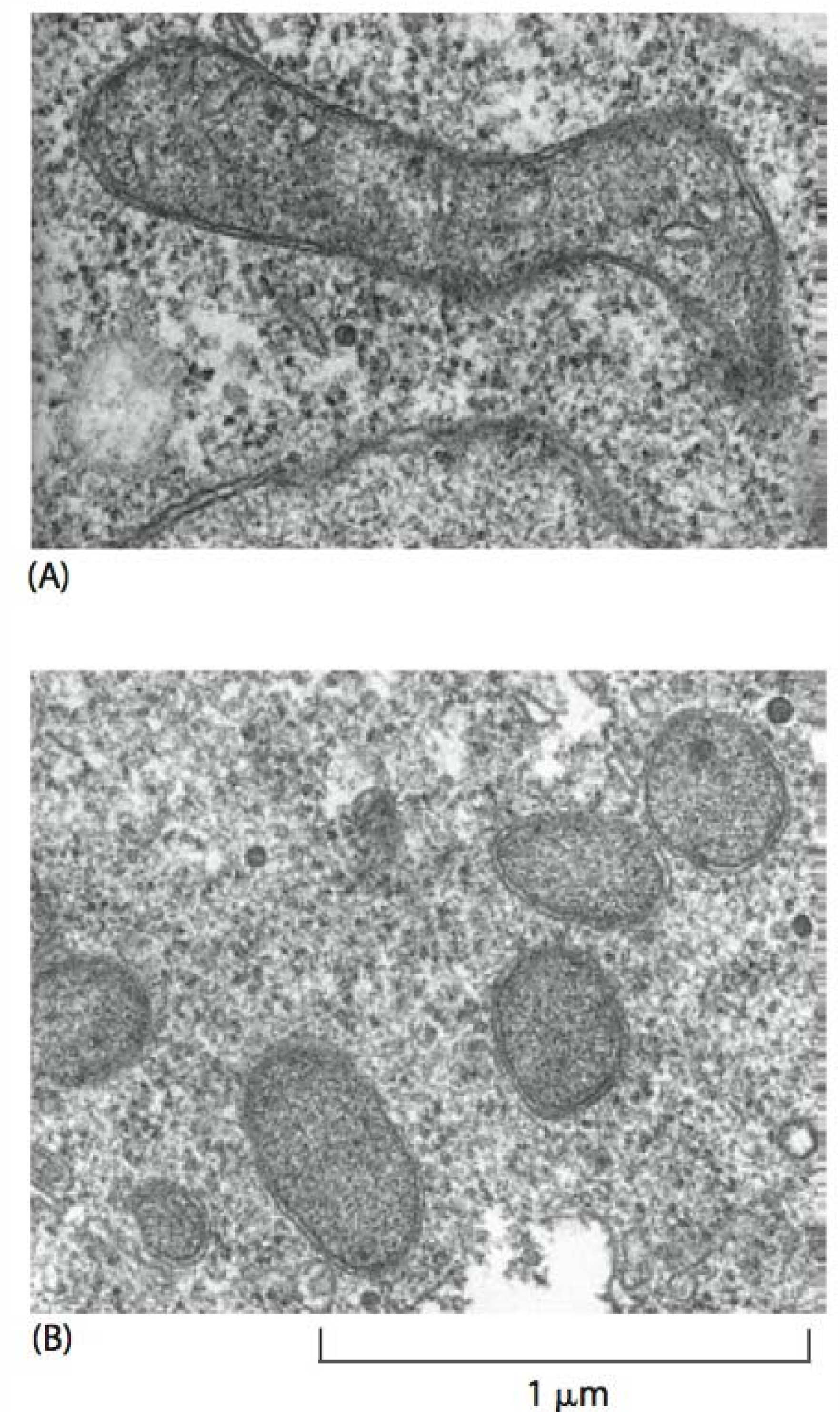


Figura 14-64 Micrografias eletrônicas de células de levedura. (A) A estrutura de mitocôndrias normais. (B) Mitocôndrias de um mutante *petite*. Nos mutantes *petite*, todos os produtos codificados por genes mitocondriais estão ausentes e, assim, as organelas são inteiramente construídas a partir de proteínas codificadas pelo núcleo. (Cortesia de Barbara Stevens.)

As mitocôndrias e os cloroplastos possuem proteínas tecido-específicas codificadas no núcleo celular

As mitocôndrias podem ter funções especializadas em tipos particulares de células. O *ciclo da ureia*, por exemplo, é a via metabólica central nos mamíferos para a eliminação dos produtos finais do metabolismo celular que contenham nitrogênio. Esses produtos são excretados na urina na forma de ureia. As enzimas da matriz mitocondrial codificadas pelo núcleo são responsáveis por várias etapas do ciclo. A síntese de ureia ocorre somente em alguns tecidos, como o fígado, e as enzimas necessárias são sintetizadas e importadas para as mitocôndrias somente nesses tecidos.

Os complexos enzimáticos respiratórios da membrana mitocondrial interna dos mamíferos contêm várias subunidades proteicas tecido-específicas e codificadas pelo núcleo, acreditando-se que atuem como reguladoras do transporte de elétrons. Assim, alguns seres humanos com uma certa doença muscular genética apresentam uma subunidade defectiva na citocromo-oxidase; uma vez que a subunidade é específica às células musculares esqueléticas, as suas outras células, incluindo as células musculares cardíacas, funcionam normalmente, permitindo aos indivíduos sobreviverem. Como seria esperado, as diferenças tecido-específicas também são encontradas entre as proteínas de cloroplastos codificadas pelo núcleo.

As mitocôndrias importam e os cloroplastos produzem a maior parte dos seus lipídeos

A biossíntese de novas mitocôndrias e cloroplastos requer lipídeos em adição a ácidos nucleicos e proteínas. Os cloroplastos normalmente fabricam os lipídeos de que necessitam. Nas folhas de espinafre, por exemplo, toda a síntese de ácidos graxos celulares ocorre nos cloroplastos, embora a dessaturação dos ácidos graxos ocorra em outro local. Os principais glicolipídeos dos cloroplastos também são sintetizados localmente.

As mitocôndrias, por outro lado, importam a maior parte dos seus lipídeos. As células animais sintetizam os fosfolipídeos fosfatidilcolina e fosfatidilserina no retículo endoplasmático e então os transferem para a membrana externa das mitocôndrias. Além de descarboxilar a fosfatidilserina importada em fosfatidiletanolamina, a principal reação de biossíntese de lipídeos catalisada pelas próprias mitocôndrias é a conversão dos lipídeos importados em cardiolipina (bifosfatidilglicerol). A cardiolipina é um fosfolipídeo "duplo" que contém quatro caudas de ácidos graxos (**Figura 14-65**). Ela é encontrada principalmente na membrana mitocondrial interna, onde constitui cerca de 20% dos lipídeos totais.

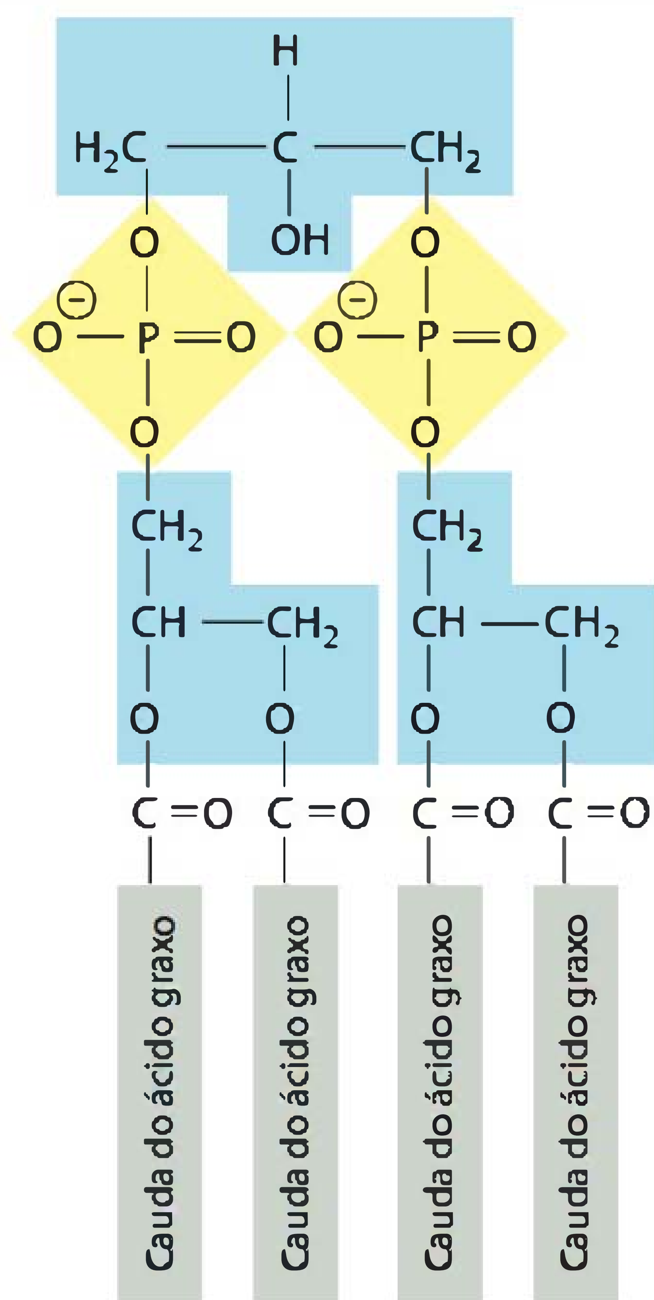


Figura 14-65 **A estrutura da cardiolipina.** A cardiolipina é um lipídeo incomum, encontrado na membrana mitocondrial interna.

Discutimos a importante questão de como as proteínas citosólicas específicas são importadas pelas mitocôndrias e pelos cloroplastos no Capítulo 12.

As mitocôndrias podem contribuir para o envelhecimento das células e dos organismos

O gás oxigênio, O_2, que possui uma forte afinidade por elétrons, torna-se particularmente reativo quando adquire um único elétron e se torna parcialmente reduzido na forma de superóxido (O_2^-). Isso explica por que, até o final da cadeia respiratória, os dois átomos de oxigênio do O_2^- permanecem fortemente ligados à citocromo-oxidase até que tenham recebido quatro elétrons e possam ser liberados de maneira segura como duas moléculas de água (ver Figura 14-27). Conforme aprendemos mais detalhes do processo de transferência biológica de elétrons, observaremos que a evolução selecionou diversos mecanismos inteligentes que previnem que os elétrons altamente energéticos escapem da cadeia transportadora de elétrons. No entanto, acidentes ocorrem com frequência, com a estimativa da formação de uma molécula de O_2^- a cada 2.000 elétrons transferidos do NADH para o oxigênio.

Portanto, as células possuem sistemas de proteção que minimizam os danos caudados pelo superóxido e por outras espécies reativas do oxigênio, uma vez que elas sejam formadas. O principal mecanismo de proteção são as enzimas *superóxido-dismutase* (SOD), que catalisam a reação $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. O peróxido de hidrogênio, ainda tóxico, é metabolizado em água, tanto por uma enzima *catalase* (que catalisa a reação $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) quanto por uma *glutationa-peroxidase* (que catalisa a reação $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$, onde GSH representa um tripeptídeo de glutationa com os grupos sulfidril das suas cisteínas).

Cerca de 90% do O_2^- gerado na célula são formados no interior da mitocôndria. Portanto, não é surpresa que as mitocôndrias contenham suas próprias enzimas superóxidos-dismutase e glutationa-peroxidase, ou que camundongos deficientes em peróxido-dismutase mitocondrial (MnSOD) morram cedo, ao contrário dos camundongos que não apresentam as versões citosólica ou extracelular desta enzima. Mesmo em animais normais, o DNA mitocondrial contém 10 vezes mais nucleotídeos anormais oxidados do que o DNA nuclear. Essas observações, associadas ao mal funcionamento das mitocôndrias em humanos mais velhos, levaram à hipótese do "ciclo vicioso" que pretende explicar os motivos do envelhecimento de um organismo. De acordo com essa hipótese, os danos oxidativos causados por mutações se acumulam no DNA mitocondrial dos tecidos somáticos, que por sua vez aceleram a taxa de erros causados por oxidação nestes tecidos. Esta retroalimentação danosa continua até que a mitocôndria de um camundongo velho ou de um humano idoso esteja produzindo tantos produtos oxidativos que todo o organismo decaia – levando a uma idade avançada debilitante.

Existe alguma verdade nessa ideia? Está claro que o envelhecimento é um processo complexo. Além disso, para organismos inferiores, como os vermes e as moscas, o período de vida pode ser alongado dramaticamente por meio de uma dentre diversas alterações genéticas. Tais dados sugerem que estes organismos podem ser programados para envelhecer e morrem quando eles o fazem, e não como resultado do acúmulo de mutações ou danos. Como um teste direto para a hipótese do ciclo vicioso, camundongos modificados geneticamente para produzir metade da quantidade normal de MnSOD vivem tanto quanto os camundongos normais e não parecem envelhecer prematuramente, mesmo que acumulem quantidades anormais de danos oxidativos mitocondriais, apresentem declínio prematuro da função mitocondrial e tenham uma formação aumentada de tumores.

Apesar de nada ainda ter sido estabelecido em relação aos humanos, parece bastante improvável, até o presente momento, que sejamos capazes de prolongar nossas vidas simplesmente tomando pílulas de antioxidantes.

Por que as mitocôndrias e os cloroplastos têm os seus próprios sistemas genéticos?

Por que as mitocôndrias e os cloroplastos necessitam de sistemas genéticos próprios e separados enquanto outras organelas que dividem o mesmo citoplasma, como peroxissomos e lisossomos, não necessitam? A questão não é trivial, porque manter um sistema genético separado é custoso: mais de 90 proteínas – incluindo muitas proteínas ribossômicas, ami-

noacil-tRNA-sintases, DNA e RNA polimerases e enzimas processadoras e modificadoras de RNA – devem ser codificadas por genes nucleares especificamente para este propósito (**Figura 14-66**). As sequências de aminoácidos da maioria das proteínas de mitocôndrias e de cloroplastos diferem das suas correspondentes do núcleo e do citosol, e estas organelas possuem relativamente poucas proteínas em comum com o resto da célula. Isso significa que o núcleo deve fornecer pelo menos 90 genes somente para manter o sistema genético de cada organela.

A razão para um arranjo tão dispendioso não está clara. Não podemos pensar em razões convincentes pelas quais as proteínas produzidas nas mitocôndrias e nos cloroplastos sejam feitas nessas organelas e não no citosol.

As subunidades proteicas individuais em vários complexos enzimáticos mitocondriais são altamente conservadas ao longo da evolução, mas não o seu local de síntese (ver Figura 14-59). Não obstante, dois genes codificadores de proteínas, *Cox1* e *Cob*, estão presentes em todos os genomas mitocondriais. As proteínas codificadas por esses genes são grandes e hidrofóbicas, com diversos segmentos que permeiam a membrana plasmática, e talvez elas precisem ser inseridas na membrana mitocondrial interna juntamente com a tradução, pelos ribossomos das mitocôndrias.

Talvez os sistemas genéticos das organelas sejam um beco sem saída da evolução. Em termos da hipótese endossimbiótica, isso significa que o processo pelo qual os endossimbiontes transferiram a maior parte dos seus genes para o núcleo terminou antes que estivesse completo. Transferências seguintes devem ter sido descartadas, no caso das mitocôndrias, pelas alterações recentes do código genético mitocondrial, que tornou os genes mitocondriais restantes não-funcionais, quando transferidos para o núcleo.

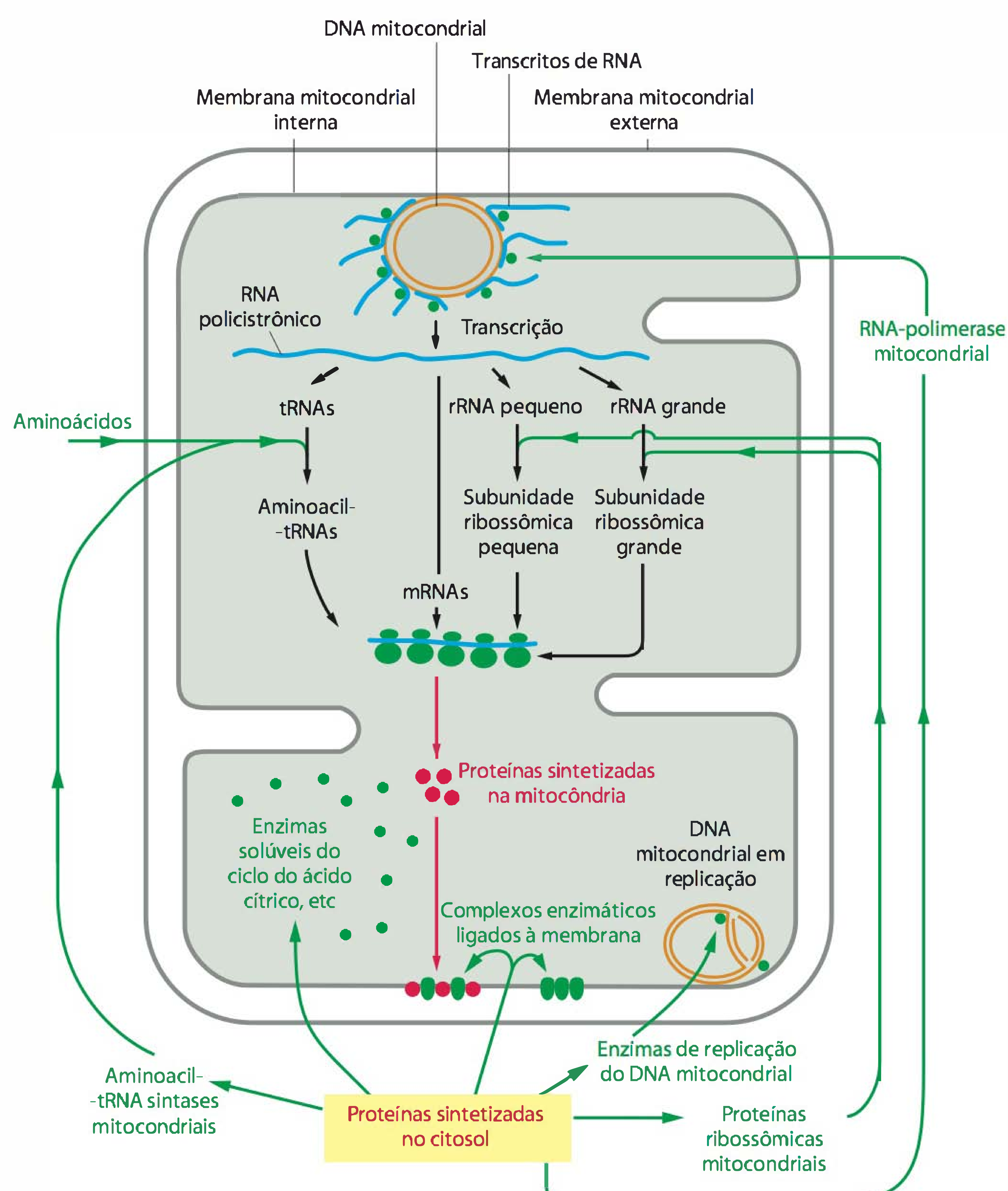


Figura 14-66 As origens dos RNAs e das proteínas mitocondriais. As proteínas codificadas no núcleo e importadas do citosol desempenham um papel principal na criação do sistema genético da mitocôndria, somando-se à contribuição da maioria das outras proteínas da organela. Não estão indicadas neste diagrama as proteínas adicionais codificadas no núcleo que regulam a expressão individual de genes mitocondriais individuais em níveis pós-transcricionais. A própria mitocôndria contribui apenas com mRNAs, rRNAs e tRNAs ao seu sistema genético – e na mitocôndria de alguns organismos, até mesmo os tRNAs são importados.

Resumo

As mitocôndrias são acréscimos para as células que permitem que a maioria dos eucariotos realize a fosforilação oxidativa, enquanto os cloroplastos são acréscimos que permitem que alguns eucariotos selecionados (plantas e algumas algas) realizem a fotossíntese. Provavelmente como resultado da sua origem procariótica, cada organela cresce em um processo coordenado que necessita da contribuição de dois sistemas genéticos separados – um na organela e um no núcleo celular. A maioria das proteínas nestas organelas é codificada pelo DNA nuclear, sintetizada no citosol e, então, individualmente importada para as organelas. Algumas proteínas e RNAs de organelas são codificados pelo DNA da própria organela e sintetizados neste mesmo compartimento. O genoma mitocondrial humano possui cerca de 16.500 nucleotídeos e codifica 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores e 13 cadeias polipeptídicas diferentes. Os genomas dos cloroplastos são cerca de 10 vezes maiores e contêm cerca de 120 genes. Porém, as organelas parcialmente funcionais são formadas em número normal mesmo em mutantes que perderam o genoma funcional da organela, demonstrando a extrema importância do núcleo para a biogênese de ambas as organelas.

Os ribossomos dos cloroplastos se assemelham muito aos ribossomos bacterianos, enquanto os ribossomos mitocondriais apresentam tanto similaridades como diferenças, tornando a sua origem mais difícil de ser rastreada. As semelhanças proteicas, entretanto, sugerem que ambas as organelas se originaram quando uma célula eucariótica primitiva entrou em uma relação endossimbiótica estável com uma bactéria. Acredita-se que uma bactéria púrpura originou a mitocôndria e, mais tarde, uma cianobactéria deu origem ao cloroplasto. Embora muitos dos genes destas antigas bactérias ainda funcionem para produzir proteínas de organelas, a maior parte se tornou integrada ao genoma nuclear, onde codificam enzimas semelhantes às de bactérias que são sintetizadas pelos ribossomos citosólicos e então importadas para a organela.

O dano acumulado no genoma das mitocôndrias ao longo do tempo pode contribuir para o envelhecimento das células e do organismo, apesar de muito ainda precisar ser provado para corroborar a hipótese do "ciclo vicioso".

A EVOLUÇÃO DAS CADEIAS TRANSPORTADORAS DE ELÉTRONS

Grande parte da estrutura, da função e da evolução das células e dos organismos pode estar relacionada às suas necessidades de energia. Vimos que os mecanismos fundamentais para processar energia a partir de fontes tão distintas como a luz ou a oxidação da glicose são os mesmos. Aparentemente, um método eficiente para sintetizar ATP surgiu no início da evolução e desde então tem-se conservado com pequenas modificações. Como surgiram cada um destes componentes cruciais – ATP-sintase, bombas de H^+ dirigidas pelo potencial redox e fotossistemas? As hipóteses sobre os eventos decorridos dentro de uma escala evolutiva de tempo são difíceis de testar. Mas há abundância de pistas, tanto nas muitas cadeias transportadoras de elétrons primitivas e diferentes que sobreviveram em algumas bactérias de hoje quanto em evidências geológicas envolvendo o ambiente do planeta há bilhões de anos.

As células mais primitivas provavelmente produziam ATP por fermentação

Como explicado no Capítulo 1, acredita-se que as primeiras células vivas tenham surgido há mais de 3×10^9 anos, quando a Terra não tinha mais do que 10^9 anos de existência. Uma vez que o ambiente era privado de oxigênio, porém rico em moléculas orgânicas produzidas geoquimicamente, presume-se que as primeiras vias metabólicas para a produção de ATP se assemelhavam às formas de fermentação hoje conhecidas.

No processo de fermentação, o ATP é fabricado por um evento de fosforilação que utiliza a energia liberada quando uma molécula orgânica rica em hidrogênios, como a glicose, é parcialmente oxidada (ver Figura 2-71). Os elétrons perdidos pela molécula orgânica oxidada são transferidos (via NADH ou NADPH) para uma molécula orgânica diferente (ou para uma porção diferente da mesma molécula), a qual, consequentemente, torna-se mais reduzida. Ao final do processo de fermentação, uma (ou mais) das moléculas orgânicas pro-

duzidas é excretada no meio como produto final do metabolismo; outras, como o piruvato, são retidas na célula para biossíntese.

Os produtos finais excretados são diversos em diferentes organismos, mas tendem a ser ácidos orgânicos (compostos de carbono que contêm um grupo COOH). Nas células bacterianas, entre os mais importantes desses produtos estão o ácido láctico (que também é acumulado na glicólise anaeróbia que ocorre nos músculos) e os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e succínico.

As cadeias transportadoras de elétrons permitiram que as bactérias anaeróbias utilizassem moléculas não-fermentáveis como suas principais fontes de energia

Os processos fermentativos primitivos deviam fornecer não somente ATP, mas também a força redutora (como NADH ou NADPH) necessária às biossínteses fundamentais. Assim, muitas das principais vias metabólicas provavelmente evoluíram quando a fermentação era a única forma de produção de energia. Com o tempo, entretanto, as atividades metabólicas desses organismos procarióticos devem ter modificado o ambiente local, forçando os organismos a desenvolver novas vias bioquímicas. O acúmulo de produtos finais da fermentação, por exemplo, deve ter resultado da seguinte série de mudanças:

Estágio 1. A contínua excreção de ácidos orgânicos baixou o pH do ambiente, favorecendo a evolução de proteínas que funcionam como bombas transmembrana de H^+, capazes de bombear H^+ para fora da célula a fim de protegê-la dos efeitos nocivos da acidificação intracelular. Uma dessas bombas utilizou a energia disponível pela hidrólise do ATP e deve ter sido a ancestral da atual ATP-sintase.

Estágio 2. Ao mesmo tempo em que os ácidos orgânicos não-fermentáveis se acumulavam no ambiente, favorecendo a evolução de uma bomba de H^+ consumidora de ATP, o fornecimento de nutrientes fermentáveis gerados geoquimicamente e que proporcionavam a energia para as bombas e para todos os outros processos celulares foi diminuindo. Isso favoreceu as bactérias capazes de excretar H^+ sem hidrolisar ATP, permitindo a conservação de ATP para outras funções celulares. As pressões seletivas desse tipo devem ter levado às primeiras proteínas ligadas a membranas que podiam utilizar o transporte de elétrons entre moléculas com diferentes potenciais redox como fontes de energia para transportar H^+ através da membrana plasmática. Algumas dessas proteínas teriam encontrado os seus doadores e aceptores de elétrons entre os ácidos orgânicos não-fermentáveis acumulados. Muitas dessas proteínas transportadoras de elétrons podem ser encontradas em bactérias atuais: algumas bactérias que crescem em ácido fórmico, por exemplo, bombeiam H^+ utilizando a pequena quantidade de energia redox derivada da transferência de elétrons do ácido fórmico para o fumarato (**Figura 14-67**). Outras possuem componentes transportadores de elétrons semelhantes, envolvidos somente com a oxidação e a redução de substratos inorgânicos (ver Figura 14-69, por exemplo).

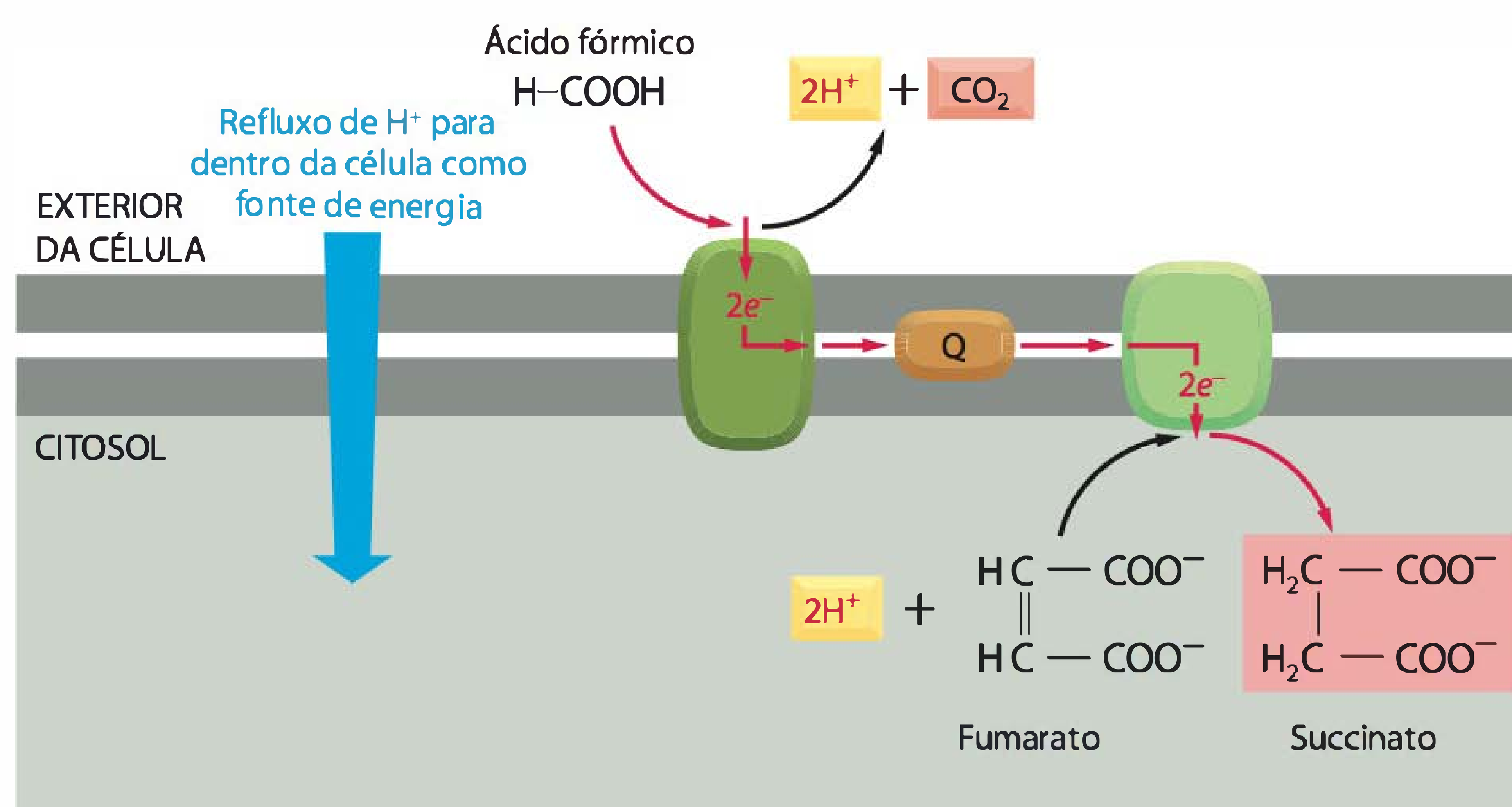


Figura 14-67 Oxidação do ácido fórmico em algumas bactérias atuais. Nestas bactérias anaeróbias, incluindo *E. coli*, a oxidação é mediada por uma cadeia transportadora de elétrons conservadora de energia da membrana plasmática. Como indicado, os materiais iniciais são ácido fórmico e fumarato, e os produtos são succinato e CO_2. Note que H^+ é consumido dentro da célula e gerado fora dela, o que é equivalente a bombear H^+ para o exterior celular. Portanto, esse sistema transportador de elétrons ligado à membrana pode gerar um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática. O potencial redox do par ácido fórmico-CO_2 é de −420 mV, e o do par fumarato-succinato é de +30 mV. (Compare com a Figura 14-29.)

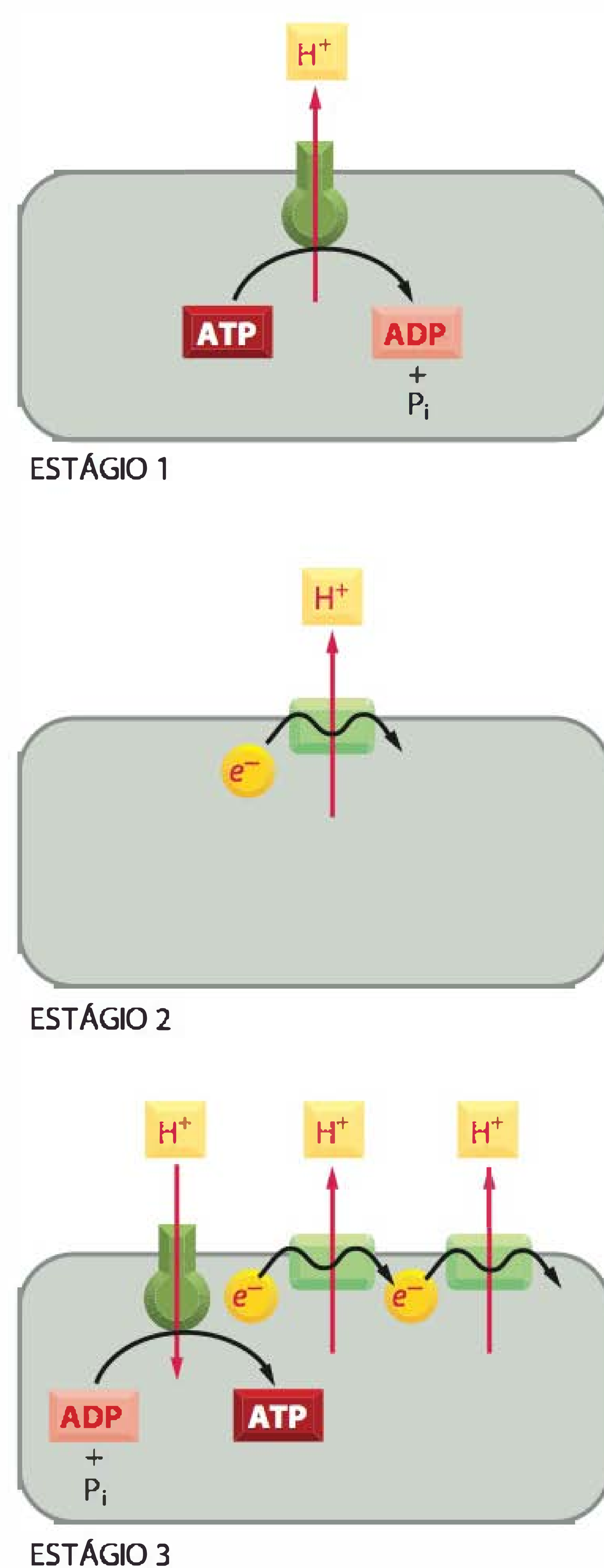


Figura 14-68 A evolução dos mecanismos de fosforilação oxidativa. Uma sequência possível é apresentada; os estágios estão descritos no texto.

Estágio 3. Finalmente, algumas bactérias desenvolveram sistemas bombeadores de H^+ acoplados ao transporte de elétrons eficientes, para processar mais energia redox do que necessitavam, apenas para manter seus valores de pH internos. As bactérias possuidoras de ambos os tipos de bombas de H^+ estavam em vantagem. Nessas células, um grande gradiente eletroquímico de prótons, gerado pelo bombeamento excessivo de H^+, deve ter permitido o refluxo de prótons à célula, através das bombas de H^+ dependentes de ATP, e, consequentemente, obrigando estas células a girar ao contrário, de tal forma que passaram a funcionar como ATP-sintases, fabricando ATP. Como essas bactérias dependiam muito menos da fonte crescentemente escassa de nutrientes fermentáveis, elas proliferaram às custas das suas células vizinhas.

Esses três estágios hipotéticos da evolução dos mecanismos de fosforilação oxidativa estão resumidos na **Figura 14-68**.

Ao proporcionar uma fonte inesgotável de força redutora, as bactérias fotossintetizantes superaram um grande obstáculo na evolução das células

As etapas evolutivas recém-descritas teriam resolvido o problema de manter tanto o pH interno neutro quanto o estoque abundante de energia, mas não teriam resolvido outro problema igualmente sério. A depleção de nutrientes orgânicos do ambiente exigia dos organismos a busca de fontes alternativas de carbono para fabricar os açúcares que serviam de precursores para tantas outras moléculas celulares. Embora o CO_2 da atmosfera proporcionasse uma fonte potencial e abundante de carbono, a sua conversão em uma molécula orgânica, como um carboidrato, requer a sua redução por um forte doador de elétrons, como NADH ou NADPH, os quais podem fornecer os elétrons de alta energia necessários para gerar cada unidade de (CH_2O) a partir do CO_2 (ver Figura 14-40). No início da evolução celular, fortes agentes redutores (doadores de elétrons) teriam sido abundantes como produtos da fermentação. Mas como o fornecimento de nutrientes fermentáveis diminuiu e uma ATP-sintase ligada à membrana passou a produzir a maior parte do ATP, a fonte abundante de NADH e de outros agentes redutores teria desaparecido. Portanto, tornou-se imperativo para as células desenvolver uma nova forma de gerar agentes redutores fortes.

Possivelmente, os principais agentes redutores ainda disponíveis foram os ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo anaeróbio dos carboidratos, as moléculas inorgânicas como o sulfeto de hidrogênio (H_2S) geradas geoquimicamente e a água. A força redutora de todas estas moléculas, porém, é muito fraca para ser utilizada na fixação de CO_2. Uma fonte primitiva de doadores de elétrons fortes poderia ter sido gerada pela utilização do gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática para dirigir um *fluxo reverso de elétrons*. Isso teria exigido a evolução de complexos enzimáticos ligados a membranas, semelhantes à NADH-desidrogenase; mecanismos desse tipo sobrevivem no metabolismo anaeróbio de algumas bactérias atuais (**Figura 14-69**).

A principal descoberta evolutiva do metabolismo energético, entretanto, certamente foi o desenvolvimento dos centros de reação fotoquímica que podiam utilizar a energia da luz solar para produzir moléculas como NADH. Acredita-se que isso tenha ocorrido muito cedo no processo de evolução celular – provavelmente há mais de 3×10^9 anos, nos ancestrais das sulfobactérias verdes. As atuais sulfobactérias verdes utilizam a energia luminosa para transferir átomos de hidrogênio (na forma de um elétron mais um próton) do H_2S para o NADPH, criando, assim, a grande força redutora necessária à fixação de carbono (**Figura 14-70**). Como os elétrons removidos do H_2S possuem um potencial redox muito mais baixo do que aqueles de H_2O (−230 mV de H_2S comparados a +820 mV de H_2O), um quantum de luz absorvida pelo único fotossistema dessas bactérias é suficiente para alcançar um potencial redox alto o bastante para gerar NADPH por meio de uma cadeia transportadora de elétrons fotossintetizante relativamente simples.

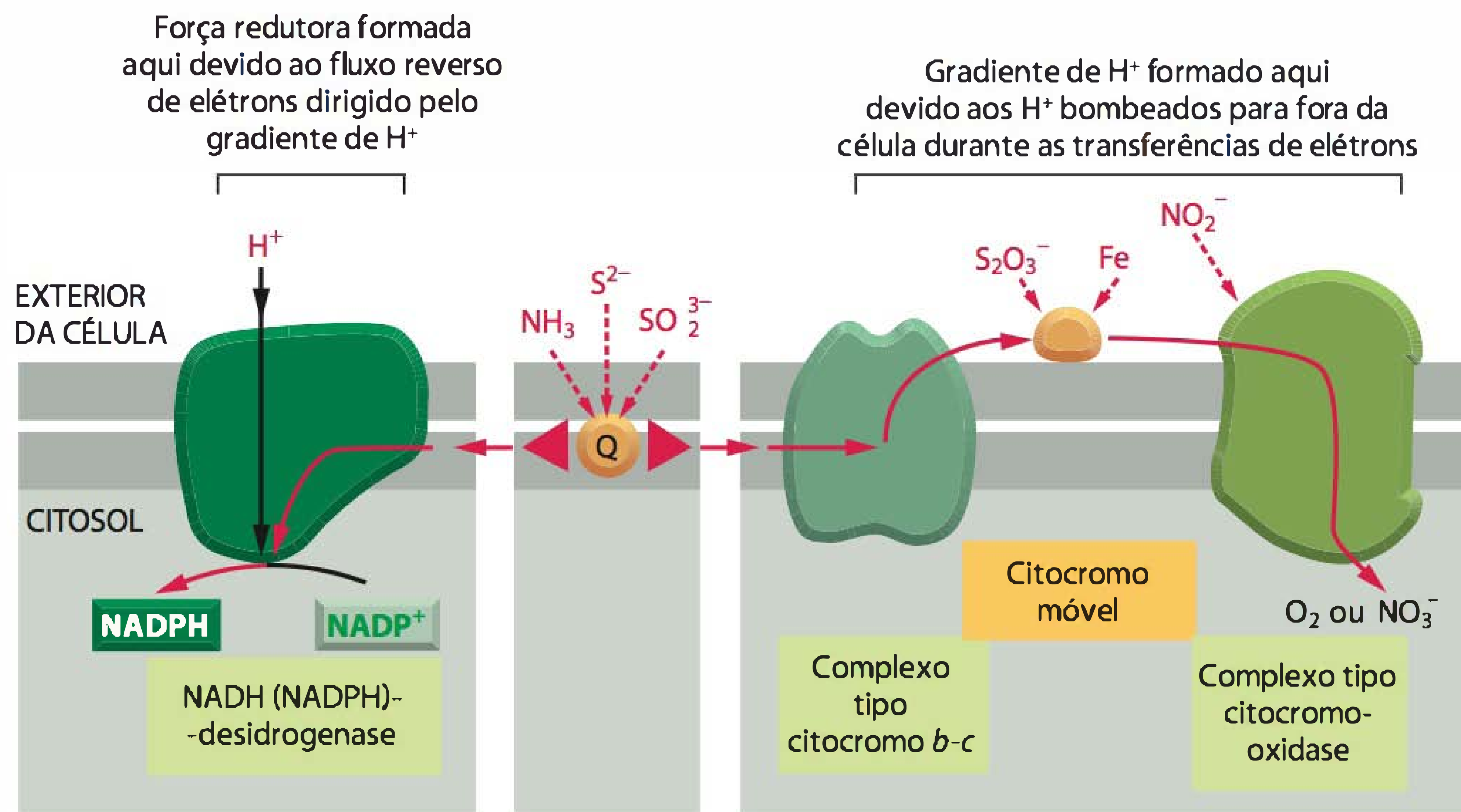


Figura 14-69 Algumas das vias transportadoras de elétrons das bactérias atuais. Algumas espécies podem crescer anaerobiamente, substituindo nitrato por oxigênio como aceptor final de elétrons. A maioria das bactérias utiliza o ciclo de fixação do carbono e sintetiza as suas moléculas orgânicas inteiramente a partir do dióxido de carbono. As vias indicadas geram todo o ATP celular e a força redutora necessária a partir da oxidação de moléculas inorgânicas, como ferro, amônia, nitrito e compostos de enxofre.

Note que ambos os fluxos de elétrons, para fora e reverso, ocorrem a partir da quinona (Q). Assim como na cadeia respiratória, o fluxo de elétrons para fora determina o bombeamento de H^+ para fora da célula, e o gradiente de H^+ resultante direciona a produção de ATP pela ATP-sintase (não-mostrado). O NADPH necessário para a fixação de carbono é produzido por um fluxo reverso de elétrons que também é derivado do gradiente de H^+, como indicado.

As cadeias transportadoras de elétrons fotossintetizantes mais complexas das cianobactérias produziram o oxigênio atmosférico e permitiram novas formas de vida

A próxima etapa, que se acredita ter ocorrido com o desenvolvimento das cianobactérias há pelo menos 3×10^9 anos, foi a evolução dos organismos capazes de utilizar a água como fonte de elétrons para a redução do CO_2. Isso implicou na evolução de uma enzima capaz de quebrar a molécula da água e também necessitou da adição de um segundo fotossistema, atuando em série com o primeiro, para cobrir a enorme diferença de potencial redox entre H_2O e NADPH. As homologias estruturais entre os fotossistemas de hoje sugerem que essa mudança envolveu a cooperação de um fotossistema derivado de bactérias verdes (fotossistema I) e outro derivado de bactérias púrpuras (fotossistema II). As consequências biológicas dessa etapa evolutiva foram de grande alcance. Pela primeira vez originaram-se organismos com exigências químicas mínimas ao ambiente e que podiam se distribuir e evoluir de maneiras antes negadas às bactérias fotossintetizantes primitivas, dependentes de H_2S ou de ácidos orgânicos como fontes de elétrons. Consequentemente, grandes quantidades de materiais orgânicos reduzidos e sintetizados biologicamente se acumularam. Além disso, o oxigênio entrou na atmosfera pela primeira vez.

O oxigênio é altamente tóxico, pois as reações de oxidação que ele produz podem alterar aleatoriamente as moléculas biológicas. Muitas das bactérias anaeróbias atuais, por exemplo, são rapidamente mortas quando expostas ao ar. Portanto, os organismos da Terra primitiva tiveram que desenvolver medidas de proteção contra os crescentes níveis de O_2 do ambiente. Os organismos que surgiram mais tarde, como os humanos, dispõem de numerosos

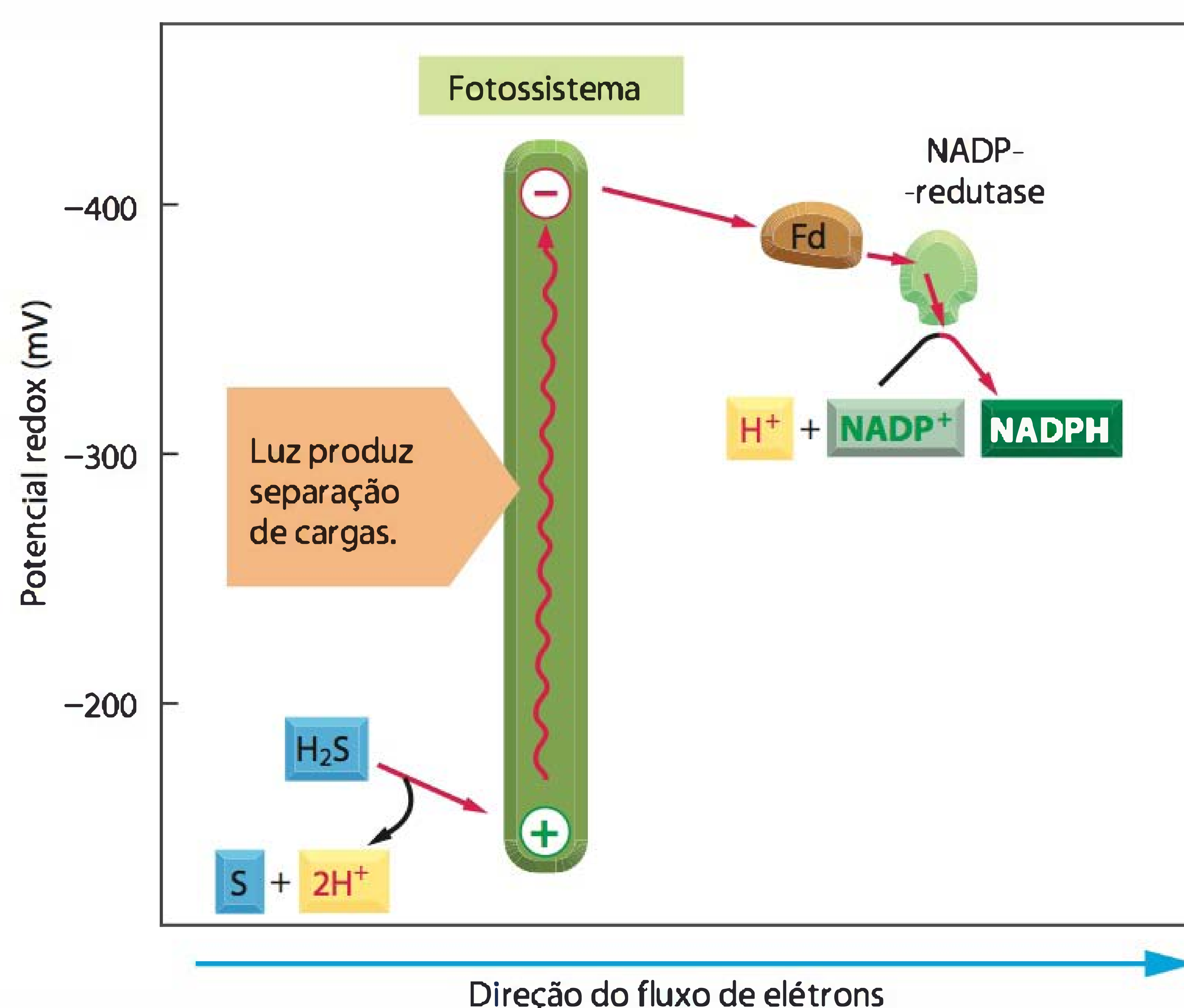


Figura 14-70 Fluxo geral de elétrons em uma forma relativamente primitiva de fotossíntese observada em sulfobactérias verdes atuais. O fotossistema em sulfobactérias verdes assemelha-se ao fotossistema I de plantas e de cianobactérias. Ambos os fotossistemas utilizam uma série de centros de ferro-enxofre como aceptores primários de elétrons que, finalmente, doam os seus elétrons ricos em energia para a ferredoxina (Fd). Um exemplo de uma bactéria deste tipo é a *Chlorobium tepidum*, a qual pode multiplicar-se sob altas temperaturas e baixas intensidades luminosas em fontes termais.

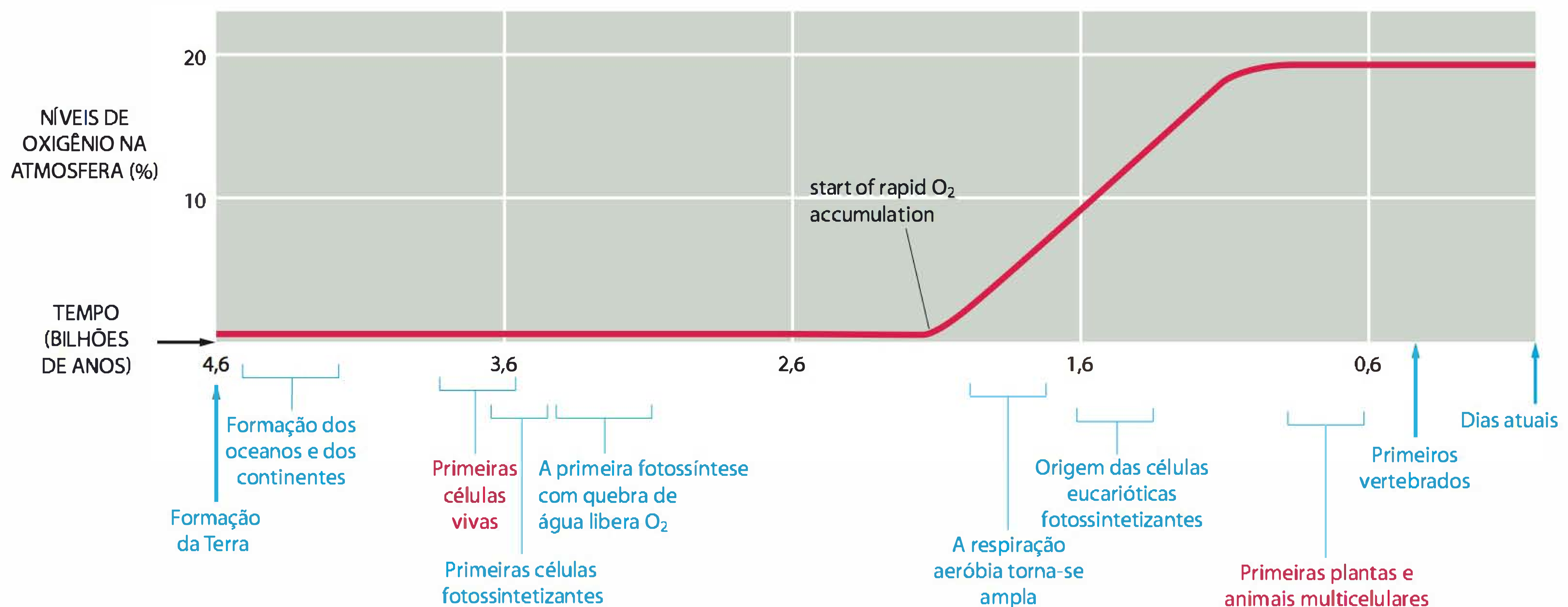


Figura 14-71 Alguns dos principais eventos que, acredita-se, tenham ocorrido durante a evolução dos organismos vivos sobre a Terra. Com a evolução dos processos de fotossíntese com base em membranas, os organismos puderam produzir as suas próprias moléculas orgânicas a partir do gás CO_2. Como explicado no texto, acredita-se que um período de mais de 10^9 anos transcorreu entre o surgimento de bactérias capazes de cindir a água e liberar O_2 durante a fotossíntese e o acúmulo de altos níveis de O_2 na atmosfera como resultado da reação inicial do oxigênio com o abundante ferro ferroso (Fe^{2+}) dissolvido nos oceanos primitivos. Somente quando o ferro passou a ser usado é que o oxigênio passou a acumular-se na atmosfera. Em resposta aos níveis cada vez maiores de oxigênio na atmosfera, organismos não-fotossintetizantes que utilizam oxigênio apareceram, e a concentração de oxigênio na atmosfera passou a aumentar.

mecanismos destoxificantes que protegem as suas células dos efeitos nocivos do oxigênio. Mesmo assim, postula-se que um acúmulo de danos oxidativos às nossas macromoléculas seja a principal causa do envelhecimento humano, como discutido anteriormente.

O aumento do O_2 atmosférico foi muito lento no início e permitiu uma evolução gradual dos sistemas de defesa. Os mares primitivos continham grandes quantidades de íons ferrosos (Fe^{2+}), e aproximadamente todo o O_2 produzido pelas bactérias fotossintetizantes primitivas foi utilizado para converter Fe^{2+} em Fe^{3+}. Essa conversão causou a precipitação de quantidades enormes de óxidos de ferro, e as extensas formações bandeadas de ferro, iniciadas há $2,7 \times 10^9$ anos, auxiliam a datar o surgimento das cianobactérias. Por volta de 2×10^9 anos, o estoque de íons ferrosos foi esgotado, e a deposição dos derivados precipitados de ferro cessou. Evidências geológicas sugerem que os níveis de O_2 na atmosfera começaram então a aumentar, atingindo os níveis atuais entre 0,5 e $1,5 \times 10^9$ anos atrás (**Figura 14-71**).

A disponibilidade de O_2 tornou possível o desenvolvimento de bactérias sustentadas pelo metabolismo aeróbio para fabricar o seu ATP. Como previamente explicado, estes organismos podiam processar uma grande quantidade de energia liberada da degradação de carboidratos e de outras moléculas orgânicas reduzidas por toda a via metabólica até CO_2 e H_2O. Os componentes preexistentes dos complexos transportadores de elétrons foram modificados para produzir uma citocromo-oxidase, de tal forma que os elétrons obtidos de substratos orgânicos ou inorgânicos podiam ser transportados para o O_2, o aceptor final de elétrons. Dependendo da disponibilidade de luz e de O_2, muitas das bactérias púrpuras fotossintetizantes de hoje podem alternar entre a fotossíntese e a respiração, necessitando, para isso, de reorganizações relativamente simples das suas cadeias transportadoras de elétrons.

Com o acúmulo de matérias orgânicas sobre a Terra, como resultado da fotossíntese, algumas bactérias fotossintetizantes (incluindo as precursoras da *E. coli*) perderam a habilidade de sobreviver somente às custas de energia luminosa e vieram a depender inteiramente da respiração. Como descrito anteriormente (ver Figura 14-58), foi sugerido que as mitocôndrias se originaram há cerca de $1,5 \times 10^9$ anos, quando uma célula eucariótica primitiva endocitou uma das bactérias dependentes da respiração. Acredita-se que os vegetais tenham evoluído mais tarde, quando uma célula descendente desta célula eucariótica aeróbia primitiva endocitou uma bactéria fotossintetizante que, por sua vez, tornou-se a precursora dos cloroplastos.

Na **Figura 14-72** estão relacionadas essas vias postuladas e os vários tipos de bactérias discutidos neste capítulo. A evolução é sempre conservativa, tomando elementos do que é antigo e construindo, a partir deles, alguma coisa nova. Assim sendo, partes das cadeias

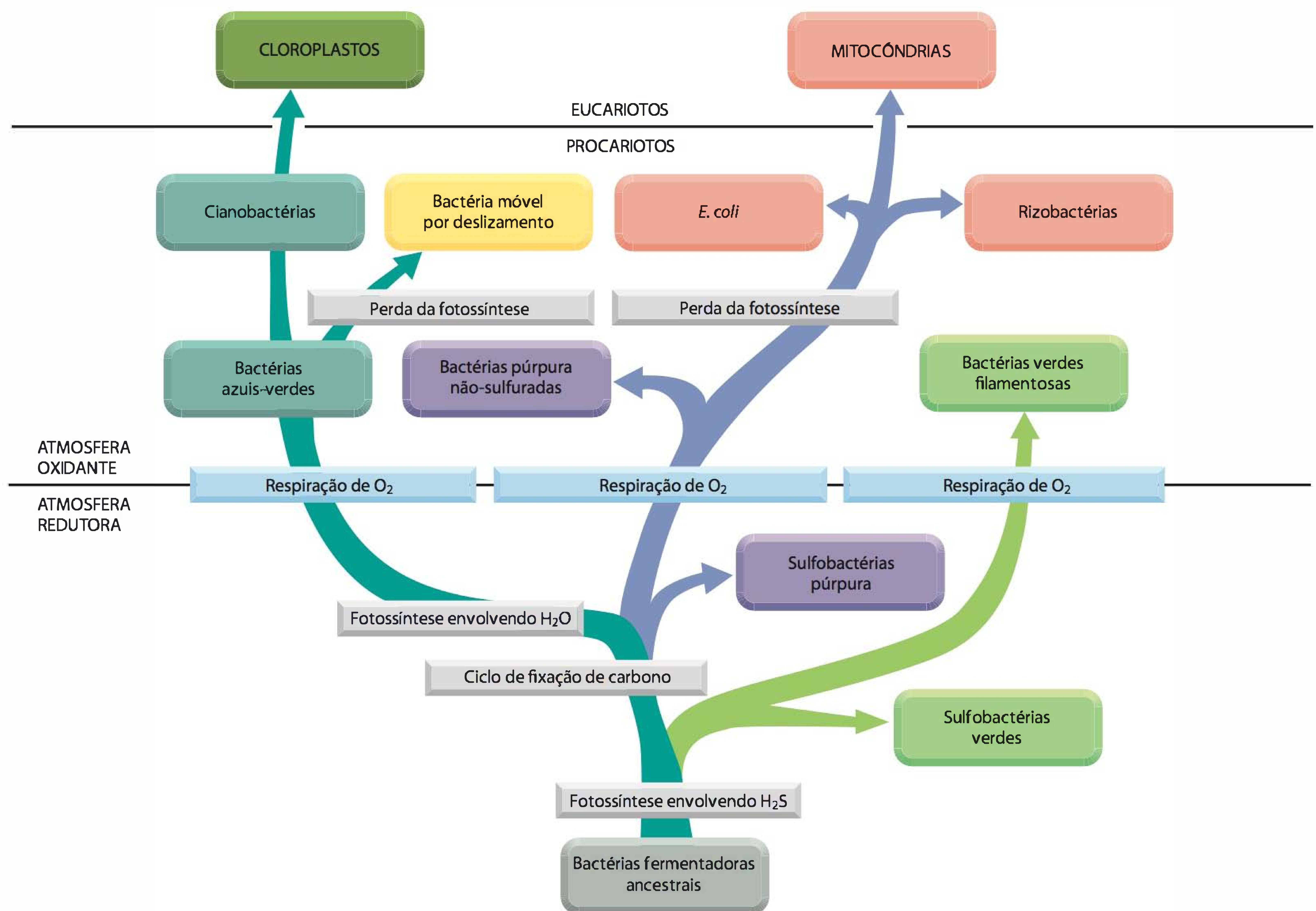


Figura 14-72 **Árvore filogenética da provável evolução das mitocôndrias e dos cloroplastos e seus ancestrais bacterianos.** Acredita-se que a respiração à base de oxigênio começou a se desenvolver há cerca de 2×10^9 anos. Como indicado, parece ter evoluído independentemente em linhas de bactérias fotossintetizantes verdes, púrpuras e azuis-verdes (cianobactérias). Acredita-se ainda que uma bactéria púrpura aeróbia que perdeu a habilidade de fotossintetizar originou a mitocôndria, enquanto várias bactérias azuis-verdes diferentes originaram os cloroplastos. As análises de sequências de nucleotídeos sugerem que as mitocôndrias se originaram a partir de bactérias semelhantes às rizobactérias, às agrobactérias e às riquétsias – três espécies muito relacionadas conhecidas por formar íntimas associações com as células eucarióticas atuais. Não se sabe se as arquebactérias contêm os tipos de fotossistemas descritos neste capítulo; elas não foram incluídas aqui.

transportadoras de elétrons que se derivaram para servir bactérias há 3 a 4×10^9 anos provavelmente sobrevivam até hoje, de forma alterada, nas mitocôndrias e nos cloroplastos dos eucariotos superiores atuais. Considere, por exemplo, a impressionante homologia, em estrutura e em função, entre os complexos enzimáticos que bombeiam H^+ no segmento central da cadeia respiratória mitocondrial (o complexo do citocromo b-c_1) e os segmentos correspondentes das cadeias transportadoras de elétrons de bactérias e cloroplastos (**Figura 14-73**).

Resumo

Acredita-se que as células primitivas foram organismos semelhantes a bactérias vivendo em um ambiente rico em moléculas orgânicas altamente reduzidas, sendo estas últimas formadas por processos geoquímicos no curso de centenas de milhões de anos. Elas provavelmente derivaram a maior parte do seu ATP da conversão das moléculas orgânicas reduzidas em uma variedade de ácidos orgânicos que eram liberados no ambiente como produtos finais do metabolismo. Ao acidificar o ambiente, tais fermentações devem ter levado à evolução das primeiras bombas de H^+ ligadas a membranas, as quais podiam manter um pH neutro no interior celular. As propriedades das bactérias atuais sugerem que as bombas de H^+ dirigidas pelo transporte de elétrons ou pelo ATP surgiram pela primeira vez nesses ambientes anaeróbios. A inversão da bomba dependente de ATP teria possibilitado seu funcionamento como uma ATP-sintase. À medida que se desenvolveram cadeias transportadoras de elétrons mais eficientes, a energia liberada pelas reações redox entre moléculas

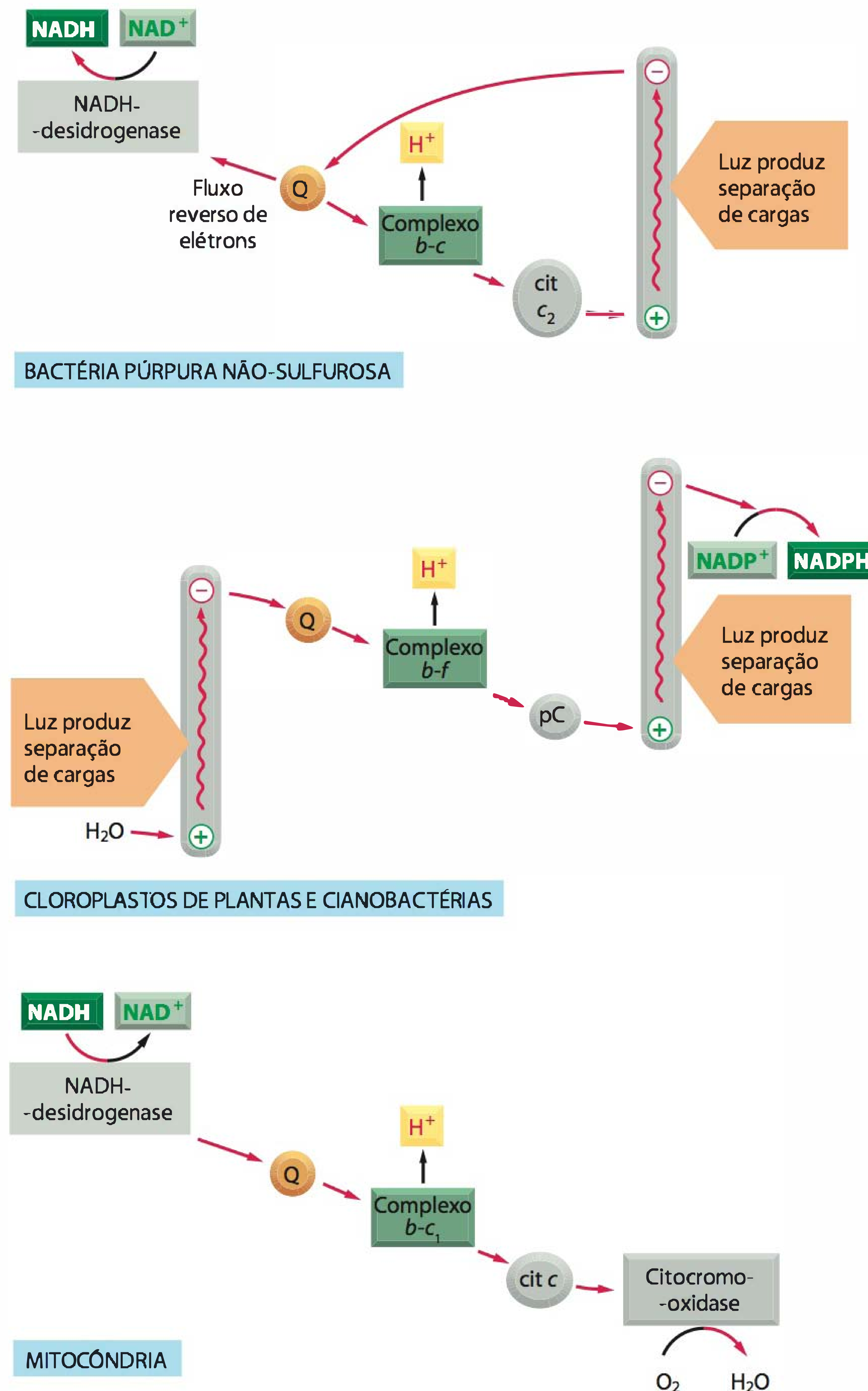


Figura 14-73 Comparação entre três cadeias transportadoras de elétrons discutidas neste capítulo. Tanto bactérias como cloroplastos e mitocôndrias contêm um complexo enzimático ligado à membrana que muito se assemelha ao complexo citocromo b-c_1 das mitocôndrias. Todos estes complexos aceitam elétrons de uma quinona carreadora (Q) e bombeiam H^+ através das suas respectivas membranas. Além disso, em sistemas reconstituídos *in vitro*, os diferentes complexos podem substituir uns aos outros, e as sequências de aminoácidos dos seus componentes proteicos revelam que estão evolutivamente relacionados.

inorgânicas e compostos não-fermentáveis acumulados produziu um grande gradiente eletroquímico de prótons, o qual pode ser processado pela bomba dependente de ATP para produzir ATP.

Como as moléculas orgânicas pré-formadas foram reabastecidas muito lentamente pelos processos geoquímicos, a proliferação das bactérias que as utilizavam como fonte de carbono e força redutora não pode continuar para sempre. O esgotamento dos nutrientes orgânicos fermentáveis presumivelmente levou à evolução de bactérias que podiam utilizar CO_2 para produzir carboidratos. Pela combinação de partes das cadeias transportadoras de elétrons desenvolvidas em períodos anteriores, a energia luminosa foi coletada pelo fotossistema único de bactérias fotossintetizantes para gerar o NADPH requerido para a fixação do carbono. A aparição subsequente de cadeias transportadoras de elétrons mais complexas e fotossintetizantes das cianobactérias permitiu que o H_2O fosse usado como doador de elétrons para a formação de NADPH, e não mais outros doadores de elétrons muito menos abundantes requeridos por outras bactérias fotossintetizantes. A vida pode então proliferar por grandes áreas da superfície terrestre, de tal forma que moléculas orgânicas reduzidas se acumularam novamente.

Há cerca de 2×10^9 anos, o O_2 liberado pela fotossíntese das cianobactérias começou a se acumular na atmosfera. Uma vez que tanto moléculas orgânicas como O_2 tornaram-se abundantes, as cadeias transportadoras de elétrons adaptaram-se à transferência de elétrons do NADH para o O_2, e um eficiente metabolismo aeróbio se desenvolveu em muitas bactérias. Exatamente os mesmos mecanismos aeróbios operam as mitocôndrias de eucariotos, e há evidências consideráveis indicando que as mitocôndrias e os cloroplastos evoluíram de bactérias aeróbias que foram endocitadas por células eucarióticas primitivas.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

14-1 Os três complexos respiratórios na membrana mitocondrial interna existem em arranjos estruturalmente ordenados que facilitam a transferência correta de elétrons entre os complexos apropriados.

14-2 Ácidos lipofílicos fracos fazem o curto circuito do fluxo normal de prótons através da membrana interna, eliminando, assim, a força próton-motriz, parando a síntese de ATP e bloqueando o fluxo de elétrons.

14-3 As mutações que são herdadas de acordo com as regras mendelianas afetam os genes nucleares; mutações cuja herança viola as regras mendelianas provavelmente afetam genes de organelas.

Discuta as seguintes questões.

14-4 Nos anos de 1860, Louis Pasteur observou que, quando ele adicionava O_2 a uma cultura de leveduras em crescimento anaeróbio com glicose, a velocidade de consumo de glicose diminuía drasticamente. Explique a base para este resultado, que é conhecido como efeito Pasteur.

14-5 Nas mitocôndrias em respiração ativa no fígado, o pH dentro da matriz é cerca de uma unidade de pH mais alta do que no citosol. Assumindo que o citosol tem pH 7 e a matriz é uma esfera com um diâmetro de 1 μm [$V = (4/30)\pi r^3$], calcule o número total de prótons na matriz das mitocôndrias respirando no fígado. Se a matriz inicia com um pH 7 (igual ao do citosol), quantos prótons teriam que ser bombeados para fora para estabilizar a matriz em pH 7,5 (uma diferença de 0,5 unidade de pH)?

14-6 O músculo cardíaco consegue a maior parte do ATP necessário para dar força as suas contrações contínuas por meio da fosforilação oxidativa. Quando oxida glicose para CO_2, o músculo cardíaco consome O_2 a uma velocidade de 10 μmol/min por g de tecido, para repor o ATP usado na contração e ficar com uma concentração de ATP em estado estacionário de 5 μmol/g de tecido. Nessa velocidade, quantos segundos o coração levaria para consumir uma quantidade de ATP igual aos seus níveis do estado estacionário? (A oxidação completa de uma molécula de glicose para CO_2 gera 30 ATPs, 26 dos quais são derivados por fosforilação oxidativa usando os 12 pares de elétrons capturados nos carreadores de elétrons NADH e $FADH_2$.)

14-7 Se mitocôndrias isoladas são incubadas com uma fonte de elétrons como o succinato, mas sem oxigênio, os elétrons entram na cadeia respiratória, reduzindo quase que completamente cada um dos carreadores de elétrons. Quando o oxigênio é então introduzido, os carreadores tornam-se oxidados em diferentes velocidades (**Figura Q14-1**). Como este resultado permite a você ordenar os carreadores de elétrons na cadeia respiratória? Qual é a sua ordem?

14-8 O desacoplador dinitrofenol foi uma vez prescrito como substância para auxiliar a perda de peso. Como um desacoplador da fosforilação oxidativa promove a perda de peso? Suponha por que ele não é mais prescrito.

14-9 Quanta energia está disponível na luz visível? Quanta energia a luz solar emite sobre a Terra? O quão eficiente as plantas são em converter energia luminosa em energia química? As respostas a essas questões fornecem um importante cenário para o assunto de fotossíntese.

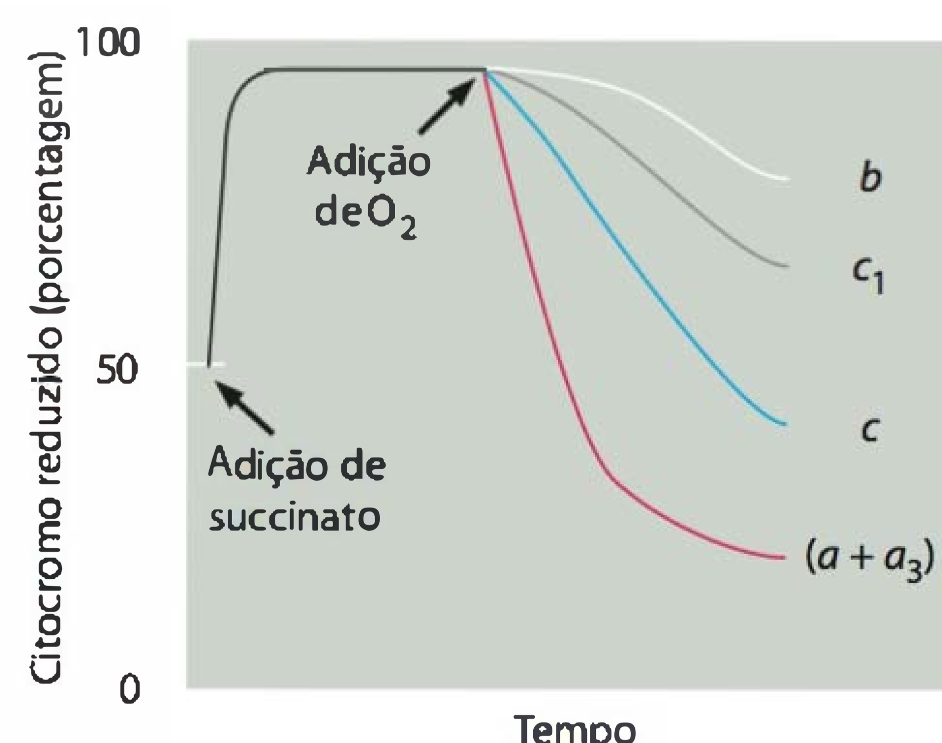


Figura Q14-1 Análise espectrofotométrica rápida das velocidades de oxidação dos carreadores de elétrons na cadeia respiratória (Questão 14-7). Os citocromos a e a_3 não podem ser distinguidos e por isso estão listados como citocromo $(a + a_3)$.

Cada quantum ou fóton de luz tem energia $h\nu$, onde h é a constante de Planck ($1{,}58 \times 10^{-37}$ kcal seg/fóton) e ν é a frequência em seg^{-1}. A frequência da luz é igual a c/λ, onde c é a velocidade da luz ($3{,}0 \times 10^{17}$ nm/seg) e λ é o comprimento de onda em nm. Assim, a energia (E) do fóton é

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

A. Calcule a energia de um mol de fótons (6×10^{23} fótons/mol) a 400 nm (luz violeta), a 680 nm (luz vermelha) e a 800 nm (próximo à luz infravermelha).
B. A luz do sol atinge a Terra a uma velocidade de cerca de 0,3 kcal/seg por metro quadrado. Assumindo, para propósito de cálculo, que a luz do sol consiste em luz monocromática de comprimento de onda 680 nm, quantos segundos levariam para que um mol de fótons atingisse um metro quadrado?
C. Assumindo que fossem precisos oito fótons para fixar uma molécula de CO_2 com carboidrato sob condições ótimas (8 a 10 fótons é o valor aceito atualmente), calcule quanto tempo levaria para uma planta de tomate, com uma folha de um metro quadrado de área, fazer um mol de glicose a partir de CO_2. Assuma que fótons atingem a folha na velocidade calculada acima, e que todos os fótons são absorvidos e usados para fixar CO_2.
D. Se são usados 112 kcal/mol para fixar um mol de CO_2 em carboidrato, qual é a eficiência da conversão de energia luminosa em energia química após a captura dos fótons? Assuma novamente que oito fótons de luz vermelha (680 nm) são necessários para fixar uma molécula de CO_2.

14-10 Relembrando o experimento famoso de Joseph Priestley no qual uma planta de menta salvou a vida de um camundongo em uma câmara selada, você decide fazer um experimento análogo para observar o que ocorre quando plantas C_3 e C_4 são confinadas juntas em meio selado. Você coloca uma planta de milho (C_4) e um gerânio (C_3) em uma câmara plástica selada com ar normal (300 partes por milhão de CO_2) sobre um parapeito de janela no seu laboratório. O que acontecerá com as duas plantas? Elas irão competir ou colaborar uma com a outra? Se elas competirem, qual delas ganhará e por quê?

14-11 Examine a folha variegada mostrada na **Figura Q14-2**. Manchas amarelas circundadas por verde são normais, mas não existem manchas verdes circundadas por amarelos. Proponha uma explicação para este fenômeno.



Figura Q14-2 Uma folha variegada de *Aucuba japonica* com manchas verdes e amarelas (Questão 14-11).

REFERÊNCIAS

Gerais

Cramer WA & Knaff DB (1990) Energy Transduction in Biological Membranes: A Textbook of Bioenergetics. New York: Springer-Verlag.
Mathews CK, van Holde KE & Ahern K-G (2000) Biochemistry, 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cummings.
Nicholls DG & Ferguson SJ (2002) Bioenergetics, 3rd ed. London: Academic Press.

A mitocôndria

Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R & Walker JE (1994) Structure at 2.8Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621–628.
Berg HC (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72:19-54.
Boyer PD (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717–749.
Ernster L & Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91:227s–255s.
Frey TG, Renken CW & Perkins GA (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555:196–203.
Pebay-Peyroula E & Brandolin G (2004) Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol* 14:420–425.
Meier T, Polzer P, Diederichs K et al (2005) Structure of the rotor ring of F-type Na^+-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* 308:659–662.
Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144–148.
Nicholls DG (2006) The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757:459–466.
Racker E & Stoeckenius W (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J Biol Chem* 249:662–663.
Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488–1493.
Scheffler IE (1999) Mitochondria. New York/Chichester: Wiley-Liss.
Stock D, Gibbons C, Arechaga I et al. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10:672–679.
Weber J (2007) ATP synthase—the structure of the stator stalk. *Trends Biochem Sci* 32:53–56.

As cadeias transportadoras de elétrons e suas bombas de prótons

Beinert H, Holm RH & Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653–659.
Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS & Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu Rev Biochem* 69:1005–1075.
Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* 33:897–904.
Brandt U (2006) Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69–92.
Chance B & Williams GR (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176:250–254.
Gottschalk G (1997) Bacterial Metabolism, 2nd ed. New York: Springer.
Gray HB & Winkler JR (1996) Electron transfer in proteins. *Annu Rev Biochem* 65:537–556.
Keilin D (1966) The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge: Cambridge University Press.
Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46:2275–2288.
Subramaniam S & Henderson R (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature* 406:653–657.
Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E et al (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8Å. *Science* 272:1136–1144.
Wikstrom M & Verkhovsky MI (2006) Towards the mechanism of proton pumping by the haem-copper oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1757:1047–1051.

Os cloroplastos e a fotossíntese

Blankenship RE (2002) Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Oxford, UK: Blackwell Scientific.
Bassham JA (1962) The path of carbon in photosynthesis. *Sci Am* 206:88–100.
Deisenhofer J & Michel H (1989) Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J* 8:2149–2170.
Edwards GE, Furbank RT, Hatch MD & Osmond CB (2001) What does it take to be c(4)?—lessons from the evolution of c(4) photosynthesis. *Plant Physiol* 125:46–49.
Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K et al (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831–1838.
Iwata S & Barber J (2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr Opin Struct Biol* 14:447–453.
Jordan P, Fromme P, Witt HT et al (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. *Nature* 411:909–917.
Merchant S & Sawaya MR (2005) The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *The Plant Cell* 17:648–663.
Nelson N & Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:971–982.

Os sistemas genéticos de mitocôndrias e de plastídeos

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.
Balaban RS, Nemoto S & Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483–495.
Bendich AJ (2004) Circular chloroplast genomes:The grand illusion. *The Plant Cell* 16:1661–1666.
Birky CW, Jr (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11331–11338.
Bullerwell CE & Gray MW (2004) Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol* 7:528–534.
Cavalier-Smith T (2002) Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol* 12:R62–R64.
Chen XJ & Butow RA (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev Genet* 6:815–825.
Clayton DA (2000) Vertebrate mitochondrial DNA—a circle of surprises. *Exp Cell Res* 255:4–9.
Daly DO & Whelan J (2005) Why genes persist in organelle genomes. *Genome Biol* 6:110.
de Duve C (2007) The origin of eukaryotes: A reappraisal. *Nature Rev Genet* 8:395–403.
Dyall SD, Brown MT & Johnson PJ (2004) Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304:253–257.
Hoppins S, Lackner L & Nunnari J (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751–80.
Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482–1488.

A evolução das cadeias transportadoras de elétrons

Blankenship RE & Bauer CE (eds) (1995) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Dordrecht: Kluwer.
de Las Rivas J, Balsera M & Barber J (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends Plant Sci* 9:18–25.
Orgel LE (1998) The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem Sci.* 23:491–495.
Schafer G, Purschke W & Schmidt CL (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol Rev* 18:173–188.
Skulachev VP (1994) Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65:271–284.

Mecanismos da Comunicação Celular

15

A formação de um organismo multicelular exige que as células se comuniquem, bem como ocorre com os seres humanos, os quais necessitam da comunicação para se organizarem em uma sociedade complexa. E, assim como a comunicação humana envolve mais do que a passagem de ruídos da boca para o ouvido, a comunicação célula-célula envolve mais do que a transmissão de sinais químicos pelo espaço entre uma célula e outra. Mecanismos intracelulares complexos são necessários para controlar o tipo de sinais emitidos, assim como o tempo, e para permitir que a célula receptora dos sinais os interprete e os use para conduzir seu comportamento. De acordo com registros fósseis, organismos multicelulares sofisticados só apareceram 2,5 milhões de anos depois da existência, na Terra, de organismos unicelulares semelhantes aos procariotos atuais. Esta longa demora pode refletir a dificuldade no desenvolvimento de sistemas de linguagem das células animais, vegetais e fúngicas – a maquinaria que permite às células que têm em comum o mesmo genoma colaborar e coordenar seu comportamento, especializando-se de diferentes formas e subordinando sua chance de sobrevivência individual aos interesses do organismo multicelular como um todo. Esses mecanismos de comunicação célula-célula, altamente evoluídos, são o assunto deste capítulo.

A comunicação entre as células é mediada, principalmente, por **moléculas-sinal extracelulares.** Algumas delas atuam a longas distâncias, sinalizando para células distantes; outras sinalizam apenas para células vizinhas. A maioria das células em um organismo multicelular emite e recebe sinais. A recepção dos sinais depende das *proteínas receptoras*, geralmente (mas nem sempre) localizadas na superfície celular, às quais as moléculas-sinal se ligam. A ligação ativa o receptor, o qual, por sua vez, ativa uma ou mais *vias intracelulares de sinalização*. Estas transmitem cadeias de moléculas – principalmente *proteínas sinalizadoras intracelulares* – processam o sinal dentro da célula receptora e o distribuem para os alvos intracelulares apropriados. Estes alvos geralmente são *proteínas efetoras,* as quais são alteradas quando a via de sinalização está ativada e implementam a mudança comportamental apropriada na célula. Dependendo do sinal, do estado e da natureza da célula receptora, estes efetores podem ser, entre outros, proteínas reguladoras de genes, canais iônicos, componentes de uma via metabólica, ou partes do citoesqueleto (**Figura 15-1**).

Iniciaremos o capítulo com a discussão dos princípios gerais da comunicação celular. A seguir, discutiremos as principais famílias de receptores de superfície e as respectivas vias de sinalização ativadas por elas. O enfoque principal do capítulo será as células animais, mas encerraremos considerando algumas características especiais da comunicação celular em plantas.

Neste capítulo

PRINCÍPIOS GERAIS DA COMUNICAÇÃO CELULAR 879

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS À PROTEÍNA G E MEDIADORES INTRACELULARES PEQUENOS 904

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS A ENZIMAS 921

VIAS DE SINALIZAÇÃO DEPENDENTES DE PROTEÓLISE REGULADA DE PROTEÍNAS REGULADORAS GÊNICAS LATENTES 946

SINALIZAÇÃO EM PLANTAS 955

PRINCÍPIOS GERAIS DA COMUNICAÇÃO CELULAR

Muito tempo antes de os organismos multicelulares terem aparecido na Terra, os organismos unicelulares já haviam desenvolvido mecanismos para responder às mudanças físicas e químicas no seu ambiente. Estes certamente incluem mecanismos de resposta à presença de outras células. As evidências provêm de estudos dos organismos unicelulares atuais como bactérias e leveduras. Apesar de estas células terem vida independente, elas podem se comunicar e influenciar mutuamente seu comportamento. Por exemplo, muitas bactérias respondem a sinais químicos secretados por suas vizinhas cuja concentração aumenta com o aumento da densidade populacional. Esse processo, chamado de *sensação do número mínimo suficiente*, permite à bactéria coordenar seu comportamento, incluindo mobilidade, produção de antibiótico, formação de esporos e conjugação sexual.

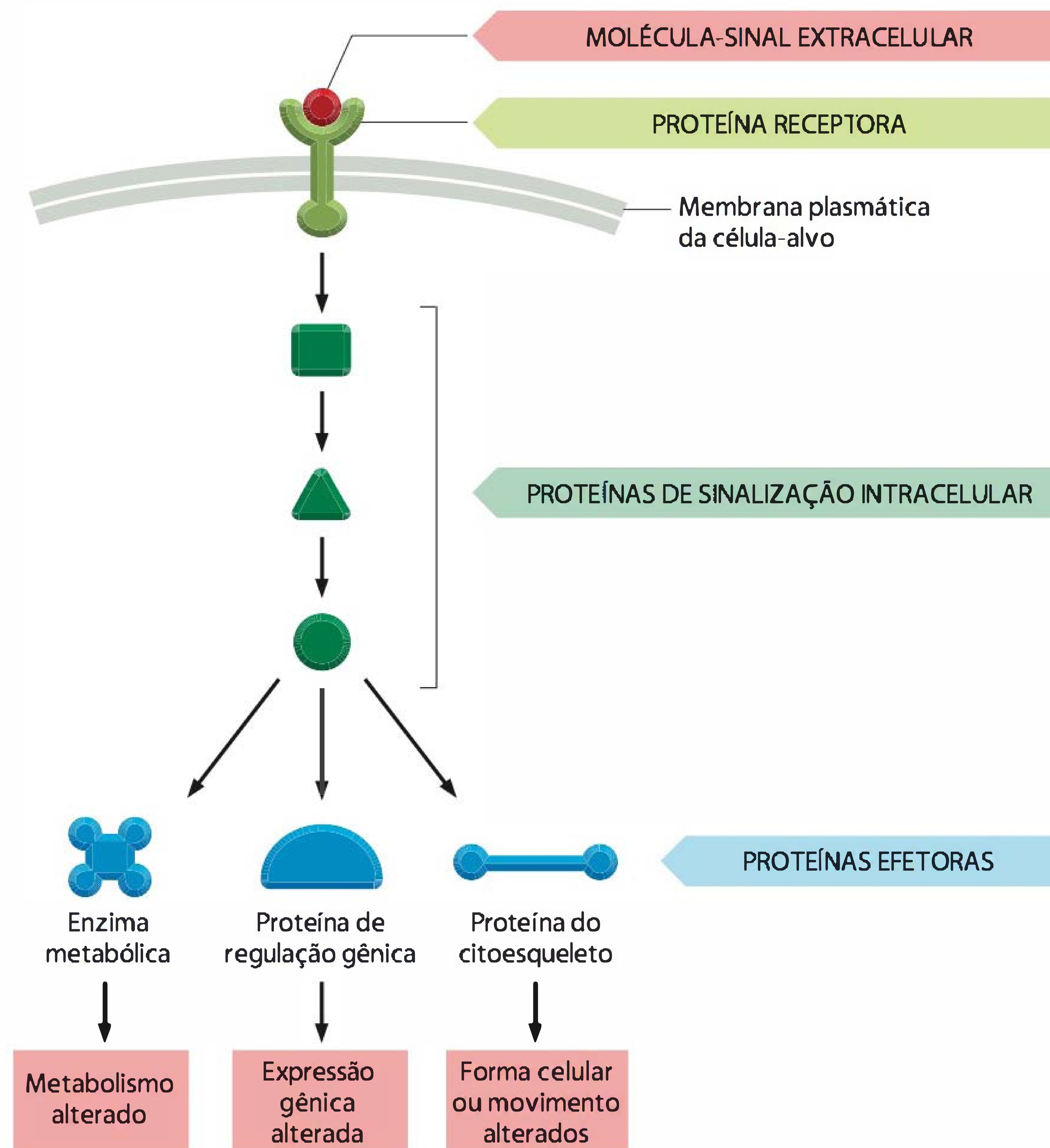


Figura 15-1 Via de sinalização intracelular simples ativada por uma molécula-sinal extracelular. A molécula-sinal geralmente se liga a uma proteína receptora inserida na membrana plasmática da célula-alvo e ativa uma ou mais vias intracelulares mediadas por uma série de proteínas sinalizadoras. Finalmente, uma ou mais dessas proteínas alteram a atividade de proteínas efetoras, alterando, assim, o comportamento da célula.

Similarmente, as células de leveduras se comunicam umas com as outras na preparação para o acasalamento. A levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae* constitui um exemplo bem-documentado: quando um indivíduo haploide está pronto para acasalar, ele secreta um *fator de acasalamento* peptídico que sinaliza para as células do "sexo" oposto pararem de proliferar e se prepararem para o acasalamento (**Figura 15-2**). A fusão de duas células haploides de "sexos" opostos produz uma célula diploide, a qual pode sofrer meiose e esporular, gerando células haploides com um novo sortimento de genes (ver Figura 21-3B). O rearranjo dos genes por meio da reprodução sexual ajuda na sobrevivência da espécie em ambientes com variações imprevisíveis (conforme discutido no Capítulo 21).

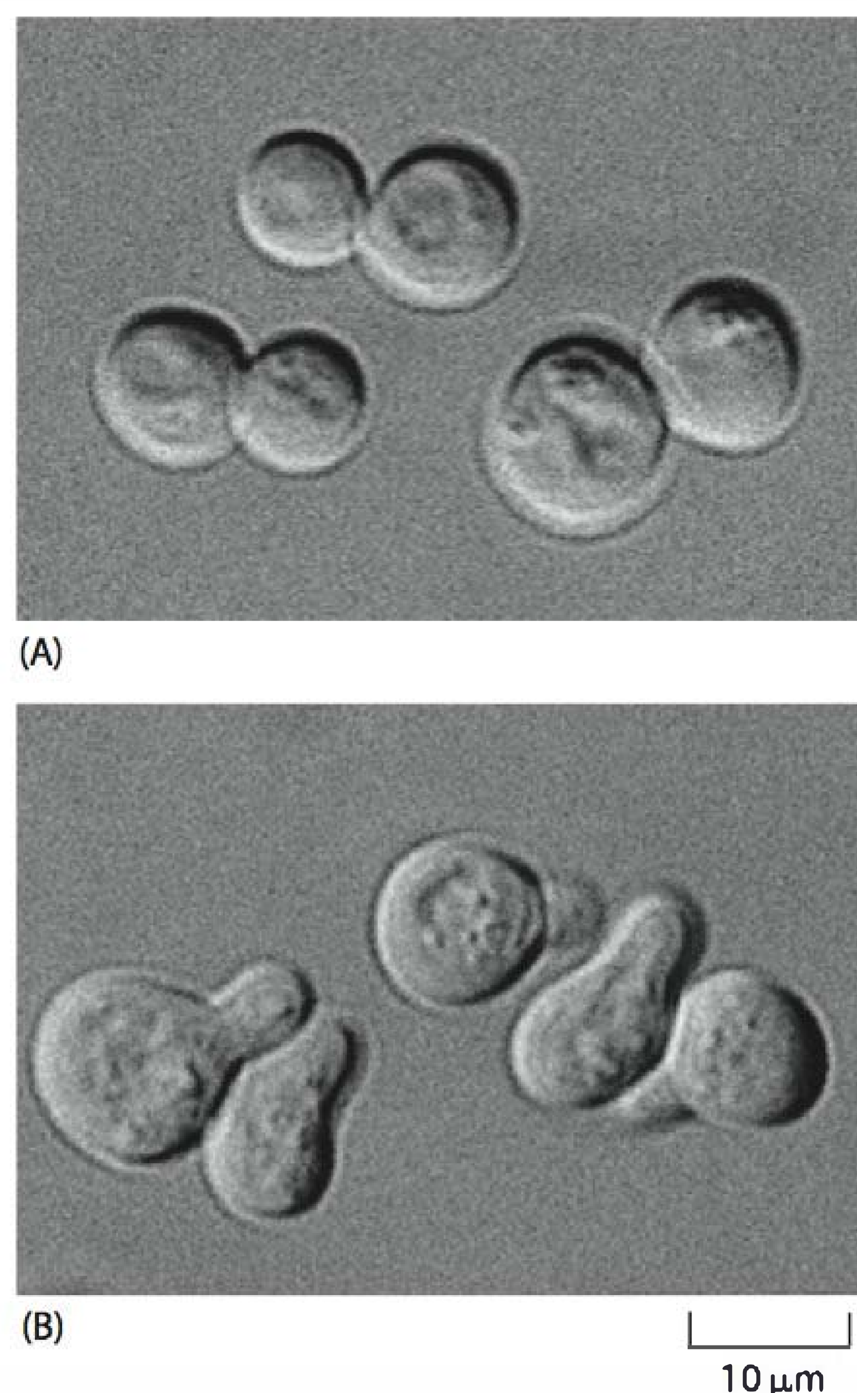


Figura 15-2 Células de levedura de brotamento respondem ao fator de acasalamento. (A) As células normalmente são esféricas. (B) Em resposta ao fator de acasalamento secretado pelas leveduras vizinhas, as células se preparam para o acasalamento emitindo um prolongamento na direção da fonte do fator. (Cortesia de Michael Snyder.)

Os estudos com mutantes de leveduras incapazes de acasalar têm possibilitado a identificação de muitas proteínas envolvidas no processo de sinalização. Essas proteínas compõem uma rede de sinalização que inclui receptores de superfície celular, proteínas que se ligam a GTP e proteína-cinases, tendo, cada um deles, parentes próximos entre as proteínas envolvidas com a sinalização nas células animais. Contudo, devido à duplicação e à divergência gênicas, os sistemas de sinalização das células animais tornaram-se muito mais elaborados do que os das leveduras; o genoma humano, por exemplo, contém mais de 1.500 genes que codificam proteínas receptoras, e o número de proteínas receptoras diferentes é ainda mais aumentado pelo *splicing* alternativo do RNA e por modificações pós-traducionais.

O grande número de proteínas-sinal, receptores e proteínas de sinalização intracelular usadas pelos animais pode ser agrupado em um número bem menor de famílias proteicas, sendo que a maioria delas mostra uma alta conservação evolutiva. As moscas, os vermes e os mamíferos usam uma maquinaria muito similar na comunicação celular, e muitas vias de sinalização e seus componentes-chave foram descobertos em primeiro lugar por meio de análises de mutações em *Drosophila* e *C. elegans*.

As moléculas-sinal extracelulares se ligam a receptores específicos

Nos animais multicelulares, as células se comunicam por meio de centenas de tipos diferentes de moléculas-sinal. Estas incluem proteínas, peptídeos pequenos, aminoácidos,

nucleotídeos, esteroides, retinóis, derivados de ácidos graxos, e mesmo gases dissolvidos, como óxido nítrico e monóxido de carbono. A maioria dessas moléculas é liberada pela célula sinalizadora no espaço extracelular por exocitose, conforme discutido no Capítulo 13. Algumas, contudo, são enviadas por difusão através da membrana celular, enquanto outras são expostas na superfície externa da célula e permanecem ligadas a ela, sinalizando para outras células somente quando entram em contato. As proteínas transmembrana são utilizadas neste tipo de sinalização. Alternativamente, seus domínios extracelulares podem ser liberados da superfície da célula, por proteólise, e atuam à distância.

Independentemente da natureza do sinal, a *célula-alvo* responde por meio de um **receptor**, ao qual a molécula-sinal se liga de forma específica, iniciando uma resposta na célula-alvo. As moléculas-sinal extracelulares frequentemente atuam em concentrações muito baixas ($\leq 10^{-8}$ M), e os receptores que as reconhecem, de modo geral, ligam-se a elas com uma alta afinidade (constante de afinidade $K_a \geq 10^8$ litros/mol; ver Figura 3-43).

Na maioria dos casos, essas moléculas são proteínas transmembrana expostas na superfície da célula-alvo. Ao se ligarem a uma molécula-sinal extracelular (*um ligante*), esses receptores são ativados e geram uma cascata de sinais intracelulares, que alteram o comportamento da célula. Em outros casos, os receptores proteicos são intracelulares, e a molécula-sinal tem que penetrar a célula-alvo para se ligar a eles: isso requer que ela seja suficientemente pequena e hidrofóbica para que possa se difundir através da membrana plasmática (**Figura 15-3**).

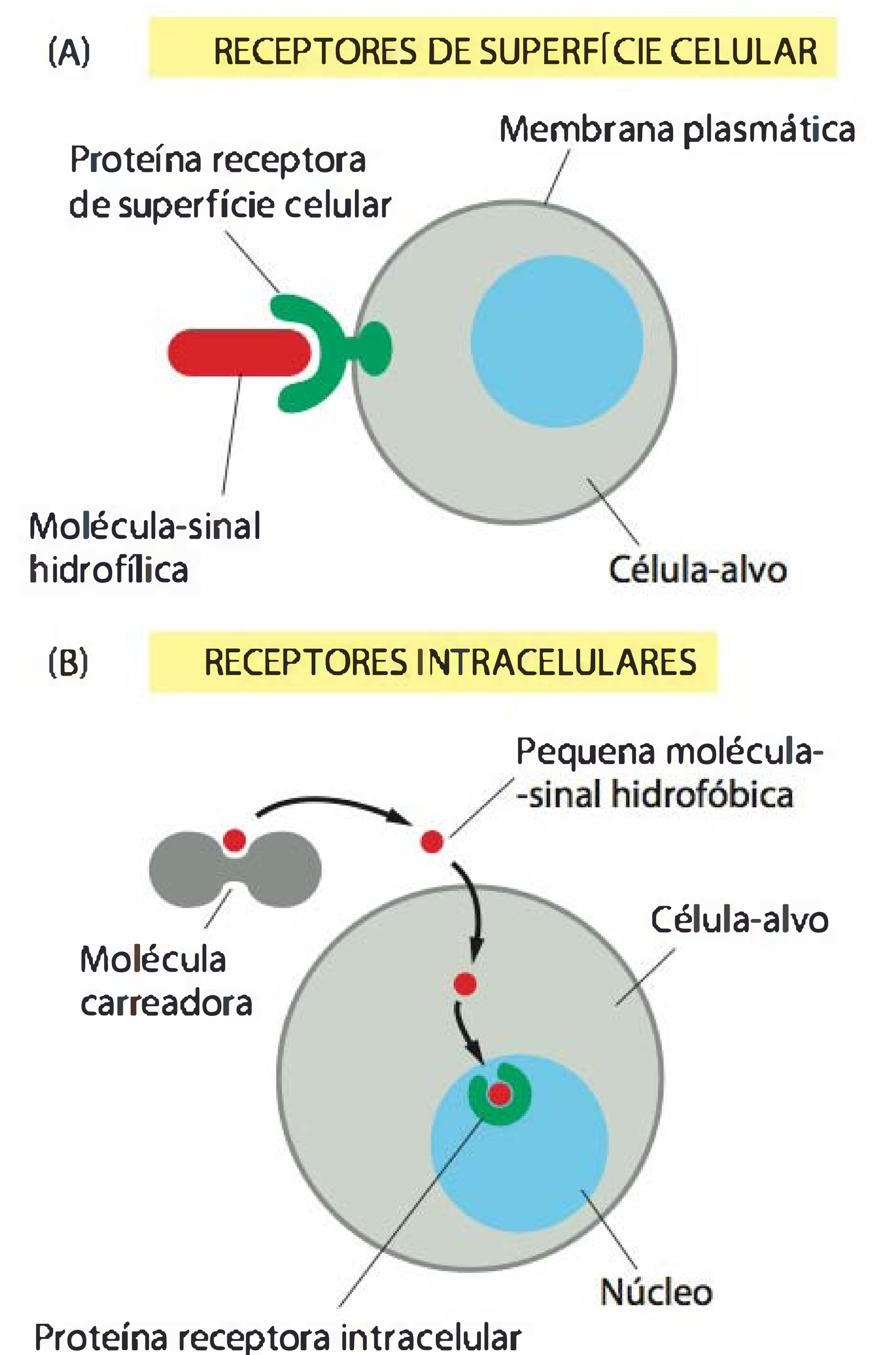


Figura 15-3 Ligação de moléculas-sinal extracelulares aos receptores de superfície e intracelulares. (A) A maioria das moléculas-sinal é hidrofílica e, por isso, incapaz de atravessar a membrana da célula-alvo; elas se ligam a receptores de superfície que, por sua vez, geram sinais no interior da célula-alvo (ver Figura 15-1). (B) Em contraste, algumas moléculas-sinal pequenas se difundem através da membrana plasmática e se ligam a proteínas receptoras no interior da célula-alvo – no citosol ou no núcleo (conforme mostrado na figura). Muitas destas moléculas pequenas são hidrofóbicas e praticamente insolúveis em soluções aquosas; por isso, são transportadas, na corrente sanguínea ou em outros fluidos extracelulares, ligadas a proteínas carreadoras, das quais se dissociam antes de entrar na célula-alvo.

As moléculas-sinal extracelulares podem agir a pequenas ou a grandes distâncias

Muitas moléculas-sinal permanecem ligadas à superfície das células e influenciam somente células que estabelecem contato (**Figura 15-4A**). Esta **sinalização dependente de contato** é importante, especialmente durante o desenvolvimento e na resposta imune. Durante o desenvolvimento, essa sinalização às vezes pode atuar em distâncias relativamente grandes, e as células que se comunicam estendem longos prolongamentos para fazer contato umas com as outras.

Na maioria dos casos, entretanto, as moléculas-sinal são secretadas para o fluido extracelular e podem ser levadas para longe, agindo em alvos distantes, ou podem agir como **mediadores locais**, afetando somente as células que estão muito próximas da célula sinalizadora. Este último processo é chamado de **sinalização parácrina** (Figura 15-4B). Geralmente, nessa sinalização, as células sinalizadoras e as células-alvo são de tipos celulares diferentes, mas também podem produzir sinais aos quais elas mesmas respondem: a isso se denomina *sinalização autócrina*. As células cancerosas, por exemplo, frequentemente usam essa estratégia para estimular sua própria sobrevivência e proliferação.

Para que os sinais parácrinos atuem apenas localmente, as moléculas secretadas devem ter sua difusão restrita; por isso, elas com frequência são captadas rapidamente pelas células-alvo das vizinhanças, destruídas por enzimas extracelulares ou imobilizadas pela matriz extracelular. Os *proteoglicanos de heparan sulfato* (discutido no Capítulo 19), na matriz extracelular ou fixados à superfície da célula frequentemente participam na localização da ação das proteínas-sinal secretadas. Eles contêm cadeias laterais longas que se ligam às proteínas-sinal e as imobilizam. Eles também podem controlar a estabilidade destas proteínas, seu transporte através do espaço extracelular, ou sua interação com receptores de superfície celular. Proteínas *antagonistas* secretadas também afetam a distância na qual um sinal parácrino atua. Esses antagonistas se ligam à molécula-sinal ou ao seu receptor de superfície, bloqueando sua atividade, e têm uma participação importante na restrição do alcance efetivo das proteínas secretadas que influenciam nas decisões que as células embrionárias devem tomar com relação ao seu desenvolvimento (discutido no Capítulo 22).

Os organismos grandes, complexos e multicelulares requerem mecanismos de sinalização de longo alcance para coordenar o comportamento de células em partes distantes do corpo. Assim, desenvolveram tipos celulares especializados na comunicação intercelular a grandes distâncias. Os mais sofisticados são as células nervosas, ou neurônios, que estendem longos prolongamentos (axônios) que lhes permitem entrar em contato com células-alvo distantes, onde os prolongamentos terminam em sítios de transmissão de sinais

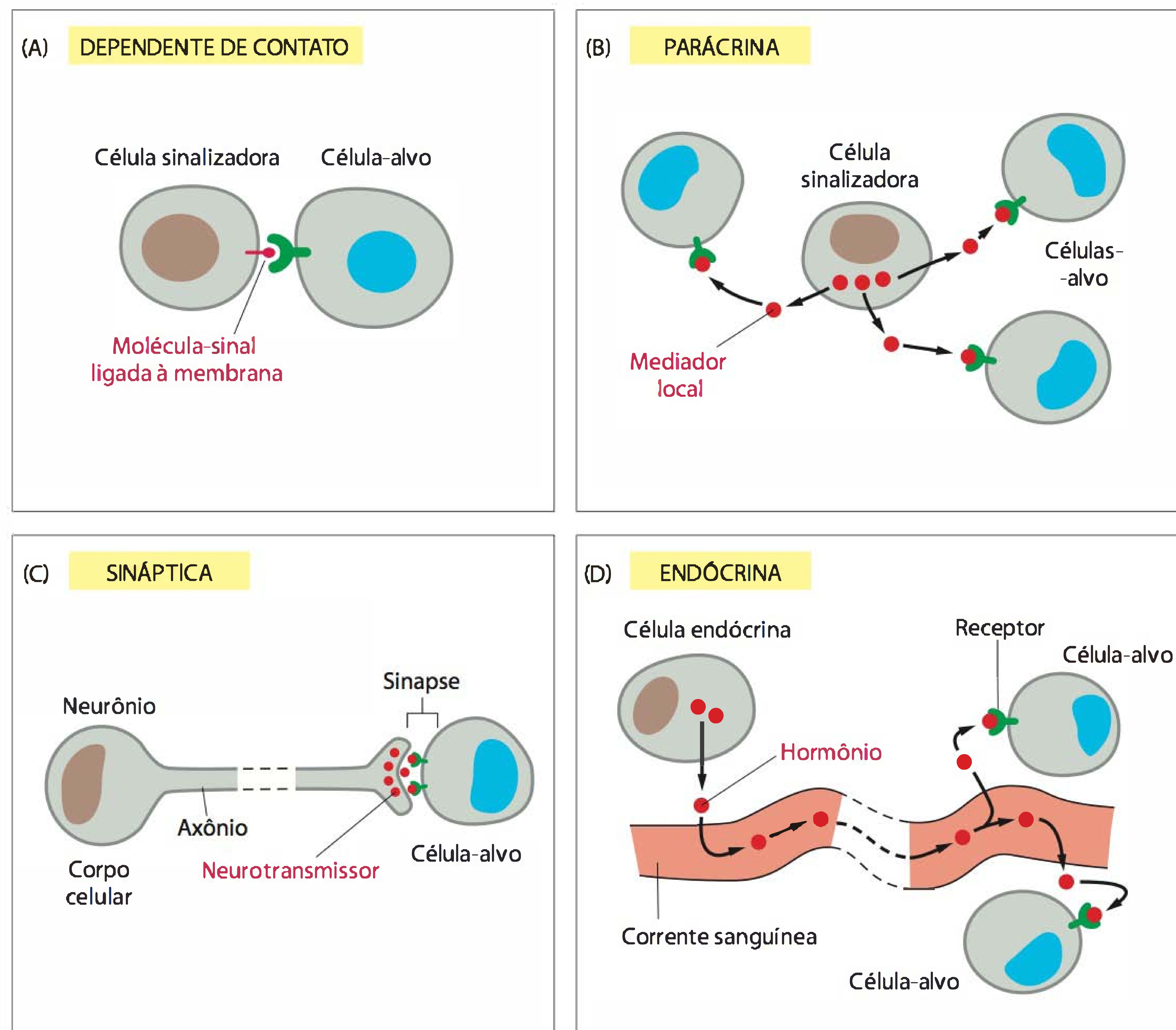


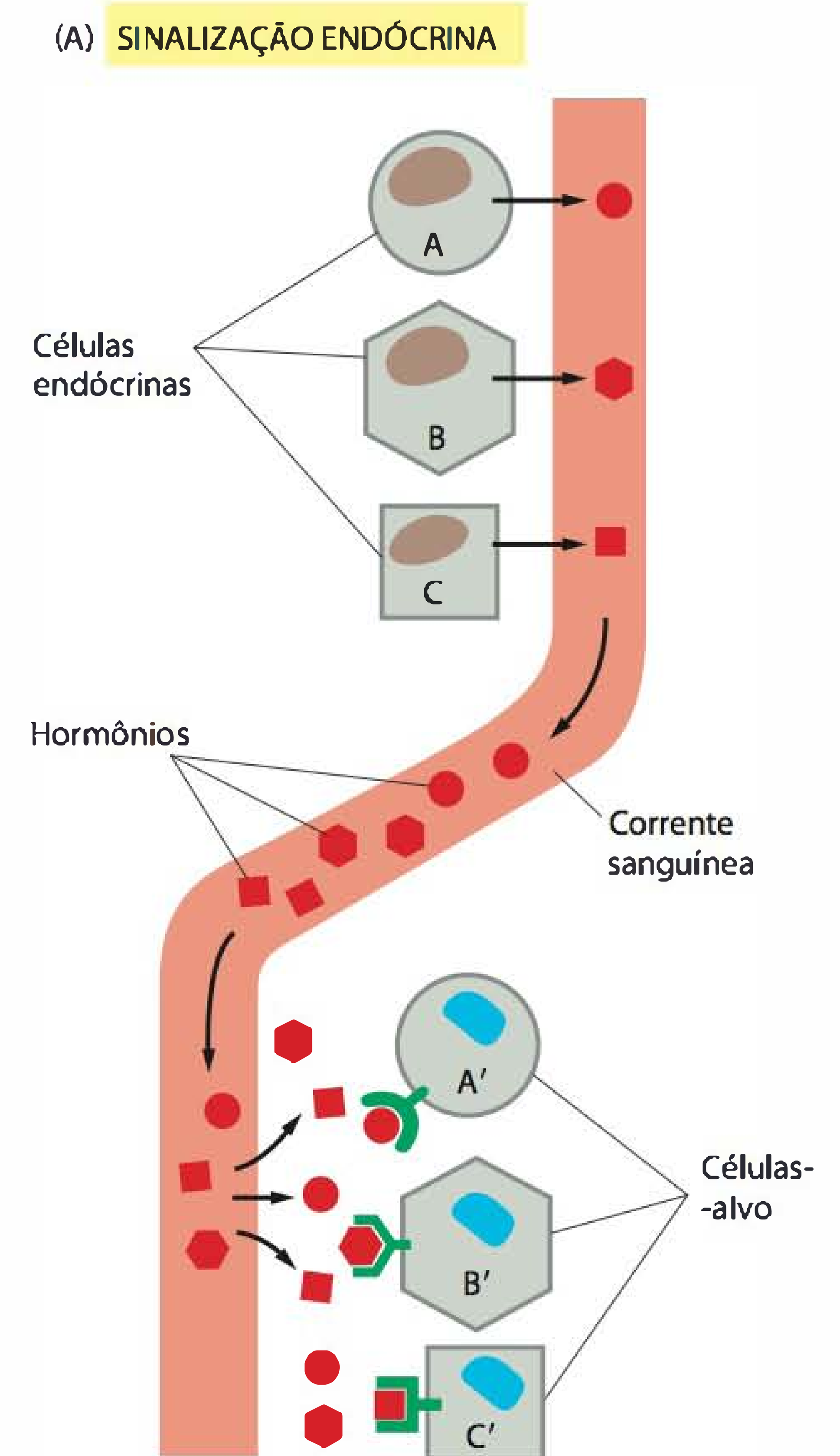
Figura 15-4 Quatro formas de sinalização intercelular. (A) A sinalização dependente de contato requer que as células estejam em contato direto membrana-membrana. (B) A sinalização parácrina depende de sinais liberados no espaço extracelular e atua localmente sobre as células próximas. (C) A sinalização sináptica é realizada por neurônios que transmitem sinais elétricos ao longo de seus axônios e liberam neurotransmissores nas sinapses, que frequentemente estão localizadas longe do corpo celular neuronal. (D) A sinalização endócrina depende das células endócrinas que secretam hormônios para a corrente sanguínea, de onde são distribuídos para todo o corpo. Muitas moléculas sinalizadoras de um mesmo tipo participam nas sinalizações parácrina, sináptica e endócrina: as diferenças básicas estão na velocidade e na seletividade com que os sinais são enviados para seus alvos.

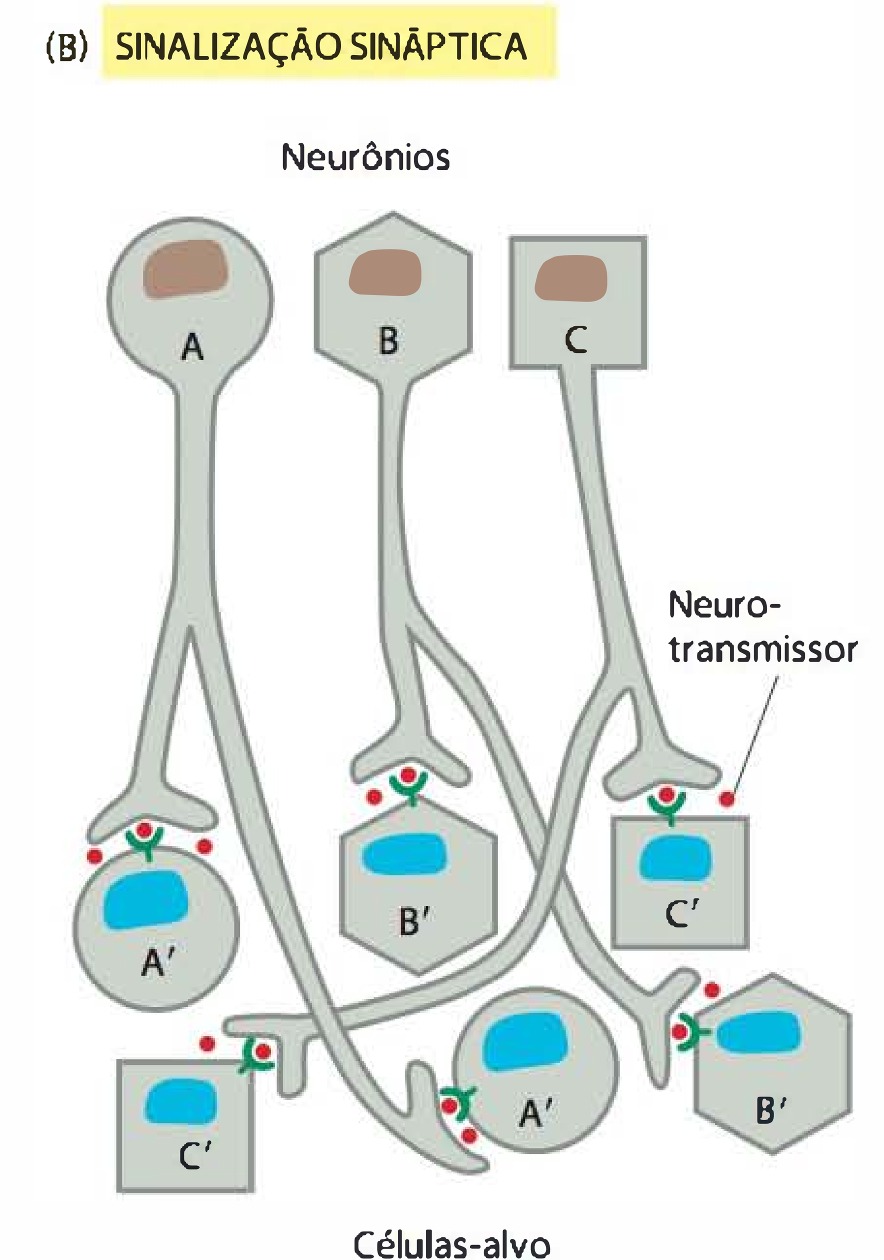
especializados conhecidos como *sinapses químicas*. Quando ativado por estímulos do meio ou de outras células nervosas, o neurônio envia impulsos elétricos (potenciais de ação) ao longo do seu axônio; quando um impulso desse tipo alcança a sinapse na extremidade do axônio, desencadeia a secreção de um sinal químico que atua como **neurotransmissor**. A estrutura firmemente organizada da sinapse assegura que o neurotransmissor seja liberado especificamente aos receptores na célula-alvo pós-sináptica (Figura 15-4C). Os detalhes desse processo de **sinalização sináptica** são discutidos no Capítulo 11.

Uma estratégia bem diferente de sinalização a longa distância faz uso das **células endócrinas.** Essas células secretam suas moléculas-sinal, chamadas de **hormônios**, na corrente sanguínea, que se encarrega de transportá-las por todo o corpo, permitindo que atuem sobre as células-alvo que podem estar em qualquer lugar do corpo (Figura 15-4D).

Os mecanismos que permitem às células endócrinas e aos neurônios coordenar a longa distância o comportamento celular nos animais são comparados na **Figura 15-5**. A sinalização endócrina é relativamente lenta, pois depende da difusão e do fluxo sanguíneo. A sinalização sináptica, ao contrário, é muito mais rápida e precisa. As células nervosas podem transmitir informações a longas distâncias, por impulsos elétricos que viajam a velocidades de até 100 m por segundo; uma vez liberado pelo terminal nervoso, o neurotransmissor precisa difundir menos de 100 nm para alcançar a célula-alvo, o que é conseguido em menos de um milissegundo. Outra diferença entre a sinalização endócrina e a nervosa é que, enquanto os hormônios são diluídos na corrente sanguínea e no líquido intersticial, e, assim, devem ser capazes de atuar em concentrações muito baixas ($< 10^{-8}$ M), os neurotransmissores são muito menos diluídos e podem alcançar altas concentrações locais. A concentração de *acetilcolina* na fenda sináptica de uma junção neuromuscular ativa, por exemplo, é de 5×10^{-4} M. De modo correspondente, os receptores dos neurotransmissores têm uma afinidade relativamente baixa por seus ligantes, o que significa que podem se dissociar rapidamente do receptor, para extinguir a resposta. Além disso, após sua liberação do terminal nervoso, o neurotransmissor é removido rapidamente da fenda sináptica pela ação de enzimas hidrolíticas específicas que o destroem, ou por proteínas transportadoras específicas de membrana que o bombeiam de volta para o terminal nervoso, ou para as cé-

Figura 15-5 Comparação entre as estratégias endócrina e neuronal na sinalização de longo alcance. Nos animais complexos, as células endócrinas e as células nervosas atuam juntas na coordenação das atividades de células em partes distantes do corpo. Enquanto as diferentes células endócrinas devem utilizar diferentes hormônios para se comunicar especificamente com suas células-alvo, diferentes células nervosas podem usar o mesmo neurotransmissor e, ainda assim, comunicam-se de uma forma altamente específica. (A) As células endócrinas secretam os hormônios para o sangue, e estes atuam somente naquelas células-alvo que possuem os receptores apropriados: os receptores ligam os hormônios específicos, que são "captados" do fluido extracelular pelas células-alvo. (B) Em contraste, na sinalização sináptica a especificidade provém de contatos sinápticos entre a célula nervosa e suas células-alvo específicas. Geralmente, somente a célula-alvo que está em comunicação sináptica com a célula nervosa é exposta ao neurotransmissor liberado pelo terminal nervoso (embora alguns neurotransmissores atuem de modo parácrino, servindo como mediadores locais que influenciam múltiplas células-alvo na área).





lulas gliais vizinhas. Assim, a sinalização sináptica é muito mais precisa do que a endócrina, tanto temporal como espacialmente.

A velocidade da resposta a um sinal extracelular não depende somente do mecanismo de liberação do sinal, mas também da natureza da resposta da célula-alvo. Quando a resposta envolve somente mudanças em proteínas já existentes na célula, ela pode ocorrer muito rapidamente: por exemplo, uma mudança alostérica em um canal iônico controlado por neurotransmissor pode alterar, em milissegundos, o potencial elétrico da membrana plasmática, e as respostas que dependem somente de fosforilação de proteínas podem ocorrer em segundos. Contudo, quando a resposta envolve mudanças na expressão gênica e na síntese de novas proteínas, ela normalmente demora muitos minutos ou horas, não importando o mecanismo de liberação do sinal (**Figura 15-6**).

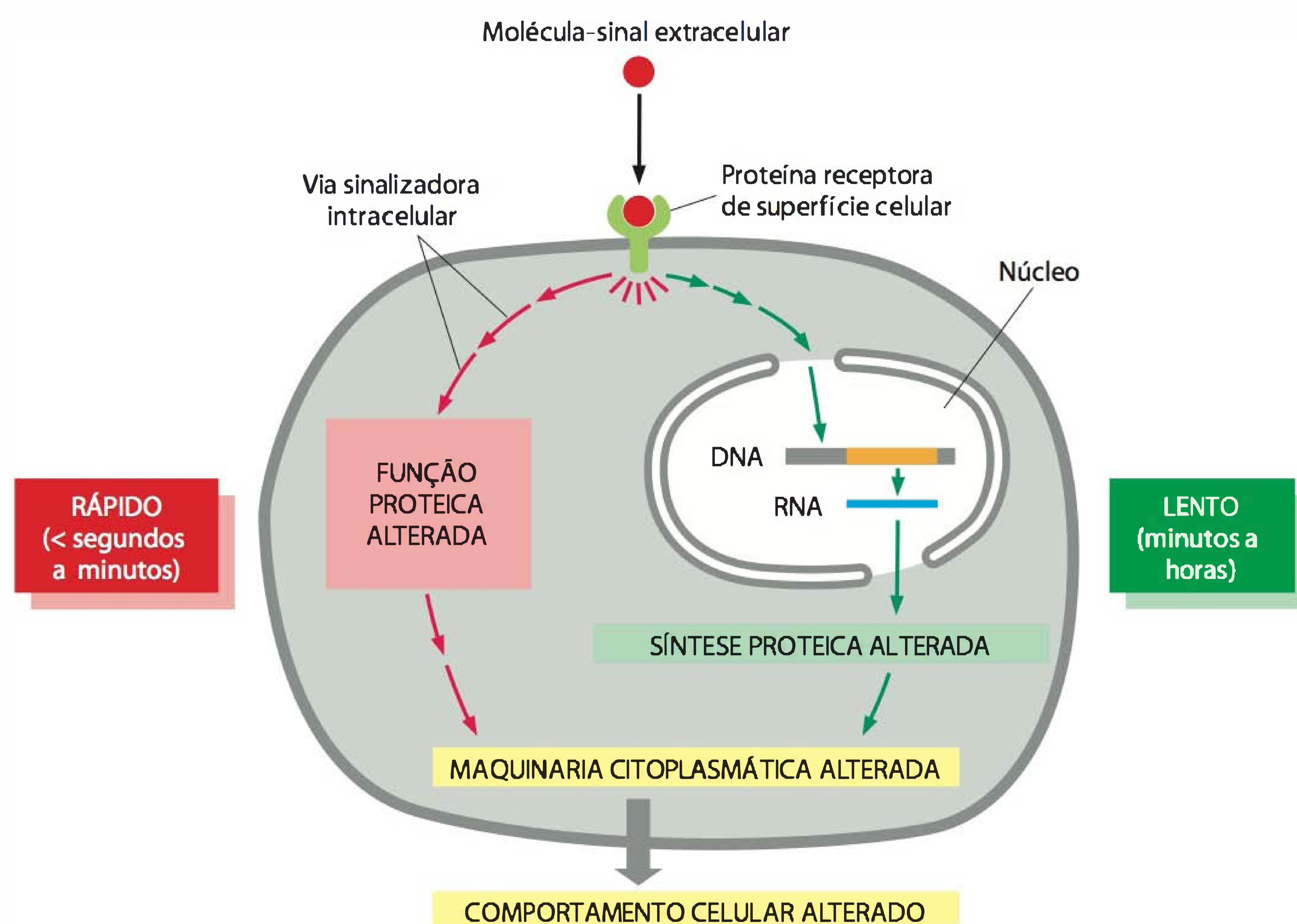


Figura 15-6 Os sinais extracelulares podem agir de modo lento ou rápido na mudança de comportamento da célula-alvo. Determinados tipos de respostas aos sinais, como aumento do crescimento e divisão celular, envolvem mudanças na expressão gênica e síntese de novas proteínas; por isso ocorrem lentamente, com início após uma hora ou mais. Outras respostas – como mudanças no movimento, na secreção, ou no metabolismo celular – não necessitam do envolvimento de alterações na transcrição de genes e por isso são muito mais rápidas, tendo início em segundos ou minutos; estas podem envolver, por exemplo, a fosforilação rápida de proteínas efetoras no citoplasma. As respostas sinápticas mediadas por mudanças no potencial de membrana ocorrem em milissegundos (não-mostrado).

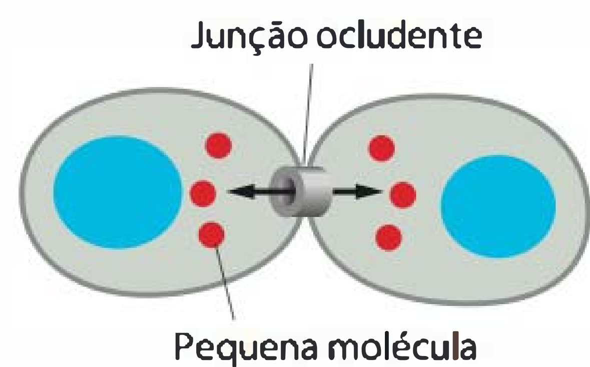


Figura 15-7 Sinalização via junções ocludentes. As células conectadas por junções ocludentes compartilham moléculas pequenas, entre elas moléculas sinalizadoras intracelulares como AMP cíclico e Ca^{2+}, e podem por isso responder de maneira coordenada a sinais extracelulares.

As junções ocludentes permitem que a informação sinalizadora seja compartilhada pelas células vizinhas

As **junções ocludentes** são canais aquosos estritos que conectam o citoplasma de células epiteliais adjacentes, bem como de outros tipos celulares (ver Figura 19-34). Esses canais permitem a troca de íons inorgânicos e outras moléculas hidrossolúveis pequenas, mas excluem as macromoléculas como as proteínas e os ácidos nucleicos. Assim, as células conectadas por junções ocludentes podem se comunicar diretamente, sem a necessidade de transpor a barreira representada pela membrana plasmática (**Figura 15-7**). Dessa maneira, com exceção das pontes citoplasmáticas (ver Figura 21-31), ou da fusão celular, as junções ocludentes proporcionam a mais íntima das formas de comunicação celular.

As junções ocludentes, ao contrário de outras modalidades de sinalização celular, geralmente permitem a comunicação em ambas as direções simetricamente, e seu efeito típico é a homogeneização de condições nas células envolvidas. Elas também podem ser importantes na propagação do efeito de sinais extracelulares que atuam por meio de mediadores intracelulares pequenos, como o Ca^{2+} e o AMP cíclico (discutido mais adiante) que passam pelos canais. No fígado, por exemplo, uma queda nos níveis de glicose sanguínea libera *noradrenalina* (norepinefrina) dos terminais nervosos simpáticos. Esta estimula os hepatócitos a aumentar a degradação do glicogênio e liberar glicose no sangue, uma resposta que depende de um aumento do AMP cíclico intracelular. Contudo, nem todos os hepatócitos têm inervação simpática. Por meio das junções ocludentes que os conectam, os hepatócitos inervados transmitem o sinal aos não-inervados, pelo menos em parte, devido ao movimento do AMP cíclico através dos canais. Como esperado, camundongos com uma mutação no gene principal da junção ocludente expresso no fígado não conseguem mobilizar a glicose normalmente quando os seus níveis diminuem no sangue. As junções ocludentes são discutidas em detalhes no Capítulo 19.

Cada célula está programada para responder a combinações específicas de moléculas-sinal extracelulares

Uma célula típica em um organismo multicelular pode estar exposta a centenas de moléculas-sinal diferentes em seu ambiente. Estas moléculas podem ser solúveis, ou ligadas à matriz extracelular ou, ainda, ligadas à superfície de uma célula vizinha; elas podem ser estimuladoras ou inibidoras; podem atuar em inumeráveis combinações diferentes; e podem influenciar praticamente qualquer aspecto do comportamento celular. A célula deve responder seletivamente a essa confusão de sinais de acordo com sua própria característica específica. Essa característica é adquirida através da especialização celular progressiva no curso do desenvolvimento. Uma célula pode responder a uma combinação de sinais se diferenciando, a uma outra combinação, proliferando, e, ainda, a outra combinação, realizando alguma função especializada, como contração ou secreção. Um dos grandes desafios da biologia celular consiste em entender como uma célula integra todas essas informações para tomar suas decisões críticas – dividir-se, locomover-se, diferenciar-se, e assim por diante. Para a maioria das células dos tecidos animais, mesmo a decisão de continuar vivendo depende da interpretação correta de uma combinação específica de sinais requeridos à sobrevivência. Quando privadas desses sinais (em uma placa de cultura, p. ex.), elas ativam um programa suicida e se matam – geralmente por *apoptose*, uma forma de *morte celular programada* (**Figura 15-8**), como será discutido no Capítulo 18. Como diferentes tipos de células exigem diferentes combinações de sinais de sobrevivência, cada tipo celular está restrito a conjuntos específicos de ambientes no corpo. Muitas células epiteliais, por exemplo, requerem sinais de sobrevivência da lâmina basal sobre a qual elas se acomodam (discutido no Capítulo 19); se perderem o contato com esta lâmina da matriz, elas morrem por apoptose.

Em princípio, as centenas de moléculas-sinal que os animais produzem podem ser usadas para criar um número quase ilimitado de combinações, de forma a controlar de uma maneira altamente específica os diferentes comportamentos de suas células. Um número relativamente pequeno de tipos de moléculas-sinal e de receptores é suficiente. A complexidade encontra-se nas maneiras pelas quais as células respondem às combinações dos sinais que recebem.

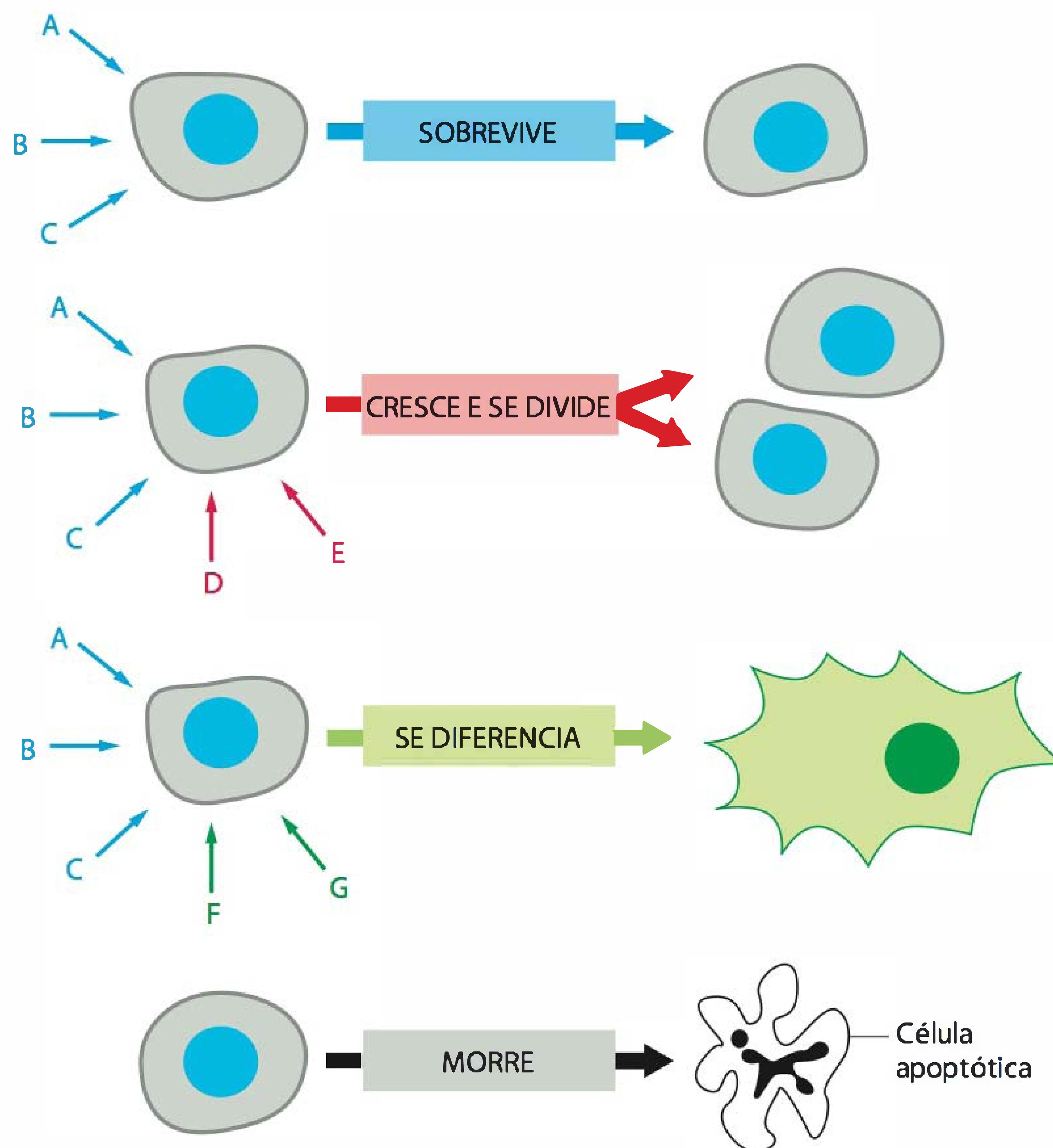


Figura 15-8 Dependência de uma célula animal de múltiplas moléculas-sinal extracelulares. Cada tipo celular exibe um conjunto de receptores que o torna capaz de responder a um conjunto correspondente de moléculas-sinal produzidas por outras células. Essas moléculas regulam o comportamento celular trabalhando de forma coordenada. Como está mostrado na figura, uma célula necessita de múltiplos sinais para sobreviver (*flechas azuis*), e sinais adicionais para crescer e se dividir (*flechas vermelhas*) ou se diferenciar (*flechas verdes*). Se a célula for privada dos sinais de sobrevivência apropriados, ela sofre uma forma de suicídio conhecido como apoptose. A situação real é ainda mais complexa. Apesar de não mostrado, algumas moléculas-sinal extracelulares atuam na inibição destes e de outros comportamentos celulares, ou mesmo na indução da apoptose.

Diferentes tipos celulares respondem diferentemente à mesma molécula-sinal extracelular

A resposta celular aos sinais extracelulares não depende somente das proteínas receptoras, mas também da maquinaria intracelular, por meio da qual a célula integra e interpreta os sinais que recebe. Assim, uma única molécula-sinal normalmente tem diferentes efeitos sobre diferentes tipos de células-alvo. O neurotransmissor acetilcolina (**Figura 15-9**A**)**, por exemplo, reduz a velocidade e a força de contração das células musculares cardíacas (ver

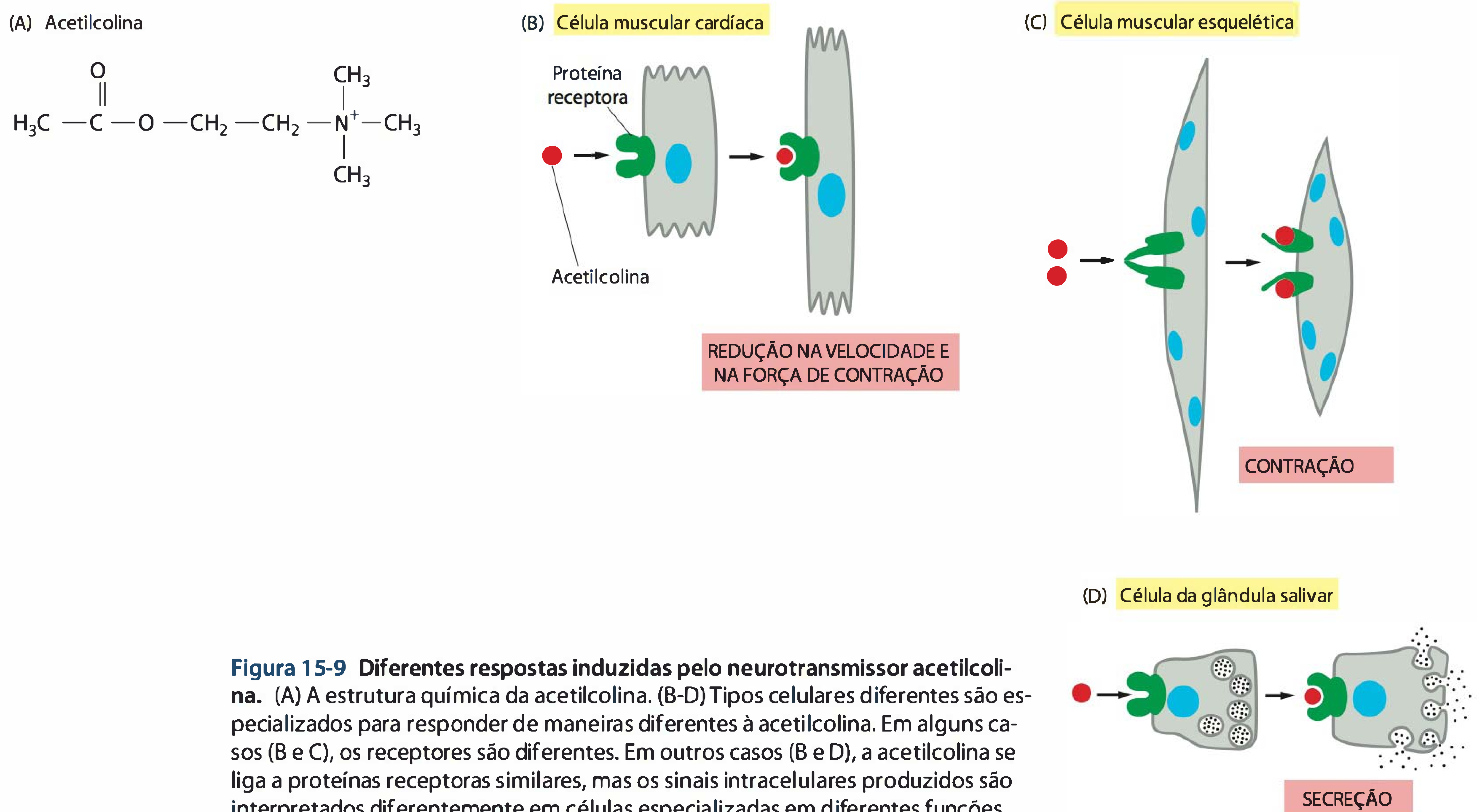


Figura 15-9 Diferentes respostas induzidas pelo neurotransmissor acetilcolina. (A) A estrutura química da acetilcolina. (B-D) Tipos celulares diferentes são especializados para responder de maneiras diferentes à acetilcolina. Em alguns casos (B e C), os receptores são diferentes. Em outros casos (B e D), a acetilcolina se liga a proteínas receptoras similares, mas os sinais intracelulares produzidos são interpretados diferentemente em células especializadas em diferentes funções.

Figura 15-9B), mas estimula a contração das células musculares esqueléticas (ver Figura 15-9C). Neste caso, os receptores de acetilcolina das células musculares esqueléticas são diferentes dos das células cardíacas. No entanto, as diferenças nos receptores nem sempre são a explicação para os efeitos distintos. A mesma molécula-sinal ligada a receptores idênticos geralmente produz respostas muito diferentes em tipos diferentes de células-alvo, como no caso da ligação da acetilcolina ao músculo cardíaco e às células das glândulas salivares (compare as Figuras 15-9B e D). Em alguns casos, isso reflete diferenças entre as proteínas sinalizadoras intracelulares ativadas, enquanto em outros reflete diferenças nas proteínas efetoras ou nos genes ativados. Assim, o próprio sinal extracelular tem pouco conteúdo de informação; ele simplesmente induz a célula a responder de acordo com seu estado predeterminado, que depende da história do desenvolvimento da célula e dos genes específicos expressos.

O desafio para a compreensão de como a célula integra, reage e processa os vários estímulos que recebe é análogo, sob muitos aspectos, ao desafio da compreensão de como o cérebro integra e processa a informação para controlar o comportamento. Em ambos os casos, necessitamos mais do que a lista dos componentes e das conexões no sistema para entender como os processos funcionam. Em uma primeira etapa, temos que levar em consideração alguns princípios básicos relacionados à maneira pela qual a célula responde a um sinal simples de um determinado tipo.

O destino de algumas células em desenvolvimento depende da sua posição no gradiente morfogênico

O mesmo sinal que atua sobre o mesmo tipo celular pode ter, qualitativamente, diferentes efeitos dependendo da concentração do sinal. Como discutiremos no Capítulo 22, essas respostas diferentes da célula a diferentes concentrações da mesma molécula-sinal são críticas no desenvolvimento animal, quando as células se diferenciam.

A molécula-sinal extracelular que atua durante o desenvolvimento se chama **morfógeno**, e, nos casos mais simples, ela se difunde a partir de uma fonte celular localizada (um centro de sinalização), gerando um gradiente de concentração do sinal. As células-alvo escolhem diferentes destinos de acordo com sua posição no gradiente: aquelas mais próximas ao centro de sinalização que encontram a concentração mais alta do morfógeno têm um maior número de receptores ativados e seguem uma via de desenvolvimento, enquanto as células um pouco mais distantes seguem outra, e assim por diante (**Figura 15-10**). Como discutiremos mais adiante (e no Capítulo 22), os diferentes níveis de ativação dos receptores levam a diferenças nas concentrações ou na atividade de uma ou mais proteínas reguladoras gênicas no núcleo de cada célula, o que, por sua vez, resulta em diferentes padrões de expressão gênica. Além disso, mais interações locais entre as células no gradiente frequentemente determinam e estabilizam as escolhas dos diferentes destinos.

Uma célula pode alterar rapidamente a concentração de uma molécula somente se o tempo de vida da molécula for curto

É natural pensar nos sistemas de sinalização em termos das mudanças produzidas quando o sinal extracelular é distribuído. No entanto, é importante considerar também o que acontece quando o sinal é removido. Durante o desenvolvimento, os sinais transitórios com frequência produzem efeitos permanentes: eles podem desencadear uma mudança no desenvolvimento da célula que persiste indefinidamente por meio de mecanismos de memória celular, como será discutido mais tarde (e nos Capítulos 7 e 22). Na maioria dos casos de tecidos adultos, contudo, a resposta desaparece quando o sinal cessa. O efeito é transitório, porque o sinal exerce seu efeito pela alteração de um grupo de moléculas de vida curta (instáveis), que sofrem reposição contínua. Assim, quando o sinal é removido, a substituição das moléculas velhas por novas remove todas as marcas de sua ação. O resultado é que a velocidade com a qual a célula responde à remoção do sinal depende da velocidade de destruição ou de reposição das moléculas afetadas por ele.

É também verdade, embora muito menos óbvio, que a velocidade dessa reposição também determina a rapidez da resposta quando um sinal é emitido. Considere, por exemplo, duas moléculas sinalizadoras intracelulares, **X** e **Y**, cada uma sendo mantida a uma concentração de mil moléculas por célula. A molécula Y é sintetizada e degradada a uma velocidade de cem moléculas por segundo, tendo cada molécula uma vida média de 10 segundos. A

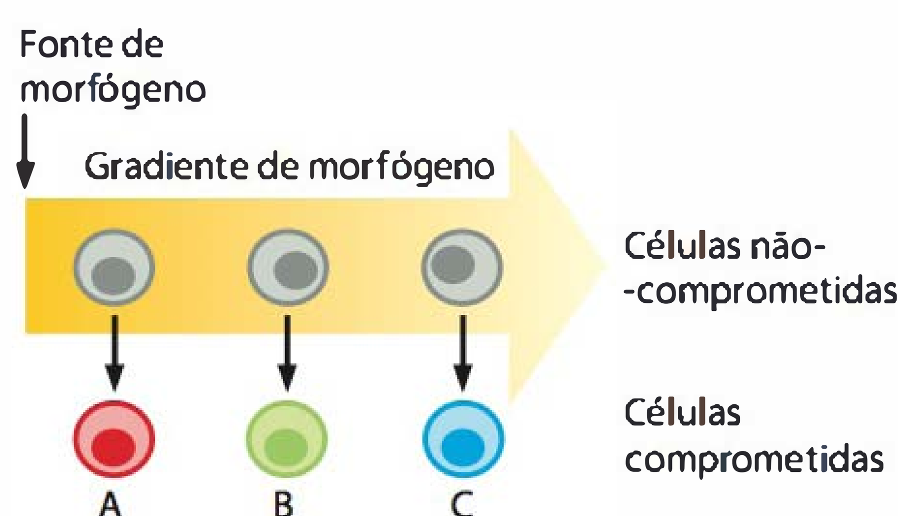


Figura 15-10 As célulasseguem destinos diferentes dependendo de suas posições em um gradiente de morfógeno. Diferentes concentrações do morfógeno induzem a expressão de grupos diferentes de genes, resultando em diferentes destinos celulares (indicados por letras e cores diferentes).

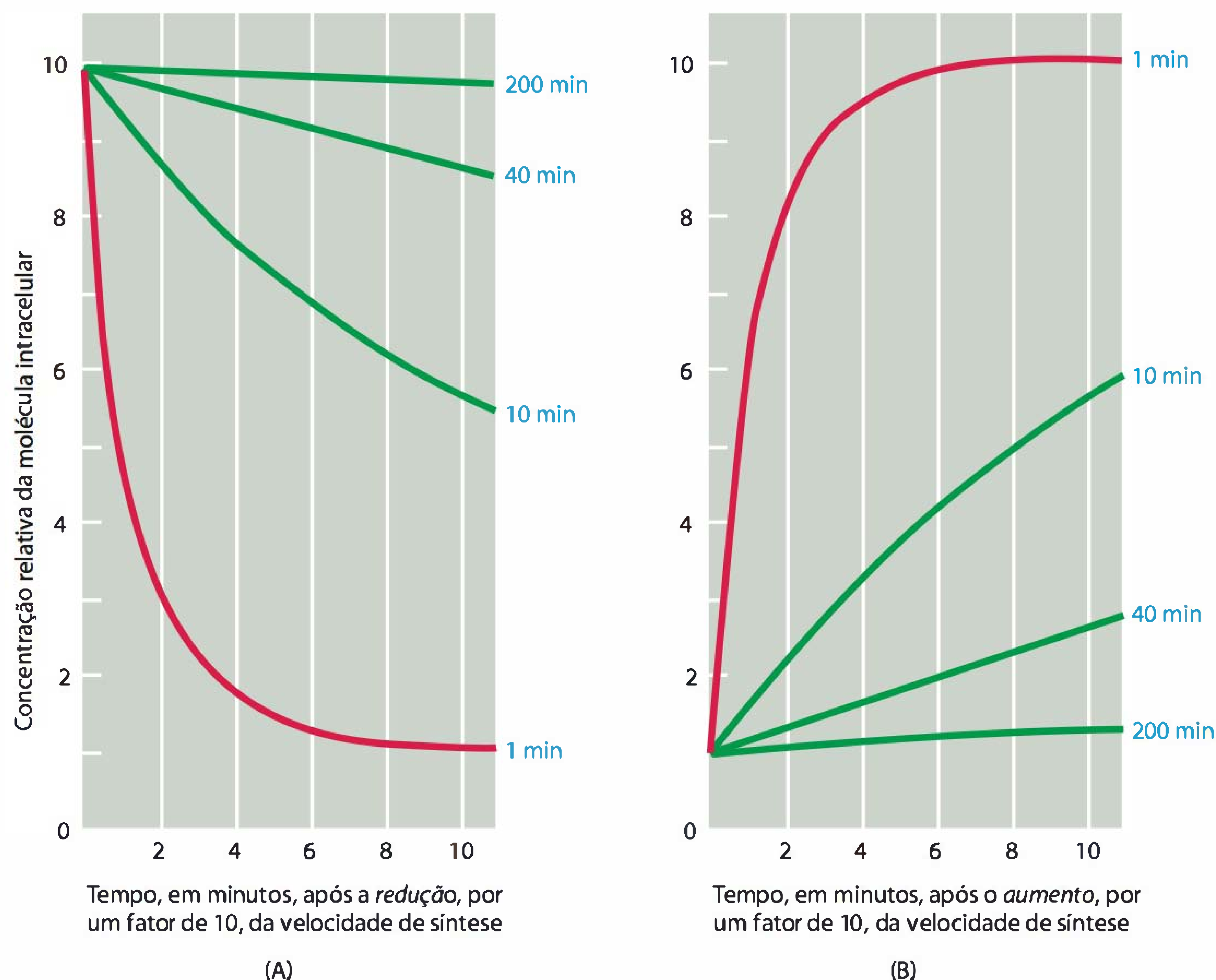


Figura 15-11 A importância da reposição rápida. Os gráficos mostram as velocidades relativas previstas de mudança na concentração intracelular de moléculas com diferentes tempos de reposição quando suas velocidades de síntese são (A) reduzidas ou (B) aumentadas repentinamente, por um fator de 10. Em ambos os casos, as concentrações das moléculas que sofrem degradação rápida dentro da célula (*curvas em vermelho*) são alteradas rapidamente, enquanto as concentrações daquelas que normalmente são degradadas lentamente (*curvas em verde*) são alteradas, proporcionalmente, de forma mais lenta. Os números à direita (*em azul*) correspondem às meias-vidas presumidas para cada uma das diferentes moléculas.

molécula X tem uma velocidade de reposição 10 vezes menor do que a Y: ela é sintetizada e degradada a uma velocidade de 10 moléculas por segundo, de forma que cada molécula tem uma vida média de 100 segundos. Se um sinal atuando na célula aumentar em 10 vezes a velocidade de síntese de ambas as moléculas, sem mudança nas suas vidas médias, ao final de 1 segundo a concentração de Y terá aumentado para aproximadamente 900 moléculas por célula ($10 \times 100 - 100$), enquanto a concentração de X terá aumentado para somente 90 moléculas por célula. De fato, após o aumento ou a diminuição abrupta da velocidade de síntese da molécula, o tempo necessário para que metade das moléculas mude da concentração de equilíbrio antiga para a nova é igual à sua meia-vida normal, isto é, igual ao tempo necessário para que a sua concentração diminua a metade, se a síntese parar completamente (**Figura 15-11**).

Os mesmos princípios se aplicam às proteínas e a pequenas moléculas, quer elas estejam no espaço extracelular ou no interior da célula. Muitas proteínas intracelulares têm meia-vida curta, algumas sobrevivem por menos de 10 minutos. Na maioria dos casos, existem proteínas com funções reguladoras-chave, cujas concentrações intracelulares são reguladas rapidamente por mudanças na sua velocidade de síntese.

Veremos mais tarde que muitas respostas celulares aos sinais extracelulares dependem mais da conversão das proteínas sinalizadoras intracelulares de uma forma inativa para uma forma ativa, do que da sua síntese ou degradação. A fosforilação ou a ligação de GTP, por exemplo, comumente ativa as proteínas sinalizadoras. Mesmo nestes casos, contudo, a ativação deve ser rápida e continuamente revertida (por desfosforilação ou por hidrólise do GTP a GDP, respectivamente, nestes exemplos) para tornar possível a sinalização rápida. Esses processos de inativação são críticos na determinação da magnitude, rapidez e duração da resposta.

O óxido nítrico sinaliza pela regulação direta da atividade de proteínas específicas dentro da célula-alvo

A maior parte deste capítulo ocupa-se com vias de sinalização ativadas por receptores de superfície celular. Porém, antes de discutir estes receptores e as vias, consideraremos resumidamente algumas moléculas-sinal importantes que ativam *receptores intracelulares*. Estas moléculas incluem o óxido nítrico e os hormônios esteroides, os quais serão discutidos em sequência. Embora a maioria dos sinais extracelulares seja moléculas hidrofílicas que se ligam a receptores na superfície da célula-alvo, algumas delas são suficientemente

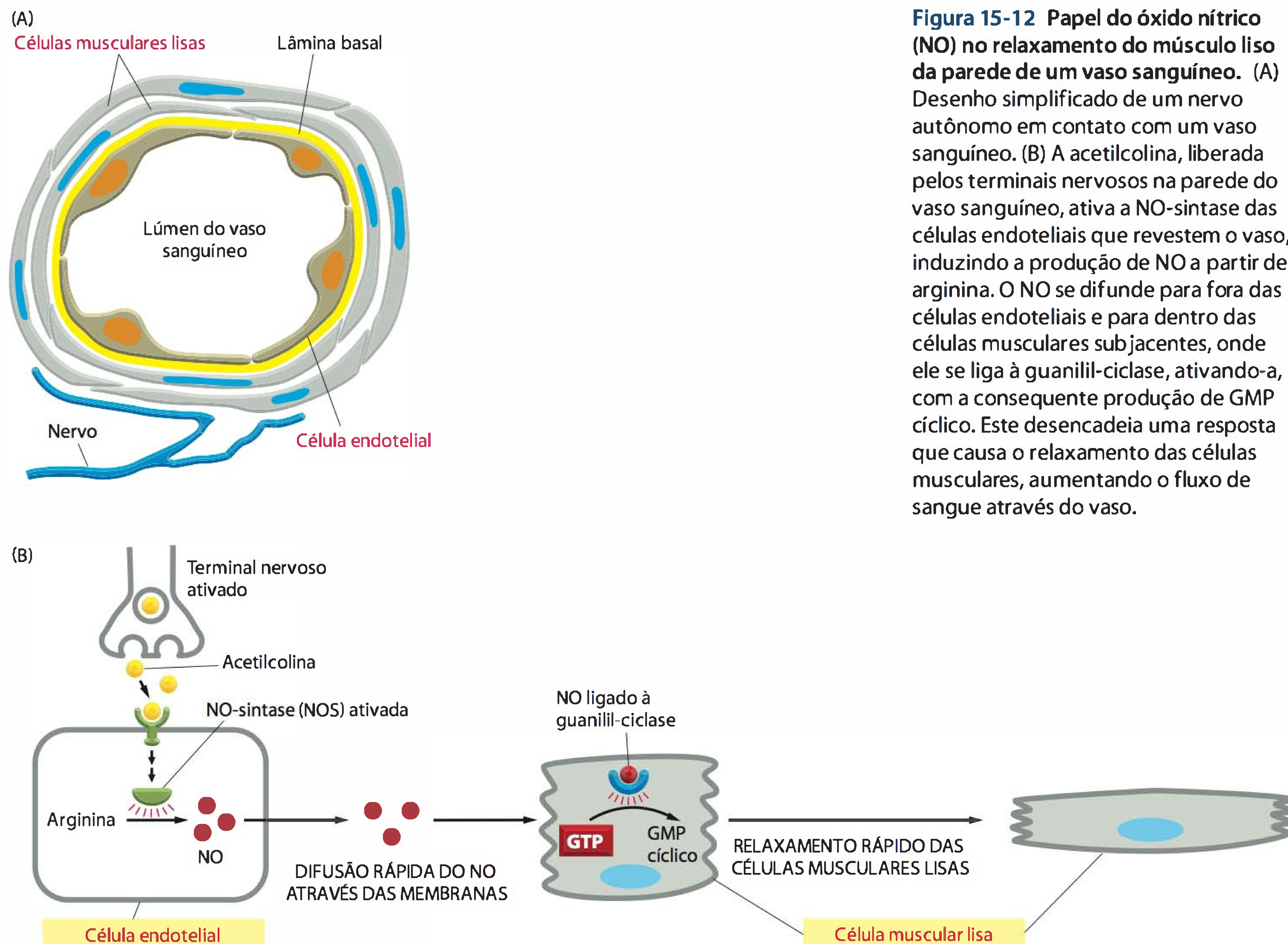


Figura 15-12 Papel do óxido nítrico (NO) no relaxamento do músculo liso da parede de um vaso sanguíneo. (A) Desenho simplificado de um nervo autônomo em contato com um vaso sanguíneo. (B) A acetilcolina, liberada pelos terminais nervosos na parede do vaso sanguíneo, ativa a NO-sintase das células endoteliais que revestem o vaso, induzindo a produção de NO a partir de arginina. O NO se difunde para fora das células endoteliais e para dentro das células musculares subjacentes, onde ele se liga à guanilil-ciclase, ativando-a, com a consequente produção de GMP cíclico. Este desencadeia uma resposta que causa o relaxamento das células musculares, aumentando o fluxo de sangue através do vaso.

hidrofóbicas e/ou suficientemente pequenas para atravessar a membrana plasmática da célula-alvo. Uma vez no interior da célula, elas regulam diretamente a atividade de proteínas intracelulares específicas. Um importante e extraordinário exemplo é o gás **óxido nítrico** (**NO**, *nitric oxide*), que funciona como molécula-sinal tanto em animais como em plantas. Até mesmo algumas bactérias são capazes de detectar concentrações muito baixas de NO e se afastar dele.

Nos mamíferos, uma das muitas funções do NO é a de relaxar a musculatura lisa. Ele tem essa função, por exemplo, nas paredes dos vasos sanguíneos (**Figura 15-12**A). Os nervos autônomos nas paredes dos vasos liberam acetilcolina; a acetilcolina atua sobre as células endoteliais próximas que revestem o interior dos vasos; e as células endoteliais respondem liberando NO, o que causa o relaxamento da musculatura lisa da parede, induzindo o relaxamento dos vasos. Esse efeito do NO sobre os vasos sanguíneos explica o mecanismo de ação da nitroglicerina, que tem sido usada por cem anos no tratamento de pacientes com angina (dor resultante do fluxo sanguíneo inadequado do músculo cardíaco). A nitroglicerina é convertida em NO, o que relaxa os vasos sanguíneos. Isso reduz a carga de trabalho do coração e, como consequência, reduz a necessidade de oxigênio do músculo cardíaco.

Muitos tipos de células nervosas usam o gás NO para enviar sinais às suas vizinhas. O NO liberado pelos nervos autônomos no pênis, por exemplo, causa a vasodilatação local que é responsável pela ereção. O NO também é produzido por macrófagos ativados e neutrófilos, ajudando-os a matar micro-organismos invasores. Nas plantas, o NO está envolvido nas respostas de defesa contra injúria ou infecção.

O gás NO é produzido pela desaminação do aminoácido arginina, catalisada pelas enzimas chamadas de **óxido nítrico-sintases (NOS)** (Figura15-12B). A NOS das células endoteliais é chamada de *eNOS*, enquanto que a das células nervosas e musculares é chamada de *nNOS*. As células nervosas e musculares produzem nNOS constitutivamente, e a enzima é ativada por um influxo de Ca^{2+} para produzir NO quando as células são estimuladas. Os macrófagos, em contraste, produzem outra NOS, chamada de NOS induzível (*iNOS*), pois a produzem somente quando são ativados, geralmente em resposta a uma infecção.

Como o NO dissolvido atravessa a membrana plasmática, ele se difunde rapidamente para fora da célula onde foi produzido e para as células vizinhas. Ele atua apenas localmente, porque tem uma meia-vida curta, de 5 a 10 segundos no espaço extracelular, antes de se converter em nitratos e nitritos pela ação do oxigênio e da água.

Em muitas células-alvo, inclusive nas células musculares lisas, o NO se liga reversivelmente ao ferro no sítio ativo da enzima *guanilil-ciclase*, estimulando-a a produzir a pequena molécula sinalizadora intracelular *GMP cíclico*, a ser descrita mais tarde. Assim, a guanilil-ciclase atua tanto como receptor intracelular para o NO como proteína sinalizadora intracelular (ver Figura 15-12B). O NO pode aumentar o GMP cíclico no citosol em segundos, porque a velocidade normal de reposição do GMP cíclico é alta: a degradação rápida a GMP, por ação de uma *fosfodiesterase* constantemente equilibra a produção de GMP cíclico pela guanilil-ciclase a partir de GTP. O medicamento Viagra, e seus parentes mais novos, inibem a fosfodiesterase no pênis, aumentando, desta forma, o tempo de permanência dos níveis elevados de GMP cíclico na musculatura lisa dos vasos sanguíneos penianos, após sua produção pelos terminais nervosos locais. O GMP cíclico, por sua vez, mantém os vasos sanguíneos relaxados e o pênis ereto.

O NO também pode agir independentemente do GMP cíclico. Ele pode, por exemplo, alterar a atividade de uma proteína intracelular pela nitrosilação covalente de grupos tiol (–SH) em cisteínas específicas da proteína.

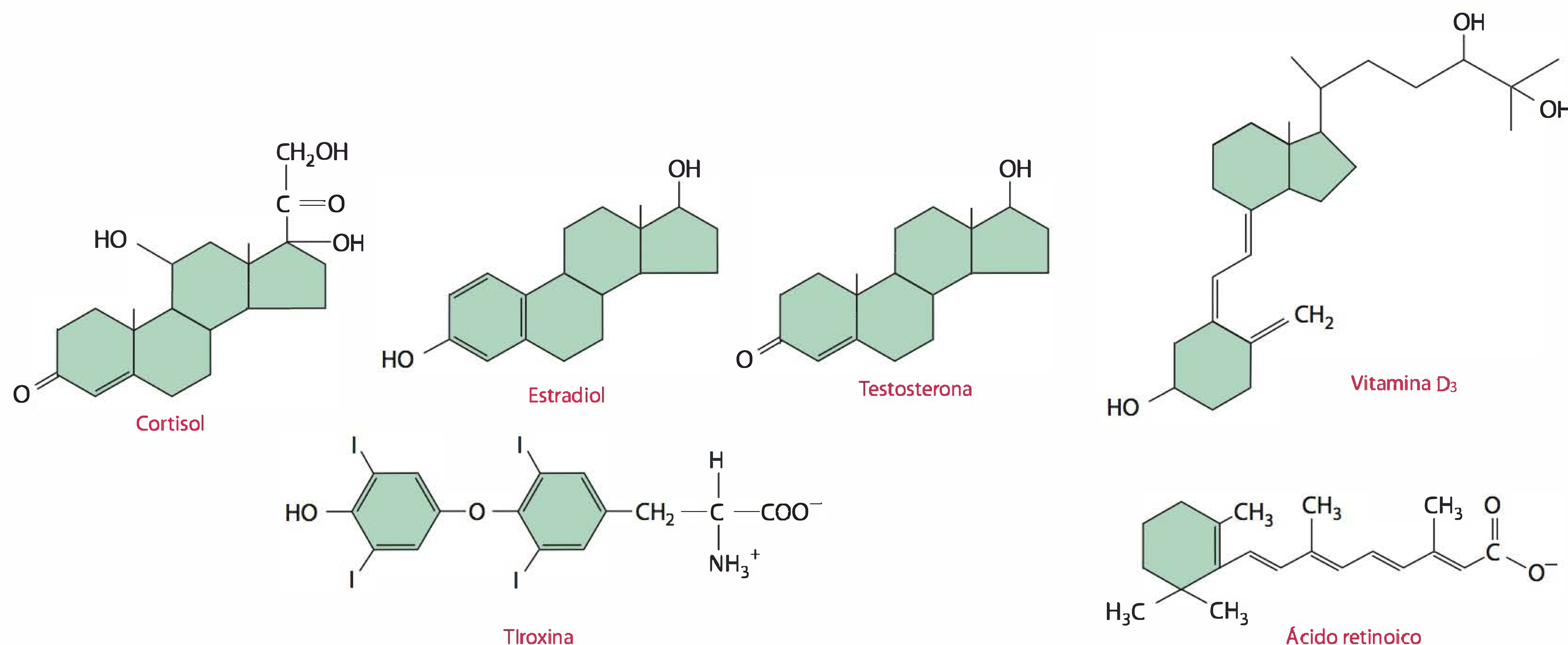
O *monóxido de carbono* (*CO*, *carbon monoxide*) é outro gás usado como um sinal extracelular e, à semelhança do NO, atua estimulando a guanilil-ciclase. Contudo, esses gases não são as únicas moléculas-sinal que podem atravessar a membrana plasmática da célula-alvo, como discutiremos a seguir.

Os receptores nucleares são proteínas reguladoras gênicas moduladas por ligantes

Várias moléculas-sinal pequenas e hidrofóbicas se difundem através da membrana plasmática das células-alvo e se ligam a receptores intracelulares que são proteínas reguladoras gênicas. Entre essas moléculas estão os hormônios esteroides, os hormônios tireóideos, os retinóis e a vitamina D. Embora essas moléculas sejam muito diferentes entre si tanto em estrutura química (**Figura 15-13**), como em função, seu mecanismo de ação é similar. Elas se ligam às suas respectivas proteínas receptoras intracelulares e alteram a capacidade delas de controlar a transcrição de genes específicos. Assim, estas proteínas servem, ao mesmo tempo, como receptores e efetores intracelulares do sinal.

Os receptores são estruturalmente semelhantes, fazendo parte de uma **superfamília de receptores nucleares**. Muitos membros dessa família têm somente a sequência de DNA identificada, e seus ligantes ainda não são conhecidos; essas proteínas são, por isso, conhecidas como *receptores nucleares órfãos*. Presentemente, mais da metade dos 48 receptores nucleares codificados no genoma humano são órfãos, assim como o são 17 dos 18 de *Drosophila*, e todos os 278 do nematoide *C. elegans* (ver Figura 4-85). Alguns receptores nucle-

Figura 15-13 Algumas moléculas-sinal não-gasosas que se ligam a receptores intracelulares. Note que todas elas são pequenas e hidrofóbicas. A vitamina D_3 está representada em sua forma ativa hidroxilada. O estradiol e a testosterona são hormônios sexuais esteroides.



ares de mamíferos são regulados por metabólitos intracelulares e não por moléculas-sinal secretadas; os *receptores ativados pela proliferação de peroxissomos* (*PPARs*, *peroxisome proliferation-activated receptors*), por exemplo, ligam-se a metabólitos lipídicos intracelulares e regulam a transcrição dos genes envolvidos com o metabolismo dos lipídeos e com a diferenciação de células adiposas (discutido no Capítulo 23). É provável que os receptores nucleares de hormônios tenham evoluído desses receptores de metabólitos, o que explicaria sua localização intracelular.

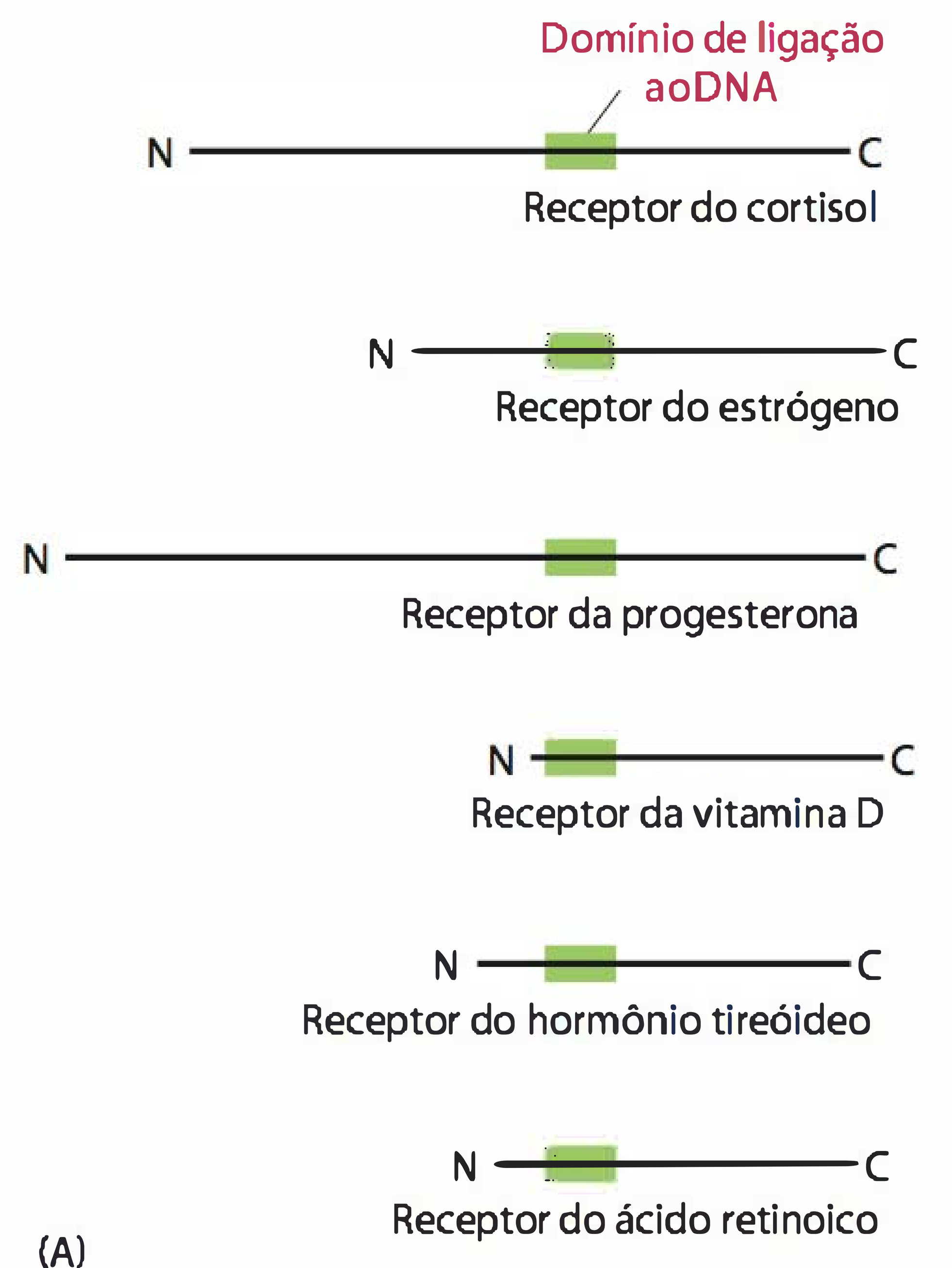
Os hormônios esteroides – que incluem o cortisol, os hormônios sexuais esteroides, a vitamina D (nos vertebrados) e a *ecdisona*, ou hormônio da muda (nos insetos) – são derivados do colesterol. O *cortisol* é produzido no córtex das glândulas adrenais e influencia o metabolismo de muitos tipos de células. Os *hormônios sexuais esteroides* são sintetizados nos testículos e nos ovários e são responsáveis pelas características sexuais secundárias que distinguem machos de fêmeas. A *vitamina D* é sintetizada na pele em resposta à luz solar; após ser convertida em sua forma ativa no fígado e nos rins, ela regula o metabolismo do Ca^{2+}, promovendo sua captação pelo intestino e reduzindo sua excreção pelos rins. Os *hormônios da tireoide*, produzidos a partir do aminoácido tirosina, atuam aumentando a taxa metabólica de uma ampla variedade de tipos celulares, enquanto os *retinoides*, como o ácido retinoico, são produzidos a partir da vitamina A e têm papel importante como mediadores locais no desenvolvimento dos vertebrados. Embora todas essas moléculas-sinal sejam relativamente insolúveis em água, são transportadas na corrente sanguínea e em outros fluidos extracelulares, ligadas a proteínas carreadoras que as tornam solúveis e das quais se dissociam antes de entrar nas células-alvo (ver Figura 15-3B).

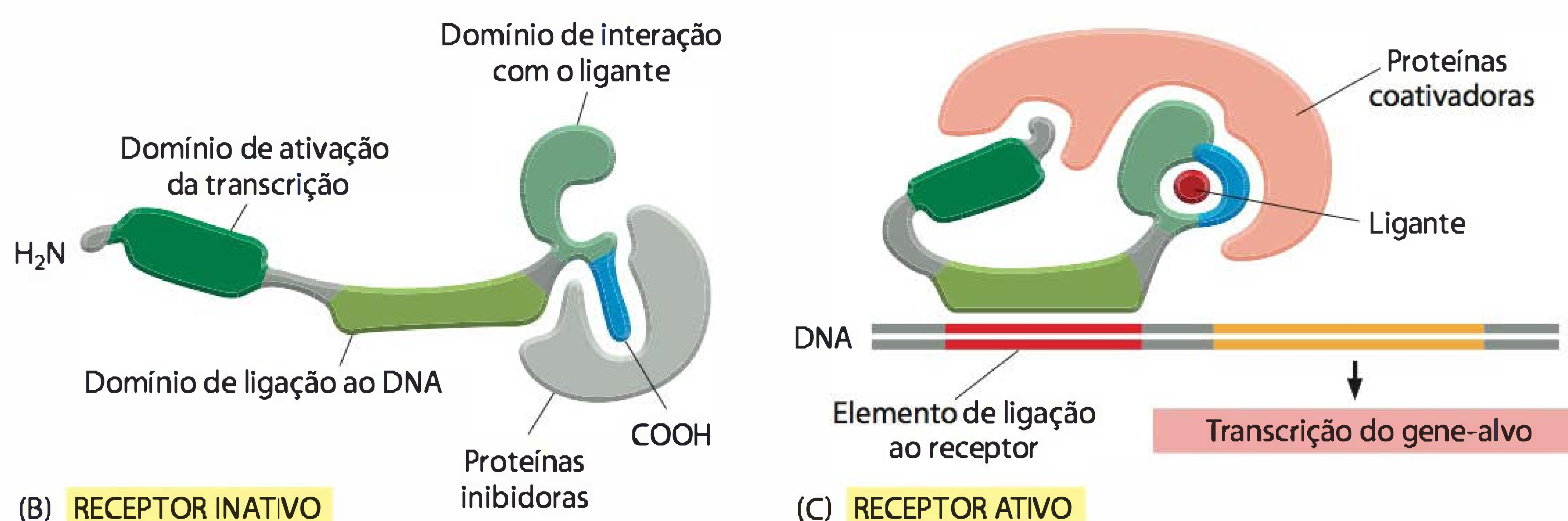
Os receptores nucleares se ligam a sequências específicas de DNA adjacentes aos genes regulados pelo ligante. Alguns deles, como os do cortisol, localizam-se primeiramente no citosol e entram no núcleo somente após a interação com o ligante; outros, como os receptores do hormônio tireóideo ou do retinol, ligam-se ao DNA no núcleo, mesmo na ausência do ligante. Em ambos os casos, o receptor inativo está ligado a complexos proteicos inibidores. A interação com o ligante altera a conformação do receptor, causando a dissociação do complexo inibidor e a ligação do receptor a proteínas coativadoras que estimulam a transcrição gênica (**Figura 15-14**). Em outros casos, contudo, a interação do ligante com um receptor nuclear inibe a transcrição: alguns receptores dos hormônios tireóideos, por exemplo, atuam como ativadores transcricionais na ausência de seus hormônios e tornam-se repressores da transcrição quando os hormônios estão ligados a eles.

A resposta transcricional geralmente acontece em etapas múltiplas. Nos casos, por exemplo, em que a interação com o ligante ativa a transcrição, a ativação direta de um pequeno número de genes específicos ocorre dentro de 30 minutos e constitui a *resposta primária*; os produtos proteicos desses genes ativam, por sua vez, outros genes, produzindo uma resposta tardia, a *resposta secundária*; e assim por diante. Além disso, algumas das proteínas produzidas na resposta primária podem atuar retroativamente na inibição dos genes de resposta primária, limitando dessa forma a resposta – um exemplo de retroalimentação negativa, que será discutida mais tarde. Dessa forma, um sinal hormonal simples pode desencadear uma mudança muito complexa no padrão da expressão gênica (**Figura 15-15**).

As respostas aos hormônios esteroides e tireóideos, aos retinóis e à vitamina D são determinadas tanto pela natureza da célula-alvo como pela natureza da molécula-sinal. Muitos tipos celulares possuem receptores intracelulares idênticos, mas o conjunto de genes regulados por eles é diferente em cada tipo celular. Isso acontece porque é necessária a ligação de mais de um tipo de proteína reguladora a um gene eucariótico para ativar sua transcrição. Por isso, um receptor intracelular só pode ativar um gene se ocorrer a combinação correta de outras proteínas reguladoras, e muitas delas são específicas para os diferentes tipos celulares.

Em resumo, essas moléculas-sinal hidrofóbicas induzem, em um animal, um conjunto característico de respostas por dois motivos. Primeiro, porque somente determinados tipos de células possuem receptores para elas. Segundo, porque cada um desses tipos celulares tem uma combinação diferente de outras proteínas reguladoras específicas que colaboram com o receptor ativado para induzir a transcrição de conjuntos específicos de genes. Esse princípio se aplica a todas as respostas sinalizadas que dependem de proteínas reguladoras gênicas, incluindo muitos dos demais exemplos discutidos neste capítulo. No Capítulo 7,





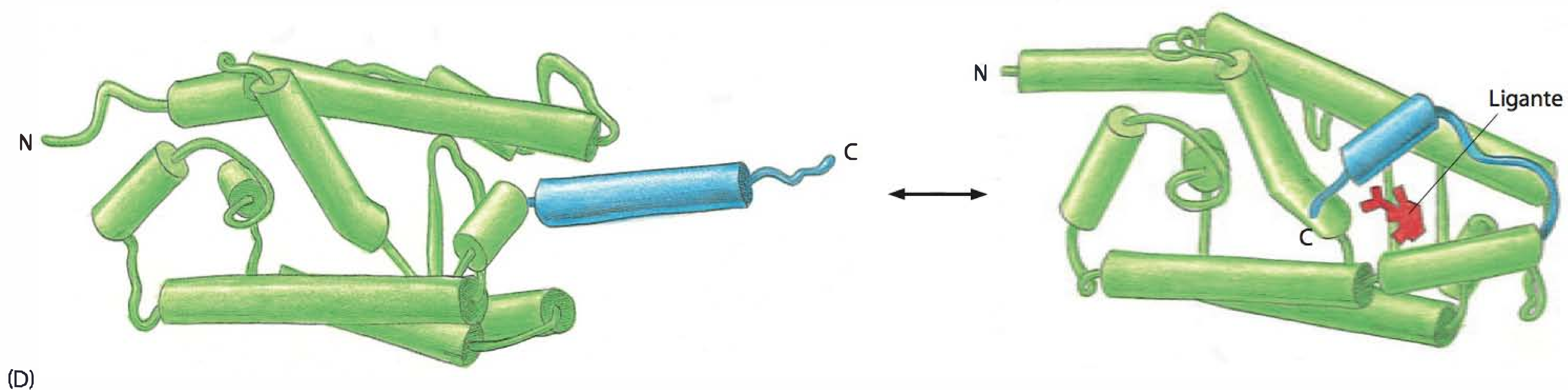


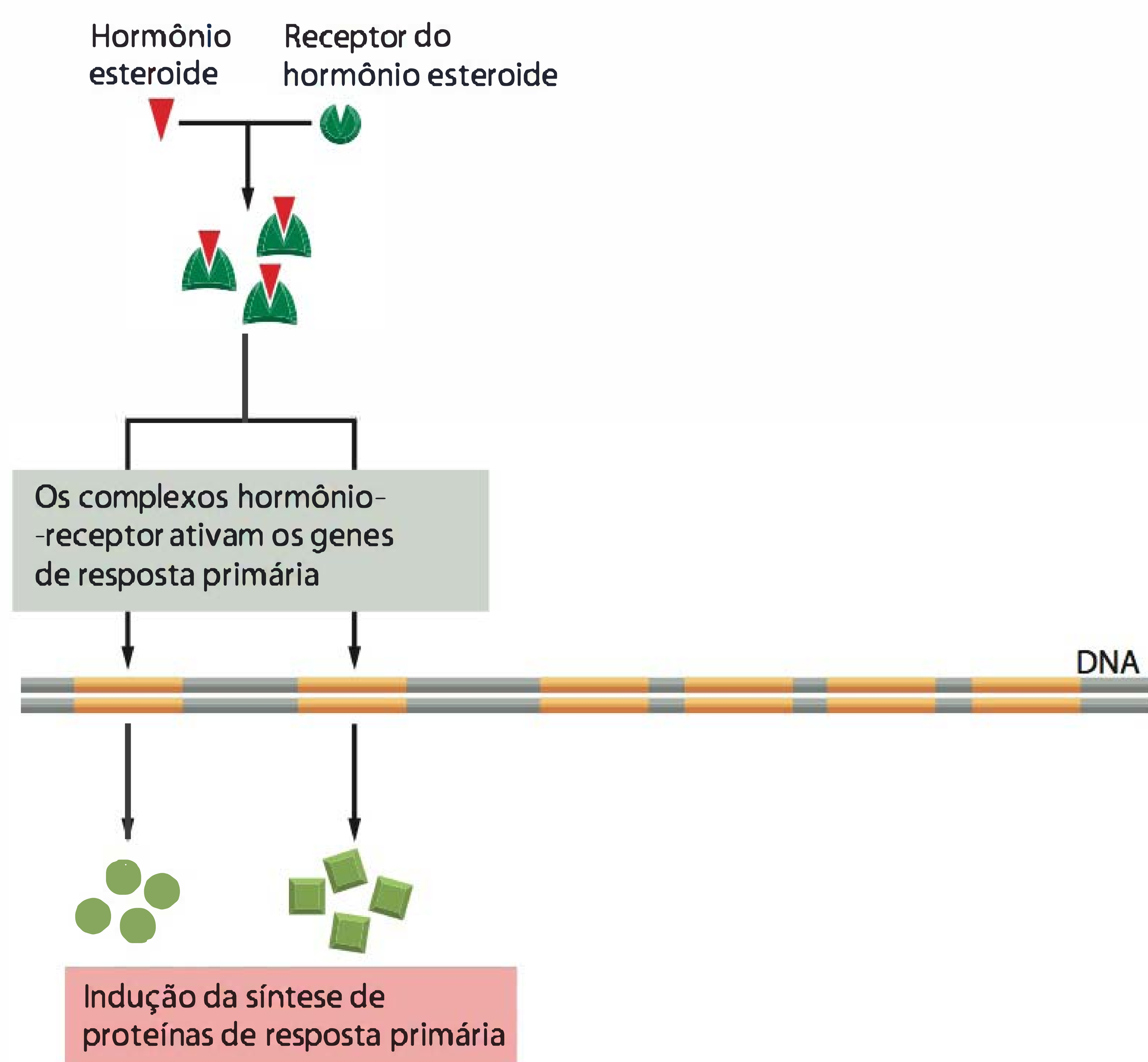
Figura 15-14 A superfamília dos receptores nucleares. Todos os receptores nucleares se ligam ao DNA na forma de homodímeros ou de heterodímeros, mas, para simplificar, estão representados aqui como monômeros. (A) Todos têm uma estrutura semelhante. O pequeno domínio de ligação ao DNA está representado em *verde-claro*. (B) Um receptor no seu estado inativo ligado a proteínas inibidoras. Experimentos de troca de domínios sugerem que muitos dos domínios de interação com ligantes, de ativação de transcrição e de ligação ao DNA, nestes receptores, podem atuar como módulos intercambiáveis. (C) Ativação do receptor. A interação do ligante com o receptor provoca o fechamento do domínio de ligação do receptor ao redor do ligante, como uma pinça, provocando também a dissociação das proteínas inibidoras e a ligação das proteínas coativadoras ao domínio de ativação da transcrição no receptor, aumentando assim a transcrição gênica. Em outros casos, a interação com o ligante tem o efeito oposto, causando a ligação de proteínas correpressoras ao receptor, reduzindo a transcrição (não-mostrado). Apesar de não representado aqui, a atividade pode ser controlada também por meio de uma mudança na localização do receptor: em sua forma inativa, ele pode ser retido no citoplasma; a interação com o ligante pode então levar à exposição de sinais de localização nuclear, o que leva à importação do receptor para o núcleo, para atuar sobre o DNA. (D) A estrutura tridimensional do domínio de interação com o ligante, com o ligante (*à direita*) e sem ele (*à esquerda*). Note que a hélice α, *em azul*, funciona como uma tampa que se fecha quando o ligante interage (mostrado em *vermelho*), prendendo-o.

são discutidos os detalhes moleculares de como os receptores nucleares e outras proteínas reguladoras controlam a transcrição gênica específica.

As proteínas receptoras nucleares estão, às vezes, presentes também na superfície da célula, onde atuam por mecanismos completamente diferentes dos descritos há pouco. No restante do capítulo, consideraremos várias maneiras pelas quais os receptores de superfície celular convertem sinais extracelulares em intracelulares, um processo chamado de *transdução de sinal*.

Os receptores associados a canais iônicos, a proteínas G e a enzimas são as três maiores classes de receptores de superfície celular

Em contraste às moléculas-sinal hidrofóbicas que se ligam a receptores intracelulares discutidos há pouco, a maioria das moléculas-sinal extracelulares se liga a receptores específicos na superfície das células-alvo e não entra no citosol ou no núcleo. Esses receptores funcionam como *transdutores de sinal*. Eles convertem um evento extracelular de interação com o ligante em sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula-alvo.



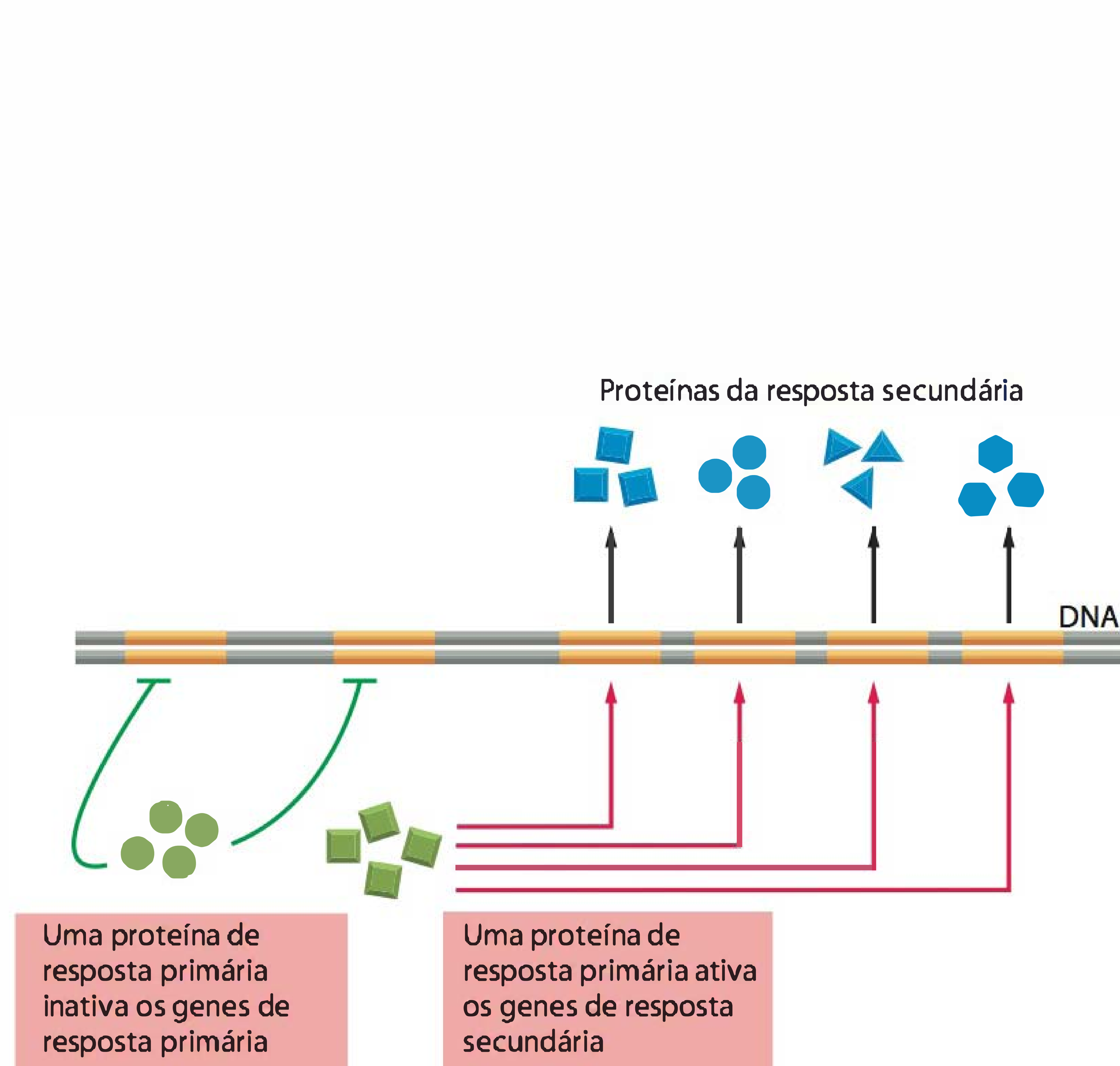


Figura 15-15 Exemplo de respostas primária e secundária induzidas pela ativação de um receptor hormonal nuclear. (A) Resposta primária precoce e (B) resposta secundária tardia. Algumas proteínas de resposta primária ativam genes de resposta secundária, enquanto outras inativam genes de resposta primária. O número real de genes de resposta primária e secundária é maior do que o representado. Substâncias que inibem a síntese proteica suprimem a transcrição dos genes de resposta secundária, mas não os genes de resposta primária, permitindo diferenciar entre as duas classes de resposta de transcrição. A figura mostra as respostas a um hormônio esteroide, mas os mesmos princípios são empregados por muitos outros ligantes que ativam proteínas receptoras nucleares.

A maioria das proteínas receptoras de superfície celular pertence a três classes, definidas por seus mecanismos de transdução. Os **receptores associados a canais iônicos**, também conhecidos como *canais iônicos controlados por transmissores* ou *receptores ionotrópicos*, estão envolvidos na sinalização sináptica rápida entre as células nervosas e outras células-alvo eletricamente excitáveis, como os neurônios e as células musculares (**Figura 15-16**A). Esse tipo de sinalização é mediado por um pequeno número de neurotransmissores que abrem ou fecham, temporariamente, um canal iônico formado pela proteína à qual se ligam, alterando por um período curto a permeabilidade da membrana plasmática aos íons e, dessa forma, a excitabilidade da célula-alvo pós-sináptica. A maioria dos receptores associados a canais iônicos pertence à grande família das proteínas homólogas transmembrana de múltiplas passagens. Não os discutiremos aqui, visto que foram apresentados com detalhes no Capítulo 11.

Os **receptores associados à proteína G** atuam indiretamente na regulação da atividade de uma proteína-alvo ligada à membrana plasmática, que pode ser tanto uma enzima como um canal iônico. A interação entre o receptor e essa proteína-alvo é mediada por uma terceira proteína, chamada de *proteína trimérica de ligação a GTP* (*proteína G*) (Figura 15-16B). A ativação da proteína-alvo altera a concentração de um ou mais mediadores intracelulares pequenos (se a proteína-alvo for uma enzima) ou altera a permeabilidade da membrana plasmática aos íons (se a proteína-alvo for um canal iônico). Os pequenos mediadores intracelulares afetados, por sua vez, alteram o comportamento de outras proteínas de sinalização na célula. Todos os receptores associados à proteína G pertencem à grande família das proteínas homólogas transmembrana de múltiplas passagens.

Os **receptores associados a enzimas**, quando ativados, funcionam diretamente como enzimas, ou estão associados diretamente a enzimas ativadas por eles (Figura 15-16C). Geralmente são proteínas transmembrana de passagem única, cujo sítio de interação com o ligante está do lado de fora da célula e cujo sítio catalítico, ou de ligação à enzima, está do lado de dentro. Esses receptores apresentam uma estrutura heterogênea em comparação às outras duas classes. A grande maioria, contudo, é representada por cinases ou é a elas associada e, quando ativados, fosforilam grupos específicos de proteínas na célula-alvo.

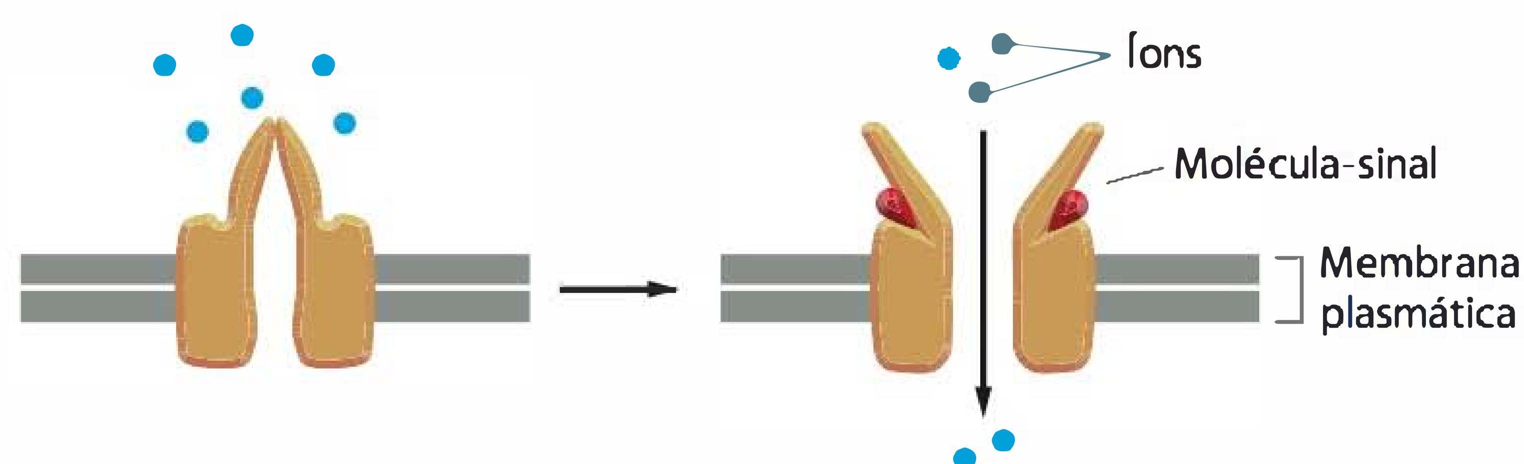
Existem alguns receptores de superfície celular que não se enquadram facilmente em nenhuma das classes citadas anteriormente, mas têm funções importantes no controle da especialização de diferentes tipos celulares durante o desenvolvimento e na renovação ou regeneração de tecidos. Estes serão discutidos em uma seção posterior, após a explicação detalhada de como funcionam os receptores associados à proteína G e os receptores associados a enzimas. Primeiro, contudo, consideraremos alguns princípios gerais da sinalização via receptores de superfície celular, a fim de preparar a discussão detalhada das principais classes desses receptores, feita a seguir.

A maioria dos receptores de superfície celular ativados transmite sinais por meio de pequenas moléculas e de uma rede de proteínas de sinalização intracelular

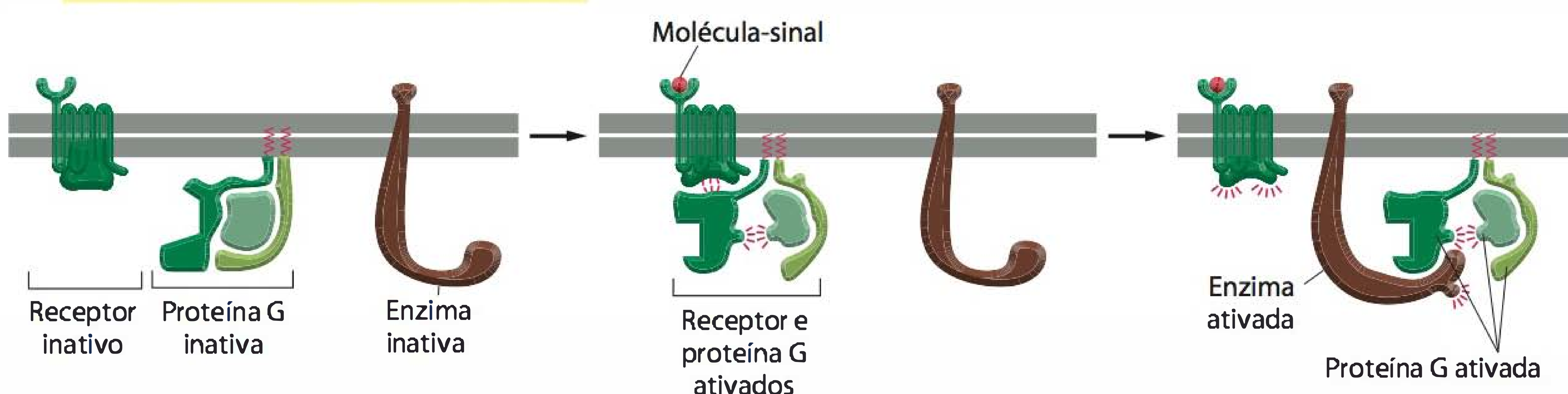
Os sinais recebidos por receptores associados à proteína G ou associados a enzimas, na superfície de uma célula, são transmitidos para o seu interior por uma combinação de pequenas e grandes *moléculas de sinalização intracelular*. A cadeia de eventos de sinalização intracelular resultante altera proteínas-alvo que serão responsáveis pela modificação do comportamento da célula (ver Figura 15-1).

As pequenas moléculas de sinalização intracelular são denominadas **mediadores intracelulares pequenos** ou **segundos mensageiros** (os sinais extracelulares são os "primeiros mensageiros"). Eles são gerados em grande número em resposta à ativação do receptor e se difundem rapidamente para longe de sua fonte de produção, transmitindo o sinal para outras partes da célula. Alguns, como o *AMP cíclico* e o *Ca*$^{2+}$, são hidrossolúveis e se difundem no citosol, enquanto outros, como o *diacilglicerol*, são lipossolúveis e se difundem no plano da membrana plasmática. Em ambos os casos, eles transmitem o sinal por se ligarem a proteínas de sinalização específicas ou a proteínas efetoras e alterarem sua conformação e seu comportamento.

(A) RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS IÔNICOS



(B) RECEPTORES ASSOCIADOS À PROTEÍNA G



(C) RECEPTORES ASSOCIADOS A ENZIMAS

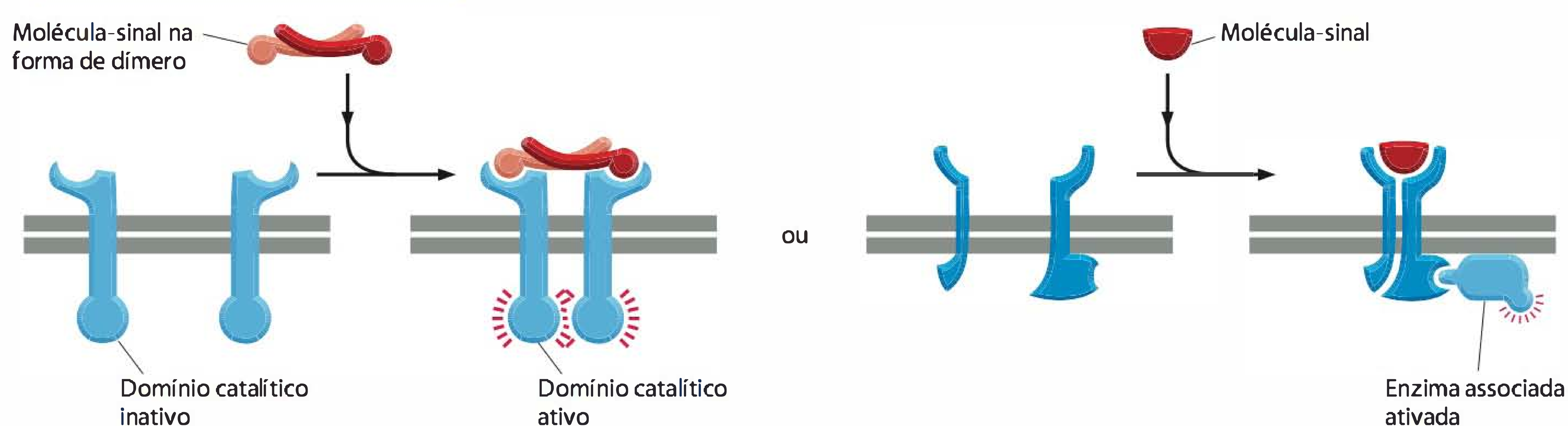


Figura 15-16 Três classes de receptores de superfície celular. (A) Receptores associados a canais iônicos (também chamados de canais iônicos controlados por transmissores), (B) receptores associados à proteína G e (C) receptores associados a enzimas. Apesar de muitos receptores associados a enzimas terem atividade enzimática intrínseca, como mostrado à esquerda, muitos outros contam com enzimas associadas, como mostrado à direita.

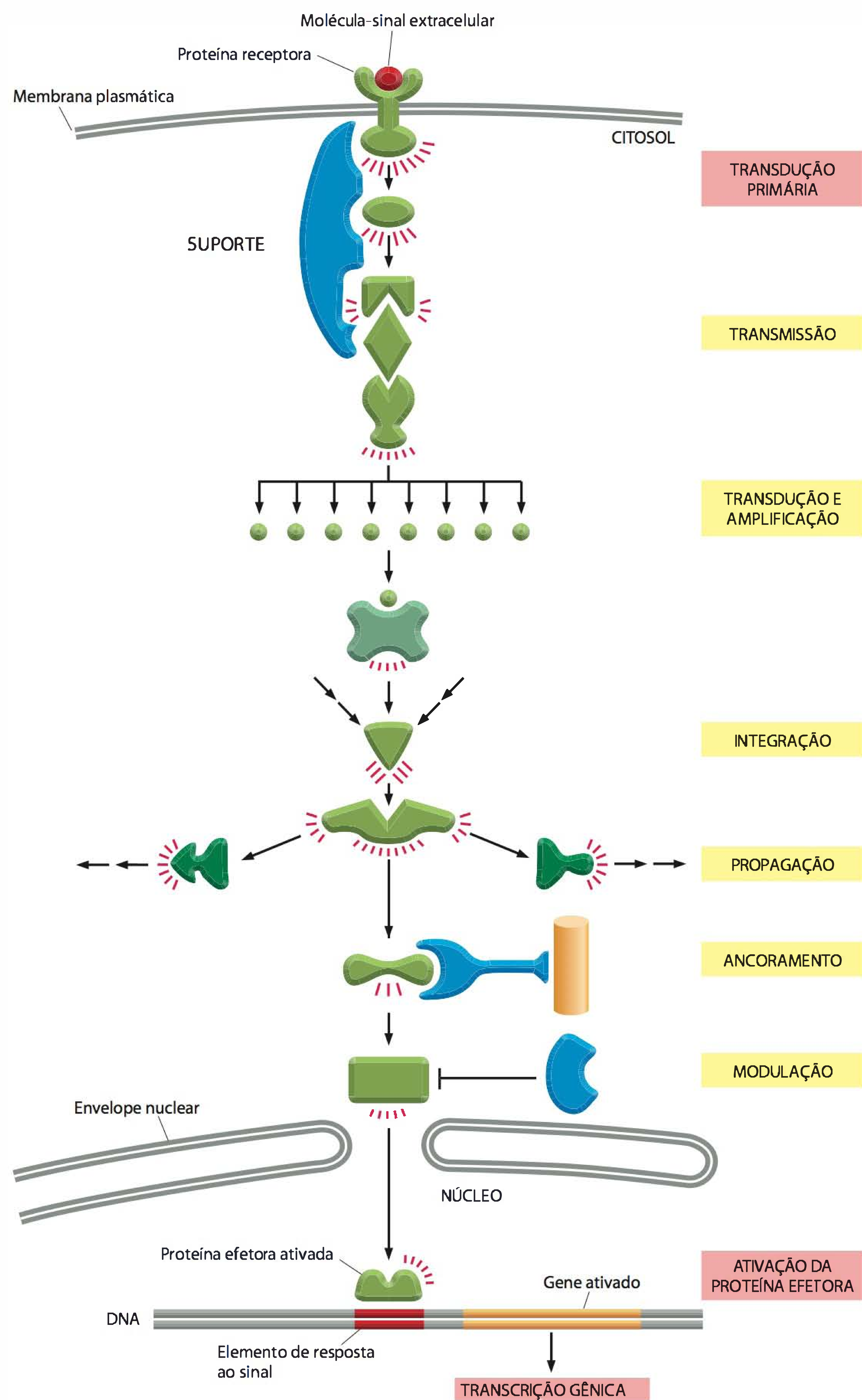


Figura 15-17 Via de sinalização intracelular hipotética, desde o receptor de superfície até o núcleo. Neste exemplo, uma série de proteínas sinalizadoras e mediadores intracelulares pequenos transmitem o sinal extracelular para o núcleo, causando mudanças na expressão gênica. O sinal é modificado (transduzido), amplificado, distribuído e modulado ao longo da via. Uma vez que muitas das etapas podem ser afetadas por outros sinais extra e intracelulares, o efeito final de um sinal extracelular depende de múltiplos fatores que afetam as células (ver Figura 15-8). No final, a via de sinalização ativa (ou inativa) proteínas efetoras que alteram o comportamento celular. Neste exemplo, o efetor é uma proteína de regulação que ativa a transcrição gênica. Apesar da figura mostrar proteínas sinalizadoras individuais executando uma única função, na verdade elas apresentam, frequentemente, mais do que uma função; as proteínas de suporte, por exemplo, com frequência atuam na ancoragem de várias proteínas sinalizadoras a uma determinada estrutura intracelular. A maioria das vias de sinalização que vão ao núcleo é mais direta do que a do exemplo, que não é baseado em uma via conhecida.

As grandes moléculas de sinalização intracelular são as **proteínas de sinalização intracelular,** que auxiliam na transmissão do sinal para o interior da célula pela ativação da proteína sinalizadora seguinte na cadeia ou pela geração de pequenos mediadores intracelulares. Essas proteínas formam uma rede funcional na qual cada uma delas auxilia na transformação do sinal de uma, ou mais, das seguintes formas à medida que propaga os efeitos do sinal pela célula (**Figura 15-17**):

1. A proteína pode, simplesmente, *transmitir* a mensagem para o próximo componente da cadeia de sinalização.

2. Ela pode atuar como *suporte* para reunir duas ou mais proteínas sinalizadoras para que possam interagir de forma mais rápida e eficiente.
3. Ela pode transformar, ou *transduzir,* o sinal em uma forma diferente, adequada para passá-lo adiante ou estimular a resposta celular.
4. Ela pode *amplificar* o sinal que recebe, produzindo grandes quantidades do mediador intracelular pequeno ou ativando muitas cópias de uma proteína sinalizadora *downstream*. Dessa forma, um pequeno número de moléculas-sinal extracelulares pode evocar uma resposta intracelular ampla. Quando existem etapas de amplificação múltipla em uma cadeia de transmissão, esta frequentemente é referida como uma **cascata de sinalização.**
5. Ela pode receber sinais de duas ou mais vias de sinalização e o *integrar* antes de transmiti-lo adiante. Uma proteína que requer informações de duas ou mais vias para se tornar ativada é referida, frequentemente, como um detector de coincidência.
6. Ela pode *propagar* o sinal de uma via para outra, criando ramificações no fluxo de sinalização, aumentando, assim, a complexidade da resposta.
7. Ela pode *ancorar* uma ou mais proteínas de sinalização em uma via que leva a uma estrutura específica na célula, onde a proteína sinalizadora é necessária.
8. Ela pode *modular* a atividade de outras proteínas sinalizadoras e, dessa forma, regular a intensidade da sinalização ao longo de uma via.

Consideraremos agora, em mais detalhes, algumas estratégias que as proteínas sinalizadoras intracelulares utilizam no processamento do sinal à medida que o transmitem ao longo das vias. Encontraremos estas estratégias gerais novamente nas seções posteriores deste capítulo, quando discutiremos as classes específicas de receptores e as vias de sinalização ativadas por eles.

Muitas proteínas de sinalização intracelular atuam como comutadores moleculares que são ativados por fosforilação ou por ligação ao GTP

Muitas proteínas de sinalização intracelular se comportam como comutadores moleculares. Quando recebem um sinal, elas passam da conformação inativa para a ativa, até que outro processo as desligue, retornando-as a sua conformação inativa. Como discutimos anteriormente, a inativação é tão importante quanto a ativação. Para que uma via de sinalização, após transmitir um sinal, possa se recuperar e ficar preparada para transmitir outro sinal, cada molécula ativada deve retornar ao seu estado inativo inicial.

Duas classes importantes de comutadores moleculares que operam nas vias de sinalização intracelular dependem da perda ou do ganho de grupos fosfato para sua ativação ou inativação, embora a maneira pela qual o fosfato é ganho ou perdido seja bem diferente nas duas classes. A maior classe consiste em proteínas que são ativadas ou inativadas por **fosforilação** (discutido no Capítulo 3). No caso dessas proteínas, elas são, por um lado, fosforiladas por uma **proteína-cinase**, que adiciona um ou mais grupos fosfato em ligação covalente, e, por outro lado, desfosforiladas por uma **proteína-fosfatase**, que remove os grupos fosfato da molécula (**Figura 15-18**A). A atividade de qualquer proteína regulada por fosforilação

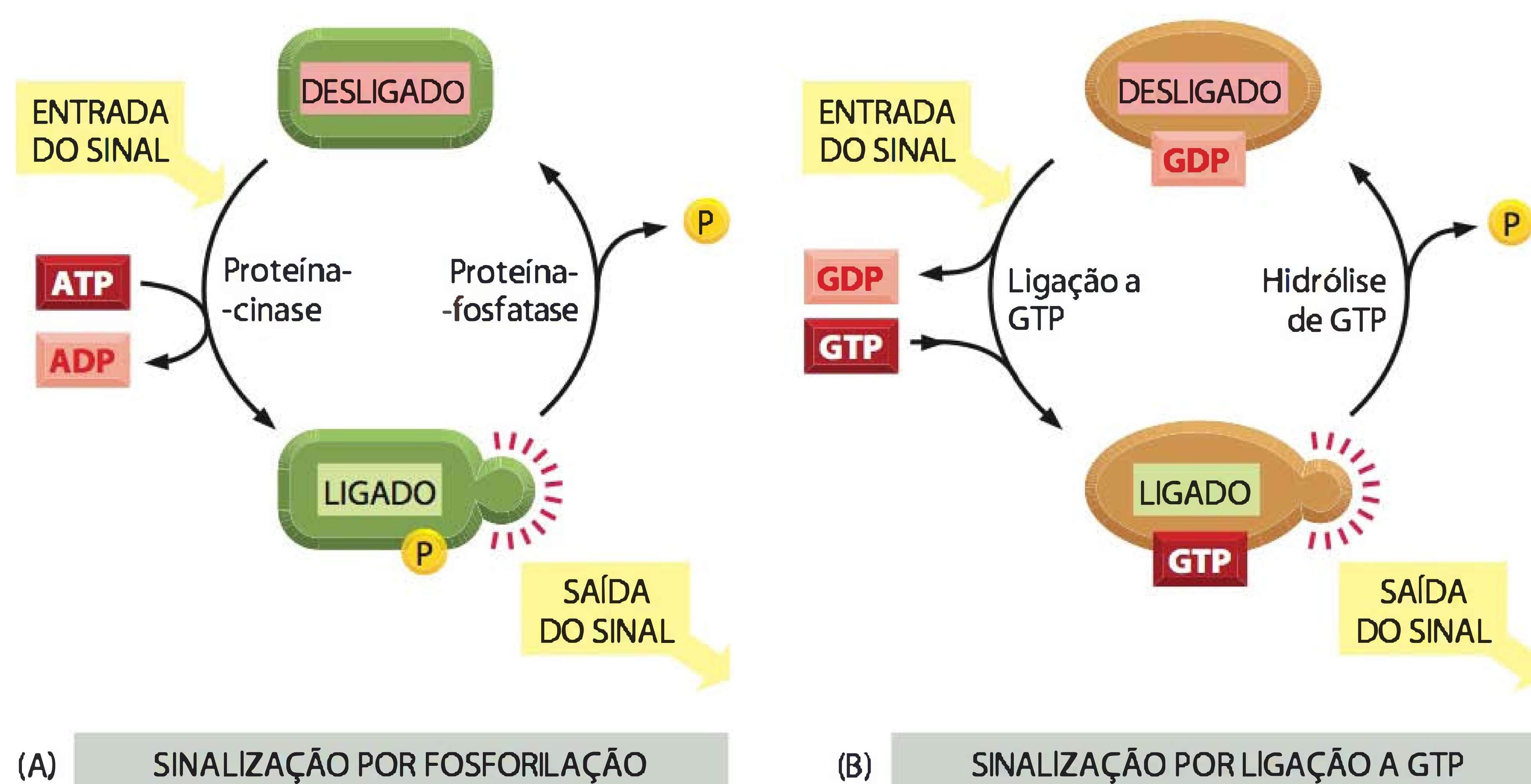


Figura 15-18 Dois tipos de proteínas sinalizadoras intracelulares que atuam como comutadores moleculares. Apesar de um tipo ser ativado por fosforilação e o outro pela ligação ao GTP, em ambos os casos, a adição de um grupo fosfato "liga" o estado de ativação da proteína, enquanto a remoção do fosfato "desliga" este estado. (A) Uma proteína-cinase adiciona covalentemente um fosfato do ATP na proteína sinalizadora, e uma proteína-fosfatase remove o fosfato. Apesar de não estarem na figura, algumas proteínas são ativadas por desfosforilação e não por fosforilação. (B) Uma proteína de ligação a GTP é induzida a trocar seu GDP por GTP, o que a ativa; esta proteína é autoinativada quando hidrolisa seu GTP a GDP.

depende do balanço, a qualquer instante, entre a atividade das cinases que a fosforilam e a das fosfatases que a desfosforilam. Cerca de 30% das proteínas humanas contêm fosfato em ligação covalente, e o genoma humano codifica em torno de 520 proteína-cinases e em torno de 150 proteína-fosfatases. Considera-se que uma célula típica de mamífero utilize centenas de tipos distintos de proteína-cinases.

Muitas das proteínas de sinalização controladas por fosforilação são cinases e com frequência estão organizadas em **cascatas de fosforilação.** Em tais cascatas, uma cinase, ativada por fosforilação, fosforila a próxima cinase na sequência, e assim por diante, transmitindo adiante o sinal, amplificando-o e, às vezes, distribuindo-o para outras vias. Dois tipos principais de cinases atuam como proteínas sinalizadoras. A grande maioria são **serinatreonina-cinases**, que fosforilam resíduos de serina e (menos frequentemente) resíduos de treonina. Outras são as **tirosina-cinases**, que fosforilam resíduos de tirosina. Às vezes, uma mesma cinase pode fazer as duas coisas.

A outra classe principal de comutadores moleculares que funciona pela perda ou ganho de grupos fosfato consiste nas **proteínas de ligação a GTP** (discutidas no Capítulo 3). Elas passam de um estado "ligado" (sinalizando ativamente), quando o GTP está ligado, para um estado "desligado", quando o GDP está ligado a elas. Quando ativadas, possuem atividade GTPásica intrínseca e inativam a si mesmas, hidrolisando o GTP em GDP (Figura 15-18B). Existem dois tipos principais de proteínas de ligação a GTP. As grandes *proteínas triméricas de ligação a GTP* (também chamadas de *proteínas G*) ajudam a transmitir sinais a partir dos receptores associados à proteína G que as ativam (ver Figura 15-16B). As pequenas **GTPases monoméricas** (também chamadas de *proteínas monoméricas de ligação a GTP*) auxiliam na transmissão de sinais de muitas classes de receptores de superfície celular.

Proteínas reguladoras específicas controlam ambos os tipos de proteínas de ligação a GTP. As **proteínas de ativação da GTPase** (**GAPs**, *GTPase-activating proteins*) conduzem as proteínas a um estado "desligado" pelo aumento da taxa de hidrólise do GTP; as GAPs que atuam dessa forma também são chamadas de *reguladores da sinalização da proteína G (RGSs, regulators of G-protein signaling)*. Reciprocamente, os receptores associados à proteína G ativam as proteínas G triméricas, e os **fatores de troca de nucleotídeos de guanina** (**GEFs**, *guanine nucleotide exchange factors*) ativam as GTPases monoméricas por promoverem a troca do GDP por GTP. A **Figura 15-19** ilustra a regulação das GTPases monoméricas.

As proteínas G triméricas e as GTPases monoméricas também participam de outros processos nas células, incluindo a regulação do tráfego vesicular e alguns aspectos da divisão celular.

Conforme discutido anteriormente, combinações específicas de sinais extracelulares, e não a atuação isolada de uma molécula-sinal, geralmente são requeridas para estimular os comportamentos celulares complexos, como sobrevivência e proliferação (ver Figura 15-8). Por isso, a célula deve integrar as informações provenientes de múltiplos sinais de forma a montar uma resposta apropriada; muitas células de mamíferos, por exemplo, requerem

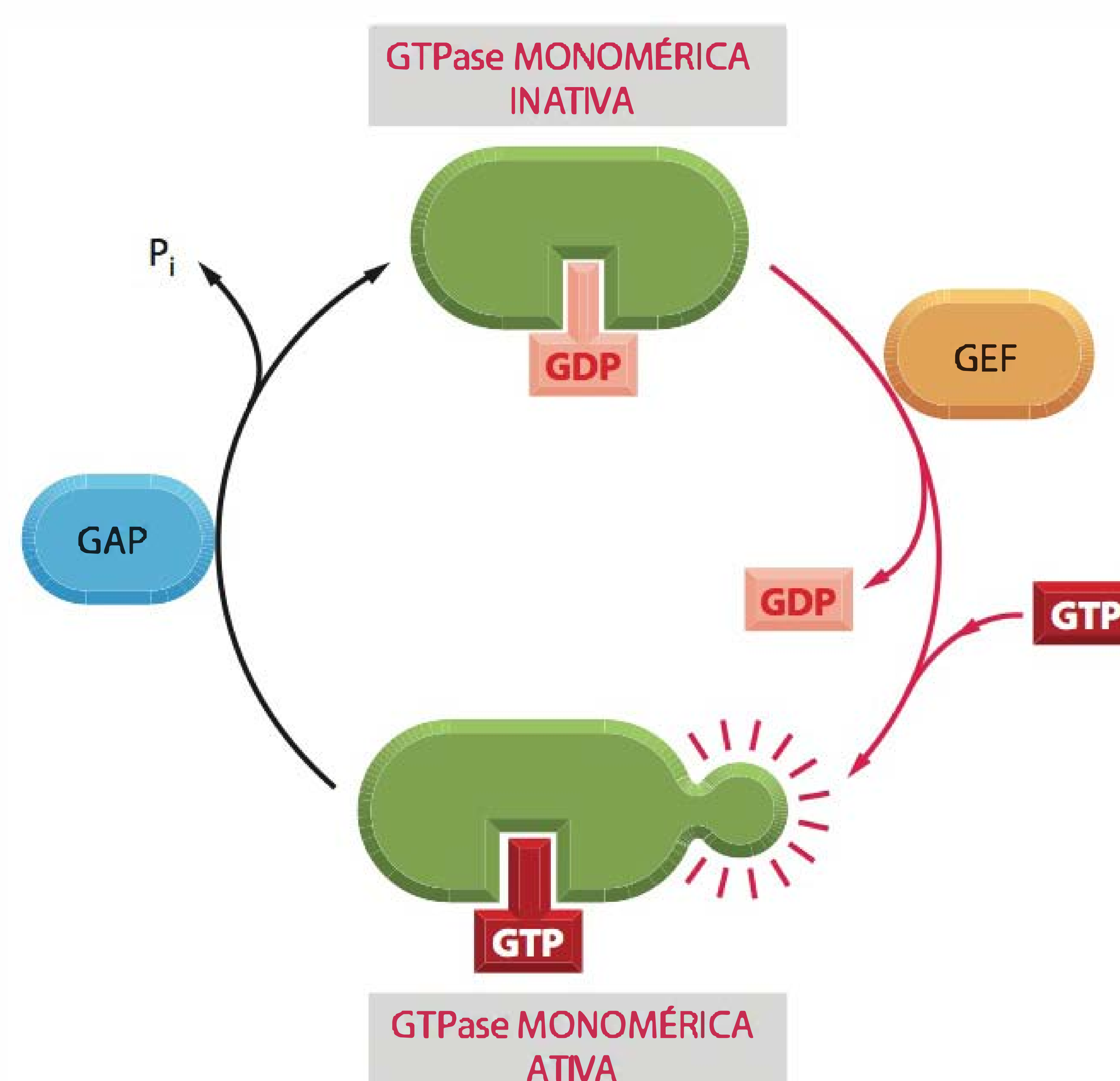


Figura 15-19 Regulação de uma GTPase monomérica. As proteínas de ativação da GTPase (GAPs) inativam a proteína por estimularem a hidrólise de seu GTP a GDP, o qual permanece firmemente ligado à GTPase inativada. Fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) a ativam por estimularem a liberação do GDP; como a concentração citosólica do GTP é 10 vezes maior do que a do GDP, logo após a liberação do GDP, a proteína liga GTP e torna-se, assim, ativa.

tanto sinais solúveis como os procedentes da matriz extracelular (discutidos no Capítulo 19) para crescer e proliferar. A integração depende em parte dos *detectores de coincidência* intracelulares, os quais são equivalentes às *portas AND* do microprocessador de um computador, porque são ativados somente se receberem múltiplos sinais convergentes (ver Figura 15-17). A **Figura 15-20** ilustra um exemplo hipotético simples de uma proteína desse tipo.

Nem todos os comutadores moleculares, contudo, dependem de fosforilação ou de ligação a GTP. Veremos mais adiante que algumas proteínas de sinalização comutam pela ligação de outro tipo de proteína sinalizadora, ou por um mediador intracelular pequeno como o AMP cíclico ou o íon Ca^{2+}, ou ainda por outras modificações covalentes que não sejam fosforilação ou desfosforilação, como a ubiquitinação. Além disso, nem todas as proteínas de sinalização intracelular atuam como comutadores quando estão fosforiladas ou modificadas reversivelmente. Como discutiremos mais adiante, em muitos casos o grupo covalentemente adicionado simplesmente marca a proteína para que ela possa interagir com outras proteínas que reconheçam a modificação.

Os complexos de sinalização intracelular aumentam a velocidade, a eficiência e a especificidade da resposta

Um único tipo de sinal extracelular que atua por meio de um único tipo de receptor de superfície celular frequentemente ativa múltiplas vias de sinalização paralelas, podendo, dessa maneira, influenciar muitos aspectos do comportamento celular – como forma, movimento, metabolismo e expressão gênica. Dada a complexidade desses sistemas de resposta a sinais, que frequentemente envolvem múltiplas cadeias de transmissão de proteínas sinalizadoras, como uma célula individual consegue elaborar respostas específicas a tantas combinações diferentes de sinais extracelulares? A questão é desafiadora porque muitos dos sinais estão intimamente relacionados e se ligam a tipos de receptores também intimamente relacionados. O mesmo tipo de proteína transmissora intracelular pode se acoplar com um subtipo de receptor de um grupo de efetores e a outro subtipo de receptor de outro grupo. Em tais casos, como é possível conseguir especificidade e evitar comunicação cruzada? Uma estratégia faz uso das **proteínas de suporte** (ver Figura 15-17), que organizam grupos de proteínas sinalizadoras em *complexos de sinalização*, frequentemente antes que o sinal seja recebido (**Figura 15-21**A). Uma vez que o suporte mantém as proteínas muito próximas, os componentes podem interagir em concentrações locais altas e podem ser ativados sequencialmente, de forma rápida, eficiente e seletiva, em resposta a um sinal extracelular apropriado, evitando a comunicação cruzada indesejada com outras vias.

Em outros casos, os complexos de sinalização se formam somente transitoriamente em resposta a um sinal extracelular e se desmontam rapidamente quando o sinal cessa. Tais complexos se reúnem ao redor de um receptor, após a ativação deste por uma molécula-sinal extracelular. Em muitos desses casos, a cauda citoplasmática do receptor é fosforilada durante o processo de ativação, e os aminoácidos fosforilados servem como sítios de ancoragem para a reunião de outras proteínas sinalizadoras (Figura 15-21B). Em outros casos ainda, a ativação do receptor leva à produção, na membrana plasmática adjacente, de moléculas de fosfolipídeos modificadas (chamadas de fosfoinositídeos), que recrutam, para essa região da membrana, proteínas sinalizadoras intracelulares específicas, onde elas são ativadas (Figura 15-21C). No Capítulo 13, discutimos as funções dos fosfoinositídeos nos eventos de tráfego de membrana.

As interações entre as proteínas de sinalização intracelular são mediadas por domínios de ligação modulares

Muitas vezes, simplesmente reunir as proteínas de sinalização intracelular é suficiente para ativá-las. Assim, a *proximidade induzida*, na qual um sinal desencadeia a montagem de um complexo de sinalização, comumente é utilizada na transmissão de sinais de uma proteína para outra ao longo de uma via de sinalização. A montagem de tais complexos depende de vários **domínios de interação** pequenos e altamente conservados, que são encontrados em muitas proteínas de sinalização intracelular. Cada um desses módulos proteicos compactos se liga a um motivo estrutural particular na proteína (ou no lipídeo) com o qual a proteína sinalizadora interage. O motivo reconhecido pode ser uma sequência peptídica curta, uma modificação covalente (aminoácidos fosforilados ou ubiquitinados), ou outro domínio

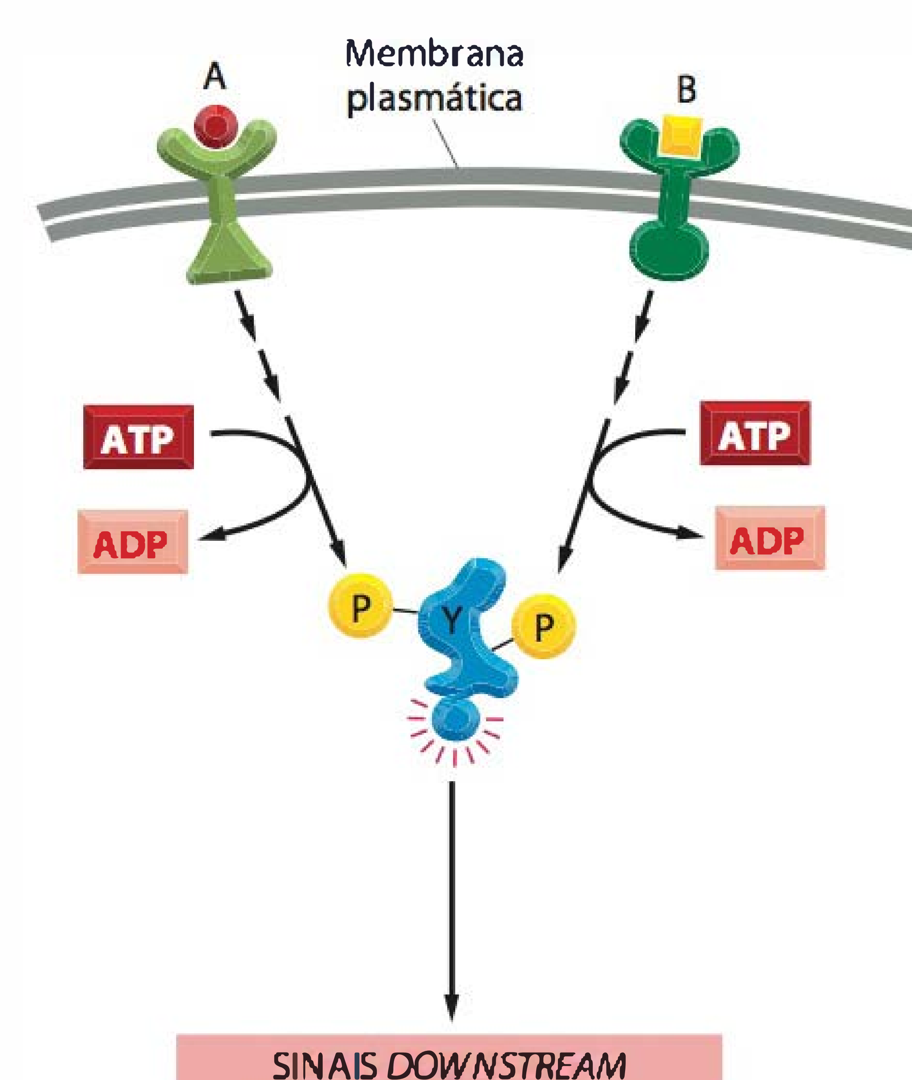


Figura 15-20 Integração de sinais. Os sinais extracelulares A e B ativam diferentes vias de sinalização intracelulares, que levam à fosforilação de diferentes sítios da proteína Y. Esta é ativada somente quando ambos os sítios forem fosforilados, ou seja, é ativada somente quando os sinais A e B estiverem presentes simultaneamente. Tais proteínas são chamadas de detectores de coincidência.

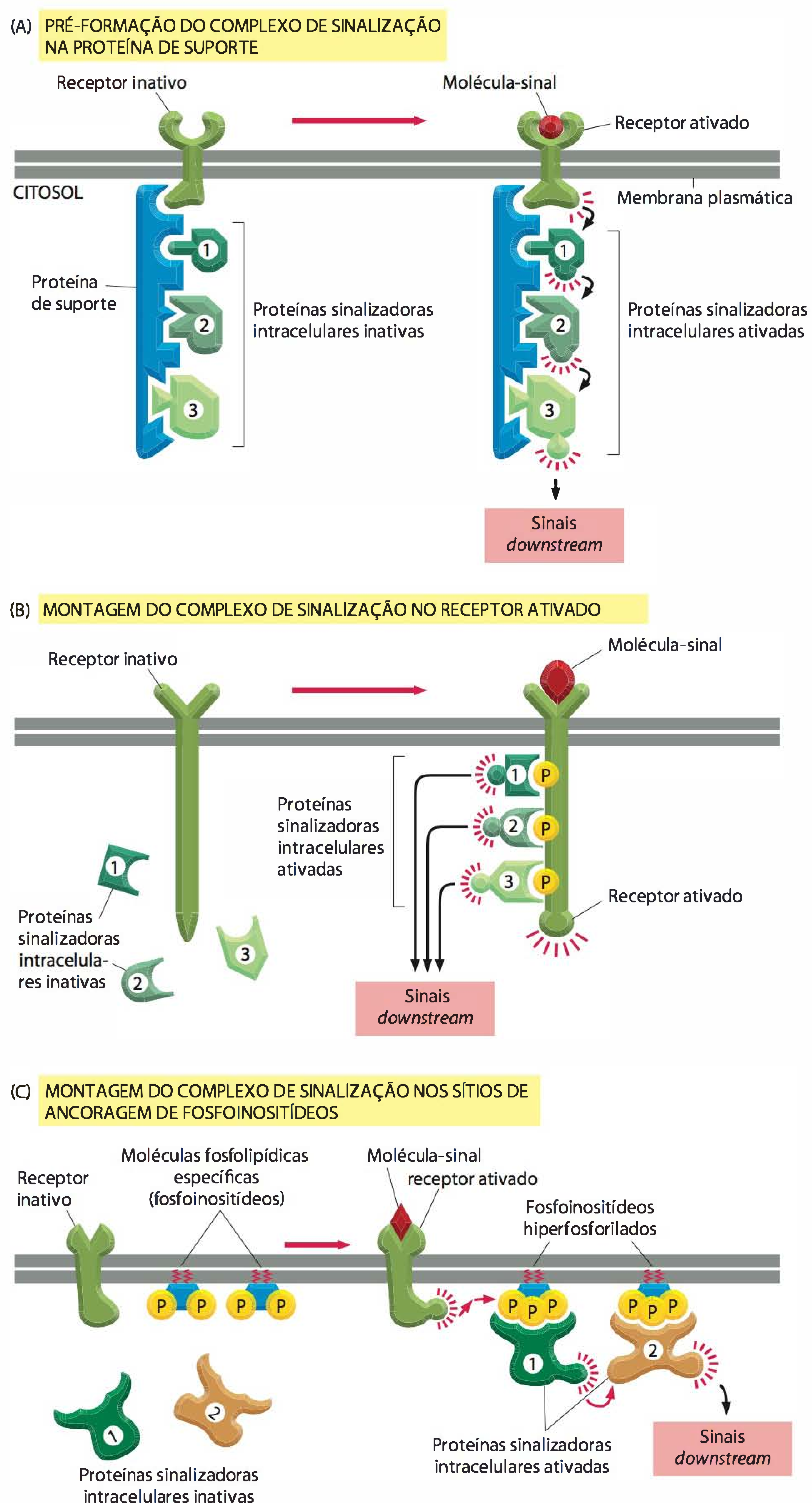


Figura 15-21 Três tipos de complexos de sinalização intracelular. (A) Um receptor e algumas proteínas sinalizadoras intracelulares que são ativadas sequencialmente por ele são pré-montados em uma grande proteína de suporte, formando um complexo de sinalização com o receptor inativo. Em outros casos, um complexo pré-montado se liga ao receptor somente após sua ativação (não-mostrado). (B) Um complexo de sinalização é organizado sobre o receptor somente após sua ativação pela ligação de uma molécula-sinal extracelular; aqui o receptor ativado faz autofosforilação em múltiplos sítios, que atuam então como sítios de ancoragem para proteínas sinalizadoras intracelulares. (C) A ativação de um receptor leva ao aumento da fosforilação de fosfolipídeos específicos (fosfoinositídeos) na membrana plasmática adjacente, os quais servem como sítios de ancoragem para proteínas sinalizadoras intracelulares específicas, que podem agora interagir entre si.

proteico. O uso de domínios modulares de interação provavelmente facilitou a evolução de novas vias de sinalização; como eles podem ser inseridos praticamente em qualquer local na proteína sem perturbar sua conformação ou função, a inserção de um novo domínio de interação em uma proteína de sinalização preexistente poderia conectá-la a outras vias de sinalização.

Existem muitos tipos de domínios de interação nas proteínas de sinalização. Os *domínios de homologia com Src 2 (SH2, Src homology)* e os *domínios de ligação à fosfotirosina (PTB, phosphotyrosine-binding)*, por exemplo, ligam-se a tirosinas fosforiladas em uma sequência peptídica específica nos receptores ativados, ou nas proteínas de sinalização intra-

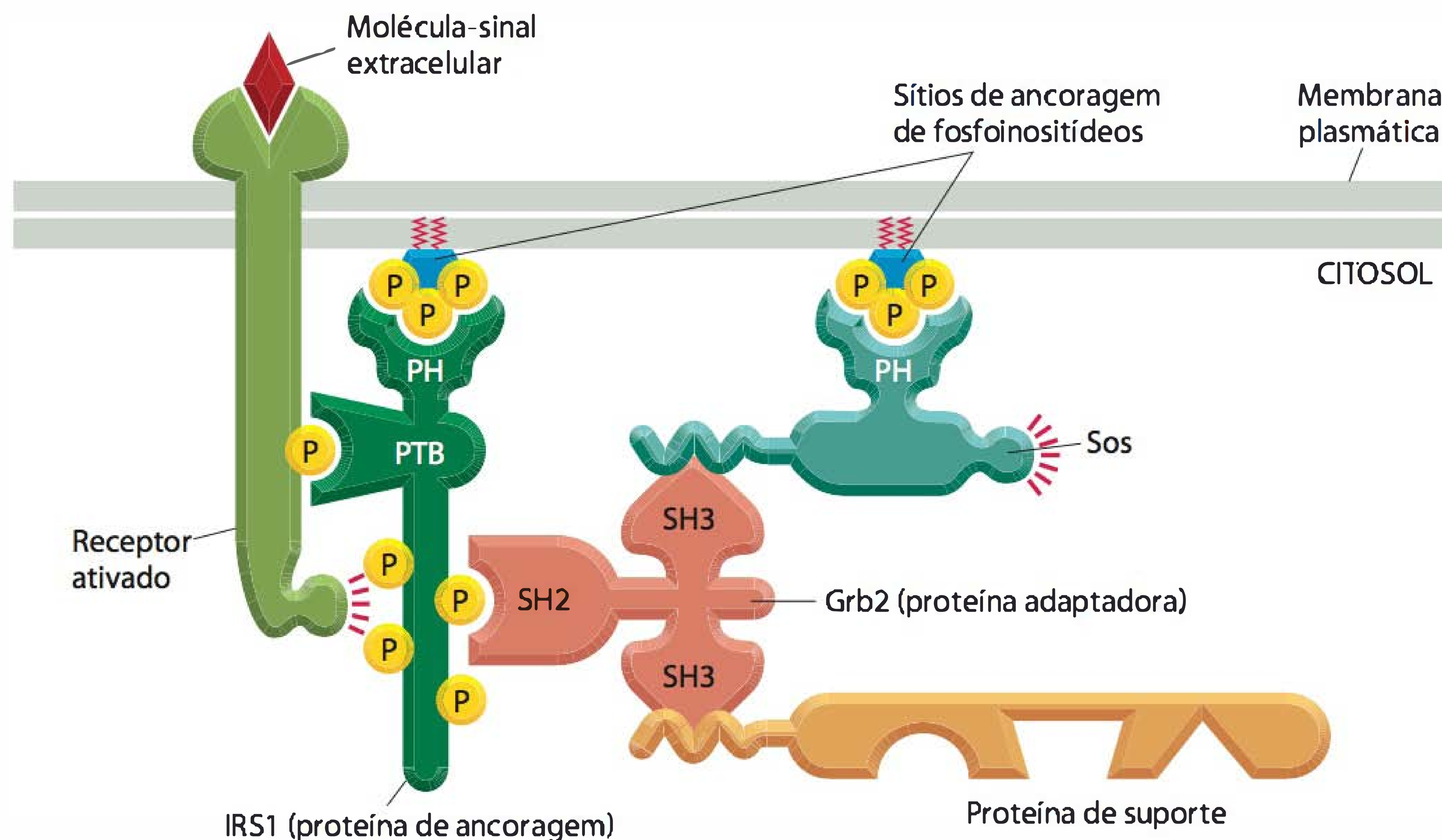


Figura 15-22 Complexo de sinalização específico formado pelo uso de domínios de interação modulares. Este exemplo tem como base o receptor de insulina, um receptor acoplado à enzima (um receptor tirosina-cinase, apresentado mais adiante). Em primeiro lugar, o receptor ativado sofre autofosforilação em suas tirosinas, e uma delas recruta uma proteína de ancoragem chamada de substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) via um domínio PTB IRS1; o domínio PH do IRS1 também se liga a fosfoinositídeos específicos sobre a superfície interna da membrana plasmática. O receptor ativado fosforila IRS1 nas tirosinas, e uma dessas fosfotirosinas recruta a proteína adaptadora Grb2 via um domínio SH2 da Grb2. A seguir, a Grb2 usa um dos seus dois domínios SH3 para se ligar a uma região rica em prolinas na proteína ativadora de GTPase monomérica chamada de Sos (uma Ras-GEF, discutida mais adiante), a qual também se liga a fosfoinositídeos na membrana plasmática através de seu domínio PH. A Grb2 usa seu segundo domínio SH3 para se ligar a uma sequência rica em prolinas na proteína de suporte. Esta liga várias outras proteínas sinalizadoras, e as outras tirosinas fosforiladas no IRS1 recrutam proteínas sinalizadoras adicionais com domínios SH2 (não-mostrado).

celular. Os *domínios de homologia com Src 3 (SH3, Src homology 3)* se ligam a sequências curtas ricas em prolina. Alguns *domínios de homologia com plequistrina* (*PH, pleckstrin homology*) se ligam a grupos carregados de fosfoinositídeos específicos, produzidos na membrana plasmática em resposta a um sinal extracelular; eles permitem que a proteína, da qual fazem parte, ancore na membrana e interaja com outras proteínas sinalizadoras recrutadas da mesma maneira (ver Figura 15-21C). Algumas proteínas de sinalização consistem somente em dois ou mais domínios de interação e funcionam somente como **adaptadores** para reunir duas ou mais proteínas em uma via.

Os domínios de interação permitem que as proteínas se liguem umas às outras em combinações múltiplas. Como peças de brinquedos de encaixar (tipo Lego), as proteínas podem formar cadeias lineares ou ramificadas, ou redes tridimensionais de interações que determinam o caminho seguido pela via de sinalização. A **Figura 15-22** ilustra, como exemplo, de que forma os domínios de interação atuam no caso do receptor do hormônio *insulina*.

Alguns receptores de superfície celular e proteínas de sinalização intracelular podem se reunir, transitoriamente, em microdomínios específicos ricos em colesterol e glicolipídeos na bicamada lipídica da membrana plasmática (ver Figura 10-13). Estas *balsas lipídicas* promovem sinalização eficiente porque servem como sítios nos quais as moléculas sinalizadoras se reúnem e interagem, mas sua importância na sinalização permanece controversa.

Outra maneira de reunir receptores e proteínas de sinalização intracelular é concentrá-los em uma região específica da célula. Um exemplo importante é o **cílio primário** que se projeta como uma antena da superfície da maioria das células de vertebrados (discutido no Capítulo 16). Ele geralmente é curto, imóvel, possui microtúbulos no seu interior e contém uma alta concentração de receptores de superfície e proteínas de sinalização. Veremos, mais tarde, que os receptores para luz e os receptores olfativos também estão altamente concentrados em cílios especializados.

As células podem usar múltiplos mecanismos para responder abruptamente a um aumento gradual na concentração de um sinal extracelular

Algumas respostas celulares a moléculas-sinal extracelulares são lineares e proporcionais à concentração das moléculas. Em outros casos, a relação entre o sinal e a resposta pode ser descontínua ou do tipo tudo-ou-nada, com uma mudança abrupta de um tipo de efeito para outro quando a concentração do sinal aumenta acima de um determinado valor (**Figura 15-23**). Estes efeitos frequentemente são o resultado da retroalimentação positiva no sistema de resposta, conforme discutiremos a seguir. Ambos os tipos de resposta são comuns, e não é

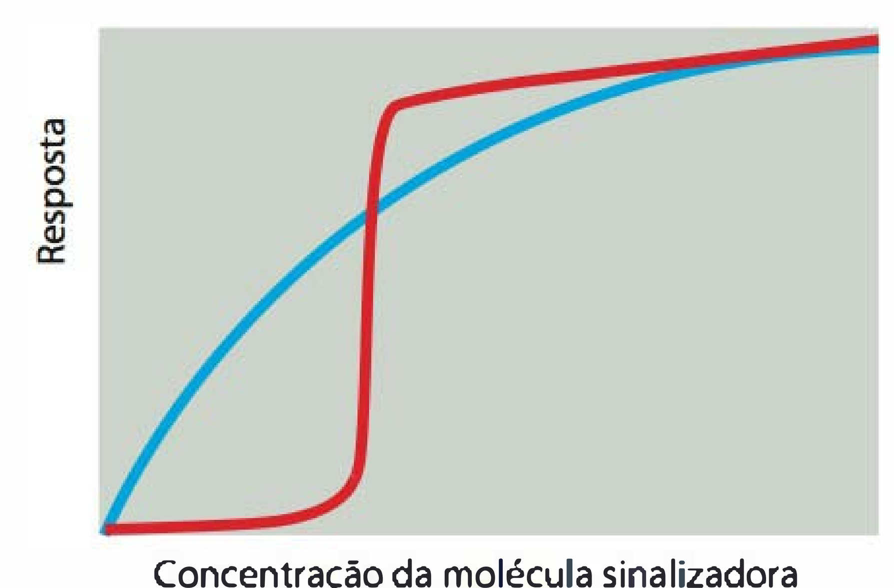


Figura 15-23 Respostas à sinalização graduais e abruptas. Algumas respostas celulares aumentam gradualmente à medida que aumenta a concentração extracelular da molécula-sinal (*linha azul*). Em outros casos, a célula passa abruptamente para um estado diferente quando a intensidade do sinal ultrapassa um determinado valor crítico (*linha vermelha*).

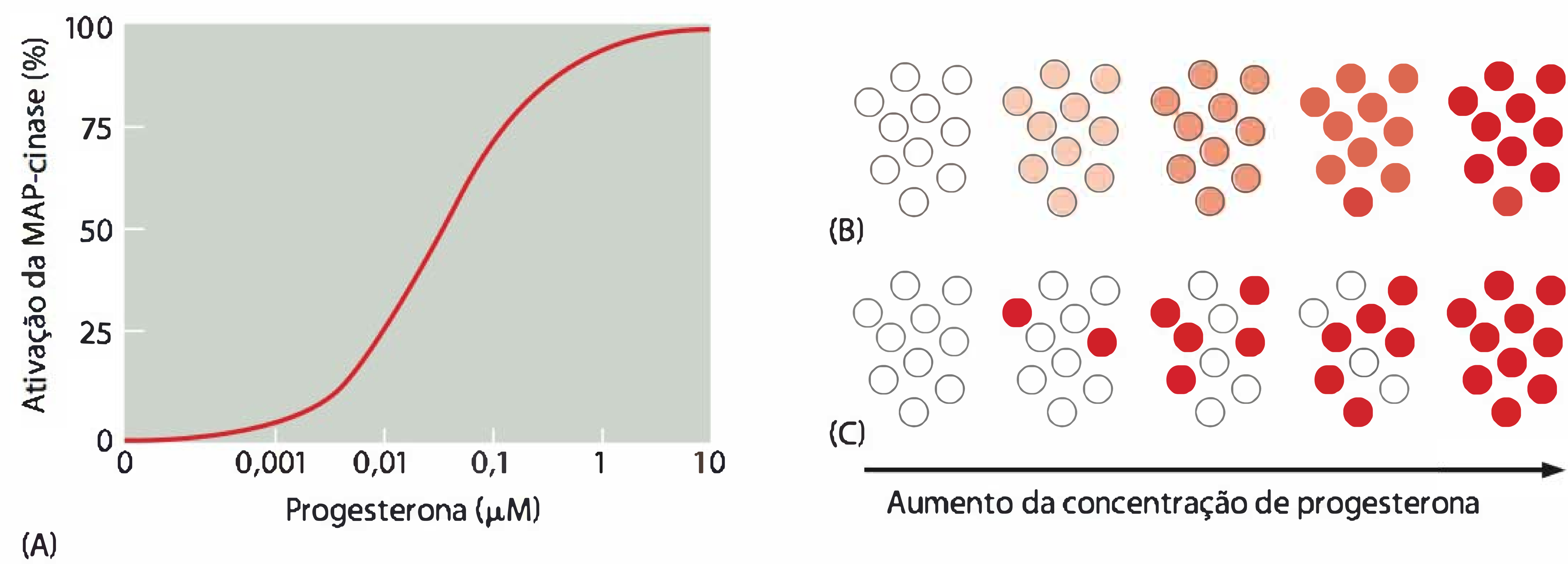


Figura 15-24 A importância da análise de células individuais para a detecção de todas as respostas do tipo tudo-ou-nada devidas ao aumento de concentração de um sinal extracelular. Nestes experimentos, ovos imaturos de sapo (oócitos) foram estimulados com concentrações crescentes do hormônio progesterona. A resposta foi avaliada pela análise da ativação da *MAP-cinase* (discutida mais adiante), uma das enzimas ativadas por fosforilação na resposta à estimulação. A quantidade de MAP-cinase fosforilada (ativada) nos extratos dos oócitos foi avaliada bioquimicamente. Em (A), foram analisados extratos de populações de oócitos estimulados, e observa-se que a ativação da MAP-cinase aumenta progressivamente com o aumento da concentração da progesterona. Existem duas explicações possíveis para este resultado: (B) a MAP-cinase ativada aumentou gradualmente com o aumento da concentração do hormônio, em cada célula individualmente; (C) alternativamente, cada célula pode ter respondido individualmente de uma forma tudo-ou-nada, e o aumento gradual na ativação total da MAP-cinase refletiria o aumento do número de células que estaria respondendo ao incremento na concentração da progesterona. Quando os extratos dos oócitos foram analisados individualmente, observou-se que as células apresentavam concentrações muito baixas, ou muito altas, da cinase ativada, sem concentrações intermediárias, indicando que, ao nível das células individuais, a resposta foi do tipo tudo-ou-nada, conforme desenhado em (C). (Adaptada de J. E. Ferrel e E. M. Machleder, *Science* 280:895-898, 1998. Com permissão de AAAS.)

fácil distingui-los. Quando se mede o efeito de um sinal sobre uma população inteira de células, ele pode parecer linear mesmo que as células individuais respondam de uma maneira tudo-ou-nada, mas com variação de célula para célula na concentração do sinal na qual a resposta ocorre; a **Figura 15-24** mostra um exemplo.

Além disso, as respostas lineares às vezes podem ser muito abruptas dependendo da intensidade do sinal, dando um aspecto de comportamento próximo do tipo comutador. As células usam uma grande variedade de mecanismos moleculares para conseguir estes efeitos. Em um dos mecanismos, deve haver a ligação de mais de uma molécula de sinalização intracelular à sua proteína-alvo para induzir a resposta. Conforme discutiremos mais adiante, quatro moléculas do mediador intracelular AMP cíclico, por exemplo, devem se ligar simultaneamente a todas as moléculas da *proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA)* para ativá-la. Uma nitidez de resposta similar é vista quando a ativação de uma proteína de sinalização intracelular exige a fosforilação em mais de um sítio. Tais respostas *cooperativas* tornam-se mais nítidas à medida que aumenta o número de moléculas cooperativas ou de grupos fosfato e, se o número for suficientemente grande, as respostas se tornam praticamente do tipo tudo-ou-nada (**Figura 15-25**).

As respostas também são mais nítidas quando uma molécula sinalizadora intracelular ativa uma enzima e, ao mesmo tempo, inibe outra que catalisa a reação oposta. A estimulação da degradação do glicogênio nas células musculares esqueléticas, induzida pelo hormônio *adrenalina* (epinefrina), é um exemplo bem-estudado desse tipo comum de regulação. A ligação da adrenalina a um receptor de superfície associado à proteína G leva a um aumento na concentração intracelular de AMP cíclico, o que, ao mesmo tempo, ativa a enzima que promove a degradação do glicogênio e inibe a enzima que promove sua síntese.

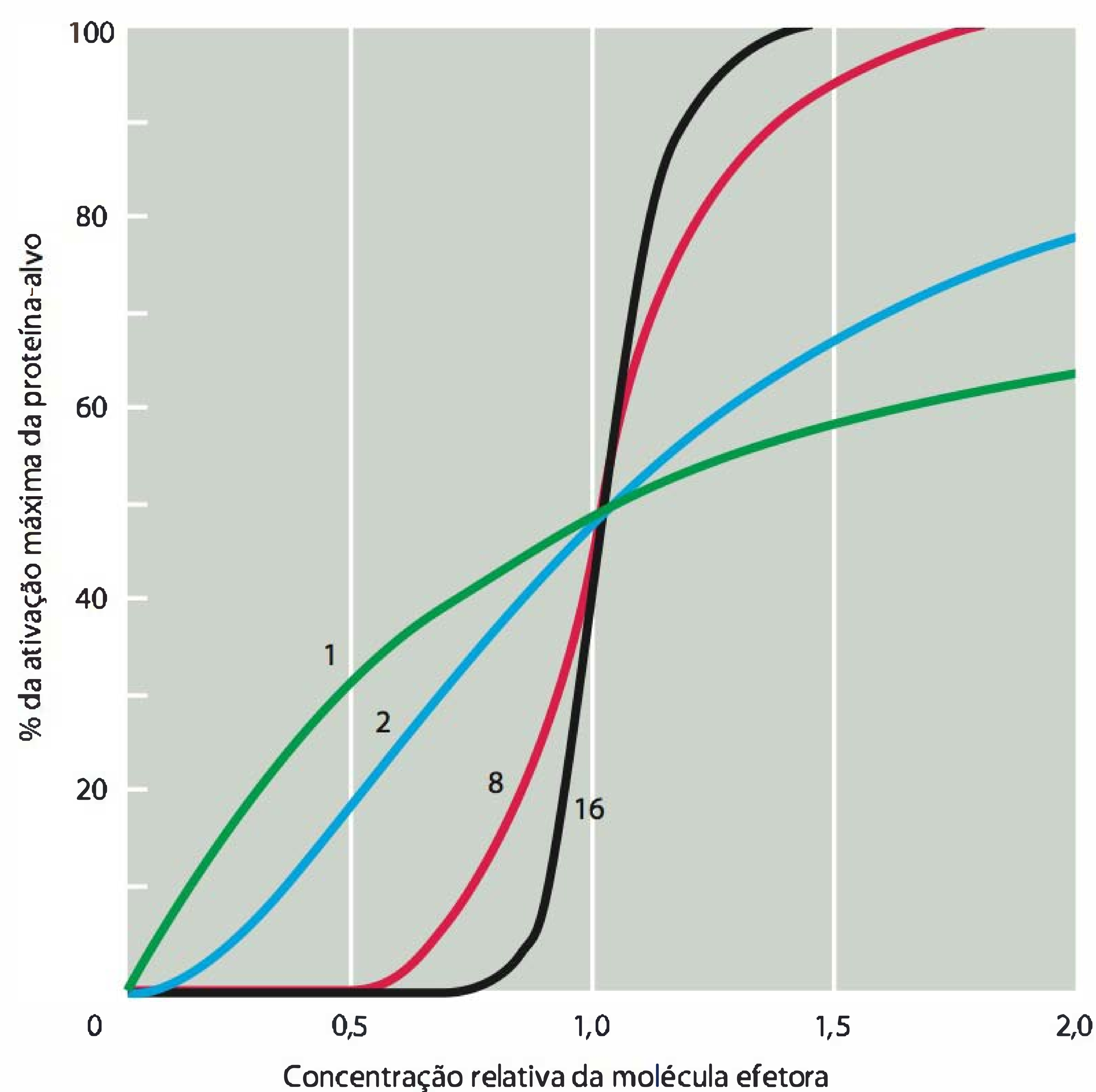


Figura 15-25 Curvas de ativação de uma proteína alostérica como uma função da concentração da molécula efetora. As curvas mostram como a definição da resposta aumenta com o aumento do número de moléculas efetoras que devem se ligar simultaneamente para ativar a proteína-alvo. As curvas mostradas são as esperadas se a ativação exigir a ligação simultânea de 1, 2, 8 ou 16 moléculas efetoras.

Todos esses mecanismos podem produzir respostas muito abruptas, mas ainda lineares, de acordo com a concentração da molécula-sinal extracelular. Para produzir respostas tudo-ou-nada verdadeiras é necessário outro mecanismo, a *retroalimentação positiva*, como discutiremos a seguir.

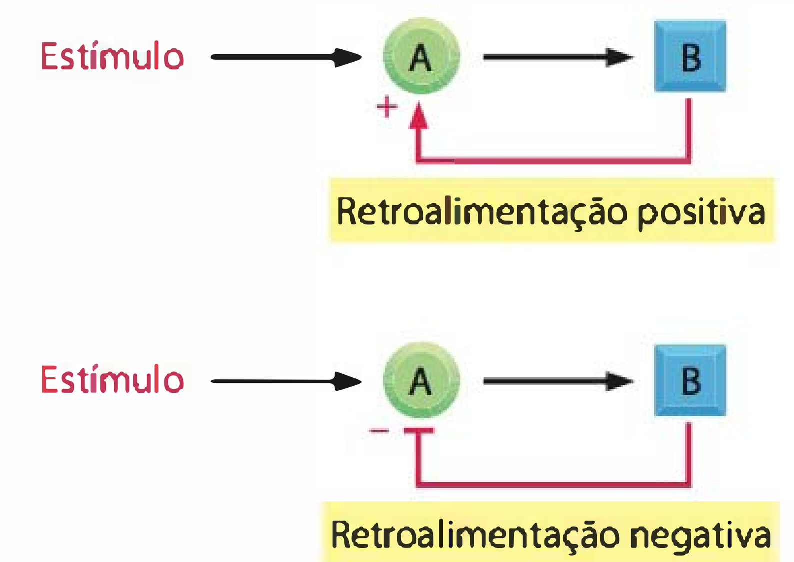


Figura 15-26 Retroalimentação positiva e negativa. Nestes exemplos simples, um estímulo ativa a proteína A, que, por sua vez, ativa a proteína B. Esta atua retroativamente sobre A, aumentando ou diminuindo sua atividade.

As redes de sinalização intracelular utilizam circuitos de retroalimentação

À semelhança das vias metabólicas intracelulares (discutidas no Capítulo 2), a maioria das redes de sinalização intracelular incorpora circuitos de retroalimentação, nos quais o produto de um processo atua retroativamente para regular este mesmo processo. Na *retroalimentação positiva*, o produto estimula sua própria produção; na *retroalimentação negativa*, o produto inibe sua própria produção (**Figura 15-26**). Os circuitos de retroalimentação são muito importantes em biologia, regulando muitos processos químicos e físicos na célula. Eles atuam em um enorme limite de escalas de tempo, desde milissegundos (no caso de um potencial de ação, p. ex. – ver Figura 11-29) até muitas horas (no caso das oscilações circadianas, p. ex. – ver Figura 7-73). Os que regulam a sinalização celular podem atuar exclusivamente dentro da célula-alvo ou envolver a secreção de sinais extracelulares. Focaremos aqui os circuitos de retroalimentação que ocorrem totalmente dentro da célula-alvo; mesmo os mais simples destes circuitos podem produzir efeitos complexos e interessantes.

Um **circuito de retroalimentação positiva** em uma via de sinalização pode transformar o comportamento da célula-alvo. Se a retroalimentação positiva for de uma intensidade apenas moderada, seu efeito será simplesmente aumentar de forma abrupta a resposta ao sinal. Contudo, se a retroalimentação for suficientemente forte, ela pode produzir um resultado qualitativamente diferente: um aumento descontrolado na quantidade do produto quando o sinal aumentar acima de um valor crítico, levando a um novo nível estável de produção que é nitidamente diferente daquele obtido quando o sinal era levemente mais fraco (**Figura 15-27**).

Esse tipo de resposta tudo-ou-nada está conectado a outra propriedade: uma vez que o sistema de resposta está no seu nível mais alto de ativação, esta condição é autossustentada e pode persistir mesmo depois que a intensidade do sinal tenha diminuído abaixo do seu valor crítico. Em tal caso, diz-se que o sistema é *biestável*: ele pode existir no estado "desligado" ou no estado "ligado", e um estímulo transiente pode alterá-lo de um estado para o outro (**Figura 15-28**A e B). As células usam os circuitos de retroalimentação positiva desse tipo para tomar decisões tudo-ou-nada estáveis, especialmente durante o desenvolvimento, quando as células em diferentes posições têm que escolher entre vias alternativas de desenvolvimento em resposta a sinais graduais posicionais (morfógenos), conforme discutido previamente. Por meio da retroalimentação positiva, um sinal extracelular transiente pode induzir mudanças de longa duração nas células e na sua progênie, as quais podem persistir por toda a vida do organismo. Os sinais podem desencadear a definição da célula muscular, por exemplo, pela ativação da transcrição de uma série de genes que codificam proteínas reguladoras de genes específicos de músculo, as quais estimulam a transcrição dos seus próprios genes, bem como de genes que codificam várias outras proteínas de célula muscular; dessa forma, a decisão de se tornar uma célula muscular passa a ser permanente (ver Figura 7-75). Este tipo de memória celular dependente de retroalimentação positiva é uma das maneiras básicas pelas quais a célula pode sofrer uma mudança duradoura de característica sem nenhuma alteração na sequência de seu DNA; e este estado alterado pode ser transmitido para suas células-filhas. Tais mecanismos de herança são chamados de *epigenéticos*, em contraste aos mecanismos genéticos que envolvem mutações no DNA, e são apresentados mais detalhadamente no Capítulo 7 (ver Figura 7-86).

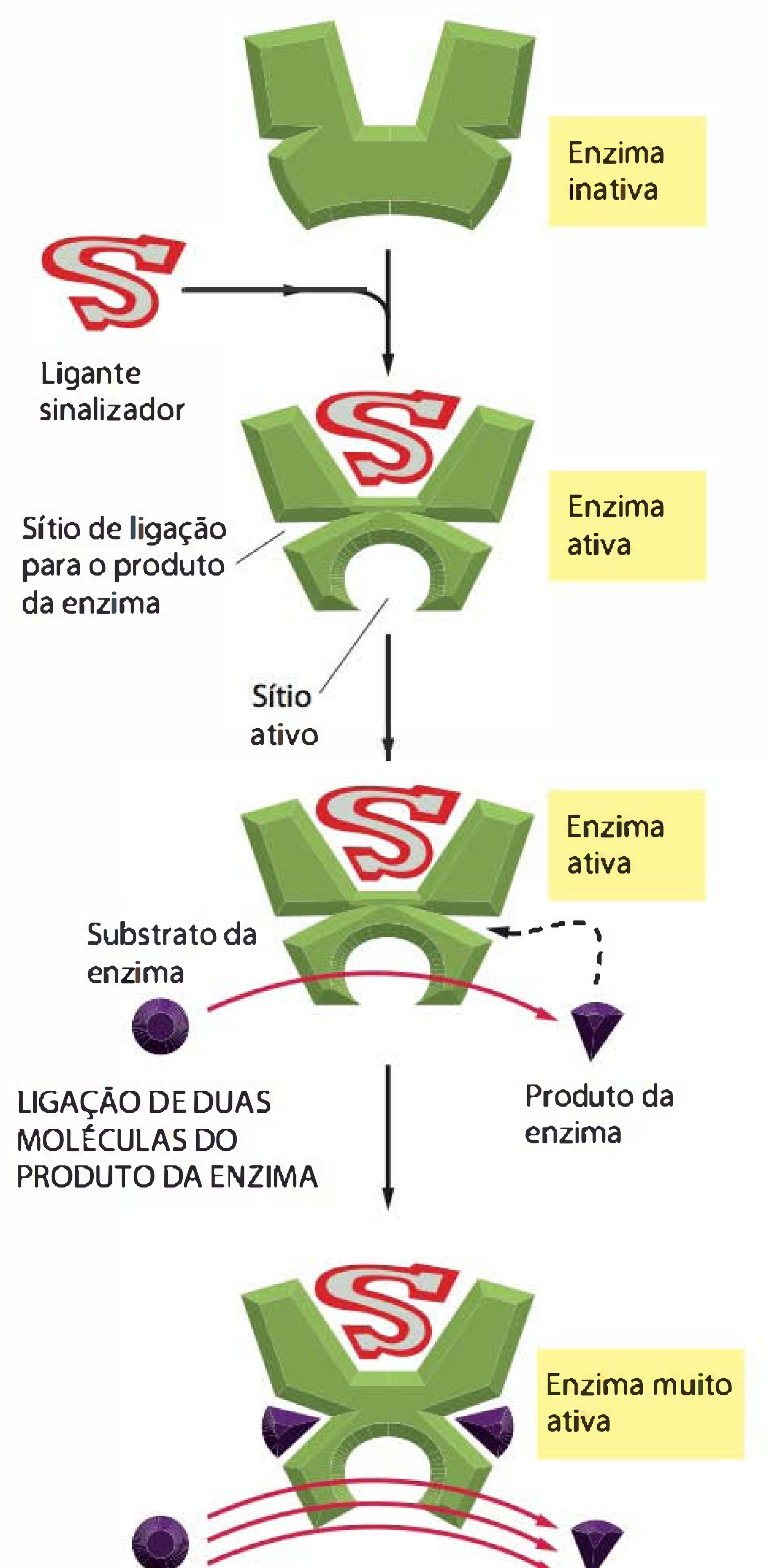


Figura 15-27 O mecanismo de retroalimentação positiva gerando comportamento do tipo comutador. Neste exemplo, uma molécula sinalizadora intracelular (ligante) ativa uma enzima localizada *downstream* em uma via de sinalização. Duas moléculas do produto da reação enzimática ligam-se a esta enzima e a mantêm ativada. A consequência é uma taxa muito baixa de síntese do produto na ausência do ligante. A taxa aumenta lentamente com a concentração do ligante até que, em um determinado nível limiar deste, quantidade suficiente do produto é sintetizada para ativar a enzima de uma forma autoaceleradora. A concentração do produto aumenta então rapidamente para um nível muito mais alto.

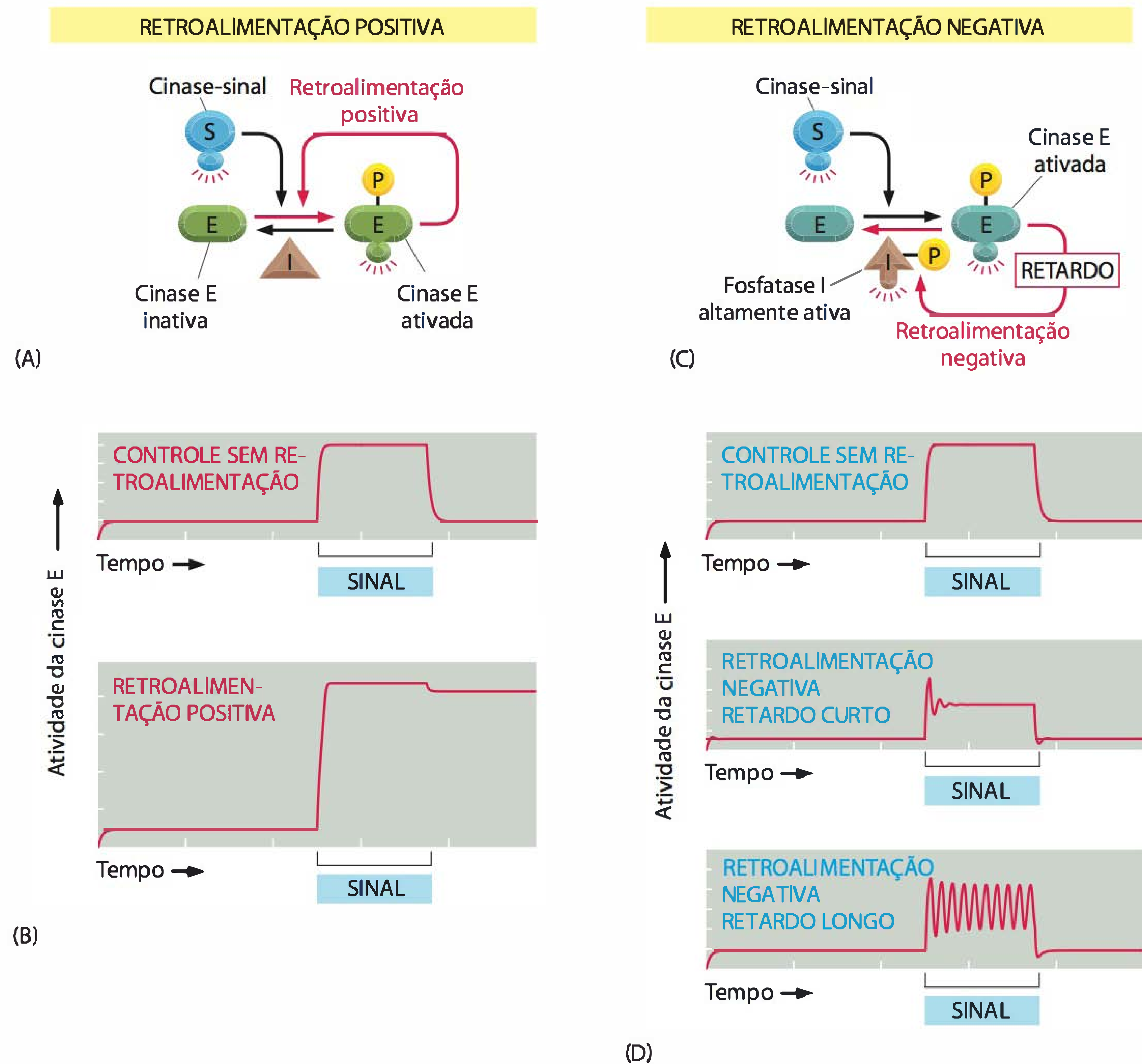


Figura 15-28 Alguns efeitos da retroalimentação simples. Os gráficos mostram os efeitos de circuitos simples de retroalimentação positiva e negativa. Em cada caso, o sinal inicial é uma proteína-cinase ativada (S) que ativa, por fosforilação, outra proteína-cinase (E); uma proteína-fosfatase (I) inativa, por desfosforilação, a cinase E. Nos gráficos, a linha *vermelha* indica a atividade da cinase E ao longo do tempo. A barra *azul* sublinhada indica o tempo de permanência do sinal inicial (cinase S ativada). (A) Diagrama do circuito de retroalimentação positiva, no qual a cinase E ativada atua retroativamente promovendo a sua própria fosforilação e ativação; a atividade basal da fosfatase I desfosforila a cinase E em uma taxa baixa constante. (B) O gráfico superior mostra que, sem a retroalimentação, a atividade da cinase E é simplesmente proporcional (com uma latência curta) ao nível da estimulação dado pela cinase S. O gráfico inferior mostra que, com o circuito de retroalimentação positiva, o sistema é biestável (isto é, capaz de coexistir nos dois estados); a estimulação transitória pela cinase S comuta o sistema de um estado "desligado" para um estado "ligado", o qual persiste após a remoção do estímulo. (C) Diagrama do circuito de retroalimentação negativa, no qual a cinase E ativada fosforila e ativa a fosfatase I, aumentando, dessa forma, a taxa na qual a fosfatase desfosforila e inativa a cinase E. O gráfico superior mostra novamente a resposta da atividade da cinase E sem retroalimentação. Os outros gráficos mostram os efeitos, sobre a atividade da cinase E, da retroalimentação negativa agindo após períodos curtos ou longos de retardo. No retardo curto, o sistema mostra uma resposta intensa e curta quando o sinal é alterado abruptamente, e a retroalimentação conduz a resposta de volta a um nível mais baixo. No retardo longo, a retroalimentação produz oscilações sustentadas enquanto o estímulo estiver presente.

Pequenas mudanças nos detalhes da retroalimentação podem alterar radicalmente o modo pelo qual o sistema responde, mesmo neste exemplo simples; a figura mostra somente um pequeno exemplo dos comportamentos possíveis.

Em contraste à retroalimentação positiva, um **circuito de retroalimentação negativa** neutraliza o efeito de um estímulo e, dessa forma, abrevia e limita o nível da resposta, tornando o sistema menos sensível a perturbações. No entanto, como no caso da retroalimentação positiva, podem ser obtidos fenômenos qualitativamente diferentes quando a retroalimentação atua mais vigorosamente. Uma retroalimentação negativa com um retardo suficientemente longo pode produzir respostas oscilantes. As oscilações podem persistir enquanto o estímulo estiver presente (Figura 15-28C) ou podem mesmo ser geradas espontaneamente, sem a necessidade de um sinal externo (ver Figura 22-82). Mais adiante neste capítulo, encontraremos um grande número de exemplos desse comportamento oscilatório nas respostas intracelulares aos sinais extracelulares; todos eles dependem de retroalimentação negativa.

Se a retroalimentação negativa opera com um retardo curto, o sistema se comporta como um detector de mudança. Ele dá uma resposta forte ao estímulo, mas ela decai rapidamente mesmo com a persistência do estímulo; se o estímulo for aumentado subitamente, contudo, o sistema responde de novo de forma intensa, mas novamente a resposta decai rapidamente. Esse é o fenômeno de *adaptação,* que discutiremos a seguir.

As células podem ajustar sua sensibilidade ao sinal

As células e os organismos são capazes de detectar a mesma porcentagem de variações de um sinal em uma escala muito ampla de intensidade do estímulo em resposta a muitos tipos de estímulos. As células-alvo conseguem isso por meio de um processo reversível de **adaptação**, ou **dessensibilização**, pelo qual uma exposição prolongada a um estímulo reduz a resposta celular. Na sinalização química, a adaptação permite que as células respondam a *alterações* na concentração da molécula-sinal extracelular (em vez de responderem a sua concentração absoluta) em uma escala muito ampla de concentrações do sinal. O mecanismo básico é o de uma retroalimentação negativa que opera com retardo curto: uma resposta intensa altera a maquinaria de sinalização envolvida, de forma que esta se torna menos responsiva à mesma concentração do sinal (ver Figura 15-28D, gráfico do meio). Graças ao retardo, contudo, uma alteração súbita no estímulo é capaz de estimular a célula novamente, por um curto período, antes que a retroalimentação negativa possa atuar.

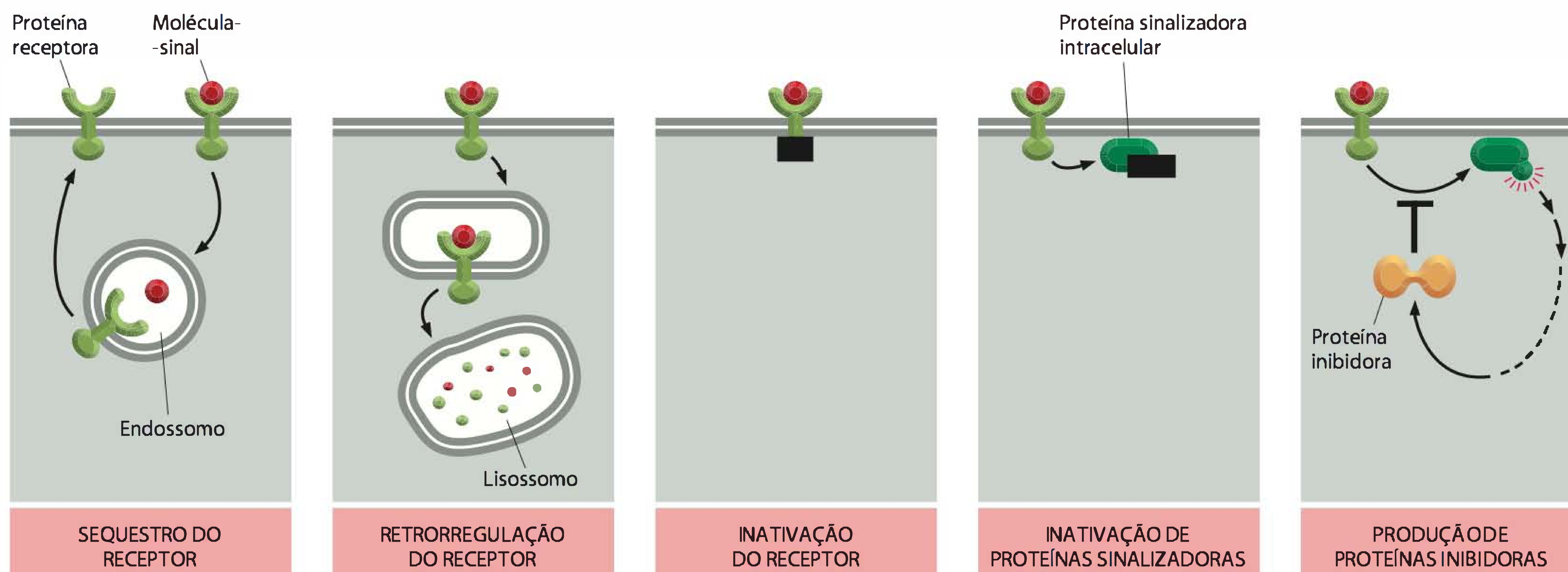


Figura 15-29 Algumas formas pelas quais as células-alvo podem se tornar dessensibilizadas (adaptadas) a uma molécula-sinal extracelular. Os mecanismos mostrados aqui, relacionados com o receptor, com frequência envolvem fosforilação ou ubiquitinação das proteínas receptoras. Na quimiotaxia bacteriana, a ser discutida mais tarde, a adaptação depende da metilação das proteínas receptoras.

A dessensibilização a uma molécula-sinal pode ocorrer de várias maneiras. Ela pode resultar de uma inativação dos próprios receptores. A chegada de uma molécula-sinal aos receptores de superfície, por exemplo, pode induzir a sua endocitose e o sequestro temporário dentro de endossomos. Em alguns casos, essa endocitose do receptor, induzida pelo sinal, leva à destruição dos receptores nos lisossomos, um processo conhecido como *retrorregulação do receptor* (em outros casos, contudo, os receptores ativados continuam sinalizando mesmo após terem sido endocitados, como discutiremos mais tarde). Os receptores também podem ser dessensibilizados (inativados) na superfície celular – por exemplo, tornando-se fosforilados ou metilados – pouco tempo depois de sua ativação. A dessensibilização também pode ocorrer em sítios posteriores ao receptor por uma alteração nas proteínas de sinalização intracelular envolvidas na transdução do sinal extracelular, ou pela produção de uma proteína inibidora que bloqueie o processo de transdução do sinal. Esses diversos mecanismos de dessensibilização estão comparados na **Figura 15-29**.

Após ter examinado alguns dos princípios gerais da sinalização celular, vamos agora retornar aos receptores associados à proteína G. Esta é, de longe, a maior classe de receptores de superfície, mediando as respostas aos mais diversos tipos de sinais extracelulares.

Resumo

As células de um animal pluricelular foram programadas, durante o desenvolvimento, para responder a um conjunto específico de sinais extracelulares produzidos por outras células. Estas moléculas-sinal atuam em várias combinações para regular o comportamento celular. A maioria das moléculas-sinal medeia uma forma de sinalização na qual são secretados intermediários locais que são removidos rapidamente, destruídos ou imobilizados, de forma que agem somente nas células vizinhas. Outras moléculas-sinal permanecem ligadas à superfície externa da célula sinalizadora e medeiam a sinalização dependente de contato. Existem também dois tipos distintos de sinalização à longa distância. Na sinalização endócrina, os hormônios produzidos pelas células endócrinas são transportados pelo sangue para as células-alvo em todo o corpo. Na sinalização sináptica, os neurotransmissores secretados pelos axônios das células nervosas atuam localmente nas células pós-sinápticas com as quais os axônios fazem contato.

A sinalização celular requer não somente moléculas-sinal extracelulares, mas também um conjunto de proteínas receptoras expressas pelas células-alvo que se ligam especificamente às moléculas-sinal. Algumas moléculas-sinal pequenas e hidrofóbicas, como os hormônios esteroides e tireoideos, difundem-se através da membrana plasmática da célula-alvo e ativam proteínas receptoras intracelulares que regulam diretamente a transcrição de genes específicos. Os gases óxido nítrico e monóxido de carbono se difundem pela membrana plasmática da célula-alvo e atuam como mediadores locais, ativando uma enzima intracelular, em geral a guanilil-ciclase, que produz GMP cíclico na célula-alvo. Contudo, a maioria das moléculas-sinal extracelulares é hidrofílica e não pode atravessar a membrana plasmática. Estas ativam proteínas receptoras de superfície celular, que atuam como transdutores de sinal, convertendo o sinal extracelular em sinais intracelulares que modificam o comportamento da célula-alvo.

As três maiores famílias de receptores de superfície transduzem sinais extracelulares de diferentes maneiras. Os receptores associados a canais iônicos são canais iônicos com portões controlados por transmissores, que abrem ou fecham por curtos períodos, em resposta à ligação de um neurotransmissor. Os receptores associados à proteína G ativam ou inativam, indiretamente, as enzimas ligadas à membrana plasmática ou aos canais iônicos, via proteínas triméricas de ligação a GTP (proteínas G). Os receptores associados a enzimas atuam diretamente como enzimas ou estão associados a elas; essas enzimas em geral são cinases que fosforilam os receptores e proteínas sinalizadoras específicas na célula-alvo.

Os receptores associados à proteína G ou os associados a enzimas, uma vez ativados, transmitem o sinal para o interior da célula pela ativação de cadeias de proteínas sinalizadoras intracelulares; alguns transduzem, amplificam ou distribuem o sinal à medida que o transmitem, enquanto outros integram sinais de diferentes vias de sinalização. Alguns funcionam como comutadores, ativados transitoriamente por fosforilação ou por ligação de GTP. Os grandes complexos de sinalização funcionais se formam por meio de domínios modulares de interação nas proteínas sinalizadoras, que permitem a formação de redes de sinalização funcionais.

As células-alvo usam uma variedade de mecanismos intracelulares, incluindo circuitos de retroalimentação para ajustar as maneiras pelas quais respondem aos sinais extracelulares. Circuitos de retroalimentação positiva podem ajudar as células a responder de uma forma tudo-ou-nada a aumentos graduais na concentração de um sinal extracelular ou para converter um sinal de curta duração em uma resposta de longa duração ou mesmo irreversível. A retroalimentação negativa com retardo permite a dessensibilização das células à molécula-sinal, o que as torna capazes de responder a pequenas mudanças na concentração desta molécula em uma escala muito ampla de concentrações.

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS À PROTEÍNA G (GPCRs) E MEDIADORES INTRACELULARES PEQUENOS

Todos os eucariotos usam **receptores associados à proteína G** (**GPCRs**, *G-protein-coupled receptors*). Estes formam a maior família de receptores de superfície celular e medeiam a maioria das respostas aos sinais do mundo externo, bem como a sinais de outras células, como hormônios, neurotransmissores e mediadores locais. Os sentidos da visão, da gustação e do olfato (com a possível exceção do gosto ácido) dependem deles. Existem mais de 700 GPCRs em humanos, e nos camundongos existem cerca de 1.000 relacionados somente com o sentido do olfato. As moléculas-sinal que interagem com os GPCRs são tão variadas em estrutura como o são em função e incluem proteínas e pequenos peptídeos, bem como derivados de aminoácidos e ácidos graxos, sem mencionar fótons de luz e todas as moléculas que podemos cheirar e degustar. A mesma molécula-sinal pode ativar muitos membros da família dos GPCRs; por exemplo, nove receptores diferentes, pelo menos, são ativados pela adrenalina, outros cinco, ou mais, pela acetilcolina, e pelo menos 14, pelo neurotransmissor serotonina. Os diferentes receptores para um mesmo sinal são, geralmente, expressos em tipos celulares diferentes e induzem respostas diferentes.

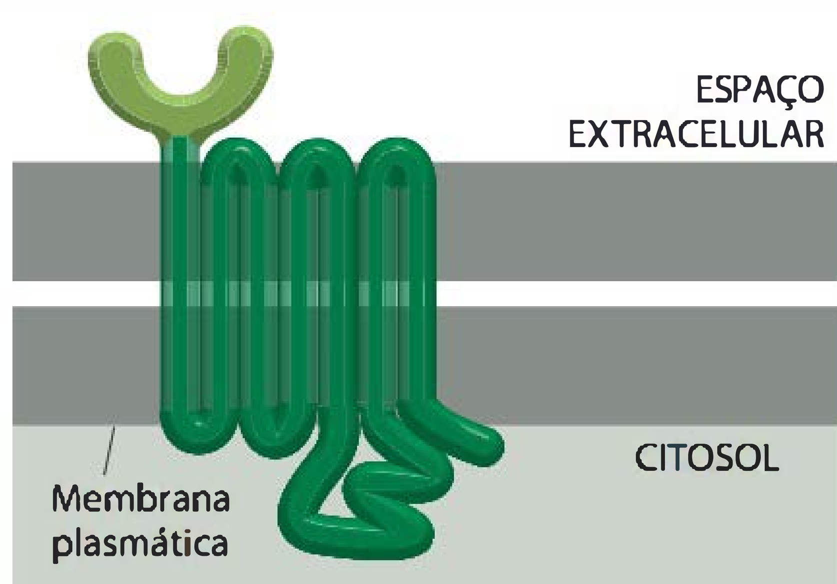


Figura 15-30 Receptor associado à proteína G (GPCR). Os GPCRs que interagem com ligantes proteicos possuem um domínio extracelular grande formado pela parte da cadeia polipeptídica mostrada em *verde-claro*. Esse domínio, juntamente com alguns dos segmentos transmembrana, interage com o ligante. Os receptores para ligantes pequenos como a adrenalina têm domínios extracelulares pequenos, e o ligante interage profundamente, no plano da membrana, com um sítio formado por aminoácidos de vários segmentos transmembrana.

A despeito da diversidade química e funcional das moléculas-sinal que os ativam, todos os GPCRs têm uma estrutura semelhante. Eles consistem em uma única cadeia polipeptídica que atravessa sete vezes a bicamada lipídica (**Figura 15-30**). Além de sua orientação característica na membrana plasmática, todos usam as proteínas G para transmitir o sinal para o interior da célula.

A superfamília dos GPCRs inclui a *rodopsina*, uma proteína ativada pela luz no olho dos vertebrados, bem como os numerosos receptores olfativos nas fossas nasais dos vertebrados. Outros membros da família são encontrados em organismos unicelulares: um exemplo são os receptores que reconhecem fatores de acasalamento nas leveduras. É provável que os GPCRs que medeiam a sinalização célula-célula nos organismos multicelulares tenham evoluído dos receptores sensoriais dos eucariotos unicelulares ancestrais.

É extraordinário que a metade dos fármacos conhecidos atue por meio dos GPCRs ou pelas vias de sinalização ativadas por eles. Das muitas centenas de genes no genoma humano que codificam GPCRs, cerca de 150 codificam receptores órfãos, para os quais não se conhecem os ligantes. Muitos deles são prováveis alvos para novos fármacos que ainda não foram descobertos.

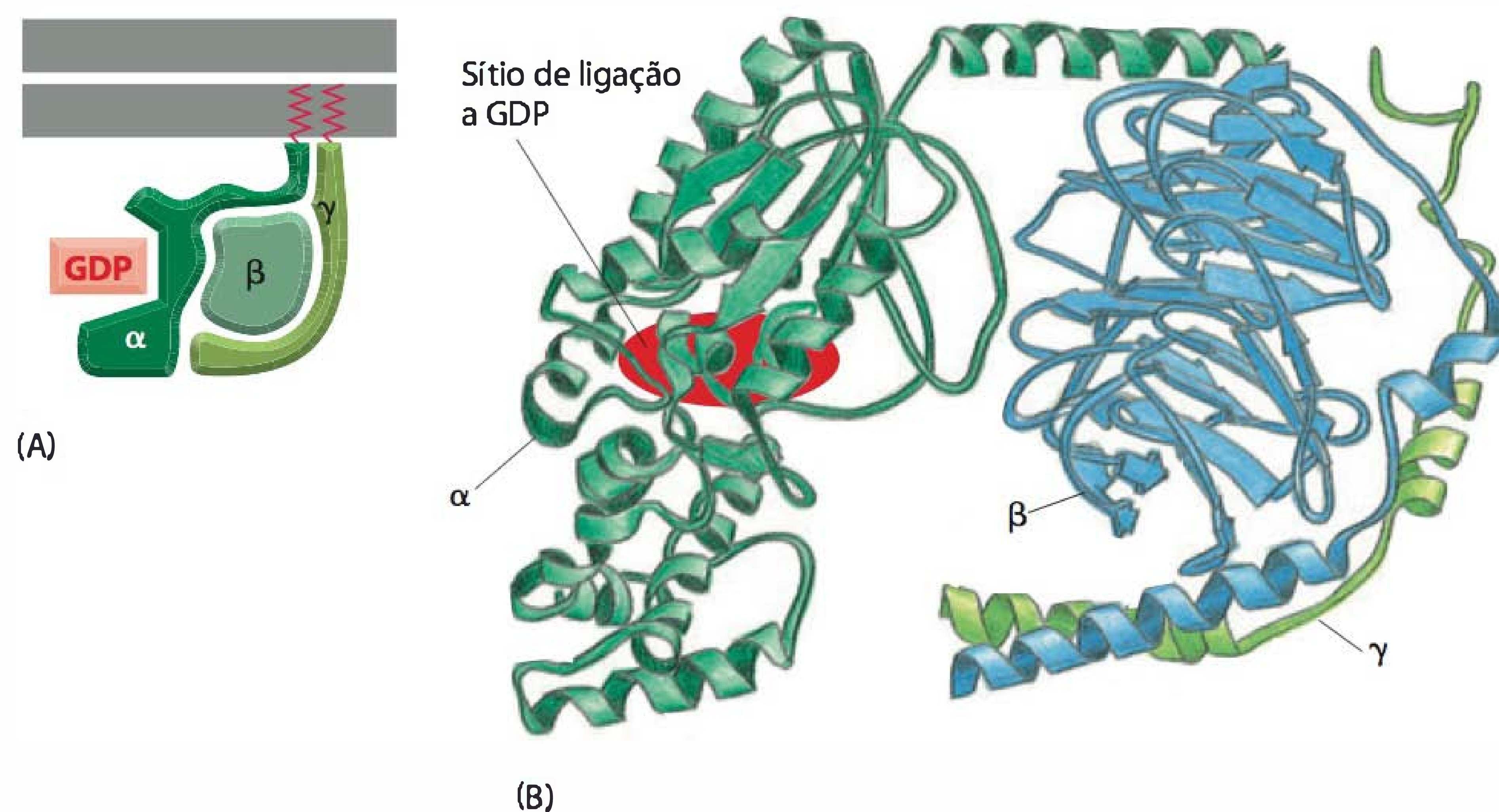


Figura 15-31 A estrutura de uma proteína G inativa. (A) Note que ambas as subunidades α e γ possuem moléculas de lipídeos unidas covalentemente (*vermelho*) que auxiliam a ligação delas à membrana plasmática, e que a subunidade α tem GDP ligado. (B) A estrutura tridimensional de uma proteína G inativa, com base na transducina, a proteína G que participa da transdução visual (discutida mais adiante). A subunidade α contém o domínio de GTPase e se liga a um dos lados da subunidade β, o que bloqueia o domínio em uma conformação inativa que liga GDP. A subunidade γ se liga ao outro lado da subunidade β, as duas subunidades juntas formam uma unidade funcional única. (B, com base em D. G. Lombright et al., *Nature* 379:311-319, 1996. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As proteínas G triméricas transmitem os sinais a partir dos receptores associados à proteína G

Quando uma molécula-sinal extracelular se liga a um GPCR, este sofre uma mudança conformacional que o torna capaz de ativar uma **proteína trimérica de ligação a GTP** (**proteína G**). Esta proteína G está ligada à face citoplasmática da membrana, onde acopla funcionalmente o receptor a enzimas ou a canais iônicos na membrana. Em alguns casos, a proteína G está associada fisicamente ao receptor antes da ativação deste, enquanto em outros ela somente se liga após a ativação do receptor. Existem vários tipos de proteínas G, cada uma específica para um conjunto particular de receptores associados e para um conjunto particular de proteínas-alvo na membrana plasmática. Todas têm, contudo, uma estrutura semelhante e funcionam de modo similar.

As proteínas G são formadas por três subunidades – α, β e γ. No estado não-estimulado, a subunidade α possui GDP, e a proteína G está inativa (**Figura 15-31**). Quando um receptor associado é ativado, ele atua como um fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF) e induz a subunidade α a liberar seu GDP, permitindo que o GTP se ligue no seu lugar. Essa troca causa uma grande mudança conformacional na proteína G, ativando-a. Acreditava-se originalmente que a ativação levasse sempre à dissociação do trímero em dois componentes ativados – uma *subunidade* α e um *complexo* βγ. Evidências recentes, no entanto, mostram que, pelo menos em alguns casos, a mudança conformacional expõe superfícies previamente ocultas entre a subunidade α e o complexo βγ, de forma que ambos possam agora interagir com seus alvos sem requerer a dissociação das subunidades (**Figura 15-32**). Estes alvos são enzimas ou canais iônicos na membrana plasmática e transmitem o sinal para a frente.

A subunidade α é uma GTPase que se inativa ao hidrolisar o GTP ligado a ela a GDP. O tempo que a proteína G permanece ativa depende da rapidez com que a subunidade α hidrolisa o GTP. Esse tempo geralmente é curto porque a atividade da GTPase é bastante aumentada pela ligação da subunidade α a uma segunda proteína, que pode ser a proteína-alvo ou um **regulador da sinalização da proteína G** (**RGS**). As proteínas RGS atuam como proteínas de ativação da GTPase (GAPs) especificas para a subunidade α (ver Figura 15-19), e elas estão envolvidas na extinção das respostas mediadas por proteínas G em todos os eucariotos. Existem 25 proteínas RGS codificadas no genoma humano e cada uma delas interage com um conjunto particular de proteínas G.

Os GPCRs ativam várias vias de sinalização intracelular, incluindo algumas que também são ativadas pelos receptores associados a enzimas. Nesta seção, no entanto, focaremos aquelas vias ativadas pelos GPCRs que utilizam pequenos mediadores intracelulares.

Algumas proteínas G regulam a produção de AMP cíclico

O **AMP cíclico** (**cAMP**) atua como um pequeno mediador intracelular em todos os procariotos e células animais estudados. Sua concentração intracelular normal é de 10^{-7} M, mas um sinal extracelular pode causar, em alguns segundos, um aumento de mais de 20 vezes nesses níveis (**Figura 15-33**). Conforme explicado anteriormente (ver Figura 15-11), uma resposta tão rápida requer que a síntese rápida da molécula seja equilibrada por sua rápida

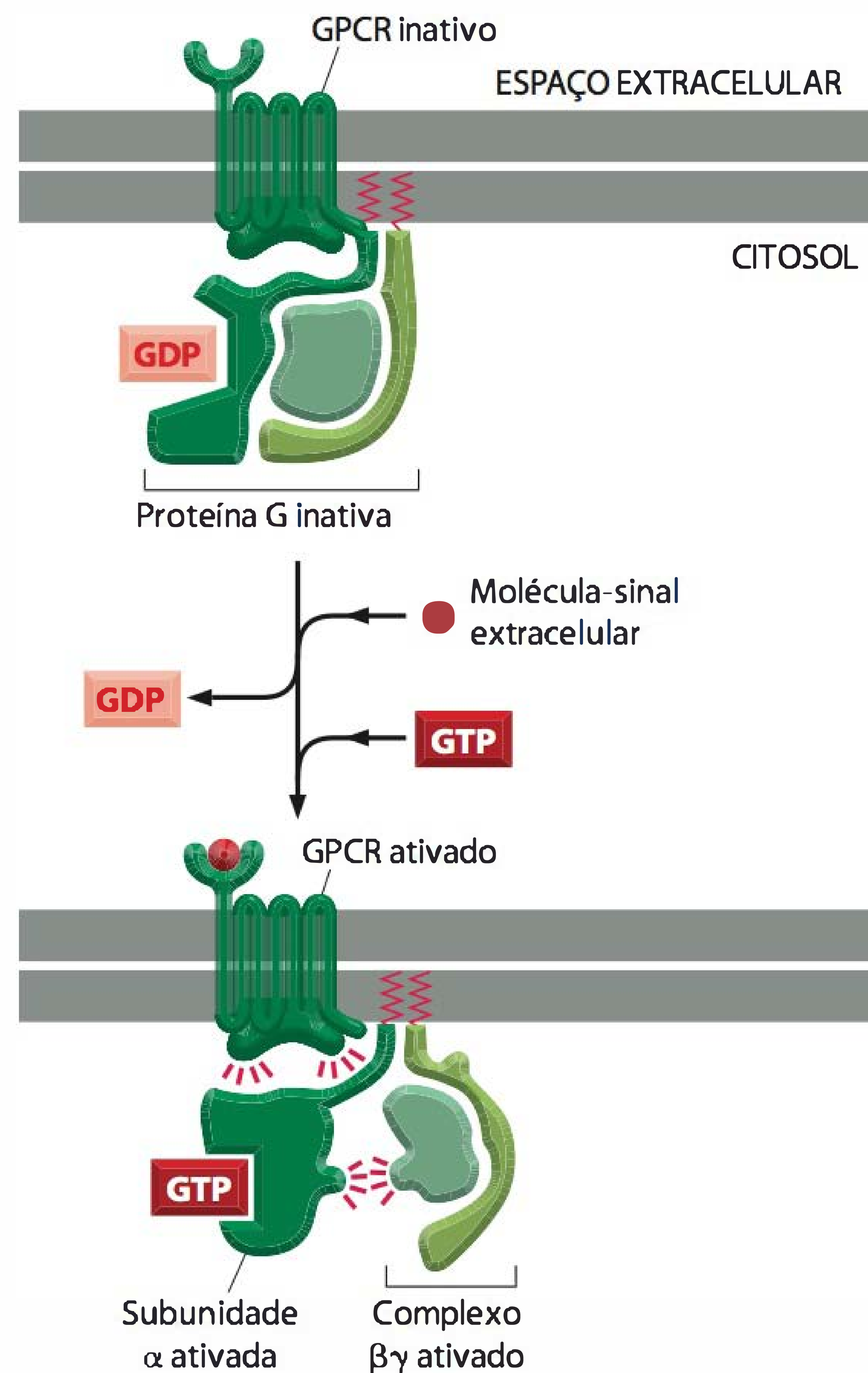


Figura 15-32 Ativação de uma proteína G por um GPCR ativado. A ligação de um sinal extracelular ao GPCR altera a conformação do receptor, o qual, por sua vez, altera a conformação da proteína G. A alteração da subunidade α da proteína G permite a troca de GDP por GTP, o que ativa tanto a subunidade α quanto o complexo βγ, e ambos podem regular a atividade de proteínas-alvo na membrana plasmática. O receptor permanece ativo enquanto a molécula-sinal extracelular estiver ligada a ele, podendo, por isso, catalisar a ativação de muitas moléculas de proteína G, as quais se dissociam do receptor logo que são ativadas (não-mostrado). Em alguns casos, a subunidade α e o complexo βγ se dissociam quando a proteína G é ativada.

degradação ou remoção. O cAMP é sintetizado a partir do ATP por uma enzima de membrana chamada de **adenilil-ciclase**, sendo degradado rápida e continuamente por uma ou mais **fosfodiesterases de cAMP** que o hidrolisam em 5'-monofosfato de adenosina (5'–AMP) (**Figura 15-34**).

Muitas moléculas-sinal extracelulares atuam aumentando o conteúdo de cAMP e o fazem aumentando a atividade da adenilil-ciclase em oposição à atividade basal permanente da fosfodiesterase. A adenilil-ciclase é uma proteína transmembrana grande de múltiplas passagens, com o seu domínio catalítico no lado citosólico da membrana. Nos mamíferos existem pelo menos oito isoformas, sendo a maioria delas regulada por proteínas G e Ca^{2+}. Os GPCRs que agem pelo aumento do cAMP estão acoplados a uma **proteína G estimuladora (G_s)**, que ativa a adenilil-ciclase, aumentando, assim, a concentração de cAMP. Outra proteína G, chamada de **proteína G inibidora (G_i)**, inibe a adenilil-ciclase, mas atua principalmente regulando diretamente os canais iônicos (como discutiremos mais adiante).

Tanto a G_s como a G_i são alvos de algumas toxinas bacterianas de importância médica. A *toxina da cólera*, produzida pela bactéria que causa a cólera, é uma enzima que catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD^+ intracelular para a subunidade α da G_s. Essa ribosilação altera a subunidade α de forma que ela não pode mais hidrolisar seu GTP, fazendo com que se mantenha no estado ativo, estimulando indefinidamente a adenilil-ciclase. A elevação prolongada nos níveis de cAMP nas células epiteliais intestinais provoca um grande influxo de Cl^- e de água para o lúmen do intestino, causando, dessa forma, a diarreia grave que caracteriza a cólera. A *toxina pertussis*, produzida pela bactéria que causa a coqueluche,

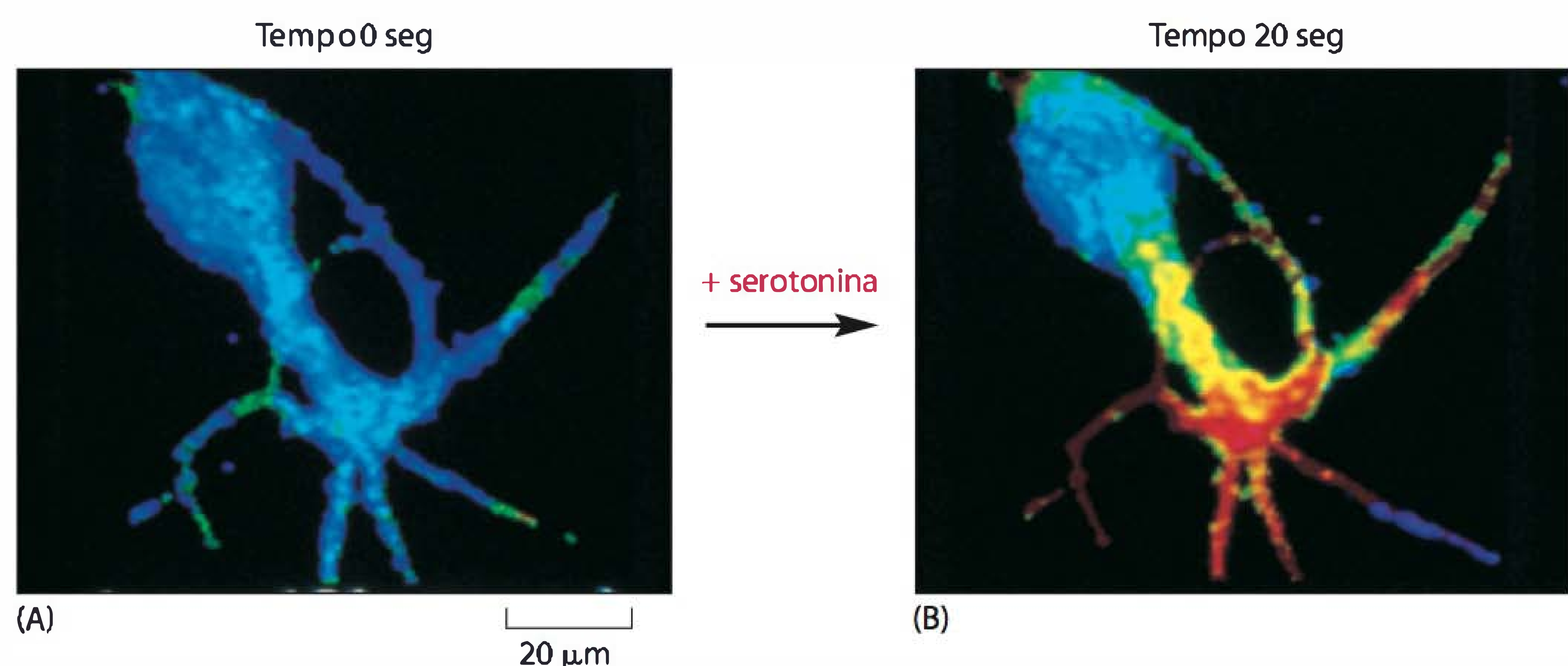


Figura 15-33 Aumento da concentração de AMP cíclico em resposta a um sinal extracelular. Esta célula nervosa em cultura responde ao neurotransmissor serotonina, que atua por meio de um GPCR e causa um aumento rápido na concentração intracelular de AMP cíclico. Para acompanhar o nível de AMP cíclico, a célula recebeu uma proteína fluorescente que tem sua fluorescência alterada quando se liga a ele. *Azul* indica um nível baixo, *amarelo*, um nível intermediário, e *vermelho*, um nível alto de AMP cíclico. (A) Na célula em repouso, o nível é de 5×10^{-8}M. (B) Vinte segundos após a adição de serotonina ao meio de cultura, o nível intracelular de AMP cíclico subiu para mais de 10^{-6} M nas partes relevantes da célula, um aumento de mais de vinte vezes. (De Brian J. Bacskai et al., *Science* 260:222-226, 1993. Com permissão de AAAS.)

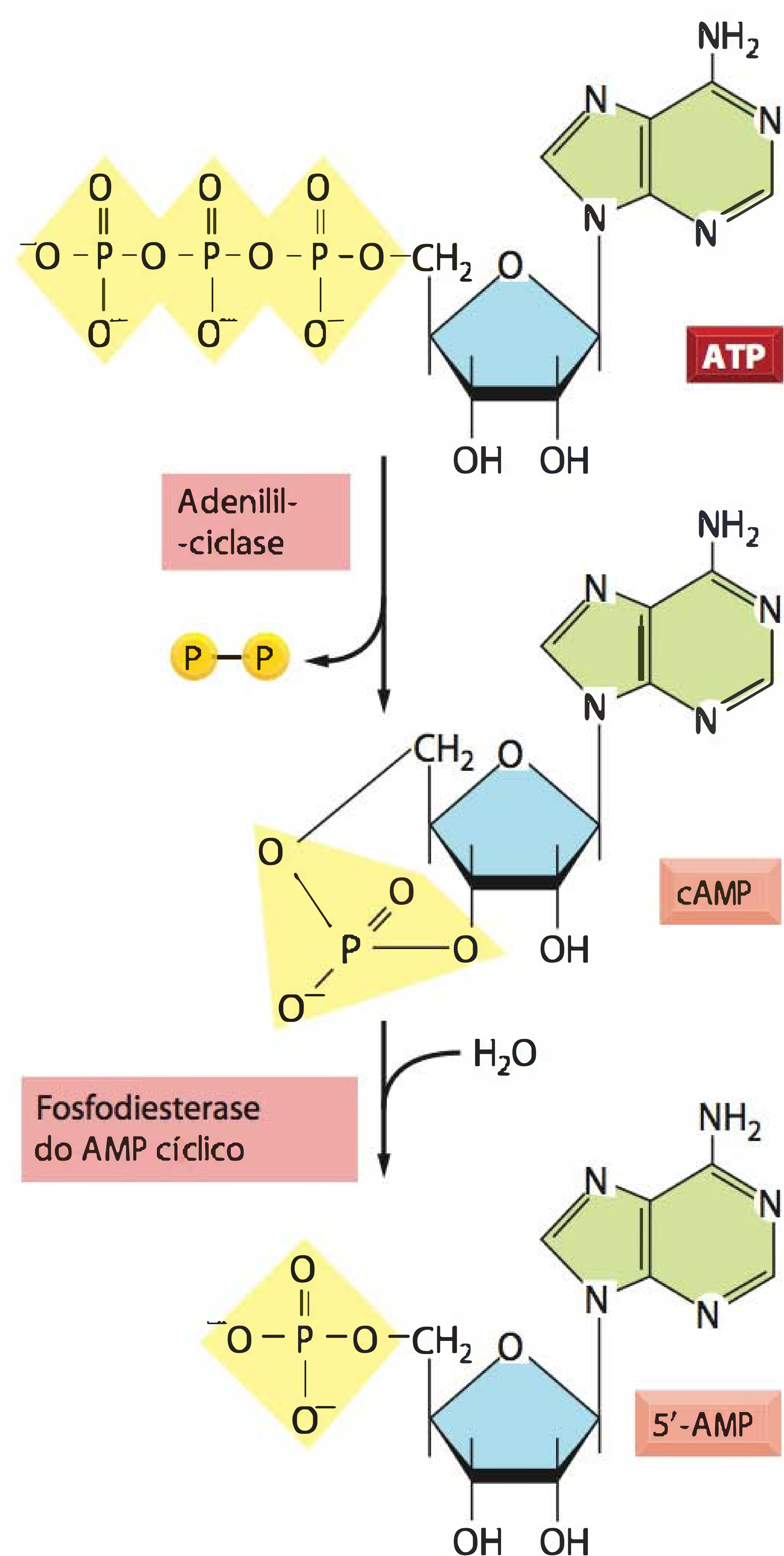


Figura 15-34 Síntese e degradação do AMP cíclico. O AMP cíclico (cAMP) é sintetizado a partir do ATP por uma reação de ciclização, catalisada pela enzima adenilil-ciclase, na qual são removidos dois grupos fosfato na forma de pirofosfato (Ⓟ – Ⓟ); a síntese é impulsionada por uma pirofosfatase que hidrolisa o pirofosfato formado, liberando fosfato (não-mostrado). O cAMP é instável na célula, pois é hidrolisado por uma fosfodiesterase específica, formando 5'-AMP, como indicado.

catalisa a ribosilação do ADP da subunidade α da G_i, impedindo sua interação com os receptores; como resultado, essa subunidade retém seu GDP, sendo incapaz de regular suas proteínas-alvo. Essas duas toxinas são amplamente utilizadas em experimentos para determinar se a resposta celular a um sinal é mediada por G_s ou por G_i.

Algumas das respostas mediadas pelo aumento na concentração de cAMP estimulado por G_s estão listadas na **Tabela 15-1**. Como mostra a tabela, tipos celulares diferentes respondem diferentemente a um aumento na concentração do cAMP, e cada um dos tipos celulares responde da mesma maneira, ainda que o aumento seja induzido por sinais extracelulares diferentes. Por exemplo, pelo menos quatro hormônios ativam a adenilil-ciclase nas células adiposas e todos estimulam a degradação de triglicerídeos (a forma de armazenamento de gordura) a ácidos graxos (ver Tabela 15-1).

Os indivíduos geneticamente deficientes em uma determinada subunidade α de G_s apresentam respostas reduzidas a determinados hormônios. Como consequência, mostram anormalidades metabólicas, desenvolvimento ósseo anormal e são mentalmente retardados.

Tabela 15-1 Algumas respostas celulares induzidas por hormônios mediadas por AMP cíclico

TECIDO-ALVO	HORMÔNIO	RESPOSTA PRINCIPAL
Tireoide	Hormônio estimulador da tireoide (TSH)	Síntese e secreção do hormônio da tireoide
Córtex adrenal	Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)	Secreção de cortisol
Ovário	Hormônio luteinizante (LH)	Secreção de progesterona
Músculo	Adrenalina	Degradação do glicogênio
Osso	Paratormônio	Reabsorção óssea
Coração	Adrenalina	Aumento da frequência cardíaca e da força de contração
Fígado	Glucagon	Degradação do glicogênio
Rim	Vasopressina	Reabsorção de água
Tecido adiposo	Adrenalina, ACTH, glucagon, TSH	Degradação de triglicerídeos

A proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA) faz a mediação da maioria dos efeitos do AMP cíclico

O cAMP exerce seus efeitos na maioria das células animais, principalmente por meio da ativação da **proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA).** Essa enzima fosforila serinas ou treoninas específicas de determinadas proteínas-alvo, inclusive proteínas de sinalização intracelular e proteínas efetoras, regulando suas atividades. As proteínas-alvo diferem nos diferentes tipos celulares, o que explica por que os efeitos do cAMP variam tanto dependendo do tipo celular (ver Tabela 15-1).

No seu estado inativo, a PKA consiste em um complexo de duas subunidades catalíticas e de duas subunidades reguladoras. A ligação do cAMP às subunidades reguladoras altera a conformação dessas subunidades, provocando sua dissociação do complexo. As subunidades catalíticas liberadas são, assim, ativadas e fosforilam substratos proteicos específicos (**Figura 15-35**). As subunidades reguladoras da PKA (também chamada de cinase A) são importantes para localizar a enzima dentro da célula: *proteínas especiais de ancoragem à cinase A* (*AKAPs, A-kinase anchoring proteins*) se ligam simultaneamente às subunidades reguladoras e a componentes do citoesqueleto ou à membrana de uma organela, confinando o complexo enzimático a um determinado compartimento subcelular. Algumas dessas proteínas de ancoragem também se ligam a outras proteínas sinalizadoras, formando um complexo que funciona como um módulo de sinalização. Uma AKAP localizada ao redor do núcleo das células musculares cardíacas, por exemplo, liga-se à PKA e a uma fosfodiesterase que hidrolisa o cAMP. Nas células não-estimuladas, a fosfodiesterase mantém baixa a concentração local de cAMP, de forma que a PKA associada está inativa; nas células estimuladas, a concentração de cAMP aumenta rapidamente, suplantando e ativando a PKA. Entre as proteínas-alvo fosforiladas e ativadas por PKA nestas células está a fosfodiesterase adjacente, a qual reduz de novo, rapidamente, a concentração de cAMP. Esse arranjo converte o que poderia ser uma resposta longa e fraca da PKA em um pulso local de atividade da enzima, breve e forte.

Enquanto algumas respostas mediadas pelo cAMP ocorrem em fração de segundo e não dependem de alterações na transcrição gênica (ver Figura 15-33), outras dependem de mudanças na transcrição de genes específicos e levam horas para ocorrer totalmente. Nas células que secretam o hormônio peptídico *somatostatina*, por exemplo, o cAMP ativa o gene que codifica este hormônio. A região reguladora do gene contém uma sequência curta de DNA, chamada de *elemento de resposta ao cAMP* (*CRE, cyclic AMP response element*), encontrado também na região reguladora de muitos genes ativados pelo cAMP. Uma proteína reguladora específica chamada de **proteína de ligação a CRE** (**CREB**, *CRE-binding*) reconhece essa sequência. Quando a PKA está ativada pelo cAMP, ela fosforila a CREB em uma única serina; a CREB fosforilada recruta então o coativador transcricional chamado de *proteína de ligação a CREB* (*CBP, CREB-binding protein*), que estimula a transcrição dos genes-alvo (**Figura 15-36**). Assim, a CREB pode transformar um sinal curto de cAMP em uma mudança de longa duração na célula, um processo que se acredita ter uma função importante em algumas formas de aprendizado e memória no cérebro.

A PKA não medeia todos os efeitos do cAMP nas células. Conforme discutiremos mais adiante, nos neurônios olfativos (responsáveis pelo sentido do olfato), o cAMP também ativa diretamente canais iônicos especiais na membrana plasmática. Além disso, em algumas ou-

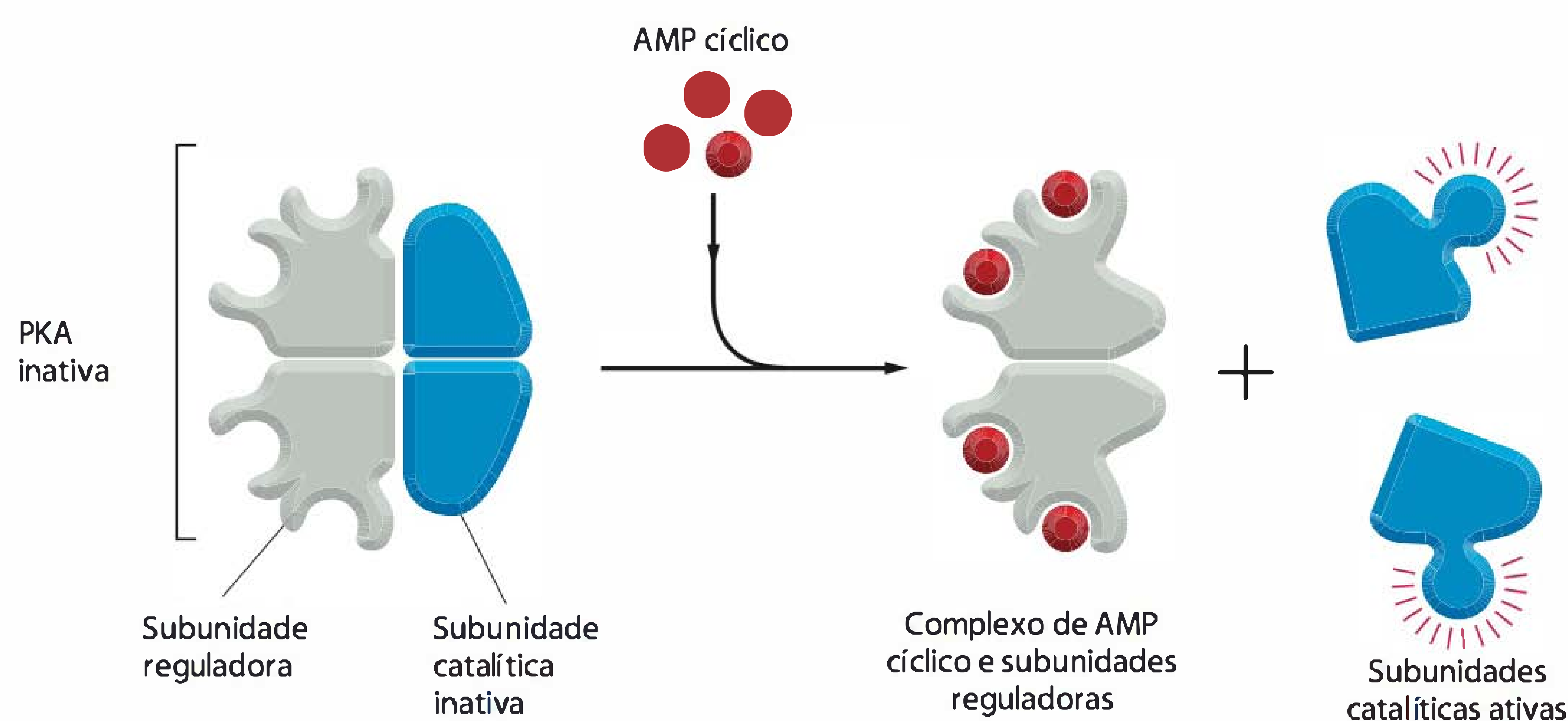


Figura 15-35 Ativação da proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA). A ligação do cAMP às subunidades reguladoras do tetrâmero da PKA induz uma mudança conformacional, causando sua dissociação das subunidades catalíticas e ativando, dessa forma, a função cinásica destas subunidades. A liberação das subunidades catalíticas requer a ligação, ao tetrâmero, de mais de duas moléculas de cAMP às subunidades reguladoras. Essa exigência aumenta muito a definição da resposta da cinase a alterações na concentração do cAMP, conforme discutido anteriormente (ver Figura 15-25). As células de mamíferos possuem, pelo menos, dois tipos de PKA: o tipo I está principalmente no citosol, enquanto o tipo II está ligado, por meio de suas subunidades reguladoras e de proteínas de ancoragem especiais, às membranas plasmática, nuclear, mitocondrial externa e aos microtúbulos. Em ambos os tipos, contudo, quando as subunidades catalíticas estão livres e ativas, elas migram para o núcleo (onde fosforilam proteínas reguladoras de genes), enquanto as subunidades reguladoras permanecem no citoplasma. A Figura 3-65 mostra a estrutura tridimensional do domínio proteína-cinase da subunidade catalítica da PKA.

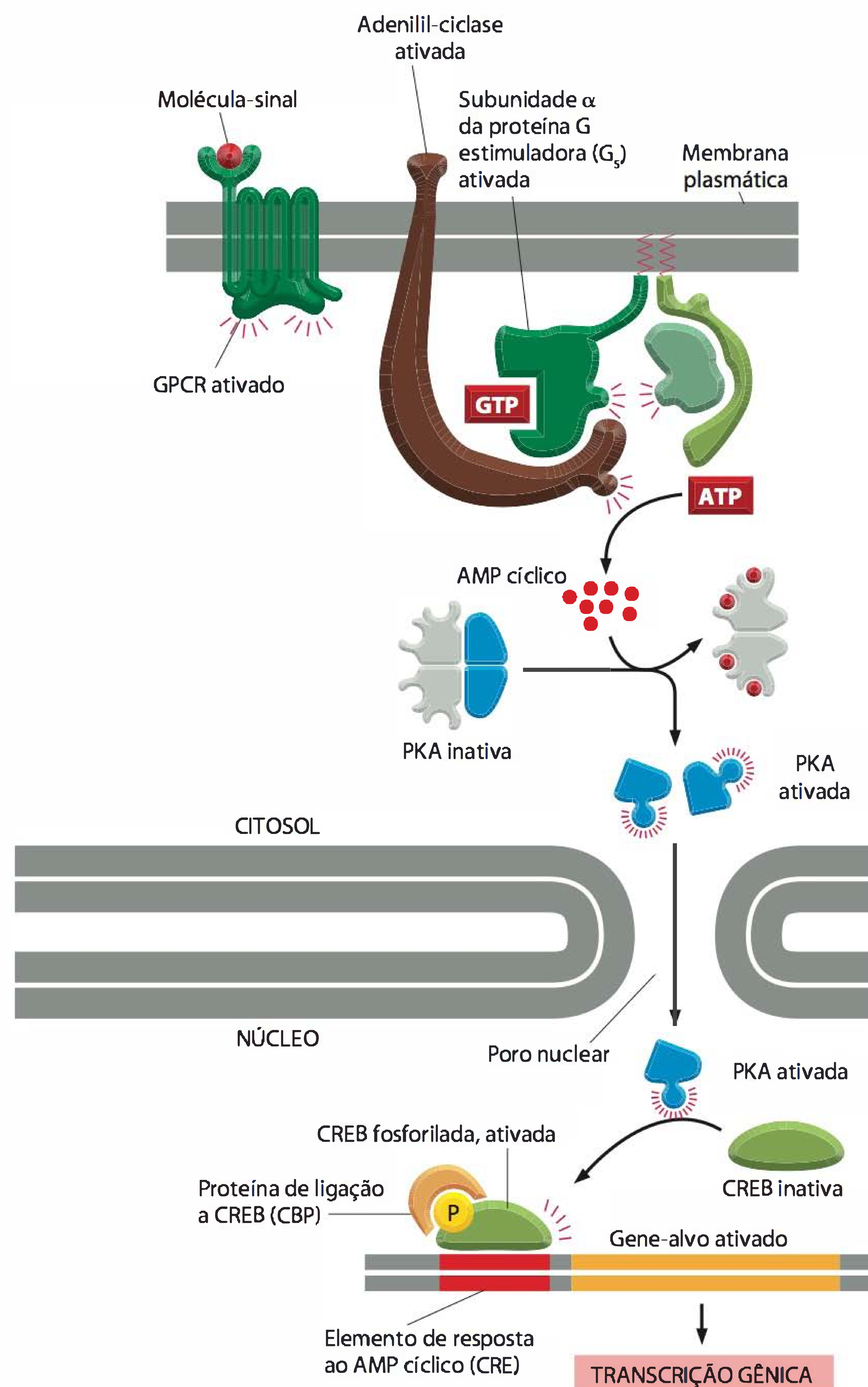


Figura 15-36 Como o aumento na concentração intracelular de AMP cíclico altera a transcrição gênica. A ligação de uma molécula-sinal extracelular ao seu GPCR ativa a adenilil-ciclase via G_s e aumenta a concentração de cAMP no citosol. Esse aumento ativa a PKA, e suas subunidades catalíticas liberadas entram no núcleo, onde fosforilam a proteína reguladora CREB. Após a fosforilação, esta proteína recruta o coativador CBP, que estimula a transcrição gênica. Pelo menos em alguns casos a CREB inativa está ligada ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CRE) no DNA antes deste ser fosforilado (não-mostrado).

Esta via de sinalização controla muitos processos celulares, desde a síntese de hormônios pelas células endócrinas até a produção de proteínas necessárias à indução da memória de longa duração no cérebro. Veremos, mais tarde, que a CREB também pode ser ativada por outras vias de sinalização independentes de cAMP.

tras células, ele ativa diretamente um GEF que, por sua vez, ativa uma GTPase monomérica chamada de *Rap1*, o que, frequentemente, leva a um aumento da adesão celular por meio da ativação das *integrinas* da superfície da célula (discutido no Capítulo 19).

Tendo discutido de que forma as proteínas G triméricas conectam os receptores associados a elas com a adenilil-ciclase, consideraremos agora como elas acoplam os mesmos a outra enzima crítica, a *fosfolipase C*. A ativação dessa enzima aumenta a concentração de vários mediadores intracelulares pequenos, inclusive o Ca^{2+}, os quais ajudam na transmissão do sinal para a frente. O Ca^{2+} é mais amplamente utilizado como mediador intracelular pequeno do que o cAMP.

Algumas proteínas G ativam a via de sinalização do fosfolipídeo de inositol pela ativação da fosfolipase C-β

Muitos dos GPCRs exercem seus efeitos principalmente via ativação da enzima de membrana **fosfolipase C-β** (**PLCβ**, phospholipase C-β). Na **Tabela 15-2** estão citados vários exemplos de respostas ativadas dessa forma. A fosfolipase atua sobre um fosfolipídeo de inositol (um *fosfoinositídeo*) chamado de **fosfatidilinositol 4,5-bifosfato** (**PI[4,5]P_2**, ou **PIP_2**), que está presente em pequenas quantidades na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática (**Figura 15-37**). Os receptores que ativam essa **via de sinalização do fosfolipídeo de inositol** o fazem principalmente por meio de uma proteína G chamada de **G_q**, que ativa a PLCβ, basicamente da mesma forma que a G_s ativa a adenilil-ciclase. A fosfolipase

Tabela 15-2 Algumas respostas celulares nas quais receptores associados à proteína G ativam a fosfolipase C-β

TECIDO-ALVO	MOLÉCULA-SINAL	RESPOSTA PRINCIPAL
Fígado	Vasopressina	Degradação do glicogênio
Pâncreas	Acetilcolina	Secreção de amilase
Músculo liso	Acetilcolina	Contração muscular
Plaquetas	Trombina	Agregação plaquetária

ativada age sobre o PIP_2 gerando dois produtos: *inositol 1,4,5-trifosfato* e *diacilglicerol* (**Figura 15-38**). Nessa etapa, a via de sinalização se bifurca.

O **inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)** é uma molécula pequena, hidrossolúvel, que atua como mediador intracelular pequeno. Ele sai da membrana e se difunde rapidamente no citosol. Quando alcança o retículo endoplasmático (RE), liga-se aos **canais de liberação de Ca^{2+} controlados por IP_3** (também chamados de **receptores de IP_3**) na membrana do RE abrindo-os. O Ca^{2+} estocado no RE é liberado através dos canais abertos, aumentando rapidamente sua concentração no citosol (**Figura 15-39**). Quando os estoques de Ca^{2+} do RE forem depletados, eles são novamente repostos pela ativação dos *canais de Ca^{2+} de reposição* na membrana plasmática e uma proteína sensora de Ca^{2+} na membrana do RE, em regiões onde as duas membranas estão próximas.

Discutiremos mais tarde como um aumento no Ca^{2+} citosólico atua na propagação do sinal pela influência da atividade das proteínas intracelulares sensíveis ao íon. Vários mecanismos agem para terminar a resposta inicial do Ca^{2+}: (1) o IP_3 é desfosforilado rapidamente, por fosfatases específicas, formando IP_2; (2) o IP_3 é fosforilado por cinases lipídicas específicas, formando IP_4 (que pode agir como outro mediador intracelular), e (3) o Ca^{2+} que entra no citosol é rapidamente bombeado, principalmente para fora da célula (ver Figura 15-41).

Ao mesmo tempo que o IP_3 produzido pela hidrólise do PIP_2 causa o aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol, o outro produto da clivagem do PIP_2 – **diacilglicerol** – exerce efeitos diferentes. Ele também atua como um mediador intracelular pequeno, mas permanece na membrana plasmática, onde tem vários papéis potenciais na sinalização. Ele pode ser clivado e liberar ácido araquidônico, que pode agir como um mensageiro, ou ser usado na síntese de outras moléculas-sinal lipídicas pequenas, chamadas de *eicosanoides*. A maio-

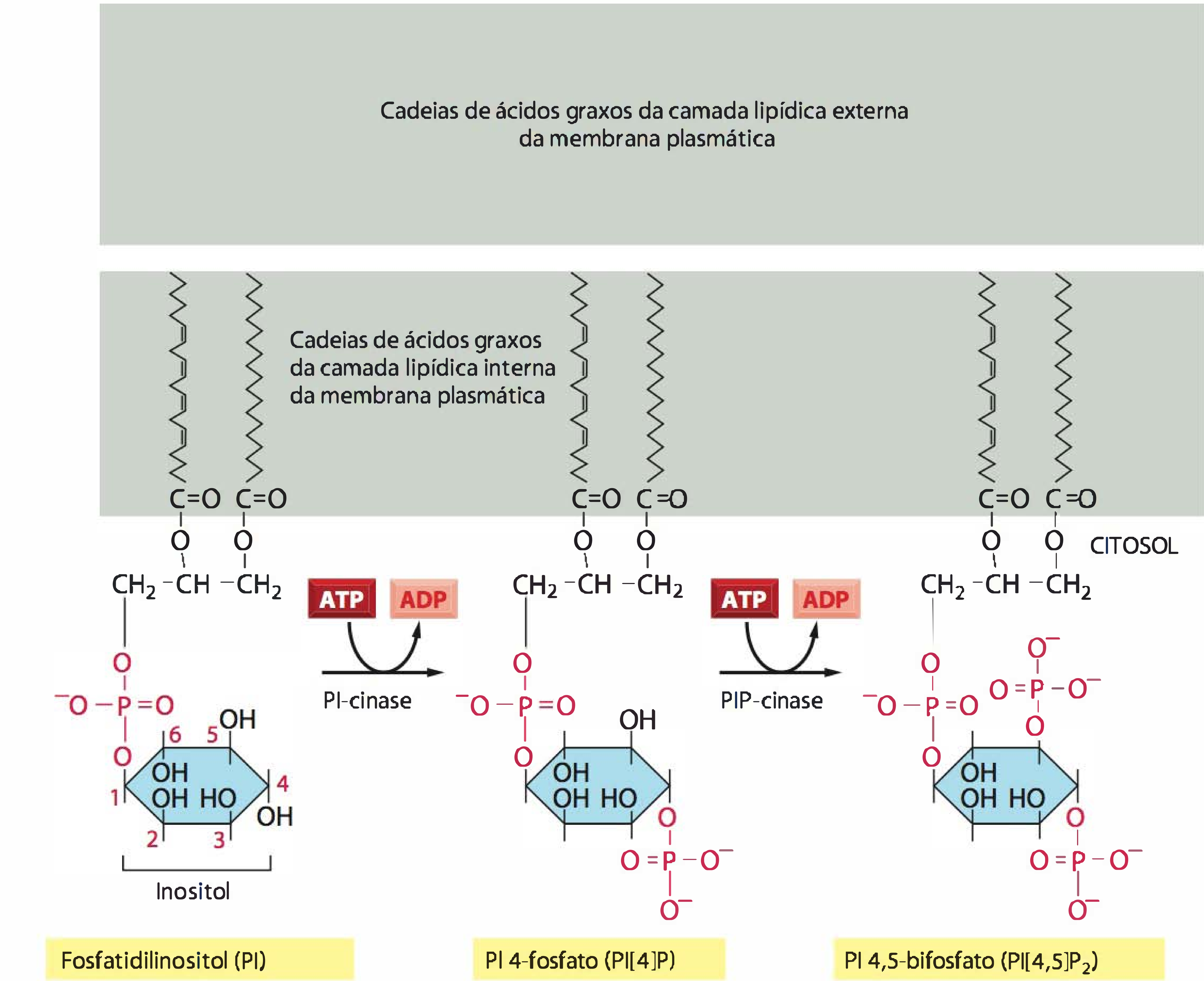


Figura 15-37 A síntese de PI(4-5)P_2. Os fosfoinositídeos PI(4)P e PI(4,5)P_2 são produzidos, respectivamente, pela fosforilação do fosfatidilinositol (PI) e do PI(4)P. Embora os três fosfolipídeos de inositol possam ser degradados durante uma resposta à sinalização, a degradação do PI(4,5)P_2 é a predominante e a mais crítica, pois gera dois mediadores intracelulares, conforme mostrado nas Figuras 15-38 e 15-39. Não obstante, o PI(4,5)P_2 é o menos abundante, constituindo menos de 10% do total de fosfolipídeos de inositol e cerca de 1% do total de lipídeos da membrana plasmática. Os *números em vermelho* mostram a numeração convencional dos átomos de carbono no anel de inositol da molécula de PI.

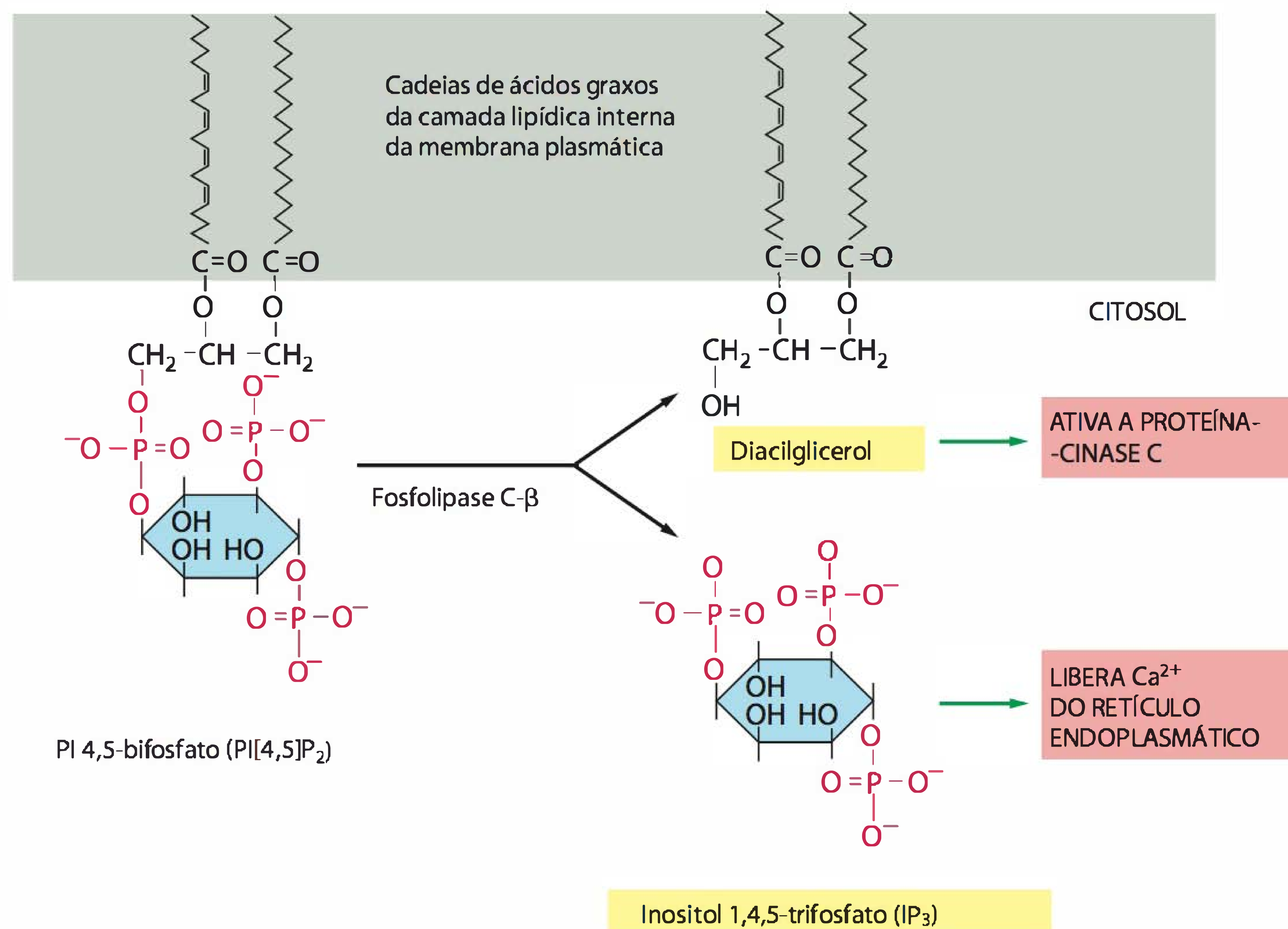


Figura 15-38 A hidrólisedo PI(4,5)P_2 pela fosfolipase C-β. A hidrólise do PIP_2 gera dois pequenos mediadores intracelulares: o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que se difunde no citosol e libera Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, e o diacilglicerol, que permanece na membrana e auxilia na ativação da proteína-cinase C (PKC, ver Figura 15-39). Existem várias classes de PKC, incluindo a classe β, que é ativada por GPCRs; veremos mais adiante que a classe γ é ativada por uma classe de receptores associados a enzimas chamados de receptores tirosina-cinases (RTKs).

ria das células de vertebrados produz eicosanoides, incluindo as *prostaglandinas,* as quais têm muitas atividades biológicas. Por exemplo, participam nas respostas inflamatórias e à dor, e a maioria dos fármacos anti-inflamatórios (como aspirina, ibuprofeno e cortisona) atua – pelo menos em parte – inibindo sua síntese.

A segunda função do diacilglicerol é a de ativação da enzima crítica serinatreonina-cinase, denominada **proteína-cinase C (PKC)**, assim chamada porque é dependente de Ca^{2+}. O aumento inicial no Ca^{2+} citosólico, induzido por IP_3, altera a PKC de forma que ela se desloca do citosol para a face citoplasmática da membrana. Aí ela é ativada pela combinação de Ca^{2+}, diacilglicerol e do fosfolipídeo de membrana carregado negativamente, fosfatidilserina (ver Figura 15-39). Uma vez ativada, a PKC fosforila proteínas-alvo que variam dependendo do tipo celular. Os princípios são os mesmos já apresentados anteriormente para a PKA, embora a maioria das proteínas-alvo seja diferente.

Existem várias classes de PKCs, e somente algumas delas (chamadas de *PKCs convencionais*) são ativadas por Ca^{2+} e diacilglicerol; as outras são chamadas de *PKCs atípicas*. Diferentes PKCs fosforilam diferentes substratos, principalmente porque proteínas de ancoragem ou de suporte as retêm em diferentes compartimentos celulares.

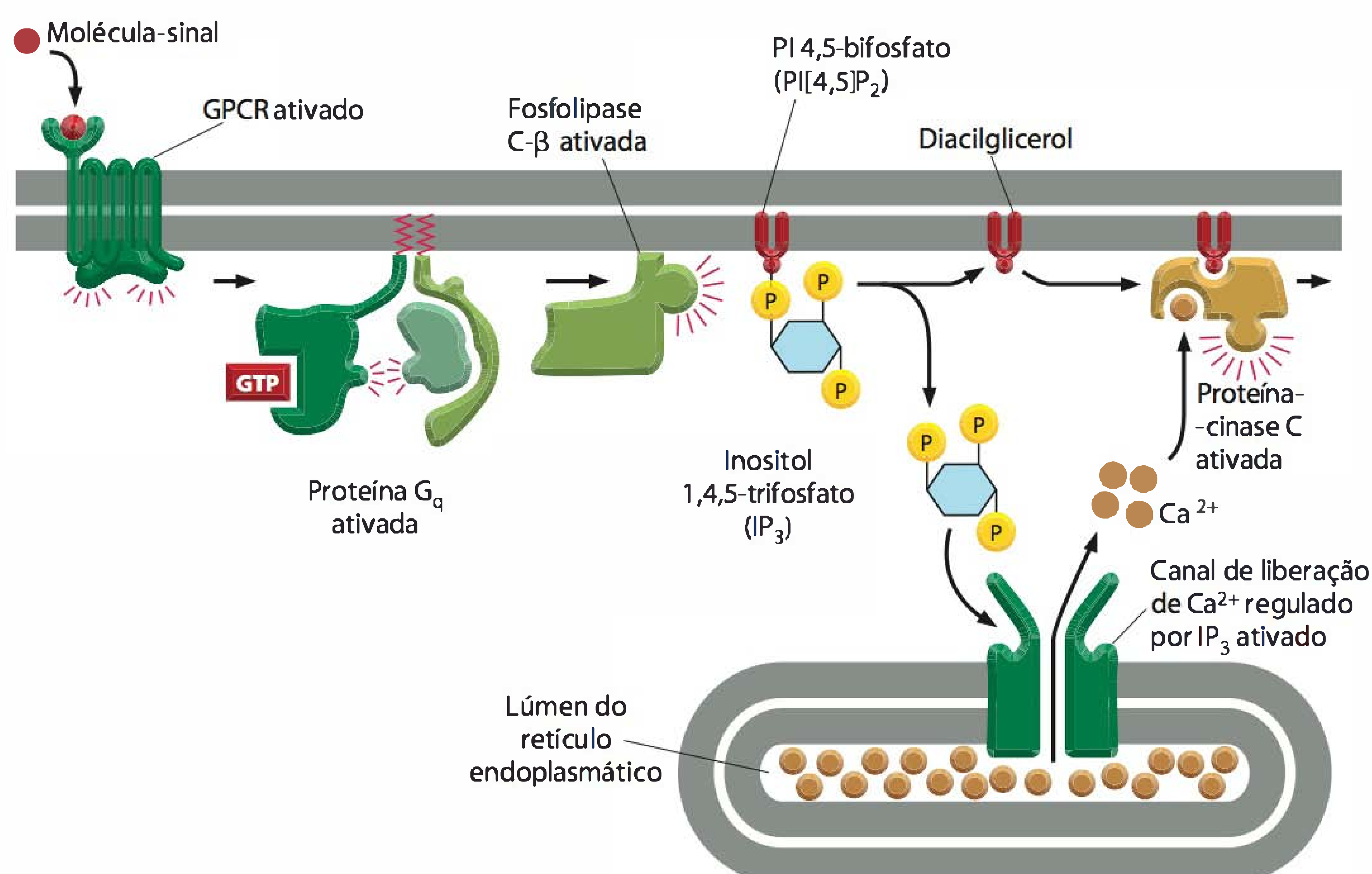


Figura 15-39 Como os receptores associados à proteína G aumentam o Ca^{2+} citosólico e ativam a proteína-cinase C. Os receptores ativados estimulam a enzima de membrana fosfolipase C-β via uma proteína G. Dependendo da isoforma da enzima, ela pode ser ativada pela subunidade α da G_q conforme mostrado, pelas subunidades βγ de outra molécula de proteína G, ou por ambas. São produzidas duas moléculas do mensageiro intracelular quando o PI(4,5)P_2 é hidrolisado pela proteína-cinase C ativada. O inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) se difunde pelo citosol e se liga aos canais de Ca^{2+} controlados por IP_3 na membrana do retículo endoplasmático, abrindo-os e liberando Ca^{2+}. O gradiente eletroquímico de Ca^{2+} através da membrana do retículo faz com que o íon saia para o citosol quando os canais de liberação se abrem. O diacilglicerol permanece na membrana plasmática e, juntamente com a fosfatidilserina (não-mostrada) e o Ca^{2+}, auxilia na ativação da proteína-cinase C, a qual é recrutada do citosol para a face citosólica da membrana plasmática. Do total de mais de 10 isoformas diferentes da enzima em humanos, pelo menos quatro são ativadas pelo diacilglicerol.

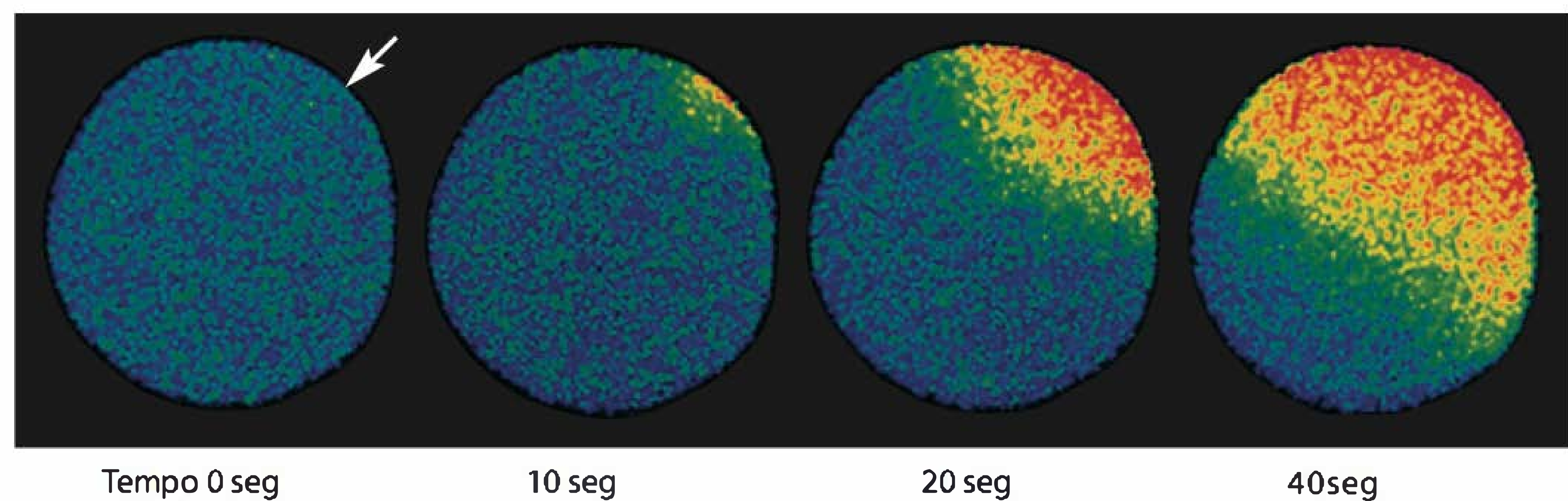


Figura 15-40 Fertilização de um óvulo por um espermatozoide desencadeia um aumento no Ca^{2+} citosólico. Este óvulo de estrela-do-mar foi injetado com um corante fluorescente sensível ao Ca^{2+} antes de ser fertilizado. Pode-se observar uma onda de Ca^{2+} citosólico (*vermelho*), proveniente do retículo endoplasmático, movendo-se através do ovo a partir do local de entrada do espermatozoide (*seta*). Esta onda provoca uma alteração na superfície do ovo, impedindo a entrada de outros espermatozoides e iniciando o desenvolvimento embrionário (discutido no Capítulo 21). Acredita-se que o aumento inicial no Ca^{2+} seja causado por uma forma de fosfolipase (PLCζ) específica do espermatozoide, liberada por ele no citoplasma do ovo no momento da fusão; a PLCζ hidrolisa $PI(4,5)P_2$ e produz IP_3, que libera Ca^{2+} do retículo endoplasmático do ovo. (Cortesia de Stephen A. Stricker.)

O Ca^{2+} funciona como um mediador intracelular ubíquo

Muitos sinais extracelulares, além daqueles que atuam via proteína G, desencadeiam um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+}. Em células-ovo, por exemplo, um aumento repentino na concentração citosólica de Ca^{2+}, que segue a fertilização, provoca uma onda de Ca^{2+} responsável pelo início do desenvolvimento embrionário (**Figura 15-40**). Nas células musculares, o Ca^{2+} dá início à contração, e inicia a secreção em muitas células secretoras, incluindo as células nervosas. O Ca^{2+} pode ser usado como sinal, porque sua concentração no citosol normalmente é muito baixa (~ 10^{-7} M), enquanto é alta no fluido extracelular (~10^{-3} M) e no lúmen do RE (e no retículo sarcoplasmático [RS] no músculo). Assim, existe um grande gradiente através da membrana plasmática e da membrana do RE e do RS, tendendo a conduzir o íon para o citosol. Quando um sinal abre temporariamente os canais de Ca^{2+} nessas membranas, o íon migra para o citosol, aumentando de 10 a 20 vezes sua concentração local, o que estimula as proteínas celulares que respondem a ele.

Os íons Ca^{2+} de fora da célula entram no citosol por meio de vários canais na membrana plasmática, que se abrem em resposta à interação com ligantes, ao estiramento ou à despolarização da membrana. O Ca^{2+} do RE entra no citosol por meio de receptores IP_3 (ver Figura 15-39) ou por **receptores de rianodina** (assim chamados porque são sensíveis a um alcaloide extraído de plantas que tem esse nome). Os receptores de rianodina normalmente são ativados pela ligação ao Ca^{2+} e, dessa forma, amplificam o sinal do íon. O Ca^{2+} também ativa receptores IP_3, mas somente na presença de IP_3; concentrações muito altas de Ca^{2+} inativam estes receptores. No Capítulo 16, discutiremos como o Ca^{2+} é liberado do RS e causa a contração das células musculares.

Vários mecanismos mantêm a concentração de Ca^{2+} baixa no citosol das células em repouso (**Figura 15-41**). Todas as células eucarióticas possuem em suas membranas plasmáticas uma bomba de Ca^{2+} que usa a energia da hidrólise do ATP para bombear o íon para fora da célula. As células que fazem uso extensivo da sinalização mediada por Ca^{2+}, como as musculares e as nervosas, possuem, em suas membranas plasmáticas, uma proteína transportadora de Ca^{2+} adicional (permutador de Ca^{2+} dirigido por Na^+) que acopla o efluxo de Ca^{2+} ao influxo de Na^+. Uma bomba de Ca^{2+} na membrana do RE também tem um papel importante na manutenção da concentração baixa de Ca^{2+} no citosol: essa bomba permite que o RE capte do citosol grandes quantidades de Ca^{2+} contra um gradiente de concentração, mesmo quando os níveis do íon no citosol estão baixos. Além disso, a bomba de Ca^{2+} de baixa afinidade e alta capacidade da membrana mitocondrial interna tem um papel importante na limitação do sinal de Ca^{2+} e na sua terminação; ela usa o gradiente eletroquímico gerado através da membrana durante as etapas de transferência de elétrons na fosforilação oxidativa para remover o Ca^{2+} do citosol. O aumento da concentração de Ca^{2+} na mitocôndria pode ativar algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico, aumentando dessa forma a síntese de ATP e ligando a ativação celular com a produção de energia; um aumento excessivo no Ca^{2+} mitocondrial, no entanto, leva à morte celular.

A frequência das oscilações do Ca^{2+} influencia a resposta celular

Os pesquisadores frequentemente utilizam indicadores fluorescentes sensíveis a Ca^{2+}, como *aequorina* ou *fura-2* (apresentados no Capítulo 9), para acompanhar o Ca^{2+} citosólico em células isoladas, após a ativação da via de sinalização do fosfolipídeo de inositol. Quando visualizado dessa forma, o sinal inicial de Ca^{2+} é visto, frequentemente, como um sinal pequeno e localizado em uma ou mais regiões diferentes na célula. Esses sinais têm

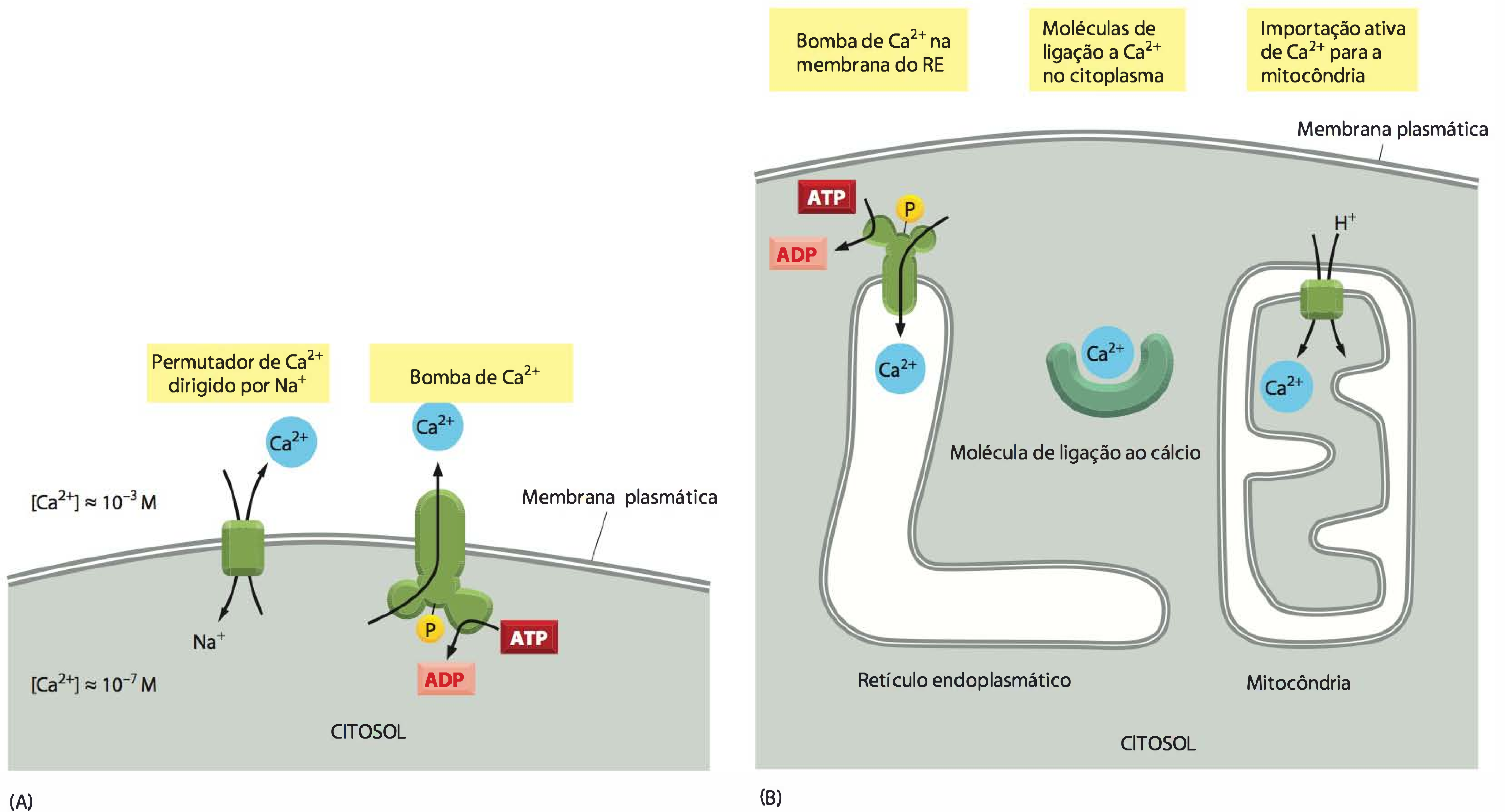


Figura 15-41 Principais formas pelas quais as células mantêm uma concentração muito baixa de Ca^{2+} livre no citosol. (A) O Ca^{2+} é bombeado ativamente do citosol para o exterior da célula. (B) O Ca^{2+} é bombeado do citosol para o retículo endoplasmático e para a mitocôndria, e várias moléculas citosólicas se ligam firmemente ao Ca^{2+} livre.

sido chamados de *puffs* ou e *sparks* de Ca^{2+} e refletem a abertura local de canais individuais ou de pequenos grupos de canais de liberação do íon no RE. Como várias proteínas de ligação ao Ca^{2+} atuam como tampões de Ca^{2+} e restringem a difusão do íon, o sinal frequentemente permanece no sítio de entrada do Ca^{2+} no citosol. Se o sinal extracelular for suficientemente forte e persistente, esse sinal localizado pode se propagar como uma onda através do citosol (ver Figura 15-40), muito semelhante a um potencial de ação em um axônio. Esse "pico" de Ca^{2+} é seguido por uma série de picos adicionais, cada um deles com a duração de segundos (**Figura 15-42**). Essas *oscilações de Ca^{2+}* podem persistir durante todo o tempo que o receptor de superfície estiver ativado. Acredita-se que as ondas e as oscilações dependam, pelo menos em parte, de uma combinação de retroalimentação

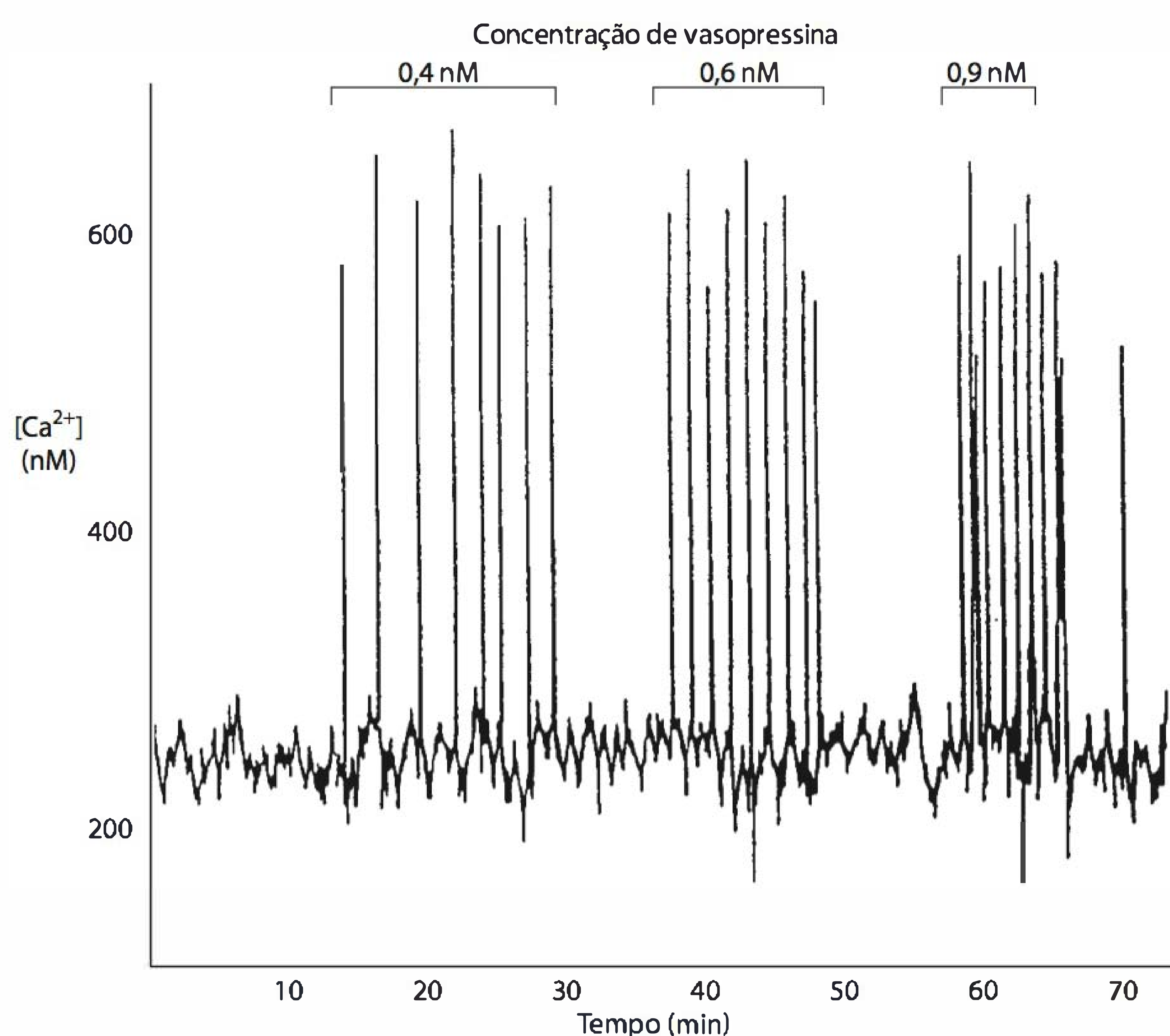


Figura 15-42 Oscilações de Ca^{2+} induzidas pela vasopressina em uma célula de fígado. As células foram carregadas com a equorina, uma proteína sensível ao Ca^{2+}, e expostas a concentrações crescentes de *vasopressina*, que ativa um GPCR e, dessa forma, a PLCβ (ver Tabela 15-2). Observe que a frequência dos picos de Ca^{2+} aumenta com o aumento da concentração da vasopressina, mas a amplitude dos picos não é afetada. Cada pico tem a duração de 7 segundos. (Adaptada de N. M. Woods, K. S. R. Cuthbertson e P. H. Cobbold, *Nature* 319:600-602, 1986. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

positiva e negativa, pelo Ca^{2+}, nos receptores de IP_3 e nos receptores de rianodina: o Ca^{2+} liberado inicialmente estimula mais liberação, um processo conhecido como *liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}*; contudo, quando a concentração estiver suficientemente alta, o íon inibe sua liberação adicional; e esta retroalimentação negativa com retardo dá origem às oscilações (ver Figura 15-28D).

Pode-se seguir o efeito das oscilações do Ca^{2+} sobre as proteínas específicas sensíveis a ele pelo uso de imagens em tempo real de células individuais expressando proteínas repórter fluorescentes. Pode-se mostrar, por exemplo, que cada pico de Ca^{2+} em algumas respostas induzidas por sinal recrutará a PKC transitoriamente, para a membrana plasmática, onde ela irá fosforilar, transitoriamente, uma proteína repórter.

A frequência das oscilações do Ca^{2+} reflete a força do estímulo extracelular (ver Figura 15-42) e pode ser traduzida em uma resposta celular dependente de frequência. Em alguns casos, essa resposta também é oscilatória: nas células da hipófise, por exemplo, a estimulação por um sinal extracelular induz repetidos picos de Ca^{2+}, sendo cada um deles associado a um aumento repentino na secreção de hormônio. Em outros casos, a resposta dependente de frequência é não-oscilatória: em alguns tipos de células, por exemplo, uma determinada frequência de picos de Ca^{2+} ativa a transcrição de um determinado conjunto de genes, enquanto uma frequência mais alta ativa a transcrição de um conjunto diferente. Como as células percebem a frequência de picos e alteram suas respostas? O mecanismo depende, presumivelmente, de proteínas sensíveis ao Ca^{2+} que alteram sua atividade em função da frequência de picos. Uma proteína-cinase que atua como um dispositivo de memória molecular parece possuir essa admirável propriedade, conforme discutiremos a seguir.

As proteína-cinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases) fazem a mediação de muitas das respostas aos sinais de Ca^{2+} nas células animais

Várias proteínas de ligação a Ca^{2+} ajudam na transmissão do sinal citosólico de Ca^{2+}. A mais importante é a **calmodulina**, encontrada em todas as células eucarióticas, nas quais constitui 1% do total da massa proteica. A calmodulina funciona como um receptor intracelular polivalente de Ca^{2+}, mediando muitos processos regulados por Ca^{2+}. Essa proteína consiste em uma única cadeia polipeptídica altamente conservada, com quatro sítios de ligação ao Ca^{2+} de alta afinidade (**Figura 15-43**A). Quando ativada pela ligação ao íon, ela sofre uma mudança conformacional. Uma vez que a conformação ativa só é obtida após a ligação de dois ou mais íons Ca^{2+}, a proteína responde de uma forma cooperativa ao aumento da concentração do íon (ver Figura 15-25): por exemplo, um aumento de 10 vezes na concentração do Ca^{2+} causa um aumento de 50 vezes na ativação da calmodulina.

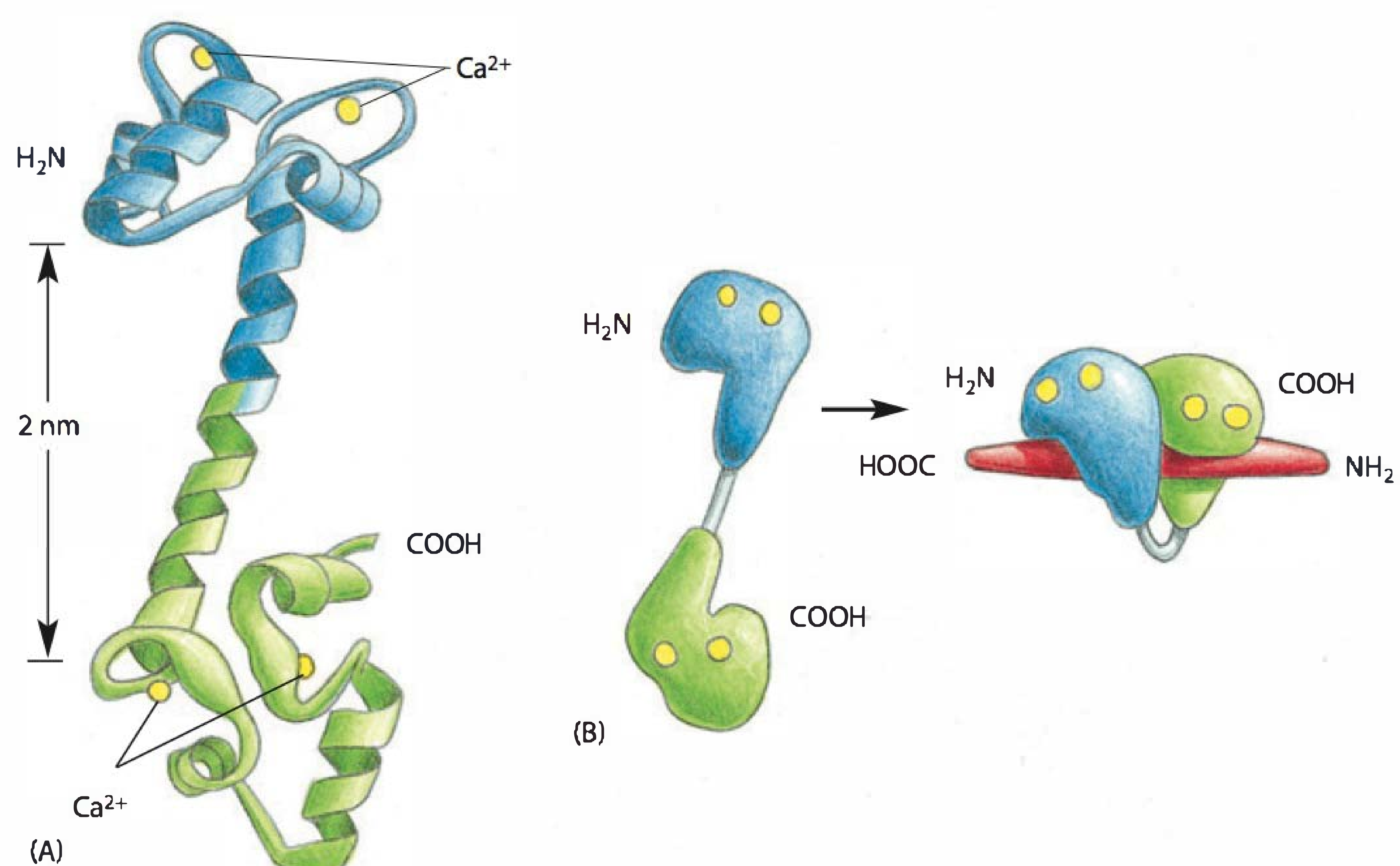


Figura 15-43 Estrutura do complexo Ca^{2+}/calmodulina com base em difração de raios X e estudos de ressonância nuclear magnética. (A) A molécula tem a forma de um altere, com duas extremidades globulares que se ligam a muitas proteínas-alvo. As extremidades globulares são conectadas por uma hélice α longa e exposta que permite à proteína adotar um grande número de conformações diferentes, dependendo da proteína-alvo com a qual está interagindo. Cada uma das cabeças globulares possui dois domínios de ligação ao Ca^{2+}. (B) A principal mudança estrutural que ocorre no complexo Ca^{2+}/calmodulina ao se ligar a uma proteína-alvo (neste exemplo, um peptídeo que forma o domínio de ligação de uma proteína-cinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina). Observe que o complexo Ca^{2+}/calmodulina forma uma espécie de foice que envolve o peptídeo. Ele pode adotar diferentes conformações quando se liga a outros alvos. (A, com base em dados de cristalografia por raios X de Y. S. Babu et al., *Nature* 315:37-40, 1985. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.; B, com base em dados de cristalografia por raios X de W. E. Meador, A. R. Means e F. A. Quiocho, *Science* 257:1251-1255, 1992, e em dados de ressonância nuclear magnética de M. Ikura et al., *Science* 256: 632-638, 1992. Com permissão de AAAS.)

A ativação alostérica da calmodulina pelo Ca^{2+} é análoga à ativação alostérica da PKA pelo cAMP, exceto pelo fato de o complexo Ca^{2+}/calmodulina não ser dotado, ele próprio, de atividade enzimática: atua por se ligar a outras proteínas. Em alguns casos, a calmodulina serve como uma subunidade reguladora permanente de um complexo enzimático, mas, na maioria das vezes, a ligação do Ca^{2+} permite a ligação da proteína a várias outras proteínas-alvo na célula, alterando suas atividades.

O complexo Ca^{2+}/calmodulina ativado sofre uma acentuada mudança de conformação quando se liga à sua proteína-alvo (Figura 15-43B). Entre os alvos regulados pela calmodulina estão muitas enzimas e proteínas de transporte de membrana. Como exemplo, Ca^{2+}/calmodulina ativa uma bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática que usa a hidrólise do ATP para transportar o íon para fora da célula (ver Figura 15-41). Assim, sempre que a concentração intracelular do Ca^{2+} aumenta, a bomba é ativada, auxiliando no retorno do íon aos níveis citosólicos normais.

Contudo, muitos dos efeitos do Ca^{2+} são indiretos e mediados por fosforilações catalisadas por uma família de **proteína-cinases dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases)**. Algumas fosforilam proteínas reguladoras de genes, como a CREB (ver Figura 15-36), ativando ou inibindo a transcrição de genes específicos.

Uma das CaM-cinases melhor estudada é a **CaM-cinase II**, encontrada em quase todas as células animais, sendo especialmente abundante no sistema nervoso, constituindo cerca de 2% da massa proteica total em algumas regiões do cérebro, e altamente concentrada nas sinapses. Essa enzima tem, pelo menos, duas propriedades extraordinárias, as quais estão relacionadas entre si. Ela funciona como um dispositivo de memória molecular, tornando-se ativa quando exposta ao complexo Ca^{2+}/calmodulina e permanecendo ativa mesmo após a extinção do sinal de Ca^{2+}. Isso acontece porque, quando ativada pelo complexo, a cinase, além de fosforilar outras proteínas, fosforila a si mesma (um processo chamado de *autofosforilação*). Neste estado autofosforilado, a enzima permanece ativa, mesmo na ausência do Ca^{2+}, prolongando, assim, a duração da atividade cinásica. Essa atividade é mantida até que a atividade autofosforilante seja sobrepujada pelas serinatreonina-fosfatases e a enzima seja desativada (**Figura 15-44**). A ativação da CaM-cinase II pode, dessa forma, servir como um sinal de memória de um pulso de Ca^{2+} prévio, e parece ter um papel importante nos mecanismos de memória e de aprendizagem no sistema nervoso dos vertebrados. Os camundongos mutantes sem a subunidade específica do cérebro têm defeitos específicos na sua capacidade de memória espacial.

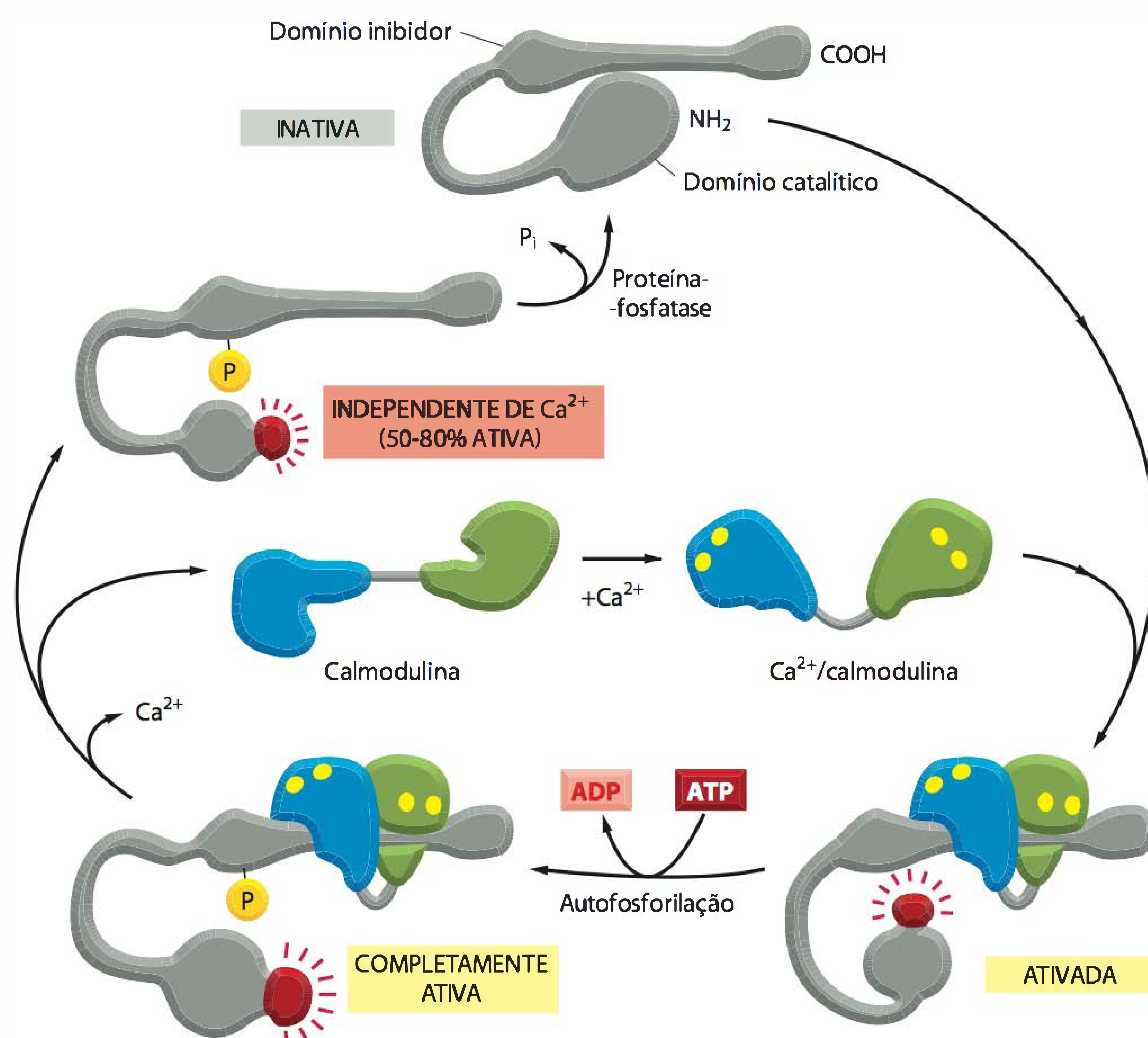


Figura 15-44 Ativação gradual da CaM-cinase II. A enzima consiste em um grande complexo proteico com 12 subunidades. Para simplificar, é mostrada aqui somente uma subunidade (em *cinza*). A enzima é inativa na ausência de Ca^{2+}/calmodulina por causa de uma interação entre um domínio inibidor e um catalítico. A ligação da Ca^{2+}/calmodulina altera a conformação da proteína, ativando-a parcialmente. Os domínios catalíticos no complexo fosforilam os domínios inibidores de subunidades vizinhas, bem como outras proteínas (não-mostradas). A autofosforilação do complexo enzimático (por fosforilação mútua de suas subunidades) leva à ativação completa da enzima. Também prolonga a atividade da enzima por dois motivos. Em primeiro lugar, ela captura a Ca^{2+}/calmodulina de forma que esta só se dissocia do complexo quando os níveis de Ca^{2+} citosólico retornam aos valores basais por, pelo menos, 10 segundos (não-mostrado). Em segundo lugar, ela converte a enzima em uma forma independente de Ca^{2+}, de maneira que a cinase permanece ativa mesmo após a dissociação da Ca^{2+}/calmodulina. Essa atividade continua até que a ação de uma proteína-fosfatase anule a autofosforilação da CaM-cinase II.

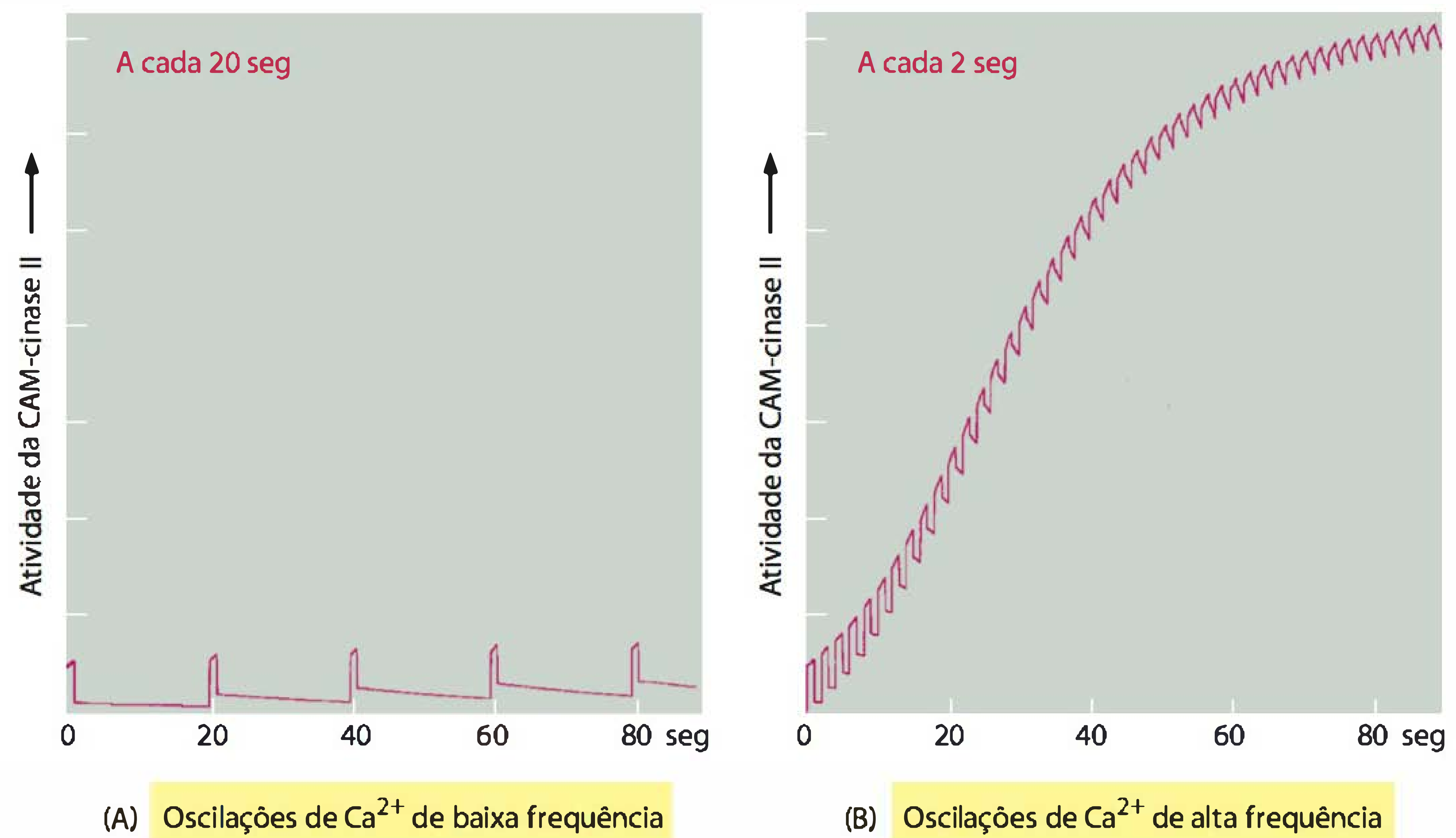


Figura 15-45 CAM-cinase II como um decodificador de frequência das oscilações de Ca^{2+}. (A) A enzima se torna inativa a cada pico de baixa frequência de Ca^{2+}, uma vez que a autofosforilação induzida pela ligação de Ca^{2+}/calmodulina não mantém a atividade da enzima pelo tempo suficiente até que surja o pico seguinte. (B) Nos picos de alta frequência, no entanto, a enzima não consegue se inativar completamente no intervalo entre os picos, de forma que ela aumenta progressivamente a atividade com cada pico. Se a frequência de picos for suficientemente alta, esse aumento progressivo da atividade da enzima terá continuidade até que seja autofosforilada em todas as suas subunidades alcançando, assim, a ativação máxima. Embora não esteja mostrado, uma vez que um número suficiente de subunidades seja autofosforilado, a enzima pode ser mantida em um estado altamente ativo, mesmo com uma frequência relativamente baixa de picos de Ca^{2+} (uma forma de memória celular).

A ligação da Ca^{2+}/calmodulina à enzima é intensificada pela autofosforilação da CAM-cinase II (uma forma adicional de retroalimentação positiva), fazendo com que a resposta da enzima a picos repetidos de Ca^{2+} exiba um limiar abrupto na sua resposta à frequência dos picos, conforme discutido anteriormente. (De P. I. Hanson, T. Meyer, L. Stryer and H. Schulman, *Neuron* 12:943-956, 1994. Com permissão de Elsevier.)

A segunda propriedade extraordinária da CaM-cinase II consiste no uso do seu mecanismo de memória para atuar como um decodificador de frequência das oscilações do Ca^{2+}. Acredita-se que essa propriedade seja importante especialmente nas sinapses, onde as mudanças dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em uma célula pós-sináptica ativada podem resultar em mudanças de longa duração na eficiência subsequente dessa sinapse (discutido no Capítulo 11). Quando a enzima é mobilizada em uma superfície sólida e exposta, ao mesmo tempo, a uma fosfatase e a pulsos repetitivos de Ca^{2+}/calmodulina de diferentes frequências, que mimetizam os pulsos observados nas células estimuladas, a atividade da enzima aumenta, proporcionalmente, como uma função da frequência do pulso (**Figura 15-45**). Além disso, a resposta da enzima à frequência depende da composição exata de suas subunidades, de forma que, pelo ajuste da composição da CaM-cinase, a célula pode adaptar sua resposta às oscilações do Ca^{2+} a necessidades particulares.

Algumas proteínas G regulam canais iônicos diretamente

As proteínas G não atuam exclusivamente na regulação da atividade das enzimas de membrana que alteram a concentração de cAMP ou de Ca^{2+} no citosol. A subunidade α de um tipo de proteína G (chamada de G_{12}), por exemplo, ativa um GEF que converte uma GTPase monomérica da *família Rho* (discutida mais adiante e no Capítulo 16) em sua forma ativa capaz de regular o citoesqueleto de actina.

Em alguns outros casos, as proteínas G ativam ou inativam, diretamente, os canais iônicos na membrana plasmática da célula-alvo, alterando, assim, a permeabilidade aos íons e, por conseguinte, a excitabilidade da membrana. A acetilcolina, liberada pelo nervo vago, por exemplo, reduz a velocidade e a força de contração do músculo cardíaco (ver Figura 15-9B). Uma classe especial de receptores de acetilcolina que ativam a proteína G_i, discutida anteriormente, medeia esse efeito. A subunidade α da proteína G_i, uma vez ativada, inibe a adenilil-ciclase (conforme descrito previamente), enquanto as subunidades βγ se ligam aos canais de K^+ da membrana plasmática das células musculares cardíacas, abrindo-os. A abertura destes canais dificulta a despolarização da célula, o que contribui para o efeito inibitório da acetilcolina no coração. (Os receptores de acetilcolina que são ativados pelo alcaloide fúngico muscarina são chamados de *receptores muscarínicos,* para distingui-los dos *receptores nicotínicos* de acetilcolina, bem diferentes, que são associados a canais iônicos nas células musculoesqueléticas e nas células nervosas e ativados por nicotina e por acetilcolina.)

Outras proteínas G regulam a atividade de canais iônicos de forma mais indireta, pela estimulação da fosforilação dos canais (p. ex., por PKA, PKC ou CaM-cinase) ou pela produção ou destruição de nucleotídeos cíclicos que ativam ou inativam diretamente esses canais. Estes *canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos* têm um papel crítico no olfato e na visão, conforme discutiremos agora.

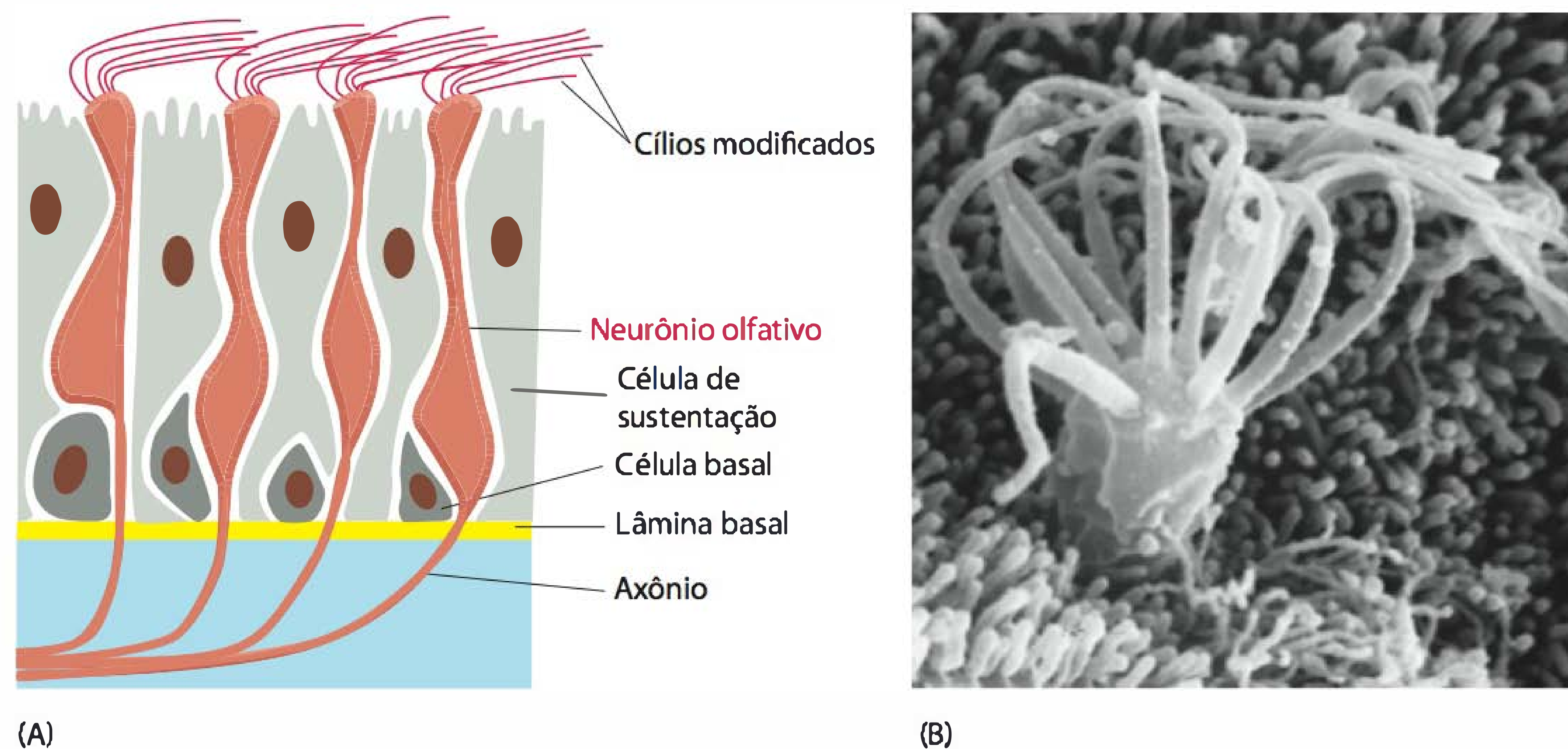


Figura 15-46 Neurônios receptores olfativos. (A) Desenho esquemático de um corte do epitélio olfativo da cavidade nasal. Os neurônios olfativos possuem cílios modificados que se projetam na superfície do epitélio e contêm os receptores olfativos, além da maquinaria de transdução de sinal. Quando a célula é ativada por um odorante, o axônio, que se estende a partir da extremidade oposta do receptor, envia sinais elétricos para o cérebro para gerar um potencial de ação. Pelo menos nos roedores, as células basais atuam como células-tronco, produzindo, ao longo da vida do animal, novos neurônios receptores para substituir os que morrem. (B) Micrografia eletrônica de varredura dos cílios na superfície de um neurônio olfativo. (B, de E. E. Morrison e R. M. Costanzo, *J. Comp. Neurol.* 297:1-13, 1990. Com e permissão de Willey-Liss.)

O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos

Os humanos são capazes de distinguir mais de 10 mil odores, detectados por neurônios olfativos especializados na mucosa nasal. Essas células reconhecem odores por meio de GPCRs específicos, chamados de **receptores olfativos;** os receptores estão localizados na superfície dos cílios modificados que se projetam das células (**Figura 15-46**). Os receptores atuam por meio do cAMP. Quando estimulados pela ligação de um odorante, eles ativam uma proteína G específica do olfato (conhecida como G_{olf}), que, por sua vez, ativa uma adenilil-ciclase. O aumento resultante no cAMP abre os *canais catiônicos controlados por cAMP*, permitindo um influxo de Na^+, o que despolariza a membrana do neurônio olfativo e inicia um impulso nervoso que percorre o axônio até o cérebro.

Existem, em camundongos, cerca de mil receptores olfativos diferentes, e cerca de 350 em humanos, cada um codificado por um gene diferente e reconhecendo um grupo diferente de odorantes. Cada neurônio olfativo produz um único tipo de receptor (ver p. 453); o neurônio responde a um grupo específico de odorantes por meio do seu respectivo receptor específico, e cada odorante ativa seu próprio grupo de neurônios olfativos. O mesmo receptor tem um papel crucial no direcionamento do prolongamento axonal de cada neurônio olfativo em desenvolvimento para os neurônios-alvo cerebrais específicos com os quais será conectado. Um grupo diferente de GPCRs atua de uma forma semelhante na mediação da resposta aos *ferormônios*, sinais químicos detectados em uma parte diferente da cavidade nasal e que são utilizados na comunicação entre os membros de uma mesma espécie.

A visão dos vertebrados envolve um processo de detecção de sinal altamente sensível e tão elaborado quanto o do olfato. Estão também envolvidos canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos, mas, neste caso, o nucleotídeo envolvido é o **GMP cíclico** (**Figura 15-47**). Da mesma forma que para o cAMP, a concentração de GMP cíclico no citosol é controlada pela sua síntese rápida (pela *guanilil-ciclase*) e pela sua rápida degradação (pela *fosfodiesterase de GMP cíclico*).

Nas respostas de transdução visual, que são, dentre as mediadas pelas proteínas G, as mais rápidas conhecidas nos vertebrados, a ativação do receptor pela luz resulta em redução no nível de GMP cíclico e não em aumento. A via tem sido bem estudada nos **fotorreceptores dos bastonetes** (**bastonetes**) da retina de vertebrados. Os bastonetes são responsáveis pela visão monocromática no escuro, enquanto os *fotorreceptores dos cones (cones)* são responsáveis pela visão colorida na presença de luz. O bastonete é uma célula altamente especializada, com um segmento externo e um interno, um corpo celular e uma região sináptica por meio da qual o sinal químico é transmitido para a célula nervosa da retina (**Figura 15-48**). Esta transmite o sinal para outra célula nervosa na retina, que, por sua vez, o transmite para o cérebro (ver Figura 23-16).

O aparelho de fototransdução está localizado no segmento externo do bastonete, que possui uma pilha de *discos*, sendo cada um deles formado por um saco membranar fechado contendo muitas moléculas de **rodopsina** fotossensíveis. A membrana plasmática que en-

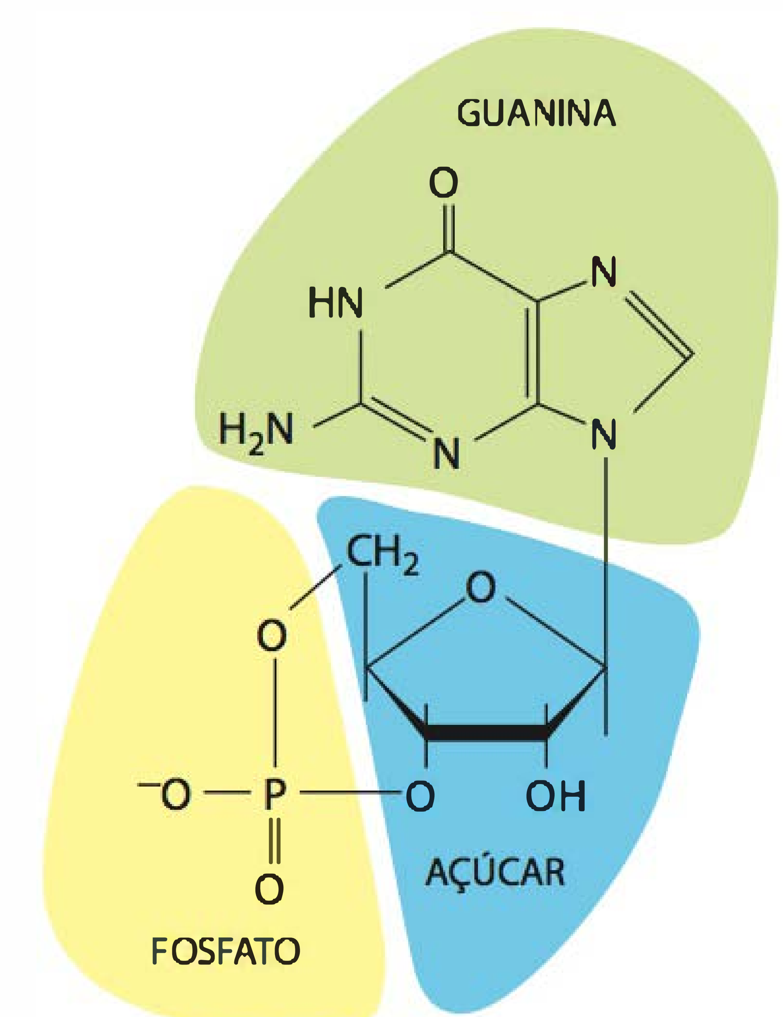


Figura 15-47 GMP cíclico.

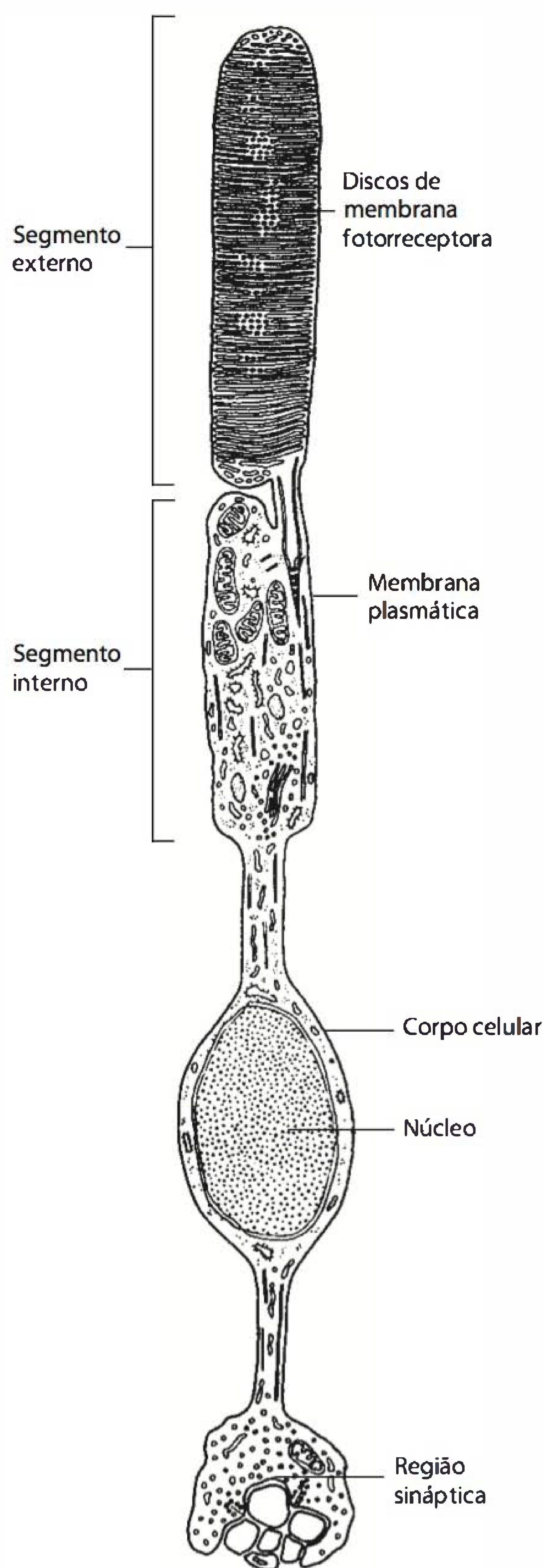


Figura 15-48 Célula fotorreceptora do tipo bastonete. Existem cerca de mil discos no segmento externo. As membranas dos discos não estão conectadas com a membrana plasmática. O segmento externo e o interno são regiões especializadas de um *cílio primário* (discutido no Capítulo 16); conforme foi mencionado anteriormente e será discutido mais tarde, o cílio primário pode ser encontrado na superfície da maioria das células dos vertebrados, onde serve como uma organela de sinalização.

volve o segmento externo possui *canais de Na^+ controlados por GMP cíclico*. O GMP cíclico ligado aos canais os mantém abertos no escuro. Paradoxalmente, a luz causa uma hiperpolarização da membrana plasmática (o que inibe a sinalização sináptica) ao invés de uma despolarização (o que estimularia a sinalização sináptica). A hiperpolarização (ou seja, o potencial de membrana se torna mais negativo – discutido no Capítulo 11) acontece porque a ativação pela luz das moléculas de rodopsina na membrana do disco provoca uma queda na concentração de GMP cíclico e o fechamento dos canais de cátions na membrana plasmática que envolve o conjunto dos discos (**Figura 15-49**).

A rodopsina é um membro da família de GPCRs, mas o sinal extracelular ativador não é uma molécula, e sim um fóton de luz. Cada molécula de rodopsina possui um cromóforo, o 11-*cis* retinal, ligado covalentemente e que isomeriza quase de maneira instantânea para retinal todo-*trans* quando absorve um único fóton. A isomerização altera a forma do retinal, forçando uma mudança conformacional na proteína (opsina). A rodopsina ativada altera a conformação da proteína G *transducina* (G_t), fazendo com que sua subunidade α ative a **fosfodiesterase do GMP cíclico**. A enzima hidrolisa o GMP cíclico, reduzindo, assim, seus níveis no citosol. Essa queda na concentração leva a uma redução na quantidade de GMP cíclico ligado aos canais de cátions na membrana plasmática, provocando o fechamento deles. Dessa forma, o sinal é transmitido rapidamente da membrana do disco para a membrana plasmática, e o sinal luminoso é convertido em sinal elétrico, por meio da hiperpolarização da membrana plasmática do bastonete.

Os bastonetes utilizam vários circuitos de retroalimentação negativa para permitir que as células retornem rapidamente a um estado escuro de repouso que se segue a um sinal luminoso, uma exigência para que a brevidade do sinal seja percebida. Uma cinase espe-

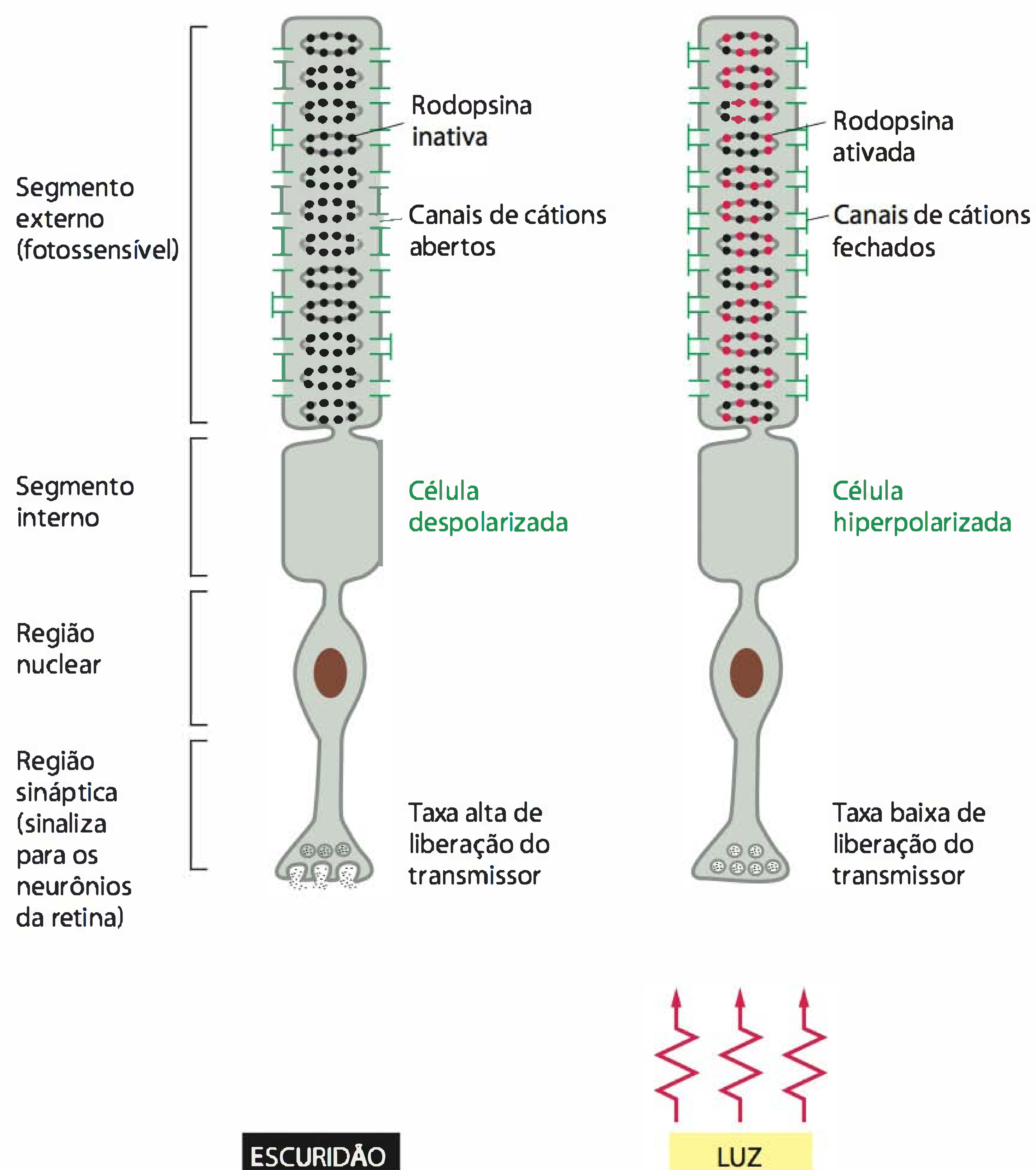


Figura 15-49 Resposta do bastonete ao estímulo luminoso. Os fótons são absorvidos pelas moléculas de rodopsina nos discos do segmento externo. Isso leva ao fechamento dos canais de cátions na membrana plasmática, o que a hiperpolariza e reduz a taxa de liberação do neurotransmissor na região sináptica. Como o neurotransmissor inibe muitos neurônios pós-sinápticos da retina, a luz serve para liberá-los da inibição e, assim, excitá-los.

Tabela 15-3 Quatro principais famílias das proteínas G triméricas*

FAMÍLIA	AL UNS MEMBROS DA FAMÍLIA	SUBUNIDADES QUE MEDEIAM A AÇÃO	ALGUMAS FUNÇÕES
I	G_s	α	Ativa a adenilil-ciclase; ativa canais de Ca^{2+}
	G_{olf}	α	Ativa a adenilil-ciclase nos neurônios sensoriais olfativos
II	G_i	α	Inibe a adenilil-ciclase
		$\beta\gamma$	Ativa canais de K^+
	G_o	$\beta\gamma$	Ativa canais de K^+; inativa canais de Ca^{2+}
		α e $\beta\gamma$	Ativa a fosfolipase C-β
	G_t (transducina)	α	Ativa a fosfodiesterase de GMP cíclico nos fotorreceptores dos bastonetes de vertebrados
III	G_q	α	Ativa a fosfolipase C-β
IV	$G_{12/13}$	α	Ativa as GTPases monoméricas da família Rho (via Rho-GEF) para regular o citoesqueleto de actina

*As famílias são determinadas pela sequência de aminoácidos das subunidades α. São mostrados somente exemplos selecionados. Em humanos foram descritas 20 subunidades α e, pelo menos, 6 subunidades β e 11 subunidades γ.

cífica da rodopsina, chamada de *rodopsina-cinase* (*RK*), fosforila várias serinas na cauda citosólica da rodopsina ativada, inibindo parcialmente sua capacidade de ativar a transducina. Uma proteína inibitória chamada de *arrestina* liga-se então à rodopsina fosforilada, inibindo sua atividade. Se o gene que codifica RK, em camundongos ou em humanos, for inativado por mutação, a resposta dos bastonetes à luz é prolongada, e essas células acabam morrendo.

Ao mesmo tempo em que a rodopsina é desativada pela arrestina, uma proteína RGS (ver p. 896) liga-se à transducina ativada estimulando a hidrólise do GTP ligado a ela a GDP, fazendo-a retornar ao seu estado inativo. Além disso, os canais de cátions que se fecham em resposta à luz são permeáveis também ao Ca^{2+}, bem como ao Na^+, de forma que, quando fecham, inibem o influxo normal de Ca^{2+}, fazendo diminuir a concentração do íon no citosol. Essa queda na concentração estimula a guanilil-ciclase, que repõe rapidamente o GMP cíclico, fazendo seu nível retornar àquele de antes do estímulo luminoso. A ativação da guanilil-ciclase é mediada por uma proteína específica sensível ao Ca^{2+} que responde à queda dos níveis do íon. Em contraste com a calmodulina, essa proteína está inativa quando tem Ca^{2+} ligado a ela e está ativa na ausência do íon. Por isso, ela estimula a ciclase quando os níveis de Ca^{2+} diminuem em consequência de uma resposta à luz.

Os mecanismos de retroalimentação negativa fazem mais do que levar o bastonete a um estado de repouso após um estímulo luminoso; eles também auxiliam na *adaptação* do fotorreceptor, reduzindo sua resposta, quando exposto continuamente à luz. A adaptação, conforme discutido anteriormente, permite que a célula receptora funcione como um detector sensível de *mudanças* na intensidade do estímulo, abrangendo uma enorme variação de níveis basais de estimulação. É por isso que podemos ver o clarão de uma câmera fotográfica à luz do dia.

A **Tabela 15-3** mostra um resumo das quatro principais famílias às quais pertencem as várias proteínas G triméricas apresentadas neste capítulo.

Os mediadores intracelulares e as cascatas enzimáticas amplificam os sinais extracelulares

Apesar das diferenças nos detalhes moleculares, os sistemas de sinalização desencadeados pelos GPCRs compartilham determinadas características e são regidos por princípios gerais semelhantes. Eles dependem de cadeias de transmissão de proteínas sinalizadoras e de pequenas moléculas mediadoras intracelulares. Contrastando com as vias de sinalização mais diretas utilizadas pelos receptores nucleares apresentados anteriormente, essas cadeias de transmissão propiciam numerosas oportunidades para a amplificação das respostas aos sinais extracelulares. Por exemplo, na cascata de transdução visual descrita anteriormente, uma única molécula de rodopsina ativada catalisa a ativação de centenas de moléculas de transducina em uma velocidade de mil moléculas por segundo. Cada uma delas ativa uma molécula de fosfodiesterase de GMP cíclico, cada uma das quais hidrolisa 4 mil moléculas

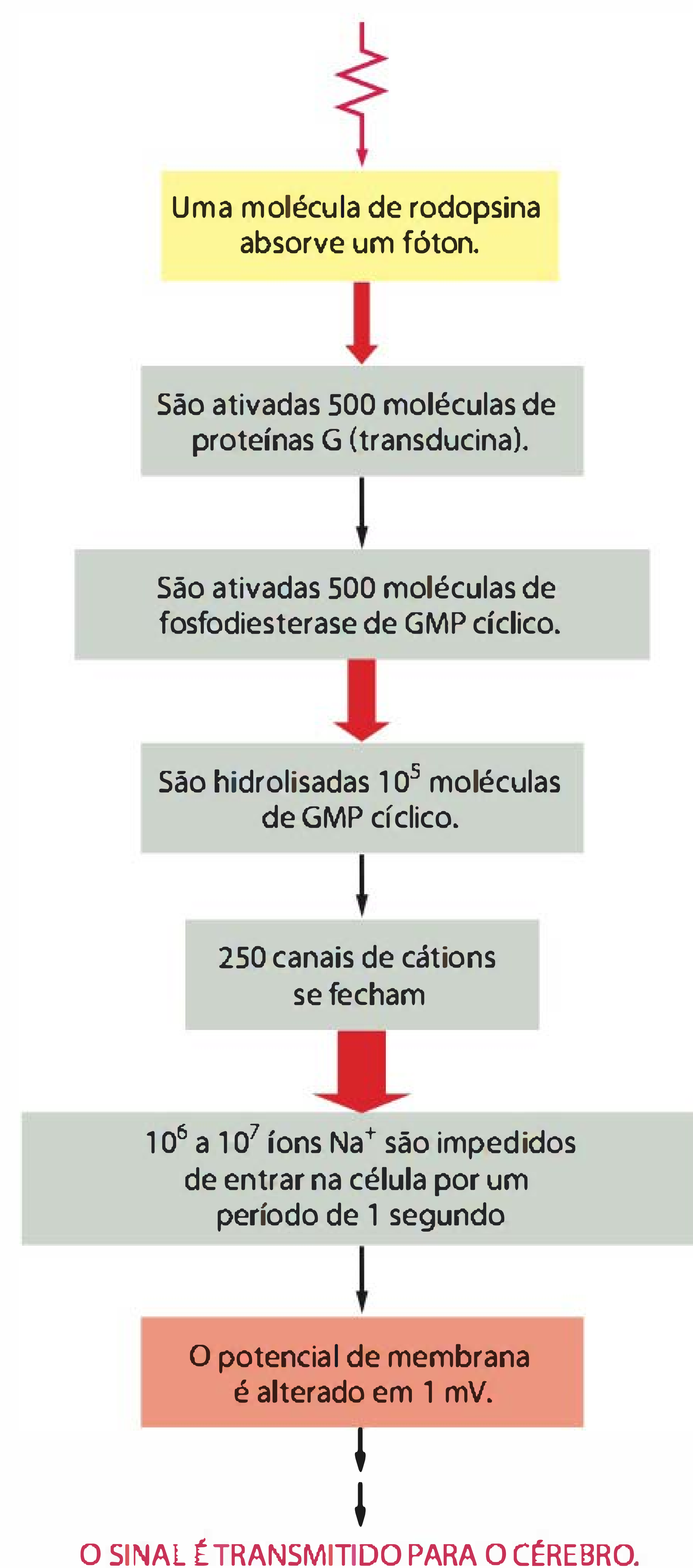


Figura 15-50 Amplificação da cascata catalítica, induzida pela luz, nos bastonetes de vertebrados. As *setas vermelhas* indicam onde as etapas de amplificação ocorrem, e a espessura das setas indica a magnitude aproximada da amplificação.

de GMP cíclico por segundo. Essa cascata catalítica demora cerca de 1 segundo e resulta na hidrólise de mais de 10^5 moléculas de GMP cíclico para cada quantum de luz absorvido, e a consequente queda na concentração de GMP cíclico promove o fechamento transitório de centenas de canais de cátions na membrana plasmática (**Figura 15-50**). Como resultado, um bastonete responde a um único fóton de luz de uma forma altamente reprodutível no tempo de duração e na magnitude.

Da mesma maneira, quando uma molécula-sinal extracelular se liga a um receptor que ativa indiretamente a adenilil-ciclase via G_s, cada proteína receptora pode ativar muitas moléculas de G_s, e cada uma delas ativa uma molécula de ciclase. Cada ciclase, por sua vez, catalisa a conversão de um grande número de moléculas de ATP em cAMP. Na via do fosfolipídeo de inositol, acontece uma amplificação semelhante. Por isso, uma mudança nanomolar (10^{-9} M) na concentração de um sinal extracelular pode induzir mudanças micromolares (10^{-6} M) na concentração de mediadores intracelulares como cAMP ou Ca^{2+}. Como esses mediadores funcionam como efetores alostéricos na ativação de enzimas ou de canais iônicos específicos, uma única molécula-sinal extracelular pode causar a alteração de milhares de moléculas proteicas dentro da célula-alvo.

Qualquer uma dessas cascatas amplificadoras de sinais estimuladores necessita de mecanismos de regulação em cada etapa, a fim de restabelecer o estado de repouso do sistema quando o sinal cessa. Conforme foi enfatizado anteriormente, a resposta à estimulação será rápida somente se os mecanismos de inativação também forem rápidos. Para isso, as células são dotadas de mecanismos eficientes para degradar (e ressintetizar) nucleotídeos cíclicos rapidamente, para tamponar e remover o Ca^{2+} citosólico e para desativar enzimas e canais iônicos que tenham sido ativados. Isso não é essencial somente para desativar uma resposta, é também importante para definir o estado de repouso a partir do qual ela inicia.

Cada proteína na cadeia de transmissão do sinal, incluindo o próprio receptor, pode ser um alvo para regulação, como veremos a seguir.

A dessensibilização dos receptores associados à proteína G depende da fosforilação do receptor

Quando as células-alvo são expostas, por um longo período, a altas concentrações de um ligante estimulador, elas se tornam *dessensibilizadas*, ou *adaptadas*, de várias maneiras diferentes. Uma categoria importante de mecanismos de dessensibilização depende de alterações na quantidade ou nas condições das próprias moléculas receptoras.

No caso dos GPCRs, existem três formas gerais de dessensibilização (ver Figura 15-29): (1) Na *inativação*, eles se alteram de forma a não mais interagir com as proteínas G. (2) No *sequestro*, eles são temporariamente removidos para o interior da célula (internalizados) de forma a não terem mais acesso ao seu ligante. (3) Na *retrorregulação*, eles são destruídos nos lisossomos após a internalização.

Em cada caso, a dessensibilização dos receptores depende da sua fosforilação pelas enzimas PKA, PKC, ou por um membro da família das **cinases dos GPCRs (GRKs)**, que incluem a cinase específica da rodopsina RK envolvida na dessensibilização dos bastonetes, discutida anteriormente. As GRKs fosforilam várias serinas e treoninas do receptor, mas isso

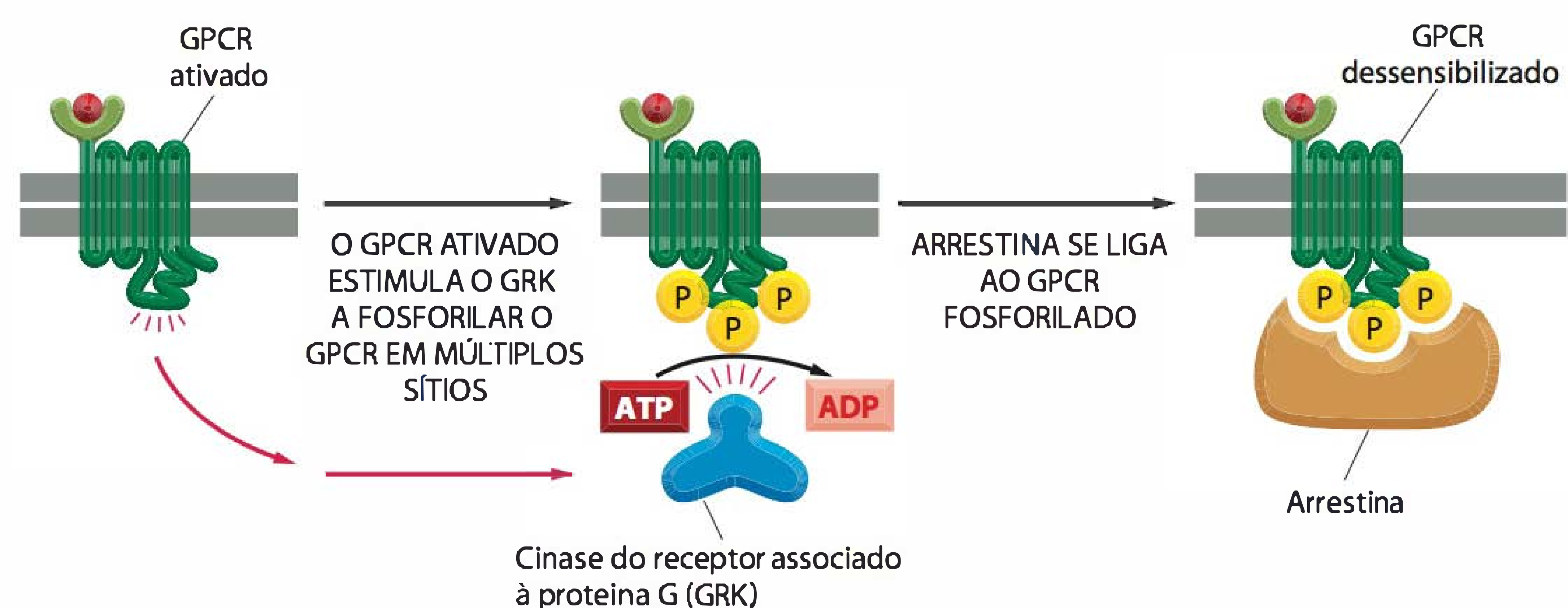


Figura 15-51 Funções das cinases dos receptores associados à proteína G (GRKs) e das arrestinas na dessensibilização desses receptores. Uma GRK fosforila somente os receptores ativados porque são estes que a ativam. A ligação de uma arrestina ao receptor fosforilado impede a ligação deste à proteína G e direciona também sua endocitose (não-mostrado). Camundongos deficientes em uma forma de arrestina, por exemplo, não são dessensibilizados em resposta à morfina, atestando a importância das arrestinas no processo.

só acontece após sua ativação pelo ligante. Como no caso da rodopsina, tão logo o receptor seja fosforilado, ele se liga com alta afinidade a um membro da família das **arrestinas** (**Figura 15-51**).

A arrestina ligada ao receptor contribui de duas formas, pelo menos, ao processo de dessensibilização. Na primeira, ela impede a interação do receptor com as proteínas G. Na segunda, ela serve como uma proteína adaptadora que acopla o receptor à maquinaria endocítica dependente da clatrina (discutida no Capítulo 13), induzindo endocitose mediada por receptor. O destino do complexo GPCR-arrestina internalizado depende de outras proteínas do complexo. Em alguns casos, o receptor é desfosforilado e reciclado para a membrana plasmática, para ser reutilizado. Em outros, ele é ubiquitinado e degradado nos lisossomos (discutido mais adiante).

A endocitose de receptores não necessariamente faz com que o receptor pare de sinalizar. Em alguns casos a arrestina ligada recruta outras proteínas de sinalização para liberar o sinal ao longo de novas rotas a partir dos GPCRs internalizados.

Resumo

Os GPCRs ativam ou inativam, indiretamente, via proteínas G, as enzimas ligadas à membrana plasmática e aos canais iônicos. Quando estimulada por um receptor ativado, a proteína G se dissocia em uma subunidade α e nas subunidades βγ, as quais regulam diretamente a atividade de proteínas-alvo na membrana plasmática. Alguns GPCRs tanto ativam como inativam a adenilil-ciclase, alterando, dessa forma, a concentração intracelular do pequeno mediador cAMP. Outros ativam a fosfolipase C específica para fosfoinositídeos (PLCβ), que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI[4,5]P_2) com a geração de dois mediadores intracelulares pequenos. Um deles é o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que libera Ca^{2+} do RE, aumentando, assim, a concentração do íon no citosol. O outro é o diacilglicerol, que permanece na membrana plasmática e ativa a proteína-cinase C (PKC). Um aumento nos níveis tanto de cAMP como de Ca^{2+} afeta as células, principalmente por estimular, respectivamente, a proteína-cinase A (PKA) e as proteína-cinases dependentes do complexo Ca^{2+}/calmodulina (CaM-cinases).

A PKC, a PKA e a CaM-cinase fosforilam serinas e treoninas de proteínas-alvo específicas, alterando, assim, a atividade dessas proteínas. Cada tipo de célula possui grupos característicos de proteínas-alvo reguladas dessa forma, permitindo que a célula tenha sua própria resposta aos mediadores intracelulares. As cascatas de sinalização intracelulares ativadas pelos GPCRs permitem que as respostas sejam bastante amplificadas, de forma que muitas proteínas-alvo são alteradas para cada molécula-sinal extracelular ligada ao seu receptor.

As respostas mediadas pelos GPCRs desaparecem rapidamente, quando o sinal extracelular é removido. Assim, a subunidade α da proteína G é estimulada por sua proteína-alvo, ou por um RGS, a se autoinativar pela hidrólise do GTP ligado a ela; o IP_3 é desfosforilado rapidamente por uma lipídeo-fosfatase (ou fosforilado por uma cinase), os nucleotídeos cíclicos são hidrolisados pelas fosfodiesterases, o Ca^{2+} é bombeado rapidamente para fora do citosol, e as proteínas fosforiladas são desfosforiladas por proteína-fosfatases. Os próprios GPCRs ativados são fosforilados pelas GRKs, desencadeando a ligação da arrestina, o que os desacopla das proteínas G e promove sua endocitose, resultando em dessensibilização ou em sinalização constante via proteínas sinalizadoras recrutadas pela arrestina.

SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS A ENZIMAS

Assim como os GPCRs, os **receptores associados a enzimas** são proteínas transmembrana com seu domínio de interação com o ligante localizado na superfície externa da membrana plasmática. Seu domínio citosólico, entretanto, em vez de estar associado a uma proteína G trimérica, associa-se diretamente a uma enzima, ou tem atividade enzimática intrínseca. Enquanto os GPCRs possuem sete segmentos transmembrana, cada subunidade dos receptores associados a enzimas possui apenas um. Algumas vias de sinalização são ativadas pelas duas classes de receptores, e não há razão óbvia para um determinado sinal extracelular utilizar uma ou outra classe desses receptores.

Existem seis classes de receptores associados a enzimas:

1. Os *receptores tirosina-cinases* fosforilam tirosinas específicas próprias e em um pequeno grupo de proteínas sinalizadoras intracelulares.
2. Os *receptores associados à tirosina-cinase* não têm atividade enzimática intrínseca, mas recrutam, diretamente, proteínas tirosina-cinases citoplasmáticas para transmitir o sinal.
3. Os *receptores serinatreonina-cinases* fosforilam serinas ou treoninas específicas próprias e em proteínas reguladoras gênicas latentes, com as quais se associam.
4. Os *receptores associados à histidina-cinase* ativam uma via de sinalização de dois componentes na qual a cinase fosforila suas próprias histidinas e transfere o fosfato imediatamente para uma segunda proteína sinalizadora intracelular.
5. Os *receptores guanilil-ciclases* catalisam, diretamente, a produção de GMP cíclico no citosol, o qual atua como um mediador intracelular pequeno da mesma maneira que o cAMP.
6. As *tirosina-fosfatases* similares a receptor removem grupos fosfato de tirosinas de proteínas sinalizadoras intracelulares específicas. (São chamadas de "similares a receptor" porque os ligantes presumidos ainda não foram identificados, de forma que sua função receptora ainda não foi demonstrada diretamente.)

Focaremos nossa discussão nas primeiras quatro classes, começando com os receptores tirosina-cinases, os mais numerosos entre os receptores associados a enzimas.

Os receptores tirosina-cinases ativados se autofosforilam

Muitas proteínas-sinal extracelulares atuam via **receptores tirosina-cinases** (**RTKs**, *receptor tyrosine kinases*). Exemplos marcantes, discutidos em outra parte deste livro, incluem o *fator de crescimento epidérmico (EGF, epidermal growth factor)*, o *fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor)*, os *fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs, fibroblast growth factors)*, o *fator de crescimento de hepatócitos (HGF, hepatocyte growth factor)*, a *insulina*, o *fator de crescimento-1 semelhante à insulina (IGF1, insulinelike growth factor-1)*, o *fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor)*, o *fator estimulador de colônia de macrófagos (MCSF, macrophage-colony-stimulating factor)* e as *neutrofinas*, incluindo o *fator de crescimento neuronal (NGF, nerve growth factor)*.

Muitas proteínas-sinal extracelulares ligadas à superfície celular também atuam via RTKs. A maior classe desses ligantes é a das **efrinas**, tendo sido identificadas oito em humanos. Entre suas muitas funções, elas ajudam a guiar a migração das células e dos axônios por vias específicas durante o desenvolvimento, pela estimulação de respostas que resultam na atração ou repulsão (discutido mais adiante e no Capítulo 22). Os receptores para as efrinas, chamados de **receptores Eph**, também são os mais abundantes entre os RTKs, sendo codificados por treze genes em humanos. As efrinas e os receptores Eph são incomuns pelo fato de poderem atuar, simultaneamente, como receptores e como ligantes: algumas efrinas, ao se ligarem aos receptores Eph, não só os ativam, como também ativam a si mesmas, transmitindo sinais para o interior da célula que expressa efrina; dessa forma, o comportamento da célula sinalizadora e da célula-alvo é alterado. Essa *sinalização bidirecional* é necessária, por exemplo, para impedir que alguns grupos de células vizinhas se misturem com outros grupos durante o desenvolvimento.

Existem cerca de 60 genes que codificam os RTKs. Estes receptores são classificados em mais de 16 subfamílias estruturais, cada uma delas relacionada às famílias complementares de proteínas ligantes. Várias dessas famílias existentes em mamíferos estão na **Figura 15-52**, e na **Tabela 15-4** estão alguns dos seus ligantes e suas funções. Em todos os casos, a ligação, no lado de fora da célula, da proteína-sinal ao domínio de ligação ativa o domínio intracelular da tirosina-cinase, possibilitando a fosforilação de cadeias laterais de tirosinas selecionadas nos próprios receptores e nas proteínas de sinalização intracelular que, subsequentemente, ligam-se às tirosinas fosforiladas dos receptores.

De que forma a interação com um ligante extracelular ativa o domínio de cinase, do outro lado da membrana plasmática? Acredita-se que, no caso de um GPCR, a ligação altere a orientação relativa de várias hélices α transmembrana, alterando, assim, a posição relativa das alças citoplasmáticas. É difícil imaginar, contudo, como uma mudança conformacional se propagaria através da bicamada lipídica por meio de uma única hélice α transmembrana. No caso dos RTKs, a interação com o ligante induz a dimerização das

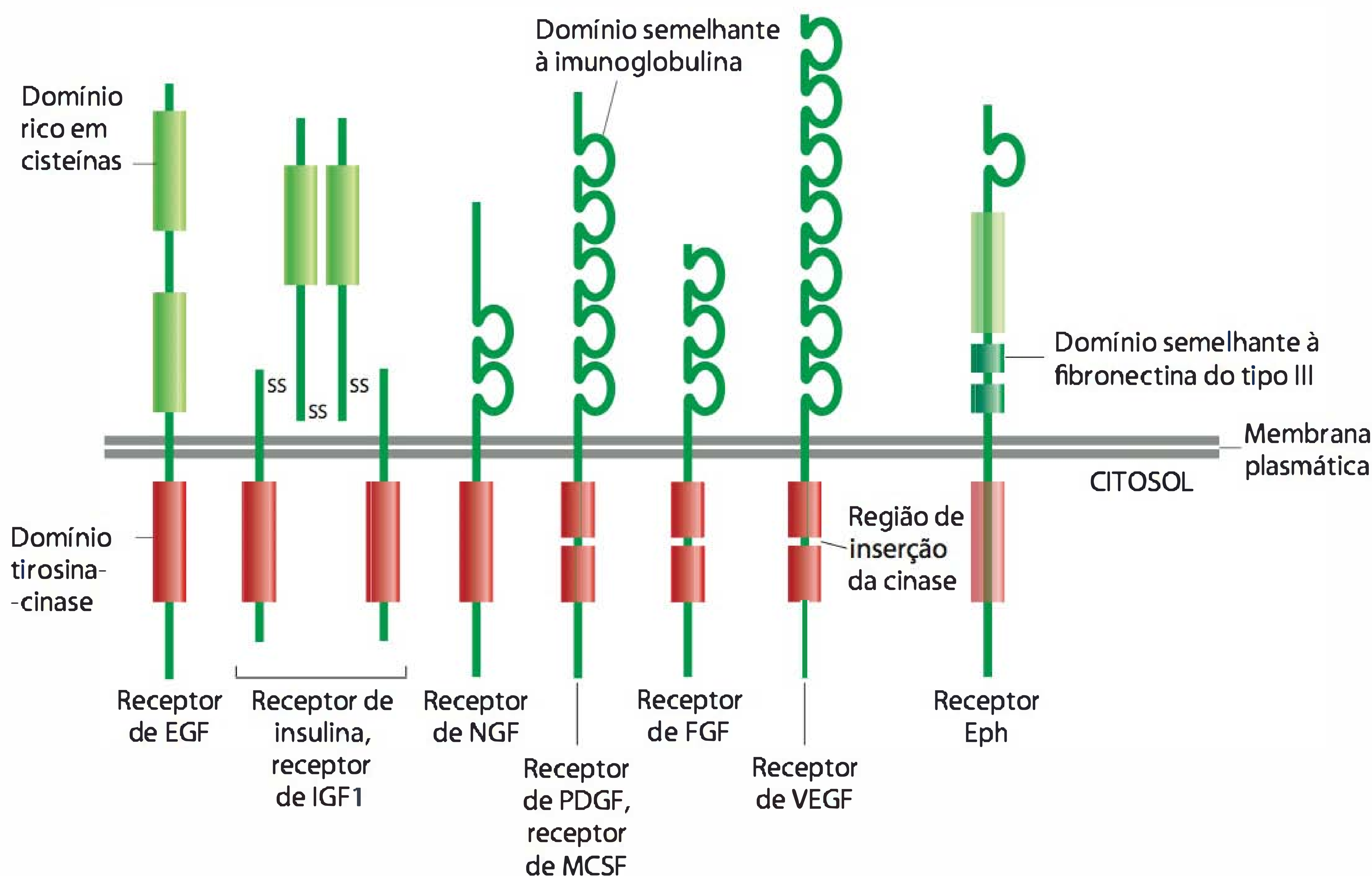


Figura 15-52 Algumas subfamílias de receptores tirosina-cinases. Estão indicados somente um ou dois membros de cada subfamília. Note que, em algumas delas, o domínio tirosina-cinase é interrompido por uma "região de inserção da cinase". Não estão mostrados os papéis funcionais da maioria dos domínios ricos em cisteínas, dos domínios semelhantes à imunoglobulina e dos domínios semelhantes à fibronectina do tipo III. Na Tabela 15-4, estão listados alguns dos ligantes desses receptores, juntamente com algumas das respostas representativas mediadas por eles.

cadeias do receptor aproximando os domínios de cinase de dois receptores (um exemplo de *proximidade induzida*, discutida anteriormente), de modo que se tornam ativados e fosforilam reciprocamente múltiplas tirosinas, um processo conhecido como *transautofosforilação* (**Figura 15-53**A).

Devido à necessidade de dimerização do receptor, é relativamente fácil desativar uma tirosina-cinase específica a fim de determinar sua importância para a resposta celular. Para isso, as células são transfectadas com o DNA codificando uma forma mutante do receptor que dimeriza normalmente, mas possui um domínio de cinase inativo. Quando coexpresso em altos níveis junto com receptores normais, o mutante atua de forma *negativo-dominante*, desativando os receptores normais pela formação de dímeros inativos (Figura 15-53B).

As tirosinas fosforiladas nos receptores tirosina-cinases servem como sítios de ancoragem para proteínas de sinalização intracelular

A fosforilação cruzada de caudas citosólicas dos RTKs contribui de duas formas para o processo de ativação. Primeiramente, a fosforilação das tirosinas dentro do domínio cinase aumenta a atividade cinásica da enzima. Em segundo lugar, a fosforilação das tirosinas fora

Tabela 15-4 Algumas proteínas sinalizadoras que atuam via receptores tirosina-cinases

PROTEÍNA-SINAL	RECEPTORES	ALGUMAS RESPOSTAS REPRESENTATIVAS
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Receptores de EGF	Estimula sobrevivência, crescimento, proliferação, ou diferenciação de vários tipos celulares; atua como sinal indutor no desenvolvimento
Insulina	Receptor de insulina	Estimula a utilização de carboidratos e de síntese proteica
Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF1 e IGF2)	Receptor IGF-1	Estimulam o crescimento celular e a sobrevivência em muitos tipos celulares
Fator de crescimento neuronal (NGF)	TrK A	Estimula a sobrevivência e o crescimento de alguns neurônios
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF AA, BB, AB)	Receptores de PDGF (α e β)	Estimula a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e a migração de vários tipos celulares
Fator estimulador de colônia de macrófagos (MCSF)	Receptor de MCSF	Estimula a proliferação e a diferenciação de monócitos/macrófagos
Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF1 a FGF24)	Receptores de FGF (FGFR1 a FGFR4, mais múltiplas isoformas)	Estimulam a proliferação de vários tipos celulares; inibem a diferenciação de algumas células precursoras; atuam como sinais indutores no desenvolvimento
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Receptor de VEGF	Estimula a angiogênese
Efrinas (tipos A e B)	Receptores Eph (tipos A e B)	Estimulam a angiogênese; guiam a migração de células e de axônios

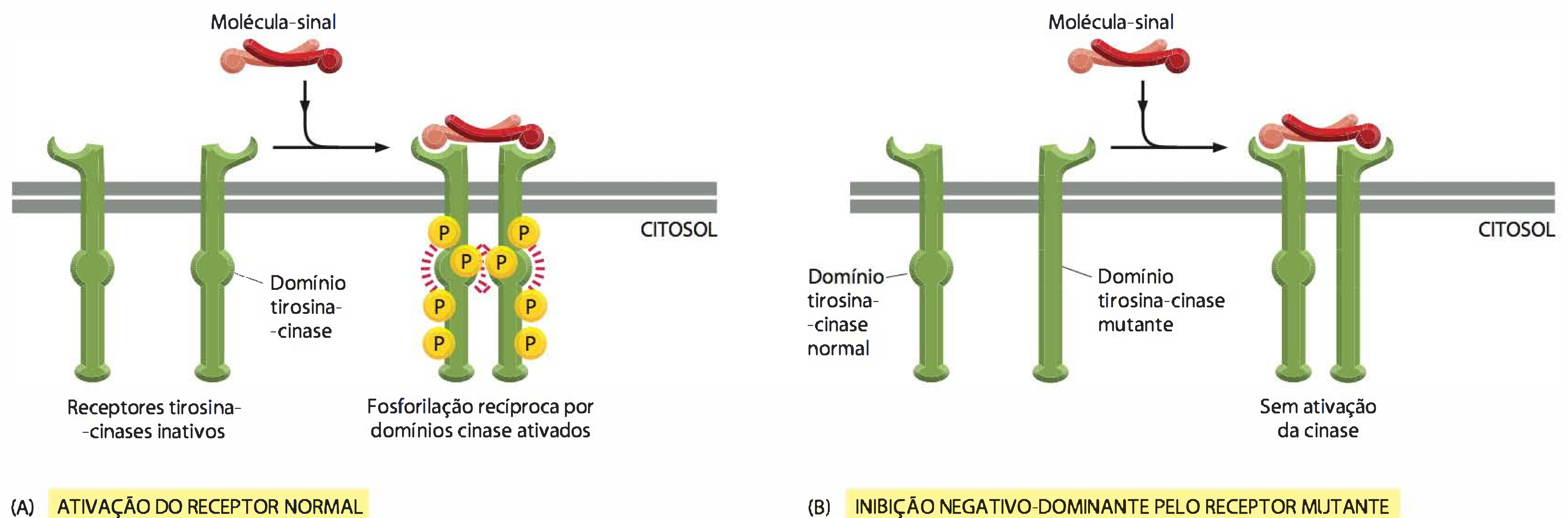


Figura 15-53 Ativação e inativação dos receptores tirosina-cinases por dimerização. (A) Os receptores normais dimerizam em resposta à interação com o ligante. Os dois domínios de cinase se fosforilam reciprocamente, aumentando a atividade dos domínios cinase, que agora fosforilam outros sítios nos receptores. (B) O receptor mutante, com um domínio cinase inativado, pode dimerizar normalmente, mas não pode fosforilar um receptor normal no dímero. Por essa razão, os receptores mutantes, quando presentes em excesso, irão bloquear a sinalização pelos receptores normais – um processo chamado de *regulação negativo-dominante*. Os biólogos celulares frequentemente usam essa estratégia para inibir um determinado tipo de RTK de uma célula e, assim, determinar sua função normal. Uma abordagem semelhante pode ser utilizada para inibir a função de outros tipos de receptores e proteínas de sinalização intracelular que atuam na forma de dímeros ou oligômeros maiores.

do domínio cinase cria sítios de ancoragem de alta afinidade para a ligação de um grande número de proteínas sinalizadoras intracelulares na célula-alvo. Cada tipo de sinalizador se liga a um sítio fosforilado diferente no receptor ativado, porque ele contém um domínio de ligação específico para fosfotirosina que reconhece características da cadeia polipeptídica, além da fosfotirosina.

Uma vez ligada ao RTK ativado, a proteína sinalizadora pode ser fosforilada em algumas tirosinas, tornando-se ativa. Em muitos casos, contudo, a ligação por si só é suficiente para ativar a proteína sinalizadora, tanto por induzir uma mudança conformacional na proteína, como simplesmente por aproximá-la da proteína seguinte na via de sinalização. Assim, a transautofosforilação serve como comutador para desencadear a montagem transitória de grandes complexos de sinalização intracelular, que enviam sinais ao longo de múltiplas vias para muitos destinos na célula (**Figura 15-54**). Diferentes RTKs desencadeiam diferentes respostas, pois se ligam a diferentes combinações de proteínas sinalizadoras.

Os receptores de insulina e de IGF1 atuam de uma forma ligeiramente diferente. Eles são tetrâmeros (ver Figura 15-52), e presume-se que a interação com o ligante provoque um rearranjo das suas cadeias transmembrana de forma a aproximar dois domínios cinase. Além disso, a maioria dos sítios de ancoragem de fosfotirosinas gerados não está no próprio receptor, mas em uma proteína de ancoragem especializada, chamada de *substrato-1 do receptor de insulina (IRS1, insuline receptor substrate-1)*. O receptor ativado transautofosforila primeiro seu domínio cinase, que fosforila múltiplas tirosinas em IRS1, criando, assim, um número de sítios de ancoragem maior do que aquele que seria gerado somente no receptor (ver Figura 15-22). Outras proteínas de ancoragem são utilizadas, de forma semelhante, por alguns outros RTKs para aumentar o tamanho do complexo de sinalização.

Proteínas com domínios SH2 se ligam às tirosinas fosforiladas

As mais diferentes proteínas sinalizadoras intracelulares podem se ligar às fosfotirosinas dos RTKs ativados (ou a proteínas de ancoragem especiais, como a IRS1). Elas participam da

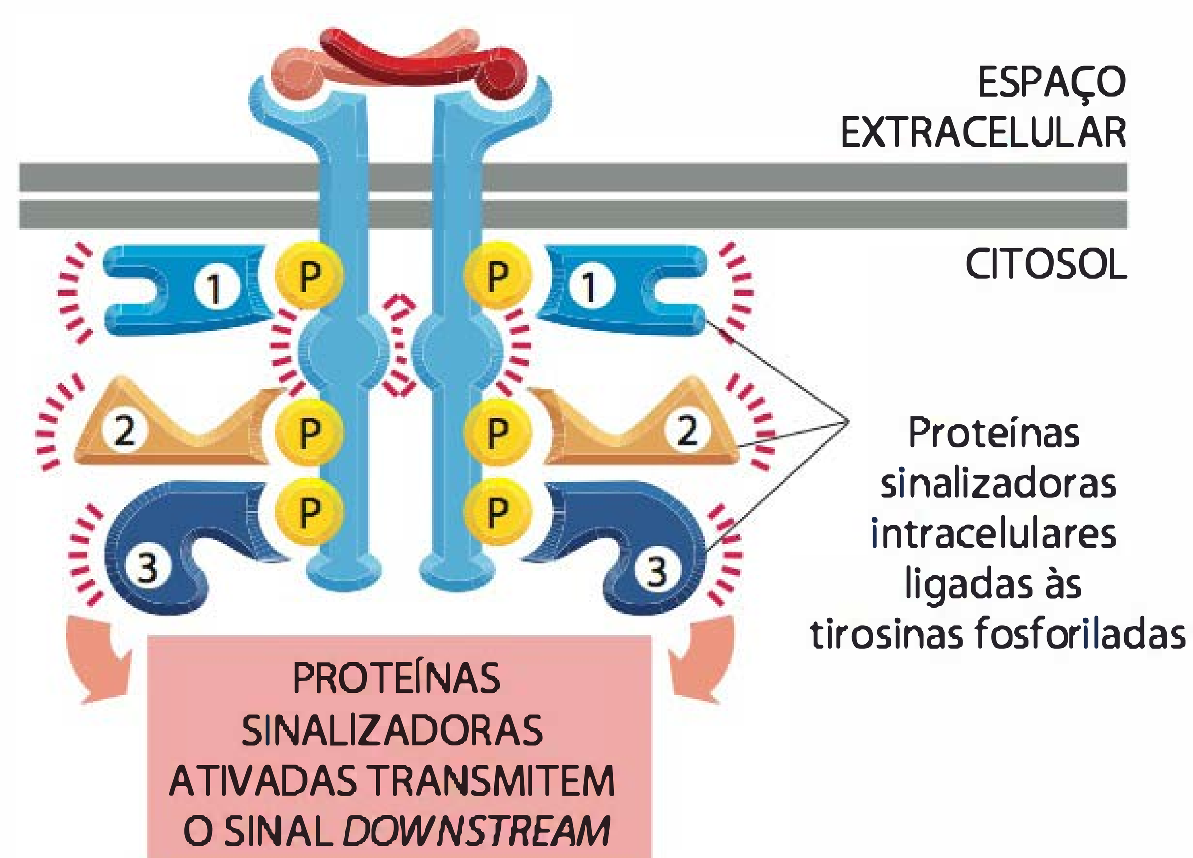


Figura 15-54 A ancoragem das proteínas sinalizadoras intracelulares nas fosfotirosinas de um receptor tirosina-cinase ativado. O receptor ativado mais as proteínas ligadas a ele formam um complexo de sinalização que transmite os sinais ao longo de múltiplas vias sinalizadoras.

transmissão do sinal por meio de cadeias de interações proteína-proteína, mediadas por *domínios de interação* modulares, conforme discutido anteriormente. Algumas das proteínas de ancoragem são enzimas, como a **fosfolipase C-γ (PLCγ**, *phospholipase C-γ*), que age da mesma forma que a PLCβ, ou seja, ativando a via de sinalização do fosfolipídeo de inositol, discutida anteriormente, junto com os GPCRs (ver Figuras 15-38 e 15-39). É através dessa via que os RTKs podem aumentar os níveis citosólicos de Ca^{2+} e ativam a PKC. A tirosina-cinase citoplasmática *Src* é outra enzima que ancora nesses receptores e fosforila tirosinas de outras proteínas sinalizadoras. Outra, ainda, é a *fosfatidilinositídeo 3-cinase* (*PI 3-cinase*), que fosforila principalmente lipídeos; como será discutido mais adiante, os lipídeos fosforilados servem então como sítios de ancoragem que atraem várias proteínas sinalizadoras para a membrana plasmática.

As proteínas de sinalização intracelular que se ligam às fosfotirosinas dos RTKs ativados e das proteínas de ancoragem têm estruturas e funções variadas. Contudo, elas geralmente compartilham domínios de ligação à fosfotirosina altamente conservados. Estes podem ser tanto os **domínios SH2** (denominação derivada de *região de homologia com Src*, por terem sido encontrados pela primeira vez nessa proteína) ou, menos comumente, os *domínios PTB* (*ligação à fosfotirosina*). Pelo fato de reconhecerem tirosinas fosforiladas específicas, esses pequenos domínios de interação permitem que as proteínas que os possuem liguem-se a RTKs ativados, bem como a muitas outras proteínas sinalizadoras intracelulares que tenham suas tirosinas fosforiladas transitoriamente (**Figura 15-55**). Conforme mencionado anteriormente, muitas proteínas sinalizadoras possuem outros domínios que possibilitam a sua interação específica com outras proteínas como parte do processo de sinalização. Entre eles está o *domínio SH3*, que se liga a motivos ricos em prolinas nas proteínas intracelulares (ver Figura 15-22). Existem cerca de 115 domínios SH2 e 295 domínios SH3 codificados no genoma humano.

Nem todas as proteínas que se ligam aos RTKs ativados via domínios SH2 auxiliam na transmissão do sinal. Algumas agem reduzindo o processo, promovendo uma retroalimen-

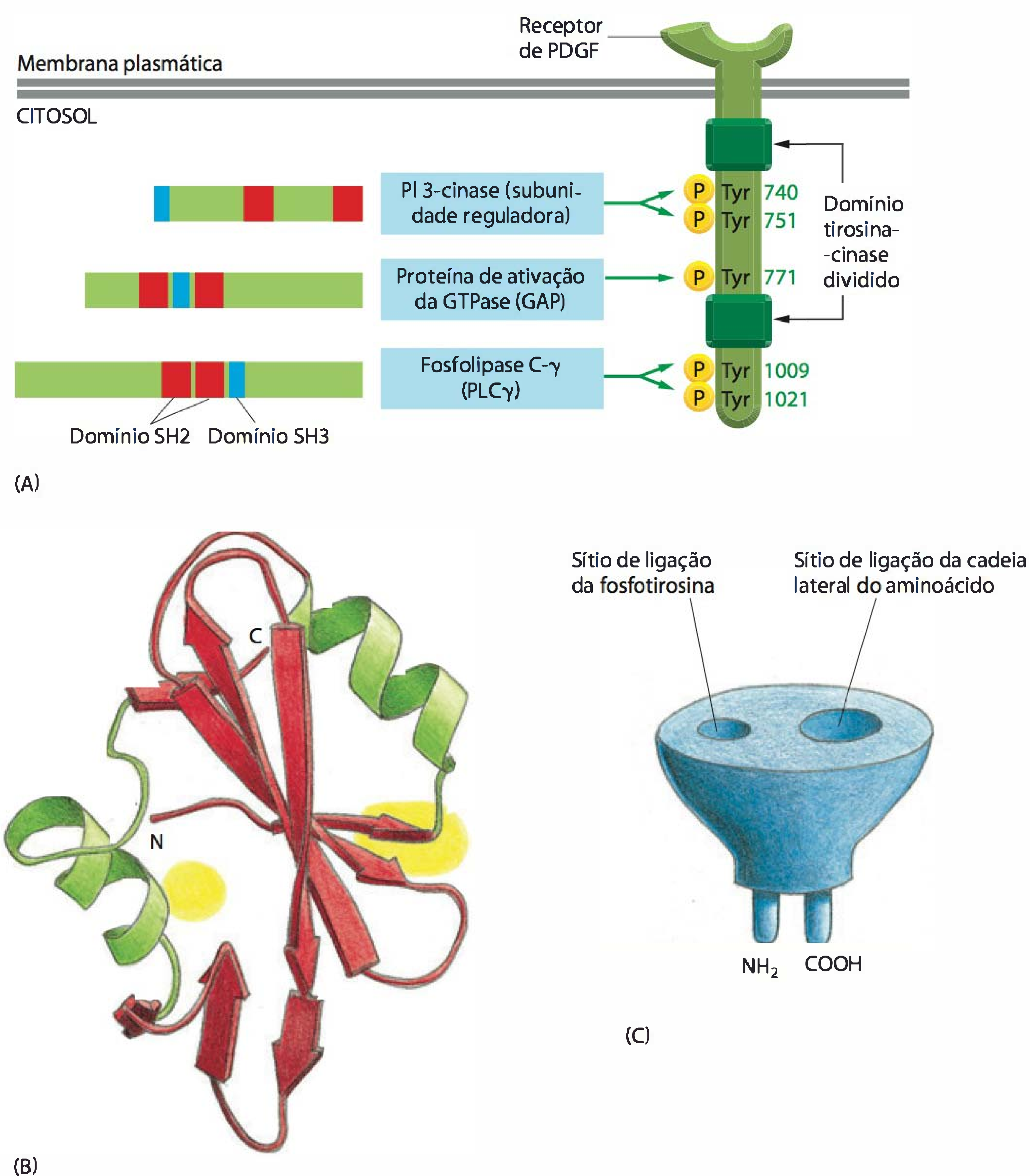


Figura 15-55 Ligação de proteínas sinalizadoras intracelulares contendo SH2 a um receptor de PDGF ativado. (A) Este esquema de um receptor de PDGF mostra cinco sítios de ancoragem de fosfotirosinas, sendo três na região de inserção da cinase e dois na cauda C-terminal, aos quais se ligam as três proteínas sinalizadoras, como indicado. Os números à direita indicam as posições das tirosinas na cadeia polipeptídica. Estes sítios foram identificados utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante para mutar tirosinas específicas no receptor. As mutações nas tirosinas 1009 e 1021, por exemplo, impedem a ligação e a ativação da PLCγ, de forma que a ativação do receptor não estimula mais a via de sinalização do fosfolipídeo de inositol. A localização dos domínios SH2 (*vermelho*) e SH3 (*azul*) nas três proteínas sinalizadoras está indicada. (Não estão mostrados sítios de ancoragem de fosfotirosinas nesse receptor, como aqueles que servem como sítios de ligação para a tirosina-cinase citoplasmática Src e para as proteínas adaptadoras Grb2 e de Shc, discutidos mais adiante.) Ainda não está claro como ocorre a ligação simultânea de muitas proteínas sinalizadoras a um único RTK. (B) Estrutura tridimensional de um domínio SH2, determinada por cristalografia por raios X. O sítio de ligação da fosfotirosina está em *amarelo*, à direita, e o sítio para a ligação da cadeia lateral de um aminoácido específico (neste caso, a isoleucina) está em *amarelo*, à esquerda (ver também Figura 3-39). (C) O domínio SH2 é um módulo compacto que pode ser inserido em praticamente qualquer lugar na proteína, sem perturbar sua estrutura ou sua função (discutido no Capítulo 3). Uma vez que cada domínio possui sítios distintos para o reconhecimento da fosfotirosina e para o reconhecimento da cadeia lateral de um aminoácido específico, diferentes domínios SH2 reconhecem as fosfotirosinas no contexto de diferentes sequências de aminoácidos flanqueadoras. (B, com base em dados de G. Waksman et al. *Cell* 72:779-790, 1993. Com permissão de Elsevier.)

tação negativa. Um exemplo é a *proteína c-Cbl*, que ancora em alguns receptores ativados e catalisa sua ubiquitinação pela adição de uma única molécula de ubiquitina a um ou mais sítios no receptor (chamada de *monoubiquitinação*, para distinguir da *poliubiquitinação*, na qual são adicionadas à proteína uma ou mais cadeias longas de ubiquitina). A monoubiquitinação promove a endocitose e a degradação dos receptores nos lisossomos – um processo chamado de retrorregulação do receptor (ver Figura 15-29). As proteínas endocíticas que contêm *motivos de interação com ubiquitina* (*UIMs, ubiquitin-interaction motifs*) reconhecem os receptores monoubiquitinados e os direcionam para vesículas recobertas de clatrina e, no final, para os lisossomos (discutido no Capítulo 13). Mutações que inativam a destruição dos RTKs dependente de c-Cbl prolongam a sinalização dos receptores e promovem, dessa forma, o desenvolvimento de câncer.

Como no caso dos GPCRs, a endocitose dos RTKs nem sempre reduz a sinalização. Em alguns casos, estes receptores são endocitados juntamente com suas proteínas sinalizadoras e continuam atuando a partir de endossomos ou de outros compartimentos intracelulares. Este mecanismo permite, por exemplo, que o *fator de crescimento neuronal* (*NGF*) se ligue ao seu RTK específico (chamado de TrkA) na extremidade de um longo axônio e sinalize para o corpo celular da mesma célula a uma longa distância. Nesse caso, as vesículas endocíticas contendo TrkA, com o NGF ligado no seu interior e proteínas sinalizadoras ancoradas na face citosólica, são transportadas ao longo do axônio para o corpo celular, onde sinalizam para a sobrevivência da célula.

Algumas proteínas sinalizadoras são formadas, quase exclusivamente, por domínios SH2 e SH3 e funcionam como *adaptadoras* no acoplamento de proteínas fosforiladas com outras proteínas que não possuem seus próprios domínios SH2 (ver Figura 15-22). Essas proteínas adaptadoras auxiliam no acoplamento de receptores ativados à importante proteína sinalizadora *Ras,* uma GTPase monomérica que, por sua vez, pode ativar várias vias de sinalização, como discutiremos a seguir.

A Ras pertence à grande superfamília das GTPases monoméricas

A **superfamília Ras** consiste em várias famílias de GTPases monoméricas, mas somente a família Rho e a família Ras estão envolvidas na transmissão de sinais dos receptores de superfície (**Tabela 15-5**). Um único membro da família Ras ou Rho pode difundir coordenadamente o sinal ao longo de várias vias de sinalização diferentes, pois interage com diferentes proteínas de sinalização intracelular, atuando, assim, como um *centro de sinalização.*

Existem, em humanos, três principais proteínas Ras intimamente relacionadas (H-, K– e N-Ras – ver Tabela 15-5). Embora tenham funções discretamente diferentes, acredita-se que todas funcionem praticamente da mesma forma, e serão denominadas simplesmente **Ras**. Como muitas GTPases monoméricas, as proteínas Ras possuem um ou mais grupos lipídicos ligados covalentemente que auxiliam na ancoragem da proteína à membrana – nesse caso, à face citoplasmática da membrana, de onde a proteína transmite sinais para outras partes da célula. Ela é utilizada, por exemplo, quando os RTKs enviam sinais ao núcleo para estimular a proliferação ou a diferenciação por alteração da expressão gênica. Se a função de Ras for inibida por microinjeção de anticorpos neutralizantes antiRas, ou por formas de

Tabela 15-5 A superfamília Ras de GTPases monoméricas

FAMÍLIA	ALGUNS MEMBROS DA FAMÍLIA	ALGUMAS FUNÇÕES
Ras	H-Ras, K-Ras, N-Ras	Transmitem sinais de RTKs
	Rheb	Ativa mTOR para estimular o crescimento celular
	Rep1	Ativado por uma GEF dependente de AMP cíclico; influencia a adesão celular pela ativação das integrinas
Rho*	Rho, Rac, Cdc42	Transmitem sinais dos receptores de superfície para o citoesqueleto e outros locais
ARF*	ARF1-ARF6	Regula a montagem das coberturas proteicas nas vesículas intracelulares
Rab*	Rab1-60	Regulam o tráfego intracelular de vesículas
Ran*	Ran	Regulam a montagem do fuso mitótico e o transporte nuclear de RNAs e proteínas

*A família Rho é apresentada no Capítulo 16, as proteínas ARF e Rab estão no Capítulo 13, e Ran está nos Capítulos 12 e 17. A estrutura tridimensional de Ras está na Figura 3-72.

Ras mutantes negativo-dominantes, as respostas de proliferação celular ou de diferenciação, normalmente induzidas pelos RTKs ativados, não ocorrem. Ao contrário, 30% dos tumores em humanos têm formas mutantes hiperativas de Ras, o que contribui para a proliferação descontrolada das células cancerosas.

Assim como outras proteínas de ligação a GTP, as proteínas Ras funcionam como comutadores moleculares revezando em dois estados conformacionais distintos – com GTP ligado são ativas e com GDP ligado são inativas (ver Figura 5-18B). Conforme discutido anteriormente para as GTPases monoméricas em geral, duas classes de proteínas sinalizadoras regulam a atividade de Ras, influenciando sua transição entre o estado ativo e o inativo (ver Figura 15-19). Os *fatores de troca de nucleotídeos de guanina-Ras* (**Ras-GEFs**) promovem a permuta dos nucleotídeos pela estimulação da dissociação do GDP e da ligação do GTP do citosol, ativando, desse modo, a Ras. As *proteínas de ativação da GTPase-Ras* (**Ras-GAPs**) aumentam a velocidade de hidrólise do GTP pela Ras, inativando-a. Os mutantes hiperativos de Ras são resistentes à estimulação da GTPase mediada por GAP, permanecendo na forma ativa ligada ao GTP e promovendo, assim, o desenvolvimento de câncer.

Contudo, de que forma os RTKs ativam Ras? Em princípio, eles podem ativar Ras-GEF ou inibir Ras-GAP. Mesmo que algumas GAPs se liguem diretamente (via seus domínios SH2) aos RTKs ativados (ver Figura 15-55A), enquanto os GEFs se ligam indiretamente, o acoplamento indireto do receptor com Ras-GEF é o responsável pela ativação de Ras. De fato, a perda da função de uma Ras-GEF específica tem efeito similar ao da perda de função de Ras. A ativação de outras proteínas da superfamília Ras, bem como as da família Rho, também ocorre por meio da ativação de GEFs. O GEF é quem determina em qual membrana a GTPase está ativada e, atuando como um suporte, quais as proteínas que são ativadas pela GTPase.

As proteínas Ras e as que as regulam são altamente conservadas na evolução, e análises genéticas em *Drosophila* e *C. elegans* propiciaram os primeiros indícios de como os RTKs ativam Ras. Estudos genéticos do desenvolvimento de células fotorreceptoras no olho de *Drosophila* foram particularmente informativos.

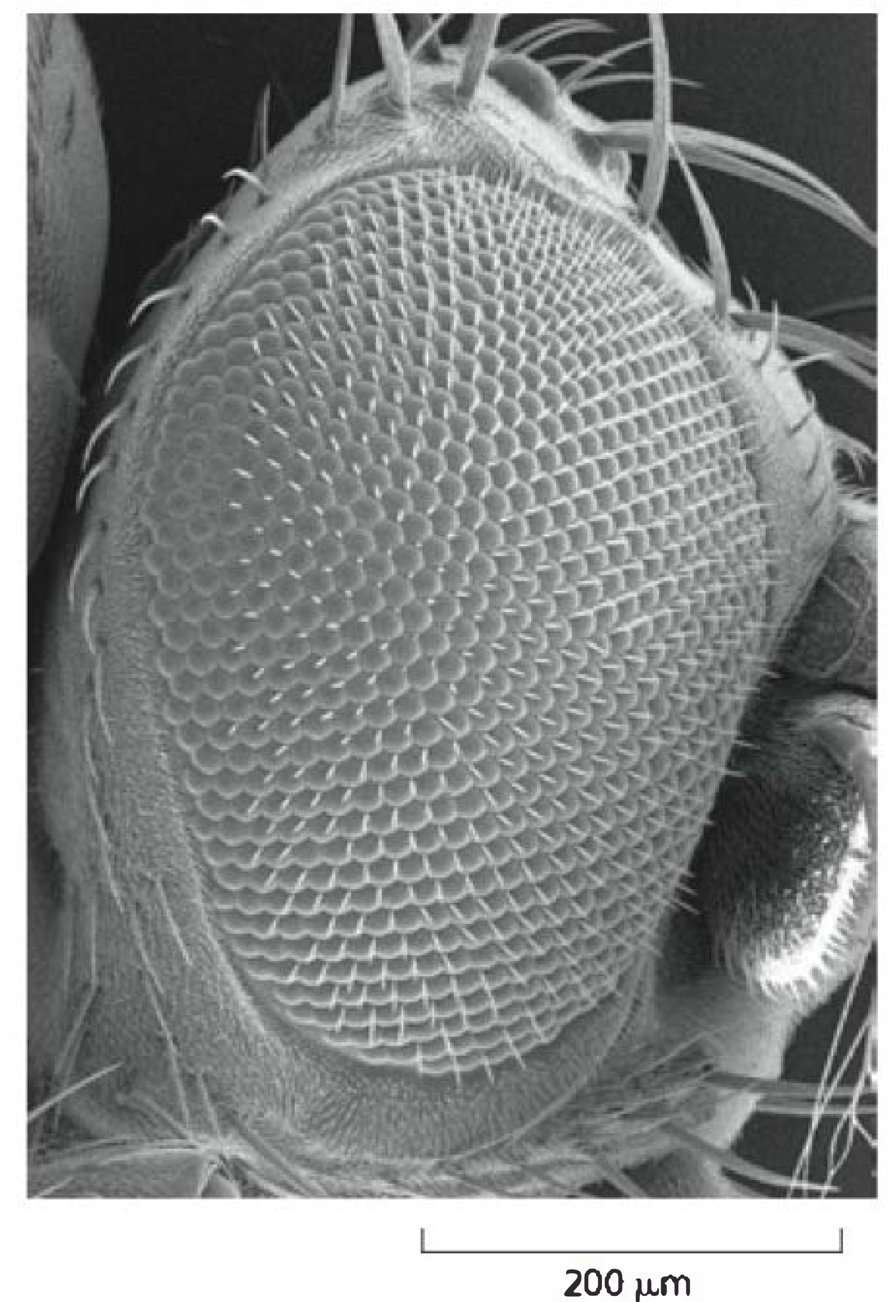


Figura 15-56 Micrografia eletrônica de varredura do olho composto da *Drosophila*. O olho é composto por cerca de 800 unidades idênticas (omatídeos), cada uma com uma lente que focaliza a luz para oito células fotorreceptoras na sua base. (Cortesia de Kevin Moses.)

Os receptores tirosina-cinases ativam Ras via adaptadores e GEFs: evidências oriundas do olho de *Drosophila* em desenvolvimento

O olho composto da *Drosophila* consiste cerca de 800 unidades idênticas chamadas de *omatídeos,* cada uma delas composta por 8 células fotorreceptoras (R1-R8) e 12 células acessórias (**Figura 15-56**). O olho se desenvolve a partir de uma camada epitelial simples, e as células que compõem cada omatídeo são recrutadas desta camada por uma série de interações célula-célula em uma sequência fixa. Cada célula em desenvolvimento, começando pelo fotorreceptor R8, induz suas vizinhas imediatas a seguir um destino específico e se organizar no omatídeo em formação (**Figura 15-57**).

O desenvolvimento do fotorreceptor R7, necessário para a detecção da luz ultravioleta, tem sido estudado mais intensamente, começando com a descrição de um mutante da mosca chamado de *Sevenless* (*Sev*), no qual o único defeito observado é uma deficiência de R7. Tais mutantes são fáceis de selecionar com base na sua cegueira à luz ultravioleta. O gene *Sev* normal codifica um RTK que é expresso nas células precursoras de R7. Análise genética adicional dos mutantes, nos quais o desenvolvimento de R7 está bloqueado, mas a proteína Sev não está afetada, levou à identificação do gene *Bride-of-sevenless* (*Boss*), que codifica o ligante do RTK Sev. Boss é uma proteína transmembrana com sete passos, expressa exclusivamente na superfície da célula R8 adjacente, e quando se liga a uma Sev ativada, induz a diferenciação da célula precursora de R7 em um fotorreceptor. A proteína Sev também é expressa em várias outras células precursoras no omatídeo em desenvolvimento, mas nenhuma delas tem contato com R8; por isso, a proteína Sev não é ativada, e essas células não se diferenciam.

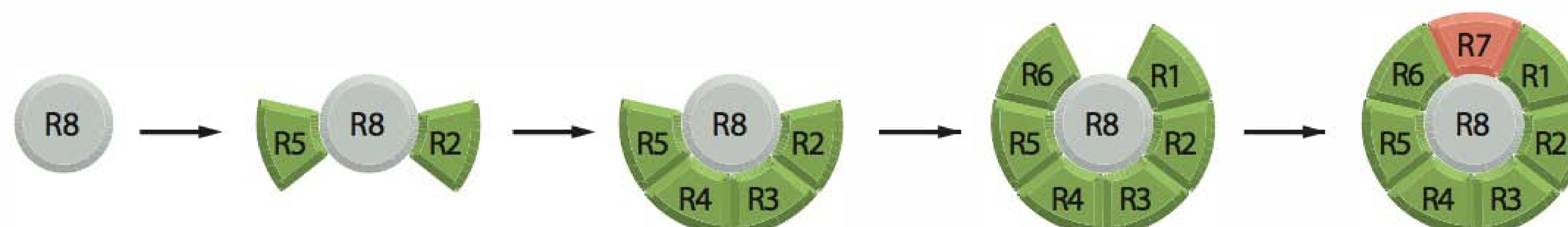


Figura 15-57 Montagem das células fotorreceptoras em um omatídeo de *Drosophila* em desenvolvimento. As células são recrutadas sequencialmente para se tornarem fotorreceptores, começando com R8 e terminando com R7, que é o último fotorreceptor a se desenvolver.

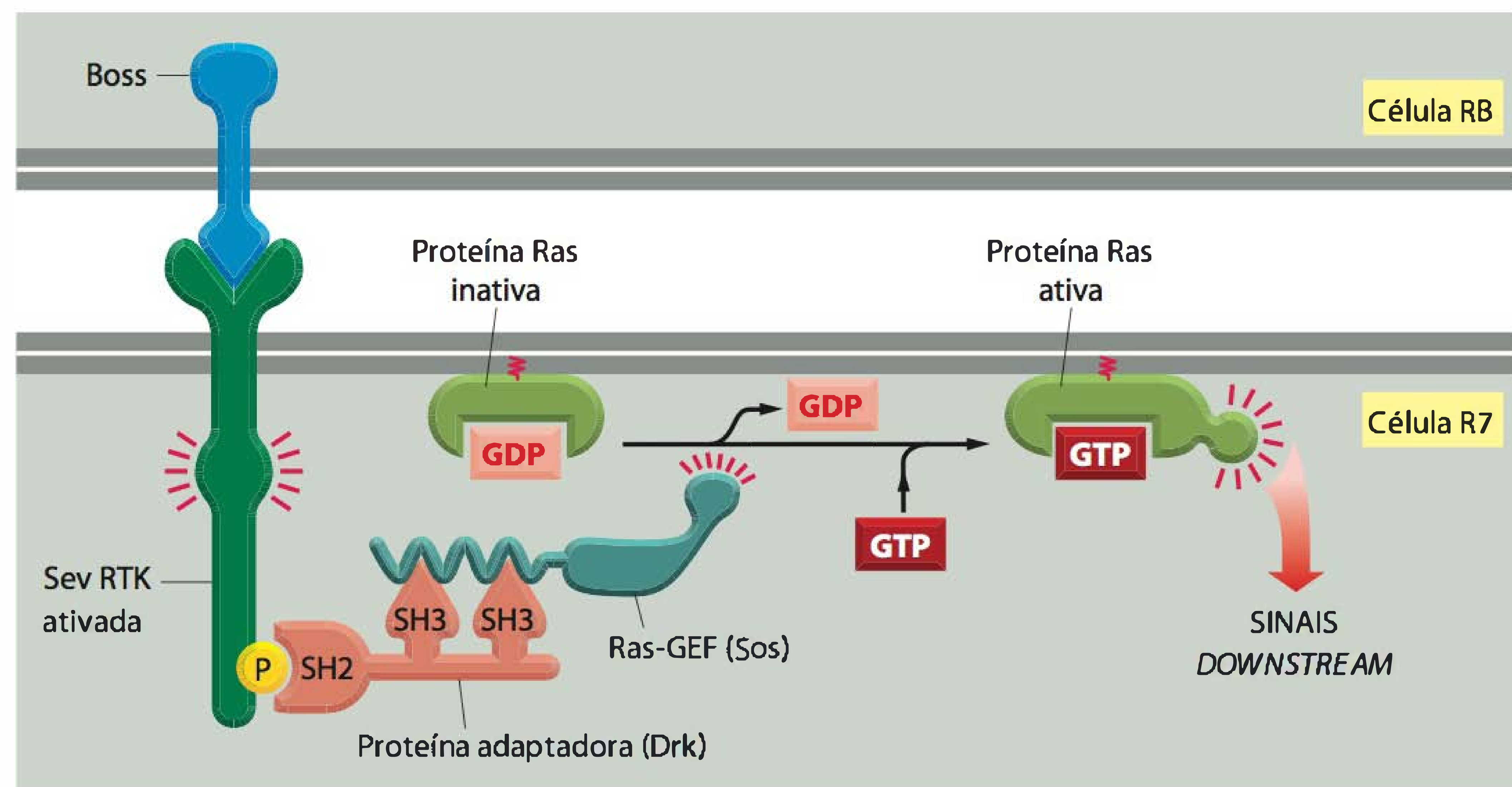


Figura 15-58 Como a Sev RTK ativa Ras no olho da mosca. A ativação de Sev na superfície da célula precursora de R7 pela proteína Boss na superfície de R8 ativa a Ras-GEF Sos via proteína adaptadora Drk. Esta reconhece uma tirosina fosforilada específica na proteína Sev, por meio de um domínio SH2, e interage com Sos por meio de dois domínios SH3. Sos estimula a Ras inativa a substituir seu GDP por um GTP, o que a ativa e a faz liberar o sinal *downstream*, induzindo a diferenciação da célula precursora de R7 em um fotorreceptor sensor de raios ultravioleta.

Os componentes das vias de sinalização intracelular ativados por Sev na célula precursora de R7 se mostraram mais difíceis de ser identificados do que o receptor ou seu ligante, porque as mutações que os inativam são letais. O problema foi solucionado fazendo-se uma triagem genética em moscas nas quais a proteína Sev era parcialmente inativa. Um dos genes identificados codifica uma proteína Ras. As moscas nas quais ambas as cópias do gene *Ras* estavam inativadas por mutação morriam, enquanto as moscas com somente uma das cópias inativada sobreviviam. Contudo, quando a mosca possui uma proteína Sev parcialmente inativa nos olhos em desenvolvimento, uma mutação inativante em uma cópia do gene *Ras* resulta em perda de R7. Além disso, se um dos genes *Ras* se torna operante por mutação, R7 se desenvolve mesmo nos mutantes nos quais ambos os genes *Sev* e *Boss* estiverem inativos. Esses resultados indicam que Ras atua depois de Sev e sua ativação nas células precursoras de R7 é necessária e suficiente para induzir a diferenciação de R7.

O segundo gene identificado nessas triagens genéticas é chamado de *Son-of-sevenless* (*Sos*). Ele codifica uma Ras-GEF, necessária à ativação de Ras pelo RTK Sev. Um terceiro gene (chamado de *Drk*) codifica uma proteína adaptadora, que acopla o Sev à proteína Sos; o domínio SH2 do adaptador Drk se liga à Sev ativada, enquanto seus dois domínios SH3 se ligam à Sos (**Figura 15-58**). Esse tipo de triagem, na qual os organismos com um componente da via genética parcialmente incapacitado são usados para identificar genes que codificam outras proteínas da via, tem sido utilizado atualmente, com grande sucesso, em outros estudos.

Estudos bioquímicos e de biologia celular têm mostrado que o acoplamento do RTK a Ras acontece por um mecanismo similar nas células de mamíferos, onde a proteína adaptadora se chama **Grb2,** e a Ras-GEF também é chamada de Sos (ver Figura 15-22). É interessante que, quando a Sos de mamífero ativa Ras, esta age retroativamente para estimular mais Sos, formando um circuito de retroalimentação positiva simples.

Os RTKs não são a única maneira de ativação de Ras. O Ca^{2+} e o diacilglicerol, por exemplo, ativam a Ras-GEF encontrada principalmente no cérebro; esta pode acoplar GPCRs com ativação de Ras.

Uma vez ativada, Ras ativa várias outras proteínas sinalizadoras para que o sinal seja transmitido ao longo de diferentes vias, como discutiremos a seguir.

Ras ativa um módulo de sinalização de MAP-cinase

Tanto as fosforilações das tirosinas como a ativação de Ras, desencadeada pelos RTKs ativados, têm curta duração (**Figura 15-59**). As *proteína-fosfatases específicas para tirosina* (discutidas mais tarde) revertem as fosforilações rapidamente, e as GAPs induzem a Ras ativada a se autoinativar pela hidrólise do GTP ligado que é convertido em GDP. Para estimular a proliferação ou a diferenciação celular, esses eventos sinalizadores de curta duração precisam ser convertidos em eventos de longa duração, que possam manter o sinal e transmiti-lo para o núcleo, onde irão alterar o padrão de transcrição gênica. Um dos mecanismos-chave utilizado para esse propósito é um sistema de proteínas chamado de *módulo proteína-cinase ativado por mitógenos* (**módulo MAP-cinase**, *mitogen-activated protein kinase module*) (**Fi-**

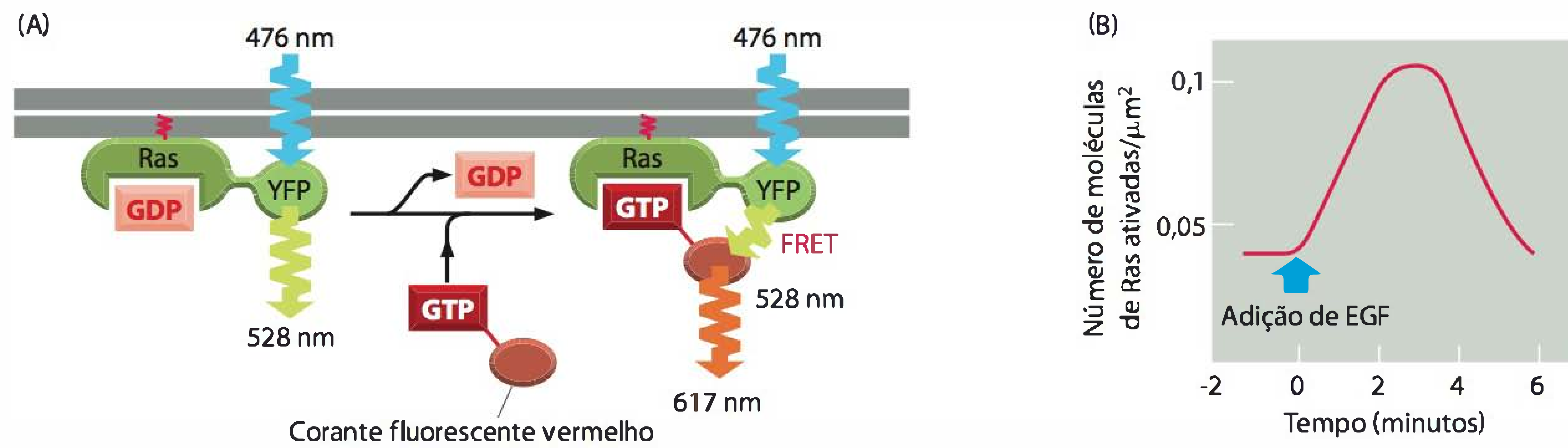


Figura 15-59 Ativação transiente de Ras, detectada por transferência de energia de ressonância fluorescente de molécula única (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*). (A) Desenho esquemático da estratégia experimental. Células de uma linhagem de câncer humano foram geneticamente modificadas para expressar uma proteína Ras ligada covalentemente a uma proteína fluorescente amarela (YFP, *yellow fluorescent protein*). GTP marcado com uma proteína fluorescente vermelha foi microinjetado em algumas células. As células foram então estimuladas com uma proteína sinalizadora extracelular, o fator de crescimento epidérmico (EGF), e as moléculas de Ras-YFP fluorescentes na superfície interna da membrana de células individuais foram seguidas por vídeo-microscopia de fluorescência. Quando a molécula Ras-YFP fluorescente é ativada, ela troca seu GDP não-marcado por GTP fluorescente; a luz amarelo-esverdeada emitida pela YFP ativa o GTP fluorescente que passa a emitir luz vermelha. Dessa forma, a ativação de moléculas individuais de Ras pode ser seguida pela emissão de luz vermelha, a partir de um ponto na membrana plasmática que emitia previamente fluorescência amarelo-esverdeada. Conforme mostrado em (B), as moléculas de Ras ativadas podem ser detectadas em 30 segundos após a estimulação com EGF. O sinal vermelho atinge o máximo em 3 a 4 minutos e decresce, atingindo a linha basal em 6 minutos. Uma vez que a Ras-GAP é recrutada para os mesmos pontos que Ras na membrana plasmática, presume-se que sua participação seja fundamental na supressão rápida do sinal fluorescente da proteína. (Modificada de H. Murakoshi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7317-7322, 2004. Com permissão da National Academy of Sciences.)

gura 15-60). Os três componentes deste sistema reunidos formam um módulo funcional de sinalização altamente conservado, desde leveduras até humanos, e que é utilizado, com variações, em muitos contextos diferentes de sinalização.

Todos os três componentes são proteína-cinases. A última da série é chamada simplesmente de MAP-cinase (MAPK). A penúltima é a MAP-cinase-cinase (MAPKK): ela fosforila a MAP-cinase e, dessa forma, a ativa. A seguinte é a MAP-cinase-cinase-cinase (MAPKKK), que recebe um sinal de ativação diretamente da Ras. Ela fosforila e ativa a MAPKK. Na **via de sinalização da Ras-MAP-cinase** nos mamíferos estas três cinases são conhecidas por nomes mais curtos: Raf (= MAPKKK), Mek (= MAPKK) e Erk (= MAPK).

A MAP-cinase, quando ativada, transmite o sinal pela fosforilação de várias proteínas na célula, entre elas proteínas reguladoras de genes e outras proteína-cinases (ver Figura 15-60). A Erk MAP-cinase, por exemplo, entra no núcleo e fosforila um ou mais componentes de um complexo regulador de genes. Isso ativa a transcrição de um grupo de *genes preco-*

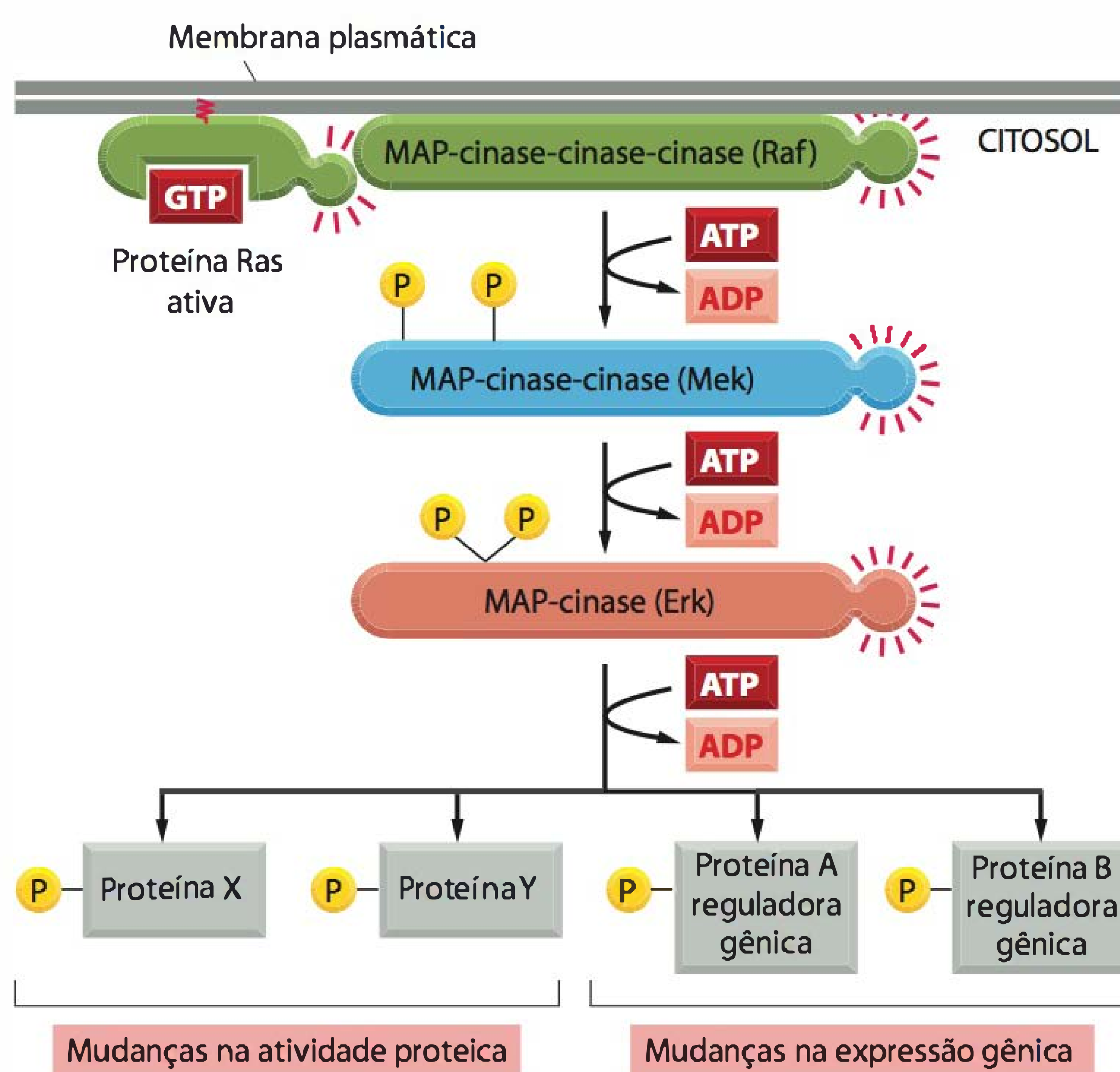


Figura 15-60 Módulo de fosforilação da serinatreonina-MAP-cinase ativado por Ras. O módulo de três componentes inicia com a MAP-cinase-cinase--cinase, chamada de *Raf*. A Ras recruta a Raf para a membrana plasmática e ajuda na sua ativação. A Raf então ativa a MAP-cinase-cinase *Mek*, que, por sua vez, ativa a MAP-cinase *Erk*. Esta fosforila várias proteínas, incluindo outras cinases, bem como proteínas nucleares reguladoras de genes. As mudanças resultantes na expressão gênica e na atividade proteica causam alterações complexas no comportamento celular.

ces imediatos, assim denominados porque são ativados poucos minutos após a recepção de um sinal extracelular por um receptor proteína-cinase, mesmo que a síntese proteica tenha sido experimentalmente bloqueada com fármacos. Alguns desses genes codificam outras proteínas reguladoras de genes que ativam outros genes, em um processo que necessita de síntese proteica e de mais tempo. Essa relação entre os genes precoces imediatos e os tardios é semelhante à existente entre os genes de resposta primária e secundária ativados pelos receptores nucleares discutidos anteriormente – ver Figura 15-15).

Dessa forma, a via de sinalização da Ras-MAP-cinase transporta sinais desde a superfície celular até o núcleo e altera o padrão de expressão gênica. Entre os genes ativados dessa forma estão aqueles necessários à proliferação celular, como os que codificam as *ciclinas* G_1 (apresentadas no Capítulo 17).

As MAP-cinases são, de modo geral, ativadas transitoriamente, em resposta aos sinais extracelulares, e o período de tempo em que permanecem ativas influencia profundamente a natureza da resposta. Em uma linhagem celular precursora neural, por exemplo, quando o EGF ativa seus receptores, a atividade da Erk MAP-cinase alcança um pico em cinco minutos, decaindo rapidamente, e as células, mais tarde, entram em divisão. Em contraste, quando o NGF ativa seus receptores nas mesmas células, a atividade da Erk permanece alta por muitas horas, e as células param de proliferar e se diferenciam em neurônios. Muitos fatores podem influenciar a duração da resposta, inclusive circuitos de retroalimentação positiva e negativa (ver Figura 15-28).

As MAP-cinases participam de circuitos de retroalimentação tanto positiva como negativa, que se combinam para dar respostas graduais ou do tipo comutador, breves ou permanentes. No exemplo ilustrado anteriormente, na Figura 15-24, a MAP-cinase ativa um circuito de retroalimentação positiva complexo para produzir uma resposta tudo-ou-nada irreversível quando a maturação dos oócitos de sapo é estimulada por uma breve exposição à molécula-sinal extracelular progesterona. Em muitas células, a MAP-cinase ativa um circuito de retroalimentação negativa pelo aumento da concentração de uma *fosfatase com dupla especificidade*, que remove os fosfatos das tirosinas e das treoninas e inativa a cinase (que é fosforilada pela MAPKK). O aumento da fosfatase é resultado tanto de um aumento na transcrição do gene da enzima como da estabilização desta contra a degradação. Na via Ras-MAP-cinase mostrada na Figura 15-61, a Erk também fosforila e ativa a Raf, provendo outro circuito de retroalimentação negativa que ajuda na inativação do módulo da MAP-cinase.

Proteínas de suporte ajudam a prevenir a intercomunicação entre módulos paralelos de MAP-cinases

Os módulos de sinalização de três componentes da MAP-cinase ocorrem em todas as células eucarióticas, com módulos diferentes mediando respostas diferentes em uma mesma célula. Nas leveduras, por exemplo, um módulo medeia a resposta ao feromônio do acasalamento, enquanto outro medeia a resposta ao jejum, e um terceiro, a resposta ao choque osmótico. Alguns desses módulos usam uma ou mais de uma cinase do mesmo tipo, conseguindo mesmo assim ativar diferentes proteínas efetoras e desencadeando, consequentemente, respostas diferentes. Conforme discutido anteriormente, uma maneira pela qual as células evitam intercomunicação entre as diferentes vias de sinalização paralelas para garantir respostas específicas é pelo uso de proteínas de suporte (ver Figura 15-21A). Nas células das leveduras, estes suportes ligam algumas ou todas as cinases de um módulo para formar um complexo e assim ajudam a garantir a especificidade da resposta (**Figura 15-61**).

As células de mamíferos também usam essa estratégia para evitar intercomunicação entre as vias de sinalização das MAP-cinases. Nestas células existem, pelo menos, cinco módulos de MAP-cinase paralelos. Esses módulos são formados por, pelo menos, 12 MAP-cinases, 7 MAP-cinase-cinases e 7 MAP-cinase-cinase-cinases. Dois deles (terminando nas MAP-cinases chamadas de JNK e p38) são ativados por diferentes tipos de estresse celular, como irradiação UV, choque térmico, estresse osmótico e estimulação por citocinas inflamatórias; outros medeiam principalmente respostas a sinais de outras células.

Embora a estratégia de suporte determine precisão e evite intercomunicação entre as vias, ela reduz as possibilidades de amplificação e de disseminação do sinal para diferentes partes da célula que exigem que, pelo menos, alguns dos componentes sejam difusíveis (ver Figura 15-17). Não está claro se os componentes individuais dos módulos de MAP-cinases se

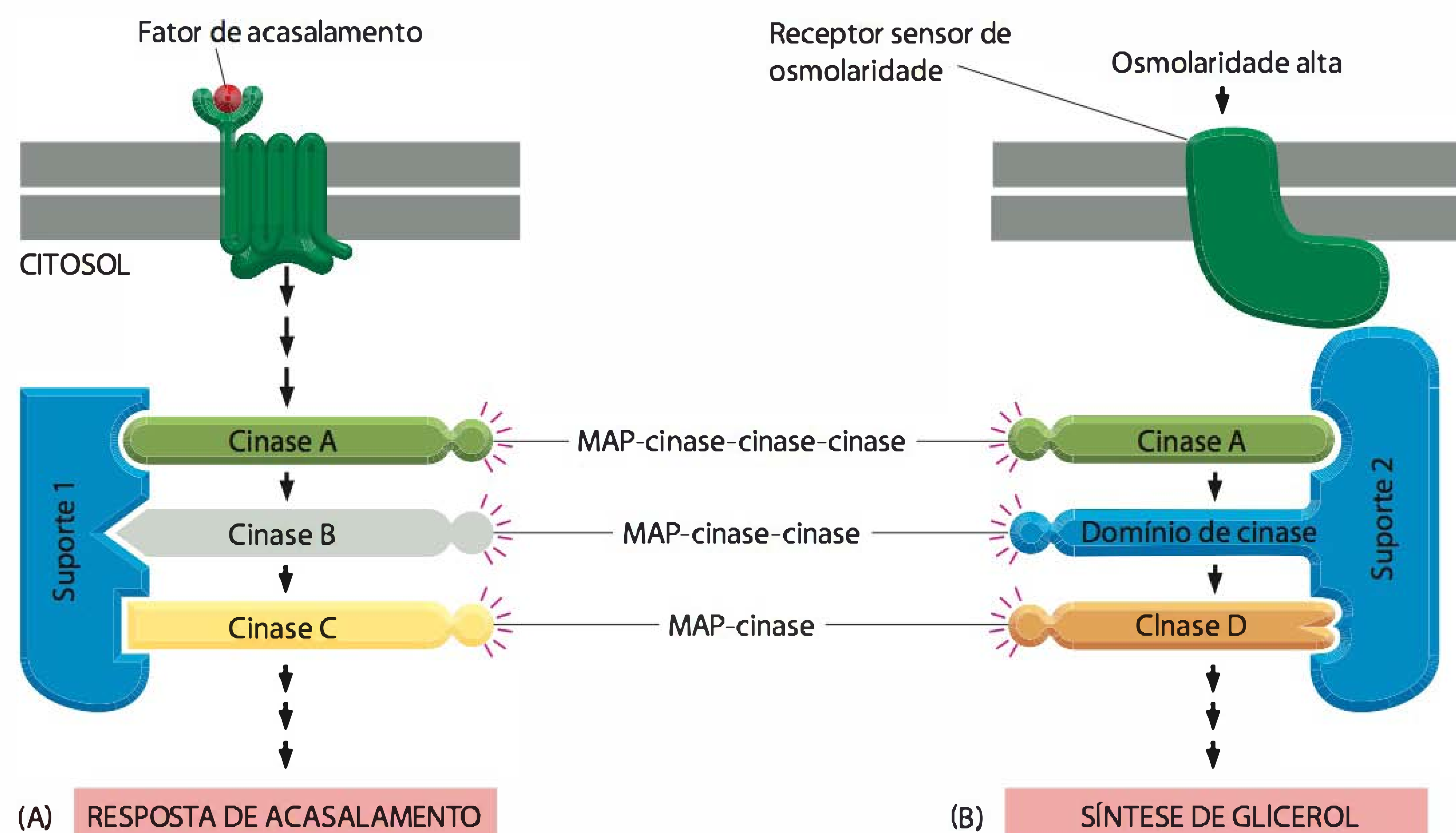


Figura 15-61 Organização dos dois módulos MAP-cinase envolvendo proteínas de suporte em leveduras de brotamento. As leveduras possuem, pelo menos, seis módulos de MAP-cinase de três componentes envolvidos em vários processos biológicos, incluindo as duas respostas exemplificadas aqui – a resposta de acasalamento e a resposta à osmolaridade alta. (A) A resposta de acasalamento é desencadeada quando um fator de acasalamento, secretado pela levedura de tipo oposto, se liga a um GPCR, ativando a proteína G. Como consequência, o complexo βγ ativa indiretamente a MAP-cinase-cinase-cinase (cinase A), que transmite adiante a resposta. A MAP-cinase (cinase C) ativada fosforila várias proteínas que medeiam a resposta de acasalamento, ativando-as. A levedura então para de se dividir e se prepara para a fusão. As três cinases desse módulo estão ligadas à proteína de suporte 1. (B) Na segunda resposta, uma levedura exposta a um meio hiperosmótico é induzida a sintetizar glicerol para aumentar sua osmolaridade interna. Essa resposta é mediada por um osmorreceptor transmembrana e por um módulo de MAP-cinase diferente ligado a uma segunda proteína de suporte. (Note que o domínio de cinase da proteína de suporte 2 possui a atividade de MAP-cinase-cinase desse módulo.) Embora ambas as vias utilizem a mesma MAP-cinase-cinase-cinase (cinase A, em *verde*), não existe cruzamento entre elas, porque as cinases estão firmemente ligadas a diferentes proteínas de suporte, e o sensor osmótico está ligado à mesma proteína de suporte que a cinase ativada por ele.

A proteína de suporte 1 é capaz de funcionar mesmo se for desprovida (por engenharia genética) de qualquer capacidade de alinhar ou regular alostericamente suas três cinases. Sua função, aparentemente, é somente de aproximar as cinases, e, por meio disso, aumentar a taxa de encontro entre elas, conforme esperado para acelerações na velocidade da reação causadas pela reunião firme das proteínas.

dissociam do suporte durante o processo de ativação para permitir a amplificação, e este é o motivo pelo qual nos referimos a eles como módulos e não cascatas.

A família das Rho-GTPases acoplam funcionalmente os receptores de superfície celular ao citoesqueleto

A outra classe das GTPases da superfamília Ras que transmite sinais de receptores de superfície, além das proteínas Ras, é a grande **família Rho** (ver Tabela 15-5). As GTPases monoméricas da família Rho regulam o citoesqueleto de actina e os microtúbulos, controlando a forma da célula, a polaridade, a motilidade e a adesão (discutido no Capítulo 16); elas também regulam a progressão no ciclo celular, a transcrição gênica e o transporte de membrana. Elas têm uma atuação-chave na orientação da migração celular e no crescimento do axônio, mediando respostas citoesqueléticas à ativação de uma classe especial de receptores de orientação. Aqui focaremos neste aspecto da função da família Rho.

Os três membros da família Rho melhor caracterizados são a própria **Rho,** a **Rac** e a **Cdc42,** e todas afetam múltiplas proteínas-alvo. Da mesma forma que para a Ras, os GEFs ativam e as GAPs inativam as GTPases da família Rho; existem mais de 60 Rho-GEFs e mais de 70 Rho-GAPs em humanos. Algumas são específicas para algum membro em especial da família, enquanto outras são menos específicas. Ao contrário de Ras, que está associada à membrana mesmo na forma inativa (com GDP ligado), as GTPases da família Rho inativas estão ligadas a *inibidores de dissociação de nucleotídeos de guanina* (*GDIs, guanine nucleotide dissociation inhibitors*) no citosol, que impedem a interação das GTPases com suas Rho-GEFs na membrana plasmática.

Embora os receptores de superfície ativem a Rho-GTPase pela ativação das Rho-GEFs, não se sabe, na maioria dos casos, como o receptor ativa seu GEF. Uma das exceções é o RTK *Eph* (ver Figura 15-52) na superfície dos neurônios motores que ajudam a orientar o *cone de crescimento* do axônio para seu músculo-alvo. A ligação de uma proteína e*frina* de superfície celular ativa o receptor Eph, causando o colapso dos cones de crescimento, repelindo-os, assim, de regiões inapropriadas e mantendo-os no caminho certo. A resposta depende de uma Rho-GEF chamada de *efexina*, associada de modo estável à cauda citosólica do receptor Eph. Quando a ligação da efexina ativa o receptor, este ativa uma tirosina-cinase citoplasmática que fosforila uma tirosina da efexina, intensificando a capacidade da efexina de ativar a proteína RhoA. Esta proteína ativada (RhoA-GTP) regula então *downstream* várias proteínas-alvo, inclusive algumas proteínas efetoras que controlam o citoesqueleto de actina, causando o colapso do cone de crescimento (**Figura 15-62**).

As efrinas estão entre as *proteínas de orientação* extracelulares melhor caracterizadas, com muitas funções, tanto no sistema nervoso como fora dele. Um dos seus papéis, por exemplo, consiste em direcionar o caminho pelo qual os axônios crescem desde o olho até o *tectum* óptico de modo a criar, no cérebro, um "mapa" neural do campo visual (discutido no Capítulo 22). Contudo, a orientação do prolongamento do axônio é um assunto complexo, e

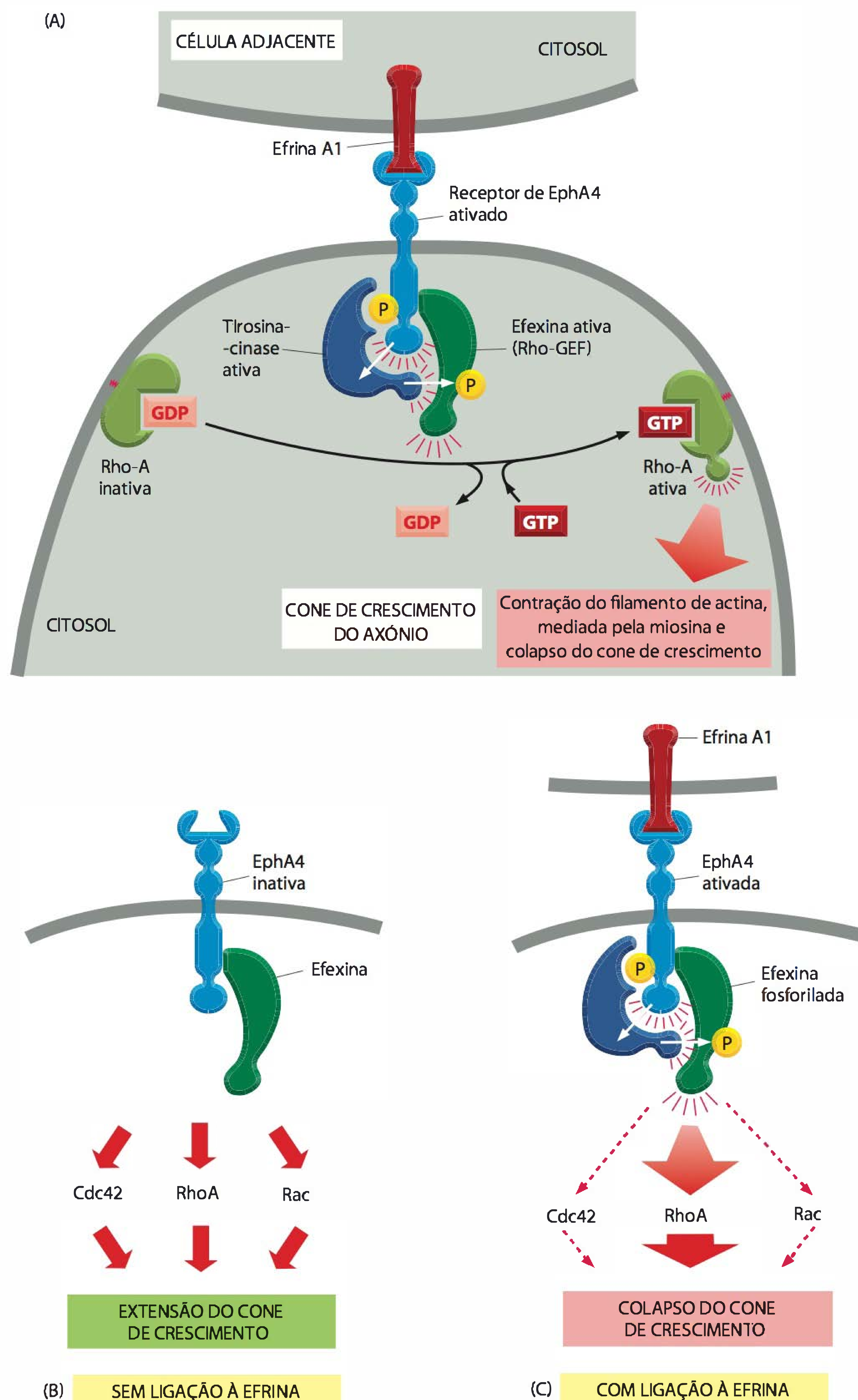


Figura 15-62 Colapso do cone de crescimento mediado pelas GTPases da família Rho. (A) A ligação da proteína transmembrana efrina A1 a uma célula adjacente ativa os RTKs EphA4 no cone de crescimento de um axônio, pelo mecanismo desenhado na Figura 15-53A. As fosfotirosinas dos receptores Eph ativados recrutam e ativam uma tirosina-cinase citoplasmática para fosforilar uma tirosina da efexina Rho-GEF associada ao receptor. Isso aumenta a capacidade da efexina de ativar a RhoA. Esta, então, induz o colapso do cone de crescimento por estimular a contração do citoesqueleto de actina dependente de miosina. (B) Quando a efrina A1 não está ligada ao receptor EphA4, a efexina ativa três membros diferentes da família Rho (Cdc42, Rac e RhoA) com a mesma intensidade, promovendo o avanço do cone de crescimento para a frente. (C) A ligação da efrina A1 ao EphA4 altera a atividade da efexina, de modo que ela agora ativa preferencialmente RhoA, causando o colapso do cone de crescimento.

estão envolvidos outros tipos de receptores de orientação, conforme discutido no Capítulo 22. Acredita-se, contudo, que todos esses receptores orientem o movimento celular por interferirem no citoesqueleto, via membros da família Rho.

Após as considerações sobre como os RTKs usam os GEFs e os GTPases monoméricas para transmitir sinais para o interior da célula, consideraremos agora uma segunda e importante estratégia usada por esses receptores que depende de um mecanismo de transmissão intracelular completamente diferente.

A PI 3-cinase produz sítios lipídicos de ancoragem na membrana plasmática

Conforme mencionado anteriormente, uma das proteínas que se ligam à cauda intracelular das moléculas dos RTKs é a enzima **fosfoinositídeo 3-cinase (PI 3-cinase)**, ligada à

membrana plasmática. Esta cinase fosforila principalmente fosfolipídeos de inositol, sendo ativada tanto por RTKs como por GPCRs. Ela tem uma função central na promoção da sobrevivência celular e no crescimento.

O *fosfatidilinositol* (*PI*) é exclusivo entre os lipídeos de membrana, porque pode ser fosforilado reversivelmente em múltiplos sítios, gerando uma grande variedade de diferentes fosfolipídeos de inositol, chamados de **fosfoinositídeos** (ver Figura 15-37). A PI 3-cinase, quando ativada, catalisa a fosforilação na posição 3 do anel do inositol, gerando vários fosfoinositídeos (**Figura 15-63**). A produção de PI(3,4,5)P_3 é a mais importante porque ele pode servir de sítio de ancoragem para várias proteínas de sinalização intracelular, que se organizam em complexos de sinalização que transmitem o sinal para dentro da célula a partir da face citosólica da membrana plasmática (ver Figura 15-21C).

Perceba a diferença entre essa função dos fosfoinositídeos e aquela que já foi descrita, na qual o PI(3,4)P_2 era hidrolisado pela PLCβ (no caso de GPCRs) ou pela PLCγ (no caso dos RTKs), gerando IP_3 solúvel e diacilglicerol ligado à membrana (ver Figuras 15-38 e 15-39). Em contraste, o PI(3,4,5)P_3 não é clivado pela PLC. Ele é formado a partir de PI(4,5)P_2 e permanece na membrana plasmática até ser desfosforilado por *fosfatases de fosfoinositídeos* específicas. Uma destas é a fosfatase *PTEN*, que desfosforila a posição 3 do anel inositol. Mutações na PTEN são encontradas em muitos tipos de cânceres: elas promovem crescimento celular descontrolado porque prolongam a sinalização pela PI 3-cinase.

Existem vários tipos de PI 3-cinases. As ativadas por RTKs e GPCRs pertencem à classe I. São heterodímeros formados por uma subunidade catalítica comum e subunidades reguladoras diferentes. Os RTKs ativam as *PI3-cinases de classe Ia,* nas quais a subunidade reguladora é uma proteína adaptadora que se liga, por meio de seus dois domínios SH2, a duas fosfotirosinas dos receptores ativados (ver Figura 15-55A). Os GPCRs ativam as *PI3-cinases de classe Ib*, as quais possuem uma subunidade reguladora que se liga ao complexo βγ de uma proteína G triméricaativada quando os GPCRs são ativados por seus ligantes extracelulares. A ligação direta de uma Ras ativada também pode ativar a subunidade catalítica comum de classe I.

As proteínas sinalizadoras intracelulares se ligam ao PI(3,4,5)P_3 produzido pela PI 3-cinase ativa, por meio de um domínio de interação específico, tal como o **domínio de homologia com plequistrina (PH)** mencionado anteriormente, identificado pela primeira vez na proteína plaquetária plequistrina. Os domínios PH atuam principalmente como domínios de interação proteína-proteína, e somente um pequeno subgrupo dele se liga a PIP_3; pelo menos alguns deles também reconhecem uma proteína específica de membrana além de PIP_3, que aumenta bastante a especificidade da ligação e ajuda a explicar por que nem todas as proteínas sinalizadoras com domínios PH de ligação a PIP_3 ancoram nos sítios de PI(3,4,5)

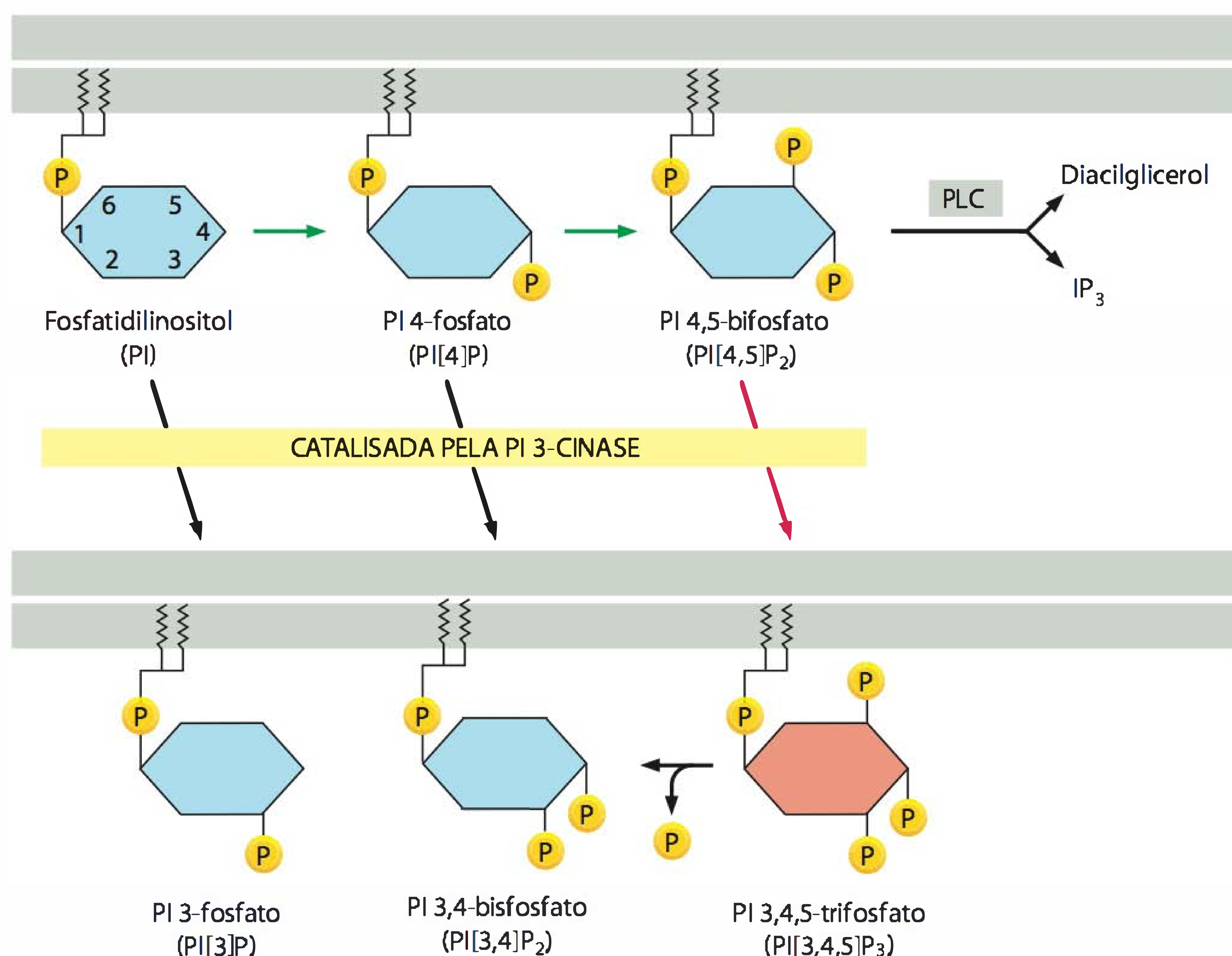


Figura 15-63 Geração de sítios de ancoragem de fosfoinositídeos pela PI 3-cinase. A PI 3-cinase fosforila o carbono 3 do anel do inositol gerando fosfoinositídeos, mostrados na parte inferior da figura (desviando-os da via que produz IP_3 e diacilglicerol). A fosforilação mais importante (indicada em *vermelho*) é a do PI(4,5)P_2 para PI(3,4,5)P_3, que serve como sítio de ancoragem para proteínas sinalizadoras com domínios PH de ligação a PIP_3. As fosforilações indicadas pelas *flechas verdes* são catalisadas por outras cinases de fosfolipídeos de inositol.

P_3. Os domínios PH são encontrados em aproximadamente 200 proteínas humanas, entre elas a Ras-GEF Sos apresentada anteriormente (ver Figura 15-22).

Uma proteína especialmente importante que contém domínio PH é a serinatreonina-cinase *Akt*. A *via de sinalização PI 3-cinase-Akt* é a principal via ativada pelo hormônio *insulina*. Ela também tem uma função-chave na promoção da sobrevivência e no crescimento de muitos tipos celulares, tanto nos invertebrados como nos vertebrados, como veremos a seguir.

A via de sinalização PI 3-cinase-Akt estimula a sobrevivência e o crescimento celular

Para que um organismo multicelular cresça, suas células devem crescer (acumular massa e aumentar de tamanho). Se as células simplesmente se dividirem sem crescimento, elas ficarão progressivamente menores, e o organismo como um todo permanecerá do mesmo tamanho. Sinais extracelulares são requeridos para que as células cresçam e se dividam, além de sobreviverem, conforme discutido anteriormente (ver Figura 15-8). Os membros da família dos *fatores de crescimento semelhantes à insulina* (*IGFs*) de proteínas-sinal, por exemplo, estimulam o crescimento e a sobrevivência de muitos tipos de células animais. Eles se ligam a RTKs (ver Figura 15-52), os quais ativam a PI 3-cinase para que produza PI(3,4,5)P_3. O PIP_3 recruta duas proteína-cinases para a membrana plasmática via domínios PH – **Akt** (também chamada de *proteína-cinase B*, ou *PKB*) *e a proteína-cinase 1 dependente de fosfoinositídeos* (*PDK1, phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), e isto leva à ativação de Akt (**Figura 15-64**). Após ativada, ela fosforila várias proteínas-alvo na membrana plasmática, bem como no citosol e no núcleo. O efeito observado na maioria dos alvos conhecidos é a inativação; mas os alvos são tais que todas as ações da Akt cooperam para o aumento da sobrevivência e do crescimento.

Por exemplo, um efeito da Akt é a fosforilação de uma proteína citosólica chamada de *Bad*, a qual, em seu estado não-fosforilado, provoca a morte celular por apoptose (discutido no Capítulo 18). A fosforilação da Bad cria sítios de ligação à fosfosserina em uma proteína de suporte chamada de *14-3-3*, a qual sequestra a Bad fosforilada e a mantém fora de ação, promovendo, assim, a sobrevivência celular (ver Figura 15-64).

A **via da PI 3-cinase-Akt** sinaliza para o crescimento das células por meio de um mecanismo mais complexo, que depende de uma grande serinatreonina-cinase chamada de **TOR** (alvo da rapamicina, de *target of rapamycin*), uma toxina bacteriana que inativa a cinase e é utilizada clinicamente como fármaco imunossupressor e anticâncer). A TOR foi identificada originalmente nas triagens genéticas de resistência à rapamicina em leveduras; nas células de mamíferos, é denominada **mTOR**. Essa proteína existe nas células em dois complexos

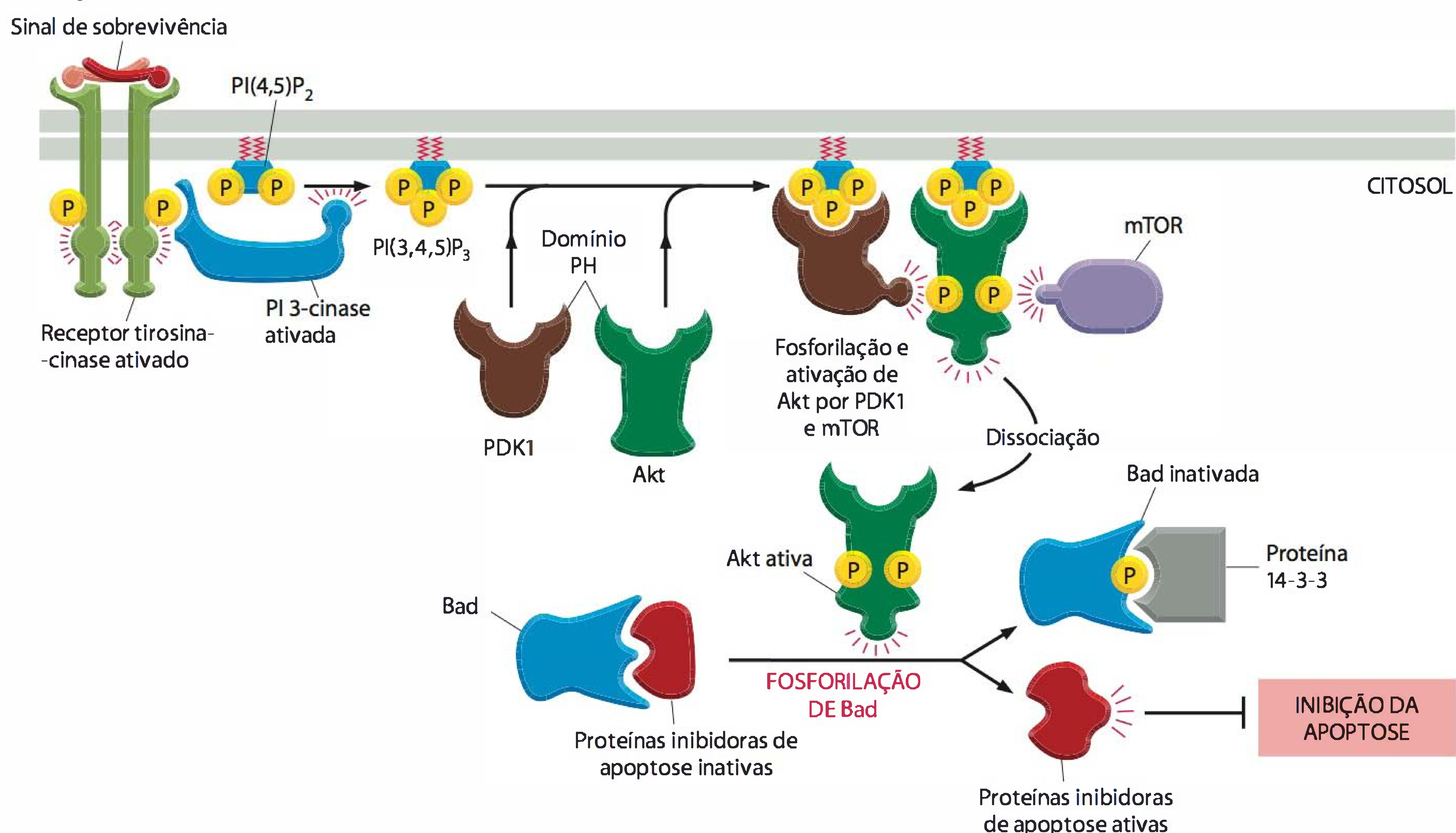


Figura 15-64 Uma **das maneiras pelas quais a sinalização por meio da PI 3-cinase promove a sobrevivência celular.** Um sinal extracelular de sobrevivência ativa um RTK, que recruta e ativa uma PI 3-cinase. Esta produz PI(3,4,5)P_3, que serve como sítio de ancoragem para duas serinatreonina-cinases com domínios PH – Akt e a cinase dependente de fosfatidilinositol PDK1 – que se posiciona próximo à membrana. Uma terceira cinase (usualmente mTOR) fosforila Akt, alterando sua conformação, de forma que ela pode ser fosforilada, em uma treonina, pela PDK1, o que a ativa. A Akt ativada se dissocia da membrana plasmática e fosforila várias proteínas-alvo, entre as quais a proteína Bad.

No estado não-fosforilado, Bad mantém uma ou mais proteínas apoptóticas (da família Bcl2 – apresentadas no Capítulo 18) em estado inativo. No estado fosforilado, Bad libera as proteínas inibidoras que podem, agora, bloquear a apoptose e assim promover a sobrevivência celular. A Bad fosforilada torna-se inativa ao se ligar a uma proteína citosólica ubíqua chamada de *14-3-3*, o que a mantém fora de ação.

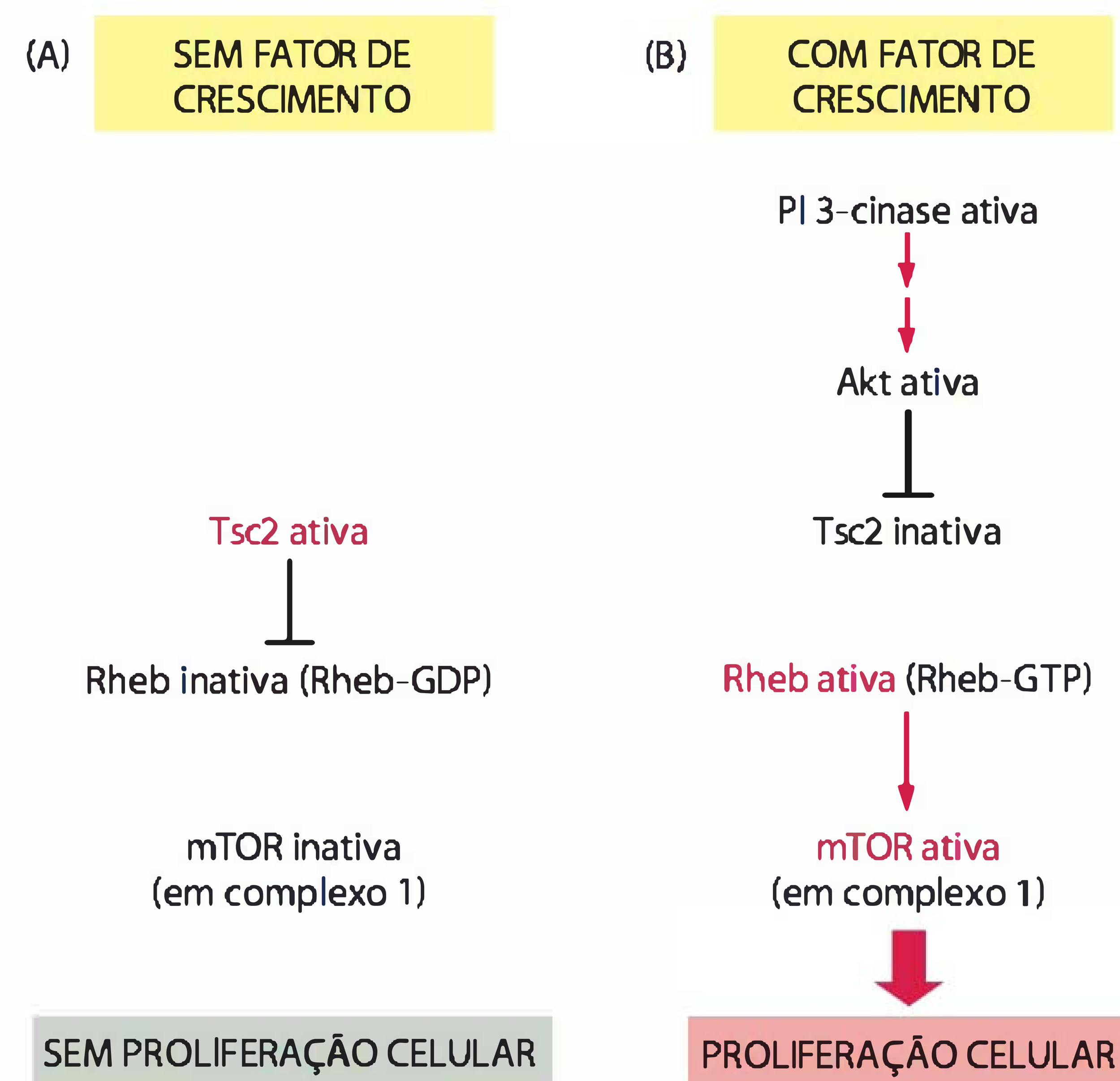


Figura 15-65 Ativação de mTOR pela via de sinalização PI 3-cinase-Akt. (A) Na ausência de fatores de crescimento extracelulares, Tsc2 (uma Rheb-GAP) mantém Rheb inativa; mTOR no complexo1 é inativo, e não há proliferação celular. (B) Na presença de fatores de crescimento, Akt ativada fosforila e inibe Tsc2, promovendo, assim, a ativação de Rheb. A Rheb ativada (Rheb-GTP) auxilia na ativação de mTOR no complexo 1, o qual, por sua vez, estimula a proliferação celular. A Figura 15-64 mostra como os fatores de crescimento (ou sinais de sobrevivência) ativam Akt.

A MAP-cinase Erk (ver Figura 15-60) também pode fosforilar e inibir Tsc2 e, dessa forma, ativar mTOR. Assim, as vias de sinalização da PI 3-cinase-Akt e da Ras-MAP-cinase convergem sobre mTOR em complexo 1, na estimulação da proliferação celular.

Tsc2 é abreviatura de *proteína 2 de esclerose tuberosa* (*tuberous sclerosis protein 2*) e é um componente do heterodímero formado por Tsc1 e Tsc2 (não-mostrado); estas proteínas têm esta denominação porque mutações em ambos os genes que as codificam causam a doença genética esclerose tuberosa, que está associada a tumores benignos no cérebro ou em outros locais que contenham células anormalmente grandes.

multiproteicos funcionalmente distintos. Nas células de mamíferos, o *complexo 1 mTOR* contém a proteína *raptor;* este complexo é sensível à rapamicina e estimula o crescimento celular – promovendo a produção dos ribossomos e a síntese proteica, além da inibição da degradação das proteínas. O complexo 1 também promove o crescimento e a sobrevivência celular pela estimulação do metabolismo e da captação de nutrientes. O *complexo 2 mTOR* contém a proteína *rictor* e é insensível à rapamicina. Ele ajuda na ativação da Akt (ver Figura 15-64) e regula o citoesqueleto de actina via GTPases da família Rho.

O mTOR no complexo 1 integra informações de várias fontes, inclusive de proteínas-sinal extracelulares conhecidas como *fatores de crescimento* e de nutrientes, como aminoácidos, ambos ajudando na ativação de mTOR e promovendo o crescimento celular. Os fatores de crescimento ativam mTOR principalmente por meio da via da PI 3-cinase-Akt. Esta ativa mTOR no complexo 1 indiretamente pela fosforilação e consequente inativação de uma GAP chamada de Tsc2. Esta age sobre uma GTPase monomérica relacionada com Ras, chamada de **Rheb** (ver Tabela 15-5). Rheb em sua forma ativada (Rheb-GTP) ativa mTOR. O resultado líquido é que Akt ativa mTOR e, dessa forma, promove o crescimento celular (**Figura 15-65**). No Capítulo 17, discutiremos como mTOR estimula a produção dos ribossomos e a síntese proteica (ver Figura 17-65).

As vias de sinalização ativadas pelos receptores tirosina-cinases e pelos receptores associados à proteína G se sobrepõem

Os RTKs e os GPCRs ativam algumas vias de sinalização intracelular comuns, conforme mencionado anteriormente. Ambos, por exemplo, podem ativar a via do fosfolipídeo de inositol desencadeada pela fosfolipase C. Além disso, mesmo quando ativam diferentes vias, estas convergem nas mesmas proteínas-alvo. A **Figura 15-66** ilustra esse tipo de sinalização sobreposta: a figura resume as cinco vias de sinalização intracelular paralelas discutidas até o momento – uma desencadeada pelos GPCRs, duas pelos RTKs e duas por ambos os tipos de receptores.

Os receptores associados a tirosina-cinases dependem de tirosina-cinases citoplasmáticas

Muitos receptores de superfície celular dependem da fosforilação de tirosinas para sua atividade, mas carecem de um domínio de tirosina-cinase conspícuo. Esses receptores agem por meio de **tirosina-cinases citoplasmáticas**, que estão associadas a eles e fosforilam várias proteínas-alvo, incluindo, frequentemente, os próprios receptores, quando estes interagem com seus ligantes. Estes **receptores associados a tirosina-cinases** funcionam de forma muito semelhante aos RTKs, exceto que seu domínio de cinase é codificado por um gene separado e está ligado à cadeia polipeptídica do receptor de forma não-covalente. Uma grande variedade de classes de receptores pertence à esta categoria, incluindo os receptores de antígenos e interleucinas nos linfócitos (apresentados no Capítulo 25), integrinas (apresentadas

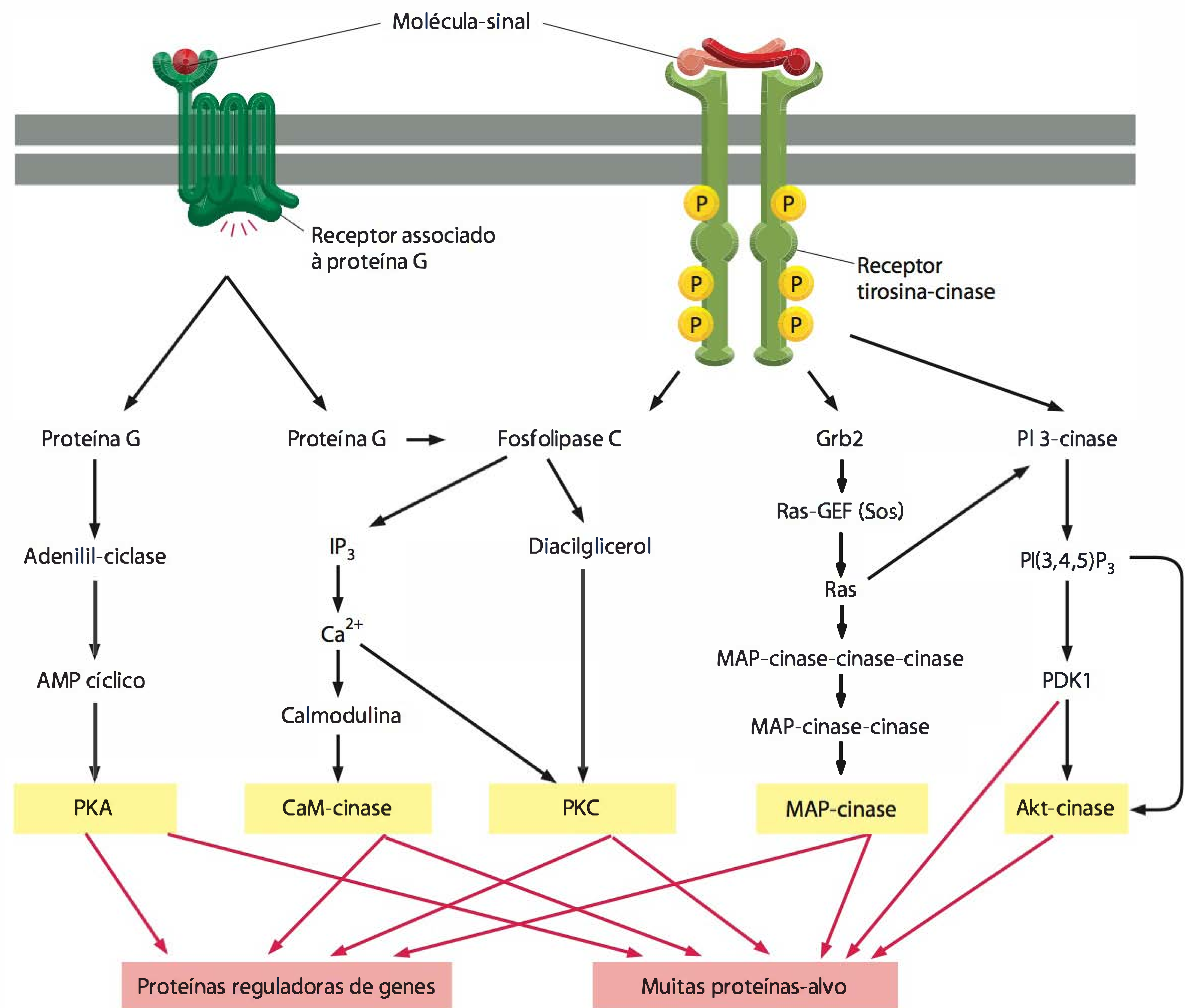


Figura 15-66 Cinco vias de sinalização intracelulares paralelas, ativadas por receptores associados à proteína G e/ou por receptores tirosina-cinases. Neste exemplo hipotético, as cinco cinases (marcadas em *amarelo*) fosforilam proteínas-alvo no final de cada via (marcadas em *vermelho*), muitas das quais são fosforiladas por mais de uma cinase. A fosfolipase C ativada pelos dois tipos de receptores é diferente: os GPCRs ativam a PLCβ, enquanto os RTKs ativam a PLCγ (não-mostrado). Embora não seja mostrado, alguns GPCRs também podem ativar Ras, mas o fazem independentemente de Grb2, via uma Ras-GEF que é ativada por Ca^{2+} e diacilglicerol.

no Capítulo 19) e receptores para várias citocinas e alguns hormônios. Tal qual os receptores associados a tirosina-cinases, muitos destes são dímeros pré-formados (**Figura 15-67**) ou dimerizam pela interação com o ligante.

Alguns desses receptores dependem de membros da maior família de tirosina-cinases citoplasmáticas dos mamíferos, a **família Src** (ver Figuras 3-10 e 3-69), os quais incluem *Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck e Blk*. Todas essas enzimas possuem domínios SH2 e SH3 e estão localizadas no lado citoplasmático da membrana plasmática, onde são fixadas parcialmente por interação com proteínas receptoras transmembrana e parcialmente por cadeias lipídicas covalentemente ligadas. Diferentes membros da família estão associados a receptores diferentes e fosforilam grupos de proteínas-alvo sobrepostos, mas distintos. Por exemplo, Lyn, Fyn e Lck estão associadas a diferentes grupos de receptores em linfócitos (apresentados no Capítulo 25). Em cada caso, a cinase é ativada quando uma proteína receptora apropriada interage com um ligante extracelular. A Src pode, assim como vários outros membros da família, ligar-se a RTKs ativados; nesses casos, o receptor e a cinase citoplasmática estimulam mutuamente suas atividades catalíticas, dessa forma fortalecendo e prolongando o sinal (ver Figura 15-62). Existem mesmo algumas proteínas G (G_s e G_i) que ativam Src, sendo este um dos caminhos pelos quais a ativação dos GPCRs pode levar à fosforilação de tirosinas de proteínas de sinalização intracelular e de proteínas efetoras.

Um outro tipo de tirosina-cinase citoplasmática se associa a *integrinas*, a principal família de receptores usados pelas células para se ligar à matriz extracelular (discutido no Capítulo 19). A ligação dos componentes da matriz às integrinas ativa vias de sinalização

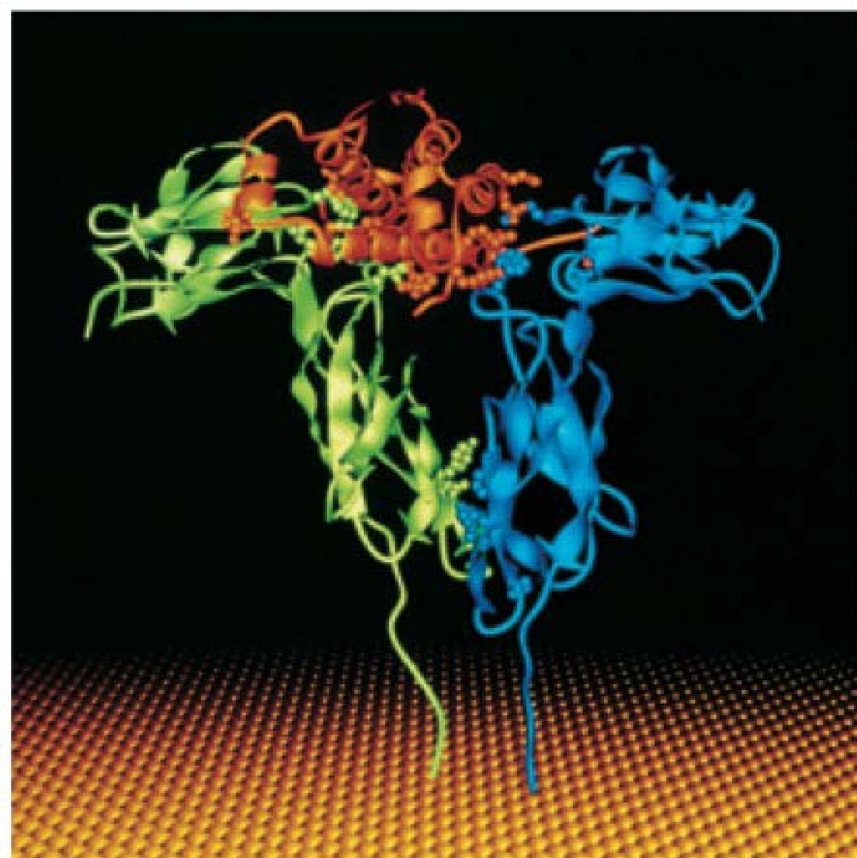


Figura 15-67 Estrutura tridimensional do hormônio de crescimento humano ligado ao seu receptor. O receptor é um homodímero e o hormônio (em *vermelho*) está ligado a duas subunidades idênticas (uma em *verde* e a outra em *azul*), as quais reconhecem diferentes partes do hormônio. Supõe-se que a ligação do hormônio cause um rearranjo das subunidades, o que ativa tirosina-cinases citoplasmáticas firmemente ligadas às caudas citosólicas dos receptores (não-mostrado). A estrutura aqui mostrada foi determinada por cristalografia por raios X de complexos entre o hormônio e os domínios extracelulares do receptor, produzidos pela tecnologia do DNA recombinante. (De A. M. deVos, M. Ultsch e A. A. Kossiakoff, *Science* 255:306-312, 1992. Com permissão de AAAS.)

intracelular que influenciam o comportamento da célula. Quando as integrinas se agrupam em sítios de contato na matriz, auxiliam no desencadeamento da montagem das junções célula-matriz, chamadas de *adesões focais*. Entre as muitas proteínas recrutadas para essas junções está a tirosina-cinase citoplasmática denominada **cinase de adesão focal** (**FAK**, *focal adhesion kinase*), que se liga à cauda citosólica de uma das subunidades da integrina com a ajuda de outras proteínas. As moléculas FAK agrupadas fosforilam umas às outras, criando sítios de ancoragem de fosfotirosinas, onde as Srcs se ligam. Src e FAK fosforilam, então, uma à outra, além de fosforilarem, outras proteínas que se agrupam na junção, inclusive muitas das proteínas sinalizadoras usadas pelos RTKs. Dessa forma, as duas cinases sinalizam à célula que ela está aderida a um substrato adequado onde pode sobreviver, crescer, se dividir, migrar, e assim por diante.

A maior e a mais diversificada classe de receptores que utilizam tirosina-cinases citoplasmáticas para transmitir sinais para o interior das células é a dos *receptores de citocinas*, apresentados a seguir.

Os receptores de citocinas ativam a via de sinalização JAK-STAT, promovendo um caminho rápido para o núcleo

A grande família dos **receptores de citocinas** inclui receptores para vários tipos de mediadores locais (coletivamente chamados de *citocinas*), bem como receptores para alguns hormônios, tais como o *hormônio do crescimento* (ver Figura 15-67) e a *prolactina*. Esses receptores estão associados, de forma estável, a uma classe de tirosina-cinases citoplasmáticas denominadas **Janus-cinases (JAKs)** (em homenagem ao deus romano de duas faces), que ativam proteínas reguladoras gênicas chamadas de **STATs** (transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição, *signal transducers and activators of transcription*). Estas proteínas localizam-se no citosol e são referidas como *proteínas reguladoras gênicas latentes* porque migram para o núcleo e regulam a transcrição gênica somente após serem ativadas.

Apesar de muitas vias de sinalização intracelular irem dos receptores de superfície para o núcleo, onde alteram a transcrição gênica (ver Figura 15-66), a **via de sinalização JAK-STAT** é uma das mais diretas. Os receptores de citocinas são dímeros ou trímeros e estão associados a uma ou duas das quatro JAKs conhecidas (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2). A ligação da citocina altera a organização, causando a aproximação de duas JAKs para que possam fazer transfosforilação, aumentando, assim, a atividade de seus domínios de tirosina-cinase. As JAKs então fosforilam as tirosinas dos receptores de citocinas, criando assim sítios para a ancoragem das STATs (ver **Figura 15-68**). Algumas proteínas adaptadoras podem também se ligar a alguns desses sítios e acoplar os receptores de citocinas à via de sinalização Ras-MAP-cinase, discutida anteriormente, mas estas proteínas não serão discutidas aqui.

São conhecidas, pelo menos, seis STATs nos mamíferos. Cada uma delas possui um domínio SH2 que realiza duas funções. A primeira consiste na mediação da ligação da proteína STAT a um sítio de ancoragem de fosfotirosina em um receptor de citocina ativado. Uma vez ligada, suas tirosinas são fosforiladas pelas JAKs, o que provoca sua dissociação do receptor. A segunda consiste na mediação, pelo domínio SH2 da STAT livre, da ligação desta a uma fosfotirosina de outra STAT, formando um homo ou um heterodímero de STAT. O dímero formado se desloca para o núcleo onde, em combinação com outras proteínas reguladoras gênicas, liga-se a um elemento específico de resposta ao DNA em vários genes e estimula a sua transcrição (ver Figura 15-68). Por exemplo, a STAT5 ativada estimula a transcrição de genes que codificam proteínas do leite, em esposta ao hormônio prolactina, o que estimula a produção de leite pelas células da mama. A **Tabela 15-6** relaciona algumas das mais de 30 citocinas e hormônios que ligam-se a receptores de citocinas e ativam a via JAK-STAT; a tabela mostra também as JAKs e as STATs específicas envolvidas.

Algumas STATs também possuem um domínio SH2, o que lhes permite ancorar em fosfotirosinas específicas de determinados RTKs ativados. Esses receptores podem ativar a STAT de maneira direta, independentemente das JAKs. O nematoide *C. elegans* usa STATs para sinalização, mas não sintetiza JAKs nem receptores de citocinas, o que sugere que as STATs tenham evoluído antes deles.

As respostas mediadas pelas STATs são reguladas por retroalimentação negativa. Além da ativação de genes que codificam proteínas que medeiam a resposta induzida pelas citocinas, os dímeros de STAT ativam também genes que codificam proteínas inibi-

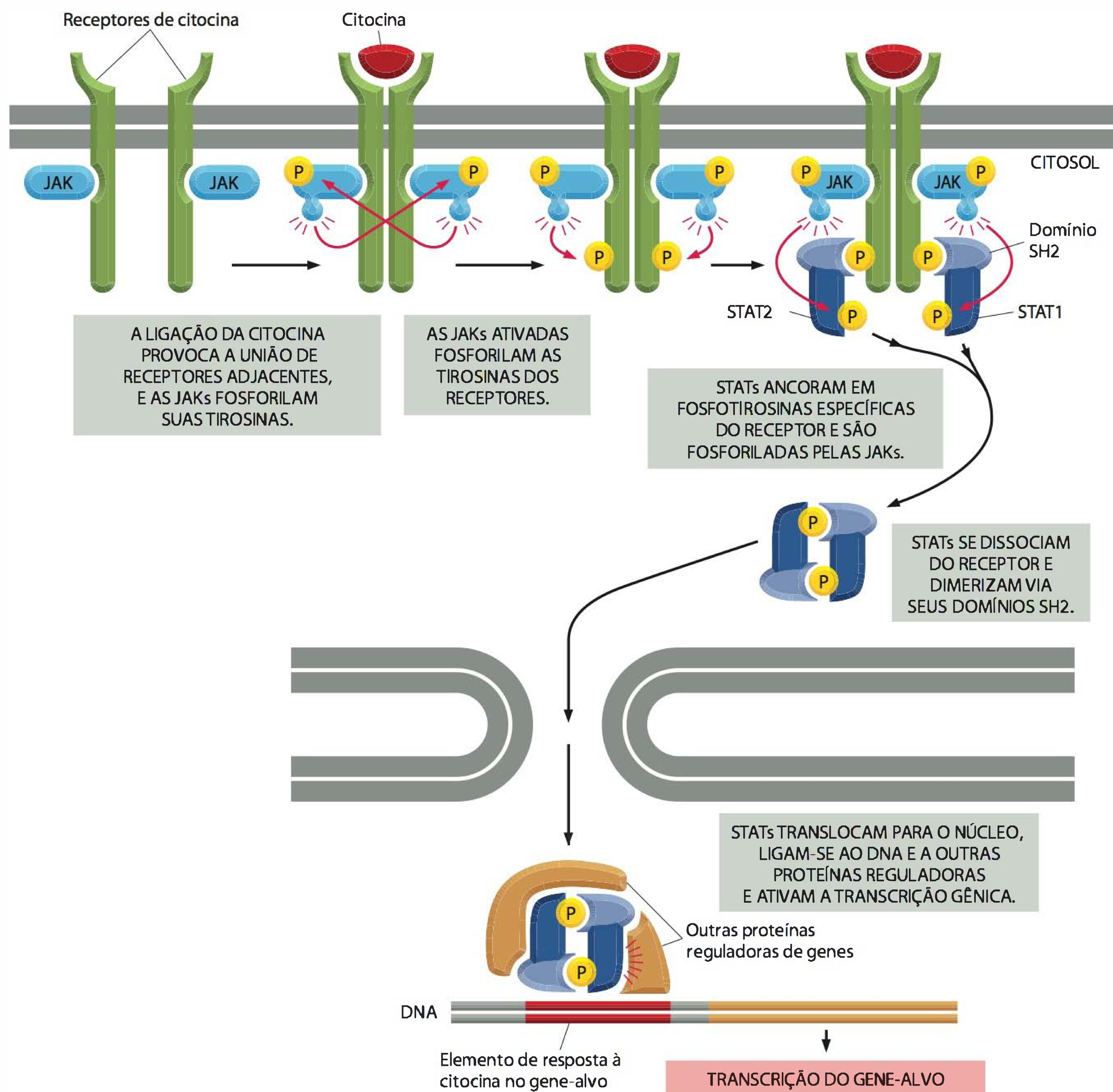


Figura 15-68 Via de sinalização Jak-STAT ativada pela citocina. A ligação da citocina causa a dimerização das duas cadeias polipeptídicas do receptor (conforme mostrado) ou reorienta as cadeias do receptor em um dímero pré-formado. Em ambos os casos, as JAKs são supostamente reunidas de forma que possam fosforilar umas às outras, iniciando o processo de sinalização. Em alguns casos, o receptor ativo é um trímero.

doras que ajudam na finalização da resposta. Algumas destas proteínas se ligam às JAKs fosforiladas, inativando-as, bem como os seus receptores associados; outras se ligam aos dímeros de STAT fosforilados e os impedem de se ligar aos seus DNAs-alvo. Contudo, somente estes mecanismos de retroalimentação negativa não são suficientes para finalizar a resposta. A inativação das JAKs e das STATs requer a desfosforilação de suas fosfotirosinas.

As tirosina-fosfatases revertem as fosforilações das tirosinas

Em todas as vias de sinalização que usam fosforilação de tirosinas, estas são revertidas por desfosforilações realizadas pelas **tirosina-fosfatases.** Estas enzimas são tão importantes nos processos de sinalização quanto as tirosina-cinases que adicionam os fosfatos. Enquanto existem somente poucos tipos de subunidades catalíticas de *proteína serinatreonina-fosfatases* responsáveis pela remoção de grupos fosfato de serinas e treoninas, existem cerca de 100 tirosina-fosfatases codificadas no genoma humano, inclusive algumas *fosfatases biespecíficas* que também desfosforilam serinas e treoninas.

Como as tirosina-cinases, as tirosina-fosfatases ocorrem nas formas citoplasmática e transmembrana, e nenhuma delas está relacionada estruturalmente às serinatreonina-fosfatases. Acredita-se que algumas delas, pelo menos, funcionem como receptores de superfície celular, mas como isso ainda não foi demonstrado, elas são denominadas tirosina-fosfatases similares a receptor.

Tabela 15-6 Algumas proteínas de sinalização extracelular que atuam por meio de receptores citocina e a via de sinalização JAK-STAT

Proteína de sinalização	JAKs associadas a receptores	Ativadas por STAS	Algumas respostas
Interferon γ	JAK1 e JAK2	STAT1	Ativa macrófagos
Interferon α	TYK2 e JAK2	STAT1 e STAT2	Aumenta resistência celular à infecção viral
Eritropoietina	JAK2	STAT5	Estimula a produção de eritrócitos
Prolactina	JAK1 e JAK2	STAT5	Estimula a produção de leite
Hormônio de crescimento	JAK 2	STAT1 e STAT5	Estimula o crescimento pela indução da produção de IGF1
GMCSF	JAK2	STAT5	Estimula a produção de granulócitos e macrófagos

Ao contrário das serinatreonina-fosfatases, que geralmente apresentam uma especificidade ampla, a maioria das tirosina-fosfatases exibe especificidade refinada por seus substratos, removendo grupos fosfato somente de fosfotirosinas de um determinado subgrupo de proteínas. Essas fosfatases asseguram que as fosforilações sejam de curta duração e que o nível de tirosinas fosforiladas seja muito baixo nas células em repouso. No entanto, elas não revertem simplesmente os efeitos das tirosina-cinases; elas estão programadas para agir somente na hora apropriada, em uma resposta sinalizadora, ou no ciclo de divisão celular (discutido no Capítulo 17).

Tendo discutido o papel crítico da fosforilação e da desfosforilação de tirosinas nas vias de sinalização intracelular ativadas por muitos receptores associados a enzimas, apresentaremos agora outra classe de receptores associados a enzimas que contam unicamente com a fosforilação de serinas e de treoninas. Esses *receptores de erinatreonina-cinases* ativam uma via de sinalização para o núcleo ainda mais direta do que a via JAK-STAT discutida anteriormente. Estas cinases fosforilam proteínas reguladoras gênicas latentes denominadas *Smads*, que migram para o núcleo e ativam a transcrição gênica.

As proteínas sinalizadoras da superfamília TGFβ atuam por meio de receptores serinatreonina-cinases e Smads

A **superfamília fator de crescimento e de transformação β** (**TGFβ**, *transforming growth factor*-β *superfamily*) consiste em um grande número (de 30 a 40 em humanos) de proteínas diméricas secretadas e estruturalmente relacionadas. Elas atuam como hormônios ou, mais frequentemente, como mediadores locais, regulando uma ampla gama de funções biológicas em todos os animais. Durante o desenvolvimento, elas regulam o padrão de formação e influenciam vários comportamentos celulares, como proliferação, diferenciação, produção de matriz extracelular e morte. Nos adultos, estão envolvidas com reparo de tecidos e regulação imune, assim como em muitos outros processos. A superfamília é composta pela família TGFβ/*ativina* e pela família maior *proteínas morfogênicas dos ossos* (*BMPs, bone morphogenetic proteins*).

Todas essas proteínas atuam por meio de receptores associados a enzimas que são proteínas transmembrana de passagem única, com um domínio serinatreonina-cinase na face citosólica da membrana plasmática. Existem duas classes desses **receptores serinatreonina-cinases** – *tipo I* e *tipo II* – que são homodímeros com estrutura semelhante. Os membros da superfamília TGFβ ligam-se aos receptores dímeros tipo I e tipo II quando em uma combinação característica, aproximando os domínios de cinase de forma que o receptor tipo II fosforila e ativa o receptor tipo I, formando um complexo receptor tetramérico ativo.

Quando ativado, o complexo receptor envia rapidamente o sinal para o núcleo, usando uma estratégia muito semelhante à utilizada pela JAK-STAT no caso dos receptores de citocinas. O receptor tipo I ativado se liga a uma proteína reguladora gênica latente da **família Smad** (denominação derivada dos primeiros membros da família identificados, Sma em *C. elegans* e Mad em *Drosophila*) e a fosforila. Os receptores TGFβ/ativina ativados fosforilam Smad2 ou Smad3, enquanto os receptores BMP ativados fosforilam Smad1, Smad5 ou Smad8. Uma vez que uma dessas *Smads ativadas por receptores* (*R-Smads*) tenha sido fosforilada, ela se dissocia do receptor e se liga à Smad4 (chamada de *co-Smad*), que pode formar um complexo com qualquer uma das cinco R-Smads. Esse complexo se desloca para

o núcleo, onde se associa a outras proteínas reguladoras gênicas e regula a transcrição de genes-alvo específicos (**Figura 15-69**). Os genes afetados variam porque as proteínas nucleares associadas variam dependendo do tipo celular e do estado da célula.

Os receptores TGFβ ativados e seus ligantes são internalizados por endocitose, por duas vias distintas, uma levando a mais ativação, e a outra levando à inativação. A via de ativação depende de vesículas recobertas de clatrina e conduz aos endossomos iniciais (discutido no Capítulo 13), onde ocorre a maior parte da ativação de Smad. Uma proteína de ancoragem chamada de SARA, (âncora de Smad para ativação do receptor, de *Smad anchor for receptor activation*) tem um papel importante nessa via; ela está concentrada nos endossomos iniciais e se liga tanto aos receptores TGFβ ativados quanto às Smads, aumentando a eficiência da fosforilação do receptor mediada pela Smad. A via de inativação depende de *cavéolas* (apresentadas no Capítulo 13) e conduz à ubiquitinação do receptor e degradação nos proteossomos.

Alguns membros da família TGFβ atuam como classificadores morfogênicos durante o desenvolvimento e, dependendo das suas concentrações, induzem respostas diferentes nas células (ver Figura 15-10; também discutido no Capítulo 22). Suas concentrações extracelulares efetivas frequentemente são reguladas por proteínas inibidoras secretadas, que se ligam diretamente às moléculas sinalizadoras, impedindo-as de ativar seus receptores nas células-alvo. *Nogina* e *cordina*, por exemplo, inibem BMPs, e *folistatina* inibe as ativinas. Alguns desses inibidores, assim como a maioria dos próprios membros da família TGF, são secretados como precursores inativos que são ativados por proteólise extracelular.

As Smads transitam continuamente entre o citoplasma e o núcleo durante a resposta à sinalização: elas são desfosforiladas no núcleo e exportadas para o citoplasma, onde podem ser refosforiladas por receptores ativados. Dessa forma, o efeito exercido sobre os genes-alvo reflete tanto a concentração do sinal extracelular quanto o tempo de atuação sobre os receptores de superfície celular (frequentemente várias horas). As células expostas a um morfógeno em alta concentração, ou por um longo tempo, ou ambos, ativarão um conjunto de genes,

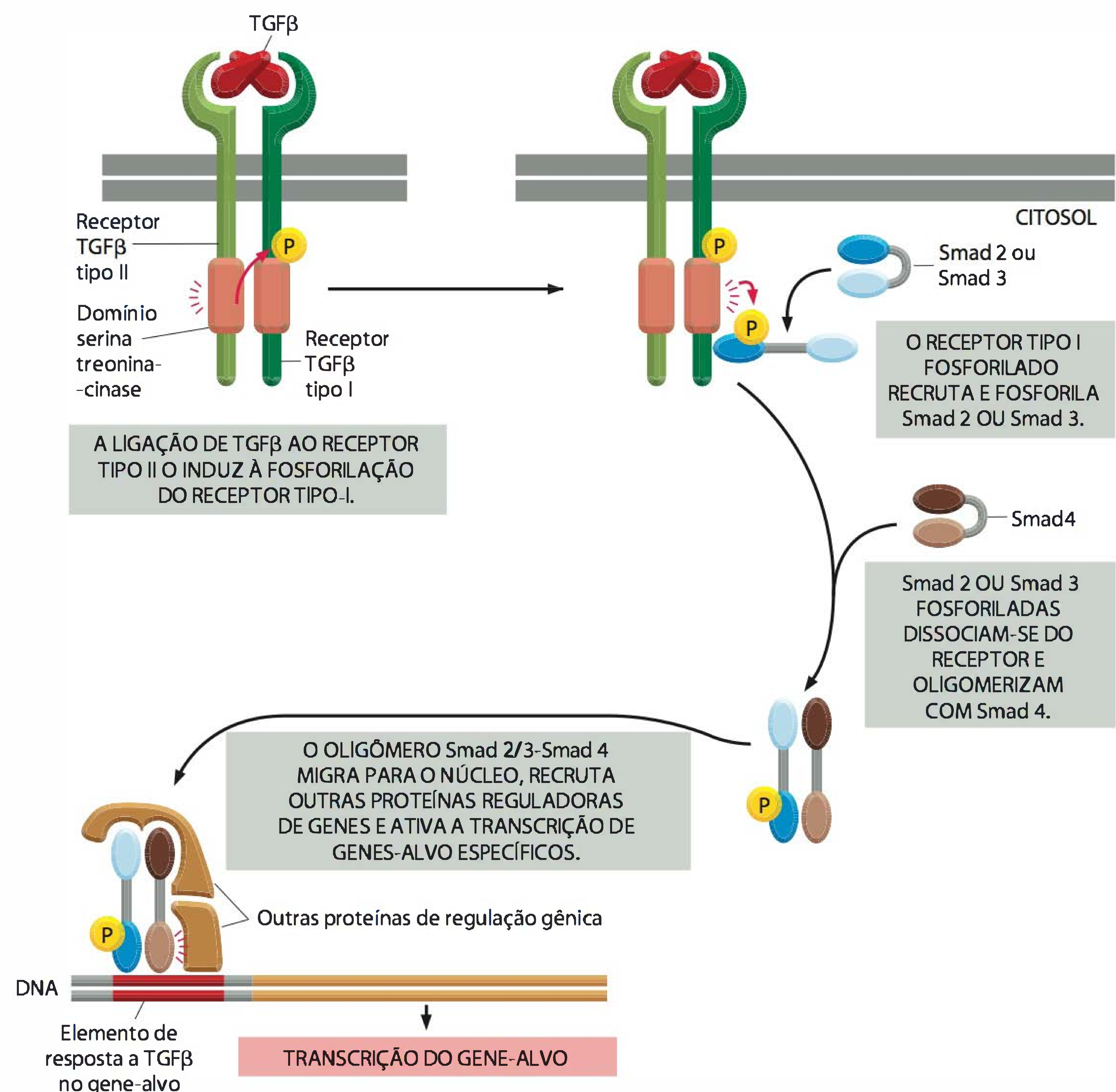


Figura 15-69 A via de sinalização dependente de Smad ativada por TGFβ. Note que o TGFβ é um dímero e que as Smads, quando são fosforiladas, se abrem e expõem a superfície de dimerização. Para simplificar o esquema, várias características da via foram omitidas, incluindo as seguintes. (1) Os receptores tipo I e tipo II seriam dímeros. (2) Os receptores tipo I estão, normalmente, associados a uma proteína inibidora que se dissocia quando os receptores são fosforilados por um receptor tipo II. (3) Acredita-se que as Smads sejam trímeros. (4) Uma proteína âncora denominada SARA auxilia no recrutamento de Smad2 ou de Smad3 para o receptor tipo I ativado, principalmente nos endossomos, conforme discutido no texto.

enquanto as células que receberem uma exposição mais baixa, ou mais transitória, ativarão um outro conjunto.

A via Smad, à semelhança da via JAK-STAT, é regulada por retroalimentação negativa. Entre os genes-alvo ativados pelos complexos Smad estão aqueles que codificam *Smads inibidoras*, como Smad6 e Smad7. A Smad7 (e possivelmente a Smad6) se liga aos receptores ativados e impede sua capacidade de sinalização de três maneiras: (1) compete com as R-Smads pelos sítios de ligação no receptor, reduzindo a fosforilação da R-Smad; (2) recruta uma ubiquitina-ligase chamada de *Smurf*, a qual ubiquitina o receptor, levando à sua internalização e degradação (elas são chamadas de Smurfs, *fatores reguladores de ubiquitinação de Smads*, de *Smad ubiquitylation regulatory factors,* porque também promovem a ubiquitinação e a degradação das Smads); e (3) recruta uma proteína-fosfatase que desfosforila e inativa o receptor. Além disso, as Smads inibidoras se ligam à co-Smad, Smad4, inibindo-a, tanto por impedir sua ligação às R-Smads como por promover sua ubiquitinação e degradação.

Embora os receptores serinatreonina-cinases atuem, principalmente, por meio da via das Smads recém-descrita, eles podem, também, afetar outras vias de sinalização intracelular. Reciprocamente, proteínas de sinalização de outras vias podem fosforilar as Smads e, dessa forma, influenciar a sinalização ao longo dessa via.

As proteína-cinases serinatreonina e tirosina são estruturalmente relacionadas

Todas as vias de sinalização ativadas por GPCRs e associados a enzimas considerados até agora dependem de serinatreonina-cinases específicas ou de tirosina-cinases específicas, ou de ambas. Todas essas cinases são relacionadas estruturalmente, conforme resumido na **Figura 15-70**.

A complexidade desconcertante das múltiplas vias de sinalização e de circuitos de retroalimentação já discutidos não é apenas o resultado de um entrelaçamento ao acaso, mas é um sistema altamente evoluído para processar e interpretar a grande massa de sinais que influenciam as células animais. Toda a rede de controle molecular, que vai desde os receptores na superfície da célula até os genes no núcleo, pode ser comparada a um computador; e, tal como outro computador, o cérebro, ela representa um dos mais difíceis problemas em biologia. Podemos identificar os componentes e descobrir como funcionam individualmente. Podemos entender como os subconjuntos menores de componentes trabalham juntos como módulos de regulação, como já vimos. Contudo, é uma tarefa muito mais difícil entender de que forma o sistema trabalha como um todo. Não somente porque o sistema é complexo, mas também porque a maneira como ele se comporta é extremamente dependente dos detalhes quantitativos das interações moleculares, e para muitas células animais temos apenas informações qualitativas aproximadas.

As vias de sinalização nas células bacterianas são mais simples, sendo muito mais fácil obter informações quantitativas exatas. Assim, é possível descrever com detalhes como os sistemas de sinalização atuam e os sinais que os controlam, pelo menos para um tipo específico de comportamento bacteriano. Um desses exemplos será discutido a seguir, no qual as bactérias respondem a sinais do meio ambiente distribuídos via receptores associados a enzimas que, mais uma vez, são cinases, mas de um tipo não relacionado com as que foram apresentadas até agora.

A quimiotaxia bacteriana depende de uma via de sinalização, com dois componentes, ativada por receptores associados a histidina-cinases

Conforme mostrado anteriormente, acredita-se que muitos dos mecanismos envolvidos em sinalização química entre as células de um organismo multicelular tenham evoluído de mecanismos utilizados pelos organismos unicelulares em resposta a mudanças químicas no seu ambiente. De fato, alguns mediadores intracelulares, como os nucleotídeos cíclicos e o Ca^{2+}, são utilizados por ambos os organismos. As *respostas quimiotáticas* dos organismos unicelulares aos sinais extracelulares são as reações melhor estudadas, nas quais o movimento celular é orientado na direção de uma fonte de determinados compostos químicos do ambiente, ou para longe dela. Concluiremos essa seção sobre receptores associados a enzimas com uma breve explicação sobre **quimiotaxia bacteriana**, que proporciona uma

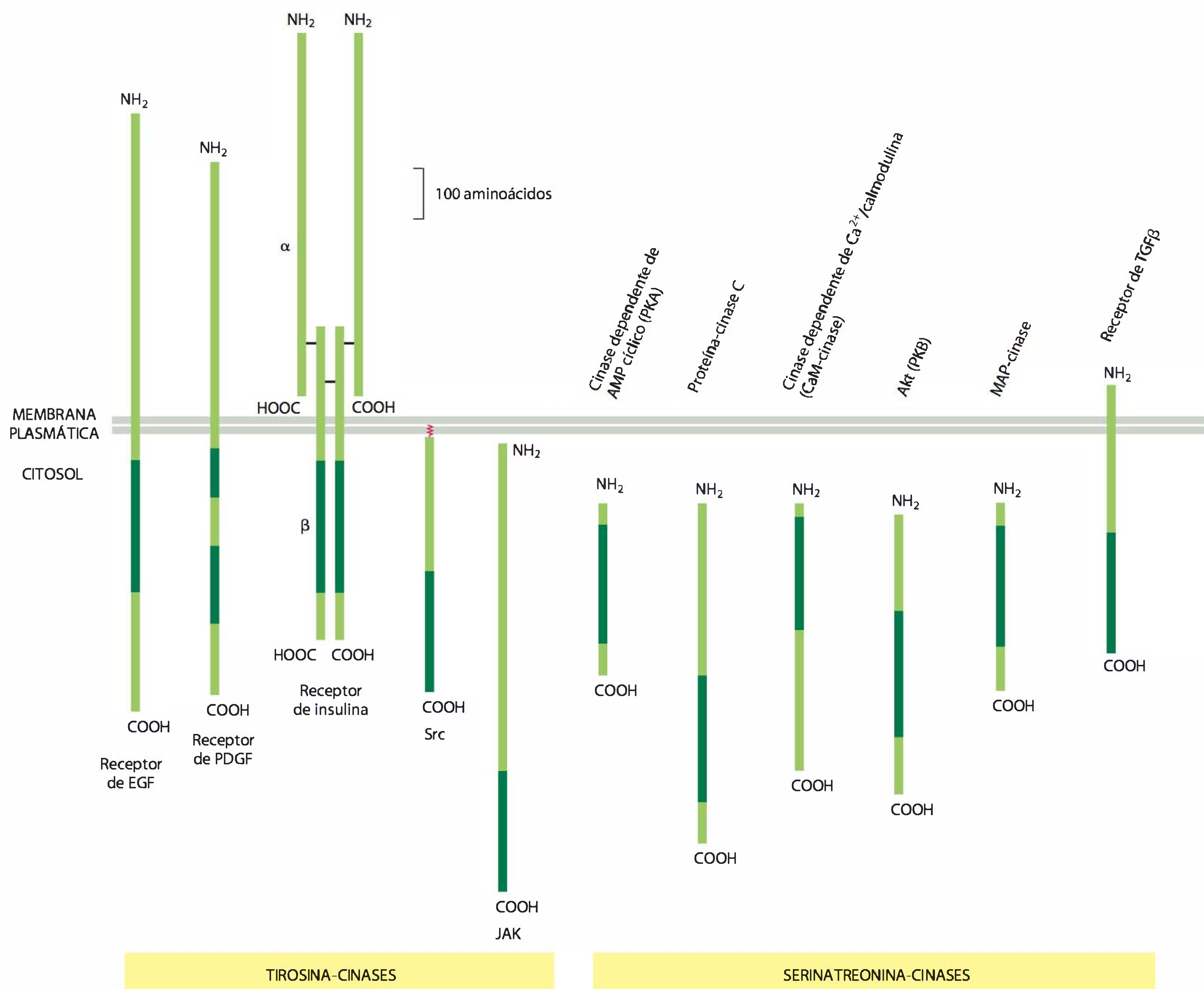


Figura 15-70 Algumas das proteína--cinases apresentadas neste capítulo. Estão mostrados o tamanho e a localização de seus domínios catalíticos (em *verde escuro*). Em todos os casos, os domínios têm 250 aminoácidos, cuja sequência é semelhante, sugerindo que todas tenham evoluído de uma cinase ancestral comum (ver também Figura 3-66). Note que todas as tirosina-cinases estão ligadas à membrana plasmática (as JAKs estão ligadas por sua associação aos receptores de citocinas – ver Figura 15-68), enquanto a maioria das serinatreonina-cinases está no citosol.

ilustração particularmente bem conhecida do papel crítico da adaptação na resposta aos sinais químicos. Essa resposta é mediada pelos **receptores associados a histidina-cinases** que ativam uma *via de sinalização de dois componentes*, a qual é utilizada também por leveduras e plantas, mas, aparentemente, não por animais.

As bactérias móveis, como a *E. coli*, deslocam-se na direção de altas concentrações de nutrientes (*atrativos*), como açúcar, aminoácidos e pequenos peptídeos, e para longe de altas concentrações de compostos químicos nocivos (*repelentes*). Elas se movem por meio de quatro ou seis flagelos inseridos, por um gancho pequeno e flexível em sua base, a um pequeno disco proteico embebido na membrana bacteriana. Esse disco faz parte de um pequeno motor que usa a energia do gradiente de H^+ transmembrana para rodar rapidamente e fazer girar o flagelo helicoidal (**Figura 15-71**). Diferentes direções de rotação têm efeitos distintos no movimento, pois a superfície da bactéria possui uma tendência destra intrínseca. A rotação no sentido anti-horário faz com que todos os flagelos adiantem-se juntos em um feixe, de forma que a bactéria se desloca uniformemente em uma direção. Na ausência de estímulo ambiental, um ou mais motores revertem a direção a cada poucos segundos, de forma que o flagelo fixo se separa do feixe, fazendo a bactéria se movimentar caoticamente, sem se deslocar em linha reta (**Figura 15-72**). Esta sequência produz um padrão característico de movimento no qual o deslocamento em linha reta é interrompido por mudanças de direção abruptas e aleatórias, causadas pelos desvios.

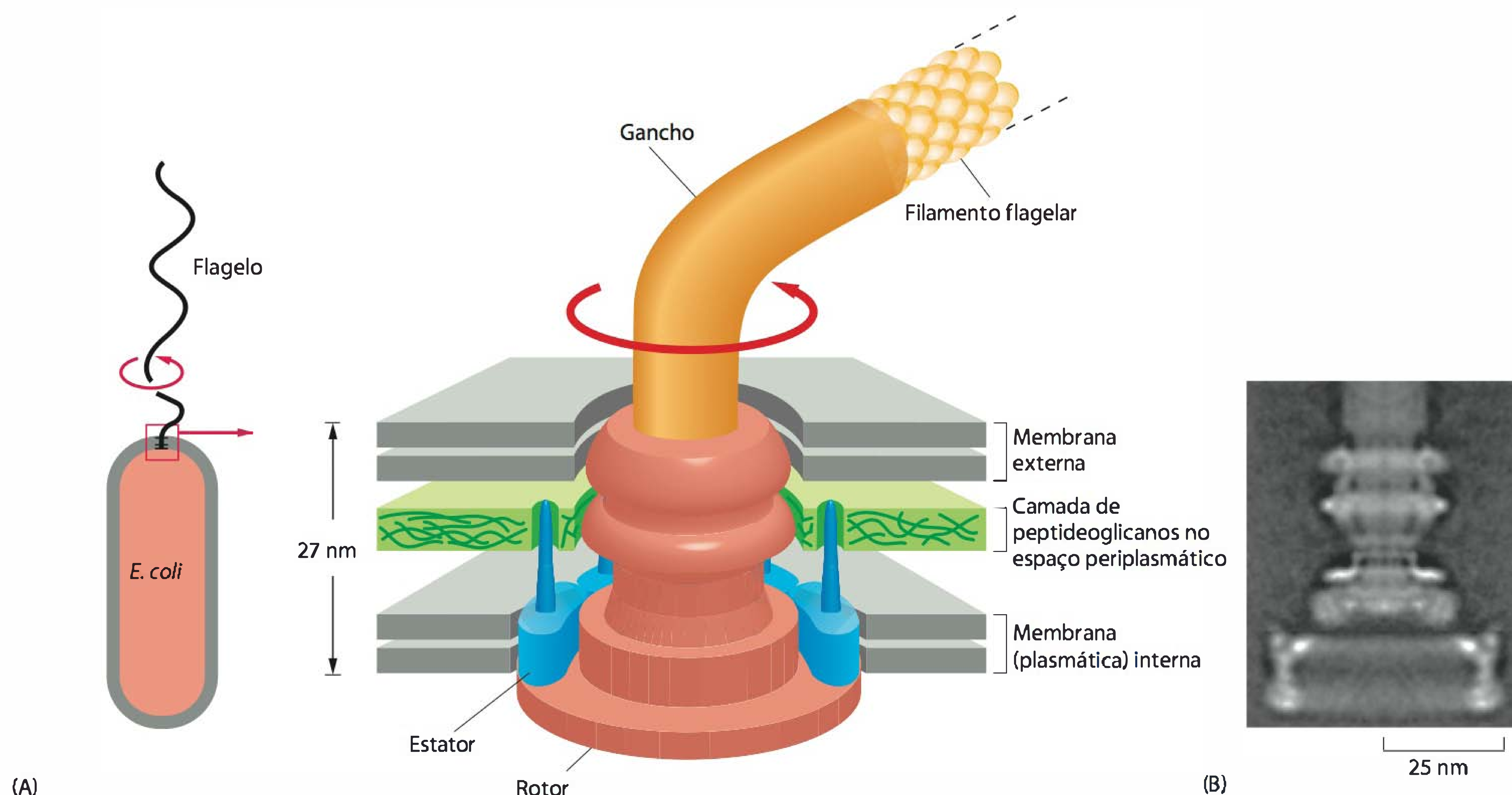


Figura 15-71 Motor flagelar bacteriano. (A) Desenho esquemático da estrutura. O flagelo está ligado a um gancho flexível unido a uma série de anéis proteicos (mostrados em cor *laranja*) inseridos nas membranas externa e interna. Os anéis formam um rotor que movimenta o flagelo a mais de cem revoluções por segundo. A rotação é impelida por um fluxo de prótons através de um anel externo de proteínas, o estator (*azul*), que está inserido na membrana interna e fixado à camada de peptideoglicanos. O estator também contém as proteínas responsáveis pela mudança de direção da rotação. (B) Um motor flagelar reconstituído a partir de múltiplas imagens de microscopia eletrônica. (A, com base em dados de T. Kubori et al., *J.Mol. Biol.* 226:433-446, 1992, com permissão da Academic Press, e N. R. Francis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6304-6308, 1992, com permissão da National Academy of Sciences; B, de D. Thomas, D. G. Morgan e D. J. DeRosier, *J. Bacteriol.* 183:6404-6412, 2001. Com permissão da American Society for Microbiology.)

O comportamento normal de deslocamento das bactérias é modificado pela presença de compostos quimiotáticos atrativos ou repelentes, que se ligam a receptores específicos e afetam a frequência dos desvios por aumentar ou reduzir o tempo entre mudanças sucessivas na direção da rotação flagelar. Quando as bactérias estão se deslocando em uma direção favorável (na direção de uma concentração mais alta de um atrativo ou para longe de uma alta concentração de um repelente), elas desviam menos frequentemente do que quando estão se deslocando em uma direção desfavorável (ou quando não há gradiente).

Desde que os períodos de movimento deslizante sejam maiores quando a bactéria está se deslocando em uma direção favorável, ela progredirá gradualmente nessa direção, ou seja, na direção de um atrativo, ou para longe de um repelente.

Essas respostas são mediadas por **receptores de quimiotaxia** associados a histidina-cinases. Os receptores são proteínas transmembrana diméricas que se ligam a atrativos ou a repelentes específicos do lado de fora da membrana plasmática. As caudas citoplasmáticas dos receptores estão associadas, de modo estável, a uma proteína histidina-cinase *CheA* por meio da adaptadora *CheW* (**Figura 15-73**). A ligação de um repelente ativa os receptores, enquanto a ligação de um atrativo inativa-os; um único receptor pode ligar ambos os tipos de moléculas, com consequências opostas. A ligação de um repelente ao receptor ativa *CheA*, que autofosforila suas histidinas e, quase imediatamente, transfere o grupo fosforil para um ácido aspártico de uma proteína reguladora de resposta *CheY*. Esta agora se dissocia do receptor, difunde-se pelo citosol, liga-se ao motor flagelar e o faz rodar no sentido horário, de forma que a bactéria desvia. A CheY tem atividade fosfatásica intrínseca e se desfosforila em um processo que é muito acelerado pela proteína *CheZ* (ver Figura 15-73).

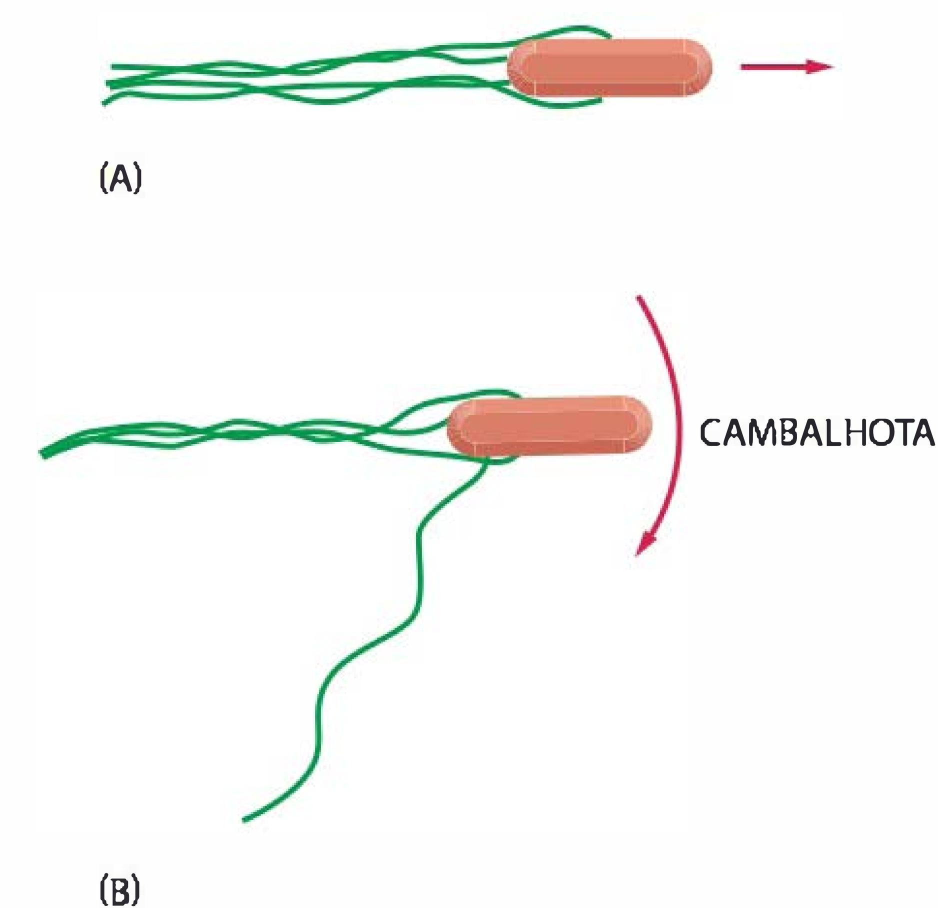


Figura 15-72 Posições dos flagelos de *E. coli* durante o deslocamento. (A) A rotação no sentido anti-horário (olhando para a célula a partir do flagelo) faz com que os flagelos se organizem em um único feixe, que funciona como um propulsor, produzindo um deslocamento deslizante. (B) Quando um ou mais rotores revertem a direção, um dos flagelos se separa do feixe, fazendo a bactéria dar uma cambalhota.

A metilação do receptor é responsável pela adaptação na quimiotaxia bacteriana

A mudança na frequência dos desvios, em resposta a um aumento na concentração de um atrativo ou de um repelente, ocorre em menos de um segundo, mas é transitória. Mesmo

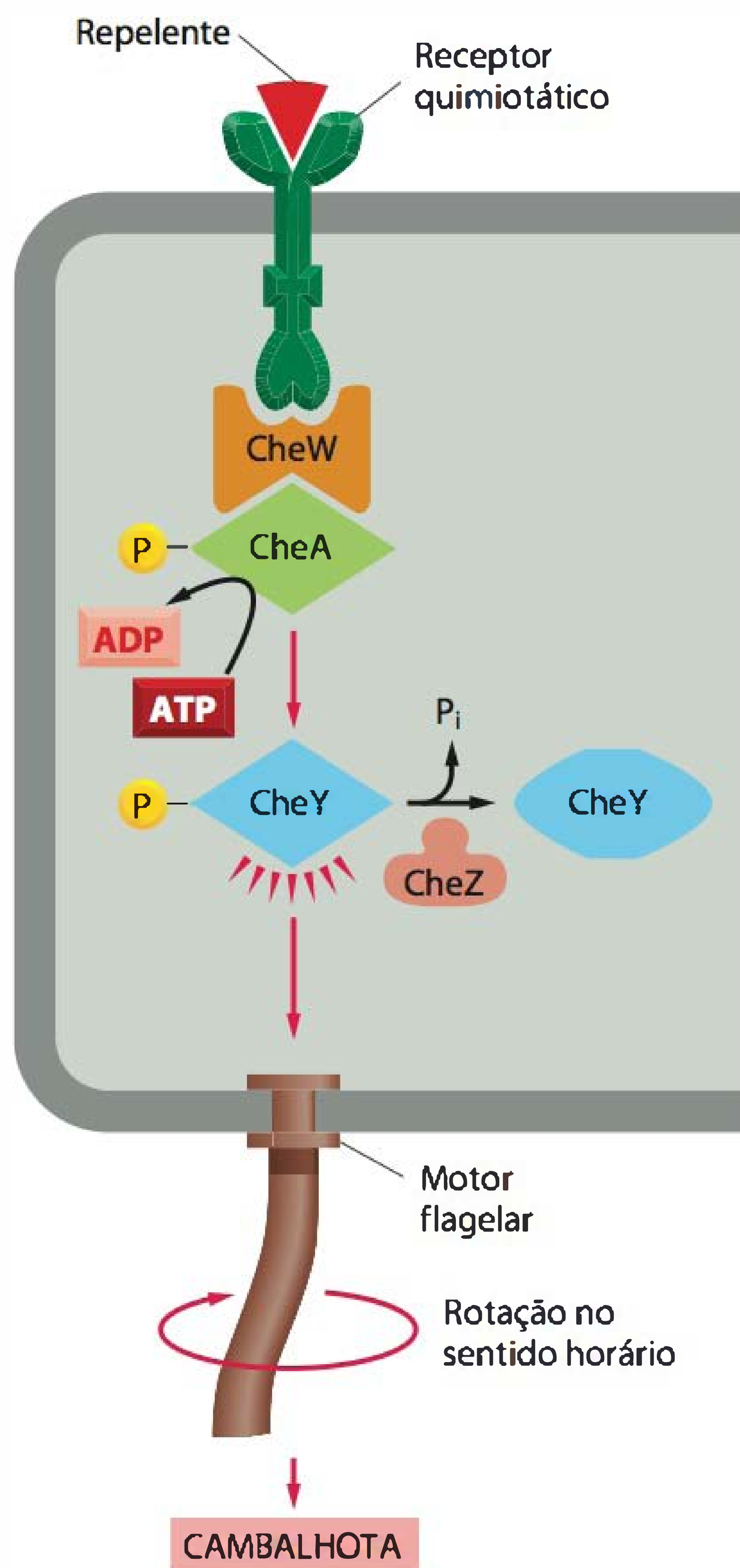


Figura 15-73 Via de sinalização de dois componentes que permite o controle dos motores flagelares pelos receptores quimiotáticos, durante a quimiotaxia bacteriana. A histidina-cinase CheA está ligada ao receptor, de forma estável, via proteína adaptadora CheW. Os receptores e as proteínas associadas a eles estão agrupados em uma extremidade da célula (ver Figura 15-74). A ligação do repelente aumenta a atividade do receptor, que estimula a autofosforilação de CheA, que, rapidamente, transfere seus grupos fosforil em ligação rica em energia diretamente para CheY, gerando CheY-fosfato, o qual se difunde e se liga ao motor flagelar, fazendo com que gire no sentido horário, o que resulta em movimento desordenado (cambalhota). A ligação de um atrativo tem o efeito oposto: ele reduz a atividade do receptor, reduzindo a fosforização de CheA e de CheY, o que resulta em uma rotação flagelar no sentido anti-horário e no deslocamento deslizante. A CheZ acelera a autodesfosforilação de CheY-fosfato, inativando-a. Cada um dos intermediários fosforilados decai com uma meia-vida de menos de um segundo, tornando a bactéria capaz de responder, muito rapidamente, a mudanças em seu ambiente (ver Figura 15-11).

que seja mantido um nível mais alto do ligante, a bactéria se *adapta* (se dessensibiliza) ao estímulo aumentado. A adaptação é uma parte critica da resposta, pois permite que a bactéria compare seu meio ambiente atual àquele do passado recente e assim possa responder a *mudanças* na concentração do ligante e não aos níveis de equilíbrio.

A adaptação é mediada por metilação (catalisada por uma *metil-transferase*) e desmetilação (catalisada por uma *metilase*) covalente dos receptores quimiotáticos que alteram sua capacidade de resposta ao ligante em consequência da modificação. Quando um atrativo se liga a um receptor quimiotático, ele produz dois efeitos: (1) reduz a capacidade do receptor de ativar CheA, o que resulta em uma taxa reduzida de desvios; (2) altera lentamente (em minutos) o receptor de modo que este possa ser metilado pela metil-transferase, o que restaura sua capacidade de ativar CheA até seu nível original. Assim, o receptor não-metilado sem um ligante tem a mesma atividade do receptor metilado com o ligante, e a frequência de desvios da bactéria é a mesma nos dois casos.

Cada dímero de receptor tem oito sítios de metilação, e este número aumenta com o aumento da concentração do atrativo (pois cada receptor passa um tempo maior em interação com o ligante em concentrações maiores). Quando o atrativo é removido, a metilase desmetila o receptor. Embora o nível de metilação se altere durante a resposta quimiotática, ele permanece constante quando a bactéria está adaptada, porque é alcançado um equilíbrio exato entre as taxas de metilação e desmetilação. Um modelo simples de como a interação com o ligante e a metilação podem atuar na quimiotaxia bacteriana propõe que tanto a metilação do receptor quanto a ligação do repelente compacta a estrutura de sua multissubunidade e de suas proteínas sinalizadoras associadas, aumentando, assim, a sinalização e os desvios; em contraste, a desmetilação do receptor e a ligação do atrativo afrouxam a estrutura do complexo, reduzindo, assim, a sinalização e os desvios. Acredita-se que a sensibilidade dessa resposta seja bastante aumentada por efeitos cooperativos resultantes do agrupamento das caudas citoplasmáticas de receptores adjacentes na membrana (**Figura 15-74**).

Todos os genes e as proteínas envolvidas na quimiotaxia bacteriana já foram identificados, e suas interações já foram avaliadas com algum detalhe. Por isso, é provável que este seja o primeiro sistema de sinalização a ser completamente elucidado em termos moleculares. Mesmo nesta rede de sinalização relativamente simples, contudo, são necessárias simulações computacionais para se compreender de que forma o sistema funciona como uma rede integrada. A via de sinalização celular proporcionará uma área de investigação especialmente rica para a nova geração de biólogos computacionais, já que as propriedades de rede destas vias só serão compreendidas com o uso de ferramentas computacionais poderosas.

Conforme mencionado anteriormente, existem alguns receptores de superfície celular que não se encaixam em nenhuma das três classes principais apresentadas até agora – associados a canais iônicos, associados à proteína G e associados a enzimas. Na próxima seção, consideraremos os receptores de superfície que ativam vias de sinalização que dependem de proteólise para regular a atividade de proteínas reguladoras gênicas latentes. Essas vias têm funções muito importantes no desenvolvimento animal, assim como no reparo e na renovação de tecidos.

Resumo

Existem várias classes de receptores associados a enzimas, entre eles os receptores tirosina-cinases (RTKs), receptores associados a tirosina-cinases, receptores serinatreonina-cinases e receptores associados a histidina-cinases. As primeiras duas classes são, de longe, as mais numerosas nos mamíferos.

A interação dos ligantes com os RTKs induz a fosforilação cruzada de múltiplas tirosinas nos domínios citoplasmáticos destes. A autofosforilação ativa as cinases ao mesmo tempo em que produz um grupo de fosfotirosinas que servirão como sítios de ancoragem para um grupo de proteínas de sinalização intracelular, que se ligam via seus domínios SH2 (ou PTB). Uma proteína desse tipo serve como adaptador para acoplar alguns receptores ativados a uma Ras-GEF (Sos), a qual, por sua vez, ativa a GTPase monomérica Ras; esta, por sua vez, ativa um módulo de sinalização de MAP-cinase de três componentes, o qual transmite o sinal para o núcleo por meio da fosforilação de proteínas reguladoras gênicas. Outra proteína sinalizadora importante que ancora em

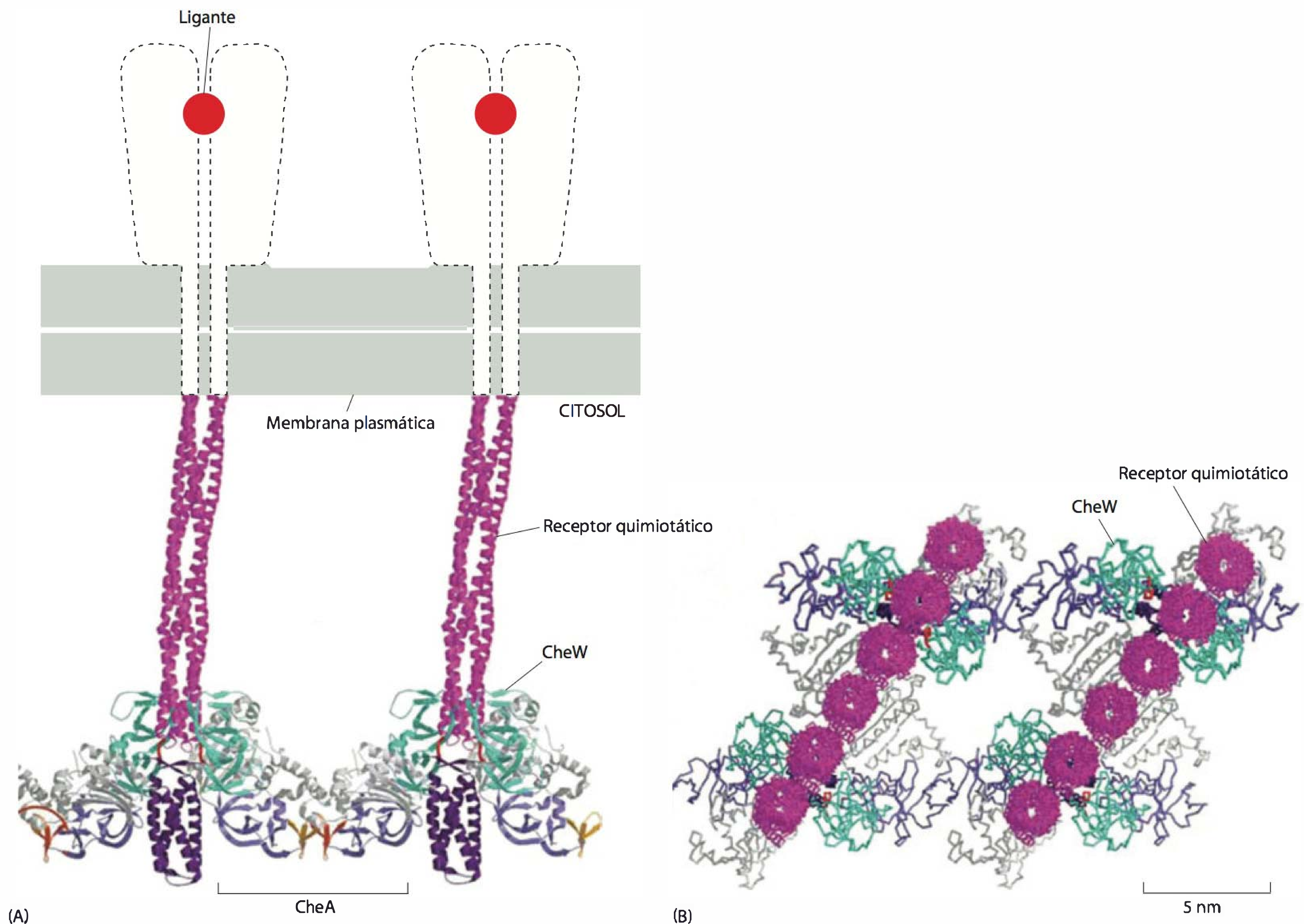


Figura 15-74 Modelo estrutural do agrupamento de receptores quimiotáticos na membrana plasmática bacteriana. São mostrados dois receptores agrupados. Cada um deles é um homodímero, e a cauda citoplasmática α-helicoidal longa de cada uma das duas subunidades se enrola sobre si mesma. Assim, cada subunidade contribui com duas hélices para o grupo de quatro hélices. As medidas das distâncias entre os domínios das proteínas, determinadas pela técnica denominada ressonância de eletro-*spin* pulsada, foram integradas com a estrutura tridimensional proteica conhecida, para gerar o modelo mostrado. O agrupamento de complexos do receptor CheA-CheW em arranjos desse tipo permite interações cooperativas entre complexos adjacentes, aumentando muito a sensibilidade do processo de sinalização. (A) Vista da estrutura imediatamente abaixo da membrana plasmática. O domínio extracelular do receptor está desenhado esquematicamente. (B) Vista da mesma estrutura a partir da membrana para o interior da célula. (Adaptada de S. Y. Park et al., *Nat. Struct. Biol.* 13:400-407, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

RTKs ativados é a PI3-cinase, que fosforila fosfoinositídeos específicos gerando sítios lipídicos de ancoragem na membrana plasmática para proteínas sinalizadoras com domínios PH de ligação a fosfoinositídeos, entre elas a serinatreonina-cinase Akt (PKB), a qual tem uma função-chave no controle do crescimento e da sobrevivência celular. Muitas classes de receptores, incluindo alguns RTKs, ativam as GTPases monoméricas da família Rho, que acoplam funcionalmente os receptores ao citoesqueleto.

Os receptores associados a tirosina-cinases dependem, para sua atividade, de várias tirosina-cinases citoplasmáticas. Dentre elas estão membros da família Src, que se associam a muitos tipos de receptores, e a cinase de adesão focal (FAK), que se associa a integrinas nas adesões focais. As tirosina-cinases citoplasmáticas então fosforilam uma grande variedade de proteínas sinalizadoras para que o sinal seja transmitido adiante. A maior família dessa classe é a dos receptores de citocinas. Quando estimulados pela interação com o ligante, esses receptores ativam tirosina-cinases citoplasmáticas JAK, que fosforilam STATs. Em consequência, as STATs dimerizam, migram para o núcleo e ativam a transcrição de genes específicos. Os receptores serina-treonina-cinases, ativados por proteínas-sinal da superfamília TGFβ, atuam de modo similar: fosforilam e ativam Smads, que oligomerizam com outra Smad, migram para o núcleo e ativam a transcrição gênica.

A quimiotaxia bacteriana é regulada por uma via de sinalização excepcionalmente bem-conhecida. Ela é mediada por receptores quimiotáticos associados a histidina-cinases, que ativam uma via de sinalização de dois componentes. Quando ativados pela ligação de um repelente, estimulam sua proteína-cinase associada a autofosforilar suas histidinas e a transferir os grupos fosforil para uma proteína reguladora de resposta, que transmite o sinal para o motor flagelar e altera o comportamento de deslocamento da bactéria. Estas respostas têm uma dependência crítica da adaptação do receptor, que é mediada pela metilação reversível deste receptor.

VIAS DE SINALIZAÇÃO DEPENDENTES DE PROTEÓLISE REGULADA DE PROTEÍNAS REGULADORAS GÊNICAS LATENTES

A sinalização intercelular é extremamente necessária, especialmente durante o desenvolvimento animal. Cada célula do embrião é guiada para diferentes vias de desenvolvimento, de acordo com sua história, sua posição e a natureza das células vizinhas. Em cada etapa da via, ela deve trocar sinais com suas vizinhas, com o objetivo de coordenar seu comportamento em relação a elas. A maioria das vias de sinalização já apresentada é amplamente utilizada para essas finalidades de desenvolvimento, controlando a sobrevivência, o crescimento, a proliferação, a adesão, a especificação, a diferenciação e a migração celular.

Contudo, existem outras vias que também são importantes para o controle dos processos de desenvolvimento, mas que utilizam outros mecanismos para transmitir os sinais dos receptores de superfície para o interior da célula. Várias dessas vias dependem de *proteólise regulada* para controlar a atividade e a localização de *proteínas reguladoras gênicas latentes*, as quais entram no núcleo e ativam a transcrição de genes-alvo específicos somente depois de terem sido sinalizadas para isso. Apesar de as proteínas STAT e Smad também serem proteínas reguladoras gênicas latentes, elas são ativadas por fosforilação em resposta aos sinais extracelulares, e não pela degradação proteica altamente seletiva. As vias de sinalização que usam proteínas reguladoras gênicas latentes proporcionam, como função primária, uma via linear e relativamente direta pela qual os sinais extracelulares podem controlar a expressão gênica, motivo pelo qual elas são provavelmente muito usadas, durante o desenvolvimento, para controlar especialmente as decisões sobre os destinos celulares.

Embora a maioria das vias discutidas nesta seção tenha sido descoberta por meio de estudos genéticos na *Drosophila*, elas são altamente conservadas ao longo da evolução e têm sido utilizadas reiteradas vezes durante o desenvolvimento de diferentes tecidos e diferentes animais. Conforme será discutido no Capítulo 23, elas têm um papel crítico nos inúmeros processos de desenvolvimento que ocorrem nos tecidos e órgãos adultos, onde constantemente estão sendo produzidas novas células.

Discutiremos, nesta seção, quatro dessas vias: a mediada pelo receptor *Notch*, a ativada por proteínas *Wnt* secretadas, a ativada por proteínas *Hedgehog* secretadas e a via dependente da ativação da proteína reguladora gênica *NFkB*. Todas são críticas para o desenvolvimento animal. No Capítulo 22 discutiremos o papel da sinalização por Notch, por Wnt e por Hedgehog no desenvolvimento embrionário.

O receptor Notch é uma proteína reguladora gênica latente

A sinalização por meio do receptor **Notch** talvez seja a via mais amplamente utilizada no desenvolvimento animal. Conforme será discutido no Capítulo 22, ela tem uma atuação geral no controle da escolha do destino das células e na regulação do padrão de formação durante o desenvolvimento da maioria dos tecidos, bem como na renovação contínua de tecidos como o revestimento do intestino. Contudo, ela é mais conhecida pelo seu papel na formação das células nervosas na *Drosophila*, as quais geralmente surgem isoladas dentro de uma camada epitelial de células precursoras. Durante esse processo, quando as células precursoras se comprometem com o desenvolvimento em células nervosas, elas sinalizam para suas vizinhas mais próximas para que não se desenvolvam da mesma forma; a células inibidas se diferenciam em células epiteliais. Esse processo, conhecido como *inibição lateral*, depende de um mecanismo de sinalização dependente de contato mediado por uma proteína-sinal transmembrana de passagem única chamada de **Delta**, exposta na superfície da futura célula neural. Delta liga-se a Notch na célula vizinha e sinaliza para que ela não se transforme em célula neural (**Figura 15-75**). Quando o processo é defeituoso, as vizinhas da célula neural também se tornam neurais, produzindo um enorme excesso de neurônios às expensas das células epiteliais, o que é letal.

A sinalização entre células adjacentes via Notch ou Delta (ou ligantes similares a Delta) regula a escolha do destino em muitos tecidos e animais. Medeia, frequentemente, a inibi-

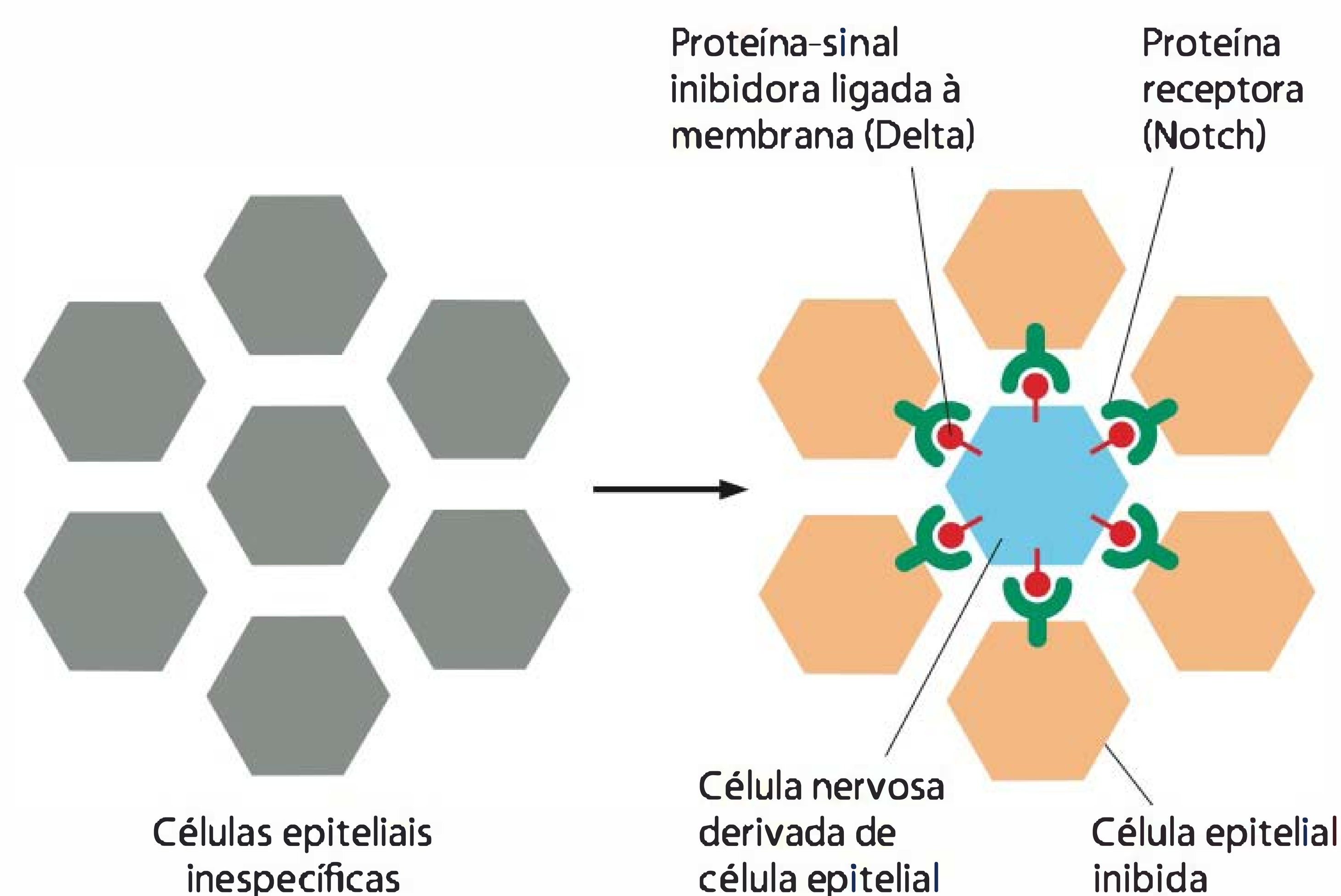


Figura 15-75 Inibição lateral mediada por Notch e Delta durante o desenvolvimento das células nervosas em *Drosophila*. Quando determinadas células do epitélio iniciam sua diferenciação em células neurais, elas sinalizam para as células vizinhas para que não façam o mesmo. Esta sinalização inibidora dependente de contato é mediada pelo ligante Delta, que aparece na superfície da futura célula nervosa e se liga às proteínas Notch das células vizinhas. Em muitos tecidos, todas as células de um agrupamento, inicialmente, expressam Delta e Notch. Então, ocorre uma competição, e uma célula surge como vencedora, expressando Delta em grande quantidade e impedindo suas vizinhas de fazê-lo (ver Figura 22-60). Em outros casos, fatores adicionais interagem com Delta ou com Notch, tornando algumas células suscetíveis e outras resistentes ao sinal de inibição lateral.

ção lateral para controlar a formação de misturas de tipos celulares diferenciados dentro de um tecido, como no caso do sistema nervoso da mosca. Em alguns outros casos, no entanto, ela funciona de maneira oposta, induzindo um comportamento similar nas células vizinhas. Não existe nenhum comportamento celular no desenvolvimento de um ou de outro tecido que não seja regulado pela sinalização por Notch.

Notch é uma proteína transmembrana de passagem única que necessita de processamento proteolítico para funcionar. Ela atua como uma proteína reguladora gênica latente e produz a via de sinalização mais simples e mais direta de um receptor de superfície celular para o núcleo. Quando ativada pela ligação de Delta de outra célula, a cauda citoplasmática de Notch é hidrolisada por uma protease ligada à membrana e se desloca para o núcleo, onde ativa a transcrição de um grupo de genes que respondem a Notch. A cauda interage com uma proteína de ligação ao DNA, convertendo-a de repressor transcricional, em ativador transcricional. Veremos que as vias de sinalização de Wnt e Hedgehog usam esta mesma estratégia de mudar de um repressor para um ativador transcricional na regulação do destino da célula. O grupo de genes ativado pela sinalização por Notch varia dependendo do tecido e das circunstâncias, embora os alvos primários sejam, na maioria das células, membros de uma família gênica conhecida (em mamíferos) como genes *Hes,* os quais codificam proteínas reguladoras gênicas inibidoras. No sistema nervoso, por exemplo, os produtos dos genes *Hes* bloqueiam a expressão de genes necessários para a diferenciação neural.

O receptor Notch sofre três clivagens proteolíticas sucessivas, mas somente as duas últimas dependem da ligação de Delta. Como parte de sua biossíntese, ele é hidrolisado no aparelho de Golgi, formando um heterodímero, que é então transportado para a superfície celular como receptor maduro. A ligação de Delta a Notch induz uma segunda hidrólise no domínio extracelular, mediada por uma protease extracelular. Segue-se uma hidrólise final, liberando a cauda citoplasmática do receptor ativado (**Figura 15-76**). Observe que, ao contrário da maioria dos receptores, a ativação de Notch é irreversível; uma vez ativada pela interação com o ligante, a proteína não pode ser utilizada outra vez.

A hidrólise final da cauda de Notch ocorre dentro do segmento transmembrana, sendo mediada por um complexo proteolítico chamado de *γ-secretase*, que também é responsável pela hidrólise intramembrana de várias outras proteínas. Uma de suas subunidades essenciais é a *Presenilina,* assim chamada porque mutações no gene que a codifica são causas frequentes da doença de Alzheimer familiar precoce, uma forma de demência pré-senil. Acredita-se que o complexo proteolítico contribua para esta e outras formas da doença de Alzheimer por gerar fragmentos peptídicos extracelulares de uma proteína transmembrana neuronal; os fragmentos se acumulam em grande quantidade, formando agregados de proteínas malformadas chamadas de placas amiloides, que danificam as células nervosas, contribuindo para sua degeneração e perda.

Notch e Delta são glicoproteínas, e sua interação é regulada por glicosilação de Notch. A *família Fringe* de glicosiltransferases adiciona açúcares extras ao oligossacarídeo ligado a O (discutido no Capítulo 13) de Notch, o que altera sua especificidade pelos ligantes. Esse é o primeiro exemplo de modulação de sinalização ligante-receptor por glicosilação diferencial do receptor.

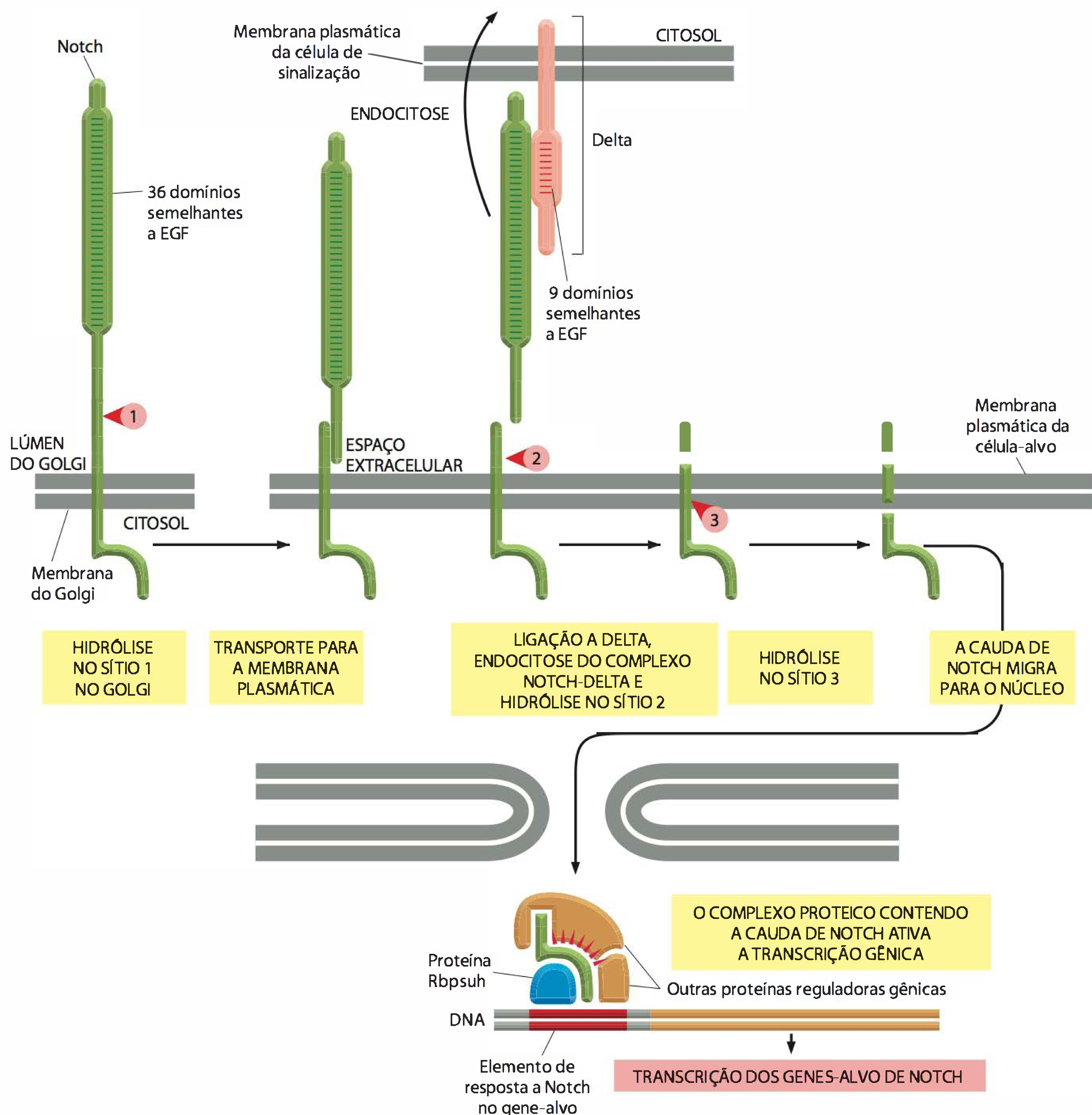


Figura 15-76 Processamento e ativação de Notch por proteólise. As *setas vermelhas numeradas* indicam os sítios de processamento proteolítico. A primeira etapa do processamento ocorre dentro da rede *trans* Golgi e gera um receptor Notch heterodimérico maduro que é exposto na superfície celular. A ligação de Delta, que está exposta em uma célula vizinha, desencadeia as duas etapas proteolíticas seguintes: O complexo de Delta e da subunidade Notch à qual ela está ligada é endocitado pela célula que está expressando Delta, expondo o sítio de clivagem extracelular na subunidade Notch transmembrana. Note que Notch e Delta interagem através dos seus domínios repetidos similares a EGF.

A cauda de Notch liberada migra para o núcleo, onde se liga à proteína Rbpsuh e a converte de repressor em ativador de transcrição.

As proteínas Wnt interagem com os receptores Frizzled e inibem a degradação de β-catenina

As **proteínas Wnt** são moléculas-sinal secretadas que atuam como mediadores locais e morfógenos no controle de muitos aspectos do desenvolvimento em todos os animais nos quais foram estudadas. Foram descobertas independentemente em moscas e em camundongos: na *Drosophila*, o gene *Wingless* (*Wg*) foi descoberto devido ao seu papel como morfógeno no desenvolvimento das asas (discutido no Capítulo 22), enquanto, em camundongos, o gene *Int1* foi encontrado porque promovia o desenvolvimento de tumores de mama quando ativado pela integração de um vírus próximo a ele. Ambos os genes codificam proteínas Wnt. Essas proteínas são incomuns como proteínas secretadas pelo fato de terem uma cadeia de ácido graxo ligada covalentemente à sua extremidade N-terminal, o que aumenta sua ligação com a superfície celular. Existem 19 Wnts em humanos, cada uma com funções distintas, mas frequentemente sobrepostas.

As Wnts ativam, pelo menos, três tipos de vias de sinalização intracelular: (1) a *via Wnt/β-catenina* (também conhecida como *via Wnt canônica*) é centrada na proteína reguladora gênica latente *β-catenina;* (2) a *via de polaridade planar* coordena a polarização das células no plano de um epitélio em desenvolvimento (discutido nos Capítulos 19 e 22) e depende das GTPases da família Rho; (3) a via Wnt/Ca^{2+} estimula o aumento do Ca^{2+}, com

consequências semelhantes às descritas anteriormente para outras vias. As três vias iniciam com a ligação das Wnts aos receptores de superfície celular da família **Frizzled**, proteínas transmembrana de sete passos, com estrutura semelhante à dos GPCR. Em humanos, existem sete tipos deste receptor. Quando ativadas pela ligação de Wnt, as proteínas Frizzled recrutam a proteína de suporte **Dishevelled**, que é necessária à transmissão do sinal para todas as três vias. Focaremos aqui a primeira via.

A **via Wnt/β-catenina** atua pela regulação da proteólise de uma proteína multifuncional chamada de **β-catenina** (ou *Armadillo*, em moscas), que atua na adesão célula-célula (discutido no Capítulo 19) e na regulação gênica. As Wnts atuam somente nessa via pela interação com a proteína Frizzled e com uma proteína correceptora relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low-density lipoprotein*, discutido no Capítulo 13), sendo, por isso, denominada **proteína relacionada com o receptor LDL** (**LRP**, de *LDL-receptor-related protein*). Nas células epiteliais, a maioria das β-cateninas se localiza nas junções aderentes célula-célula, onde estão associadas a *caderinas*, proteínas transmembrana de adesão. Conforme será discutido no Capítulo 19, as β-cateninas dessas junções auxiliam na ligação das caderinas ao citoesqueleto de actina. Nas células epiteliais e nas não-epiteliais, as β-cateninas que não estejam associadas a caderinas são degradadas rapidamente no citoplasma.

A degradação das β-cateninas citoplasmáticas depende de um grande *complexo de degradação* proteico, que se liga à β-catenina e a mantém fora do núcleo enquanto promove sua degradação. O complexo contém, pelo menos, outras quatro proteínas: uma serinatreonina-cinase, chamada de *caseína-cinase 1* (*CK1*) que fosforila uma serina da β-catenina, marcando-a, assim, para outra fosforilação por outra serinatreonina-cinase, chamada de *glicogênio-sintase-cinase 3* (*GSK3*); esta última fosforilação marca a proteína para ubiquitinação e degradação rápida nos proteossomos. Duas proteínas de suporte, chamadas de *axina* e *adenomatous polyposis coli* (*APC*, ou *polipose adenomatosa de cólon*) estabilizam o complexo (**Figura 15-77**A). A proteína APC tem este nome porque o gene que a codifica está frequentemente mutado em um tipo de tumor benigno de cólon (adenoma); o tumor se projeta para o lúmen como um pólipo, que pode se tornar maligno. (Esta APC não deve ser

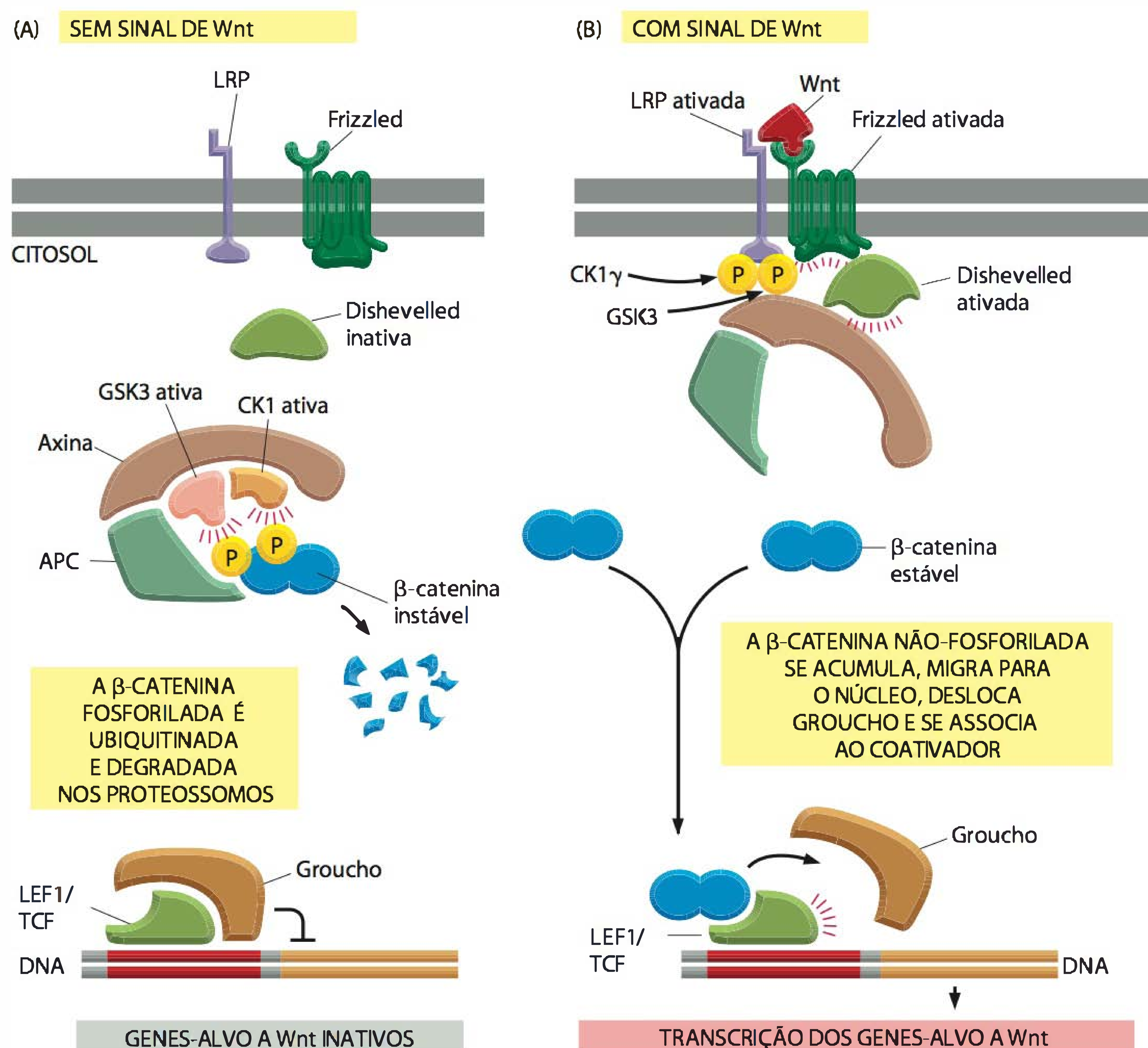


Figura 15-77 Via de sinalização Wntβ-catenina. (A) Na ausência do sinal de Wnt, algumas β-cateninas que não estão ligadas à cauda citosólica das caderinas (não-mostrado) e as β-cateninas citosólicas ligam-se ao complexo de degradação formado por APC, axina, GSK3 e CK1. Nesse complexo, a β-catenina é fosforilada pela CK1 e pela GSK3, o que desencadeia sua ubiquitinação e degradação nos proteossomos. Os genes que respondem a Wnt são mantidos inativos pela ligação da proteína correpressora Groucho à proteína reguladora gênica LEF1/TCF. (B) A ligação de Wnt a Frizzled e a LRP reúne os dois tipos de receptores, resultando no recrutamento do complexo de degradação para a membrana plasmática e na fosforilação da cauda citosólica da LRP pela GSK3 e pela CK1γ. A axina se liga à LRP fosforilada, sendo inativada e/ou degradada. O complexo de degradação, agora sem axina, torna-se inativo e, desta forma, a ubiquitinação e a degradação da β-catenina são bloqueadas, o que permite o acúmulo e a translocação da β-catenina não-fosforilada para o núcleo. A Dishevelled e, provavelmente, uma proteína G são necessárias para a atuação dessa via de sinalização; ambas se ligam a Frizzled, e Dishevelled se torna fosforilada (não-mostrado), mas seus papéis funcionais são desconhecidos.

No núcleo, a β-catenina se liga à LEF1/TCF, desloca o correpressor Groucho e atua como um coativador na estimulação da transcrição dos genes-alvo Wnt.

confundida com o complexo promotor de anáfase, de *anaphase promoting complex,* também chamado de APC, que tem uma função central na degradação proteica seletiva durante o ciclo celular – ver Figura 17-20A.)

A ligação de uma proteína Wnt a Frizzled e ao receptor LRP reúne os dois receptores, formando um complexo. Os detalhes do mecanismo são pouco conhecidos, mas as duas proteína-cinases, GSK3 e CK1γ, fosforilam a cauda citosólica do receptor LRP para recrutar e inativar a axina, rompendo, dessa forma, o complexo de degradação no citoplasma. Dessa maneira, a fosforilação e a degradação da β-catenina são inibidas, permitindo um acúmulo gradual de β-catenina não-fosforilada e sua translocação para o núcleo, onde ela altera o padrão de transcrição gênica (Figura 15-77B).

Na ausência de sinalização por Wnt, os genes-alvo da sinalização normalmente são reprimidos por um complexo inibidor de proteínas reguladoras gênicas. O complexo inclui proteínas da família *LEF1/TCF* ligados a uma proteína correpressora da família *Groucho* (ver Figura 15-77A). A β-catenina entra no núcleo, em resposta a um sinal de Wnt, e se liga às proteínas LEF1/TCF, deslocando Groucho. Dessa forma, a β-catenina funciona como um coativador, induzindo a transcrição dos genes-alvo de Wnt (ver Figura 15-77B). Assim, a sinalização por Wnt/β-catenina desencadeia uma mudança de repressão para ativação transcricional, tal como acontece na sinalização por Notch.

Entre os genes ativados pela β-catenina está *c-Myc*, que codifica uma proteína (c-Myc) que é um potente estimulador do crescimento e da proliferação celular (discutido no Capítulo 17). O gene *Apc* está mutado em 80% dos cânceres de cólon humano (discutido no Capítulo 20). Essas mutações inibem a capacidade da proteína de se ligar à β-catenina, provocando o acúmulo da proteína no núcleo e a consequente estimulação da transcrição de *c-Myc* e de outros genes-alvo de Wnt, mesmo na ausência do sinal específico. O crescimento e a proliferação celular descontrolados resultantes promovem o desenvolvimento do câncer.

Várias proteínas inibidoras secretadas regulam a sinalização por Wnt durante o desenvolvimento. Algumas se ligam aos receptores LRP e promovem sua retrorregulação, enquanto outras competem com os receptores Frizzled pelas Wnt secretadas. Pelo menos em *Drosophila*, a Wnt ativa circuitos de retroalimentação negativa, nos quais os genes-alvo de Wnt codificam proteínas que ajudam a desligar a resposta; algumas destas proteínas inibem Dishevelled, e outras são inibidores secretados.

As proteínas Hedgehog se ligam a Patched, liberando a inibição por Smoothened

As proteínas Hedgehog e as proteínas Wnt atuam de maneira similar. Ambas são moléculas-sinal secretadas que atuam como mediadores locais e morfógenos em muitos tecidos em desenvolvimento, tanto em invertebrados como em vertebrados. Ambas são modificadas pela ligação covalente de lipídeos, dependem, para sua ação, de proteoglicanos secretados ou ligados à membrana (discutidos no Capítulo 19) e ativam proteínas reguladoras gênicas latentes pela inibição de sua proteólise. Elas também desencadeiam uma mudança de repressão transcricional para ativação, e a sinalização excessiva ao longo de ambas as vias nas células adultas pode levar ao câncer.

As **proteínas Hedgehog** foram descobertas em *Drosophila*, onde esta família proteica tem somente um membro. Mutação do gene *Hedgehog* produz uma larva coberta por prolongamentos pontiagudos (dentículos) lembrando um ouriço (em inglês, *hedgehog*, daí o nome). Em vertebrados, elas são codificadas por, pelo menos, três genes – *Sonic*, *Desert* e *Indian*. As formas ativas de todas as proteínas Hedgehog estão covalentemente ligadas ao colesterol, bem como a cadeias de ácidos graxos. O colesterol é adicionado durante um processamento incomum, no qual uma proteína precursora sofre autoproteólise e produz uma proteína-sinal menor contendo colesterol. A maior parte do que conhecemos sobre estas vias de sinalização *downstream* ativadas por Smoothened, contudo, advem de estudos genéticos em moscas, e resumiremos aqui a via nestes animais.

Três proteínas transmembrana – Patched, Smoothened e iHog – medeiam as respostas às proteínas Hedgehog. A **Patched** atravessa 12 vezes a membrana, e apesar de muitas delas estarem em vesículas intracelulares, algumas estão na superfície da célula onde se

ligam à proteína Hedgehog. As proteínas **iHog** têm quatro ou cinco domínios semelhantes a imunoglobulinas e dois ou três domínios semelhantes à fibronectina tipo III; eles estão na superfície e acredita-se que também sirvam como receptores para as Hedgehog, provavelmente atuando com Patched como correceptores. A **Smoothened** é uma proteína transmembrana de sete passos com uma estrutura semelhante à da Frizzled. Na ausência de um sinal de Hedgehog, a Patched mantém a Smoothened sequestrada nas vesículas intracelulares e inativa. Essa inibição é removida quando uma Hedgehog se liga a uma Patched e a uma iHog, induzindo a endocitose e a degradação de Patched. O resultado é que Smoothened torna-se fosforilada, se transloca para a superfície celular e transmite o sinal *downstream*.

Os efeitos *downstream* são mediados por uma proteína reguladora gênica latente denominada **Cubitus interruptus (Ci)**. Na ausência do sinal de Hedgehog, Ci é ubiquitinada e sofre proteólise nos proteossomos. Contudo, ao invés de ser totalmente degradada, ela é processada, gerando uma proteína menor, que se acumula no núcleo, onde atua como um repressor transcricional, ajudando a manter reprimidos alguns dos genes que respondem a Hedgehog. O processamento proteolítico da Ci depende de sua fosforilação por três serinatreonina-cinases – PKA e mais duas cinases também utilizadas na via da Wnt, chamadas de GSK3 e CK1. Como na via de Wnt, o processamento proteolítico ocorre em um complexo multiproteico. Este inclui a serinatreonina-cinase *Fused* e uma proteína de suporte *Costal2,* a qual faz uma associação estável com Ci, recruta as outras três cinases e liga o complexo aos microtúbulos, mantendo, assim, fora do núcleo a Ci não-processada (**Figura 15-78**A).

Quando a via de Hedgehog é ativada e, em consequência, a Smoothened é deixada livre na membrana plasmática, ela recruta o complexo proteico contendo Ci, Fused e Costal2. Esta última não pode mais se ligar às outras três cinases, e assim a Ci não é mais processada. A proteína não-processada pode agora entrar no núcleo, onde ativa a transcrição dos genes-alvo de Hedgehog (Figura 15-78B). O próprio *Patched* está entre os genes ativados por Ci; o aumento resultante na proteína Patched na superfície celular inibe a sinalização adicional por Hedgehog – o que é mais um exemplo de um circuito de retroalimentação negativa.

Muitas etapas na via de sinalização por Hedgehog ainda não estão esclarecidas. Não se sabe, por exemplo, como Patched mantém Smoothened inativa e intracelular. Já que a estrutura de Patched lembra a de uma proteína transportadora transmembrana, tem sido proposto que ela deva transportar uma pequena molécula para dentro da célula que manteria a Smoothened sequestrada nas vesículas.

Muito menos ainda se sabe sobre essa via nas células dos vertebrados. Além de existirem, pelo menos, três tipos de proteínas Hedgehog nessas células, existem três proteínas reguladoras gênicas semelhantes a Ci (*Gli1, Gli2* e *Gli3*) *downstream* de Smoothened. Somente em Gli3 foi evidenciado o processamento proteolítico como em Ci, e uma ação tanto de repressão como de ativação transcricional. Acredita-se que Gli1 e Gli2 atuem somente como ativadores transcricionais. Além disso, nos vertebrados, a Smoothened ativada se localiza em um sítio muito específico na membrana plasmática – a superfície do cílio primário, que se projeta da superfície da maioria dos tipos celulares de vertebrados (conforme discutido no Capítulo 16). O cílio primário atua, assim, como um centro de sinalização de Hedgehog, e as proteínas Ci também estão concentradas aí. É provável que essa organização aumente a velocidade e a eficiência do processo de sinalização.

A sinalização por Hedgehog promove proliferação celular, e a sinalização excessiva pode levar ao câncer. Por exemplo, as mutações que inativam um dos dois genes *Patched* em humanos, que resultam na sinalização excessiva por Hedgehog, ocorrem com frequência nos *carcinomas basocelulares* da pele, a forma mais comum de câncer nos caucasianos. Uma pequena molécula chamada de *ciclopamina*, sintetizada por um lírio do campo, tem sido utilizada no tratamento de cânceres associados com a sinalização excessiva por Hedgehog. Ela bloqueia essa sinalização por se ligar firmemente à Smoothened e inibir sua atividade. Ela foi originalmente identificada por causar defeitos graves no desenvolvimento da progênie de ovelhas que se alimentam destas plantas; entre os defeitos se encontra a presença de um único olho central (condição chamada de *ciclopia*), o que se observa também em camundongos deficientes na sinalização por Hedgehog.

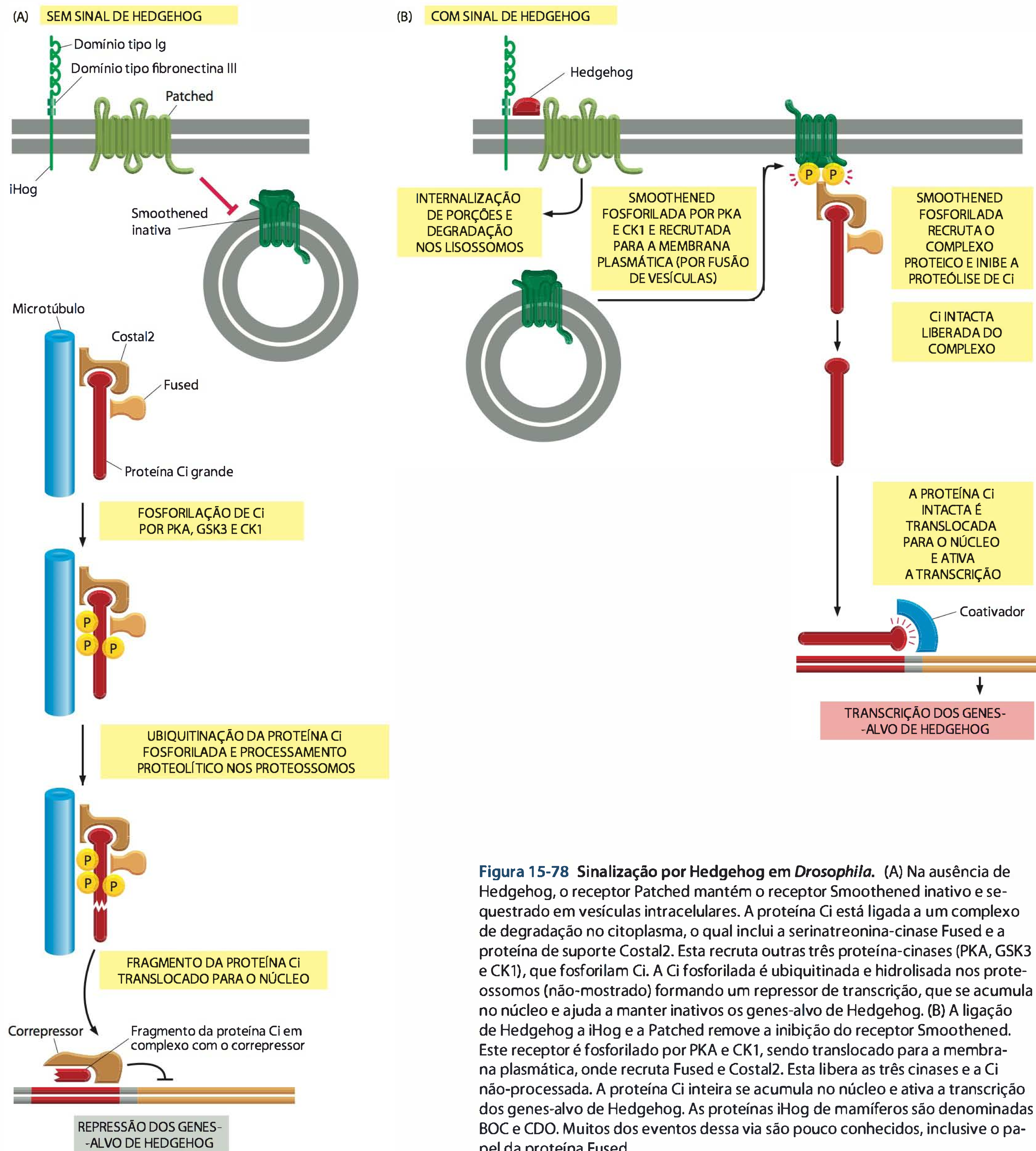


Figura 15-78 Sinalização por Hedgehog em *Drosophila*. (A) Na ausência de Hedgehog, o receptor Patched mantém o receptor Smoothened inativo e sequestrado em vesículas intracelulares. A proteína Ci está ligada a um complexo de degradação no citoplasma, o qual inclui a serinatreonina-cinase Fused e a proteína de suporte Costal2. Esta recruta outras três proteína-cinases (PKA, GSK3 e CK1), que fosforilam Ci. A Ci fosforilada é ubiquitinada e hidrolisada nos proteossomos (não-mostrado) formando um repressor de transcrição, que se acumula no núcleo e ajuda a manter inativos os genes-alvo de Hedgehog. (B) A ligação de Hedgehog a iHog e a Patched remove a inibição do receptor Smoothened. Este receptor é fosforilado por PKA e CK1, sendo translocado para a membrana plasmática, onde recruta Fused e Costal2. Esta libera as três cinases e a Ci não-processada. A proteína Ci inteira se acumula no núcleo e ativa a transcrição dos genes-alvo de Hedgehog. As proteínas iHog de mamíferos são denominadas BOC e CDO. Muitos dos eventos dessa via são pouco conhecidos, inclusive o papel da proteína Fused.

Os múltiplos estímulos estressantes e inflamatórios atuam por meio de uma via de sinalização dependente de NFκB

As **proteínas NFκB** são reguladoras gênicas latentes presentes na maioria das células animais e estão envolvidas na maioria das respostas do sistema imune estressantes, inflamatórias e inatas. Estas respostas fazem parte das reações a infecções ou a lesões e ajudam a proteger os organismos multicelulares estressados e suas células (discutido no Capítulo 24). No entanto, quando excessivas ou inapropriadas, essas respostas podem danificar os tecidos

e causar muita dor, e a inflamação crônica pode levar ao câncer; como acontece na sinalização por Wnt e Hedgehog, a sinalização excessiva por NFκB é encontrada em um grande número de cânceres humanos. Proteínas NFκB também possuem papéis importantes durante o desenvolvimento animal normal. O membro *Dorsal* da família das NFκB de *Drosophila*, por exemplo, tem um papel decisivo na especificação do eixo dorso-ventral no embrião em desenvolvimento (discutido no Capítulo 22).

Vários receptores de superfície celular ativam a via de sinalização da NFκB nas células animais. Os *receptores Toll* na *Drosophila* e os *receptores tipo Toll* nos vertebrados, por exemplo, reconhecem patógenos e ativam esta via no desencadeamento das respostas imunes inatas (discutido no Capítulo 24). Os receptores do *fator α de necrose tumoral* (*TNFα, tumor necrosis factor α*) e da *interleucina-1 (IL1)*, os quais são citocinas de vertebrados importantes na indução de respostas inflamatórias, também ativam esta via. Os receptores Toll, tipo Toll e IL1 pertencem à mesma família de proteínas, enquanto o receptor TNF pertence a uma família diferente; todos eles, no entanto, atuam de forma semelhante na ativação da NFκB. Quando ativados, desencadeiam uma ubiquitinação multiproteica e uma cascata de fosforilações que libera a NFkB de um complexo proteico inibidor, possibilitando sua translocação para o núcleo, onde ativa centenas de genes que participam nas respostas imunes inflamatórias e inatas.

Nos mamíferos existem cinco proteínas NFκB (*RelA*, *RelB*, *c-Rel*, *NFκB1* e *NFκB2*), que formam uma variedade de homo e heterodímeros, e cada uma delas ativa um grupo específico de genes. As proteínas inibidoras chamadas de **IκB** ligam-se firmemente aos dímeros e os mantém inativos no citoplasma das células não-estimuladas. Existem três proteínas IκB principais em mamíferos (IκBα, β e ε), e os sinais que liberam os dímeros de NFκB o fazem porque desencadeiam uma via de sinalização que promove a fosforilação, a ubiquitinação e a posterior degradação das proteínas IκB. A fosforilação de IκB é mediada pela *IκB-cinase* (*IKK*), que constitui um complexo multiproteico contendo duas serinatreonina-cinases (IKKα e IKKβ) e uma proteína reguladora chamada de *NEMO* (modificador essencial de NfκB, de *NFκB essential modifier*), ou IKKγ (**Figura 15-79**).

Entre os genes ativados pela NFκB liberada está aquele que codifica IκBα, uma das três isoformas de IkB que mantém a NFκB inativa no citosol de células em repouso. Esta ativação leva à ressíntese da proteína IκBα, a qual se liga à NFκB e a inativa, criando um circuito de retroalimentação negativa (**Figura 15-80**A). Experimentos envolvendo respostas induzidas por TNFα, bem como estudos de modelagem computacional das respostas, indicam que a

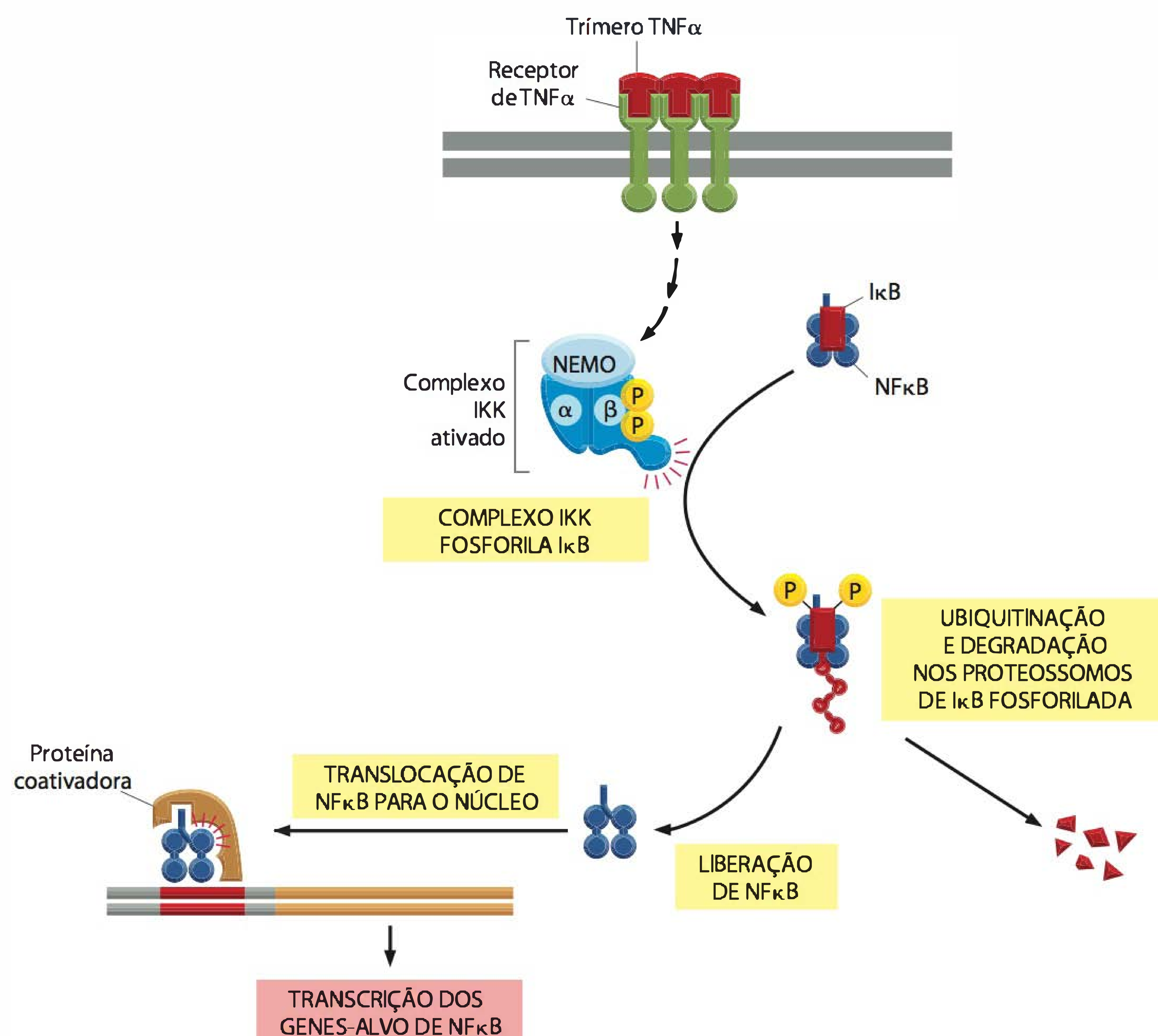


Figura 15-79 Ativação da via de NFkB por TNFα. A TNFα e seus receptores são trímeros. A ligação de TNFα induz o rearranjo das caudas citosólicas dos receptores, que recrutam um grande número de proteínas sinalizadoras intracelulares, resultando na ativação de uma serinatreonina-cinase que fosforila e ativa uma IkB-cinase-cinase (IKK). IKK é um heterotrímero formado por duas subunidades cinásicas (IKKα e IKKβ) e uma subunidade reguladora chamada de NEMO. A IKKβ fosforila duas serinas de IkB, marcando a proteína para ser ubiquitinada e degradada nos proteossomos. A NFkB livre é translocada para o núcleo onde, em colaboração com proteínas coativadoras, estimula a transcrição dos seus genes-alvo.

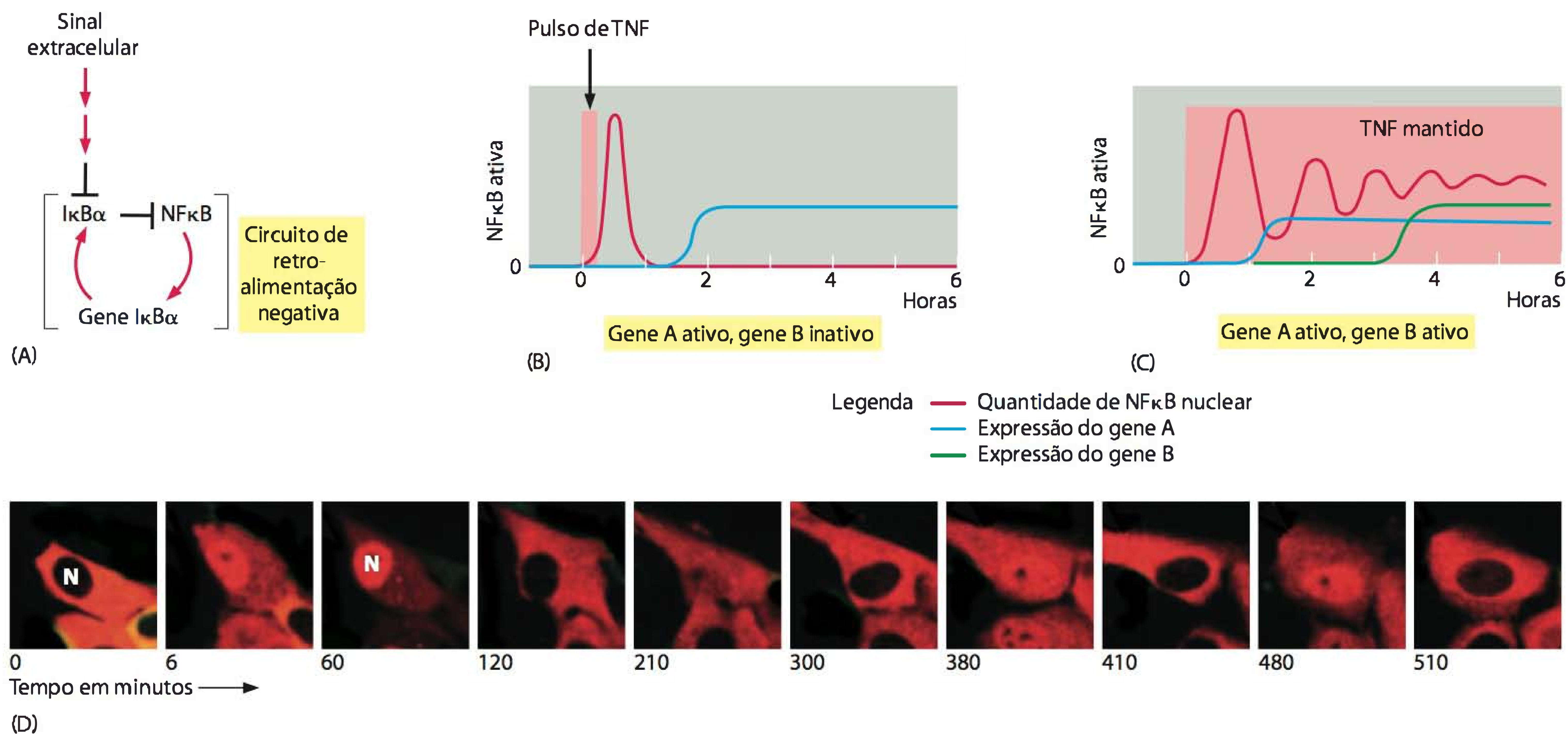


Figura 15-80 A retroalimentação negativa na via de sinalização de NFκB induz oscilações na ativação da proteína. (A) O esquema mostra como NFκB ativada estimula a transcrição de IkBα, cujo produto proteico atua retroativamente no sequestro de NFκB no citoplasma; se o estímulo for persistente, as novas moléculas de IkBα sintetizadas serão ubiquitinadas e degradadas, liberando NFκB ativa novamente, que poderá retornar ao núcleo e ativar a transcrição (ver Figura 15-79). (B) Uma exposição curta a TNFα produz um único pulso curto de ativação de NFκB, começando em minutos e terminando em uma hora. Esta resposta induz a transcrição do gene A, mas não do gene B. (C) Uma exposição a TNFα mantida durante o período de 6 horas do experimento produz oscilações na ativação de NFκB que se extinguem ao longo do tempo. Esta resposta induz a transcrição de ambos os genes; o gene B é induzido somente após várias horas, indicando que sua transcrição requer ativação prolongada de NFκB, por razões ainda desconhecidas. (D) Estas micrografias de fluorescência confocal em intervalos de tempo, obtidas em um outro experimento de estimulação de TNFα, mostram as oscilações de NFκB em uma célula em cultura, como indica o movimento periódico para dentro do núcleo (N) de uma proteína de fusão composta por NFκB mais uma proteína fluorescente vermelha. Na célula mostrada na parte superior da micrografia, NFκB está ativa e dentro do núcleo, nos tempos de 6, 60, 210, 380 e 480 minutos, mas está exclusivamente no citoplasma nos tempos de 0, 120, 300, 410 e 510 minutos. (A-C, com base em dados de A. Hoffmann et al., *Science* 298:1241-1245, 2002, e adaptada de A. Y. Ting e D. Endy, *Science* 298:1189-1190, 2002; D, de D. E. Nelson et al., *Science* 306:704-708, 2004. Todos com permissão de AAAS.)

retroalimentação negativa produz dois tipos de resposta à NFκB, dependendo da duração do estímulo por TNFα; a curta exposição (menos de uma hora) à TNFα produz um período curto de ativação de NFκB que é independente da duração do estímulo TNFα; a retroalimentação negativa por meio de IκBα desliga a resposta depois de uma hora. A exposição prolongada, em contraste, produz oscilações lentas da ativação por NFκB, nas quais a ativação é seguida por inativação mediada por IκBα, que é seguida por sua destruição e reativação de NFκB, e assim por diante; as oscilações podem persistir por várias horas antes de desaparecerem, mesmo com a manutenção do estímulo. É importante salientar que os dois tipos de resposta induzem padrões diferentes de expressão gênica, pois alguns genes-alvo de NFκB são ativados somente em resposta à ativação oscilatória prolongada de NFκB (Figura 15-80B, C e D). A retroalimentação negativa por meio de IκBα é requerida em ambos os tipos de resposta: em células deficientes em IκBα, mesmo uma exposição curta ao TNFα induz uma ativação de NFκB sustentada, sem oscilações, e todos os seus genes-alvo são ativados.

Até agora discutimos a sinalização celular principalmente em animais, com alguns exemplos também em leveduras e em bactérias. Contudo, a sinalização intercelular é tão importante para as plantas como é para os animais, embora os mecanismos e as moléculas utilizadas sejam muito diferentes, como veremos a seguir.

Resumo

Algumas vias de sinalização importantes no desenvolvimento animal dependem de proteólise para controlar a atividade e a localização de proteínas reguladoras gênicas latentes. Os receptores Notch pertencem a este tipo de proteínas e são ativados por proteólise, após a ligação de Delta (ou de um ligante relacionado) de outra célula; a cauda citosólica liberada migra para o núcleo, onde estimula a transcrição de genes de resposta a Notch. Na via de sinalização Wnt/β-catenina, ao contrário, a proteólise da proteína reguladora gênica β-catenina é inibida quando as proteínas Wnt secretadas se ligam às proteínas receptoras Frizzled e LRP; como resultado, a β-catenina se acumula no núcleo e ativa a transcrição dos genes-alvo de Wnt.

A sinalização pela proteína Hedgehog em moscas funciona de forma semelhante à de Wnt. Na ausência do sinal, a proteína reguladora gênica citoplasmática bifuncional Ci é processada proteoliticamente, formando um repressor transcricional que mantém reprimidos os genes-alvo de Hedgehog. A ligação de Hedgehog aos seus receptores (Patched e iHog) inibe o processamento de Ci; como resultado, uma forma maior de Ci se acumula no núcleo e ativa a transcrição dos genes-alvo de Hedgehog. Na sinalização por Notch, Wnt e Hedgehog, o sinal extracelular desencadeia a troca de repressão transcricional para ativação.

A sinalização por meio da proteína reguladora gênica latente NFκB também depende de proteólise. Essa proteína normalmente é mantida inativa, no citoplasma, por proteínas inibidoras IκB. Uma grande variedade de estímulos extracelulares, entre os quais as citocinas pró-inflamatórias,

inicia uma cascata de fosforilação e ubiquitinação de IκB, marcando-a para degradação; isso permite a translocação de NFκB para o núcleo e a ativação da transcrição dos seus genes-alvo. NFκB ativa também a transcrição dos genes que codificam IκBα, criando um circuito de retroalimentação negativa, o que pode produzir, com a sinalização extracelular sustentada, oscilações prolongadas na atividade de NFκB.

SINALIZAÇÃO EM PLANTAS

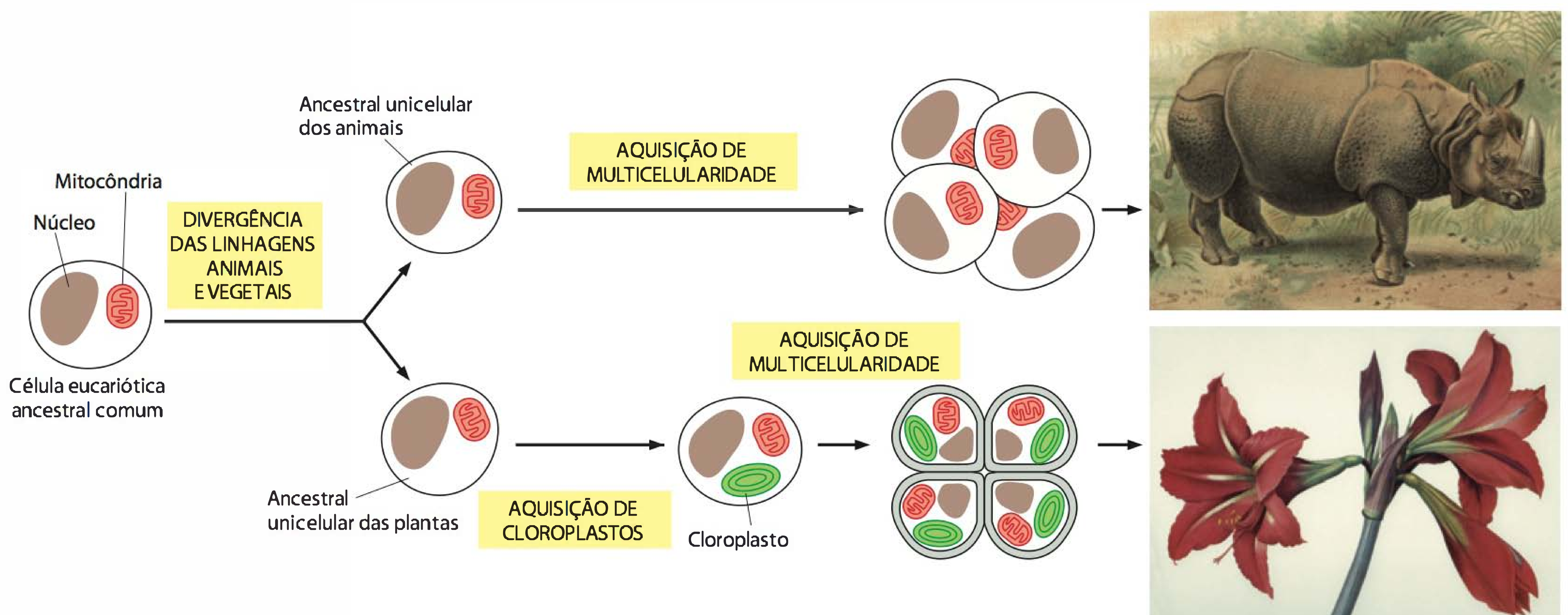
Nas plantas, como nos animais, as células estão em constante comunicação umas com as outras. As células vegetais se comunicam para coordenar suas atividades em resposta a mudanças nas condições de luz, de escuridão e de temperatura que orientam o ciclo de crescimento, de florescimento e de frutificação. Elas também se comunicam para coordenar o que acontece em suas raízes, seus ramos e suas folhas. Nesta seção final, consideraremos como as células vegetais sinalizam umas para as outras e como respondem à luz. Sabe-se pouco sobre os receptores e os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos na comunicação celular em plantas, e nos concentraremos nos aspectos que os diferenciam daqueles utilizados pelos animais. No Capítulo 22, serão discutidos alguns detalhes do desenvolvimento das plantas.

A multicelularidade e a comunicação celular evoluíram independentemente em plantas e animais

Embora as plantas e os animais sejam eucariotos, eles evoluíram separadamente por mais de um bilhão de anos. Seu último ancestral comum foi um eucarioto unicelular que possuía mitocôndrias, mas não cloroplastos. A linhagem vegetal adquiriu cloroplastos depois que as plantas e os animais divergiram. Os primeiros fósseis de animais e de plantas multicelulares datam de, aproximadamente, 600 milhões de anos. Assim, parece que a multicelularidade nas plantas e nos animais evoluiu independentemente entre 1,6 e 0,6 bilhão de anos atrás, cada um deles começando de um eucarioto unicelular diferente (**Figura 15-81**).

Se a multicelularidade evoluiu independentemente nas plantas e nos animais, as moléculas e os mecanismos usados para a comunicação também devem ter evoluído separadamente, e espera-se que sejam diferentes. Contudo, deve haver algum grau de semelhança, já que os genes das plantas e dos animais divergiram a partir daqueles existentes no último ancestral unicelular comum a ambos. Assim, enquanto o óxido nítrico, o GMP cíclico, o Ca^{2+} e as GTPases da família Rho são amplamente utilizados para sinalização tanto nas plantas como nos animais, não existem homólogos para a família dos receptores nucleares Ras, JAK, STAT, TGFβ, Notch,Wnt ou Hedgehog codificados pelo genoma completamente sequenciado da pequena planta *Arabidopsis thaliana*. Da mesma forma, as plantas não usam o cAMP na sinalização intracelular.

Figura 15-81 Divergência proposta para as linhagens animais e vegetais a partir de um ancestral eucarioto unicelular comum. Após a divergência, a linhagem vegetal adquiriu cloroplastos. Ambas as linhagens originaram, independentemente, organismos multicelulares – plantas e animais. (Desenhos cortesia de John Innes Foundation.)



Muito do que se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sinalização das plantas é proveniente de estudos genéticos em *Arabidopsis*. Embora as moléculas específicas utilizadas na comunicação celular das plantas sejam diferentes das usadas pelas células animais, as estratégias gerais são, frequentemente, muito semelhantes. Por exemplo, os receptores de superfície associados a enzimas são utilizados por ambos, como veremos a seguir.

A classe dos receptores serinatreonina-cinases é a maior entre os receptores de superfície celular nas plantas

Enquanto a maioria dos receptores de superfície nos animais é a dos GPCRs, a maioria encontrada até agora nas plantas é a dos associados a enzimas. Além disso, enquanto nos animais a maior classe de receptores associados a enzimas é a dos RTKs, este tipo de receptor é extremamente raro em plantas. Elas possuem, contudo, muitas tirosina-cinases citoplasmáticas, e a fosforilação e a desfosforilação de tirosinas têm papel importante na sinalização das células vegetais. Ao invés dos receptores associados a enzimas, as plantas parecem contar com uma grande diversidade de *receptores serinatreonina-cinases* transmembrana. Embora sejam, em muitos aspectos, muito diferentes dos receptores animais correspondentes, eles são semelhantes por possuírem um domínio serinatreonina-cinase citoplasmático típico e um domínio extracelular de interação com ligantes. Os tipos mais abundantes têm um arranjo extracelular de repetições ricas em leucina (**Figura 15-82**), sendo, por isso, denominados **receptores com repetições ricas em leucina** (**LRR**, *leucine-rich repeat*).

O genoma de *Arabidopsis* possui cerca de 175 genes para os receptores LRR. Um dos exemplos melhor estudados é o complexo *receptor Clavata1/Clavata2* (*Clv1/Clv2*). As mutações que inativam qualquer uma das duas subunidades do receptor induzem a produção de flores com órgãos florais extra e com um aumento progressivo nos *meristemas* florais e do caule, que são grupos de células que se autorrenovam, produzindo as células que darão origem aos ramos, às folhas e às flores (discutido no Capítulo 22). Acredita-se que a molécula-sinal extracelular seja uma pequena proteína chamada de *Clv3*, secretada pelas células vizinhas. A ligação de Clv3 ao seu receptor Clv1/Clv2 suprime o crescimento do meristema pela inibição da divisão celular ou, mais provavelmente, pela estimulação da diferenciação celular (**Figura 15-83**A).

A via de sinalização intracelular desde Clv1/Clv2 até a resposta celular é pouco conhecida, mas sabe-se que existe uma serinatreonina-fosfatase que inibe a sinalização. Outras proteínas sinalizadoras na via incluem uma GTPase da família Rho e uma proteína reguladora gênica relacionada, de longe, às proteínas animais dotadas de homeodomínios. As mutações que inativam essa proteína reguladora têm o efeito contrário de mutações que inativam o receptor Clv1/Clv2: a divisão celular é muito reduzida no meristema germinal, e a planta produz flores com poucos órgãos florais. Assim, parece que a via de sinalização intracelular ativada pelo receptor Clv1/Clv2 estimula a diferenciação celular por meio da inibição da proteína reguladora gênica que, normalmente, inibe a diferenciação (Figura 15-83B).

Na *Arabidopsis*, um receptor LRR diferente, chamadode de *Bri1*, faz parte de um receptor de superfície para hormônios esteroides. As plantas sintetizam uma classe de esteroi-

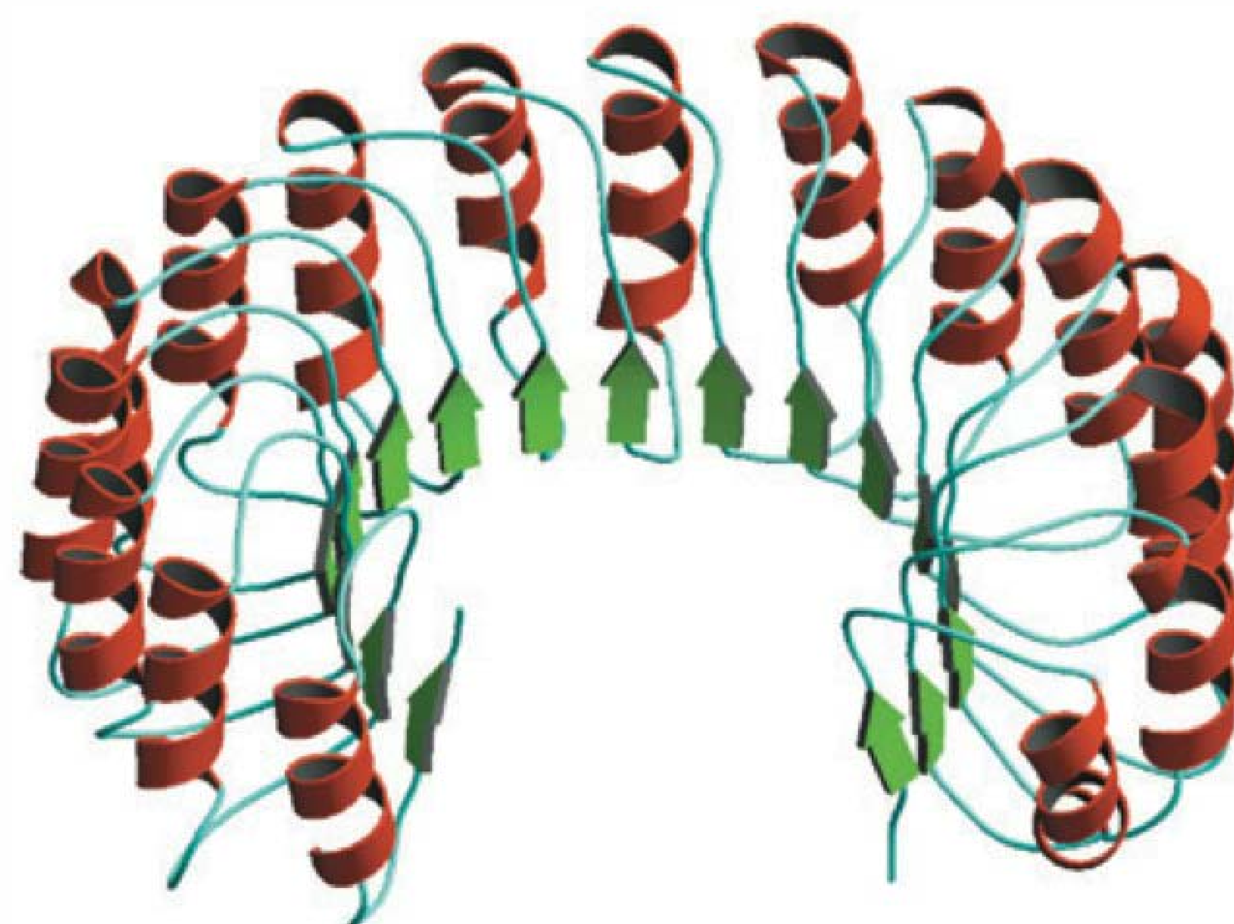
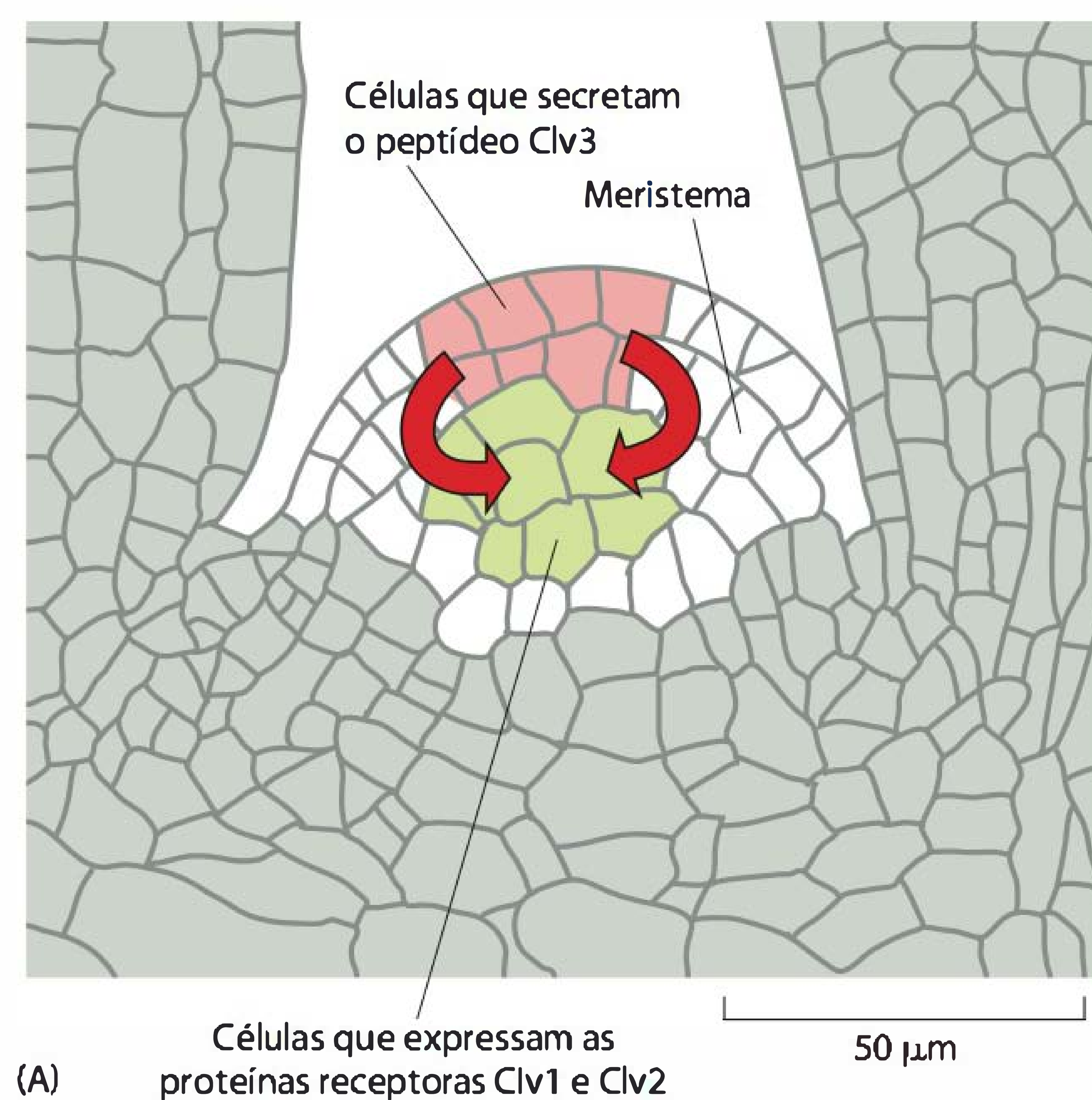


Figura 15-82 Estrutura tridimensional das repetições ricas em leucina, similares às encontradas nos receptores serinatreonina-cinases LRR. Múltiplas cópias destas repetições estão presentes no domínio extracelular dos receptores LRR, onde participam na ligação da molécula-sinal. (Cortesia de David Lawson.)



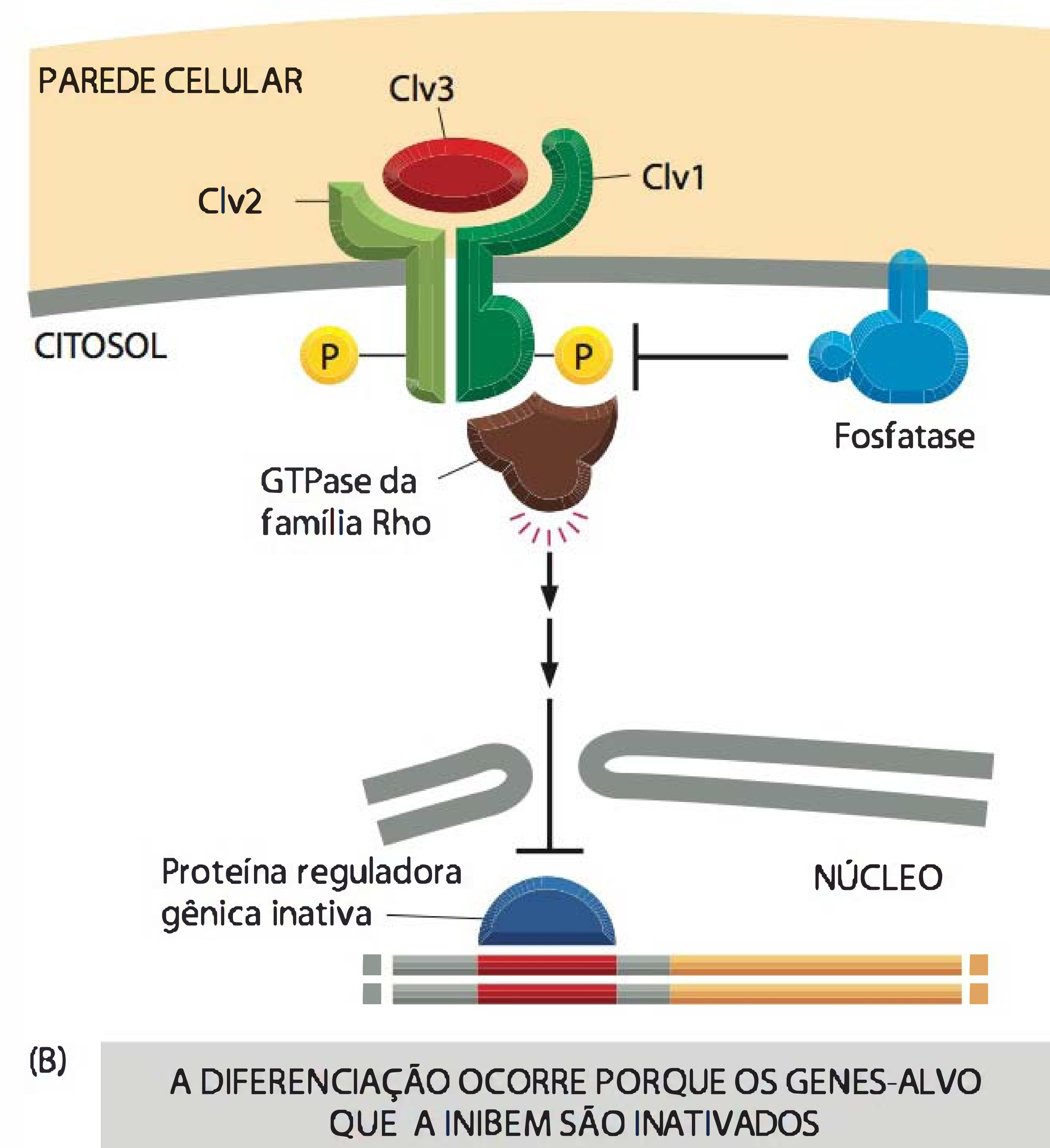


Figura 15-83 Modelo hipotético de regulação, pelo Clv3 e pelo receptor serinatreonina-cinase Clv1/Clv2, da proliferação celular e/ou diferenciação no meristema do caule. (A) As células da camada externa do meristema (*verde claro*) secretam a proteína Clv3, que se liga ao receptor Clv1/Clv2 de células-alvo em uma região adjacente mais central do meristema (*verde*), estimulando a diferenciação dessas células. (B) Algumas partes da via de sinalização intracelular ativada pela ligação de Clv3. Clv1 fosforila as serinas das proteínas receptoras, ativando assim o complexo receptor e levando à ativação da GTPase da família Rho. A via ainda não está esclarecida deste ponto em diante, mas sabe-se que ocorre a inibição, no núcleo, de uma proteína reguladora gênica chamada de Wuschel. Como esta proteína normalmente bloqueia a transcrição de genes necessários para a diferenciação, a inibição da sinalização de Clv3 torna a diferenciação possível. A proteína-fosfatase desfosforila as proteínas receptoras e, assim, regula negativamente a via de sinalização.

des chamados de **brassinoesteroides** porque foram identificados originalmente na família Brassicaceae, da qual a *Arabidopsis* é um representante. Estas moléculas-sinal regulam o crescimento e a diferenciação da planta por todo o seu ciclo de vida. A ligação de um brassinoesteroide a um receptor Bri1 na superfície celular inicia uma cascata de sinalização que usa uma cinase GSK3 e uma fosfatase para regular a fosforilação e a desfosforilação de proteínas reguladoras gênicas específicas no núcleo, regulando, dessa forma, a transcrição gênica específica. As plantas mutantes deficientes no receptor Bri1 são insensíveis aos brassinoesteroides e por isso são anãs.

Os receptores LRR são apenas uma das muitas classes de receptores serinatreonina-cinases transmembrana em plantas. Existem, pelo menos, mais seis famílias, cada uma com seu próprio conjunto de domínios extracelulares. Os *receptores de lecitinas*, por exemplo, possuem domínios extracelulares que interagem com moléculas-sinal do tipo carboidrato. O genoma de *Arabidopsis* codifica mais de 300 receptores serinatreonina-cinases, sendo essa a maior família de receptores conhecida em plantas. Muitos desses receptores estão envolvidos em respostas de defesa contra patógenos.

O etileno bloqueia a degradação de proteínas reguladoras gênicas específicas no núcleo

Vários **reguladores de crescimento** (também chamados de **hormônios vegetais**) participam no controle do desenvolvimento das plantas. Entre eles estão o *etileno*, a *auxina*, as *citocinas*, as *giberilinas* e o *ácido abscísico*, bem como os brassinoesteroides. Todos se difundem facilmente através da parede celular, podendo agir localmente ou serem transportados para agir sobre células mais distantes. Cada regulador de crescimento pode ter múltiplos efeitos. O efeito específico depende das condições ambientais, do estado nutricional da planta, da capacidade de resposta da célula-alvo e da atuação de outros reguladores de crescimento.

O **etileno** é um exemplo importante. Esta pequena molécula gasosa (**Figura 15-84**A) influencia no desenvolvimento da planta de várias maneiras; ela pode, por exemplo, promover a maturação dos frutos, a queda das folhas e a senescência. Também funciona como um sinal de estresse em resposta a lesão, infecção, hemorragia, etc. Quando o caule de uma plântula recém-germinada, por exemplo, encontra um obstáculo, como um cascalho no solo, a plântula responde a ele de três maneiras. Primeiro, o caule torna-se espessado, o que permite que exerça mais força sobre o obstáculo. Em segundo lugar, a plântula protege a ponta do caule aumentando a curvatura de uma estrutura especializada em forma de gancho. Em terceiro lugar, ela reduz a tendência do caule de crescer contra a gravidade, para evitar o obstáculo. Essa *resposta tripla* é controlada pelo etileno (Figura 15-84B e C).

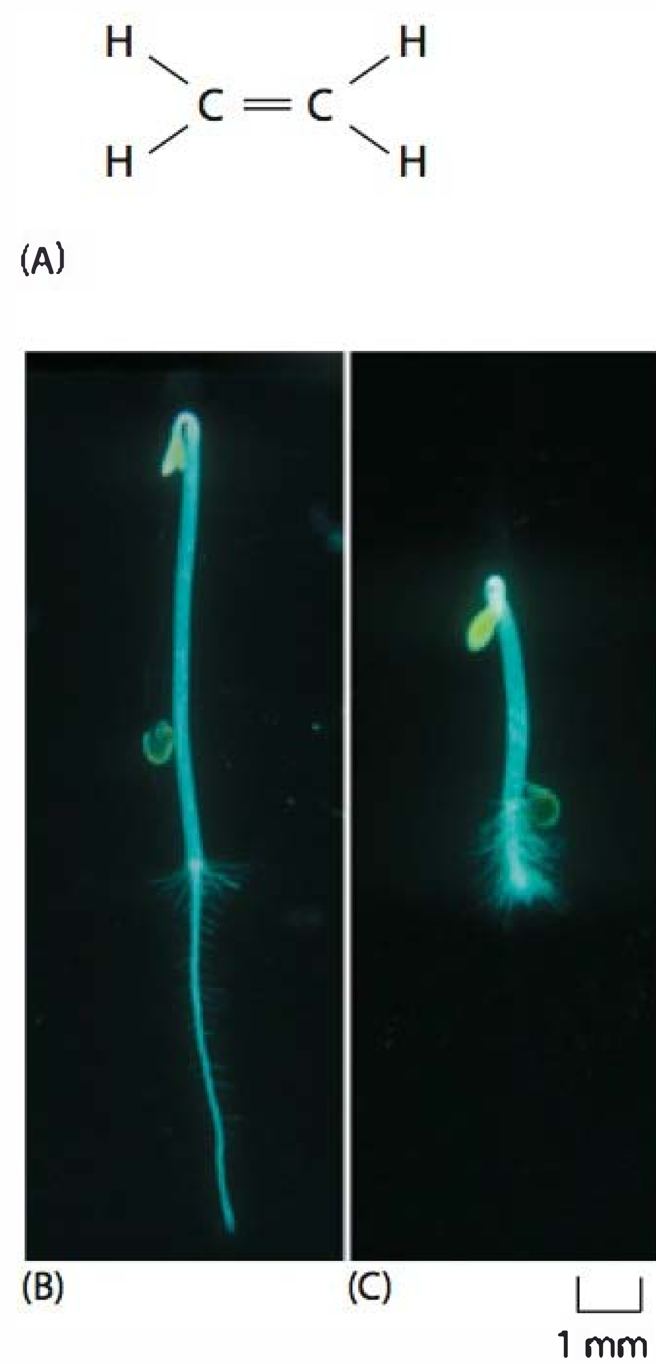


Figura 15-84 Resposta tripla, mediada pelo etileno, que acontece quando o caule de uma plântula recém-germinada encontra um obstáculo no solo. (A) Estrutura do etileno. (B) Antes de encontrar o obstáculo, o caule é longo e fino e cresce para cima. (C) Após o encontro, o caule se espessa e o gancho protetor (*no alto*) acentua sua curvatura para proteger a extremidade do caule. A direção do crescimento também é alterada, e o caule cresce ao redor do obstáculo (não-mostrado). (Cortesia de Melanie Webb.)

As plantas possuem vários receptores para etileno, com estrutura semelhante e localizados no RE. São proteínas transmembrana diméricas com um domínio de ligação ao etileno contendo um átomo de cobre, e um domínio que interage com uma proteína chamada de *CTR1*, cuja sequência está intimamente relacionada com a MAP-cinase-cinase-cinase Raf, discutida anteriormente (ver Figura 15-60). A função da CTR1 na sinalização pelo etileno depende de sua atividade de serinatreonina-cinase e da associação de seu domínio N-terminal com o receptor do etileno. Surpreendentemente, os receptores vazios é que são ativos e mantêm a CRT1 ativa. Por um mecanismo de sinalização desconhecido, a CRT1 ativa estimula a ubiquitinação e a degradação nos proteossomos de uma proteína reguladora gênica nuclear chamada de *EIN3*, requerida para a transcrição dos genes de resposta ao etileno. Desta forma, os receptores vazios, mas ativos, e a CTR1 ativa mantêm esses genes desligados. A proteína EIN tem este nome pelo fato de as plantas com mutações que inativam o gene que a codifica serem insensíveis ao etileno.

A ligação do etileno inativa os receptores, alterando sua conformação de forma que eles não se ligam mais à CTR1. Como resultado, a CTR1 é inativada, e a via de sinalização *downstream* a partir dela é bloqueada; a proteína EIN3 não é ubiquitinada nem degradada, podendo agora ativar a transcrição de um grande número de genes de resposta ao etileno (**Figura 15-85**).

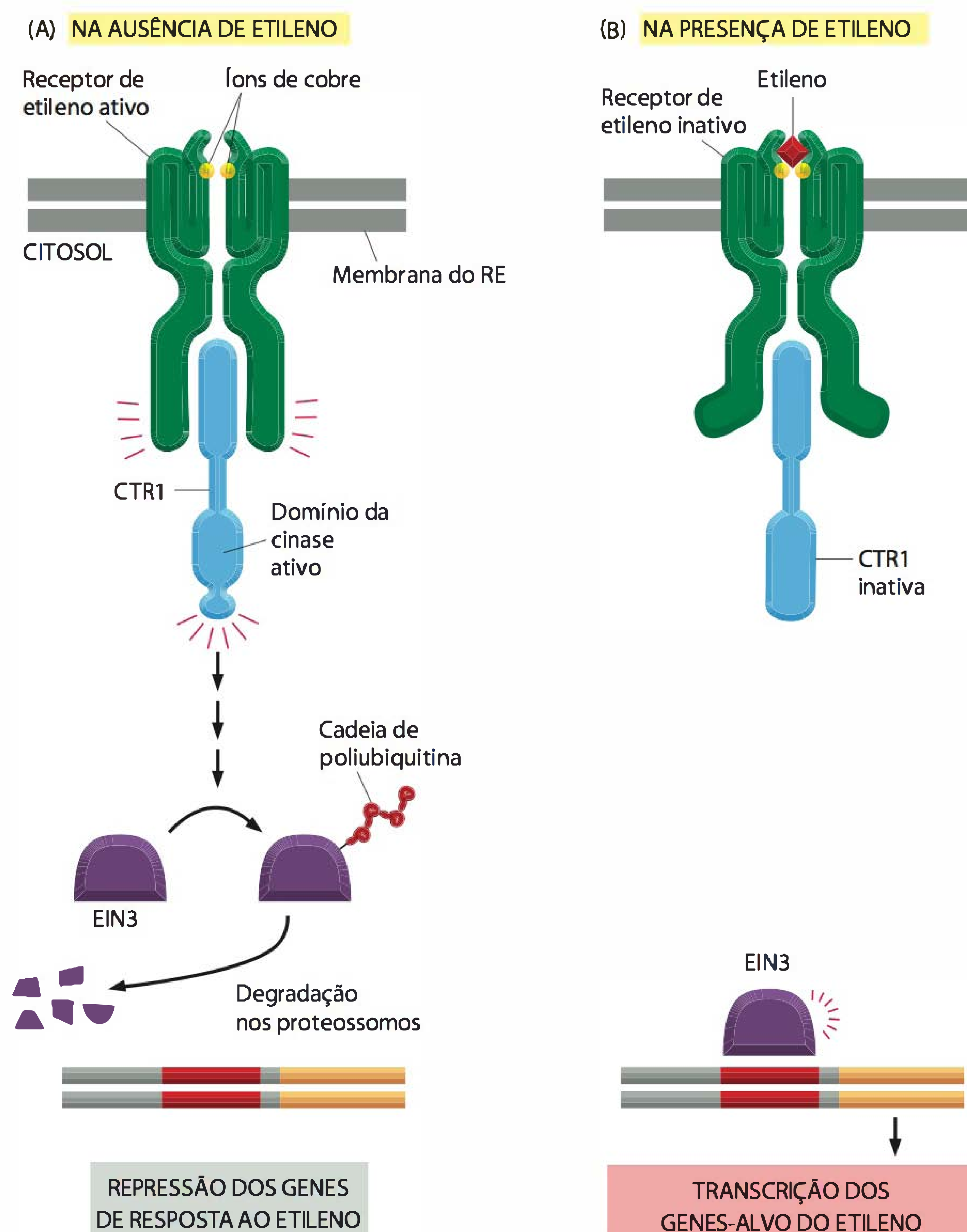


Figura 15-85 Visão atual da via de sinalização do etileno. (A) Na ausência do etileno, os receptores e a CTR1 estão ativos, causando a ubiquitinação e destruição de EIN3, uma proteína reguladora gênica que é responsável pela transcrição dos genes de resposta ao etileno. (B) A ligação do etileno inativa os receptores e rompe a interação entre eles e a CRT1. A proteína EIN3 não é degradada e, portanto, ativa a transcrição dos genes de resposta ao etileno.

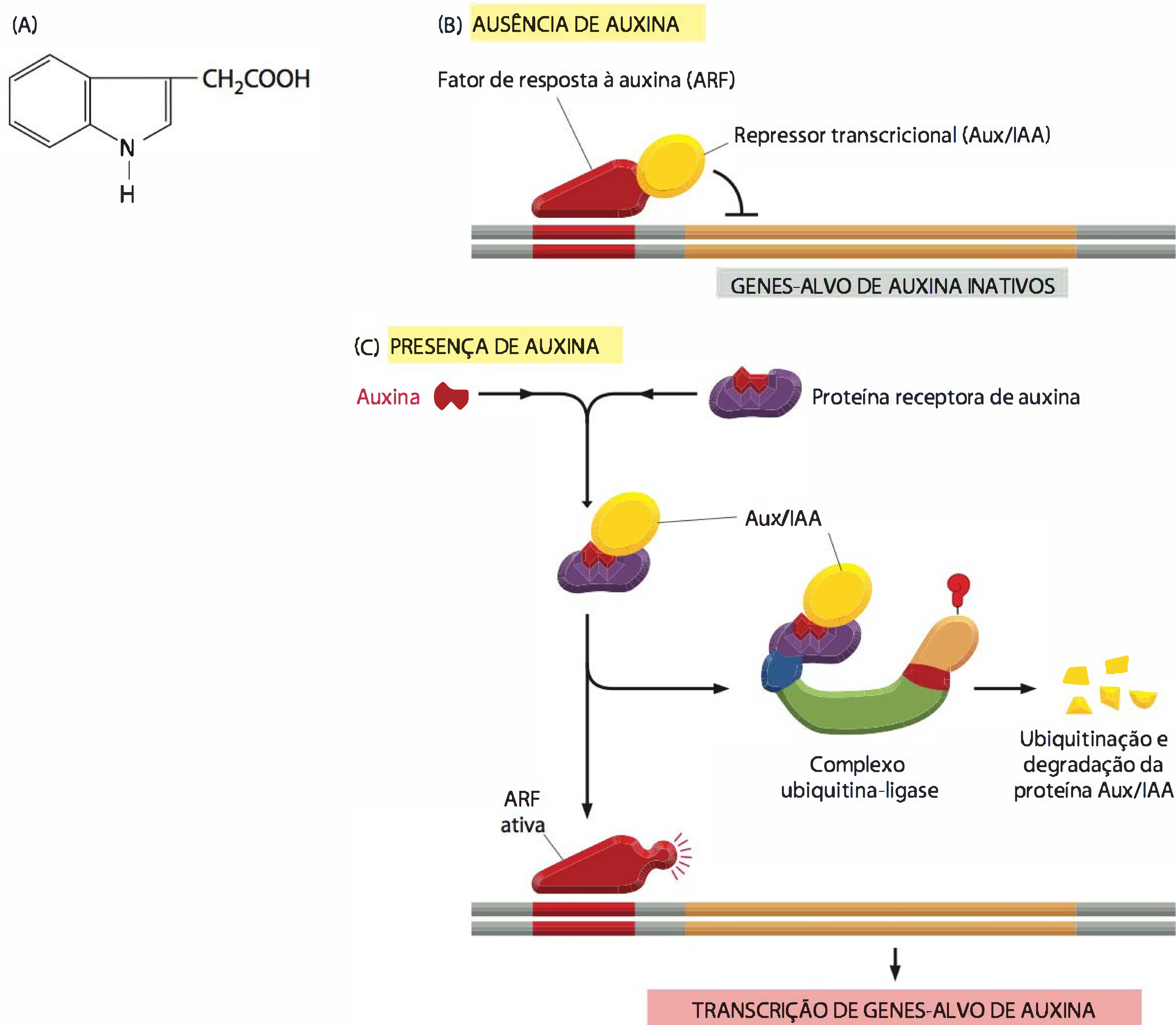


Figura 15-86 Via de sinalização da auxina. (A) Estrutura do ácido indol-3-acético de auxina. (B) Na ausência de auxina, uma proteína repressora de transcrição (chamada de Aux/IAA) se liga a uma proteína reguladora gênica (chamada de fator de resposta à auxina, ARF, *auxin-response factor*) e a inibe. Esta é requerida para a transcrição dos genes de resposta à auxina. (C) As proteínas receptoras de auxina estão localizadas principalmente no núcleo e fazem parte dos complexos de ubiquitina-ligase (não-mostrado). Uma vez ativado pela ligação da auxina, o complexo receptor-auxina recruta o complexo ubiquitina-ligase, que ubiquitina as proteínas Aux/IAA, marcando-as para degradação nos proteossomos. A proteína ARF está agora livre para ativar a transcrição dos genes de resposta à auxina. Existem muitas proteínas ARF, Aux/IAA e receptores de auxina que atuam conforme mostra a ilustração.

Uma estratégia um pouco diferente está envolvida na regulação dos genes de resposta à *auxina*. Além disso, a maneira pela qual a auxina controla a direção e o padrão de crescimento de plantas é diferente de qualquer mecanismo observado em animais, conforme será discutido agora.

O posicionamento regulado dos transportadores de auxina modela o crescimento das plantas

O hormônio vegetal **auxina**, que geralmente é o ácido indol-3-acético (**Figura 15-86**A), liga-se a proteínas receptoras no núcleo. Ele ajuda as plantas a crescerem na direção da luz e para cima, ao invés de ramificarem, e garante o crescimento das raízes para baixo. Ele também regula a iniciação e o posicionamento dos órgãos, além de ajudar na floração e na produção de frutos. Tal como o etileno, ele interfere na transcrição gênica por controlar a degradação de proteínas reguladoras gênicas no núcleo; contudo, ao invés de bloquear a ubiquitinação e a degradação das proteínas reguladoras necessárias à expressão dos genes de resposta à auxina, estimula a ubiquitinação e a degradação de proteínas repressoras que bloqueiam a transcrição destes genes nas células não-estimuladas (Figura 15-86B e C).

A auxina é única na maneira como é transportada. Ao contrário dos hormônios animais, que em geral são secretados por um órgão endócrino específico e transportados pelo sistema circulatório para as células-alvo, a auxina tem seu próprio sistema de transporte. *Proteínas transportadoras de influxo* e *proteínas transportadoras de efluxo* específicas ligadas à membrana plasmática movem a auxina, respectivamente, para dentro e para fora das células vegetais. Famílias gênicas distintas codificam os transportadores de influxo e os de efluxo, e as duas famílias de proteínas têm regulação independente. Os transportadores de efluxo são compostos pelas *proteínas Pin*, e as células podem distribuí-las assimetricamente na membrana plasmática para direcionar o efluxo da auxina. Uma fileira de células com seus transportadores de efluxo confinados na membrana basal, por exemplo, transportará auxina do topo da planta para a base.

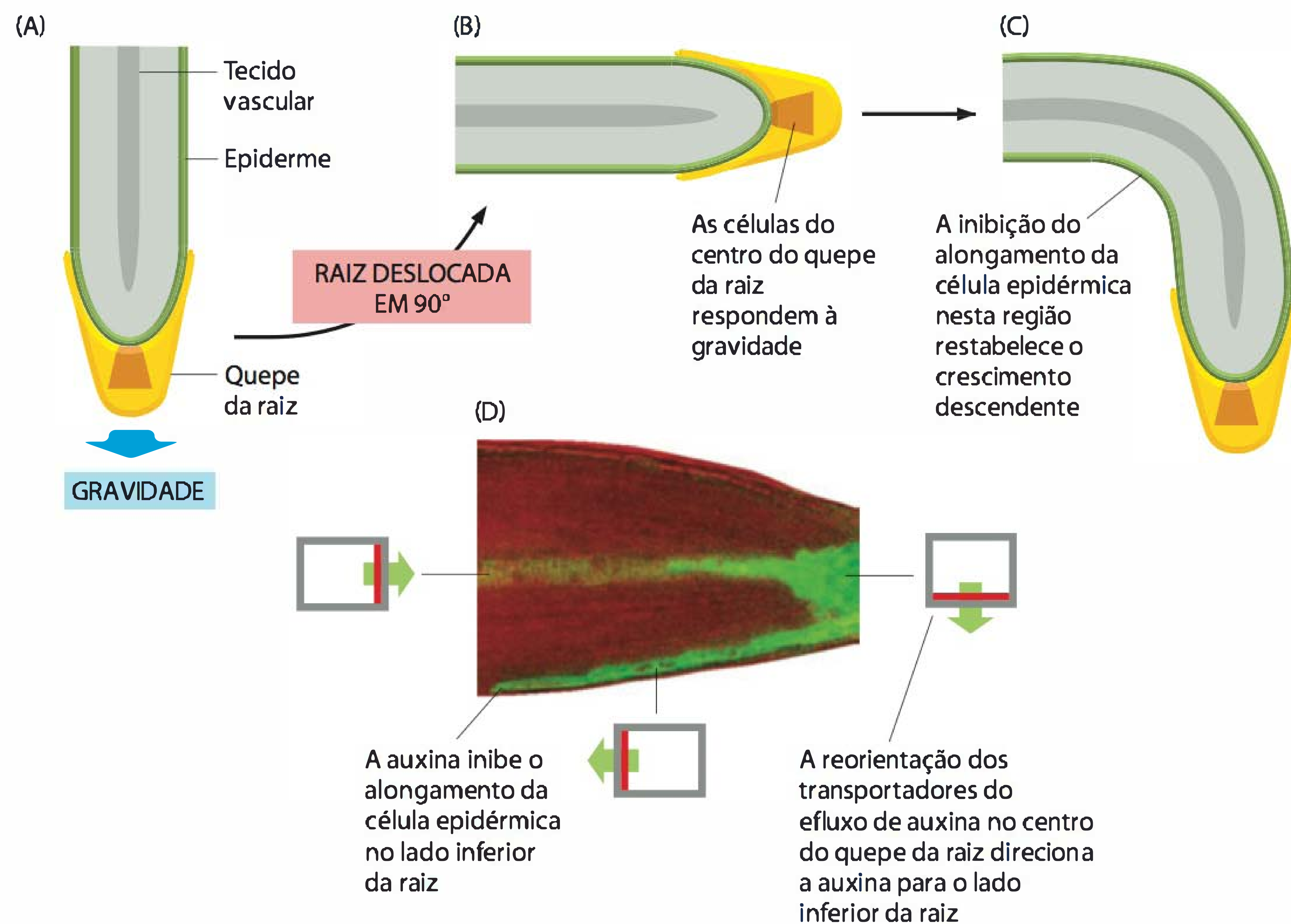


Figura 15-87 Transporte de auxina e gravitropismo. (A-C) As raízes respondem a uma mudança de 90° na orientação gravitacional e ajustam sua direção de crescimento de forma que voltam a crescer na direção descendente. As células que respondem à gravidade estão no centro do quepe da raiz, enquanto as células epidérmicas localizadas mais para trás (no lado inferior) reduzem sua taxa de alongamento para restaurar o crescimento descendente. (D) As células que respondem à gravidade no quepe da raiz redistribuem seus transportadores de efluxo de auxina em resposta ao deslocamento da raiz. Isso redireciona o fluxo de auxina principalmente para a parte inferior da raiz, onde inibe o alongamento das células epidérmicas. A distribuição assimétrica de auxina resultante na ponta da raiz de *Arabidopsis* mostrada aqui é determinada indiretamente, pelo uso de um gene repórter responsivo à auxina que codifica uma proteína fusionada à proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*); as células epidérmicas do lado inferior da raiz são verdes, enquanto as do lado superior não são, refletindo a distribuição assimétrica da auxina. A distribuição dos transportadores de efluxo de auxina na membrana plasmática das células em diferentes regiões da raiz (mostrado como *retângulos cinzentos*) está indicada em *vermelho*, e a direção do efluxo de auxina está indicada por uma *flecha verde*. (A fotografia fluorescente em D é de autoria de T. Paciorek et al., *Nature* 435:1251-1256, 2005. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Em algumas regiões da planta, a localização dos transportadores de auxina e, portanto, a direção do fluxo do hormônio são altamente dinâmicas e reguladas. Uma célula pode redistribuir rapidamente os transportadores pelo controle do tráfego das vesículas que os contêm. Os transportadores de efluxo, por exemplo, normalmente reciclam entre as vesículas intracelulares e a membrana plasmática. Uma célula pode redistribuir estes transportadores na sua superfície, pela inibição da sua endocitose em um domínio da membrana plasmática, fazendo com que se acumulem neste local. Um exemplo acontece na raiz, onde a gravidade influencia a direção do crescimento. Os transportadores de efluxo normalmente são distribuídos simetricamente nas células do quepe da raiz. No entanto, passados alguns minutos após uma mudança de direção do vetor de gravidade, os transportadores de efluxo se redistribuem para um dos lados das células, e a auxina é bombeada para fora na direção do lado da raiz que está apontando para baixo. Uma vez que a auxina inibe o alongamento da célula da raiz, esta redistribuição do transporte do hormônio causa a reorientação da ponta da raiz, de forma que ela cresce de novo na descendente (**Figura 15-87**).

Nos meristemas apicais do caule, a distribuição de um transportador de efluxo também é dinâmica e regulada. Neste caso, o transporte direcionado da auxina auxilia na determinação do arranjo regular das folhas e flores (ver Figura 22-122).

Os fitocromos detectam a luz vermelha e os criptocromos detectam a luz azul

O desenvolvimento das plantas é muito influenciado pelas condições ambientais. Ao contrário dos animais, as plantas não podem mudar de ambiente quando as condições se tornam desfavoráveis; elas têm que se adaptar ou morrem. A influência ambiental mais importante é a luz, que é a fonte de energia das plantas e tem o papel mais importante ao longo de todo o seu ciclo de vida – desde a germinação, passando pelo desenvolvimento da plântula, ao florescimento e senescência. As plantas selecionaram um grande conjunto de proteínas sensíveis à luz para monitorar a quantidade, a qualidade, a direção e a duração da luz. Estas proteínas em geral são referidas como *fotorreceptores*. No entanto, como o termo fotorreceptor também é usado para as células sensíveis à luz na retina dos animais (ver Figura 15-48), usaremos aqui o termo *fotoproteína*.

Todas as fotoproteínas detectam a luz por meio de um cromóforo, ligado covalentemente, que altera sua forma ao absorver a luz, induzindo uma mudança na conformação da proteína.

Os **fitocromos** são as fotoproteínas mais conhecidas das plantas, estando presentes em todas elas e em algumas algas. São serinatreonina-cinases diméricas citoplasmáticas, que

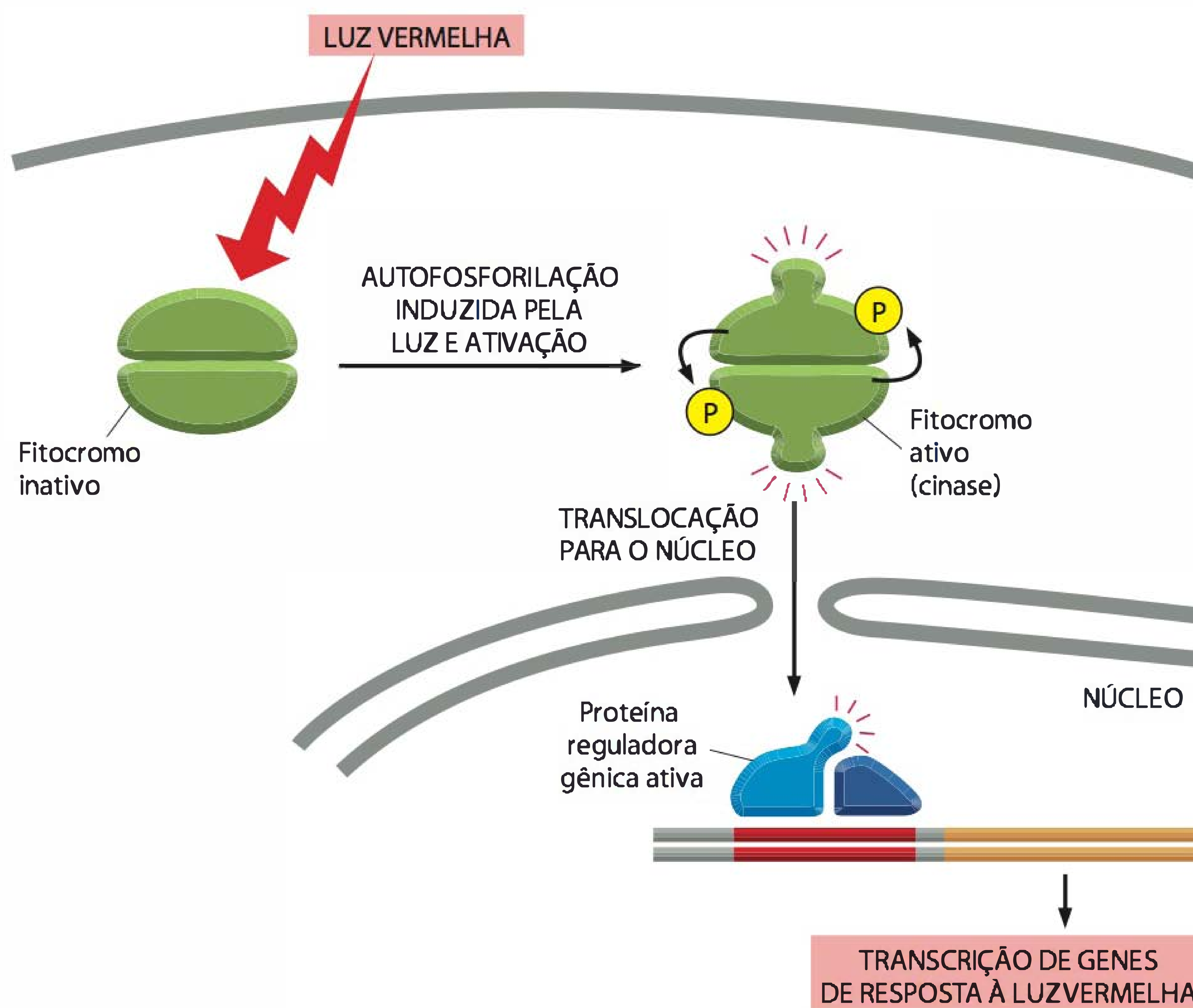


Figura 15-88 Visão atual da forma pela qual os fitocromos medeiam a resposta à luz nas células vegetais. O fitocromo, que é um dímero, sofre autofosforilação quando ativado pela luz vermelha e migra para o núcleo, onde ativa as proteínas reguladoras gênicas que estimulam a transcrição de genes específicos de resposta à luz vermelha.

respondem à luz vermelha e à luz infravermelha de forma diferencial e reversível: enquanto a luz vermelha geralmente ativa a cinase do fitocromo, a infravermelha a inativa. Acredita-se que o fitocromo, quando ativado pela luz, sofra autofosforilação, para depois fosforilar uma ou várias proteínas na célula. Em algumas respostas à luz, os fitocromos ativados migram para o núcleo, onde interagem com proteínas reguladoras gênicas e alteram a transcrição de alguns genes (**Figura 15-88**). Em outros casos, os fitocromos ativam, no citoplasma, uma proteína reguladora gênica latente, que migra para o núcleo onde regula a transcrição gênica. Em outros casos ainda, a fitoproteína dá início, no citosol, a vias de sinalização que alteram o comportamento da célula, sem o envolvimento do núcleo.

Embora os fitocromos realizem a atividade de serinatreonina-cinase, partes de sua estrutura lembram as histidina-cinases envolvidas na quimiotaxia bacteriana discutida anteriormente. Esse dado sugere que os fitocromos dos vegetais descendam das histidina-cinases bacterianas e que tenham alterado sua especificidade de substrato, de histidina para serina/treonina, evolutivamente mais tarde.

As plantas detectam luz azul usando dois tipos de fotoproteínas, a fototropina e os criptocromos. A **fototropina** está associada à membrana plasmática, sendo parcialmente responsável pelo **fototropismo**, ou seja, a tendência das plantas de crescerem em direção à luz. O fototropismo ocorre pelo alongamento celular direcionado, que é estimulado pela auxina, mas não se conhecem as ligações entre a fototropina e a auxina.

Os **criptocromos** são flavoproteínas sensíveis à luz azul. São relacionados, estruturalmente, com enzimas sensíveis à luz azul, chamadas de *fotoliases*, envolvidas no reparo de danos ao DNA induzidos por irradiação ultravioleta em quase todos os organismos, com exceção da maioria dos mamíferos. Ao contrário dos fitocromos, os criptocromos também são encontrados nos animais, nos quais têm um importante papel nos relógios circadianos que operam na maioria das células, mantendo ciclos com ritmo de 24 horas (discutido no Capítulo 7). Embora se acredite que os criptocromos tenham evoluído a partir das fotoliases, eles não apresentam atividade de reparo do DNA.

Neste capítulo discutimos como os sinais extracelulares influenciam o comportamento celular. Um dos alvos mais importantes destes sinais é o citoesqueleto, que determina a forma das células e é responsável pelos movimentos celulares, como discutiremos no próximo capítulo.

Resumo

Acredita-se que a multicelularidade e os mecanismos de comunicação celular tenham evoluído independentemente nas plantas e nos animais, cada um iniciando a partir de um eucarioto unicelu-

lar diferente que, por sua vez, evoluiu de um ancestral eucarioto unicelular comum. Por esse motivo, não é surpreendente que os mecanismos de sinalização das células animais e vegetais tenham semelhanças e diferenças entre si. Por exemplo, enquanto os animais contam principalmente com GPCRs de superfície, as plantas contam basicamente com receptores associados a enzimas do tipo serinatreonina-cinases, especialmente aqueles com repetições extracelulares ricas em leucina. Vários hormônios vegetais, ou reguladores de crescimento, entre eles o etileno e a auxina, participam no controle do desenvolvimento das plantas. O etileno atua por meio de receptores intracelulares para interromper a degradação de proteínas nucleares reguladoras de genes específicos, que ativam a transcrição dos genes de resposta ao etileno. Os receptores para alguns outros hormônios vegetais, incluindo a auxina, também regulam a degradação de proteínas reguladoras de genes específicos, embora os detalhes sejam variáveis. A sinalização pela auxina é incomum, pois este hormônio possui seu próprio sistema de transporte altamente regulado, no qual o posicionamento dinâmico dos transportadores controla a direção do fluxo de auxina e, portanto, a direção do crescimento da planta. A luz tem um papel importante na regulação do desenvolvimento nos vegetais. As respostas à luz são mediadas por uma variedade de fotoproteínas, como os citocromos, que respondem à luz vermelha, e os criptocromos e a fototropina, sensíveis à luz azul.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

15-1 Todos os receptores envolvidos na sinalização parácrina, sináptica e endócrina têm afinidade muito alta por suas respectivas moléculas sinalizadoras.

15-2 Todos os mediadores intracelulares (segundos mensageiros) são hidrossolúveis e se difundem livremente pelo citosol.

15-3 Com relação à regulação dos comutadores moleculares, as proteína-cinases e os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) sempre ativam as proteínas, enquanto as proteína-fosfatases e as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) sempre inibem as proteínas.

15-4 Em contraste com as vias de sinalização mais diretas utilizadas pelos receptores nucleares, as cascatas catalíticas de mediadores intracelulares fornecem numerosas oportunidades para a amplificação das respostas aos sinais extracelulares.

15-5 A interação de ligantes extracelulares com os RTKs ativa o domínio catalítico intracelular, pela propagação de uma mudança conformacional através da bicamada lipídica por meio de uma única hélice α transmembrana.

15-6 As tirosina-fosfatases apresentam uma especificidade fina por seus substratos, ao contrário das serinatreonina-fosfatases, que apresentam uma especificidade ampla.

15-7 Apesar de plantas e animais terem evoluído a multicelularidade de modo independente, todos eles usam praticamente as mesmas proteínas de sinalização e os mesmos segundos mensageiros na comunicação célula-célula.

Discuta as seguintes questões.

15-8 Suponha que a concentração circulante de um hormônio seja de 10^{-10} M e o K_d da ligação ao seu receptor seja de 10^{-8} M. Que fração de receptores estará ocupada com o hormônio? Se uma resposta fisiológica significativa ocorrer quando 50% dos receptores estiverem ocupados com as moléculas do hormônio, quanto será necessário aumentar a concentração do hormônio para provocar a resposta? A fração de receptores (R) ligados ao hormônio (H) para formar um complexo receptor-hormônio (R-H) é $[R\text{-}H]/([R] + [R\text{-}H]) = [R\text{-}H]/[R]_{total} = [H]/([H] + K_d)$.

15-9 As células se comunicam de maneiras que lembram a comunicação humana. Decida quais das seguintes formas de comunicação humana são análogas às sinalizações celulares autócrina, parácrina, endócrina e sináptica.

(A) Uma conversa telefônica
(B) Conversando com as pessoas em um coquetel
(C) Um anúncio pelo rádio
(D) Falar consigo mesmo

15-10 Por que as respostas de sinalização que envolvem alterações em proteínas já presentes nas células ocorrem em milissegundos, enquanto as respostas que requerem mudanças na expressão gênica precisam de minutos ou horas para ocorrer?

15-11 Como é que células diferentes podem responder de diferentes formas às mesmas moléculas sinalizadoras mesmo que elas tenham receptores idênticos?

15-12 Por que você supõe que a fosforilação/desfosforilação, por exemplo, tenha evoluído para ter um papel tão proeminente, em oposição à ligação alostérica de pequenas moléculas, na ativação e na inativação de proteínas nas vias de sinalização?

15-13 Considere uma via de sinalização que segue por meio de três proteína-cinases que são ativadas sequencialmente por fosforilação. Em um caso, a cinase é mantida em um complexo de sinalização por uma proteína de suporte; no outro, as cinases se difundem livremente (**Figura Q15-1**). Discuta as propriedades destes dois tipos de organização em termos de amplificação do sinal, velocidade e potencial para interação entre vias.

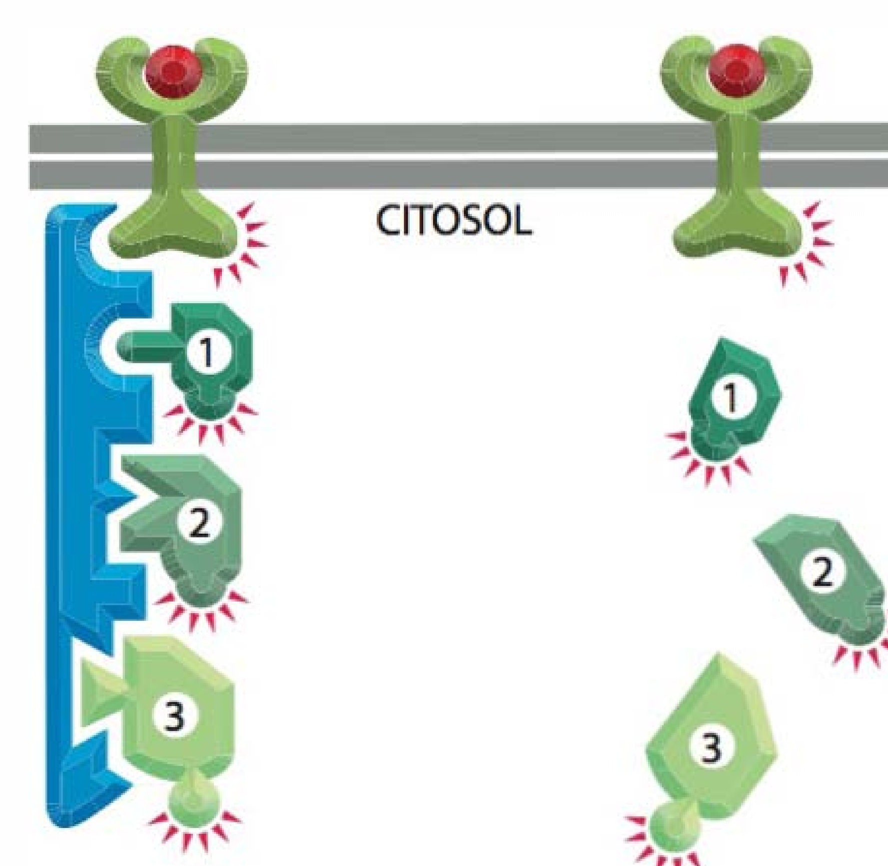


Figura Q15-1 Uma cascata de proteína-cinases organizada por meio de uma proteína de suporte ou composta por componentes que se difundem livremente (Questão 15-13).

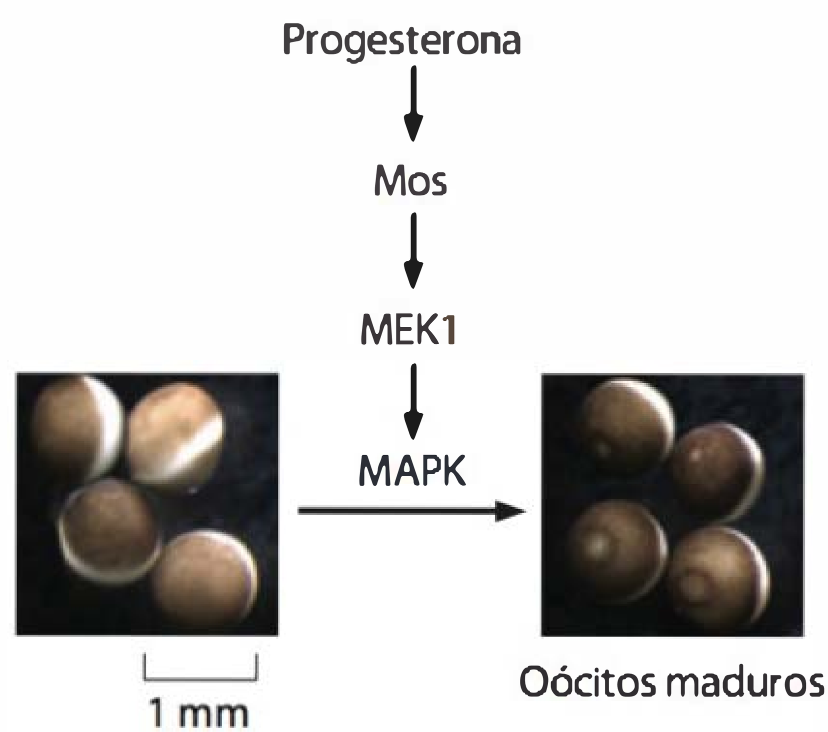


Figura Q15-2 Ativação da MAP-cinase induzida por progesterona, levando à maturação do oócito (Questão 15-15). (Cortesia de Helfrid Hochegger.)

15-14 Descreva três maneiras pelas quais um aumento em um sinal extracelular pode ser acentuado para produzir uma resposta celular abrupta do tipo tudo-ou-nada.

15-15 A ativação ("maturação") de oócitos de sapo é sinalizada por meio de um módulo de sinalização da MAP-cinase. Um aumento na progesterona ativa o módulo por estimular a tradução do RNA mensageiro da Mos, que é a MAP-cinase-cinase-cinase do sapo (**Figura Q15-2**). A maturação é facilmente identificada visualmente pela presença de um ponto branco no centro da superfície marrom do oócito (ver Figura Q15-2). Para determinar a curva dose-resposta da ativação da MAP-cinase induzida pela progesterona, coloque 16 oócitos em cada uma de seis placas plásticas e adicione diferentes concentrações de progesterona. Após uma incubação de 18 horas, esmague os oócitos, prepare um extrato e determine o estado de fosforilação (e, portanto, de ativação) da MAP-cinase por meio de uma eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (**Figura Q15-3**A). Esta análise mostra uma resposta gradual da MAP-cinase ao aumento da concentração da progesterona.

Antes de esmagar os oócitos, perceba que nem todos eles apresentam pontos brancos. Será que alguns deles atingiram ativação parcial e ainda não alcançaram o estágio com pontos brancos? Para responder a esta pergunta, repita o experimento, mas desta vez analise a ativação da MAP-cinase em oócitos individuais. Você se surpreenderá ao constatar que os oócitos terão sua MAP-cinase totalmente ativada ou completamente inativa (Figura Q15-3B). Como uma resposta tudo-ou-nada nos oócitos individuais pode se traduzir em uma resposta gradual na população?

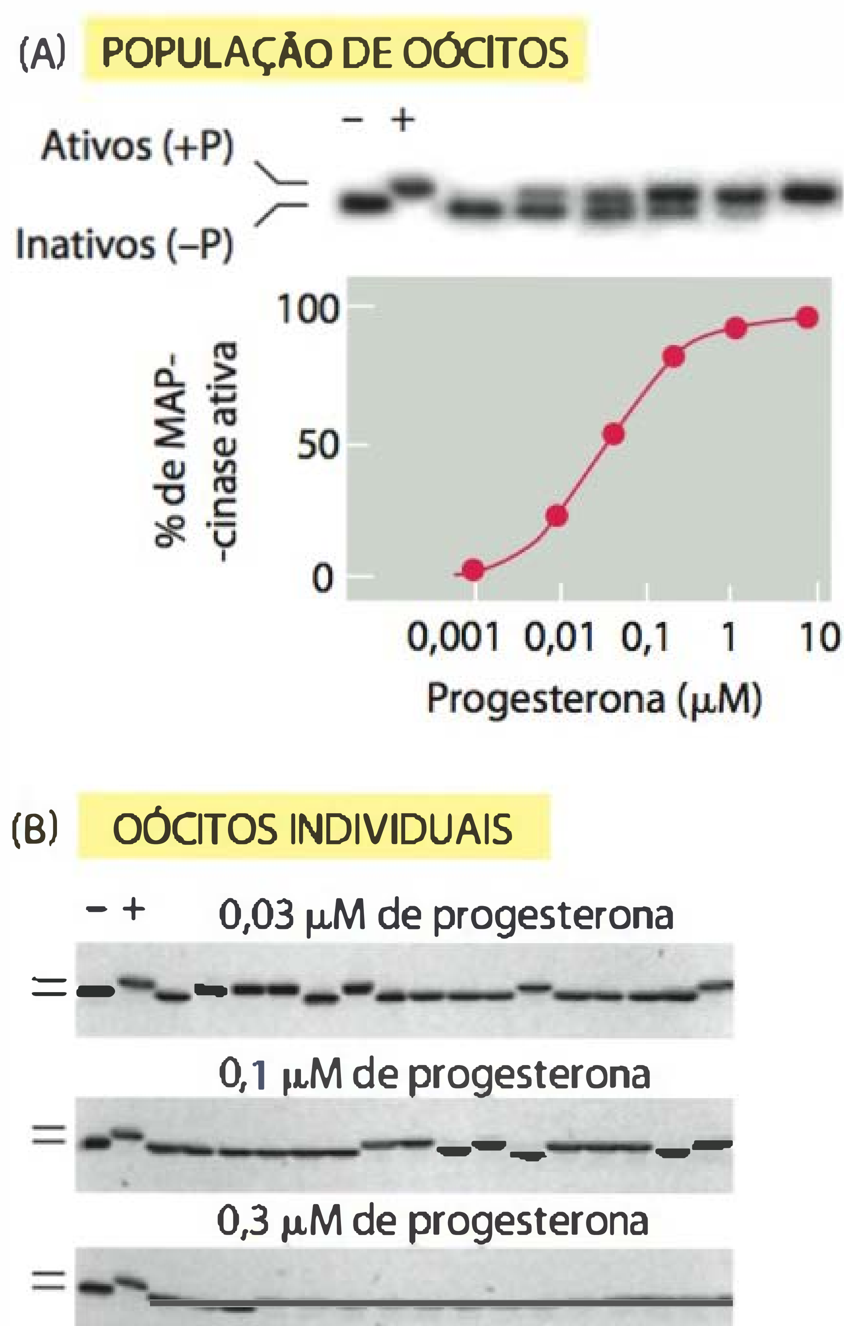


Figura Q15-3 Ativação de oócitos de sapo (Questão 15-15). (A) Fosforilação de MAP-cinase na população de oócitos. (B) Fosforilação da MAP-cinase em oócitos individuais. A enzima foi detectada por imunoensaio usando um anticorpo específico. As duas primeiras canaletas de cada gel contêm MAP-cinase inativa não-fosforilada (-) e ativa fosforilada (+). (De J. E. Ferrell, Jr., e E. M. Machleder, *Science* 280:895-898, 1998. Com permissão de AAAS.)

15-16 Proponha tipos específicos de mutações no gene da subunidade reguladora da PKA que poderia resultar em uma enzima permanentemente ativa ou permanentemente inativa.

15-17 A fosforilase-cinase integra sinais das vias de sinalização dependentes de cAMP e das dependentes de Ca^{2+}, que controlam a degradação do glicogênio nas células do fígado e do músculo (**Figura Q15-4**). A fosforilase-cinase é composta por quatro subunidades. Uma delas é a proteína-cinase que catalisa a adição de fosfato à glicogênio-fosforilase, tornando-a ativa para degradar glicogênio. As outras três subunidades são proteínas reguladoras que controlam a atividade da subunidade catalítica. Duas delas contêm sítios para fosforilação pela PKA, que é ativada pelo cAMP. A subunidade remanescente é a calmodulina, que liga Ca^{2+} quando aumenta a concentração citosólica do íon. A subunidade reguladora controla o equilíbrio entre a conformação ativa e a inativa da subunidade catalítica. De que forma este arranjo permite que a fosforilase-cinase desempenhe seu papel como uma proteína integradora nas vias múltiplas que estimulam a degradação do glicogênio?

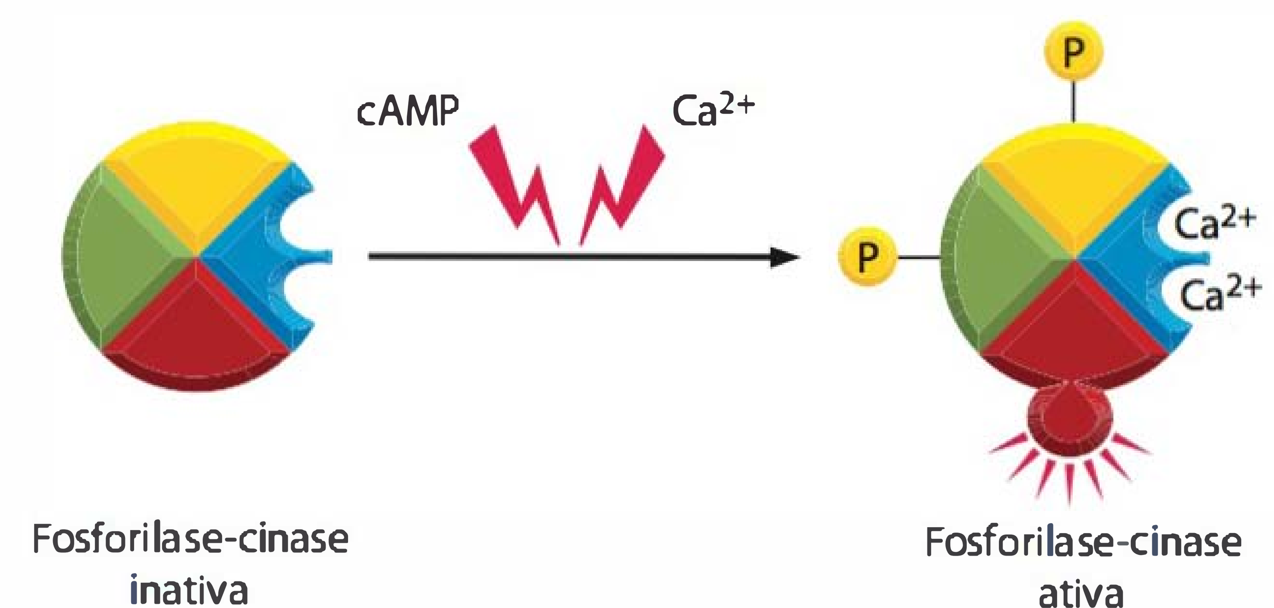


Figura Q15-4 Integração das vias de sinalização dependentes de cAMP e das dependentes de Ca^{2+} pela fosforilase-cinase nas células do fígado e do músculo (Questão 15-17).

15-18 Em princípio, a forma de Ras ativada ligada a GDP pode ser aumentada pela ativação do fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF), ou pela inativação da proteína ativadora de GTPase (GAP). Por que você supõe que as vias de sinalização mediadas por Ras sempre aumentem Ras-GTP por ativarem uma GEF ao invés de inativarem uma GAP?

15-19 A polaridade planar da via de sinalização de Wnt normalmente assegura que cada célula da asa da *Drosophila* tenha um único pelo. A superexpressão do gene *Frizzled* a partir de um promotor de choque térmico (hs-*Fz*) faz com que cresçam múltiplos pelos a partir de muitas células (**Figura Q15-5**A). Este fenótipo é suprimido se hs-*Fz* for combinado com uma deleção heterozigótica (Dsh^{Δ}) do gene *Dishevelled* (Figura Q15-5B). Estes resultados permitem a você ordenar a ação de Frizzled e de Dishevelled na via de sinalização? Em caso afirmativo, qual é a ordem? Explique seu raciocínio

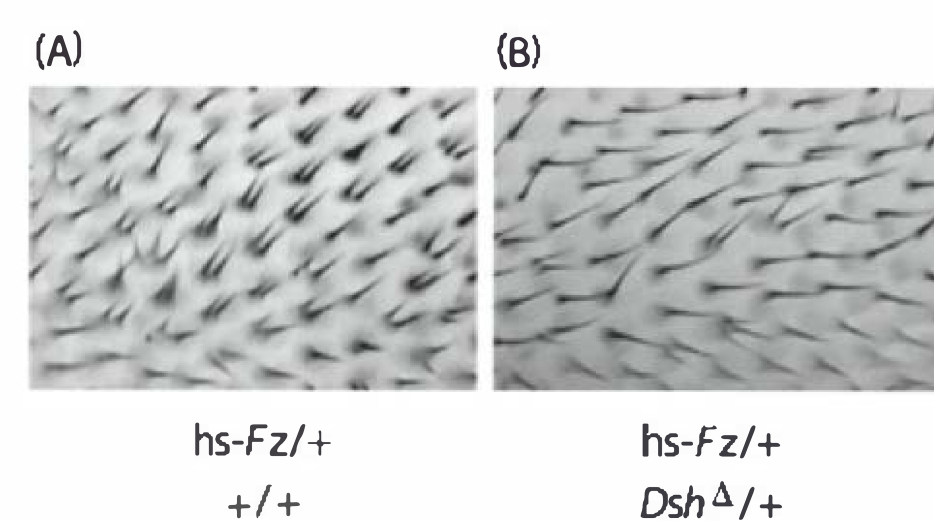


Figura Q15-5 Padrão de crescimento de pelos nas células da asa na *Drosophila* geneticamente diferente (Questão 15-19). (De C. G. Winter et al., *Cell* 105:81-91, 2001. Com permissão de Elsevier.)

REFERÊNCIAS

Geral

Bradshaw RA & Dennis EA (eds) (2003) Handbook of Cell Signaling. Elsevier: St Louis.
Science's Signal Transduction Knowledge Environment (Stke): www.stke.org

Princípios gerais da comunicação celular

Ben-Shlomo I, Yu Hsu S, Rauch R et al (2003) Signaling receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction. *Sci STKE* 187:RE9.
Bourne HR (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:283–289.
Ferrell JE Jr (2002) Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* 14:140–148.
Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839.
Murad F (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355:2003–2011.
Papin JA, HunterT, Palsson BO & Subramaniam S (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:99–111.
Pawson T & Scott JD (2005) Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30:286–290.
Pires-daSilva A & Sommer RJ (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature RevGenet* 4:39–49.
Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H & Laudet V (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116:585–586.
Seet BT, Dikic I, Zhou MM & Pawson T (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:473–483.
Singla V & Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313:629–633.

Sinalização por meio de receptores de superfície celular associados à proteína G e mediadores intracelulares pequenos

Berridge MJ (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1–21.
Berridge MJ, Bootman MD & Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:517–529.
Breer H (2003) Sense of smell: recognition and transduction of olfactory signals. *Biochem Soc Trans* 31:113–116.
Burns ME & Baylor DA (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 24:779–805.
Cooper DM (2005) Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* 33:1319–1322.
Hoeflich KP & Ikura M (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739–742.
Hudmon A & Schulman H (2002) Structure-function of the multifunctional Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364:593–611.
Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM et al (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* 362:623–639.
Luttrell LM (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 332:3–49.
McConnachie G, Langeberg LK & Scott JD (2006) AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12:317–323.
Parker PJ (2004) The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 32:893–898.
Pierce KL, Premont RT & Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:639–650.
Reiter E & Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17:159–165.
Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281–312.
Robishaw JD & Berlot CH (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol* 16:206–209.
Shaywitz AJ & Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821–861.

Sinalização por meio de receptores de superfície celular associados a enzimas

Baker MD, Wolanin PM & Stock JB (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays* 28:9–22.
Dard N & Peter M (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *BioEssays* 28:146–156.
Darnell JE Jr, Kerr IM & Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.
Downward J (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15:177–182.
Jaffe AB & Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247–269.
Massague J & Gomis RR (2006) The logic of TGFβ signaling. *FEBS Lett* 580:2811–2820.
Mitin N, Rossman KL & Der CJ (2005) Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15:R563–574.
Murai KK & Pasquale EB (2003) Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116:2823–2832.
Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116:191–203.
Qi M & Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118:3569–3572.
Rawlings JS, Rosler KM & Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117:1281–1283.
Roskoski R Jr (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1155–1164.
Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–225.
Sahin M, Greer PL, Lin MZ et al (2005) Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* 46:191–204.
Schwartz MA & Madhani HD (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 38:725–748.
Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 44:424–430.
Wassarman DA, Therrien M & Rubin GM (1995) The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *CurrOpin GenetDev* 5:44–50.
Wullschleger S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.

Vias de sinalização dependentes de proteólise regulada de proteínas reguladoras gênicas latentes

Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:678–689.
Clevers H (2006) Wntβ-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469–480.
Hoffmann A & Baltimore D (2006) Circuitry of nuclear factor κB signaling. *Immunol Rev* 210:171–186.
Huangfu D & Anderson KV (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133:3–14.

Sinalização em plantas

Benavente LM & Alonso JM (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol Biosyst* 2:165–173.
Chen M, Chory J & Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. *AnnuRevGenet* 38:87–117.
Dievart A & Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131:251–261.
Teale WD, Paponov IA & Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:847–859.

O Citoesqueleto

16

Neste capítulo

AUTOASSOCIAÇÃO E ESTRUTURA DINÂMICA DOS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO 965

COMO AS CÉLULAS REGULAM SEUS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO 992

MOTORES MOLECULARES 1010

O CITOESQUELETO E O COMPORTAMENTO CELULAR 1025

Para que as células funcionem adequadamente, elas devem se organizar no espaço e interagir mecanicamente com o ambiente ao seu redor. Elas devem apresentar uma conformação correta, ser fisicamente robustas e estar estruturadas de forma adequada internamente. Muitas células devem também ser capazes de modificar sua forma e migrar para outros locais. Além disso, toda célula deve ser capaz de reorganizar seus componentes internos como decorrência dos processos de crescimento, divisão e/ou adaptação a mudanças no ambiente. Todas essas funções estruturais e mecânicas apresentam-se altamente desenvolvidas em células eucarióticas, sendo dependentes de um extraordinário sistema de filamentos denominado **citoesqueleto** (**Figura 16-1**).

O citoesqueleto separa os cromossomos durante a mitose e a seguir divide a célula em duas; também guia e direciona o tráfego intracelular de organelas, transportando materiais de uma região à outra das células. O citoesqueleto dá suporte à frágil membrana plasmática e proporciona as ligações mecânicas que fazem com que esta célula resista a estresses e esforços sem que seja rasgada ou destruída quando ocorrem mudanças ou alterações no ambiente. O citoesqueleto permite que células como os espermatozoides possam nadar e que outras, como os fibroblastos e os leucócitos, possam deslizar sobre superfícies. Ele proporciona a maquinaria necessária à contração das células musculares e permite aos neurônios que estendam seus axônios e dendritos. É o citoesqueleto que guia o crescimento da parede celular vegetal e controla a impressionante diversidade de formas das células eucarióticas.

A grande variedade funcional do citoesqueleto está centrada no comportamento de três famílias de moléculas proteicas, as quais se associam para formar três tipos principais de filamentos. Cada tipo de filamento possui funções biológicas, propriedades mecânicas e dinâmicas distintas; no entanto, certos princípios básicos fundamentais são comuns a todos eles. Estes princípios fornecem a base para uma compreensão geral a respeito do funcionamento do citoesqueleto e das interações entre seus diferentes elementos. Da mesma forma que necessitamos da ação conjunta de nossos ligamentos, ossos e músculos, os três sistemas de filamentos do citoesqueleto devem atuar coletivamente para fornecer a uma determinada célula sua resistência, forma e capacidade de locomoção.

Neste capítulo, descreveremos inicialmente os três principais tipos de filamentos, os princípios básicos que delineiam sua associação e dissociação e suas peculiaridades individuais. Após, descreveremos os processos pelos quais outras proteínas interagem com estes três sistemas principais de filamentos, permitindo à célula o estabelecimento e a manutenção de sua organização interna, a formação e a remodelação de sua superfície, o transporte de organelas de modo direcionado de uma região à outra internamente à célula, bem como a locomoção da célula propriamente dita, quando apropriado.

AUTOASSOCIAÇÃO E ESTRUTURA DINÂMICA DOS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO

A maioria das células animais possui três tipos de filamentos do citoesqueleto responsáveis por sua organização espacial e propriedades mecânicas. Os *filamentos intermediários* proporcionam resistência mecânica. Os *microtúbulos* determinam o posicionamento de organelas delimitadas por membrana e direcionam o transporte intracelular. Os *filamentos de actina* determinam a forma da superfície celular e são necessários à locomoção da célula como um todo. Entretanto, estes filamentos do citoesqueleto seriam absolutamente ineficientes sem a presença de centenas de moléculas acessórias que tanto interligam os filamentos entre si quanto os conectam aos outros componentes celulares. Este grande grupo de *proteínas acessórias* é essencial ao controle da montagem dos filamentos do citoesqueleto em locais definidos e inclui as *proteínas motoras*, impressionantes máquinas moleculares que conver-

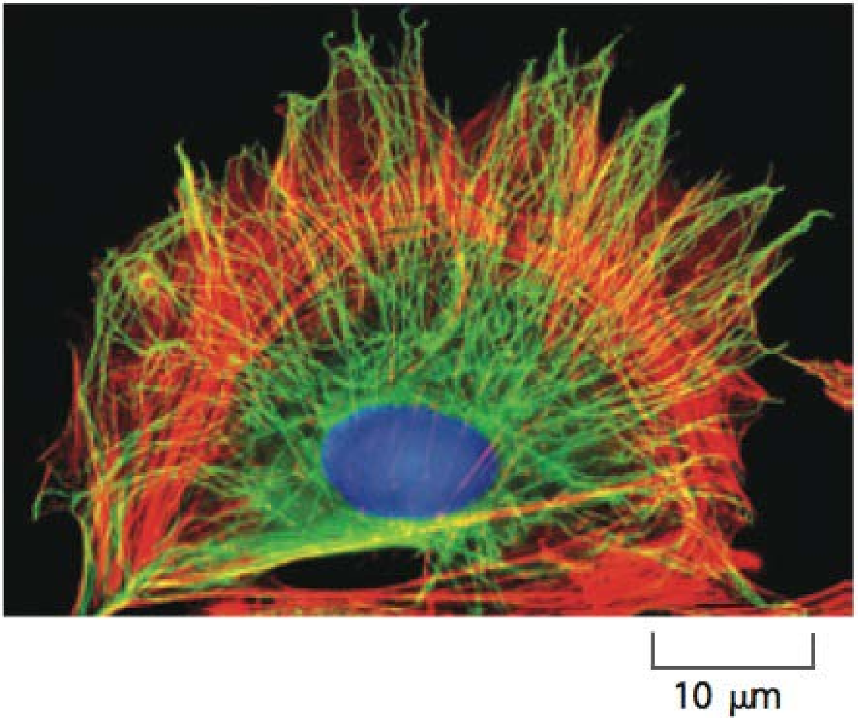


Figura 16-1 O citoesqueleto. Uma célula em cultura foi fixada e corada para mostrar dois dos principais componentes do citoesqueleto, microtúbulos (em *verde*) e filamentos de actina (em *vermelho*). O DNA nuclear está corado em *azul*. (Cortesia de Albert Tousson.)

tem a energia da hidrólise de ATP em força mecânica que pode tanto mover organelas sobre os filamentos quanto movimentar os filamentos propriamente ditos.

Nesta seção, discutiremos as propriedades das proteínas que formam os filamentos do citoesqueleto. Centraremos a discussão em sua capacidade de formar estruturas auto-organizadas e intrinsecamente polarizadas. Veremos também que, devido a mecanismos impressionantes que fazem com que os filamentos do citoesqueleto sejam dinâmicos, a célula é capaz de rapidamente responder a praticamente qualquer situação a que for confrontada.

Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação

Os sistemas do citoesqueleto são dinâmicos e adaptáveis, organizados de tal forma que podem ser melhor comparados a uma trilha de formigas do que a uma grande via expressa. Uma trilha de formigas pode se estender por várias horas do ninho até um delicioso local de piquenique, mas, considerando-se uma única formiga nesta trilha, teremos certamente que afirmar que ela não se encontra estática. Se as formigas de reconhecimento encontram uma nova e melhor fonte de alimento, ou se os turistas limpam o local e terminam seu piquenique, a estrutura dinâmica da trilha reorganiza-se a uma velocidade estonteante para adaptar-se a essa nova situação. De modo semelhante, grandes estruturas citoesqueléticas podem persistir ou sofrer modificações de acordo com as necessidades, podendo apresentar uma duração que varia de menos de um minuto ao período total de vida da célula. No entanto, os componentes macromoleculares individuais que compõem estas estruturas encontram-se sob um fluxo constante. Assim, da mesma forma que ocorre quando existe uma alteração na trilha das formigas, o rearranjo estrutural em uma célula requer uma quantidade de energia extra relativamente pequena quando as condições sofrem alteração.

A regulação do comportamento dinâmico e a montagem dos filamentos do citoesqueleto permitem que a célula eucariótica construa uma enorme variedade de estruturas a partir dos três sistemas básicos de filamentos. As microfotografias do **Painel 16-1** revelam algumas dessas estruturas. Os microtúbulos, que se encontram frequentemente estruturados em um arranjo citoplasmático em forma de estrela, com origem no centro da célula interfásica, podem rapidamente reorganizar-se para a formação de um *fuso mitótico* bipolar durante a divisão celular. Eles podem também formar estruturas de locomoção denominadas *cílios* e *flagelos* na superfície das células, ou estruturas fortemente empacotadas em feixes que servem como trilhos para o transporte de materiais ao longo dos axônios neuronais. Em células vegetais, conjuntos organizados de microtúbulos auxiliam a direcionar o padrão de síntese da parede celular.

Filamentos de actina revestem a face interna da membrana plasmática de células animais, conferindo resistência e forma a esta fina bicapa lipídica. Eles também formam diversos tipos de projeções na superfície das células. Algumas dessas projeções são estruturas dinâmicas, como os *lamelipódios* e os *filopódios*, usados pelas células para explorar o território e para impulsionar a própria célula através dele. O *anel contrátil* com base em actina se organiza de forma transiente para promover a divisão da célula em duas; arranjos mais estáveis permitem que a célula se fixe a um substrato adjacente, permitindo também a contração muscular. Os feixes regulares do *estereocílio* na superfície de células do ouvido interno contêm feixes de filamentos de actina que vibram como hastes rígidas em resposta ao som, e as *microvilosidades* da superfície de células epiteliais intestinais apresentam arranjos semelhantes que aumentam bastante a área de superfície apical para aumentar a absorção de nutrientes.

Filamentos intermediários revestem a face interna do envelope nuclear, formando uma espécie de gaiola protetora para o DNA da célula; no citosol, estes filamentos são trançados sob a forma de fortes cabos que mantêm as camadas das células epiteliais unidas ou que auxiliam a extensão dos longos e fortes axônios das células neuronais. Eles também permitem a formação de determinados apêndices resistentes, como os pelos e as unhas.

Um importante e dramático exemplo da rápida reorganização do citoesqueleto ocorre durante a divisão celular, como ilustrado na **Figura 16-2**, que mostra o crescimento de um fibroblasto em uma placa de cultura. Após a replicação dos cromossomos, o arranjo de microtúbulos da interfase, que se estende através do citoplasma, é reconfigurado em um *fuso mitótico* bipolar, que desempenha o papel essencial de segregar para os núcleos das células-filhas, de forma exata, as duas cópias de cada cromossomo replicado. Ao mesmo tempo, estruturas especializadas de actina que permitem ao fibroblasto deslizar sobre a superfície da placa sofrem dissociação, e a célula para de se mover e assume um formato mais esférico. A actina e sua proteína motora associada, miosina, formam uma cinta em torno da região central da célula, o *anel contrátil*, que sofre constrição como se fosse um minúsculo músculo e separa a célula em duas.

Quando a divisão está completa, os citoesqueletos dos dois fibroblastos-filhos se organizam em arranjo de interfase e convertem as duas células-filhas arredondadas em versões

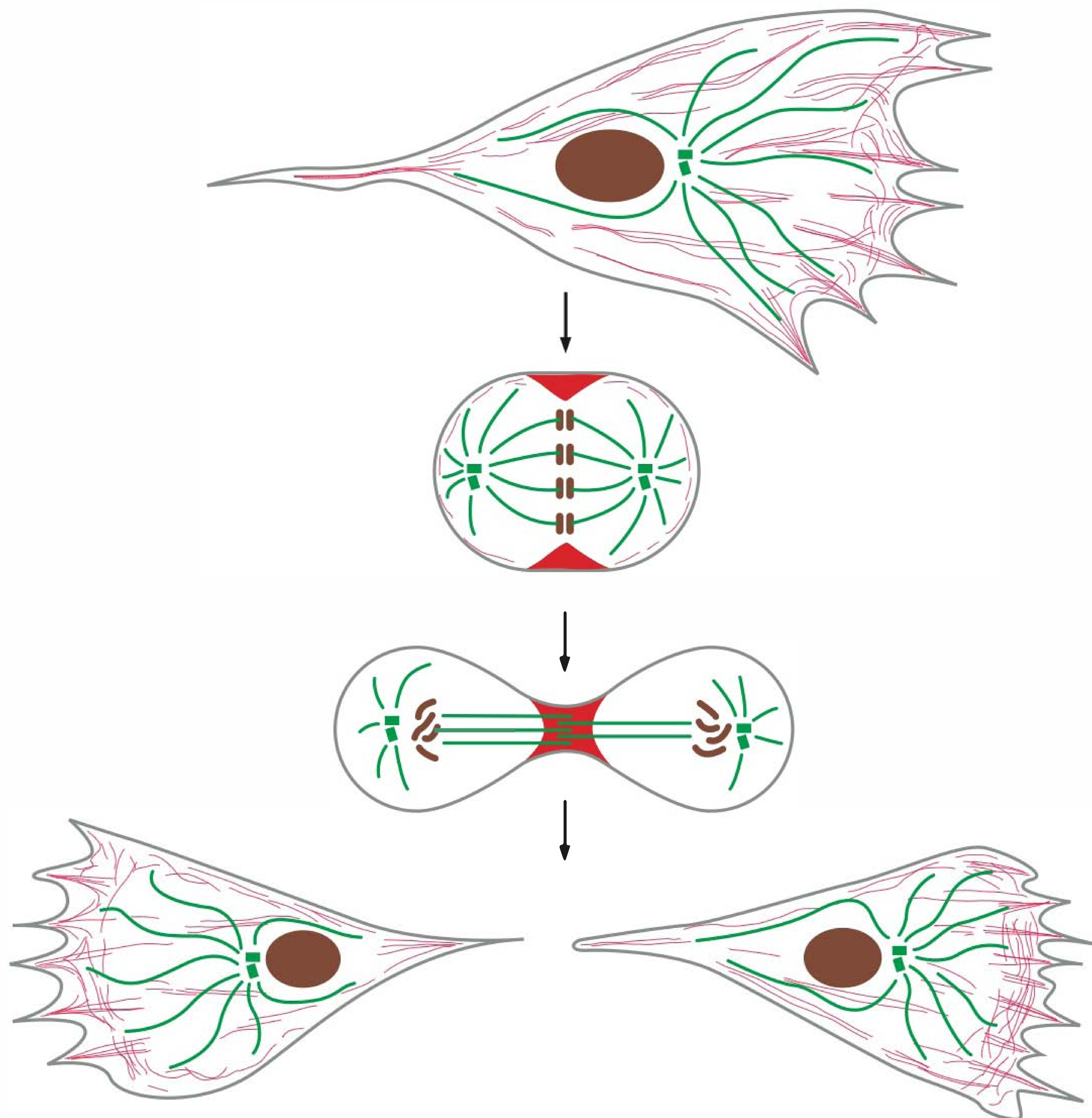


Figura 16-2 Rápidas alterações na organização do citoesqueleto associadas à divisão celular. O fibroblasto em movimento aqui representado possui um citoesqueleto de actina dinâmico e polarizado (ilustrado em *vermelho*) que se associa para impelir a borda frontal para a direita. A polarização do citoesqueleto de actina é auxiliada pelo citoesqueleto de microtúbulos (ilustrado em *verde*), o qual consiste em longos microtúbulos que partem de um único centro organizador de microtúbulos localizado em região anterior ao núcleo. Quando a célula se divide, o arranjo polarizado de microtúbulos é reorganizado para a formação de um fuso mitótico bipolar, o qual é responsável pelo alinhamento e pela posterior separação dos cromossomos duplicados (*marrom*). Os filamentos de actina formam um anel contrátil no centro da célula que a comprime separando-a em duas após a segregação dos cromossomos. Após a completa divisão da célula, ambas as células-filhas reorganizam seus citoesqueletos de actina e de microtúbulos em versões menores daquelas que se encontravam na célula-mãe, permitindo que estas se arrastem em direções distintas.

menores da célula-mãe, achatadas e com capacidade de deslizamento. Em um fibroblasto, essa sequência de eventos leva aproximadamente uma hora para se completar; em alguns casos, como nas primeiras divisões nucleares de um embrião de *Drosophila*, os citoesqueletos de microtúbulos e de actina podem sofrer um rearranjo completo em um período inferior a cinco minutos (**Figura 16-3**).

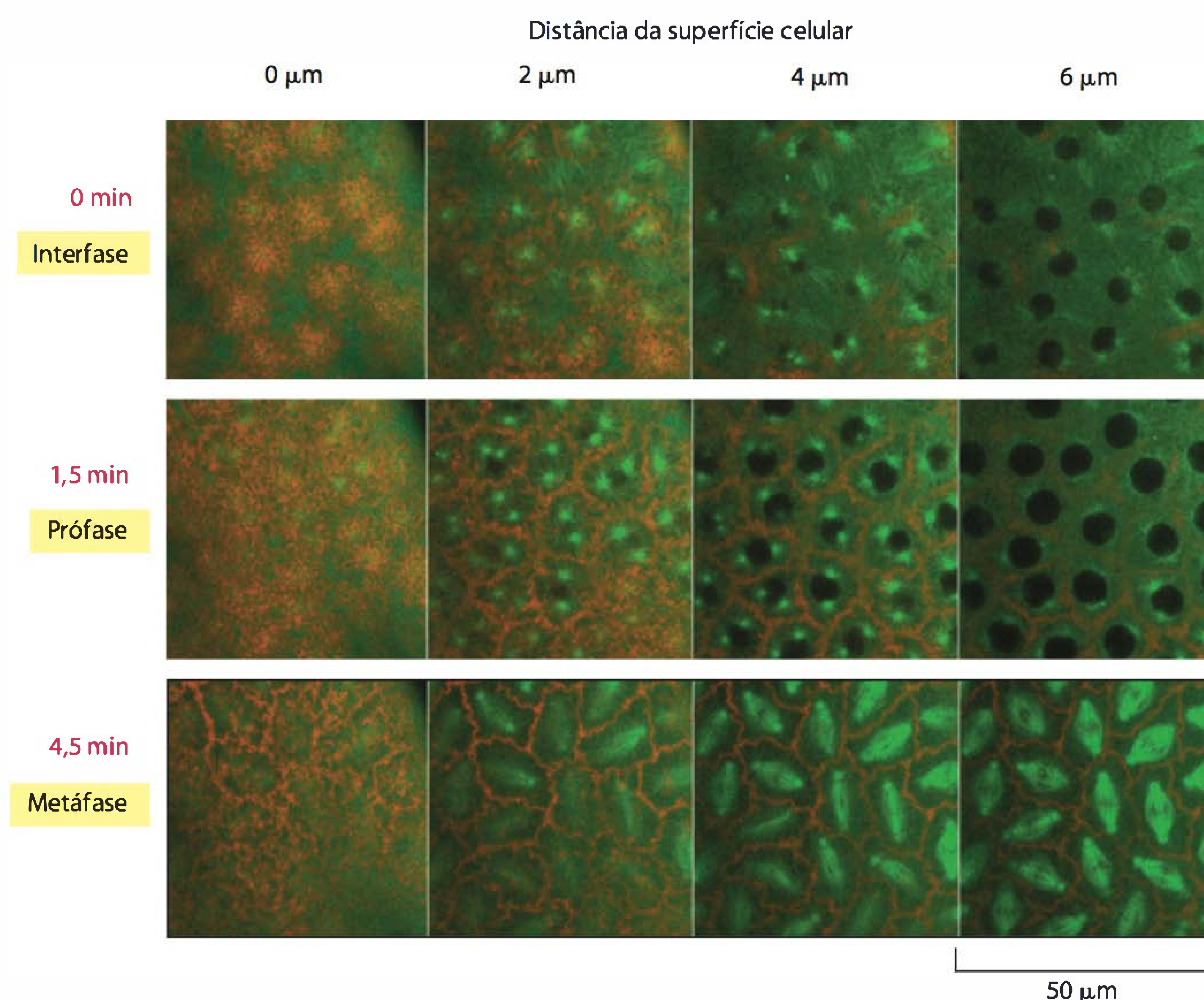
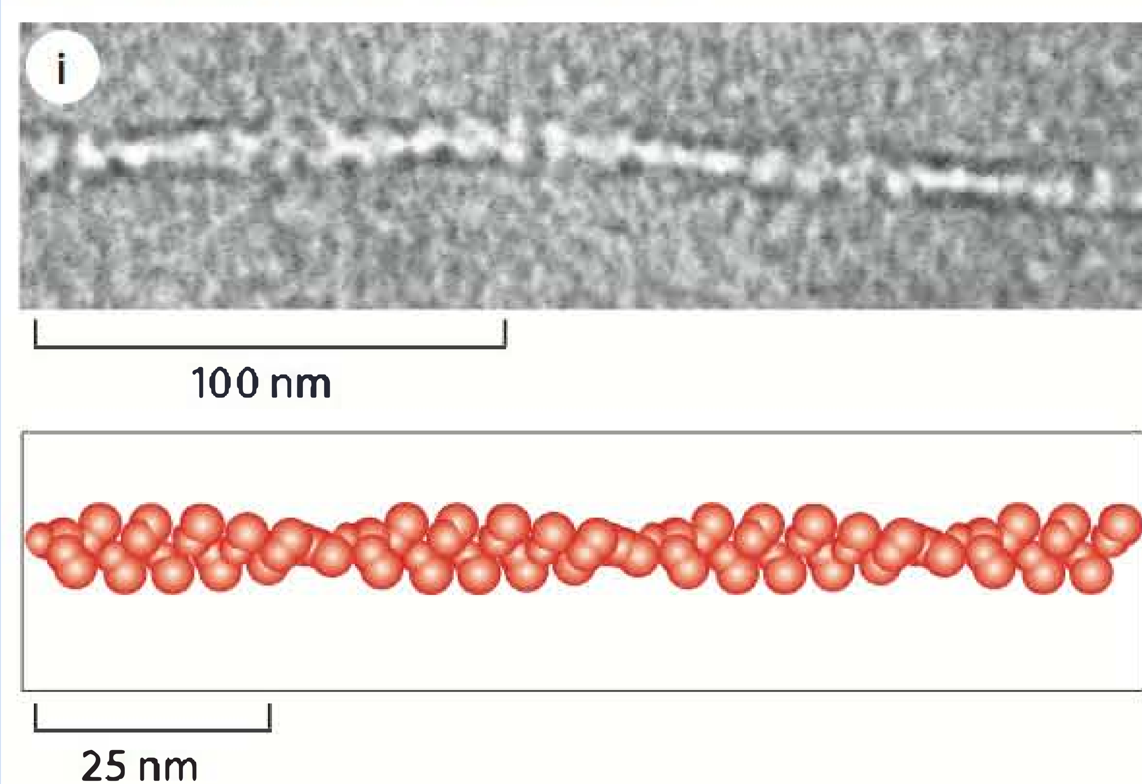
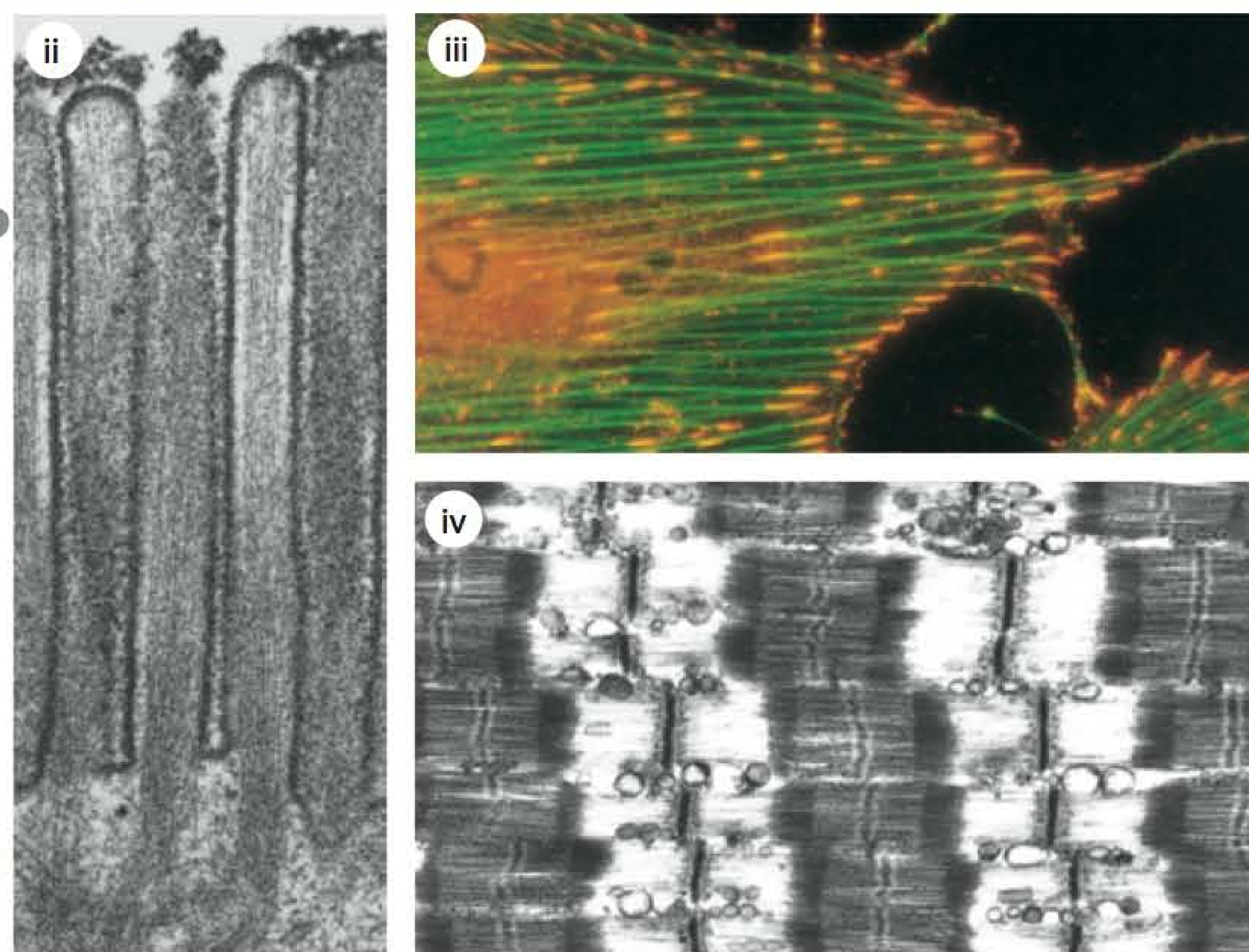


Figura 16-3 Rápidas alterações na organização do citoesqueleto observadas ao longo do desenvolvimento de um embrião jovem de *Drosophila*. Nesta célula gigante multinucleada, divisões nucleares iniciais ocorrem aproximadamente a cada 10 minutos, no interior de um citoplasma comum. Os rápidos rearranjos de filamentos de actina (em *vermelho*) e dos microtúbulos (em *verde*), aqui observados em um embrião vivo, são necessários para a separação dos cromossomos na mitose simultânea à manutenção da individualidade de cada núcleo, impedindo que eles colidam com outros núcleos próximos. (Cortesia de William Sullivan.)

FILAMENTOS DE ACTINA

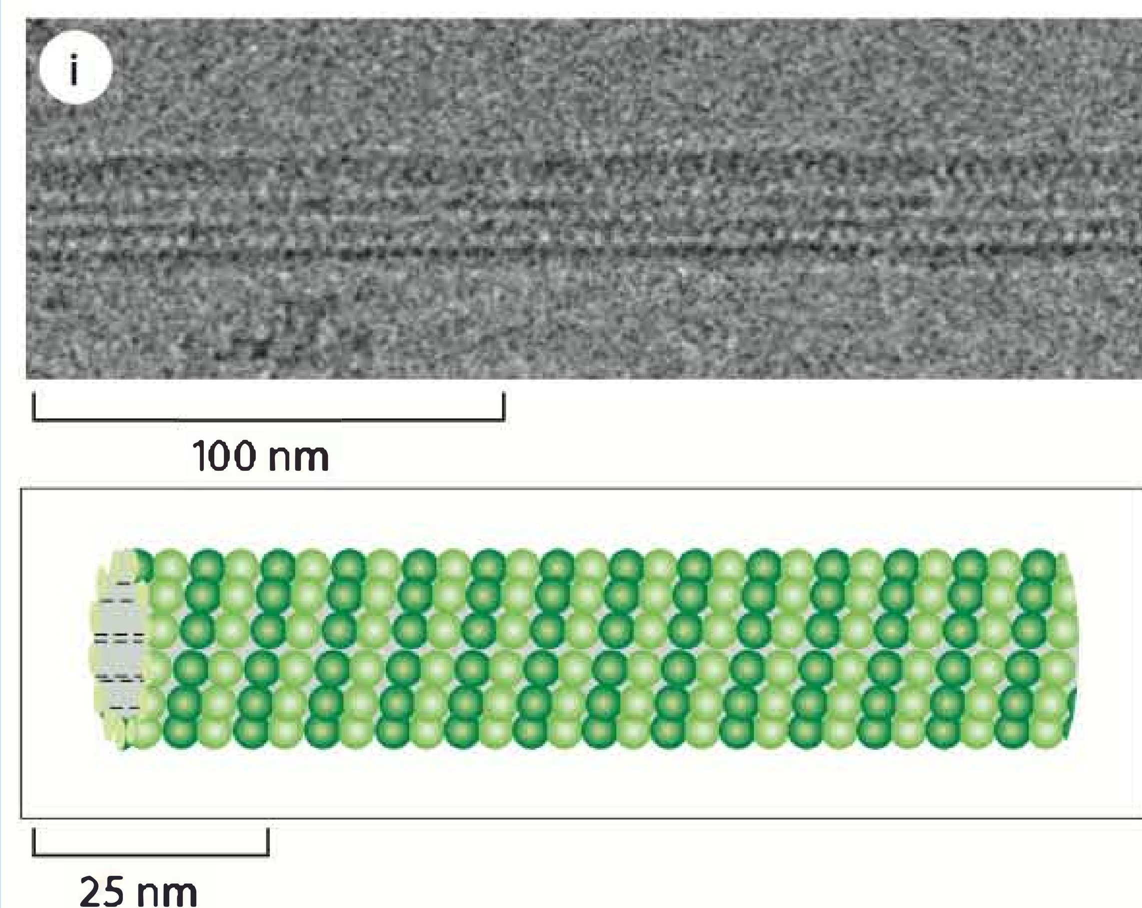


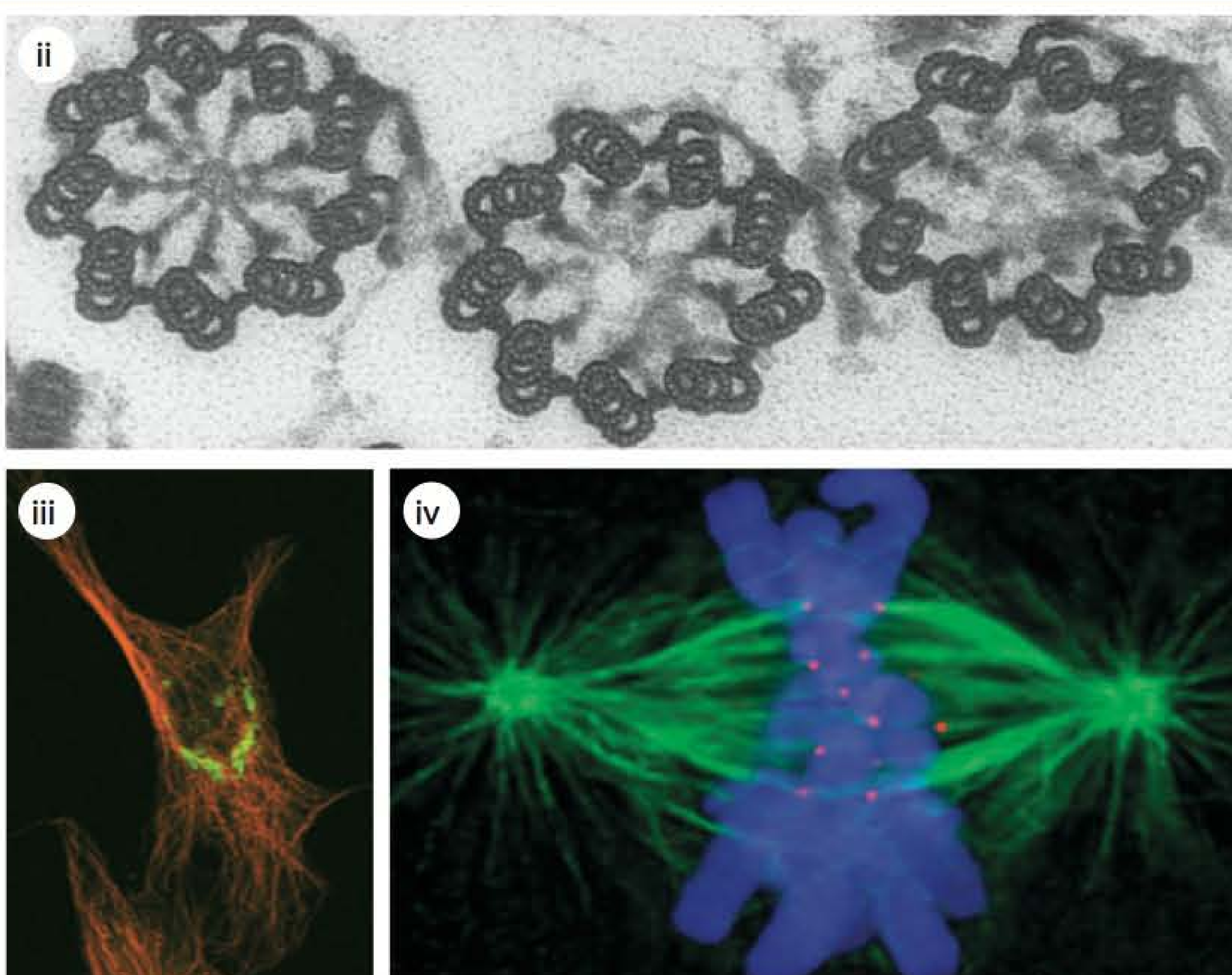


Os filamentos de actina (também conhecidos como *microfilamentos*) são polímeros helicoidais de fita dupla da proteína actina. Eles se apresentam sob a forma de estruturas flexíveis, com diâmetro entre 5 e 9 nm, podendo estar organizados sob uma ampla variedade de feixes lineares, redes bidimensionais e géis tridimensionais. Apesar de os filamentos de actina estarem dispersos por toda a célula, eles estão em maior concentração no *córtex*, logo abaixo da membrana plasmática.

Microfotografias cortesia de Roger Craig (i e iv); P. T. Matsudaira e D. R. Burgess (ii); Keith Burridge (iii).

MICROTÚBULOS

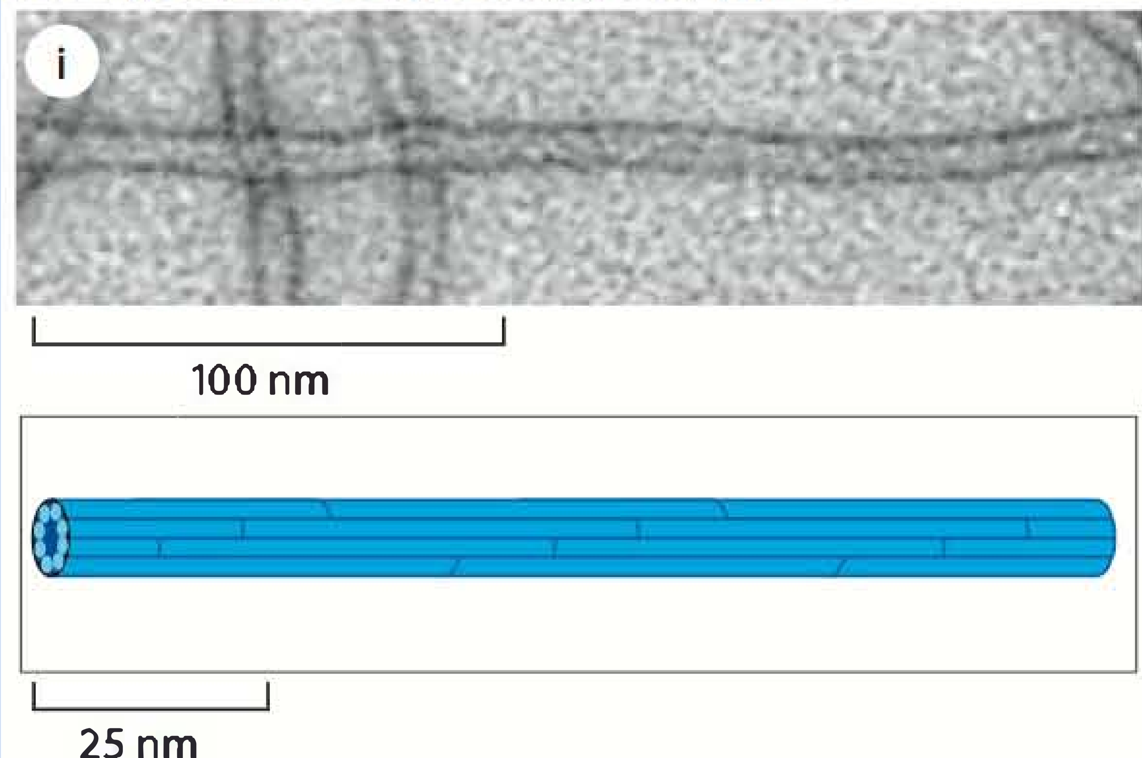


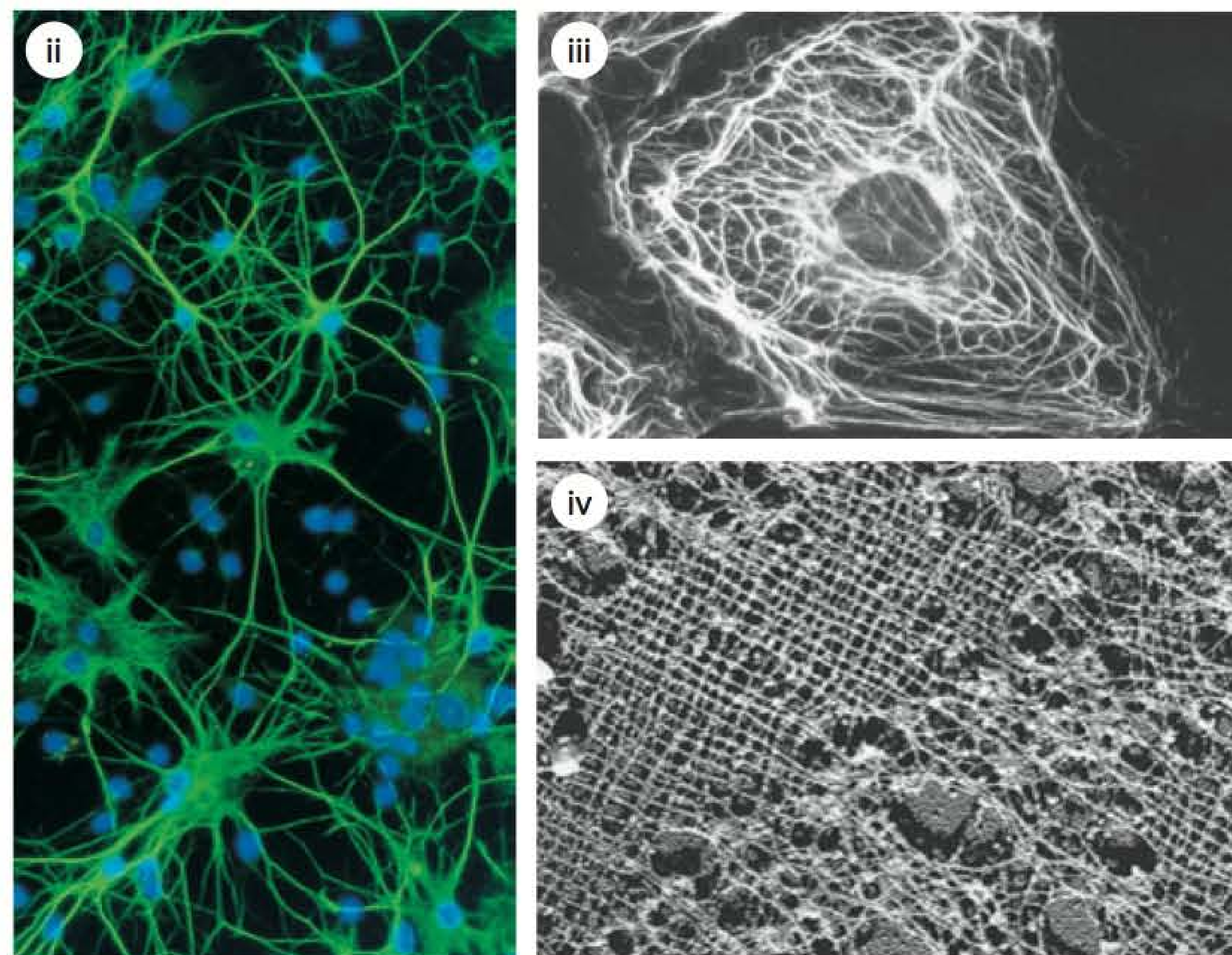


Os microtúbulos são longos cilindros ocos formados pela proteína tubulina. Apresentando um diâmetro externo de 25 nm, eles são bem mais rígidos do que os filamentos de actina. Os microtúbulos são longos e retilíneos e caracteristicamente apresentam uma das extremidades ligada a um centro organizador de microtúbulos (MTOC) único, denominado *centrossomo*.

Microfotografias cortesia de Richard Wade (i); D. T. Woodrow e R. W. Linck (ii); David Shima (iii); A. Desai (iv).

FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS





Os filamentos intermediários são fibras semelhantes a cabos com um diâmetro de aproximadamente 10 nm; eles são compostos por proteínas de filamentos intermediários, as quais pertencem a uma grande e heterogênea família. Um tipo de filamento intermediário forma uma trama chamada de lâmina nuclear logo abaixo da membrana nuclear interna. Outros tipos estendem redes através do citoplasma, conferindo resistência mecânica às células. Nos tecidos epiteliais, eles se estendem em todo o citoplasma, de uma junção célula-célula a outra, fortalecendo, dessa forma, o epitélio como um todo.

Microfotografias cortesia de Roy Quinlan (i); Nancy L. Kedersha (ii); Mary Osborn (iii); Ueli Aebi (iv).

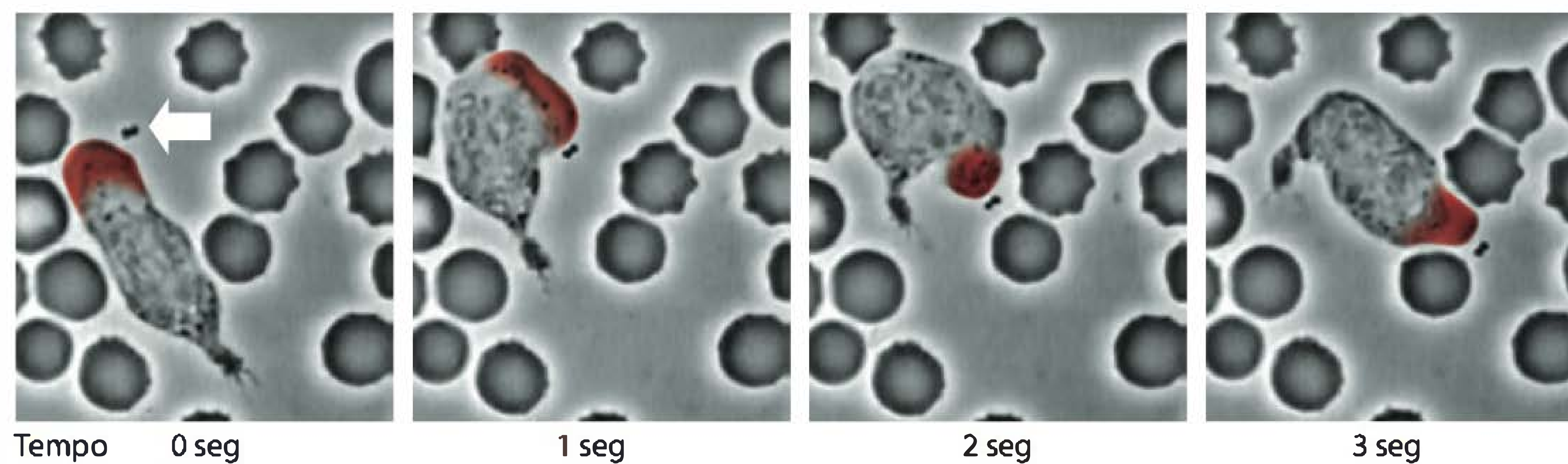


Figura 16-4 Um **neutrófilo à caça de uma bactéria.** Nesta preparação de sangue humano, um agregado de bactérias (*seta branca*) está prestes a ser capturado por um neutrófilo. Conforme as bactérias se movimentam, o neutrófilo rapidamente reorganiza sua densa rede de actina na região anterior (em *vermelho*) para se movimentar rumo à bactéria. A rápida associação e dissociação do citoesqueleto de actina nesta célula permitem que ela altere a orientação e a direção de seu movimento em um intervalo de poucos segundos. (A partir de um vídeo registrado por David Rogers.)

Diversas células necessitam de rápidos rearranjos para que funcionem mesmo durante o período de interfase. Por exemplo, os *neutrófilos*, um tipo de célula branca sanguínea, caçam e englobam células bacterianas e fungos que acidentalmente, por exemplo, através de cortes na pele, têm acesso a porções de nosso organismo que normalmente deveriam ser estéreis. Como a maioria das células com locomoção, os neutrófilos avançam através da emissão de estruturas e protrusões, na borda anterior, as quais estão repletas de filamentos de actina recentemente sintetizados. Quando uma possível presa bacteriana, se move para uma direção diferente, o neutrófilo é obrigado a reorganizar suas estruturas protrusivas polarizadas em uma questão de segundos (**Figura 16-4**). Ambos os tipos de rearranjos rápidos do citoesqueleto citados serão abordados em maiores detalhes na seção final deste capítulo.

O citoesqueleto também pode formar estruturas estáveis

Em células que adquiriram uma morfologia diferenciada e estável, como é o caso de neurônios ou células epiteliais maduras, os elementos dinâmicos do citoesqueleto também devem prover estruturas grandes e estáveis à organização celular. Em células epiteliais especializadas que revestem tecidos do intestino e dos pulmões, protrusões da superfície celular com base no citoesqueleto, como as microvilosidades e os cílios, são capazes de manter posicionamento, comprimento e diâmetro constantes ao longo de todo o tempo de vida da célula. No caso dos feixes de actina da região central das microvilosidades de células epiteliais intestinais, esse período se restringe a uns poucos dias. No entanto, feixes de actina da região central dos estereocílios de células do ouvido interno mantêm sua organização estável durante toda a vida do animal, tendo em vista que estas células não sofrem reposição. Entretanto, filamentos de actina individuais continuam a apresentar comportamento altamente dinâmico e estão continuamente sendo remodelados e substituídos, em um período médio de a cada 48 horas, mesmo dentro destas estruturas de superfície celular estáveis que podem persistir por décadas.

Além de formar protrusões estáveis na superfície de células especializadas, o citoesqueleto também é responsável pela polarização geral das células, permitindo que elas apresentem diferenças entre suas regiões superiores e inferiores ou anteriores e posteriores. A informação referente à polarização geral codificada pela organização do citoesqueleto também deve ser frequentemente mantida durante todo o período de vida da célula. Células epiteliais polarizadas, como as que revestem o intestino, por exemplo, usam arranjos organizados de microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários para manter diferenças funcionais críticas entre a *superfície apical* que absorve os nutrientes, a partir do lúmen do intestino onde encontram-se os alimentos, e a *superfície basolateral*, onde as células transferem os nutrientes, através da membrana plasmática, para a corrente sanguínea. As células também devem manter fortes contatos adesivos entre si para permitir que esta camada única de células atue eficientemente como barreira física (**Figura 16-5**).

Mesmo células pequenas e morfologicamente simples como as da levedura *Saccharomyces cerevisiae* necessitam de um sistema de polarização geral estável. A característica mais impressionante dessas células é sua marcada assimetria, a qual fica evidente quando sua divisão por brotamento dá origem a uma célula-filha pequena e uma célula-mãe grande. Essa assimetria advém da orientação polar do citoesqueleto de actina da célula. Existem dois tipos de arranjos de filamentos de actina nessas células: cabos de actina (longos feixes de filamentos de actina) e manchas de actina (pequenos arranjos de filamentos associados ao córtex celular, que marcam regiões de endocitose mediada por actina). As células de levedura em processo de proliferação ou brotamento devem estar fortemente polarizadas para permitir que a célula dê origem a um broto a partir de um único ponto da superfície, contrariamente a um processo de crescimento geral uniforme da célula. Nesse processo, as manchas de actina se tornam altamente concentradas na região apical do broto em crescimento, com cabos de actina alinhados e direcionados rumo a elas. Esse arranjo de actina direciona a

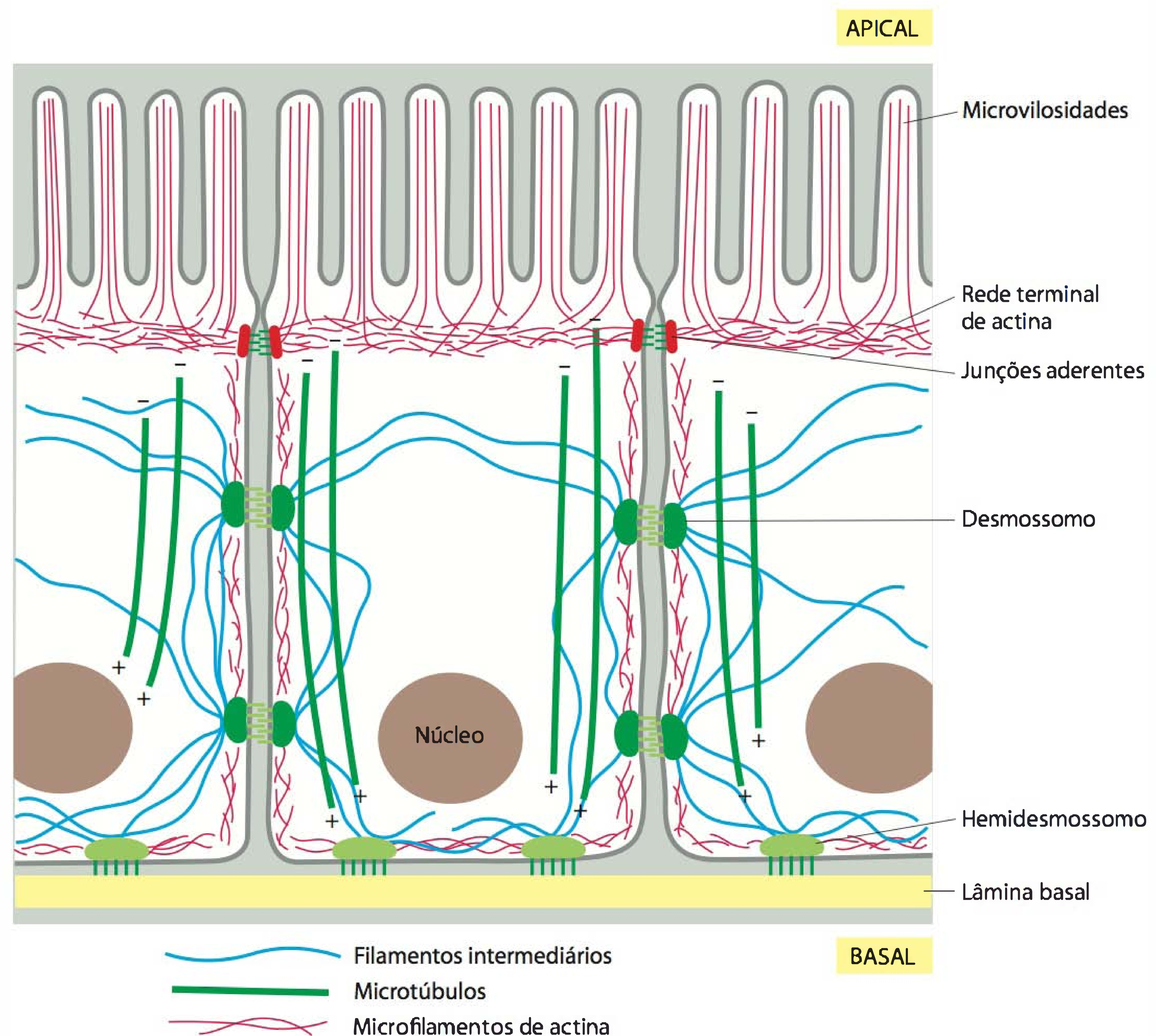


Figura 16-5 Organização do citoesqueleto em células epiteliais polarizadas. Todos os componentes do citoesqueleto cooperam para a definição dos formatos característicos de células especializadas, como as células epiteliais que revestem o intestino delgado. Na superfície apical (superior), que se dirige para o lúmen do intestino, feixes de filamentos de actina (em *vermelho*) formam microvilosidades que aumentam a área de superfície celular disponível para a absorção de nutrientes a partir dos alimentos. Exatamente abaixo das microvilosidades, uma banda circunférica de filamentos de actina contribui para a formação de junções célula-célula que evitam que o conteúdo do lúmen intestinal penetre o organismo. Filamentos intermediários (em *azul*) estão ancorados a outros tipos de estruturas adesivas, como desmossomos e hemidesmossomos, que conectam as células epiteliais em uma camada e as prendem à matriz extracelular subjacente, na extremidade basal da célula; estas importantes estruturas de adesão serão discutidas no Capítulo 19. Microtúbulos (em *verde*) projetam-se verticalmente do alto da célula até sua base e fornecem um sistema coordenado geral que permite à célula direcionar, para o local adequado, componentes recentemente sintetizados.

secreção da nova parede celular e de outros materiais para o sítio de brotamento (**Figura 16-6**). Por sua vez, o arranjo polarizado das estruturas de actina influencia a orientação do fuso mitótico, de tal forma que um conjunto completo de cromossomos pode ser transportado e entregue no interior da célula-filha ao final do processo de divisão celular.

Cada tipo de filamento do citoesqueleto é construído a partir de subunidades proteicas menores

As estruturas do citoesqueleto frequentemente englobam toda a extensão da célula, unindo uma extremidade à outra e podendo estender-se por dezenas ou mesmo centenas de micrômetros. Apesar disso, as moléculas proteicas individuais que compõem o citoesqueleto geralmente apresentam um tamanho pequeno, não excedendo poucos nanômetros. A célula é capaz de construir grandes estruturas pela associação de um grande número destas pequenas subunidades repetitivas, do mesmo modo que um enorme prédio de apartamentos é construído a partir de pequenos tijolos. Essas subunidades, por serem pequenas, podem difundir-se rapidamente pelo citoplasma, capacidade esta inexistente em filamentos já associados. Assim, as células podem promover uma reorganização estrutural rápida, pela dissociação de filamentos em uma determinada região e reassociação em uma região bastante afastada (**Figura 16-7**).

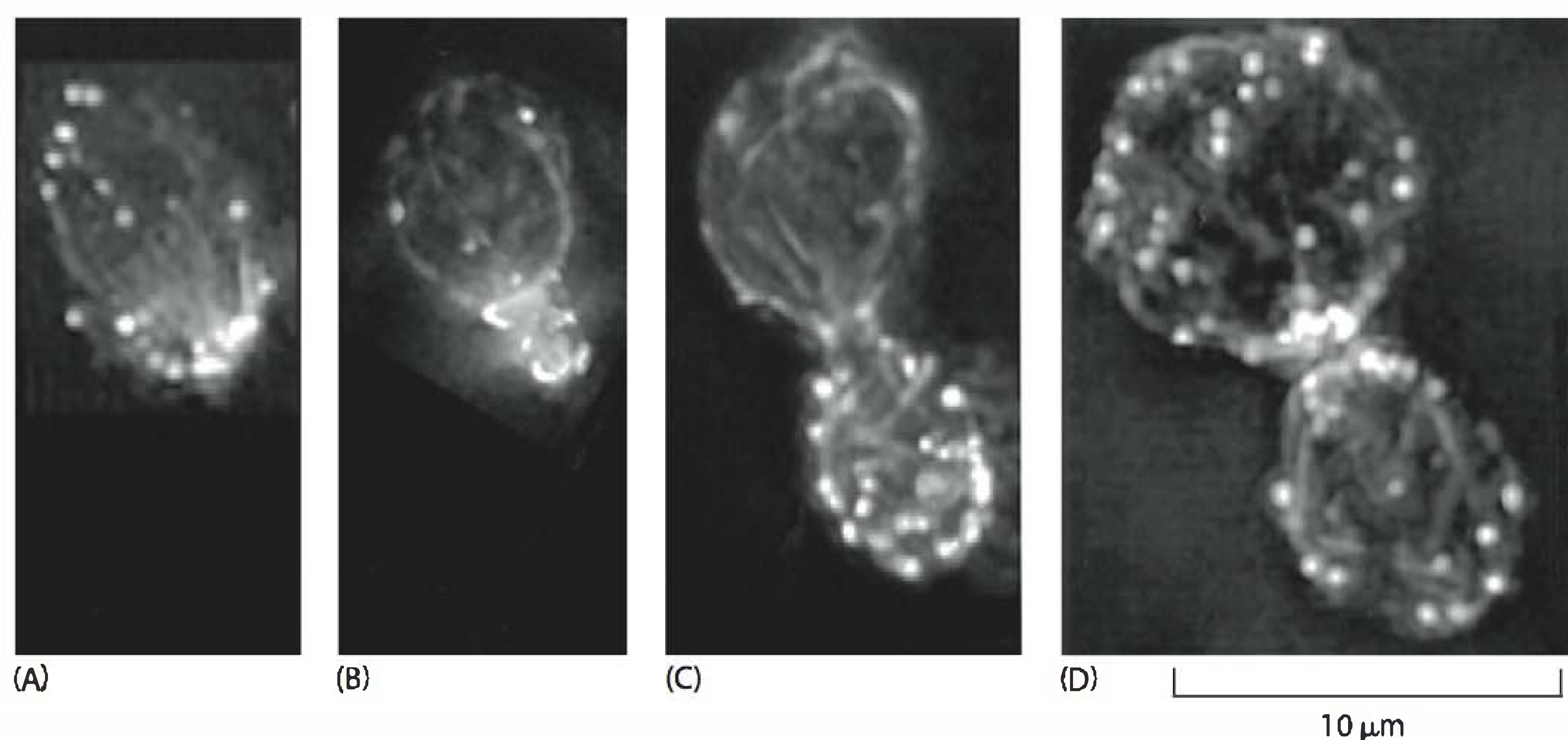


Figura 16-6 Polaridade de cabos e manchas (*patches*) de actina ao longo do ciclo celular de leveduras. Estruturas filamentosas de actina na célula de levedura, aqui coradas com faloidina fluorescente, incluem as manchas de actina (pontos arredondados brilhantes) e os cabos de actina (linhas longitudinais). (A) Na célula-mãe, antes da formação de um brotamento, a maior parte das manchas se encontra agrupada em uma das extremidades. Os cabos encontram-se alinhados e direcionados ao conjunto de manchas, que caracteriza a região onde ocorrerá a formação do broto. (B) Conforme ocorre o crescimento do broto, a maior parte das manchas fica dentro dele. Os cabos na célula-mãe continuam a apontar rumo a esta região de crescimento de uma nova parede celular. (C) As manchas apresentam-se distribuídas praticamente de forma uniforme na superfície do broto que atingiu seu tamanho total. Os cabos na célula-mãe permanecem polarizados. (D) Imediatamente após a divisão celular, as células mãe e filha formam novas manchas, que estão concentradas próximo à região de divisão, apesar de ambas as células apresentarem cabos com orientação aleatória. (De T. S. Karpova et al., *J. Cell Biol.* 142:1501-1517, 1998. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

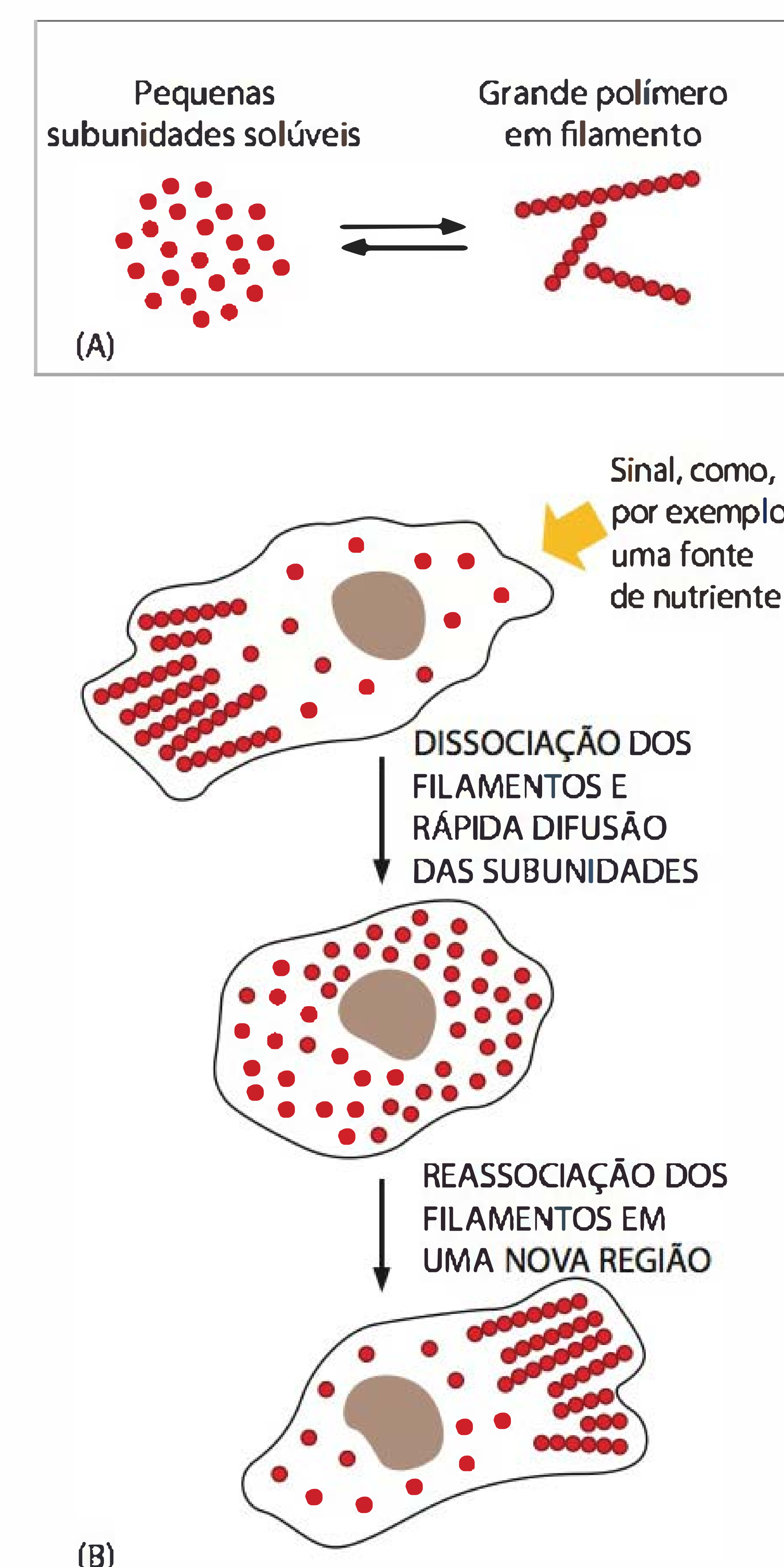


Figura 16-7 O citoesqueleto durante alterações na forma da célula. A formação de filamentos de proteína a partir de subunidades proteicas muito menores permite a remodelação regulada do citoesqueleto por associação e dissociação de filamentos. (A) A formação de filamento a partir de uma proteína pequena. (B) A rápida reorganização do citoesqueleto de uma célula em resposta a um sinal externo.

Os filamentos intermediários são formados a partir de subunidades que são, por si próprias, fibrosas e longas, ao passo que os filamentos de actina e os microtúbulos são compostos por subunidades globulares e compactas – *subunidades de actina,* no caso dos filamentos de actina, e *subunidades de tubulina,* no caso dos microtúbulos. Esses três tipos de filamentos do citoesqueleto formam arranjos helicoidais de subunidades (ver Figura 3-26) que se associam através da combinação de contatos proteicos entre extremidades ou lateralmente. Diferenças entre as estruturas destas subunidades e da resistência das forças de atração existente entre elas são as principais responsáveis pelas diferenças marcantes e características de estabilidade e propriedades mecânicas de cada tipo de filamento.

Muitos polímeros biológicos – incluindo o DNA, o RNA e as proteínas – são mantidos em união por ligações covalentes entre suas subunidades. Em contraste, a estrutura dos três tipos de "polímeros" do citoesqueleto é mantida por interações não-covalentes fracas, o que significa que sua associação e dissociação podem ocorrer rapidamente, sem a necessidade de formação ou quebra de ligações covalentes.

No interior de uma célula, centenas de proteínas acessórias diferentes associadas ao citoesqueleto regulam a distribuição espacial e o comportamento dinâmico dos filamentos, convertendo informações recebidas através de vias de sinalização em ações do citoesqueleto. Essas proteínas acessórias ligam-se aos filamentos ou às suas subunidades para determinar o local de montagem de novos filamentos, para regular a distribuição das proteínas poliméricas entre as formas filamento ou subunidade, para modificar a cinética de montagem e dissociação dos filamentos, para concentrar a energia para gerar força e para ligar os filamentos uns aos outros ou a estruturas celulares, como organelas ou a membrana plasmática. Nesses processos, as proteínas acessórias mantêm a estrutura do citoesqueleto sob o controle de sinais intra e extracelulares, entre os quais se incluem aqueles que determinam as drásticas transformações que o citoesqueleto sofre durante cada uma das etapas do ciclo celular. Atuando de forma conjunta, as proteínas acessórias permitem que a célula eucariótica mantenha uma alta organização mesmo apresentando uma estrutura interna flexível, podendo inclusive, em muitos casos, locomover-se.

Filamentos formados a partir de múltiplos protofilamentos apresentam vantagens

Em geral, a ligação de subunidades proteicas entre si para a formação de um filamento pode ser vista como uma simples reação de associação. Uma subunidade livre liga-se à extremidade de um filamento que contém n subunidades para dar origem a um filamento de tamanho igual a $n + 1$. A adição de cada subunidade à extremidade terminal do polímero gera uma nova extremidade à qual uma nova subunidade pode ligar-se. Entretanto, os fortes filamentos do citoesqueleto das células vivas não são formados pela simples adição de subunidades em uma fita simples e contínua. Por exemplo, mil monômeros de tubulina alinhados por suas extremidades terminais seriam suficientes para cobrir o diâmetro de uma pequena célula eucariótica, mas um filamento assim formado não teria resistência suficiente para evitar seu rompimento pela ação da energia térmica ambiente, a menos que cada subunidade tivesse sido fortemente unida às duas subunidades adjacentes. Um sistema que utilizasse fortes associações entre as subunidades adjacentes limitaria a taxa de dissociação do filamento, fazendo com que o citoesqueleto fosse uma estrutura estática e bem menos útil do que na realidade é.

Os polímeros do citoesqueleto combinam resistência e capacidade de adaptação, pois são constituídos a partir de múltiplos **protofilamentos** – longas fitas lineares de subunidades unidas pelas extremidades – que se associam uns aos outros lateralmente. Em geral e como característica, os protofilamentos enrolam-se uns aos outros formando uma estrutura helicoidal. A adição ou a perda de uma subunidade na extremidade de um protofilamento forma ou quebra um conjunto de ligações longitudinais e um ou dois grupos de ligações laterais. Em contraste, para que haja a quebra de um filamento ao meio, é necessário que ocorra simultaneamente a quebra de um conjunto de ligações longitudinais em vários protofilamentos (**Figura 16-8**). A grande diferença de energia necessária entre estes dois processos faz com que a maioria dos filamentos esqueléticos resista à quebra térmica ao mesmo tempo

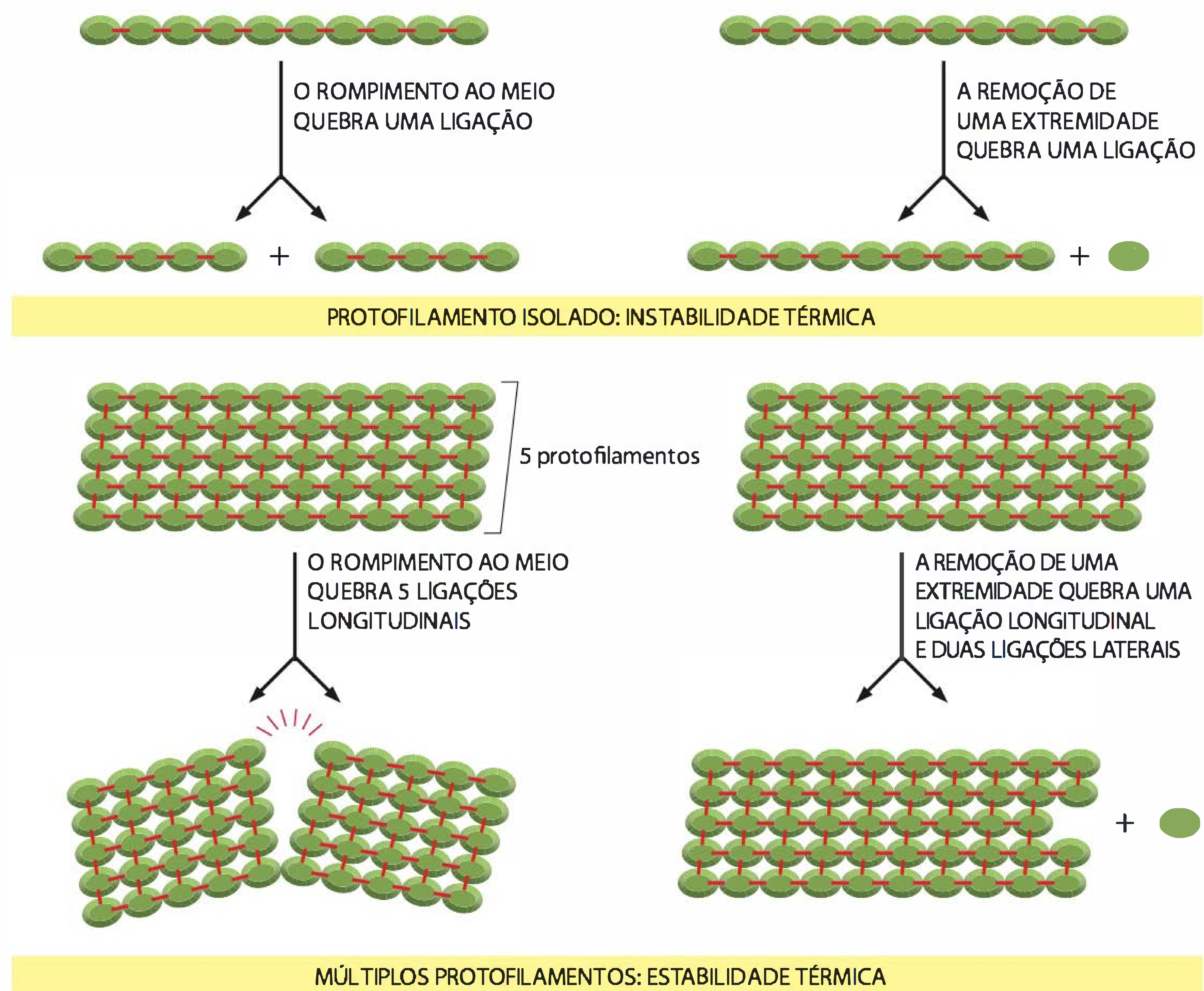


Figura 16-8 Estabilidade térmica de filamentos do citoesqueleto com extremidades dinâmicas. A formação de filamentos do citoesqueleto a partir de mais de um protofilamento permite a ocorrência de extremidades dinâmicas, ao mesmo tempo em que os filamentos *per se* apresentam resistência à degradação térmica. Neste exemplo hipotético, o filamento estável é formado a partir de cinco protofilamentos. As ligações que mantêm as subunidades unidas nos filamentos estão representadas em *vermelho*.

em que permite que as extremidades do filamento permaneçam como estruturas dinâmicas, onde subunidades podem ser rapidamente adicionadas ou retiradas.

Como ocorre em outras interações entre proteínas, as subunidades dos filamentos do citoesqueleto são mantidas em união por um grande número de interações hidrofóbicas e ligações não-covalentes fracas (ver Figura 3-4). Os pontos e tipos de contato entre as subunidades são diferentes para cada tipo de filamento do citoesqueleto. Os filamentos intermediários, por exemplo, são montados pela formação de contatos laterais fortes entre hélices α supertorcidas, as quais ocorrem ao longo da quase totalidade de cada subunidade fibrosa adicionada. Tendo em vista que as subunidades individuais estão intercaladas no filamento, os filamentos intermediários toleram a tração e a torção, formando estruturas fortes semelhantes a um cabo ou corda (**Figura 16-9**). Os microtúbulos, em contraste, são construídos a partir de subunidades globulares unidas entre si principalmente por ligações longitudinais, sendo comparativamente fracas as ligações laterais que unem o conjunto de 13 protofilamentos. Por essa razão, os microtúbulos são rompidos de forma muito mais fácil que os filamentos intermediários quando sofrem dobramento.

A taxa de nucleação é o fator limitante na formação de um polímero do citoesqueleto

Existe uma importante consequência adicional da organização dos polímeros citoesqueléticos estar baseada em múltiplos protofilamentos. Pequenos oligômeros compostos de pou-

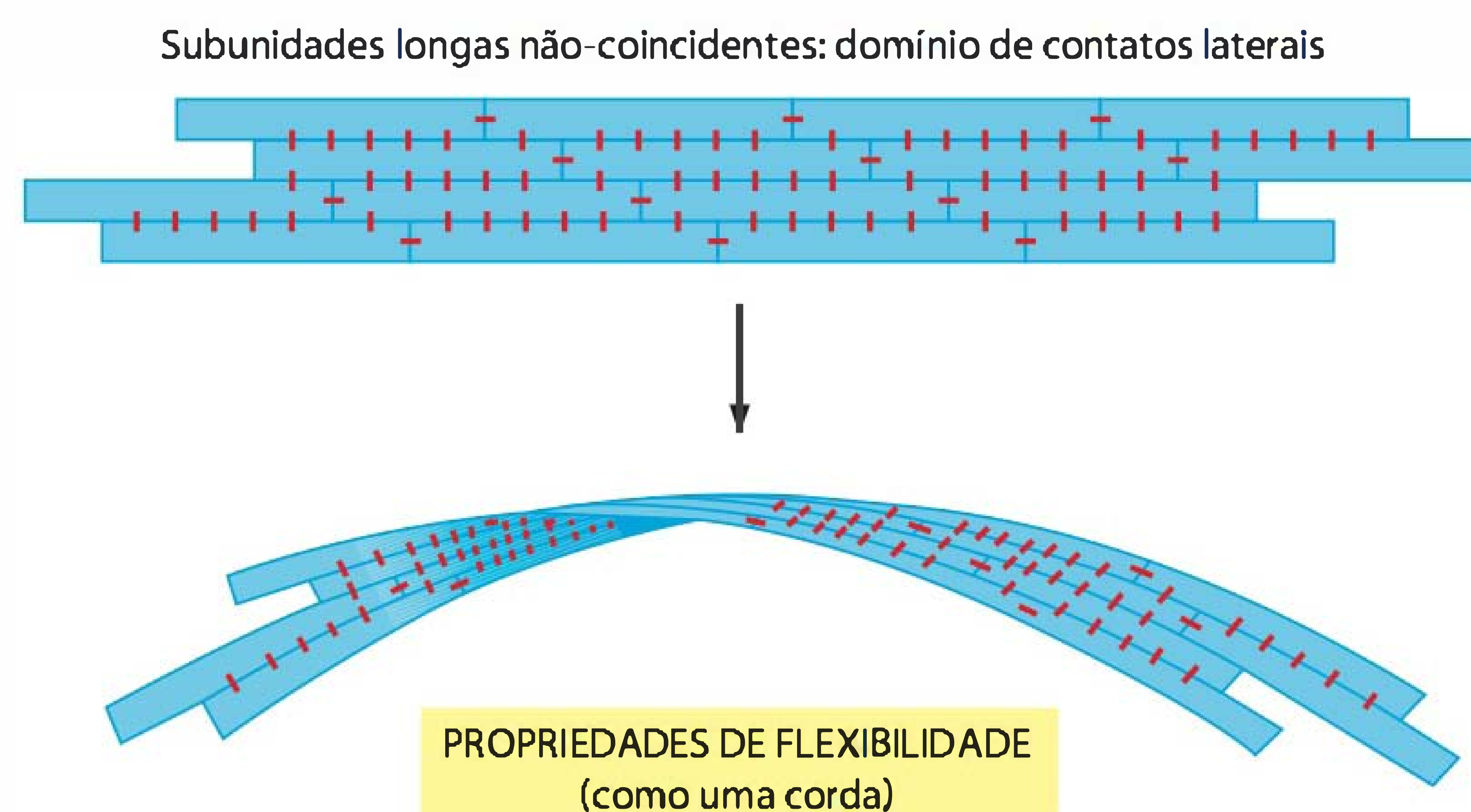


Figura 16-9 Filamento resistente formado a partir de subunidades de fibras alongadas com fortes contatos laterais. Filamentos intermediários são formados desta forma; como consequência, são especialmente resistentes a forças de tração, apesar de serem facilmente dobrados.

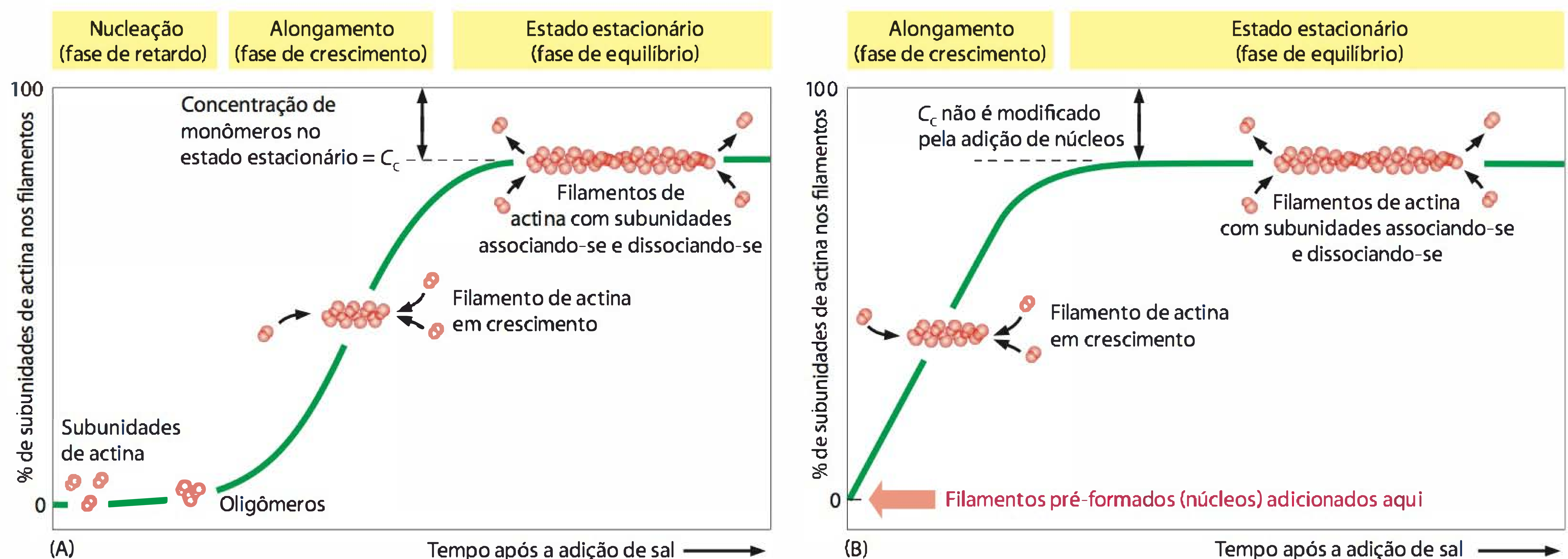


Figura 16-10 Curva de tempo da polimerização de actina em um tubo de ensaio. (A) A polimerização é iniciada pelo aumento da concentração salina em uma solução de subunidades puras de actina. (B) A polimerização é iniciada da mesma forma, mas na presença de filamentos de actina pré-formados que atuam como núcleos de crescimento dos filamentos. Conforme indicado, a porcentagem de subunidades livres reflete a concentração crítica (C_C), o ponto no qual o polímero encontra-se em um balanço de associação/dissociação e não apresenta alteração aparente.

cas subunidades podem sofrer organização espontânea, mas são instáveis e dissociam-se rapidamente, pois cada monômero está ligado a apenas um ou a poucos outros monômeros. Para que um novo grande filamento seja formado, as subunidades devem associar-se em um agregado inicial, ou núcleo, o qual será estabilizado por vários contatos subunidade-subunidade, e somente então poderá sofrer um rápido crescimento pela adição de novas subunidades. Este processo inicial de formação de um núcleo é chamado de *nucleação* do filamento, e pode levar um tempo considerável para ocorrer, dependendo de quantas subunidades devam unir-se para a formação deste núcleo.

A instabilidade dos agregados menores cria uma barreira cinética para a nucleação, a qual é facilmente observada em uma solução de actina ou tubulina pura – as subunidades dos filamentos de actina e dos microtúbulos, respectivamente. Quando a polimerização é iniciada em um tubo de ensaio contendo uma solução de subunidades individuais puras (pelo aumento da temperatura ou incremento da concentração salina), existe uma fase inicial de retardo durante a qual não são observados filamentos. Durante essa fase de retardo, no entanto, uns poucos agregados instáveis conseguem fazer a transição para a forma mais estável de filamento, de tal forma que a fase de retardo seja seguida por uma fase de rápido crescimento do filamento, na qual subunidades são rapidamente associadas às extremidades dos filamentos nucleados (**Figura 16-10**A). A seguir, o sistema aproxima-se de um estado de repouso no qual a taxa de adição de novas subunidades às extremidades dos filamentos é exatamente balanceada pela taxa de dissociação que ocorre nestas extremidades. A concentração de subunidades livres que permanece em solução neste momento é chamada de *concentração crítica*, C_c. Como explicado no **Painel 16-2** (p. 978-979), o valor da concentração crítica é igual à taxa constante de perda de subunidades dividida pela taxa constante de adição de subunidades, ou seja: $C_c = k_{off}/k_{on}$.

A fase de retardo do crescimento de um filamento é eliminada se núcleos preexistentes (como fragmentos de filamentos que tenham sido quimicamente ligados entre si) são adicionados à solução no início da reação de polimerização (Figura 16-10B). A célula tira grande proveito dessa necessidade de nucleação: ela utiliza proteínas especiais para catalisar a nucleação de filamentos em regiões específicas, desse modo determinando a localização onde novos filamentos do citoesqueleto deverão ser formados. De fato, a regulação da nucleação do filamento é uma forma essencial de controle por meio da qual as células regulam sua forma e seu movimento.

As subunidades de actina e tubulina associam-se à cabeça e à cauda em oposição, gerando filamentos polarizados

Os microtúbulos são formados por subunidades proteicas de **tubulina**. A subunidade de tubulina é, ela própria, um heterodímero formado de duas proteínas globulares bastante relacionadas denominadas *α-tubulina* e *β-tubulina*, fortemente associadas por ligações não-covalentes (**Figura 16-11**). Estas duas proteínas tubulina são encontradas apenas neste heterodímero. Cada um dos monômeros α e β possui um sítio de ligação a uma molécula de GTP. O GTP que se liga ao monômero de α-tubulina encontra-se fisicamente preso à interface do dímero e nunca é hidrolisado ou trocado; ele pode, portanto, ser considerado como parte integrante da estrutura do heterodímero de tubulina. Contrariamente, o nucleotídeo que se liga à β-tubulina pode estar ou sob a forma de GTP ou de GDP, e essa situação é intercambiável. Como poderemos ver, a hidrólise de GTP neste sítio, produzindo GDP, tem um importante efeito na dinâmica do microtúbulo.

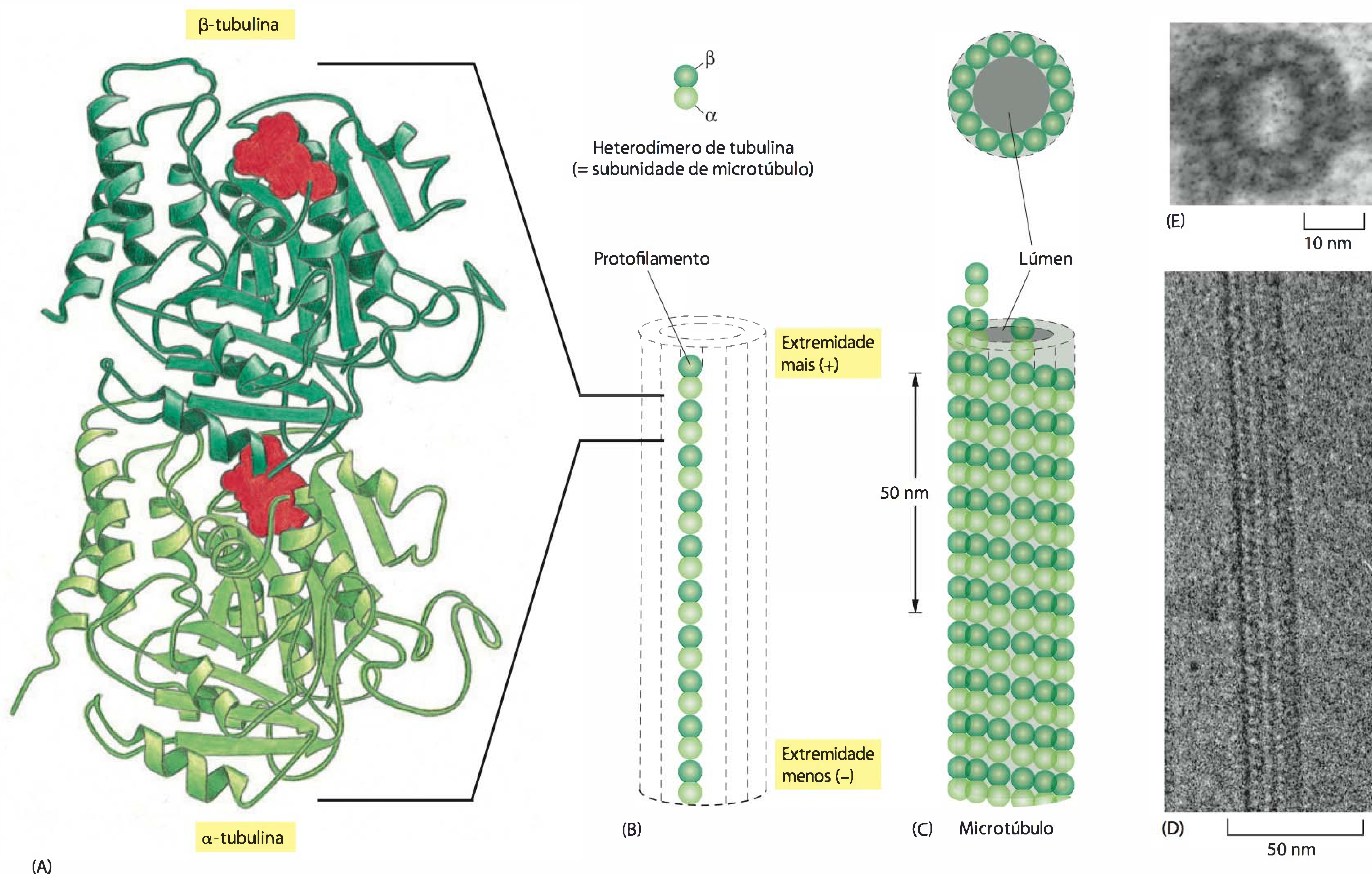


Figura 16-11 Estrutura de um microtúbulo e de suas subunidades. (A) A subunidade de cada protofilamento é um heterodímero de tubulina, formado por um par de monômeros de α e β-tubulina fortemente ligados. A molécula de GTP no monômero de α-tubulina está tão fortemente associada que pode ser considerada como parte integrante da proteína. A molécula de GTP no monômero de β-tubulina, no entanto, apresenta uma associação menos intensa e desempenha papel importante na dinâmica do filamento. Ambos os nucleotídeos estão apresentados em *vermelho*. (B) Uma subunidade de tubulina (heterodímero α-β) e um protofilamento estão apresentados esquematicamente. Cada protofilamento consiste em diversas subunidades adjacentes com a mesma orientação. (C) O microtúbulo é um cilindro oco rígido formado por 13 protofilamentos alinhados paralelamente. (D) Um segmento curto de microtúbulo visto em microscopia eletrônica. (E) Microfotografia eletrônica de uma secção transversal de um microtúbulo mostrando um anel de 13 protofilamentos distintos. (D, cortesia de Richard Wade; E, cortesia de Richard Linck.)

Um microtúbulo é uma estrutura cilíndrica oca e firme, construída a partir de 13 protofilamentos paralelos, cada um deles composto de moléculas alternadas de α-tubulina e β-tubulina. Quando os heterodímeros de tubulina são organizados para formar a estrutura cilíndrica oca do microtúbulo, eles dão origem a dois novos tipos de contatos proteína-proteína. Ao longo do eixo longitudinal do microtúbulo, o "topo" de uma molécula de β-tubulina forma uma interface com a "base" de uma molécula de α-tubulina da subunidade heterodimérica adjacente. Esta interface assemelha-se bastante à interface que mantém os monômeros α e β unidos na subunidade dimérica e apresenta uma forte energia de ligação. Perpendicularmente a essas interações, são formados contatos laterais entre protofilamentos vizinhos. Nesta dimensão, os principais contatos laterais ocorrem entre monômeros de mesmo tipo (α–α e β–β). Ambos os contatos laterais e longitudinais são repetidos no arranjo helicoidal regular do microtúbulo. Visto que múltiplos contatos nesse arranjo mantêm em união a maior parte das subunidades de um microtúbulo, a adição ou a perda de subunidades ocorre quase que exclusivamente nas extremidades do microtúbulo (ver Figura 16-8). Esses contatos múltiplos entre subunidades fazem com que os microtúbulos sejam rígidos e difíceis de sofrer dobramento. A rigidez de um filamento pode ser caracterizada pelo seu *comprimento de persistência*, uma propriedade do filamento que descreve quão longo ele pode ser sem que flutuações térmicas aleatórias provoquem sua quebra. O comprimento de persistência de um microtúbulo é de vários milímetros, o que os torna os elementos estruturais mais rijos e resistentes encontrados na maioria das células animais.

Cada um dos protofilamentos de um microtúbulo é montado a partir de subunidades que apontam para a mesma direção, sendo os protofilamentos, eles próprios, alinhados paralelamente (na Figura 16-11, por exemplo, a α-tubulina está posicionada para baixo e a β-tubulina está posicionada para cima em todos os heterodímeros). Desse modo, o microtúbulo apresentará uma polaridade estrutural distinta, onde as α-tubulinas estarão expostas em uma extremidade e as β-tubulinas estarão expostas na extremidade oposta.

A subunidade de actina é uma cadeia polipeptídica globular única, sendo portanto um monômero e não um dímero. Assim como a tubulina, cada subunidade de actina apresenta um sítio de ligação a um nucleotídeo, mas no caso da actina esse nucleotídeo será um ATP (ou ADP) ao invés de GTP (ou GDP) (**Figura 16-12**). Assim como a tubulina, as subunidades de actina associam-se em oposição de cabeça e de cauda para compor filamentos com

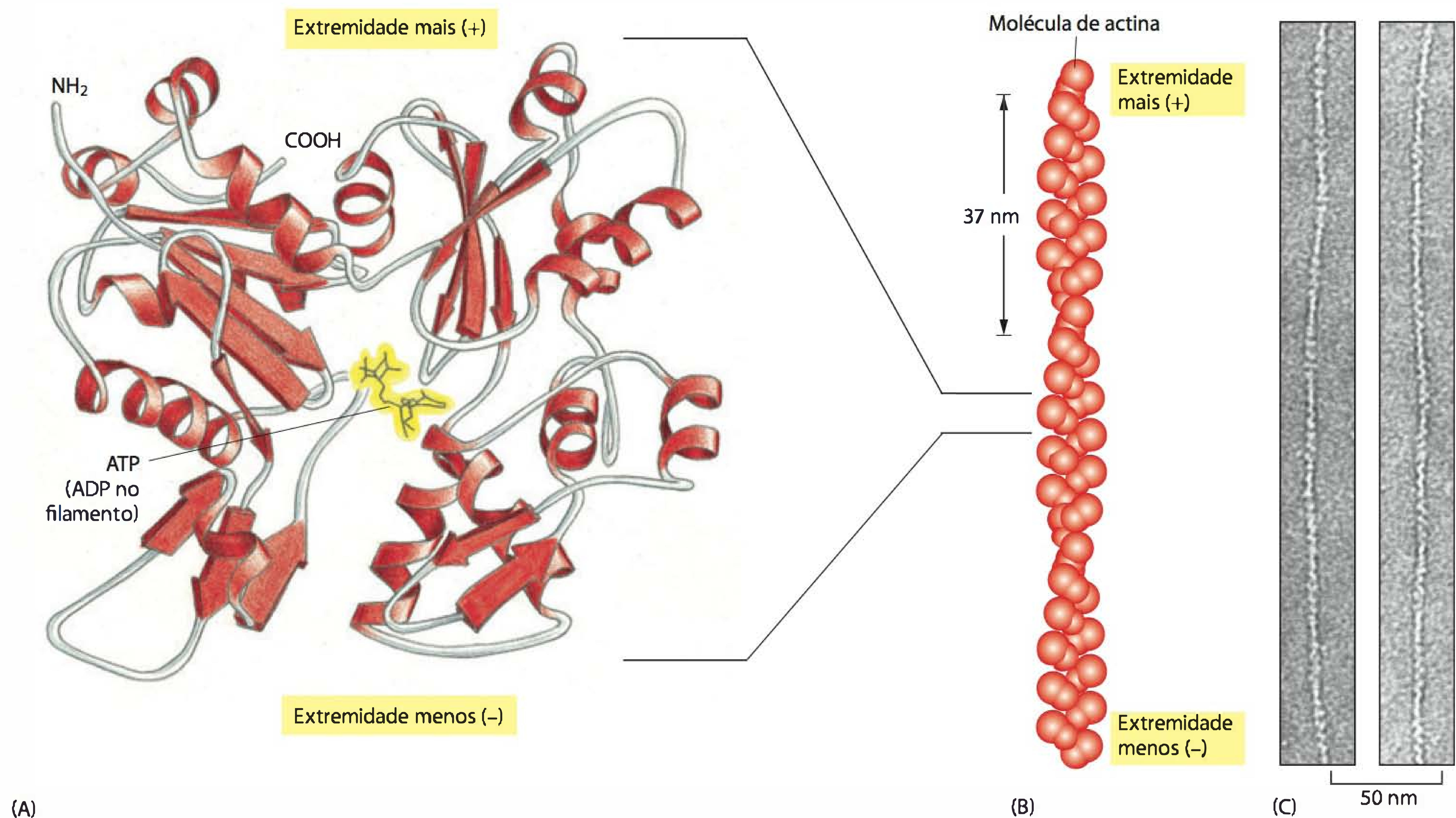


Figura 16-12 Estruturas de um monômero de actina e de um filamento de actina. (A) O monômero de actina possui um nucleotídeo (ATP ou ADP) ligado a uma profunda fenda no centro da molécula. (B) O arranjo de monômeros em um filamento. Apesar de o filamento frequentemente ser descrito como uma hélice simples de monômeros, ele também pode ser imaginado como consistindo em dois protofilamentos que são mantidos unidos por contatos laterais e que se enroscam um ao outro como duas fitas paralelas de uma hélice, apresentando uma volta completa a cada 37 nm. Todas as subunidades de um filamento apresentam a mesma orientação. (C) Microfotografia eletrônica de filamentos de actina em coloração negativa. (C, cortesia de Roger Craig.)

polaridade estrutural evidente. A composição do filamento de actina pode ser considerada como consistindo em dois protofilamentos paralelos enrolados um sobre o outro em uma hélice dextrógira. Os filamentos de actina são relativamente flexíveis e fáceis de ser curvados, se comparados aos cilindros ocos do microtúbulo, e apresentam um comprimento de persistência de apenas umas poucas dezenas de micrômetros. No entanto, em uma célula viva, proteínas acessórias (ver a seguir) interligam os filamentos formando feixes, tornando estas grandes estruturas muito mais fortes do que filamentos de actina individuais.

Filamentos de actina e microtúbulos possuem duas extremidades distintas com diferentes taxas de crescimento

A polaridade estrutural dos filamentos de actina e dos microtúbulos é criada pela orientação paralela e regular de todas as suas subunidades. Essa orientação faz com que as duas extremidades de cada polímero sejam diferentes entre si, e estas diferenças se refletirão nas taxas de crescimento do filamento. A adição de uma subunidade a qualquer uma das extremidades de um filamento com n subunidades resultará em um filamento de $n + 1$ subunidades. Na ausência de hidrólise de ATP ou GTP, a diferença de energia livre e, consequentemente, a constante de equilíbrio (e a concentração crítica) devem ser as mesmas para a adição de subunidades em qualquer uma das duas extremidades do polímero. Nesse caso, as proporções entre as taxas constantes de crescimento para a frente e para trás, k_{on}/k_{off}, devem ser idênticas para as duas extremidades, mesmo considerando-se que os valores absolutos destas taxas constantes possam ser bastante diferentes em cada extremidade.

Em um filamento estruturalmente polar, as taxas das constantes cinéticas para associação e dissociação – κ_{on} e κ_{off}, respectivamente – geralmente são bem maiores em uma das extremidades se comparadas à extremidade complementar. Assim, se permitirmos que um excesso de subunidades purificadas se associe a fragmentos marcados de filamentos pré-formados, observaremos que uma das extremidades de cada fragmento crescerá muito mais rapidamente do que a outra (**Figura 16-13**). Se os filamentos são rapidamente diluídos, de tal modo que a concentração de subunidades livres venha a situar-se abaixo da concentração crítica, a extremidade de crescimento mais rápido também sofrerá uma despolimerização mais rápida. A mais dinâmica das duas extremidades de um filamento, onde tanto o crescimento quanto a dissociação ocorrem mais rapidamente, é denominada **extremidade mais (+)**, e a outra extremidade recebe o nome de **extremidade menos (–)**.

Em microtúbulos, subunidades α estão expostas na extremidade menos (–) e subunidades β estão expostas na extremidade mais (+). No caso de filamentos de actina, a fenda de ligação ao ATP no monômero aponta para a extremidade menos (–). (Por razões históricas,

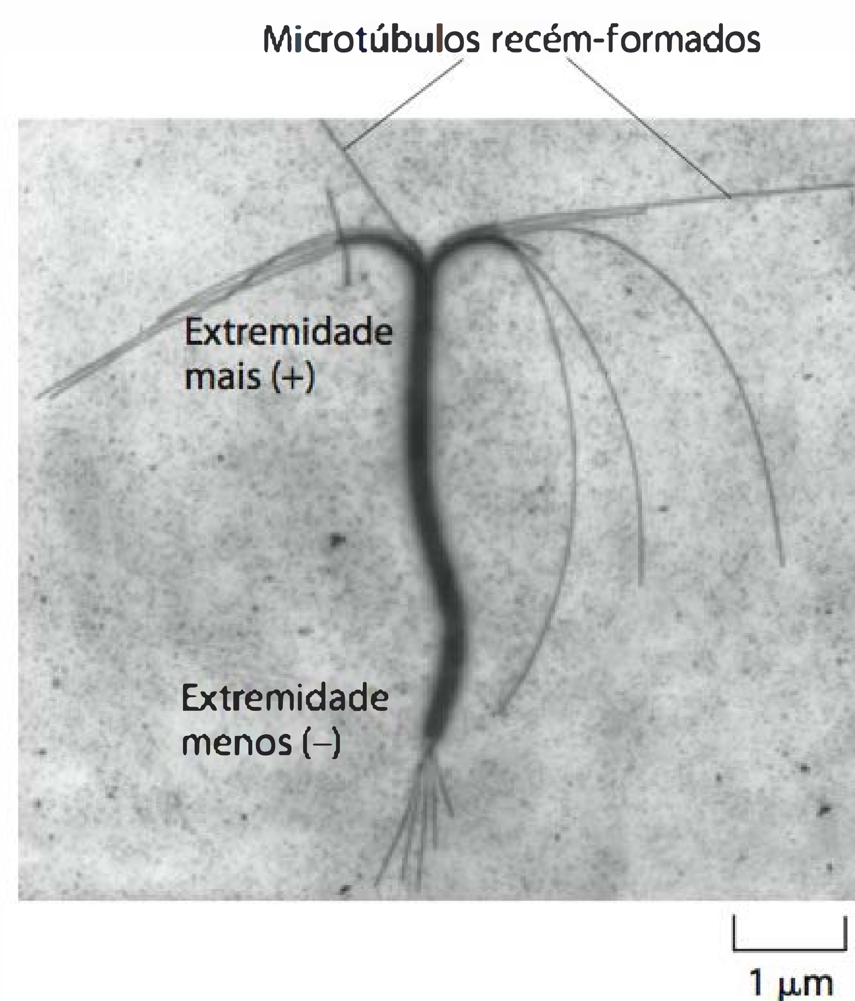


Figura 16-13 O crescimento preferencial de microtúbulos ocorre na extremidade mais (+). Tanto microtúbulos quanto filamentos de actina crescem mais rapidamente em uma das extremidades, em comparação à extremidade oposta. Neste caso, um feixe estável de microtúbulos obtido a partir do centro de um cílio (discutido a seguir) foi incubado, por um curto período, com subunidades de tubulina sob condições de polimerização. Microtúbulos crescem mais rapidamente na extremidade mais (+) do feixe, a extremidade que se encontra na parte *superior* desta microfotografia. (Cortesia de Gary Borisy.)

as extremidades mais dos filamentos de actina geralmente são referidas como extremidades "da pena", e as extremidades menos como extremidades "da ponta", devido à aparência de ponta de flecha que as cabeças de miosina apresentam quando ligadas sobre o filamento.)

O crescimento do filamento ocorre espontaneamente quando o equilíbrio de energia livre (ΔG) para a adição de subunidades solúveis é menor que zero. Este é o caso quando a concentração de subunidades em solução excede a concentração crítica. De forma semelhante, a despolimerização do filamento ocorre espontaneamente quando o equilíbrio de energia livre é maior que zero. Uma célula pode acoplar um processo energeticamente desfavorável a este processo espontâneo e, dessa forma, a energia livre liberada durante a polimerização ou despolimerização espontânea dos filamentos poderá ser usada para trabalhos mecânicos – em especial para puxar ou impulsionar uma determinada carga. Por exemplo, microtúbulos em crescimento podem impulsionar membranas para fora, e o encurtamento de microtúbulos pode colaborar, na mitose, puxando os cromossomos e separando as cromátides-irmãs durante a anáfase. De modo semelhante, o crescimento de filamentos de actina auxilia na protrusão da borda anterior de células com capacidade de migração, como será discutido mais tarde.

Os processos de *Treadmilling* (transferência contínua de subunidades de tubulina do final de um microtúbulo para o outro) e de instabilidade dinâmica dos filamentos são consequência da hidrólise de nucleotídeos pela tubulina e pela actina

Até o momento, nossa discussão a respeito da dinâmica de filamentos tem ignorado uma característica crítica que se aplica tanto a filamentos de actina quanto a microtúbulos. Além de sua capacidade de formar polímeros não-covalentes, ambas as subunidades de actina e de tubulina são enzimas que podem catalisar a hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo, ATP ou GTP, respectivamente. No caso de subunidades livres, essa hidrólise ocorre de forma bastante lenta; no entanto, o processo é acelerado quando as subunidades estão incorporadas nos filamentos. A hidrólise de nucleotídeo ocorre rapidamente, logo após a incorporação de uma subunidade de actina ou tubulina em um filamento; o grupo fosfato livre é liberado de cada subunidade, mas o difosfato de nucleosídeo permanece preso à estrutura do filamento. (No caso da tubulina, o sítio de ligação ao nucleotídeo está localizado na interface entre duas subunidades adjacentes – ver Figura 16-11 – enquanto que, para a actina, o nucleotídeo está mergulhado profundamente em uma fenda próxima ao centro da subunidade – ver Figura 16-12.) Assim, dois tipos diferentes de estruturas de filamento podem existir, um sob a "forma T" referente ao nucleotídeo ligado (ATP para a actina e GTP para a tubulina) e outro sob a "forma D" também referente ao nucleotídeo ligado (ADP para a actina e GDP para a tubulina).

Quando o nucleotídeo é hidrolisado, muito da energia livre liberada pela clivagem da ligação fosfato-fosfato de alta energia é estocado no arranjo do polímero. Isso faz com que o equilíbrio de energia livre de dissociação da forma D do polímero seja maior do que o da forma T. Consequentemente, a razão κ_{on}/k_{off} para a forma D do polímero, a qual é numericamente igual a sua concentração crítica [C_c(D)], é maior do que a razão correspondente para a forma T do polímero. Dessa forma, C_c(D) é maior do que C_c(T). Para determinadas concentrações de subunidades livres, polímeros de forma D sofrerão encurtamento, enquanto polímeros de forma T estarão em crescimento.

Em células vivas, a maioria das subunidades livres encontra-se sob a forma T, considerando-se que tanto as concentrações de ATP quanto as de GTP são aproximadamente dez vezes maiores do que as concentrações de ADP e GDP. Quanto mais tempo uma subunidade permanecer no arranjo polimérico, maior será a probabilidade de que esta venha a ter seu nucleotídeo hidrolisado. A taxa de hidrólise comparada à taxa de adição de subunidades definirá se a subunidade da extremidade de um filamento irá encontrar-se sob a forma T ou D. Se a taxa de adição de subunidades é alta, ou seja, se o filamento está crescendo rapidamente, é bastante provável que uma nova subunidade seja adicionada ao filamento antes que o nucleotídeo presente na subunidade anteriormente adicionada possa sofrer hidrólise e, dessa forma, ocorrerá a manutenção de uma forma T na extremidade do polímero, forman-

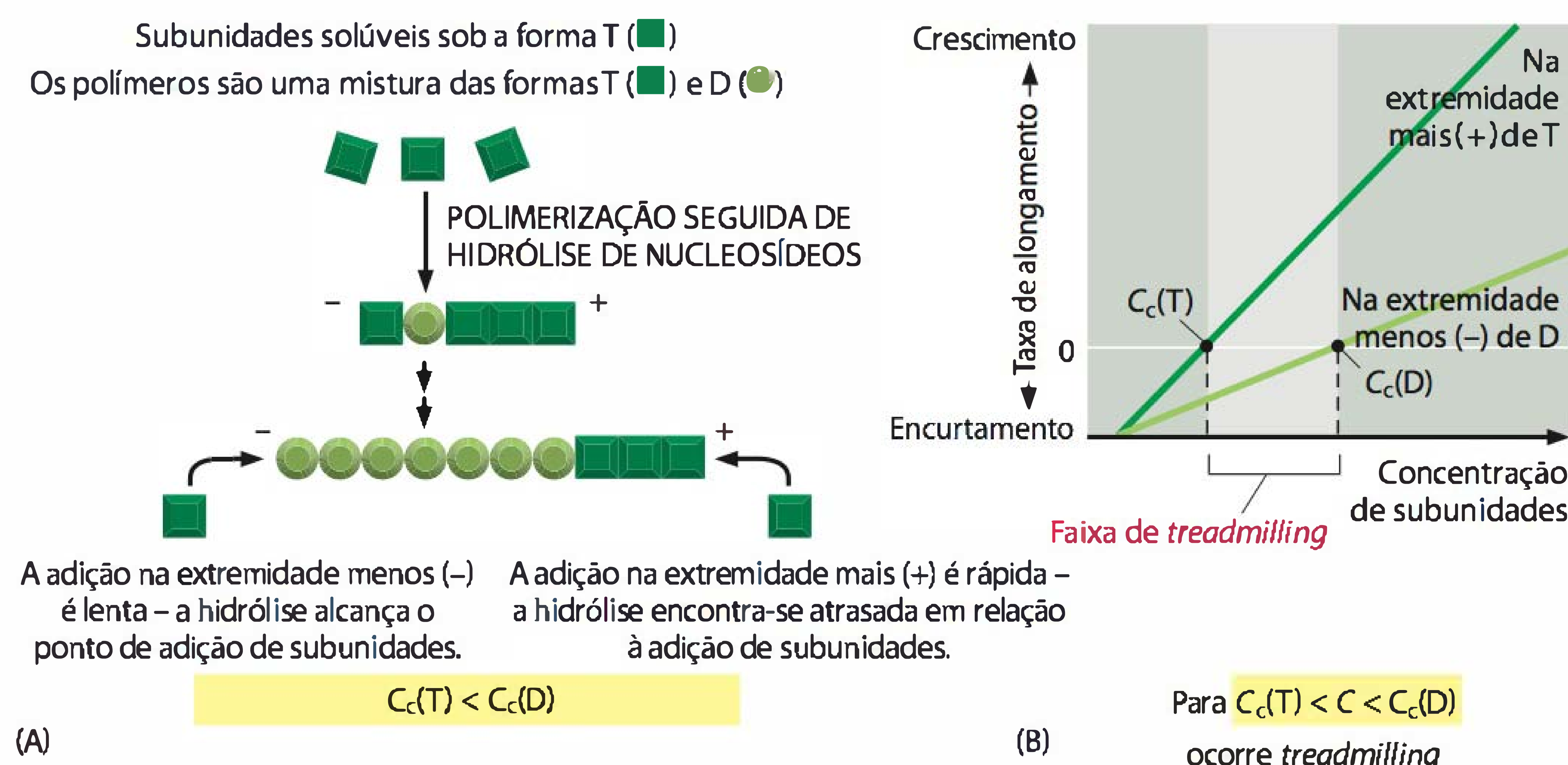


Figura 16-14 O processo de *treadmilling* de um filamento de actina ou microtúbulo é possível devido à hidrólise do trifosfato de nucleosídeo que se segue à adição da subunidade. (A) Explicação para as diferentes concentrações críticas (C_c) nas extremidades mais (+) e menos (–). As subunidades com trifosfato de nucleosídeo (subunidades de forma T) são introduzidas em ambas as extremidades de um filamento em crescimento e então sofrem hidrólise do nucleotídeo no corpo do filamento. Conforme o filamento cresce, neste exemplo, o processo de alongamento é mais rápido do que a hidrólise na extremidade mais (+), fazendo com que essa extremidade encontre-se sempre sob a forma T. Entretanto, a hidrólise na extremidade menos (–) é mais rápida do que o alongamento, e consequentemente as subunidades terminais nesta extremidade encontram-se sob a forma D. (B) O *treadmilling* ocorre em concentrações intermediárias de subunidades livres. A concentração crítica para a polimerização em uma extremidade de filamento sob a forma T é mais baixa do que para uma extremidade de filamento sob a forma D. Se a concentração de subunidades em um dado momento encontra-se em algum ponto entre estes dois valores, a extremidade mais (+) crescerá e a extremidade menos (–) encurtará, o que resultará em *treadmilling*.

do uma *capa de ATP* ou uma *capa de GTP*. Entretanto, se a taxa de adição de subunidades é baixa, a hidrólise poderá ocorrer antes da adição da próxima subunidade, e a extremidade do filamento se apresentará sob a forma D.

A taxa de adição de subunidades à extremidade do filamento é o produto da concentração de subunidades livres e da taxa constante k_{on}. A k_{on} é muito mais rápida para a extremidade mais (+) do que para a extremidade menos (–) do filamento, devido a diferenças estruturais existentes entre essas duas extremidades (ver Painel 16-2). Portanto, em concentrações intermediárias de subunidades livres, é possível que a taxa de adição de subunidades seja mais rápida do que a hidrólise de nucleotídeos na extremidade mais (+) e, simultaneamente, mais lenta do que a hidrólise de nucleotídeos na extremidade menos (–). Nesse caso, a extremidade mais (+) permanecerá sob a forma T, enquanto a extremidade D se apresentará sob a forma D. Como acabamos de discutir, a forma D possui uma concentração crítica mais alta do que a forma T. (Em outras palavras, a forma D encaminha-se mais facilmente para a dissociação, ao passo que a forma T apresenta uma tendência para o crescimento.) Se a concentração de subunidades livres na solução encontra-se em um nível intermediário – mais alto do que a concentração crítica para a forma T (ou seja, para a extremidade mais [+]), mas mais baixo do que a concentração crítica para a forma D (ou seja, para a extremidade menos [–]) – o filamento sofrerá adição de subunidades na extremidade mais (+) e, simultaneamente, perda de subunidades na extremidade menos (–). Isso leva a uma propriedade característica do filamento denominada ***treadmilling*** (**Figura 16-14** e Painel 16-2).

Durante o *treadmilling*, subunidades sob a forma T são recrutadas para a extremidade mais (+) do polímero ao mesmo tempo em que subunidades sob a forma D desprendem-se da extremidade menos (–). É a hidrólise de ATP ou GTP que ocorre ao longo deste recrutamento e a perda de subunidades que dão origem à diferença da energia livre das reações de associação/dissociação nas extremidades menos e mais do filamento de actina ou do microtúbulo e que, consequentemente, tornam possível a ocorrência de *treadmilling*. Sob uma concentração intermediária particular de subunidades, o crescimento do filamento na extremidade mais (+) se encontra exatamente balanceado pela dissociação de subunidades da extremidade menos (–). Neste ponto, as subunidades alternam rapidamente entre os estados livre ou filamento, enquanto o comprimento total do filamento permanece inalterado. Este ponto de "*treadmilling* de repouso" requer consumo constante de energia sob a forma de hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo. Apesar de a extensão do processo de *treadmilling* dentro de uma célula não estar determinada, já foi possível observar o *treadmilling* de filamentos isolados de actina *in vitro*, além de ser possível observar em células vivas, para microtúbulos individuais, um fenômeno que se assemelha ao *treadmilling* (**Figura 16-15**).

As diferenças cinéticas entre o comportamento das formas D e T tem outra importante consequência sobre o comportamento dos filamentos. Se a taxa de adição de subunidades

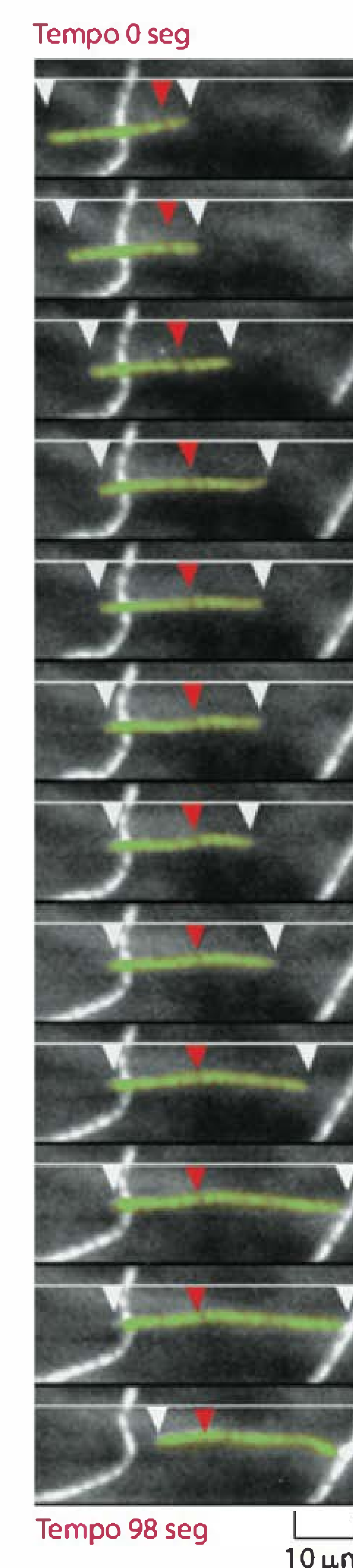
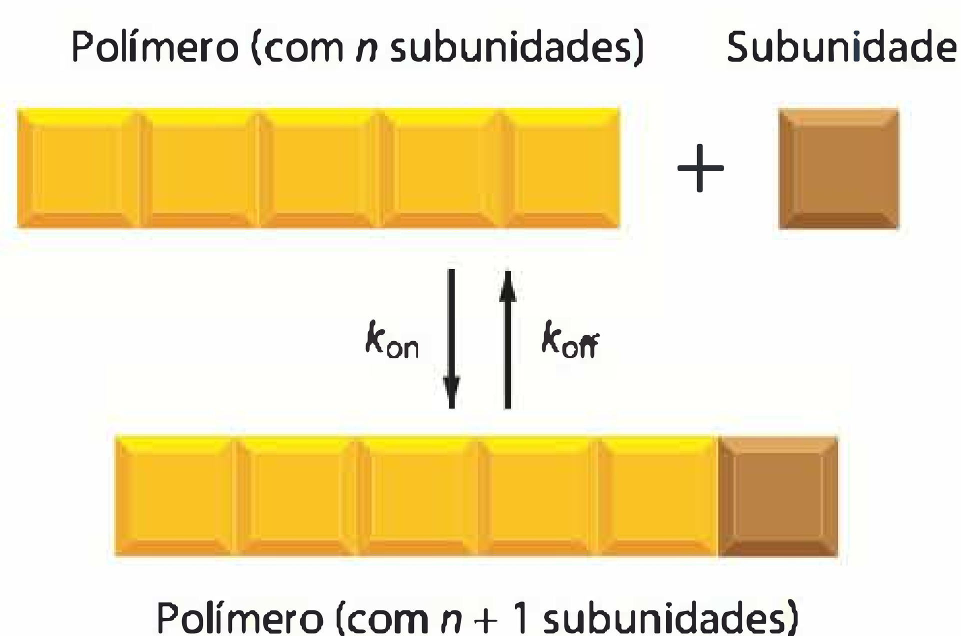


Figura 16-15 Comportamento de um microtúbulo em *treadmilling*, como observado em uma célula viva. Uma célula foi injetada com tubulina anteriormente marcada de tal forma com o corante fluorescente rodamina que 1 em cada 20 subunidades de tubulina são fluorescentes. A fluorescência de microtúbulos individuais foi observada com uma câmara eletrônica sensível. O microtúbulo observado parece deslizar da *esquerda* para a *direita*, mas na verdade a rede permanece estacionária (como pode ser observado pela marca escura, sobre o microtúbulo, indicada pela seta *vermelha*), enquanto a extremidade mais (+) (à *direita*) cresce e a extremidade menos (–) (à *esquerda*) sofre encurtamento. Simultaneamente, a extremidade mais (+) apresenta instabilidade dinâmica. (De C. M. Waterman-Storer e E. D. Salmon, *J. Cell Biol.* 139:417-434, 1997. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

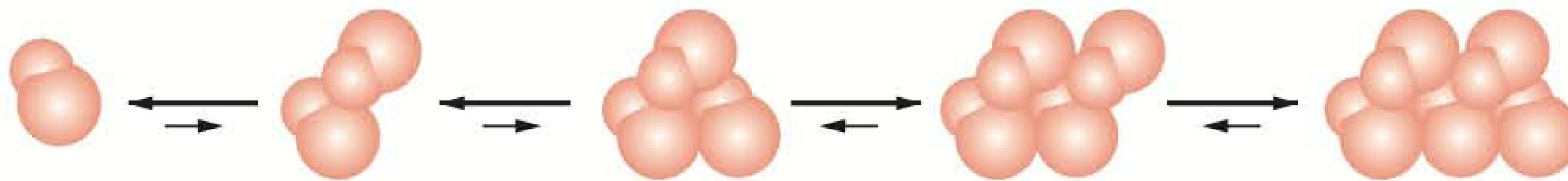
TAXAS DE ADIÇÃO E TAXAS DE REMOÇÃO

Um polímero linear de moléculas proteicas, como um filamento de actina ou um microtúbulo, associa-se (polimeriza) e dissocia (despolimeriza) pela adição ou remoção de subunidades nas extremidades do polímero. A taxa de adição destas subunidades (chamadas de monômeros) é dada pela taxa constante k_{on}, expressa em M^{-1} seg^{-1}. A taxa de remoção é dada por k_{off} (unidades de seg^{-1}).



NUCLEAÇÃO

Um polímero helicoidal é estabilizado por múltiplos contatos entre as subunidades adjacentes. No caso da actina, duas moléculas de actina sofrem ligação relativamente fraca, uma em relação à outra, mas a adição de um terceiro monômero de actina formando um trímero torna este grupo mais estável.



Adições subsequentes de monômeros podem ocorrer sobre este trímero, que atuará como um núcleo para a polimerização. No caso da tubulina, o núcleo é maior e tem uma estrutura mais complicada (possivelmente sendo feito de um anel com 13 ou mais moléculas de tubulina), mas o princípio básico é o mesmo.

A associação de um núcleo é relativamente lenta, o que explica a fase de retardo observada durante a polimerização. Esta fase de retardo pode ser reduzida ou inteiramente abolida se núcleos pré-formados, como fragmentos de microtúbulos ou filamentos de actina já polimerizados, forem adicionados.

A CONCENTRAÇÃO CRÍTICA

O número de monômeros que são adicionados ao polímero (filamento de actina ou microtúbulo) por segundo será proporcional à concentração de subunidades livres ($k_{on}C$); no entanto, as subunidades deixarão a extremidade livre sob uma taxa constante (k_{off}), a qual não depende de *C*. Conforme o polímero cresce, as subunidades são utilizadas, e *C* diminui até alcançar um valor constante, chamado de concentração crítica (C_c). Nesta concentração, a taxa de adição de subunidades se iguala à taxa de perda de subunidades. Neste equilíbrio,

$$k_{on}\,C = k_{off}$$

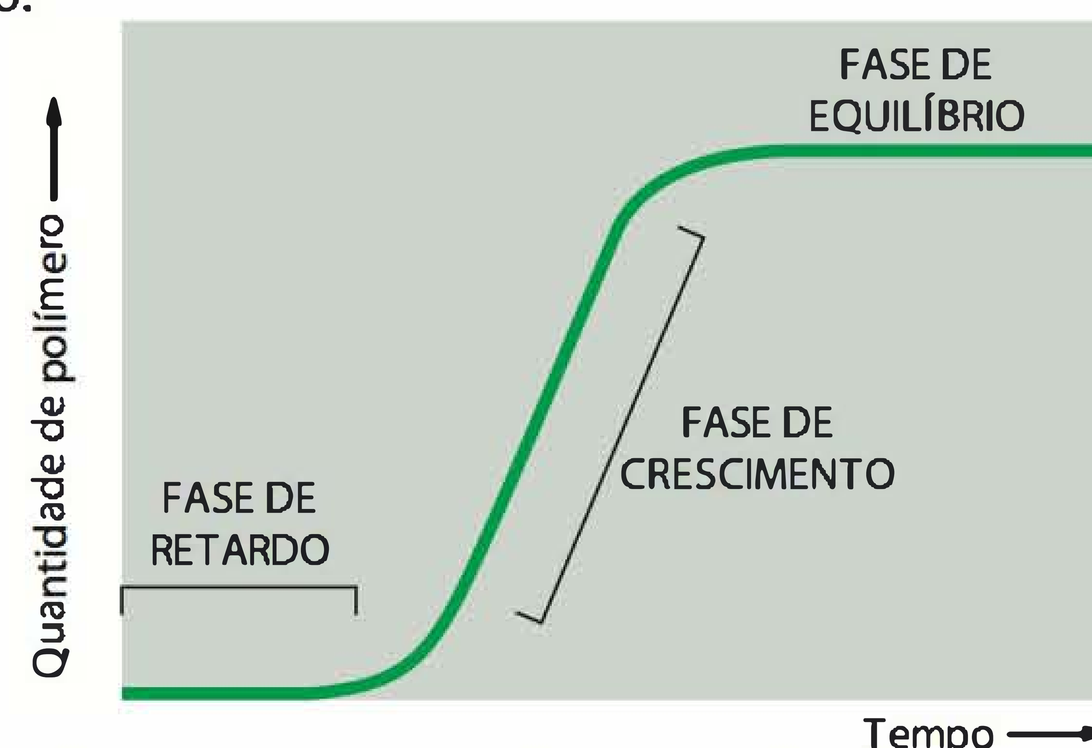
de tal forma que

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{1}{K}$$

(onde *K* é a constante de equilíbrio para a adição de subunidades; ver Figura 3-43).

CURVA DE TEMPO DA POLIMERIZAÇÃO

A montagem de uma proteína sob a forma de um longo polímero helicoidal como um filamento do citoesqueleto ou um flagelo de bactéria apresenta, caracteristicamente, a seguinte curva de tempo:



A fase de retardo corresponde ao tempo necessário à nucleação.

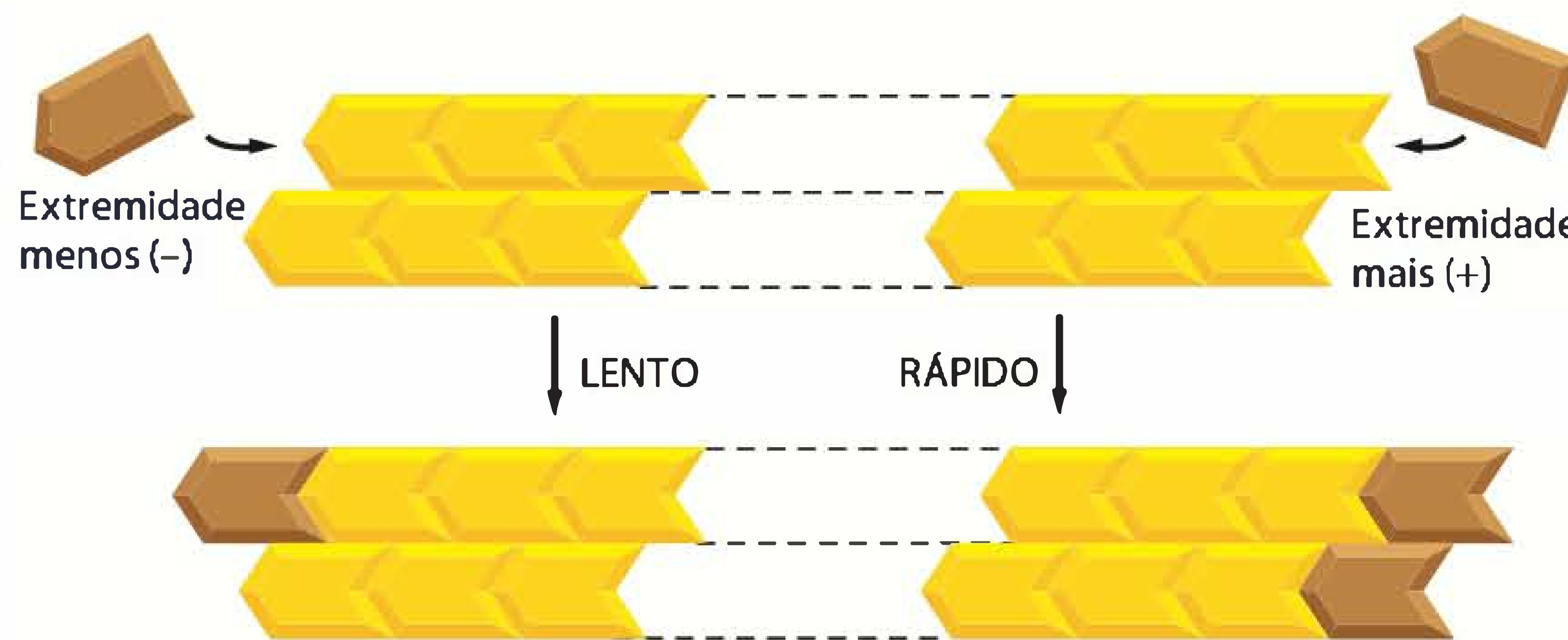
A fase de crescimento ocorre enquanto os monômeros são adicionados nas extremidades do filamento, levando ao aumento do seu comprimento.

A fase de equilíbrio, ou fase de repouso, é alcançada quando o crescimento do polímero devido à adição de monômeros é exatamente equilibrado pelo encurtamento do polímero devido à dissociação de monômeros.

EXTREMIDADES MAIS (+) E EXTREMIDADES MENOS (–)

As duas extremidades de um filamento de actina ou de microtúbulo polimerizam sob diferentes taxas. A extremidade de crescimento mais rápido é denominada extremidade mais (+), enquanto a extremidade que apresenta crescimento mais lento é chamada de extremidade menos (–). A diferença entre as taxas de crescimento das duas extremidades ocorre devido a alterações conformacionais que ocorrem em cada subunidade conforme elas se integram ao polímero.





Esta alteração conformacional afeta as taxas nas quais subunidades são adicionadas às duas extremidades.

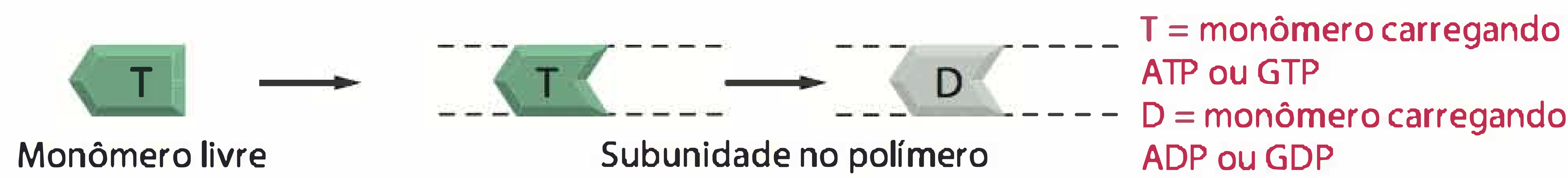
Mesmo se k_{on} e k_{off} tiverem valores diferentes para as extremidades mais e menos do polímero, a relação k_{on}/k_{off} – e desse modo C_c – deverá ser a mesma em ambas as extremidades no caso de uma reação de polimerização simples (sem hidrólise de ATP ou GTP). Isso ocorre porque exatamente as mesmas interações de subunidade são quebradas quando uma subunidade é perdida em qualquer uma das extremidades, e o estado final da subunidade após a dissociação é idêntico em ambos os casos.

Desse modo, o ΔG para a perda de subunidades, o qual determina a constante de equilíbrio para a sua associação com a extremidade, é idêntico em ambas as extremidades: se a extremidade mais (+) cresce quatro vezes mais rapidamente do que a extremidade menos (–), ela também sofre encurtamento quatro vezes mais rápido. Assim, para $C > C_c$ ambas as extremidades crescem; para $C < C_c$, ambas as extremidades sofrem encurtamento.

A hidrólise de trifosfato de nucleosídeo que acompanha a polimerização de actina e de tubulina elimina essa restrição.

A HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS

Cada molécula de actina carrega uma molécula de ATP fortemente associada e que é hidrolisada em uma molécula de ADP fortemente associada logo após sua adição ao polímero. De forma semelhante, cada molécula de tubulina carrega uma molécula de GTP fortemente associada que é convertida em uma molécula de GDP fortemente associada logo após sua adição ao polímero.



A hidrólise do nucleotídeo associado reduz a afinidade de ligação da subunidade pelas subunidades adjacentes e torna mais provável a dissociação desta subunidade na extremidade do filamento (ver Figura 16-16 para um modelo deste mecanismo). É geralmente a forma T que é adicionada ao filamento e a forma D que sofre dissociação.

Considerando apenas os eventos na extremidade mais (+):



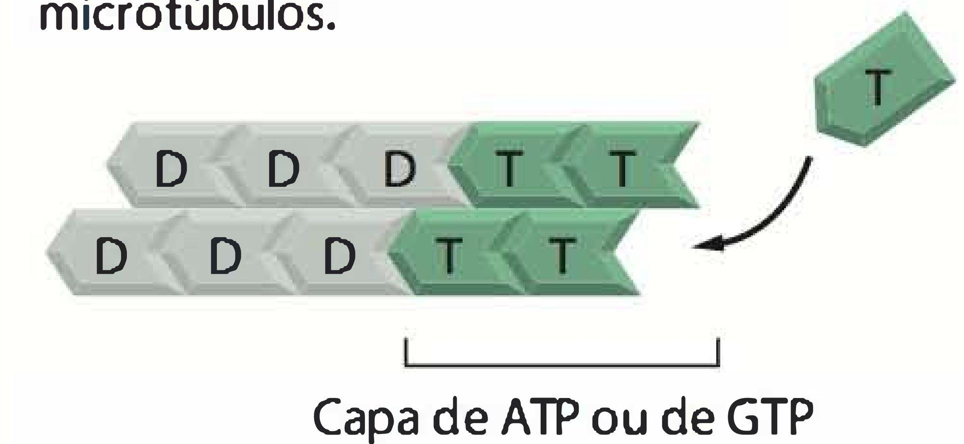
Como anteriormente, o polímero crescerá até $C = C_c$. Para fins ilustrativos, podemos ignorar k^D_{on} e k^T_{off} uma vez que eles geralmente são muito pequenos, de tal modo que o crescimento do polímero cessará quando

$$k^T_{on}\, C = k^D_{off} \quad \text{ou} \quad C_c = \frac{k^D_{off}}{k^T_{on}}$$

Este é um estado de constância e não um equilíbrio verdadeiro, pois o ATP ou o GTP que é hidrolisado deverá ser reposto por reações de troca de nucleotídeos de subunidades livres (D → T).

CAPAS ATP E CAPAS GTP

A taxa de adição de subunidades em um filamento de actina ou microtúbulo em crescimento pode ser mais rápida do que a taxa na qual seus nucleotídeos associados são hidrolisados. Sob estas condições, a extremidade possuirá uma "capa" de subunidades contendo o trifosfato de nucleosídeo – uma capa de ATP no caso de filamentos de actina ou uma capa de GTP no caso de microtúbulos.



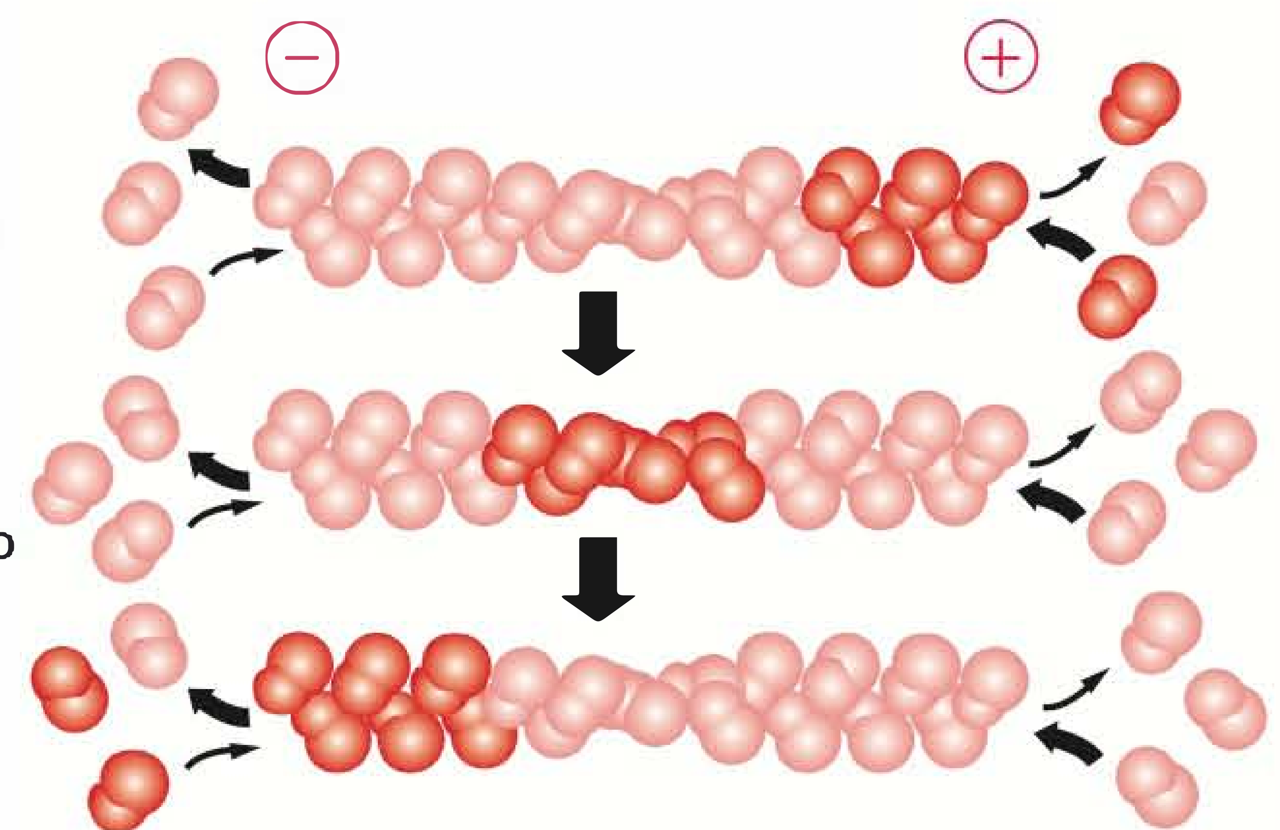
INSTABILIDADE DINÂMICA E *TREADMILLING* são dois comportamentos observados em polímeros do citoesqueleto. Ambos estão associados à hidrólise de trifosfatos de nucleotídeo. Acredita-se que a instabilidade dinâmica predomine em microtúbulos e que o *treadmilling* deva predominar em filamentos de actina.

TREADMILLING

Uma consequência da hidrólise de nucleotídeos que acompanha a formação do polímero é a mudança da concentração crítica em ambas as extremidades do polímero. Considerando que k^D_{off} e k^T_{on} referem-se a diferentes reações, sua relação k^D_{off}/k^T_{on} não precisa ser a mesma em ambas as extremidades do polímero, de modo que:

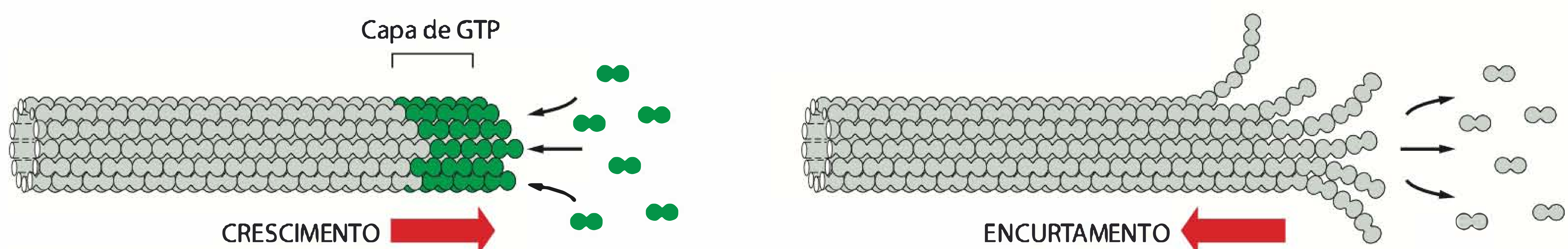
$$C_c \text{ (extremidade menos [–])} > C_c \text{ (extremidade mais [+])}$$

Desse modo, se ambas as extremidades de um polímero estão expostas, a polimerização prossegue até que a concentração do monômero livre alcance um valor que seja acima de C_c para a extremidade mais (+) e abaixo de C_c para a extremidade menos (–). Neste estado de repouso, as subunidades estarão sendo, na média, associadas à extremidade mais (+) e, na média, dissociadas da extremidade menos (–) sob taxas idênticas. O polímero manterá um tamanho constante, mesmo considerando-se que existe um fluxo médio de subunidades através do polímero, denominado *treadmilling*.



INSTABILIDADE DINÂMICA

Os microtúbulos despolimerizam aproximadamente 100 vezes mais rápido extremidades que contêm tubulina GDP do que extremidades que contêm tubulina GTP. Uma capa de GTP favorece o crescimento, mas se for perdida, ocorrerá despolimerização.



Microtúbulos isolados podem, portanto, alternar períodos de lento crescimento e períodos de rápida dissociação, um processo conhecido como instabilidade dinâmica.

em uma das extremidades é similar em magnitude à taxa de hidrólise, existe uma probabilidade finita de que esta extremidade começará sob a forma T, mas que a hidrólise eventualmente poderá "alcançá-la", transformando-a em uma forma D. Essa transformação ocorrerá de forma repentina e aleatória, sua ocorrência correspondendo a uma determinada probabilidade por unidade de tempo.

Suponha que a concentração de subunidades livres é intermediária entre as concentrações críticas das formas de extremidade T e D (isto é, na mesma faixa de concentrações onde o *treadmilling* ocorre). Neste momento, qualquer extremidade que esteja sob a forma T sofrerá crescimento, ao passo que qualquer extremidade que esteja sob a forma D apresentará dissociação e consequente encurtamento. Em um determinado filamento, uma extremidade sob a forma T poderá crescer durante um dado período de tempo, mas então repentinamente mudar para a forma D e começar rapidamente a encurtar, mesmo considerando que a concentração de subunidades livres foi mantida constante. Algum tempo depois, este filamento pode readquirir a forma T e começar a crescer novamente. Esta rápida interconversão entre os estados de crescimento e encurtamento que ocorre sob concentração uniforme de subunidades livres recebe o nome de **instabilidade dinâmica** (**Figura 16-16**A). Uma mudança para um estado de rápido encurtamento recebe o nome de *catástrofe*, ao passo que uma mudança direcionada para o crescimento é chamada de *resgate*.

Em uma população de microtúbulos, em um dado instante, algumas extremidades estão sob a forma T ao passo que outras se encontram sob a forma D, em uma razão dependente da taxa de hidrólise e da concentração de subunidades. A diferença estrutural entre as extremidades de forma T e as extremidades de forma D é marcante. Subunidades de tubulina com GTP ligado ao monômero β produzem protofilamentos retos que interagem entre si por contatos laterais fortes e regulares. A hidrólise de GTP para GDP está associada, no entanto, a uma discreta alteração conformacional na proteína, que provoca uma flexão nos protofilamentos (Figura 16-16B). Em um microtúbulo em rápido crescimento, a capa de GTP restringe a curvatura dos protofilamentos, e as extremidades parecem retas. No entanto, quando as subunidades terminais têm seus nucleotídeos hidrolisados, essa restrição é abolida, e os protofilamentos curvos sofrem separação. Essa liberação cooperativa da energia de hidrólise armazenada no arranjo de microtúbulos resulta em uma rápida desmontagem dos protofilamentos curvos, podendo ser observados anéis e oligômeros curvos de tubulina contendo GDP nas proximidades dos microtúbulos em processo de despolimerização (Figura 16-16C).

Os filamentos de actina também apresentam flutuações de comprimento. No entanto, em um estado de repouso, seu comprimento varia não mais do que um micrômetro em um período englobando vários minutos, uma escala muito menor se comparada à variação de dezenas de micrômetros que ocorre por instabilidade dinâmica nos microtúbulos. Na maioria das células eucarióticas, acredita-se que a instabilidade dinâmica ocorra predominantemente nos microtúbulos, ao passo que o *treadmilling* seria característico dos filamentos de actina.

O *Treadmilling* e a instabilidade dinâmica auxiliam a rápida reorganização do citoesqueleto

Tanto o *treadmilling* quanto a instabilidade dinâmica permitem que a célula mantenha o mesmo conteúdo médio de filamentos ao mesmo tempo em que subunidades individuais estão sendo constantemente recicladas entre o citosol e os filamentos. Mas, afinal, quão dinâmicos são os filamentos de actina e os microtúbulos no interior de uma célula viva? Tipicamente, um microtúbulo, com suas marcantes diferenças estruturais entre suas extremidades em crescimento e encurtamento, alterna entre crescimento e encurtamento em um espaço de tempo de poucos minutos. As extremidades de microtúbulos individuais podem, portanto, ser observadas em tempo real para que possamos visualizar a instabilidade dinâmica (**Figura 16-17**). Devido a seu menor tamanho e empacotamento mais denso, é mais difícil visualizar as extremidades de filamentos de actina individuais em uma célula viva. No entanto, com o uso de técnicas apropriadas com base em microscopia de fluorescência, é possível demonstrar que o *turnover* dos filamentos de actina ocorre rapidamente, e que filamentos individuais persistem por períodos não superiores a algumas dezenas de segundos ou poucos minutos.

À primeira vista, este comportamento dinâmico dos filamentos parece representar um gasto desnecessário de energia. Para manter a concentração constante de filamentos de actina e microtúbulos, a maioria dos quais está sofrendo a ação de *treadmilling* e da instabilidade dinâmica, a célula deve hidrolisar grandes quantidades de trifosfatos de nucleosídeo. Como exemplificamos com nossa analogia da trilha das formigas no início do capítulo, a vantagem para a célula parece residir na flexibilidade espacial e temporal que é inerente a um sistema

estrutural com *turnover* constante. Subunidades individuais são pequenas e podem difundir rapidamente; uma subunidade de actina ou tubulina pode difundir a uma distância correspondente ao diâmetro de uma célula eucariótica típica em poucos segundos. Como observado anteriormente, a etapa limitante da taxa de formação de um novo filamento é a nucleação, então

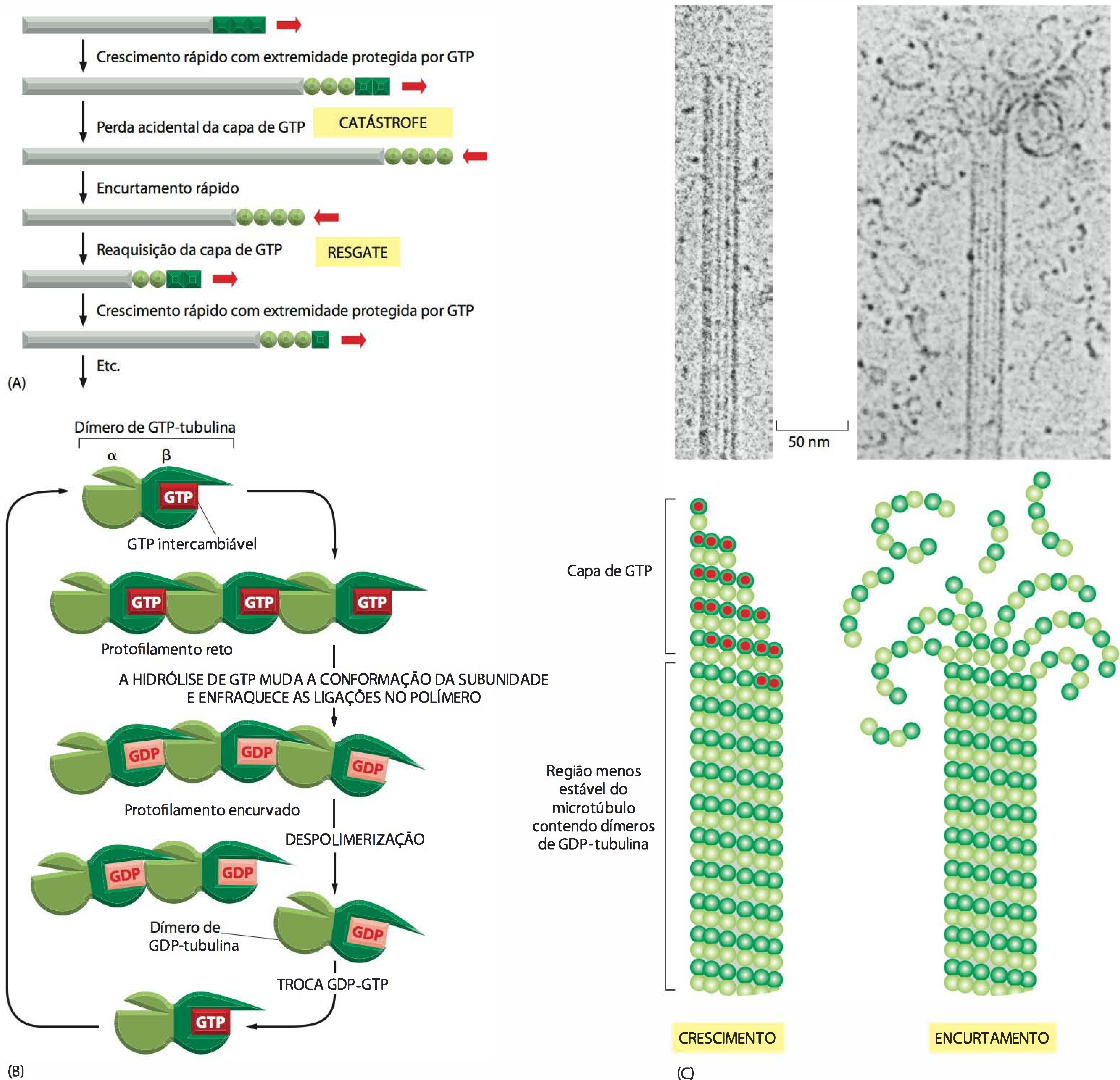


Figura 16-16 Instabilidade dinâmica devido a diferenças estruturais entre as extremidades do microtúbulo que estão sob crescimento e encurtamento. (A) Se a concentração de tubulina livre na solução encontra-se entre os valores críticos indicados na Figura 16-14B, uma extremidade determinada do microtúbulo pode sofrer transições entre estados de crescimento e encurtamento. Um microtúbulo em crescimento possui subunidades com GTP em sua extremidade, formando uma proteção, ou capa, de GTP. Se a hidrólise de nucleotídeos ocorre mais rapidamente do que a adição de subunidades, essa proteção é perdida, e o microtúbulo começa a sofrer encurtamento, em um evento denominado "catástrofe". No entanto, subunidades com GTP ainda podem ser adicionadas à extremidade que está sob encurtamento e, se inseridas subunidades suficientes para formar uma nova capa, o microtúbulo retoma o crescimento em um evento chamado de "resgate". (B) Modelo para as consequências estruturais da hidrólise de GTP no corpo do microtúbulo. A adição de subunidades de tubulina contendo GTP à extremidade de um protofilamento provoca o crescimento linear deste, que poderá facilmente empacotar sob a forma da parede cilíndrica do microtúbulo. A hidrólise de GTP, após a montagem, modifica a conformação das subunidades e tende a forçar o encurvamento do protofilamento, tornando-o menos eficiente na formação da parede do microtúbulo. (C) Em um microtúbulo intacto, protofilamentos constituídos de subunidades com GDP são forçados a tomar uma conformação linear devido à existência de muitas ligações laterais dentro da parede do microtúbulo, o que ocasiona a formação de uma capa estável de subunidades contendo GTP. A perda da capa de GTP, no entanto, permite o relaxamento dos protofilamentos com GDP que adquirem a conformação mais recurvada. Isso leva a uma disrupção progressiva do microtúbulo. Acima dos desenhos que esquematizam microtúbulos em crescimento e em encurtamento, microfotografias eletrônicas mostram microtúbulos reais em cada um desses dois estados, observados em preparações em gelo vítreo. Observe particularmente os protofilamentos encaracolados de subunidades de GDP que estão desintegrando-se na extremidade do microtúbulo em encurtamento. (C, cortesia de E. M. Mandelkow, E. Mandelkow e R. A. Milligan, *J. Cell Biol.* 114: 977-991, 1991. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

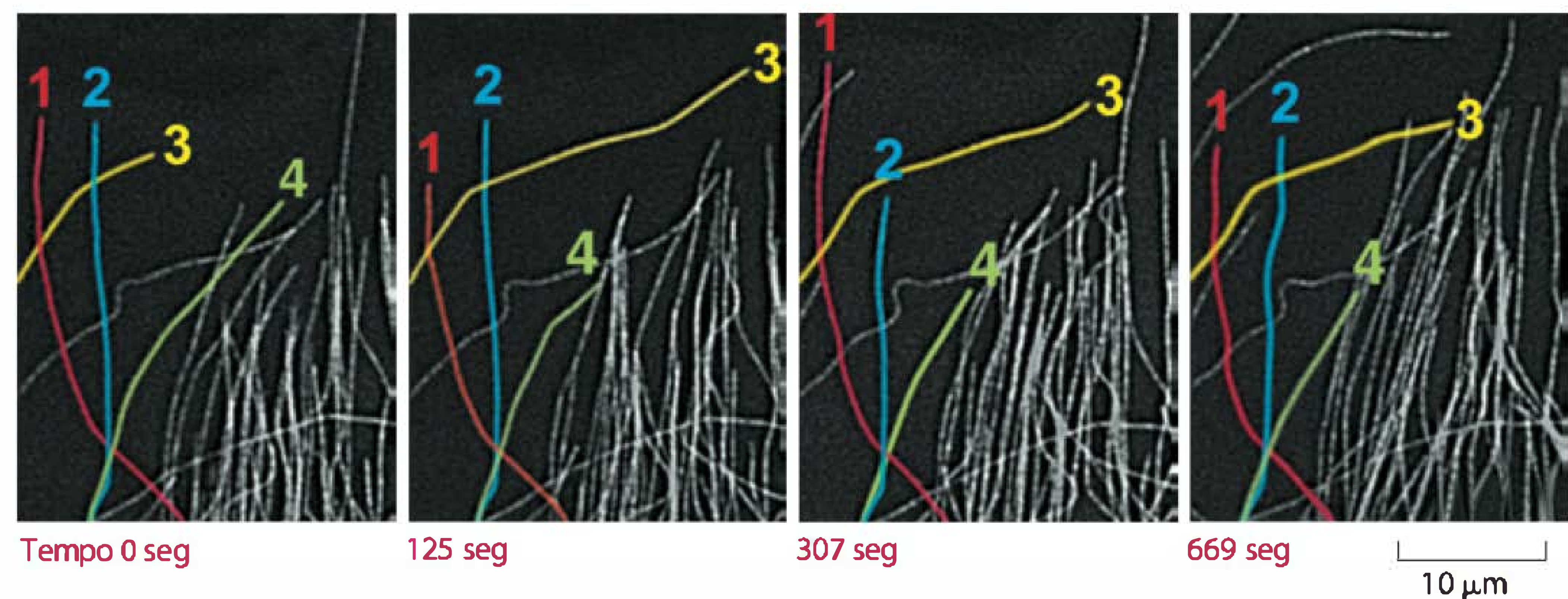


Figura 16-17 Observação direta da instabilidade dinâmica de microtúbulos em uma célula viva Microtúbulos em uma célula epitelial do pulmão de salamandra observados após a célula ter sido injetada com uma pequena quantidade de tubulina marcada com rodamina, como na Figura 16-15. Observe a instabilidade dinâmica dos microtúbulos na borda da célula. Quatro microtúbulos foram indicados individualmente para facilitar esta observação: cada um deles mostra padrões alternados de crescimento e encurtamento. (Cortesia de Wendy C. Salmon e Clare Waterman-Storer.)

estas subunidades de rápida difusão tendem a associar-se em extremidades de filamentos preexistentes ou em regiões particulares onde a etapa de nucleação esteja sendo catalisada por proteínas específicas. Em qualquer um desses casos, os novos filamentos formados são altamente dinâmicos e, a menos que sejam especificamente estabilizados, terão uma existência fugaz.

Pelo controle da região de nucleação desses filamentos e pela estabilização seletiva, uma célula pode controlar o posicionamento dos seus sistemas de filamentos e, consequentemente, sua estrutura. Aparentemente, a célula está continuamente testando uma enorme variedade de estruturas internas e preservando apenas aquelas que se mostram úteis. Quando as condições externas sofrem alguma alteração, ou na presença de novos sinais internos (como durante as transições do ciclo celular), a célula é forçada a modificar rapidamente a sua estrutura (ver Figuras 16-2 a 16-4).

A actina e a tubulina evoluíram independentemente seus processos de hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo, o que permite que seus filamentos sofram fácil despolimerização após terem sido polimerizados. Essas duas proteínas são totalmente distintas em termos de sequências de aminoácidos: a actina é distantemente relacionada em estrutura à enzima glicolítica hexocinase, ao passo que a tubulina é distantemente relacionada à grande família de GTPases que inclui as proteínas G heterotriméricas e as GTPases monoméricas, como a Ras (apresentada no Capítulo 3). Em ambas as famílias proteicas, a associação entre a hidrólise de nucleotídeos e uma alteração conformacional da proteína que leva à alteração na função proteica parece ser um aspecto evolutivo bastante antigo; no entanto, os objetivos destas associações estruturais divergiram ao longo do tempo, incluindo a transmissão de sinais, a catálise e a regulação do ciclo de polimerização/despolimerização.

Em determinadas estruturas especializadas, porções do citoesqueleto tornam-se menos dinâmicas. Em uma célula em estado de diferenciação terminal, como é o caso de um neurônio, por exemplo, é desejável manter-se uma estrutura consistente e estável ao longo do tempo, e muitos filamentos de actina e microtúbulos encontram-se estabilizados por associação a outras proteínas. No entanto, quando novas conexões são feitas no cérebro, como acontece quando a informação que está sendo lida neste momento é transferida para uma memória de longa duração, mesmo uma célula tão estável quanto um neurônio pode promover o crescimento e a extensão de novos processos para fazer novas sinapses. Para que isso ocorra, o neurônio precisa das atividades exploratórias e da dinâmica inerentes aos filamentos do citoesqueleto.

A tubulina e a actina são extremamente conservadas na evolução de eucariotos

A tubulina ocorre em todas as células eucarióticas, podendo ser encontrada sob múltiplas isoformas. As tubulinas de levedura e de seres humanos apresentam uma identidade de 75% em nível de sequência de aminoácidos. Em mamíferos, existem pelo menos seis formas de α-tubulina e um número similar de formas de β-tubulina, cada uma delas codificada por um gene diferente. As diferentes formas de tubulina são bastante similares e geralmente copolimerizam em microtúbulos mistos em testes *in vitro*. No entanto, elas apresentam posicionamento celular distinto e realizam tarefas relativamente diferentes. Um exemplo bastante ilustrativo é o caso dos microtúbulos dos seis neurônios sensíveis ao toque do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, os quais contêm uma forma específica de β-tubulina. Mutações que eliminam esta proteína levam à perda da sensibilidade ao toque, aparentemente sem interferir em outras funções celulares.

Assim como a tubulina, a actina é encontrada em todas as células eucarióticas. A maioria dos organismos possui múltiplos genes que codificam para a actina: seres humanos possuem seis. A actina é extraordinariamente conservada entre os eucariotos. As sequências de aminoácido da actina de diferentes espécies geralmente têm similaridade na ordem de 90%.

Contudo, assim como no caso da tubulina, pequenas variações na sequência de aminoácidos da actina podem gerar diferenças funcionais significativas. Em vertebrados, existem três isoformas levemente diferentes de actina, denominadas α, β e γ, as quais diferem ligeiramente em suas sequências de aminoácidos. A α-actina é expressa apenas em células musculares, ao passo que a β e a γ-actinas são encontradas em conjunto em praticamente todas as células não-musculares. A actina de levedura e a actina muscular de *Drosophila* apresentam similaridade de 89%, apesar de a expressão da actina de levedura em *Drosophila* dar origem a uma mosca aparentemente normal, mas incapaz de voar.

Por que a sequência de aminoácidos da actina e da tubulina apresenta esse grau de conservação tão alto ao longo da evolução dos eucariotos, enquanto a maioria das outras proteínas do citoesqueleto, inclusive proteínas dos filamentos intermediários e as grandes famílias de proteínas acessórias que se ligam à actina e à tubulina, não apresenta uma conservação evolutiva importante em nível de sequência de aminoácidos? A explicação mais plausível talvez seja que mudanças na estrutura da superfície dos filamentos de actina e de microtúbulos como um todo são extremamente restritas devido à necessidade de interação com muitas outras proteínas, as quais devem ser capazes de interagir com estes dois componentes celulares comuns e abundantes. Assim, a necessidade de interação de outras proteínas com a superfície total de um filamento de actina ou de um microtúbulo limita a variabilidade dessas estruturas. Estudos genéticos e da bioquímica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a actina interage diretamente com dúzias de outras proteínas e indiretamente com muitas mais (**Figura 16-18**). Dessa forma, qualquer mutação na actina que possa resultar em uma modificação favorável a sua interação com uma determinada proteína pode ocasionar modificações extremamente desfavoráveis em relação à interação com outras proteínas que se ligam na mesma região ou à proximidade dela. Com o passar do tempo, os organismos em evolução devem ter observado que era mais favorável manter constante a actina e a tubulina e alterar apenas seus companheiros de ligação.

A estrutura dos filamentos intermediários depende do empacotamento lateral e do enrolamento da supertorção

Todas as células eucarióticas contêm actina e tubulina. No entanto, o terceiro tipo principal de proteínas do citoesqueleto, os *filamentos intermediários*, forma filamentos citoplasmáticos apenas em alguns metazoários, como os vertebrados, os nematódeos e os moluscos. Mesmo nestes organismos, os filamentos intermediários não são necessários no citoplasma

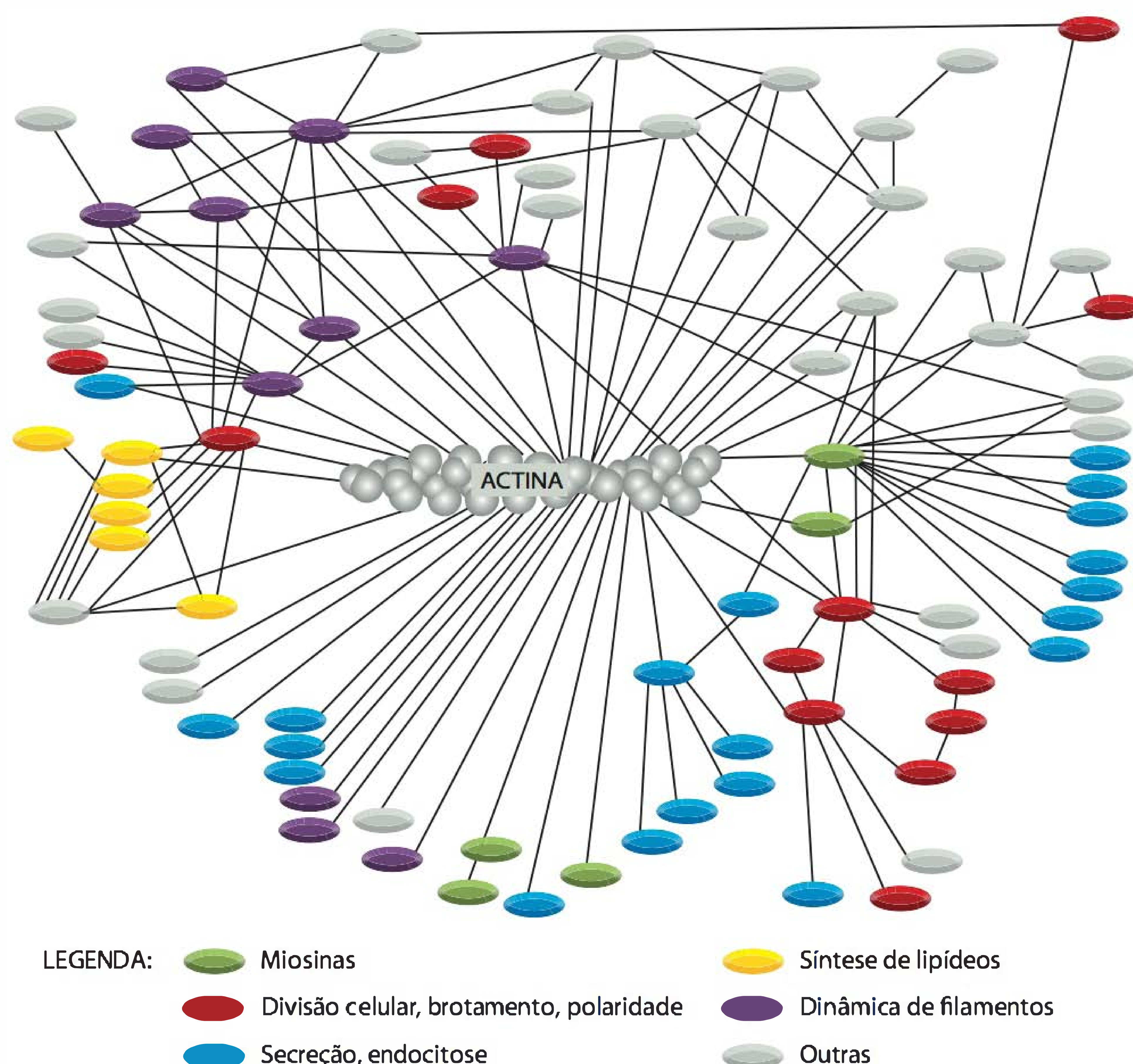


Figura 16-18 A actina em diferentes vias, uma encruzilhada. A actina liga-se a uma grande diversidade de proteínas acessórias em todas as células eucarióticas. Este diagrama mostra a maioria das interações que foram demonstradas por técnicas genéticas ou bioquímicas, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Proteínas acessórias que operam em um mesmo processo intracelular estão mostradas sob a mesma cor, de acordo com a legenda. (Adaptada de D. Botstein et al., em The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* [J. R. Broach, J. R. Pringle, E. W. Jones, eds.], Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.)

de todos os tipos celulares. As células especializadas da glia (chamadas de oligodendrócitos) que produzem mielina no sistema nervoso central de vertebrados, por exemplo, não contêm filamentos intermediários.

Os filamentos intermediários estão particularmente presentes no citoplasma de células sujeitas a estresse mecânico e geralmente não são encontrados em animais que possuem exoesqueletos rígidos, como os artrópodes e os equinodermos. Aparentemente, os filamentos intermediários desempenham um papel importante conferindo resistência mecânica em animais que possuem tecidos moles ou maleáveis.

Os filamentos intermediários citoplasmáticos estão proximamente relacionados a seus ancestrais, as *laminas nucleares*, as quais são muito mais amplamente distribuídas. As laminas nucleares são proteínas de filamentos intermediários que formam uma rede que reveste a membrana interna do envelope nuclear de eucariotos, onde proporcionam sítios de ancoramento para cromossomos e poros nucleares (seu comportamento dinâmico durante a divisão celular é discutido no Capítulo 12). Aparentemente, os genes de lamina sofreram duplicação muitas vezes ao longo da evolução dos metazoários, e os genes duplicados evoluíram para produzir os filamentos intermediários citoplasmáticos, que apresentam estrutura semelhante a cabos.

Os polipeptídeos individuais dos **filamentos intermediários** são moléculas alongadas com um domínio central estendido de hélice α que forma uma estrutura paralela supertorcida com outro monômero. Um par de dímeros paralelos associa-se de forma antiparalela produzindo um arranjo em tetrâmero. Este tetrâmero representa a subunidade solúvel que é análoga ao dímero de αβ-tubulina ou ao monômero de actina (**Figura 16-19**). Diferentemente da actina e da tubulina, as subunidades do filamento intermediário não contêm sítios de ligação para trifosfatos de nucleosídeo.

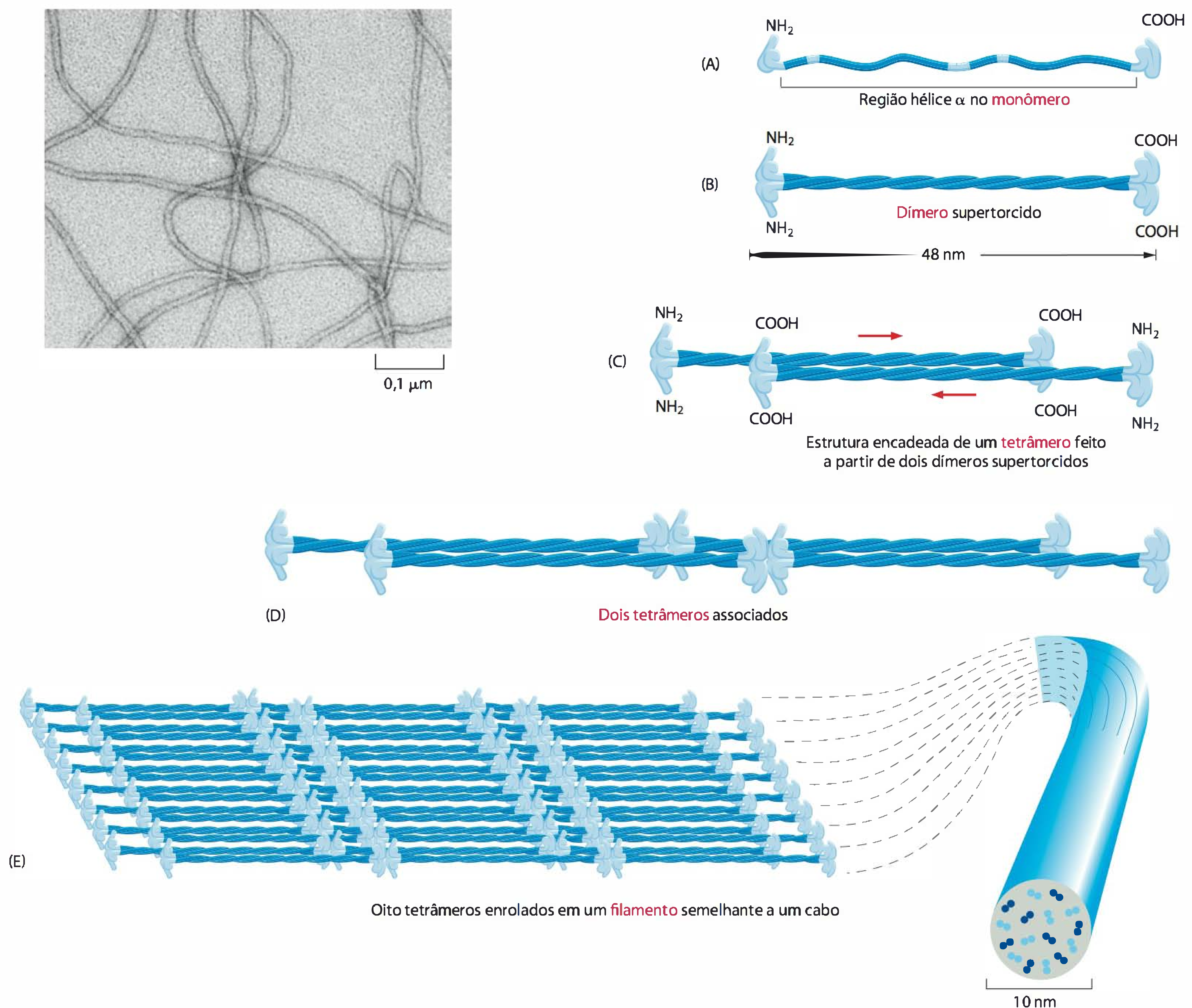


Figura 16-19 Modelo de construção de filamentos intermediários. O monômero mostrado em (A) pareia com um monômero idêntico para formar um dímero (B), no qual os domínios centrais em bastão estão alinhados em paralelo e enrolados entre si de forma supertorcida. (C) A seguir, dois dímeros alinham-se lado a lado para formar um tetrâmero antiparalelo de quatro cadeias polipeptídicas. O tetrâmero é a subunidade solúvel dos filamentos intermediários. (D) Dentro de cada tetrâmero, as extremidades de um dos dímeros estão desalinhadas em relação ao outro dímero, permitindo que este se associe a outro tetrâmero. (E) Nos 10 nm finais do filamento enrolado, os tetrâmeros são empacotados em um arranjo helicoidal composto por 16 dímeros (32 monômeros supertorcidos) em secção transversal. A metade destes dímeros aponta para cada direção. Uma microfotografia eletrônica de filamentos intermediários está apresentada na extremidade superior esquerda. (Microfotografia eletrônica cortesia de Roy Quinlan.)

Tabela 16-1 Principais tipos de proteínas de filamentos intermediários em células de vertebrados

TIPOS DE FI	COMPONENTES POLIPEPTÍDICOS	LOCALIZAÇÃO
Nuclear	Laminas A, B e C	Lâmina nuclear (revestimento interno do envelope nuclear)
Semelhantes à vimentina	Vimentina	Diversas células de origem mesenquimal
	Desmina	Músculo
	Proteína ácida glial fibrilar	Células gliais (astrócitos e algumas células de Schwann)
	Periferina	Alguns neurônios
Epitelial	Queratinas tipo I (ácidas) Queratinas tipo II (básicas)	Células epiteliais e seus derivados (p. ex., cabelos e unhas)
Axonal	Proteínas de neurofilamento (NF-L, NF-M e NF-H)	Neurônios

Tendo em vista que a subunidade tetramérica é composta de dois dímeros que apontam para direções opostas, suas duas extremidades são idênticas. Assim, o filamento intermediário organizado não apresenta uma estrutura polarizada, a qual é tão importante para os filamentos de actina e para os microtúbulos. Os tetrâmeros são empacotados lateralmente, formando um filamento que agrega oito protofllamentos paralelos, feitos a partir destes tetrâmeros. Cada filamento intermediário individual apresenta, consequentemente, uma secção transversal de 32 hélices α enroladas. Esse grande número de polipeptídeos organizados em conjunto e mantidos unidos por interações hidrofóbicas laterais fortes, típicas de proteínas supertorcidas, confere aos filamentos intermediários sua característica semelhante a um cabo. Eles podem ser facilmente flexionados, com um comprimento de persistência menor que um micrômetro (comparado a vários milímetros dos microtúbulos ou a aproximadamente dez micrômetros da actina), mas é extremamente difícil rompê-los.

O mecanismo de associação e dissociação dos filamentos intermediários é menos conhecido do que o de filamentos de actina e microtúbulos, mas alguns tipos de filamentos intermediários, como a *vimentina*, formam estruturas altamente dinâmicas em células, como os fibroblastos. Sob condições normais, a fosforilação proteica regula sua dissociação provavelmente da mesma forma que o processo de fosforilação regula a dissociação das laminas nucleares na mitose (ver Figura 12-20). Uma evidência para o rápido *turnover* é o fato de subunidades marcadas microinjetadas em células em cultura adicionarem-se a filamentos intermediários preexistentes rapidamente, em intervalos de poucos minutos, ao passo que a injeção de peptídeos derivados de uma região helicoidal conservada da subunidade induz a rápida dissociação da rede de filamentos intermediários. Interessantemente, a injeção destes últimos elementos pode também, em alguns casos, induzir a dissociação de microtúbulos e da rede de filamentos de actina, revelando a existência de integração mecânica fundamental entre os três sistemas do citoesqueleto nestas células.

Filamentos intermediários conferem estabilidade mecânica às células animais

Existem muitos tipos de filamentos intermediários, com uma variação de sequências nas isoformas das subunidades bem maior do que ocorre nas isoformas de actina e tubulina. Um domínio central hélice α contém mais ou menos 40 sequências de heptâmero repetidas que formam uma extensão supertorcida (ver Figura 3-9). Esse domínio é semelhante nas diferentes isoformas, mas domínios globulares N e C-terminais podem apresentar uma grande variabilidade.

As diferentes famílias de filamentos intermediários são expressas em diferentes tipos celulares (**Tabela 16-1**). A família de filamentos intermediários mais diversificados é a das **queratinas**: existem aproximadamente 20 queratinas encontradas em diferentes tipos de células epiteliais humanas, além de aproximadamente 10 outras que são específicas do cabelo e das unhas; a análise do genoma humano revelou que devem existir aproximadamente 50 queratinas distintas. Cada filamento de queratina é constituído a partir de uma mistura equitativa de cadeias de queratina tipo I (ácidas) e tipo II (neutras/básicas); estas formam heterodímeros, que são unidos dois a dois para formar a subunidade tetramérica básica (ver Figura 16-19). Redes de queratina interligadas, unidas por ligações dissulfeto, podem sobreviver mesmo à morte de suas células, formando coberturas resistentes para animais, como

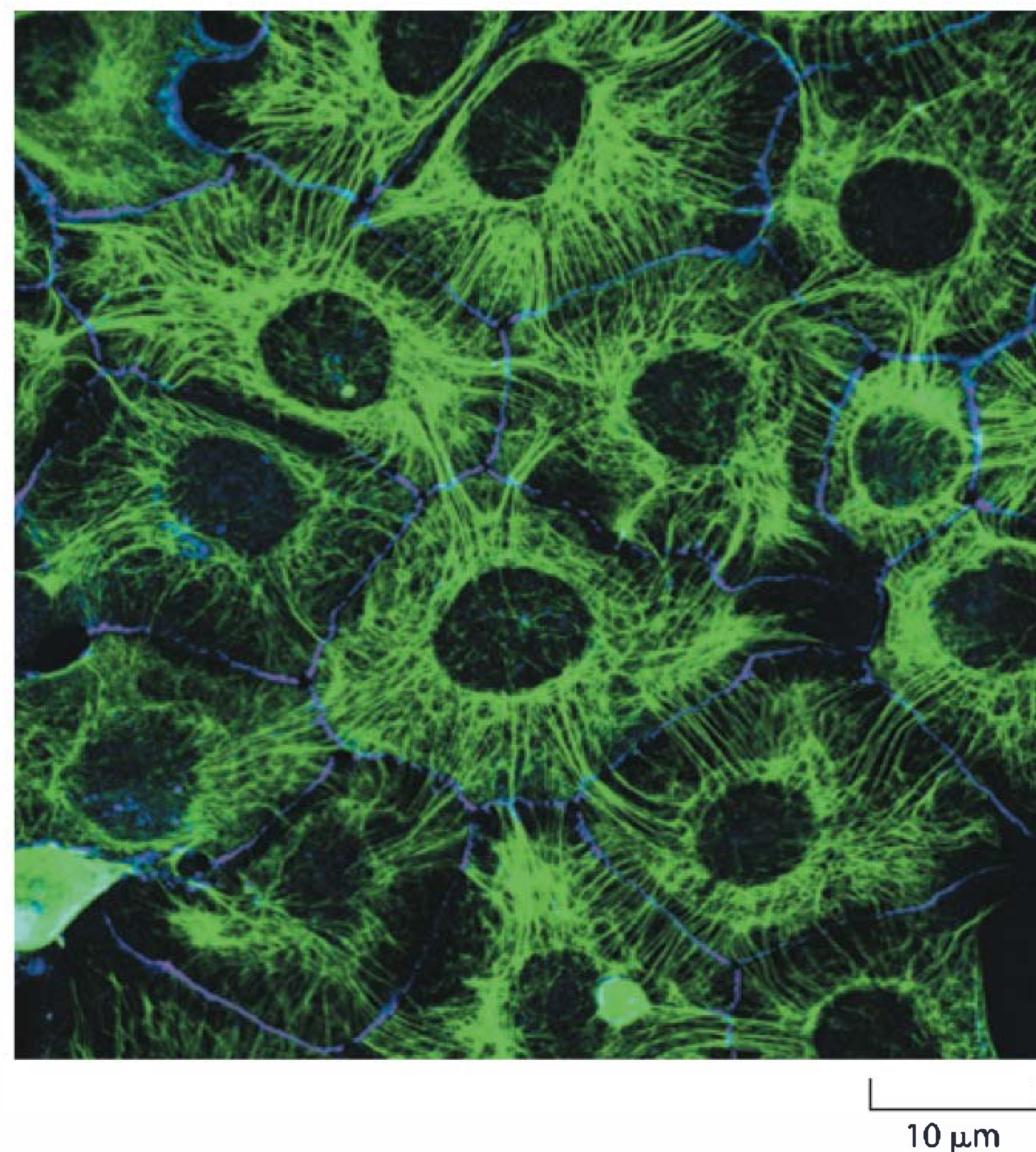


Figura 16-20 Filamentos de queratina em células epiteliais. Microfotografia de imunofluorescência de uma rede de filamentos de queratina (*verde*) em uma camada de células epiteliais em cultura. Os filamentos de cada célula estão indiretamente conectados aos das células vizinhas por desmossomos (discutidos no Capítulo 19). Uma segunda proteína (*azul*) foi corada para revelar a localização das junções celulares. (Cortesia de Kathleen Green e Evangeline Amargo.)

ocorre nas camadas externas da pele e nos cabelos, nas unhas, nas garras e nas escamas. A diversidade das queratinas é utilizada clinicamente para o diagnóstico de cânceres epiteliais (carcinomas), pois a expressão de um grupo específico de queratinas fornece indicações sobre o tecido epitelial a partir do qual a célula cancerosa é originária e, dessa maneira, pode auxiliar na escolha de um tratamento adequado.

Uma única célula epitelial pode produzir diferentes tipos de queratinas, e estas podem copolimerizar, formando uma rede única (**Figura 16-20**). Os filamentos de queratina conferem resistência mecânica a tecidos epiteliais, em parte pelo ancoramento dos filamentos intermediários a regiões de contato célula-célula, denominadas *desmossomos*, ou de contato célula-matriz, denominadas *hemidesmossomos* (ver Figura 16-5). Discutiremos estas importantes estruturas de adesão, detalhadamente, no Capítulo 19.

Mutações nos genes de queratina são a causa de diferentes doenças genéticas humanas. Por exemplo, a doença denominada *epidermólise bulosa simples* ocorre quando queratinas defeituosas são expressas em células da camada basal da epiderme. Esta doença caracteriza-se pela formação de bolhas na pele mesmo em resposta a estresses mecânicos muito leves, os quais conseguem romper as células basais (**Figura 16-21**). Outros tipos de doenças com formação de bolhas, incluindo doenças do revestimento da boca e esofaringe e da córnea nos olhos, são causados por mutações em diferentes tipos de queratina cuja expressão é específica para estes tecidos. Todas essas doenças apresentam como característica a ruptura de células em consequência de trauma mecânico e a desorganização ou o acúmulo do citoesqueleto de filamentos de queratina. Muitas das mutações específicas que causam essas doenças alteram as extremidades do domínio central em bastão, ressaltando a importância desta porção particular da proteína para uma correta montagem do filamento.

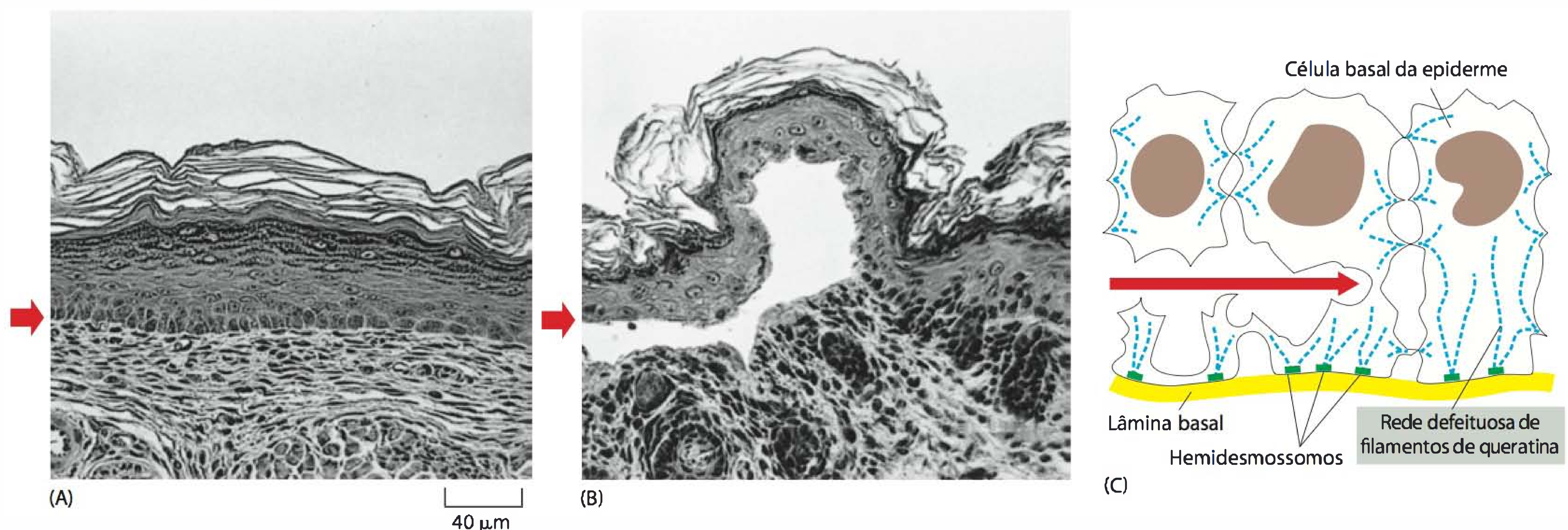


Figura 16-21 Enrugamento da pele causado por um gene de queratina mutado. Um gene mutante que codifica uma proteína queratina truncada (ausência dos domínios N-terminal e C-terminal) foi expresso em um camundongo transgênico. A proteína defectiva associa-se à queratina normal e causa a disrupção da rede de filamentos de queratina das células basais da pele. A microscopia óptica de secções transversais de pele normal (A) e mutante (B) mostram que o enrugamento é resultado da ruptura de células na camada basal da epiderme mutante (pequena flecha *vermelha*). (C) Um esquema de três células na camada basal da epiderme mutante, a partir de observação em microscopia eletrônica. Como indicado pela flecha *vermelha*, as células sofrem ruptura entre o núcleo e os hemidesmossomos (discutidos no Capítulo 19), os quais conectam os filamentos de queratina à lâmina basal inferior. (De P. A. Coulombe et al., *J. Cell Biol.* 115:1661-1674,1991. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

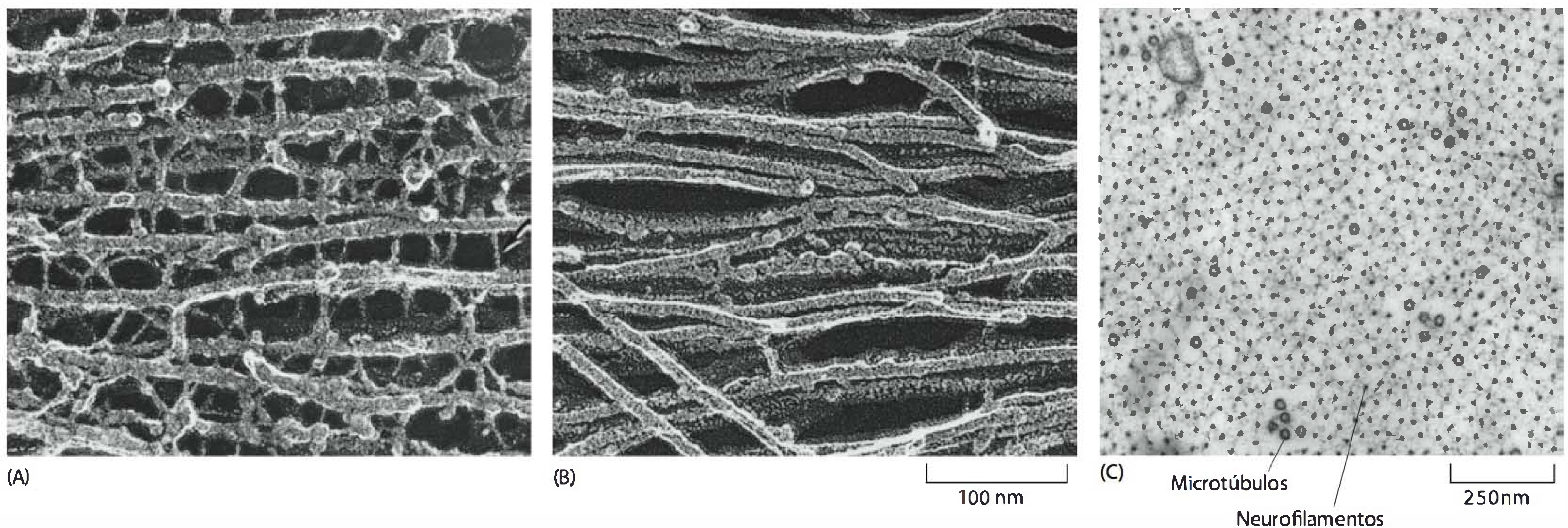


Figura 16-22 Dois tipos de filamentos intermediários em células do sistema nervoso. (A) Imagem de microscopia eletrônica de criofratura de neurofilamentos no axônio de uma célula neuronal, mostrando a grande quantidade de interligações por pontes proteicas – uma organização que deve ser capaz de fornecer à célula grande resistência à tensão. As pontes são formadas por longas extensões não-helicoidais na região C-terminal da maior das proteínas do neurofilamento (NF-H). (B) Imagem de criofratura de filamentos da glia em células gliais, mostrando que estes filamentos intermediários são lisos e possuem poucas interligações. (C) Microfotografia eletrônica convencional de uma secção transversal de um axônio mostrando o espaçamento lateral regular dos neurofilamentos, os quais superam amplamente em número os microtúbulos. (A e B, cortesia de Nobutaka Hirokawa; C, cortesia de John Hopkins.)

Uma segunda família de filamentos intermediários, denominados **neurofilamentos**, é encontrada em altas concentrações nos axônios dos neurônios de vertebrados (**Figura 16-22**). Três tipos de proteínas de neurofilamentos (NF-L, NF-M e NF-H) coassociam-se *in vivo*, formando heteropolímeros que contêm NF-L mais uma das outras duas formas. As proteínas NF-H e NF-M apresentam domínios C-terminais compridos que se ligam aos filamentos adjacentes dando origem a arranjos com espaçamento interfilamentar uniforme. Durante o crescimento do axônio, novas subunidades de neurofilamentos são incorporadas ao axônio em um processo dinâmico que envolve tanto a adição de subunidades longitudinalmente ao comprimento do filamento quanto a adição de subunidades às extremidades do filamento. Após um axônio ter crescido e ter sido conectado à sua célula-alvo, o diâmetro do axônio poderá aumentar em até cinco vezes. O nível de expressão do gene de neurofilamento parece controlar diretamente o diâmetro do axônio, o qual, por sua vez, influencia a velocidade de transporte dos sinais elétricos pelo axônio.

A doença neurodegenerativa esclerose lateral amiotrófica (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis),* ou doença de Lou Gehrig, está associada ao acúmulo e à montagem anormal de neurofilamentos no corpo celular e axônios de neurônios motores, os quais podem interferir com o transporte axonal normal. A degeneração dos axônios leva à fraqueza muscular e atrofia, a qual frequentemente é fatal. A superexpressão de NF-L ou de NF-H humana em camundongos dá origem a animais que apresentam uma doença muito semelhante à ALS.

Os filamentos semelhantes à vimentina correspondem a uma terceira família de filamentos intermediários. Um dos membros desta família, a desmina, é expresso em músculo esquelético, cardíaco e liso. Camundongos deficientes em desmina apresentam desenvolvimento muscular inicial normal, mas adultos desenvolvem uma grande variedade de anormalidades nas células musculares, inclusive com problemas de alinhamento das fibras musculares.

A polimerização de filamentos pode ser alterada por substâncias

Considerando-se que a sobrevivência de uma célula eucariótica depende de um equilíbrio entre a associação e a dissociação de filamentos citoesqueléticos altamente conservados formados a partir de actina e tubulina, estes dois tipos de filamentos frequentemente são alvos do ataque de toxinas naturais. Estas toxinas, de modo geral, perturbam as reações de polimerização dos filamentos e são produzidas por plantas, fungos ou esponjas para sua própria defesa, pois tais organismos não desejam servir de alimento e não podem fugir de seus predadores. A toxina liga-se fortemente ao filamento ou à subunidade livre de um polímero, direcionando a reação de associação, de modo a favorecer a forma à qual se liga. Por exemplo, a *latrunculina*, extraída da esponja marinha *Latrunculia magnifica*, liga-se aos monômeros de actina e evita sua organização sob a forma de filamentos; consequentemente, isso provoca despolimerização efetiva de filamentos de actina. Em contraste, a *faloidina*, produzida pelo fungo *Amanita phalloides* (chapéu da morte), liga-se aos filamentos de actina, estabilizando-os e provocando um aumento efetivo da polimerização de actina. (Esse cogumelo atraente, mas não-comestível, também expressa outra proteína mortal, o inibidor de RNA-polimerase II denominado α–amanitina.) Qualquer alteração nos filamentos de actina é altamente tóxica para as células. De forma semelhante, a *colchicina*, obtida do açafrão do campo (ou crocus de outono), liga-se à tubulina livre, estabilizando-a e provocando despolimerização dos microtúbulos. Em contraste, o *taxol*, extraído da casca de uma espécie

Tabela 16-2 Fármacos que afetam os filamentos de actina e os microtúbulos

FÁRMACOS ACTINO-ESPECÍFICOS	
Faloidina	Liga-se aos filamentos, estabilizando-os
Citocalasina	Promove o capeamento da extremidade mais (+) do filamento
Swinholide	Quebra os filamentos
Latrunculina	Liga-se a subunidades e evita sua polimerização
FÁRMACOS MICROTÚBULO-ESPECÍFICOS	
Taxol	Liga-se aos microtúbulos, estabilizando-os
Colchicina, colcemida	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização
Vimblastina, vincristina	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização
Nocodazol	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização

pouco comum de conífera, liga-se e estabiliza microtúbulos, provocando aumento efetivo da polimerização de tubulina. Estes e alguns outros produtos naturais comumente utilizados por biólogos celulares para manipular o citoesqueleto estão listados na **Tabela 16-2**.

Fármacos desse tipo provocam um rápido e intenso efeito sobre a organização do citoesqueleto de células vivas (**Figura 16-23**). Eles forneceram as primeiras evidências de que o citoesqueleto é uma estrutura dinâmica mantida pela rápida e contínua alternância de subunidades entre as formas filamentosas e solúveis, e revelaram que este fluxo de subunidades é necessário ao funcionamento normal do citoesqueleto.

Os fármacos listados na Tabela 16-2 têm sido úteis para os biólogos celulares na tentativa de estabelecimento das funções da actina e dos microtúbulos nos diversos processos celulares. Alguns deles também são empregados para o tratamento de câncer. Tanto fármacos despolimerizadores de microtúbulos (como a vimblastina) como fármacos polimerizadores de microtúbulos (como o taxol) provocam a morte preferencialmente de células que se encontram em divisão, pois a associação e a dissociação de microtúbulos são essenciais para um funcionamento adequado do fuso mitótico (discutido posteriormente neste capítulo). Esses fármacos matam eficientemente certos tipos de células tumorais em pacientes humanos, apesar de apresentarem um certo grau de toxicidade para as células normais que apresentam uma alta taxa de divisão, como é o caso de células da medula óssea, do intestino e de folículos pilosos. O taxol, especificamente, tem sido amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama e de pulmão, com frequência atingindo sucesso no tratamento de tumores resistentes a outros agentes quimioterápicos.

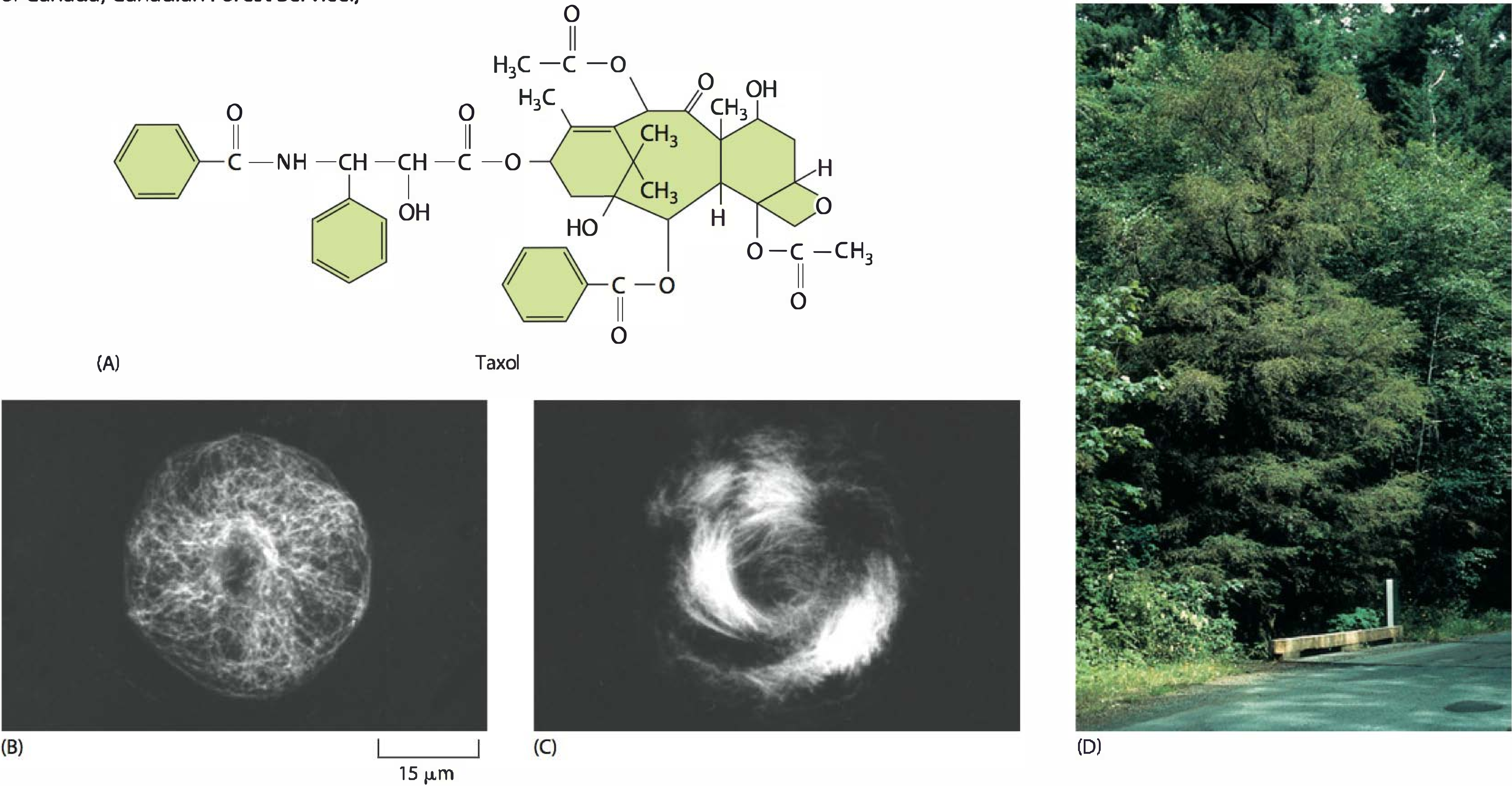


Figura 16-23 Efeito do fármaco taxol na organização de microtúbulos. (A) Estrutura molecular do taxol. Recentemente, químicos orgânicos conseguiram sintetizar esta molécula complexa, a qual é amplamente utilizada no tratamento de câncer. (B) Microfotografia de imunofluorescência mostrando a organização de microtúbulos em uma célula epitelial do fígado antes da adição de taxol. (C) Organização de microtúbulos no mesmo tipo de célula após o tratamento com taxol. Observe os grossos feixes em arco de microtúbulos presentes na periferia da célula. (D) A fonte natural do taxol, uma conífera do pacífico. (B, C de N. A. Gloushankova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:8597-8601, 1994. Com permissão da National Academy of Sciences; D, cortesia de A. K. Mitchell 2001. © Her Majesty the Queen in Right of Canada, Canadian Forest Service.)

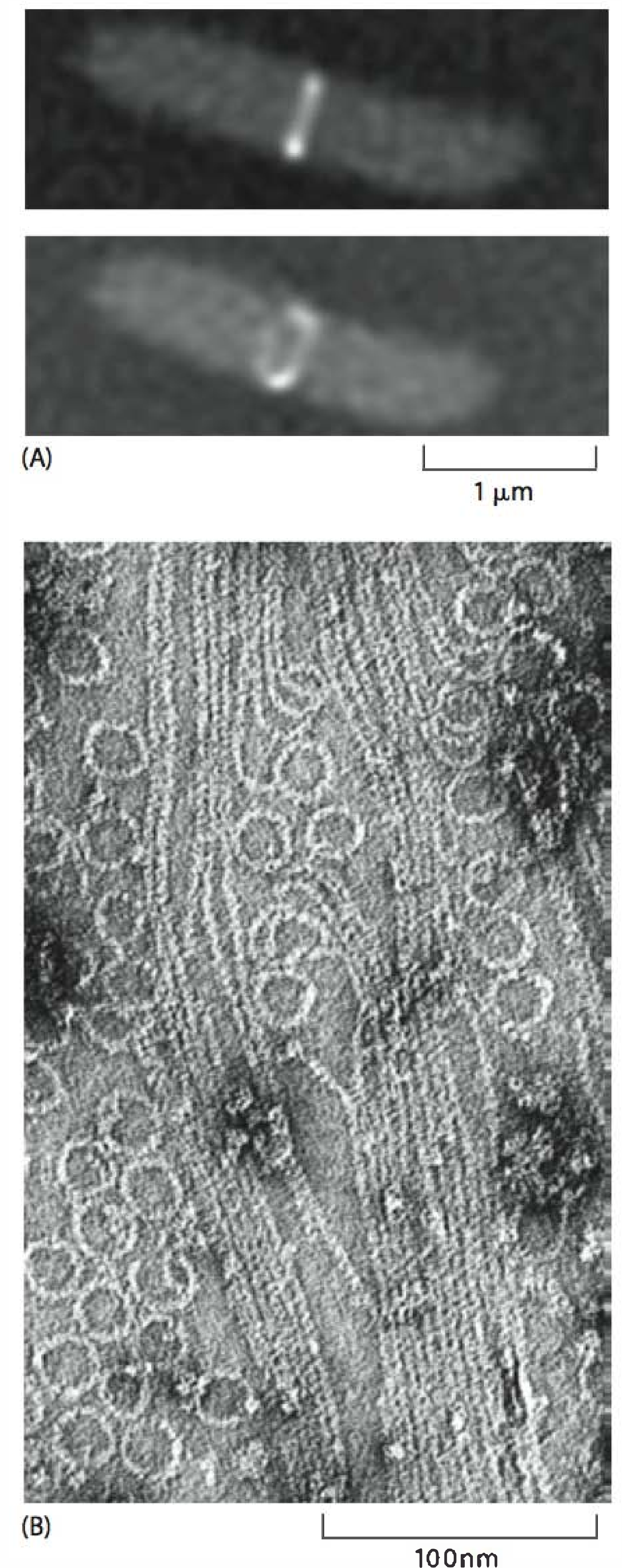


Figura 16-24 A proteína bacteriana FtsZ, um homólogo da tubulina em procariotos. (A) Uma banda de proteína FtsZ forma um anel em uma célula bacteriana em divisão. Este anel foi corado pela fusão da proteína FtsZ com a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*), o que permite sua observação em células vivas de *E. coli* sob microscópio de fluorescência. *Acima*, vista lateral mostra o anel como uma barra no meio da célula em divisão. *Abaixo*, uma vista, após rotação, mostra a estrutura em anel. (B) Filamentos e anéis FtsZ, formados *in vitro*, visualizados por microscopia eletrônica. Compare esta imagem com a imagem de um microtúbulo mostrado à *direita*, na Figura 16-16C. (A, de X. Ma, D. W. Ehrhardt e W. Margolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:12998-13003, 1996; B, de H. A. Erickson et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 93:519-523, 1996. Com permissão da National Academy of Sciences.)

A organização e a divisão celular em bactérias dependem de homólogos do citoesqueleto de eucariotos

Enquanto as células eucarióticas são tipicamente grandes e morfologicamente complexas, as células de bactérias em geral possuem um tamanho de poucos micrômetros e assumem uma morfologia modesta, em forma de esferas ou bastões. As bactérias também não possuem as elaboradas redes de organelas intracelulares delimitadas por membranas, como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Por muito tempo, os biólogos consideraram que a ausência de um citoesqueleto bacteriano seria a causa destas marcantes diferenças na organização celular entre o reino dos eucariotos e as bactérias. Esse pressuposto foi colocado à prova com a descoberta, no início dos anos de 1990, de que todas as bactérias e diversas arquebactérias continham um homólogo da tubulina, FtsZ, que pode polimerizar dando origem a filamentos e organizar-se em um anel (denominado anel Z) na região em que é formado o septo, durante a divisão celular (**Figura 16-24**).

A estrutura proteica tridimensional de FtsZ é incrivelmente semelhante à estrutura das tubulinas α ou β, e, assim como a tubulina, a hidrólise de GTP é promovida pela polimerização, levando a uma alteração conformacional na estrutura do filamento. Apesar de o anel Z persistir por vários minutos, os filamentos individuais que o compõem são extremamente dinâmicos, com uma meia-vida de cerca de 30 segundos. Conforme a bactéria sofre a divisão, o anel Z torna-se menor, até sua completa dissociação. Acredita-se que o encurtamento do anel Z possa contribuir para a invaginação da membrana, necessária ao processo de divisão celular. O anel Z pode também atuar como uma região para localização de enzimas especializadas na síntese da parede celular, necessárias à construção do septo entre as duas células-filhas. As subunidades FtsZ dissociadas reassociam-se posteriormente em novos sítios de formação do septo, nas células-filhas (**Figura 16-25**).

Mais recentemente, descobriu-se que diversas bactérias também contêm homólogos de actina. Dois destes homólogos, MreB e Mbl, são encontrados predominantemente em células em bastão ou espirais, e mutações que impedem sua expressão levam a anomalias extremas na forma celular e defeitos na segregação cromossômica (**Figura 16-26**). Filamentos de MreB e Mbl organizam-se *in vivo*, formando grandes espirais que se estendem por todo o comprimento da célula e que, aparentemente, contribuem para a determinação da forma celular, servindo como um molde que direciona a síntese de peptideoglicanos da parede celular, semelhantemente à forma como os microtúbulos auxiliam na organização da síntese da parede celular

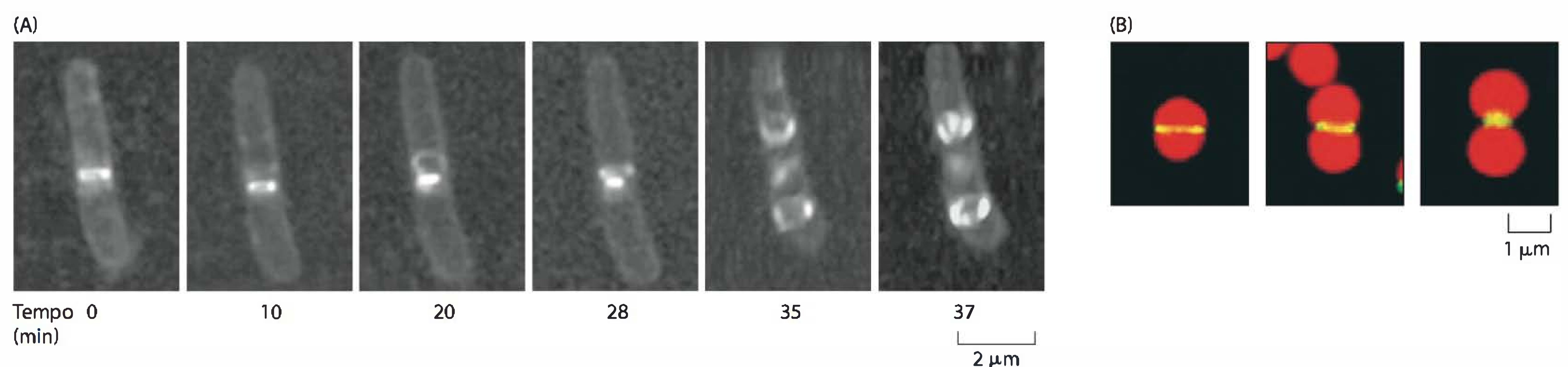


Figura 16-25 O rápido rearranjo de FtsZ durante o ciclo celular em bactérias. (A) Após o final da segregação cromossômica, o anel formado por FtsZ no centro da célula começa a ficar menor, e a célula sofre um estreitamento, dividindo-se em duas, de forma semelhante ao que ocorre com o anel contrátil formado por filamentos de actina e miosina em células eucarióticas. Os filamentos FtsZ que foram dissociados enquanto as células eram separadas serão novamente reassociados para formarem dois novos anéis no centro das duas células-filhas. (B) Cloroplastos em divisão (em *vermelho*) de uma alga vermelha também utilizam um anel proteico composto de FstZ (em *amarelo*) para a clivagem. (A, de Q. Sun e W. Margolin, *J. Bacteriol.* 180:2050-2056, 1998. Com permissão da American Society for Microbiology; B, de S. Miyagishima et al., *Plant Cell* 13:2257-2268, 2001. Com permissão da American Society of Plant Biologists.)

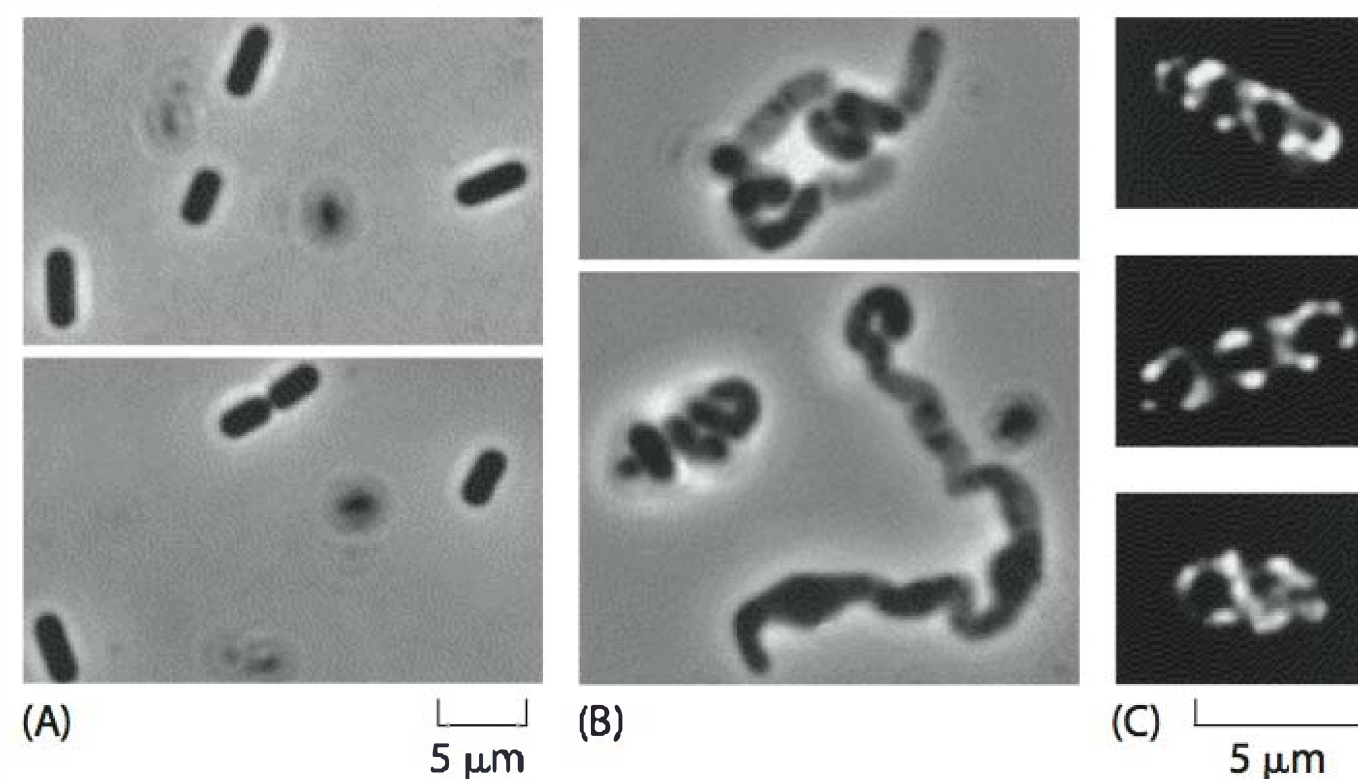


Figura 16-26 Homólogos da actina determinam a forma das células em bactérias. (A) *Bacillus subtilis*, uma bactéria comum de solos, normalmente apresenta células com formato regular semelhante a um bastonete. (B) Células de *B. subtilis* deficientes em Mbl, um homólogo da actina, crescem em formato irregular de tubos retorcidos, o que as leva à morte. (C) A proteína Mbl forma longas hélices compostas de diversos filamentos curtos que se dispõem ao longo de todo o comprimento da célula bacteriana e auxiliam no direcionamento dos sítios de síntese de parede celular. (De L. J. Jones, R. Carbadillo-Lopez e J. Errington, *Cell* 104:913-922, 2001. Com permissão de Elsevier.)

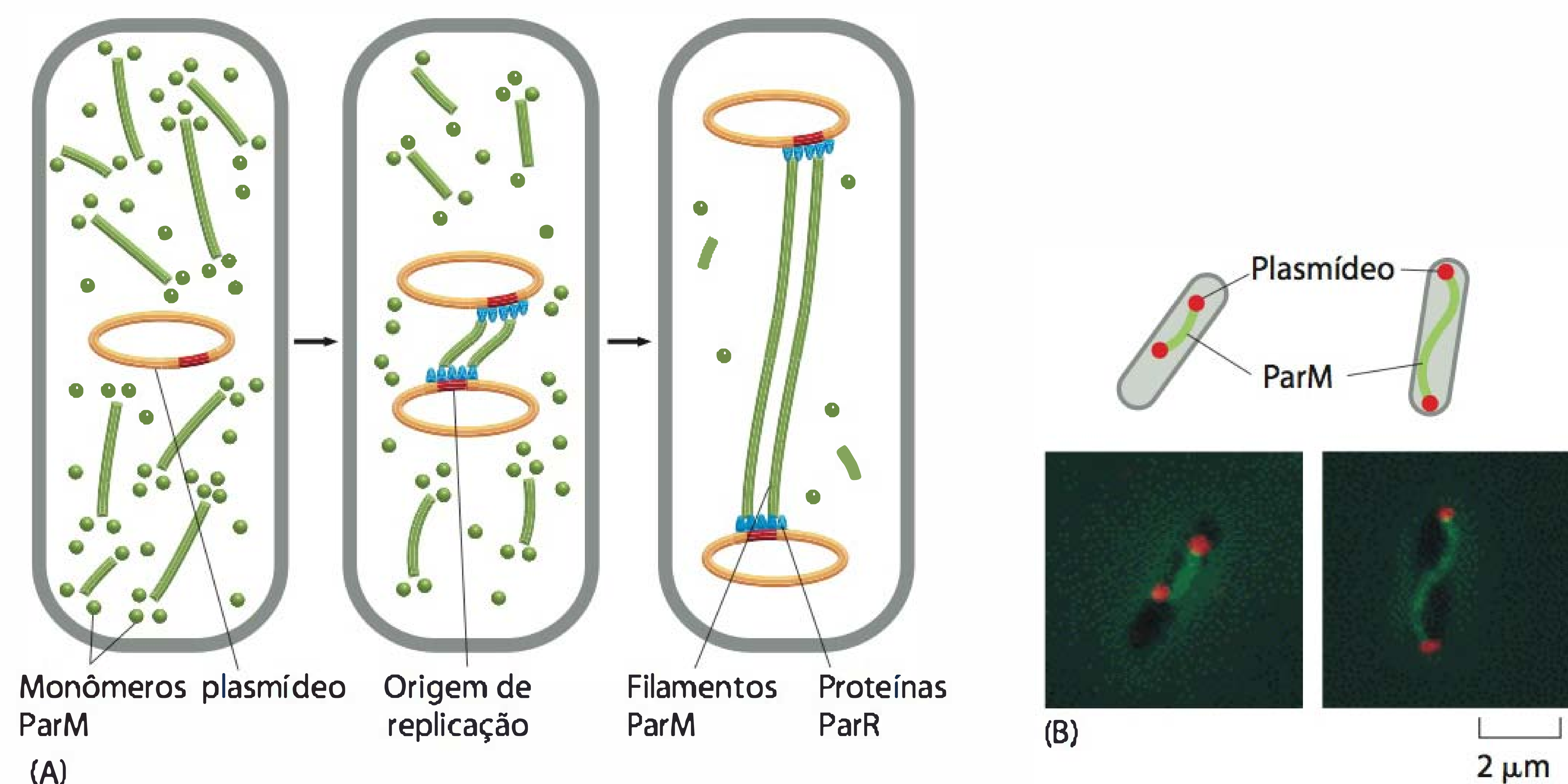
de celulose, em células vegetais superiores (ver Figura 19-82). Assim como FtsZ, os filamentos das espirais de MreB e MbI são altamente dinâmicos, com meia-vida de alguns minutos; como ocorre no caso da actina, a hidrólise de ATP acompanha o processo de polimerização.

Diversas moléculas relacionadas a MreB e Mbl desempenham funções mais especializadas. Um homólogo de actina em bactérias particularmente intrigante é ParM, que é codificado por certos plasmídeos bacterianos que também contêm genes responsáveis por resistência a antibióticos e frequentemente levam à disseminação de resistência a múltiplos fármacos em epidemias. Os plasmídeos bacterianos tipicamente codificam todos os produtos gênicos necessários a sua própria segregação, presumivelmente como estratégia para assegurar sua propagação e herança nas bactérias hospedeiras. *In vivo*, ParM se organiza sob uma estrutura filamentosa que associa a cada extremidade uma cópia do plasmídeo que o codifica. O crescimento do filamento de ParM parece separar as cópias replicadas do plasmídeo, de forma semelhante ao reverso da operação de um fuso mitótico (**Figura 16-27**). Apesar de ParM ser um homólogo estrutural de actina, seus comportamentos dinâmicos diferem significativamente. Os filamentos de ParM sofrem dramático efeito de instabilidade dinâmica *in vitro*, e a forma como crescem ou encurtam-se os assemelha mais a microtúbulos do que a filamentos de actina. A estrutura semelhante a um fuso, anteriormente citada, é aparentemente construída por estabilização seletiva de filamentos espontaneamente nucleados que se ligam a proteínas especializadas recrutadas nas origens de replicação dos plasmídeos.

Os diversos homólogos de actina em bactérias compartilham semelhanças em termos de estrutura molecular, mas possuem baixa similaridade em suas sequências de aminoácidos (~10 a 15% de resíduos idênticos). Eles se organizam em filamentos com padrões de empacotamento helicoidal distintos, os quais também apresentam comportamentos dinâmicos bastante diferentes. Ao invés de usarem uma mesma actina extremamente conservada para diferentes funções, como ocorre em células eucarióticas, as bactérias aparentemente optaram por diversificar e especializar seus homólogos de actina para diferentes atividades.

Atualmente parece óbvio que o princípio geral de organização da estrutura celular pela autoassociação de proteínas de ligação a nucleotídeos em filamentos helicoidais dinâmicos é usado por todas as células, e que as duas principais famílias de actina e tubulina são bastante ancestrais, provavelmente anteriores à separação entre os reinos eucariótico e bacteriano. No entanto, o emprego que uma bactéria faz de seu citoesqueleto parece ser distinto daquele referente a seus homólogos eucarióticos. Por exemplo, em bactérias, é a tubulina (FtsZ) que está envolvida na *citocinese* (a efetiva separação da célula em divisão em duas

Figura 16-27 Papel do homólogo de actina ParM na segregação de plasmídeos. (A) Alguns plasmídeos bacterianos de resistência a fármacos (em *amarelo*) codificam um homólogo da actina, ParM, que sofre nucleação espontânea formando pequenos filamentos dinâmicos (em *verde*) no interior do citoplasma da bactéria. Uma segunda proteína codificada no plasmídeo (em *azul*) se liga a sequências específicas de DNA sobre o plasmídeo, além de estabilizar as extremidades dinâmicas dos filamentos de ParM. Após a duplicação do plasmídeo, o que permite a estabilização de ambas as extremidades dos filamentos ParM, os filamentos crescem e empurram os plasmídeos duplicados para extremidades opostas da célula. (B) Nestas células bacterianas, que possuem um plasmídeo de resistência a fármacos, os plasmídeos estão corados em *vermelho*, e a proteína ParM, em *verde*. À esquerda, um feixe curto de ParM conecta os dois plasmídeos-filhos logo após sua duplicação. À direita, filamentos ParM totalmente montados empurram os plasmídeos duplicados para os polos da célula. (A, adaptada de E. C. Garner, C. S. Campbell e R. D. Mullins, *Science* 306:1021-1025, 2004. Com permissão de AAAS; B, de J. Moller-Jensen et al., *Mol. Cell* 12:1477-1487, 2003. Com permissão de Elsevier.)



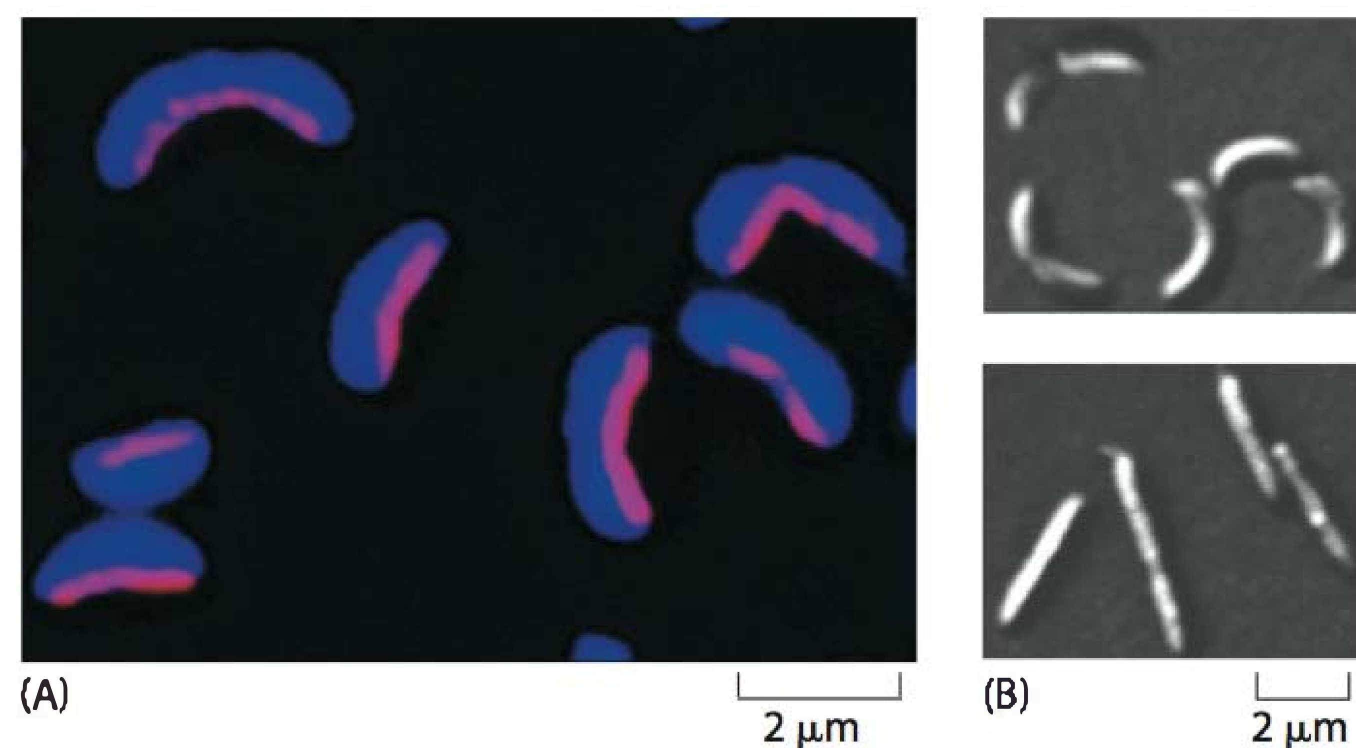


Figura 16-28 ***Caulobacter*** **e crescentina.** A bactéria *Caulobacter crescentus*, que apresenta um formato de foice, expressa uma proteína, a crescentina, que possui uma série de domínios supertorcidos similares em tamanho e organização aos domínios dos filamentos intermediários eucarióticos. Nas células, a proteína crescentina forma uma fibra que se distribui ao longo da superfície interna da parede celular curva da bactéria. Quando o gene é disrupcionado, as bactérias permanecem viáveis, mas crescem apresentando forma de bastonete ereto. (De N. Ausmees, J. R. Kuhn e C. Jacobs-Wagner, *Cell* 115:705-713, 2003. Com permissão de Elsevier.)

células-filhas), ao passo que em células eucarióticas é a actina que direciona esse processo. Em contraponto, os microtúbulos eucarióticos são responsáveis pela segregação dos cromossomos, ao passo que as actinas bacterianas (ParM e possivelmente MreB) é que auxiliam a segregação do DNA replicado em bactérias.

Pelo menos uma espécie bacteriana que apresenta um formato incomum, em lua crescente, *Caulobacter crescentus*, parece conter uma proteína com similaridade estrutural significante com outra das três principais classes de filamentos do citoesqueleto encontradas em células animais, ou seja, com os filamentos intermediários. Uma proteína denominada crescentina forma estruturas filamentosas que aparentemente influenciam a forma da célula, pois quando o gene que codifica a crescentina é deletado, as células de *Caulobacter* apresentam forma de bastonete (**Figura 16-28**).

Hoje sabemos que as bactérias efetivamente possuem sofisticados citoesqueletos dinâmicos. Assim, por que elas são tão pequenas e morfologicamente simples? Como ainda não foram identificadas *proteínas motoras* que possam percorrer os filamentos bacterianos, podemos imaginar que a evolução dessas proteínas tenha sido uma etapa essencial que permitiu a elaboração morfológica dos eucariotos.

Resumo

O citoplasma das células eucarióticas é organizado espacialmente em uma rede de proteínas filamentosas conhecida como citoesqueleto. Esta rede contém três tipos principais de filamentos: microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. Todos estes três tipos de filamentos se organizam em arranjos helicoidais a partir de subunidades que se autoassociam usando uma combinação de contactos proteicos extremidade-extremidade e laterais. Diferenças na estrutura das subunidades e na maneira pela qual elas se autoassociam dão aos diferentes filamentos propriedades mecânicas diversas. Filamentos intermediários são semelhantes a cabos, curvam-se facilmente, sendo, no entanto, resistentes ao rompimento. Microtúbulos são tubos ocos, rígidos e fortes. Filamentos de actina são mais finos do que os anteriores e são facilmente rompidos.

Em células vivas, os três tipos de filamentos do citoesqueleto sofrem remodelação constante por associação e dissociação de suas subunidades. Microtúbulos e filamentos de actina adicionam e perdem subunidades apenas em suas extremidades, uma delas (a extremidade "mais") apresentando crescimento mais rápido do que a outra. A tubulina e a actina (as subunidades de microtúbulos e filamentos de actina, respectivamente) ligam-se a trifosfatos de nucleosídeo hidrolisando-os (a tubulina liga-se a GTP e a actina liga-se a ATP). A hidrólise de nucleotídeos caracteriza o comportamento dinâmico típico destes dois filamentos. Os filamentos de actina nas células parecem estar predominantemente sob a ação de treadmilling, *com associação em uma das extremidades do filamento e dissociação simultânea na outra extremidade. Os microtúbulos celulares apresentam predominantemente instabilidade dinâmica, de tal forma que um microtúbulo alterna fases de crescimento e de encurtamento.*

A tubulina e a actina são evolutivamente bastante conservadas em eucariotos, ao passo que a família dos filamentos intermediários é muito diversa. No citoplasma de células animais, existe uma grande variedade de formas tecido-específicas de filamentos intermediários, entre elas os filamentos de queratina das células epiteliais, os neurofilamentos das células nervosas e os filamentos de desmina nas células musculares. Em todas estas células, a função primordial dos filamentos intermediários é a de fornecer resistência mecânica.

Células bacterianas também possuem homólogos de tubulina, de actina e de filamentos intermediários, formando estruturas filamentosas dinâmicas envolvidas na determinação da forma celular e nos processos de divisão celular.

COMO AS CÉLULAS REGULAM SEUS FILAMENTOS DO CITOESQUELETO

Os microtúbulos, os filamentos de actina e os filamentos intermediários são muito mais dinâmicos nas células do que em um tubo de ensaio. A célula regula o comprimento e a estabilidade dos seus filamentos citoesqueléticos, regulando também a quantidade e a geometria deles. Este controle é feito basicamente pela regulação das ligações que ocorrem entre os filamentos e entre filamentos e outros componentes celulares, de tal maneira que a célula pode formar uma ampla variedade de estruturas macromoleculares. Algumas das propriedades dos filamentos são reguladas por modificações covalentes diretas das subunidades estes, mas a maioria dos processos reguladores é realizada por proteínas acessórias que se ligam aos filamentos ou às subunidades livres. Algumas das proteínas acessórias mais importantes que se associam a microtúbulos e filamentos de actina estão apresentadas no **Painel 16-3** (p. 994-995). Esta seção enfocará os mecanismos pelos quais estas moléculas acessórias modificam a dinâmica e a estrutura dos filamentos do citoesqueleto. Inicialmente discutiremos como os microtúbulos e os filamentos de actina são nucleados nas células tendo em vista que este processo é essencial para a determinação da organização geral do interior celular.

Um complexo proteico que contém γ-tubulina faz a nucleação dos microtúbulos

Enquanto a α–tubulina e a β-tubulina são as unidades básicas normais para a montagem de microtúbulos, um outro tipo de tubulina, denominado *γ–tubulina*, possui um papel mais específico. Ocorrendo em quantidades muito menores do que as tubulinas α e β, esta proteína está envolvida na nucleação do crescimento de microtúbulos em organismos tão variados quanto leveduras e humanos. Os microtúbulos geralmente são nucleados em uma região intracelular específica conhecida como **centro organizador de microtúbulos** (**MTOC,** *microtubule-organizing center*). Anticorpos dirigidos contra γ-tubulina coram o MTOC em praticamente todas as espécies e tipos celulares nos quais este reagente foi testado até o momento.

Os microtúbulos são nucleados em sua extremidade menos (–), enquanto a extremidade mais (+) cresce a partir do MTOC, criando diferentes tipos de arranjos. Um **complexo em anel de γ –tubulina** (**γ-TuRC**, *γ–tubulin ring complex*) que é capaz de nuclear o crescimento de microtúbulos foi isolado, tanto a partir de células de insetos quanto de vertebrados. Duas proteínas, conservadas de leveduras a humanos, ligam-se diretamente à γ-tubulina, juntamente a várias outras proteínas que auxiliam na formação de um anel de moléculas de γ-tubulina. Este anel pode ser visto nas extremidades menos de microtúbulos nucleados por γ-TuRC, e acredita-se que sirva como molde para gerar um microtúbulo com 13 protofilamentos (**Figura 16-29**).

Os microtúbulos irradiam a partir do centrossomo de células animais

Na maioria das células animais, existe um MTOC único e bem-definido chamado de **centrossomo**, localizado próximo ao núcleo. A partir desse ponto focal, os microtúbulos citoplasmáticos emanam radialmente, em uma conformação em forma de estrela. Os microtúbulos são nucleados no centrossomo a partir de suas extremidades menos e, consequentemente, suas extremidades mais estão posicionadas para fora, crescendo em direção à periferia celular. Os microtúbulos nucleados no centrossomo sofrem um contínuo crescimento e encurtamento por instabilidade dinâmica, abarcando todo o volume tridimensional da célula. Um centrossomo é composto de uma *matriz centrossomal* fibrosa, a qual contém mais de 50 cópias de

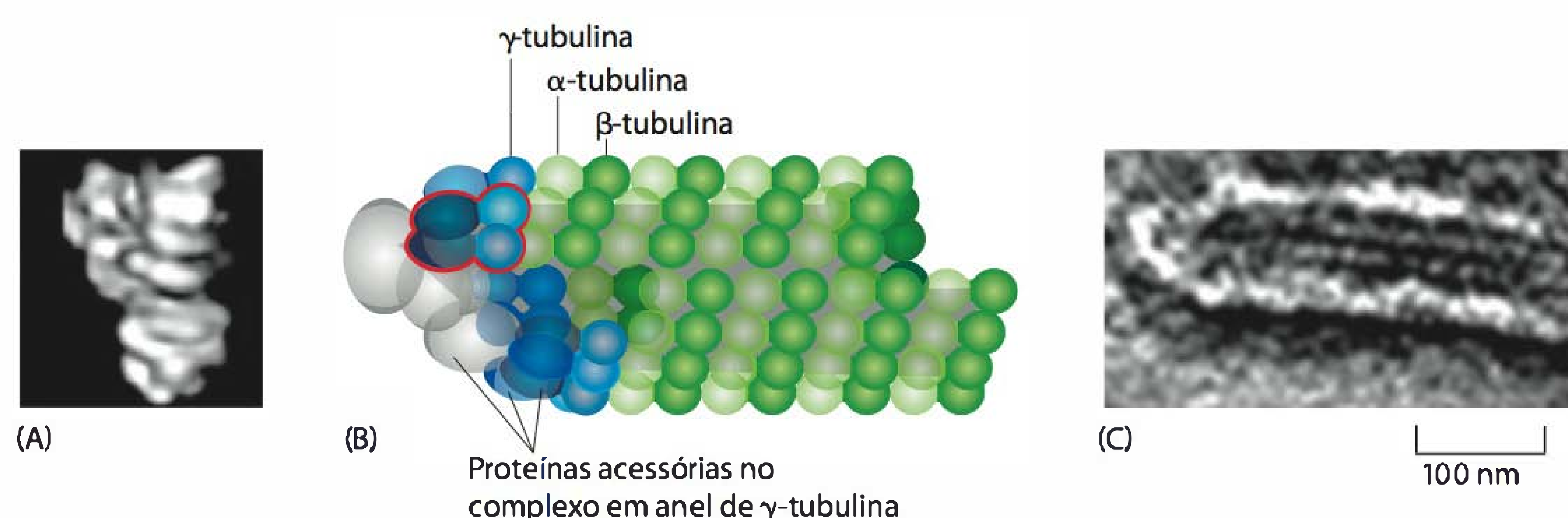
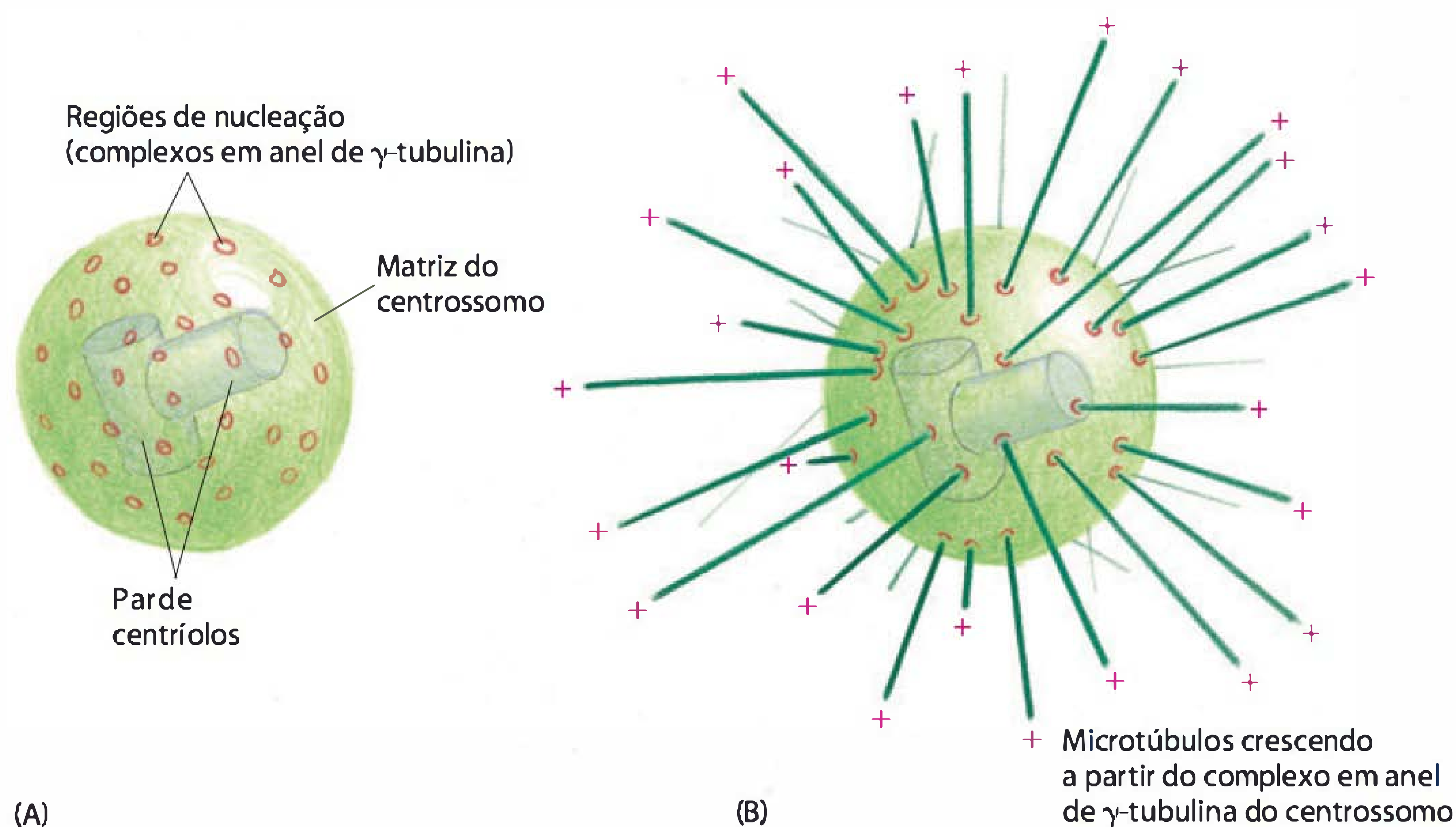


Figura 16-29 Polimerização de tubulina nucleada por complexos em anel de γ-tubulina. (A) Estrutura de um complexo em anel de γ-tubulina, reconstruída a partir de composição de microfotografias eletrônicas de complexos individuais purificados. (B) Modelo para a nucleação do crescimento de microtúbulos por γ-TuRC. A marcação em vermelho indica um par de proteínas ligado a duas moléculas de γ-tubulina; este grupo pode ser isolado como um subcomplexo do anel maior. Observe a descontinuidade longitudinal entre dois protofilamentos. Os microtúbulos geralmente possuem uma destas "fissuras", quebrando a uniformidade do empacotamento helicoidal de protofilamentos. (C) Microfotografia eletrônica de um único microtúbulo nucleado a partir dos complexos em anel de γ-tubulina purificados. (A e C, de M. Moritz. et al., *Nat. Cell Biol.* 2:365-370, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



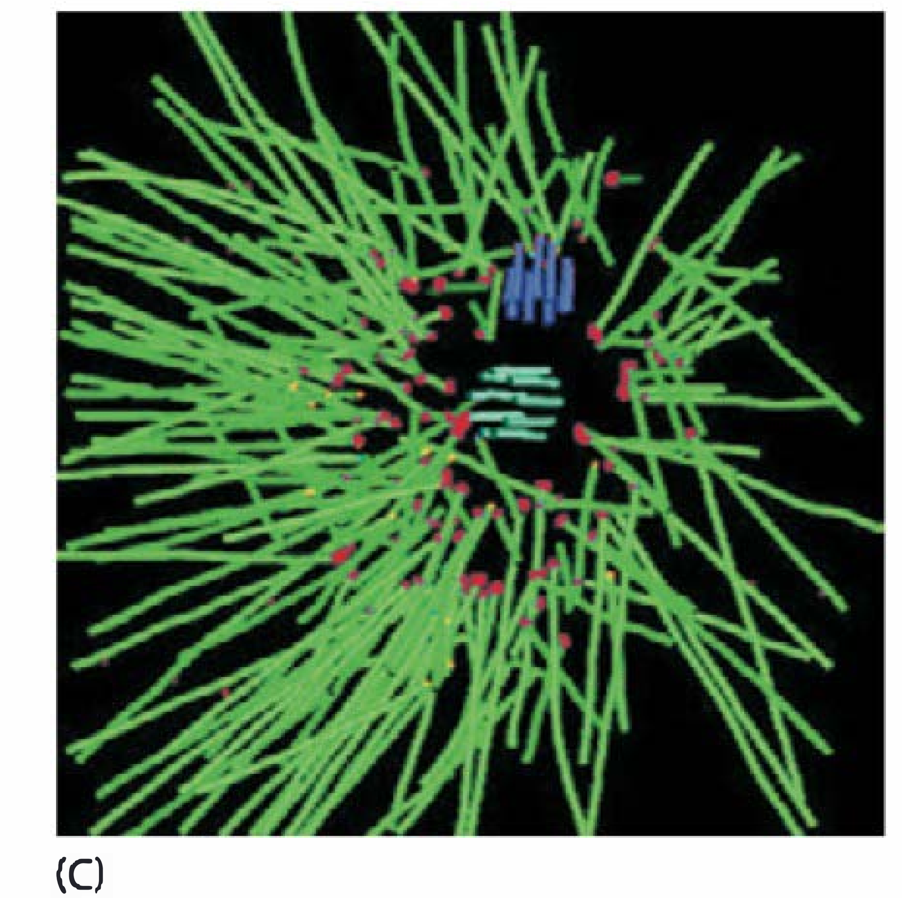

(C)

Figura 16-30 O centrossomo. (A) O centrossomo é o principal MTOC em células animais. Localizado no citoplasma, próximo ao núcleo, ele consiste em uma matriz amorfa de proteínas fibrosas às quais os complexos em anel de γ-tubulina que irão nuclear o crescimento de microtúbulos estão ligados. Essa matriz é organizada por um par de centríolos, conforme descrito no texto. (B) Um centrossomo com microtúbulos ligados. A extremidade menos (–) de cada microtúbulo está inserida no centrossomo, tendo crescido a partir de um complexo em anel de γ-tubulina, ao passo que a extremidade mais (+) de cada microtúbulo encontra-se livre no citoplasma. (C) Em uma imagem reconstruída de MTOC de uma célula de *C. elegans*, um denso emaranhado de microtúbulos pode ser observado emanando de um centrossomo. (C, de E. T. O´Toole et al., *J. Cell Biol.* 163:451-456, 2003. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

γ-TuRC. A maioria das proteínas que forma esta matriz ainda não foi descrita, e ainda não conhecemos os processos de recrutamento e ativação do γ-TuRC.

Um par de estruturas cilíndricas organizadas em ângulo reto entre si, formando uma configuração semelhante a um L, encontra-se inserido no centrossomo (**Figura 16-30**). Estes são os **centríolos**, os quais se tornarão os corpos basais de cílios e flagelos em células móveis (descritos mais tarde). Os centríolos organizam a matriz centrossomal (também chamada de material pericentriolar), garantindo a sua duplicação durante cada ciclo celular ao mesmo tempo em que os próprios centríolos são duplicados (**Figura 16-31**). Como descrito no Capítulo 17, o centrossomo duplica e separa-se em duas partes iguais durante a interfase, cada uma contendo um par de centríolos duplicados. Estes dois centríolos-filhos se movem para lados opostos do núcleo no início da mitose e originam os dois polos do fuso mitótico (ver Painel 17-1, p. 1072-1073). Um centríolo consiste em um pequeno cilindro de microtúbulos modificados, acrescido de uma grande quantidade de moléculas acessórias. As bases moleculares de sua duplicação ainda não estão esclarecidas.

Em fungos e diatomáceas, os microtúbulos são nucleados em um MTOC inserido no envelope nuclear sob a forma de uma pequena placa chamada de *corpo polar do fuso*. Células vegetais superiores parecem nuclear microtúbulos em regiões distribuídas por todo o envelope nuclear. Nem os fungos nem a maioria das célula vegetais contêm centríolos. Apesar dessas diferenças, todas essas células possuem γ-tubulina e aparentemente utilizam essa proteína para nuclear seus microtúbulos.

Em células animais, a configuração em estrela dos microtúbulos é bastante nítida, apresentando as extremidades dinâmicas mais posicionadas para o exterior, em direção à periferia da célula, e as extremidades estáveis menos recolhidas, próximo ao núcleo. O sistema de microtúbulos que irradia a partir do centrossomo atua como um aparelho que controla os limites celulares e posiciona o centrômero na região central da célula. Esse controle é mantido mesmo em sistemas artificiais (**Figura 16-32**). Mesmo em um fragmento celular isolado que não possui centrossomo, microtúbulos dinâmicos interagindo com organelas membranares

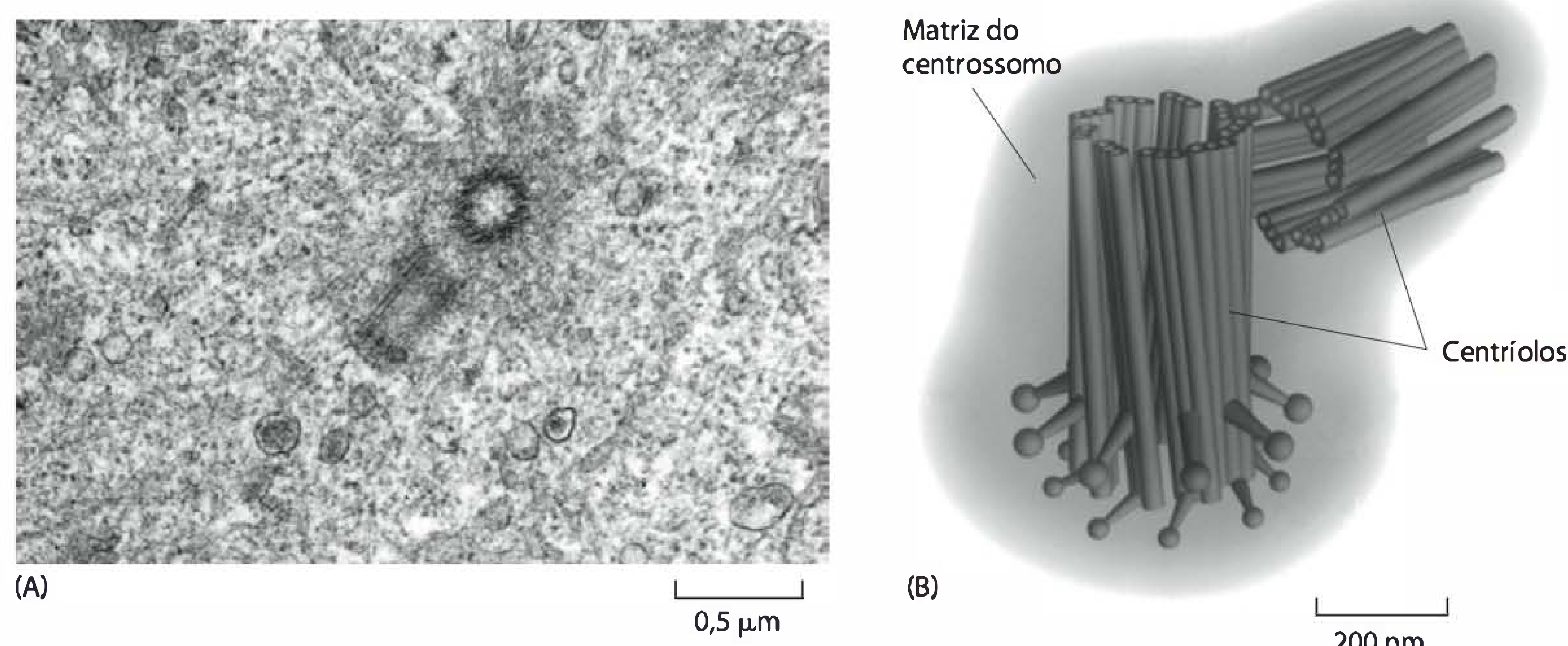
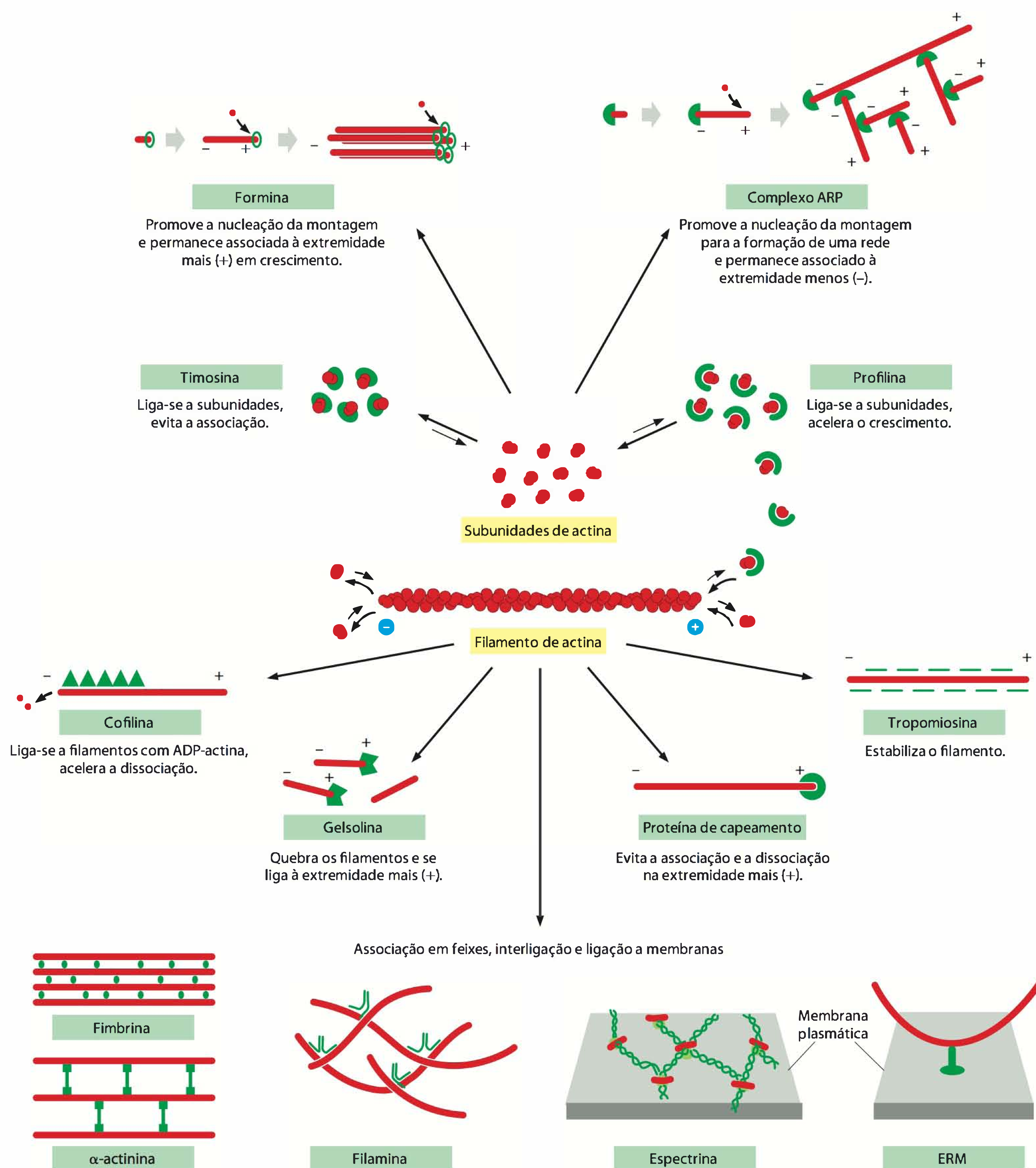


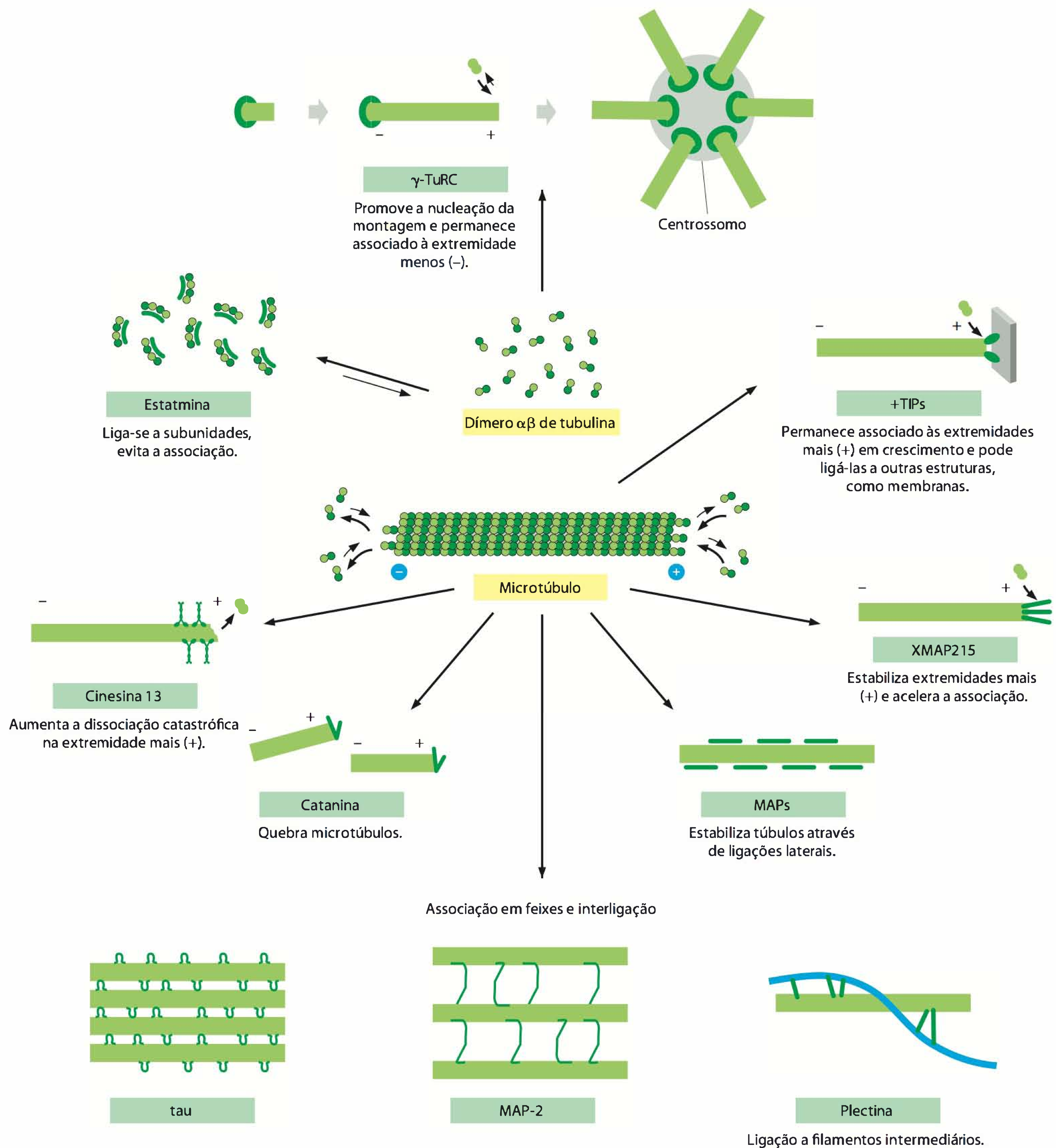
Figura 16-31 Um centríolo no centrossomo. (A) Microfotografia eletrônica de uma fina secção de um centrossomo mostrando a extremidade terminal de um centríolo-mãe e uma secção longitudinal de um centríolo-filho. Diversos microtúbulos podem ser observados à proximidade. (B) Estrutura de um par de centríolos. (A, de G. J. Mack, Y. Ou e J. B. Rattner, *Microsc. Res. Tech.* 49:409-419, 2000. Com permissão de John Wiley & Sons. B, adaptada de D. Chrétien et al., *J. Struct. Biol.* 120:117-133, 1997. Com permissão de Elsevier.)

FILAMENTOS DE ACTINA



Algumas das principais proteínas acessórias do citoesqueleto de actina. Excetuando-se as proteínas motoras miosina, que serão discutidas em uma seção posterior, é ilustrado um exemplo para cada um dos principais tipos de proteínas acessórias. Cada um desses tipos é discutido no texto. No entanto, a maioria das células contém mais de uma centena de proteínas de ligação à actina diferentes, e provavelmente existam tipos importantes de proteínas de associação à actina que ainda não foram identificados.

MICROTÚBULOS



Algumas das principais proteínas acessórias do citoesqueleto de microtúbulos. Excetuando-se as duas classes de proteínas motoras que serão discutidas em uma seção posterior, é ilustrado um exemplo para cada um dos principais tipos de proteínas acessórias. Cada um desses tipos é discutido no texto. No entanto, a maioria das células contém mais de uma centena de proteínas de ligação ao microtúbulo diferentes, e – como ocorre no caso de proteínas associadas à actina – provavelmente existam tipos importantes de proteínas de associação a microtúbulos que ainda não foram identificados.

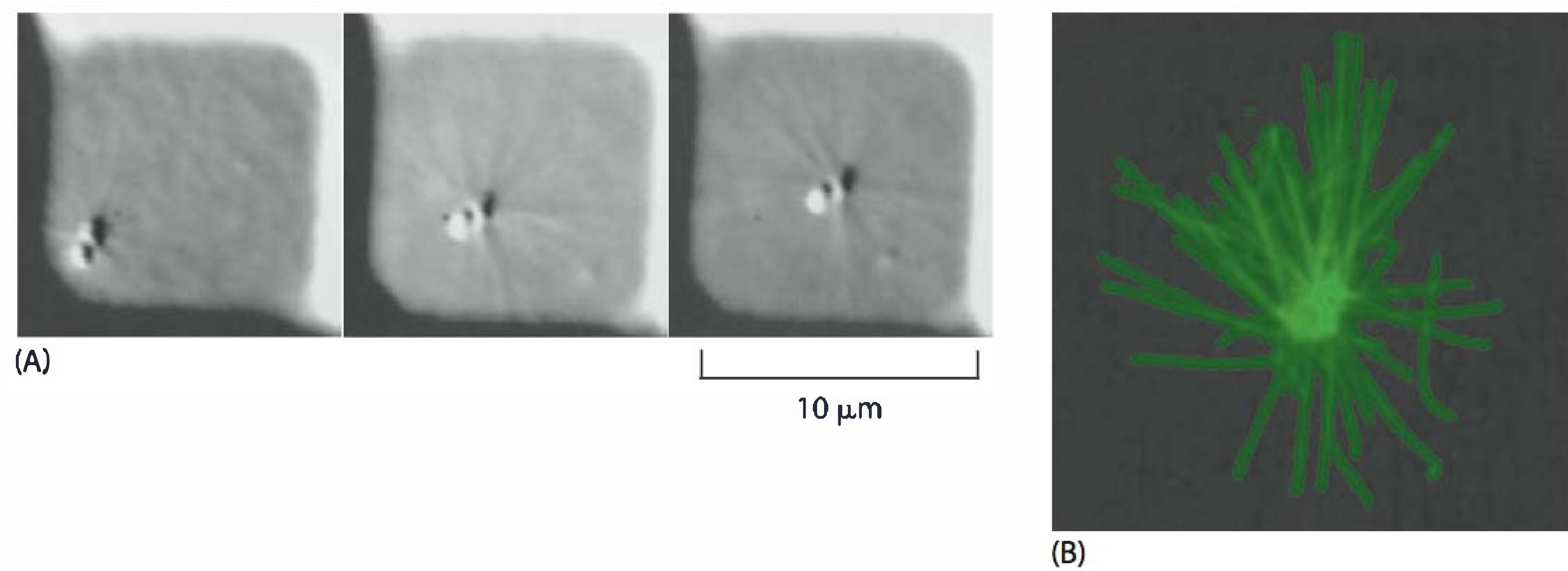


Figura 16-32 O comportamento de centralização de um centrossomo. (A) Pequenos poços quadrados foram micromanipulados em placas, a partir de um substrato plástico. Um centrossomo isolado foi colocado no interior de uma destas placas, na presença de uma solução contendo subunidades de tubulina. Conforme ocorre a polimerização de microtúbulos, nucleada a partir do centrossomo, eles pressionam as paredes da placa. A necessidade de pressão igual em todas as direções para a estabilização da posição força o centrossomo para o centro da placa. As três fotos foram feitas em intervalos de três minutos. (B) Um centrossomo similarmente autocentralizado foi fixado e corado para mostrar a distribuição dos microtúbulos que pressionam as quatro paredes delimitadoras. (De T. E. Holy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6228-6231, 1997. Com permissão da National Academy of Sciences.)

organizam-se em um arranjo em forma de estrela com as extremidades menos agrupadas na parte central, apesar de esse processo envolver mais componentes do que o simples mecanismo de impulsão usado pelo centrossomo isolado (**Figura 16-33**). Esta capacidade que o citoesqueleto de microtúbulos possui de localizar o centro da célula estabelece um sistema geral coordenado, o qual é então utilizado para posicionar diferentes organelas no interior da célula. Células altamente especializadas, com morfologias complexas, como neurônios, células musculares e células epiteliais, devem utilizar mecanismos adicionais de medida no estabelecimento de seus sistemas coordenados internos mais elaborados. Assim, por exemplo, quando uma célula epitelial forma junções célula-célula e torna-se altamente polarizada, as extremidades menos dos microtúbulos são movidas para uma região próxima à membrana plasmática apical. A partir dessa localização assimétrica, um arranjo de microtúbulos praticamente paralelos se forma ao longo do eixo maior da célula, com as extremidades mais se estendendo rumo à superfície basal (ver Figura 16-5).

Os filamentos de actina frequentemente são nucleados na membrana plasmática

Em contraste à nucleação dos microtúbulos, que ocorre principalmente em regiões bem internas do citoplasma, próximo ao núcleo, a nucleação dos filamentos de actina ocorre com mais frequência na membrana citoplasmática, ou próximo a ela. Consequentemente, na maioria das células, a maior densidade de filamentos de actina encontra-se na periferia celular. A camada adjacente à membrana citoplasmática é denominada **córtex celular**, e os filamentos de actina ali presentes determinam o formato e o movimento da superfície celular. Por exemplo, dependendo das ligações entre elas e de ligações com a membrana citoplasmática, as estruturas de actina podem formar vários tipos extremamente diferentes de projeções na superfície celular. Entre estas projeções estão feixes pontiagudos como as *microvilosidades* ou os *filopódios*, projeções planas em véu chamadas de *lamelipódios* que auxiliam o movimento das células sobre substratos sólidos e as projeções fagocíticas dos macrófagos.

A nucleação de filamentos de actina na membrana citoplasmática em geral é regulada por sinais externos, o que permite que a célula modifique rapidamente sua conformação e consistência em resposta a seu ambiente externo. Essa nucleação pode ser catalisada por dois tipos diferentes de fatores regulados, o complexo ARP e as forminas (discutidas a seguir). O primeiro desses fatores é um complexo de proteínas que inclui duas *proteínas rela-*

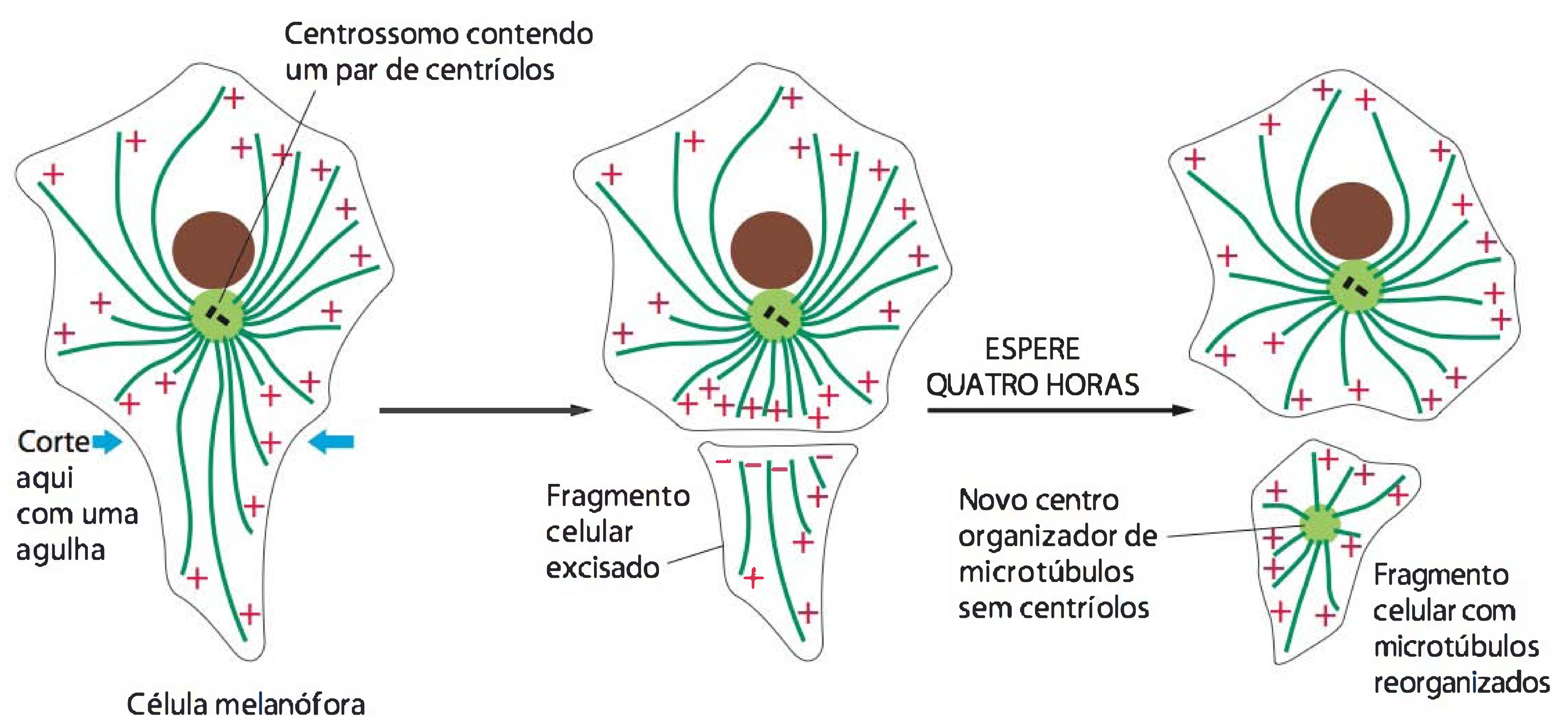


Figura 16-33 Um **arranjo de microtúbulos pode encontrar o centro de uma célula.** Após a retirada, com o auxílio de uma agulha, de uma parte de uma célula pigmentar de peixe, os microtúbulos presentes no fragmento celular isolado reorganizam-se de tal modo que suas extremidades menos se dirigem para sua região central, inserindo-se em um novo centro organizador de microtúbulos.

cionadas à actina (ARPs, actin-related proteins), cada uma apresentando aproximadamente 45% de similaridade com a actina. Com função análoga à de γ-TuRC, o **complexo ARP** (também conhecido como *complexo Arp 2/3*) provoca a nucleação do crescimento do filamento de actina a partir da extremidade menos (–), permitindo uma rápida extensão na extremidade de mais (+) (**Figura 16-34**A e B). Esse complexo pode também se ligar à lateral de um outro filamento de actina, ainda permanecendo ligado à extremidade menos (–) do filamento que

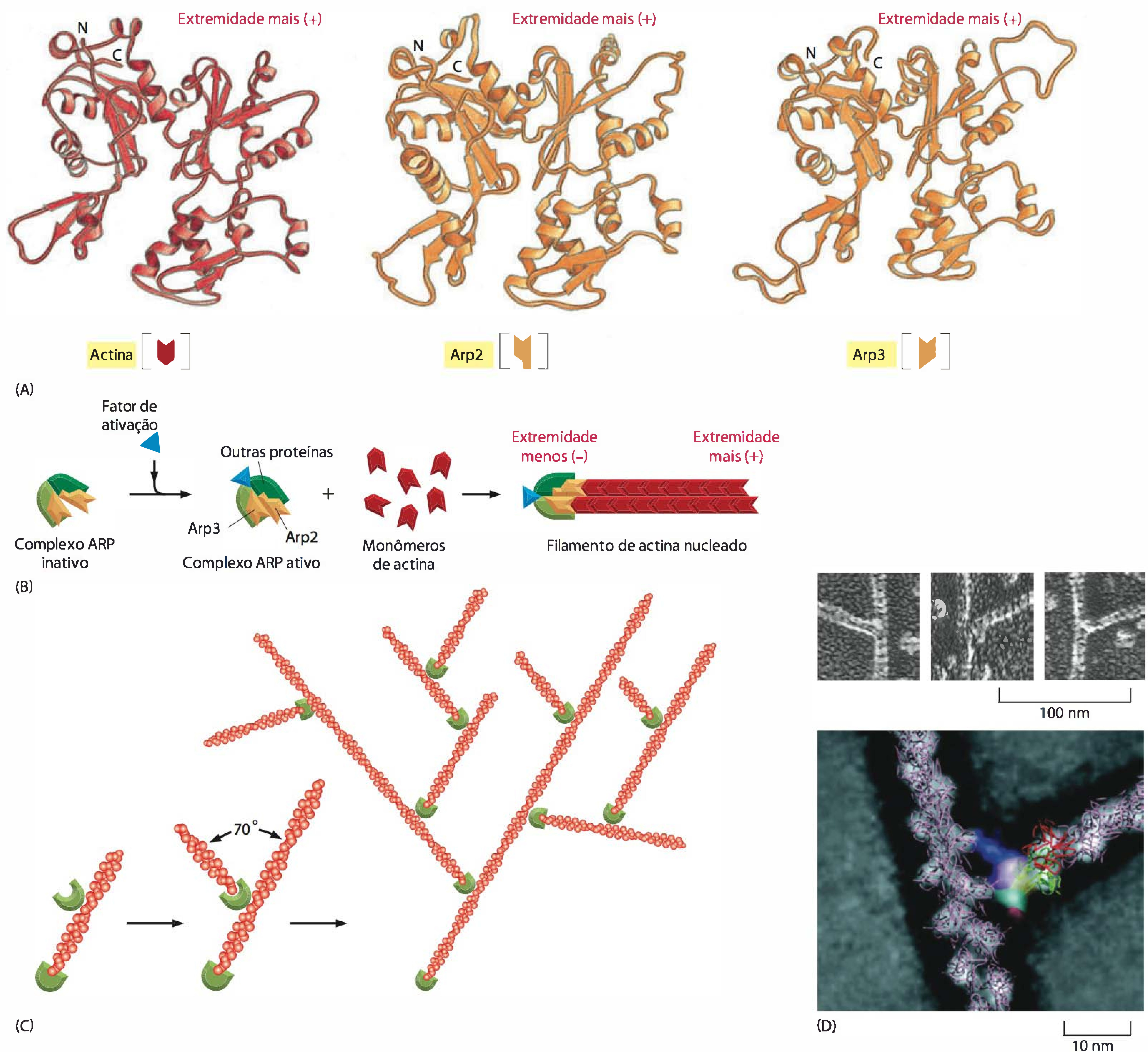


Figura 16-34 Nucleação e formação da rede de actina pelo complexo ARP. (A) As estruturas de Arp2 e Arp3, comparadas à estrutura de actina. Apesar de a face da molécula equivalente à extremidade mais (+) (*superior*) tanto em Arp2 quanto em Arp3 ser bastante similar à extremidade mais (+) da actina, diferenças nas laterais e na extremidade menos (–) (*inferior*) evitam que essas proteínas relacionadas à actina possam formar filamentos associando-se entre si ou coassociando-se no interior dos filamentos à actina. (B) Um modelo para a nucleação do filamento de actina pelo complexo ARP. Na ausência de um fator de ativação, Arp2 e Arp3 são posicionadas por suas proteínas acessórias em uma orientação que evita induzirem nucleação de um novo filamento de actina. Quando um fator de ativação, indicado pelo *triângulo azul*, liga-se ao complexo, Arp2 e Arp3 são posicionadas em uma nova conformação, a qual se assemelha à extremidade mais (+) de um filamento de actina. As subunidades de actina podem então ser adicionadas sobre esta estrutura, o que supera o passo de limitação de taxa referente à nucleação do filamento (ver Figura 16-10). (C) O complexo ARP promove a nucleação de filamentos mais eficientemente quando este se liga à lateral de um filamento de actina preexistente. O resultado é uma ramificação que cresce em angulo de 70° em relação ao filamento original. Ciclos repetidos de nucleação ramificada geram uma rede de filamentos de actina semelhante a um arbusto. (D) Acima, microfotografias eletrônicas de filamentos de actina ramificados formados a partir da mistura de subunidades purificadas de actina com complexos ARP purificados. Abaixo, imagem reconstruída de uma ramificação onde a estrutura cristalizada da actina e a do complexo ARP foram adaptadas à densidade eletrônica. O filamento-mãe está posicionado de cima para baixo, e o filamento-filho se ramifica à direta, no ponto em que o complexo ARP se liga a três subunidades de actina sobre o filamento-mãe (D, de R. D. Mullins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6181-6186, 1998. Com permissão da National Academy of Sciences, e de N. Volkmann et al., *Science* 293:2456-2459, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

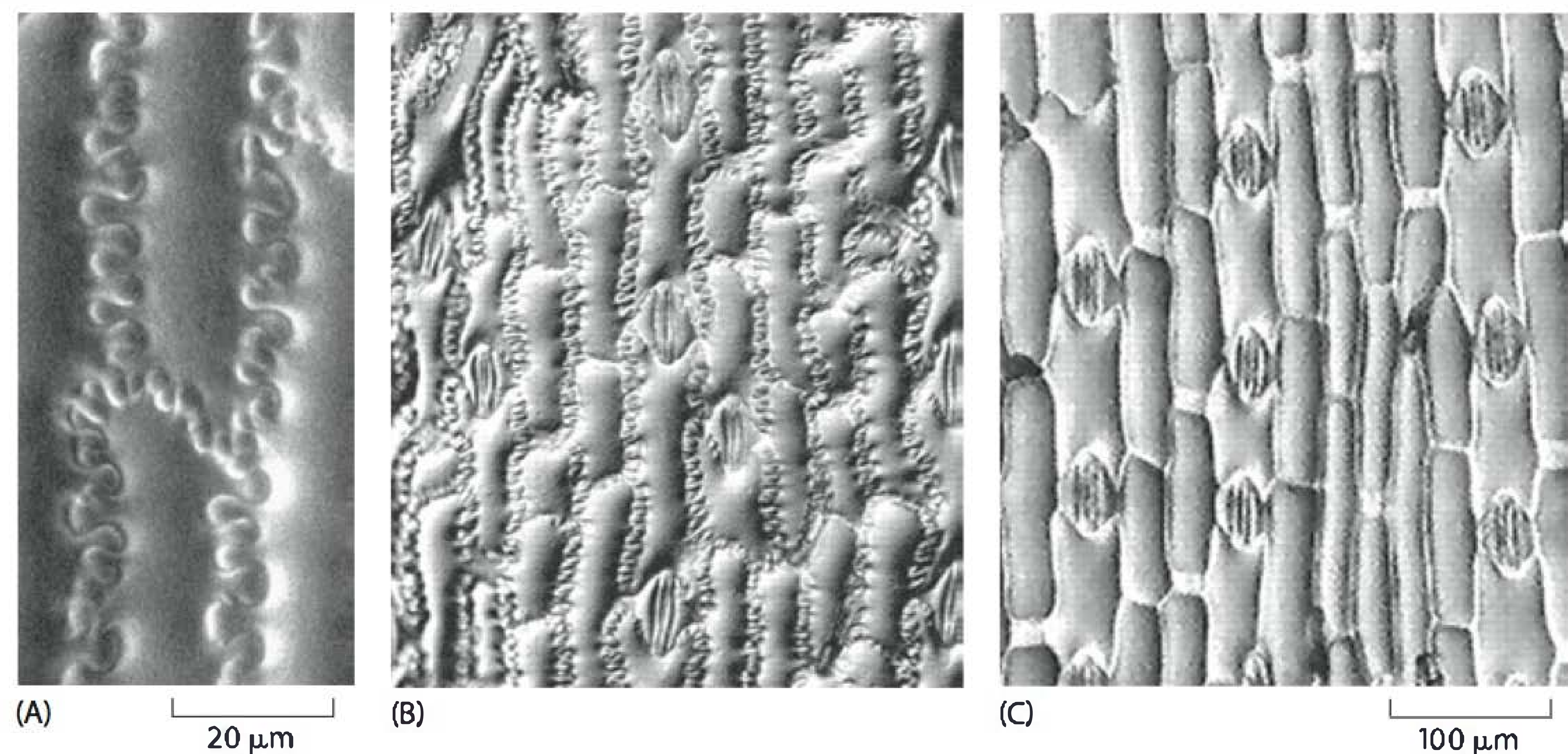


Figura 16-35 Função do complexo ARP em células vegetais. (A) Células na epiderme de uma folha de milho formam pequenas alças ricas em actina que mantêm unidas células adjacentes, como se fossem peças de um quebra-cabeças. (B) O padrão regular de células entrelaçadas cobre a superfície de uma folha. (C) Células epidermais em uma planta mutante que não possui o complexo ARP são incapazes de formar as alças de entrelace. As células com formato retangular apresentam um tamanho e espaçamento normal, mas formam folhas que parecem extremamente brilhantes a olho nu. (De M. J. Frank, H. N. Cartwright e L. G. Smith, *Development* 130:753-762, 2003. Com permissão de Company of Biologists.)

inicialmente nucleou, dessa forma dando origem a filamentos individuais organizados em uma rede ramificada (Figura 16-34C e D).

Em animais, o complexo ARP está associado a estruturas presentes na borda anterior de células com capacidade de migração. O complexo está localizado em regiões de rápido crescimento de filamentos de actina, como é o caso de lamelipódios, e sua atividade de nucleação é regulada por moléculas de sinalização intracelular e por componentes da face citosólica da membrana citoplasmática. Esse complexo conservado também está envolvido na nucleação de filamentos de actina próximo à membrana plasmática em leveduras, onde é necessário à formação de manchas de actina cortical (ver Figura 16-6), e em células vegetais, onde direciona a formação de feixes de actina na superfície, os quais são necessários ao crescimento de morfologias celulares complexas em diferentes tecidos (**Figura 16-35**).

Tanto a γ-tubulina quanto as ARPs possuem origem evolutiva bastante antiga e grande conservação em uma ampla gama de espécies de eucariotos. Os genes que as codificam parecem ter-se originado a partir da duplicação dos genes que codificavam a subunidade de microtúbulos e filamentos de actina, respectivamente, seguida de divergência e especialização das cópias gênicas, levando à codificação de proteínas com função especial de nucleação. O fato de uma estratégia semelhante ter evoluído em dois sistemas de citoesqueleto separados salienta a importância central da regulação da nucleação de filamentos como um princípio básico de organização celular.

O mecanismo de nucleação afeta a organização em larga escala de filamentos

Visto que o complexo ARP induz o crescimento de um novo filamento de actina mais eficientemente quando este está posicionado na lateral de um filamento de actina mais antigo, a ativação regulada do complexo ARP em células animais tende a levar ao estabelecimento de grandes redes ramificadas de actina. No entanto, muitas das grandes estruturas de actina vistas nas células, como o sulco de clivagem encontrado na região central de uma célula em divisão (ver Figura 16-2) e os cabos de actina que apontam rumo à região de crescimento do broto em leveduras (ver Figura 16-6), são compostas por feixes paralelos de filamentos de actina não-ramificados. A formação de vários destes feixes de actina é induzida por um grupo distinto de proteínas de nucleação, as *forminas*, as quais são capazes de nuclear o crescimento de filamentos retos e não-ramificados que podem ser interligados pela atuação de outras proteínas para a formação de feixes paralelos.

As **forminas** pertencem a uma grande família de proteínas diméricas (o genoma de camundongos codifica aproximadamente 15 forminas diferentes). Cada subunidade de formina possui um sítio de ligação à actina monomérica, e o dímero de formina parece ser capaz de nuclear a polimerização de um filamento de actina pela captura de dois monômeros. O dímero de formina permanece associado à extremidade mais (+), de rápido crescimento, enquanto o filamento recentemente nucleado cresce e, ao mesmo tempo, permite a ligação de novas subunidades a essa extremidade para tornar o filamento maior (**Figura 16-36**). Esse comportamento é bastante distinto do comportamento apresentado pelo complexo ARP ou por γ-TuRC, os quais permanecem ligados de forma estável à extremidade menos (–) do filamento de actina ou microtúbulo e impedem tanto a adição quanto a perda de subunidades nessa extremidade.

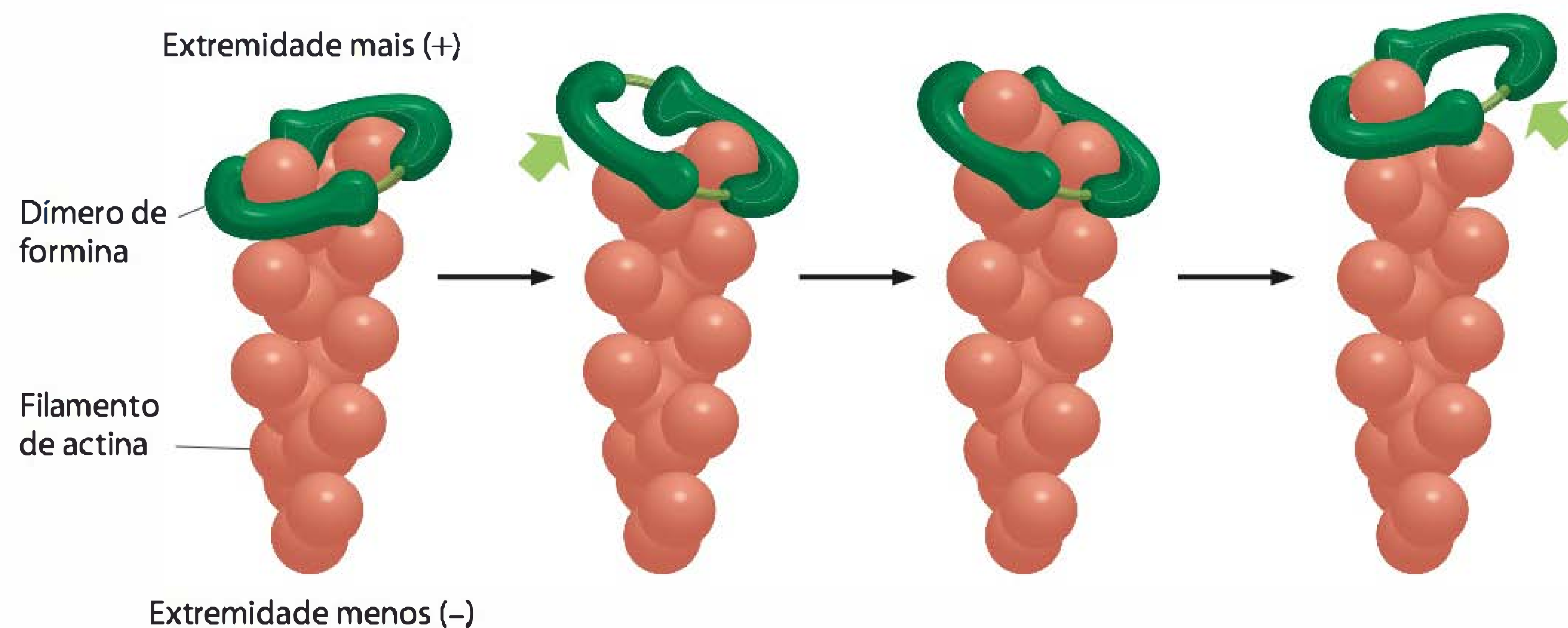


Figura 16-36 Alongamento da actina mediado por forminas. Proteínas formina (*em verde*) formam um complexo dimérico capaz de nuclear a formação de um novo filamento de actina (*em vermelho*) e que permanece associado à extremidade mais (+), de rápido crescimento, durante o processo de extensão. A proteína formina mantém sua ligação a uma das duas subunidades de actina expostas na extremidade mais (+) ao mesmo tempo em que permite que uma nova subunidade seja acrescida. Apenas uma pequena parte da grande molécula de formina está representada. Outras regiões regulam sua atividade e a ligam a estruturas específicas na célula. Diversas forminas estão indiretamente conectadas à membrana plasmática celular e auxiliam a polimerização insercional do filamento de actina diretamente abaixo da superfície da membrana.

Proteínas que se ligam às subunidades livres alteram o crescimento de um filamento

Uma vez que os filamentos citoesqueléticos tenham sido nucleados, eles geralmente sofrem extensão pela adição de subunidades solúveis. Na maioria das células não-musculares de vertebrados, aproximadamente 50% da actina estão sob a forma de filamento e 50% sob a forma solúvel, apesar de essas taxas poderem sofrer rápida alteração em resposta a sinais externos. A concentração de monômero solúvel tipicamente está entre 50 e 200 μM (2 a 8 mg/mL), sendo surpreendentemente alta, considerando-se a concentração crítica inferior a 1 μM observada para a actina pura em experimentos *in vitro*. Por que então a maior parte da actina solúvel não polimeriza formando filamentos? A razão é que o conjunto de subunidades contém proteínas especiais que se ligam aos monômeros de actina, o que em muito desfavorece a polimerização (uma ação bastante semelhante a da latrunculina). A mais abundante dessas proteínas é uma pequena proteína chamada de *timosina*. Monômeros de actina ligados à timosina estão em um estado de bloqueio, não podendo associar-se nem à extremidade mais (+) nem à extremidade menos (–) do filamento de actina, e não podendo hidrolisar ou modificar o nucleotídeo ao qual estão ligados.

Como células recrutam monômeros de actina a partir desse conjunto bloqueado para utilizá-los para a polimerização? Se poderia imaginar que vias de transdução de sinal como as discutidas no Capítulo 15 pudessem regular a timosina; no entanto, não é isso que acontece. Em vez disso, o recrutamento depende de uma outra proteína de ligação a monômeros, a *profilina*. A profilina liga-se à face do monômero de actina que é oposta à fenda de ligação de ATP, bloqueando a lateral do monômero que normalmente se associaria à extremidade menos (–) do filamento, ao mesmo tempo em que deixa exposto o sítio do monômero que se liga a extremidade mais (+) (**Figura 16-37**). O complexo profilina-actina pode facilmente ser adicionado a uma extremidade mais (+) livre. Essa adição induz uma mudança conformacional na actina que reduz sua afinidade pela profilina, e, consequentemente, a profilina é retirada do complexo, deixando o filamento de actina uma subunidade mais longa. Visto que a profilina compete com a timosina pela ligação a monômeros individuais de actina, o resultado geral da ativação local de moléculas de profilina é o movimento de subunidades de actina do conjunto sequestrado ligado à timosina rumo as extremidades mais dos filamentos. O crescimento de filamentos de actina depende ainda mais fortemente da ativação da profilina no caso daqueles filamentos cujas extremidades mais estão associadas a determinadas forminas (a família de proteínas nucleadores de actina discutida anteriormente); nesses casos, a extensão de filamentos de actina pode necessitar que a actina monomérica esteja ligada à profilina (**Figura 16-38**).

Vários mecanismos intracelulares regulam a atividade da profilina, entre eles a fosforilação da profilina e sua ligação com fosfolipídeos inositol. Esses mecanismos podem definir as regiões onde a profilina atuará. Por exemplo, a capacidade da profilina de direcionar subunidades sequestradas de actina para as extremidades em crescimento de filamentos é crucial para a montagem de filamentos na membrana plasmática. A profilina está localizada na face citosólica da membrana plasmática, pois tem capacidade de se ligar a fosfolipídeos ácidos que ali se

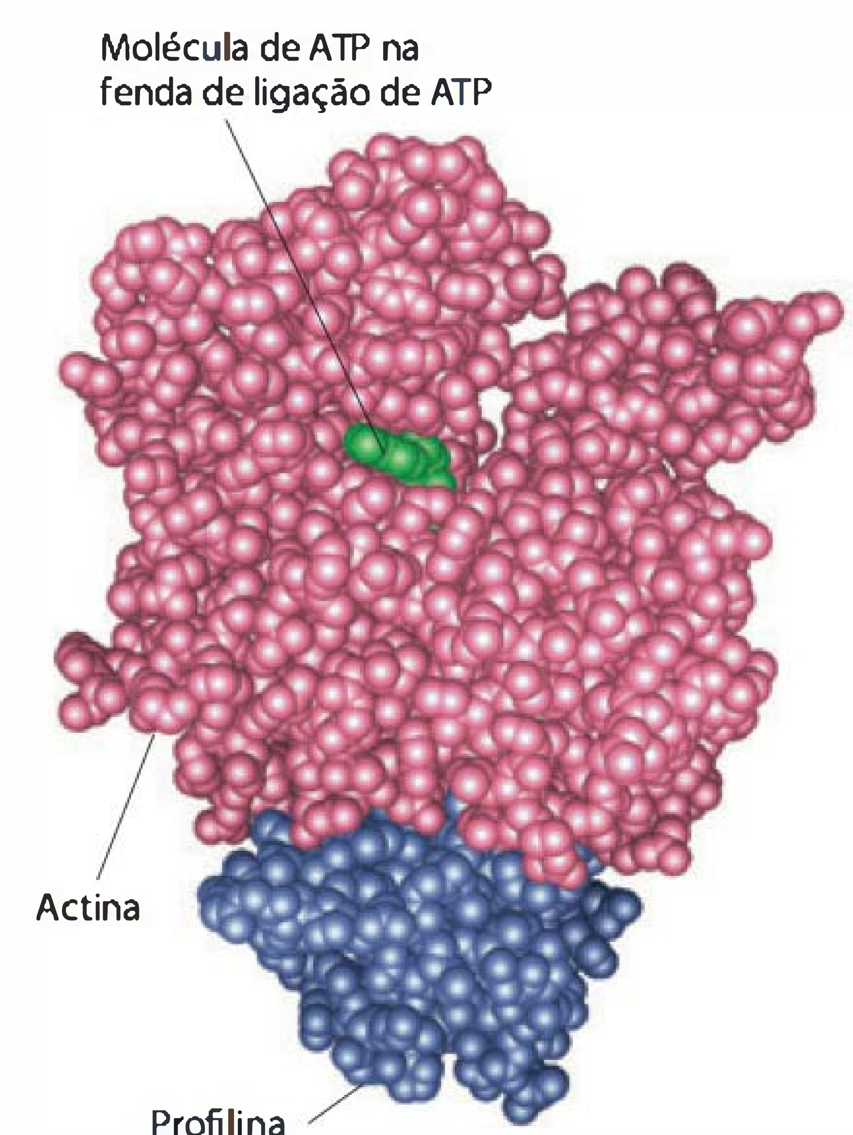


Figura 16-37 Profilina ligada a um monômero de actina. A molécula da proteína profilina está representada em *azul*, e a de actina, em *vermelho*. ATP é apresentado em *verde*. A profilina liga-se à face da actina oposta à fenda de ligação ao ATP. Este heterodímero profilina-actina pode a seguir ligar-se e promover o crescimento da extremidade mais (+) de um filamento de actina, mas é estericamente impedido de se ligar à extremidade menos (–). (Cortesia de Michael Rozycki e Clarence E. Schutt.)

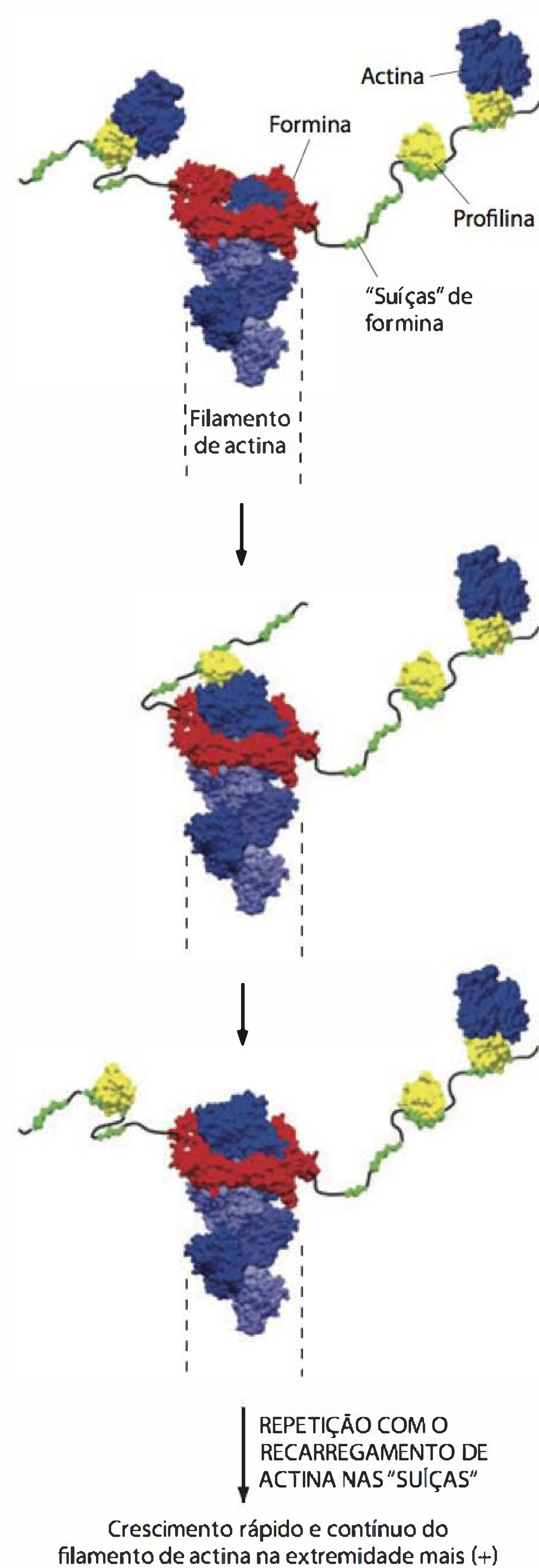


Figura 16-38 Profilina e forminas. Alguns membros da família de proteínas formina possuem domínios não-estruturados ou "suíças" que contêm diversos sítios de ligação à profilina ou ao complexo actina-profilina. Esses domínios flexíveis atuam como uma área de apoio para a adição de actina à extremidade mais (+) em crescimento do filamento de actina quando a formina está ligada. Sob condições determinadas, isto pode acelerar a taxa de extensão do filamento de actina de tal forma que o crescimento do filamento será mais rápido do que seria esperado em uma reação controlada por difusão, e mais rápido na presença de formina e profilina do que a taxa apresentada somente para a actina pura (ver também Figura 3-80C).

encontram. Neste ponto, sinais extracelulares podem ativar a profilina de modo a produzir polimerização localizada de actina a taxas enormes, provocando também a extensão de estruturas de locomoção ricas em actina como filopódios e lamelipódios (ver a seguir). Além da ligação à actina e a fosfolipídeos, a profilina também pode se ligar a várias outras proteínas intracelulares que apresentam domínios ricos em prolina; essas proteínas também podem auxiliar no direcionamento da profilina para regiões onde uma rápida polimerização de actina seja necessária.

Assim como ocorre com os monômeros de actina, subunidades de tubulina não-polimerizadas são sequestradas na célula para manter o conjunto de subunidades em um nível substancialmente mais alto do que a concentração crítica. Uma molécula da pequena proteína *estatmina* liga-se a dois heterodímeros de tubulina e evita que sejam adicionados às extremidades dos microtúbulos. Dessa forma, a estatmina reduz a concentração efetiva de subunidades de tubulina disponíveis para a polimerização (por ação análoga a da colchicina). Além disso, a estatmina aumenta a probabilidade de que um microtúbulo em crescimento sofra transição catastrófica para um estado de encurtamento. A fosforilação de estatmina inibe sua ligação à tubulina e, assim, sinais que causam a fosforilação de estatmina podem aumentar a taxa de alongamento de microtúbulos e suprimir a instabilidade dinâmica. Células tumorais frequentemente superexpressam estatmina. Acredita-se que a resultante taxa aumentada de *turnover* de microtúbulos contribua para as alterações típicas na morfologia celular que estão associadas à transformação maligna.

Proteínas de quebra regulam o comprimento e a cinética do comportamento de filamentos de actina e de microtúbulos

Em certas situações, uma célula poderá quebrar um filamento longo preexistente em diversos filamentos menores. Isso dará origem a um grande número de novas extremidades de filamento: ou, em outras palavras, um longo filamento contendo apenas uma extremidade mais (+) e uma extremidade menos (−) pode ser quebrado em dúzias de filamentos curtos, cada um possuindo suas próprias extremidades mais e menos. Sob condições intracelulares determinadas, estas extremidades recém-formadas nuclearão o crescimento dos filamentos, e, nesses casos, a quebra resultará em aceleração da montagem de novas estruturas de filamentos. Sob outras condições, a quebra promoverá a despolimerização de filamentos antigos, acelerando a taxa de despolimerização em um fator de 10 ou mais. Além disso, a quebra de filamentos altera as propriedades mecânicas e físicas do citoplasma: grandes feixes e redes rijas tornam-se mais fluidos quando ocorre quebra de filamentos.

Para partir um microtúbulo, 13 ligações longitudinais devem ser quebradas, uma relativa a cada um dos protofilamentos. A proteína *catanina*, assim denominada a partir da palavra japonesa para "espada", consegue realizar esta tarefa (**Figura 16-39**). A catanina é constituída por duas subunidades, uma subunidade menor, que hidrolisa ATP e desempenha ativamente a tarefa de quebra, e uma subunidade maior, que direciona a catanina para o centrossomo. A catanina solta os microtúbulos de sua ligação ao centro de organização de microtúbulos, tendo sido sugerido que ela desempenha um papel particularmente importante na rápida despolimerização de microtúbulos observada nos polos do fuso durante a mitose e a meiose. Ela também pode estar envolvida na liberação e na despolimerização de microtúbulos que ocorrem na interfase de células em proliferação e em células pós-mitóticas como os neurônios.

Em contraste ao processo de quebra de microtúbulos pela catanina, que necessita de ATP, a quebra de filamentos de actina não requer um aporte extra de energia. Das proteínas envolvidas na quebra de actina, a maioria faz parte da *superfamília gelsolina*, cuja ação de quebra é ativada por altos níveis de Ca^{2+} citosólico. A gelsolina possui subdomínios que se ligam a dois diferentes sítios sobre a subunidade de actina, um exposto na superfície do filamento e um que se encontra, normalmente, escondido na ligação longitudinal com a subunidade adjacente do protofilamento. De acordo com um modelo proposto para a ação da gelsolina, esta se liga à lateral do filamento de actina e espera até que flutuações de temperatura provoquem a formação de uma pequena abertura entre as subunidades adjacentes do protofilamento; nesse momento, a gelsolina introduz seu subdomínio na abertura, provocando a quebra do filamento.

Proteínas que se ligam lateralmente aos filamentos podem tanto estabilizá-los quanto desestabilizá-los

Quando um filamento do citoesqueleto é formado por nucleação e seu crescimento é mediado pela adição de subunidades, diferentes proteínas que se ligam às laterais do polímero alteram sua estabilidade e propriedades mecânicas. Diferentes proteínas associadas aos filamentos usam a sua energia de ligação para diminuir ou para aumentar a energia livre do polímero e, assim, respectivamente, estabilizar ou desestabilizar o polímero.

Proteínas que se ligam lateralmente aos microtúbulos são coletivamente chamadas de **proteínas de associação a microtúbulos** (**MAPs**, *microtubule-associated proteins*). Assim como o taxol, as MAPs podem estabilizar os microtúbulos, prevenindo sua dissociação. Um subgrupo de MAPs também pode mediar a interação de microtúbulos com outros componentes celulares. Este subgrupo é bastante presente em neurônios, onde feixes de microtúbulos estabilizados formam o centro de axônios e dendritos que se estendem a partir do corpo celular (**Figura 16-40**). Essas MAPs apresentam pelo menos um domínio de ligação à superfície do microtúbulo e outro que se projeta a partir do microtúbulo. O comprimento do domínio que se projeta pode determinar a distância de empacotamento de microtúbulos associados por MAP, como demonstrado em células que foram modificadas para a superprodução de diferentes MAPs. Células que superexpressam *MAP2*, a qual apresenta longos domínios projetados, formam feixes de microtúbulos estáveis com um amplo espaçamento, ao passo que células que superexpressam *tau*, uma MAP que apresenta domínios de projeção curtos, formam feixes de microtúbulos empacotados de forma muito mais compacta (**Figura 16-41**). A ligação de tau aos filamentos também pode regular o transporte de organelas delimitadas por membrana direcionado por motores moleculares, processo discutido posteriormente.

As MAPs são alvo de diversas proteína-cinases, e a desfosforilação de uma MAP pode desempenhar um papel primordial no controle tanto de sua atividade quanto de sua localização dentro das células. Dentre as importantes proteína-cinases que podem regular as MAPs encontram-se aquelas que são ligadas e desligadas conforme a célula progride pelo ciclo celular (discutido no Capítulo 17). Em especial, a atividade de MAP regula as alterações na dinâmica de microtúbulos que ocorrem conforme a célula reorganiza seu citoesqueleto de microtúbulos para a formação do fuso mitótico em preparação ao processo de segregação cromossômica (ver Figura 16-2).

Além de ligar-se às laterais dos microtúbulos, a proteína tau é capaz de formar seus próprios filamentos helicoidais quando presente em concentrações suficientemente altas. O citoplasma de células neuronais no cérebro de pessoas com a doença de Alzheimer contém grandes agregados de filamentos de tau, denominados emaranhados (ou novelos) neurofibrilares. Ainda não foi esclarecido se esses agregados de tau são uma causa ou uma consequência da neurodegeneração associada a essa doença.

Filamentos de actina também são bastante afetados pela ligação de proteínas acessórias a suas laterais. Filamentos de actina específicos são, na maioria das células, estabilizados pela ligação com *tropomiosina*, uma proteína longa que se liga simultaneamente a sete subunidades de actina adjacentes em um protofilamento. A ligação da tropomiosina ao filamento de actina pode evitar a interação deste filamento com outras proteínas; desse modo, a regulação da ligação com a tropomiosina é uma etapa importante na contração muscular, como será discutido a seguir (ver Figura 16-78).

Outra importante proteína de ligação a filamentos de actina presente em todas as células eucarióticas é a *cofilina*, a qual desestabiliza os filamentos de actina. Também conhecida como *fator de despolimerização de actina*, a cofilina é incomum pelo fato de ligar-se a ambas as formas de actina, ou seja, tanto ao filamento como à subunidade livre. A cofilina liga-se sobre o filamento de actina, forçando uma torção um pouco mais compacta do filamento (**Figura 16-42**). Esse estresse mecânico enfraquece os contatos entre as subunidades de actina do filamento, tornando-o quebradiço e mais facilmente afetado por oscilações térmicas.

Além disso, a cofilina faz com que seja mais fácil a dissociação de uma subunidade de ADP-actina da extremidade menos (–) do filamento. Essas atividades aceleram substancialmente a dissociação do filamento de actina. Como resultado, a maioria dos filamentos de

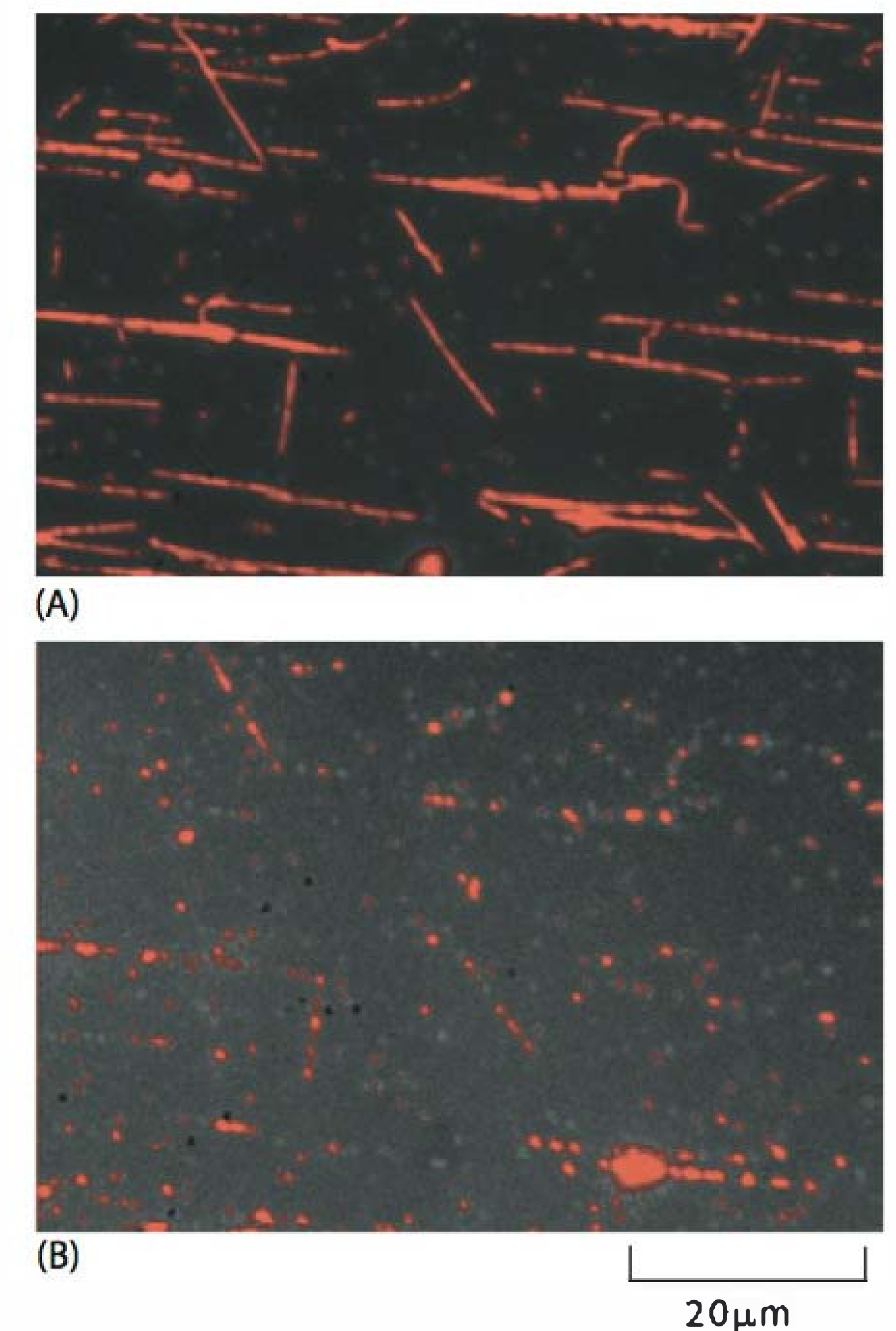


Figura 16-39 Quebra de microtúbulos por catanina. Os microtúbulos corados com rodamina e estabilizados por taxol foram adsorvidos na superfície de uma lâmina de vidro, e catanina purificada foi adicionada junto ao ATP. (A) Após 30 segundos da adição de catanina podem ser observadas umas poucas quebras nos microtúbulos. (B) O mesmo campo, três minutos após a adição de catanina. Os filamentos foram quebrados em vários pedaços, deixando uma série de pequenos fragmentos onde antes havia longos microtúbulos. (De J. J. Hartman et al., *Cell* 93:277-287, 1998. Com permissão de Elsevier.)



Figura 16-40 Localização de MAPs no axônio e em dendritos de um neurônio. Esta microfotografia de imunofluorescência mostra a distribuição de tau (corada em *verde*) e de MAP2 (corada em *laranja*) em um neurônio do hipocampo em cultura. A coloração de tau está restrita ao axônio (longo e ramificado neste neurônio), ao passo que a coloração de MAP2 está confinada ao corpo celular e de seus dendritos. O anticorpo usado para a detecção de tau liga-se unicamente à tau não-fosforilada; a tau fosforilada também está presente nos dendritos. (Cortesia de James W. Mandell e Gary A. Banker.)

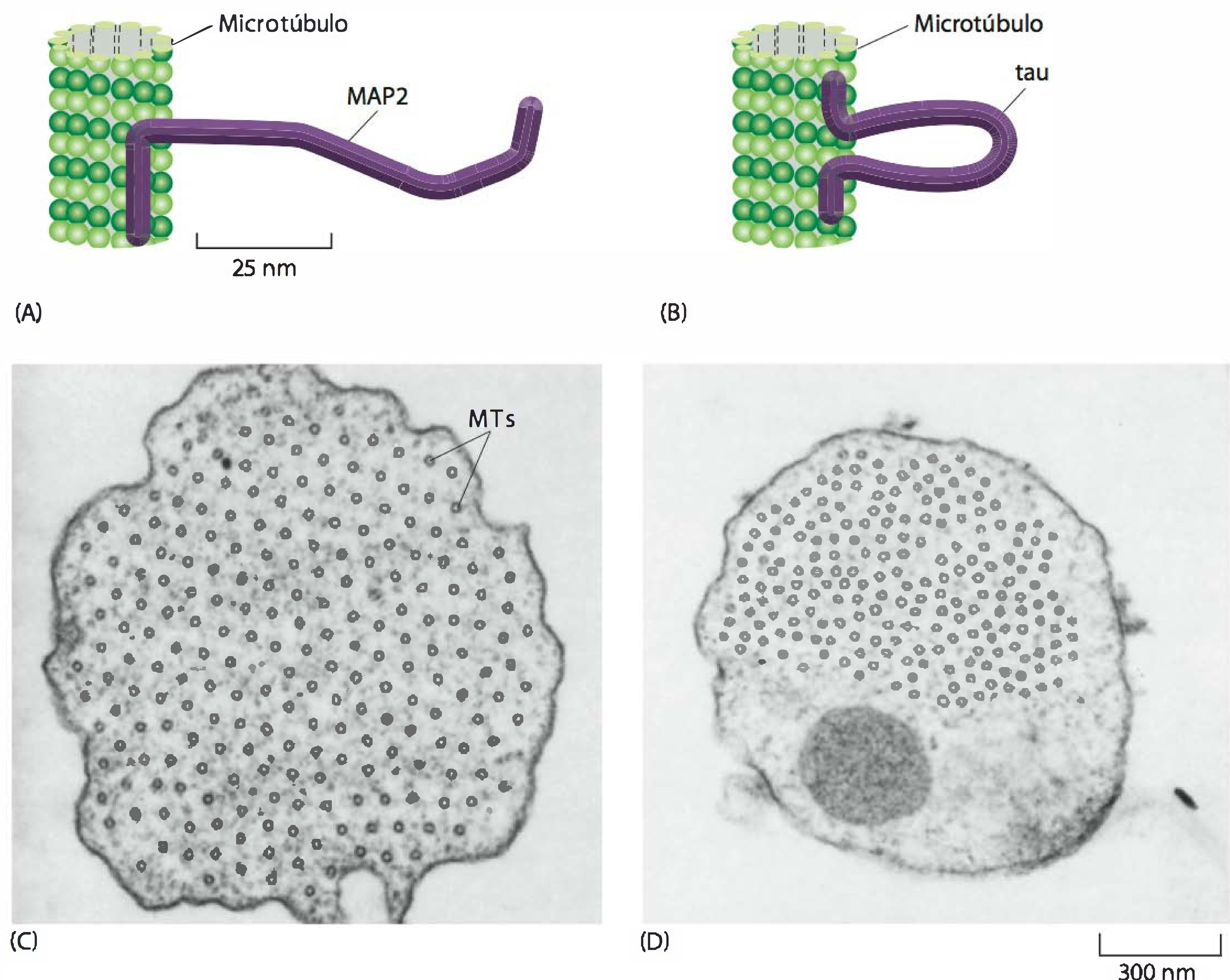


Figura 16-41 Organização dos feixes de microtúbulos pelas MAPs. (A) MAP2 liga-se à lateral do microtúbulo por uma de suas extremidades e estende um braço sob forma de uma longa projeção, contendo um segundo domínio de ligação ao microtúbulo em sua outra extremidade. (B) Tau liga-se à lateral do microtúbulo usando tanto sua extremidade N-terminal quanto sua extremidade C-terminal, formando uma pequena projeção em alça. (C) Microfotografia eletrônica mostrando uma secção transversal de um feixe de microtúbulos em uma célula com superexpressão de MAP2. O espaçamento regular dos microtúbulos (MTs) neste feixe é consequência do comprimento constante dos braços da MAP2. (D) Secção transversal similar de um feixe de microtúbulos de uma célula superexpressando tau. Neste caso, o espaçamento dos microtúbulos é menor e eles encontram-se mais próximos do que em (C), pois tau apresenta um braço relativamente menor. (C e D, cortesia de V. Chen et al., *Nature* 360:674-647, 1992. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

actina no interior das células tem uma vida média muito menor do que a dos filamentos formados a partir de actina pura em um experimento *in vitro*. Os filamentos de actina podem ser protegidos da ação da cofilina por ligação à tropomiosina.

A cofilina liga-se preferencialmente a filamentos de actina contendo ADP, em detrimento a filamentos de actina contendo ATP. Visto que a hidrólise de ATP em geral é mais lenta do que a associação do filamento, os filamentos mais recentes de actina da célula, em sua maioria, ainda contêm ATP e são resistentes à despolimerização por cofilina. Desse modo, a cofilina eficientemente desmancha os filamentos mais velhos da célula, garantindo uma substituição rápida de todos os filamentos de actina. Como discutiremos mais tarde, a dissociação de filamentos antigos de actina, mas não de filamentos mais recentes, mediada pela cofilina, é essencial ao crescimento direcionado e polarizado da rede de actina responsável pelo deslizamento unidirecional das células.

Proteínas que interagem com as extremidades dos filamentos podem modificar drasticamente sua dinâmica

Como vimos há pouco, proteínas que se ligam à lateral de um filamento podem provocar modificações no comportamento dinâmico desse filamento. Em vistas de um efeito máximo, no entanto, essas proteínas frequentemente necessitam recobrir completamente o filamento, e isso significa que elas devem apresentar relações estequiométricas bastante altas (p. ex., aproximadamente uma tropomiosina para cada sete subunidades de actina, uma tau para cada quatro subunidades de tubulina ou uma cofilina para cada subunidade de actina). Em contraste, proteínas que se ligam preferencialmente às extremidades dos filamentos podem

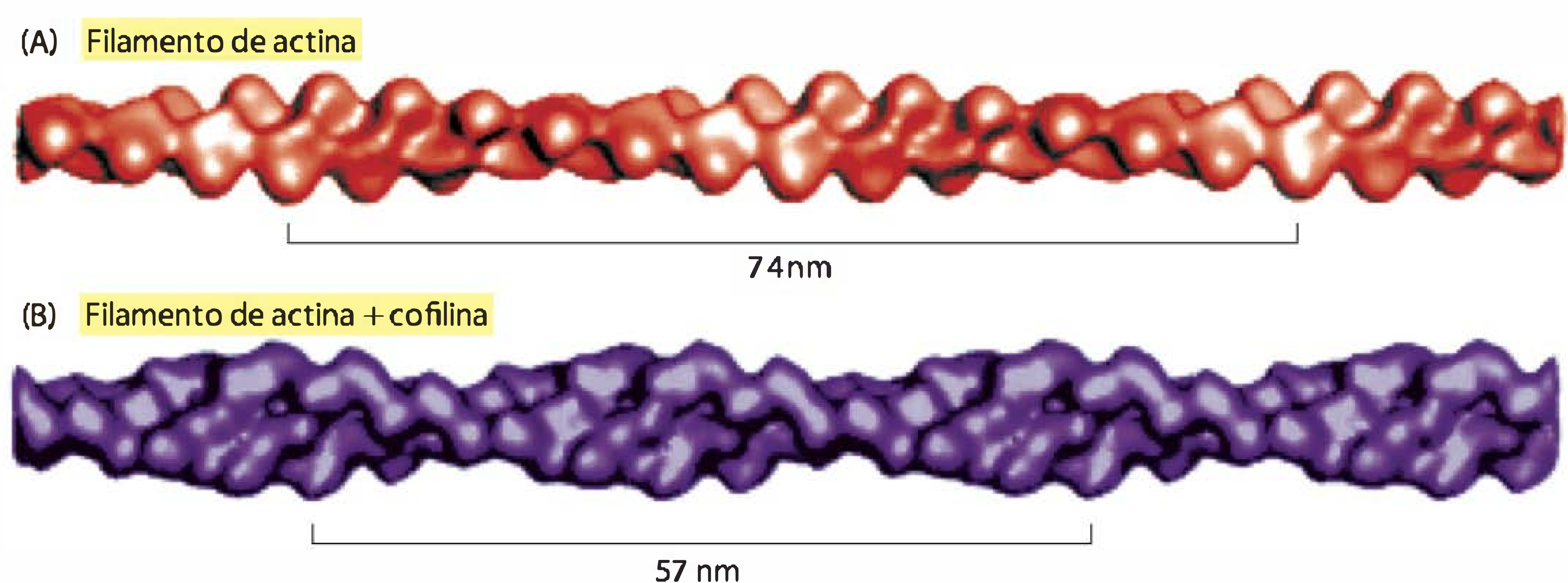


Figura 16-42 Enrolamento de um filamento de actina induzido pela cofilina. (A) Reconstrução tridimensional de crioeletromicrofotografias de filamentos produzidos a partir de actina pura. Os colchetes mostram a extensão de dois giros da hélice de actina. (B) Reconstrução de um filamento de actina recoberto por cofilina, a qual se liga em uma proporção estequiométrica de 1:1 às subunidades de actina ao longo do filamento. A cofilina é uma proteína pequena (14 quilodáltons) comparada à actina (43 quilodáltons), e deste modo o filamento apresenta-se apenas levemente mais espesso. A energia de ligação da cofilina atua na deformação do arranjo do filamento de actina, enrolando-o mais fortemente e reduzindo a distância ocupada por uma volta da hélice. (De A. McGough et al., *J. Cell Biol.* 138:771-781, 1997. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

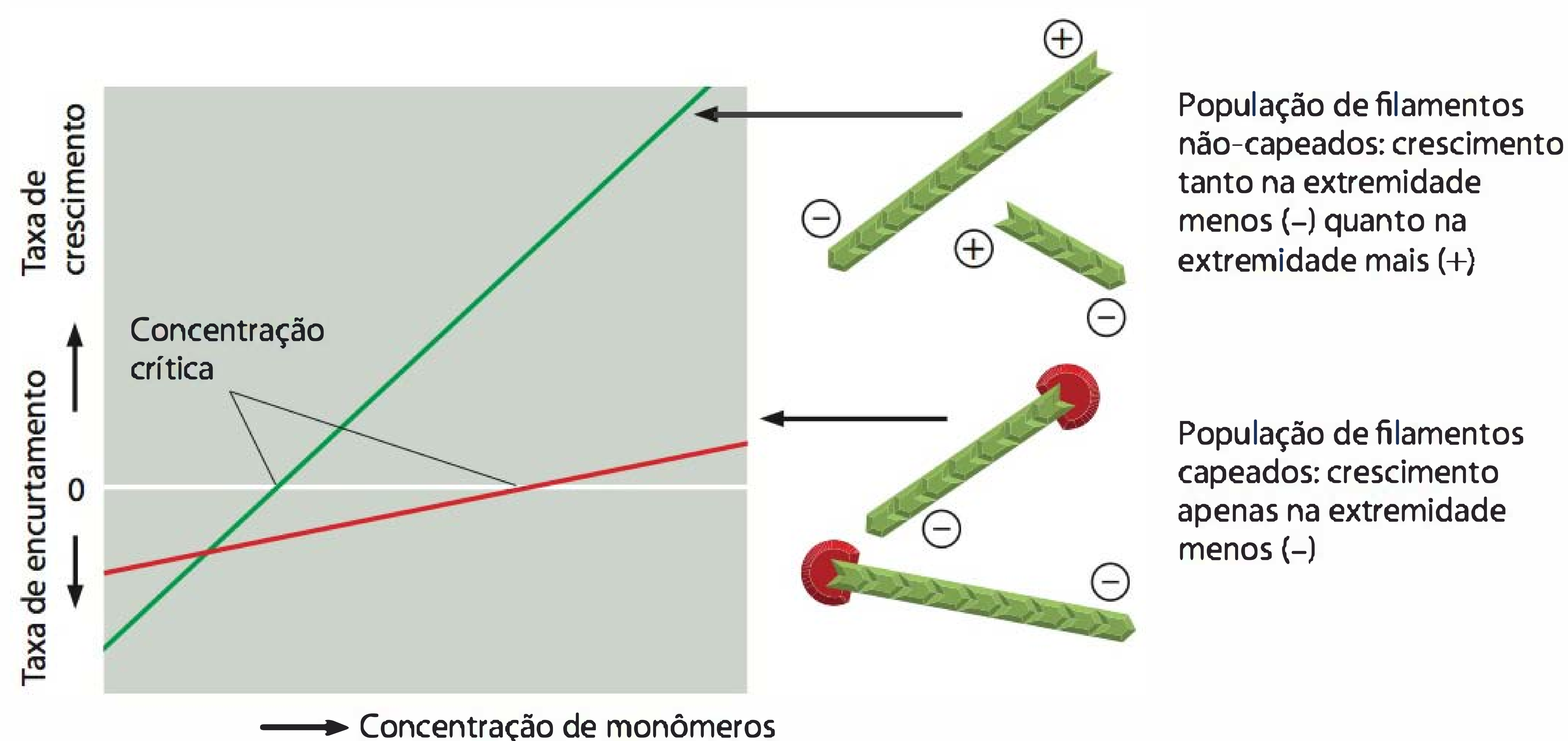


Figura 16-43 Capeamento e seu efeito na dinâmica dos filamentos. Uma população de filamentos que não sofreu capeamento adiciona e perde subunidades tanto na extremidade mais (+) quanto na extremidade menos (–), o que resulta em rápido crescimento ou encurtamento, dependendo da concentração disponível de monômeros livres (linha *verde*). Na presença de uma proteína que provoca capeamento na extremidade mais (+) (linha *vermelha*), apenas a extremidade menos (–) mantém a capacidade de adicionar ou perder subunidades; consequentemente, o crescimento do filamento será mais lento em todas as concentrações acima da concentração crítica, e o encurtamento do filamento será mais lento em todas as concentrações abaixo da concentração crítica. Além disso, a concentração crítica para a população se altera para aquela referente à extremidade menos (–) do filamento.

produzir efeitos dramáticos na dinâmica dos filamentos mesmo quando presentes em níveis bastante baixos. Tendo em vista que a adição e a perda de subunidades ocorrem principalmente nas extremidades dos filamentos, uma molécula desse tipo de proteína por filamento de actina (tipicamente uma a cada 200 a 500 monômeros de actina) pode ser suficiente para transformar a arquitetura de uma rede de filamentos de actina.

Como discutido anteriormente, um filamento de actina que cessa seu crescimento e não é especificamente estabilizado pela célula pode sofrer rápida despolimerização: ele pode perder subunidades tanto em sua extremidade mais (+) quanto em sua extremidade menos (–), uma vez que as moléculas de actina desta extremidade hidrolisem seu ATP para converter para a forma D. No entanto, as modificações mais rápidas ocorrem na extremidade mais (+). Um filamento de actina pode ter sua extremidade mais (+) estabilizada por ligação com uma *proteína de capeamento*, a qual reduz bastante tanto a taxa de crescimento quanto a taxa de despolimerização do filamento, pela inativação desta extremidade (**Figura 16-43**). De fato, a maior parte dos filamentos de actina em uma célula apresenta a extremidade mais (+) capeada por proteínas como a *CapZ* (assim denominada devido à sua localização na banda Z muscular, ver a seguir; ela também é conhecida como proteína de capeamento). Um filamento de actina pode sofrer capeamento em sua extremidade menos (–) pela manutenção da ligação ao complexo ARP, inicialmente responsável pela sua nucleação. No entanto, estima-se que a maioria das extremidades menos de actina de células típicas tenham sido liberadas do complexo ARP e não estejam capeadas.

Em células musculares, onde os filamentos de actina têm uma meia-vida extremamente longa, estes se apresentam capeados de forma especial em ambas as extremidades – pela CapZ na extremidade mais (+) e pela *tropomodulina* na extremidade menos (–). A tropomodulina liga-se apenas à extremidade menos (–) de filamentos de actina que tenham sido recobertos por tropomiosina e que já tenham, dessa forma, sofrido um certo processo de estabilização.

Diferentes tipos de proteínas alteram as propriedades das extremidades de microtúbulos em rápido crescimento

A extremidade de um microtúbulo, contendo treze protofilamentos em um anel oco (ver Figura 16-11), é uma estrutura muito maior e mais complexa do que a extremidade de um filamento de actina, com possibilidades bem maiores de ação para proteínas acessórias. Apresentamos anteriormente um importante capeador de microtúbulo: o complexo em anel de γ-tubulina (γ-TuRC), que tanto pode provocar a nucleação do crescimento de microtúbulos em um centro organizador quanto provocar o capeamento de suas extremidades menos. Outra proteína verdadeiramente capeadora de microtúbulos é um complexo proteico especial encontrado nas extremidades de microtúbulos em cílios (estrutura discutida mais tarde), um local onde microtúbulos são tanto estáveis quanto uniformes em comprimento.

Algumas proteínas que atuam nas extremidades de microtúbulos desempenham papéis essenciais muito além daquele esperado para uma simples proteína de capeamento. Em particular, algumas proteínas podem ter efeitos dramáticos sobre a instabilidade dinâmica dos microtúbulos (ver Figura 16-16). Estas proteínas podem influenciar a taxa na qual um microtúbulo muda de crescimento para um estado de encurtamento (a frequência de catástrofes) ou a taxa de mudança de um estado de encurtamento para um estado de crescimento (a frequência de resgates). Por exemplo, membros de uma família de proteínas relacionadas à cinesina, conhecidos como *fatores de catástrofe*, aumentam significativamente a frequência

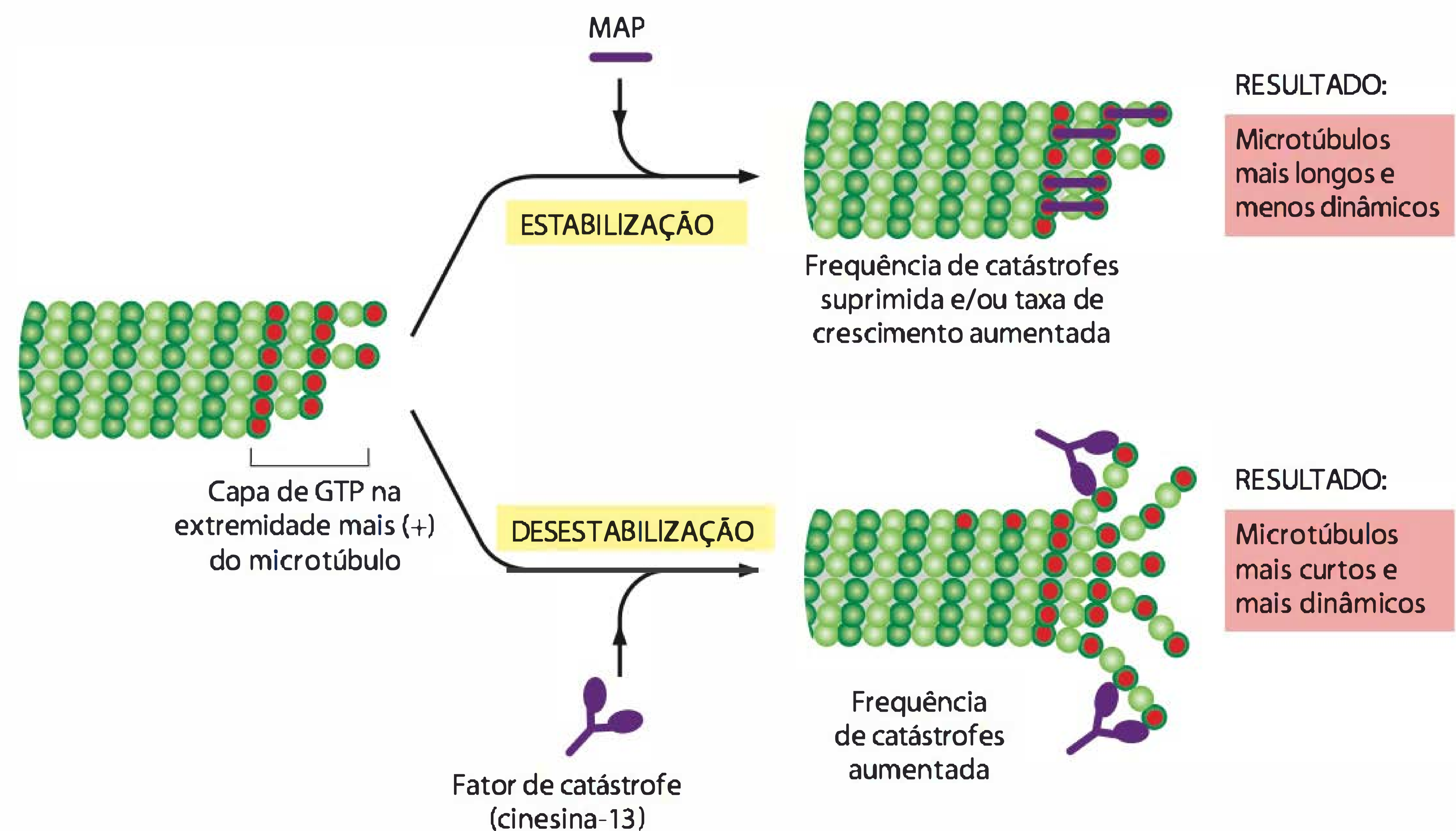


Figura 16-44 Efeitos das proteínas que se ligam às extremidades de microtúbulos. A transição entre os estados de crescimento e de encurtamento de um microtúbulo é controlada, nas células, por proteínas especializadas. Uma MAP como a XMAP215 estabiliza a extremidade de um microtúbulo em crescimento por ligação preferencial a esta. De ação oposta são os fatores de catástrofe, como a cinesina-13, membro da superfamília das proteínas motoras cinesina (discutida mais tarde).

de catástrofes (essas proteínas são membros da família da cinesina-13; ver Figura 16-58). Eles se ligam especificamente às extremidades de microtúbulos e aparentemente separam os protofilamentos por redução na barreira de energia de ativação normal, a qual evitaria que um microtúbulo se dissociasse apresentando a conformação de protofilamentos curvados típica do estado de encurtamento (ver Figura 16-16C). Com atuação oposta, existem as MAPs, como a ubíqua *XMAP215* que tem homólogos bastante similares em organismos tão diversos quanto leveduras e humanos (a sigla XMAP deriva de proteína de associação com microtúbulos de *Xenopus*, e o número refere-se à sua massa molecular em quilodáltons). Essa proteína possui capacidade especial de estabilizar as extremidades livres de microtúbulos e inibe seu encurtamento evitando a transição de um estado de crescimento para um estado de encurtamento. A fosforilação de XMAP215 durante a mitose inibe sua atividade e direciona o balanço de sua competição com fatores de catástrofe (**Figura 16-44**). Esse direcionamento leva ao aumento de até dez vezes na instabilidade dinâmica de microtúbulos observado durante a mitose, uma transição que é essencial para a construção eficiente do fuso mitótico (ver Figura 17-33).

Em muitas células, as extremidades menos dos microtúbulos estão estabilizadas pela associação com o centrossomo; em outros locais, estas extremidades serviriam como regiões de despolimerização de microtúbulos. As extremidades mais, ao contrário, eficientemente sondam e exploram o espaço celular por completo. Proteínas associadas a microtúbulos denominadas proteínas de busca de extremidades mais (*+TIPs, plus-end trackingproteins*) acumulam-se nessas extremidades e parecem ser rapidamente transportadas através da célula sob a forma de passageiros sobre as extremidades de microtúbulos em rápido crescimento, dissociando-se delas assim que o microtúbulo comece a sofrer encurtamento (**Figura 16-45**).

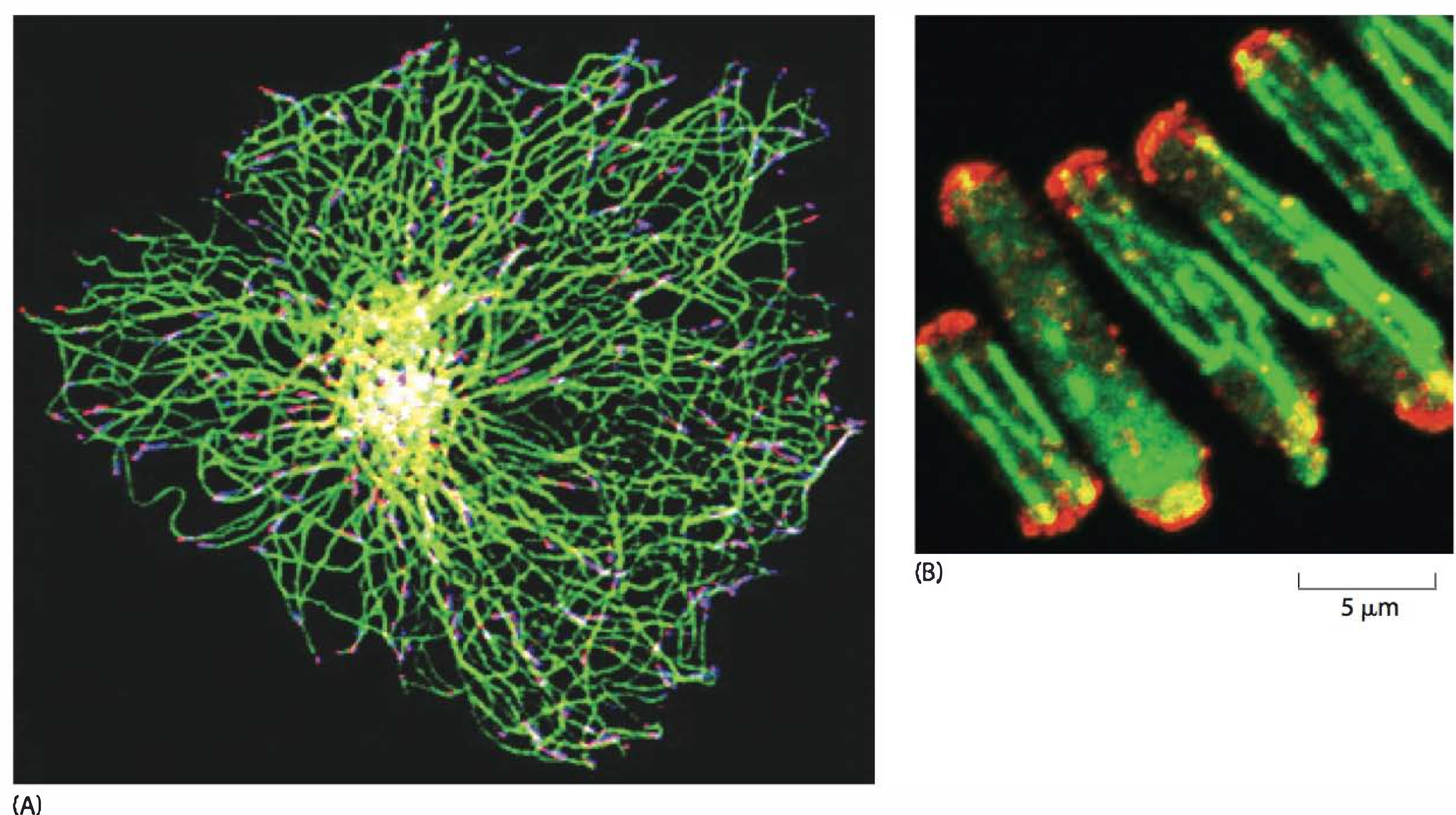


Figura 16-45 Proteínas +TIP encontradas nas extremidades mais (+) dos microtúbulos em crescimento. (A) Em uma célula epitelial em crescimento, em cultura, cada microtúbulo (em *verde*) possui uma extremidade mais (+) em crescimento a qual está associada à proteína +TIP EB1 (em *vermelho*). (B) No fungo de fissão em bastonete *Schizosaccharomyces pombe*, as extremidades mais (+) dos microtúbulos (em *verde*) estão associadas com um homólogo de EB1 (em *vermelho*), em ambos os polos das células em bastão. (A, de A. Akhmanova e C. C. Hoogenraad, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:47-54, 2005. Com permissão de Elsevier; B, cortesia de Ken Sawin.)

Algumas das +TIPs, como é o caso dos fatores de catástrofe relacionados à cinesina e da XMAP215 mencionada anteriormente, modulam o crescimento e o encurtamento da extremidade mais (+) do microtúbulo ao qual estão ligadas. Outras controlam o posicionamento do microtúbulo, pois auxiliam a captura e a estabilização da extremidade do microtúbulo em crescimento no local do córtex celular onde ocorrem proteínas-alvo específicas. EB1, uma +TIP presente tanto em leveduras quanto em humanos, por exemplo, é essencial ao posicionamento do fuso mitótico em leveduras, direcionando as extremidades mais em crescimento dos microtúbulos do fuso da levedura para uma região de atracagem específica no broto da levedura e, então, auxiliando em seu ancoramento.

Os filamentos estão organizados em estruturas complexas nas células

Até o momento descrevemos como as células usam as proteínas acessórias para regular o posicionamento e o comportamento dinâmico dos filamentos do citoesqueleto. Estas proteínas podem promover a nucleação da montagem de filamentos, podem ligar-se às extremidades ou regiões laterais dos filamentos, ou podem ligar-se a subunidades livres destes filamentos. No entanto, para que os filamentos do citoesqueleto formem uma estrutura intracelular funcional que confira integridade mecânica à célula e determine sua forma, os filamentos individuais devem ser organizados e unidos em estruturas maiores. O centrossomo é um exemplo de organizador do citoesqueleto; além de promover a nucleação do crescimento dos microtúbulos, ele os mantêm unidos sob uma geometria definida, onde todas as extremidades menos se encontram mergulhadas no centrossomo e as extremidades mais apontam para a periferia da célula. Desse modo, o centrossomo cria um arranjo em forma de estrela que é capaz de localizar o centro de cada célula (ver Figura 16-32).

Outro mecanismo que é usado para organizar os filamentos em grandes estruturas é a interligação de filamentos. Como descrito anteriormente, algumas MAPs podem organizar os microtúbulos em feixes: elas possuem dois domínios – um que se liga à lateral do microtúbulo (e, dessa forma, estabiliza o filamento) e outro que se projeta para conectar-se a outros microtúbulos também recobertos por MAP. No citoesqueleto de actina, as funções de estabilização e interligação estão separadas. A tropomiosina se liga às laterais dos filamentos de actina, mas não possui qualquer domínio de projeção. Como veremos em breve, a interligação de filamentos é mediada por um segundo grupo de proteínas de ligação com actina que desempenha apenas esta função específica. A interligação de filamentos intermediários é ainda diferente das anteriores; eles são organizados tanto pela autoassociação lateral entre os próprios filamentos quanto pela atividade de interligação mediada por proteínas acessórias, como descrito a seguir.

Filamentos intermediários são interligados sob a forma de fortes arranjos em feixes

Cada filamento intermediário individual se apresenta como um longo feixe de subunidades tetraméricas (ver Figura 16-19). A seguir, vários filamentos intermediários agregam por autoassociação; por exemplo, as proteínas de neurofilamento NF-M e NF-H (ver Tabela 16-1, p. 985) contêm um domínio C-terminal que se estende a partir da superfície de um arranjo organizado de filamentos intermediários e se liga ao filamento adjacente. Assim, grupos de neurofilamentos formam fortes arranjos paralelos que são mantidos em união por múltiplos contatos laterais, fornecendo resistência e estabilidade aos longos processos celulares dos neurônios (ver Figura 16-22).

Outros tipos de feixes de filamentos intermediários são mantidos unidos por proteínas acessórias como a *filagrina*, a qual forma feixes de filamentos de queratina em células epidérmicas em diferenciação e que serão responsáveis pela resistência característica das camadas mais externas da pele. Uma proteína de interligação que apresenta um interesse especial é a *plectina*. Além de promover a formação de feixes de filamentos intermediários, a plectina também interliga os filamentos intermediários a microtúbulos, a feixes de filamentos de actina e a filamentos da proteína motora miosina II (que será discutida mais adiante), além de auxiliar a ligação de feixes de filamentos intermediários a estruturas de adesão na membrana plasmática (**Figura 16-46**).

Mutações no gene da plectina são responsáveis por uma doença devastadora em humanos que combina epidermólise bulbosa (causada pela disrupção de filamentos de queratina da pele), distrofia muscular (causada pela disrupção de filamentos de desmina) e neurodegeneração (causada pela disrupção de neurofilamentos). Camundongos que não apresentam gene de plectina funcional morrem poucos dias após o nascimento, apresentando

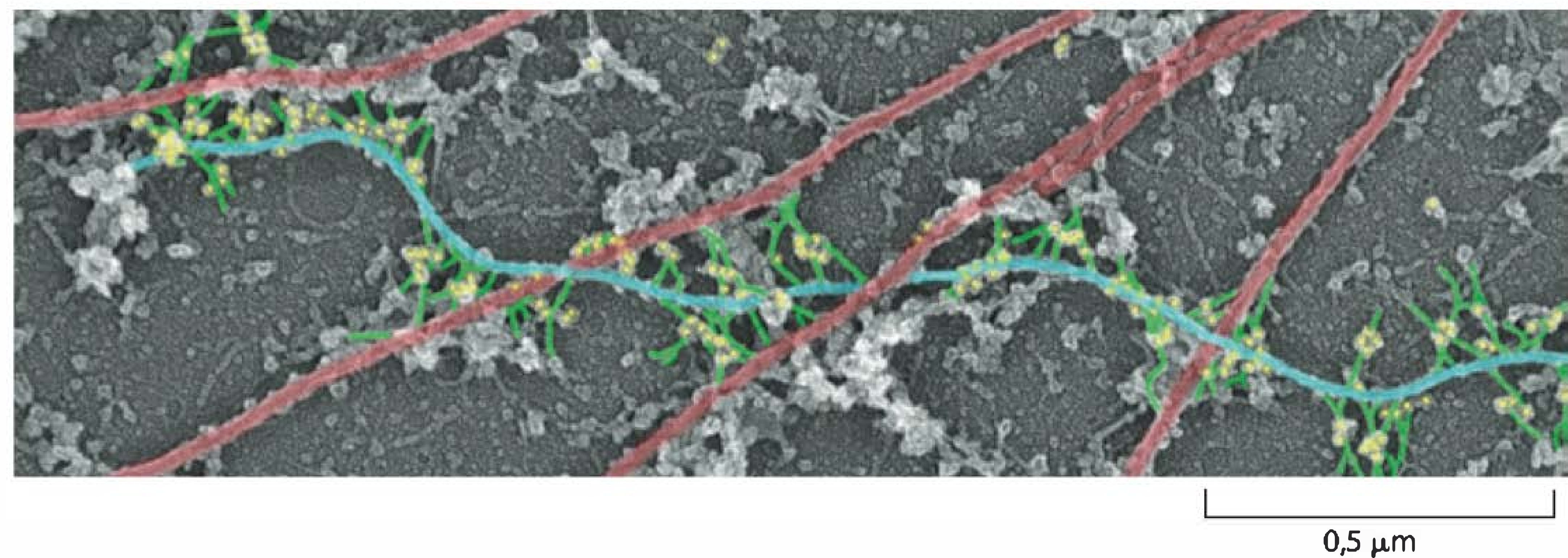


Figura 16-46 Interligação de diversos elementos do citoesqueleto pela plectina. A plectina (em *verde*) faz ligações dos filamentos intermediários (em *azul*) com microtúbulos (em *vermelho*) e com grossos filamentos de miosina. Nesta microfotografia eletrônica, os pontos (em *amarelo*) são partículas de ouro ligadas a anticorpos antiplectina. Toda a rede de filamentos de actina foi removida para a revelação destas proteínas. (De T. M. Svitkina e G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* 135:991-1007,1996. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

bolhas na pele e anomalias esqueléticas e na musculatura cardíaca. Desse modo, apesar de a plectina poder ser dispensável durante a formação inicial e a montagem dos filamentos intermediários, sua ação de interligação é necessária para dar à célula a resistência de que ela necessita para enfrentar o estresse mecânico inerente à vida de um vertebrado.

Proteínas de ligação cruzada (interligação) com diferentes propriedades organizam os diversos arranjos de filamentos de actina

Os filamentos de actina em células animais estão organizados em dois tipos de arranjos: feixes e redes ou teias (semelhante a uma estrutura em gel) (**Figura 16-47**). Como descrito anteriormente, estas diferentes estruturas são inicialmente formadas a partir da ação de proteínas de nucleação distintas: os longos e resistentes filamentos produzidos pelas forminas dão origem aos feixes, e o complexo ARP origina redes. As proteínas de interligação de filamentos de actina que auxiliam a estabilizar e manter essas duas estruturas distintas estão divididas em duas classes: as *proteínas de feixes* e as *proteínas formadoras de redes*. As proteínas de feixes interligam filamentos de actina em arranjos paralelos, ao passo que as proteínas formadoras de redes associam filamentos de actina em ângulos abertos, criando, dessa forma, tramas frouxas. Ambos os tipos de proteínas de interligação geralmente apresentam dois sítios similares de ligação com filamentos de actina, os quais podem integrar uma única cadeia polipeptídica ou podem ser o resultado da interação de duas cadeias de polipeptídeos mantidas unidas sob a forma de um dímero (**Figura 16-48**). O espaçamento e o arranjo desses dois domínios de ligação aos filamentos determina o tipo de estrutura de actina que será formado a partir de uma determinada proteína de interligação.

Cada tipo de proteína de feixe determina também que outras moléculas podem interagir com um filamento de actina. A miosina II (discutida mais adiante) é a proteína motora que permite a contração nas fibras de estresse e em outros arranjos contráteis. O empacotamento extremamente compacto dos filamentos de actina provocado pela pequena proteína de feixe

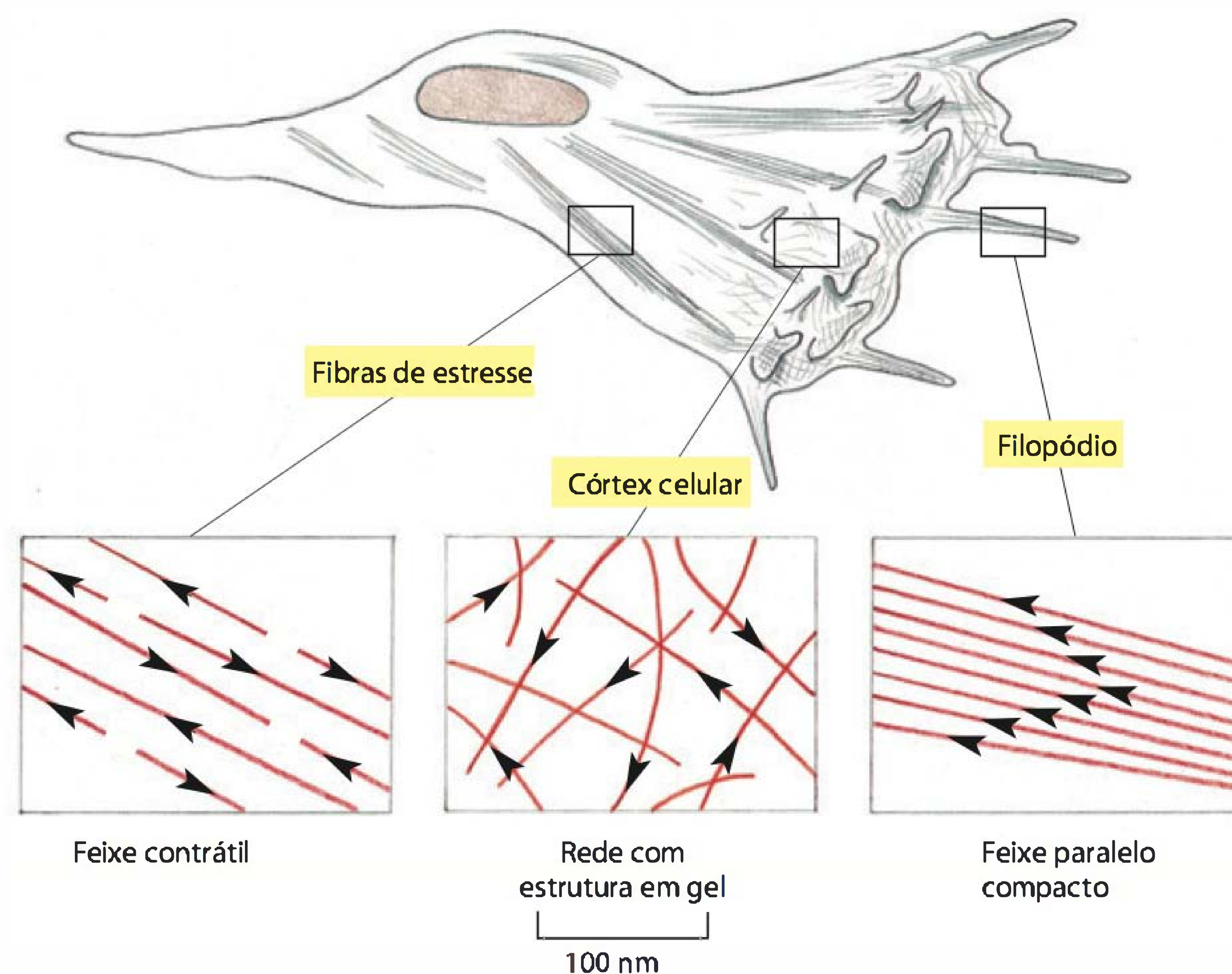


Figura 16-47 Arranjos de actina em uma célula. Um fibroblasto movendo-se sobre uma placa de cultura de tecidos é apresentado, destacando-se três áreas para mostrar os arranjos de filamentos de actina. Os filamentos de actina estão apresentados em *vermelho*, com flechas apontando em direção a suas extremidades menos. Fibras de estresse são contráteis e exercem tensão. Filopódios são projeções finas da membrana citoplasmática semelhantes a espículas e permitem que a célula explore seu ambiente. O córtex situa-se abaixo da membrana citoplasmática.

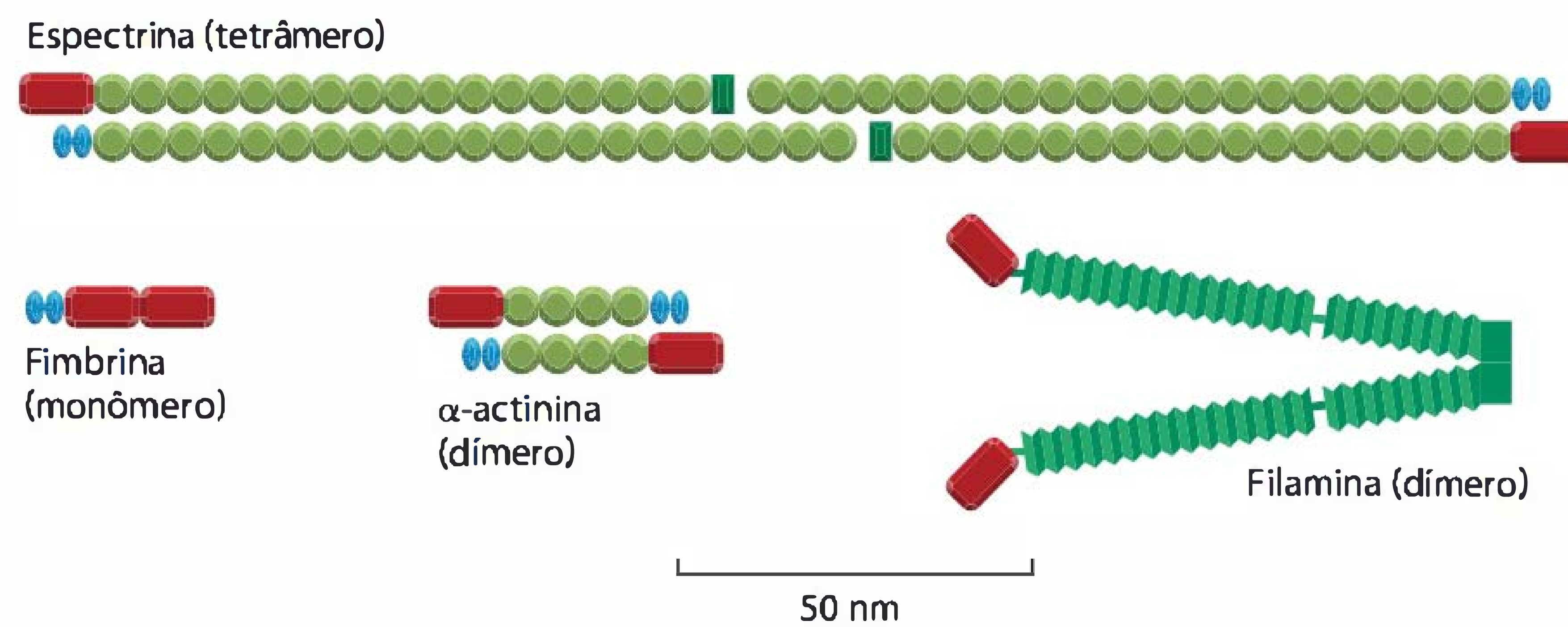
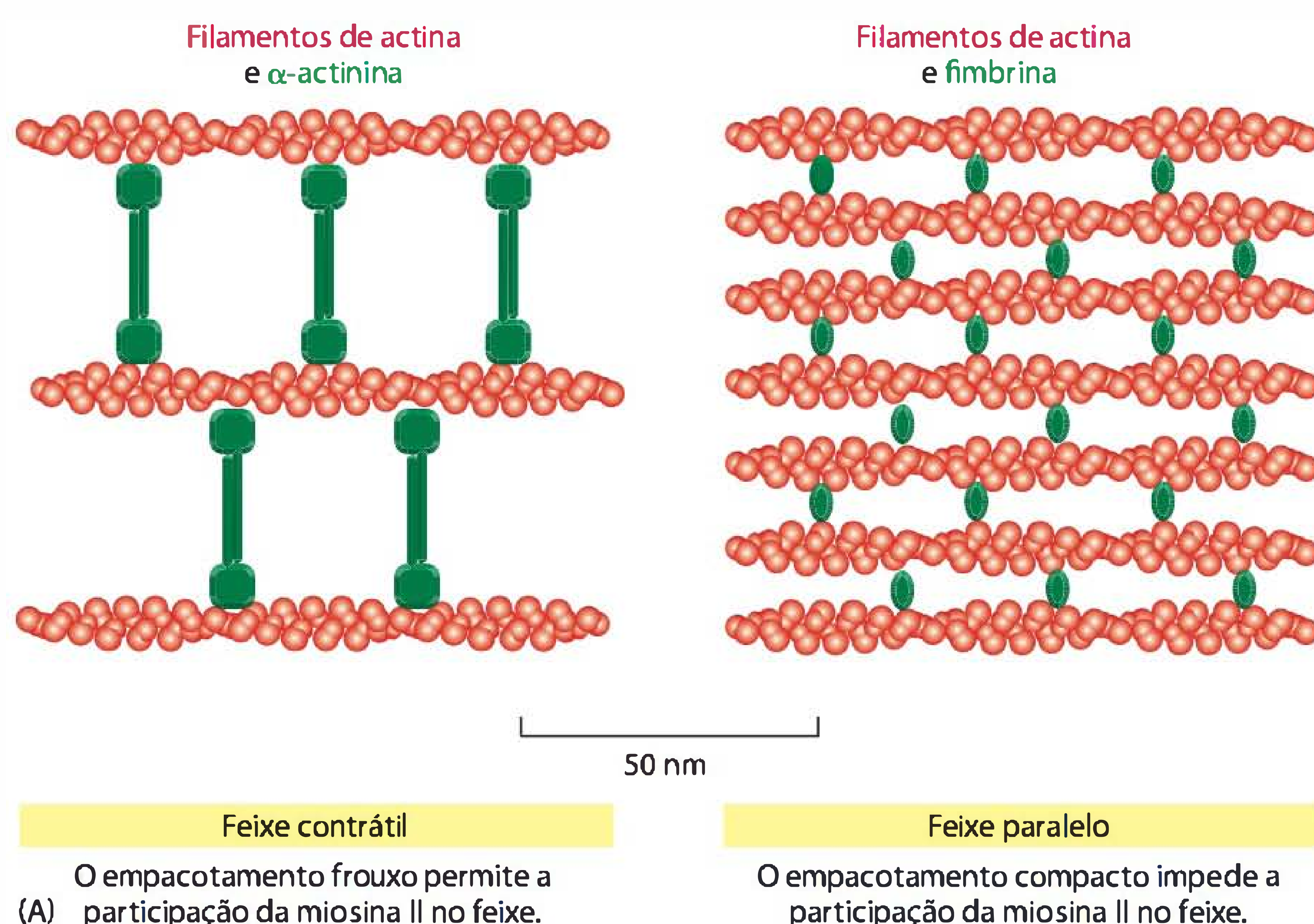


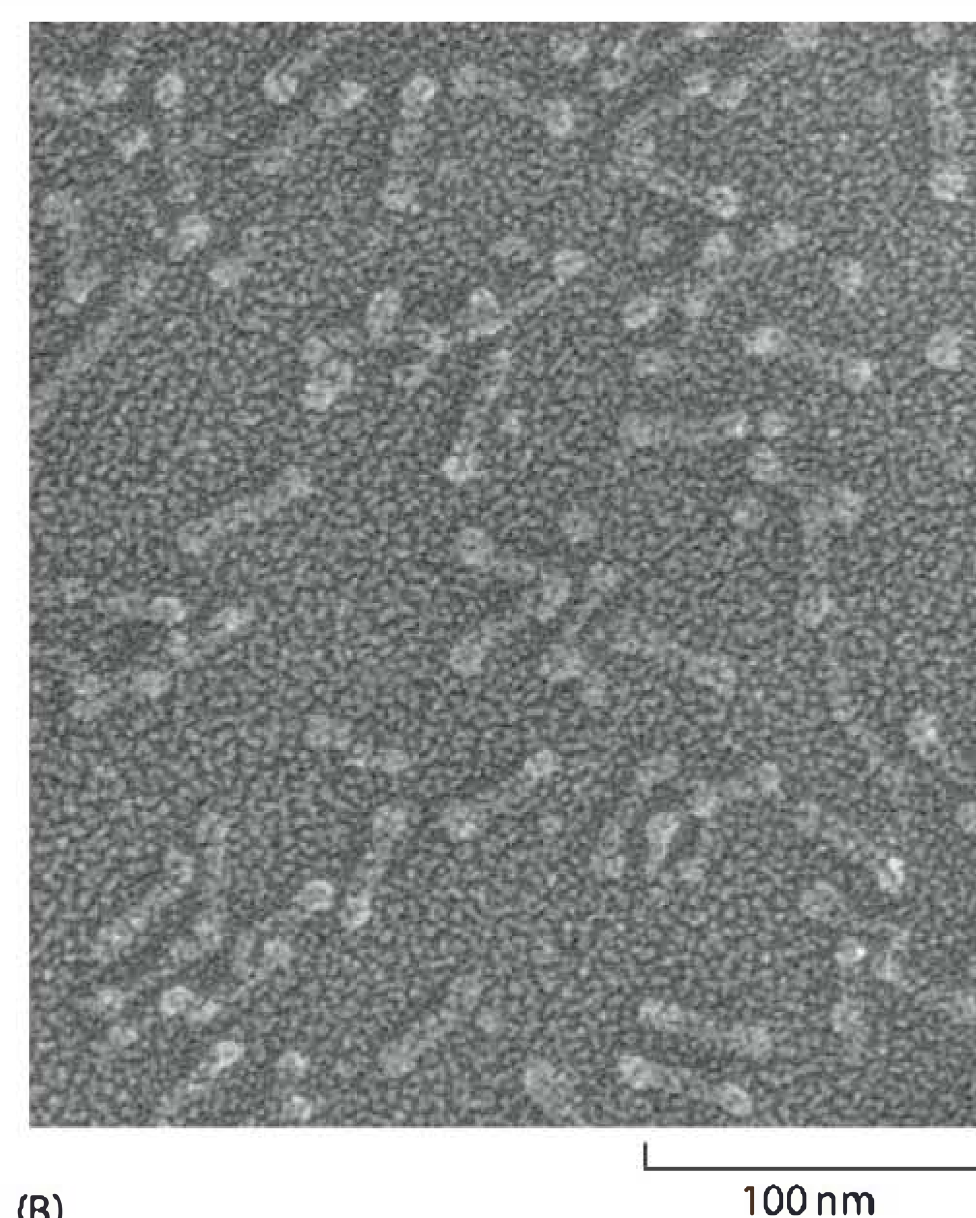
Figura 16-48 Estruturas em módulos de quatro proteínas de interligação com actina. Cada uma das proteínas apresentadas possui dois sítios de ligação com actina (em *vermelho*) com sequências similares. A fimbrina tem dois sítios de ligação com actina diretamente adjacentes, de tal forma que ela mantém seus dois filamentos de actina intimamente associados (distanciados em 14 nm) e alinhados com a mesma polaridade (ver Figura 16-49A). Os dois sítios de ligação com actina na α-actinina estão separados por um espaçador de aproximadamente 30 nm de comprimento, de tal forma que os feixes de actina formados serão menos compactos que os anteriores (ver Figura 16-49A). A filamina tem dois sítios de ligação com actina conectados por uma ligação em V, e, dessa maneira, os filamentos de actina interligados na rede estão orientados quase formando ângulos retos entre si (ver Figura 16-51). A espectrina é um tetrâmero de duas subunidades α e duas subunidades β e possui dois sítios de ligação com actina separados por uma distância de 200 nm (ver Figura 10-41).

monomérica *fimbrina* aparentemente exclui a miosina e, consequentemente, os filamentos paralelos de actina unidos pela fimbrina não são contráteis; ao contrário, o empacotamento frouxo mediado pela grande proteína de feixe dimérica *α-actinina* permite a entrada de moléculas de miosina, fazendo com que as fibras de estresse possam apresentar capacidade de contração (**Figura 16-49**). Tendo em vista as nítidas diferenças de espaçamento entre os filamentos de actina, a formação de feixes por fimbrina automaticamente desencoraja a formação de feixes por α-actinina, e vice-versa, de tal modo que estes dois tipos de proteínas de feixe são mutuamente excludentes.

A *vilina* é outra proteína de feixe que, assim como a fimbrina, apresenta dois sítios de ligação com filamentos de actina bastante próximos um do outro e sobre a mesma cadeia polipeptídica. A vilina (junto com a fimbrina) auxilia a interligação dos 20 a 30 filamentos de actina fortemente empacotados encontrados nas microvilosidades, as extensões de membrana plasmática, semelhantes a um dedo, que são encontradas na superfície de muitas células epiteliais (**Figura 16-50**). Uma única célula epitelial de absorção no intestino delgado humano, por exemplo, possui vários milhares de microvilosidades em sua superfície apical. Cada uma dessas microvilosidades possui aproximadamente 0,08 μm de largura e 1 μm de comprimento, fazendo com que a área de superfície de absorção da célula possa ser aproximadamente 20 vezes maior do que seria na ausência dessas estruturas. Quando a vilina é introduzida em uma cultura de fibroblastos, os quais normalmente não contêm vilina e possuem poucas e pequenas microvilosidades, não só as poucas estruturas presentes deste tipo aumentam de tamanho e tornam-se estabilizadas, como novas microvilosidades são induzidas. O centro do filamento de actina da microvilosidade está ligado à membrana plasmática por seus braços laterais compostos de *miosina I* (apresentada mais adiante), a qual possui um sítio de ligação com filamentos de actina em uma extremidade e um domínio que se liga a lipídeos na outra. Esses dois tipos de interligantes, um ligando filamentos de actina e o outro ligando estes filamentos à membrana, parecem ser suficientes para a formação de microvilosidades nas células. Interessantemente, quando o gene da vilina é disrupcionado em camundongos, as microvilosidades intestinais são formadas com morfologia aparentemente normal, indicando que outras proteínas de feixe possuem funcionamento suficientemente redundante para desempenhar este papel. No entanto, a remodelação das microvilosidades intestinais em resposta a determinados tipos de estresse ou redução de nutrientes é defeituosa nestes camundongos.

Figura 16-49 Formação de dois tipos de feixes de filamentos de actina. (A) A α-actinina, um homodímero, conecta filamentos de actina entre si formando feixes frouxos, permitindo a participação da proteína motora miosina II (não-apresentada) em sua estrutura. A fimbrina conecta os filamentos de actina entre si formando feixes compactos, excluindo a participação da miosina. A fimbrina e a α-actinina tendem a excluir-se mutuamente devido aos diferentes espaçamentos apresentados pelos feixes de filamentos de actina formados por estas proteínas. (B) Microfotografia eletrônica de moléculas de α-actinina. (B, cortesia de John Heuser.)





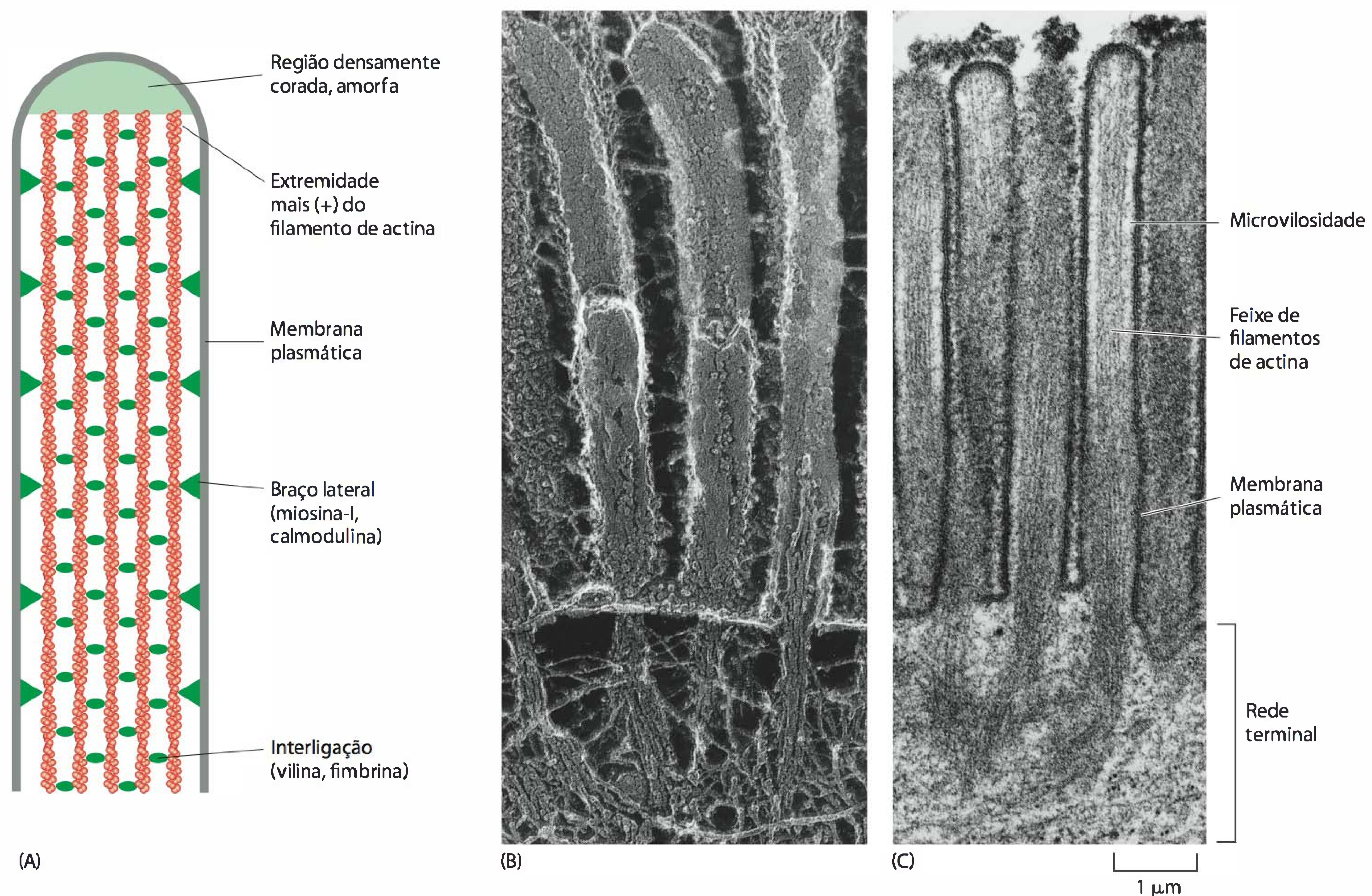


Figura 16-50 Uma microvilosidade. (A) Um feixe de filamentos paralelos de actina interligados pelas proteínas de empacotamento de actina vilina e fimbrina forma a parte central da microvilosidade. Braços laterais (formados de miosina I e da proteína de ligação ao Ca^{2+} calmodulina) conectam os lados do feixe de filamentos de actina à membrana citoplasmática que os reveste. Todas as extremidades mais (+) dos filamentos de actina estão na parte superior da microvilosidade, onde estão inseridas em uma substância amorfa, densamente corável, de composição ainda não-estabelecida. (B) Microfotografia eletrônica de preparação em criofratura da superfície apical de uma célula epitelial intestinal, mostrando microvilosidades. Feixes de actina da microvilosidade estendem-se em direção à célula e enraízam-se em uma rede terminal onde estão interligados por um conjunto complexo de proteínas que inclui espectrina e miosina II. Abaixo da rede terminal existe uma camada de filamentos intermediários. (C) Microfotografia eletrônica de uma secção delgada de microvilosidades. (B, cortesia de John Heuser; C, de P. T. Matsudaira e D. R. Burgess, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46:845-854, 1985. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

A filamina e a espectrina formam redes de filamentos de actina

As diferentes proteínas de feixe que foram apresentadas até o momento formam conexões rígidas e resistentes entre seus dois domínios de ligação com o filamento de actina e tendem a alinhar os filamentos em feixes paralelos. Em contraste, as proteínas de interligação de actina que possuem conexões flexíveis ou conexões rígidas em ângulos entre seus dois domínios de ligação formam redes ou géis de filamentos de actina ao invés de feixes.

Qualquer proteína de interligação que possua seus dois domínios de ligação à actina unidos por uma ligação longa e flexível pode formar redes tridimensionais de actina. A *filamina* (ver Figura 16-48) promove a formação de uma rede frouxa e extremamente viscosa pela união de dois filamentos de actina em ângulos retos praticamente exatos (**Figura 16-51**). Os géis de actina formados pela filamina são necessários para que a célula possa estender finas projeções planas de membrana chamadas de *lamelipódios*, os quais a auxiliam a se mover sobre superfícies sólidas. A filamina está ausente em alguns tipos de células cancerosas, especialmente em alguns melanomas malignos (cânceres de células pigmentares). Estas células não podem mover-se adequadamente e, em contraponto, formam protrusões desorganizadas em forma de bolhas na membrana (**Figura 16-52**). A perda da filamina é ruim para as células do melanoma, mas é uma boa notícia para o paciente com este câncer, pois devido à incapacidade que as células apresentarão para se movimentar, estas células serão menos invasivas do que as de melanomas similares que retiveram a expressão de filamina e, como consequência, existirá uma menor probabilidade de aparecimento de metástase.

Uma proteína formadora de redes bastante diferente e muito estudada é a *espectrina*, inicialmente identificada em células vermelhas do sangue. A espectrina é uma proteína longa e flexível, composta a partir de quatro cadeias polipeptídicas longas (duas subunidades α e duas subunidades β), organizadas de tal forma que seus sítios de ligação a filamentos de actina en-

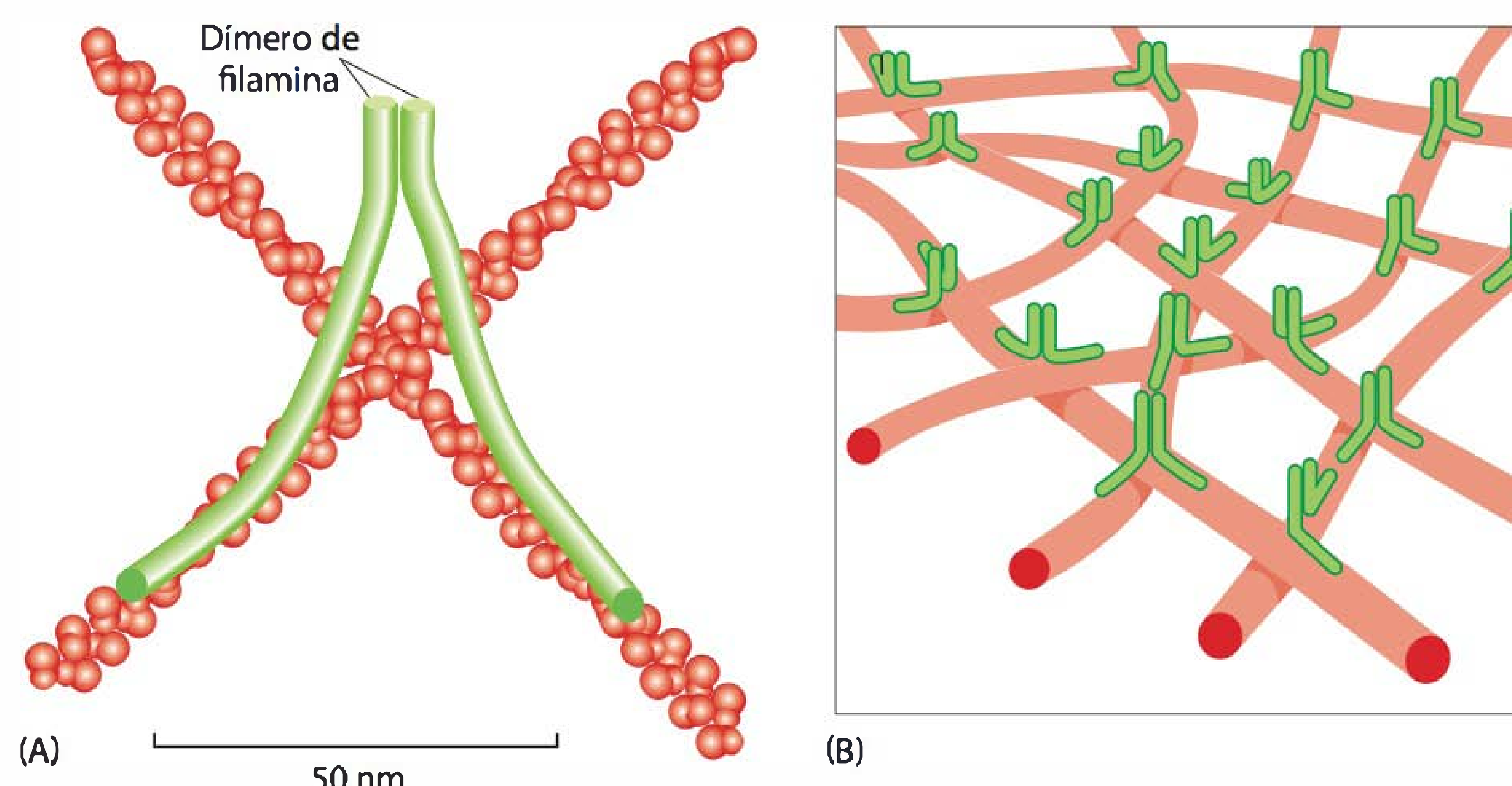


Figura 16-51 A filamina interliga filamentos de actina em redes tridimensionais que apresentam propriedades físicas de gel. (A) Cada homodímero de filamina tem aproximadamente 160 nm de comprimento quando completamente estendido e forma uma ligação flexível em ângulo reto entre dois filamentos adjacentes de actina. (B) Um conjunto de filamentos de actina interligados por filamina forma uma rede ou gel mecanicamente forte.

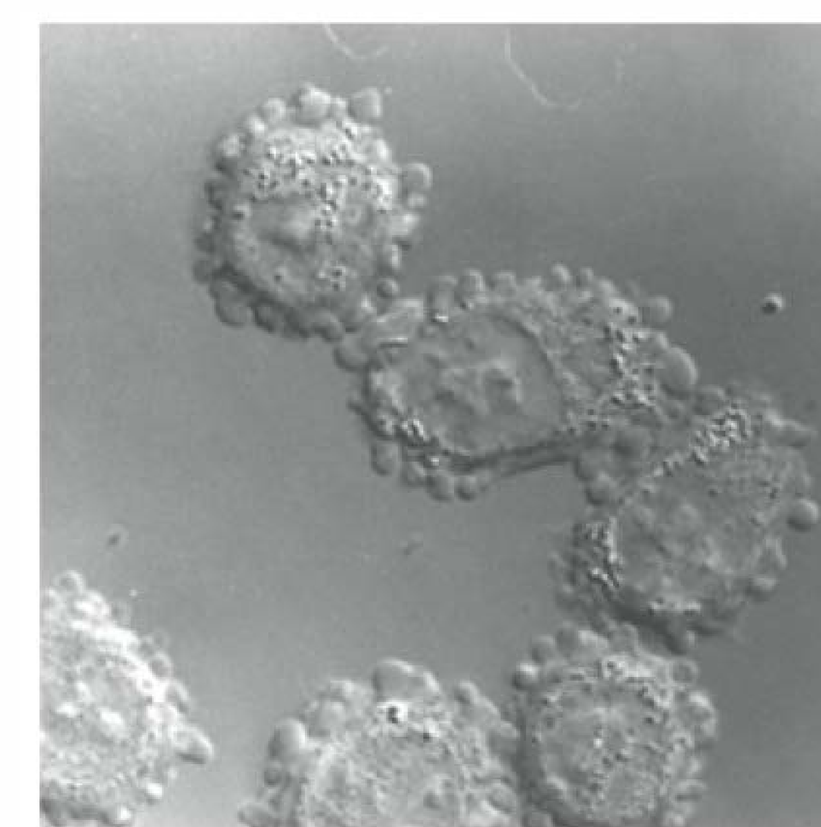
contram-se 200 nm distantes uns dos outros (comparados aos 14 nm da fimbrina e aos aproximadamente 30 nm para a α–actinina; ver Figura 16-48). Em células vermelhas do sangue, a espectrina está concentrada exatamente abaixo da membrana plasmática, onde forma uma rede bidimensional mantida em união por curtos filamentos de actina; a espectrina conecta esta rede à membrana plasmática, pois possui também sítios de ligação a proteínas periféricas da membrana, as quais estão, por sua vez, posicionadas próximo à bicapa lipídica por proteínas integrais de membrana (ver Figura 10-41). A rede resultante cria um córtex celular rígido capaz de prover suporte mecânico para a membrana plasmática que o envolve, e permite que a célula vermelha do sangue retome sua forma original após ter sido prensada em sua passagem através de um capilar. Proteínas bastante aparentadas à espectrina são encontradas no córtex da maioria dos outros tipos celulares de vertebrados, onde também auxiliam na manutenção e no estabelecimento da forma e na rigidez da membrana da superfície.

Elementos do citoesqueleto estabelecem diversas conexões a membranas

As estruturas de actina do citoesqueleto atuam tanto no enrijecimento da membrana plasmática como promovem alterações em sua forma. Já discutimos dois exemplos: a rede de actina-espectrina adjacente às membranas plasmáticas e os feixes de vilina-actina em microvilosidades que aumentam a área de absorção de células epiteliais. A eficiência dessas estruturas requer ligações específicas entre a rede de filamentos de actina e proteínas ou lipídeos da membrana plasmática.

As conexões do citoesqueleto cortical de actina à membrana plasmática ainda não estão totalmente compreendidas. Uma família amplamente distribuída de proteínas intracelulares intimamente relacionadas, a família *ERM* (denominada a partir de seus três primeiros membros: ezrina, radixina e moesina), contém membros necessários à manutenção da polaridade celular e estão envolvidos na exocitose e na endocitose. O domínio C-terminal das proteínas ERM liga-se diretamente à lateral dos filamentos de actina. O domínio N-terminal, por sua vez, liga-se à face citoplasmática de uma ou mais glicoproteínas transmembrana, como CD44, o receptor para o componente de matriz extracelular hialurano.

As ligações entre a actina e a membrana plasmática mediadas por proteínas ERM são reguladas tanto por sinais intracelulares quanto extracelulares. As proteínas ERM podem ocorrer sob duas conformações, uma conformação ativa estendida que oligomeriza e se liga tanto à actina quanto a uma proteína transmembrana, e uma conformação inativa dobrada, na qual as regiões N– e C-terminais são mantidas em união por uma interação intramolecular. A mudança para a conformação ativa pode ser induzida por fosforilação proteica ou



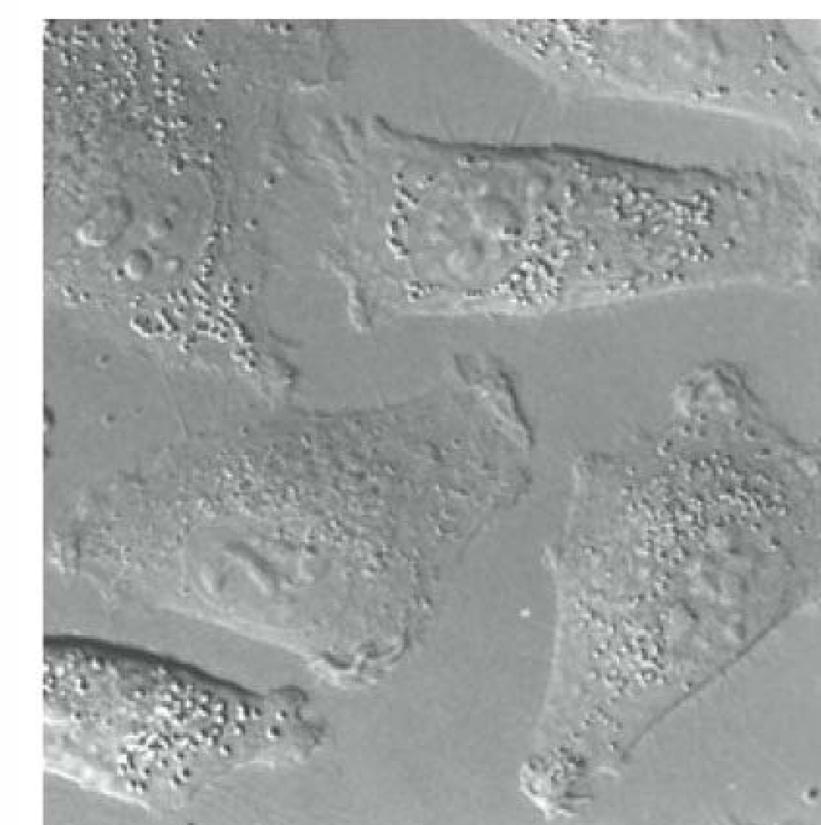


Figura 16-52 A perda de filamina causa mobilidade anormal nas células. (A) Um grupo de células de melanoma dotado de níveis anormalmente baixos de filamina. Estas células não são capazes de produzir lamelipódios normais e apresentam uma membrana coberta de "bolhas". Como resultado disso, elas se movem pouco e não apresentam tendência a metástase. (B) A mesma linhagem celular na qual a expressão de filamina foi restaurada artificialmente. As células produzem lamelipódios normais e apresentam alta incidência de desenvolvimento de metástases. Este é um dos muitos exemplos que demonstram os profundos efeitos na mobilidade e na morfologia da célula que podem resultar da presença ou da ausência de uma única proteína estrutural. (De C. Cunningham et al., *J. Cell Biol.* 136:845-857, 1997. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

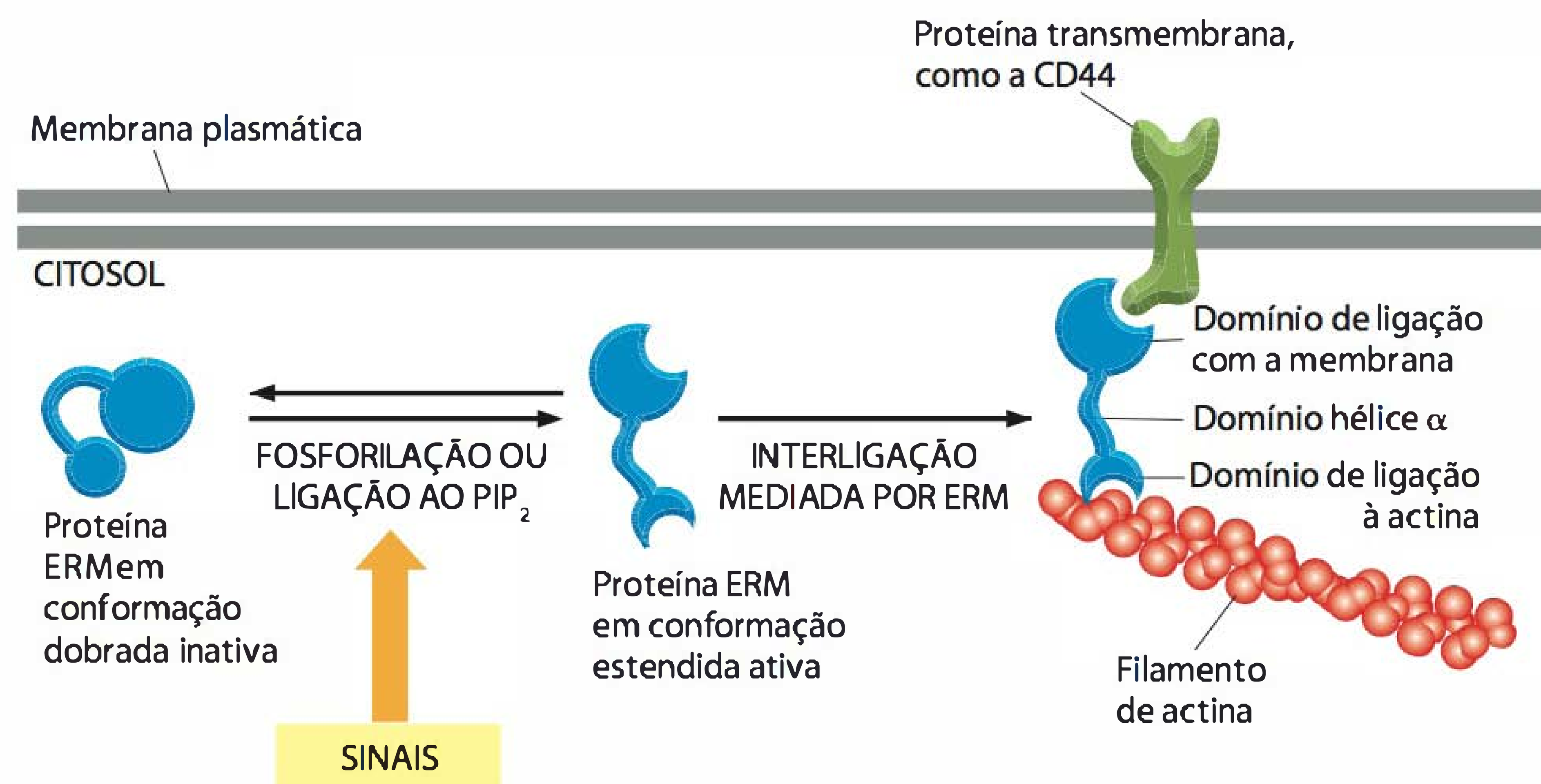


Figura 16-53 Papel das proteínas da família ERM na conexão dos filamentos de actina à membrana plasmática. O desdobramento regulado de uma proteína da família ERM devido à fosforilação ou à ligação com PIP$_2$ expõe dois sítios de ligação, um para o filamento de actina e o outro para uma proteína transmembrana. A ativação de proteínas da família ERM pode, assim, gerar e estabilizar protrusões formadas em resposta a sinais extracelulares.

pela ligação a PIP$_2$, o que pode ocorrer, por exemplo, em resposta a sinais extracelulares (as proteínas ERM atuam como alvos diretos de diversas tirosina-cinases receptoras). Assim, as propriedades do córtex celular são sensíveis a uma ampla variedade de sinais recebidos pela célula (**Figura 16-53**).

A perda de um dos membros da família ERM, denominado merlina, leva ao desenvolvimento de uma doença genética humana denominada *neurofibromatose*, na qual múltiplos tumores benignos se desenvolvem nos nervos auditivos e em determinadas outras partes do sistema nervoso. Esta é uma das muitas indicações da existência de um sistema de retroalimentação que conecta os elementos estruturais celulares ao controle do crescimento celular (ver Capítulo 17).

As proteínas, discutidas nesta seção, que controlam o posicionamento dos filamentos de actina e microtúbulos são revisadas no Painel 16-3 (p. 994-995). Algumas dessas proteínas possuem funções adicionais e auxiliam a conexão da estrutura interna da célula a outras células e à membrana basal extracelular. Tanto os filamentos de actina quanto os filamentos intermediários são essenciais ao estabelecimento dessas conexões, as quais requerem a ocorrência das junções célula-célula e junções célula-matriz especializadas discutidas no Capítulo 19.

Resumo

As diferentes formas e funções das estruturas de filamentos do citoesqueleto em células eucarióticas dependem de um repertório versátil de proteínas acessórias. Cada uma das três principais classes de filamentos (microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina) apresenta um grande leque de proteínas acessórias associadas.

Um determinante básico dos sítios das estruturas do citoesqueleto é a regulação dos processos que iniciam a nucleação de novos filamentos. Na maioria das células animais, os microtúbulos são nucleados no centrossomo, um arranjo complexo localizado próximo à região central da célula. Em contraste, a maior parte dos filamentos de actina sofre nucleação próximo à membrana plasmática.

A cinética de associação e dissociação de filamentos pode tanto ser freada quanto acelerada por proteínas acessórias que se ligam a subunidades livres ou aos próprios filamentos. Algumas destas proteínas alteram a dinâmica dos filamentos pela ligação às extremidades destes ou pela quebra dos filamentos em fragmentos menores. Outras classes de proteínas acessórias agregam os filamentos em estruturas de maior magnitude por interligação dos filamentos uns aos outros em formas geometricamente definidas. Ainda, outro tipo de proteínas acessórias determina o formato e as propriedades de adesão das células pela junção dos filamentos à membrana plasmática.

MOTORES MOLECULARES

Entre as mais fascinantes proteínas que se associam ao citoesqueleto estão os motores moleculares denominados **proteínas motoras**. Estas impressionantes proteínas se ligam a um filamento polarizado do citoesqueleto e utilizam a energia derivada de ciclos repetidos de hidrólise de ATP para se deslocarem uniformemente ao longo do filamento. Dúzias de diferentes proteínas motoras coexistem em cada célula eucariótica. Elas diferem em relação ao tipo de filamento ao qual se ligam (actina ou microtúbulos), à direção para a qual se movem sobre o filamento e em relação à "carga" que transportam. Diversas proteínas motoras transportam organelas delimi-

tadas por membrana – como mitocôndrias, pilhas de Golgi ou vesículas secretoras – rumo a sua posição adequada dentro da célula. Outras proteínas motoras fazem com que os filamentos do citoesqueleto exerçam tensão ou deslizem uns sobre os outros, gerando a força necessária para fenômenos como a contração muscular, o batimento de cílios e a divisão celular.

As proteínas motoras do citoesqueleto que se movem unidirecionalmente sobre um caminho de polímeros orientados lembram algumas outras proteínas e complexos proteicos discutidos em outros pontos deste livro, como as DNA e RNA-polimerases, as helicases e os ribossomos. Todas essas estruturas apresentam a capacidade de usar energia química para sua propulsão sobre um caminho linear, a direção do deslizamento dependendo da polaridade estrutural do caminho. Todas elas geram movimento pelo acoplamento da hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo a mudanças conformacionais em larga escala em uma proteína, como explicado anteriormente no Capítulo 3 (ver Figura 3-77).

As proteínas motoras do citoesqueleto se associam a seus caminhos de filamentos por uma região da "cabeça", ou *domínio motor*, que se liga e hidrolisa ATP. Dirigidas por ciclos de hidrólise de nucleotídeo que produzem alterações na conformação, as proteínas ciclam entre estados nos quais elas se encontram fortemente ligadas ao filamento e estados nos quais elas estão dele desconectadas. Por meio de um ciclo mecanoquímico de ligação ao filamento, alteração da conformação, liberação do filamento, relaxamento conformacional e religação ao filamento, a proteína motora e sua carga associada movem-se, um passo por vez, ao longo do filamento (tipicamente uma distância equivalente a uns poucos nanômetros). A identidade do caminho e a direção do movimento ao longo dele são determinadas pelo domínio motor (cabeça), ao passo que a identidade da carga (e, consequentemente, a função biológica de uma proteína motora específica) é determinada pela cauda da proteína motora.

Nesta seção, começaremos pela descrição dos três grupos de proteínas motoras do citoesqueleto: miosinas, cinesinas e dineínas. A seguir, descreveremos como elas atuam no transporte de organelas delimitadas por membrana e RNAs mensageiros (mRNAs) ou como modificam a forma de estruturas construídas a partir de filamentos do citoesqueleto. Na seção final deste capítulo, examinaremos como a colaboração entre proteínas motoras e os dinâmicos filamentos do citoesqueleto anteriormente descritos geram comportamentos celulares complexos.

Proteínas motoras com base em actina são membros da superfamília da miosina

A primeira proteína motora identificada foi a **miosina** de músculo esquelético, a qual é responsável pela geração de força para a contração muscular. Essa miosina, denominada *miosina II* (ver a seguir), é uma proteína longa formada por duas cadeias pesadas e duas cópias de cada uma das duas cadeias leves. Cada uma das cadeias pesadas possui um domínio globular (cabeça) em sua extremidade N-terminal que contém a maquinaria geradora de força, seguida por uma longa sequência de aminoácidos que forma uma extensão supertorcida que será mediadora da dimerização da cadeia pesada (**Figura 16-54**). As duas cadeias leves ligam-se próximo ao domínio globular N-terminal, ao passo que a longa cauda supertorcida

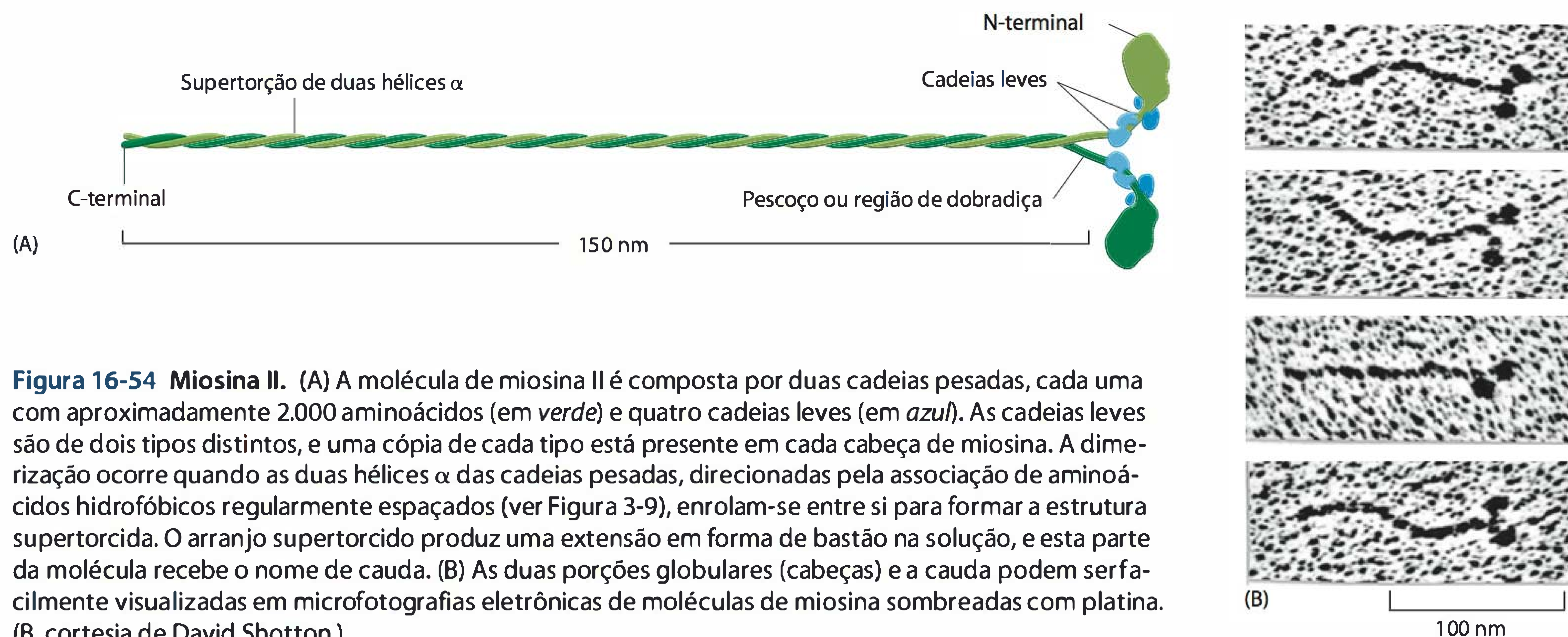


Figura 16-54 Miosina II. (A) A molécula de miosina II é composta por duas cadeias pesadas, cada uma com aproximadamente 2.000 aminoácidos (em *verde*) e quatro cadeias leves (em *azul*). As cadeias leves são de dois tipos distintos, e uma cópia de cada tipo está presente em cada cabeça de miosina. A dimerização ocorre quando as duas hélices α das cadeias pesadas, direcionadas pela associação de aminoácidos hidrofóbicos regularmente espaçados (ver Figura 3-9), enrolam-se entre si para formar a estrutura supertorcida. O arranjo supertorcido produz uma extensão em forma de bastão na solução, e esta parte da molécula recebe o nome de cauda. (B) As duas porções globulares (cabeças) e a cauda podem ser facilmente visualizadas em microfotografias eletrônicas de moléculas de miosina sombreadas com platina. (B, cortesia de David Shotton.)

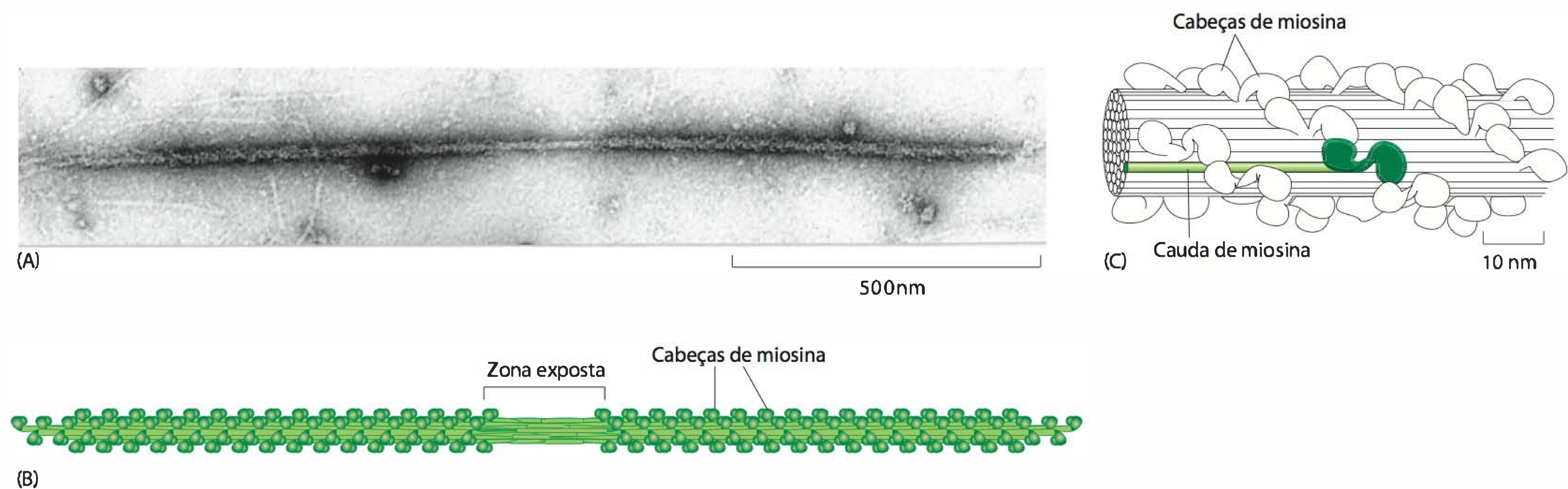


Figura 16-55 Filamento espesso bipolar de miosina II no músculo. (A) Microfotografia eletrônica de filamento espesso bipolar de miosina II isolado a partir de músculo de sapo. Observe a zona central exposta, que se apresenta livre de domínios globulares. (B) Diagrama esquemático, não apresentado em escala. As moléculas de miosina II se agregam através de suas caudas e projetam as cabeças para a região externa do filamento. A zona exposta no centro do filamento é constituída apenas de caudas de miosina II. (C) Uma pequena seção de filamentos de miosina II desenhada a partir de microfotografias eletrônicas. Uma molécula individual de miosina está realçada em *verde*. Os filamentos citoplasmáticos de miosina II em células não-musculares são bem mais curtos, apesar de apresentarem organização semelhante (ver a Figura 16-72). (A, cortesia de Murray Stewart; C, com base em R. A. Crowther, R. Padron e R. Craig., *J.Mol. Biol.* 184:429-439,1985. Com permissão de Academic Press.)

formará feixes através da ligação às caudas de outras moléculas de miosina. Essas interações cauda-cauda levam à formação de um grande "filamento espesso" bipolar que apresenta várias centenas de cabeças de miosina, orientadas em direções opostas nas duas extremidades do filamento espesso (**Figura 16-55**).

Cada cabeça de miosina se liga a ATP e é capaz de hidrolisá-lo, usando a energia dessa hidrólise para caminhar rumo à extremidade mais (+) do filamento de actina. A orientação oposta das cabeças no filamento espesso torna eficiente o deslizamento de pares de filamentos de actina orientados de forma oposta, um sobre o outro. Na musculatura esquelética, onde os filamentos de actina estão cuidadosamente organizados e alinhados em arranjos de "filamentos delgados" ao redor dos filamentos espessos de miosina, o deslizamento de filamentos de actina dirigido por ATP resulta em contração muscular (discutida a seguir). As musculaturas cardíaca e lisa contêm moléculas de miosina II similarmente organizadas, apesar de estas serem codificadas por diferentes genes.

Quando a miosina muscular é digerida por quimiotripsina e papaína, o domínio da cabeça é liberado sob a forma de um fragmento intacto (denominado S1). O fragmento S1 isolado pode promover o deslizamento de filamentos *in vitro*, dando provas de que a atividade motora está completamente contida na cabeça (**Figura 16-56**).

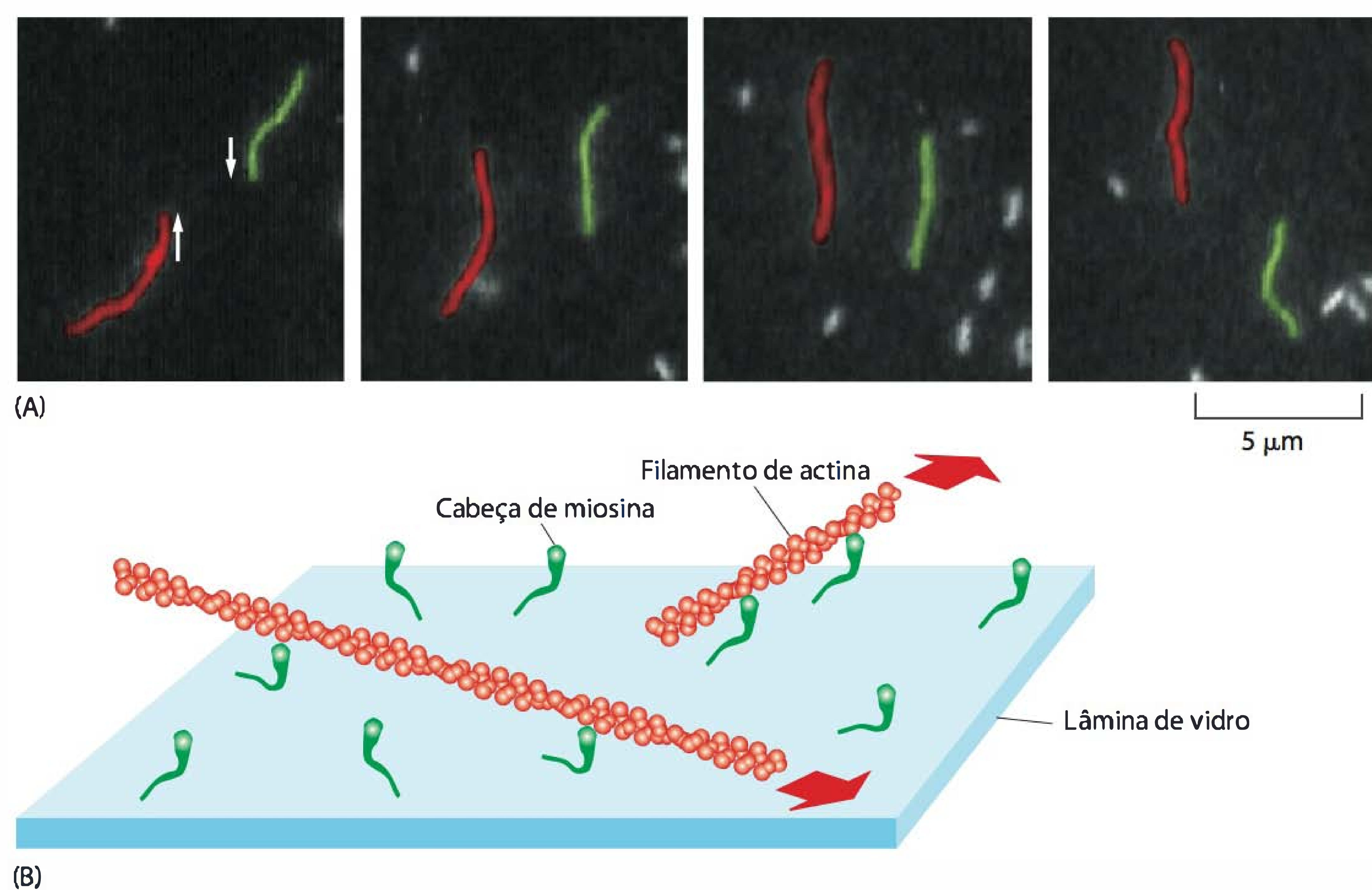


Figura 16-56 Evidência direta da atividade motora da cabeça de miosina. Neste experimento, cabeças de miosina S1 purificadas foram aderidas a uma lâmina de vidro, e filamentos de actina corados com faloidina fluorescente foram adicionados a esta preparação para que se ligassem às cabeças de miosina. (A) Quando ATP foi adicionado, os filamentos de actina começaram a se mover sobre a superfície como consequência dos muitos passos individuais dados por cada uma das muitas cabeças de miosina ligadas a cada filamento. As fotos mostradas nesta sequência foram obtidas em intervalos de 0,6 segundo, os dois filamentos de actina apresentados (um em *vermelho* e o outro em *verde*) movem-se em sentidos contrários, em velocidades de aproximadamente 4 μm/seg. (B) Uma representação esquemática do experimento. As grandes flechas *vermelhas* indicam a direção do movimento dos filamentos de actina. (A, cortesia de James Spudich.)

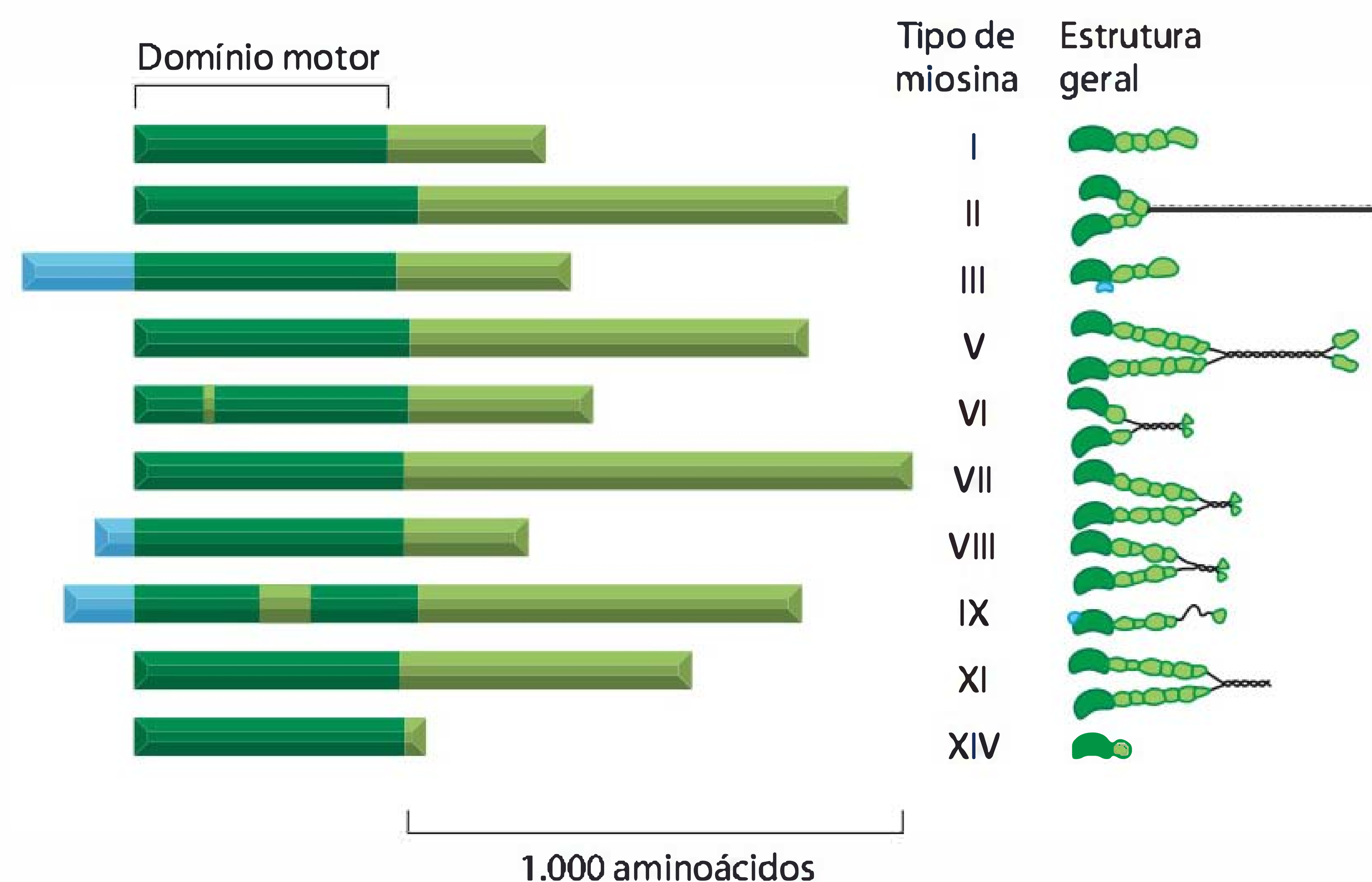


Figura 16-57 Membros da superfamília da miosina. Uma comparação dos domínios estruturais das cadeias pesadas de alguns tipos de miosina. Todas as miosinas compartilham domínios motores similares (mostrados em *verde-escuro*), mas apresentam caudas C-terminais (em *verdeclaro*) e extensões N-terminais (em *azul claro*) muito diversas. À direita estão esquemas da estrutura molecular de membros desta família. Muitas miosinas formam dímeros, com dois domínios motores por molécula, mas algumas (como é o caso das miosinas I, IX e XIV) parecem atuar como monômeros, contendo um único domínio motor. A miosina VI, apesar de se apresentar estruturalmente similar aos outros membros da família, é a única que se move em direção à extremidade de menos (−) (ao invés de mover-se em direção à extremidade mais [+]) sobre um filamento de actina. A pequena inserção existente no interior do seu domínio motor de cabeça, a única desta miosina, é a provável responsável pela mudança de direção no movimento.

Inicialmente pensava-se que a miosina estava presente apenas em músculo, mas, na década de 1970, pesquisadores descobriram que uma proteína com duas cabeças similar à miosina também estava presente em células não-musculares e inclusive em células de protozoários. Aproximadamente na mesma época, outros pesquisadores identificaram uma miosina incomum pelo fato de ter um domínio motor similar à cabeça de miosina muscular, mas apresentar uma cauda completamente diferente, na ameba de água fresca *Acanthamoeba castellanii*. Essa molécula parecia funcionar sob a forma de um monômero e foi chamada de *miosina I* (pois possuía uma cabeça), sendo a miosina convencional renomeada para *miosina II* (duas cabeças).

Subsequentemente, muitos outros tipos de miosina foram descobertos. A cadeia pesada geralmente inicia-se por um reconhecível domínio motor de miosina na região N-terminal, e então diverge amplamente apresentando uma ampla variedade de domínios de cauda C-terminal (**Figura 16-57**). Os novos tipos identificados de miosina incluem uma série de variedades com uma e duas cabeças que são tão relacionadas à miosina I quanto à miosina II, e a nomenclatura atual reflete sua ordem aproximada de descoberta (da miosina III até pelo menos a miosina XVIII). Comparações entre as sequências de diversos eucariotos indicam que existem pelo menos 37 famílias distintas de miosina dentro dessa superfamília. As caudas das miosinas (e as caudas das proteínas motoras em geral) aparentemente sofreram diversificação durante a evolução para permitir às proteínas a ligação a outras subunidades, e para que interajam com diferentes cargas.

Algumas miosinas (como a VIII e a XI) foram identificadas apenas em plantas, e outras foram encontradas apenas em vertebrados (IX). A maioria, no entanto, está presente em todos os eucariotos, sugerindo que as miosinas apareceram cedo na evolução eucariótica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui cinco miosinas: duas miosinas I, uma miosina II e duas miosinas V. Pode-se especular que esses três tipos de miosina são necessários para que uma célula eucariótica sobreviva e que as outras miosinas devam desempenhar funções mais especializadas, principalmente em organismos multicelulares. O nematódeo *C. elegans*, por exemplo, possui pelo menos 15 genes de miosina, representando ao menos sete classes estruturais; o genoma humano inclui aproximadamente 40 genes de miosina. Nove das miosinas humanas são expressas predominantemente ou exclusivamente nas células pilosas do ouvido interno, e mutações em cinco delas são conhecidamente causadoras de surdez hereditária. Estas miosinas extremamente especializadas são importantes para a construção e o funcionamento dos impressionantes e complexos feixes estereocílios ricos em actina encontrados na superfície apical destas células (ver Figura 9-50); eles vibram em resposta ao som e convertem as ondas sonoras em sinais elétricos (discutido no Capítulo 23).

Com uma única exceção, todas as miosinas se movem em direção à extremidade mais (+) do filamento de actina, no entanto suas velocidades de movimento são diferentes. A exceção é a miosina VI, que se move rumo à extremidade menos (–) do filamento.

A função exata da maioria das miosinas ainda não foi determinada. A miosina V está envolvida no transporte de vesículas e organelas. A miosina II está sempre associada à atividade contrátil, tanto em células musculares quanto não-musculares. Ela também em geral é necessária à citocinese (a separação da célula original em duas células-filhas) bem como para a translocação, o impulso e o transporte do corpo celular durante a migração das células. As proteínas miosina I geralmente contêm um segundo sítio de ligação à actina ou um sítio de ligação à membrana em suas caudas, e em geral estão envolvidas na organização intracelular – em atividades como a protrusão de estruturas ricas em actina na superfície celular, como discutido anteriormente para a construção de microvilosidades (ver Figura 16-50).

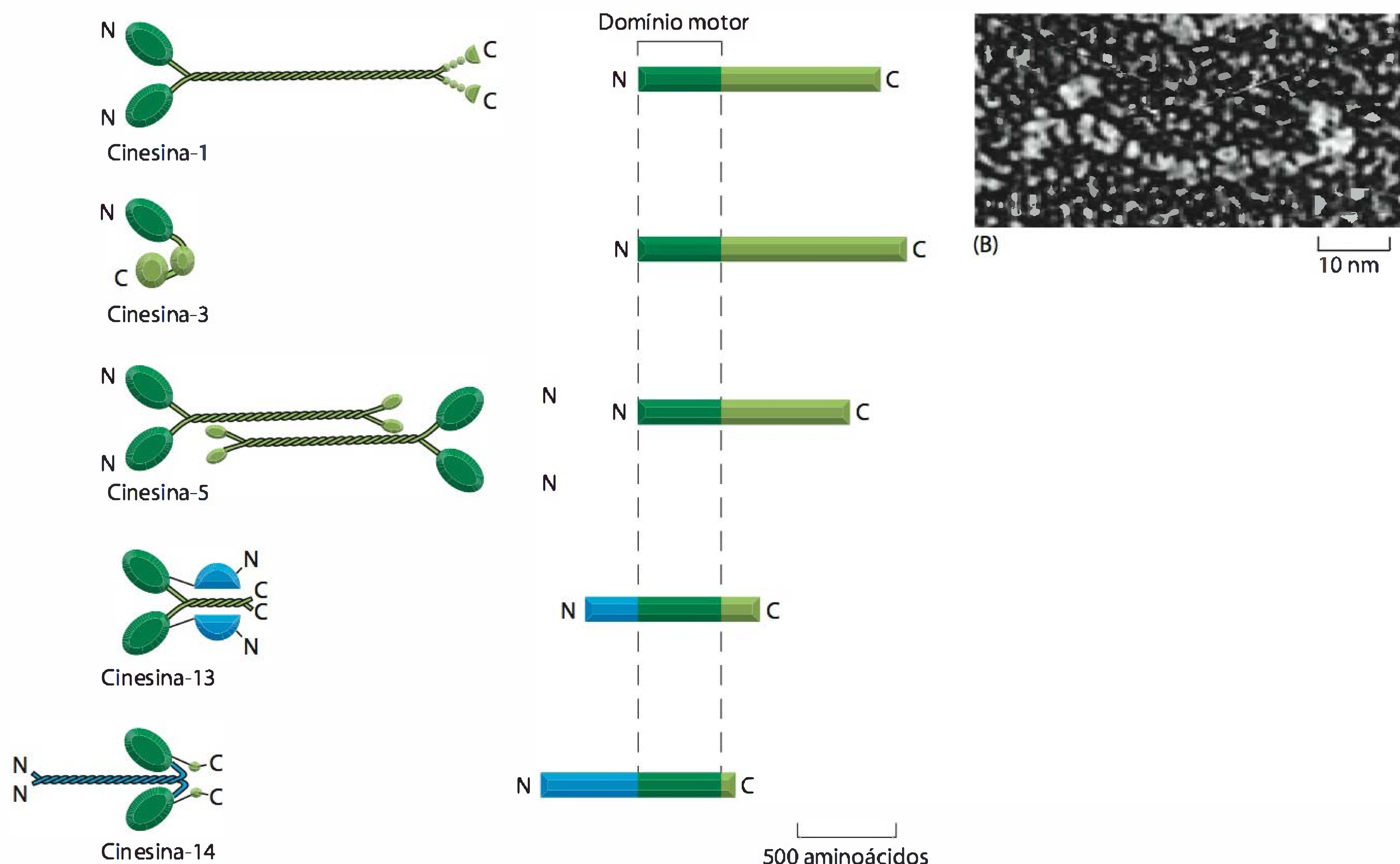


Figura 16-58 Cinesinas e proteínas relacionadas à cinesina. (A) As estruturas de cinco membros da superfamília das cinesinas. Assim como na superfamília da miosina, apenas os domínios motores apresentam conservação. A cinesina-1 apresenta o domínio motor na extremidade N-terminal da cadeia pesada. O domínio central forma uma longa estrutura supertorcida, mediando a dimerização. O domínio C-terminal forma uma cauda que se liga ao material a ser transportado, como uma organela delimitada por membrana. A cinesina-3 é um membro de uma classe incomum de cinesinas que parecem funcionar sob a forma de monômeros e que movimentam organelas delimitadas por membranas ao longo dos microtúbulos. A cinesina-5 forma tetrâmeros, com dois dímeros associados através de suas caudas. O tetrâmero de cinesina-5 bipolar é capaz de deslizar dois microtúbulos um em relação ao outro, de forma análoga à atividade dos filamentos espessos bipolares formados por miosina II. A cinesina-13 possui seu domínio motor localizado no meio da cadeia pesada. Ela é um membro de uma família de cinesinas que perderam a atividade motora típica e, ao invés desta atividade, ligam-se às extremidades dos microtúbulos para aumentar a instabilidade dinâmica deles; elas são, portanto, denominadas fatores de catástrofe (ver p. 1003). A cinesina-14 é uma cinesina C-terminal que inclui a proteína Ncd de *Drosophila* e a proteína Kar3 de leveduras. Estas cinesinas geralmente se movimentam em direção oposta a da maioria das cinesinas, rumo à extremidade menos (–), ao invés de rumo à extremidade mais (+) de um microtúbulo. (B) Microfotografia eletrônica de criofratura de uma molécula de cinesina com os domínios da cabeça à esquerda. (B, cortesia de John Heuser.)

Existem dois tipos de proteínas motoras de microtúbulos: cinesinas e dineínas

A **cinesina** é uma proteína motora que se move sobre microtúbulos. Ela foi inicialmente identificada em axônios gigantes de lula, onde transporta organelas delimitadas por membrana do corpo celular do neurônio para a terminação axonal, percorrendo um caminho de microtúbulos em direção às extremidades mais. A cinesina apresenta uma estrutura similar à da miosina II, com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves por motor ativo; isso forma duas cabeças globulares representando os domínios motores e uma extensão supertorcida responsável pela dimerização da cadeia pesada. Assim como a miosina, a cinesina faz parte de uma grande superfamília de proteínas na qual o domínio motor é o único elemento em comum (**Figura 16-58**). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui seis cinesinas distintas. O nematódeo *C. elegans* tem 16 cinesinas, e os seres humanos possuem aproximadamente 45.

Existem pelo menos 14 famílias distintas na superfamília das cinesinas. A maioria delas possui o domínio motor localizado na região N-terminal da cadeia pesada e caminha em direção à extremidade mais (+) do microtúbulo. Uma família particularmente interessante apresenta o domínio motor na região C-terminal e desloca-se em direção oposta, rumo à extremidade menos (–) do microtúbulo. Algumas cadeias pesadas de cinesina não apresentam estrutura supertorcida e parecem funcionar sob a forma de monômero, de maneira análoga à miosina I. Outras são homodímeros, e, ainda, outras formam heterodímeros. Membros da família cinesina-5 podem sofrer autoassociação por seu domínio da cauda, formando um motor bipolar que desliza microtúbulos com orientações opostas, um sobre o outro, de forma semelhante ao deslizamento provocado pelo filamento espesso de miosina II em filamentos de actina. A maioria das cinesinas possui um sítio de ligação em sua cauda que pode ser usado para conectar a uma organela delimitada por membrana ou a um outro microtúbulo. Muitos dos membros da superfamília da cinesina desempenham funções específicas na formação dos fusos mitóticos e meióticos e na separação dos cromossomos durante a divisão celular.

As **dineínas** representam uma família de motores de microtúbulos direcionados para a extremidade menos (–) e não são relacionadas à superfamília das cinesinas. Elas são compostas por duas ou três cadeias pesadas (onde se inclui o domínio motor) e um grande e variado número de cadeias intermediárias e cadeias leves associadas. A família das dineínas tem duas ramificações principais (**Figura 16-59**). O ramo mais antigo contém as *dineínas citoplasmáticas*, as quais são tipicamente homodímeros de cadeia pesada, com dois grandes domínios motores como cabeças. As dineínas citoplasmáticas provavelmente sejam encon-

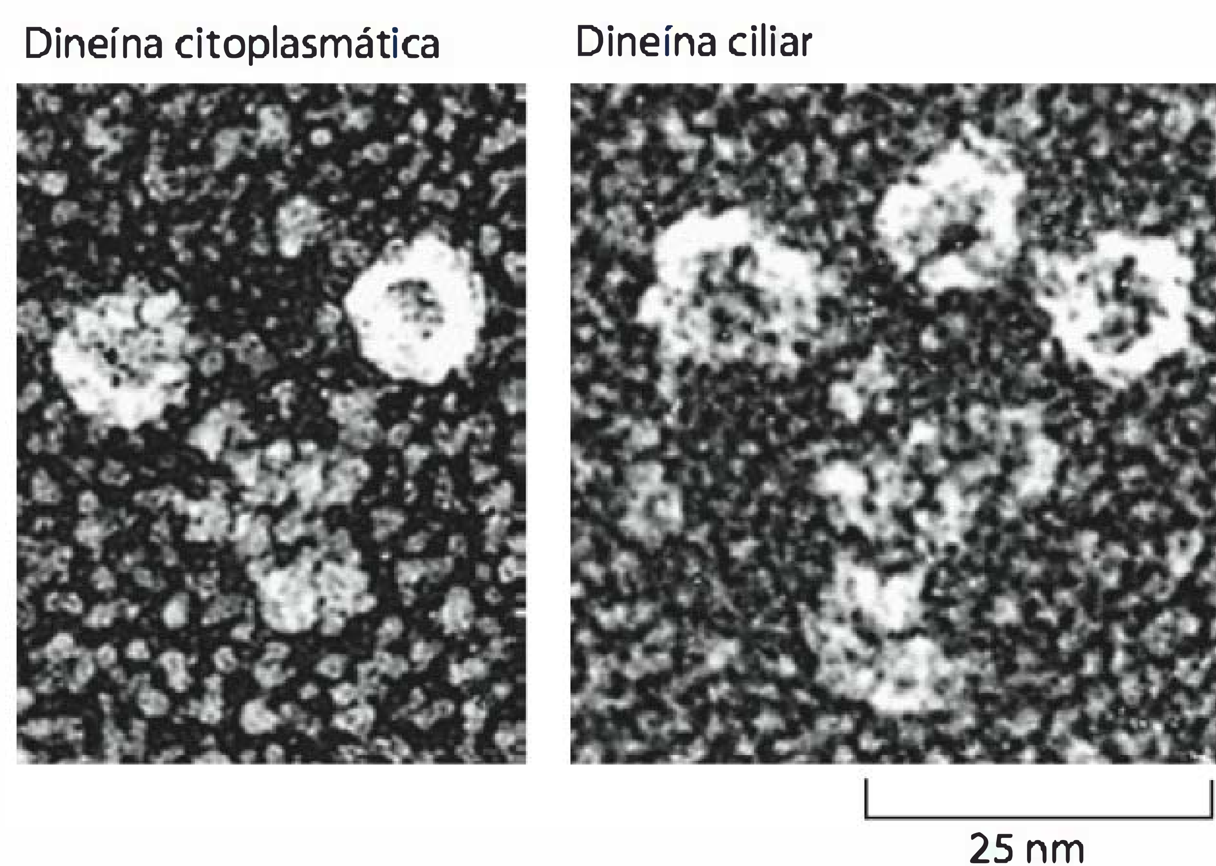


Figura 16-59 Dineínas. Microfotografia eletrônica de criofratura de uma molécula de dineína citoplasmática e de uma molécula de dineína ciliar (axonêmica). Assim como a miosina II e a cinesina, a dineína citoplasmática é uma molécula com dois domínios globulares. A dineína ciliar apresentada provém de um protozoário e possui três cabeças; dineínas ciliares de animais possuem duas cabeças. Observe que a cabeça de dineína é bastante grande quando comparada à cabeça tanto de miosina quanto de cinesina. (Cortesia de John Heuser.)

tradas em todas as células eucarióticas, sendo importantes para o trânsito de vesículas e para o posicionamento do aparelho de Golgi próximo à região central da célula. As *dineínas do axonema*, o outro grande ramo, incluem heterodímeros e heterotrímeros, com duas ou três cabeças de domínio motor, respectivamente. Elas são altamente especializadas para o rápido e eficiente movimento de deslizamento dos microtúbulos que direciona o batimento de cílios e flagelos (discutido mais tarde). Um terceiro e menor ramo compartilha uma maior similaridade de sequência com as dineínas citoplasmáticas do que com as dineínas do axonema, mas parece estar envolvido no batimento de cílios.

As dineínas são os maiores motores moleculares conhecidos e também estão entre os mais rápidos: dineínas do axonema podem mover microtúbulos *in vitro* a uma velocidade extraordinária de 14 μm/seg. Em comparação, as cinesinas mais rápidas podem mover seus microtúbulos a aproximadamente 2 a 3 μm/seg. Discutiremos a seguir como estas moléculas funcionam.

A semelhança estrutural entre as miosinas e as cinesinas indica uma origem evolutiva comum

O domínio motor das miosinas é substancialmente maior do que o das cinesinas, de tamanho aproximado de 850 aminoácidos comparado com cerca de 350. Estas duas classes de proteínas motoras deslizam sobre diferentes filamentos e possuem propriedades cinéticas diferentes, além de não apresentarem similaridade identificável em nível de sequência de aminoácidos. Entretanto, a determinação da estrutura tridimensional dos domínios motores da miosina e da cinesina revelou que ambos são construídos a partir de núcleos praticamente idênticos (**Figura 16-60**). O elemento central gerador de força que ambos os tipos de proteínas motoras apresentam em comum inclui o sítio de ligação a ATP e a maquinaria necessária para transformar a hidrólise de ATP em uma alteração conformacional alostérica. As diferenças entre o tamanho do domínio e a escolha do filamento podem ser atribuídas às grandes alças que se estendem a partir desse núcleo central. Nessas alças estão localizadas

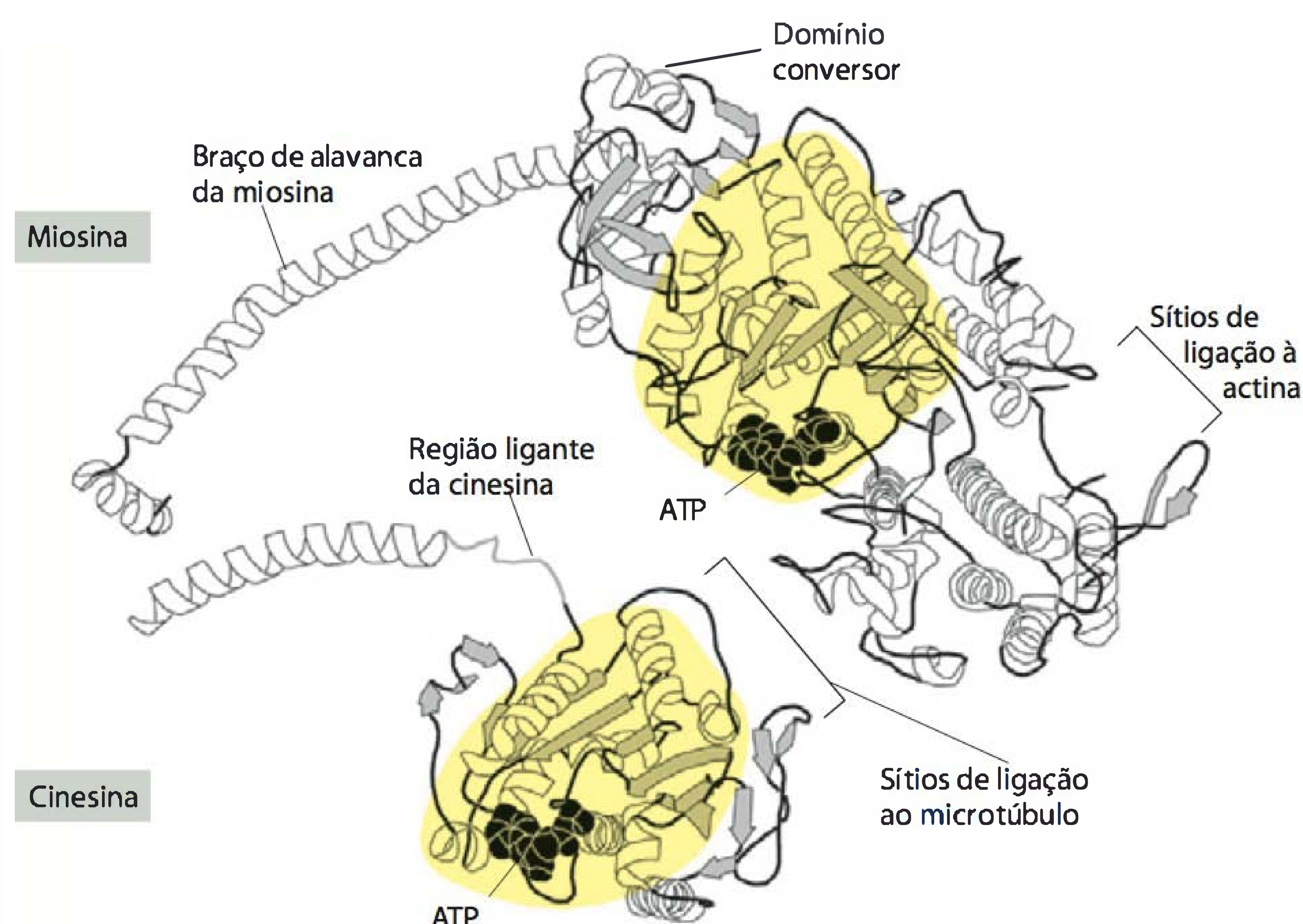


Figura 16-60 Estrutura cristalográfica das cabeças de miosina e cinesina. Os domínios centrais que se ligam a nucleotídeos (sombreados em *amarelo*) na miosina e na cinesina são estruturalmente bastante semelhantes. O tamanho e as funções tão diferentes destas duas proteínas motoras se devem às grandes diferenças nas porções de ligação ao polímero e de transdução de força do domínio motor. (Adaptada de L. A. Amos e R. A. Cross, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:239-246, 1997. Com permissão de Elsevier.)

as regiões de ligação com a actina e os sítios de ligação a microtúbulos da miosina e da cinesina, respectivamente. Acredita-se que tanto as cinesinas quanto as miosinas descendam de uma proteína motora ancestral comum, e que suas diversas funções especializadas tenham-se originado a partir de duplicação gênica e subsequente modificação ao longo da evolução das alças que emanam do núcleo central.

Uma importante dica a respeito de como o núcleo central está envolvido em geração de força foi obtida a partir da observação de que o núcleo motor também possui algumas semelhanças estruturais com o sítio de ligação a nucleotídeos das pequenas GTPases da superfamília Ras. Como discutido no Capítulo 3 (ver Figura 3-72), estas proteínas exibem duas conformações distintas, uma referente à sua ligação com GTP (forma ativa) e a outra referente à sua ligação com GDP (forma inativa): alças móveis que funcionam como "interruptores" no sítio de ligação a nucleotídeos estão em íntimo contato com o fosfato γ no estado ligado a GTP e movimentam-se quando este fosfato γ (o fosfato terminal) é liberado. Apesar de detalhes do movimento serem diferentes para as duas proteínas motoras, e ATP ser hidrolisado em vez de GTP, uma alteração estrutural relativamente pequena no sítio ativo – a presença ou a ausência de um fosfato terminal – é similarmente amplificada para causar a rotação de uma parte diferente da proteína.

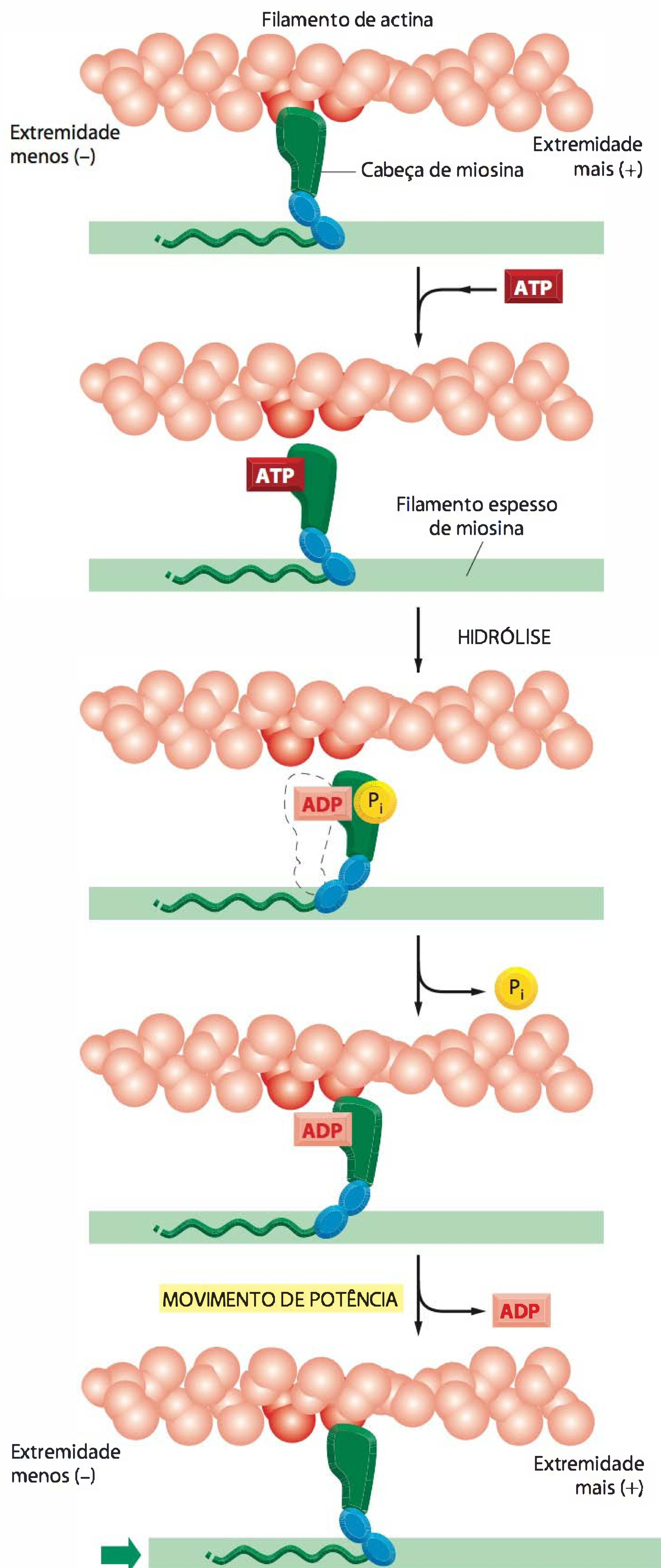
Na cinesina e na miosina, uma alça interage extensivamente com aquelas regiões da proteína que estão envolvidas na respectiva ligação com microtúbulos e actina, permitindo que transições estruturais provocadas pelo ciclo de hidrólise de ATP sejam transmitidas para a interface de ligação ao polímero. A comunicação das mudanças estruturais entre o sítio de ligação ao polímero e o sítio de hidrólise de nucleotídeos parece ocorrer em ambas as direções, visto que a atividade ATPase das proteínas motoras é fortemente ativada pela sua ligação ao filamento correto.

As proteínas motoras geram força pelo acoplamento de hidrólise de ATP às mudanças conformacionais

Apesar de tanto as proteínas motoras do citoesqueleto quanto as proteínas de ligação a GTP usarem alterações estruturais em seus sítios de ligação a trifosfatos de nucleosídeo para a produção de interações cíclicas com uma proteína companheira, as proteínas motoras apresentam uma necessidade adicional: cada ciclo de ligação e liberação deve ser capaz de impulsioná-las em uma única e determinada direção, um passo adiante sobre o filamento, para um novo sítio de ligação. Para que ocorra tal movimento unidirecional, a proteína motora deve utilizar a energia derivada da ligação e hidrólise de ATP para forçar um grande movimento de uma porção de sua molécula. No caso da miosina, cada passo do movimento ao longo da actina é gerado pela rotação de uma hélice α de 8,5 nm de comprimento, chamada de *braço de alavanca*, a qual é estruturalmente estabilizada pela ligação a cadeias leves. Na base deste braço de alavanca, próximo à cabeça, existe uma hélice, semelhante a um pistão, que conecta os movimentos da fenda de ligação a ATP na cabeça com pequenas rotações do chamado domínio conversor (ver Figura 16-60). Uma pequena alteração neste ponto pode girar a hélice como uma longa alavanca, fazendo com que sua extremidade mais (+) distante mova-se cerca de 5,0 nm.

Estas alterações conformacionais da miosina estão acopladas a alterações em sua afinidade de ligação por actina, permitindo que a cabeça de miosina seja liberada do ponto de adesão ao filamento de actina e, a seguir, seja novamente capturada, aderindo a um novo ponto. Este ciclo mecanoquímico completo de ligação do nucleotídeo, hidrólise do nucleotídeo e liberação do fosfato (que provoca o "movimento de potência") produz o movimento de um único passo (**Figura 16-61**).

Na cinesina, em vez do giro de um braço de alavanca, os pequenos movimentos da alça do interruptor no sítio de ligação ao nucleotídeo regulam o ancoramento e desligamento do domínio motor da cabeça a uma longa região ligante, a qual conecta esta cabeça motora em uma extremidade ao domínio supertorcido de dimerização na outra extremidade (ver Figura 16-61). Quando a cabeça de cinesina anterior (guia) está ligada ao microtúbulo, antes do movimento de potência, sua região ligante está relativamente não-estruturada. Quando ocorre a ligação do ATP a essa cabeça, a sua região ligante se posiciona lateralmente à cabeça, o que impulsiona a segunda cabeça para uma posição onde ela será capaz de adesão a um novo sítio sobre o protofilamento, 8 nm mais próxima da extremidade mais (+) do microtúbulo em relação ao sítio de ligação onde se encontra a primeira cabeça. Os ciclos de hidrólise de nucleotídeos nas duas cabeças são altamente acoplados e coordenados, de tal forma que o ancoramento e a liberação da região ligante permitem que o motor de duas cabeças se mova passo-a-passo (ou cabeça-a-cabeça) sobre o filamento (**Figura 16-62**), cada vez avançando uma distância de 8 nm.



CONECTADA No começo do ciclo apresentado nesta figura, uma cabeça de miosina sem ligação ao nucleotídeo está firmemente presa a um filamento de actina em uma configuração de rigor (assim denominada por ser responsável pelo *rigor mortis*, a rigidez cadavérica). Em um músculo em contração ativa, este estado é de duração extremamente curta, sendo rapidamente terminado pela ligação de uma molécula de ATP.

LIBERADA Uma molécula de ATP se liga a uma grande fenda existente na "parte posterior" da cabeça (ou seja, no lado mais distante do filamento de actina) e imediatamente provoca uma leve modificação na conformação dos domínios que formam o sítio de ligação à actina. Isso reduz a afinidade da cabeça pela actina e permite seu deslizamento sobre o filamento. (O espaço representado no desenho entre a cabeça e a actina enfatiza esta mudança, embora seja provável que, na realidade, a cabeça permaneça muito mais próxima à actina.)

ENGATILHADA A fenda se fecha, como as valvas de uma concha, sobre a molécula de ATP, desencadeando uma grande mudança de conformação que, por sua vez, faz com que a cabeça se desloque sobre o filamento por uma distância de aproximadamente 5 nm. Ocorre hidrólise de ATP, mas o ADP e o fosfato inorgânico (P_i) produzidos permanecem firmemente ligados à proteína.

GERADORA DE FORÇA Uma ligação fraca da cabeça de miosina a um novo sítio do filamento de actina provoca a liberação do fosfato inorgânico produzido pela hidrólise de ATP, concomitante à forte ligação da cabeça com a actina. Essa ligação desencadeia o movimento de potência – a modificação conformacional geradora de força durante a qual a cabeça retorna à sua conformação original. Durante o movimento de potência, a cabeça perde seu ADP, retornando, portanto, ao ponto do início para um novo ciclo.

CONECTADA Ao final de um ciclo, a cabeça de miosina está mais uma vez firmemente presa em uma configuração de rigor. Observe que a cabeça se deslocou para uma nova posição sobre o filamento de actina.

Figura 16-61 Ciclo de alterações estruturais sofridas pela miosina II para caminhar sobre um filamento de actina. No ciclo da miosina II, a cabeça permanece ligada ao filamento de actina por apenas aproximadamente 5% do período total, permitindo que várias miosinas atuem em conjunto para mover um único filamento de actina. (Com base em I. Rayment et al., *Science* 261:50-58, 1993. Com permissão de AAAS.)

O domínio supertorcido parece ser responsável tanto pela coordenação dos ciclos mecanoquímicos das duas cabeças (domínios motores) do dímero de cinesina quanto pela determinação da direcionalidade do movimento. É importante relembrar que, se a maior parte dos membros da superfamília da cinesina, com seus domínios motores na região N-terminal, se move em direção à extremidade mais (+) do microtúbulo, alguns membros dessa mesma superfamília têm seus domínios motores na região C-terminal e se movem em direção à extremidade menos (–). Considerando-se que os domínios motores desses dois tipos de cinesinas são essencialmente idênticos, como eles podem movimentar-se em sentidos opostos? A resposta parece repousar na maneira pela qual as cabeças estão conectadas. Em imagens de alta resolução de membros da superfamília da cinesina se deslocando para frente ou para trás sobre um microtúbulo, foi possível observar que as cabeças ligadas aos microtúbulos eram essencialmente indistinguíveis, mas a segunda cabeça, não conectada, estava orientada de forma bastante distinta. Essa diferença de inclinação aparentemente se-

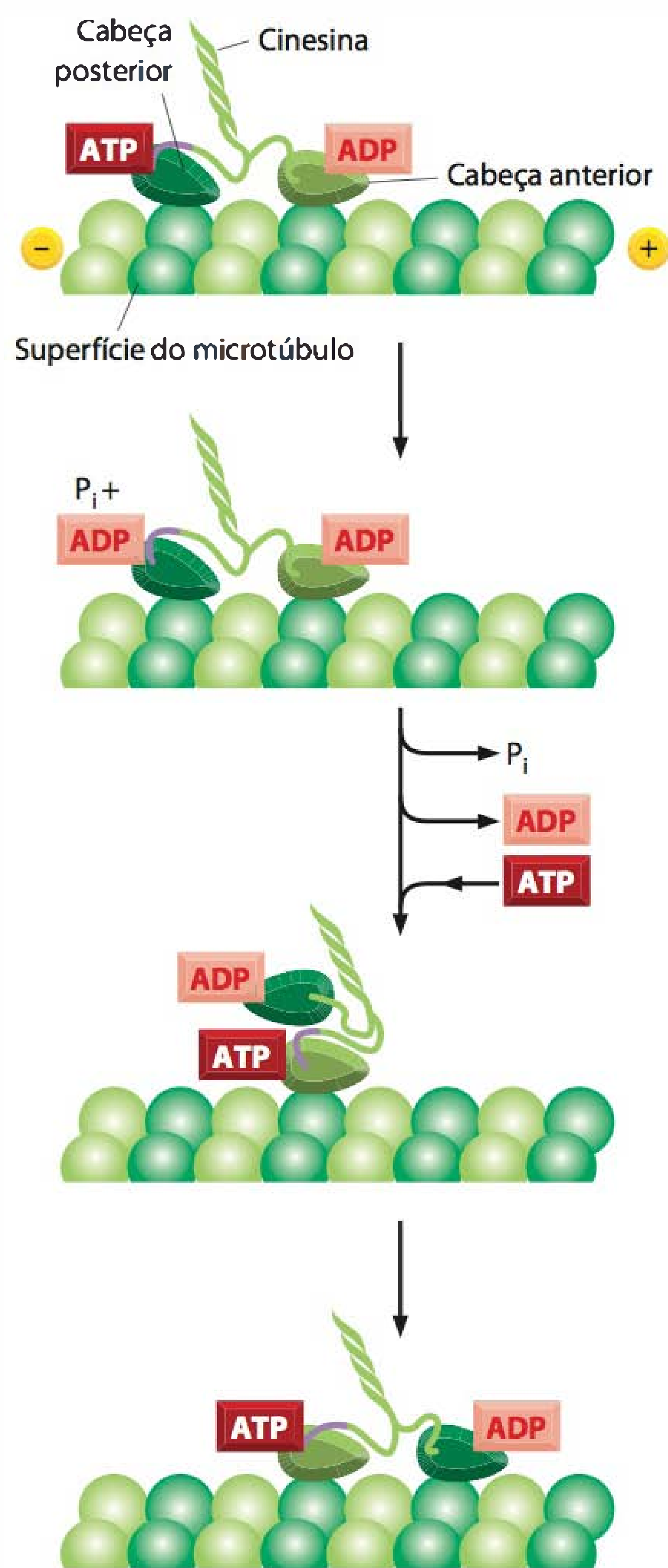


Figura 16-62 Ciclo mecanoquímico da cinesina. A cinesina-1 é um dímero de dois domínios motores de ligação ao nucleotídeo (cabeças) que se encontram conectados através de uma longa cauda supertorcida (ver Figura 16-58). Os dois domínios motores da cinesina atuam coordenadamente; durante um "passo" da cinesina, a cabeça posterior se desconecta de seu sítio de ligação na tubulina, ultrapassa se domínio motor acompanhante e então novamente liga-se ao próximo sítio de ligação disponível na tubulina. Usando este sistema de locomoção "pé-ante-pé", o dímero de cinesina pode percorrer longas distâncias sobre o microtúbulo sem perder seu rumo.

No início de cada ciclo, uma das duas cabeças de cinesina, a cabeça posterior ou de arraste (em *verde escuro*) está fortemente ligada ao microtúbulo e a ATP, ao passo que a cabeça anterior ou guia está fracamente ligada a um microtúbulo com ADP em seu sítio de ligação. O deslocamento para a frente do domínio motor posterior é direcionado pela troca do ATP por ADP no domínio motor anterior (entre os painéis 2 e 3 desta ilustração). A ligação de ATP a esse domínio motor faz com que um pequeno peptídeo denominado "de ligação ao pescoço" altere sua conformação posicionada para trás para uma conformação posicionada para a frente (o peptídeo de ligação ao pescoço aqui ilustrado sob a forma de uma linha de conexão entre o domínio motor e a região supertorcida). Esta alteração impulsiona o domínio motor posterior para a frente, que se desconectará do microtúbulo com ADP ligado (a separação requer hidrólise de ATP e liberação de fosfato [P_i]). A molécula de cinesina está agora pronta para o próximo passo, o qual procederá por uma exata repetição do processo ilustrado.

leciona o próximo sítio de ligação da segunda cabeça e, dessa forma, determina a direcionalidade do movimento motor (**Figura 16-63**).

A proteína motora dineína não possui relação estrutural com as miosinas ou com as cinesinas, no entanto segue a regra geral de acoplamento de hidrólise de nucleotídeo com a ligação e o desligamento do microtúbulo e com alterações conformacionais geradoras de força. Uma cadeia pesada gigante de mais de 500.000 dáltons forma a estrutura básica que gera movimento. Sua porção N-terminal forma uma cauda que se liga a um conjunto de cadeias pesadas e se conecta a outras cadeias pesadas na molécula de dineína, ao passo que a porção principal da cadeia pesada é usada para formar uma elaborada cabeça em forma de anel. A cabeça consiste em um anel plano formado por sete domínios: seis domínios AAA acrescidos do domínio C-terminal da cadeia pesada; dessa forma, ela é um parente complexo das ATPases hexaméricas discutidas no Capítulo 6 (ver Figura 6-91). Uma região de ligação em gancho conecta a cauda da cadeia pesada ao domínio AAA que é mais ativo como ATPase. Entre os domínios de número quatro e cinco existe um domínio de cadeia pesada que forma uma longa haste supertorcida antiparalela. Esta haste se estende da parte superior do anel e

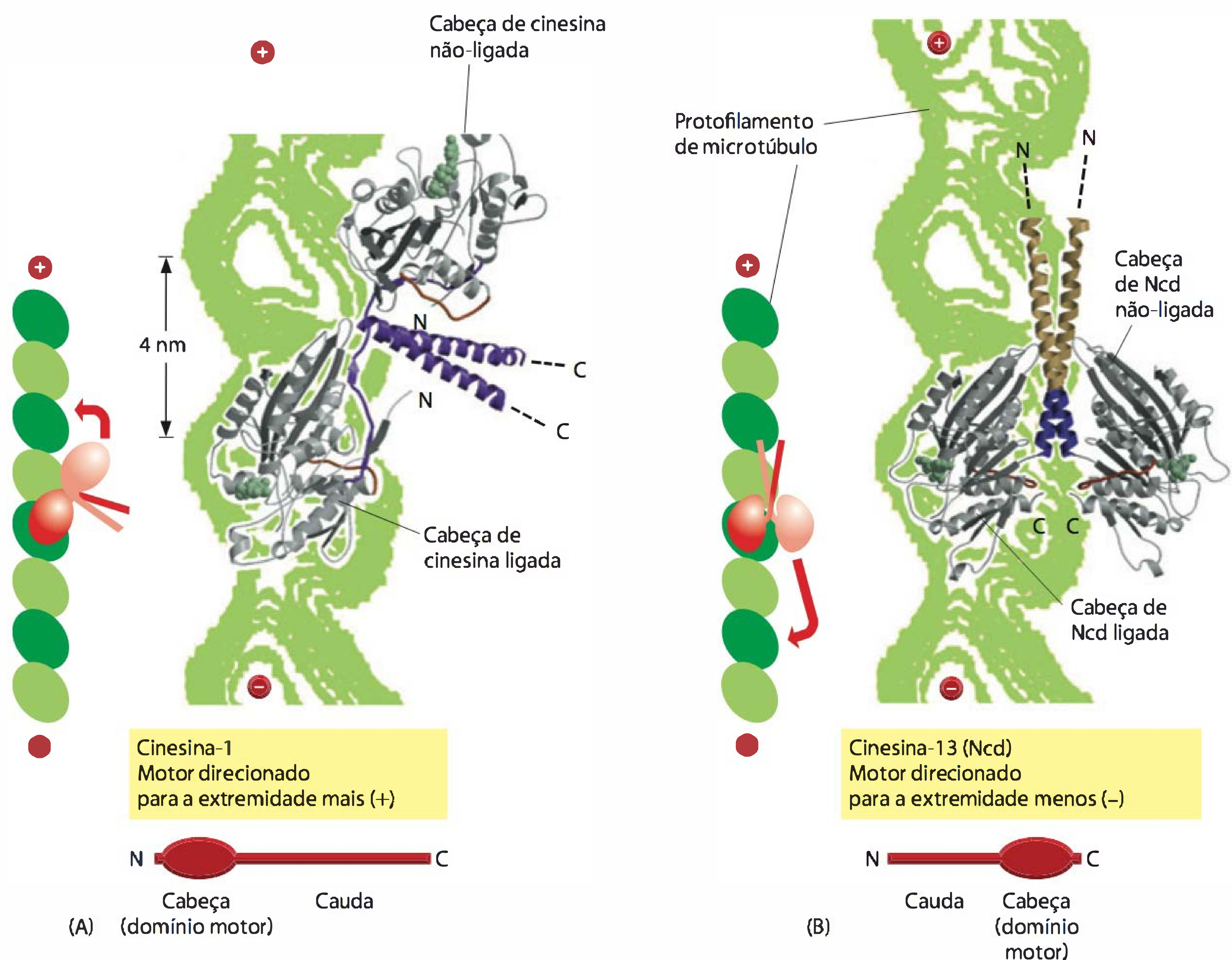


Figura 16-63 Orientação da direção do movimento (para a frente e para trás) das proteínas da superfamília das cinases ligadas aos microtúbulos. Estas imagens foram geradas encaixando-se as estruturas de dímeros de proteínas motoras livres (determinadas por cristalografia) sobre imagens de baixa resolução de dímeros ligados a microtúbulos (determinadas por microscopia crioeletrônica). (A) A cinesina-1 (cinesina convencional) tem seu domínio motor localizado na extremidade N-terminal da proteína e movimenta-se em direção à extremidade mais (+) do microtúbulo. Quando uma cabeça do dímero está ligada ao microtúbulo em um estado pós-movimento de potência (com ATP em seu sítio de ligação a nucleotídeos), a segunda cabeça, não-ligada, está apontando para a extremidade mais (+) do microtúbulo, pronta para o próximo passo. (B) A cinesina-13 (denominada Ncd, em *Drosophila*), uma proteína motora que se movimenta rumo à extremidade menos (–), tem seu domínio motor C-terminal e forma dímeros com orientação oposta. (De E. Sablin et al., *Nature* 395:813-816, 1998. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

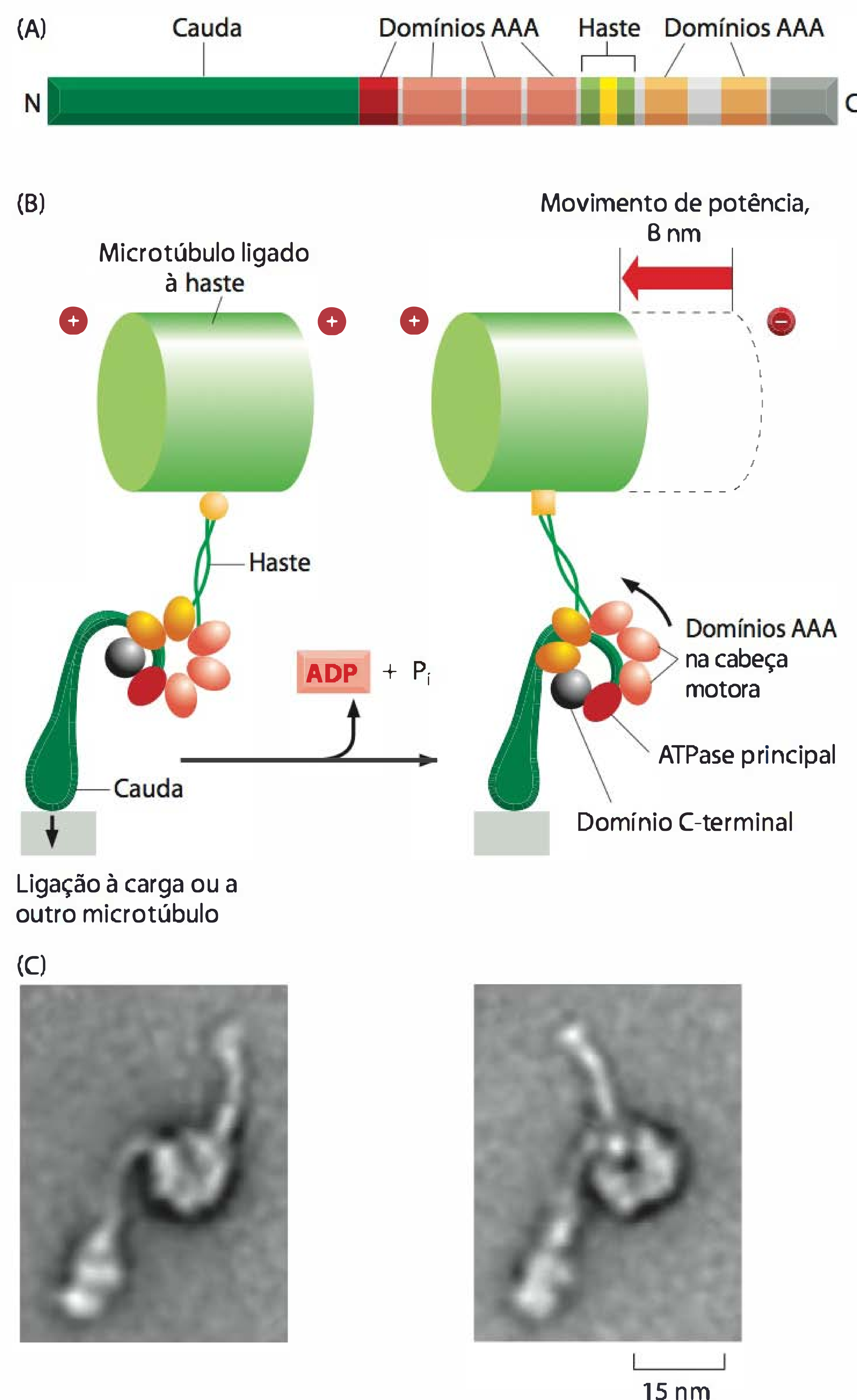


Figura 16-64 Movimento de potência da dineína. (A) A organização dos domínios em cada cadeia pesada da dineína. Esta é uma molécula bastante grande que contém aproximadamente 5.000 aminoácidos. O número de cadeias pesadas em uma dineína é igual ao número de cabeças motoras. (B) A dineína c é uma dineína monomérica de flagelo encontrada na alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. A grande cabeça motora da dineína é composta por um anel plano que contém um domínio C-terminal (em *cinza*) e seis domínios AAA, quatro dos quais contendo sequência de ligação a ATP, mas um único deles (em *vermelho escuro*) responsável principal pela atividade ATPase. Estendendo-se a partir da cabeça encontram-se uma longa haste supertorcida com um sítio de ligação ao microtúbulo em sua extremidade, e uma cauda com sítio de ligação a moléculas carga. Sob o estado ligado a ATP, a haste está desconectada do microtúbulo, e a hidrólise de ATP provoca a ligação entre haste e microtúbulo. A subsequente liberação de ADP e P_i leva à extensa alteração conformacional "movimento de potência" envolvendo a rotação da cabeça e da haste em relação à cauda. Cada ciclo gera um passo de aproximadamente 8 nm sobre o microtúbulo, em direção à extremidade menos (–). (C) Microfotografia eletrônica de dineínas purificadas sob duas diferentes conformações representando diferentes passos do ciclo mecanoquímico. (B, de S. A. Burgess et al., *Nature* 421:715-718, 2003. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

possui em sua extremidade um sítio de ligação a microtúbulo regulado por hidrólise de ATP. O "movimento de potência" da dineína é ocasionado pela liberação de ADP e fosfato inorgânico e faz com que o anel sofra uma rotação em relação à cauda (**Figura 16-64**).

Apesar de tanto a miosina quanto a cinesina e a dineína desenvolverem ciclos mecanoquímicos análogos, a natureza exata do acoplamento entre os ciclos mecânicos e químicos é diferente em cada caso. Por exemplo, a miosina sem qualquer nucleotídeo está fortemente ligada ao seu caminho de actina, sob um estado denominado "rigor", sendo liberada desse caminho pela associação com ATP. Em contraste, a cinesina forma uma forte associação em estado semelhante ao rigor com o microtúbulo quando ATP está ligado a ela, sendo a hidrólise de ATP que promove a liberação entre proteína motora e filamento. O ciclo mecanoquímico da dineína é mais semelhante ao da miosina do que ao da cinesina, pois a dineína livre de nucleotídeos está fortemente ligada ao microtúbulo e é liberada quando ocorre ligação de ATP. No entanto, no caso da dineína, o fosfato inorgânico parece ser liberado ao mesmo tempo, provocando a alteração de conformação que gera o movimento de potência, ao passo que, no caso da miosina, o fosfato é liberado antes e o movimento de potência só ocorre após a subsequente dissociação de ADP da cabeça da proteína motora.

Desse modo, as proteínas motoras trabalham de forma análoga às proteínas de ligação a GTP, exceto pelo fato de que, em proteínas motoras, as pequenas alterações proteicas conformacionais (poucos décimos de nanômetro) associadas à hidrólise de nucleotídeos são amplificadas por domínios proteicos especiais – o braço de alavanca, no caso da miosina, a ligação, no caso da cinesina, e o anel e a haste, no caso da dineína – para gerar alterações conformacionais de grande escala (vários nanômetros) capazes de mover as proteínas motoras, passo–a–passo, sobre seu caminho de filamentos. A analogia entre as GTPases e as proteínas motoras do citoesqueleto foi recentemente ampliada pela observação de que uma das proteínas de ligação a GTP – o fator G de alongamento de bactérias – transforma a energia química da hidrólise de GTP em um movimento direcional da molécula de mRNA no ribossomo.

A cinética das proteínas motoras é adaptada às funções da célula

As proteínas motoras das superfamílias da miosina e da cinesina exibem uma diversidade marcante de suas propriedades motrizes, muito além da simples escolha de diferentes trilhas de polímero. Digno de nota, um único dímero de cinesina convencional apresenta uma enorme capacidade de *progressão*, viajando por centenas de ciclos de ATPase sobre um microtúbulo, sem que ocorra dissociação. A miosina II de músculo esquelético, em contraste, não se movimenta progressivamente, fazendo apenas um ou dois passos sobre o filamento de actina antes de dissociar-se. Essas diferenças são críticas para as várias funções biológicas das proteínas motoras. Um pequeno número de moléculas de cinesina-1 deve ser capaz de transportar uma organela ao longo de todo o percurso de um axônio de célula neuronal e, portanto, necessita de um alto nível de progressividade. A miosina de músculo esquelético, em contraste, nunca opera como uma molécula isolada, mas como parte integrante de um grande agrupamento de moléculas de miosina II em um filamento espesso. Nesse caso, a progressividade iria na verdade inibir a função biológica, pois uma contração muscular eficiente necessita que cada cabeça de miosina realize seu movimento de potência e, então, rapidamente libere o caminho, evitando interferir na ação das outras subunidades de miosina ligadas ao mesmo filamento de actina.

Existem duas razões para o alto grau de progressividade do movimento da cinesina-1. A primeira é que os ciclos mecanoquímicos das duas cabeças motoras de um dímero de cinesina estão coordenados entre si, de tal modo que uma cabeça de cinesina não se solta enquanto a outra não estiver próxima a ligar-se. Essa coordenação permite que a proteína motora atue em um sistema passo-a-passo, nunca permitindo que a organela transportada extravie-se do caminho de microtúbulos. Em contraste, não existe coordenação aparente entre as cabeças de miosina no dímero de miosina II. A segunda razão para a alta progressividade do movimento da cinesina-1 é que esta despende uma fração relativamente grande de seu ciclo de ATPase fortemente associada ao microtúbulo. Tanto para a cinesina-1 quanto para a miosina II, as alterações conformacionais que produzem o empuxo (movimento de potência) gerador da força de trabalho devem ocorrer enquanto a proteína motora estiver fortemente associada ao seu polímero, e o movimento de recuperação preparatório para o próximo passo deve ocorrer quando a proteína encontrar-se dissociada dele. Contudo, a miosina II passa apenas aproximadamente 5% do tempo de seu ciclo de ATPase em estado de forte ligação e encontra-se dissociada no tempo restante.

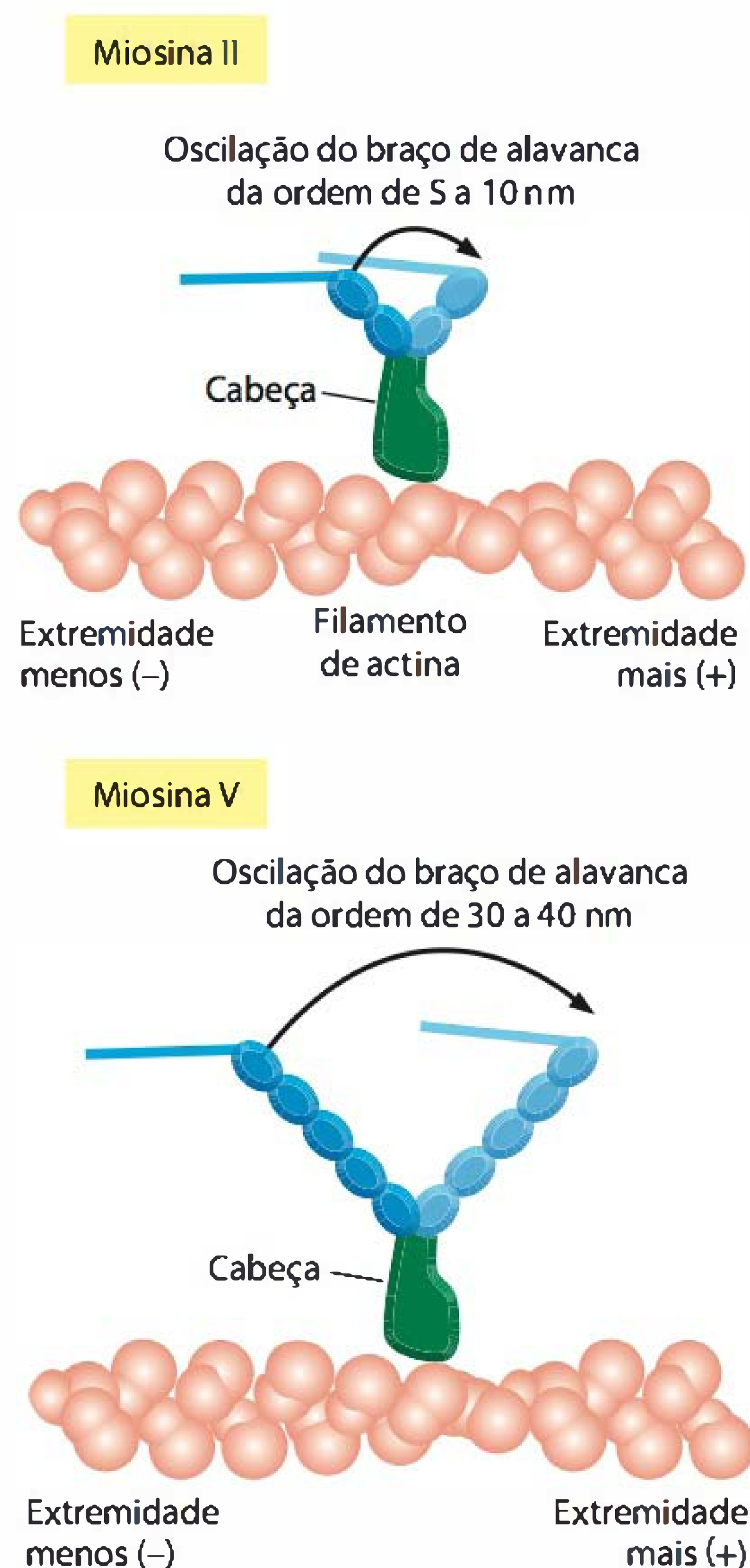


Figura 16-65 O efeito do comprimento do braço de alavanca no tamanho do passo dado por uma proteína motora. O braço de alavanca da miosina II é muito mais curto do que o da miosina V. O movimento de potência que atua sobre a cabeça provoca um giro nos braços de alavanca que segue o mesmo ângulo em ambas as proteínas. Consequentemente, a miosina V é capaz de dar passos maiores do que os passos dados pela miosina II.

O que a miosina perde em capacidade de progressão, ela ganha em velocidade; em um arranjo onde muitas cabeças motoras estão interagindo com o mesmo filamento de actina, um grupo de miosinas ligado pode mover o filamento a uma distância total equivalente a 20 passos no período de tempo de um único ciclo, enquanto as cinesinas podem mover apenas dois passos. Assim, a miosina II tipicamente pode conduzir o deslizamento do filamento muito mais rapidamente do que as cinesinas, mesmo considerando-se que essas duas proteínas motoras possuem taxas de hidrólise de ATP comparáveis e são capazes de dar passos moleculares de tamanho semelhante. Tal capacidade é de importância extrema para a rápida contração da musculatura esquelética, como discutiremos mais tarde.

Dentro de cada classe de proteínas motoras, a velocidade de movimento varia bastante, de 0,2 a 60 μm/seg para as miosinas e de 0,02 a 2 μm/seg para as cinesinas. Essas diferenças acontecem em razão de uma sintonia fina do ciclo mecanoquímico. O número de passos que uma proteína motora individualmente pode dar em um dado tempo e, consequentemente, sua velocidade, pode ser diminuído tanto pela diminuição da taxa de ATPase intrínseca da proteína motora quanto pelo aumento da proporção de tempo do ciclo que esta despende ligada ao filamento. Por exemplo, a miosina V (que atua como uma proteína motora progressiva de vesículas) passa até 90% do ciclo do nucleotídeo fortemente associada ao filamento de actina, em contraste aos 5% da miosina II. Além disso, uma proteína motora pode evoluir para alterar o tamanho de cada passo tanto pela alteração do tamanho do braço de alavanca (p. ex., o braço de alavanca da miosina V é aproximadamente três vezes mais comprido do que o da miosina II) quanto pela alteração do ângulo através do qual a hélice se movimenta (**Figura 16-65**). Cada um destes parâmetros apresenta uma pequena variação entre os diferentes membros das famílias da miosina e da cinesina, correspondente a pequenas diferenças na sequência proteica e/ou na estrutura.

Assume-se que o comportamento de cada proteína motora, cuja função é determinada pela identidade da carga associada ao seu domínio terminal de cauda, tenha sofrido um ajuste fino durante a evolução para a velocidade e progressividade de acordo com as necessidades específicas da célula, em relação a um membro específico da família. Apesar de existirem muitos membros diferentes das famílias de miosinas e cinesinas em uma célula

eucariótica determinada, nesta mesma célula em geral se encontra apenas uma forma de dineína citoplasmática. Ainda não foi determinado como, ou mesmo se é possível, modificar as propriedades mecânicas da dineína citoplasmática em resposta às diferentes necessidades da célula.

As proteínas motoras medeiam o transporte intracelular de organelas delimitadas por membrana

Uma função primordial das proteínas motoras do citoesqueleto em células interfásicas é o transporte e o posicionamento de organelas delimitadas por membrana. A cinesina foi originalmente identificada como a proteína responsável pelo transporte veloz em axônios, pelo rápido movimento de mitocôndrias, precursores de vesículas secretoras e diversos componentes sinápticos ao longo do grande caminho de microtúbulos do axônio em direção às distantes terminações nervosas. Apesar de as organelas da maioria das células não necessitarem percorrer distâncias tão longas, seu transporte polarizado é igualmente necessário. Um típico arranjo de microtúbulos em uma célula em interfase está orientado com suas extremidades menos próximas ao centro da célula, no centrossomo, e suas extremidades mais estendendo-se para a periferia da célula. Assim, movimentos centrípetos de organelas ou vesículas em direção ao centro da célula necessitam da ação de proteínas motoras direcionadas às extremidades menos, como é o caso da dineína citoplasmática, ao passo que movimentos centrífugos em direção à periferia necessitam da ação de proteínas motoras direcionadas às extremidades mais, como é o caso das cinesinas.

O efeito dos microtúbulos e dos motores de microtúbulos no comportamento das membranas intracelulares é melhor exemplificado por sua atuação junto à organização do retículo endoplasmático (RE) e do aparelho de Golgi. A rede de membranas tubulares do RE alinha-se com microtúbulos e se estende quase que até a borda da célula, enquanto o aparelho de Golgi localiza-se próximo ao centrossomo. Quando células são tratadas com uma substância que despolimeriza microtúbulos, como a colchicina ou o nocodazol, o RE colapsa para o centro da célula e o aparelho de Golgi sofre fragmentação e dispersão pelo citoplasma (**Figura 16-66**). *In vitro*, as cinesinas podem direcionar membranas derivadas do RE para segmentos pré-formados de microtúbulos e rumar para as extremidades mais desses microtúbulos, arrastando as membranas de RE em protrusões tubulares e formando uma teia membranosa bastante semelhante ao RE de uma célula viva. De forma semelhante, o movimento de túbulos do RE para a periferia está associado ao crescimento de microtúbulos em células vivas. Em oposição, as dineínas são necessárias para o posicionamento do aparelho de Golgi próximo ao centro celular, movendo as vesículas de Golgi através dos caminhos de microtúbulos em direção às extremidades menos que se encontram no centrossomo.

As diferentes caudas e suas cadeias leves associadas, em determinadas proteínas motoras, permitem que estes motores se liguem à organela a ser carregada de forma específica. Assim, receptores motores associados a membranas que são direcionados para compartimentos delimitados por membrana específicos interagem direta ou indiretamente com as caudas dos membros apropriados da família das cinesinas. Um destes receptores parece ser a proteína precursora amiloide (APP, *amyloid precursor protein*), a qual se liga diretamente à cadeia leve na cauda da cinesina-1 e foi proposta como um receptor transmembrana de proteínas motoras em axônios de células neuronais. O processamento anormal dessa proteína dá origem à doença de Alzheimer, pela alta produção de proteína estável que forma agregados nas células nervosas do cérebro (ver Figura 6-95). Outros receptores para cinesinas específicas foram identificados tanto no RE como em diversas outras organelas liga-

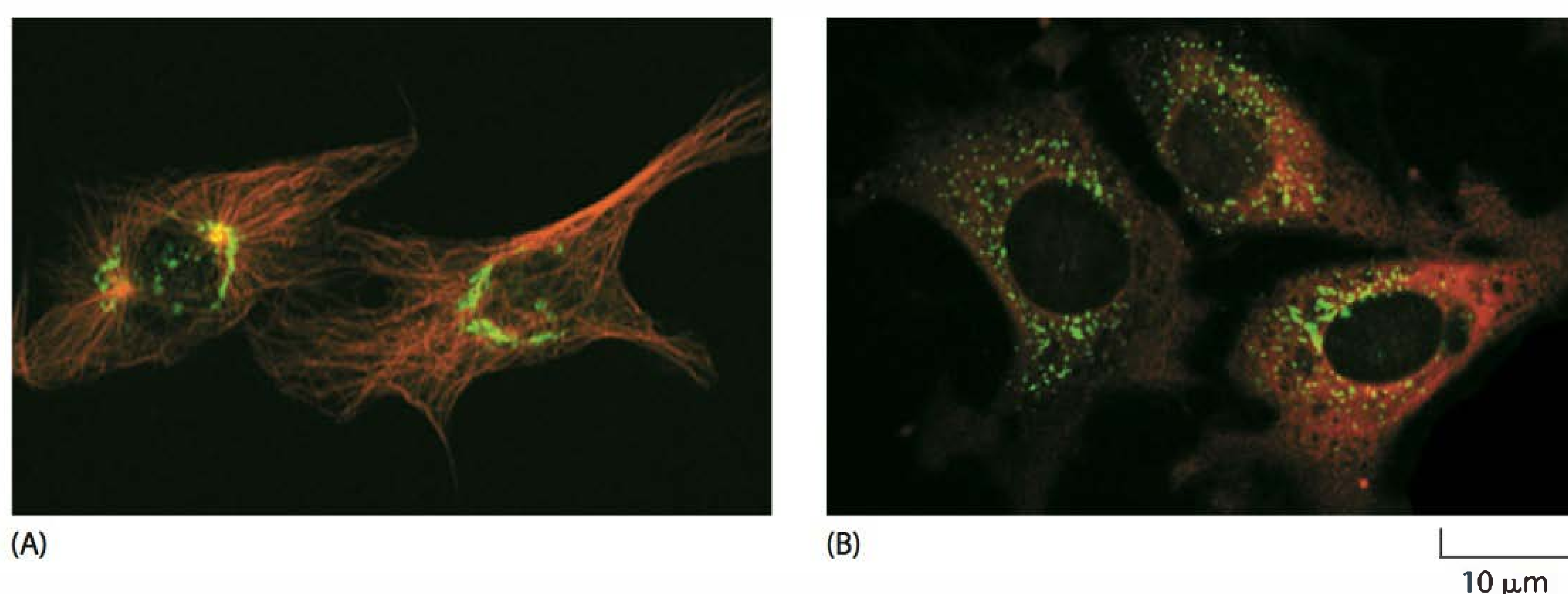


Figura 16-66 Efeito da despolimerização de microtúbulos sobre o aparelho de Golgi. (A) Nesta célula endotelial, os microtúbulos estão marcados em *vermelho* e o aparelho de Golgi em *verde* (pelo uso de anticorpos dirigidos contra proteínas do Golgi). Enquanto o sistema de microtúbulos encontra-se intacto, o aparelho de Golgi se localiza próximo ao centrossomo, perto do núcleo, na região central da célula. A célula à *direita* está em interfase, contendo um único centrossomo. A célula à *esquerda* está em prófase, e os centrossomos duplicados moveram-se para lados opostos do núcleo. (B) Após exposição a nocodazol, o qual provoca a despolimerização de microtúbulos (ver Tabela 16-2), o aparelho de Golgi sofre fragmentação e encontra-se disperso no citoplasma da célula. (Cortesia de David Shima.)

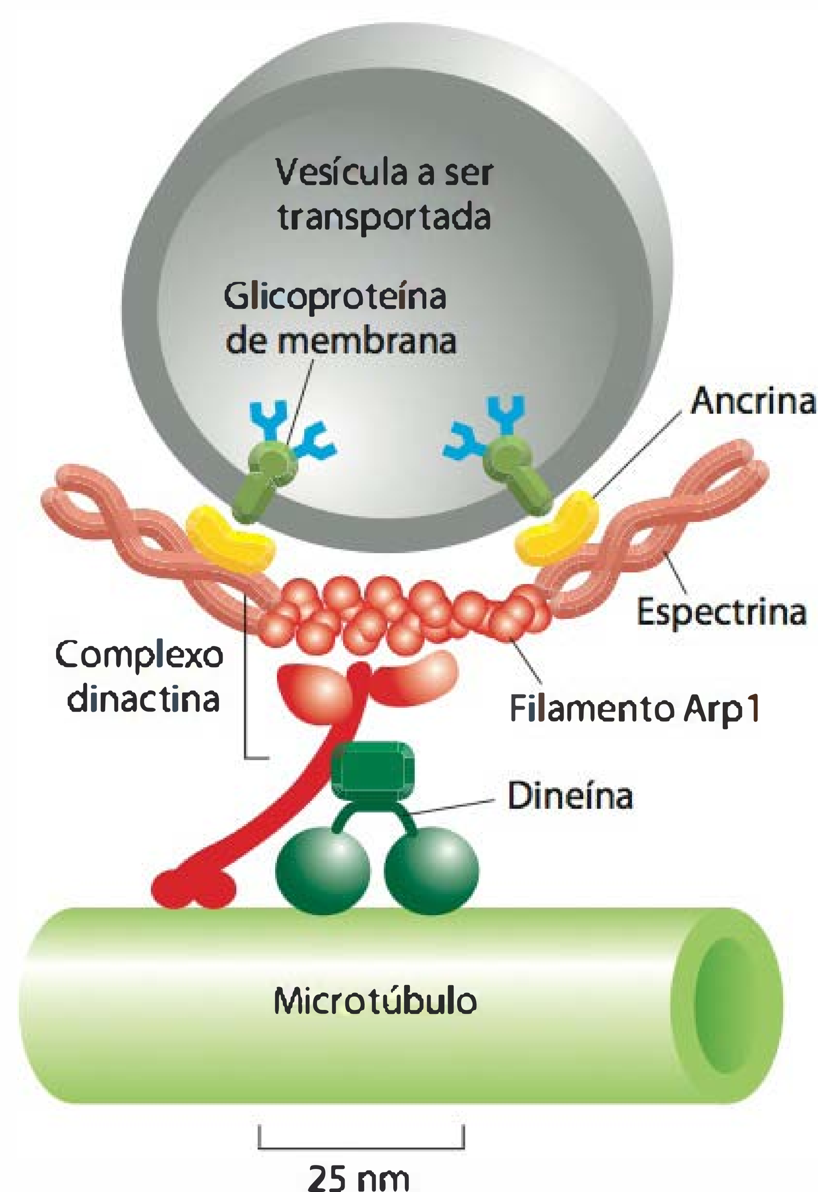


Figura 16-67 Modelo de ligação da dineína a uma organela delimitada por membrana. A dineína necessita da presença de um grande número de proteínas acessórias para associar-se a organelas delimitadas por membrana. A dinactina é um grande complexo (em *vermelho*) que inclui componentes que se ligam fracamente a microtúbulos, componentes que se ligam à dineína e componentes que formam pequenos filamentos semelhantes à actina compostos pela proteína relacionada à actina Arp1. Acredita-se que o filamento Arp1 possa mediar a ligação deste grande complexo a organelas delimitadas por membrana por uma rede de espectrina e ancrina, de modo semelhante ao citoesqueleto associado à membrana das células vermelhas sanguíneas (ver Figura 10-41).

das à membrana que dependem do transporte com base em microtúbulos para seu correto posicionamento. As proteínas que interagem com JNK (JIPs, *JNK-interacting proteins*) são proteínas estruturais associadas à sinalização celular. Estes receptores de cinesina podem fornecer uma conexão entre o transporte e a sinalização celular.

No caso da dineína, um grande arranjo macromolecular geralmente medeia a ligação a membranas. A dineína citoplasmática, que é por si só um enorme complexo proteico, necessita da associação de um segundo grande complexo proteico conhecido por *dinactina* para a efetiva translocação de organelas. O complexo da dinactina inclui um curto filamento semelhante à actina formado a partir da proteína relacionada à actina Arp1 (distinta de Arp2 e Arp3, componentes do complexo ARP envolvido na nucleação de filamentos convencionais de actina). As membranas do aparelho de Golgi estão recobertas pelas proteínas ancrina e espectrina, as quais têm como função proposta a associação com o filamento Arp1 no complexo da dinactina para a formação de um arranjo plano do citoesqueleto, semelhante ao citoesqueleto da membrana eritrocitária (ver Figura 10-41). O arranjo de espectrina provavelmente fornece estabilidade estrutural para a membrana do Golgi e – via filamento Arp1 – pode mediar a ligação regulada da dineína à organela (**Figura 16-67**). Em outras situações, os motores de dineína citoplasmática devem interagir diretamente com suas cargas. A cauda citoplasmática da rodopsina, uma proteína de detecção de luz encontrada nos bastonetes do olho, liga-se diretamente a uma das cadeias leves da dineína, e essa interação é necessária ao transporte adequado da rodopsina no bastonete.

As proteínas motoras também têm uma função importante no transporte de organelas ao longo dos filamentos de actina. A primeira miosina descrita como estando envolvida no movimento de organelas foi a miosina V, uma miosina com dois domínios globulares e grande tamanho de passo (ver Figura 16-65). Em camundongos e em humanos, grânulos de pigmento delimitados por membrana, chamados de *melanossomos*, são sintetizados em células chamadas de *melanócitos*, localizadas abaixo da superfície da pele. Estes melanossomos movimentam-se para as extremidades dos processos dendríticos nos melanócitos, a partir dos quais são liberados para os queratinócitos adjacentes, os quais formam a pele (e os pelos em camundongos). A miosina V está associada à superfície dos melanossomos (**Figura 16-68**) e é capaz de mediar o movimento, com base em actina, dessas estruturas *in vitro*. Em camundongos, mutações no gene da miosina V resultam em um fenótipo "diluído", no qual a coloração do pelo parece desbotada, pois os melanossomos não são eficientemente entregues para os queratinócitos. Outras miosinas, como a miosina I, estão associadas a endossomos e a uma ampla variedade de outras organelas.

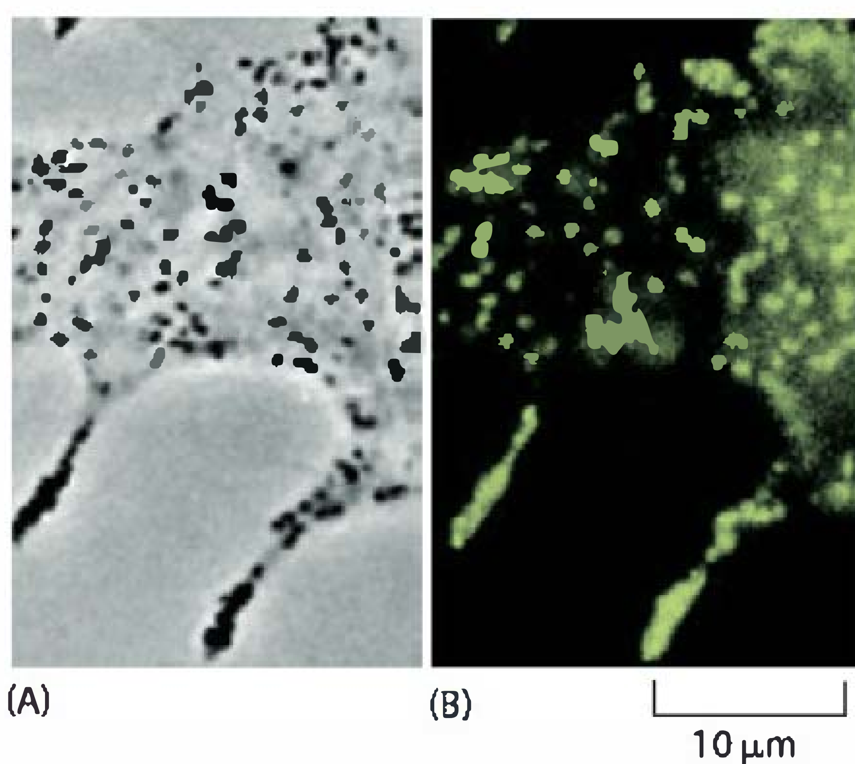


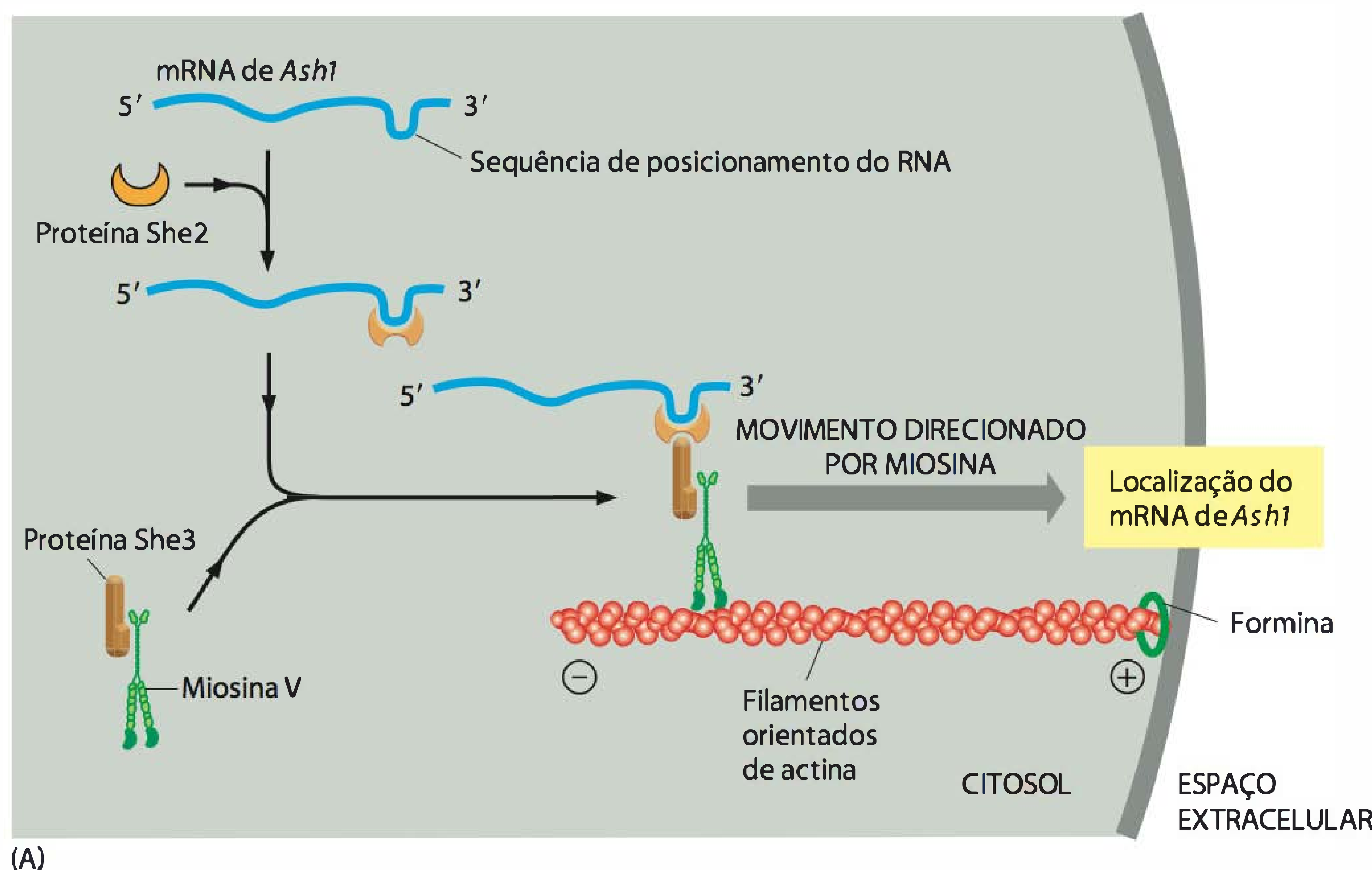
Figura 16-68 A miosina V nos melanossomos. (A) Imagem em contraste de fase de uma porção de um melanócito isolado de camundongo. Os pontos escuros são melanossomos, organelas delimitadas por membrana e preenchidas pelo pigmento da pele, melanina. (B) A mesma célula corada com anticorpos fluorescentes antimiosina V. Cada melanossomo está associado a uma grande quantidade de cópias desta proteína motora. (De X. Wu et al., J. *Cell Sci.* 110:847-859, 1997. Com permissão de The Company of Biologists.)

O citoesqueleto posiciona moléculas específicas de RNA

Com o objetivo de concentrar proteínas em seus pontos de funcionamento, as células restringem a síntese de uma determinada proteína pelo posicionamento de suas moléculas de RNA em um processo que estabelece assimetrias celulares. Essa situação é especialmente importante quando uma célula parental se divide para dar origem a duas células-filhas com destinos distintos. Em um outro exemplo, diversos mRNAs codificadores de proteínas envolvidas na sinapse são especificamente posicionados próximos às sinapses de diversos neurônios, e existem evidências de que o posicionamento de mRNA e a regulação da tradução em regiões de sinapse desempenham importantes papéis na regulação da memória de longo prazo e na plasticidade sináptica. Como era de se esperar, o citoesqueleto e as proteínas motoras do citoesqueleto são utilizados para transportar e posicionar as moléculas de mRNA nestas situações.

O oócito gigante de *Drosophila* posiciona em sítios específicos um grande número de mRNAs codificados pela mãe na antecipação dos rápidos eventos de especiação celular que ocorrem na embriogênese inicial. Um grupo de mRNAs que codifica proteínas necessárias ao desenvolvimento adequado da região posterior do embrião encontra-se posicionado na região posterior do oócito, e um grupo distinto de mRNAs que codifica proteínas necessárias à especialização de estruturas anteriores do embrião encontra-se localizado na região anterior do oócito.

O oócito faz uso de seu citoesqueleto de microtúbulos polarizados, onde a maioria das extremidades menos dos microtúbulos encontra-se agrupada na região anterior da célula e a maioria das extremidades mais encontra-se na região posterior, para estabelecer esta distribuição especializada de mRNAs. Por exemplo, o mRNA que codifica Bicoid, um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento anterior, tem uma estrutura em 3' UTR que se liga a uma proteína denominada Swallow, a qual, por sua vez, liga-se a uma cadeia leve da dineína citoplasmática, provavelmente permitindo seu transporte rumo às extremidades



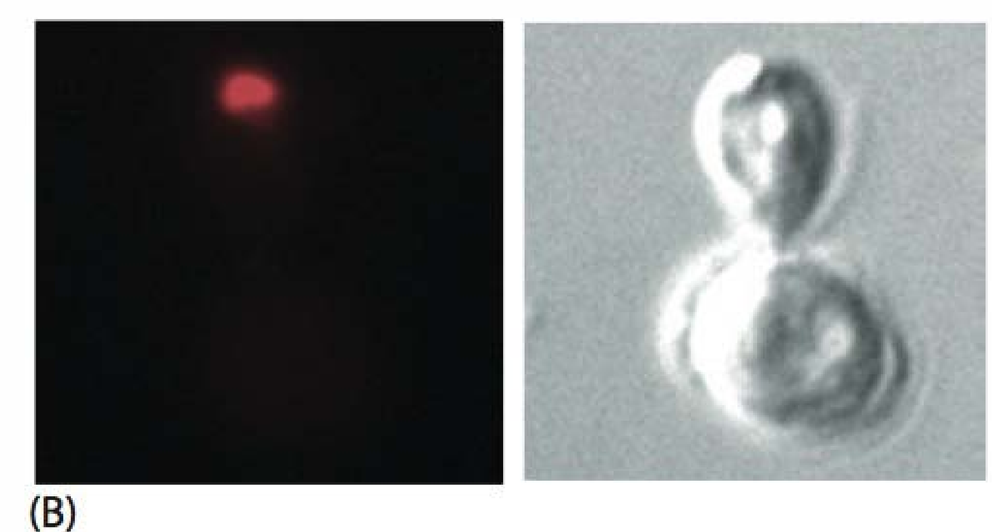


Figura 16-69 Localização polarizada do mRNA na extremidade do broto de levedura. (A) O mecanismo molecular de posicionamento de mRNA de *Ash1*, conforme determinação genética e bioquímica. (B) Nesta célula de levedura em divisão usou-se a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) para a localização de mRNA de *Ash1* (em *vermelho*). O mRNA está confinado à extremidade mais (+) distante da célula-filha (na foto ainda sob a forma de um grande broto). A proteína Ash1, transcrita a partir deste mRNA polarizado também está confinada à célula-filha. (B, cortesia de Peter Takizawa e Ron Vale.)

menos dos microtúbulos, na região anterior da célula. Como contraponto, o mRNA que codifica Oskar, uma proteína necessária ao desenvolvimento de células germinativas na região posterior do embrião, necessita de cinesina-1 para dirigir seu transporte rumo às extremidades mais dos microtúbulos. O ancoramento dos mRNAs a seus locais adequados após a entrega mediada pelos microtúbulos parece envolver o citoesqueleto cortical de actina. Por exemplo, o mRNA que codifica Oskar liga-se diretamente a uma proteína de ligação à actina denominada moesina, que é um dos membros da família ERM.

Em algumas células, tanto o transporte de mRNA como seu ancoramento é dependente de actina. A levedura-mãe e as células-filhas vão apresentar identidades distintas, como pode ser revelado por diferenças significantes em sua capacidade subsequente em realizar trocas do tipo de cruzamento (discutido no Capítulo 7) e na escolha da próxima região de brotamento. Muitas dessas diferenças são causadas por uma proteína reguladora de genes chamada de *Ash1*. Tanto o mRNA quanto a proteína derivada de *Ash1* estão localizados exclusivamente no broto de crescimento e, portanto, estarão presentes apenas na célula-filha. Uma das duas miosinas do tipo V encontrada em levedura, Myo4p, é necessária para esta distribuição assimétrica do mRNA de *Ash1*. Uma triagem genética para outras mutações que interferem nas diferenças entre mãe/filha revelou que pelo menos seis outros produtos gênicos associados ao citoesqueleto são necessários à polaridade normal; nestes, incluem-se tanto uma das forminas, a tropomiosina, a profilina e a própria actina, como um complexo de duas proteínas que formam uma ligação direta entre a sequência específica do mRNA de *Ash1* e a proteína miosina V (**Figura 16-69**).

As células regulam o funcionamento das proteínas motoras

A célula pode regular a atividade das proteínas motoras e, dessa forma, provocar alterações no posicionamento de organelas delimitadas por membrana e nos movimentos da célula como um todo. Um dos mais drásticos exemplos dessa regulação é dado pelos melanócitos de peixes. Estas células gigantes, responsáveis por rápidas mudanças na coloração da pele de várias espécies de peixes, contêm grandes grânulos de pigmento que podem alterar sua localização em resposta a estímulos neuronais ou hormonais (**Figura 16-70**). Estes grânulos de pigmento se agregam ou se dispersam movendo-se sobre uma ampla rede de microtúbulos. As extremidades menos destes microtúbulos são nucleadas pelo centrossomo e estão localizadas no centro da célula, enquanto as extremidades mais estão distribuídas pela periferia celular.

Observando-se o movimento de grânulos individuais de pigmento (**Figura 16-71**), é possível dizer que o movimento em direção ao centro da célula é rápido e uniforme, enquanto o movimento rumo à periferia é mais irregular, aos solavancos e frequentemente apresentando passos retrógrados. Tanto as proteínas motoras de microtúbulo, dineína e cinesina, quanto a proteína motora da actina, miosina V, estão associadas aos grânulos de pigmento. O movimento aos solavancos em direção à periferia é, aparentemente, o resultado de um cabo-de-guerra entre as duas proteínas motoras de microtúbulo, sendo a cinesina mais forte e vencedora na média geral. Quando as cadeias leves da cinesina são fosforiladas, após uma estimulação hor-

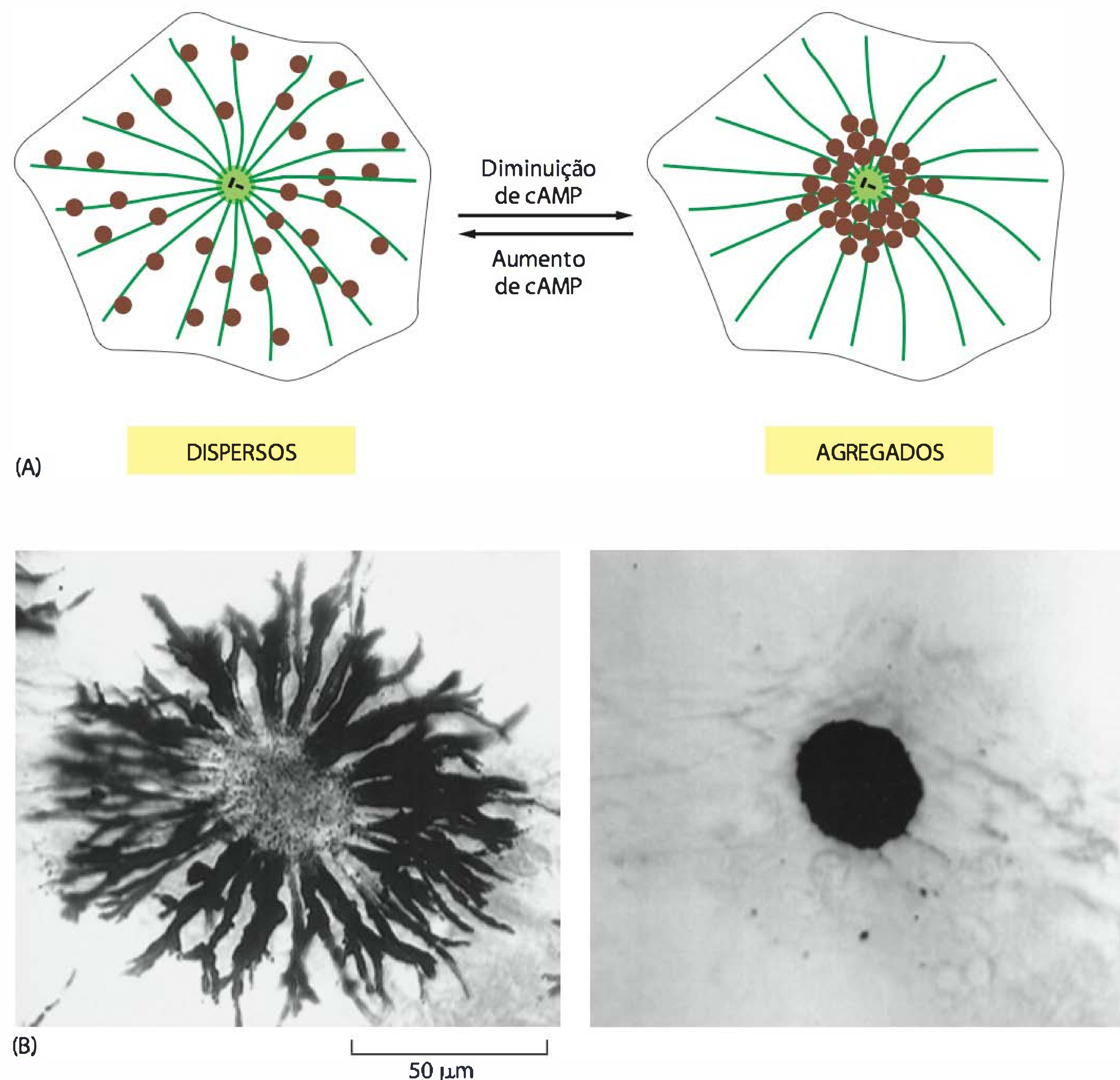
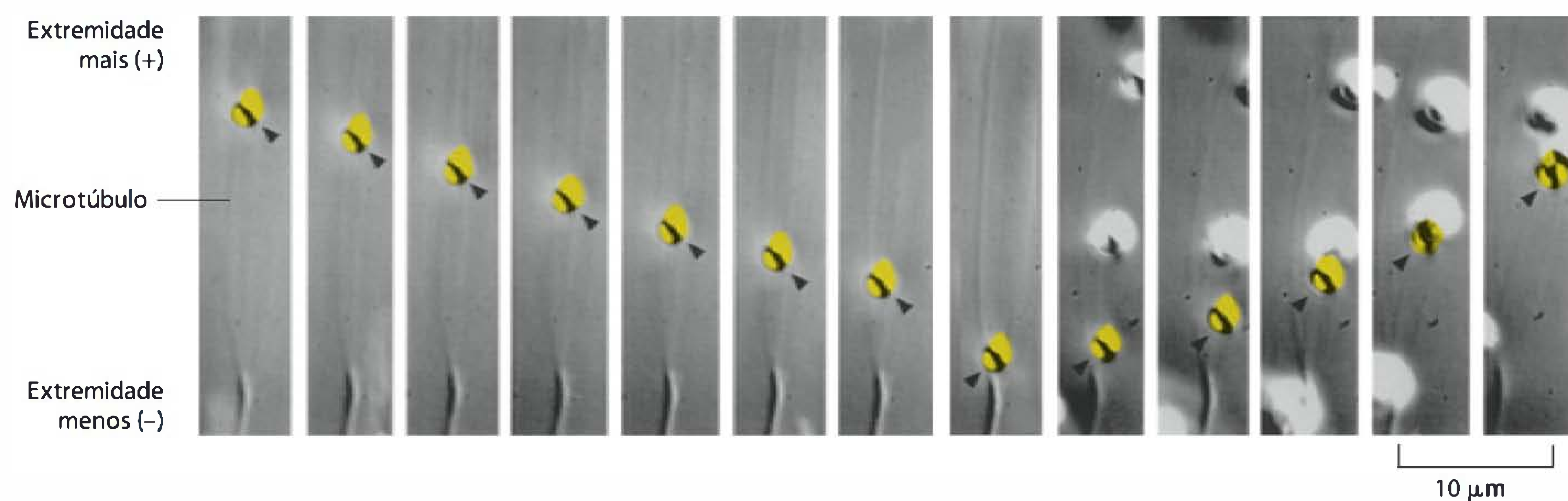


Figura 16-70 Os movimentos regulados dos melanossomos em células pigmentares de peixes. Estas células gigantes, responsáveis por mudanças na coloração da pele em diversas espécies de peixes, contêm grandes grânulos de pigmentos, ou melanossomos (em *marrom*). Os melanossomos podem mudar sua localização na célula em resposta a estímulos hormonais e neuronais. (A) Diagramas de uma célula pigmentar mostrando a dispersão e a agregação dos melanossomos em resposta, respectivamente, a um aumento ou a uma diminuição intracelular de AMP cíclico (cAMP). Esta redistribuição ocorre ao longo dos microtúbulos. (B) Imagens em campo claro de uma célula isolada a partir de uma escama de peixe ciclídio africano mostrando seus melanossomos dispersos no citoplasma (à *esquerda*) ou agregados no centro da célula (à *direita*). (B, cortesia de Leah Haimo.)

monal que sinaliza para troca da cor da pele, a cinesina é inativada, deixando a dineína livre para carregar rapidamente os pigmentos para o centro da célula e, consequentemente, para alterar a coloração do peixe. De forma semelhante, o movimento de outras organelas revestidas por proteínas motoras específicas é controlado por um balanço complexo entre sinais competitivos que regulam tanto a ligação quanto a atividade destas proteínas motoras.

A célula também pode utilizar fosforilação para regular a atividade da miosina. Em células não-musculares, a miosina II pode ser fosforilada em uma ampla variedade de sítios tanto em suas cadeias pesadas quanto nas leves, o que afetará tanto a atividade motora quanto a montagem de filamentos espessos. Nessas células, a miosina II pode ocorrer sob dois estados conformacionais diferentes, um estado estendido, capaz de formar filamentos bipolares, e um estado curvado, no qual o domínio da cauda parece interagir com a cabeça motora. A fosforilação da cadeia leve reguladora por uma *cinase de cadeia leve de miosina* (*MLCK, myosin light-chain kinase*) dependente de cálcio faz com que a miosina II preferencialmente assuma o estado estendido, o que promove a sua associação em um filamento bipolar e leva à contração celular (**Figura 16-72**). A MLCK também é ativada durante a mitose, fazendo com que a miosina II se organize em anéis contráteis com base em actina que são responsáveis pela divisão da célula mitótica em duas células filhas. Como discutiremos a seguir, a fosforilação de miosina também é um importante componente no controle da contração em

Figura 16-71 Movimento bidirecional de um melanossomo sobre um microtúbulo. Um melanossomo isolado (em *amarelo*) move-se sobre um microtúbulo em uma lâmina de vidro, da extremidade mais (+) para a extremidade menos (–). Na metade da sequência de vídeo representada, o melanossomo abruptamente inverte o sentido de seu movimento, rumando em direção à extremidade mais (+). (De S. L. Rogers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3720-3725, 1997. Com permissão de National Academy of Sciences.)



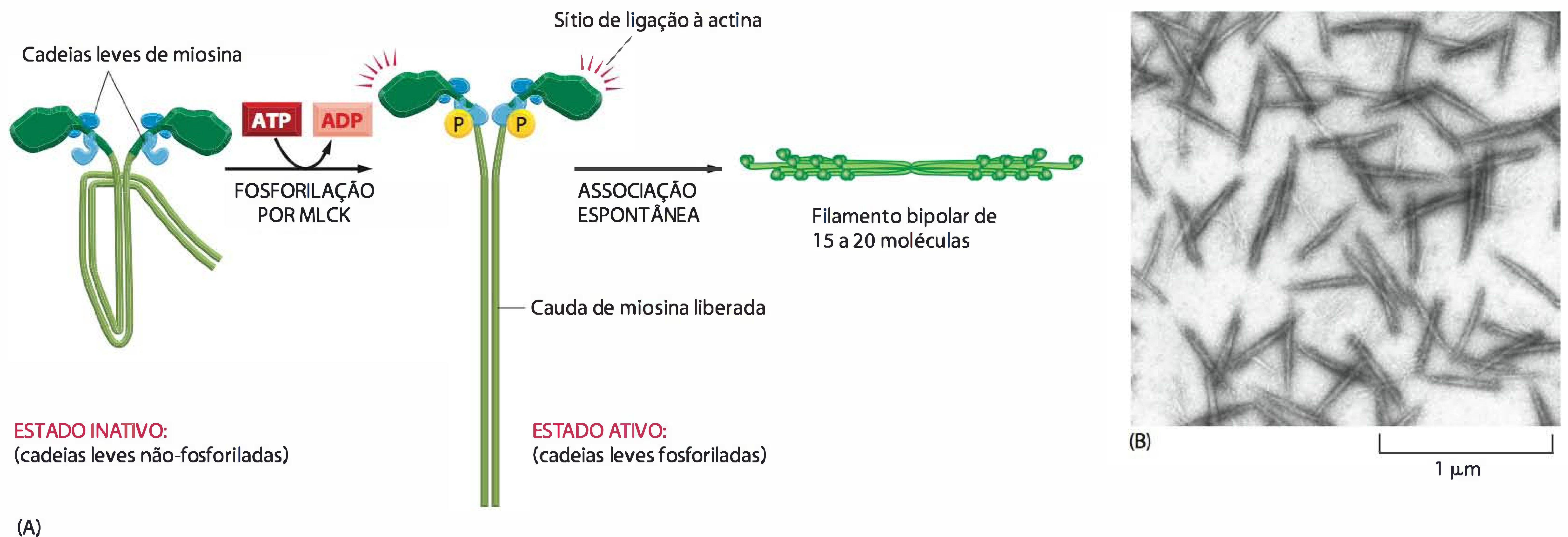


Figura 16-72 A fosforilação da cadeia leve e a regulação da montagem de miosina II em filamentos espessos. (A) A fosforilação controlada pela enzima cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) de uma das duas cadeias leves (a chamada cadeia leve reguladora, mostrada em *azul claro*) em miosina II não-muscular em tubo de ensaio tem pelo menos duas consequências: provoca uma mudança conformacional na cabeça de miosina, expondo seu sítio de ligação com actina, e libera a cauda de miosina de uma "placa de adesão" da cabeça de miosina, permitindo a associação das moléculas de miosina sob a forma de filamentos espessos, curtos e bipolares. (B) Microfotografia eletrônica de filamentos curtos de miosina II corados negativamente que sofreram indução de associação *in vitro* pela fosforilação de suas cadeias leves. Estes filamentos de miosina II são muito menores do que os filamentos encontrados em células musculares esqueléticas (ver Figura 16-55). (B, cortesia de John Kendrick-Jones.)

células musculares lisas. A regulação de outros membros da superfamília da miosina ainda não está bem esclarecida, mas o controle destas miosinas provavelmente também deve envolver a fosforilação de sítios específicos.

Resumo

Proteínas motoras usam a energia da hidrólise de ATP para movimentar microtúbulos ou filamentos de actina. Elas medeiam o deslizamento de filamentos uns sobre os outros e o transporte de cargas através dos filamentos. Todas as proteínas motoras conhecidas que se movem sobre os filamentos de actina são membros da superfamília da miosina. As proteínas motoras que se movem sobre microtúbulos podem pertencer ou à superfamília das cinesinas ou à família da dineína. As superfamílias da miosina e da cinesina são diversificadas, com aproximadamente 40 genes codificando cada um dos diferentes tipos dessas proteínas em humanos. O único elemento estrutural comum a todos os membros de cada superfamília é o domínio motor ou "cabeça". Estas cabeças estão conectadas a uma ampla variedade de "caudas", as quais se ligam a diferentes tipos de cargas e possibilitam que os diversos membros de uma família realizem funções diferentes na célula. Entre essas funções podemos citar o transporte e o posicionamento de proteínas específicas, organelas delimitadas por membrana e mRNAs.

Apesar de a miosina e a cinesina utilizarem diferentes trilhas de locomoção e diferentes mecanismos para a produção de força e movimento pela hidrólise de ATP, elas compartilham uma mesma estrutura da região central, sugerindo que sejam derivadas de um ancestral comum. A proteína motora dineína evoluiu de forma independente e apresenta estrutura e mecanismo de ação distintos das demais proteínas motoras.

O CITOESQUELETO E O COMPORTAMENTO CELULAR

Um desafio central em todas as áreas da biologia celular é a compreensão de como a atuação de vários componentes moleculares individuais combina para resultar em comportamentos celulares complexos. Os comportamentos celulares que descreveremos nesta seção final apoiam-se na utilização coordenada dos componentes e processos que foram explorados nas três primeiras seções do capítulo: a montagem e a desmontagem dinâmica de polímeros do citoesqueleto, a regulação e a alteração de suas estruturas mediadas por proteínas associadas a polímeros e a ação de proteínas motoras que se movem sobre os polímeros. Como todas estas atividades são coordenadas para definir o formato da célula, permitir sua movimentação ou sua exata divisão em duas células na mitose? Certamente, os problemas referentes à coordenação do citoesqueleto desafiarão os cientistas ainda por vários anos.

Para fornecermos uma noção de nosso conhecimento atual, iniciaremos nossa discussão com exemplos de células especializadas que constroem arranjos estáveis de filamentos e utilizam arranjos altamente ordenados de proteínas motoras para permitir o deslizamento de filamentos visando a obtenção de movimentos em larga escala de músculos, cílios e do flagelo de eucariotos. A seguir, consideraremos duas importantes situações onde filamentos dinâmicos se associam à atividade de proteínas motoras para gerar complexas estruturas dinâmicas auto-organizadas: o fuso mitótico com base em microtúbulos e os arranjos de actina envolvidos no deslizamento de uma célula. Para concluir, consideraremos a extraordinária organização e o comportamento do citoesqueleto neuronal.

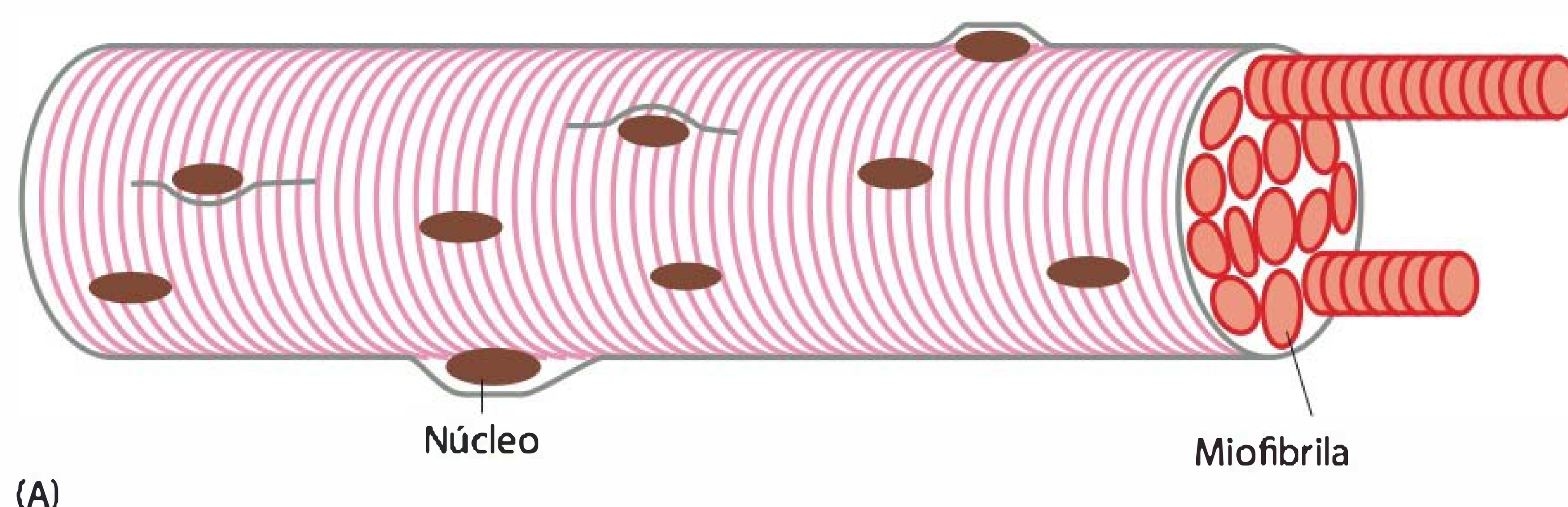
O deslizamento da miosina II e de filamentos de actina provoca a contração muscular

A contração muscular é a mais familiar e a mais compreendida das formas de movimento em animais. Em vertebrados, as ações de correr, caminhar, nadar e voar dependem da rápida contração da musculatura esquelética em seu esqueleto estrutural ósseo, enquanto movimentos involuntários como os batimentos cardíacos e o peristaltismo do intestino dependem da contração da musculatura cardíaca e da musculatura lisa, respectivamente. Todas essas formas de contração muscular dependem do deslizamento direcionado por ATP de um conjunto extremamente organizado de filamentos de actina sobre arranjos de filamentos de miosina II.

A musculatura esquelética foi um desenvolvimento evolutivo relativamente tardio, e as células musculares são altamente especializadas para uma contração rápida e eficiente. As longas e finas fibras musculares da musculatura esquelética são na verdade grandes células individuais que se formam durante o desenvolvimento pela fusão de muitas células separadas, como apresentado no Capítulo 22. Os vários núcleos das células originais permanecem no interior desta grande célula. Estes núcleos se posicionam abaixo da membrana citoplasmática (**Figura 16-73**). A maior parte do interior citoplasmático é constituída por miofibrilas, que é o nome dado aos elementos contráteis básicos da célula muscular. Uma **miofibrila** é uma estrutura cilíndrica de 1 a 2 μm de diâmetro que frequentemente é tão longa quanto a própria célula muscular. Esta estrutura consiste em uma longa cadeia repetida de pequenas unidades contráteis – denominadas *sarcômeros*, cada uma com comprimento aproximado de 2,2 μm, as quais conferem à miofibrila de vertebrados sua aparência estriada (**Figura 16-74**).

Cada sarcômero é formado a partir de um pequeno arranjo, exatamente ordenado paralelamente e parcialmente superposto de filamentos delgados e espessos. Os *filamentos delgados* são compostos de actina e proteínas associadas, sendo ligados por suas extremidades mais a um *disco Z* em cada extremidade do sarcômero. As extremidades menos capeadas dos filamentos de actina se estendem em direção ao centro do sarcômero, onde se sobrepõem aos *filamentos espessos*, os arranjos bipolares formados a partir de isoformas musculares específicas de miosina II (ver Figura 16-55). Quando essa região de sobreposição é examinada em uma secção transversal por microscopia eletrônica, os filamentos de miosina são vistos sob a forma de um arranjo hexagonal regular, com os filamentos de actina ordenadamente espaçados entre eles (**Figura 16-75**). Tanto a musculatura cardíaca quanto a musculatura lisa contém sarcômeros, no entanto a organização destes não é tão regular quanto a apresentada na musculatura esquelética.

O encurtamento do sarcômero é provocado pelo deslizamento dos filamentos de miosina sobre os filamentos delgados de actina, sem que ocorra modificação no tamanho de qualquer desses tipos de filamentos (Figura 16-74C e D). Os filamentos bipolares espessos deslizam em direção à extremidade mais (+) de dois conjuntos de filamentos delgados de orientação oposta, dirigidos por dúzias de cabeças de miosina independentes



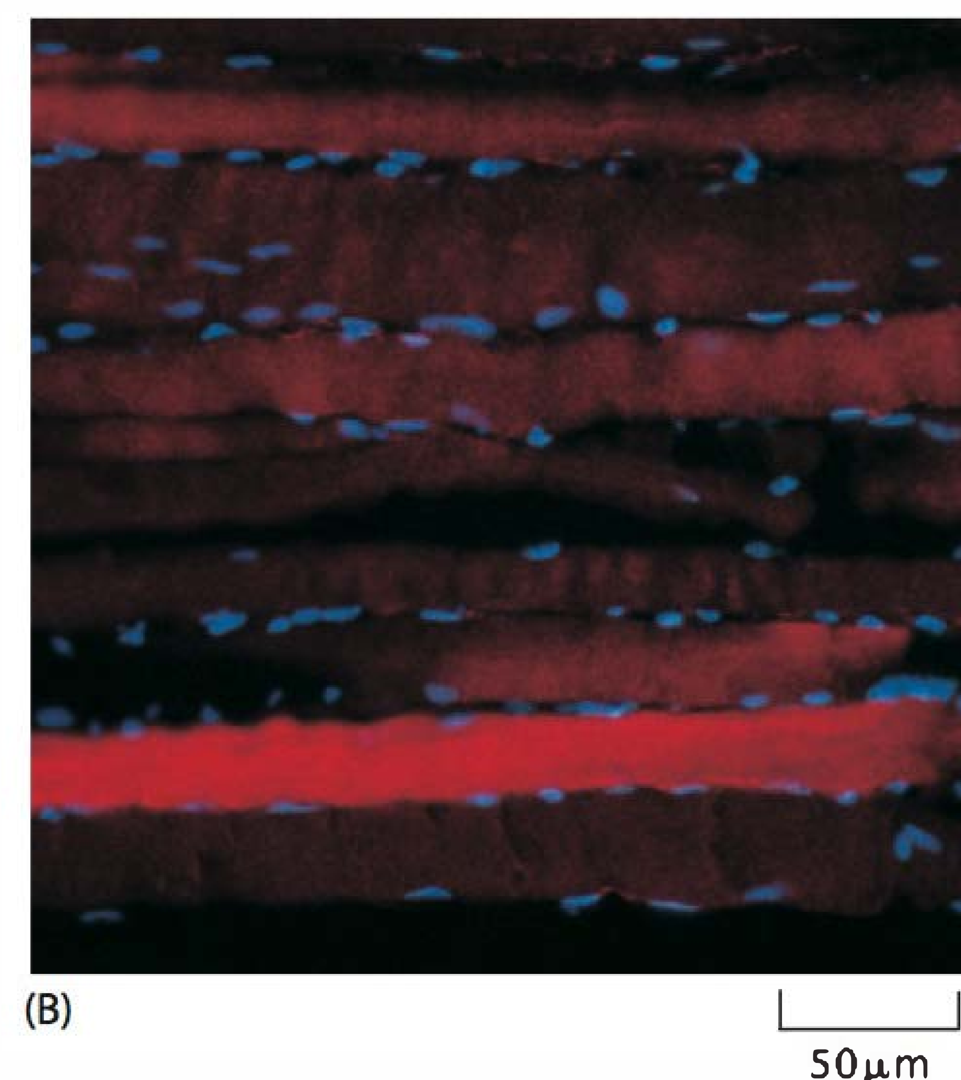


Figura 16-73 Células musculares esqueléticas (também chamadas de fibras musculares). (A) Estas imensas células multinucleadas são formadas pela fusão de várias células musculares precursoras chamadas de mioblastos. Em seres humanos adultos, uma célula muscular tipicamente apresenta um diâmetro de 50 μm e pode ter vários centímetros de comprimento. (B) Microfotografia de fluorescência de músculo de rato mostrando os núcleos localizados perifericamente (em *azul*) nestas células gigantes. As miofibrilas estão coradas em *vermelho*; ver também Figura 23-46B. (B, cortesia de Nancy L. Kedersha.)

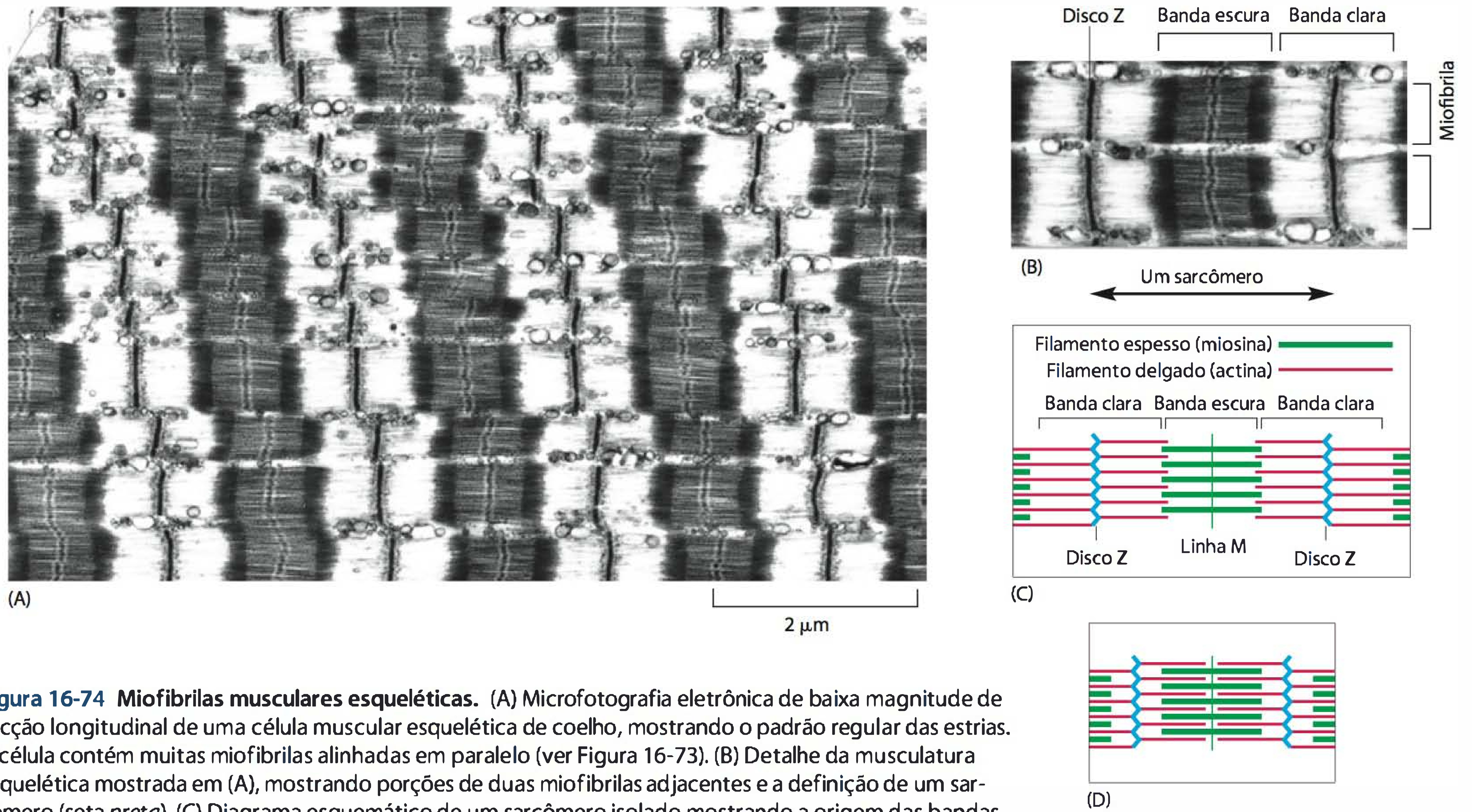


Figura 16-74 Miofibrilas musculares esqueléticas. (A) Microfotografia eletrônica de baixa magnitude de secção longitudinal de uma célula muscular esquelética de coelho, mostrando o padrão regular das estrias. A célula contém muitas miofibrilas alinhadas em paralelo (ver Figura 16-73). (B) Detalhe da musculatura esquelética mostrada em (A), mostrando porções de duas miofibrilas adjacentes e a definição de um sarcômero (seta *preta*). (C) Diagrama esquemático de um sarcômero isolado mostrando a origem das bandas claras e escuras vistas na microfotografia eletrônica. Os discos Z nas extremidades de cada sarcômero são sítios de ligação para as extremidades mais (+) dos filamentos de actina (filamentos delgados); a linha M, ou linha mediana, é o local de proteínas que ligam filamentos de miosina II adjacentes entre si (filamentos espessos). As bandas escuras que marcam a localização dos filamentos espessos são, às vezes, chamadas de bandas A, pois aparecem anisotrópicas sob luz polarizada (ou seja, seu índice de refração muda com o plano de polarização). As bandas claras, que contêm apenas filamentos delgados e, portanto, apresentam uma menor densidade de proteína, são relativamente isotrópicas sob luz polarizada e, algumas vezes, são chamadas de bandas I. (D) Quando o sarcômero se contrai, os filamentos de actina e miosina deslizam uns sobre os outros, sem que ocorra o seu encurtamento. (A e B, cortesia de Roger Craig.)

que se encontram posicionadas de tal forma a interagir com cada um dos filamentos delgados. Visto que não existe uma coordenação entre os movimentos das cabeças de miosina, é essencial que elas operem sob baixas taxas de progressividade, permanecendo fortemente ligadas ao filamento de actina apenas durante um curto período de cada ciclo de ATPase para que não interfiram umas com as outras a ponto de provocar recuos. Cada filamento espesso de miosina possui aproximadamente 300 cabeças (294 em músculo de sapos), e cada cabeça cicla aproximadamente cinco vezes por segundo no curso de uma contração rápida –

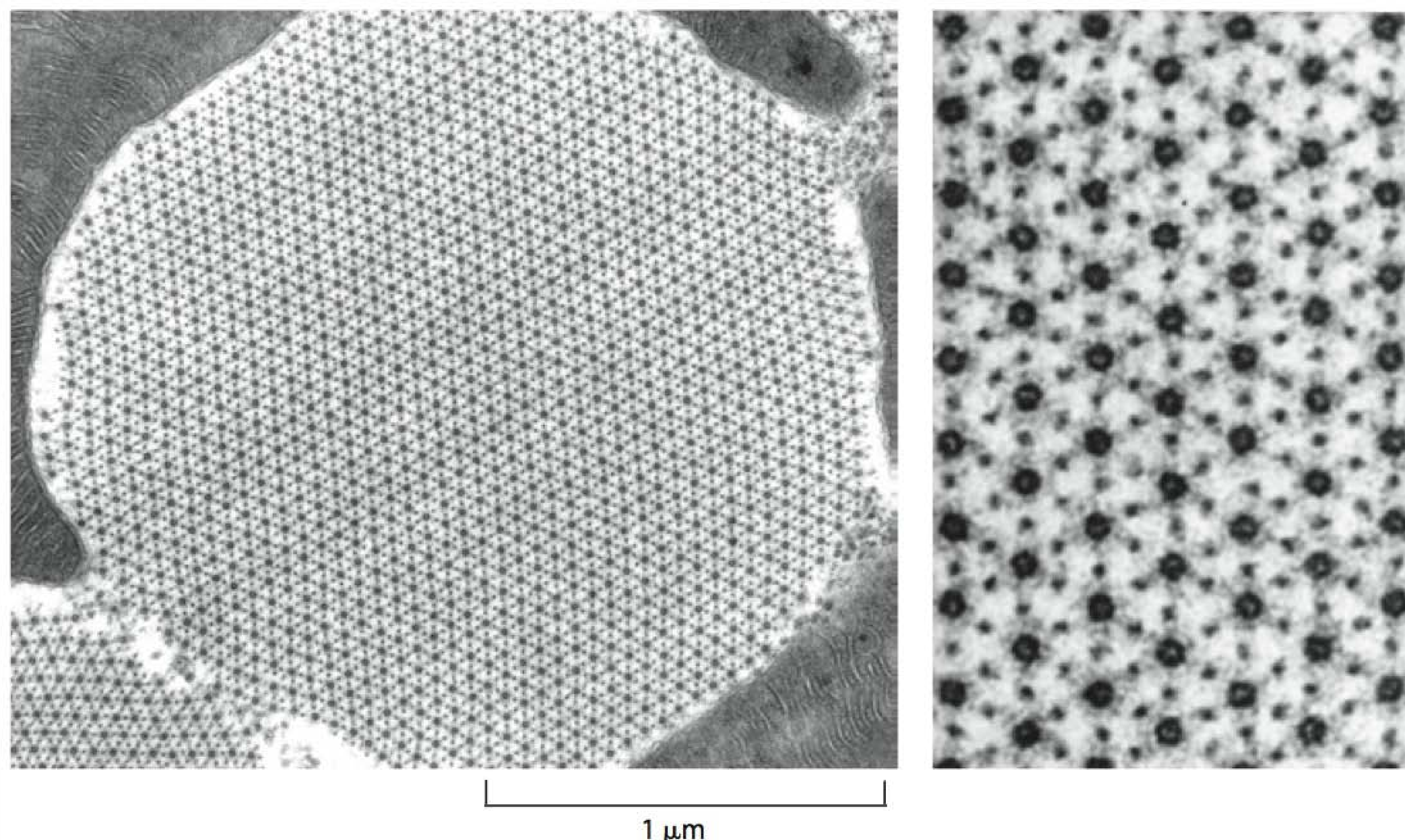


Figura 16-75 Microfotografia eletrônica de músculo de voo de um inseto visto em secção transversal. Os filamentos de miosina e de actina estão unidos empacotados sob uma constância de regularidade quase cristalina. Diferentemente de seus homólogos em vertebrados, estes filamentos de miosina apresentam uma região central oca, como pode ser visto na fotografia em maior aumento à direita. A geometria do arranjo hexagonal difere levemente da que ocorre em músculos de vertebrados. (De J. Auber, *J. de Microsc.* 8:197--232, 1969. Com permissão da Societé Française de Microscopie Électronique.)

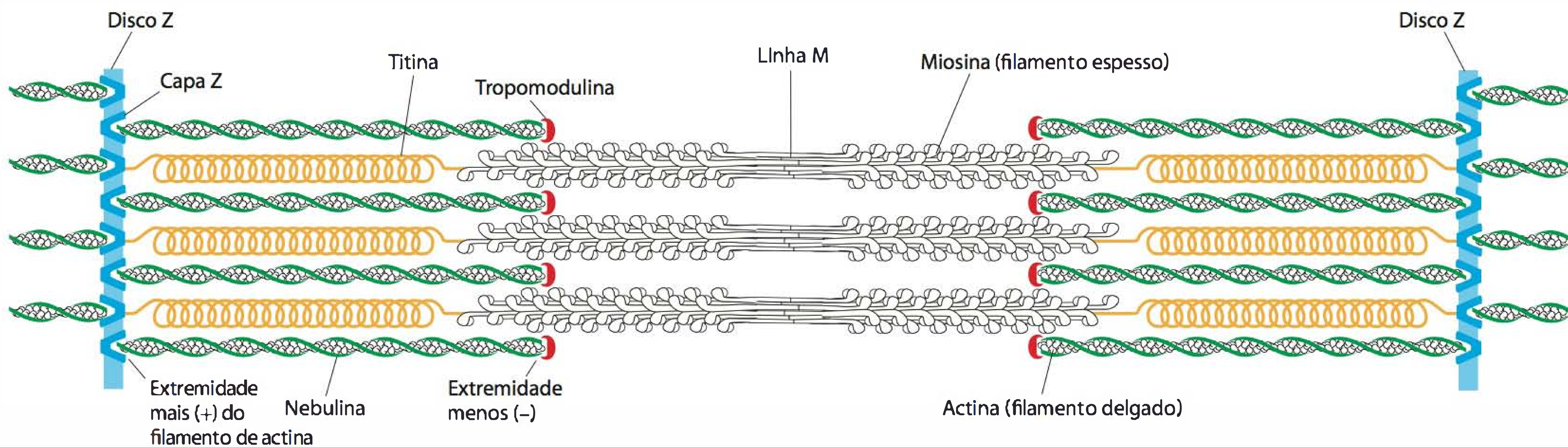


Figura 16-76 Organização das proteínas acessórias em um sarcômero. Cada molécula gigante de titina se estende do disco Z à linha M – uma distância de mais de 1 μm. Uma parte de cada molécula de titina encontra-se firmemente associada ao filamento espesso de miosina (o qual sofre inversão de polaridade na linha M); a parcela restante da molécula de titina é elástica e muda de comprimento conforme o sarcômero sofre contração ou relaxamento. Cada molécula de nebulina tem o comprimento exato de um filamento delgado. Os filamentos de actina também estão recobertos por tropomiosina e troponina (não-mostradas; ver Figura 16-78) e suas duas extremidades estão capeadas. A tropomodulina capeia a extremidade menos (–) dos filamentos de actina e a CapZ ancora a extremidade mais (+) ao disco Z, o qual também contém α-actinina.

o deslizamento dos filamentos de actina e miosina entre si apresenta taxas de até 15 μm/seg e permite a um sarcômero encurtar até 10% de seu comprimento em menos de 1/50 avos de segundo. O rápido encurtamento sincronizado de milhares de sarcômeros alinhados entre si pelas extremidades, em cada miofibrila, dá à musculatura esquelética capacidade de contração suficientemente rápida para que atividades como correr, voar ou mesmo tocar piano sejam desenvolvidas.

As proteínas acessórias controlam a impressionante uniformidade da organização do filamento, de seu comprimento e espaçamento no sarcômero (**Figura 16-76**). As extremidades mais dos filamentos de actina estão ancoradas no disco Z, o qual é constituído de CapZ e α-actinina; o disco Z cobre os filamentos (evitando a despolimerização), além de mantê-los associados em um feixe regularmente espaçado. O comprimento exato de cada filamento delgado é determinado por uma proteína-molde bastante grande denominada *nebulina*, a qual consiste quase que totalmente em repetições de um motivo de 35 aminoácidos com capacidade de ligação à actina. A nebulina estende-se do disco Z até a extremidade menos (–) de cada filamento e age como um "ajustador" ou "régua molecular" definindo o comprimento de cada filamento. As extremidades menos dos filamentos delgados são cobertas (capeadas) e estabilizadas pela tropomodulina. Apesar de existir uma baixa taxa de troca de subunidades de actina em ambas as extremidades do filamento delgado muscular, de forma que os componentes do filamento delgado apresentam uma meia-vida de substituição de alguns dias, os filamentos de actina dos sarcômeros são extremamente estáveis quando comparados aos filamentos dinâmicos de actina característicos da maior parte de outros tipos celulares, os quais apresentam taxa de substituição de, no máximo, alguns poucos minutos.

Os filamentos espessos são posicionados a meio caminho entre os discos Z por pares opostos de uma proteína-molde ainda maior denominada *titina*. A titina age como uma mola molecular, contendo uma série de domínios semelhantes à imunoglobulina que podem desenrolar-se um a um quando estresse é aplicado a esta proteína. O enrolamento e o desenrolamento "tipo mola" desses domínios mantêm os filamentos espessos posicionados no centro do sarcômero e permitem que a fibra muscular se reestruture após ter sido fortemente espichada. Em *C. elegans*, cujos sarcômeros apresentam comprimento maior do que os de vertebrados, a titina também é mais comprida, sugerindo que também sirva como ajustador molecular, determinando, nesse caso, o comprimento total de cada sarcômero (ver Figura 3-33).

A contração muscular é iniciada por uma súbita elevação da concentração citosólica de Ca^{2+}

A interação molecular geradora de força entre os filamentos espessos de miosina e os filamentos delgados de actina ocorre apenas quando um sinal proveniente do nervo motor passa através do músculo esquelético. Imediatamente após a chegada do sinal, a célula precisa ser capaz de sofrer uma rápida contração, pelo encurtamento simultâneo de todos os seus sarcômeros. Duas principais características das células musculares são necessárias para esta contração extremamente rápida. Primeiro, como discutido anteriormente, as cabeças motoras das miosinas individuais gastam em cada filamento espesso apenas uma pequena fração do tempo relativo ao ciclo de ATP ligadas ao filamento e ativamente gerando força, de tal forma que várias cabeças de miosina podem atuar em rápida sucessão sobre o mesmo filamento delgado sem que uma interfira sobre a outra. Segundo, um sistema especializado de membranas transfere o sinal que está chegando rapidamente através de toda a célula. O sinal proveniente do nervo gera um potencial de ação na membrana plasmática da célula

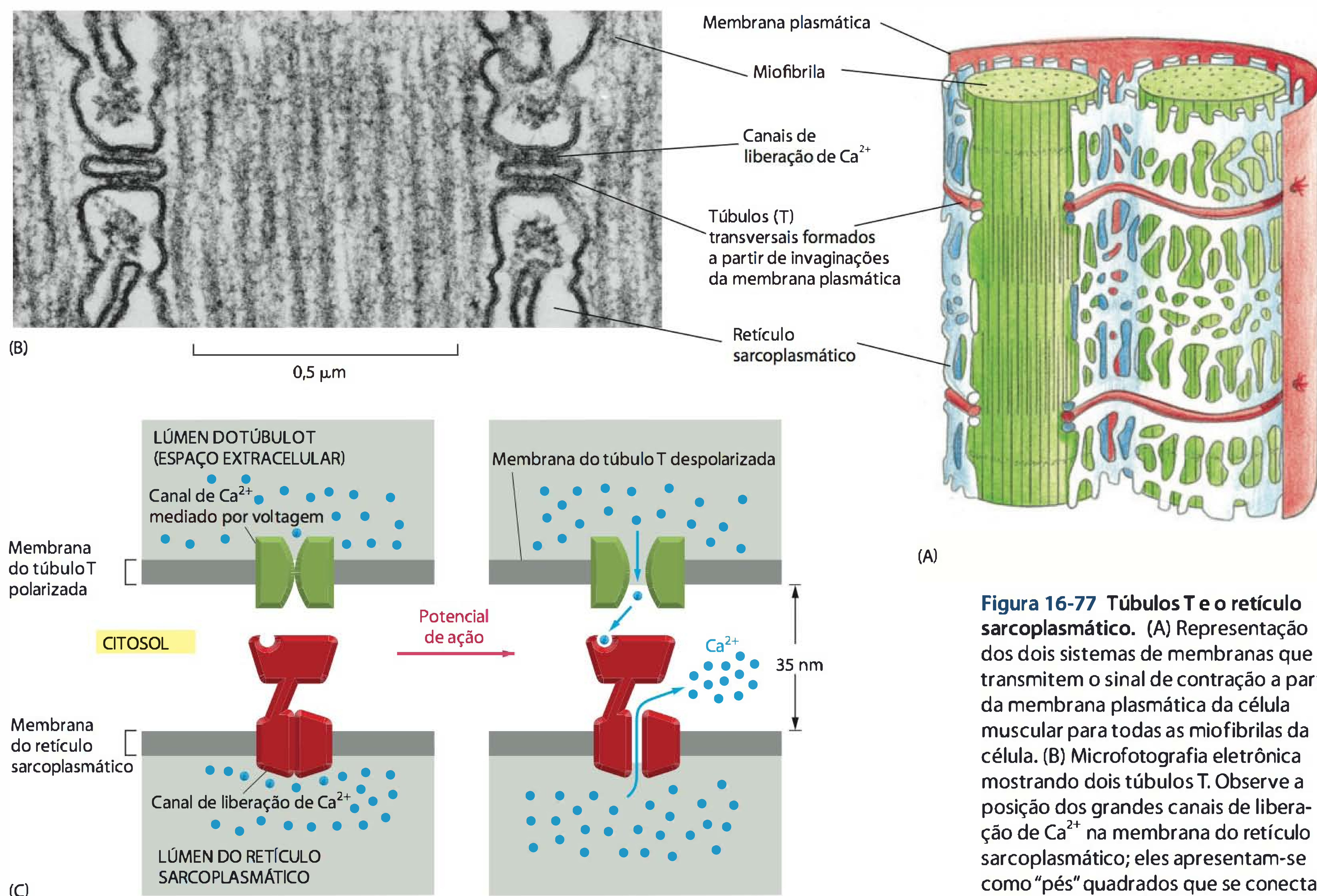


Figura 16-77 Túbulos T e o retículo sarcoplasmático. (A) Representação dos dois sistemas de membranas que transmitem o sinal de contração a partir da membrana plasmática da célula muscular para todas as miofibrilas da célula. (B) Microfotografia eletrônica mostrando dois túbulos T. Observe a posição dos grandes canais de liberação de Ca^{2+} na membrana do retículo sarcoplasmático; eles apresentam-se como "pés" quadrados que se conectam à membrana do túbulo T adjacente. (C) Diagrama esquemático mostrando como se sugere que um canal de liberação de Ca^{2+} da membrana do retículo sarcoplasmático se abra pela ativação de um canal de Ca^{2+} mediado por voltagem. (B, cortesia de Clara Franzini-Armstrong.)

muscular (discutido no Capítulo 11), e esta excitação elétrica espalha-se rapidamente através de uma série de dobramentos de membrana, os túbulos transversais, ou *túbulos T*, que se estendem internamente a partir da membrana citoplasmática ao redor de cada miofibrila. O sinal é então transmitido através de uma pequena abertura para o *retículo sarcoplasmático*, uma estrutura adjacente em forma de teia de aranha que consiste em RE modificado e envolve cada miofibrila como se fosse uma malha rendada (**Figura 16-77**A e B).

Quando o potencial de ação resultante ativa um canal de Ca^{2+} na membrana de um túbulo T, um influxo de Ca^{2+} gera a abertura de canais de liberação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (Figura 16-77C). O Ca^{2+} que flui para o citosol dá então início à contração de cada miofibrila. Tendo em vista que o sinal proveniente da membrana citoplasmática da célula muscular é transmitido em milissegundos (através dos túbulos T e do retículo sarcoplasmático) para cada um dos sarcômeros da célula, todas as miofibrilas da célula contraem ao mesmo tempo. A elevação da concentração de Ca^{2+} é transiente, pois o Ca^{2+} é rapidamente bombeado de volta ao retículo sarcoplasmático por uma bomba de Ca^{2+} dependente de ATP (também chamada de Ca^{2+}-ATPase) abundante nesta membrana (ver Figura 11-13). Tipicamente, a concentração citoplasmática de Ca^{2+} é restaurada aos níveis de repouso em 30 mseg, permitindo o relaxamento das miofibrilas. Desse modo, a contração muscular depende de dois processos que consomem enormes quantidades de ATP: o deslizamento de filamentos, conduzido pela ATPase do domínio motor da miosina, e o bombeamento de Ca^{2+}, regulado pela bomba de Ca^{2+}.

A dependência de Ca^{2+} na contração muscular esquelética de vertebrados, e sua consequente dependência de comandos transmitidos através de nervos, é o resultado da existência de um grupo de proteínas acessórias especializadas intimamente associadas aos filamentos delgados de actina. Uma dessas proteínas acessórias é a forma muscular da *tropomiosina*, uma molécula longa que se liga à fenda da hélice de actina. Outra é a *troponina*, um complexo de três polipeptídeos, troponinas T, I e C (assim denominadas devido à sua ação respectiva de ligação à tropomiosina, inibição e ligação ao Ca^{2+}). A troponina I liga-se tanto à actina quanto à troponina T. Em um músculo em repouso, o complexo troponina I-T puxa a tropomiosina para fora da fenda normal de ligação, deixando-a em uma posição

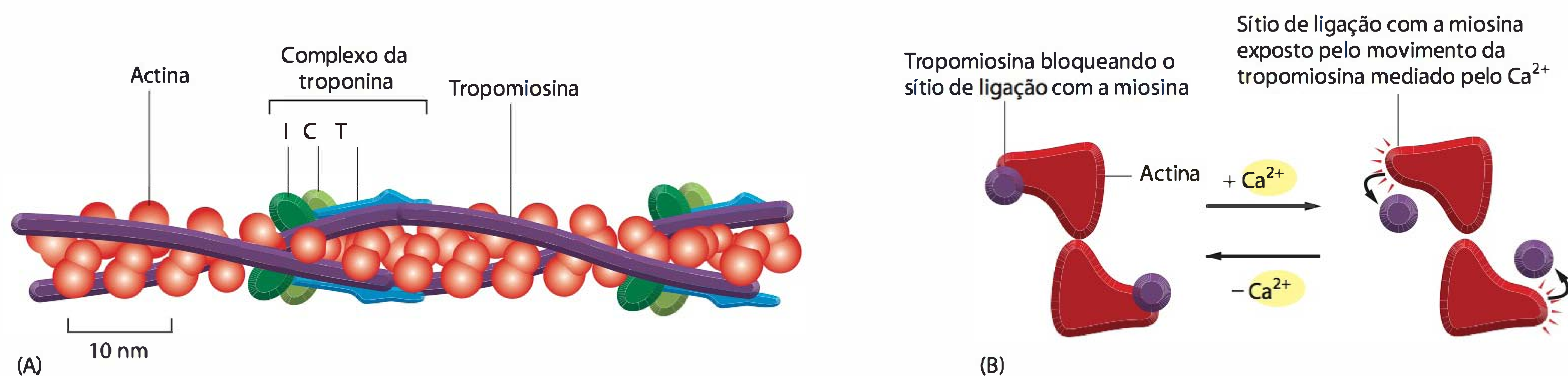


Figura 16-78 Controle da contração muscular esquelética pela troponina. (A) Um filamento delgado de uma célula muscular esquelética mostrando as posições da tropomiosina e da troponina sobre o filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina possui sete regiões regularmente espaçadas com sequência de aminoácidos semelhante, tendo sido sugerido que cada uma possua capacidade de se ligar a uma subunidade de actina sobre o filamento. (B) Vista frontal da extremidade de um filamento delgado ilustrando como o Ca^{2+} (ligando-se à troponina) atua na eliminação do bloqueio imposto pela tropomiosina para a interação entre a actina e a cabeça de miosina. (A, adaptada de G. N. Phillips, J. P. Fillers e C. Cohen, *J. Mol. Biol*. 192:111-131, 1986. Com permissão da Academic Press.)

relativa ao filamento de actina que interfere com a ligação das cabeças de miosina, impedindo, desse modo, qualquer interação geradora de força. Quando o nível de Ca^{2+} é elevado, a troponina C – que se liga a até quatro moléculas de Ca^{2+} – faz com que a troponina I seja desconectada da actina. Isso permite o retorno da molécula de tropomiosina à sua posição normal e faz com que as cabeças de miosina possam deslizar sobre os filamentos de actina (**Figura 16-78**). A troponina C é intimamente relacionada à proteína bastante comum calmodulina que se liga a Ca^{2+} (ver Figura 15-44); ela pode ser considerada como uma forma especializada de calmodulina que adquiriu sítios de ligação para a troponina I e a troponina T, garantindo desse modo uma resposta extremamente rápida da miofibrila a elevações na concentração de Ca^{2+}.

Nas células musculares lisas, assim denominadas por não apresentarem as estriações regulares características dos músculos esqueléticos, a contração também é provocada por um influxo de íons cálcio, mas os mecanismos de regulação são diferentes. A musculatura lisa forma a porção contrátil do estômago, do intestino e do útero, as paredes das artérias e diversas outras estruturas que necessitam de contrações lentas e sustentadas. O músculo liso é composto por camadas de células bastante longas e em formato de fuso, cada qual contendo um único núcleo. As células musculares lisas não expressam troponinas. Ao invés disso, o influxo de Ca^{2+} para o interior das células regula a contração por dois mecanismos que dependem da proteína ubíqua de ligação a cálcio, calmodulina.

Inicialmente, a calmodulina ligada a Ca^{2+} se liga a uma proteína de ligação à actina, a caldesmona, a qual bloqueia os sítios de actina onde as cabeças motoras de miosina normalmente poderiam se ligar. Isto faz com que a caldesmona seja excluída dos filamentos de actina, preparando os filamentos para a contração. A seguir, uma das duas cadeias leves da miosina do músculo liso é fosforilada pela MLCK, conforme anteriormente descrito na regulação da miosina II não-muscular (ver Figura 16-72). Quando a cadeia leve é fosforilada, a cabeça de miosina pode interagir com filamentos de actina e provocar a contração; quando ela é desfosforilada, as cabeças de miosina tendem a dissociar da actina, tornando-se inativas (em contraste ao que ocorre com a miosina II não-muscular, a desfosforilação da cadeia leve não provoca a dissociação do filamento espesso em células musculares lisas). A MLCK necessita de Ca^{2+}/calmodulina ligada para estar completamente ativa.

Moléculas externas de sinalização, como a adrenalina (epinefrina), também podem regular a atividade contrátil do músculo liso. A ligação da adrenalina a seu receptor de superfície celular acoplado à proteína G provoca um aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico, o qual, por sua vez, ativa a proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA) (ver Figura 15-35). A PKA fosforila e inativa a MLCK, levando em consequência o relaxamento das células musculares lisas.

Os eventos de fosforilação que regulam a contração das células musculares lisas ocorrem de forma relativamente lenta, e a contração máxima frequentemente requer quase um segundo (em contraponto aos poucos milissegundos necessários à contração de uma célula muscular esquelética). No entanto, uma rápida ativação de contração não é importante para a musculatura lisa: sua miosina II hidrolisa ATP cerca de 10 vezes mais lentamente que a miosina de músculo esquelético, produzindo um ciclo lento de alterações conformacionais da miosina que resulta em contração lenta.

O músculo cardíaco é uma delicada peça de engenharia

O coração é o músculo corporal que trabalha mais arduamente, contraindo cerca de 3 bilhões (3×10^9) de vezes ao longo da vida de um ser humano. Este é aproximadamente o número de rotações que um motor de combustão interna de um automóvel dá ao longo de sua vida útil. Várias isoformas específicas de miosina muscular cardíaca e actina muscular cardíaca são expressas nas células do coração. Mesmo alterações sutis nas proteínas contráteis expressas no coração – alterações estas que passariam despercebidas em outros tipos de tecidos – podem ocasionar sérias doenças cardíacas (**Figura 16-79**).

O aparato contrátil cardíaco normal parece ser uma máquina tão delicada e finamente ajustada que uma mínima alteração em qualquer peça pode ser suficiente para levar a um gradual desgaste e destruição após vários anos de movimentos repetitivos. A *cardiomiopatia hipertrófica familiar* é uma causa frequente de morte súbita em atletas jovens. Ela é uma condição genética herdada de forma dominante que afeta aproximadamente 2 em cada mil indivíduos e está associada ao aumento do tamanho do coração, vasos coronários anormalmente pequenos e distúrbios no ritmo cardíaco (arritmias cardíacas). Mais de 40 mutações pontuais simples que levam a essa condição já foram descritas em genes que codificam a cadeia pesada da β miosina cardíaca (quase todas causando alterações no domínio motor ou próximo a ele). Aproximadamente uma dúzia de mutações que levam ao mesmo problema foi descrita em outros genes que codificam proteínas contráteis, como a cadeia leve da miosina, a troponina cardíaca e a tropomiosina. Pequenas mutações no gene da actina cardíaca podem causar outro tipo de doença do coração chamada de *cardiomiopatia dilatada*, que frequentemente também leva a paradas cardíacas em idades precoces.



Figura 16-79 Efeito, no coração, de uma pequena mutação na miosina cardíaca. À *esquerda*, coração normal de um camundongo de 6 dias de idade. À *direita*, coração de um camundongo homozigoto para uma mutação pontual no gene da miosina cardíaca que provoca a mudança de Arg 403 para Gln. As setas indicam os átrios. No coração do camundongo com a mutação na miosina cardíaca, ambos os átrios estão aumentados (hipertróficos). Este camundongo morre poucas semanas após seu nascimento. (De D. Fatkin et al., *J. Clin. Invest.* 103:147, 1999. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

Cílios e flagelos são estruturas motrizes construídas a partir de microtúbulos e dineína

Assim como as miofibrilas são máquinas motrizes altamente especializadas e eficientes construídas a partir de filamentos de actina e miosina, cílios e flagelos são estruturas motrizes eficientes construídas a partir de microtúbulos e dineína. Tanto os cílios quanto os flagelos são apêndices celulares semelhantes a pelos que possuem um feixe de microtúbulos em seu interior. Os **flagelos** são encontrados em espermatozoides e em vários protozoários. Por um movimento ondulatório possibilitam que a célula que os possui nade através de meios líquidos (**Figura 16-80**A). Os **cílios** tendem a ser mais curtos do que os flagelos e estão organizados de modo similar a eles, no entanto batem como um chicote, em um movimento que assemelha-se ao de um nadador em nado de peito (Figura 16-80B). Os ciclos de cílios adjacentes apresentam uma quase perfeita sincronia, criando um padrão semelhante ao movimento de ondas, o qual pode ser observado em microscopia. O batimento dos cílios tanto pode propelir uma célula única através de um fluido (como é o caso da locomoção do protozoário *Paramecium*) quanto movimentar fluidos sobre a superfície de um grupo de células em um tecido. No corpo humano, uma grande quantidade de cílios ($10^9/cm^2$ ou mais) reveste o trato respiratório, varrendo camadas de muco, partículas de poeira e bactérias até a boca, onde elas serão engolidas e finalmente eliminadas. Do mesmo modo, cílios ao longo do oviduto auxiliam o percurso dos óvulos em direção ao útero.

O movimento de um cílio ou de um flagelo é produzido pela flexão de sua porção central, a qual é denominada **axonema**. O axonema é composto por microtúbulos e por suas proteínas associadas, organizadas em um padrão regular e característico. Nove pares especiais de microtúbulos (consistindo em um microtúbulo completo e um parcial fusionados de forma a compartilhar uma parede tubular entre si) encontram-se organizados em um anel ao redor de um par simples de microtúbulos (**Figura 16-81**). Essa organização característica é encontrada em quase todas as formas de flagelos eucarióticos e cílios (de protozoários a

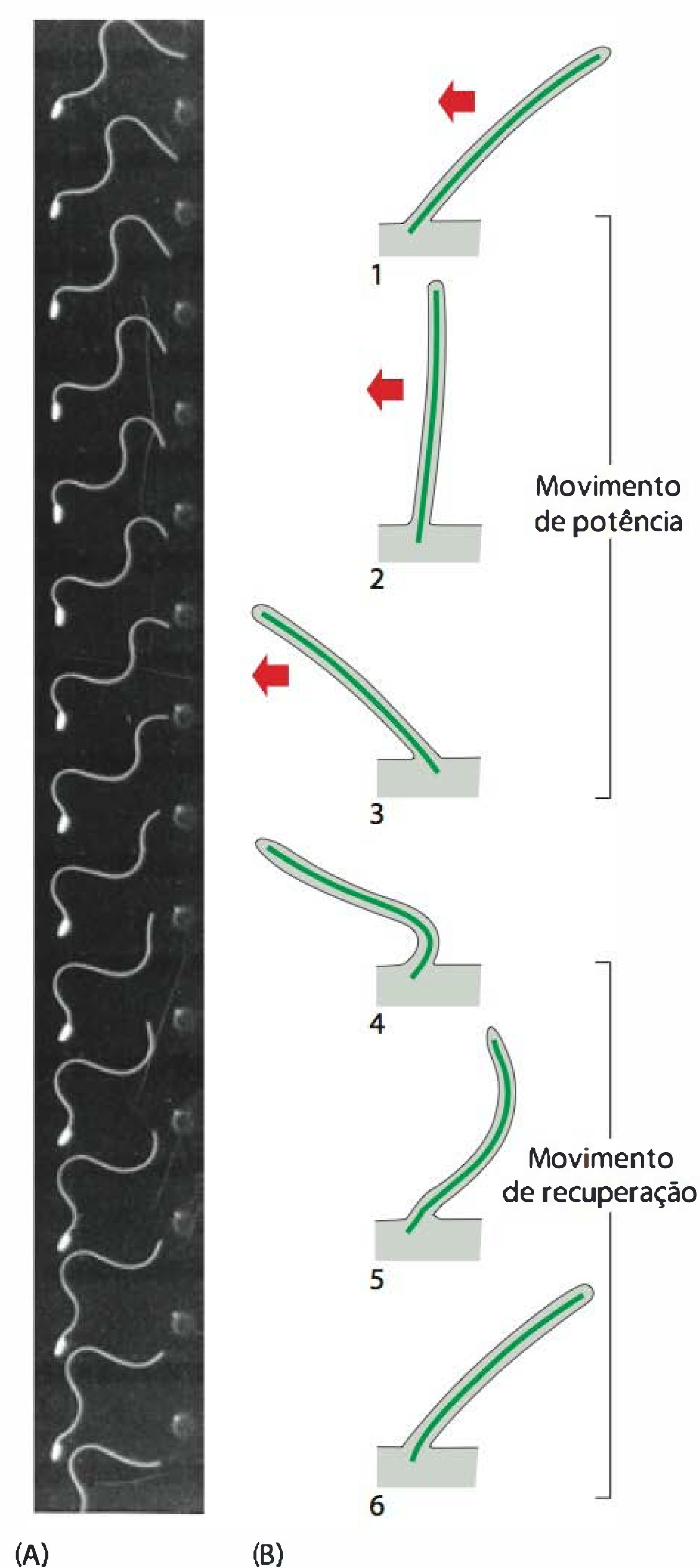


Figura 16-80 Contraste entre o movimento de flagelos e cílios. (A) O movimento ondulado do flagelo de um espermatozoide de um tunicado. A célula foi fotografada sob iluminação estroboscópica com 400 cintilações por segundo. Observe que ondas de amplitude constante movem-se continuamente da base do flagelo em direção a sua extremidade. (B) O batimento de um cílio lembra o nado de peito. Um rápido movimento de potência (flechas *vermelhas*), no qual o fluido é movimentado sobre a superfície da célula, é seguido por um lento movimento de recuperação. Cada ciclo dura tipicamente de 0,1 a 0,2 segundos e gera uma força perpendicular ao eixo do axonema (o centro ciliar). (A, cortesia de C. J. Brokaw.)

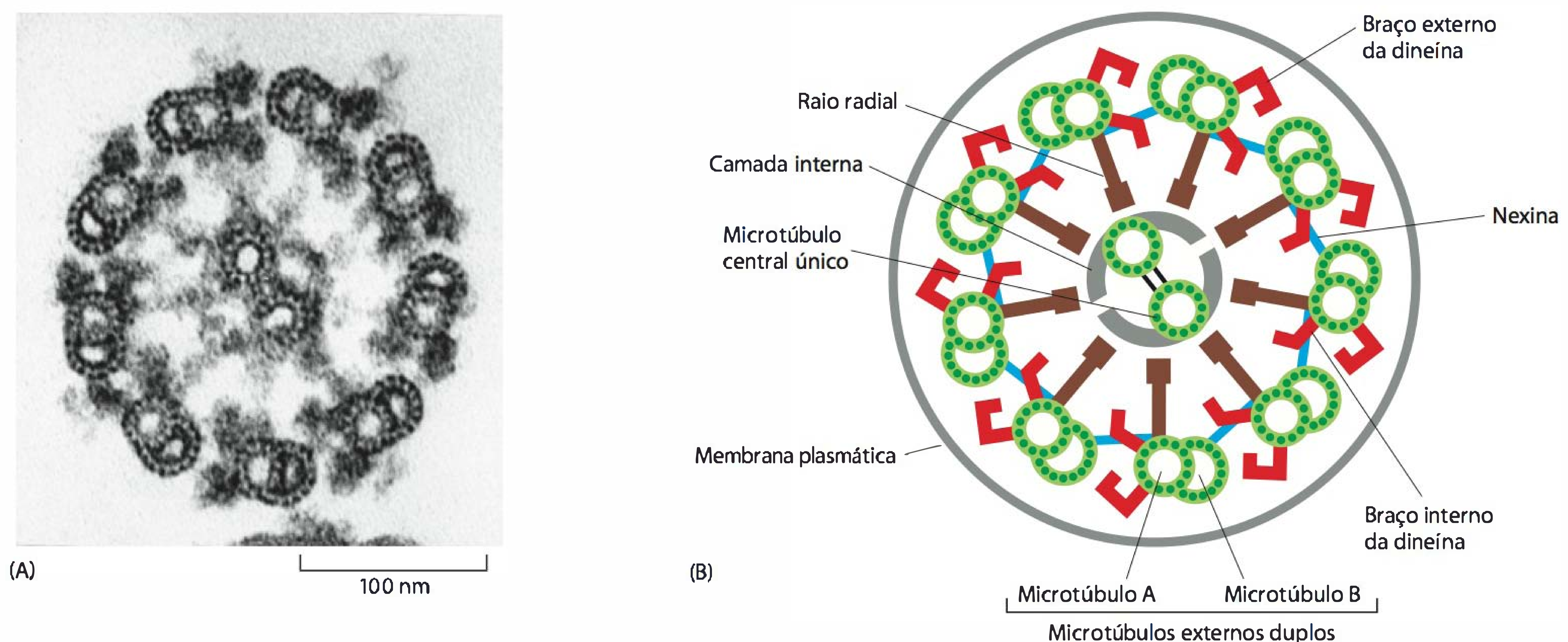


Figura 16-81 Disposição dos microtúbulos em um flagelo ou em um cílio. (A) Microfotografia eletrônica de um flagelo de uma célula de alga verde (*Chlamydomonas*) mostrado em secção transversal, ilustrando a organização característica de microtúbulos "9 + 2". (B) Diagrama das partes de um flagelo ou cílio. As várias projeções que partem dos microtúbulos ligam estas estruturas entre si e apresentam-se em intervalos regulares em todo o comprimento do axonema. (A, cortesia de Lewis Tilney.)

humanos). Os microtúbulos estendem-se de forma contínua por todo o comprimento do axonema, o qual pode apresentar de 10 a 200μ.m. Em intervalos regulares ao longo do comprimento dos microtúbulos, proteínas acessórias interligam os microtúbulos.

Moléculas de *dineína ciliar* formam pontes entre pares de microtúbulos adjacentes em toda a circunferência do axonema (**Figura 16-82**). Quando o domínio motor dessa dineína é ativado, as moléculas de dineína ligadas a um par de microtúbulos (ver Figura 16-64) tentam movimentar-se sobre o par de microtúbulos adjacente, forçando o deslizamento de um sobre o outro de forma semelhante ao deslizamento dos filamentos delgados de actina durante a contração muscular. No entanto, a presença de outras conexões entre os pares de microtúbulos impede este deslizamento, e a força da dineína é convertida em um movimento de flexão (**Figura 16-83**).

O comprimento do flagelo é cuidadosamente regulado. Se um dos dois flagelos de uma célula de *Chlamydomonas* for amputado, o flagelo remanescente sofrerá um encurtamento transiente enquanto o flagelo que foi cortado cresce, até que ambos alcancem o mesmo tamanho. A seguir, ambos os flagelos encurtados continuarão a crescer até que alcancem o mesmo comprimento original de uma célula não-alterada. Novos componentes do flagelo, como tubulina e dineína, são incorporados ao flagelo em crescimento em sua extremidade distal. Assim, mesmo nestes arranjos de filamentos motores altamente ordenados e estáveis, a célula usa a flexibilidade e adaptabilidade intrínseca do citoesqueleto para responder de forma rápida e dinâmica a alterações por ela sofridas.

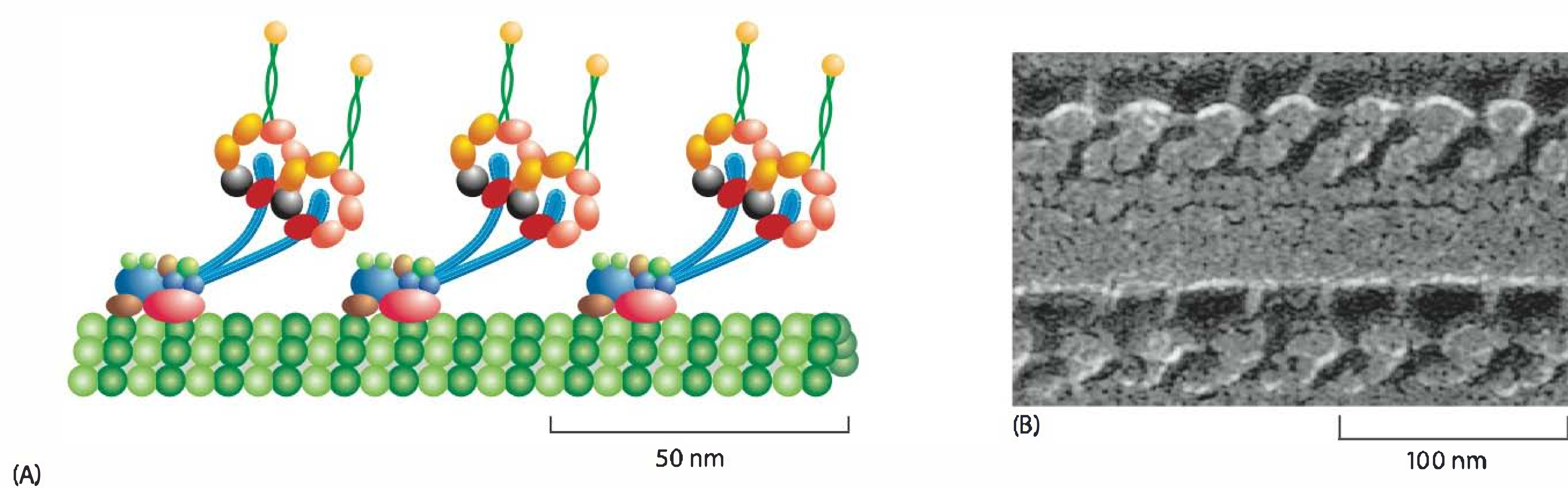


Figura 16-82 A dineína ciliar. A dineína ciliar (do axonema) é um grande arranjo proteico (aproximadamente 2 milhões de dáltons) composto por 9 a 12 cadeias polipeptídicas, a maior delas sendo a cadeia pesada que possui mais de 500.000 dáltons. (A) As cadeias pesadas formam a porção principal da cabeça globular e dos domínios da haste, e várias das cadeias menores estão agrupadas em torno da base da haste. Existem duas cabeças na dineína externa em metazoários e três em protozoários, cada qual formada por sua própria cadeia pesada (ver Figura 16-59B para visualizar uma molécula isolada). A cauda da molécula liga-se fortemente a um microtúbulo A independentemente de ATP, ao passo que as grandes cabeças globulares apresentam um sítio de ligação ao microtúbulo B (dependente de ATP) (ver Figura 16-81). Quando as cabeças hidrolisam o ATP a elas ligado, elas se movem em direção à extremidade menos (–) do microtúbulo B, produzindo assim uma força de deslizamento entre os pares de microtúbulos adjacentes, em um cílio ou flagelo. Para detalhes, ver Figura 16-64. (B) Microfotografia eletrônica de criofratura de um cílio mostrando os braços de dineína projetados a intervalos regulares a partir de um par de microtúbulos. (B, cortesia de John Heuser.)

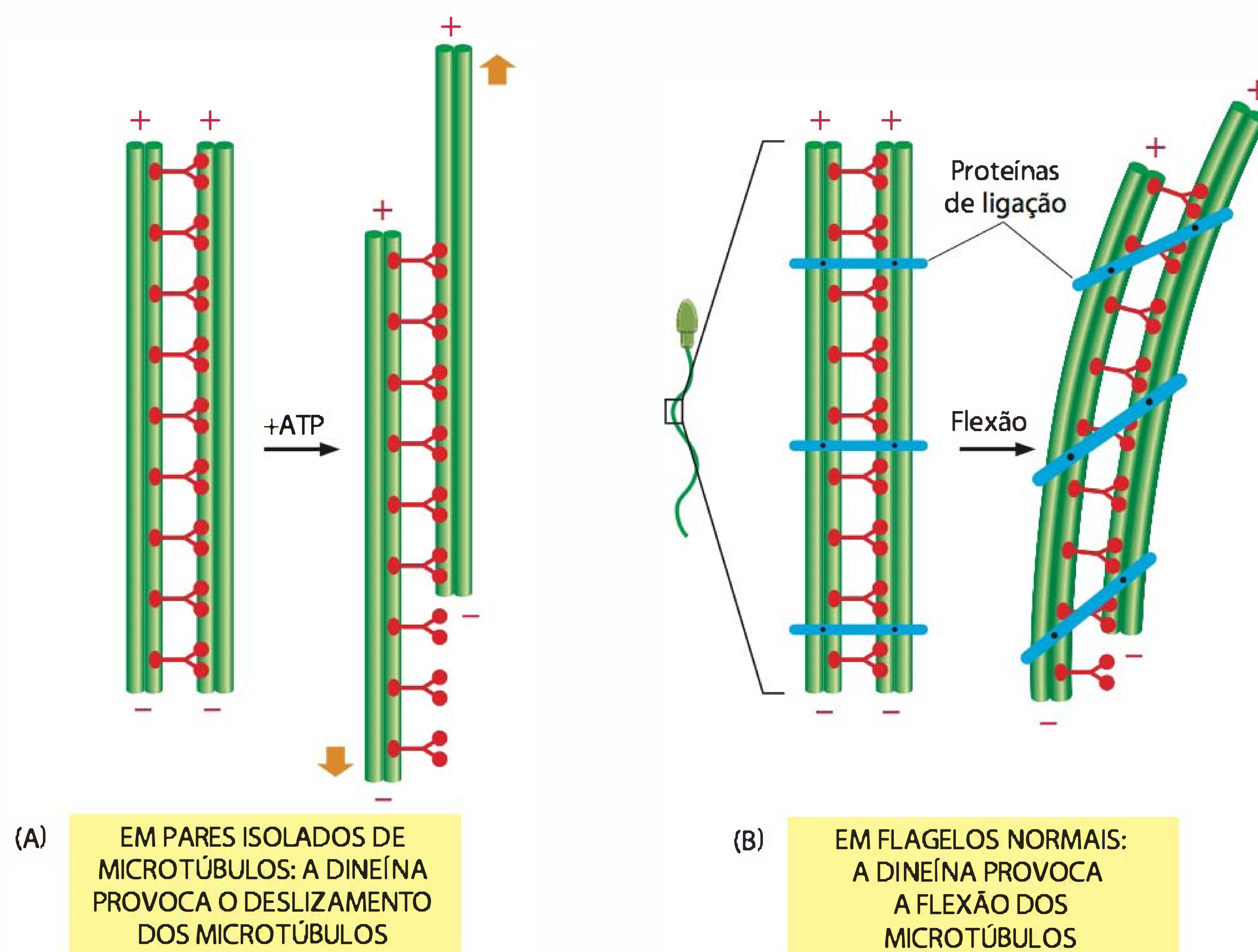


Figura 16-83 Flexão de um axonema. (A) Quando axonemas são expostos à enzima proteolítica tripsina, as ligações que mantêm os pares de microtúbulos unidos são quebradas. Neste caso, a adição de ATP permite que a ação motora das cabeças de dineína provoque o deslizamento de um par de microtúbulos sobre o outro. (B) Em um axonema intacto (como no caso de um espermatozoide), o deslizamento dos pares de microtúbulos é impedido por ligações proteicas flexíveis. A ação motora causará, portanto, um movimento de flexão, criando ondas ou batimentos, como visto na Figura 16-80.

Nos humanos, defeitos hereditários da dineína ciliar causam a síndrome de Kartagener. Esta síndrome é caracterizada por esterilidade masculina devido a imobilidade dos espermatozoides, alta suscetibilidade a infecções pulmonares devido à paralisação dos cílios do trato respiratório e consequente incapacidade em eliminar sujeira e bactérias, assim como defeitos na determinação do eixo lateral do corpo durante estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (discutido no Capítulo 22).

As bactérias também podem mover-se em meio líquido usando estruturas de superfície celular chamadas de flagelos, mas estes não contêm microtúbulos ou dineína e não ondulam ou batem. Em vez disso, *flagelos bacterianos* são filamentos helicoidais rígidos, longos, feitos de subunidades repetitivas da proteína flagelina. Os flagelos giram como propulsores, guiados por um motor rotatório especial inserido na parede celular bacteriana (ver Figura 15-71). O uso do mesmo nome para designar estes dois tipos de aparelhos para a natação é um infeliz acidente histórico.

As estruturas chamadas de *corpos basais* enraízam firmemente os cílios e os flagelos eucarióticos à superfície celular. Os corpos basais possuem a mesma forma dos centríolos que estão inseridos na região central dos centrossomos animais, com nove grupos de tripletes de microtúbulos fusionados organizados em forma de roda de carreta (**Figura 16-84**). Além disso, em alguns organismos os corpos basais e os centrômeros são funcionalmente intercambiáveis: durante cada mitose da alga unicelular *Chlamydomonas*, por exemplo, o flagelo é reabsorvido, e os corpos basais migram para o interior da célula para fazer parte dos polos do fuso. Novos centríolos e corpos basais surgem por um curioso processo de replicação, no qual uma estrutura derivada menor é formada perpendicularmente à estrutura original por um mecanismo que permanece desconhecido (ver Figura 17-31).

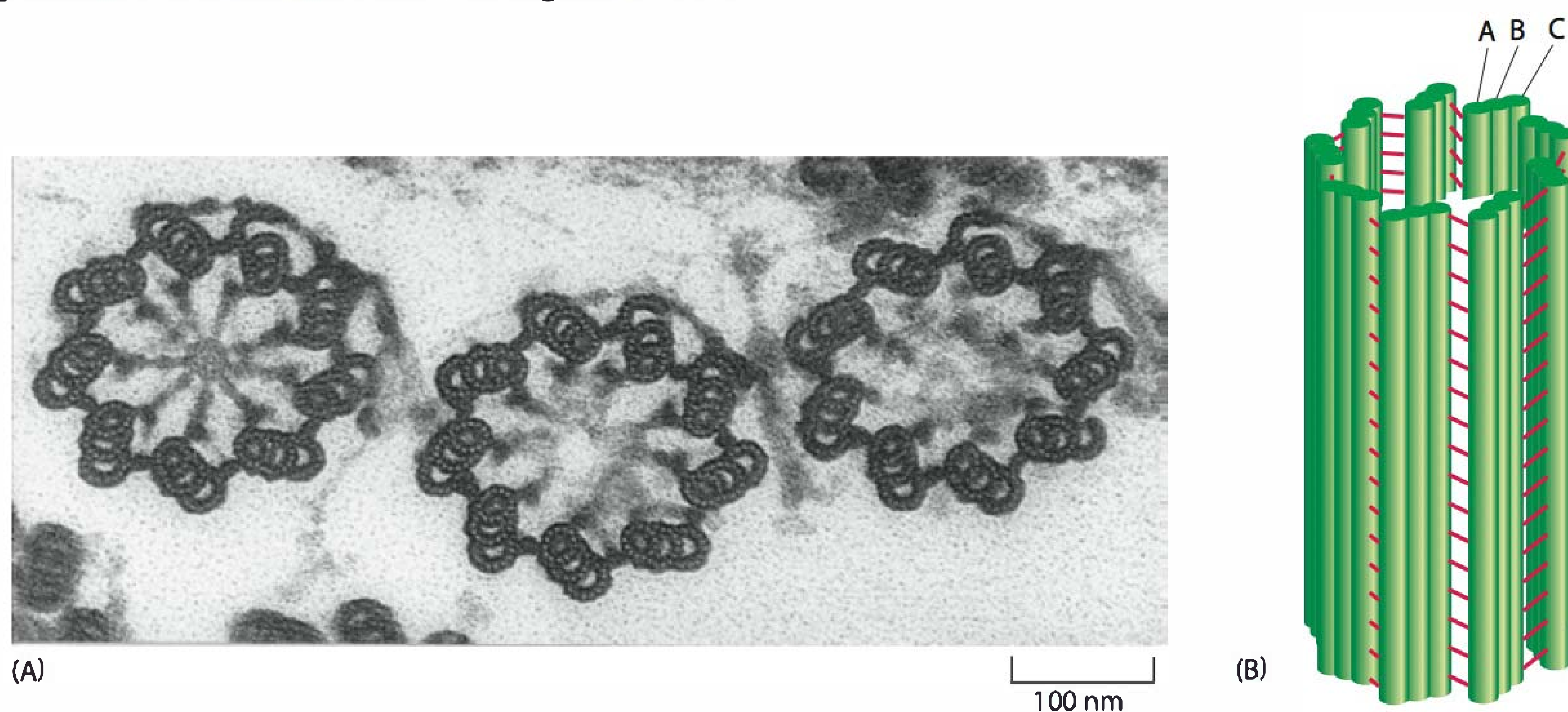


Figura 16-84 Corpos basais. (A) Microfotografia eletrônica de uma secção transversal através de três corpos basais no córtex de um protozoário. (B) Diagrama de um corpo basal visto lateralmente. Cada corpo basal forma a parte inferior de um axonema ciliar e é composto por nove grupos de tripletes de microtúbulos, cada triplete contendo um microtúbulo completo (o microtúbulo A) fusionado a dois microtúbulos incompletos (os microtúbulos B e C). Outras proteínas (ilustradas em *vermelho* em B) formam ligações que mantêm o arranjo cilíndrico dos microtúbulos unido. A organização dos microtúbulos em um centríolo é essencialmente a mesma (ver Figura 16-31). (A, cortesia de D. T. Woodrow e R. W. Linck.)

Mesmo em células animais que não possuem cílios ou flagelos completamente desenvolvidos, os centríolos frequentemente promovem a nucleação e o crescimento de uma projeção de superfície rica em microtúbulos e não motriz, denominada *cílio primário*. Os cílios primários geralmente possuem um comprimento de poucos micrômetros e não apresentam dineína. Eles são encontrados na superfície de diferentes tipos de células, como fibroblastos, células epiteliais, neurônios, células ósseas e condrócitos (células da cartilagem). Diversas proteínas de sinalização estão concentradas no cílio primário, como proteínas envolvidas na via de sinalização Hedgehog (ver p. 950) e receptores para neurotransmissores em neurônios do sistema nervoso central. Em células epiteliais renais, os cílios primários agem como sensores de fluxo na detecção de movimento do fluido que atravessa os túbulos renais. Canais de cálcio mecanossensíveis são abertos quando o fluxo flexiona o cílio primário, regulando o crescimento e a proliferação celular renal. A perda do canal de cálcio ou de outros componentes estruturais do cílio primário em células renais causa a doença do rim policístico, uma doença genética comum que leva a uma superproliferação das células epiteliais renais – o que resulta na formação de grandes cistos cheios de fluidos em todo o órgão e, ao final, falência renal. Outro tipo de cílio primário especializado incomum em termos de apresentar batimento é necessário ao estabelecimento da simetria lateral no embrião em desenvolvimento (ver Figura 22-87).

A construção do fuso mitótico requer microtúbulos dinâmicos e a interação de diversas proteínas motoras

As miofibrilas e os cílios são estruturas relativamente permanentes especializadas na produção de movimento repetitivo. No entanto, a maior parte dos movimentos celulares depende de estruturas lábeis que aparecem em estágios definidos do ciclo celular ou em resposta a sinais externos e desaparecem após cumprir suas funções. As mais familiares dessas estruturas são o fuso mitótico e o anel contrátil formados durante a divisão celular. No Capítulo 17, descreveremos em detalhes tanto o processo de mitose como o sistema de controle do ciclo celular que determina a duração dos eventos da divisão celular. Aqui, discutiremos brevemente alguns dos mecanismos do citoesqueleto que contribuem para a construção e a função mecânica do fuso mitótico.

A construção do fuso mitótico é um exemplo particularmente importante e fascinante da força de auto-organização de grupos de proteínas motoras em interação a filamentos citoesqueléticos dinâmicos. Este fenômeno também caracteriza a participação ativa dos cromossomos. Em uma rápida sequência de eventos que geralmente dura menos de uma hora em células animais, o arranjo interfásico de microtúbulos é completamente dissociado e reorganizado para a formação da estrutura em fuso bipolar que é responsável pela segregação dos cromossomos duplicados em perfeita fidelidade para as duas células-filhas. Considerando-se a grande importância da transmissão adequada do material genético, a construção e o funcionamento do fuso mitótico apresentam um enorme grau de redundância, para que, caso um conjunto de mecanismos não funcione devido a uma razão qualquer, um mecanismo substituto possa ser colocado em funcionamento e assegure a perfeita divisão dos cromossomos.

Na mitose inicial, ocorrem grandes alterações no comportamento dinâmico e no comprimento médio dos microtúbulos. Na interfase, os arranjos de microtúbulos são caracteristicamente longos e sofrem raras catástrofes, mas durante a mitose os microtúbulos são mais curtos e muito mais dinâmicos. A nucleação e a montagem de microtúbulos está aumentada nas regiões adjacentes aos cromossomos condensados. Conforme os microtúbulos são montados sobre a cromatina condensada, em orientações aleatórias, a ação coordenada de diferentes proteínas motoras constrói um fuso bipolar coerente a partir da massa de microtúbulos desorganizados. Inicialmente, a cinesina-5 bipolar (ver Figura 16-58) promove a formação de feixes de microtúbulos em arranjos paralelos e desliza os microtúbulos que estão orientados em sentidos opostos uns sobre os outros. A seguir, outra cinesina que está ligada aos braços dos cromossomos, a cinesina-4, direciona-se para as extremidades mais dos microtúbulos associados aos cromossomos e impulsiona suas extremidades menos para longe da massa de cromossomos. Finalmente, motores de dineína citoplasmática e cinesina-14 direcionados para as extremidades menos formam complexos oligoméricos com proteínas estruturais que agregam as extremidades menos para a formação dos polos do fuso. Na maioria das células de animais, estes processos são dirigidos por um par de centríolos que auxiliam a nucleação e a organização das extremidades menos dos microtúbulos. O resultado final é um fuso mitótico bipolar elegantemente balanceado (**Figura 16-85**).

Após a montagem do fuso mitótico bipolar, este pode permanecer aparentemente estável e quiescente por longos períodos. Em diversos animais, o óvulo não-fertilizado mantém

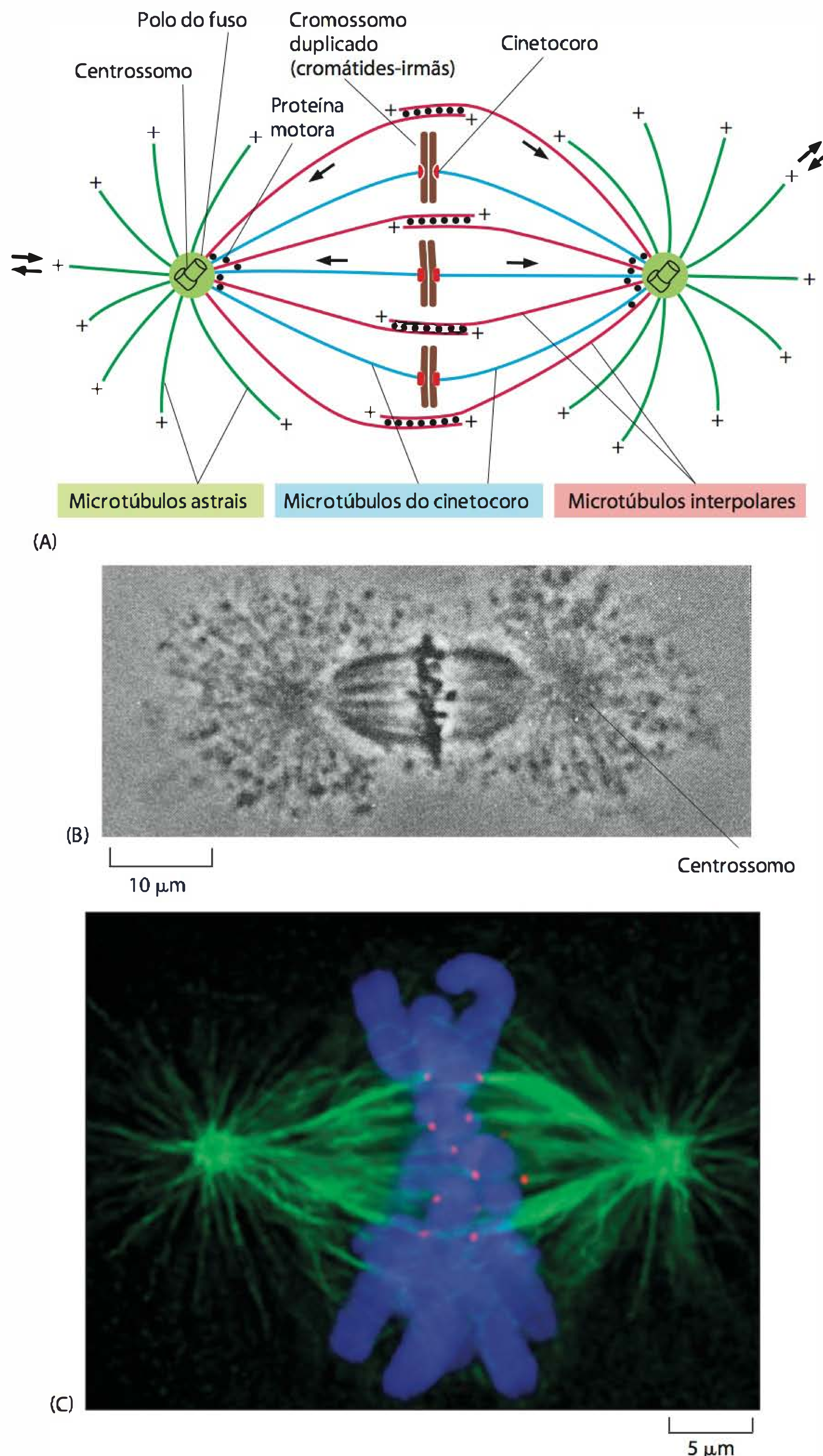


Figura 16-85 O fuso mitótico em células animais. (A) Existem três classes de microtúbulos dinâmicos em um fuso mitótico na metáfase: microtúbulos do cinetocoro (em *azul*) que conectam cada um dos cromossomos ao polo do fuso, microtúbulos interpolares (em *vermelho*) que mantêm unidas as duas metades do fuso, e microtúbulos astrais (em *verde*) que podem interagir com o córtex celular. Todos os microtúbulos estão orientados com suas extremidades menos (-) nos polos do fuso onde residem os centrossomos e com suas extremidades mais (+) se projetando a partir destas estruturas. Como indicado pelas flechas, os microtúbulos astrais apresentam instabilidade dinâmica, sofrendo tanto crescimento como encurtamento em suas extremidades mais (+), ao passo que os microtúbulos do cinetocoro e os microtúbulos interpolares seguem um fluxo contínuo rumo aos polos do fuso. (B) Microfotografia de contraste de fase de um fuso mitótico isolado na metáfase, observando-se os cromossomos alinhados no centro do fuso. (C) Esta microfotografia de fluorescência mostra os microtúbulos do fuso em *verde* e os cromossomos em *azul*. Os pontos *vermelhos* marcam os cinetocoros, estruturas especializadas que conectam os microtúbulos aos cromossomos. (B, de E. D. Salmon e R. R. Segall, *J. Cell Biol.* 86:355-365, 1980. Com permissão de The Rockefeller University Press; C, de A. Desai, *Curr. Biol.* 10:R508, 2000. Com permissão de Elsevier.)

seu ciclo celular na metáfase meiótica, e o fuso espera por dias ou meses até que a fertilização induza a progressão do ciclo celular (ver Capítulo 21). Esta aparência estática é enganosa, pois o fuso é na verdade uma estrutura extremamente dinâmica, tensionada pela ação que terá início quando os cromossomos repentinamente começarem a se separar na anáfase. Por exemplo, vários microtúbulos do fuso exibem um comportamento denominado *fluxo em direção ao polo* (*poleward flux*), com uma adição média de subunidades de tubulina nas extremidades mais, balanceando uma perda média nas extremidades menos próximas ao polo do fuso. O fluxo polar é conduzido pela ação de proteínas motoras direcionadas para a extremidade menos (–), no fuso polar, que estão constantemente circulando nos microtúbulos, e pelos motores bipolares de cinesina-5 direcionados para as extremidades mais sobre os microtúbulos interpolares que estão constantemente mantendo-os espaçados (ver Figura 16-85). Como será discutido no Capítulo 17, o delicado equilíbrio entre estes dois tipos de atividades de proteínas motoras também determina o tamanho do fuso. Em conjunto, o fuso mitótico representa um esforço conjunto que combina as propriedades dinâmicas dos microtúbulos às ações individuais de dúzias de motores moleculares e de outros componentes organizacionais.

Diversas células podem deslizar sobre um substrato sólido

O processo de deslizamento celular nos dá uma outra situação onde podemos apreciar a integração dinâmica de filamentos do citoesqueleto, reguladores dos filamentos e proteínas motoras. Muitas células se movem arrastando-se sobre superfícies em vez de utilizar cílios ou flagelos para nadar. As amebas predadoras rastejam continuamente em busca de comida e podem facilmente ser observadas atacando e devorando ciliados menores e flagelados em uma gota de água. Em animais, a maior parte da locomoção celular ocorre por rastejamento, com exceção do nado dos espermatozoides. Durante a embriogênese, a estrutura de um animal é criada pela migração de células individuais para pontos-alvo específicos e pela ação coordenada de camadas epiteliais inteiras (discutido no Capítulo 23). Em invertebrados, as *células da crista neural* são extraordinárias por suas migrações a longas distâncias, partindo da região de sua origem no tubo neural e dirigindo-se a uma ampla variedade de regiões em todo o embrião. Essas células têm diferentes destinos, tornando-se células pigmentares da pele, neurônios sensoriais e simpáticos e células da glia, além de várias estruturas faciais. Deslocamentos a grandes distâncias são essenciais para a construção do sistema nervoso completo: é por este mecanismo que os cones de crescimento ricos em actina, nas extremidades de axônios em desenvolvimento, direcionam-se para seus eventuais alvos sinápticos, guiados por combinações de sinais solúveis e sinais ligados à membrana das células e da matriz extracelular existente em seu caminho.

O animal adulto também está fervilhando de células em movimento. Macrófagos e neutrófilos encaminham-se para as regiões de infecção e englobam invasores estranhos como parte essencial da resposta imune inata. Osteoclastos perfuram o interior dos ossos, formando canais que são preenchidos pelos osteoblastos que os seguem, em um contínuo processo de remodelação e renovação óssea. De forma semelhante, fibroblastos podem migrar através de tecido conectivo, remodelando-o quando necessário e ajudando a reconstruir estruturas danificadas em regiões de lesão. Em uma procissão ordenada, as células do epitélio que reveste o intestino percorrem as laterais das vilosidades intestinais, substituindo células de absorção perdidas nas extremidades destas vilosidades. Infelizmente, células com capacidade de migrar também desempenham um importante papel em muitos tipos de câncer, quando células de um tumor primário invadem tecidos vizinhos e penetram vasos sanguíneos ou linfáticos e então emergem em outras regiões do corpo, para formar metástases.

O movimento de deslizamento das células é um processo integrado extremamente complexo, dependente do córtex rico em actina existente abaixo da membrana citoplasmática. Três atividades distintas estão envolvidas nesse processo: *protrusão*, na qual estruturas ricas em actina são impulsionadas para fora na face anterior da célula; *ligação*, na qual o citoesqueleto de actina conecta-se através da membrana citoplasmática ao substrato; e *tração*, na qual uma massa de citoplasma é arrastada e impulsionada para a frente (**Figura 16-86**). Em determinadas células deslizantes, como os queratócitos da epiderme de peixes, estas atividades

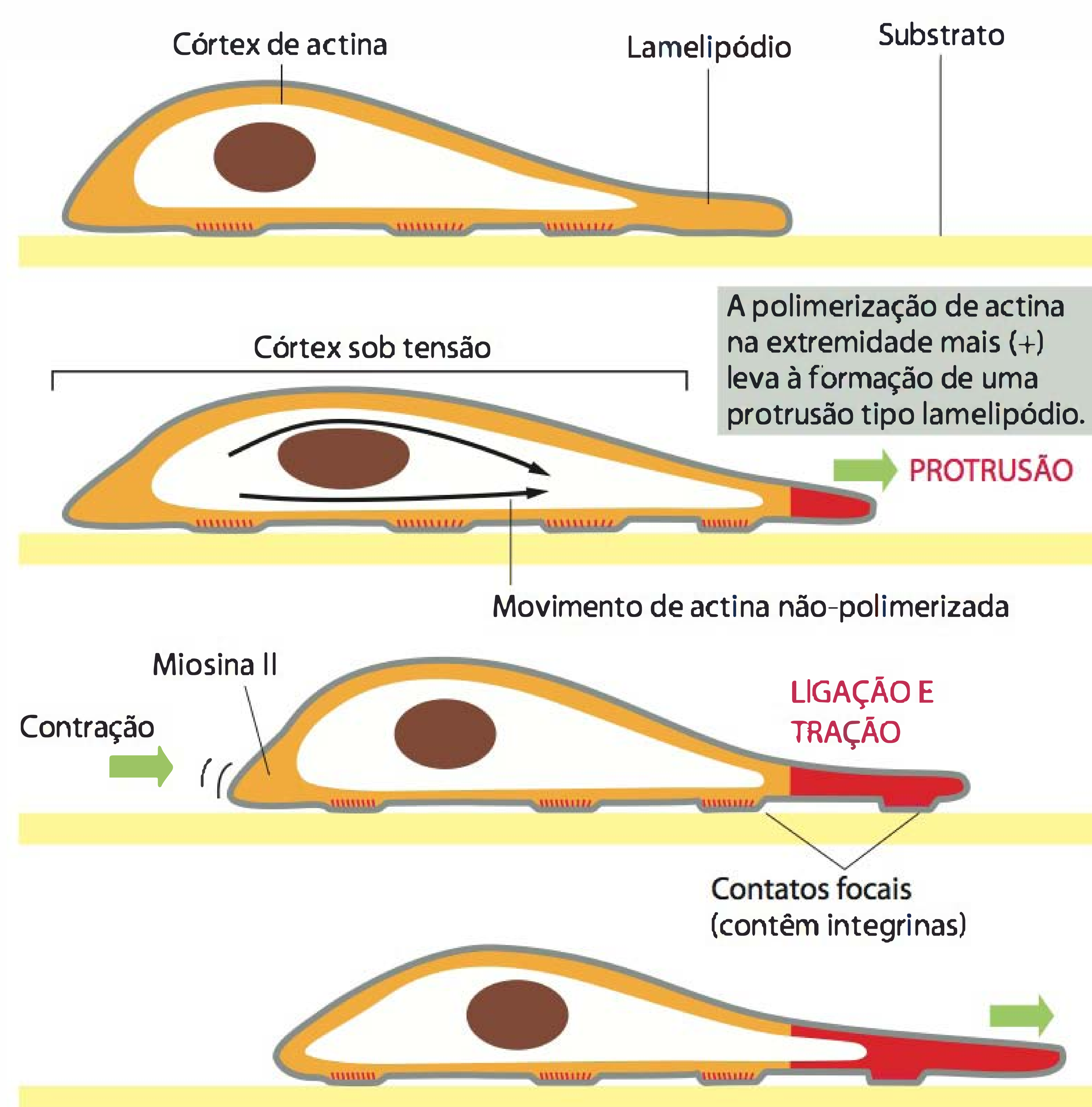


Figura 16-86 Modelo de como as forças geradas no córtex rico em actina impulsionam uma célula. A protrusão dependente de polimerização de actina e a adesão firme de um lamelipódio na borda anterior impulsionam a célula para a frente (setas *verdes* na frente da célula) e esticam o córtex de actina. Uma contração na parte posterior impele o corpo da célula para a frente (seta *verde* na região posterior) para relaxar a tensão (tração). Conforme a célula avança, novos pontos de ancoragem são estabelecidos na parte anterior, sendo os pontos de ancoragem antigos dissociados na região posterior. Este mesmo ciclo pode ser repetido fazendo a célula movimentar-se passo a passo. Alternativamente, todos os passos podem estar fortemente coordenados, fazendo com que a célula deslize suavemente. A actina cortical recentemente formada está indicada em *vermelho*.

encontram-se intimamente coordenadas, e as células parecem escorregar suavemente para a frente sem que ocorram mudanças em sua forma. Em outras células, como é o caso de fibroblastos, estas atividades são mais independentes, e a locomoção é irregular e em pulsos.

A polimerização de actina direciona a protrusão da membrana plasmática

O primeiro passo da locomoção, a protrusão de uma borda anterior, parece apoiar-se primariamente em forças geradas pela polimerização de actina que impulsiona a membrana citoplasmática para a frente. Diferentes tipos celulares dão origem a diferentes tipos de estruturas protrusivas, incluindo filopódios (também conhecidos como microespículas), lamelipódios e pseudópodes. Todas essas estruturas são preenchidas por um núcleo denso de filamentos de actina, o qual exclui a presença de organelas delimitadas por membrana. Essas três estruturas diferem entre si principalmente pela forma de organização da actina – em uma, duas ou três dimensões, respectivamente – e já foram abordadas anteriormente no que se refere aos resultados da presença de diferentes proteínas associadas à actina.

Os **filopódios**, formados por cones de crescimento em migração e alguns tipos de fibroblastos, são essencialmente unidimensionais. Eles contêm um núcleo de longos filamentos de actina em feixe, os quais são semelhantes aos das microvilosidades, apesar de serem mais longos e finos, além de mais dinâmicos. Os **lamelipódios**, formados por células epiteliais e fibroblastos, assim como por alguns neurônios, são estruturas bidimensionais semelhantes a camadas ou lençóis. Eles contêm uma rede de filamentos de actina interligados ortogonalmente, sendo a maioria organizada em um plano paralelo ao substrato sólido. Os **pseudópodes**, formados pelas amebas e pelos neutrófilos, são grossas projeções tridimensionais preenchidas por um gel de filamentos de actina. Talvez pelo fato de sua estrutura bidimensional ser mais conveniente para a análise sob microscopia óptica, temos um maior conhecimento a respeito da organização dinâmica e do mecanismo de protrusão do lamelipódio do que a respeito dos filopódios ou dos pseudópodes.

O lamelipódio contém toda a maquinaria necessária à locomoção celular. Muitos estudos abordaram os lamelipódios de células epiteliais da epiderme de peixes e anfíbios, os quais são conhecidos como *queratócitos* devido ao seu abundante conteúdo de filamentos de queratina. Estas células normalmente recobrem o animal, formando uma camada epitelial, e são especializadas na rápida cicatrização de lesões, movendo-se a velocidades de até 30 μm/min. Quando cultivados individualmente, os queratócitos assumem um formato característico, com um lamelipódio extremamente grande que arrasta um pequeno corpo celular, o qual não está conectado ao substrato (**Figura 16-87**). Fragmentos deste lamelipódio podem ser retirados com o auxílio de uma micropipeta. Apesar de geralmente ocorrer ausência de microtúbulos e de organelas delimitadas por membrana nestes fragmentos, eles continuam a mover-se normalmente, apresentando uma aparência de pequenos queratócitos.

O comportamento dinâmico dos filamentos de actina pode ser estudado em lamelipódios de queratócitos pela marcação de uma pequena parcela de actina e da análise de seu

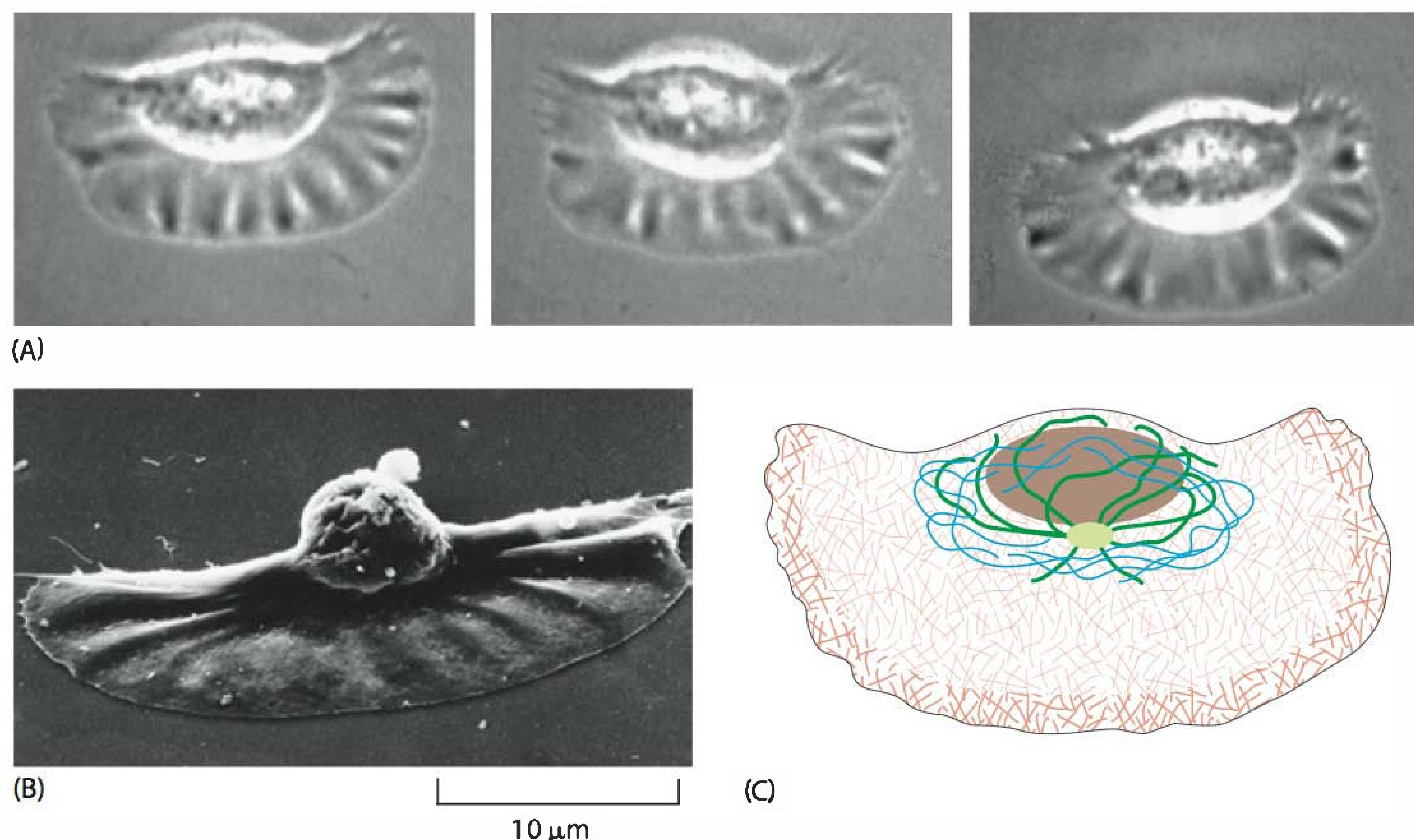


Figura 16-87 Queratócitos migratórios da epiderme de peixes. (A) Microfotografias de um queratócito em cultura tiradas em intervalos de 15 segundos. Esta célula está movimentando-se a uma velocidade de aproximadamente 15 μm/s. (B) Queratócito observado em microscopia eletrônica de varredura, mostrando seu lamelipódio grande e plano arrastando o pequeno corpo celular, no qual se encontra o núcleo, sobre o substrato. (C) A distribuição de filamentos do citoesqueleto nesta célula. Os filamentos de actina (em *vermelho*) preenchem o grande lamelipódio e são responsáveis pelo rápido movimento da célula. Os microtúbulos (em *verde*) e os filamentos intermediários (em *azul*) estão restritos às regiões próximas ao núcleo. (A e B, cortesia de Juliet Lee.)

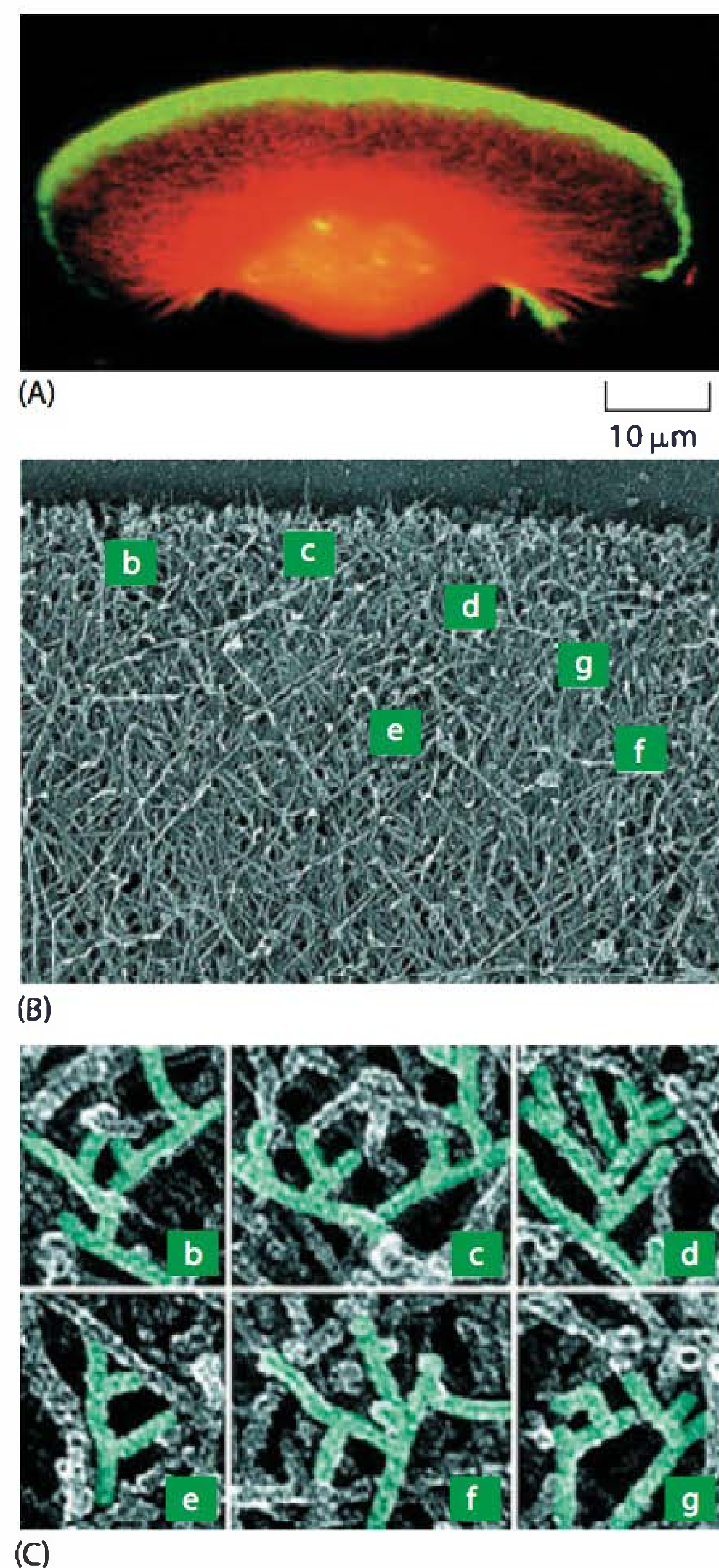


Figura 16-88 Nucleação de filamentos de actina e formação de rede pelo complexo ARP em lamelipódios. (A) Um queratócito com os filamentos de actina corados em *vermelho* por faloidina fluorescente e com o complexo ARP corado em *verde* com anticorpos dirigidos contra um dos componentes proteicos deste sistema. As regiões onde ocorre sobreposição aparecem em *amarelo*. O complexo ARP está altamente concentrado próximo à borda anterior do lamelipódio, onde a nucleação de actina é mais ativa. (B) Microfotografia eletrônica de uma borda anterior de um queratócito sombreada por platina, mostrando a densa rede de filamentos de actina. As indicações mostram as regiões apresentadas em maior aumento em C. (C) Maior aumento das regiões indicadas na rede de actina da borda anterior apresentada em B. Numerosos filamentos ramificados podem ser vistos, com o ângulo característico de 70º formado quando o complexo ARP provoca a nucleação de um novo filamento de actina a partir da lateral de um filamento preexistente (ver Figura 16-34). (De T. Svitkina e G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145:1009-1026, 1999. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

destino. Esse sistema revelou que, enquanto o lamelipódio desloca-se para a frente, os filamentos de actina permanecem estacionários em relação ao substrato. Os filamentos de actina presentes nesta rede se encontram em sua maioria orientados com suas extremidades mais para a frente. As extremidades menos (–) encontram-se frequentemente ligadas às laterais de outros filamentos de actina por complexos ARP (ver Figura 16-34), auxiliando a formar a rede bidimensional (**Figura 16-88**). A rede como um todo parece estar sob o efeito de *treadmilling*, ou seja, associando novas subunidades na face anterior e sofrendo dissociação em sua região posterior, lembrando bastante o *treadmilling* que ocorre em filamentos individuais de actina e microtúbulos, discutido anteriormente (ver Figura 16-14). O *treadmilling* de uma rede dendrítica construída a partir de complexos ARP é apenas uma das diversas formas em que a célula pode usar filamentos dinâmicos de actina pra conduzir a protrusão da borda anterior. Algumas células de lenta locomoção, como fibroblastos, parecem usar um mecanismo que não depende dos complexos ARP, mas que permanece dependente da coordenação entre a montagem e a dissociação de filamentos de actina, provavelmente coordenada por forminas.

A manutenção de um movimento unidirecional pelo lamelipódio parece necessitar da cooperação e da integração mecânica de diversos fatores. A nucleação de filamentos está localizada na borda anterior dessa estrutura, com o crescimento de filamentos novos de actina ocorrendo principalmente na região que impulsiona a membrana plasmática para a frente. A maior parte do processo de despolimerização ocorre em regiões bastante afastadas da borda anterior. Tendo em vista que a *cofilina* (ver Figura 16-42) liga-se cooperativa e preferencialmente a filamentos de actina que contêm ADP-actina (a forma D), os filamentos de forma T recém-sintetizados na borda anterior devem ser resistentes à despolimerização mediada pela cofilina (**Figura 16-89**). Conforme ocorre envelhecimento do filamento e consequente hidrólise de ATP, a cofilina pode eficientemente dissociar os filamentos mais antigos. Assim, o retardo da hidrólise de ATP pelos filamentos de actina parece fornecer a base para o mecanismo que mantém um processo de *treadmilling* unidirecional e eficiente no lamelipódio (**Figura 16-90**). Finalmente, os filamentos de miosina II bipolar parecem associar-se aos filamentos de actina na rede e puxá-los para uma nova orientação – de quase perpendicular à borda anterior para uma orientação praticamente paralela a ela. Essa contração evita a protrusão e pinça as laterais do lamelipódio em movimento, auxiliando a manutenção das laterais da célula conforme esta se movimenta para a frente (**Figura 16-91**).

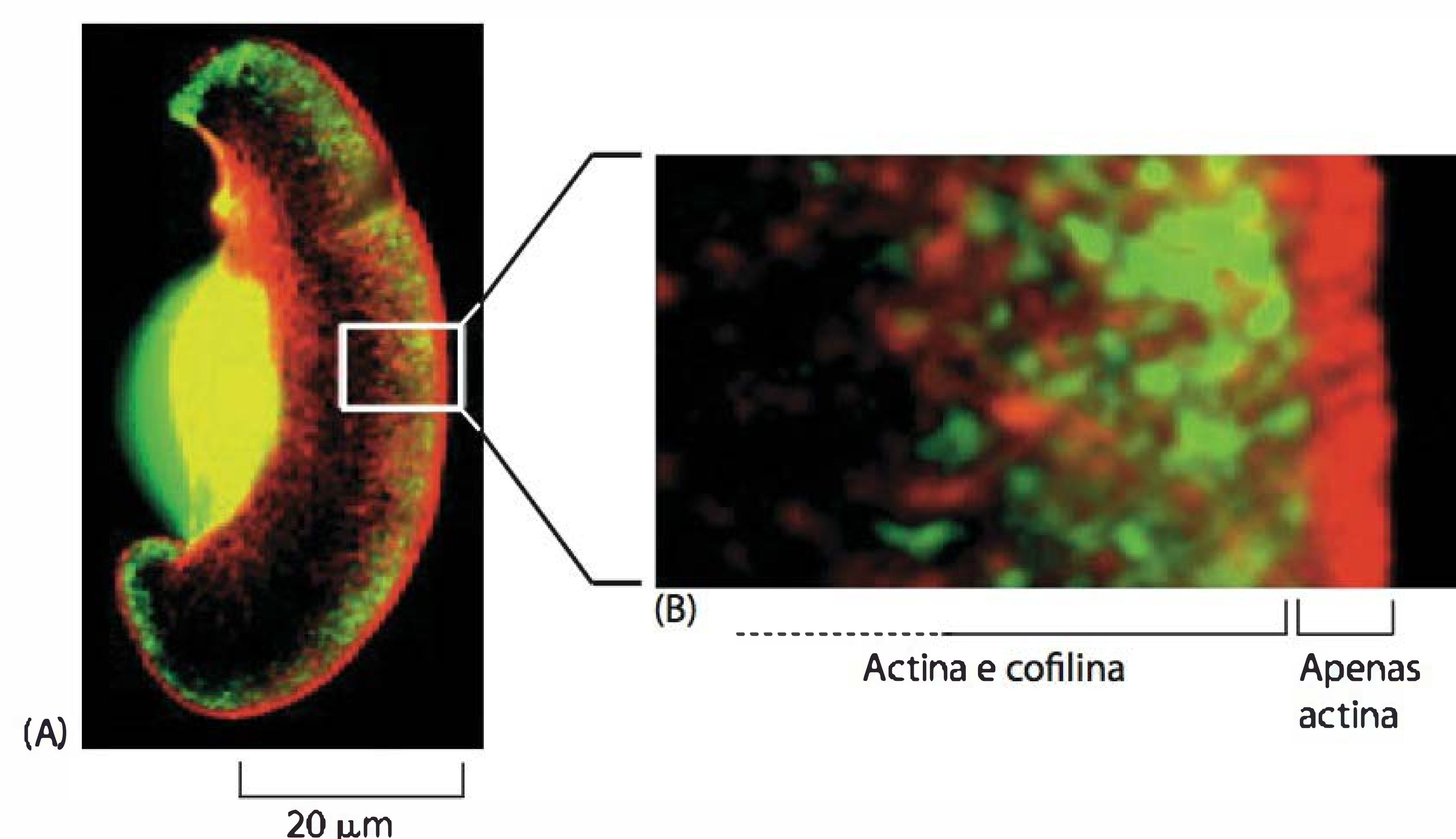


Figura 16-89 A cofilina em lamelipódios. (A) Um queratócito com filamentos de actina marcados em *vermelho* por faloidina fluorescente e com a cofilina marcada em *verde* por um anticorpo fluorescente. As regiões onde ocorre sobreposição aparecem em *amarelo*. Apesar da densa trama de actina abranger todo o lamelipódio, a cofilina não está presente na região da borda anterior. (B) Um maior aumento da região indicada pelo retângulo *branco* em A. Os filamentos de actina mais próximos à borda anterior, que são aqueles mais recentemente formados e provavelmente aqueles que contêm ATP actina (em vez de ADP actina) dentro do arranjo de filamentos, geralmente não estão associados com cofilina. (De T. Svitkina e G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145:1009-1026, 1999. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

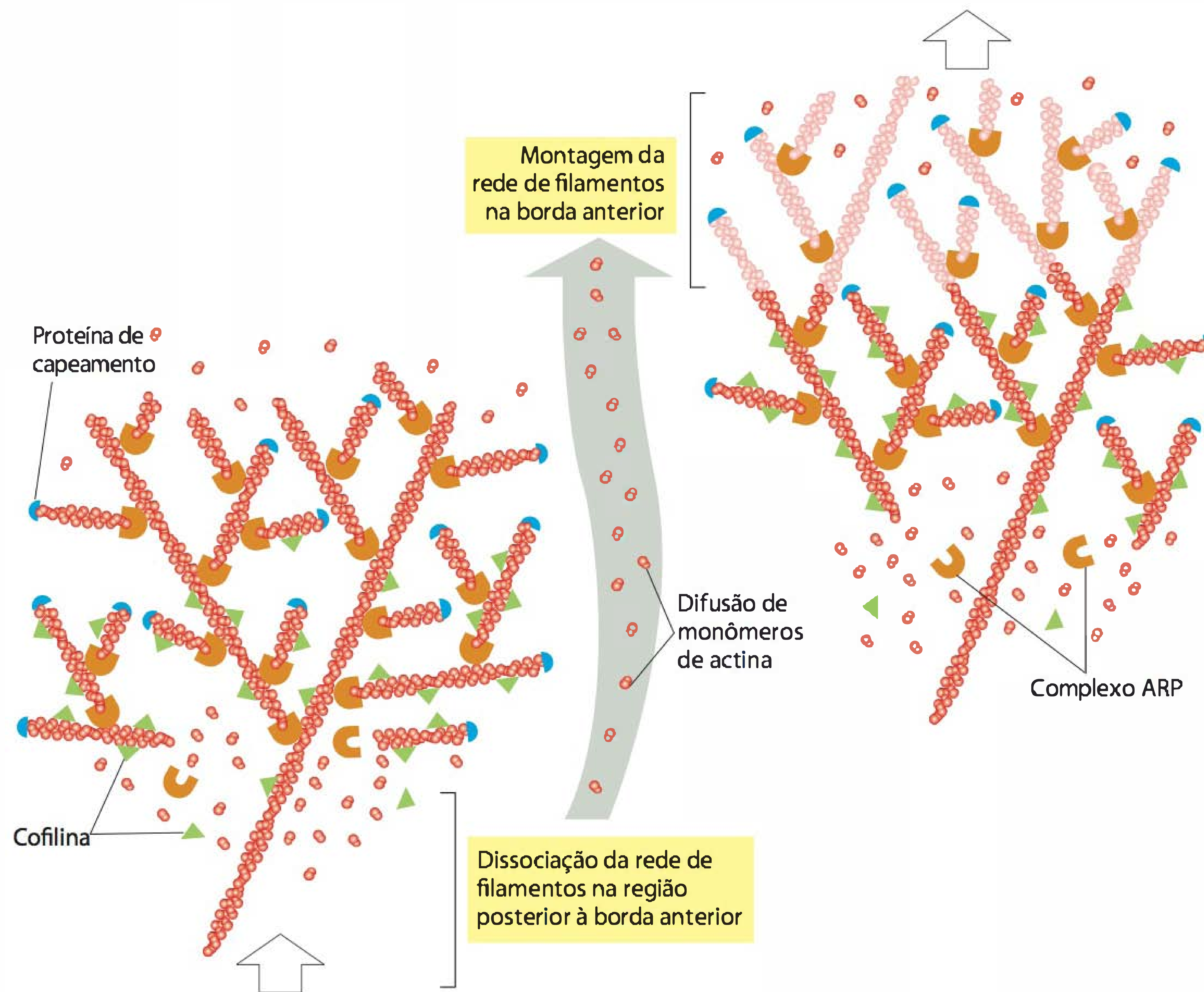


Figura 16-90 Modelo para o mecanismo de protrusão da rede de actina na borda anterior. Dois momentos durante o avanço de um lamelipódio estão ilustrados, sendo salientadas em cores claras as estruturas organizadas no espaço de tempo decorrido entre os dois pontos. A nucleação é mediada por complexos ARP na porção anterior. Filamentos de actina recentemente nucleados são ligados às laterais de filamentos preexistentes, predominantemente em ângulos de 70º. Ocorre crescimento dos filamentos, impulsionando a membrana plasmática para frente devido a algum tipo de ancoragem existente na região posterior do arranjo. Sob uma taxa constante, as extremidades mais (+) dos filamentos de actina são capeadas. Após as novas subunidades de actina polimerizadas no arranjo hidrolisarem o ATP ligado a elas, os filamentos tornam-se suscetíveis à despolimerização pela cofilina. Este ciclo provoca uma separação espacial entre a montagem da rede de filamentos na região anterior e a dissociação dos mesmos na região posterior, de tal forma que a trama de filamentos de actina, em conjunto, move-se para frente, mesmo se considerarmos que filamentos individuais permanecem em estado estacionário em relação ao substrato.

A força de impulsão criada pela polimerização de uma rede ramificada de filamentos de actina desempenha papéis importantes em diversos processos celulares. A polimerização na extremidade mais (+) impulsiona a membrana plasmática para frente, como no exemplo que acabamos de apresentar (ver Figura 16-90), ou pode impulsionar vesículas ou partículas através do citoplasma da célula, como no exemplo da bactéria *Listeria monocytogenes*, apresentado no Capítulo 24 (ver Figura 24-37). Além disso, quando ancorado à membrana sob uma forma mais complexa, esse mesmo tipo de força gera invaginações da membrana plasmática, como ocorre durante os processos de endocitose e de fagocitose discutidos no Capítulo 13.

É interessante comparar a organização de um lamelipódio rico em actina à organização de um fuso mitótico rico em microtúbulos. Em ambos os casos, a célula fortalece e amplifica o comportamento dinâmico intrínseco dos sistemas de filamento citoesquelético para gerar estruturas em grande escala que determinam o comportamento da célula como um todo. Ambas as estruturas citadas se caracterizam por um rápido *turnover* dos filamentos citoesqueléticos constituintes, mesmo considerando-se que as estruturas *per se* podem permanecer intactas, em estado de repouso, por longos períodos. A borda anterior da membrana plasmática do lamelipódio desempenha uma função de organização análoga a dos cromossomos condensados que organizam e estimulam a dinâmica do fuso mitótico. Em ambos os casos, proteínas motoras moleculares auxiliam o aumento do fluxo e *turnover* de filamentos do citoesqueleto em arranjos em grande escala.

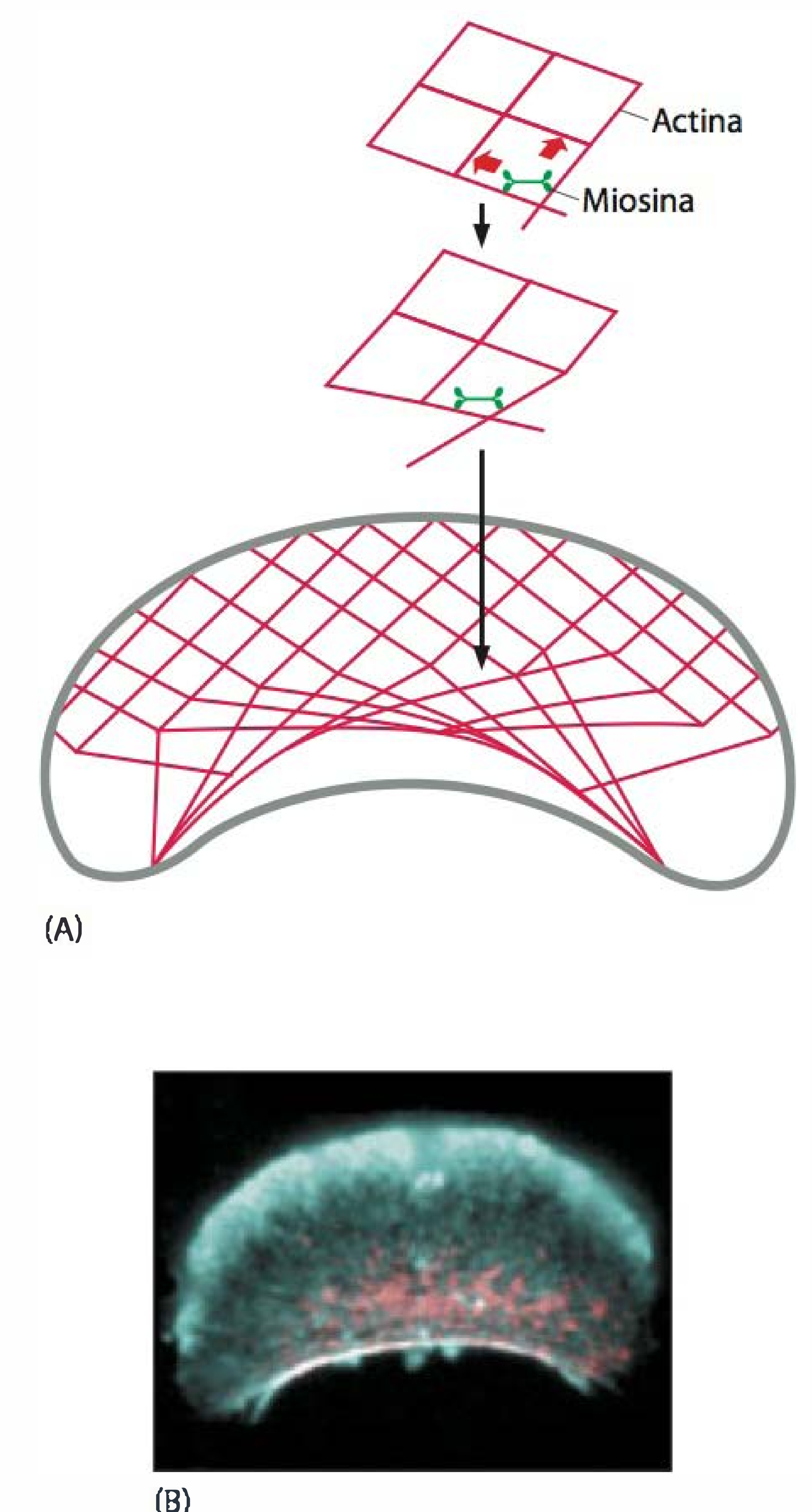
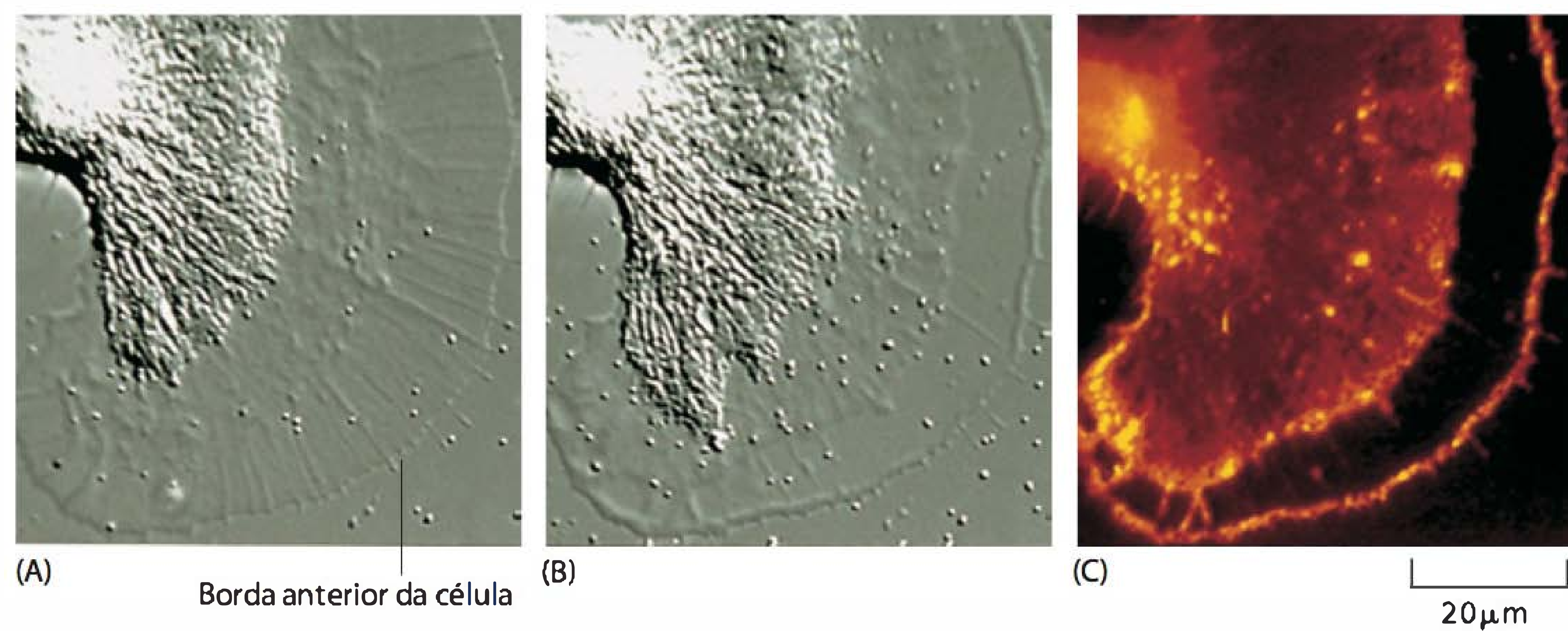


Figura 16-91 Contribuição da miosina II para a polarização do movimento celular. (A) Filamentos bipolares de miosina II se ligam a filamentos de actina na rede dendrítica do lamelipódio e provocam uma contração na rede. A reorientação dos filamentos de actina mediada pela miosina na rede dendrítica forma um feixe de actina que recruta mais miosina II e contribui para a geração de forças contráteis necessárias à retração da porção posterior da célula em movimento. (B) Um fragmento de um grande lamelipódio de um queratócito pode ser separado do corpo celular principal por cirurgia com uma micropipeta ou por tratamento da célula com fármacos específicos. Muitos destes fragmentos continuam a se mover rapidamente, através da mesma organização geral do citoesqueleto, como se fossem queratócitos intactos. A actina (em *azul*) forma uma protrusão em forma de rede na região anterior do fragmento. A miosina II (em *rosa*) está concentrada em uma linha, na região posterior. (De A. Verkovsky et al., *Curr. Biol.* 9:11-20, 1999. Com permissão de Elsevier.)



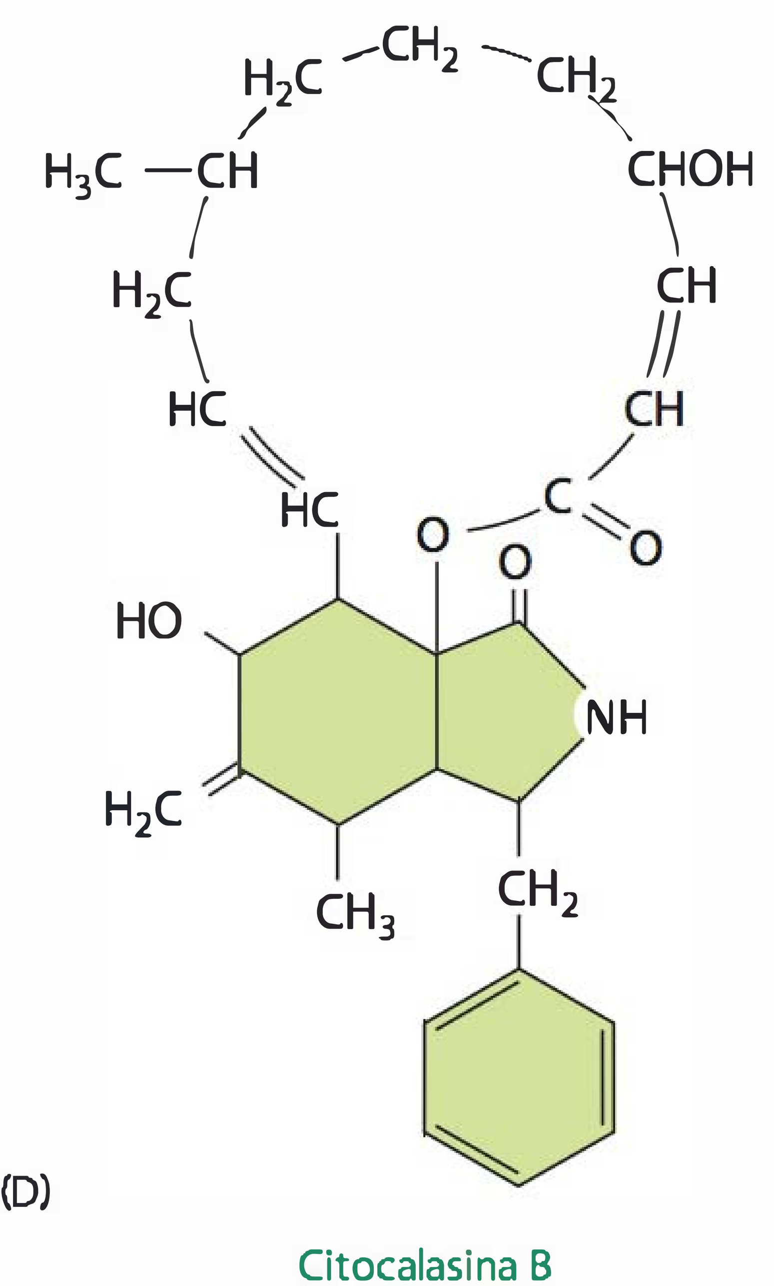


Figura 16-92 Movimento retrógrado da rede de actina em um lamelipódio de cone de crescimento. (A) Um cone de crescimento de um neurônio de *Aplysia* é cultivado em um substrato altamente adesivo e observado por microscopia diferencial de contraste de interferência. Os microtúbulos e as organelas delimitadas por membrana estão confinados à região clara posterior do cone de crescimento (à *esquerda*), enquanto a rede de filamentos de actina preenche o lamelipódio (à *direita*). (B) Após um breve tratamento com citocalasina, que provoca o capeamento da extremidade mais (+) dos filamentos de actina (ver Tabela 16-2, p. 988), a rede de actina se destaca da borda anterior do lamelipódio e é empurrada para trás. (C) No momento mostrado em B, a célula foi fixada e corada com faloidina fluorescente para observação da distribuição dos filamentos de actina. Alguns filamentos de actina persistem na borda anterior, mas a região diretamente posterior à borda encontra-se desprovida de filamentos. Observe o nítido limite da rede de actina em movimento retrógrado. (D) A complexa estrutura cíclica da citocalasina B. (A-C, cortesia de Paul Forscher.)

A adesão e a tração permitem que a célula seja impulsionada

Aparentemente, os lamelipódios de todas as células compartilham um sistema básico e simples de organização dinâmica onde a montagem de filamentos de actina ocorre preferencialmente na borda anterior, e a dissociação dos filamentos de actina ocorre predominantemente na região posterior. No entanto, as interações entre a célula e seu ambiente físico normal, em geral, tornam a situação consideravelmente mais complexa do que o simples e fácil deslocamento de um queratócito de peixe sobre uma placa de cultura celular. De importância extrema na locomoção é a íntima troca de informações entre o citoesqueleto e a maquinaria de adesão celular. Apesar de um certo grau de adesão ao substrato ser necessário para qualquer tipo de deslocamento celular, as taxas de adesão e locomoção em geral estão inversamente relacionadas, onde células altamente adesivas movem-se mais lentamente do que células fracamente adesivas. Os queratócitos são fracamente adesivos ao substrato, e a força da polimerização de actina pode impulsionar a borda anterior da célula muito rapidamente. Em contraste, quando neurônios de *Aplysia* (vaquinha-do-mar) são cultivados em um substrato altamente aderente, eles formam grandes lamelipódios que se fixam tão fortemente que chegam a impedir o movimento. Neste lamelipódio, o mesmo ciclo de nucleação localizada de novos filamentos de actina, de despolimerização de filamentos antigos e de contração dependente de miosina continua a operar. Contudo, tendo em vista que a borda anterior está fisicamente impedida de mover-se para a frente, a rede de actina move-se inteiramente para trás, em direção ao corpo celular (**Figura 16-92**). A adesão da maioria das células encontra-se em um ponto entre estes dois extremos, e a maioria dos lamelipódios exibe uma certa combinação entre a protrusão anterior de filamentos de actina (como nos queratócitos) e o fluxo retroativo de actina (como o dos neurônios de *Aplysia*).

À medida que o lamelipódio, o filopódio e os pseudópodes estendem-se para a frente posicionando-se sobre o substrato, podem formar novas regiões de adesão na parte anterior

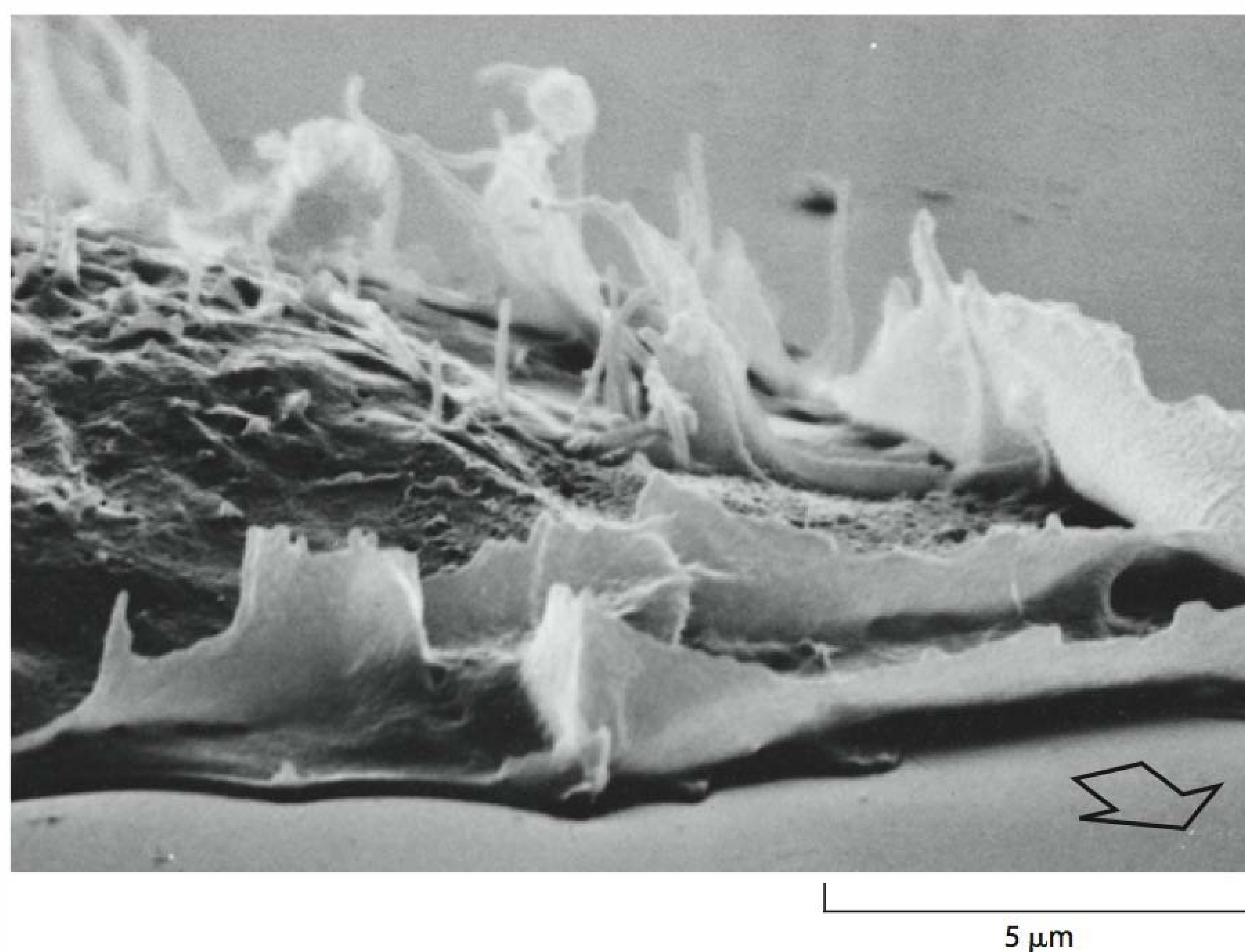


Figura 16-93 Lamelipódios e ondulações sobre a borda anterior de um fibroblasto humano migrando em cultura. A *seta* nesta microfotografia eletrônica de varredura mostra a direção do movimento da célula. Conforme a célula se movimenta, os lamelipódios que fracassam em sua tentativa de adesão ao substrato são arrastados para trás, sobre a superfície dorsal da célula, em um movimento chamado de ondulação. (Cortesia de Julian Heath.)

da célula que permanecem estacionárias conforme a célula passa sobre elas, persistindo até o momento em que a porção posterior da célula as alcança. Quando um lamelipódio não consegue aderir ao substrato, ele em geral é erguido sobre a superfície dorsal da célula e rapidamente transportado em direção à região posterior sob a forma de uma "onda" (**Figura 16-93**).

Os sítios de adesão estabelecidos na borda anterior funcionam como pontos de ancoragem, os quais proporcionam à célula a possibilidade de geração de tração sobre o substrato e a consequente capacidade para impulsionar seu próprio corpo para a frente. Proteínas motoras de miosina, especialmente a miosina II, parecem gerar força de tração. Em diversas células que se locomovem, a miosina II está concentrada na região posterior da célula onde pode auxiliar a empurrar o corpo celular para frente de forma similar ao que fazemos ao espremer um tubo de pasta de dentes, enrolando-o (**Figura 16-94**; ver também Figura 16-91). As amebas *Dictyostelium,* deficientes em miosina II, são capazes de promover a protrusão de pseudópodes em velocidade normal, mas a translocação de seus corpos é muito mais lenta do que a de outras amebas de tipo selvagem, o que parece indicar a importância da contração da miosina II neste momento do ciclo de locomoção celular. Além de auxiliar a empurrar o corpo celular para a frente, a contração do córtex rico em actina na região posterior da célula pode seletivamente enfraquecer antigas interações adesivas que tendem a puxar a célula para trás. A miosina II pode também transportar componentes do corpo celular para frente através de um feixe polarizado de filamentos de actina.

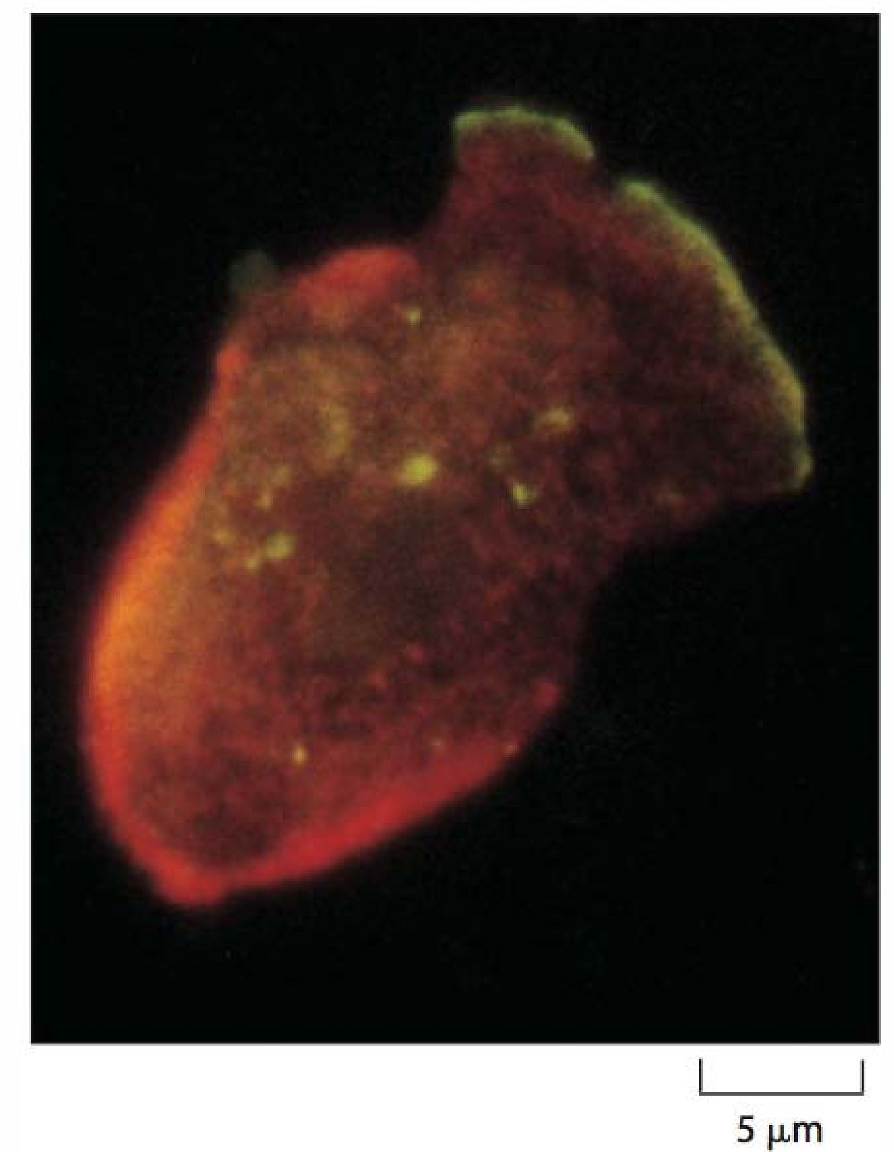


Figura 16-94 A localização de miosina I e miosina II em uma ameba *Dictyostelium* normal em movimento. Esta célula estava movendo-se para o canto direito superior quando foi fixada e corada com anticorpos específicos para duas isoformas de miosina. A miosina I (em *verde*) está restrita principalmente à borda anterior dos pseudópodes na região frontal da célula. A miosina II (em *vermelho*) encontra-se em maior concentração no córtex posterior, rico em actina. A contração do córtex na região posterior da célula, pela miosina II, pode auxiliar a impulsionar o corpo da célula para a frente. (Cortesia de Yoshio Fukui.)

As forças de tração originadas por células em locomoção exercem um impulso significativo sobre o substrato (**Figura 16-95**). Em um animal vivo, a maioria das células se movimenta ao longo de um substrato semiflexível composto pela matriz extracelular, a qual pode ser deformada e rearranjada por essas forças celulares. Em cultura, o movimento de fibroblastos através de um gel de fibrilas de colágeno alinha o colágeno, originando uma matriz extracelular organizada que, por sua vez, afeta a forma e a direção do movimento do próprio fibroblasto (**Figura 16-96**). Reciprocamente, tensão mecânica ou de estiramento aplicada externamente a uma célula provocará uma organização de fibras de estresse e de adesões focais, tornando a célula mais contrátil. Apesar de pouco compreendida, essa interação mecânica de duas vias entre as células e seu ambiente físico provavelmente seja uma forma primária de auto-organização tecidual em vertebrados.

Membros da família da proteína Rho provocam grandes rearranjos no citoesqueleto de actina

A migração celular é um exemplo de um processo que requer comunicação a longas distâncias e coordenação entre ambas as extremidades da célula. Durante uma migração direcionada, é importante que a extremidade anterior da célula permaneça estrutural e funcionalmente distinta da extremidade posterior. Além de dirigir os processos mecânicos localizados como a protrusão na região anterior e a retração na região posterior da célula, o citoesqueleto é responsável pela coordenação da morfologia celular, pela organização e por propriedades mecânicas em toda a extensão da célula, uma distância que caracteristicamente envolve várias dezenas de micrômetros em células de animais. Muitas vezes, inclusive na migração celular, mas não apenas nessa situação, a coordenação citoesquelética em larga escala se

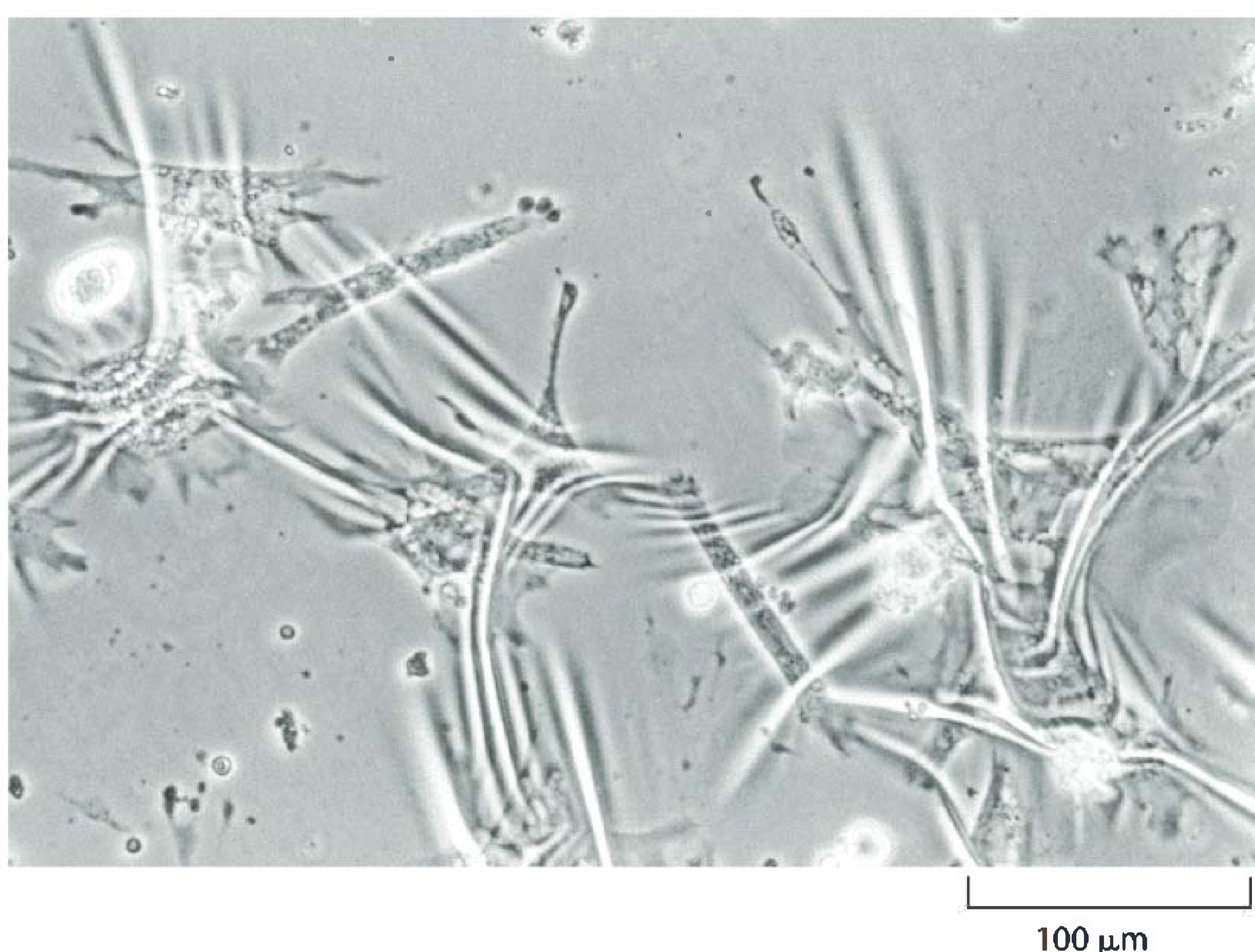


Figura 16-95 Células adesivas exercem forças de tração sobre o substrato. Estes fibroblastos foram cultivados sobre uma pequena camada de borracha de silício. A adesão das células, seguida de contração de seu citoesqueleto, provoca enrugamento do substrato. (De A. K. Harris, P. Wild e D. Stopak, *Science* 208:177-179, 1980. Com permissão de AAAS.)

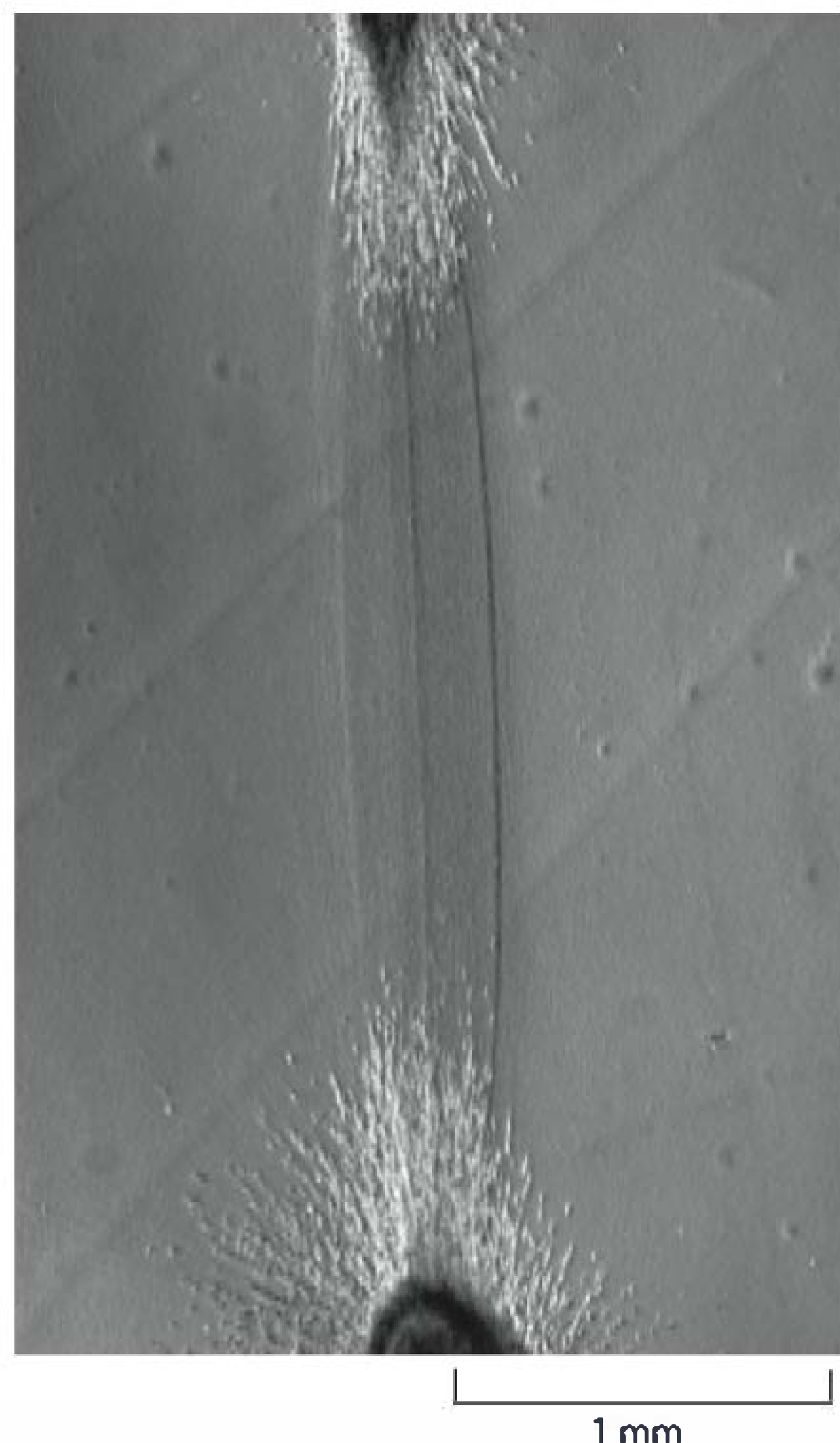


Figura 16-96 A modulação da forma da matriz extracelular por estiramento. Esta microfotografia mostra a região entre duas peças de coração de embrião de galinha (explante tecidual rico em fibroblastos e células musculares cardíacas) que foram crescidas em cultura em um gel de colágeno por 4 dias. Um denso caminho de fibras de colágeno alinhadas formou-se entre os dois explantes, aparentemente devido ao estiramento do colágeno pelos fibroblastos. (De D. Stopak e A. K. Harris, *Dev. Biol.* 90:383-398,1982. Com permissão da Academic Press.)

apresenta pelo estabelecimento de uma polarização celular, onde a célula constrói estruturas com componentes moleculares distintos em sua região anterior *versus* sua região posterior, ou em sua região apical *versus* sua região basal. Para que a locomoção celular tenha início ou fim é necessária uma polarização celular inicial. Processos de polarização celular cuidadosamente controlados também são necessários às divisões celulares orientadas em tecidos e à formação de uma estrutura multicelular coerente e organizada. Estudos genéticos em leveduras, moscas e nematódeos forneceram a maior parte das informações referentes ao nosso conhecimento sobre as bases moleculares da polaridade celular. Os mecanismos que geram a polaridade celular em vertebrados apenas agora estão começando a ser estudados. No entanto, em todos os casos conhecidos até o momento, o citoesqueleto desempenha um papel essencial, e muitos componentes moleculares apresentam conservação evolutiva.

No caso do citoesqueleto de actina, diferentes receptores de superfície celular induzem rearranjos estruturais globais em resposta a sinais externos. Entretanto, todos esses sinais parecem convergir no interior da célula em um grupo de GTPases monoméricas intimamente relacionadas que pertencem à **família da proteína Rho** – *Cdc42, Rac* e *Rho*. As mesmas proteínas da família Rho também estão envolvidas no estabelecimento de diversos tipos de polarização celular.

Assim como outros membros da superfamília Ras, estas proteínas Rho agem como interruptores moleculares controlando processos celulares por ciclagem entre um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP (ver Figura 3-71). A ativação de Cdc42 na membrana plasmática induz a polimerização de actina e o empacotamento para a formação de filopódios ou pequenas protrusões celulares chamadas de microespículas. A ativação de Rac promove a polimerização de actina na periferia celular, levando à formação de extensões do tipo lamelipódio planas e de ondulações na membrana, as quais são protrusões ricas em actina sobre a superfície dorsal da célula (ver Figura 16-93). A ativação de Rho promove tanto a produção de feixes de filamentos de actina com filamentos de miosina II, sob a forma de fibras de estresse, quanto o agrupamento de integrinas e de proteínas associadas para a formação de contatos focais (**Figura 16-97**). Estas dramáticas e complexas alterações estru-

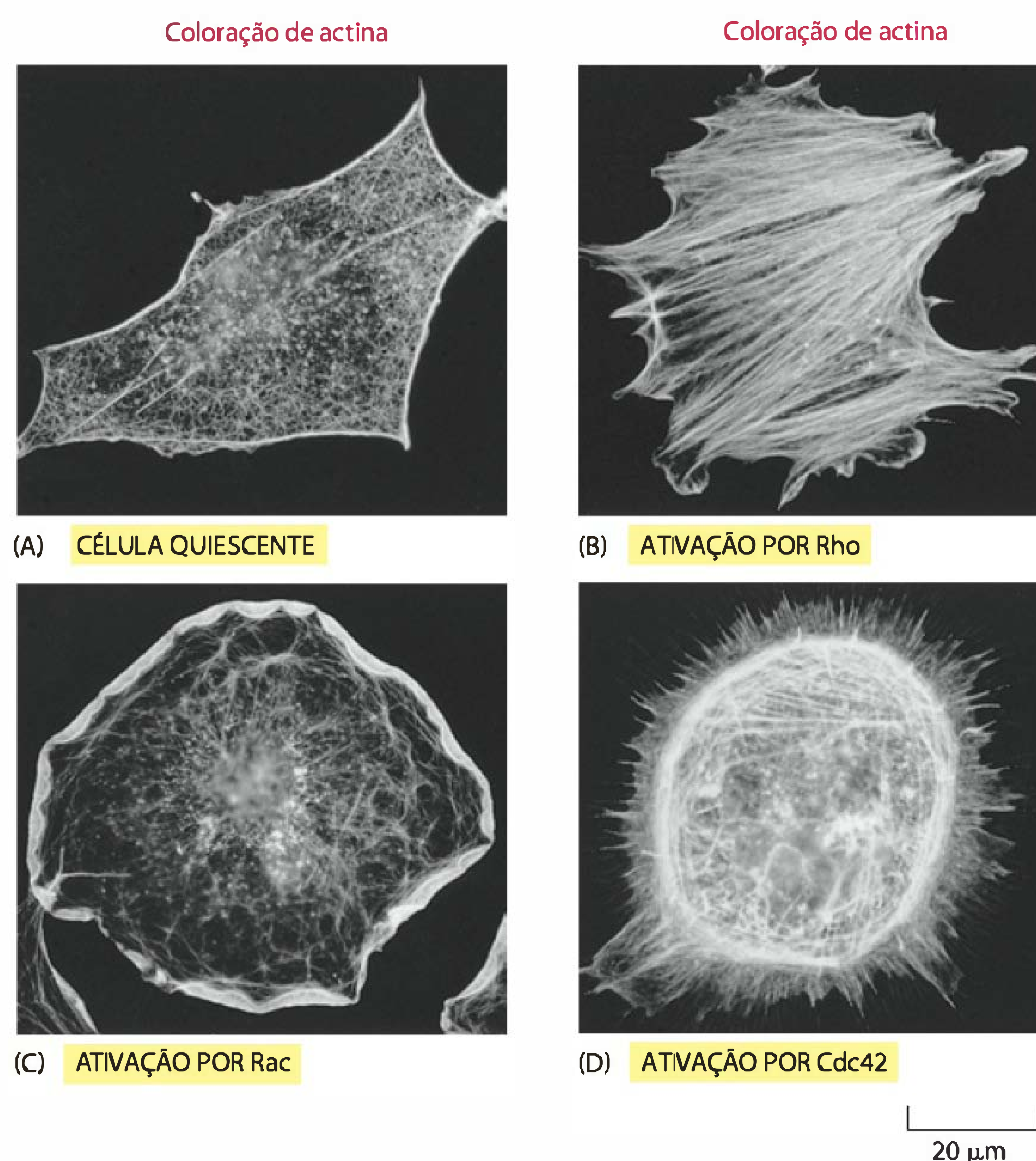


Figura 16-97 Os dramáticos efeitos de Rac, Rho e Cdc42 na organização da actina em fibroblastos. Em todos os casos, os filamentos de actina foram marcados com faloidina fluorescente. (A) Fibroblastos com deficiência de soro apresentam filamentos de actina predominantemente em seu córtex, e relativamente poucas fibras de estresse. (B) Microinjeção de uma forma constitutivamente ativa de Rho provoca a rápida organização de diversas fibras de estresse proeminentes. (C) Microinjeção de uma forma constitutivamente ativa de Rac, uma GTPase monomérica intimamente relacionada, leva à formação de um enorme lamelipódio que se estende a partir de toda a circunferência da célula. (D) Microinjeção de uma forma constitutivamente ativa de Cdc42, um outro membro da família Rho, leva à protrusão de diversos filopódios longos na periferia da célula. Estes distintos efeitos globais das três GTPases sobre a organização do citoesqueleto de actina são mediados pela ação de dúzias de outras moléculas proteicas reguladas pelas GTPases. Entre estas proteínas-alvo encontram-se diversas proteínas associadas à actina que são discutidas neste capítulo. (De A. Hall, *Science* 279:509-514,1998. Com permissão de AAAS.)

turais ocorrem pois cada um desses três interruptores moleculares interage com numerosas proteínas-alvo em cascata que afetam a organização e a dinâmica da actina.

Alguns alvos-chave de Cdc42 ativado são membros da família de proteínas WASp. Nos seres humanos, pacientes com deficiência em WASp sofrem da síndrome de Wiskott-Aldrich, uma forma severa de imunodeficiência onde as células do sistema imune apresentam motricidade com base em actina anormal, e as plaquetas não são adequadamente formadas. Apesar de a WASp *per se* ser expressa apenas em células sanguíneas e em células do sistema imune, outros membros são ubiquamente expressos e permitem que Cdc42 ativado aumente a polimerização de actina. As **proteínas WASp** podem ocorrer sob uma conformação dobrada inativa ou sob uma conformação aberta ativada. A associação com Cdc42-GTP estabiliza a forma aberta de WASp, permitindo que esta se ligue ao complexo ARP. Esta ligação provoca um forte aumento da atividade desse complexo de nucleação da actina (ver Figura 16-34). Assim, a ativação de Cdc42 leva a uma aumento na nucleação de actina.

A Rac-GTP também ativa membros da família WASp, tanto ativando a atividade de interligação da proteína formadora de gel filamina, quanto inibindo a atividade contrátil da proteína motora miosina II, estabilizando o lamelipódio e inibindo a formação de fibras de estresse contráteis (**Figura 16-98**A).

A Rho-GTP possui um conjunto de alvos bastante distinto. Em vez de ativar o complexo ARP para construir redes de actina, a Rho-GTP direciona as proteínas formina para a construção de feixes paralelos de actina. Ao mesmo tempo, a Rho-GTP ativa uma proteína-cinase que inibe indiretamente a atividade da cofilina, resultando em estabilização do filamento de actina. A mesma proteína-cinase inibe uma fosfatase, atuando sobre as cadeias leves da miosina (ver Figura 16-72). O consequente aumento na quantidade média de fosforilação na cadeia leve de miosina aumenta a quantidade da atividade contrátil da proteína motora miosina na célula, aumentando a formação de estruturas dependentes de tensão, como é o caso das fibras de estresse (Figura 16-98B).

Em alguns tipos de células, a Rac-GTP ativa Rho, geralmente com uma cinética lenta se comparada à ativação mediada por Rac do complexo ARP. Isso permite que a célula use a via Rac para construir uma nova estrutura de actina e, subsequentemente, ative a via Rho para induzir contratibilidade que gera tensão sobre essa estrutura. Isso ocorre, por exemplo, durante a formação e a maturação de contatos célula-célula. Como exploraremos em mais detalhes a seguir, a comunicação entre as vias Rac e Rho também favorece a manutenção de diferenças de larga escala entre as porções anteriores e posteriores da célula durante a migração.

Sinais extracelulares podem ativar os três membros da família da proteína Rho

A ativação das GTPases monoméricas Rho, Rac e Cdc42 ocorrem pela troca de um GTP por uma molécula GDP fortemente ligada, catalisada por fatores de troca de nucleotídeos gua-

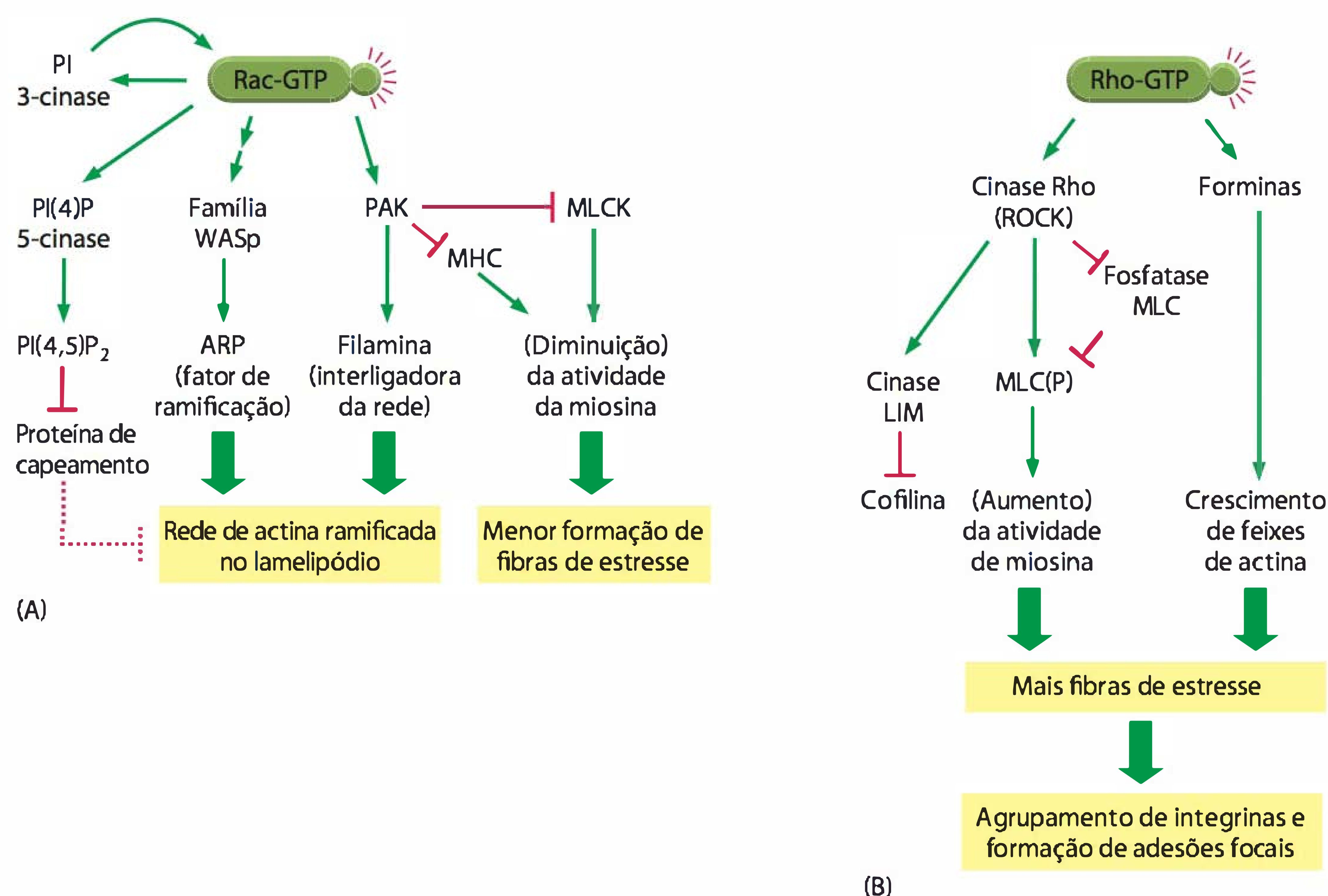


Figura 16-98 Os diferentes efeitos da ativação mediada por Rac e Rho na organização da actina. (A) A ativação da pequena GTPase Rac leva à nucleação de actina mediada pelo complexo ARP e a outras alterações nas proteínas acessórias à actina, as quais tendem a favorecer a formação de redes de actina, como os lamelipódios. Várias diferentes vias contribuem independentemente. Rac-GTP ativa membros da família da proteica WASp, que por sua vez ativam a nucleação de actina e a formação de redes ramificadas pelo complexo ARP. Em uma via paralela, Rac-GTP ativa uma proteína-cinase, PAK, que possui diferentes alvos, incluindo a filamina, que atua na interligação e na formação da rede e que é ativada por fosforilação, e a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK), que é inibida por fosforilação. A consequente diminuição na fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina leva à dissociação do filamento de miosina II e a uma diminuição da atividade contrátil. Em algumas células, PAK também inibe diretamente a atividade de miosina II pela fosforilação da cadeia pesada de miosina (MHC, *myosin heavy chain*). Outro conjunto de vias sequenciais à ativação de Rac é mediado por sinais do lipídeo fosfoinositídeo. A geração local de PIP_2 ($PI[4,5]P_2$) pode auxiliar na redução da atividade da proteína de capeamento, auxiliando ainda mais a polimerização da actina. A ativação da PI 3-cinase a qual origina PIP_3 a partir de PIP_2, leva a uma maior ativação da própria Rac via retroalimentação positiva. (B) A ativação da GTPase Rho leva à nucleação de filamentos de actina pelas forminas e aumenta a contração via miosina II, promovendo a formação de feixes contráteis de actina, como as fibras de estresse. A ativação da miosina II mediada por Rho requer uma proteína-cinase dependente de Rho denominada Rock. Essa cinase inibe a fosfatase que remove os grupos fosfato de ativação da cadeia leve de miosina II (MLC, *myosin light chain*); ela também pode fosforilar diretamente as MLCs em alguns tipos celulares. Rock também ativa outras proteína-cinases, como a cinase LIM, que, por sua vez, contribuem para a formação de feixes de filamentos de actina contrátil estáveis pela inibição do fator de despolimerização de actina, cofilina. Uma via de sinalização similar é importante para a formação do anel contrátil necessário à citocinese (ver Figura 17-52).

nina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*). Dos 85 GEFs identificados no genoma humano, alguns são específicos para um membro da família Rho de GTPases, ao passo que outros parecem atuar igualmente nos três membros da família. O número de GEFs excede o número de Rho GTPases que são por ele regulados, pois diferentes GEFs estão restritos a tecidos específicos, ou mesmo a posições subcelulares específicas, e estes fatores também são sensíveis a diferentes tipos de sinais. Diferentes receptores de superfície celular ativam os GEFs. Um exemplo é o receptor tirosina-cinase Eph envolvido no direcionamento do cone de crescimento do neurito, o qual é discutido em detalhes no Capítulo 15. Interessantemente, vários GEFs da família Rho podem se associar a extremidades em crescimento de microtúbulos por ligação a um ou mais +TIPs. Essa situação fornece uma conexão entre a dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos e a organização em larga escala do citoesqueleto de actina, o que é importante para a integração geral da morfologia e do movimento celular.

As GTPases da família Rho também são determinantes primárias da polaridade celular no brotamento de leveduras, um campo que tem sido alvo de extensas investigações genéticas e tem contribuído bastante em nossa compreensão a respeito dos mecanismos gerais envolvidos neste processo. Em situação de deficiência de alimentos (*starvation*), como vários outros organismos unicelulares, as leveduras esporulam. No entanto, a esporulação só pode ocorrer em células diploides de levedura e, predominantemente, as leveduras proliferam sob a forma de células haploides. Um indivíduo haploide em situação de carência de alimentos deve, portanto, localizar um companheiro que possua tipo oposto de acasalamento, aproximar-se com vistas à interação, acasalar e, somente após, esporular. As células de levedura são incapazes de locomoção por nado e, portanto, devem chegar até seu companheiro via crescimento polarizado. A forma haploide da levedura apresenta dois tipos distintos para acasalamento, **a** e α, os quais secretam respectivamente os fatores de acasalamento denominados fator – **a** e fator– α. Essas moléculas de sinalização secretadas agem por sua ligação a receptores de superfície celular que pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (discutido no Capítulo 15). Uma das consequências da ligação do fator α a seu receptor é a polarização da célula recipiente, a qual adotará uma forma conhecida como “shmoo” (**Figura 16-99**). Na presença de um gradiente de fator α, a porção superior de um shmoo de célula **a** é direcionada rumo a maior concentração da molécula de sinalização, o que sob as circunstâncias normais deverá levá-la diretamente a uma célula α “amorosa” e disposta a acasalar.

Este crescimento celular polarizado requer o alinhamento do citoesqueleto de actina em resposta ao sinal do fator de acasalamento. Quando o sinal liga-se a seu receptor, o receptor ativa Cdc42, que por sua vez induz a associação de filamentos de actina na região próxima à fonte do sinal. A ativação local de Cdc42 é potencializada por uma alça de retroalimentação positiva, que necessita de transporte dependente de actina do próprio Cdc42 e também de GEF e de outros componentes de sinalização, em conjunto com as estruturas de actina recentemente sintetizadas, para o local do sinal. Após, cabos de actina são organizados e direcionados para a região de acúmulo de Cdc42 devido à ativação de outra GTPase da família Rho, que, por sua vez, estimula a formina de levedura. Os cabos de actina atuarão como caminhos para o direcionamento do transporte e a exocitose do material para a parede celular da nova célula, o que resulta no crescimento polarizado da extremidade do shmoo (**Figura 16-100**).

As células haploides de levedura usam essa mesma maquinaria de polarização durante o crescimento vegetativo. Para formar o broto que dará origem à célula-filha, a levedura deve direcionar material para a nova membrana plasmática e para a nova parede celular predominantemente rumo a uma única região. Como acontece na formação do shmoo, esse processo requer uma polaridade citoesquelética inicial, com a maior parte das manchas de actina situadas na região de crescimento do broto, e cabos de actina orientados sobre o eixo do broto. Nas células haploides, uma nova região de brotamento é sempre constituída imediatamente adjacente ao sítio anterior de brotamento. Nesse caso, as dicas espaciais que definem a polaridade do citoesqueleto são intrínsecas à célula, tendo sido deixadas pelos

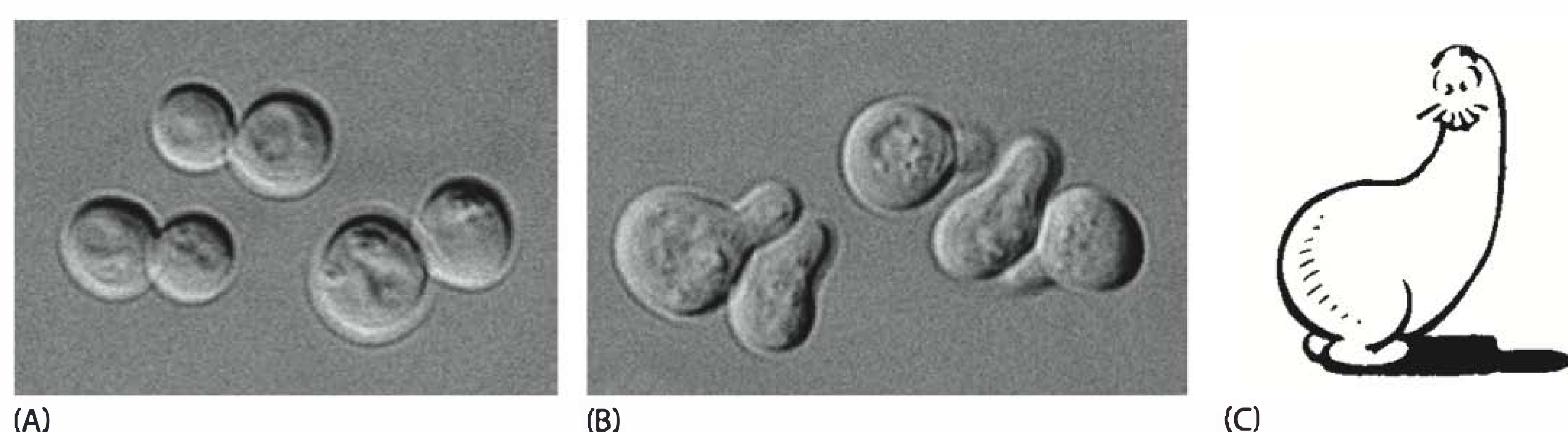


Figura 16-99 Polarização morfológica em células de levedura em resposta ao fator de cruzamento. (A) Células de *Saccharomyces cerevisiae* geralmente são esféricas. (B) Estas células tornam-se polarizadas quando tratadas com fator de cruzamento derivado de células que apresentam tipo de cruzamento oposto. As células polarizadas são chamadas de “shmoos”. (C) O Shmoo original, personagem de desenhos animados criado por Al Capp. (A e B, cortesia de Michael Snyder; C, ©1948 Capp Enterprises, Inc. Com permissão.)

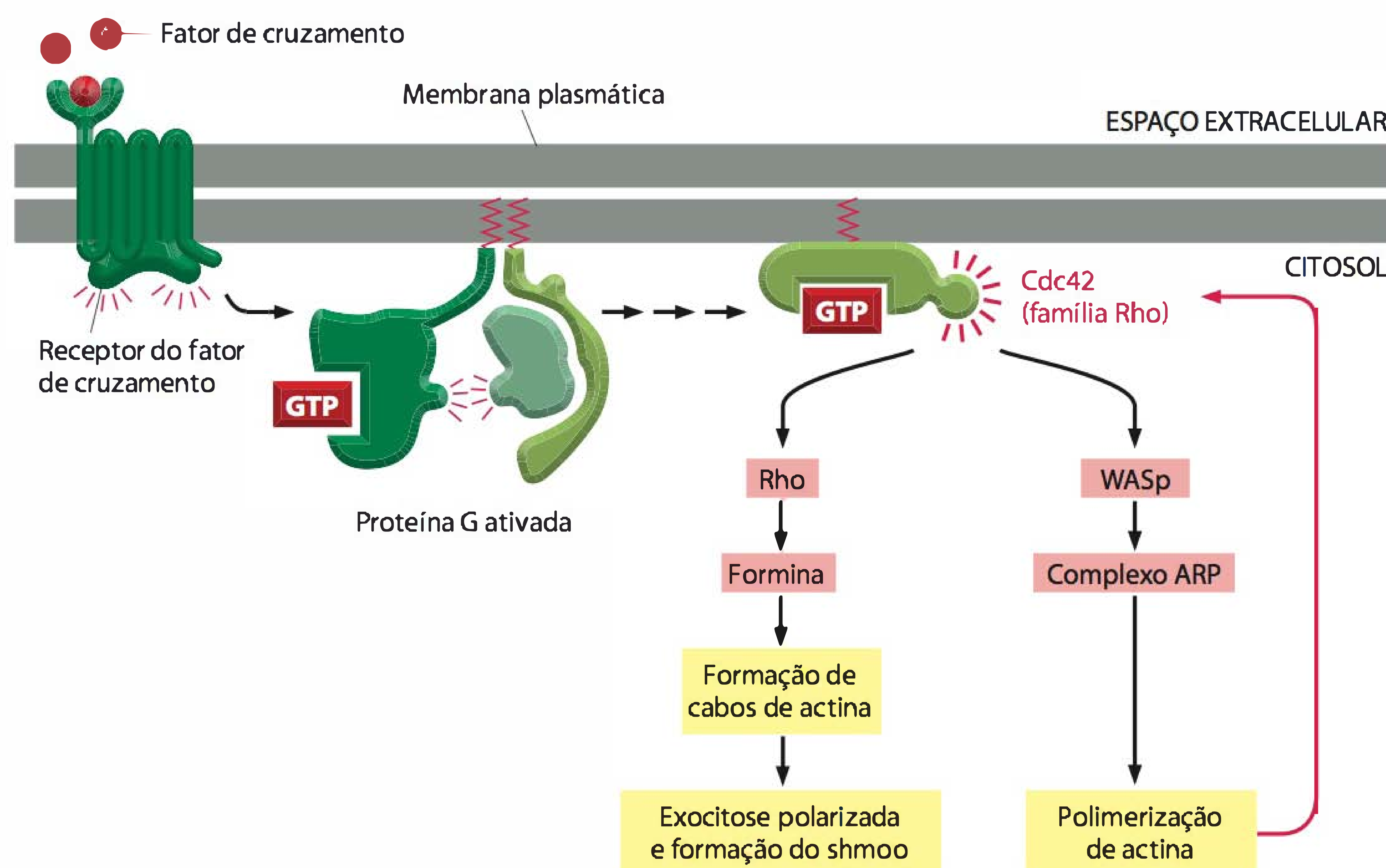


Figura 16-100 Via de sinalização de levedura em resposta ao fator de cruzamento. O fator de cruzamento extracelular liga-se a um receptor ligado à proteína G na membrana plasmática. A ativação deste receptor induz a dissociação do GTP que se encontra ligado à subunidade Gα da proteína G heterotrimérica (discutido no Capítulo 15). Isso, por sua vez, ativa Cdc42, uma proteína de ligação ao GTP pertencente à família Rho. Similarmente ao que ocorre em células de mamíferos, Cdc42 ativa uma proteína da família WASp que ativa o complexo ARP, promovendo nucleação local de actina no sítio de ligação do fator de cruzamento. A nucleação local de actina e o crescimento de filamentos criam uma alça de retroalimentação positiva onde a atividade de Cdc42 é ainda mais aumentada. Isso leva a uma extensiva ativação de formina e Rho e, finalmente, à formação de cabos de actina, crescimento polarizado e aquisição da morfologia shmoo. Além disso, a ativação do receptor desencadeia outras respostas pela cascata de MAP-cinase (discutido no Capítulo 15), preparando a célula haploide para o cruzamento (não-mostrado).

ciclos de divisão anteriores. O Cdc42 está mais uma vez envolvido na transdução de sinal do sítio de destino do brotamento para o citoesqueleto, e a maioria das proteínas envolvidas nas vias, tanto acima da cascata quanto abaixo, foi identificada por experimentos genéticos. Após sua identificação em levedura, muitos homólogos destas proteínas foram identificados em outros organismos, onde frequentemente estão também envolvidos no estabelecimento da polaridade celular.

Sinais externos podem definir a direção da migração celular

Define-se *quimiotaxia* como o movimento celular em um sentido controlado por um gradiente de um químico difusível. Esta é uma situação particularmente interessante onde sinais externos induzem proteínas da família Rho a estabelecer uma polarização celular em larga escala pela organização do aparato necessário para a motricidade celular, descrito a seguir. Um exemplo bem-estudado é o movimento quimiotáxico de uma classe de células brancas do sangue, os *neutrófilos*, em direção a uma fonte de infecção bacteriana. Proteínas receptoras na superfície dos neutrófilos permitem a eles detectar concentrações extremamente baixas de peptídeos *N*-formilados, os quais são derivados de proteínas bacterianas (apenas procariotos iniciam a síntese de proteínas com *N*-formilmetionina). Usando esses receptores, os neutrófilos são guiados em direção aos alvos bacterianos, comparando o ambiente em ambos os lados da célula por sua capacidade de identificar uma diferença de apenas 1% na concentração destes peptídeos difusíveis (**Figura 16-101**).

Tanto neste caso quanto em um semelhante de quimiotaxia da ameba *Dictyostelium* em direção a uma fonte de AMP cíclico, uma polimerização localizada de actina próximo aos receptores é estimulada quando o receptor encontra seu ligante. Esta resposta de polimerização de actina depende das GTPases monoméricas da família Rho apresentadas anteriormente. Assim como na levedura que está preparando seu shmoo (ver Figura 16-99), a célula responsiva estende uma protuberância em direção ao sinal. No caso de células quimiotáticas, a ligação do ligante quimioatrator a seu receptor acoplado à proteína G ativa cinases 3′ fosfoinositídeos (PI3Ks), que geram uma molécula de sinalização com base em lipídeo (PI[3,4,5]P_3) que, por sua vez, ativa a GTPase Rac. A seguir, a Rac ativa o complexo ARP, re-

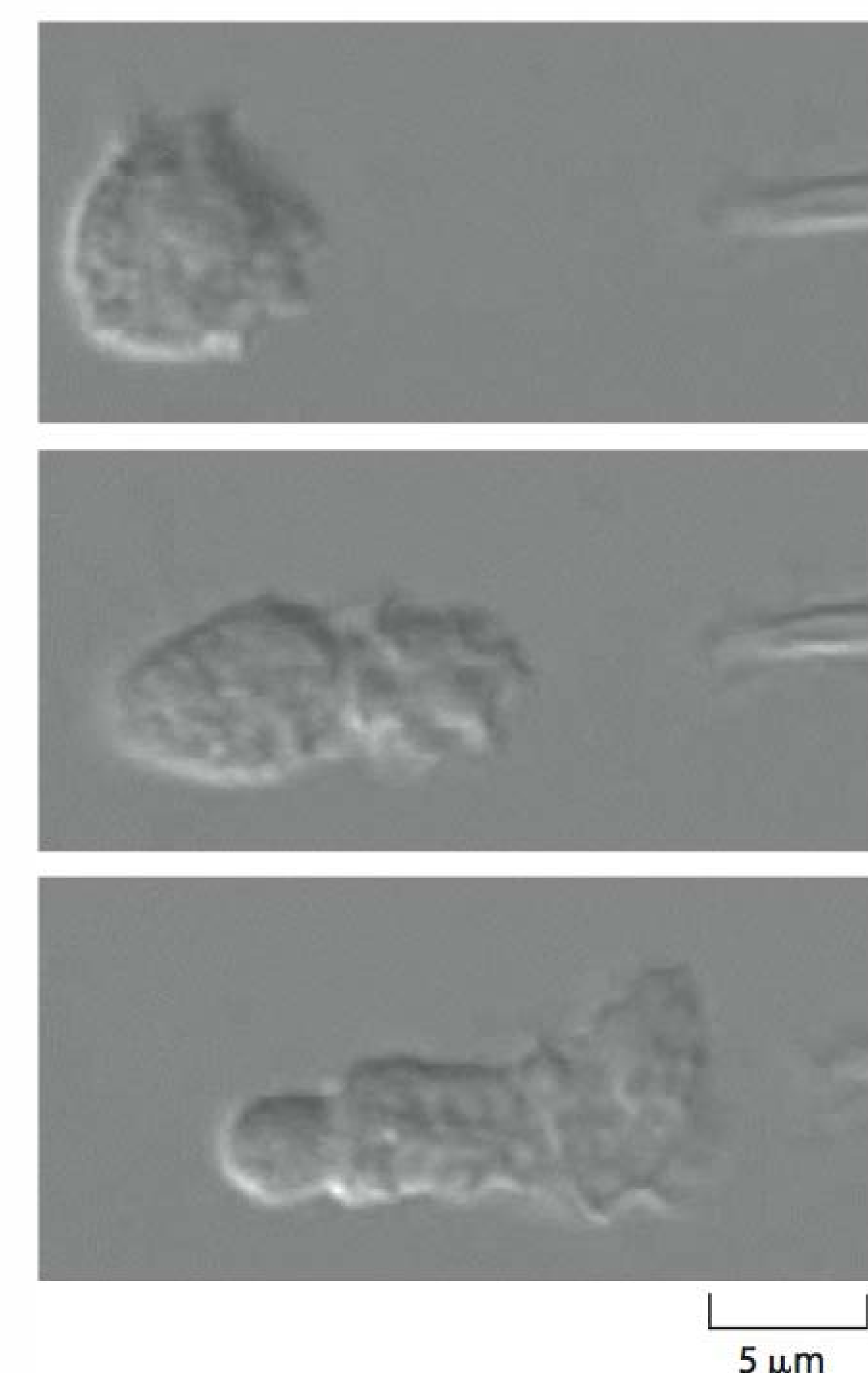


Figura 16-101 Polarização de neutrófilos e quimiotaxia. A pipeta à direita está liberando uma pequena quantidade do peptídeo formil-Met-Leu-Phe. Como apenas proteínas de origem bacteriana têm resíduos metionina formilados, os neutrófilos humanos reconhecem este produto como derivado de um invasor estranho (discutido no Capítulo 24). O neutrófilo rapidamente estende um novo lamelipódio em direção à fonte de peptídeo quimiotáxico (*acima*). Ocorre então a extensão deste lamelipódio e a polarização do citoesqueleto, de tal forma que a miosina II contrátil posiciona-se principalmente na região posterior, oposta à posição do lamelipódio (*centro*). Finalmente, a célula desliza em direção à fonte do peptídeo (*abaixo*). Se uma bactéria real fosse a fonte deste peptídeo, em vez da pipeta do investigador, o neutrófilo englobaria a bactéria e a destruiria (ver também Figura 16-4). (De O. D. Weiner et al., *Nat. Cell Biol*. 1:75-81, 1999. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

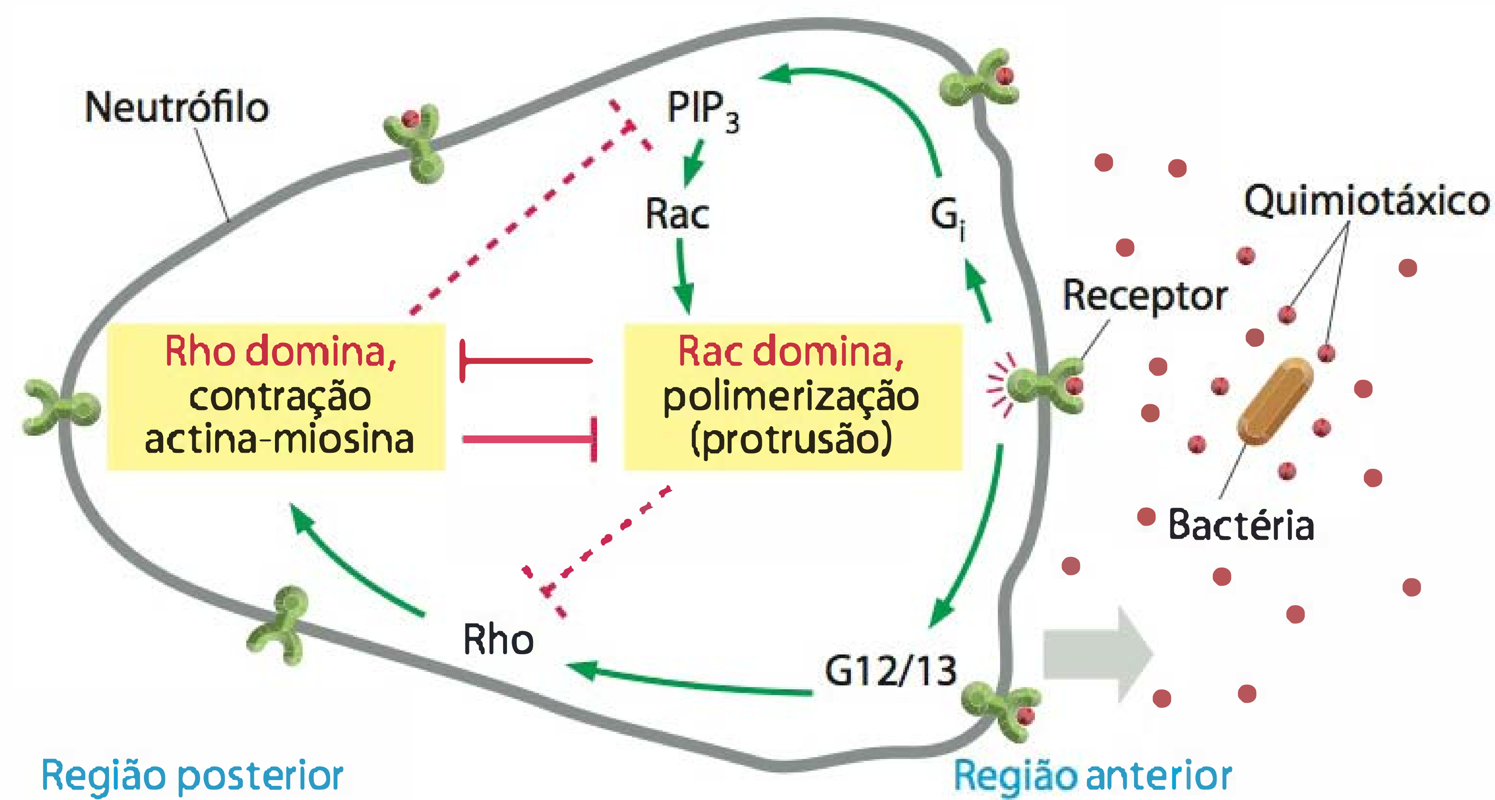


Figura 16-102 Sinalização durante a polarização de um neutrófilo. Bactérias que tenham invadido o corpo humano secretam moléculas que são reconhecidas como estranhas por células do sistema imune, como os neutrófilos. A ligação de moléculas de origem bacteriana a receptores acoplados à proteína G, nos neutrófilos, estimula movimento direcionado. Esses receptores são encontrados em toda a superfície, mas possuem maior probabilidade de se ligarem ao ligante bacteriano na parte frontal da célula. Duas vias distintas de sinalização contribuem para a polarização célular. Na região anterior da célula, próximo à fonte de sinal bacteriano, a estimulação da via Rac leva, via proteína G trimérica G_i, ao crescimento de redes de actina protuberantes. Segundos mensageiros desta via possuem vida curta, de tal forma que a protrusão limita-se à região da célula intimamente em contato com o fator estimulante. O mesmo receptor também estimula uma segunda via de sinalização, pelas proteínas G triméricas G12 e G13 (denominadas G12/13), que induzem a ativação de Rho. As duas vias são mutuamente antagônicas. Visto que a protrusão com base em Rac é ativa na região frontal da célula, Rho somente é ativada na região posterior da célula, estimulando a contração da célula nessa região e atuando diretamente sobre o direcionamento do movimento. Para um exemplo real da eficiência desse sistema de sinalização, ver Figura 16-4.

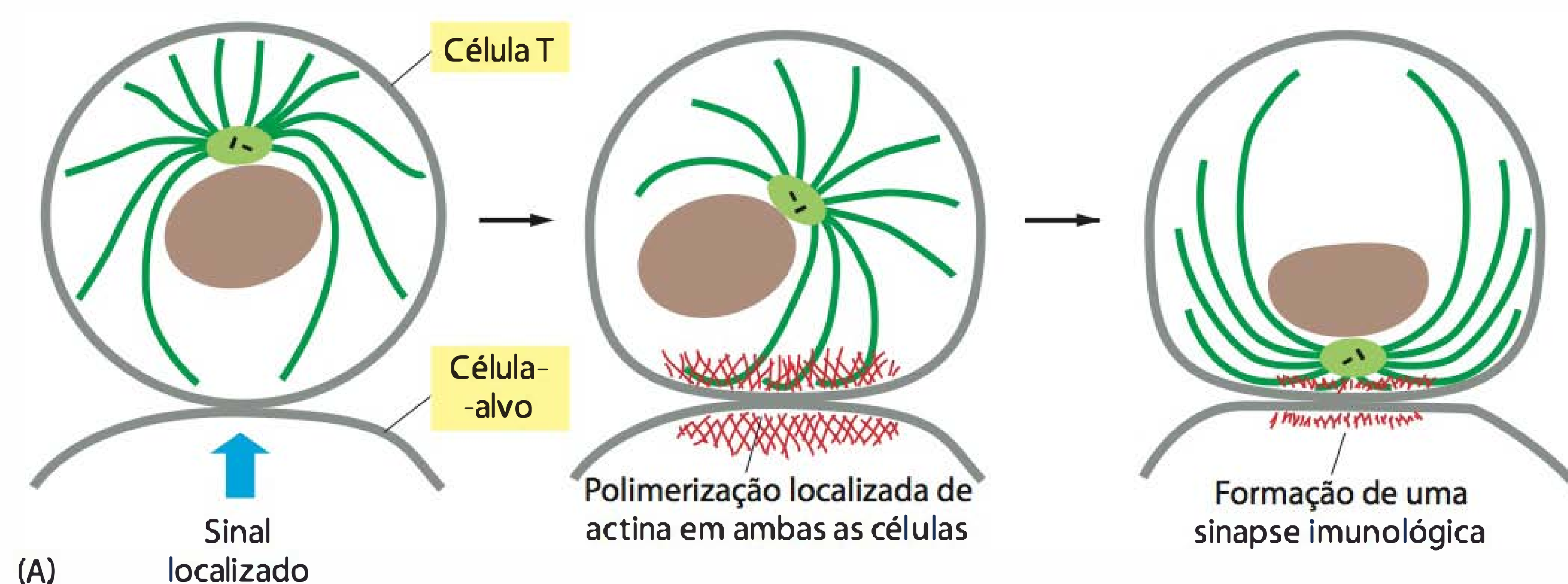
sultando na formação de protrusões de lamelipódios (ver Figura 16-98). Por um mecanismo desconhecido, o acúmulo da rede de actina polarizada na borda anterior potencializa o aumento de atividade de PI3K em um sistema de retroalimentação positiva, reforçando a indução de uma protrusão. A molécula ($PI[3,4,5]P_3$) que ativa Rac não pode difundir de seu sítio de síntese, pois é rapidamente reconvertida em PIP_2 por uma fosfatase de lipídeos constitutivamente ativa. Simultaneamente, a ligação do ligante quimioatrator a seu receptor ativa outra via que, por sua vez, ativa Rho e aumenta a contratibilidade com base em miosina. Os dois processos se inibem direta e reciprocamente, e, como resultado, a ativação de Rac domina na região anterior da célula, ao passo que a ativação de Rho domina na região posterior (**Figura 16-102**). Isso permite que a célula mantenha sua polaridade funcional com protrusões na borda anterior e contração na região posterior.

Sinais químicos não-difusíveis ligados à matriz extracelular ou à superfície de células também podem interferir no direcionamento da migração celular. Quando estes sinais ativam seus receptores, podem levar a um aumento da adesão celular e direcionar a polimerização de actina. A maioria das migrações de células animais a longas distâncias, incluindo a migração de células da crista neural e as viagens dos cones de crescimento neuronal, depende de uma combinação de sinais difusíveis e não-difusíveis para que as células em locomoção ou os cones de crescimento atinjam corretamente seu destino (ver Figura 15-62).

A comunicação entre o citoesqueleto de actina e o de microtúbulos coordena a polarização e a locomoção geral das células

Para auxiliar na organização de um movimento persistente em uma direção determinada, as células utilizam seus microtúbulos em conjunto a seus filamentos de actina. Em várias células em locomoção, a posição do centrossomo, encontrado na região anterior do núcleo, é influenciada pela localização da polimerização protrusiva de actina. O mecanismo de reorientação do centrossomo ainda não é bem compreendido, apesar de existirem evidências da participação da proteína Cdc42 da família Rho. Acredita-se que a ativação de receptores em uma extremidade da célula possa não apenas estimular a polimerização local de actina (e consequentemente uma protrusão local), mas também ativar localmente proteínas motoras semelhantes à dineína que movimentam o centrossomo por interação a seus microtúbulos. Diversas proteínas efetoras abaixo de Rac e Rho na cascata de ativação modulam diretamente a dinâmica dos microtúbulos. Por exemplo, uma proteína-cinase ativada por Rac pode fosforilar (e consequentemente inibir) a proteína de ligação à tubulina estatmina (ver Painel 16-3, p. 994-995), desestabilizando os microtúbulos, e a ativação de Rho parece estabilizar os microtúbulos.

A dinâmica dos microtúbulos, por sua vez, influencia os rearranjos de actina. O centrossomo promove a nucleação de um grande número de microtúbulos dinâmicos, e seu reposicionamento significa que muitos desses microtúbulos apresentarão suas extremidades mais estendidas do centrossomo para o interior da região protrusiva da célula. As extremidades dinâmicas mais do microtúbulo podem indiretamente modular a adesão local e também ativar a GTPase Rac para potencializar a polimerização de actina na região protrusiva pela liberação de Rac-GEFs que se ligam aos +TIPs que viajam sobre as extremidades dos microtúbulos em crescimento. A concentração aumentada de microtúbulos poderá consequentemente encorajar outras protrusões, criando um sistema de retroalimentação positiva que permite a persistência do movimento mediado por protrusões em uma direção definida por um período prolongado. Independentemente do mecanismo exato utilizado, a orientação do centrossomo parece reforçar a informação de polaridade que o citoesqueleto de actina recebe do meio ambiente, permitindo uma resposta sensitiva mesmo a sinais fracos.



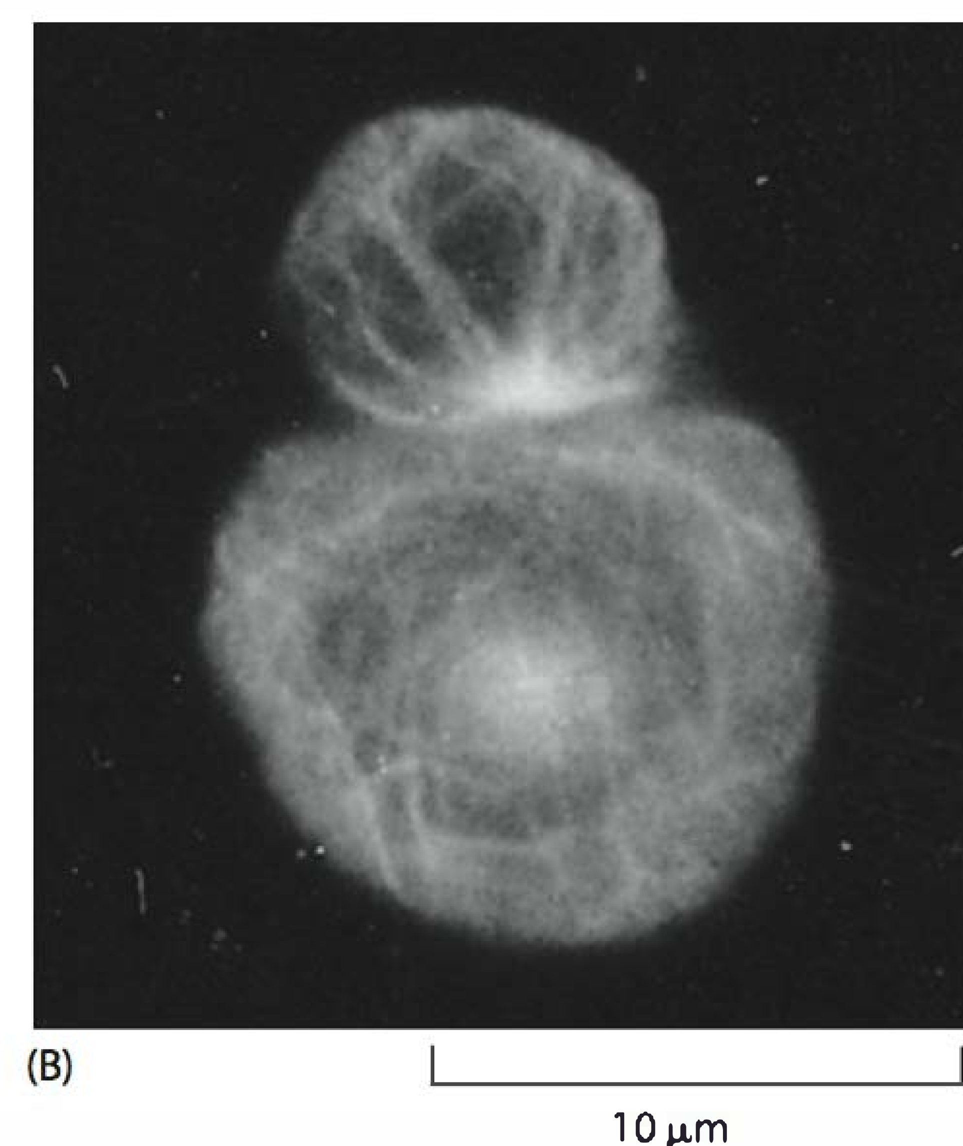


Figura 16-103 A polarização de uma célula T citotóxica após o reconhecimento de uma célula--alvo. (A) Modificações no citoesqueleto de uma célula T citotóxica após contato com uma célula-alvo. O evento inicial de reconhecimento resulta em sinais que provocam a polimerização de actina em ambas as células, no sítio de contato. Na célula T, interações entre a zona de contacto rica em actina e os microtúbulos que emanam do centrossomo levam à reorientação do mesmo, de tal forma que o aparelho de Golgi associado a ele é diretamente direcionado para a célula-alvo. (B) Microfotografia de imunofluorescência na qual tanto a célula T (*acima*) quanto a célula-alvo (*abaixo*) foram coradas com anticorpos dirigidos contra microtúbulos. O centrossomo e os microtúbulos que irradiam dele na célula T estão orientados em direção ao ponto de contato entre as células. Em contraste, a organização dos microtúbulos da célula-alvo não apresenta polarização. (B, de B. Geiger, D. Rosen e G. Berke, *J. Cell Biol.* 95:137-143, 1982. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

Um ciclo similar de retroalimentação cooperativa parece operar em diversas outras instâncias da polarização celular. Um exemplo particularmente interessante é a morte de alvos celulares específicos mediada por linfócitos T citotóxicos. Essas células são importantes componentes da resposta imune adaptativa de vertebrados contra infecções virais. As células T, assim como os neutrófilos, usam motricidade com base em actina para locomoção através dos tecidos do organismo em busca de células-alvo infectadas. Quando uma célula T entra em contato com uma célula infectada por vírus e seus receptores reconhecem os antígenos virais na superfície da célula-alvo, a mesma maquinaria de polarização é engajada de uma forma distinta, para facilitar a morte da célula-alvo. Rac é ativada no ponto de contato entre as células e provoca a polimerização de actina, criando uma região especializada no córtex. Essa região especializada induz a reorientação do centrossomo, movendo-o com seus microtúbulos para a zona de contato célula T-célula-alvo (**Figura 16-103**). Os microtúbulos, por sua vez, posicionam o aparelho de Golgi exatamente sob a zona de contato, focalizando a maquinaria de morte sobre a célula-alvo. O mecanismo completo de morte está discutido no Capítulo 25 (ver Figura 25-47).

A complexa especialização morfológica dos neurônios depende do citoesqueleto

Para nosso último estudo de caso referente às maneiras pelas quais as propriedades intrínsecas do citoesqueleto possibilitam o desenvolvimento de comportamentos específicos e extraordinariamente complicados, examinaremos os neurônios. Os neurônios iniciam sua vida no embrião sob a forma de células comuns, sem atrativos especiais, que usam motricidade com base em actina para migrar rumo a locais específicos. Lá chegando, no entanto, elas emitem uma série de longos processos especializados que irão ou receber sinais elétricos (*dendritos*) ou transmitir estes sinais elétricos para seus alvos celulares (*axônios*). A bela e elaborada morfologia ramificada de axônios e dendritos permite que um neurônio estabeleça redes de sinalização extremamente complexas, interagindo simultaneamente com muitas outras células e tornando possível os complicados, e muitas vezes imprevisíveis, comportamentos de animais superiores. Tanto axônios quanto dendritos (coletivamente denominados *neuritos*) estão preenchidos por feixes de microtúbulos, os quais são essenciais tanto para a sua estrutura quanto para o seu funcionamento.

Em axônios, todos os microtúbulos estão orientados na mesma direção, com suas extremidades menos apontando para o interior do corpo celular e suas extremidades mais direcionadas para frente, rumo às terminações do axônio (**Figura 16-104**). Os microtúbulos não conseguem cobrir individualmente a distância entre o corpo celular e as terminações do axônio, pois geralmente têm poucos micrômetros de comprimento, mas grandes quantidades de microtúbulos apresentando sobreposição formam um grande arranjo. Este caminho perfeitamente alinhado composto por microtúbulos funciona como uma verdadeira auto-

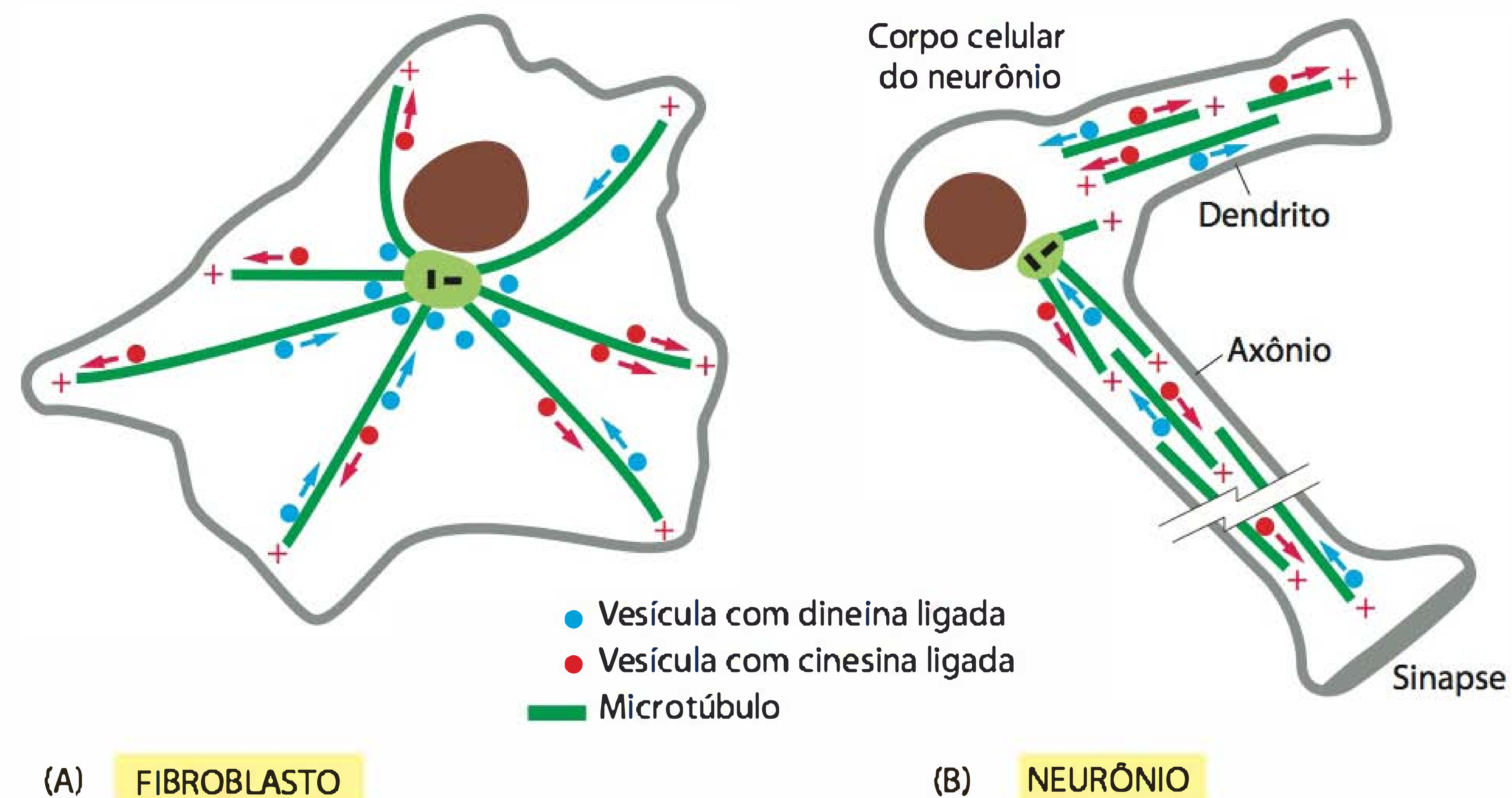


Figura 16-104 Organização de microtúbulos em fibroblastos e neurônios. (A) Em um fibroblasto, os microtúbulos emanam do centrossomo, localizado no centro da célula. Vesículas ligadas a cinesinas que se direcionam para a extremidade mais (+) se movem rumo à periferia, e vesículas ligadas à dineína, a qual se direciona para a extremidade menos (–), movem-se para o centro da célula. (B) Em um neurônio, a organização dos microtúbulos é mais complexa. No axônio, todos os microtúbulos compartilham a mesma polaridade, tendo as extremidades mais (+) apontando em direção à extremidade terminal do axônio. Nenhum microtúbulo individual abrange o comprimento total do axônio, mas pequenos segmentos de microtúbulos paralelos se sobrepõem produzindo um caminho para o rápido transporte axonal. Em dendritos, os microtúbulos apresentam polaridade mista, alguns com extremidades mais (+) direcionadas para a periferia da célula e outros para o interior.

estrada para o transporte de diversas proteínas específicas, vesículas contendo proteínas e mRNAs para as terminações do axônio, onde as sinapses devem ser estabelecidas e mantidas. O axônio mais longo do corpo humano parte da base da medula espinal e alcança o pé, atingindo até um metro de comprimento.

As mitocôndrias, um grande número de proteínas específicas para o transporte de vesículas e os precursores de vesículas sinápticas fazem uma longa jornada em direção à extremidade anterior (anterógrada) desta célula. Essas estruturas e proteínas são transportadas por proteínas motoras da família da cinesina direcionadas para a extremidade mais (+), que podem movê-las aproximadamente um metro em um período de dois ou três dias, uma eficiência espantosa se comparada ao processo de difusão, o qual levaria várias décadas para transportar uma mitocôndria por esta mesma distância. Vários membros da superfamília das cinesinas contribuem para este *transporte axonal anterógrado*, a maioria transportando ao longo dos microtúbulos subgrupos específicos de organelas delimitadas por membranas. A grande diversidade de proteínas motoras da família das cinesinas usada no transporte axonal sugere que elas estejam envolvidas tanto no direcionamento de suas cargas para estruturas específicas próximo do fim do trajeto, ou ao longo dele, quanto no movimento das cargas. Componentes velhos ou desnecessários presentes nos terminais do axônio são transportados de volta ao corpo celular para degradação e reciclagem por um *transporte axonal retrógrado*. Este transporte ocorre pelo mesmo conjunto de microtúbulos orientados, mas é dependente de dineína citoplasmática, a qual é uma proteína motora direcionada para a extremidade menos (–). O transporte retrógrado também é essencial na comunicação ao núcleo da presença de sinais de sobrevivência e de crescimento recebidos pelas terminações nervosas, para que seja modulada a expressão gênica.

Uma forma de neuropatia periférica humana, a doença de Charcot-Marie-Tooth, é causada por uma mutação pontual em um membro específico da família das cinesinas que transporta precursores de vesículas sinápticas rumo ao axônio. Outros tipos de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer, também podem ser parcialmente resultantes de disrupção do tráfego neuronal: como anteriormente mencionado, a proteína precursora amiloide APP é integrante de um complexo proteico que atua como um receptor para a ligação de cinesina-1 a outras vesículas de transporte axonal.

A estrutura axonal depende dos microtúbulos axonais e também da contribuição dos outros dois principais sistemas citoesqueléticos – os filamentos de actina e os filamentos intermediários. Os filamentos de actina revestem o córtex do axônio, exatamente abaixo da membrana citoplasmática, e proteínas motoras com base em actina, como a miosina V, também são abundantes no axônio, provavelmente com o intuito de movimentação de materiais. Os neurofilamentos, filamentos intermediários especializados das células nervosas, fornecem o mais importante suporte estrutural para um axônio. Uma disrupção na estrutura de neurofilamentos ou nas proteínas envolvidas na interligação deles com os microtúbulos e com os filamentos de actina distribuídos ao longo do axônio pode ocasionar desorganização e eventual degeneração axonal.

A construção da elaborada arquitetura ramificada de neurônios durante o desenvolvimento embrionário depende de motricidade com base em actina. Como mencionado anteriormente, as extremidades de axônios e dendritos em crescimento estendem-se por intermédio de *cones de crescimento*, uma estrutura motriz especializada rica em actina (**Figura 16-105**). A maioria dos cones de crescimento neuronais produz filopódios, e alguns produzem também lamelipódios. Tanto a projeção quanto a estabilização de cones de crescimento

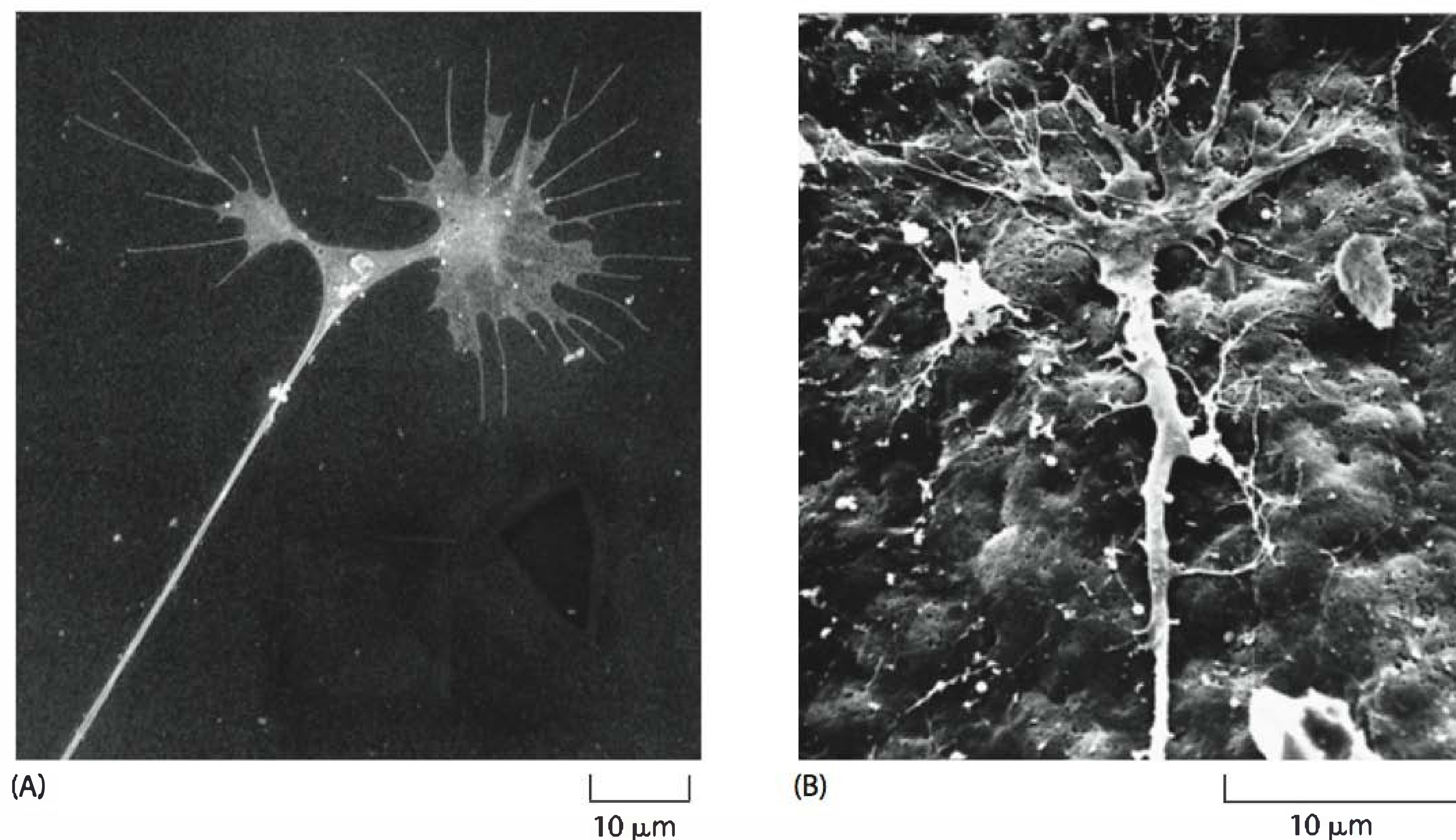


Figura 16-105 Cones de crescimento neuronal. (A) Microfotografia eletrônica de varredura de dois cones de crescimento na extremidade terminal de um neurito, surgidos em uma cultura de neurônios simpáticos de galinha. Nesta figura, observamos que um cone de crescimento, anteriormente único, dividiu-se em dois. Observe os vários filopódios e o grande lamelipódio. A aparência esticada do neurito é devida à tensão gerada pelo movimento para frente dos cones de crescimento, os quais geralmente são os únicos pontos de adesão firme entre o axônio e o substrato. (B) Microfotografia eletrônica de varredura de um cone de crescimento de uma célula sensorial migrando sobre a superfície interna da epiderme de um girino de *Xenopus*. (A, de D. Bray, em *Cell Behaviour* [R. Bellairs, A. Curtis e G. Dunn, eds.]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982; B, de A. Roberts, *Brain Res.* 118:526-530, 1976. Com permissão de Elsevier.)

do filopódio são extremamente sensíveis a sinais do ambiente. Algumas células secretam proteínas solúveis, como a netrina, para atrair ou repelir os cones de crescimento. Isso modula a estrutura e a motricidade do citoesqueleto do cone de crescimento por modificação do equilíbrio entre as atividades de Rac e Rho na borda anterior (ver Figura 15-62). Além disso, existem marcadores de direcionamento fixos ao longo do caminho, ligados à matriz extracelular ou à superfície de células. Quando um filopódio encontra uma destas "placas informativas" em sua exploração, ele rapidamente forma contatos adesivos. Acredita-se que uma resposta dependente de miosina provoque um colapso na rede de actina da porção não-estabilizada do cone de crescimento, ocasionando então um desvio do axônio em desenvolvimento e direcionando seu crescimento rumo a esta placa sinalizadora.

Desta forma, uma combinação complexa de sinais positivos e negativos, tanto solúveis quanto insolúveis, guia com exatidão o cone de crescimento rumo ao seu destino final. Os microtúbulos reforçam as decisões de direcionamento feitas pelas estruturas protrusivas ricas em actina na extremidade anterior do cone de crescimento. Microtúbulos do arranjo paralelo axonal localizados exatamente atrás do cone de crescimento estão constantemente crescendo e sofrendo encurtamento devido à instabilidade dinâmica. Os sinais adesivos de direcionamento são, de alguma forma, liberados para as extremidades dinâmicas dos microtúbulos, e aqueles microtúbulos em crescimento que apresentam um direcionamento correto são estabilizados contra a dissociação. Dessa forma, um axônio rico em microtúbulos é formado, marcando o caminho percorrido pelo cone de crescimento.

Os dendritos são projeções geralmente bem mais curtas do que os axônios, e sua função é a de recebimento e não de emissão de sinais. Em dendritos, os microtúbulos organizam-se paralelamente uns aos outros, mas a sua polaridade encontra-se misturada, alguns direcionando suas extremidades mais rumo à ponta do dendrito, enquanto outros direcionam esta mesma extremidade rumo ao corpo celular. No entanto, os dendritos também são formados pela ação de cones de crescimento. Assim, são os cones de crescimento das extremidades tanto de axônios quanto de dendritos que criam as morfologias intrincadas e altamente características de cada célula neuronal madura (**Figura 16-106**).

Apesar de os neurônios do sistema nervoso central serem células de longa duração, em momento algum isso significa que estas sejam células estáticas. As sinapses estão constante-



Figura 16-106 A complexa arquitetura de um neurônio de vertebrado. O neurônio mostrado provém da retina de um macaco. As setas indicam a direção do percurso do sinal elétrico através do axônio. Os maiores e mais compridos neurônios do corpo humano se estendem por uma distância de aproximadamente 1 metro (1 milhão de μm), desde a base da medula espinal até a ponta do dedo maior do pé, apresentando um axônio de 15 μm de diâmetro. (Adaptada de B. B. Boycott, em *Essays on the Nervous System* [R. Bellairs e E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

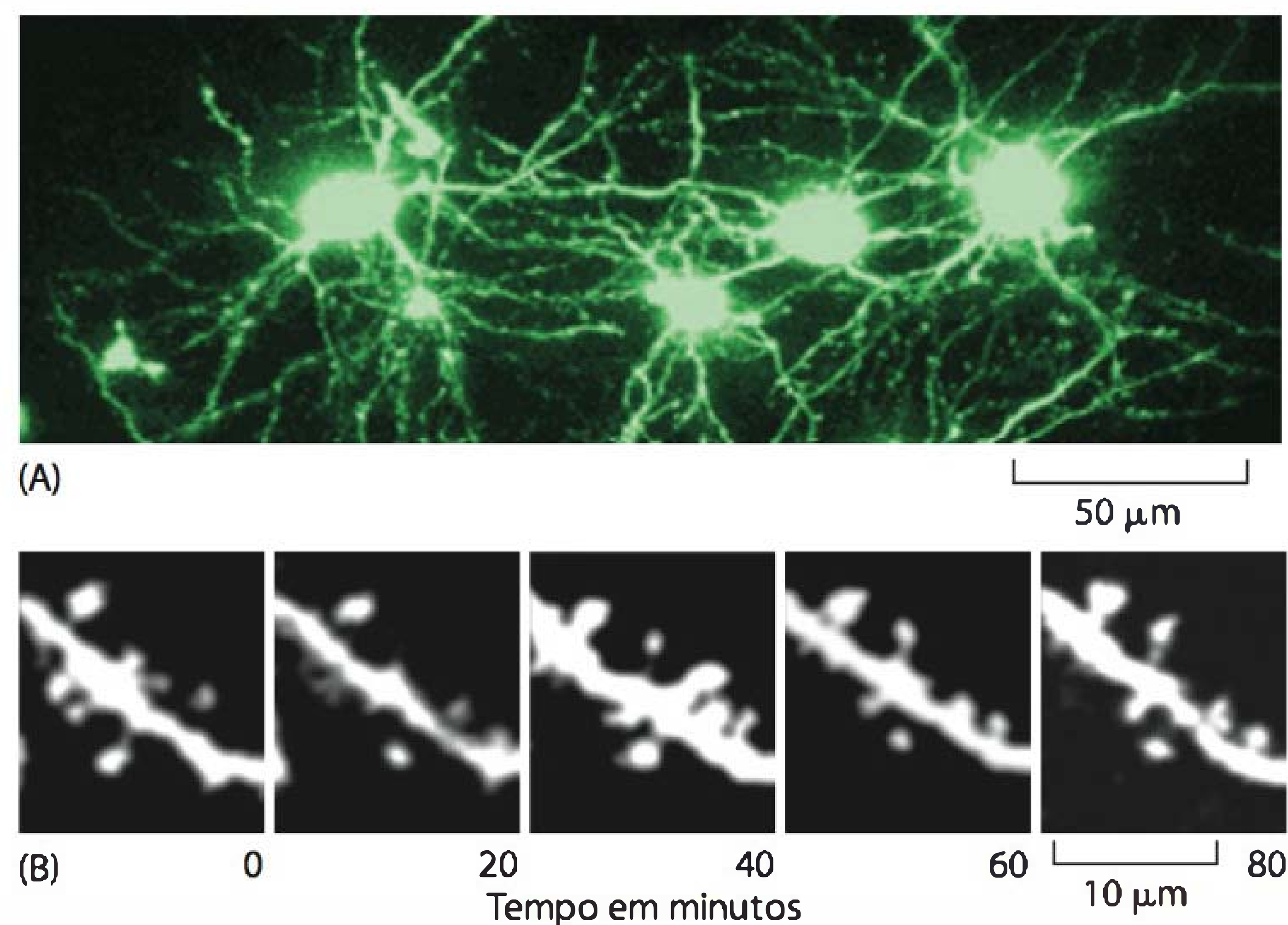


Figura 16-107 Rápidas alterações na estrutura de um dendrito no cérebro de um camundongo vivo. (A) Imagens de neurônios corticais em um camundongo transgênico que foi modificado para expressar uma proteína fluorescente verde em uma pequena fração das células de seu cérebro. Alterações nesses neurônios cerebrais e em suas projeções podem ser acompanhadas por meses pelo uso de microscópios de fluorescência altamente sensíveis. Para que isso seja possível, o camundongo é submetido a uma cirurgia que introduz uma pequena janela transparente em seu crânio e é anestesiado cada vez que as imagens são obtidas. (B) Um dendrito isolado, observado ao longo de 80 minutos, demonstra que os dendritos estão constantemente emitindo e retraindo pequenas protrusões dependentes de actina para criar as espículas dendríticas que recebem a maior parte das sinapses excitantes dos axônios no cérebro. Aquelas espículas que se tornam estáveis permanecem por meses, e acredita-se que sejam importantes para o funcionamento do cérebro, podendo estar envolvidas na memória de longa duração. (Cortesia de Karel Svoboda.)

mente sendo criadas, reforçadas, enfraquecidas ou eliminadas, conforme o cérebro aprende, avalia e esquece. Análises de imagens de alta resolução da estrutura de neurônios em cérebros de ratos adultos revelaram que a morfologia neuronal está sob um constante rearranjo, conforme diferentes sinapses são estabelecidas ou quebradas (**Figura 16-107**). Esses rearranjos dependentes de actina parecem ser essenciais para a aprendizagem e para o estabelecimento de memória de longa duração. Dessa forma, o citoesqueleto fornece um aparato para a construção do sistema nervoso como um todo, assim como para a produção de estruturas de apoio que reforçam, estabilizam e mantêm as diferentes partes deste sistema.

Resumo

Dois tipos distintos de estruturas especializadas em células eucarióticas são formados a partir de arranjos ordenados de proteínas motoras que se movem sobre trilhas de filamentos. O sistema actina-miosina do sarcômero viabiliza a contração de diferentes tipos de músculos, como o esquelético, o liso e a musculatura cardíaca. O sistema dineína-microtúbulos do axonema permite o batimento de cílios e as ondulações dos flagelos.

Os movimentos da célula como um todo, a morfologia e a modelagem em larga escala, assim como estruturação das células, necessitam da atividade coordenada dos três sistemas básicos de filamentos em conjunto a uma série de proteínas acessórias do citoesqueleto, classe na qual se incluem as proteínas motoras. Durante a divisão celular, o funcionamento do fuso mitótico com base em microtúbulos requer uma cooperação espacial e temporal entre filamentos dinâmicos do citoesqueleto, proteínas motoras moleculares ativas e uma ampla variedade de fatores acessórios. A migração celular – um comportamento celular comum e de grande importância para o desenvolvimento embrionário e também na cicatrização de lesões, na manutenção tecidual e no funcionamento do sistema imune em animais adultos – é outro exemplo clássico da coordenação complexa da ação do citoesqueleto. Para que uma célula migre, é necessário que ela crie e mantenha uma polarização estrutural geral, a qual é influenciada por sinais externos. Além disso, a célula deve coordenar as protrusões na região da borda anterior (pela montagem de novos filamentos de actina), a adesão da nova protuberância celular ao substrato e as forças geradas por motores moleculares para impulsionar o corpo celular para frente.

Células complexas, como os neurônios, necessitam da associação coordenada de microtúbulos, neurofilamentos (filamentos intermediários neuronais) e filamentos de actina, assim como a ação de dúzias de motores moleculares altamente especializados que transportam os componentes subcelulares para os seus destinos apropriados.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique

16-1 A função da hidrólise de ATP na polimerização de actina é similar à função da hidrólise de GTP na polimerização de tubulina: ambas atuam no enfraquecimento das ligações no polímero e, consequentemente, promovem despolimerização.

16-2 Na maioria das células animais, motores de microtúbulos direcionados para as extremidades menos entregam sua carga na periferia da célula, ao passo que motores de microtúbulos direcionados para as extremidades mais entregam sua carga no interior da célula.

16-3 Os neurônios motores induzem potenciais de ação nas membranas de células musculares que abrem canais de voltagem sensíveis a Ca^{2+} nos túbulos T, permitindo a penetração de Ca^{2+} extracelular no citosol, sua ligação à troponina C e a rápida iniciação de contração muscular.

Discuta as seguintes questões.

16-4 Sob uma concentração de 1,4 mg/mL de tubulina pura, os microtúbulos crescem a uma velocidade de aproximadamente 2 μm/min. Nessa taxa de crescimento, quantos dímeros de αβ-tubulina (8 nm de comprimento) são adicionados às extremidades de um microtúbulo a cada segundo?

16-5 Acredita-se que uma solução pura de dímeros de αβ-tubulina possa nuclear microtúbulos pela formação de um protofilamento linear de aproximadamente sete dímeros de comprimento. Neste ponto, a probabilidade de que o próximo αβ-dímero ligue-se lateralmente ou à extremidade do protofilamento é praticamente idêntica. Acredita-se que o evento crítico para a formação do microtúbulo seja a primeira associação lateral (**Figura Q16-1**). Como a associação lateral promove a rápida formação subsequente de um microtúbulo?

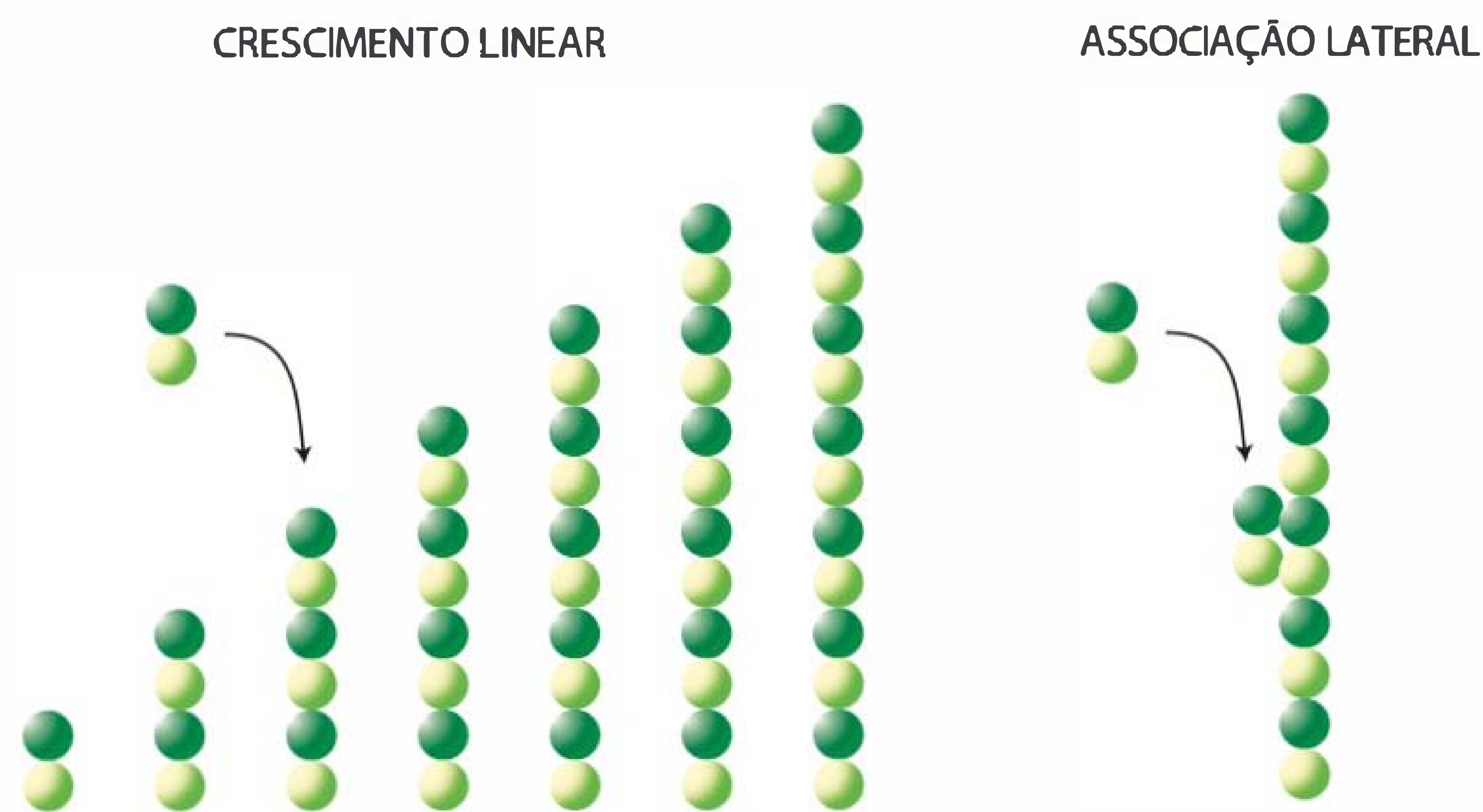


Figura Q16-1 Modelo de nucleação de microtúbulo a partir de dímeros de αβ-tubulina puros (Questão 16-5).

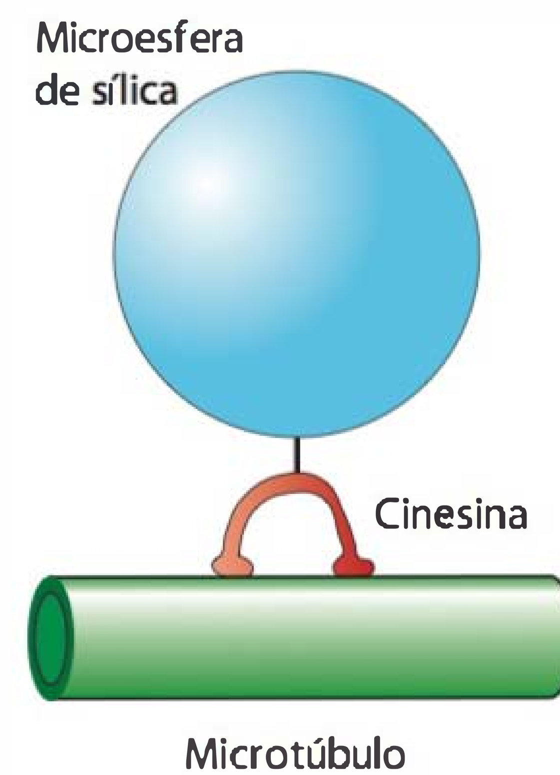
16-6 Como o centrossomo "sabe" que encontrou o centro da célula?

16-7 A concentração de actina nas células é 50 a 100 vezes maior do que a concentração crítica observada para a actina pura *in vitro*. Como isso é possível? O que evita que subunidades de actina nas células polimerizem formando os filamentos? Por que é vantajoso para as células manter uma grande quantidade de subunidades de actina livre?

16-8 Os movimentos de uma molécula individual de proteína motora podem ser diretamente analisados. Por meio de polarização de *laser* é possível criar padrões de interferência que exercem uma força centralmente direcionada, variando de zero na região central até uns poucos piconewtons na periferia (aproximadamente 200 nm do centro). Moléculas individuais que penetram o padrão de interferência são rapidamente impulsionadas para o centro, permitindo que sejam capturadas e movidas conforme a vontade do pesquisador.

Usando este sistema de "pinças ópticas", moléculas individuais de cinesina podem ser posicionadas sobre um microtúbulo que está fixado a uma lamínula de microscópio. Apesar de não ser possível a visualização óptica de uma única molécula de cinesina, esta pode ser marcada pela ligação a uma microesfera de sílica e pode ser seguida indiretamente pela visualização da microesfera (**Figura Q16-2A**). Na ausência de ATP, a molécula de cinesina permanece no centro do padrão de interferência, mas na presença de ATP ela se move rumo à extremidade mais (+) do microtúbulo. Conforme a cinesina se move sobre o microtúbulo, ela encontra a força do padrão de interferência, a qual simula a carga que a cinesina transporta quando ocorre sua real atuação na célula. Além disso, a pressão contra a microesfera contrapõe os efeitos do movimento Browniano (térmico), de tal forma que a posição da microesfera reflete com exatidão a posição da molécula de cinesina sobre o microtúbulo.

Os traços referentes aos movimentos de uma molécula de cinesina sobre um microtúbulo estão ilustrados na Figura Q16-2B.



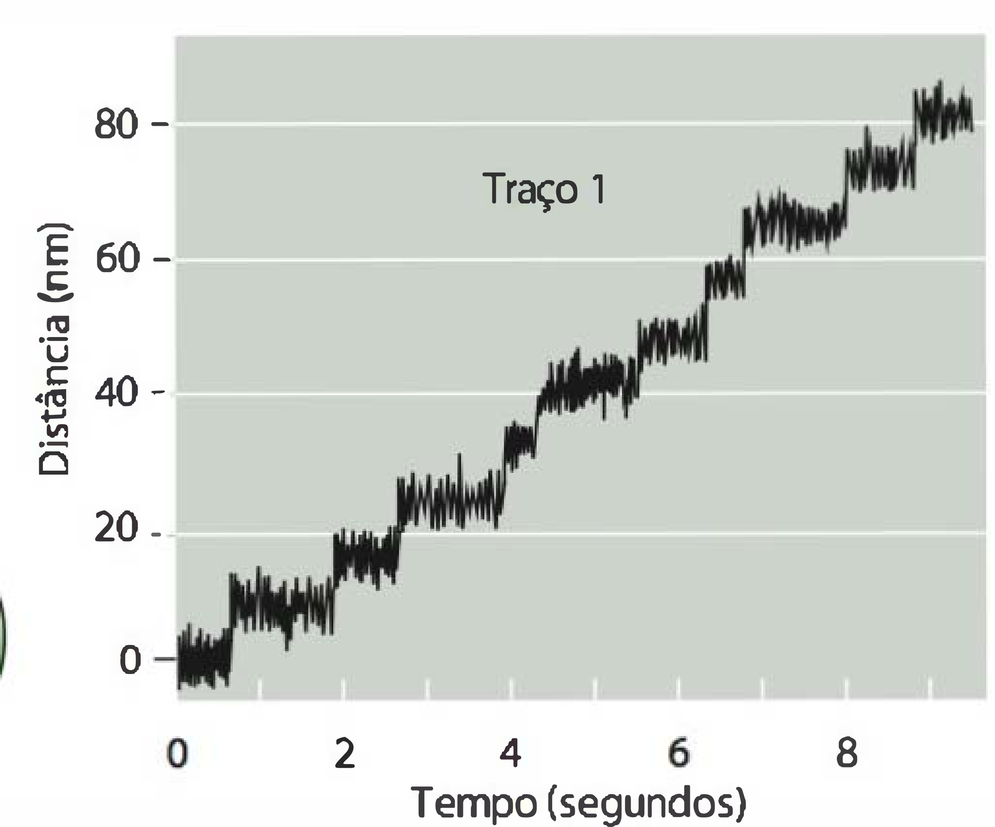


Figura Q16-2 Movimento da cinesina sobre um microtúbulo (Questão 16-8). (A) Desenho experimental com a cinesina ligada a uma microesfera de sílica, movendo-se sobre um microtúbulo. (8) Posições da cinesina (visualizada pela posição da microesfera de sílica) em relação ao centro do padrão de interferência, em função do tempo de movimento sobre o microtúbulo. O padrão em zigue-zague do traçado é resultante do movimento Browniano da microesfera.

A. Como ilustrado na Figura Q16-2B, todos os movimentos da cinesina são em uma direção (rumo à extremidade mais [+] do microtúbulo). O que fornece a energia livre necessária para assegurar um movimento unidirecional sobre o microtúbulo?
B. Qual é a velocidade média do movimento da cinesina sobre o microtúbulo?
C. Qual é o comprimento de cada passo que a cinesina dá conforme movimenta-se sobre o microtúbulo?
D. A partir de outros estudos, sabe-se que a cinesina possui dois domínios globulares e que cada um deles pode ligar-se à β-tubulina. Sabe-se também que a cinesina se move sobre um único protofilamento em um microtúbulo. Em cada protofilamento, a subunidade de β-tubulina se repete em intervalos de 8 nm. Considerando-se o tamanho do passo e o espaçamento entre as subunidades de β-tubulina, como podemos inferir que a molécula de cinesina se movimente sobre um microtúbulo?
E. Existe alguma informação nos dados da Figura Q16-2B que possa nos indicar quantas moléculas de ATP são hidrolisadas a cada passo da cinesina?

16-9 Como é mantido o movimento unidirecional de um lamelipódio?

16-10 Medições detalhadas do comprimento e da tensão de um sarcômero durante contração isométrica em músculo estriado forneceram suporte inicial essencial para o modelo de deslizamento de filamentos na contração muscular. Com base em seus conhecimentos a respeito do modelo de deslizamento de filamentos e da estrutura de um sarcômero, sugira uma explicação molecular para a relação entre a tensão e o comprimento do sarcômero nos pontos da **Figura Q16-3** marcados por I, II, III e IV. (Neste músculo, o comprimento do filamento de miosina é igual a 1,6 μm e o comprimento dos filamentos delgados de actina que se estendem a partir do disco Z é igual a 1,0 μm.)

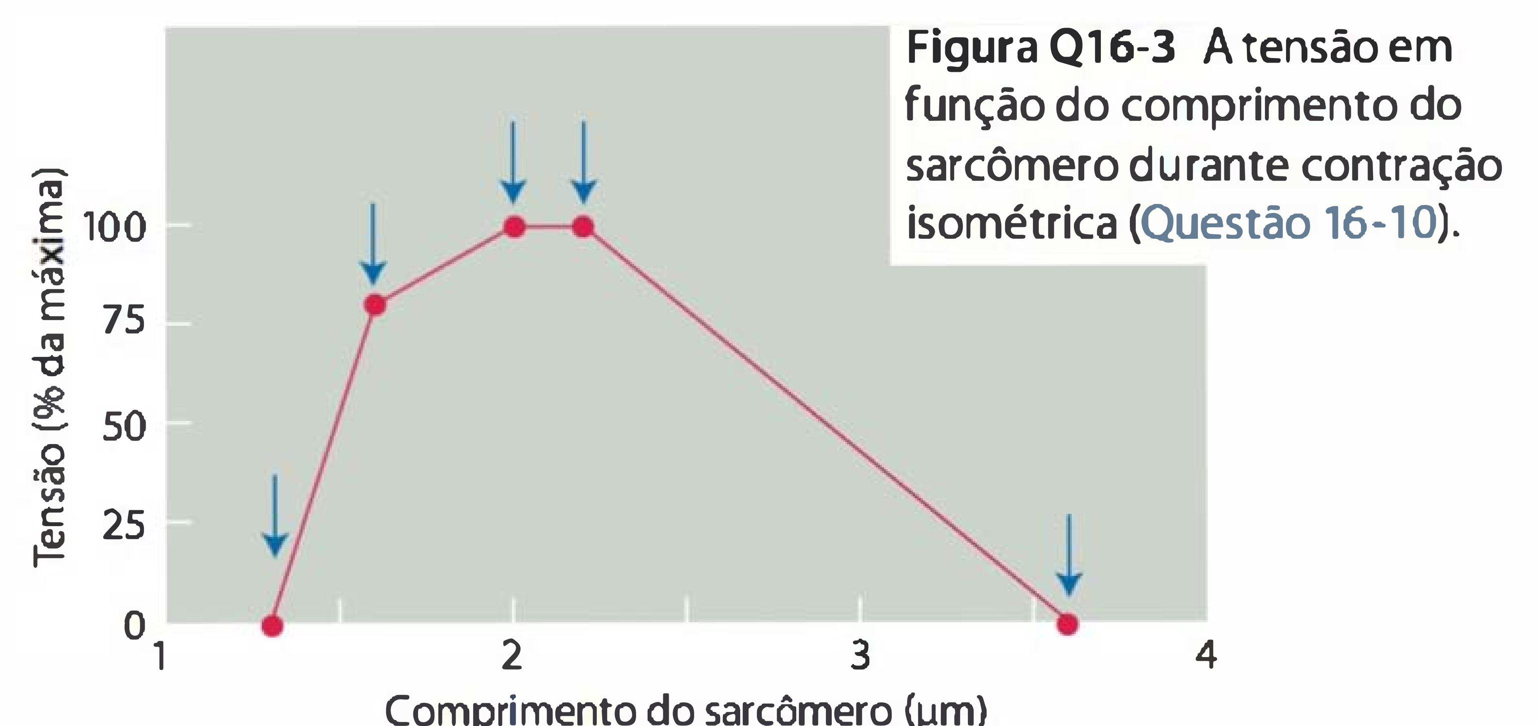


Figura Q16-3 A tensão em função do comprimento do sarcômero durante contração isométrica (Questão 16-10).

REFERÊNCIAS

Geral

Bray D (2001) Cell Movements: From Molecules to Motility, 2nd ed. New York: Garland Science.

Howard J (2001) Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. Sunderland, MA: Sinauer.

Autoassociação e estrutura dinâmica dos filamentos do citoesqueleto

Dogterom M & Yurke B (1997) Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278:856–860.

Gamer EC, Campbell CS & Mullins RD (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306:1021–1025.

Helfand BT, Chang L & Goldman RD (2003)The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:445–467.

Hill TL & Kirschner MW (1982) Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly. *Int Rev Cytol* 78:1–125.

Hotani H & Horio T (1988) Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 10:229–236.

Jones LJ, Carballido-Lopez R & Errington J (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104:913–922.

Kerssemakers JW, Munteanu EL, Laan L et al (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442:709–712.

Luby-Phelps K (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* 192:189–221.

Mitchison T & Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242.

Mitchison TJ (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:299–304.

Mukherjee A & Lutkenhaus J (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* 176:2754–2758.

Oosawa F & Asakura S (1975) Thermodynamics of the polymerization of protein. New York: Academic Press, pp 41–55, pp 90–108.

Pauling L (1953) Aggregation of Globular Proteins. *Discuss Faraday Soc* 13:170–176

Rodionov VI & Borisy GG (1997) Microtubule treadmilling *in vivo*. *Science*. 275:215–218.

Shih YL & Rothfield L (2006) The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:729–754.

Theriot JA (2000) The polymerization motor. *Traffic* 1:19–28.

Como as células regulam seus filamentos do citoesqueleto

Aldaz H, Rice LM, Steams T & Agard DA (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature* 435:523–527

Bretscher A, Chambers D, Nguyen R & Reczek D (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:113–143.

Doxsey S, McCollum D & Theurkauf W (2005) Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:411–434.

Garcia ML & Cleveland DW (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *CurrOpin Cell Biol* 13:41–48.

Holy TE, Dogterom M, Yurke B & Leibler S (1997) Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6228–6231.

Mullins RD, Heuser JA & Pollard TD (1998)The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6181–6186.

Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA et al (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294:1679–1684.

Quarmby L (2000) Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J Cell Sci* 113:2821–2827.

Steams T & Kirschner M (1994) *In vitro* reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76:623–637.

Wiese C & Zheng Y (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* 119:4143–4153.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B & Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 37B:57B–583.

Zigmond SH (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 16:99–105.

Motores moleculares

Burgess SA, Walker ML, Sakakibara H et al (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature* 421:715–718.

Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519–526.

Howard J, Hudspeth AJ &Vale RD (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342:154–158.

Howard J (1997) Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* 389:561–567.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K et al (1993)Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50–58.

Reck-Peterson SL, Yildiz A, Carter AP et al (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* 126:335–348.

Rice S, Lin AW, Safer D et al (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402:778–784.

Richards TA & Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436:1113–1118.

Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ & Block SM (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365:721–727.

Vikstrom KL & Leinwand LA (1996) Contractile protein mutations and heart disease. *Curr Opin Cell Biol* 8:97–105.

Wells AL, Lin AW, Chen LQ et al (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*401:505–508.

Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA et al (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300:2061–2065.

Yildiz A & Selvin PR (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol* 15:112–120.

O citoesqueleto e o comportamento celular

Abercrombie M (1980) The crawling movement of metazoan cells. *Proc Roy Soc B* 207:129–147.

Cooke R (2004) The sliding filament model: 1972–2004. *J Gen Physiol* 123:643–656.

Dent EW & Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209–227.

Lauffenburger DA & Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359–369.

Lo CM, Wang HB, Dembo M & Wang YL (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79:144–152.

Madden K & Snyder M (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* 52:687–744.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704–1709.

Rafelski SM & Theriot JA (2004) Crawling toward a unified model of cell motility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu Rev Biochem* 73:209–239.

Parent CA & Devreotes PN (1999) A cell's sense of direction. *Science* 284:765–770.

Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453–465.

Purcell EM (1977) Life at low Reynolds' number. *Am J Phys* 45:3–11.

Wittmann T, Hyman A & Desai A (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biol* 3:E28–E34.

O Ciclo Celular

17

A única maneira de formar uma nova célula é duplicando uma célula já existente. Esse fato simples, primeiramente estabelecido na metade do século XIX, traz consigo uma profunda mensagem de continuidade da vida. Todos os organismos vivos, da bactéria unicelular ao mamífero multicelular, são produtos de repetidos ciclos de crescimento e divisão celular que remontam aos primórdios da vida na Terra, há mais de três bilhões de anos.

Uma célula se reproduz ao executar uma sequência organizada de eventos em que ela duplica seu conteúdo e então se divide em duas. Esse ciclo de duplicação e divisão, conhecido como **ciclo celular**, é o mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. Em espécies unicelulares, como bactérias e leveduras, cada divisão celular produz um novo organismo completo. Em espécies multicelulares, sequências longas e complexas de divisões celulares são necessárias à produção de um organismo funcional. Mesmo no indivíduo adulto, a divisão celular normalmente é necessária à substituição das células que morrem. Na verdade, cada um de nós deve fabricar milhões de células a cada segundo simplesmente para sobreviver: se toda a divisão celular fosse interrompida – por exposição a uma alta dose de raios X, por exemplo – morreríamos em poucos dias.

Os detalhes do ciclo celular variam de organismo para organismo e em diferentes fases da vida de um organismo. Certas características, contudo, são universais. O conjunto mínimo de processos que uma célula tem de executar é aquele que lhe permite realizar sua tarefa fundamental: a transmissão da informação genética à próxima geração de células. Para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas, o DNA de cada cromossomo deve primeiro ser fielmente replicado a fim de produzir duas cópias completas, e os cromossomos replicados devem então ser precisamente distribuídos (*segregados*) às células-filhas, de forma que cada uma receba uma cópia de todo o genoma (**Figura 17-1**).

As células eucarióticas desenvolveram uma complexa rede de proteínas reguladoras, conhecida como *sistema de controle do ciclo celular*, que governa a progressão do ciclo celular. O núcleo desse sistema é uma série ordenada de mudanças bioquímicas que iniciam os principais eventos do ciclo, incluindo a duplicação e a segregação dos cromossomos. Na maioria das células, níveis adicionais de regulação aumentam a fidelidade da divisão celular e permitem que o sistema de controle responda a vários sinais, tanto internos como externos à célula. Dentro da célula, o sistema de controle monitora a progressão do ciclo celular, retardando eventos posteriores até que eventos anteriores tenham sido completados. Os preparativos para a segregação dos cromossomos duplicados, por exemplo, não são permitidos até que a replicação do DNA esteja completa. O sistema de controle também monitora condições fora da célula. Em um animal multicelular, o sistema é extremamente responsivo a sinais de outras células, estimulando a divisão celular quando mais células são necessárias e bloqueando-a quando elas não são. Portanto, o sistema de controle do ciclo celular tem um papel central na regulação do número de células nos tecidos do corpo. Quando o sistema funciona mal, divisões celulares em excesso podem resultar em câncer.

Além da duplicação do genoma, a maioria das células também duplica suas outras organelas e macromoléculas; se não fosse assim, as células-filhas ficariam menores a cada divisão. Para manter seu tamanho, as células em divisão devem coordenar o crescimento (isto é, o aumento da massa celular) com a divisão.

Este capítulo descreve os vários eventos do ciclo celular e como eles são controlados e coordenados. Começaremos com um breve panorama geral do ciclo celular. Descreveremos, em seguida, o sistema de controle do ciclo celular, e explicaremos como ele desencadeia os diferentes eventos do ciclo. Na sequência, consideraremos detalhadamente os principais

Neste capítulo

PANORAMA GERAL DO CICLO CELULAR 1054

O SISTEMA DE CONTROLE DO CICLO CELULAR 1060

FASE S 1067

MITOSE 1071

CITOCINESE 1092

CONTROLE DA DIVISÃO E DO CRESCIMENTO CELULAR 1101

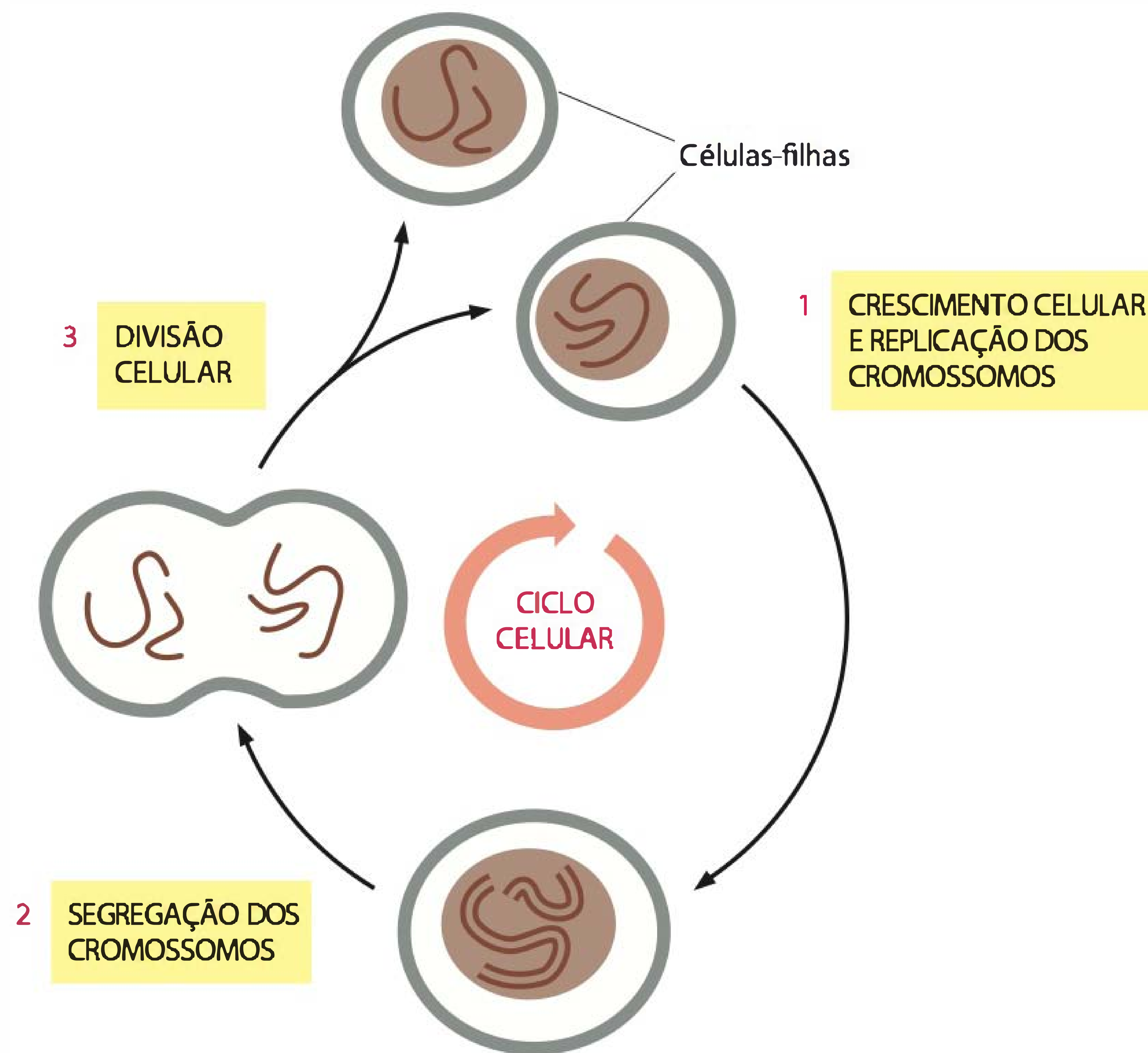


Figura 17-1 O ciclo celular. A divisão de uma célula eucariótica hipotética com dois cromossomos é apresentada a fim de ilustrar como duas células-filhas geneticamente idênticas são produzidas a cada ciclo. Em geral, cada uma das células-filhas continuará a se dividir, passando por ciclos celulares adicionais.

estágios do ciclo celular, nos quais os cromossomos são duplicados e então segregados em duas células-filhas. Por fim, consideraremos como sinais extracelulares governam as taxas de crescimento e divisão celular, e como esses dois processos são coordenados.

PANORAMA GERAL DO CICLO CELULAR

Iniciaremos esta seção com uma breve descrição das quatro *fases* do ciclo celular eucariótico. Em seguida, consideraremos alguns métodos e sistemas celulares usados como modelo no estudo do ciclo celular.

O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases

A função básica do ciclo celular é duplicar, de forma exata, a imensa quantidade de DNA nos cromossomos, e então segregar com precisão as cópias em duas células-filhas geneticamente idênticas. Esses processos definem as duas principais fases do ciclo celular. A duplicação dos cromossomos ocorre durante a *fase S* (S de síntese de DNA), que requer de 10 a 12 horas e ocupa cerca de metade do tempo do ciclo celular de uma célula típica de mamífero. Após a fase S, a segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem na *fase M* (M de *m*itose), que requer muito menos tempo (menos de uma hora em uma célula de mamífero). A fase M compreende dois eventos principais: a divisão nuclear, ou *mitose*, durante a qual os cromossomos copiados são distribuídos em um par de núcleos-filhos; e a divisão citoplasmática, ou *citocinese*, quando a própria célula se divide em duas (**Figura 17-2**).

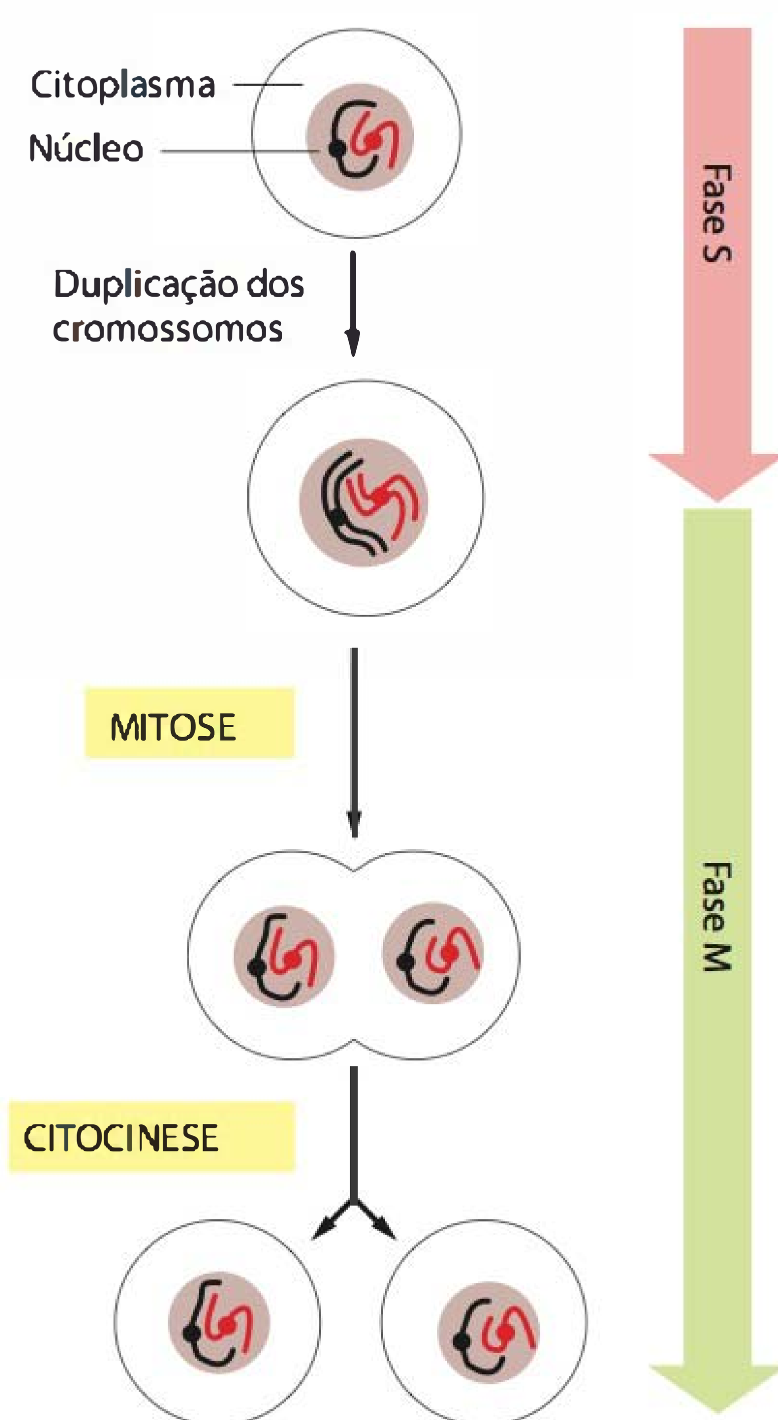


Figura 17-2 Os principais eventos do ciclo celular. Os principais eventos cromossômicos do ciclo celular ocorrem na fase S, quando os cromossomos são duplicados, e na fase M, quando os cromossomos duplicados são segregados em um par de núcleos-filhos (na mitose), após o que a própria célula se divide em duas (citocinese).

Ao fim da fase S, as moléculas de DNA em cada par de cromossomos duplicados se entrelaçam e são mantidas fortemente unidas por ligações proteicas especializadas. No começo da mitose, em um estágio chamado de *prófase*, as duas moléculas de DNA são gradativamente desembaraçadas e condensadas em pares de bastonetes rígidos e compactos chamados de **cromátides-irmãs**, as quais permanecem ligadas por meio da *coesão de cromátides-irmãs*. Quando posteriormente o envelope nuclear se desmantela na mitose, os pares de cromátides-irmãs ficam ligados ao *fuso mitótico*, um gigantesco arranjo bipolar de microtúbulos (discutido no Capítulo 16). As cromátides-irmãs são fixadas a polos opostos do fuso, e, finalmente, todas as irmãs se alinham no equador do fuso em um estágio chamado de *metáfase*. A destruição da coesão de cromátides-irmãs, no início da *anáfase*, separa as cromátides-irmãs, que são puxadas para polos opostos do fuso. O fuso é em seguida desmontado, e os cromossomos segregados são empacotados em núcleos separados na *telófase*. A citocinese então cliva a célula em duas, de forma que cada célula-filha herde um dos dois núcleos (**Figura 17-3**).

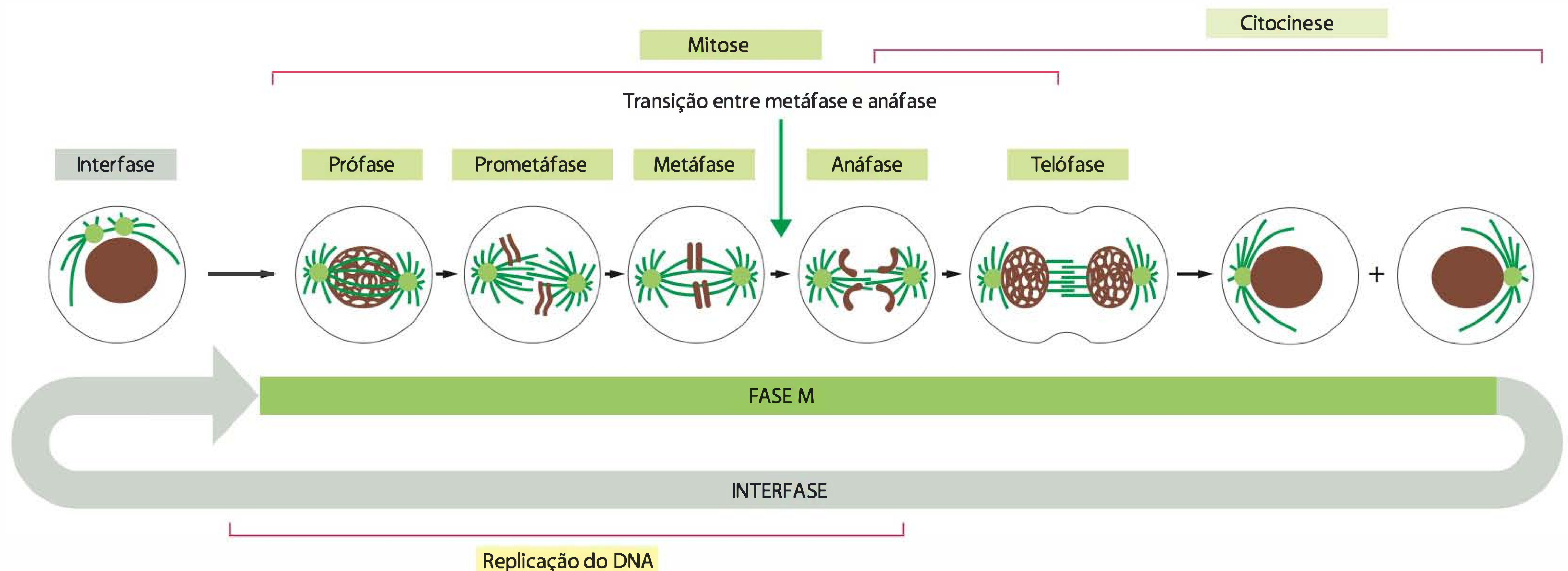


Figura 17-3 Os eventos da divisão celular eucariótica vistos sob o microscópio. Os processos facilmente visíveis de divisão nuclear (mitose) e divisão celular (citocinese), coletivamente chamados de fase M, tipicamente ocupam somente uma pequena fração do ciclo celular. A outra parte do ciclo, muito mais longa, é conhecida como interfase, que inclui a fase S e as fases de intervalo (discutido no texto). Os cinco estágios da mitose são apresentados: uma mudança brusca no estado bioquímico da célula ocorre na transição da metáfase à anáfase. A célula pode fazer uma pausa antes deste ponto de transição, mas, uma vez ultrapassado este ponto, a célula continua até o fim da mitose e atravessa a citocinese, chegando à interfase.

A maioria das células necessita de muito mais tempo para crescer e duplicar sua massa de proteínas e organelas do que o necessário para duplicar seus cromossomos e se dividir. A fim de reservar, em parte, mais tempo para o crescimento, a maioria dos ciclos celulares possui *fases de intervalo* extras – a **fase G_1** entre a fase M e a fase S, e a **fase G_2** entre a fase S e a mitose. Assim, o ciclo celular eucariótico é tradicionalmente dividido em quatro fases sequenciais: G_1, S, G_2 e M. As fases G_1, S e G_2 são em conjunto chamadas de **interfase** (**Figura 17-4** e ver Figura 17-3). Em uma célula humana típica se proliferando em cultura, a interfase pode ocupar 23 horas de um ciclo celular de 24 horas, com 1 hora de fase M. O crescimento celular ocorre ao longo do ciclo celular, exceto durante a mitose.

As duas fases de intervalo são mais do que um simples retardo de tempo que garante o crescimento celular. Elas também dão tempo para que a célula monitore o ambiente interno e externo a fim de se assegurar de que as condições são adequadas e os preparativos estejam completos, antes que a célula se comprometa com as principais transformações da fase S e da mitose. Nesse sentido, a fase G_1 é especialmente importante. Sua duração pode variar imensamente, dependendo das condições externas e de sinais extracelulares de outras células. Se as condições extracelulares são desfavoráveis, por exemplo, as células retardam a progressão a G_1 e podem entrar em um estado de repouso especializado conhecido como G_0 (G zero), no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes que a proliferação seja retomada. Na verdade, muitas células ficam permanentemente em G_0 até que elas ou o organismo morram. Se as condições extracelulares são favoráveis e os sinais para crescer e se dividir estão presentes, as células no início de G_1 ou G_0 avançam até um ponto de comprometimento próximo ao fim de G_1 conhecido como **Início** (em leveduras) ou **ponto de restrição** (em células de mamíferos). Usaremos o termo Início tanto para células de leveduras como para células de animais. Uma vez passado esse ponto, as células se comprometem com a replicação do DNA, mesmo que os sinais extracelulares que estimulam o crescimento e a divisão celular sejam removidos.

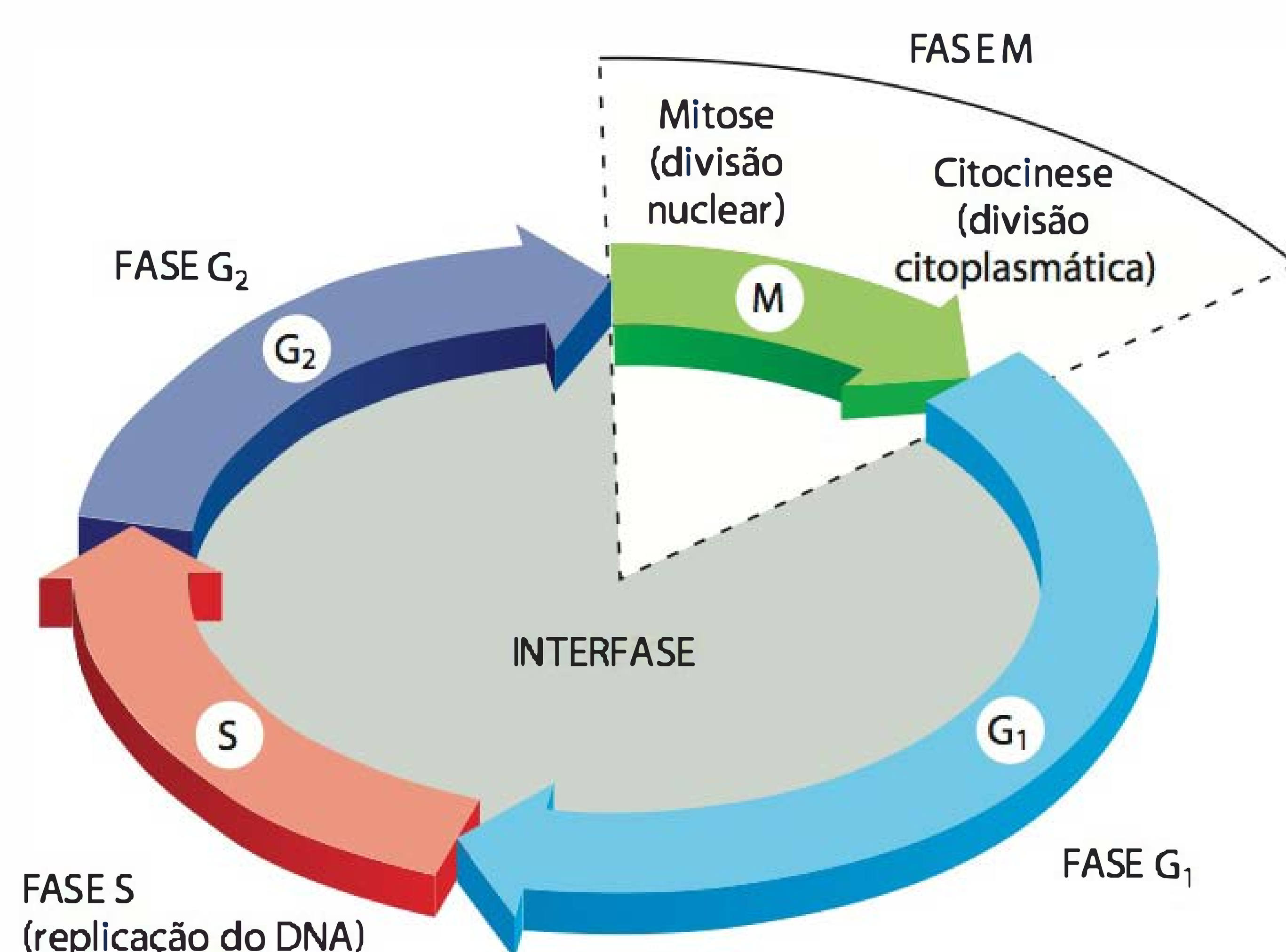


Figura 17-4 As quatro fases do ciclo celular. Na maioria das células, fases de intervalo separam os principais eventos da fase S e da fase M. A G_1 é o intervalo entre a fase M e a fase S, enquanto a G_2 é o intervalo entre a fase S e a fase M.

O controle do ciclo celular é similar em todos os eucariotos

Algumas características do ciclo celular, inclusive o tempo necessário para completar certos eventos, variam muito de um tipo celular para o outro, mesmo no próprio organismo. Contudo, a organização básica do ciclo celular é essencialmente a mesma em todas as células eucarióticas, e todos os eucariotos parecem usar uma maquinaria e mecanismos de controle similares para conduzir e regular os eventos do ciclo celular. As proteínas do sistema de controle do ciclo celular, por exemplo, apareceram pela primeira vez há mais de um bilhão de anos. Notavelmente, elas têm sido tão bem conservadas durante o curso da evolução que muitas delas funcionam perfeitamente quando transferidas de uma célula humana para uma célula de levedura. Portanto, podemos estudar o ciclo celular e sua regulação em vários organismos, usando as descobertas obtidas para montar um quadro unificado de como as células eucarióticas se dividem. No restante desta seção, revisaremos brevemente os três sistemas eucarióticos mais comumente usados para estudar a organização e o controle do ciclo celular: leveduras, embriões animais e células cultivadas de mamíferos.

O controle do ciclo celular pode ser geneticamente dissecado pela análise de mutantes de leveduras

As leveduras são minúsculos fungos unicelulares que possuem um sistema de controle do ciclo celular notavelmente similar ao nosso. Duas espécies geralmente são usadas em estudos do ciclo celular. A **levedura de fissão** *Schizosaccharomyces pombe* é assim designada por seu uso na produção da cerveja africana. É uma célula em forma de bastonete que cresce por alongamento das extremidades. A divisão ocorre quando um septo, ou placa celular, forma-se no meio do bastonete (**Figura 17-5**A). A **levedura de brotamento** *Saccharomyces cerevisiae* é usada tanto por cervejeiros como por padeiros. É uma célula oval que se divide pela formação de um broto, que aparece primeiro durante a fase G_1 e cresce constantemente, até se separar da célula-mãe após a mitose (Figura 17-5B).

Apesar de suas visíveis diferenças, as duas espécies de leveduras compartilham muitas características extremamente úteis aos estudos genéticos. Elas se reproduzem quase tão rapidamente como as bactérias e possuem um tamanho genômico inferior a 1% em relação ao de um mamífero. São suscetíveis a rápidas manipulações genéticas e moleculares, nas quais genes podem ser deletados, substituídos ou alterados. O mais importante é que possuem a capacidade de proliferação em um estado *haploide*, no qual somente uma única cópia de cada gene está presente na célula. Quando as células são haploides, é fácil isolar e estudar mutações que inativam um gene, porque se evita a complicação de ter uma segunda cópia do gene na célula.

Muitas descobertas importantes sobre o controle do ciclo celular se originaram da busca sistemática de mutações em leveduras que inativam genes que codificam componentes essenciais do sistema de controle do ciclo celular. Os genes afetados por algumas

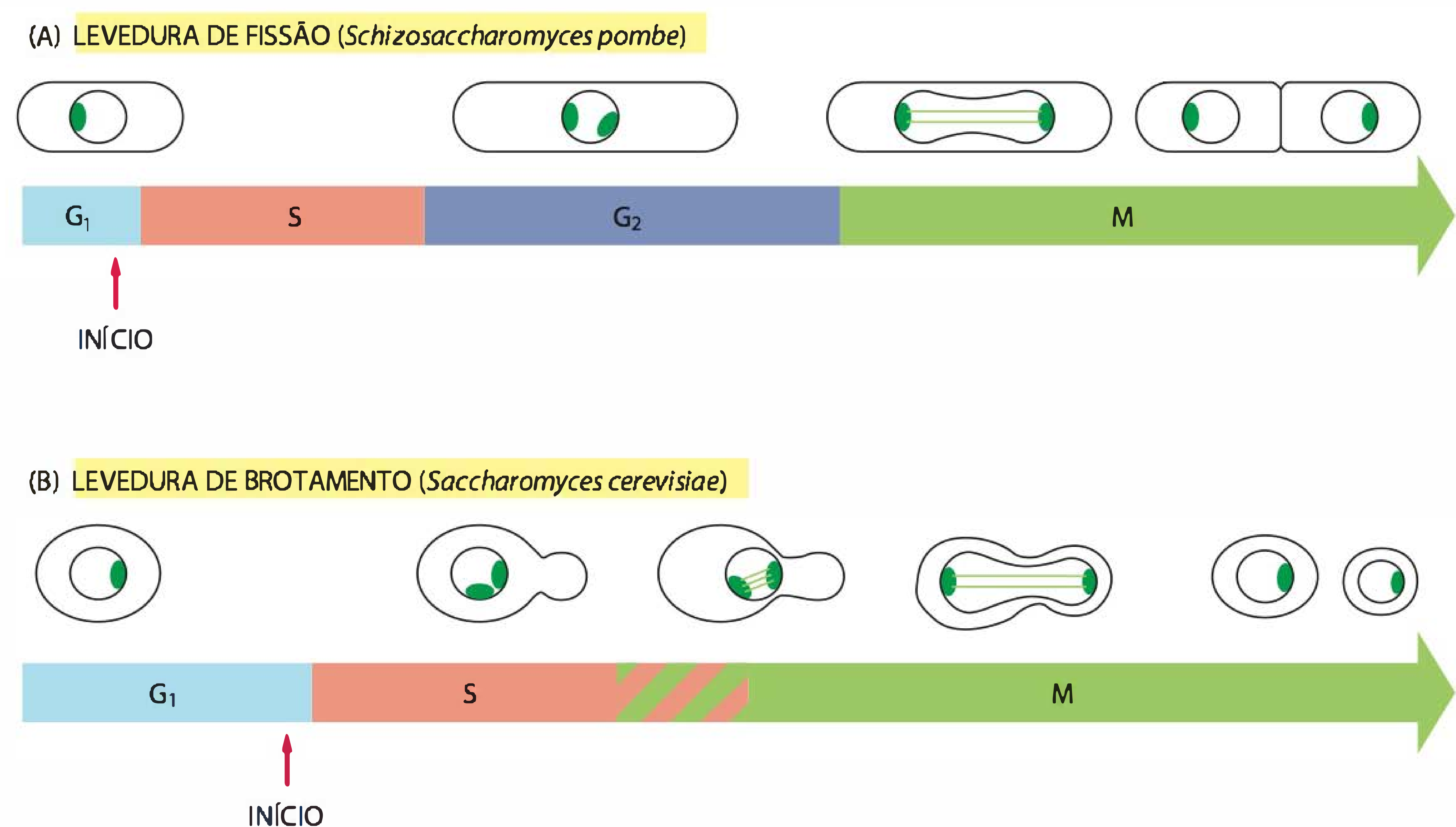


Figura 17-5 Comparação entre os ciclos celulares de leveduras de fissão e leveduras de brotamento. (A) A levedura de fissão tem um típico ciclo celular eucariótico, com fases G_1, S, G_2 e M. O envelope nuclear da célula de levedura, diferentemente do das células eucarióticas superiores, não se desintegra durante a fase M. Os microtúbulos do fuso mitótico (*verde claro*) se formam dentro do núcleo e são fixados a corpúsculos polares do fuso (*verde escuro*) na periferia. A célula se divide pela formação de uma divisória (conhecida como placa celular) que a separa em duas. (B) A levedura de brotamento tem fases G_1 e S normais, mas não tem uma fase G_2 normal. Em vez disso, um fuso com base em microtúbulos começa a se formar tardiamente na fase S; como as leveduras de fissão, o envelope nuclear permanece intacto durante a mitose, e o fuso se forma dentro do núcleo. Ao contrário das leveduras de fissão, a célula se divide por brotamento.

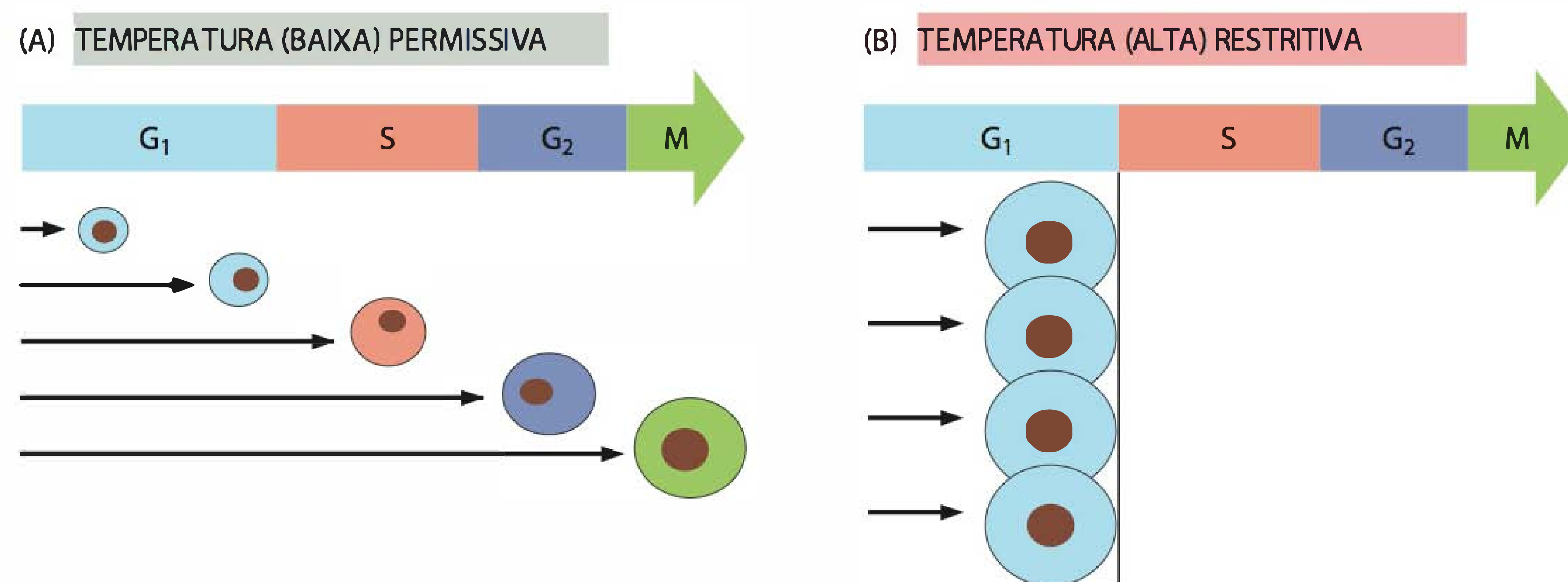


Figura 17-6 O comportamento de um mutante *Cdc* sensível à temperatura. (A) Na temperatura permissiva (baixa), as células se dividem normalmente e são encontradas em todas as fases do ciclo (a fase da célula é indicada pelas cores). (B) Na temperatura restritiva (alta), na qual o produto do gene mutante funciona anormalmente, as células mutantes continuam o progresso ao longo do ciclo celular até chegarem a uma etapa específica, que são incapazes de completar (início da fase S, neste exemplo). Como os mutantes *Cdc* ainda continuam a crescer, eles se tornam anormalmente grandes. Ao contrário, mutantes não-*Cdc*, se deficientes em um processo necessário ao longo do ciclo à biossíntese e ao crescimento (como a produção de ATP), param casualmente em qualquer estágio do ciclo – dependendo de quando suas reservas bioquímicas se esgotarem (não-mostrado).

dessas mutações são conhecidos como **genes do ciclo de divisão celular,** ou **genes *Cdc*.** Muitas dessas mutações levam as células à interrupção em um ponto específico do ciclo celular, sugerindo que o produto gênico normal é necessário para que a célula ultrapasse este ponto.

Contudo, um mutante que não pode completar o ciclo celular não pode se propagar. Dessa maneira, mutantes *Cdc* podem ser selecionados e mantidos somente se seu fenótipo for *condicional* – isto é, se o produto gênico mutante deixa de funcionar somente em certas condições específicas. A maioria das mutações condicionais do ciclo celular é constituída por *mutações sensíveis à temperatura*, nas quais a proteína mutante deixa de funcionar a altas temperaturas, mas funciona suficientemente bem a baixas temperaturas, permitindo a divisão celular. Um mutante *Cdc* sensível à temperatura pode ser propagado na temperatura baixa (a *condição permissiva*) e então ser levado a uma temperatura mais alta (a *condição restritiva*), para que a função do gene mutante seja desligada. Na temperatura mais alta, as células levam avante o ciclo celular até alcançarem o ponto em que a função do gene mutante é necessária ao progresso adicional, parando neste ponto (**Figura 17-6**). Nas leveduras de brotamento, pode-se detectar esse tipo de interrupção uniforme do ciclo celular simplesmente observando as células: a presença ou a ausência de um broto, e o tamanho do broto, indicam o ponto do ciclo no qual o mutante está parado (**Figura 17-7**).

O controle do ciclo celular pode ser bioquimicamente analisado em embriões animais

As características bioquímicas do ciclo celular são facilmente analisadas nos gigantescos óvulos fertilizados de muitos animais, que carregam grandes reservas das proteínas necessárias à divisão celular. O óvulo da rã *Xenopus*, por exemplo, tem mais de 1 mm de diâmetro e contém 100.000 vezes mais citoplasma que uma célula média do corpo humano (**Figura**

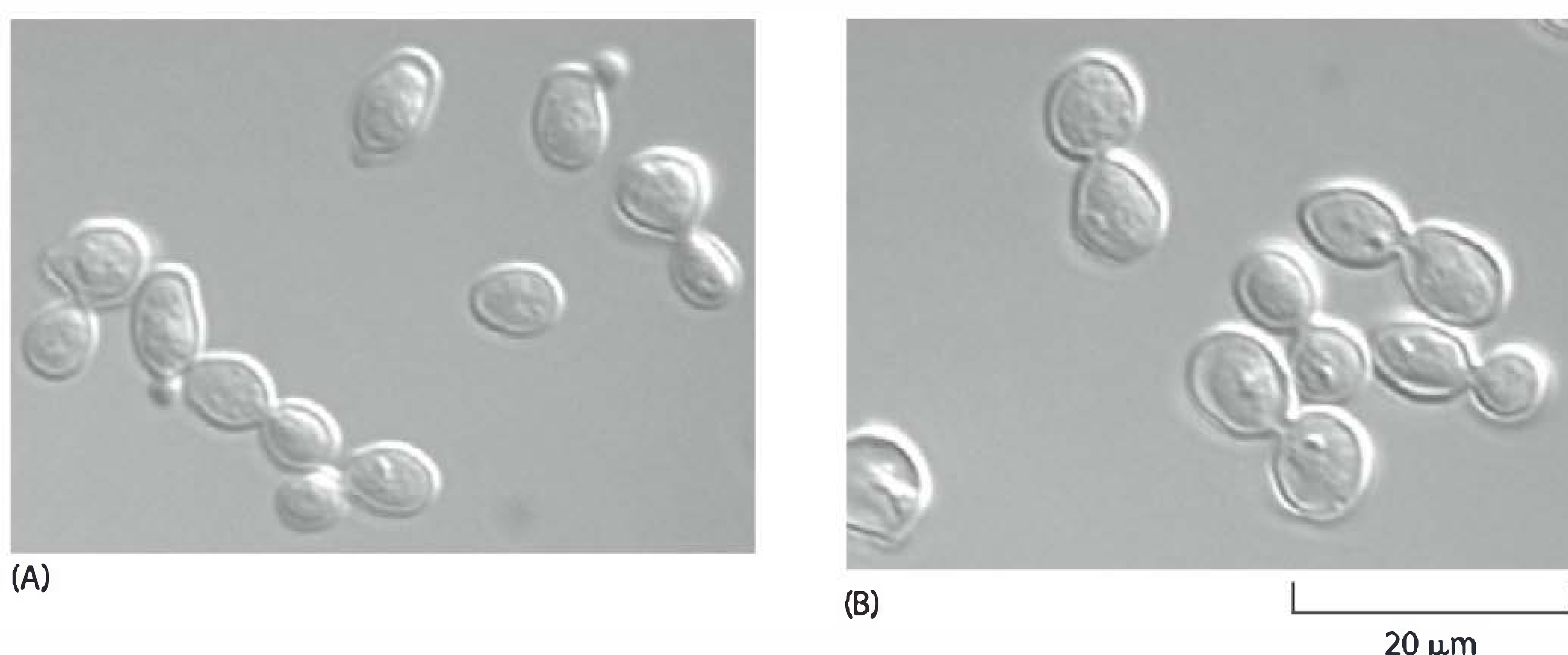


Figura 17-7 A morfologia de células de levedura de brotamento interrompidas por uma mutação *Cdc*. (A) Em uma população normal de células de levedura em proliferação, os brotos variam de tamanho, de acordo com o estágio do ciclo celular. (B) Em um mutante *Cdc15* crescido em temperatura restritiva, as células completam a anáfase, mas não completam a saída da mitose e da citocinese. O resultado é que elas param uniformemente com grandes brotos, característicos do final da fase M. (Cortesia de Jeff Ubersax.)

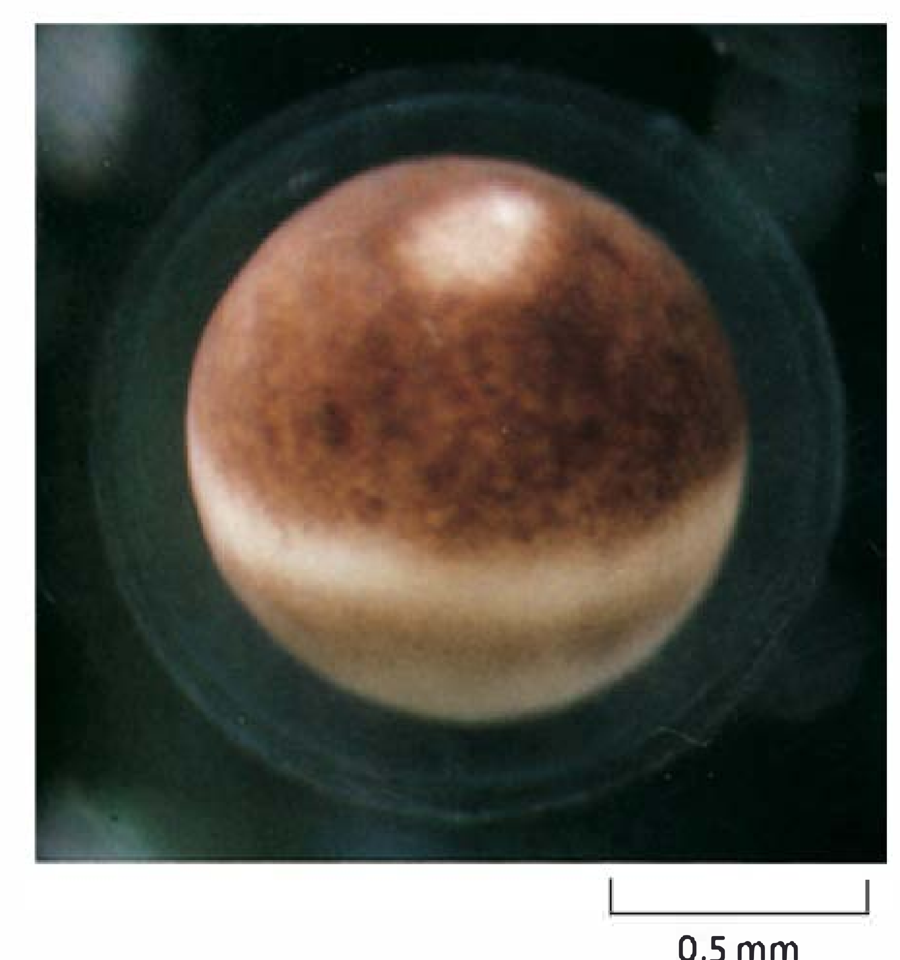


Figura 17-8 Um óvulo maduro de *Xenopus*, pronto para a fertilização. A mancha clara próxima ao topo mostra o local do núcleo, que deslocou o pigmento *marrom* na camada superficial do citoplasma do óvulo. Embora não se possa ver na foto, o envelope nuclear se desintegrou durante o processo de maturação do óvulo. (Cortesia de Tony Mills.)

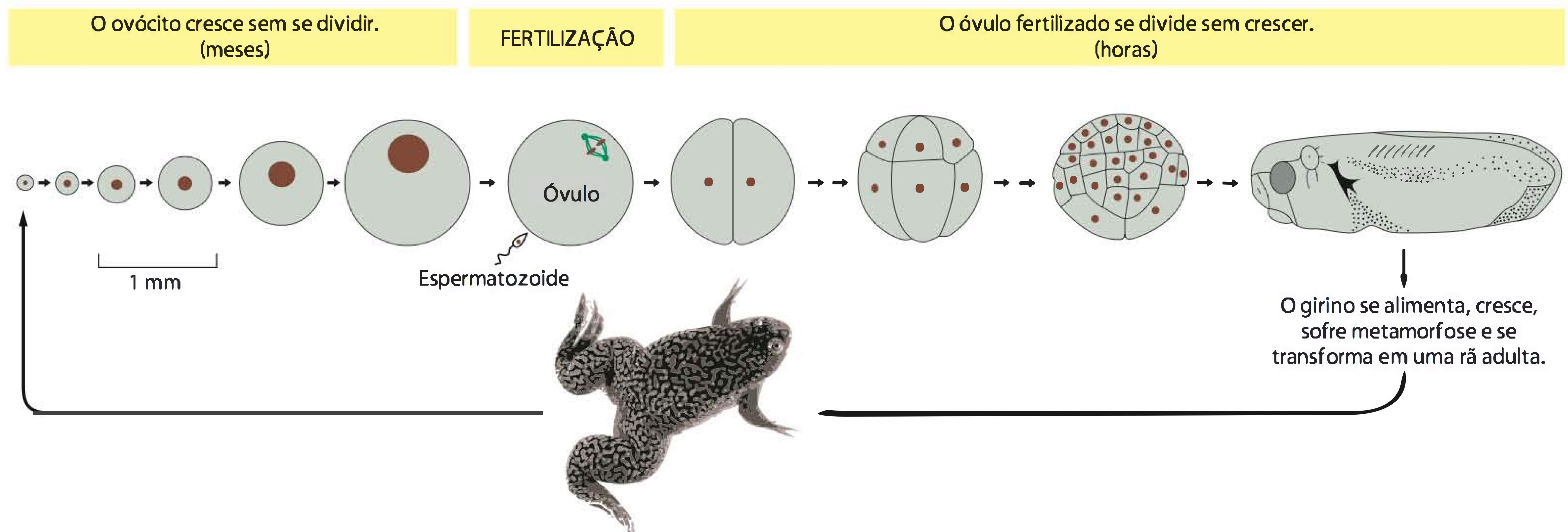


Figura 17-9 Crescimento do ovócito e clivagem do ovo em *Xenopus*. O ovócito cresce sem se dividir por muitos meses no ovário da rã mãe e finalmente amadurece em um óvulo (discutido no Capítulo 21). Após a fertilização, o ovo é clivado muito rapidamente – inicialmente a uma taxa de um ciclo de divisão a cada 30 minutos – e forma um girino multicelular em um ou dois dias. As células ficam progressivamente menores a cada divisão, mas o embrião permanece do mesmo tamanho. O crescimento inicia somente quando o girino começa a se alimentar. Todos os desenhos da série na parte superior estão na mesma escala (mas não a rã na parte inferior).

17-8). A fertilização do óvulo de *Xenopus* desencadeia uma sequência incrivelmente rápida de divisões celulares, chamadas de *divisões por clivagem*, nas quais a gigantesca célula única se divide, sem crescer, e gera um embrião contendo milhares de células menores (**Figura 17-9**). Após uma primeira divisão, que dura cerca de 90 minutos, ocorrem (mais ou menos sincronicamente, em intervalos de 30 minutos) as próximas 11 divisões, produzindo cerca de 4.096 (2^{12}) células em 7 horas. Cada ciclo é dividido em fases S e M com cerca de 15 minutos cada, sem fases G_1 ou G_2 detectáveis.

Desta maneira, as células de embriões jovens de *Xenopus*, assim como aquelas do molusco *Spisula* e da mosca-das-frutas *Drosophila*, são capazes de divisões celulares extremamente rápidas na ausência de crescimento e dos muitos mecanismos de controle (discutido posteriormente) que operam em ciclos celulares mais complexos. Portanto, tais *ciclos celulares de embriões jovens* revelam o funcionamento do sistema de controle do ciclo celular, desnudado e simplificado ao mínimo necessário à obtenção dos requisitos mais fundamentais – a duplicação do genoma e sua segregação em duas células-filhas. Outra vantagem desses embriões jovens à análise do ciclo celular é seu grande tamanho. É relativamente fácil injetar substâncias-teste dentro de um ovo para determinar seu efeito sobre a progressão do ciclo celular. Também é possível preparar citoplasma quase puro de óvulos de *Xenopus* e reconstituir muitos eventos do ciclo celular em um tubo de ensaio (**Figura 17-10**). Em tais extratos celulares, podemos observar e manipular eventos do ciclo celular sob condições bastante simplificadas e controláveis.

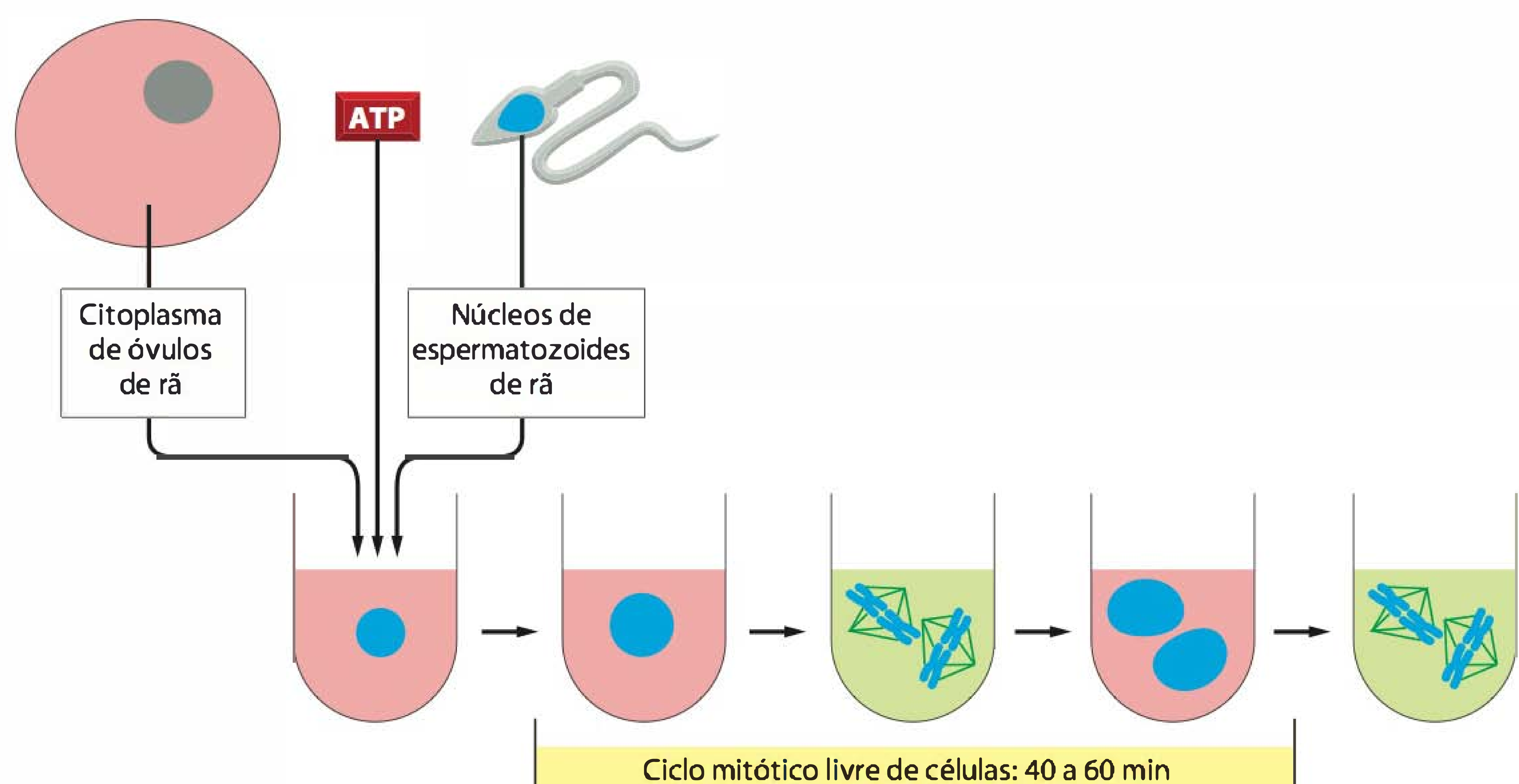


Figura 17-10 Estudo do ciclo celular em um sistema livre de células. A técnica de centrifugação gentil é usada para romper uma grande quantidade de óvulos de rã e separar o citoplasma de outros componentes celulares. O citoplasma não-diluído é coletado, e adicionam-se núcleos de espermatozoides, juntamente com ATP. Os núcleos dos espermatozoides se descondensam e então passam por repetidos ciclos de replicação do DNA e de mitose, indicando que o sistema de controle do ciclo celular está operando neste extrato citoplasmático livre de células.

O controle do ciclo celular pode ser estudado em células cultivadas de mamíferos

Não é fácil observar células individuais em um mamífero intacto. Por conseguinte, a maioria dos estudos sobre o controle do ciclo celular de mamíferos usa células que foram isoladas de tecidos normais ou de tumores e crescidas em placas de cultura na presença de nutrientes essenciais e outros fatores (**Figura 17-11**). Contudo, há uma complicação. Quando as células de tecidos normais de mamíferos são cultivadas em condições padronizadas, elas em geral param de se dividir após um número limitado de ciclos de divisão. Os fibroblastos humanos, por exemplo, param permanentemente de se dividir após 25 a 40 divisões, um processo denominado *senescência celular replicativa*, como discutiremos posteriormente.

As células de mamíferos ocasionalmente sofrem mutações que fazem com que se proliferem indefinidamente em cultura como *linhagens celulares* "imortalizadas". Embora não sejam normais, tais linhagens celulares são amplamente usadas em estudos do ciclo celular – e na biologia celular em geral – porque constituem uma fonte ilimitada de células geneticamente homogêneas. Além disso, essas células são grandes o suficiente para a realização de detalhadas observações citológicas de eventos do ciclo celular, e também são suscetíveis à análise bioquímica das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular.

Estudos de células cultivadas de mamíferos têm sido especialmente úteis na investigação dos mecanismos moleculares que governam o controle da proliferação celular em organismos multicelulares. Tais estudos são importantes não somente ao entendimento dos controles normais do número de células nos tecidos, mas também ao entendimento da perda desses controles no câncer (discutido no Capítulo 20).

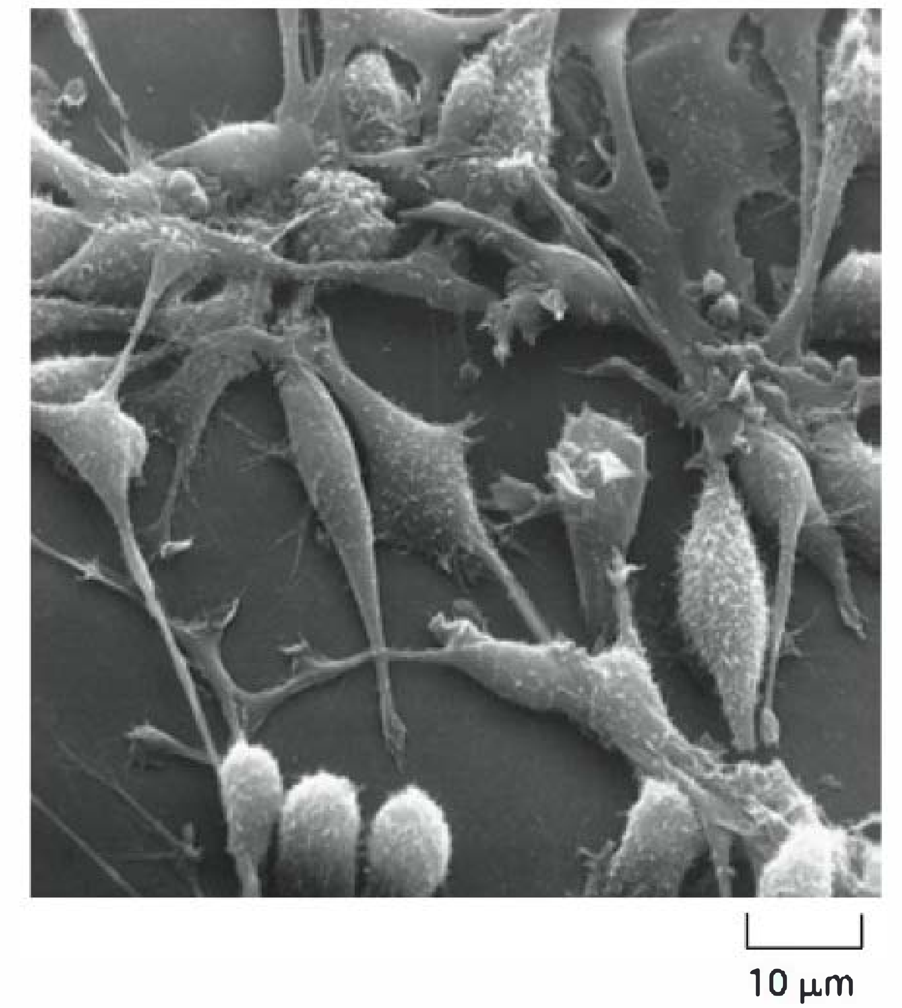


Figura 17-11 Células de mamífero se proliferando em cultura. As células nesta micrografia eletrônica de varredura são fibroblastos de rato. (Cortesia de Guenter Albrecht-Buehler.)

A progressão do ciclo celular pode ser estudada de várias maneiras

Como podemos dizer que estágio uma célula animal alcançou no ciclo celular? Uma maneira é simplesmente observar as células vivas sob o microscópio. Uma olhada rápida em uma população de células de mamíferos se proliferando em cultura revela que uma fração das células assumiu uma forma arredondada e está em mitose (ver Figura 17-11). Outras podem ser observadas no processo de citocinese. Podemos ter indícios adicionais sobre a posição no ciclo celular ao corar as células com corantes fluorescentes que se ligam ao DNA (revelando a condensação dos cromossomos na mitose) ou com anticorpos que reconhecem componentes celulares específicos, como os microtúbulos (revelando o fuso mitótico). Similarmente, as células na fase S podem ser identificadas no microscópio pela adição de moléculas visualizáveis que são incorporadas ao DNA recém-sintetizado, como o análogo artificial da timidina bromo-desoxiuridina (BrdU). Os núcleos celulares que incorporaram BrdU são então visualizados por meio de coloração com anticorpos anti-BrdU (**Figura 17-12**).

Tipicamente, em uma população de células em que todas estão se proliferando rapidamente, mas assincronicamente, cerca de 30 a 40% estarão na fase S a qualquer instante e ficarão marcadas por meio de um breve pulso de BrdU. Conforme a proporção de células em tal população que está marcada (o *índice de marcação*), podemos estimar a duração da fase S como uma fração da duração total do ciclo celular. Similarmente, conforme a proporção de células em mitose (o *índice mitótico*), podemos estimar a duração da fase M. Além disso, ao se dar um pulso de BrdU e permitir que as células continuem dentro do ciclo por períodos uniformes de tempo, podemos determinar quanto leva para que uma célula na fase S progrida de G_2 à fase M, da fase M a G_1, e finalmente de G_1 de volta à fase S.

Outra maneira de avaliar que estágio uma célula alcançou no ciclo celular é calcular seu conteúdo de DNA, que dobra durante a fase S. Essa abordagem é muito facilitada pelo uso de corantes fluorescentes que se ligam ao DNA e por um *citômetro de fluxo*, que possibilita a análise rápida e automática de um grande número de células (**Figura 17-13**). Também podemos usar a citometria de fluxo para determinar as durações das fases G_1, S e G_2 + M,

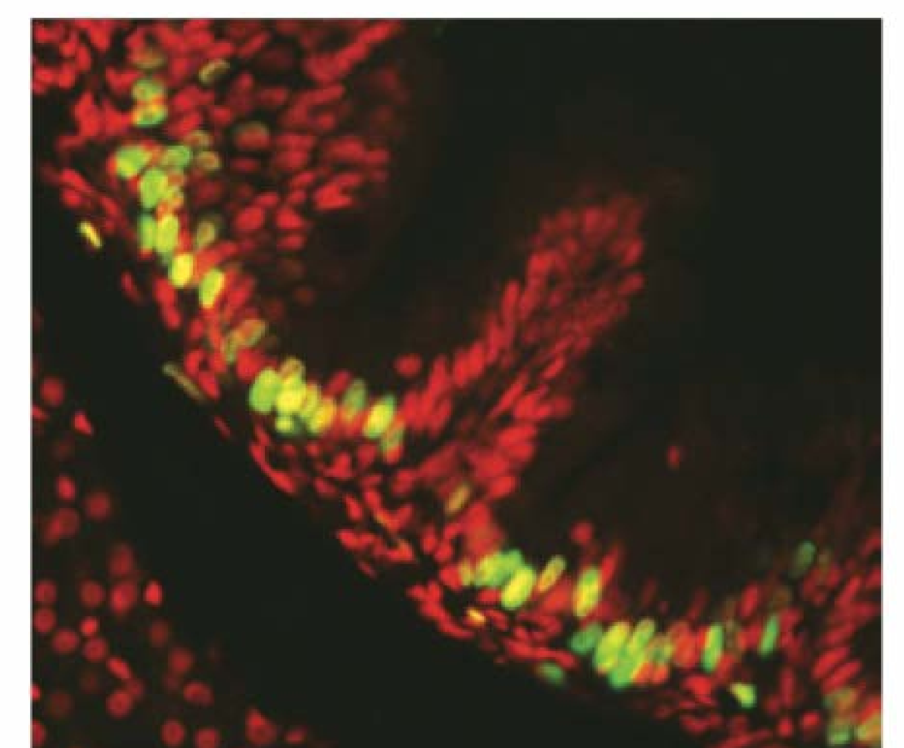


Figura 17-12 Marcação de células na fase S. Micrografia de imunofluorescência de células epiteliais do intestino de peixe-zebra marcadas com BrdU. O peixe foi exposto a BrdU, após que o tecido foi fixado e preparado para marcação com anticorpos fluorescentes antiBrdU (*verde*). Todas as células estão coradas com um corante fluorescente *vermelho*. (Cortesia de Cécile Crosnier.)

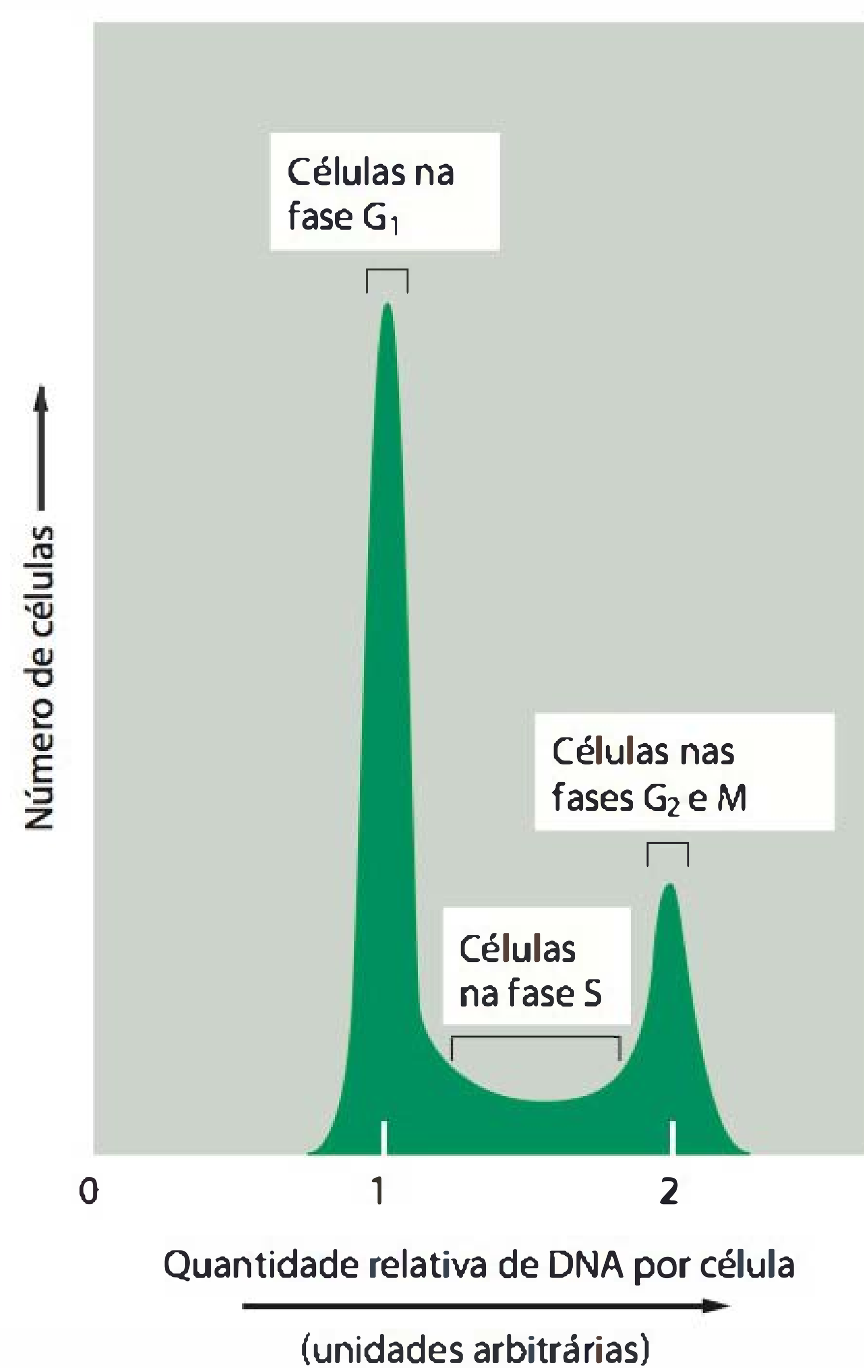


Figura 17-13 Análise do conteúdo de DNA com um citômetro de fluxo. Este gráfico mostra resultados típicos obtidos para uma população de células em proliferação, em que o conteúdo de DNA das células individuais é determinado em um citômetro de fluxo. (Um citômetro de fluxo, também chamado de separador de células ativadas por fluorescência [FACS, *fluorescence-activated cell sorter*], também pode ser usado para separar células de acordo com sua fluorescência – ver Figura 8-2.) As células aqui analisadas foram coradas com um corante que se torna fluorescente quando se liga ao DNA, de forma que a quantidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA de cada célula. As células são classificadas em três categorias: aquelas que têm um complemento de DNA não-replicado e estão, portanto, em G_1, aquelas que têm um complemento de DNA totalmente replicado (o dobro do conteúdo de DNA de G_1) e estão em G_2 ou na fase M, e aquelas que têm uma quantidade de DNA intermediária e estão na fase S. A distribuição das células no caso ilustrado indica que há um maior número de células em G_1 do que em G_2 + fase M, mostrando que G_1 é mais longa que G_2 + M nesta população.

acompanhando ao longo do tempo uma população de células com o DNA marcado que foram pré-selecionadas para estarem em uma fase particular do ciclo celular: as medições do conteúdo de DNA em tal população sincronizada de células revelam como as células progridem ao longo do ciclo.

Resumo

A divisão celular normalmente começa com a duplicação do conteúdo da célula, seguida da distribuição deste conteúdo para duas células-filhas. A duplicação dos cromossomos ocorre durante a fase S do ciclo celular, enquanto a maioria dos outros componentes celulares é duplicada continuamente ao longo do ciclo. Durante a fase M, os cromossomos replicados são segregados em núcleos individuais (mitose), e a célula então se divide em duas (citocinese). A fase S e a fase M geralmente são separadas por fases de intervalo chamadas de G_1 e G_2, quando vários sinais intracelulares e extracelulares regulam a progressão do ciclo celular. A organização e o controle do ciclo celular têm sido altamente conservados durante a evolução, e estudos em uma ampla série de sistemas – incluindo leveduras, embriões animais e células de mamíferos em cultura – levaram a uma visão unificada do controle do ciclo celular eucariótico.

O SISTEMA DE CONTROLE DO CICLO CELULAR

Por muitos anos os biólogos celulares assistiram ao espetáculo de fantoches da síntese de DNA, da mitose e da citocinese, mas não faziam ideia do que está por trás da cortina que controla esses eventos. O sistema de controle do ciclo celular era simplesmente uma caixa preta dentro da célula. Não estava nem ao menos claro se havia um sistema de controle separado, ou se os processos de síntese de DNA, mitose e citocinese de algum modo se autocontrolavam. Um avanço importante surgiu no final da década de 1980 com a identificação das principais proteínas do sistema de controle, juntamente com a percepção de que elas são distintas das proteínas que executam os processos de replicação do DNA, de segregação dos cromossomos, entre outros.

Nesta seção, primeiro consideraremos os princípios básicos sobre os quais o sistema de controle do ciclo celular opera. Em seguida discutiremos os componentes proteicos do sistema de controle e como eles trabalham em conjunto para sincronizar e coordenar os eventos do ciclo celular.

O sistema de controle do ciclo celular desencadeia os principais eventos do ciclo celular

O **sistema de controle do ciclo celular** opera de forma muito semelhante a um cronômetro ou oscilador que aciona os eventos do ciclo celular em uma sequência determinada (**Figura 17-14**). Em sua forma mais simples – como visto nos ciclos celulares embrionários anteriormente descritos e discutidos – o sistema de controle é como um cronômetro rigidamente programado que propicia uma quantidade fixa de tempo para a conclusão de cada evento do ciclo celular. O sistema de controle, nessas células, é independente dos eventos que controla, de forma que seus mecanismos de sincronização continuam a operar mesmo que aqueles



Figura 17-14 O controle do ciclo celular. Um sistema de controle do ciclo celular desencadeia os processos essenciais do ciclo celular – tais como a replicação do DNA, a mitose e a citocinese. O sistema de controle é aqui representado como um ponteiro central – o controlador – que gira no sentido horário, desencadeando processos essenciais quando alcança pontos de verificação específicos no mostrador externo. Informações sobre a conclusão de eventos do ciclo celular, assim como sinais oriundos do ambiente, podem ocasionar a parada do sistema de controle nesses pontos de verificação. Os pontos de verificação mais importantes ocorrem nos locais marcados com *retângulos amarelos*.

eventos falhem. Contudo, na maioria das células o sistema de controle não responde a informações recebidas dos processos que controla. Sensores, por exemplo, detectam a conclusão da síntese de DNA, e se alguma falha ou algum mau funcionamento impede a conclusão bem-sucedida desse processo, são enviados sinais para que o sistema de controle retarde a progressão à fase M. Tais atrasos garantem tempo para que a maquinaria seja reparada e também impedem a tragédia que poderia resultar se o ciclo celular progredisse prematuramente ao próximo estágio – segregando cromossomos incompletamente replicados, por exemplo.

O sistema de controle do ciclo celular tem como base em uma série conectada de interruptores bioquímicos, cada um dos quais inicia um evento específico do ciclo celular. Este sistema de interruptores possui muitas características de engenharia importantes, as quais aumentam tanto a precisão como a confiabilidade da progressão do ciclo celular. Em primeiro lugar, os interruptores geralmente são *binários* (liga/desliga) e desencadeiam eventos de maneira completa e irreversível. Seria claramente desastroso, por exemplo, se eventos como a condensação dos cromossomos ou a desintegração do envelope nuclear fossem iniciados apenas parcialmente ou começados e não completados. Em segundo lugar, o sistema de controle do ciclo celular é notavelmente robusto e confiável, em parte devido a mecanismos de reserva e outras características que permitem que o sistema opere eficientemente sob várias condições, mesmo que alguns componentes falhem. Por fim, o sistema de controle é altamente adaptável e pode ser modificado para se adequar a tipos celulares específicos e para responder a sinais intracelulares ou extracelulares específicos.

Na maioria das células eucarióticas, o sistema de controle do ciclo celular ativa a progressão do ciclo celular em três principais pontos de transição reguladora, ou **pontos de verificação** (ver Figura 17-14). O primeiro ponto de verificação é o Início (ou ponto de restrição) no final de G_1, onde a célula se compromete à entrada no ciclo celular e à duplicação dos cromossomos, como anteriormente mencionado. O segundo é o **ponto de verificação G_2/M**, onde o sistema de controle desencadeia os eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico. O terceiro é a **transição entre metáfase e anáfase**, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, levando à conclusão da mitose e da citocinese. O sistema de controle bloqueia a progressão a cada um desses pontos de verificação se detecta problemas dentro ou fora da célula. Se o sistema de controle percebe problemas na conclusão da replicação do DNA, por exemplo, ele manterá a célula no ponto de verificação G_2/M até que aqueles problemas sejam resolvidos. Similarmente, se as condições extracelulares não são apropriadas à proliferação celular, o sistema de controle bloqueia a progressão ao Início, impedindo com isso a divisão celular até que as condições se tornem favoráveis.



Figura 17-15 Dois componentes-chave do sistema de controle do ciclo celular. Quando uma ciclina forma um complexo com uma Cdk, a proteína-cinase é ativada e desencadeia eventos específicos do ciclo celular. Sem a ciclina, a Cdk é inativa.

O sistema de controle do ciclo celular depende de proteína-cinases dependentes de ciclinas (Cdks) ciclicamente ativadas

Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são membros de uma família de cinases conhecidas como **cinases dependentes de ciclinas** (**Cdks,** *cyclin-dependent kinases*). As atividades dessas cinases sobem e descem à medida que a célula avança no ciclo, levando a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular. O aumento da atividade das Cdks no ponto de verificação G_2/M, por exemplo, aumenta a fosforilação de proteínas que controlam a condensação dos cromossomos, a desintegração do envelope nuclear, a montagem do fuso e outros eventos que ocorrem no início da mitose.

As mudanças cíclicas na atividade das Cdks são controladas por um complexo arranjo de enzimas e outras proteínas que regulam essas cinases. O mais importante desses reguladores das Cdks são proteínas conhecidas como **ciclinas**. As Cdks, como implica o nome, são dependentes de ciclinas para sua atividade: a menos que estejam fortemente ligadas a uma ciclina, elas não têm atividade de cinase (**Figura 17-15**). As ciclinas foram originalmente assim denominadas porque sofrem um ciclo de síntese e degradação a cada ciclo celular. Por outro lado, os níveis das proteínas Cdk são constantes, ao menos nos ciclos celulares mais simples. As mudanças cíclicas nos níveis proteicos de ciclinas resultam na montagem e na ativação cíclica dos **complexos de ciclina-Cdk**; por sua vez, essa ativação desencadeia eventos do ciclo celular.

Existem quatro classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular no qual se ligam às Cdks e em que funcionam. Todas as células eucarióticas necessitam de três dessas classes (**Figura 17-16**):

1. As **G_1/S-ciclinas** ativam Cdks no final de G_1 e, com isso, ajudam a desencadear a progressão ao Início, resultando no comprometimento à entrada no ciclo celular. Seus níveis caem na fase S.
2. As **S-ciclinas** se ligam a Cdks logo após a progressão ao Início e ajudam a estimular a duplicação dos cromossomos. Os níveis das S-ciclinas permanecem elevados até a mitose, e essas ciclinas também contribuem ao controle de alguns eventos mitóticos iniciais.
3. As **M-ciclinas** ativam Cdks que estimulam a entrada na mitose no ponto de verificação G_2/M. Mecanismos que discutiremos posteriormente destroem as M-ciclinas no meio da mitose.

Na maioria das células, uma quarta classe de ciclinas, as **G_1-ciclinas**, ajuda a regular as atividades das G_1/S-ciclinas, as quais controlam, no final de G_1, a progressão ao Início.

Em células de leveduras, uma única proteína Cdk se liga a todas as classes de ciclinas e desencadeia diferentes eventos do ciclo celular, mudando de ciclina associada em diferentes estágios do ciclo. Por outro lado, em células de vertebrados, existem quatro Cdks. Duas interagem com G_1-ciclinas, uma com G_1/S-ciclinas e S-ciclinas, e uma com M-ciclinas. Neste capítulo, nos referiremos simplesmente aos diferentes complexos de ciclina-Cdk como **G_1-Cdk**, **G_1/S-Cdk**, **S-Cdk** e **M-Cdk**. Na **Tabela 17-1** estão listados os nomes das Cdks e ciclinas individuais.

Como diferentes complexos de ciclina-Cdk desencadeiam diferentes eventos do ciclo celular? A resposta, ao menos em parte, parece ser que a proteína ciclina não somente ativa

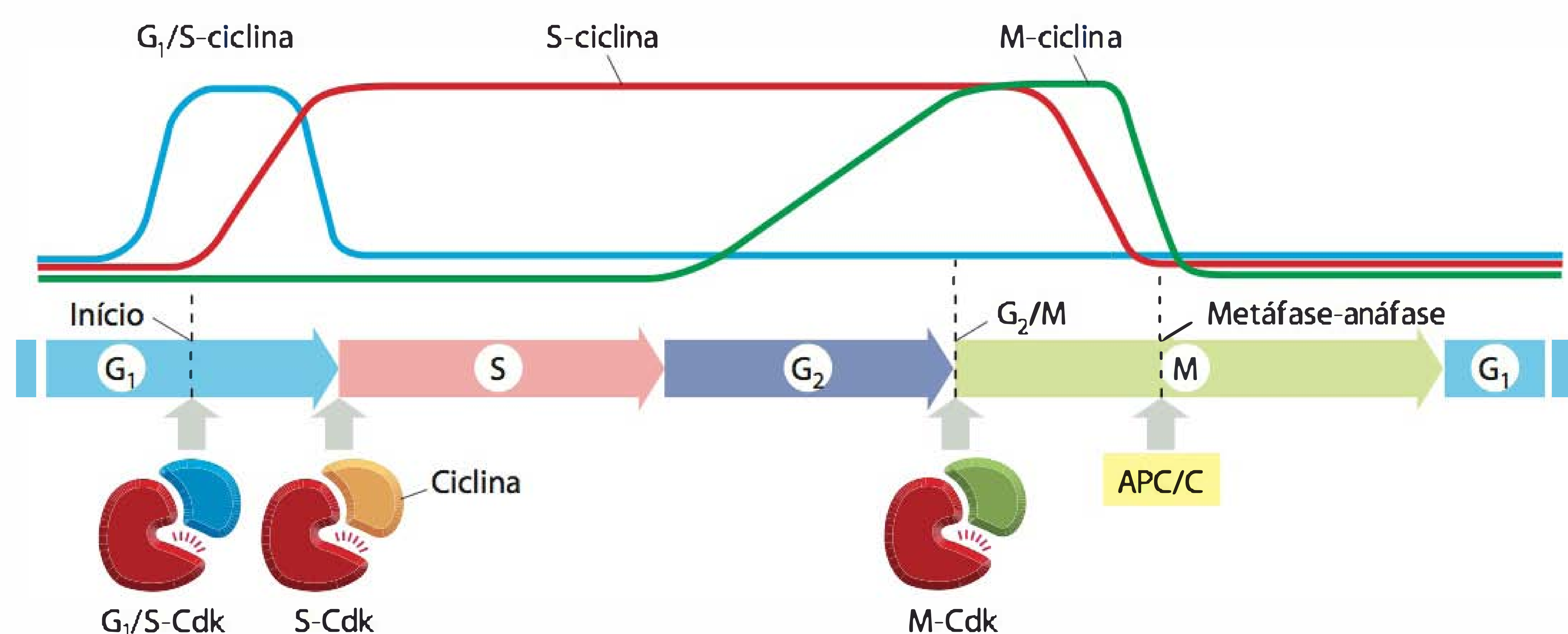


Figura 17-16 Complexos de ciclina-Cdk do sistema de controle do ciclo celular. As concentrações dos três principais tipos de ciclinas oscilam durante o ciclo celular, enquanto as concentrações das Cdks (não-mostrado) não mudam e superam as quantidades de ciclinas. No final de G_1, o aumento dos níveis de G_1/S-ciclinas leva à formação de complexos G_1/S-Cdk, os quais desencadeiam a progressão ao ponto de verificação do Início. Os complexos S-Cdk se formam no início da fase S e desencadeiam a replicação do DNA, assim como alguns eventos mitóticos iniciais. Os complexos M-Cdk se formam durante a fase G_2, mas são mantidos em um estado inativo que descreveremos posteriormente. Esses complexos são ativos no final de G_2 e desencadeiam os eventos iniciais da mitose. Uma outra proteína reguladora, o APC/C, que discutiremos posteriormente, inicia a transição entre metáfase e anáfase.

Tabela 17-1 As principais ciclinas e Cdks de vertebrados e da levedura de brotamento

COMPLEXO DE CICLINA-CDK	VERTEBRADOS		LEVEDURA DE BROTAMENTO	
	CICLINA	PARCEIRO DE CDK	CICLINA	PARCEIRO DE CDK
G_1-Cdk	ciclina D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G_1/S-Cdk	ciclina E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	ciclina A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	ciclina B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

*Existem três ciclinas D em mamíferos (ciclinas D1, D2 e D3).

**O nome original da Cdk1 era Cdc2 em vertebrados e na levedura de fissão, e Cdc28 na levedura de brotamento.

sua Cdk parceira, mas também a direciona para proteínas-alvo específicas. Como resultado, cada complexo de ciclina-Cdk fosforila um conjunto diferente de proteínas-substrato. O mesmo complexo de ciclina-Cdk também pode induzir diferentes efeitos em diferentes tempos do ciclo, provavelmente porque a acessibilidade de alguns substratos das Cdks muda durante o ciclo celular. Certas proteínas que funcionam na mitose, por exemplo, podem ser disponibilizadas à fosforilação somente em G_2.

Estudos das estruturas tridimensionais das proteínas Cdk e de ciclinas têm revelado que, na ausência de ciclinas, o sítio ativo da proteína Cdk é parcialmente ocultado por uma placa de proteína, como uma pedra bloqueando a entrada de uma caverna (**Figura 17-17**A). A ligação da ciclina faz com que a placa se afaste do sítio ativo, resultando na ativação parcial da enzima Cdk (Figura 17-17B). A ativação total do complexo de ciclina-Cdk ocorre, então, quando uma outra cinase, a **cinase ativadora de Cdk** (**CAK**, *Cdk-activating kinase*), fosforila um aminoácido próximo à entrada do sítio ativo da Cdk. Isso causa uma pequena mudança conformacional que aumenta ainda mais a atividade da Cdk, permitindo que a cinase fosforile eficientemente suas proteínas-alvo e, desse modo, induza eventos específicos do ciclo celular (Figura 17-17C).

A fosforilação inibidora e as proteínas inibidoras de Cdk (CKIs) podem suprimir a atividade das Cdks

O aumento e a diminuição dos níveis de ciclinas são os determinantes primordiais da atividade das Cdks durante o ciclo celular. Contudo, vários mecanismos adicionais ajustam precisamente a atividade das Cdks em estágios específicos do ciclo.

A fosforilação de um par de aminoácidos no topo do sítio ativo da cinase inibe a atividade de um complexo de ciclina-Cdk. A fosforilação desses sítios por uma cinase conhecida como **Wee1** inibe a atividade das Cdks, enquanto a desfosforilação desses sítios por uma fosfatase conhecida como **Cdc25** aumenta a atividade das Cdks (**Figura 17-18**). Veremos posteriormente que esse mecanismo regulador é particularmente importante no controle da atividade das M-Cdks no início da mitose.

A ligação de **proteínas inibidoras de Cdk** (**CKIs**, *Cdk inhibitor proteins*) também regula os complexos de ciclina-Cdk. A estrutura tridimensional de um complexo de ciclina-Cdk-CKI revela que a ligação de CKI estimula um grande rearranjo na estrutura do sítio ativo

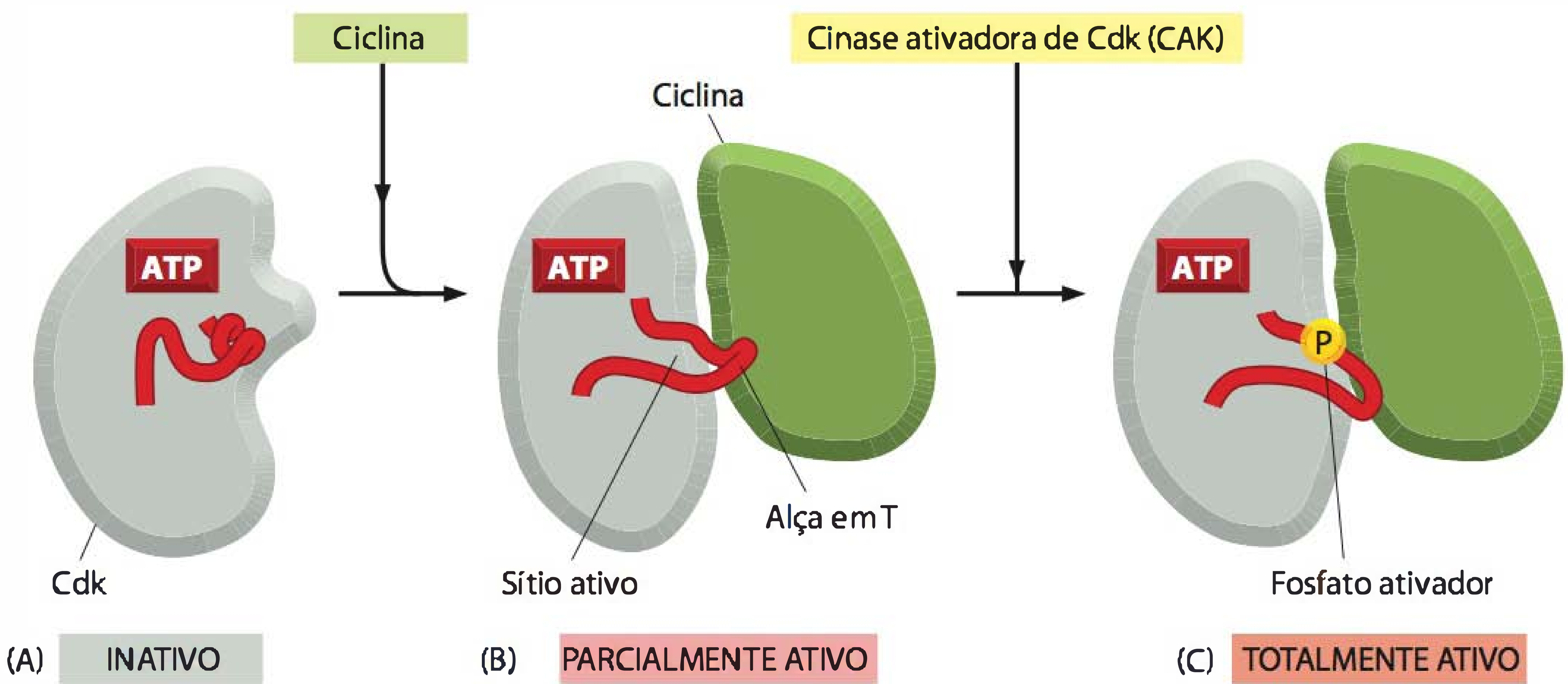


Figura 17-17 Base estrutural da ativação das Cdks. Estes desenhos se baseiam nas estruturas tridimensionais da Cdk2 humana, determinadas por cristalografia por raios X. O local de ligação da molécula de ATP é indicado. A enzima é mostrada em três estados. (A) No estado inativo, sem ciclina ligada, o sítio ativo está bloqueado por uma região da proteína denominada alça em T (*vermelho*). (B) A ligação da ciclina faz com que a alça em T se afaste do sítio ativo, resultando na ativação parcial da Cdk2. (C) A fosforilação da Cdk2 (pela CAK) em um resíduo de treonina na alça em T ativa ainda mais a enzima ao mudar a forma da alça em T, melhorando a capacidade da enzima de se ligar a seus substratos proteicos.

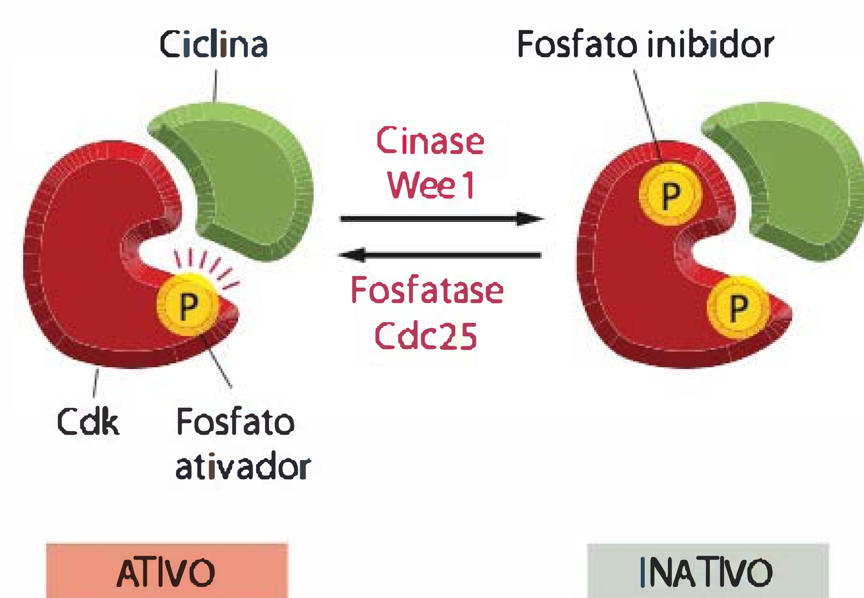


Figura 17-18 Regulação da atividade de Cdk por fosforilação inibidora. O complexo de ciclina-Cdk ativo é desligado quando a cinase Wee1 fosforila dois sítios estreitamente separados acima do sítio ativo. A remoção desses fosfatos pela fosfatase Cdc25 ativa o complexo de ciclina-Cdk. Por questão de simplicidade, somente um fosfato inibidor é mostrado. A CAK adiciona o fosfato ativador, como mostrado na Figura 17-17.

da Cdk1, tornando-o inativo (**Figura 17-19**). As células usam as CKIs primordialmente para auxiliá-las na regulação das atividades de G_1/S-Cdks e S-Cdks no início do ciclo celular.

O sistema de controle do ciclo celular depende de proteólise cíclica

Enquanto a ativação de complexos específicos de ciclina-Cdk impulsiona a progressão aos pontos de verificação do Início e de G_2/M (ver Figura 17-16), a progressão à transição entre metáfase e anáfase é desencadeada não pela fosforilação de proteínas, mas pela destruição de proteínas, levando aos estágios finais da divisão celular.

O principal regulador da transição entre metáfase e anáfase é o **complexo promotor da anáfase**, ou **ciclossomo** (**APC/C**), um membro da família enzimática das ligases de ubiquitina. Como discutido no Capítulo 3, muitas dessas enzimas são usadas em numerosos processos celulares para estimular a destruição proteolítica de proteínas reguladoras específicas. Elas transferem múltiplas cópias da pequena proteína ubiquitina para proteínas-alvo específicas, resultando em sua destruição proteolítica pelos proteossomos. Outras ligases de ubiquitina marcam proteínas para outros propósitos que não a destruição.

O APC/C catalisa a ubiquitinação e a destruição de duas proteínas principais. A primeira é a *securina*, que normalmente protege as ligações proteicas que mantêm os pares de cromátides-irmãs unidos no início da mitose. A destruição da securina na transição entre metáfase e anáfase ativa uma protease que separa as irmãs e desencadeia a anáfase. As S-ciclinas e as M-ciclinas são os segundos principais alvos do APC/C. A destruição dessas ciclinas inativa a maioria das Cdks da célula (ver Figura 17-16). O resultado é que muitas proteínas fosforiladas por Cdks da fase S ao início da mitose são desfosforiladas por várias fosfatases presentes na célula em anáfase. Essa desfosforilação de alvos das Cdks é necessária para a conclusão da fase M, incluindo as etapas finais da mitose e o processo de citocinese. Em seguida a sua ativação no meio da mitose, o APC/C permanece ativo em G_1, propiciando assim um período estável de inatividade das Cdks. Quando as G_1/S-Cdks são ativadas no final de G_1, o APC/C é desligado, permitindo com isso o acúmulo de ciclinas para o início do próximo ciclo celular.

O sistema de controle do ciclo celular também usa outra ligase de ubiquitina chamada de **SCF** (com referência aos nomes de suas três subunidades). Esta ubiquitina certas proteínas CKIs no final de G_1, ajudando assim a controlar a ativação das S-Cdks e da replicação do DNA.

Tanto o APC/C como a **SCF** são grandes complexos de multissubunidades que possuem componentes em comum, mas que são diferencialmente regulados. A atividade do APC/C se modifica durante o ciclo celular, primordialmente como resultado de mudanças em sua associação com uma subunidade de ativação – **Cdc20** durante a anáfase ou **Cdh1** do final da mitose até o início de G_1. Tais subunidades ajudam o APC/C a reconhecer suas proteínas-alvo (**Figura 17-20**A). A atividade da SCF também depende de subunidades chamadas de proteínas F-box, que ajudam o complexo a reconhecer suas proteínas-alvo. Contudo, diferentemente da atividade do APC/C, a atividade da SCF é constante durante o ciclo celular. Em vez disso, a ubiquitinação pela SCF é controlada por mudanças no estado de fosforilação de suas proteínas-alvo, uma vez que as subunidades de F-box reconhecem somente proteínas especificamente fosforiladas (Figura 17-20B).

O controle do ciclo celular também depende de regulação transcricional

No ciclo celular embrionário de rã anteriormente discutido, não ocorre transcrição gênica. O controle do ciclo celular depende exclusivamente de mecanismos pós-transcricio-

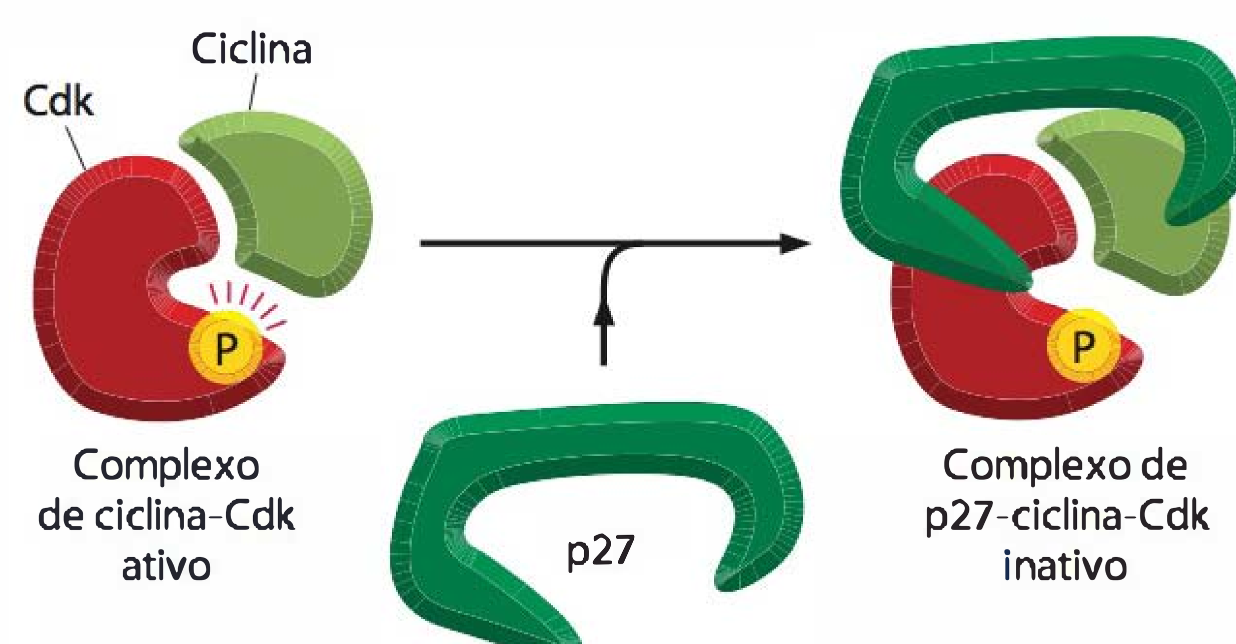
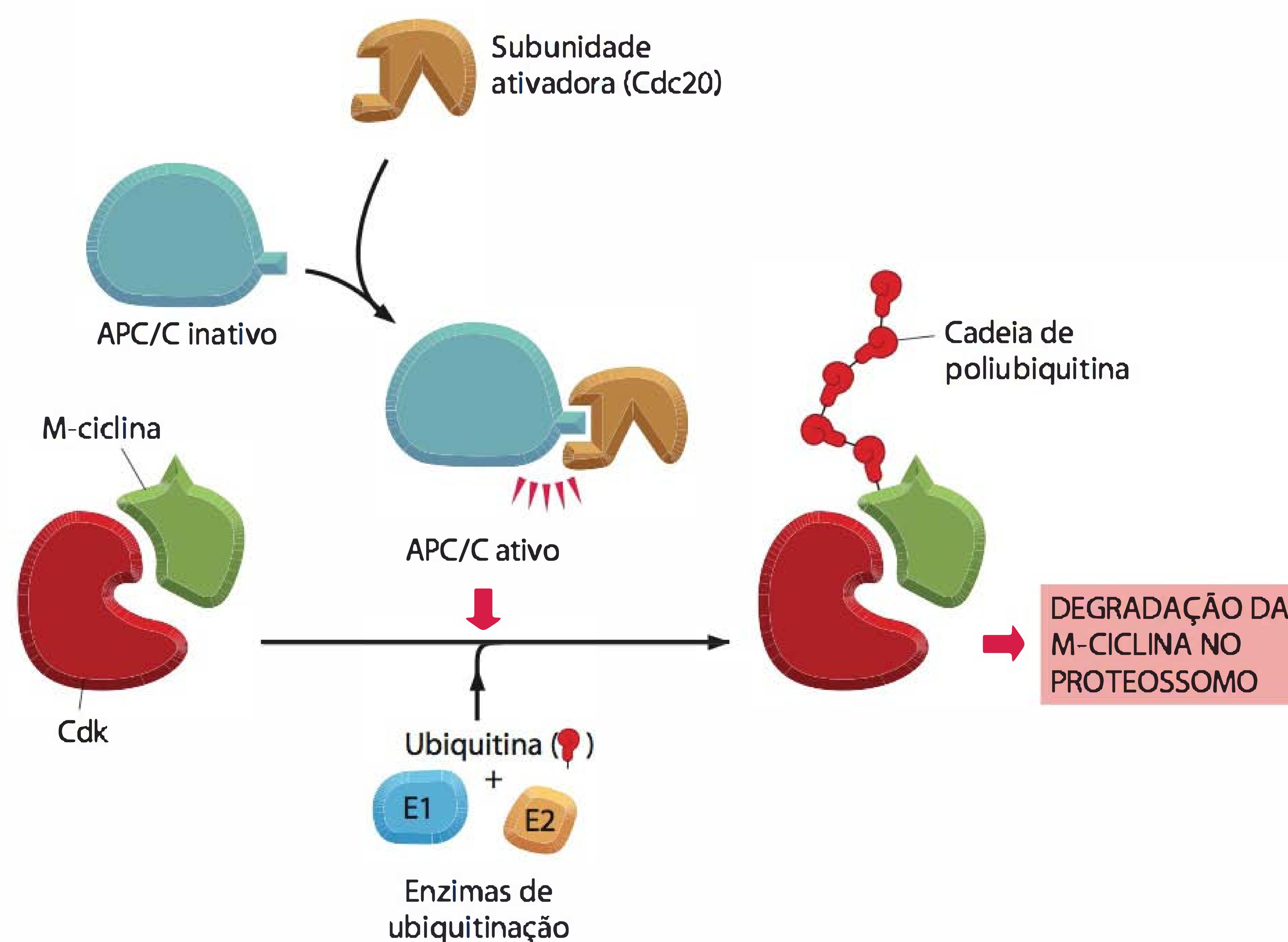


Figura 17-19 Inibição de um complexo de ciclina-Cdk por uma CKI. Este desenho tem como base a estrutura tridimensional do complexo da ciclina A-Cdk2 humana ligado à CKI p27, determinada por cristalografia por raios X. A p27 se liga tanto à ciclina como à Cdk no complexo, deformando o sítio ativo da Cdk. Ela também se insere no sítio de ligação a ATP, inibindo ainda mais a atividade da enzima.



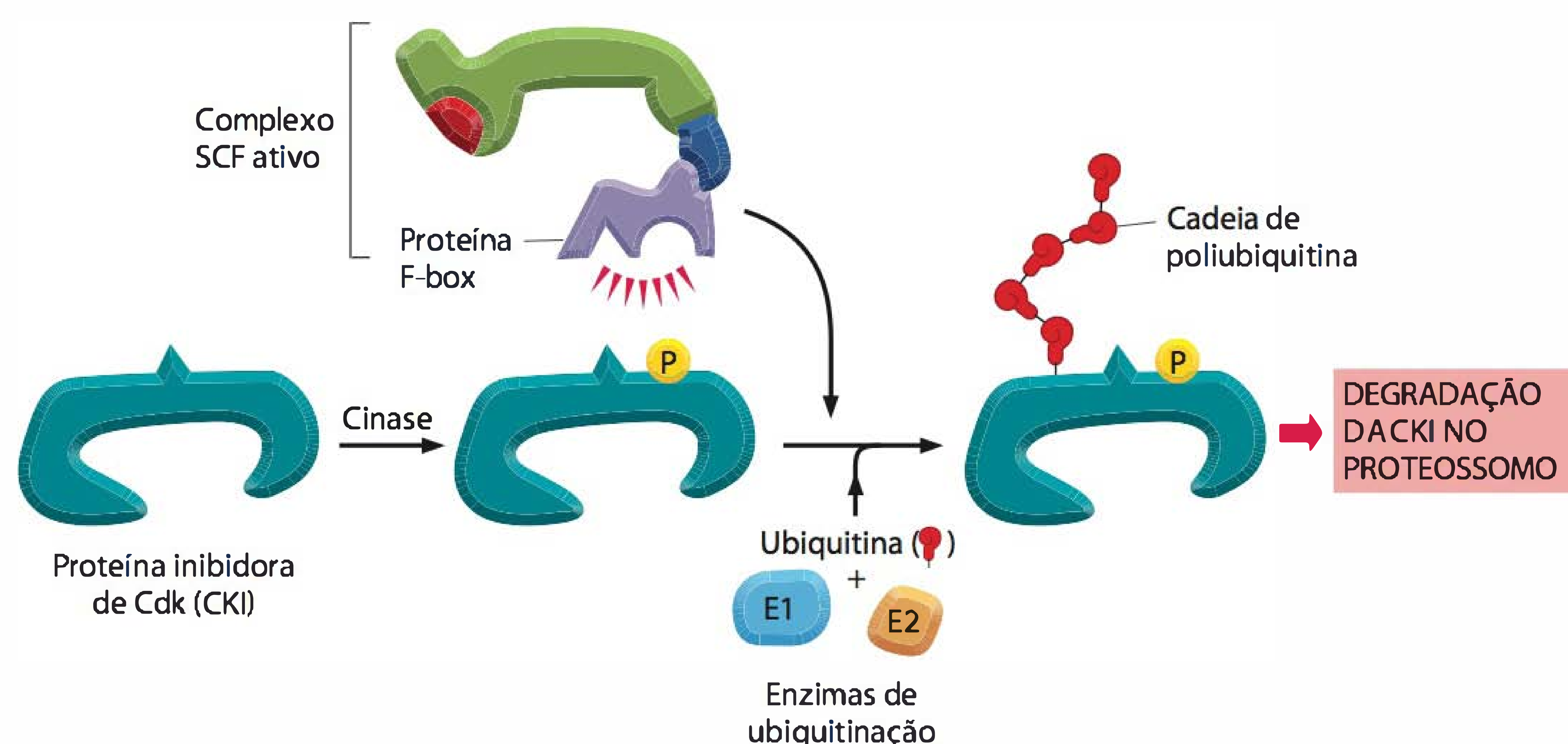


Figura 17-20 O controle da proteólise pelo APC/C e pela SCF durante o ciclo celular. (A) O APC/C é ativado na mitose por associação à subunidade ativadora Cdc20, que reconhece sequências específicas de aminoácidos na M-ciclina e em outras proteínas-alvo. Com o auxílio de duas proteínas adicionais, denominadas E1 e E2, o APC/C transfere múltiplas moléculas de ubiquitina à proteína-alvo. O alvo poliubiquitinado é então reconhecido e degradado em um proteossomo. (B) A atividade da ligase de ubiquitina SCF depende de subunidades de ligação ao substrato denominadas proteínas F-box, das quais existem muitos tipos diferentes. A fosforilação de uma proteína-alvo, como a CKI mostrada, permite que o alvo seja reconhecido por uma subunidade específica de F-box.

nais que envolvem a regulação de Cdks e ligases de ubiquitina e de suas proteínas-alvo. Contudo, nos ciclos celulares mais complexos da maioria dos tipos celulares, o controle transcricional proporciona um nível adicional de regulação. Mudanças na transcrição dos genes de ciclinas, por exemplo, auxiliam o controle dos níveis de ciclinas na maioria das células.

Podemos usar microarranjos de DNA (discutido no Capítulo 8) para analisar mudanças na expressão de todos os genes do genoma à medida que a célula avança no ciclo celular. Os resultados desses estudos são surpreendentes. Na levedura de brotamento, por exemplo, cerca de 10% dos genes codificam mRNAs cujos níveis oscilam durante o ciclo celular. Alguns desses genes codificam proteínas de função conhecida no ciclo celular, mas as funções de muitas outras são desconhecidas.

O sistema de controle do ciclo celular funciona como uma rede de interruptores bioquímicos

A **Tabela 17-2** resume alguns dos principais componentes do sistema de controle do ciclo celular. Essas proteínas estão funcionalmente ligadas umas às outras, formando uma rede robusta, que opera de forma essencialmente autônoma e ativa uma série de interruptores bioquímicos, cada um dos quais desencadeia um evento específico do ciclo celular.

Tabela 17-2 Resumo das principais proteínas reguladoras do ciclo celular

NOMEGERAL	FUNÇÕES E COMENTÁRIOS
Cinases e fosfatases que modificam Cdks	
Cinase ativadora de Cdk (CAK)	Fosforila um sítio ativador nas Cdks
CinaseWee1	Fosforila sítios inibidores nas Cdks; primariamente envolvida na supressão da atividade de Cdk1 antes da mitose
Fosfatase Cdc25	Remove fosfatos inibidores das Cdks; três membros da família (Cdc25A, B, C) em mamíferos; primariamente envolvida no controle da ativação de Cdk1 no início da mitose
Proteínas inibidoras de Cdk (CKIs)	
Sic1 (levedura de brotamento)	Suprime a atividade de Cdk1 em G_1; a fosforilação por Cdk1 no final de G_1 aciona sua destruição
p27 (mamíferos)	Suprime as atividades de G_1/S-Cdk e S-Cdk em G_1; auxilia a saída das células do ciclo celular quando se diferenciam terminalmente; a fosforilação por Cdk2 aciona sua ubiquitinação por SCF
p21 (mamíferos)	Suprime as atividades de G_1/S-Cdk e S-Cdk após danos ao DNA
p16 (mamíferos)	Suprime a atividade de G_1-Cdk em G_1; frequentemente inativada no câncer
Ligases de ubiquitina e seus ativadores	
APC/C	Catalisa a ubiquitinação de proteínas reguladoras primariamente envolvidas na saída da mitose, inclusive securina, S-ciclinas e M-ciclinas; regulada por associação com subunidades ativadoras
Cdc20	Subunidade ativadora de APC/C em todas as células; aciona a ativação inicial de APC/C na transição entre metáfase e anáfase; estimulada pela atividade de M-Cdk
Cdh1	Subunidade ativadora de APC/C que mantém a atividade de APC/C após a anáfase e ao longo de G_1; inibida pela atividade de Cdk
SCF	Catalisa a ubiquitinação de proteínas reguladoras envolvidas no controle de G_1, inclusive algumas CKIs (Sic1 na levedura de brotamento, p27 em mamíferos); a fosforilação da proteína-alvo normalmente é necessária a essa atividade

Quando as condições para a proliferação celular são adequadas, vários sinais externos e internos estimulam a ativação de G_1-Cdk, que por sua vez estimula a expressão de genes que codificam G_1/S-ciclinas e S-ciclinas. A ativação resultante de G_1/S-Cdk conduz, então, a progressão ao ponto de verificação do Início. Por meio de mecanismos que discutiremos posteriormente, as G_1/S-Cdks desencadeiam uma onda de atividade das S-Cdks, que iniciam a duplicação dos cromossomos na fase S e também contribuem para alguns eventos iniciais da mitose. A ativação das M-Cdks desencadeia, então, a progressão ao ponto de verificação G_2/M e aos eventos do início da mitose, levando ao alinhamento das cromátides-irmãs no equador do fuso mitótico. Finalmente, o APC/C, juntamente com seu ativador Cdc20, provoca a destruição da securina e de ciclinas na transição entre metáfase e anáfase, desencadeando assim a segregação das cromátides-irmãs e a conclusão da mitose (**Figura 17-21**). Quando a mitose está completa, múltiplos mecanismos colaboram na supressão da atividade das Cdks após a mitose, resultando em um período estável de G_1, como discutiremos posteriormente. Agora estamos prontos para discutir esses estágios do ciclo celular em maior detalhe, começando com a fase S.

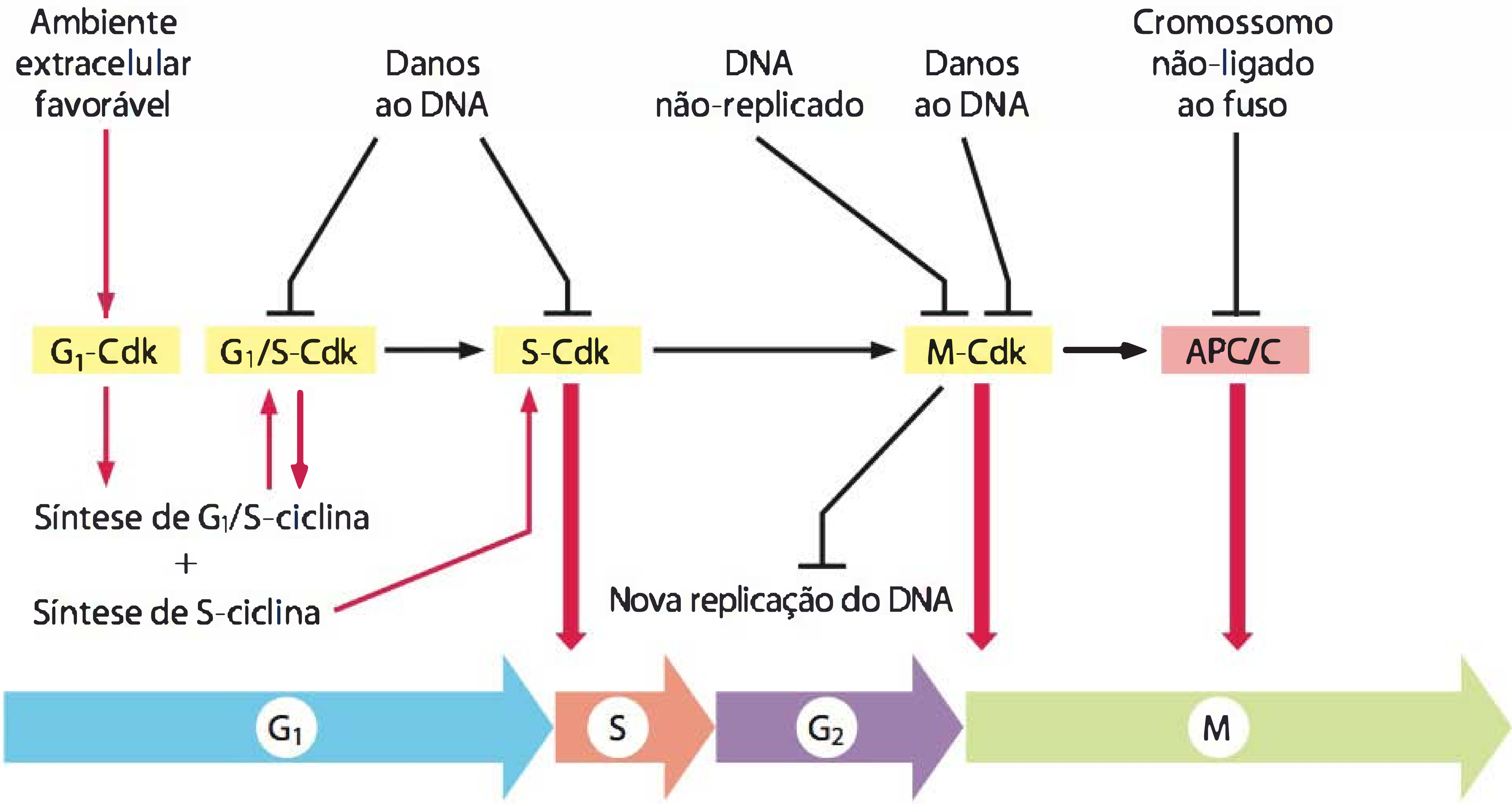


Figura 17-21 Panorama geral do sistema de controle do ciclo celular. O núcleo do sistema de controle do ciclo celular consiste em uma série de complexos de ciclina-Cdk (*amarelo*). Como discutiremos em maior detalhe posteriormente, a atividade de cada complexo também é influenciada por vários mecanismos inibidores, que fornecem informações sobre o ambiente extracelular, danos celulares e eventos incompletos do ciclo celular (*parte superior*). Esses mecanismos não estão presentes em todos os tipos celulares; muitos estão ausentes em ciclos celulares de embriões jovens, por exemplo.

Resumo

O sistema de controle do ciclo celular desencadeia os eventos do ciclo celular e assegura que esses eventos sejam devidamente sincronizados e ocorram na ordem correta. O sistema de controle responde a vários sinais intracelulares e extracelulares e interrompe o ciclo quando a célula falha em completar um processo essencial do ciclo celular ou encontra condições ambientais ou intracelulares desfavoráveis.

Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são cinases dependentes de ciclinas (Cdks), que dependem de subunidades de ciclinas para a sua atividade. Oscilações nas atividades de vários complexos de ciclina-Cdk controlam vários eventos do ciclo celular. Dessa maneira, a ativação de complexos de ciclina-Cdk da fase S (S-Cdk) inicia a fase S, ao passo que a ativação de complexos de ciclina-Cdk da fase M (M-Cdk) desencadeia a mitose. Os mecanismos que controlam as atividades dos complexos de ciclina-Cdk incluem a fosforilação das subunidades das Cdks, a ligação de proteínas inibidoras de Cdk (CKIs), a proteólise de ciclinas e mudanças na transcrição de genes que codificam reguladores das Cdks. O sistema de controle do ciclo celular também depende decisivamente de dois complexos enzimáticos adicionais, o APC/C e as ligases de ubiquitina SCF, que catalisam a ubiquitinação e a consequente destruição de proteínas reguladoras específicas que controlam eventos críticos do ciclo.

FASE S

Os cromossomos lineares das células eucarióticas são estruturas imensas e dinâmicas de DNA e proteína, e sua duplicação é um processo complexo que ocupa uma fração importante do ciclo celular. A longa molécula de DNA de cada cromossomo deve não apenas ser precisamente duplicada – um feito notável por si só – mas o empacotamento das proteínas que cercam cada região daquele DNA também deve ser reproduzido, assegurando que as células-filhas herdem todas as características da estrutura cromossômica.

O evento central da duplicação dos cromossomos é a replicação do DNA. Uma célula deve resolver dois problemas ao iniciar e concluir a replicação do DNA. Primeiro, a replicação deve ocorrer com extrema precisão, a fim de minimizar o risco de mutações na próxima geração de células. Segundo, cada nucleotídeo do genoma deve ser copiado uma vez, e somente uma única vez, a fim de evitar os efeitos danosos da amplificação gênica. No Capítulo 5, discutimos a sofisticada maquinaria proteica que executa a replicação do DNA com incrível velocidade e precisão. Nesta seção, consideraremos os elegantes mecanismos pelos quais o sistema de controle do ciclo celular inicia o processo de replicação e, ao mesmo tempo, impede que ele ocorra mais de uma vez por ciclo.

A S-Cdk inicia a replicação do DNA uma vez por ciclo

A replicação do DNA começa nas *origens de replicação*, que estão espalhadas por numerosos locais em cada cromossomo. Durante a fase S, a *iniciação* da replicação do DNA ocorre nessas origens, quando máquinas proteicas especializadas (às vezes chamadas de *proteínas iniciadoras*) desenrolam a dupla-hélice na origem e enchem os dois moldes de fita simples com enzimas de replicação do DNA. Isso leva à fase de *alongamento* da replicação, quando a maquinaria de replicação se distancia da origem em duas *forquilhas de replicação* (discutido no Capítulo 5).

A fim de garantir que a duplicação dos cromossomos ocorra somente uma vez por ciclo celular, a fase de iniciação da replicação do DNA é dividida em duas etapas distintas, que ocorrem em tempos diferentes do ciclo celular. A primeira etapa ocorre no final da mitose e no início de G_1, quando um grande complexo de proteínas iniciadoras, denominado **complexo pré-replicativo**, ou **pré-RC**, agrupa-se nas origens de replicação. Esta etapa é ocasionalmente chamada de *licenciamento* das origens de replicação, pois a iniciação da síntese de DNA é permitida somente em origens que contêm um pré-RC. A segunda etapa ocorre no início da fase S, quando componentes do pré-RC nucleiam a formação de um complexo proteico maior, denominado **complexo de pré-iniciação**. Esse complexo desenrola a hélice de DNA e transporta DNA-polimerases e outras enzimas de replicação às fitas de DNA, iniciando assim a síntese de DNA, como descrito no Capítulo 5. Uma vez ativada a origem de replicação desta forma, o pré-RC é desmantelado e não pode ser re-

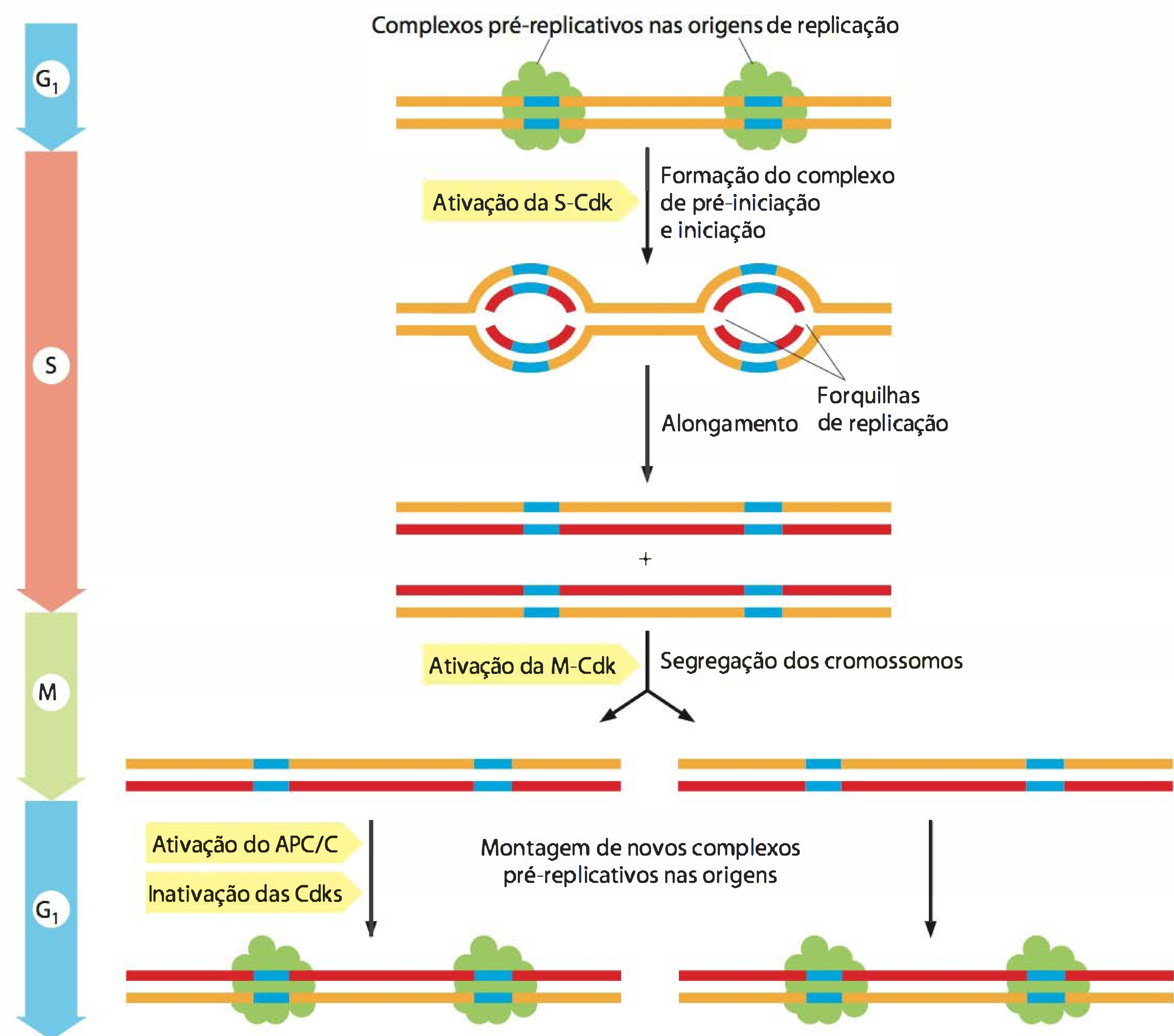


Figura 17-22 Controle da duplicação dos cromossomos. Os preparativos para a replicação do DNA começam em G_1 com a montagem de complexos pré-replicativos (pré-RCs) nas origens de replicação. A ativação da S-Cdk leva à formação de complexos de pré-iniciação multiproteicos que desenrolam o DNA nas origens e começam o processo de replicação do DNA. Duas forquilhas de replicação partem e se afastam de cada origem, até que o cromossomo inteiro seja duplicado. Os cromossomos duplicados são, então, segregados na fase M. A ativação das origens de replicação na fase S também ocasiona a desmontagem do complexo pré-replicativo, que não se forma novamente na origem até a próxima G_1 – assegurando, com isso, que cada origem seja ativada somente uma vez a cada ciclo celular.

montado naquela origem até a próxima G_1. O resultado é que as origens podem ser ativadas somente uma vez por ciclo celular.

O sistema de controle do ciclo celular dirige tanto a montagem do pré-RC como a montagem do complexo de pré-iniciação (**Figura 17-22**). A montagem do pré-RC é inibida pela atividade das Cdks, e, na maioria das células, é estimulada pelo APC/C. Portanto, a montagem do pré-RC ocorre somente no final da mitose e no início de G_1, quando a atividade de Cdk é baixa e a atividade de APC/C é alta. No início da fase S, a ativação da S-Cdk desencadeia a formação de um complexo de pré-iniciação, que inicia a síntese de DNA. Além disso, o pré-RC é parcialmente desmantelado. Como as atividades dos complexos S-Cdk e M-Cdk permanecem altas (e a atividade do APC/C permanece baixa) até o final da mitose, novos pré-RCs não podem ser montados nas origens ativadas até que o ciclo celular esteja completo.

A **Figura 17-23** ilustra algumas das proteínas envolvidas na iniciação da replicação do DNA. Um fator fundamental é um grande complexo multiproteico denominado **complexo de reconhecimento da origem** (**ORC**, *origin recognition complex*), que se liga às origens de replicação no decorrer do ciclo celular. No final da mitose e no início de G_1, as proteínas **Cdc6** e **Cdt1** se ligam ao ORC nas origens e auxiliam o transporte de um grupo de seis proteínas relacionadas denominadas **proteínas Mcm**. O grande complexo resultante é o pré-RC, estando então a origem liberada para a replicação.

As seis proteínas Mcm do pré-RC formam um anel ao redor do DNA que, imagina-se, funciona como a principal DNA-helicase que desenrola o DNA da origem quando a síntese de DNA começa e à medida que as forquilhas de replicação se afastam da origem. Assim, o propósito central do pré-RC é transportar a helicase que desempenhará um papel central no subsequente processo de replicação do DNA.

Uma vez montado o pré-RC em G_1, as origens de replicação estão prontas para serem acionadas. A ativação da S-Cdk no final de G_1 desencadeia a montagem de vários outros complexos proteicos na origem, levando à formação de um gigantesco complexo de pré-iniciação que desenrola a hélice e começa a síntese de DNA.

Ao mesmo tempo em que inicia a replicação do DNA, a S-Cdk desencadeia a desmontagem de alguns componentes do pré-RC na origem. As Cdks fosforilam tanto o ORC como a proteína Cdc6, resultando na inibição destes por vários mecanismos. Além disso, a inativa-

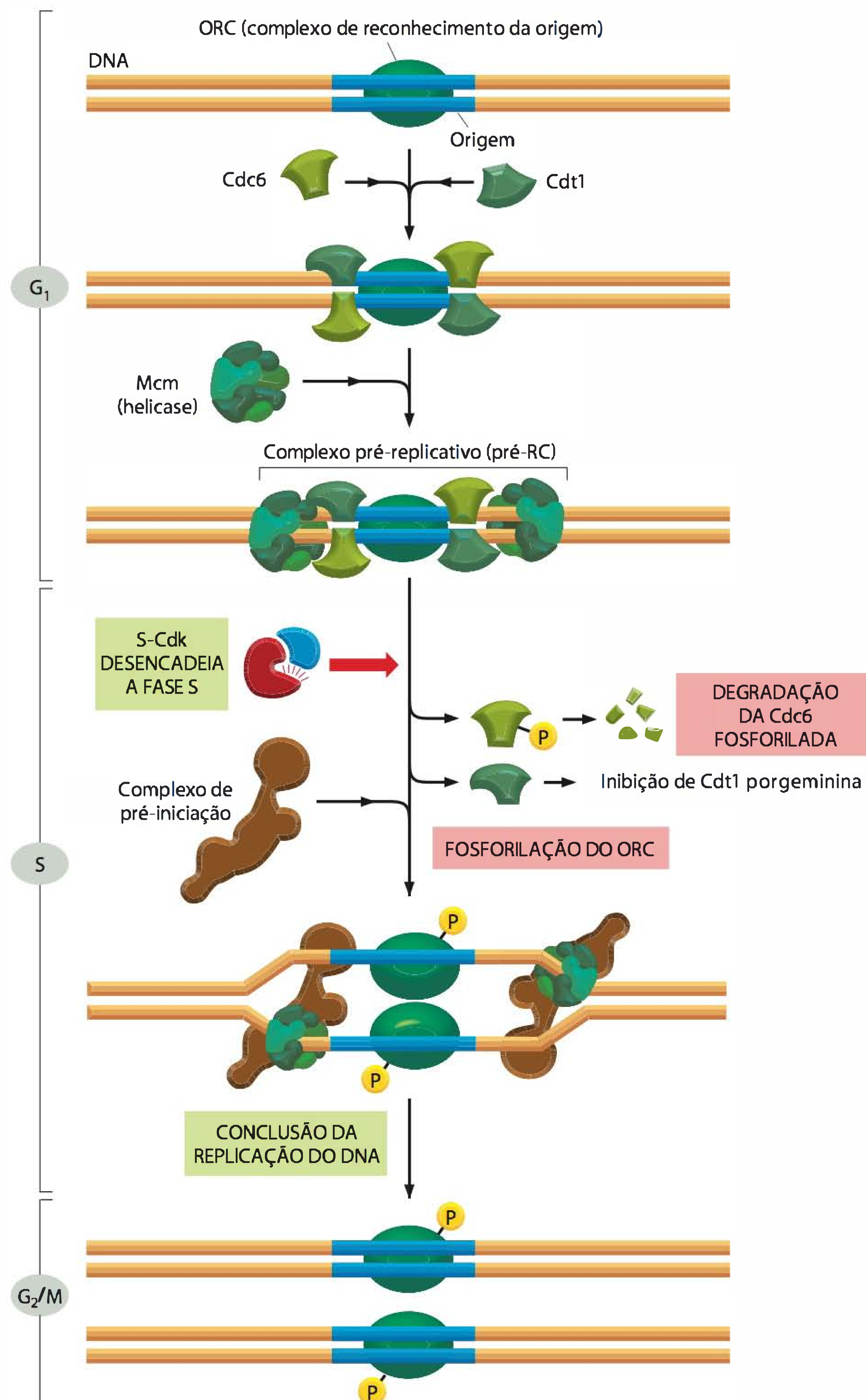


Figura 17-23 Controle da iniciação da replicação do DNA. O ORC permanece associado à origem de replicação ao longo do ciclo celular. No início de G_1, Cdc6 e Cdt1 se associam ao ORC. O complexo proteico resultante monta, então, complexos em forma de anel de Mcm no DNA adjacente, resultando na formação do complexo pré-replicativo (pré-RC). Em seguida, a S-Cdk (com o auxílio de outra cinase, não-mostrada) estimula o agrupamento de várias outras proteínas na origem para formar o complexo de pré-iniciação. A DNA-polimerase e outras proteínas de replicação são recrutadas à origem, os anéis de proteínas Mcm são ativados como DNA-helicases, e o desenrolamento do DNA permite o começo da replicação do DNA. A S-Cdk também bloqueia a re-replicação ao acionar a destruição da Cdc6 e a inativação do ORC. O componente Cdt1 é inativado pela proteína geminina. A geminina é um alvo do APC/C, e portanto seus níveis aumentam nas fases S e M, quando o APC/C está inativo. Assim, os componentes do pré-RC (Cdc6, Cdt1, Mcm) não podem formar um novo pré-RC nas origens até que a M-Cdk seja inativada e que o APC/C seja ativado no final da mitose (ver texto).

ção do APC/C no final de G_1 também ajuda a desligar a montagem do pré-RC. No final da mitose e no início de G_1, o APC/C causa a destruição de uma proteína, a **geminina**, que se liga e inibe um componente do pré-RC chamado de Cdt1. Assim, quando o APC/C é desligado no final de G_1, a geminina se acumula e inibe o Cdt1. De diferentes maneiras, as atividades da S-Cdk e da M-Cdk, combinadas à baixa atividade do APC/C, bloqueiam a formação do pré-RC durante a fase S, e também subsequentemente. Como, então, o sistema de controle do ciclo celular se recompõe, permitindo que a replicação ocorra no próximo ciclo celular? A resposta é simples. No final da mitose, a ativação do APC/C leva à inativação das Cdks e à destruição da geminina. Os componentes do pré-RC são desfosforilados, e o Cdt1 é ativado, permitindo a montagem do pré-RC e a preparação da célula para a próxima fase S.

A duplicação dos cromossomos requer a duplicação da estrutura da cromatina

O DNA dos cromossomos é extensivamente empacotado em uma ampla variedade de componentes proteicos, incluindo histonas e várias proteínas reguladoras envolvidas

no controle da expressão gênica (discutido no Capítulo 4). Assim, a duplicação de um cromossomo não é simplesmente uma questão de duplicar o DNA em sua essência, mas também requer a duplicação dessas proteínas da cromatina e sua montagem adequada no DNA.

A produção de proteínas da cromatina aumenta durante a fase S, a fim de que sejam fornecidas as matérias-primas necessárias para empacotar o DNA recém-sintetizado. Mais do que isso: as S-Cdks estimulam um grande aumento da síntese das quatro subunidades de histonas que formam os octâmeros de histonas no núcleo de cada nucleossomo. Estas subunidades são montadas nos nucleossomos no DNA por fatores de montagem de nucleossomos, que tipicamente se associam à forquilha de replicação e distribuem nucleossomos para ambas as fitas do DNA à medida que emergem da maquinaria de síntese de DNA.

O empacotamento da cromatina ajuda a controlar a expressão gênica. Em algumas partes do cromossomo, a cromatina está altamente condensada, sendo chamada de *heterocromatina*, ao passo que em outras regiões ela tem uma estrutura mais aberta, sendo chamada de *eucromatina*. Essas diferenças na estrutura da cromatina dependem de uma ampla variedade de mecanismos (discutido no Capítulo 4). Visto que essas diferenças são importantes na regulação gênica, é crucial que a estrutura da cromatina, como o DNA dentro dela, seja reproduzida de forma exata durante a fase S. Contudo, ainda não se compreende bem como a estrutura da cromatina é duplicada. Durante a síntese de DNA, enzimas de modificação de histonas e várias proteínas não-histônicas provavelmente sejam depositadas sobre as duas novas fitas de DNA à medida que emergem da forquilha de replicação, e acredita-se que tais proteínas ajudem a reproduzir a estrutura local da cromatina do cromossomo parental.

As coesinas ajudam a manter as cromátides-irmãs unidas

No final da fase S, cada cromossomo replicado consiste em um par de cromátides-irmãs idênticas, coladas uma à outra ao longo de sua extensão. Essa coesão de cromátides-irmãs monta o palco para uma mitose bem-sucedida, pois facilita bastante a ligação das duas cromátides-irmãs, em um único par, a polos opostos do fuso mitótico. Imagine o quanto seria difícil atingir tal ligação bipolar se fosse permitido que as cromátides-irmãs se amontoassem após a fase S. Na verdade, defeitos na coesão de cromátides-irmãs – em mutantes de leveduras, por exemplo – inevitavelmente levam a grandes erros na segregação dos cromossomos.

A coesão de cromátides-irmãs depende de um grande complexo proteico chamado de **coesina**, depositado em muitos locais ao longo da extensão de cada cromátide-irmã à medida que o DNA é replicado durante a fase S. Duas das subunidades da coesina são membros de uma grande família de proteínas denominada *proteínas SMC* (*structural maintanance of chromosomes*, manutenção estrutural de cromossomos). A coesina forma gigantescas estruturas similares a anel, e tem-se proposto que elas poderiam formar anéis que circundam as duas cromátides-irmãs (**Figura 17-24**).

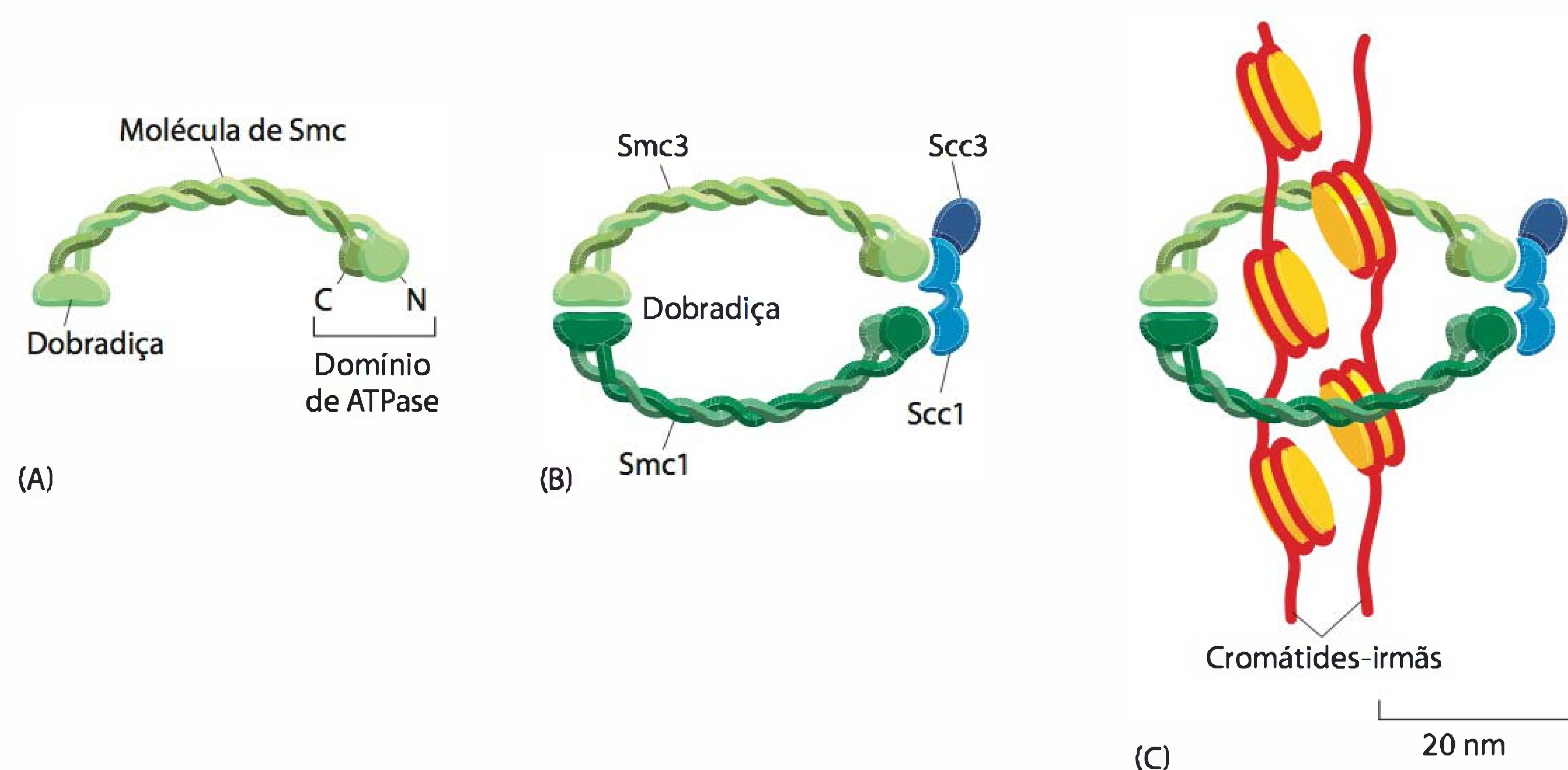


Figura 17-24 Coesina. A coesina é um complexo proteico com quatro subunidades. Duas subunidades, Smc1 e Smc3, são proteínas com estrutura em super-hélice com um domínio de ATPase em uma extremidade; juntas, formam uma grande estrutura em forma de V, como mostrado. Duas subunidades adicionais, Scc1 e Scc3, conectam os domínios da cabeça de ATPase, formando uma estrutura anelada que pode envolver as cromátides-irmãs, como mostrado.

A coesão de cromátides-irmãs também resulta, ao menos em parte, do *encadeamento de DNA*, o entrelaçamento de moléculas de DNA irmãs que ocorre quando duas forquilhas de replicação se encontram durante a síntese de DNA. A enzima topoisomerase II gradativamente desembaraça os DNAs-irmãos concatenados entre a fase S e o início da mitose, cortando uma molécula de DNA, passando a outra através da quebra, e então resselando o DNA cortado (ver Figura 5-23). Uma vez removido o encadeamento, a coesão de cromátides-irmãs depende primariamente dos complexos de coesina. Portanto, a perda da coesão das irmãs, na transição entre metáfase e anáfase, depende primariamente da disrupção destes complexos, como descreveremos posteriormente.

Resumo

A duplicação dos cromossomos na fase S envolve a cópia exata de toda a molécula de DNA em cada cromossomo, assim como a duplicação das proteínas da cromatina que se associam ao DNA e controlam vários aspectos da função dos cromossomos. A duplicação dos cromossomos é desencadeada pela ativação da S-Cdk, que ativa proteínas que desenrolam o DNA e iniciam sua replicação em sítios do DNA chamados de origens de replicação. Uma vez ativada uma origem de replicação durante a fase S, a S-Cdk também inibe proteínas necessárias para que a origem inicie novamente a replicação do DNA. Assim, cada origem de replicação é acionada uma vez e somente uma vez em cada fase S, não podendo ser reutilizada até o próximo ciclo celular.

MITOSE

Em seguida à conclusão da fase S e à transição para G_2, a célula passa por uma dramática agitação na fase M. Isso começa com a mitose, durante a qual as cromátides-irmãs são separadas e distribuídas (*segregadas*) a um par de núcleos-filhos idênticos, cada um com sua própria cópia do genoma. A mitose é tradicionalmente dividida em cinco estágios – *prófase*, *prometáfase*, *metáfase*, *anáfase* e *telófase* – primariamente definidos com base no comportamento dos cromossomos visto no microscópio. Uma vez concluída a mitose, o segundo principal evento da fase M – citocinese – divide a célula em duas metades, cada uma com um núcleo idêntico. O **Painel 17-1** resume os principais eventos da fase M.

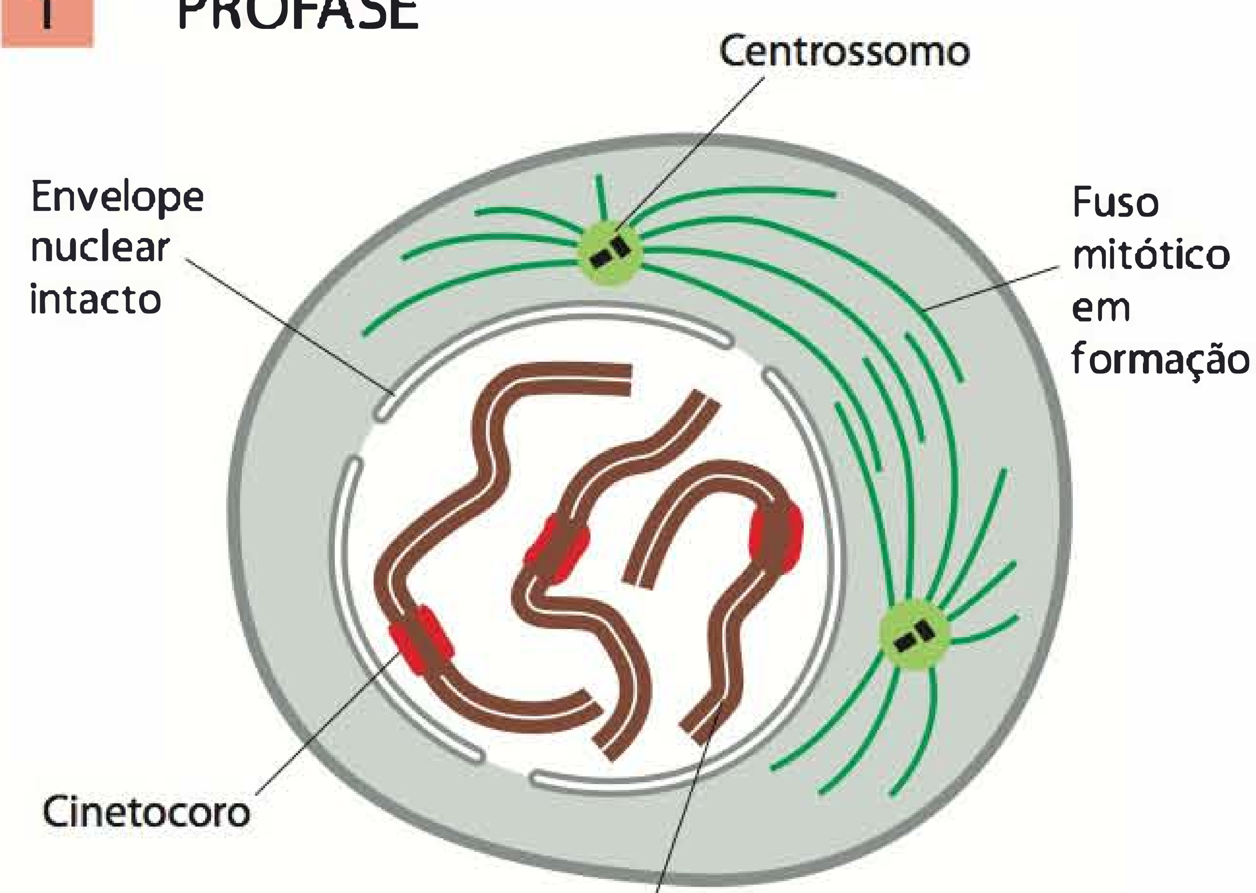
De um ponto de vista de regulação, a mitose pode ser dividida em duas partes principais, cada uma influenciada por componentes distintos do sistema de controle do ciclo celular. Primeiro, um aumento abrupto da atividade da M-Cdk no ponto de verificação G_2/M desencadeia os eventos da mitose inicial ou precoce (prófase, prometáfase e metáfase). Durante esse período, a M-Cdk e várias outras cinases mitóticas fosforilam uma série de proteínas, levando à montagem do fuso mitótico e à ligação deste aos pares de cromátides-irmãs. A segunda parte principal da mitose começa na transição entre metáfase e anáfase, quando o APC/C provoca a destruição da securina, liberando uma protease que cliva a coesina e, com isso, inicia a separação das cromátides-irmãs. O APC/C também desencadeia a destruição de ciclinas, levando à inativação das Cdks e à desfosforilação de alvos das Cdks, o que é necessário a todos os eventos do final da fase M, inclusive a conclusão da anáfase, a desmontagem do fuso mitótico e a divisão da célula por citocinese.

Nesta seção, descreveremos os principais eventos mecânicos da mitose e como a M-Cdk e o APC/C os orquestram.

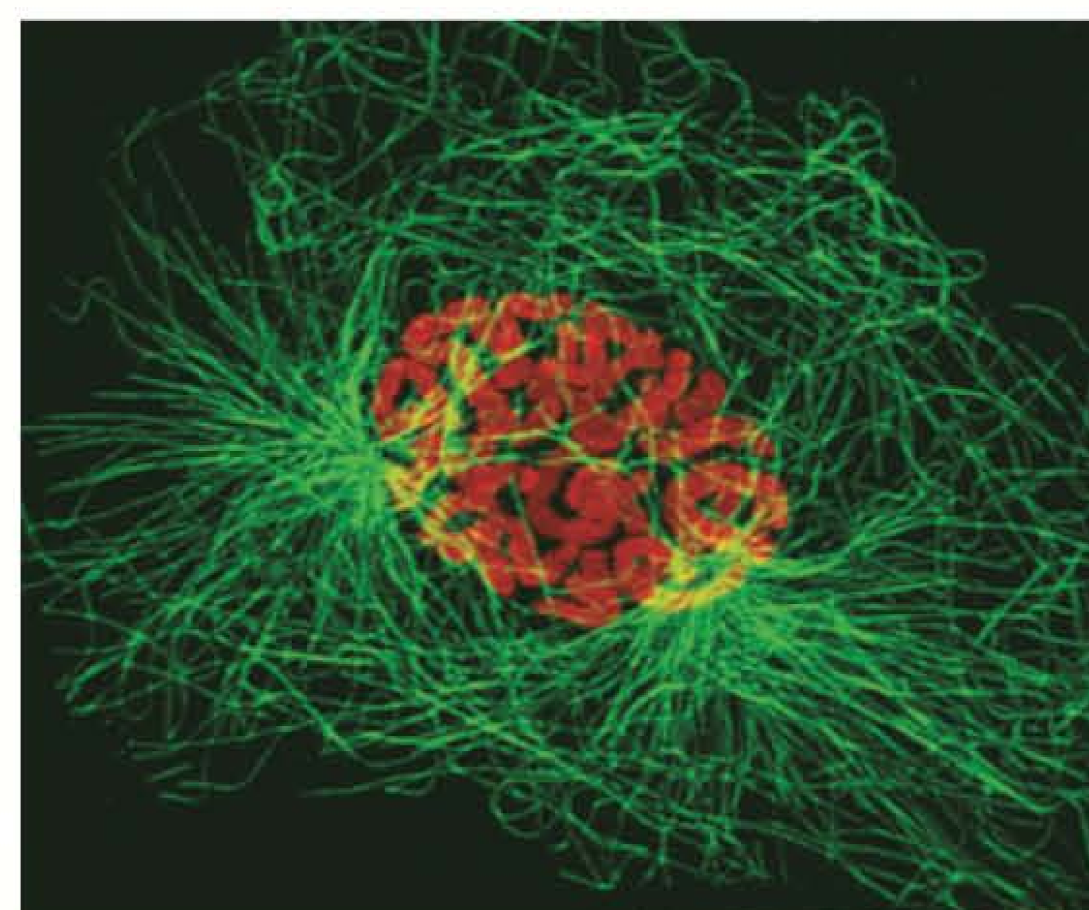
A M-Cdk leva à entrada na mitose

Uma das características mais notáveis do controle do ciclo celular é que uma única proteína-cinase, a M-Cdk, ocasiona todos os diversos e complexos rearranjos celulares que ocorrem nos estágios iniciais da mitose. A M-Cdk deve, no mínimo, induzir a montagem do fuso mitótico e assegurar que cada cromátide-irmã de um par esteja ligada ao polo oposto do fuso. Ela também desencadeia a *condensação dos cromossomos* – a reorganização em grande escala das cromátides-irmãs entrelaçadas em estruturas compactas, similares a um bastão. Em células animais, a M-Cdk também promove a desintegração do envelope nuclear e rearranjos do citoesqueleto de actina e do aparelho de Golgi. Acredita-se que cada um desses processos seja desencadeado quando a M-Cdk fosforila proteínas específicas envolvidas no processo, embora a maioria dessas proteínas ainda não tenha sido identificada.

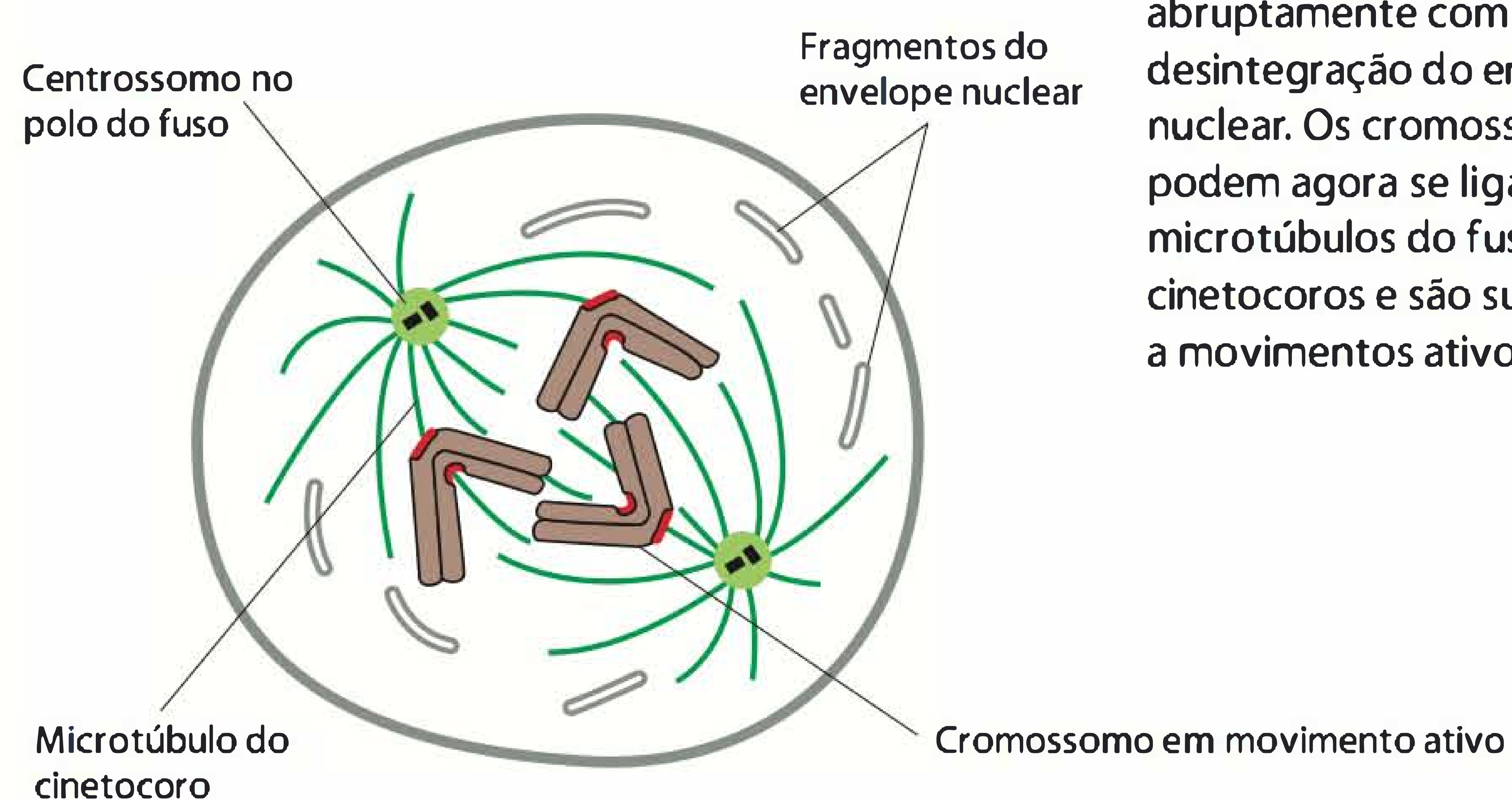
1 PRÓFASE



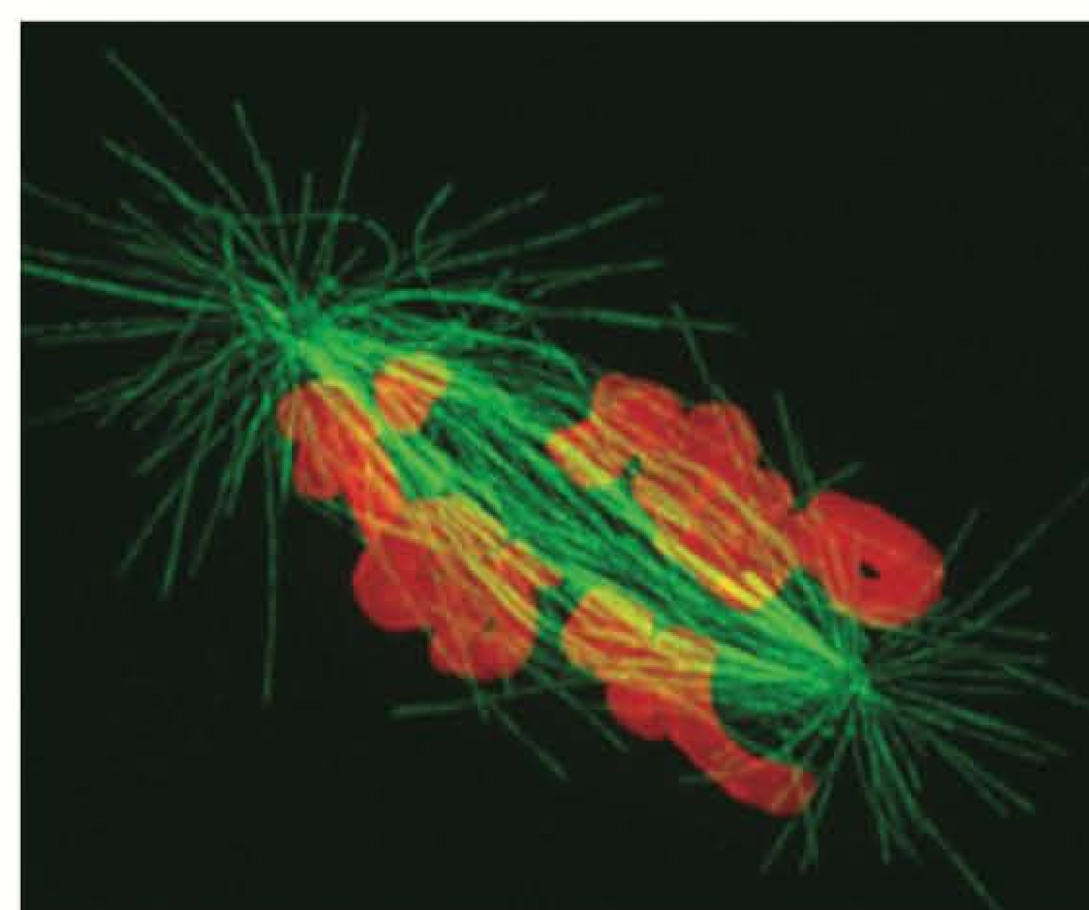
Na prófase, os cromossomos replicados, cada um consistindo em duas cromátides-irmãs intimamente associadas, se condensam. Fora do núcleo, o fuso mitótico se forma entre os dois centrossomos, que se replicaram e se distanciaram. Por questão de simplicidade, somente três cromossomos são mostrados. Em células diploides, duas cópias de cada cromossomo estariam presentes. Na fotomicrografia, os cromossomos estão corados em *laranja*, e os microtúbulos em *verde*.



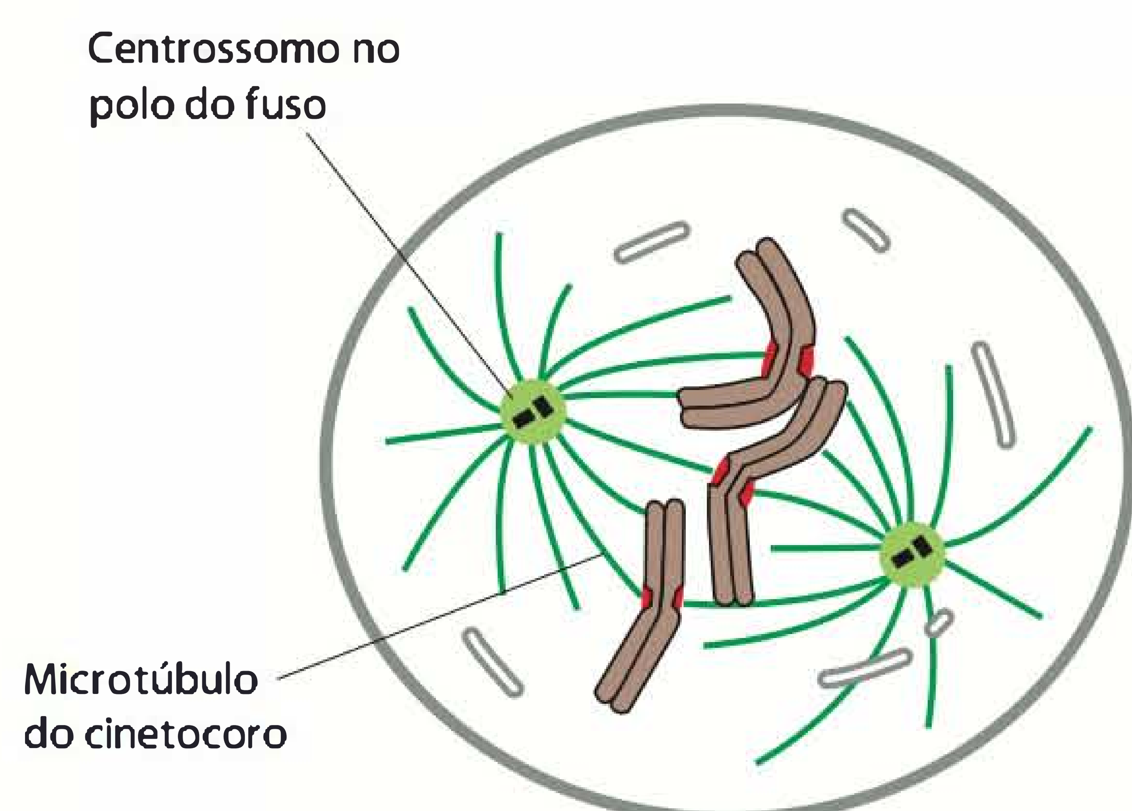
2 PROMETÁFASE



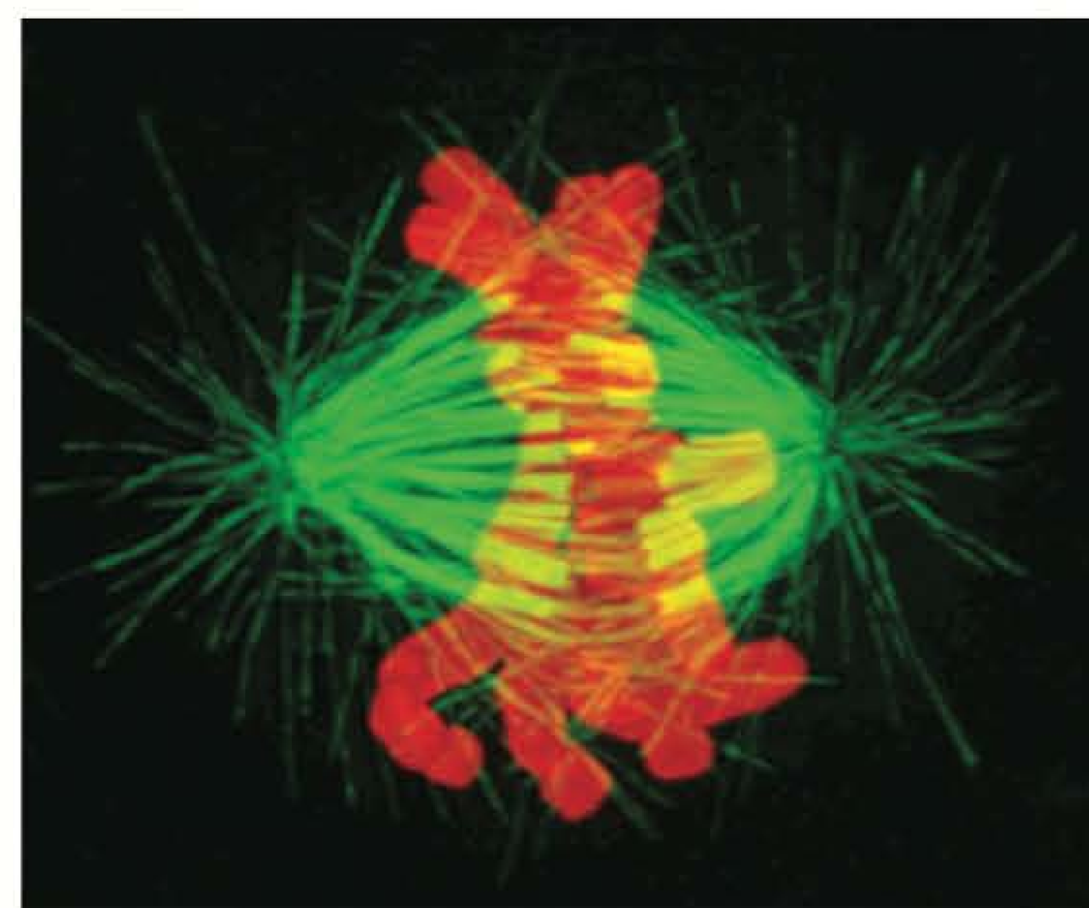
A prometáfase começa abruptamente com a desintegração do envelope nuclear. Os cromossomos podem agora se ligar aos microtúbulos do fuso via seus cinetocoros e são submetidos a movimentos ativos.



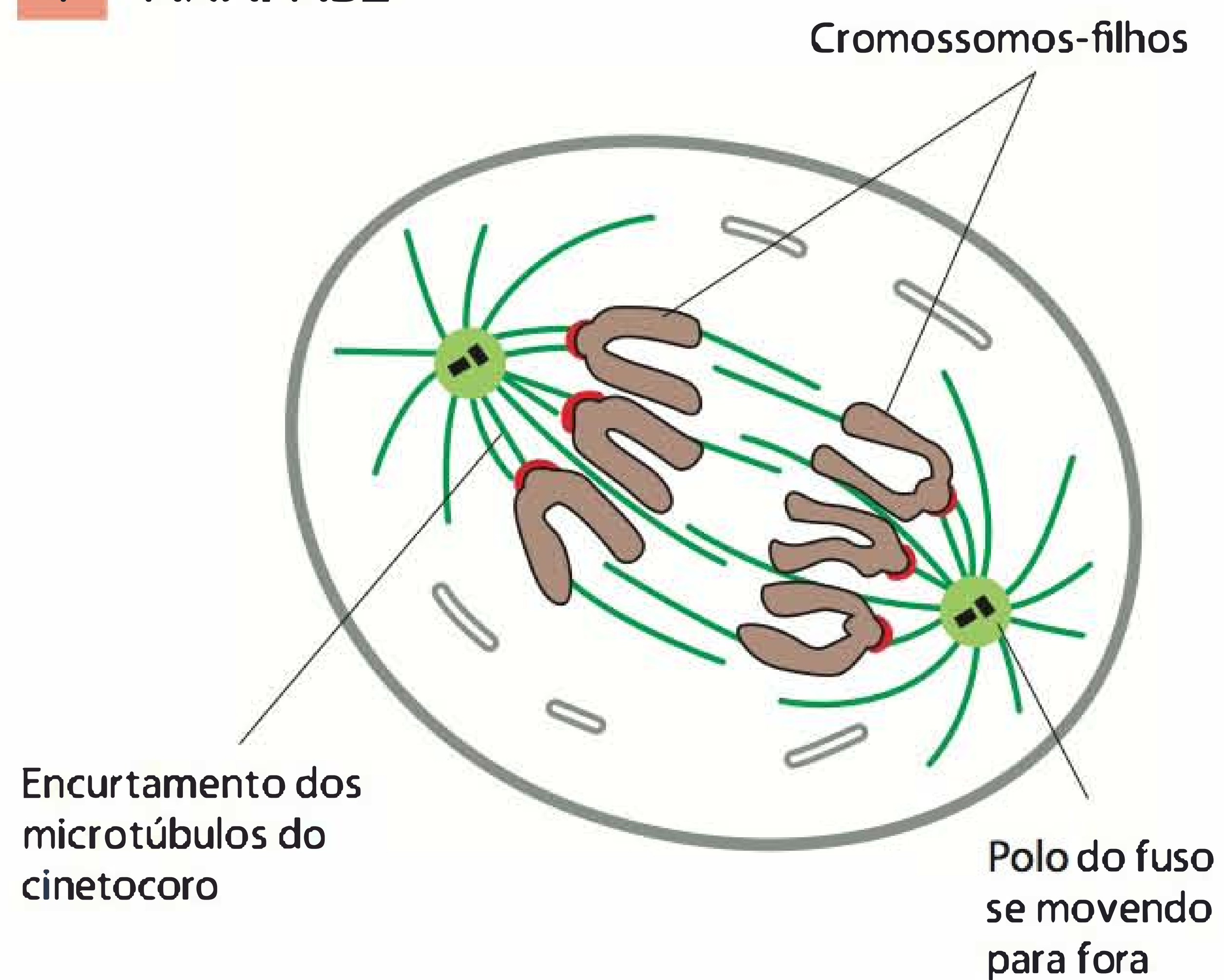
3 METÁFASE



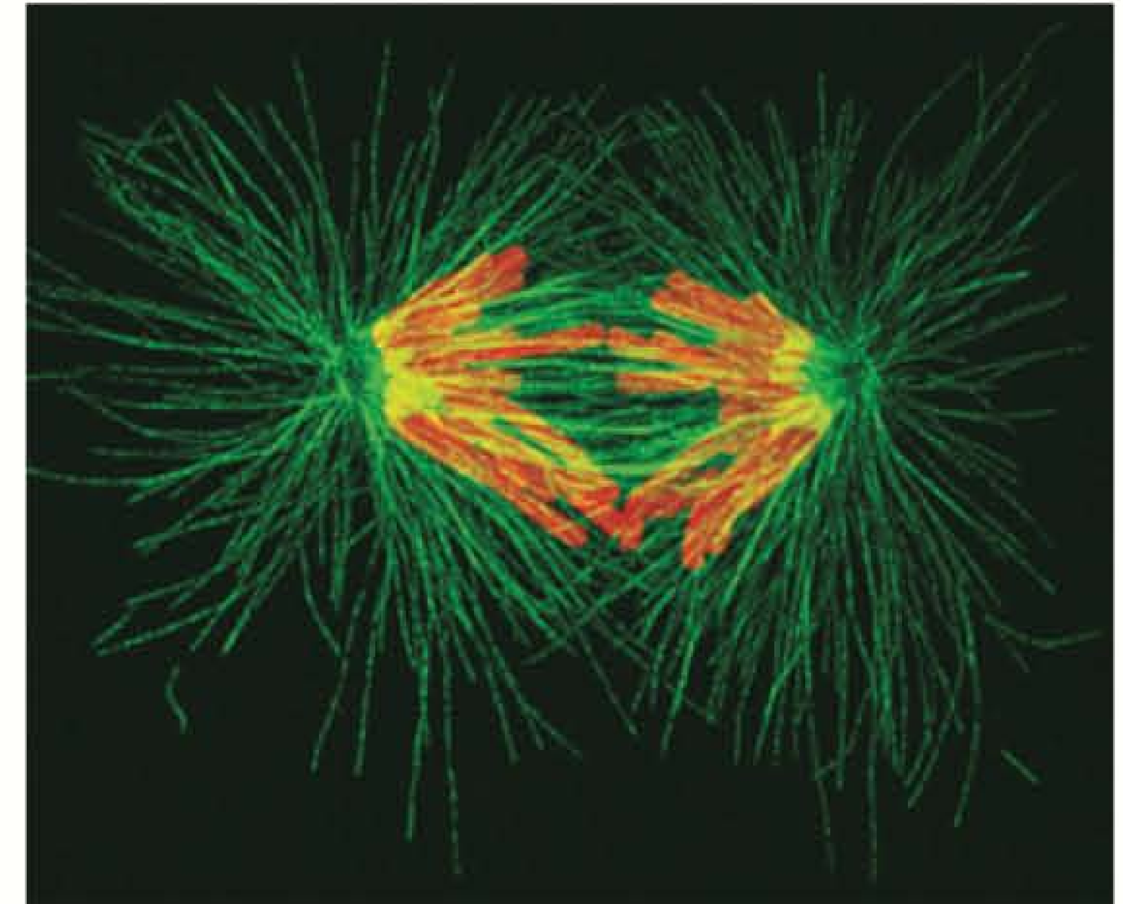
Na metáfase, os cromossomos são alinhados no equador do fuso, a meio caminho entre os polos do fuso. Os microtúbulos do cinetocoro ligam as cromátides-irmãs a polos opostos do fuso.



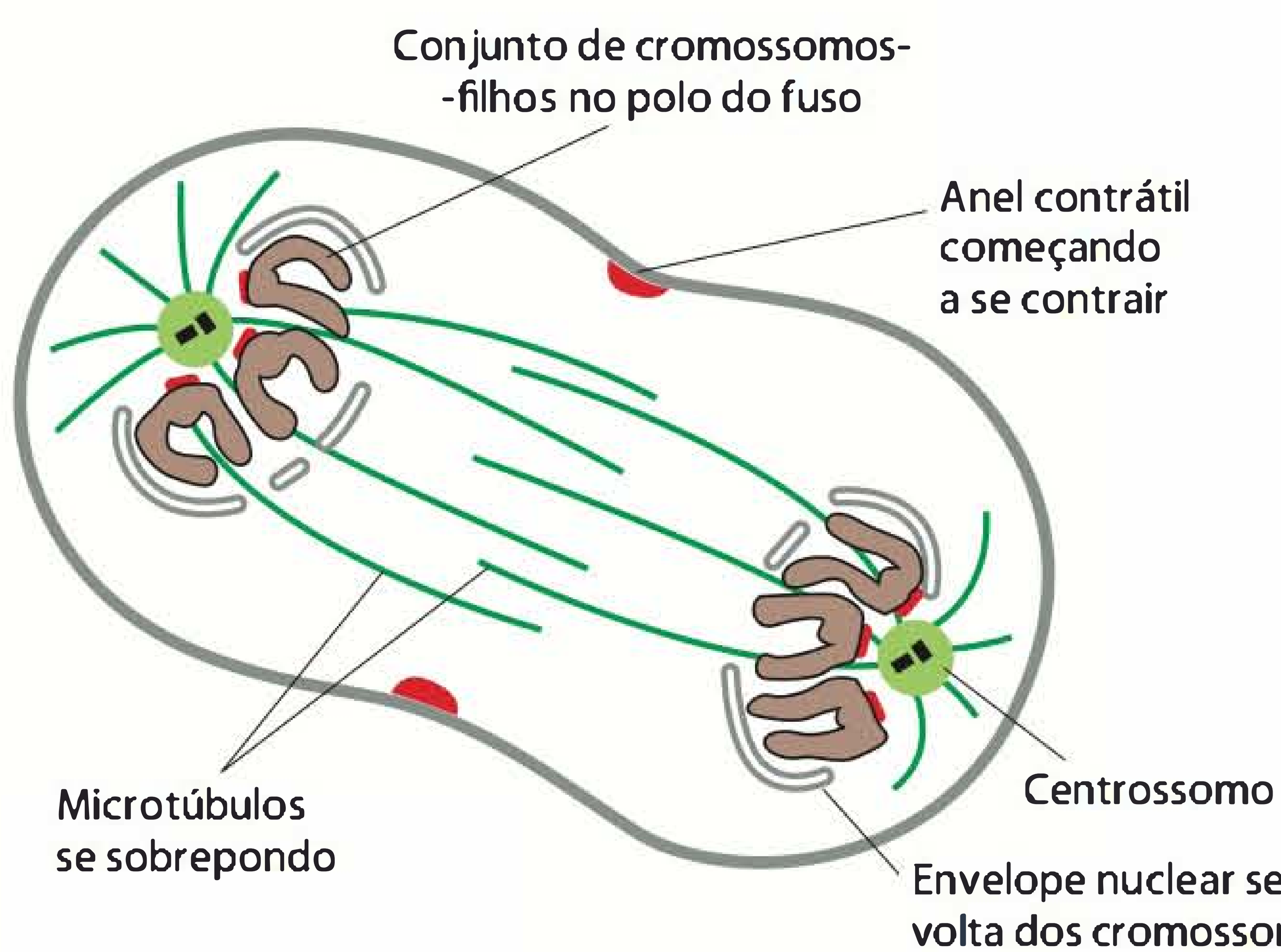
4 ANÁFASE



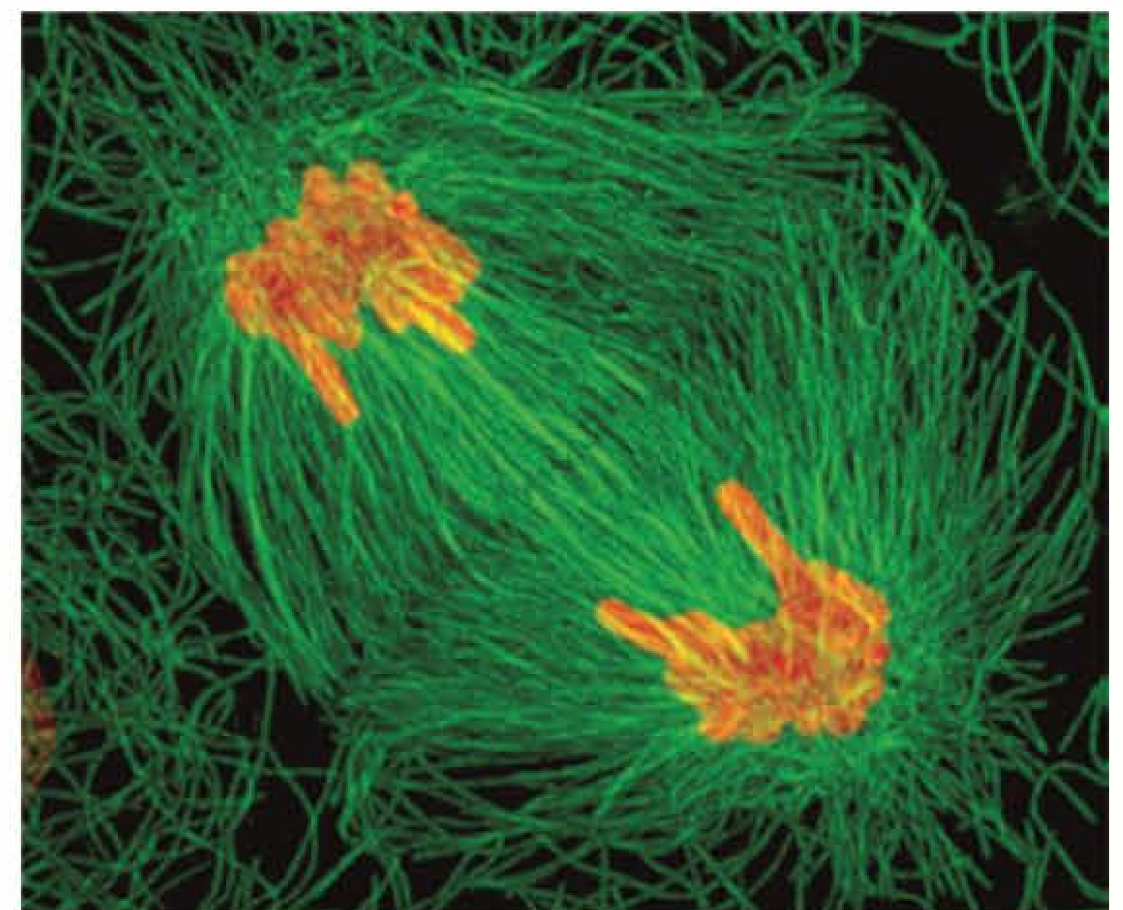
Na anáfase, as cromátides-irmãs se separam sincronicamente e formam dois cromossomos-filhos, sendo cada um deles lentamente puxado em direção ao polo do fuso ao qual está ligado. Os microtúbulos do cinetocoro ficam mais curtos, e os polos do fuso também se distanciam; ambos os processos contribuem à segregação dos cromossomos.



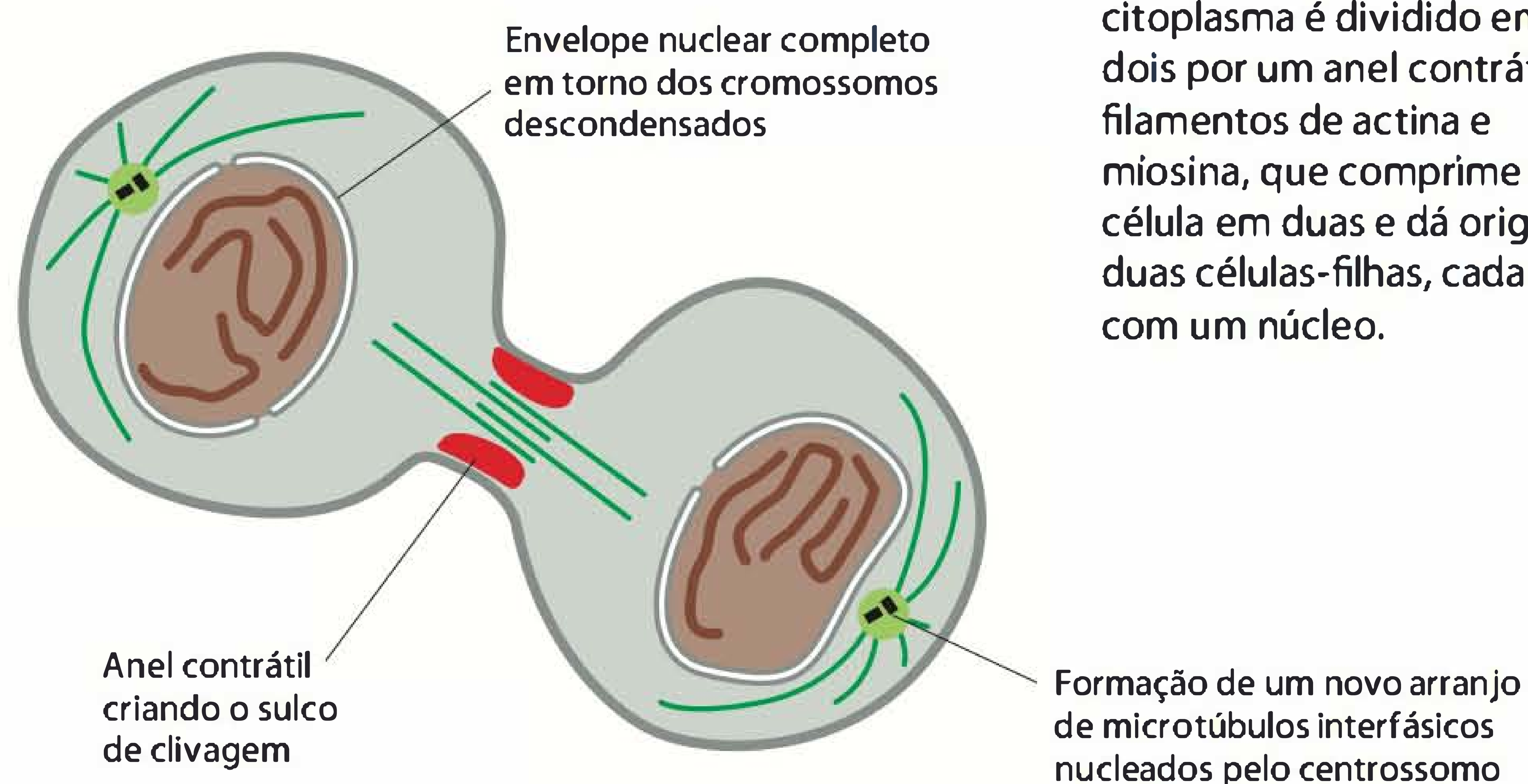
5 TELÓFASE



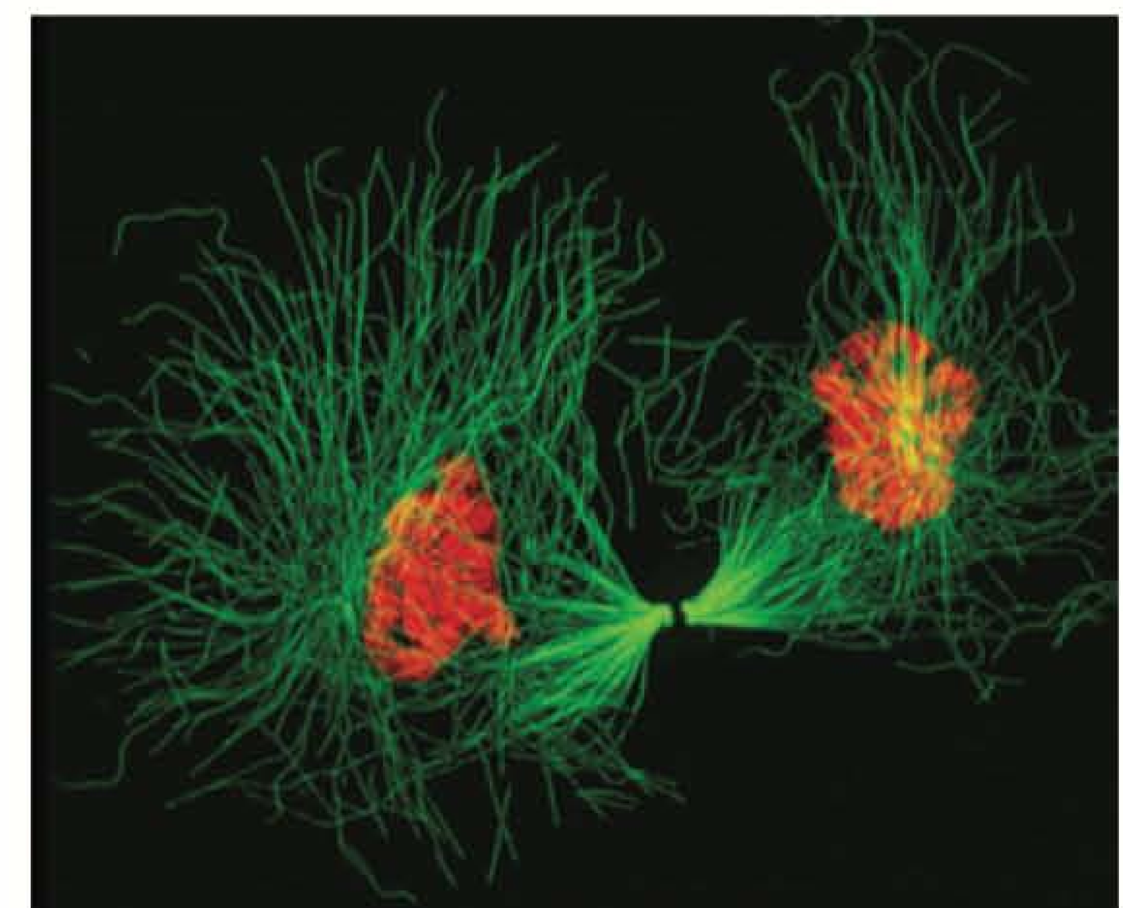
Durante a telófase, os dois conjuntos de cromossomos-filhos chegam aos polos do fuso e se descondensam. Um novo envelope nuclear é remontado em volta de cada conjunto, completando a formação de dois novos núcleos e marcando o fim da mitose. A divisão do citoplasma começa com a contração do anel contrátil.



6 CITOCINESE



Durante a citocinese, o citoplasma é dividido em dois por um anel contrátil de filamentos de actina e miosina, que comprime a célula em duas e dá origem a duas células-filhas, cada uma com um núcleo.



(As micrografias são cortesia de Julie Canman e Ted Salmon.)

A M-Cdk não atua sozinha na fosforilação de proteínas-chave envolvidas no início da mitose. Duas famílias adicionais de cinases, as *cinases similares a Polo* e as *cinases Aurora*, também dão importantes contribuições ao controle dos eventos mitóticos iniciais. A cinase similar a Polo Plk, por exemplo, é necessária à montagem normal de um fuso mitótico bipolar, em parte porque fosforila proteínas envolvidas na separação dos polos do fuso no início da mitose. A cinase Aurora A também ajuda a controlar proteínas que dirigem a montagem e a estabilidade do fuso, ao passo que a Aurora B controla a ligação das cromátides-irmãs ao fuso, como discutiremos posteriormente. A ativação de cinases similares a Polo e de cinases Aurora depende da atividade da M-Cdk, mas os mecanismos precisos de ativação ainda não estão claros.

A desfosforilação ativa a M-Cdk no início da mitose

A ativação da M-Cdk começa com o acúmulo de M-ciclina (ciclina B em células de vertebrados, ver Tabela 17-1). Em ciclos celulares embrionários, a síntese de M-ciclina é constante ao longo do ciclo celular, e o acúmulo de M-ciclina resulta da alta estabilidade da proteína na interfase. Contudo, na maioria dos tipos celulares, a síntese de M-ciclina aumenta durante G_2 e M, devido principalmente ao aumento da transcrição do gene *M-ciclina*. O aumento da proteína M-ciclina leva a um correspondente acúmulo da M-Cdk (o complexo de Cdk1 e M-ciclina) à medida que a célula se aproxima da mitose. Embora nesses complexos a Cdk seja fosforilada em um sítio ativador pela cinase ativadora de Cdk (CAK), como anteriormente discutido, a cinase Wee1 a mantém em um estado inativo, por meio de fosforilação inibidora em dois sítios vizinhos (ver Figura 17-18). Assim, no momento em que a célula chega o fim de G_2, ela contém um estoque abundante de M-Cdk, que está preparada e pronta para agir, mas está suprimida por fosfatos que bloqueiam o sítio ativo da cinase.

O que então desencadeia a ativação do estoque de M-Cdk? O evento crucial é a ativação da proteína fosfatase Cdc25, que remove os fosfatos inibidores que restringem a M-Cdk (**Figura 17-25**). Ao mesmo tempo, a atividade inibidora da cinase Wee1 é suprimida, assegurando ainda mais que a atividade da M-Cdk aumente. Os mecanismos que desencadeiam a atividade da Cdc25 (e suprimem a Wee1) no início da mitose não são bem entendidos. Uma possibilidade é que as S-Cdks que estão ativas em G_2 e no início da prófase estimulem a Cdc25.

Curiosamente, a Cdc25 também pode ser ativada, ao menos em parte, pelo seu alvo, a M-Cdk. A M-Cdk também pode inibir a cinase inibidora Wee1. A capacidade da M-Cdk de ativar seu próprio ativador (Cdc25) e inibir seu próprio inibidor (Wee1) sugere que a ativação da M-Cdk na mitose envolve circuitos de retroalimentação positiva (ver Figura 17-25). De acordo com este modelo, a ativação parcial da Cdc25 (talvez pela S-Cdk) leva à ativação parcial de uma subpopulação de complexos de M-Cdk, que então fosforilam mais moléculas de Cdc25 e Wee1. Isso leva a uma maior ativação da M-Cdk, e assim por diante. Tal mecanismo rapidamente promoveria a ativação completa de todos os complexos de M-Cdk na célula. Como anteriormente mencionado, interruptores moleculares semelhantes operam

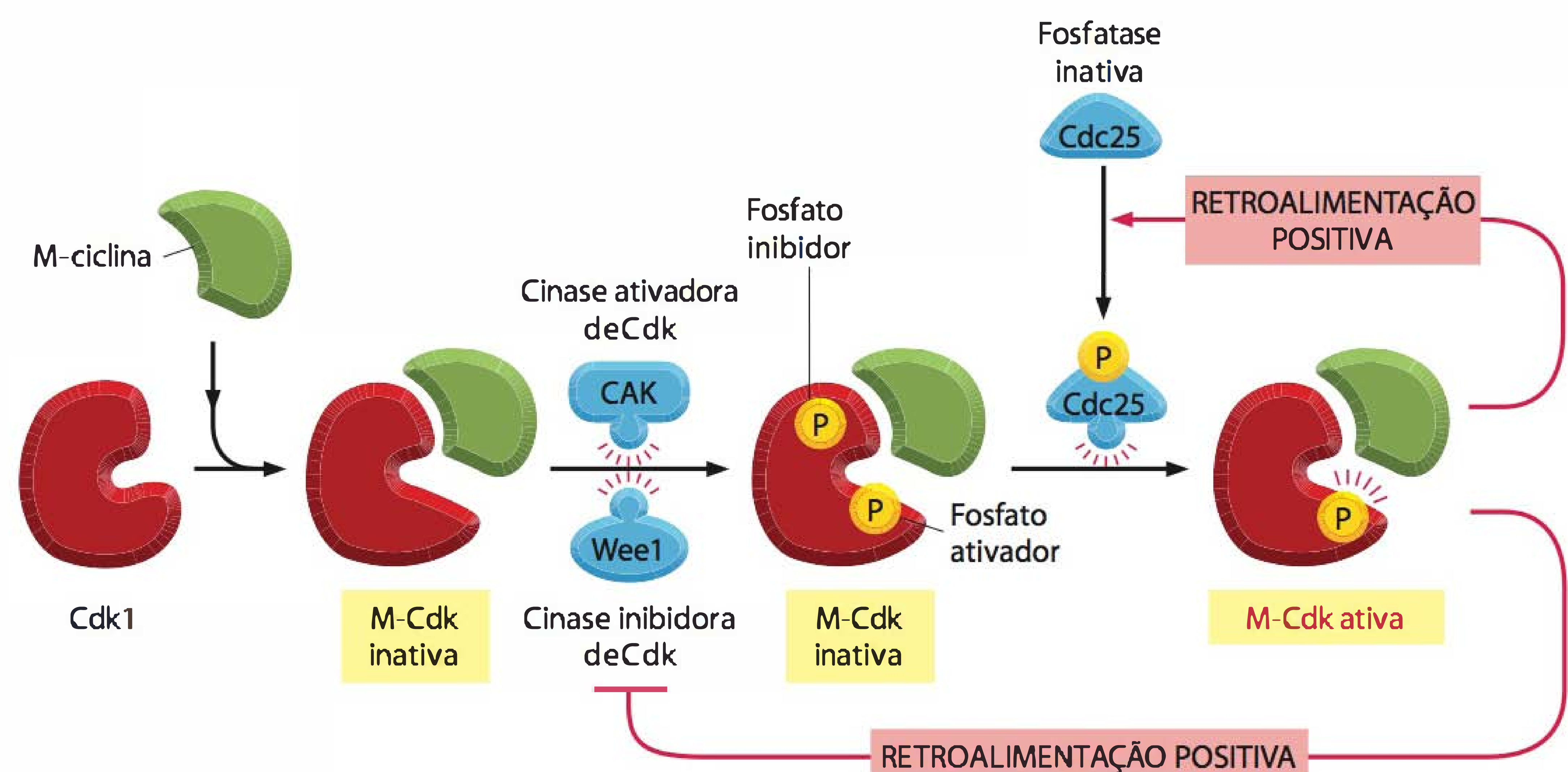


Figura 17-25 A ativação da M-Cdk. A Cdk1 se associa à M-ciclina à medida que os níveis de M-ciclina gradativamente se elevam. O complexo de M-Cdk resultante é fosforilado em um sítio ativador pela cinase ativadora de Cdk (CAK) e em um par de sítios inibidores pela cinase Wee1. O complexo M-Cdk inativo resultante é então ativado ao fim de G_2 pela fosfatase Cdc25. A Cdc25 é ainda mais estimulada pela M-Cdk ativa, resultando em retroalimentação positiva. A retroalimentação é aumentada pela capacidade da M-Cdk de inibir Wee1.

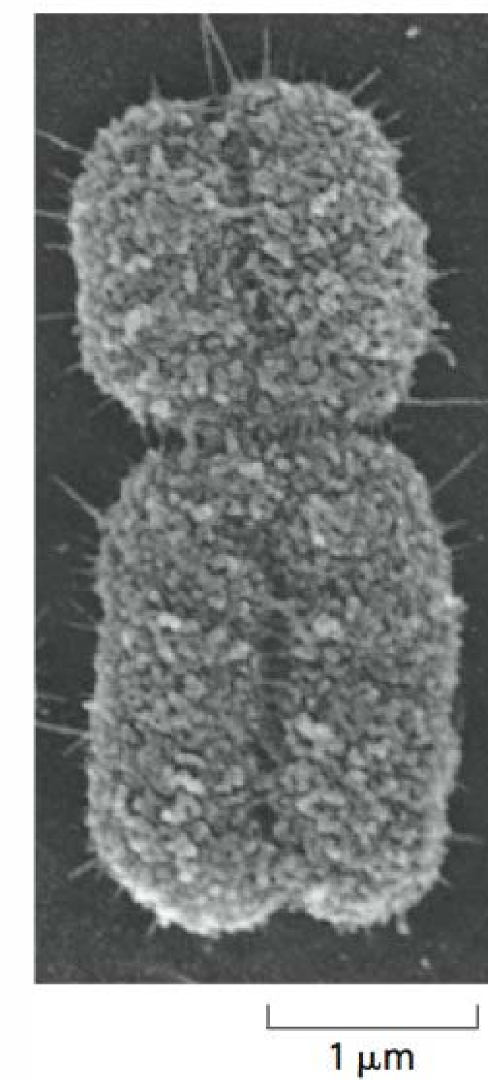


Figura 17-26 O cromossomo mitótico. Micrografia eletrônica de varredura de um cromossomo mitótico humano, consistindo em duas cromátides-irmãs unidas ao longo de sua extensão. As regiões comprimidas são os centrômeros. (Cortesia de Terry D. Allen.)

em vários pontos do ciclo celular, a fim de promover a transição abrupta e completa de um estado do ciclo celular ao próximo.

A condensina ajuda a configurar os cromossomos duplicados para a separação

Ao fim da fase S, as moléculas de DNA extremamente longas das cromátides-irmãs estão emaranhadas em uma massa de DNA parcialmente concatenado e proteínas. Neste estado, qualquer tentativa de separar bruscamente as irmãs levaria, indubitavelmente, a quebras nos cromossomos. Para evitar esse desastre, a célula dedica uma grande quantidade de energia no início da mitose a fim de gradativamente reorganizar as cromátides-irmãs em estruturas relativamente curtas e distintas, que podem ser separadas mais facilmente na anáfase. Essas mudanças cromossômicas envolvem dois processos: a *condensação dos cromossomos*, na qual as cromátides são dramaticamente compactadas; e a *resolução das cromátides-irmãs*, por meio da qual as duas irmãs são resolvidas em unidades separáveis distintas (**Figura 17-26**). A resolução resulta do desencadeamento dos DNAs-irmãos, acompanhado pela remoção parcial de moléculas de coesina ao longo dos braços cromossômicos. Como resultado, quando a célula atinge a metáfase, as cromátides-irmãs aparecem no microscópio como estruturas compactas, semelhantes a um bastão e que estão fortemente unidas em suas regiões centroméricas e apenas frouxamente ao longo dos braços.

A condensação e a resolução das cromátides-irmãs dependem, ao menos em parte, de um complexo proteico de cinco subunidades chamado de **condensina**. A estrutura da condensina é relacionada àquela do complexo de coesina que mantém as cromátides-irmãs unidas (ver Figura 17-24). Ela contém duas subunidades de SMC, semelhantes às da coesina, mais três subunidades de não-SMC (**Figura 17-27**). A condensina pode formar uma estrutura similar a um anel que, de alguma forma, usa a energia fornecida pela hidrólise de ATP para promover a compactação e a resolução das cromátides-irmãs. A condensina é capaz de modificar o enrolamento de moléculas de DNA em um tubo de ensaio, e acredita-se que essa atividade de enrolamento seja importante à condensação dos cromossomos durante a mitose. Curiosamente, a fosforilação de subunidades da condensina pela M-Cdk estimula essa atividade de enrolamento, propiciando um mecanismo pelo qual a M-Cdk pode promover a reestruturação dos cromossomos no início da mitose.

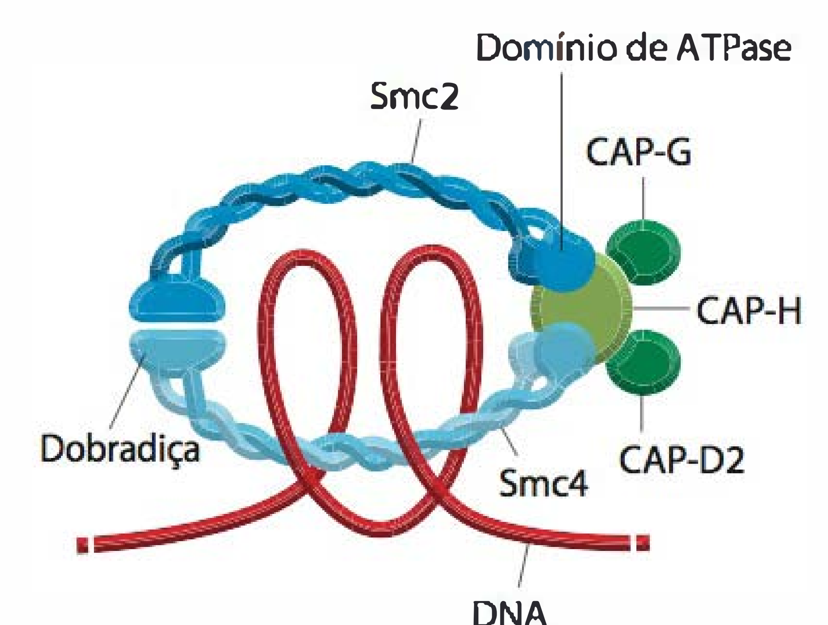


Figura 17-27 Condensina. A condensina é um complexo proteico de cinco subunidades que se assemelha à coesina (ver Figura 17-24). Os domínios da cabeça de suas duas subunidades principais, Smc2 e Smc4, são unidos por três subunidades adicionais. Não está claro como a condensina catalisa a reestruturação e a compactação do DNA dos cromossomos, mas ela pode formar uma estrutura anelada que circunda alças de DNA, como mostrado; ela pode hidrolisar ATP e enrolar moléculas de DNA em um tubo de ensaio.

O fuso mitótico é uma máquina com base em microtúbulos

Em todos os eucariotos, o evento central da mitose – a segregação dos cromossomos – depende de uma máquina complexa e bela denominada **fuso mitótico**. O fuso é um arranjo bipolar de microtúbulos, que separa as cromátides-irmãs na anáfase, segregando, com isso, os dois conjuntos de cromossomos a extremidades opostas da célula, onde eles são empacotados em dois núcleos-filhos. A M-Cdk aciona a montagem do fuso no início da mitose, em paralelo à reestruturação dos cromossomos recém-descrita. Antes de considerarmos como o fuso é montado e como seus microtúbulos se ligam às cromátides-irmãs, revisaremos brevemente as características básicas da estrutura do fuso.

Como discutido no Capítulo 16, o núcleo do fuso mitótico é um arranjo bipolar de microtúbulos, no qual as extremidades menos (–) estão orientadas aos dois polos do fuso, e as extremidades mais (+) se irradiam para fora dos polos (**Figura 17-28**). As extremidades mais (+) de alguns microtúbulos – chamadas de **microtúbulos interpolares** – interagem com as extremidades mais (+) de microtúbulos do outro polo, resultando em um arranjo antiparalelo na zona intermediária do fuso. As extremidades mais (+) de outros microtúbulos – os **microtúbulos do cinetocoro** – são ligadas aos pares de cromátides-irmãs em grandes estruturas proteicas chamadas de *cinetocoros*, que estão localizados no *centrômero* de cada

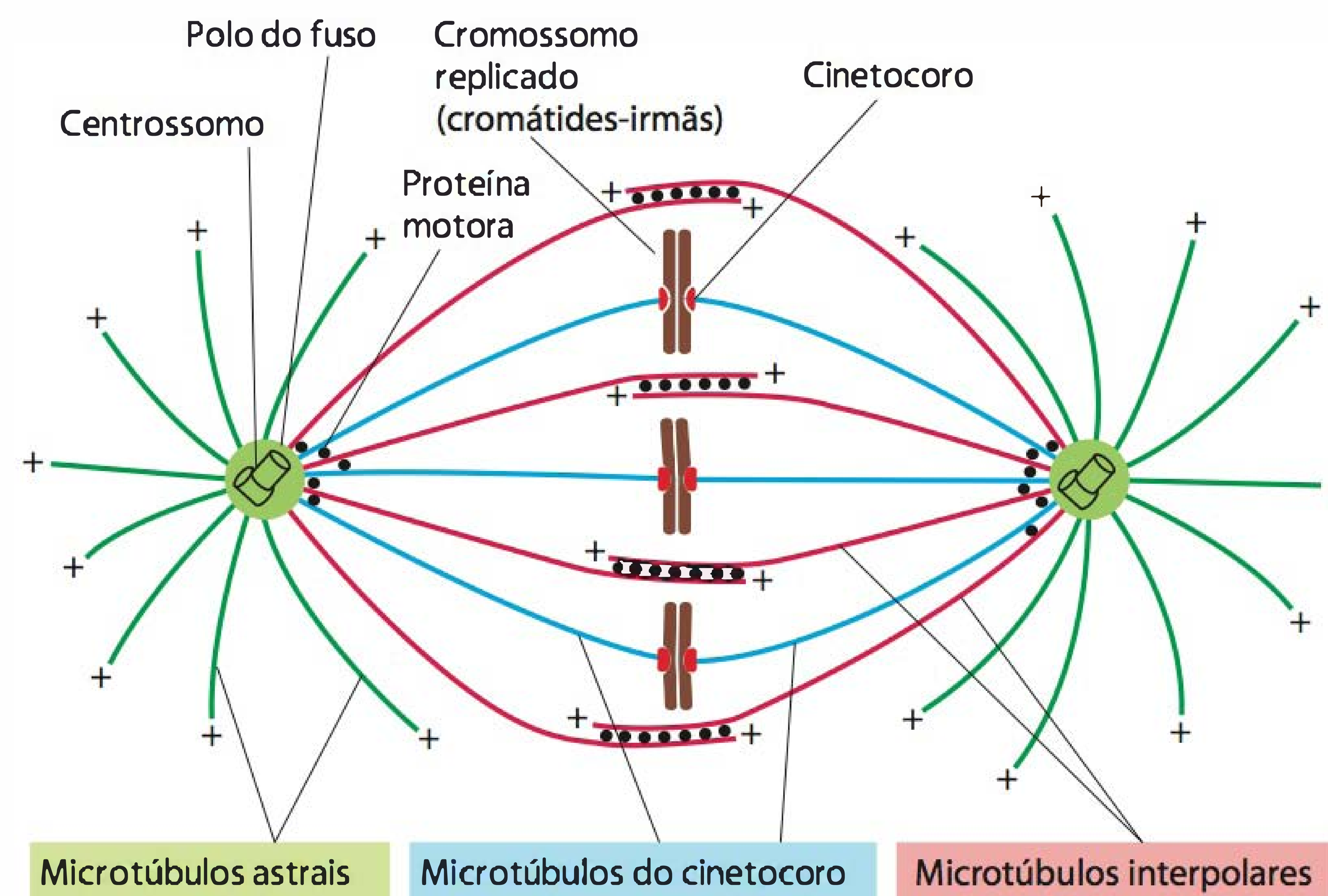


Figura 17-28 As três classes de microtúbulos do fuso mitótico em uma célula animal. As extremidades mais (+) dos microtúbulos se projetam em direção oposta aos centrossomos, ao passo que as extremidades menos (–) são ancoradas aos polos do fuso, que neste exemplo são organizados por centrossomos. Os microtúbulos do cinetocoro conectam os polos do fuso aos cinetocoros das cromátides-irmãs, enquanto microtúbulos interpolares dos dois polos se interdigitam no equador do fuso. Os microtúbulos astrais se irradiam dos polos no citoplasma e normalmente interagem com o córtex celular, ajudando a posicionar o fuso na célula.

cromátide-irmã. Por fim, muitos fusos também contêm **microtúbulos astrais** que se irradiam para fora dos polos e contatam o córtex da célula, ajudando no posicionamento do fuso na célula.

Na maioria das células somáticas animais, cada polo do fuso é orientado em uma organela proteica denominada **centrossomo** (discutido no Capítulo 16). Cada centrossomo consiste em uma nuvem de material amorfo (chamada de *matriz pericentriolar*) que cerca um par de *centríolos* (**Figura 17-29**). A matriz pericentriolar nucleia um arranjo radial de microtúbulos, com suas extremidades mais (+) de crescimento rápido projetando-se para fora e suas extremidades menos (–) associadas ao centrossomo. A matriz contém uma série de proteínas, incluindo proteínas motoras dependentes de microtúbulos, proteínas com estrutura

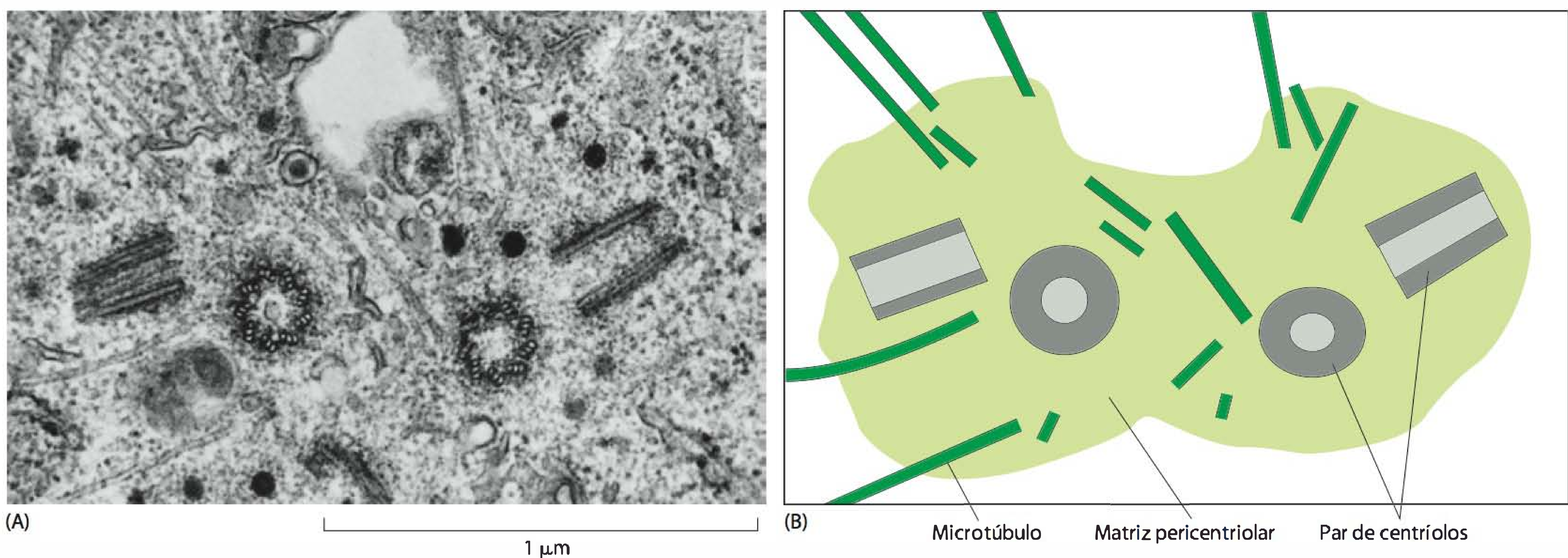




Figura 17-29 O centrossomo. (A) Micrografia eletrônica de uma célula cultivada de mamífero na fase S, mostrando um centrossomo duplicado. Cada centrossomo contém um par de centríolos; embora os centríolos tenham se duplicado, eles permanecem juntos em um único complexo, como mostrado no desenho da micrografia em (B). Um centríolo de cada par de centríolos foi cortado em secção transversal, enquanto o outro foi cortado em secção longitudinal, indicando que os dois membros de cada par estão alinhados em ângulos retos um ao outro. As duas metades do centrossomo replicado, cada uma consistindo em um par de centríolos cercado por matriz pericentriolar, irão se dividir e migrar em separado a fim de iniciar a formação dos dois polos do fuso mitótico quando a célula entra na fase M. (C) Micrografia eletrônica de um par de centríolos isolado de uma célula. Os dois centríolos se separaram parcialmente durante o procedimento de isolamento, mas permanecem presos um ao outro por fibras finas, que mantêm o par de centríolos unido até a hora da separação. Os dois centríolos estão cortados longitudinalmente, e pode-se ver que os dois possuem estruturas diferentes: o centríolo-pai é maior e mais complexo que o centríolo-filho, e somente o centríolo-pai está associado à matriz pericentriolar que nucleia os microtúbulos. Cada centríolo-filho amadurecerá durante o próximo ciclo celular, quando irá se replicar para dar origem a seu próprio centríolo-filho. (A, de M. McGill, D. P. Highfield, T. M. Monahan e B. R. Brinkley, *J. Ultrastruct. Res.* 57:43-53, 1976. Com permissão de Academic Press; C, de M. Paintrand et al., *J. Struct. Biol.* 108:107-128, 1992. Com permissão de Elsevier.)

em super-hélice que ligam os motores ao centrossomo, proteínas estruturais e componentes do sistema de controle do ciclo celular. O mais importante é que ela contém o *complexo em anel de γ-tubulina*, um componente responsável, principalmente, pela nucleação de microtúbulos (discutido no Capítulo 16).

Algumas células – especialmente as células de plantas superiores e os ovócitos de muitos vertebrados – não possuem centrossomos, e proteínas motoras dependentes de microtúbulos e outras proteínas associadas às extremidades menos (–) dos microtúbulos organizam e orientam os polos do fuso.

As proteínas motoras dependentes de microtúbulos controlam a montagem e a função do fuso

A montagem e a função do fuso mitótico dependem de um grande número de proteínas motoras dependentes de microtúbulos. Como discutido no Capítulo 16, essas proteínas pertencem a duas famílias – as proteínas relacionadas à cinesina, que normalmente se movem em direção à extremidade mais (+) dos microtúbulos, e as dineínas, que se movem em direção à extremidade menos (–). No fuso mitótico, essas proteínas motoras geralmente operam nas das extremidades dos microtúbulos ou perto delas. Quatro tipos principais de proteínas motoras – *cinesina-5*, *cinesina-14*, *cinesinas-4 e 10* e *dineína* – são particularmente importantes à montagem e ao funcionamento do fuso (**Figura 17-30**).

As proteínas cinesina-5 contêm dois domínios motores que interagem com as extremidades mais (+) de microtúbulos antiparalelos na zona média do fuso. Como os dois domínios motores se movem em direção às extremidades mais (+) dos microtúbulos, eles fazem com que os dois microtúbulos antiparalelos, ao passarem um sobre o outro, deslizem em direção aos fusos mitóticos, forçando o afastamento dos polos. As proteínas cinesina-14, por outro lado, são motores orientados para a extremidade menos (–) com um único domínio motor e outros domínios que podem interagir com um microtúbulo diferente. Elas podem fazer ligações cruzadas com microtúbulos interpolares antiparalelos na zona média do fuso, e tendem a tracionar os polos conjuntamente. As proteínas cinesina-4 e cinesina-10, também chamadas de *cromocinesinas*, são motores orientados para a extremidade mais (+) que se associam aos braços cromossômicos e afastam o cromossomo ligado do polo (ou o polo do cromossomo). Por fim, as dineínas são motores orientados para a extremidade menos (–) que, juntamente com proteínas associadas, organizam os microtúbulos em vários locais celulares. Elas ligam as extremidades mais (+) de microtúbulos astrais a componentes do citoesqueleto de actina no córtex celular, por exemplo; movendo-se em direção à extremidade menos (–) dos microtúbulos, os motores de dineína puxam o fuso mitótico em direção ao córtex celular e se afastam um do outro.

Dois mecanismos colaboram na montagem de um fuso mitótico bipolar

O fuso mitótico deve possuir dois polos a fim de puxar os dois conjuntos de cromátides-irmãs a polos opostos da célula em anáfase. Nas células animais, o foco primordial deste capítulo, dois mecanismos colaboram a fim de assegurar a bipolaridade do fuso. Um depende da capacidade dos cromossomos mitóticos de nuclear e estabilizar microtúbulos e da capacidade das várias proteínas motoras recém-descritas de organizar microtúbulos em um arranjo bi-

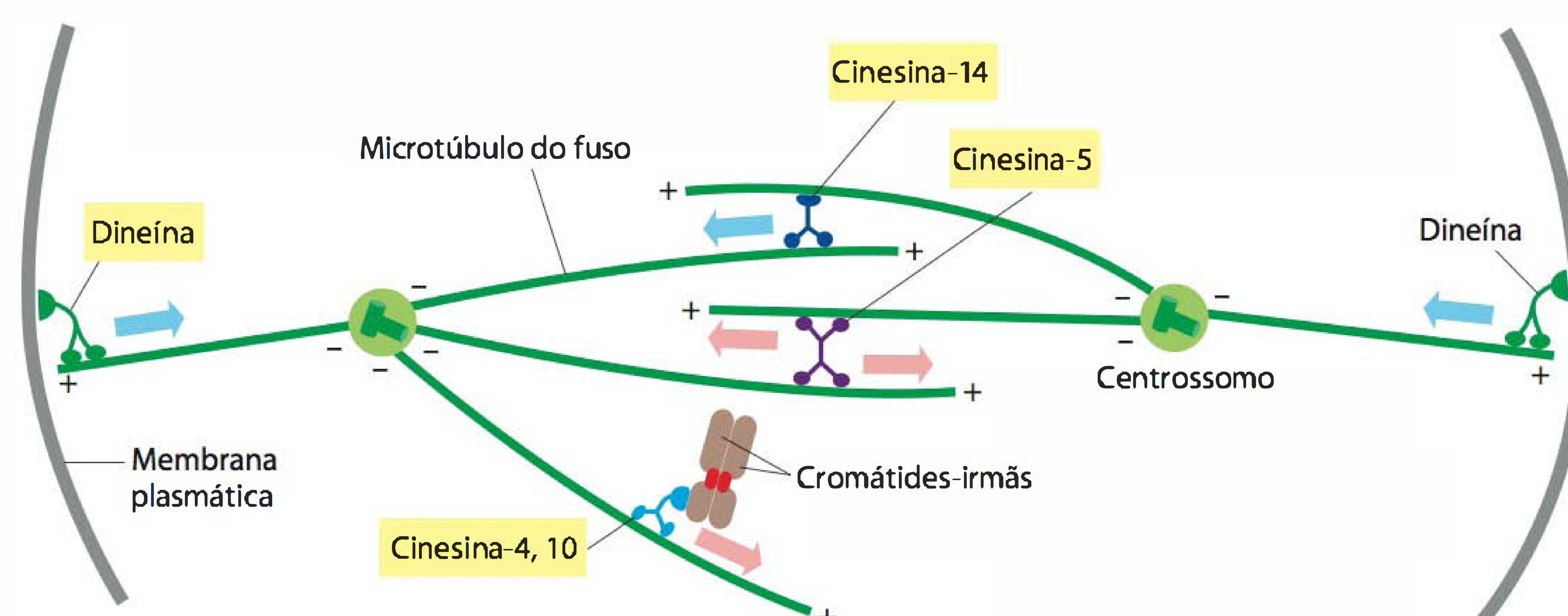


Figura 17-30 Principais proteínas motoras do fuso. Quatro classes principais de proteínas motoras dependentes de microtúbulos (retângulos *amarelos*) contribuem à montagem e ao funcionamento do fuso (veja o texto). As setas coloridas indicam a direção do movimento motor ao longo de um microtúbulo – *azul* em direção à extremidade menos (–), e *vermelho* em direção à extremidade mais (+).

polar, com extremidades menos (–) orientadas aos dois polos do fuso e extremidades mais (+) interagindo uma com a outra na zona média do fuso. O outro depende da capacidade dos centrossomos de auxiliar na formação dos polos do fuso. Uma célula animal típica entra na mitose com um par de centrossomos, cada um dos quais nucleia um arranjo radial de microtúbulos. Os dois centrossomos facilitam a montagem do fuso bipolar ao fornecer um par de polos pré-fabricados do fuso. Contudo, os centrossomos não são essenciais à montagem de um fuso bipolar, uma vez que um fuso funcional se forma em células que normalmente não possuem centrossomos e em células cultivadas nas quais um feixe de *laser* destruiu o centrossomo.

Agora descreveremos as etapas de montagem do fuso, começando com a montagem dependente de centrossomos no início da mitose. Em seguida consideraremos o mecanismo de auto-organização que não necessita de centrossomos e é particularmente importante após a desintegração do envelope nuclear.

A duplicação do centrossomo ocorre no início do ciclo celular

A maioria das células animais contém um único centrossomo que nucleia a maioria dos microtúbulos citoplasmáticos da célula. O centrossomo se duplica quando a célula entra no ciclo celular, de forma que no momento em que a célula atinge a mitose existem dois centrossomos. A duplicação do centrossomo começa mais ou menos ao mesmo tempo em que a célula entra na fase S. O G_1/S-Cdk (um complexo de ciclina E e Cdk2 em células animais; ver Tabela 17-1) que aciona a entrada no ciclo celular também inicia a duplicação do centrossomo. Os dois centríolos do centrossomo se separam, e cada um nucleia a formação de um único centríolo novo, resultando em dois pares de centríolos dentro de uma matriz pericentriolar expandida (**Figura 17-31**). Este par de centrossomos permanece junto em um lado do núcleo até a célula entrar em mitose.

Existem paralelos interessantes entre a duplicação do centrossomo e a duplicação dos cromossomos. Ambas usam um mecanismo semiconservativo de duplicação, no qual as duas metades se separam e servem de molde à construção de uma nova metade. Os centrossomos, como os cromossomos, devem se replicar uma e somente uma vez por ciclo celular, a fim de garantir que a célula entre em mitose com somente duas cópias: um número incorreto de centrossomos poderia levar a defeitos na montagem do fuso e, consequentemente, erros na segregação dos cromossomos.

Os mecanismos que limitam a duplicação do centrossomo a uma vez por ciclo celular são incertos. Em muitos tipos celulares, a inibição experimental da síntese de DNA bloqueia a duplicação do centrossomo, estabelecendo um mecanismo pelo qual o número de centrossomos é mantido sob controle. Contudo, outros tipos celulares, incluindo aqueles de embriões jovens de moscas, ouriços-do-mar e rãs, não contêm tal mecanismo, e a duplicação do centrossomo continua se a duplicação dos cromossomos for bloqueada. Não se sabe como tais células limitam a duplicação do centrossomo a uma vez por ciclo celular.

A M-Cdk inicia a montagem do fuso na prófase

No começo da mitose, o aumento repentino da atividade da M-Cdk inicia a montagem do fuso. Em células animais, os dois centrossomos se movem em separado ao longo do envelo-

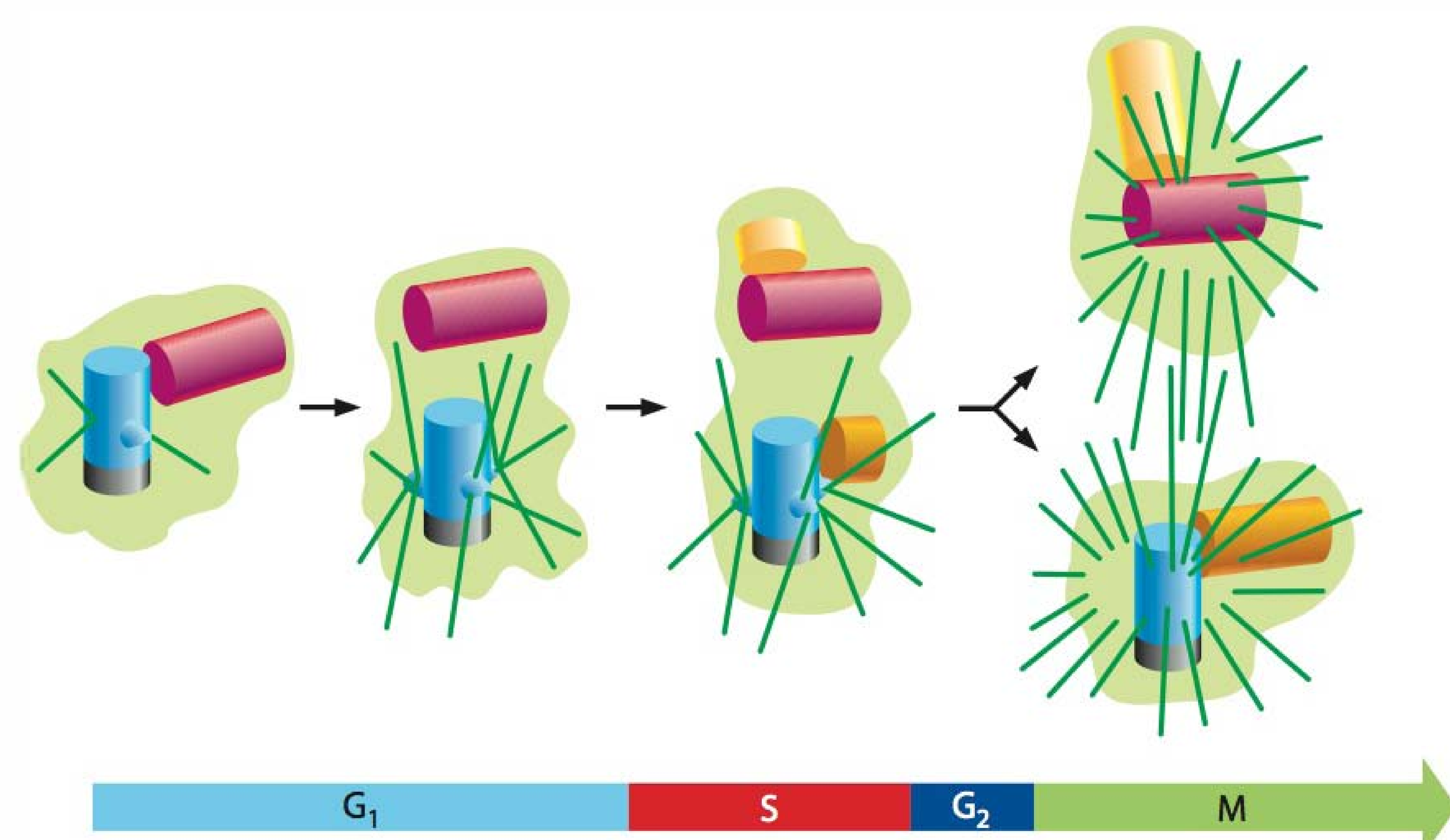


Figura 17-31 Replicação do centríolo. O centrossomo consiste em um par de centríolos e matriz pericentriolar associada (*verde*). Em um certo ponto em G_1, os dois centríolos do par se separam por alguns micrômetros. Durante a fase S, um centríolo-filho começa a crescer próximo à base de cada centríolo-pai e em ângulo reto a ele. O alongamento do centríolo-filho normalmente é completado em G_2. Os dois pares de centríolos permanecem próximos um ao outro em um único complexo centrossômico até o começo da fase M, quando o complexo se divide em dois e as duas metades começam a se separar. Cada centrossomo agora nucleia seu próprio arranjo radial de microtúbulos, chamado de áster.

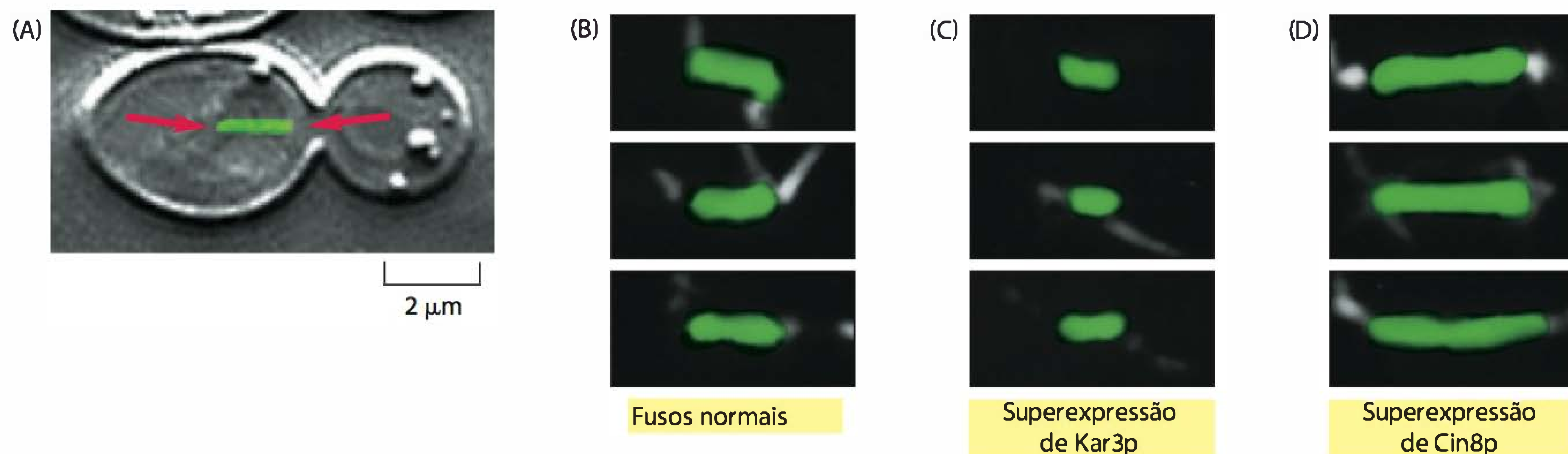


Figura 17-32 Influência de proteínas motoras opostas no comprimento do fuso da levedura de brotamento. (A) Uma micrografia de contraste de interferência diferencial de uma célula mitótica de levedura. O fuso está realçado em *verde*, e a posição dos polos do fuso é indicada por *setas vermelhas*. O envelope nuclear não se desintegra durante a mitose em leveduras, e o fuso se forma dentro do núcleo. Em (B-D), os fusos mitóticos foram corados com anticorpos fluorescentes antitubulina. (B) Células normais de levedura. (C) A superexpressão da proteína motora orientada para a extremidade menos (–) Kar3 (uma proteína cinesina-14) leva a fusos anormalmente curtos. (D) A superexpressão da proteína motora orientada para a extremidade mais (+) Cin8 (uma proteína cinesina-5) leva a fusos anormalmente longos. Assim, parece que o equilíbrio entre proteínas motoras opostas determina o comprimento do fuso nessas células. (A, cortesia de Kerry Bloom; B-D, de W. Saunders, V. Lengyel e M. A. Hoyt, *Mol. Biol. Cell* 8:1025-1033, 1997. Com permissão da American Society for Cell Biology.)

pe nuclear, e as extremidades mais (+) dos microtúbulos entre eles se interdigitam e formam os microtúbulos interpolares do fuso em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, a quantidade de complexos em anel de γ-tubulina em cada centrossomo aumenta imensamente, aumentando a capacidade dos centrossomos de nuclear novos microtúbulos, um processo denominado *maturação do centrossomo*.

Múltiplas proteínas motoras conduzem a separação dos centrossomos no início da mitose. Na prófase, as proteínas motoras de dineína orientadas para a extremidade menos (–) nas extremidades mais (+) dos microtúbulos astrais propiciam a principal força. Esses motores estão ancorados no córtex celular ou no envelope nuclear, e seu movimento em direção à extremidade menos (–) do microtúbulo separa os centrossomos (Figura 17-30). Em seguida à desintegração do envelope nuclear no final da prófase, interações entre os microtúbulos centrossômicos e o córtex celular permitem que feixes de actina-miosina no córtex separem os centrossomos ainda mais. Por fim, os motores de cinesina-5 fazem ligações cruzadas nas extremidades sobrepostas e antiparalelas de microtúbulos interpolares e afastam os polos entre si (ver Figura 17-30).

O equilíbrio de forças opostas geradas por diferentes tipos de proteínas motoras determina o comprimento final do fuso. Os motores de dineína e cinesina-5 geralmente promovem a separação dos centrossomos e aumentam o comprimento do fuso. As proteínas cinesina-14 fazem o contrário: elas são motores orientados para a extremidade menos (–) e interagem com um microtúbulo de um polo enquanto migram em direção à extremidade menos (–) de um microtúbulo antiparalelo do outro polo; como resultado, elas tendem a tracionar os polos conjuntamente. Não está claro como a célula regula o equilíbrio de forças opostas para gerar o comprimento apropriado do fuso (**Figura 17-32**).

A M-Cdk e outras cinases mitóticas são necessárias à separação e maturação dos centrossomos. A M-Cdk e a Aurora-A fosforilam motores de cinesina-5 e estimulam-nos a conduzir a separação dos centrossomos. A Aurora-A e a Plk também fosforilam componentes do centrossomo, promovendo com isso sua maturação.

A conclusão da montagem do fuso em células animais requer a desintegração do envelope nuclear

Os centrossomos e os microtúbulos das células animais estão localizados no citoplasma, separados dos cromossomos por uma dupla barreira de membrana do envelope nuclear (discutido no Capítulo 12). Claramente, a ligação das cromátides-irmãs ao fuso requer a remoção desta barreira. Além disso, muitas proteínas motoras e reguladores de microtúbulos que promovem a montagem do fuso estão associados aos cromossomos dentro do núcleo. A desintegração do envelope nuclear permite que essas proteínas executem suas funções, importantes à montagem do fuso.

A desintegração do envelope nuclear é um processo complexo e ocorre em múltiplas etapas que, acredita-se, começa quando a M-Cdk fosforila várias subunidades dos gigantescos complexos de poros nucleares do envelope nuclear. Isso dá início à desmontagem dos complexos de poros nucleares e sua dissociação do envelope. A M-Cdk também fosforila componentes da lâmina nuclear, o esqueleto estrutural que se situa sob o envelope. A fosforilação desses componentes da lâmina e de várias proteínas internas do envelope nuclear leva à desmontagem da lâmina nuclear e à desintegração das membranas do envelope em pequenas vesículas.

A instabilidade dos microtúbulos aumenta muito na mitose

A maioria das células animais em interfase contém um arranjo citoplasmático de microtúbulos que se irradia do único centrossomo presente. Como discutido no Capítulo 16, os microtúbulos desse arranjo interfásico estão em um estado de *instabilidade dinâmica*, em que os microtúbulos individuais estão crescendo ou encolhendo e estocasticamente alternam entre os dois estados. A troca de crescimento a encolhimento é chamada de *catástrofe*, e a troca de encolhimento a crescimento é denominada *salvamento* (ver Figura 16-16). Microtúbulos novos estão sendo continuamente criados para equilibrar a perda daqueles que desaparecem completamente por despolimerização.

A entrada na mitose sinaliza uma mudança brusca nos microtúbulos da célula. O arranjo interfásico de poucos e longos microtúbulos é convertido a um número maior de microtúbulos mais curtos e mais dinâmicos cercando cada centrossomo. Durante a prófase, e particularmente na prometáfase e na anáfase (ver Painel 17-1), a meia-vida dos microtúbulos diminui dramaticamente. Esse aumento na instabilidade dos microtúbulos, acoplado com o aumento da capacidade dos centrossomos de nuclear microtúbulos, como anteriormente mencionado, resulta em arranjos notavelmente densos e dinâmicos de microtúbulos do fuso que são idealmente apropriados para a captura de cromátides-irmãs.

A M-Cdk inicia essas mudanças no comportamento dos microtúbulos, ao menos em parte, pela fosforilação de duas classes de proteínas que controlam a dinâmica dos microtúbulos (discutido no Capítulo 16). Estas incluem proteínas motoras dependentes de microtúbulos e **proteínas associadas a microtúbulos** (**MAPs,** *microtubule-associated proteins*). Experimentos usando extratos de ovos de *Xenopus* livres de células, que reproduzem muitas das mudanças que ocorrem em células intactas durante o ciclo celular, revelaram os papéis desses reguladores no controle da dinâmica dos microtúbulos. Se centrossomos e tubulina fluorescente forem adicionados a esses extratos, os microtúbulos fluorescentes são nucleados a partir dos centrossomos, e pode-se observar o comportamento de microtúbulos individuais por microscopia de videofluorescência em diferentes intervalos de tempo. Os microtúbulos em extratos mitóticos diferem daqueles em extratos interfásicos primordialmente pelo aumento da taxa de catástrofe, em que os microtúbulos alternam bruscamente do crescimento lento para o encurtamento rápido.

Duas classes de proteínas governam a dinâmica dos microtúbulos na mitose. Proteínas chamadas de **fatores de catástrofe** desestabilizam arranjos de microtúbulos ao aumentar a frequência de catástrofes (ver Figura 16-16). Uma dessas proteínas é uma proteína relacionada a cinesinas, mas que não funciona como motor. As MAPs, ao contrário, têm o efeito oposto, estabilizando microtúbulos de várias maneiras: elas podem aumentar a frequência de salvamentos, nos quais os microtúbulos trocam do encolhimento ao crescimento, ou elas podem tanto aumentar a taxa de crescimento como diminuir a taxa de encolhimento dos microtúbulos. Assim, em princípio, mudanças nos fatores de catástrofe e nas MAPs podem tornar os microtúbulos muito mais dinâmicos na fase M, pelo aumento das taxas totais de despolimerização dos microtúbulos, pela diminuição das taxas totais de despolimerização dos microtúbulos, ou por ambos.

Em extratos de ovos de *Xenopus*, o equilíbrio entre um único tipo de fator de catástrofe e um único tipo de MAP determina a taxa de catástrofe e o comprimento em estado estacionário dos microtúbulos (**Figura 17-33**). Esse equilíbrio, por sua vez, governa a montagem do fuso mitótico, uma vez que microtúbulos longos demais ou curtos demais não são capazes de formar um fuso normal. Uma forma pela qual a M-Cdk pode controlar o comprimento dos microtúbulos é mediante a fosforilação desta MAP e a redução de sua capacidade de estabilizar microtúbulos. Mesmo que a atividade do fator de catástrofe permanecesse constante ao longo do ciclo celular, o equilíbrio entre as duas atividades opostas da MAP e do fator de catástrofe mudaria, aumentando a instabilidade dinâmica dos microtúbulos.

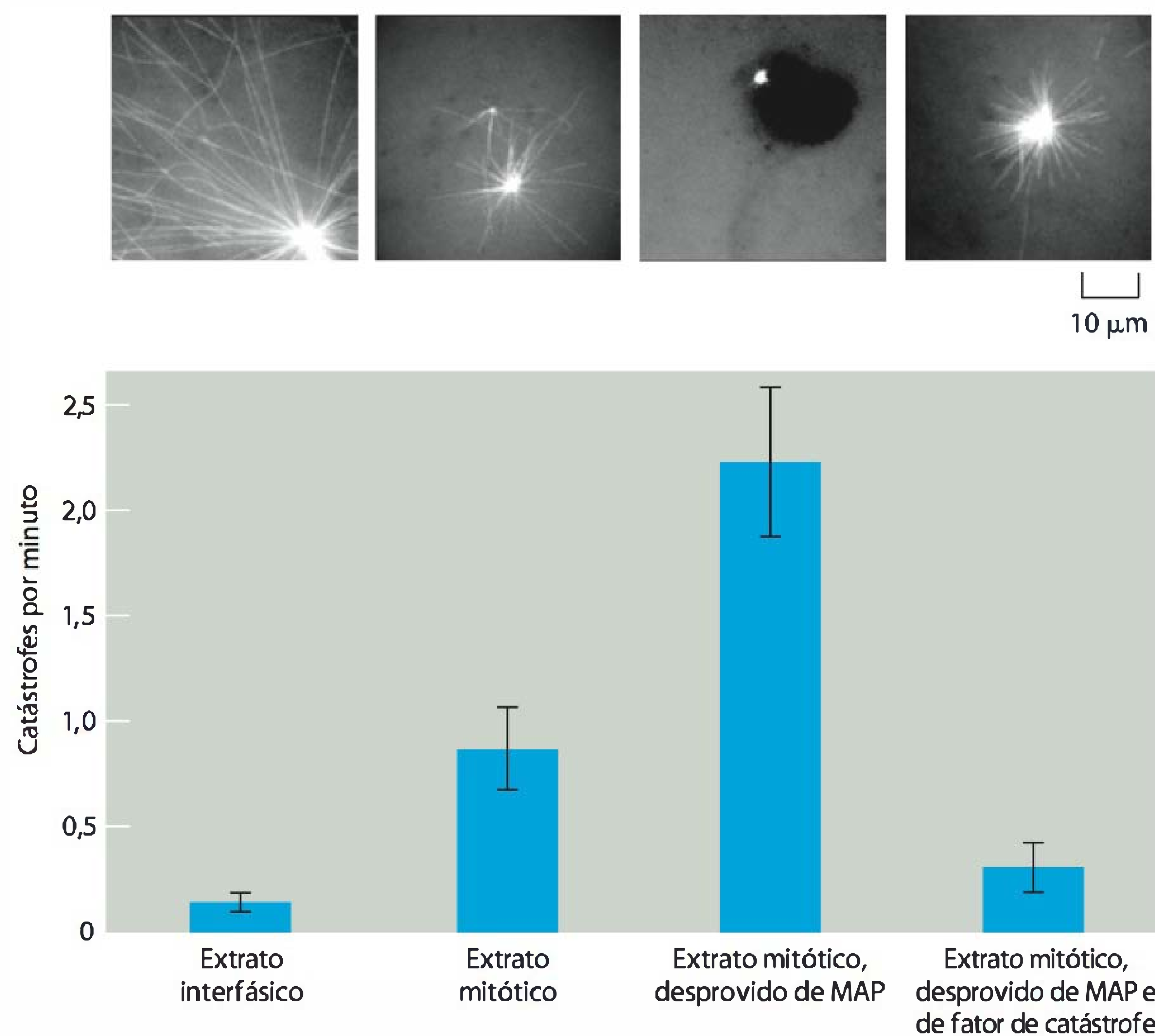


Figura 17-33 Evidência experimental de que o equilíbrio entre fatores de catástrofe e MAPs influencia a frequência de catástrofes dos microtúbulos e o comprimento dos microtúbulos. Extratos de ovos de *Xenopus* em interfase ou mitose foram incubados com centrossomos e tubulina fluorescente, e o comportamento de microtúbulos individuais, nucleados a partir dos centrossomos, foi acompanhado por microscopia de videofluorescência. Como esperado, a taxa de catástrofe é mais alta em extratos mitóticos que em extratos interfásicos. A depleção de uma MAP específica (chamada Xmap215) dos extratos mitóticos aumenta a taxa de catástrofe, indicando que esta MAP inibe catástrofes em extratos mitóticos. A inibição de um fator de catástrofe específico (a proteína relacionada a cinesinas Mcak) reduz muito a taxa de catástrofe nos extratos mitóticos desprovidos de MAP, indicando que este fator é responsável pelo estímulo de catástrofes em extratos mitóticos. Assim, a taxa de catástrofe depende do equilíbrio entre a MAP e o fator de catástrofe. Micrografias de fluorescência dos ásteres formados nas diferentes condições experimentais são mostradas nos painéis superiores; note que quanto mais altas as taxas de catástrofe, mais curtos são os microtúbulos. (De R. Tournebize et al., *Nat. Cell Biol.* 2:13-19, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os cromossomos mitóticos promovem a montagem do fuso bipolar

Os cromossomos não são simples passageiros passivos no processo de montagem do fuso. Ao criarem um ambiente local que favorece tanto a nucleação dos microtúbulos como a estabilização dos microtúbulos, eles desempenham um papel ativo na formação do fuso. A influência dos cromossomos pode ser demonstrada pelo uso de uma fina agulha de vidro que os reposiciona após o fuso ter se formado. Para algumas células em metáfase, se um único cromossomo é arrastado para fora do alinhamento, uma massa de novos microtúbulos do fuso rapidamente aparece ao redor do cromossomo recém-posicionado, ao passo que os microtúbulos do fuso na posição anterior do cromossomo se despolimerizam. Essa propriedade dos cromossomos parece depender, ao menos em parte, de um fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF, *guanine-nucleotide exchange factor*) que está ligado à cromatina; o GEF estimula uma pequena GTPase no citosol chamada de *Ran* a ligar GTP em lugar de GDP. A Ran-GTP ativada, que também está envolvida em transporte nuclear (discutido no Capítulo 12), libera proteínas estabilizadoras de microtúbulos de complexos proteicos no citosol, estimulando, assim, tanto a nucleação como a estabilização local de microtúbulos em torno dos cromossomos.

É essa capacidade dos cromossomos de estabilizar e organizar microtúbulos que permite às células formar fusos bipolares na ausência de centrossomos, como anteriormente discutido. Acredita-se que a montagem do fuso acentrossômico comece com a nucleação e estabilização de microtúbulos ao redor dos cromossomos. Proteínas motoras, particularmente membros da família de proteínas cinesina-5 (ver Figura 17-30), ligam transversalmente microtúbulos em uma orientação antiparalela e afastam suas extremidades menos (–). As cinesinas-4 e 10 nos braços dos cromossomos também ajudam a afastar as extremidades menos (–) dos cromossomos. A dineína, a cinesina-14 e várias proteínas ligantes a extremidades menos (–) fazem então ligações cruzadas e orientam as extremidades menos (–) dos microtúbulos para formar os dois polos do fuso (**Figura 17-34**).

As células que normalmente não possuem centrossomos, como aquelas de plantas superiores e de muitos ovócitos de animais, usam esse processo de auto-organização com base nos cromossomos para formar fusos. É também o processo usado para montar fusos em certos embriões de insetos que foram induzidos a desenvolver óvulos sem fertilização (isto é, *partenogeneticamente*); uma vez que o espermatozoide normalmente fornece o centrossomo quando fertiliza um óvulo (discutido no Capítulo 21), os fusos mitóticos nesses embriões partenogênicos se desenvolvem sem centrossomos (**Figura 17-35**). Mesmo em células que normalmente contêm centrossomos, os cromossomos ajudam a organizar

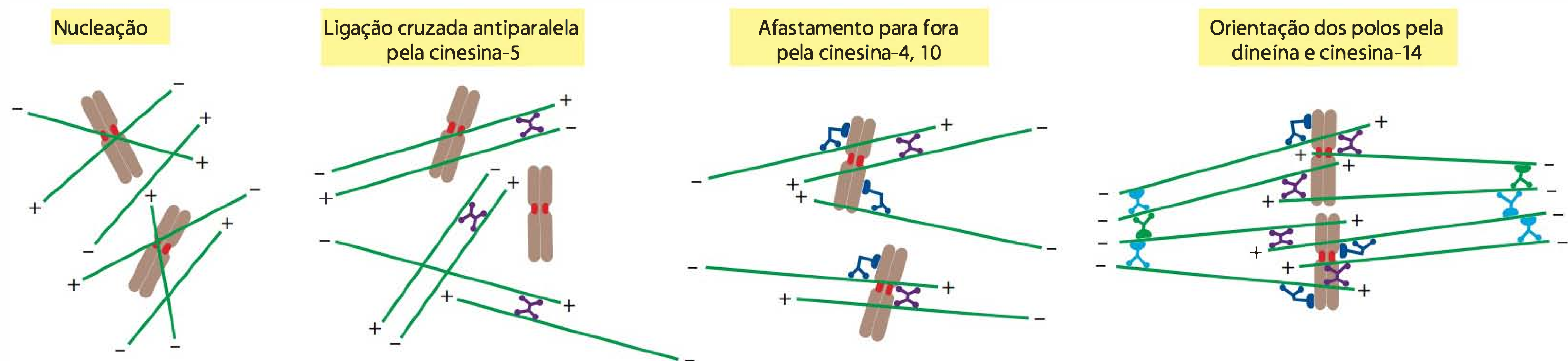


Figura 17-34 Auto-organização do fuso por proteínas motoras. Os cromossomos mitóticos estimulam a produção local de Ran-GTP (não-mostrado), que ativa proteínas que nucleiam e promovem a formação de microtúbulos na vizinhança dos cromossomos. As proteínas motoras cinesina-5 (ver Figura 17-30) organizam esses microtúbulos em feixes antiparalelos, enquanto as cinesinas-4 e 10 orientadas para as extremidades mais (+) ligam os microtúbulos aos braços cromossômicos e afastam as extremidades menos (–) dos cromossomos. Os motores de dineína e cinesina-14, juntamente com numerosas outras proteínas, orientam essas extremidades menos (–) em um par de polos do fuso.

os microtúbulos do fuso e, com o auxílio de várias proteínas motoras, podem promover a montagem de um fuso mitótico bipolar se os centrossomos forem removidos. Embora o fuso acentrossômico resultante possa segregar cromossomos normalmente, ele carece de microtúbulos astrais, que são responsáveis pelo posicionamento do fuso em células animais; como resultado, o fuso frequentemente é mal-posicionado, resultando em anormalidades na citocinese.

Os cinetocoros ligam as cromátides-irmãs ao fuso

Em seguida à montagem de um arranjo bipolar de microtúbulos, a segunda etapa importante na formação do fuso é a ligação do arranjo aos cromossomos. Os microtúbulos do fuso são ligados a cada cromátide-irmã no *cinetocoro*, uma gigantesca estrutura proteica, com múltiplas camadas, construída sobre a heterocromatina que se forma na região centromérica do cromossomo (**Figura 17-36**). As extremidades mais (+) dos microtúbulos do cinetocoro estão diretamente encaixadas em sítios especializados de ligação a microtúbulos dentro do cinetocoro. Os cinetocoros das células animais contêm de 10 a 40 desses sítios de ligação, ao passo que os cinetocoros de leveduras contêm somente um. Cada sítio de ligação contém um colar proteico que envolve o microtúbulo próximo à sua extremidade, de tal modo a segurar firmemente o microtúbulo ao cinetocoro, embora ainda seja permitido o acréscimo ou a remoção de subunidades de tubulina nesta extremidade (**Figura 17-37**). A regulação da polimerização e da despolimerização da extremidade mais (+) no cinetocoro é crítica ao controle do movimento do cromossomo sobre o fuso, como discutiremos posteriormente.

Para que seus cromossomos mitóticos sejam fixados ao fuso, as células que contêm centrossomos empregam um mecanismo de "busca e captura". As dinâmicas extremidades mais (+) dos microtúbulos se irradiam para fora dos centrossomos e finalmente capturam o cinetocoro de uma cromátide-irmã. Em células pulmonares de tritão, onde podemos observar o evento inicial de captura no microscópio, vê-se o cinetocoro primeiro se ligar à lateral do microtúbulo e, então, deslizar rapidamente ao longo deste em direção ao centrossomo. A ligação lateral ao cromossomo é rapidamente convertida em uma ligação sobre a extremidade.

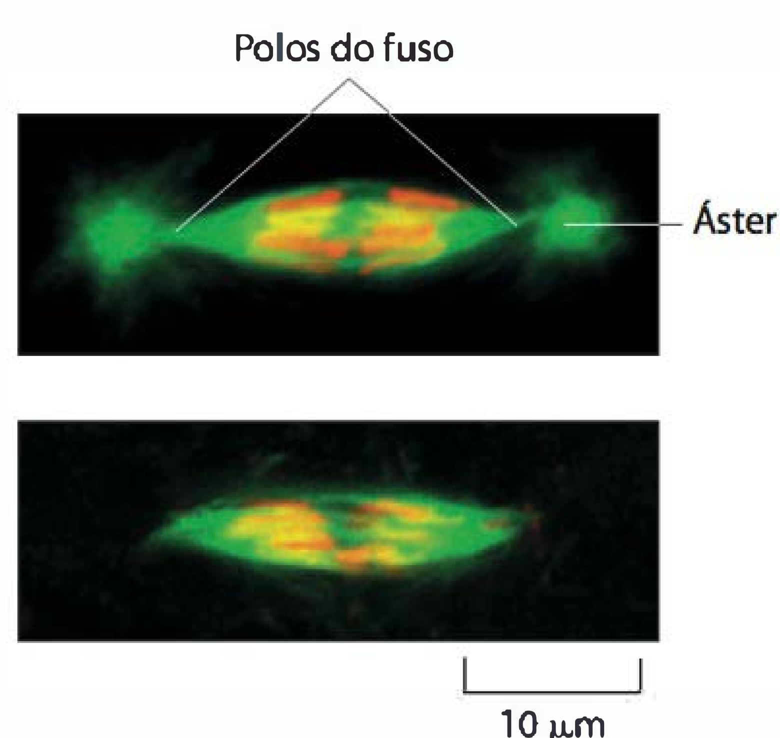


Figura 17-35 Montagem de fuso bipolar sem centrossomos em embriões partenogenéticos do inseto *Sciara* (mosca-dos-fungos ou *fungus gnat*). Os microtúbulos estão corados em *verde*, e os cromossomos em *vermelho*. A micrografia de fluorescência *superior* mostra um fuso normal formado com centrossomos em um embrião de *Sciara* fertilizado normalmente. A micrografia *inferior* mostra um fuso formado sem centrossomos em um embrião que iniciou o desenvolvimento sem fertilização. Note que o fuso com centrossomos tem um áster em cada polo, ao passo que o fuso formado sem centrossomos não. Os dois tipos de fusos são capazes de segregar os cromossomos replicados. (De B. de Saint Phalle e W. Sullivan, *J. Cell Biol.* 141:1383-1391, 1998. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

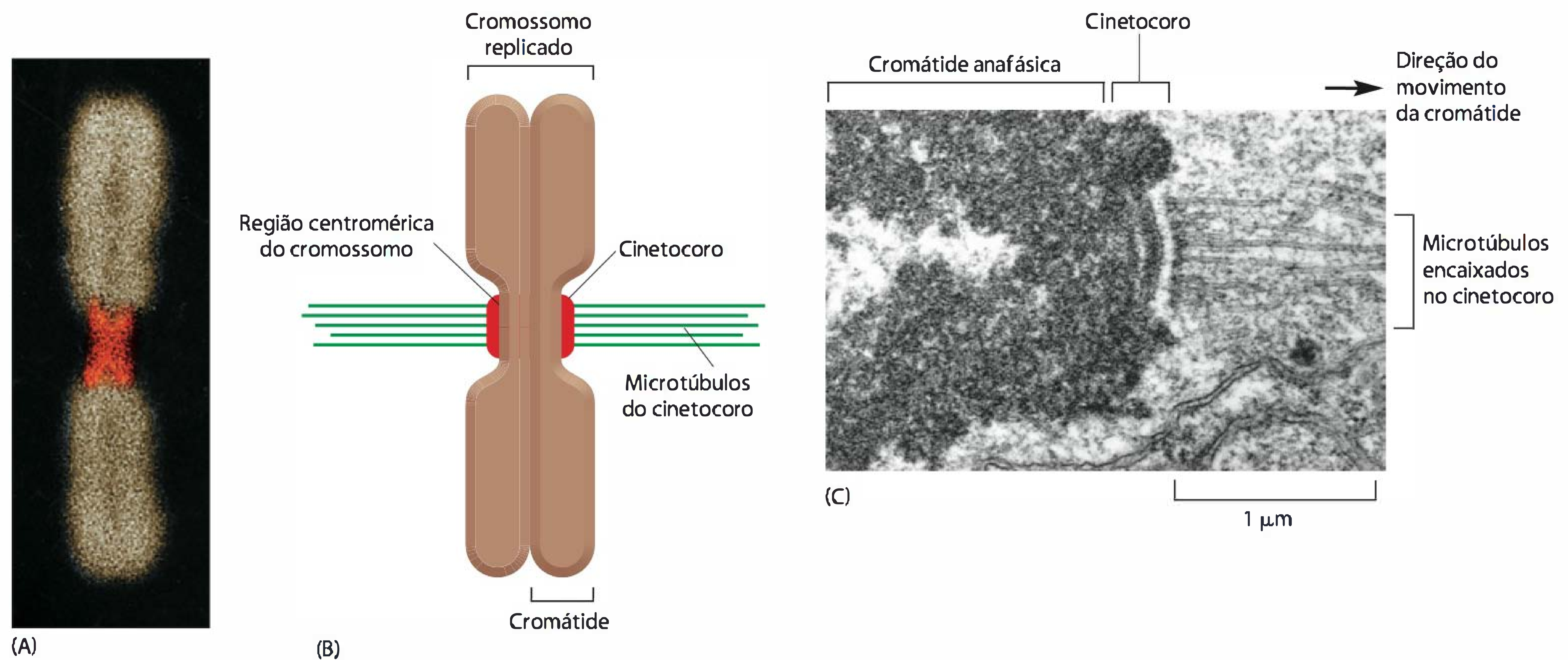


Figura 17-36 O cinetocoro. (A) Micrografia de fluorescência de um cromossomo metafásico corado com um corante fluorescente que se liga ao DNA e com autoanticorpos humanos que reagem com proteínas específicas do cinetocoro. Os dois cinetocoros, um associado a cada cromátide, estão corados em *vermelho*. (B) Desenho de um cromossomo metafásico mostrando suas duas cromátides-irmãs ligadas às extremidades mais (+) dos microtúbulos do cinetocoro. Cada cinetocoro forma uma placa sobre a superfície do centrômero. O número de microtúbulos ligados a um cinetocoro metafásico varia de 1, na levedura de brotamento, a 40, em algumas células de mamíferos. (C) Micrografia eletrônica de uma cromátide anafásica com microtúbulos ligados a seu cinetocoro. Embora a maioria dos cinetocoros tenha uma estrutura trilaminar, o aqui mostrado (de uma alga verde) tem uma estrutura surpreendentemente complexa, com camadas adicionais. (A, cortesia de B.R. Brinkley; C, de J.D. Pickett-Heaps e L.C. Fowke, *Aust. J. Biol. Sci.* 23:71-92, 1970. Com permissão de CSIRO.)

Ao mesmo tempo, os microtúbulos que crescem a partir do polo oposto do fuso se ligam ao cinetocoro no lado oposto do cromossomo, formando uma junção bipolar (**Figura 17-38**).

Como a ligação dos cromossomos ocorre na ausência de centrossomos? Uma possibilidade é que microtúbulos curtos na vizinhança dos cromossomos interajam com cinetocoros e fiquem incrustados nos colares de ligação às extremidades mais (+) do cinetocoro. A polimerização nessas extremidades resultaria, então, no crescimento dos microtúbulos à distância do cinetocoro. As extremidades menos (–) desses microtúbulos do cinetocoro, como outras extremidades menos (–) em fusos livres de centrossomos, ficariam finalmente ligadas em sentido transversal a outras extremidades menos (–) e orientadas por proteínas motoras no polo do fuso (ver Figura 17-34).

A biorientação é obtida por tentativa e erro

O sucesso da mitose demanda que as cromátides-irmãs de um par se liguem a polos opostos do fuso mitótico, de forma que se movam a extremidades opostas da célula quando se separam na anáfase. Como esse modo de ligação, denominado **biorientação**, é obtido? O que impede a ligação de ambos os cinetocoros ao mesmo polo do fuso ou a ligação de um cinetocoro a ambos os polos do fuso? Parte da resposta é que os cinetocoros-irmãos são construídos em uma orientação de costas um para o outro, que reduz a probabilidade de ambos os cinetocoros estarem voltados para o mesmo polo do fuso. Entretanto, ligações incorretas de fato ocorrem, e elegantes mecanismos reguladores foram desenvolvidos para corrigi-las.

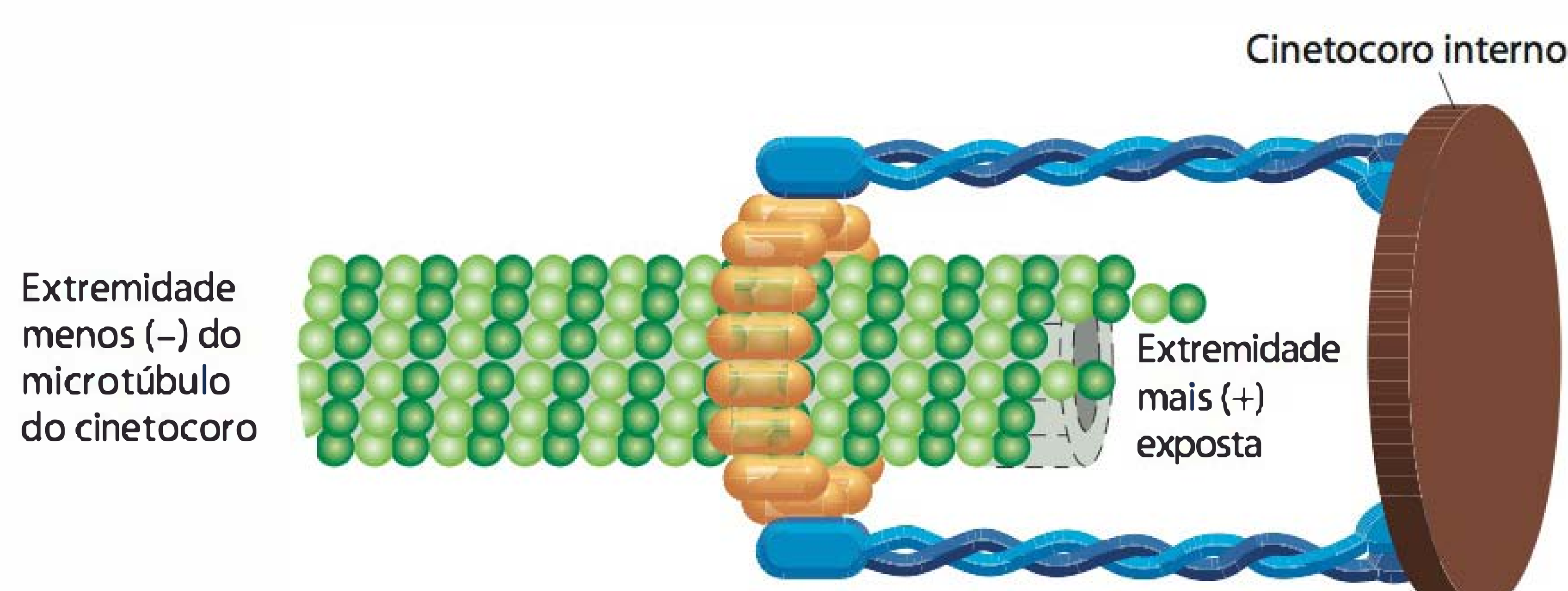


Figura 17-37 Um sítio de ligação a microtúbulo em um cinetocoro. Acredita-se que cada sítio contenha uma estrutura em forma de colar (*amarelo*) que envolve a extremidade mais (+) do microtúbulo, permitindo que a polimerização e a despolimerização ocorram na extremidade mais (+) exposta, enquanto o microtúbulo permanece ligado ao cinetocoro.

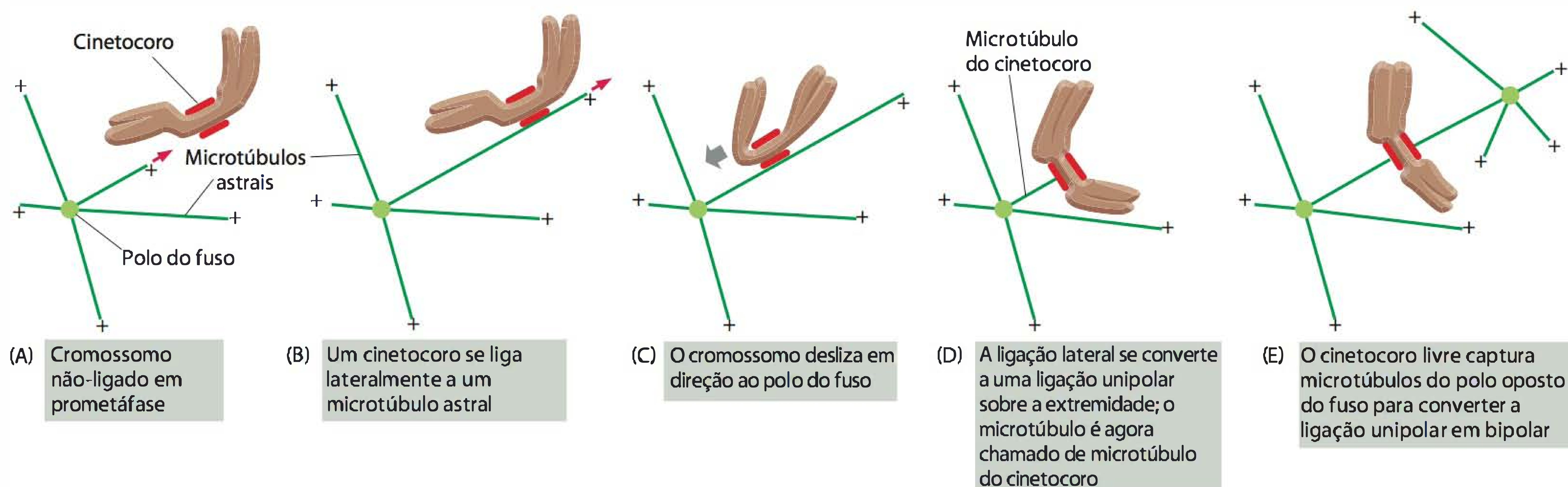


Figura 17-38 Captura de microtúbulos do centrossomo por cinetocoros. A *seta vermelha* em (A) indica a direção de crescimento do microtúbulo, enquanto a *seta cinza* em (C) indica a direção de deslizamento do cromossomo.

Ligações incorretas são corrigidas por um sistema de tentativa e erro que se baseia em um princípio simples: ligações incorretas são altamente instáveis e não duram, ao passo que ligações corretas estão travadas em seu devido lugar. Mas como o cinetocoro detecta uma ligação correta? A resposta parece ser a tensão (**Figura 17-39**). Quando um par de cromátides-irmãs está propriamente biorientado no fuso, os dois cinetocoros são puxados para direções opostas por forças fortes em direção aos polos. A coesão de cromátides-irmãs resiste a essas forças em direção aos polos, criando altos níveis de tensão dentro dos cinetocoros. Quando os cromossomos estão incorretamente ligados – quando ambas as cromátides-irmãs estão ligadas ao mesmo polo do fuso, por exemplo – a tensão é baixa, e o cinetocoro envia um sinal inibitório que relaxa o controle de seu sítio de ligação ao microtúbulo, permitindo que a separação ocorra. Quando a biorientação ocorre, a alta tensão no cinetocoro corta o sinal inibidor, fortalecendo a ligação do microtúbulo. Em células animais, a tensão não somente aumenta a afinidade do sítio de ligação, mas também leva à ligação de microtúbulos adicionais ao cinetocoro. Isso resulta na formação de uma espessa *fibra de cinetocoro*, composta de múltiplos microtúbulos.

O mecanismo de detecção da tensão depende da proteína-cinase aurora-B, que está associada ao cinetocoro. Acredita-se que a aurora-B gere o sinal inibidor que reduz a força de ligação do microtúbulo na ausência de tensão. Ela fosforila vários componentes do sítio de ligação a microtúbulo, diminuindo a afinidade do sítio por uma extremidade mais (+) do microtúbulo. A aurora-B é inativada quando a biorientação ocorre, reduzindo com isso a fosforilação do cinetocoro e aumentando a afinidade do sítio de ligação.

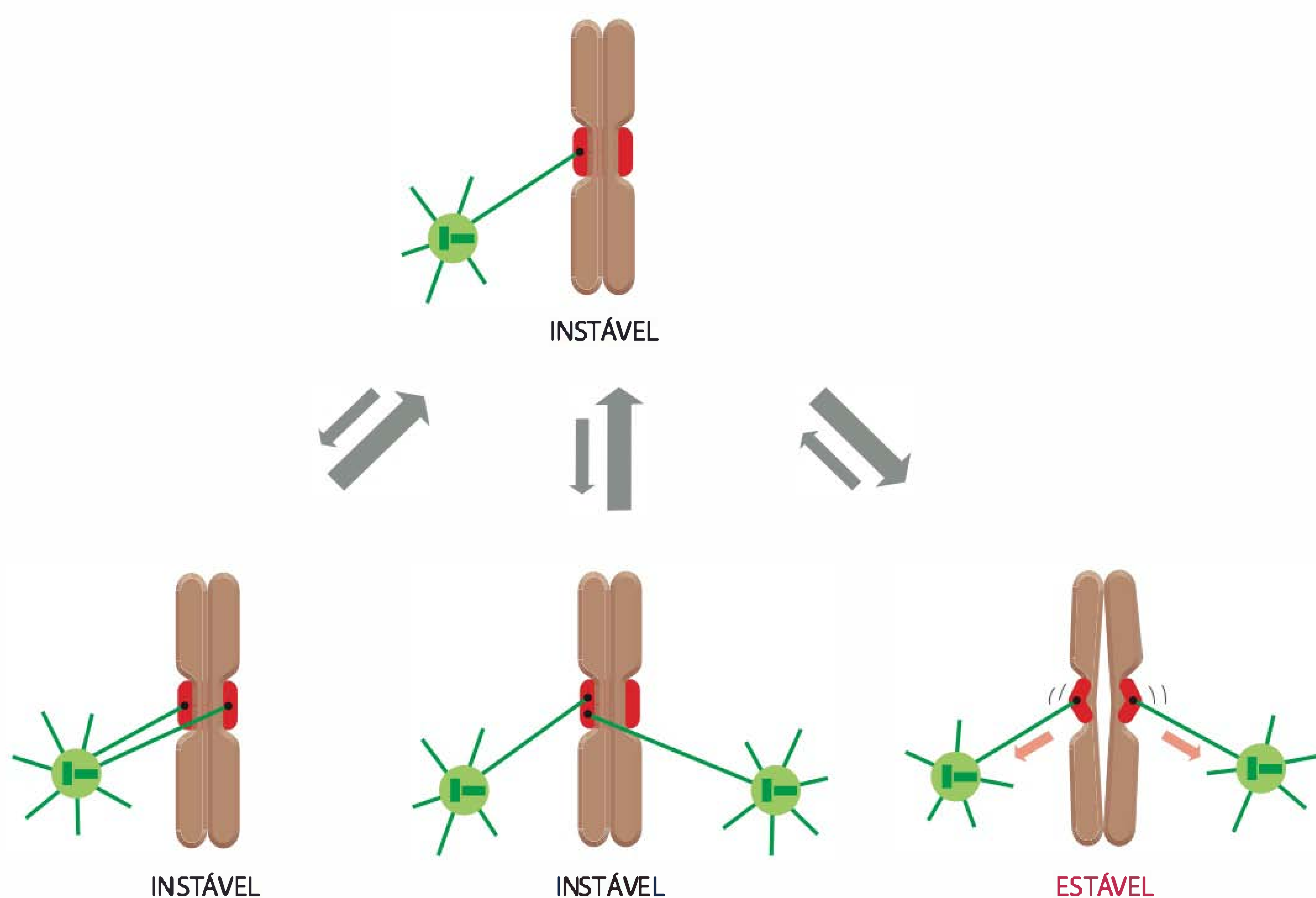


Figura 17-39 Formas alternativas de ligação ao cromossomo. Inicialmente, um único microtúbulo de um polo do fuso se liga a um cinetocoro em um par de cromátides-irmãs. Microtúbulos adicionais podem então se ligar ao cromossomo de várias maneiras. Um microtúbulo do mesmo polo do fuso pode se ligar ao outro cinetocoro-irmão, ou microtúbulos de ambos os polos do fuso podem se ligar a um cinetocoro. Contudo, essas ligações incorretas são instáveis, de forma que um dos dois microtúbulos tende a se dissociar. Quando um segundo microtúbulo do polo oposto se liga ao segundo cinetocoro, acredita-se que os cinetocoros-irmãos detectem a tensão através de seus sítios de ligação a microtúbulos, o que provoca um aumento da afinidade de ligação ao microtúbulo. Essa ligação correta está, portanto, travada em seu devido lugar.

Em seguida a sua ligação aos dois polos do fuso, os cromossomos são arrastados para trás e para frente, assumindo, finalmente, uma posição equidistante entre os dois polos do fuso, uma posição chamada de **placa metafásica**. Em células de vertebrados, os cromossomos oscilam gentilmente na placa metafásica, aguardando o sinal para que as cromátides-irmãs se separem. O sinal é produzido, com um tempo previsível de atraso, após a ligação bipolar do último dos cromossomos, como discutiremos posteriormente.

Múltiplas forças movem os cromossomos no fuso

Proteínas motoras e outros mecanismos geram as forças que movem os cromossomos nos microtúbulos do fuso mitótico. Acredita-se que três forças principais sejam particularmente importantes.

A primeira força principal puxa o cinetocoro e seu cromossomo associado ao longo do microtúbulo do cinetocoro em direção ao polo do fuso. Ela é produzida por proteínas do próprio cinetocoro. Por um mecanismo incerto, a despolimerização na extremidade mais (+) do microtúbulo gera, de alguma forma, uma força que puxa o cinetocoro em direção aos polos (**Figura 17-40**). Essa força traciona os cromossomos durante a prometáfase e a metáfase e é particularmente importante para mover as cromátides-irmãs em direção aos polos, após elas se separarem na anáfase, como discutiremos posteriormente. Curiosamente, essa força em direção aos polos gerada pelo cinetocoro não necessita de ATP. Isso poderia, em princípio, parecer implausível, mas mostrou-se que cinetocoros purificados em um tubo de ensaio, sem ATP presente, podem permanecer ligados a microtúbulos em despolimerização e, assim, se mover. A energia que dirige o movimento é armazenada no microtúbulo, sendo liberada quando o microtúbulo se despolimeriza; ela na verdade vem da hidrólise de GTP que ocorre após uma subunidade de tubulina ser adicionada à extremidade de um microtúbulo (discutido no Capítulo 16).

Uma segunda força em direção aos polos é proporcionada, em alguns tipos celulares, pelo **fluxo de microtúbulos**, de tal modo que os próprios microtúbulos são movidos em direção aos polos do fuso e desintegrados em suas extremidades menos (–). Até o início da anáfase, a adição de tubulina nova à extremidade mais (+) de um microtúbulo contrabalança a perda de tubulina na extremidade menos (–), de forma que o comprimento do microtúbulo permanece constante, a despeito do movimento de microtúbulos em direção ao polo do fuso. O fluxo de microtúbulos em fusos metafásicos pode ser visto por meio de um método engenhoso, no qual quantidades muito pequenas de tubulina fluorescente são injetadas em células vivas (**Figura 17-41**). Isso resulta no aparecimento de minúsculas manchas fluorescentes que migram em direção aos polos, tanto sobre o cinetocoro como sobre os microtúbulos interpolares. Qualquer cinetocoro que esteja ligado a um microtúbulo sofrendo tal fluxo experimenta uma força em direção ao polo, que contribui à geração de tensão no cinetocoro e ao movimento das cromátides-irmãs em direção aos polos, após elas se separarem na anáfase.

Uma terceira força que atua sobre os cromossomos é a *força de ejeção polar*. Os motores de cinesina-4 e 10 orientados para a extremidade mais (+) nos braços cromossômicos interagem com microtúbulos interpolares e transportam os cromossomos para longe dos polos do fuso. Essa força é particularmente importante na prometáfase e na metáfase, quando ajuda a alinhar os pares de cromátides-irmãs biorientados na placa metafásica (**Figura 17-42**).

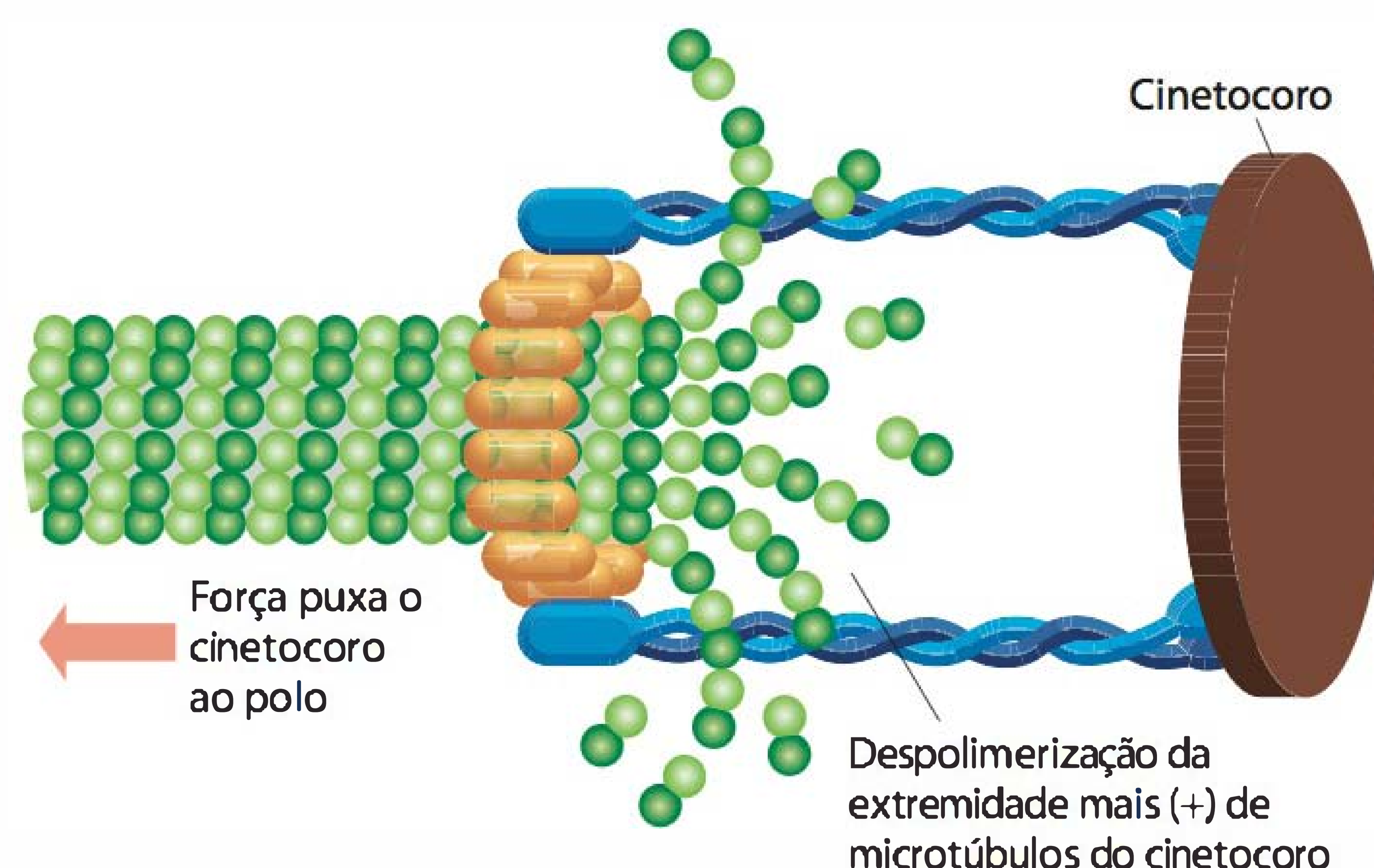


Figura 17-40 Como a despolimerização pode puxar o cinetocoro em direção ao polo do fuso. Quando ocorre a despolimerização, os protofilamentos do microtúbulo se torcem para fora (ver Figura 16-16) e fazem pressão contra a estrutura em forma de colar que envolve a extremidade mais (+) do microtúbulo. Em princípio, isso moverá o cinetocoro em direção à extremidade menos (–) do microtúbulo no polo do fuso.

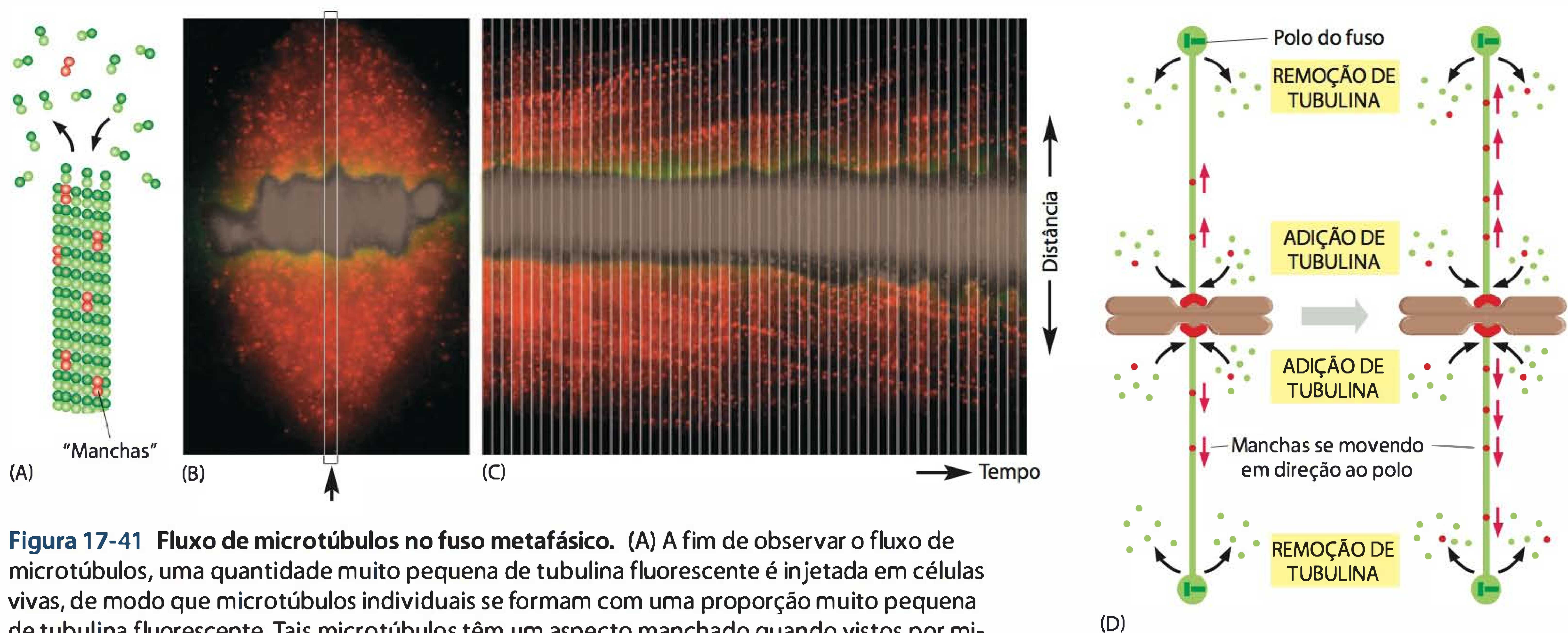


Figura 17-41 Fluxo de microtúbulos no fuso metafásico. (A) A fim de observar o fluxo de microtúbulos, uma quantidade muito pequena de tubulina fluorescente é injetada em células vivas, de modo que microtúbulos individuais se formam com uma proporção muito pequena de tubulina fluorescente. Tais microtúbulos têm um aspecto manchado quando vistos por microscopia de fluorescência. (B) Micrografias de fluorescência de um fuso mitótico em uma célula epitelial pulmonar de tritão vivo. Os cromossomos estão corados em *marrom*, e as manchas de tubulina em *vermelho*. (C) O movimento de manchas individuais pode ser acompanhado por videomicroscopia em diferentes intervalos de tempo. Imagens da região comprida e fina assinalada (*seta*) em (B) foram tiradas em tempos sequenciais e coladas lado a lado, a fim de fazer uma montagem da região ao longo do tempo. Podem-se ver manchas individuais se movendo em direção aos polos a uma taxa de cerca de 0,75 μm/min, indicando que os microtúbulos estão se movendo em direção aos polos. (D) O comprimento dos microtúbulos no fuso metafásico não se altera significativamente, porque novas subunidades de tubulina são adicionadas à extremidade mais (+) do microtúbulo à mesma taxa que subunidades de tubulina são removidas da extremidade menos (–). (B e C, de T. J. Mitchison e E. D. Salmon, *Nat. Cell Biol.* 3:E17-21, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Um dos aspectos mais extraordinários da mitose em células de vertebrados é o contínuo movimento oscilatório dos cromossomos em prometáfase e metáfase. Quando estudados por videomicroscopia em células pulmonares de tritão, observa-se a alternância dos movimentos entre dois estados – um estado em direção aos polos (P), quando os cromossomos são puxados em direção ao polo, e um estado em direção oposta aos polos (AP), ou neutro, quando forças em direção ao polo são desligadas e a força de ejeção polar afasta os cromossomos do polo. A alternância entre os dois estados pode depender do grau de tensão presente no cinetocoro. Tem-se proposto, por exemplo, que à medida que os cromossomos se movem em direção ao polo do fuso, uma força de ejeção polar crescente gera tensão no cinetocoro mais próximo ao polo, provocando uma alternância

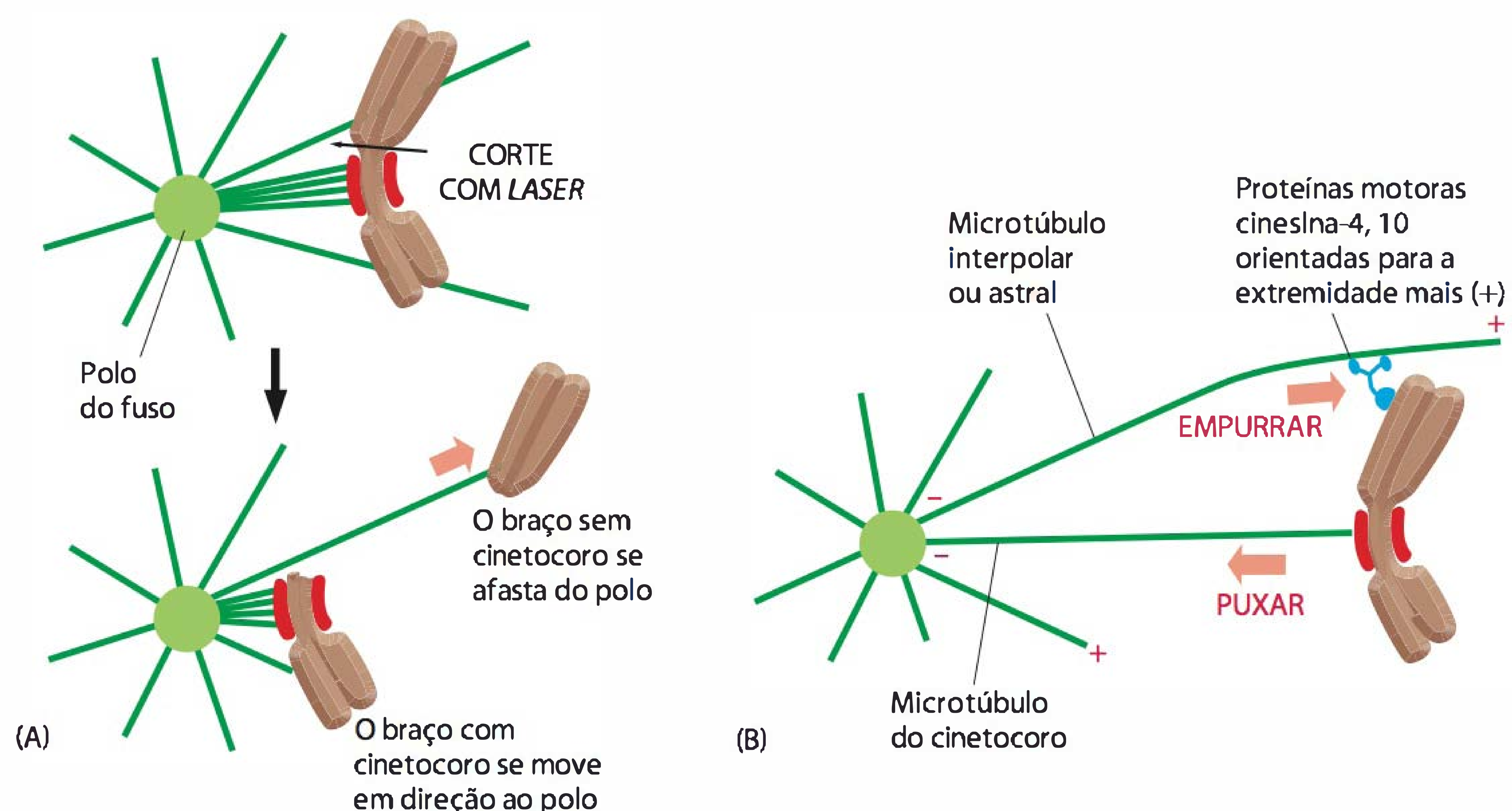


Figura 17-42 Como forças opostas podem dirigir os cromossomos à placa metafásica. (A) Evidência de uma força de ejeção polar que afasta os cromossomos dos polos do fuso em direção ao equador do fuso. Neste experimento, um feixe de *laser* corta um cromossomo em prometáfase que está ligado a um único polo por microtúbulos do cinetocoro. A parte do cromossomo cortado sem um cinetocoro rapidamente se afasta do polo, ao passo que a parte com o cinetocoro se move em direção ao polo, refletindo uma diminuição de repulsão. (B) Modelo de como duas forças opostas podem cooperar para mover os cromossomos para a placa metafásica. Acredita-se que proteínas motoras orientadas para a extremidade mais (+) (cinesina-4 e cinesina-10) nos braços cromossômicos interajam com microtúbulos e gerem a força de ejeção polar, que empurra os cromossomos em direção ao equador do fuso (ver Figura 17-30). Acredita-se que forças em direção aos polos geradas por despolimerização no cinetocoro, juntamente com o fluxo de microtúbulos, puxem os cromossomos em direção ao polo.

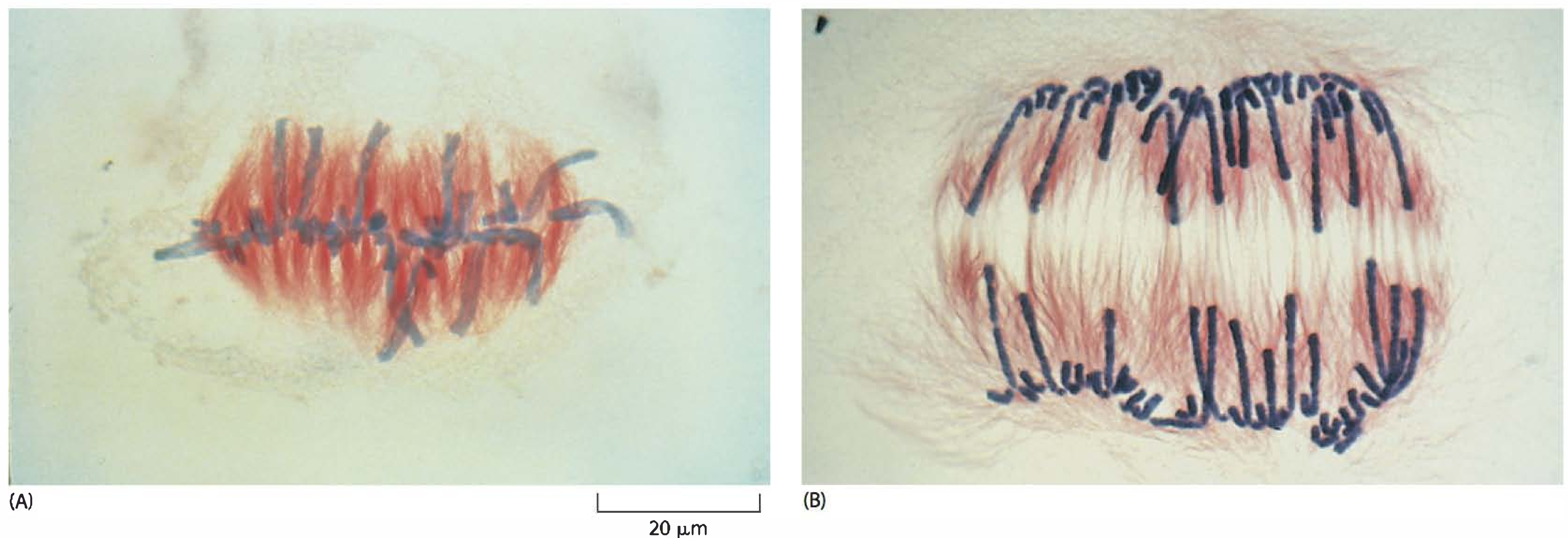


Figura 17-43 Separação da cromátide-irmã na anáfase. Na transição da metáfase (A) para anáfase (B), as cromátides-irmãs se separam subitamente e se movem em direção a polos opostos do fuso mitótico – como mostrado nessas micrografias ópticas de células do endosperma de *Haemanthus* (lírio) que foram coradas com anticorpos marcados com ouro contra a tubulina. (Cortesia de Andrew Bajer.)

ao estado em direção oposta aos polos e resultando, gradativamente, no acúmulo de cromossomos no equador do fuso.

O APC/C provoca a separação da cromátide-irmã e a conclusão da mitose

Após a M-Cdk ter desencadeado os complexos rearranjos que ocorrem no início da mitose, o ciclo celular atinge seu clímax com a separação das cromátides-irmãs na transição entre metáfase e anáfase (**Figura 17-43**). Ainda que a atividade da M-Cdk monte o palco para esse evento, o complexo promotor da anáfase (APC/C) anteriormente discutido vira o interruptor que inicia a separação das cromátides-irmãs, ao ubiquitinar várias proteínas reguladoras mitóticas e, com isso, desencadear sua destruição (ver Figura 17-20A).

Durante a metáfase, coesinas que mantêm as cromátides-irmãs unidas resistem às forças em direção aos polos que separam as cromátides-irmãs. A anáfase começa com uma súbita disrupção da coesão de cromátides-irmãs, que permite às irmãs se separarem e se moverem a polos opostos do fuso. O APC/C inicia o processo ao direcionar a proteína inibidora **securina** à destruição. Antes da anáfase, a securina se liga e inibe a atividade de uma protease chamada de **separase**. A destruição da securina, no final da metáfase, libera a separase, que então fica livre para clivar uma das subunidades de coesina. As coesinas perdem força, e as cromátides-irmãs se separam abrupta e sincronicamente (**Figura 17-44**).

Além da securina, o APC/C também direciona as S-ciclinas e as M-ciclinas à destruição, levando à perda da maioria da atividade das Cdks na anáfase. A inativação das Cdks permite que fosfatases desfosforilem muitos dos substratos-alvo de Cdks na célula, como requerido à conclusão da mitose e da citocinese (discutido posteriormente).

Se o APC/C desencadeia a anáfase, o que ativa o APC/C? Sabe-se apenas parte da resposta. Como anteriormente mencionado, a ativação do APC/C requer a proteína Cdc20, que se liga e ativa o APC/C na mitose (ver Figura 17-20A). Ao menos dois processos regulam a Cdc20 e sua associação ao APC/C. Primeiro, a síntese de Cdc20 aumenta à medida que a célula se aproxima da mitose, devido a um aumento da transcrição de seu gene. Segundo, a fosforilação do APC/C auxilia a Cdc20 a se ligar ao APC/C, ajudando, com isso, a criar um complexo ativo. Entre as cinases que fosforilam e, consequentemente, ativam o APC/C está a M-Cdk. Portanto, a M-Cdknão somente desencadeia os eventos mitóticos iniciais que levam à metáfase, mas também monta o palco para a progressão à anáfase. A capacidade da M-Cdk de promover a atividade do Cdc20-APC/C cria um circuito de retroalimentação negativa: a M-Cdk põe em movimento um processo regulador que leva à destruição de ciclinas e, portanto, a sua própria inativação.

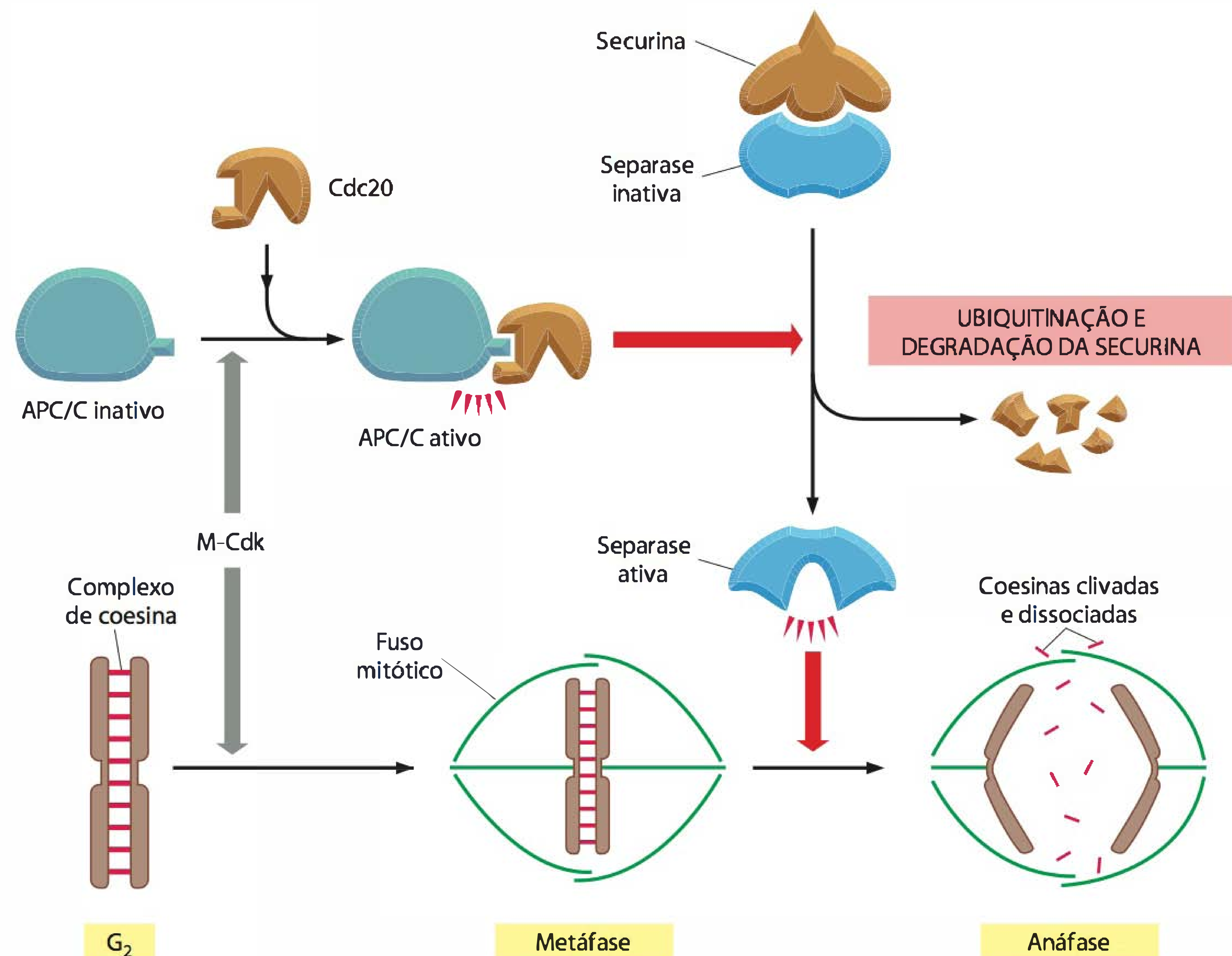


Figura 17-44 O início da separação das cromátides-irmãs pelo APC/C. A ativação do APC/C pela Cdc20 leva à ubiquitinação e à destruição da securina, que normalmente mantém a separase em um estado inativo. A destruição da securina permite à separase clivar Scc1, uma subunidade do complexo de coesina que mantém as cromátides-irmãs unidas (ver Figura 17-24). As forças que tracionam o fuso mitótico separam, então, as cromátides-irmãs. Em células animais, a fosforilação por Cdks também inibe a separase (não-mostrado). Assim, a inativação das Cdks na anáfase (resultante da destruição de ciclinas) também promove a ativação da separase, ao propiciar sua desfosforilação.

Cromossomos não-ligados bloqueiam a separação da cromátide-irmã: o ponto de verificação da montagem do fuso

As células normalmente passam cerca de metade da mitose em metáfase, com os cromossomos alinhados na placa metafásica, chocando-se uns contra os outros e esperando o sinal do APC/C que induz a separação das cromátides-irmãs. Substâncias que desestabilizam os microtúbulos, como a colchicina ou a vimblastina (discutido no Capítulo 16), sequestram as células em mitose por horas ou mesmo dias. Essa observação levou à identificação de um mecanismo chamado **ponto de verificação da montagem do fuso**, que é ativado pelo tratamento com substâncias e bloqueia a progressão à transição entre metáfase e anáfase. O mecanismo do ponto de verificação assegura que a célula não entre na anáfase até que todos os cromossomos estejam corretamente biorientados no fuso mitótico.

O ponto de verificação da montagem do fuso depende de um mecanismo sensor que monitora a força da ligação dos microtúbulos, e possivelmente a tensão, no cinetocoro. Qualquer cinetocoro que não esteja devidamente ligado ao fuso emite um sinal negativo que bloqueia a ativação do Cdc20-APC/C e, assim, bloqueia a transição entre metáfase e anáfase. Esse bloqueio é removido somente quando o último cinetocoro estiver devidamente ligado, permitindo que a separação das cromátides-irmãs ocorra.

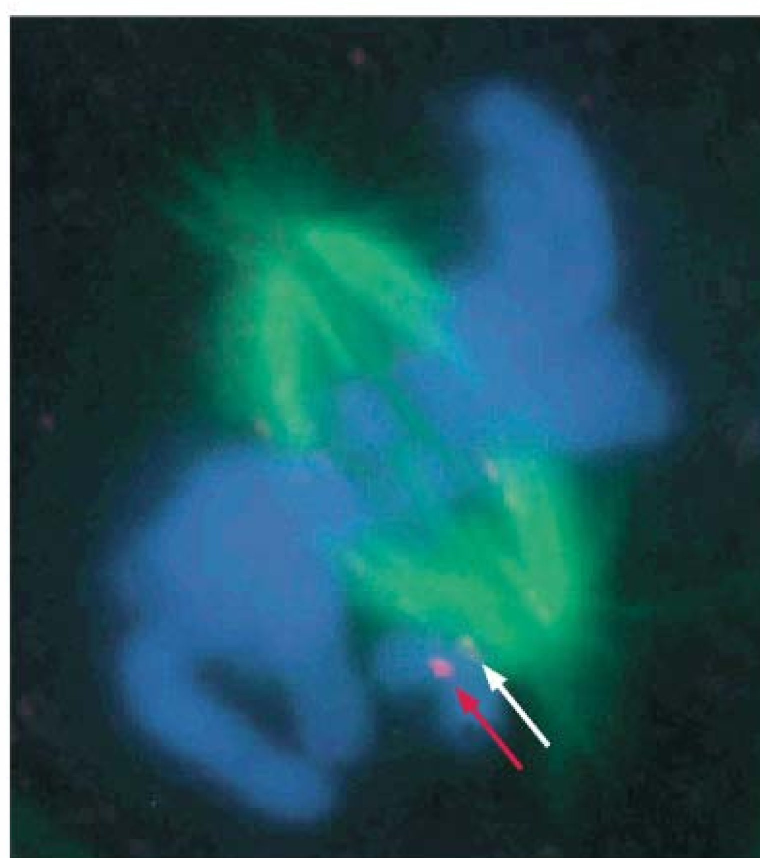


Figura 17-45 A proteína Mad2 em cinetocoros não-ligados. Esta micrografia de fluorescência mostra uma célula de mamífero em prometáfase, com o fuso mitótico em *verde* e as cromátides-irmãs em *azul*. Um par de cromátides-irmãs está ligado a um único polo do fuso. A marcação colorida com anticorpos anti-Mad2 indica que a Mad2 está ligada ao cinetocoro da cromátide-irmã não-ligada (*ponto vermelho*, indicado pela *seta vermelha*). Uma pequena quantidade de Mad2 se associa ao cinetocoro da cromátide-irmã que está ligada ao polo do fuso (*ponto claro*, indicado pela *seta branca*). (De J. C. Waters et al., *J. Cell Biol.* 141:1181-1191, 1998. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

Acredita-se que cinetocoros ligados de forma incorreta gerem, de algum modo, um sinal difusível que inibe a atividade do Cdc20-APC/C em toda a célula. A base molecular desse sinal não está clara, embora várias proteínas, incluindo a *Mad2*, sejam recrutadas a cinetocoros não-ligados e sejam necessárias ao funcionamento do ponto de verificação da montagem do fuso (**Figura 17-45**). Uma possibilidade interessante, com base originalmente em detalhadas análises estruturais da Mad2, é que o cinetocoro não-ligado atue como uma enzima que catalisa uma mudança na conformação da Mad2, de forma que a Mad2 possa se ligar ao Cdc20-APC/C e inibi-lo.

Em células somáticas de mamíferos, o ponto de verificação da montagem do fuso determina o momento normal da anáfase. A destruição da securina nessas células começa momentos após o último par de cromátides-irmãs ficar biorientado no fuso, e a anáfase começa cerca de 20 minutos mais tarde. A inibição experimental do mecanismo do ponto de verificação causa a separação prematura das cromátides-irmãs e a anáfase. Surpreendentemente, o momento normal da anáfase não depende do ponto de verificação da montagem do fuso em algumas células, como leveduras e as células de embriões jovens de rãs e moscas. Algum outro mecanismo, ainda desconhecido, deve determinar o momento da anáfase nessas células.

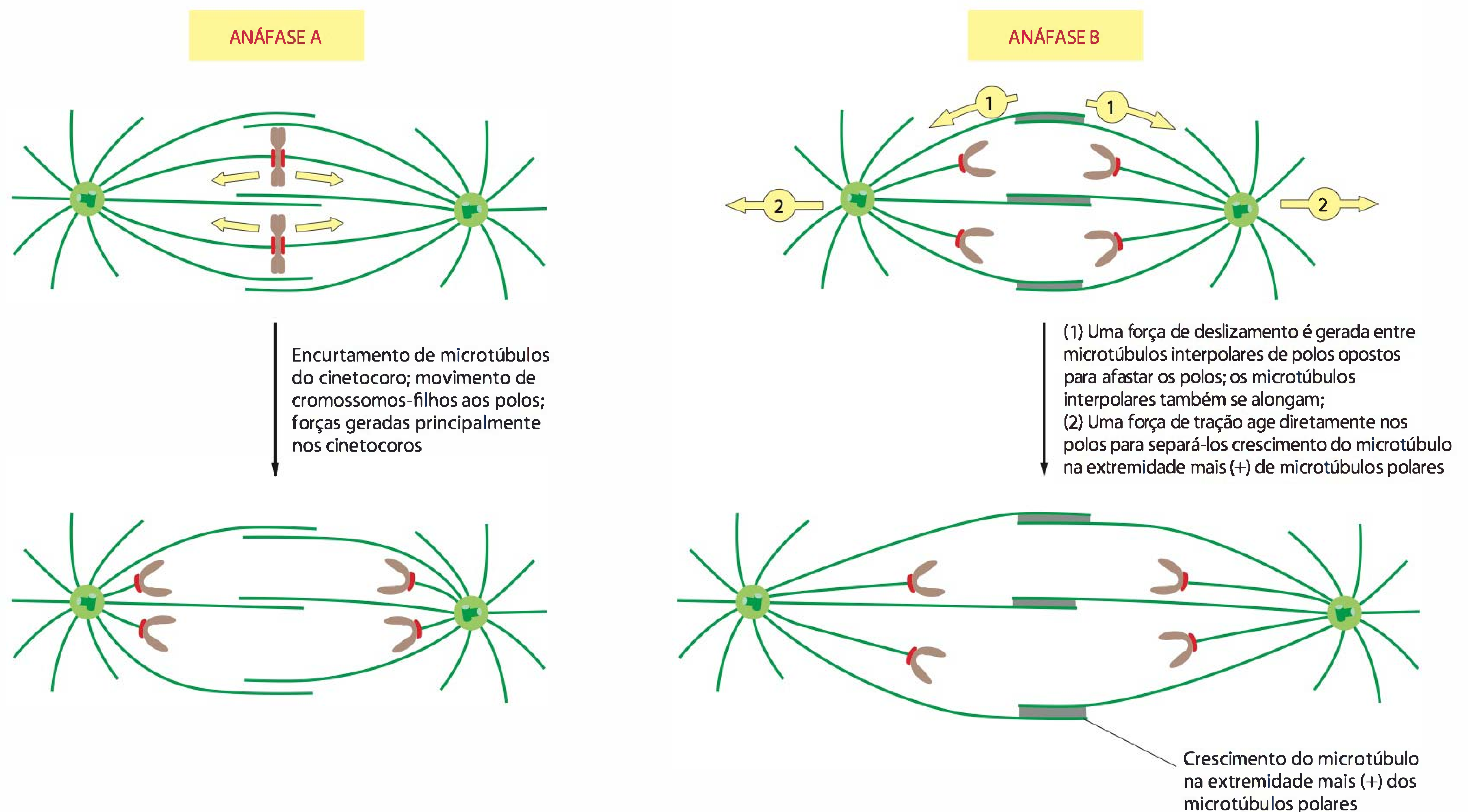


Figura 17-46 As principais forças que separam as cromátides-irmãs na anáfase em células de mamíferos. O movimento dos cromossomos em direção aos polos na anáfase A depende da despolimerização dos microtúbulos do cinetocoro e do fluxo de microtúbulos em direção aos polos. Na anáfase B, os dois polos do fuso se movem separadamente. Acredita-se que duas forças separadas sejam responsáveis pela anáfase B: o alongamento e o deslizamento dos microtúbulos interpolares, ao passarem uns sobre os outros no fuso central, empurram os polos à distância, e proteínas motoras ligadas à membrana plasmática e próximas a cada polo do fuso agem nos microtúbulos astrais, tracionando e afastando um polo do outro, em direção à superfície celular.

Os cromossomos se segregam na anáfase A e B

A perda repentina da coesão de cromátides-irmãs no início da anáfase leva à separação das cromátides-irmãs, o que possibilita que as forças do fuso mitótico puxem as irmãs a polos opostos da célula – chamada de *segregação cromossômica*. Os cromossomos se movem por meio de dois processos independentes e que se sobrepõem. O primeiro, reportado como **anáfase A**, é o movimento inicial dos cromossomos em direção aos polos, que é acompanhado pelo encurtamento dos microtúbulos do cinetocoro. O segundo, reportado como **anáfase B**, é a separação dos próprios polos do fuso, que começa após as cromátides-irmãs terem se separado e os cromossomos-irmãos terem se distanciado uma certa extensão (**Figura 17-46**).

O movimento dos cromossomos na anáfase A depende de uma combinação das duas principais forças em direção aos polos anteriormente descritas. A primeira é a força gerada pela despolimerização dos microtúbulos no cinetocoro, que resulta na perda de subunidades de tubulina na extremidade mais (+) à medida que o cinetocoro se move em direção ao polo. A segunda é propiciada pelo fluxo de microtúbulos, que é o movimento dos microtúbulos em direção ao polo do fuso, onde ocorre a despolimerização da extremidade menos (–). A importância relativa dessas duas forças durante a anáfase varia em diferentes tipos celulares: em células embrionárias, por exemplo, o movimento dos cromossomos depende principalmente do fluxo de microtúbulos, ao passo que o movimento em células de leveduras e células somáticas de vertebrados resulta primariamente de forças geradas no cinetocoro.

A separação do polo do fuso durante a anáfase B depende de mecanismos dirigidos por motores, similares àqueles que separam os dois centrossomos no início da mitose (ver Figura 17-30). As proteínas motoras cinesina-5 orientadas para a extremidade mais (+), que ligam transversalmente as extremidades mais (+) sobrepostas dos microtúbulos interpolares, afastam os polos. Além disso, motores de dineína que ancoram as extremidades mais (+) dos microtúbulos astrais ao córtex da célula tracionam e distanciam os polos.

Embora a separação das cromátides-irmãs inicie os movimentos cromossômicos da anáfase A, outros mecanismos também asseguram movimentos corretos dos cromossomos na anáfase A e o alongamento do fuso na anáfase B. Mais do que isso, a conclusão de uma anáfase normal depende da desfosforilação de substratos das Cdks, que na maioria das células resulta da destruição, dependente de APC/C, de ciclinas. Se a destruição da M-ciclina é impedida – pela produção de uma forma mutante que não é reconhecida pelo APC/C, por exemplo – a separação das cromátides-irmãs geralmente ocorre, mas os movimentos cromossômicos e o comportamento dos microtúbulos da anáfase são anormais.

As contribuições relativas da anáfase A e da anáfase B à segregação cromossômica variam muito, dependendo do tipo celular. Em células de mamíferos, a anáfase B começa pouco depois da anáfase A e para quando o fuso tem aproximadamente o dobro de seu comprimento na metáfase; por outro lado, os fusos de leveduras e de certos protozoários usam a anáfase B primariamente para separar os cromossomos em anáfase, e no processo seus fusos se alongam até 15 vezes o comprimento na metáfase.

Os cromossomos segregados são empacotados em núcleos-filhos na telófase

No final da anáfase, os cromossomos-filhos se segregaram em dois grupos iguais em extremidades opostas da célula. Na **telófase**, o estágio final da mitose, os dois conjuntos de cromossomos são empacotados em um par de núcleos-filhos. O primeiro evento principal da telófase é a desmontagem do fuso mitótico, seguida pela reformação do envelope nuclear. Inicialmente, fragmentos da membrana nuclear se associam à superfície de cromossomos individuais. Esses fragmentos de membrana se fundem para envolver parcialmente grupos de cromossomos, e depois coalescem para formar novamente o envelope nuclear completo. Complexos de poros nucleares são incorporados ao envelope, a lâmina nuclear se forma novamente, e o envelope mais uma vez se torna contínuo com o retículo endoplasmático. Uma vez reformado o envelope nuclear, os complexos de poros bombeiam proteínas nucleares para o interior, o núcleo se expande, e os cromossomos mitóticos condensados são reorganizados em seu estado interfásico, possibilitando a retomada da transcrição gênica. Um novo núcleo foi criado, e a mitose está completa. Tudo o que resta à célula é concluir sua divisão em duas.

Vimos anteriormente que a fosforilação de várias proteínas pela M-Cdk promove a montagem do fuso, a condensação dos cromossomos e a desintegração do envelope nuclear no início da mitose. Portanto, não é surpreendente que a desfosforilação dessas mesmas proteínas seja necessária à desmontagem do fuso e à reformação de núcleos-filhos na telófase. Em princípio, essas desfosforilações e a conclusão da mitose poderiam ser provocadas pela inativação de Cdks, pela ativação de fosfatases, ou por ambas. Embora a inativação de Cdks – resultante primariamente da destruição de ciclinas – seja a principal responsável na maioria das células, algumas células também dependem da ativação de fosfatases. Na levedura de brotamento, por exemplo, a conclusão da mitose depende da ativação de uma fosfatase chamada de *Cdc14*, que desfosforila um subconjunto de substratos de Cdks envolvido na anáfase e na telófase.

A meiose é uma forma especial de divisão nuclear envolvida na reprodução sexuada

A maioria dos organismos eucarióticos se reproduz sexuadamente: os genomas de dois pais se misturam para gerar uma descendência geneticamente distinta de ambos os progenitores (discutido no Capítulo 21). Em geral, as células desses organismos são *diploides*, isto é, contêm duas cópias ligeiramente diferentes, ou *homólogas*, de cada cromossomo, uma de cada progenitor. A reprodução sexuada depende de um processo especializado de divisão nuclear chamado de *meiose*, que produz células *haploides* que portam somente uma única cópia de cada cromossomo. Em muitos organismos, as células haploides se diferenciam em células reprodutivas especializadas chamadas de *gametas* – óvulos e espermatozoides na maioria das espécies. Nessas espécies, o ciclo reprodutivo termina quando um espermatozoide e um óvulo se fundem para formar um zigoto diploide, com potencial de formar um novo indivíduo. Aqui, consideraremos os mecanismos básicos e a regulação da meiose, enfatizando como eles se comparam àqueles da mitose. A meiose é discutida mais detalhadamente no Capítulo 21.

A meiose começa com um ciclo de duplicação dos cromossomos, chamado de *fase S meiótica*, seguido de dois ciclos de segregação cromossômica, chamados de *meiose I* e *meiose II*. A meiose I segrega os homólogos (cada um composto de um par de cromátides-irmãs firmemente ligadas). A meiose II, como a mitose convencional, segrega as cromátides-irmãs de cada homólogo (**Figura 17-47**).

A primeira divisão meiótica resolve o problema central da meiose: como segregar os cromossomos homólogos. À semelhança da segregação das cromátides-irmãs na mitose, a segregação dos homólogos na meiose I depende da formação de ligações entre os homólo-

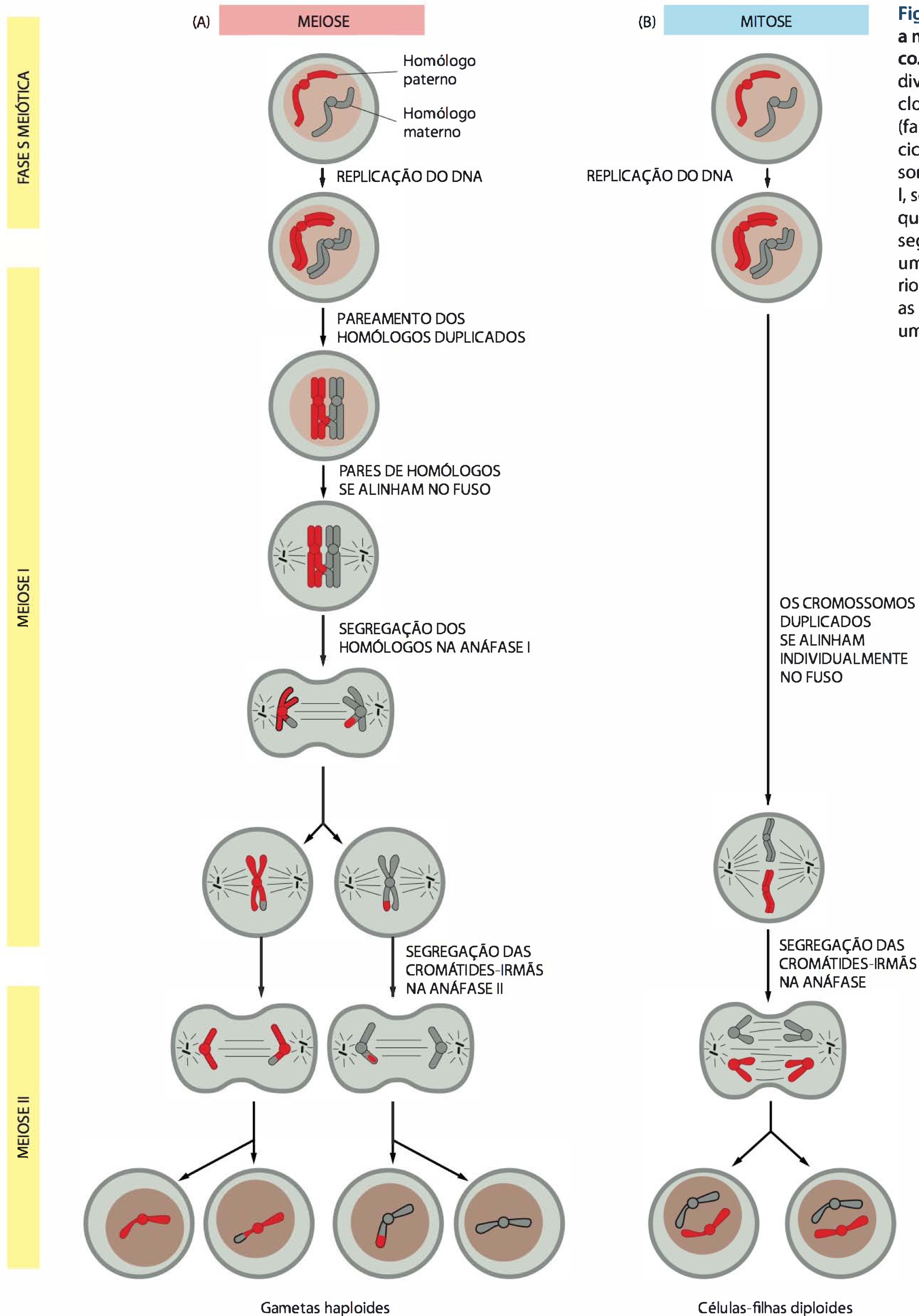


Figura 17-47 Comparação entre a meiose e o ciclo celular mitótico. (A) A meiose é uma forma de divisão nuclear na qual um único ciclo de duplicação dos cromossomos (fase S meiótica) é seguido por dois ciclos de segregação dos cromossomos. O primeiro ciclo, a meiose I, segrega os homólogos, ao passo que o segundo ciclo, a meiose II, segrega as cromátides-irmãs. (B) Em um ciclo celular mitótico, ao contrário, os homólogos não se pareiam, e as cromátides-irmãs se separam em uma única divisão.

gos. Essas ligações permitem que os pares de homólogos estejam biorientados no primeiro fuso meiótico, com os homólogos de um par ligados a polos opostos. A ligação dos homólogos é removida no início da anáfase I, possibilitando ao fuso puxar os homólogos a extremidades opostas da célula.

As ligações se formam entre os homólogos por meio de um processo notavelmente complexo e prolongado que ocorre após a fase S meiótica, em um período chamado de *prófase meiótica*, ou *prófase I*. Esse processo começa com o *pareamento* dos homólogos, pelo qual os homólogos gradativamente se aproximam um do outro no núcleo – resultado, principal-

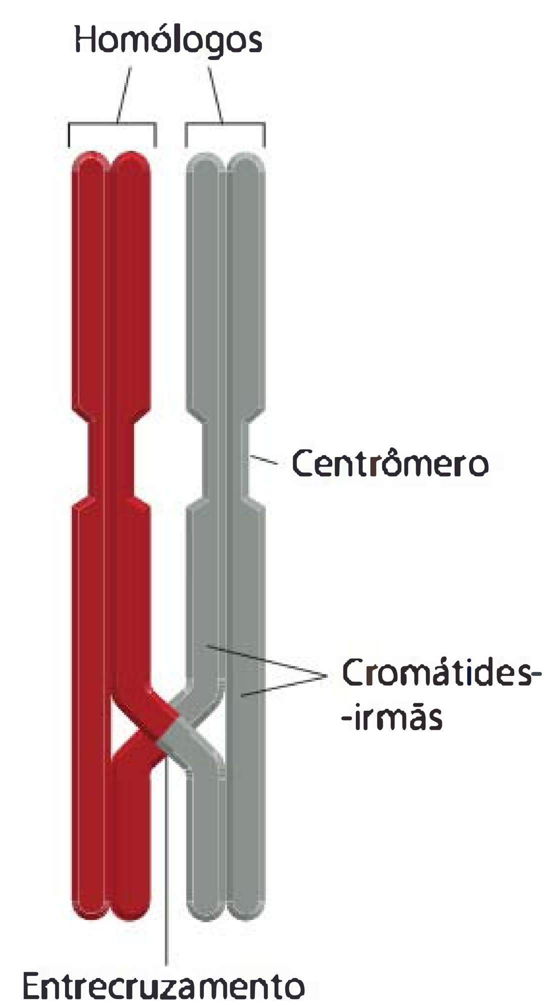


Figura 17-48 Um **entrecruzamento entre homólogos.** Como na mitose, as cromátides-irmãs de cada homólogo estão firmemente conectadas ao longo de toda a sua extensão. Neste exemplo, um único entrecruzamento ocorreu entre duas cromátides-não-irmãs, mas qualquer uma das duas cromátides de um homólogo pode formar um entrecruzamento com qualquer cromátide do outro homólogo, sendo comum que múltiplos entrecruzamentos sejam formados.

mente, de interações entre sequências complementares de DNA nos dois homólogos. As ligações dos homólogos são então travadas em seu devido lugar por recombinação homóloga entre cromátides-não-irmãs em cada par de homólogos: quebras na fita dupla de DNA se formam em vários locais em cada cromátide-irmã, resultando em um grande número de eventos de recombinação homóloga entre os homólogos. Alguns desses eventos levam a trocas recíprocas de DNA denominadas entrecruzamentos, onde ocorre o entrecruzamento do DNA de uma cromátide para que este fique contínuo ao DNA da cromátide homóloga (**Figura 17-48**). Ao menos um desses entrecruzamentos ocorre em cada par de homólogos, assegurando que os homólogos de cada par estejam fisicamente conectados quando a célula entra na primeira divisão meiótica.

Outro problema exclusivamente meiótico deve ser resolvido quando os pares de homólogos são ligados ao primeiro fuso meiótico. Cada homólogo contém duas cromátides-irmãs firmemente unidas, e assim a ligação de um homólogo a um polo do fuso requer que ambos os cinetocoros-filhos de um homólogo se liguem ao mesmo polo. Esse tipo de ligação normalmente é evitado durante a mitose (ver Figura 17-39). Contudo, na meiose I, os dois cinetocoros-filhos são de alguma forma fusionados em uma única unidade de ligação a microtúbulos, a qual se liga a um polo (ver Figura 21-12A). Esses mecanismos são invertidos após a meiose I, de forma que na meiose II os pares de cromátides-irmãs possam estar biorientados no fuso, como ocorre na mitose.

Os entrecruzamentos mantêm unidos os pares de homólogos somente porque os braços das cromátides-irmãs estão conectados pela coesão de cromátides-irmãs (ver Figura 17-48). Portanto, a perda de coesão dos braços das cromátides-irmãs provoca a separação dos homólogos no início da anáfase I. Na maioria das espécies, a perda de coesão dos braços na meiose I depende da ativação do APC/C, que leva à destruição da securina, à ativação da separase e à clivagem da coesina ao longo dos braços (ver Figura 17-44). Contudo, diferentemente da mitose, os complexos de coesina próximos aos centrômeros permanecem não-clivados na meiose I, pois a coesina naquela região está protegida da separase (discutido no Capítulo 21). Portanto, os pares de cromátides-irmãs permanecem ligados a seus centrômeros durante toda a meiose I, possibilitando sua biorientação correta no fuso na meiose II. Os mecanismos que bloqueiam a clivagem da coesina no centrômero na meiose I são removidos na meiose II. Portanto, no início da anáfase II, a ativação do APC/C provoca a clivagem da coesina centromérica e a separação das cromátides-irmãs – de forma semelhante ao que acontece na mitose.

Resumo

A M-Cdk desencadeia os eventos do início da mitose, incluindo a condensação dos cromossomos, a montagem do fuso mitótico e a ligação bipolar dos pares de cromátides-irmãs aos microtúbulos do fuso. Em células animais, a formação do fuso depende em grande parte da capacidade dos cromossomos mitóticos de estimular a nucleação local e a estabilidade de microtúbulos, assim como da capacidade de proteínas motoras de organizar os microtúbulos em um arranjo bipolar. Muitas células também usam centrossomos para facilitar a montagem do fuso. A anáfase é desencadeada pelo APC/C, que estimula a destruição das proteínas que mantêm as cromátides-irmãs unidas. O APC/C também promove a destruição de ciclinas e, assim, a inativação da M-Cdk. A desfosforilação resultante de alvos das Cdks é necessária aos eventos que completam a mitose, incluindo a desmontagem do fuso e a formação do novo envelope nuclear. A meiose é uma forma especializada de divisão nuclear em que um único ciclo de duplicação dos cromossomos é seguido por dois ciclos de segregação dos cromossomos, resultando na formação de núcleos haploides.

CITOCINESE

O passo final do ciclo celular é a **citocinese**, a divisão do citoplasma. Em uma célula típica, a citocinese sucede a cada mitose, embora algumas células, como embriões jovens de *Drosophila* (discutido posteriormente), alguns hepatócitos e algumas células musculares cardíacas de mamíferos, sofram mitose sem citocinese e, com isso, adquiram múltiplos núcleos. Na maioria das células animais, a citocinese começa na anáfase e termina pouco depois da conclusão da mitose na telófase.

A primeira mudança visível da citocinese em uma célula animal é o aparecimento repentino de uma prega, ou *sulco de clivagem*, na superfície celular. O sulco rapidamente se torna mais profundo e se espalha ao redor da célula, até dividir completamente a célula em

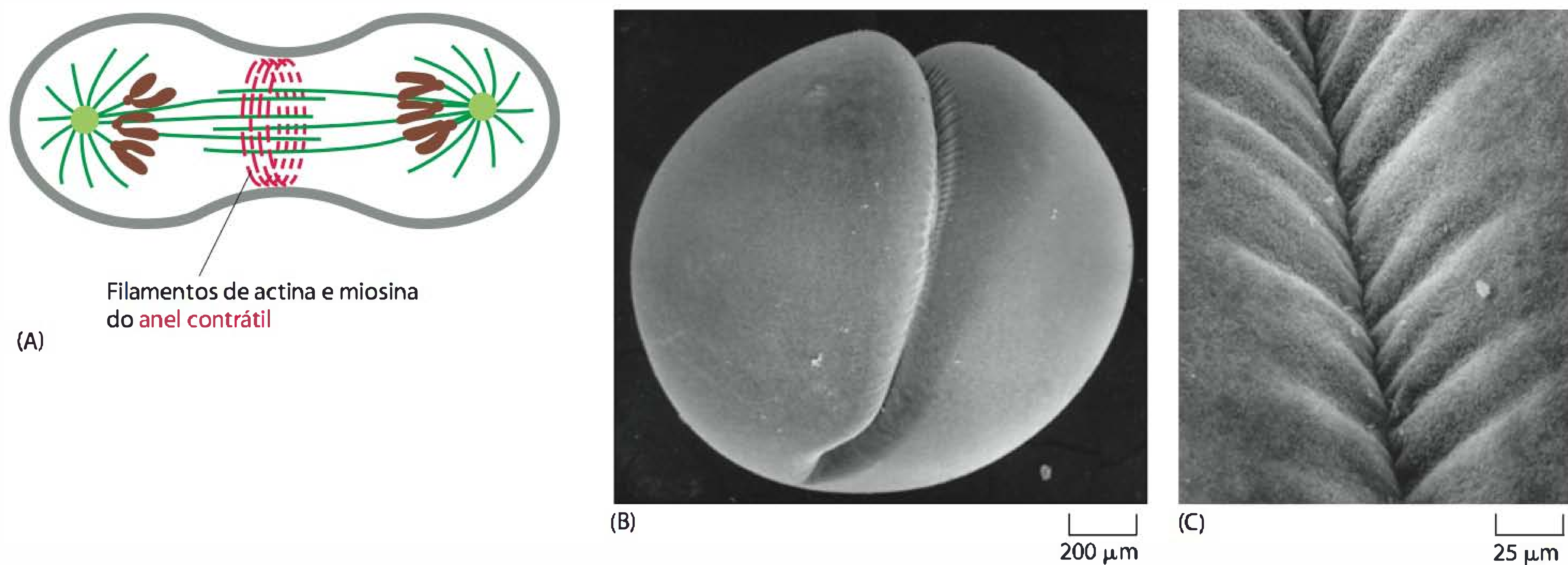


Figura 17-49 Citocinese. (A) Os feixes de actina-miosina do anel contrátil são orientados como mostrado, de forma que sua contração puxa a membrana para dentro. (B) Nesta micrografia eletrônica de varredura de baixo aumento de um ovo de rã em clivagem, o sulco de clivagem é particularmente evidente e bem-definido, uma vez que a célula é surpreendentemente grande. O enrugamento da membrana celular é causado pela atividade do anel contrátil embaixo dela. (C) A superfície de um sulco em maior aumento. (B e C, de H. W. Beams e R.G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279-290, 1976. Com permissão de Sigma Xi.)

duas. Em células animais e em muitos eucariotos unicelulares, a estrutura subjacente a esse processo é o *anel contrátil* – um agrupamento dinâmico composto de filamentos de actina, filamentos de miosina II e muitas proteínas estruturais e reguladoras. Durante a anáfase, o anel se monta logo abaixo da membrana plasmática (**Figura 17-49**; ver também Painel 17-1). O anel gradativamente se contrai, e, ao mesmo tempo, a fusão de vesículas intracelulares com a membrana plasmática insere novo material de membrana adjacente ao anel. Essa adição de membrana compensa o aumento na área de superfície que acompanha a divisão citoplasmática. Quando a contração do anel é concluída, a inserção e a fusão da membrana selam a brecha entre as células-filhas. Portanto, pode-se considerar que a citocinese ocorre em quatro estágios: iniciação, contração, inserção de membrana e conclusão.

A actina e a miosina II do anel contrátil geram força para a citocinese

Em células interfásicas, os filamentos de actina e miosina formam uma rede cortical subjacente à membrana plasmática. Em algumas células, eles também formam um grande feixe citoplasmático chamado de *fibras de estresse* (discutido no Capítulo 16). Quando as células entram na mitose, esses arranjos de actina e miosina se desestruturam; a maior parte da actina se reorganiza, e os filamentos de miosina são liberados. Quando as cromátides-irmãs se separam na anáfase, a actina e a miosina II começam a se acumular no **anel contrátil** (**Figura 17-50**) que está sendo rapidamente montado, que também contém numerosas outras

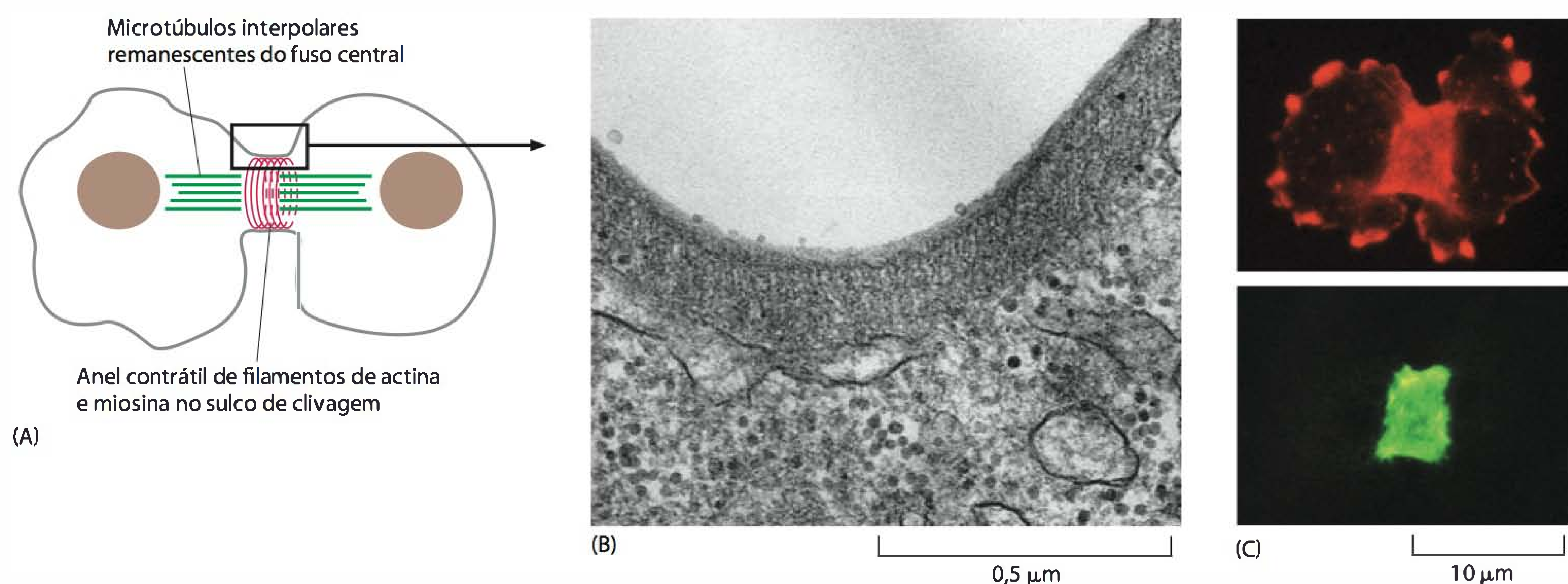


Figura 17-50 O anel contrátil. (A) Desenho do sulco de clivagem em uma célula em divisão. (B) Uma micrografia eletrônica da borda, crescendo para dentro, de um sulco de clivagem de uma célula animal em divisão. (C) Micrografias de fluorescência de uma ameba em divisão corada para actina (*vermelho*) e miosina II (*verde*). Enquanto toda a miosina II visível se redistribuiu para o anel contrátil, somente uma parte da actina o fez; o resto permanece no córtex das células-filhas nascentes. (B, de H. W. Beams e R. G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279-290, 1976. Com permissão de Sigma Xi; C, cortesia de Yoshio Fukui.)

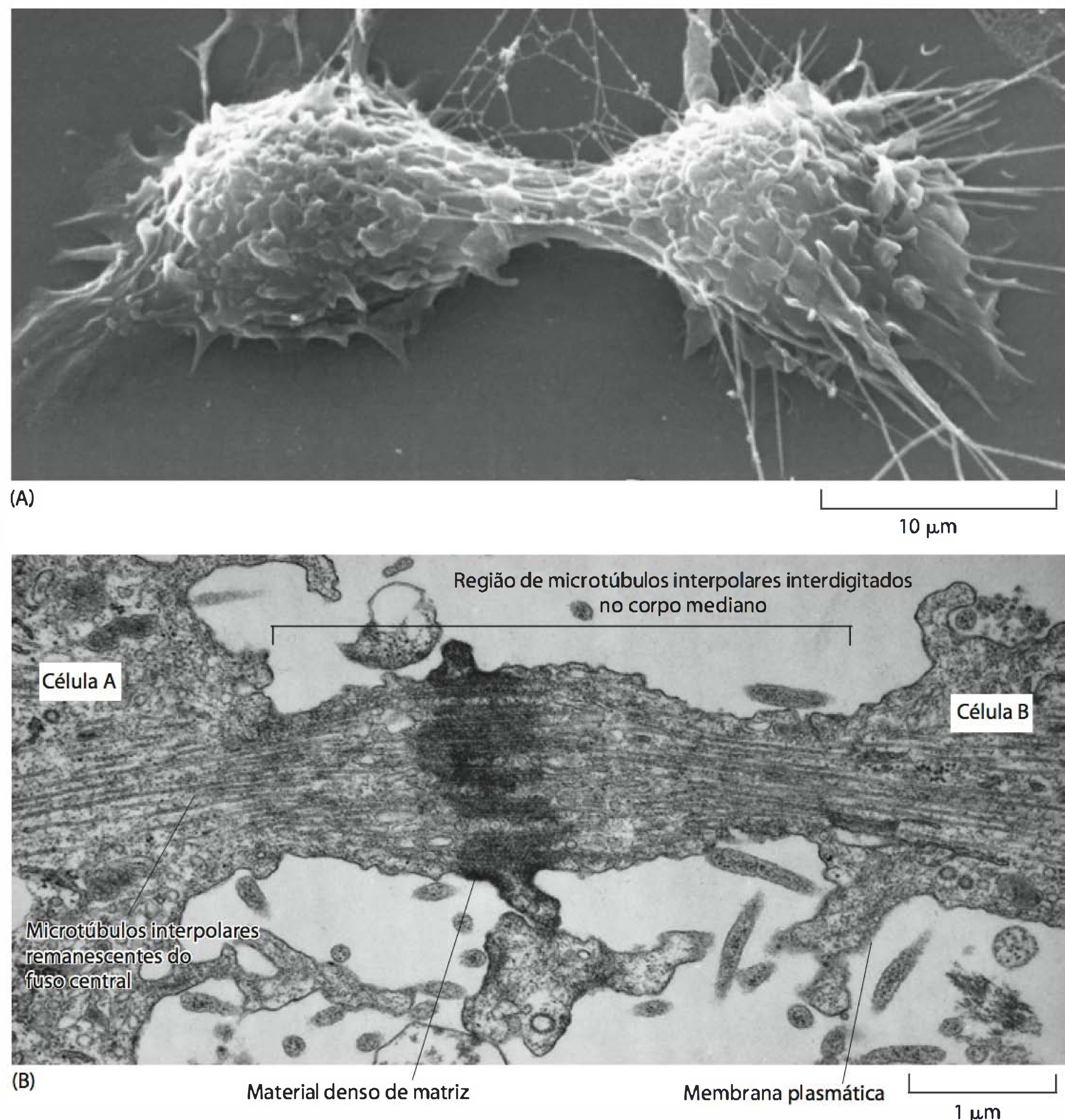


Figura 17-51 O corpo mediano. (A) Uma micrografia eletrônica de varredura de uma célula animal cultivada em processo de divisão; o corpo mediano ainda une as duas células-filhas. (B) Uma micrografia eletrônica convencional do corpo mediano de uma célula animal em divisão. A clivagem está quase completa, mas as células-filhas permanecem ligadas por esse fino filamento de citoplasma contendo os restos do fuso central. (A, cortesia de Guenter Albrecht-Buehler; B, cortesia de J. M. Mullins.)

proteínas que propiciam suporte estrutural ou ajudam na montagem do anel. A montagem do anel contrátil é em parte resultante da formação local de novos filamentos de actina, a qual depende de proteínas *formina* que nucleiam a montagem de arranjos paralelos de filamentos de actina lineares e não-ramificados (discutido no Capítulo 16). Após a anáfase, os arranjos sobrepostos de filamentos de actina e miosina II se contraem para gerar a força que divide o citoplasma em dois. Uma vez iniciada a contração, o anel exerce um força suficientemente grande capaz de dobrar uma fina agulha de vidro inserida no caminho. À medida que o anel se comprime, mantém a mesma espessura, sugerindo que seu volume total e o número de filamentos que contém diminuem constantemente. Além disso, diferentemente da actina presente nos músculos, os filamentos de actina no anel são altamente dinâmicos, e seu arranjo muda continuamente durante a citocinese.

O anel contrátil é inteiramente repartido no final, quando a clivagem termina, uma vez que a membrana plasmática do sulco de clivagem se estreita para formar o **corpo mediano**. O corpo mediano subsiste como uma corrente entre as duas células-filhas e contém os restos do fuso central, uma grande estrutura proteica derivada dos microtúbulos interpolares antiparalelos da zona média do fuso, firmemente empacotados em conjunto dentro de um material denso de matriz (**Figura 17-51**). Após as células-filhas se separarem completamente, alguns dos componentes do corpo mediano residual em geral permanecem do lado interno da membrana plasmática de cada célula, onde podem servir de ponto de referência no córtex e ajudar a orientar o fuso na divisão celular subsequente.

A ativação local da RhoA desencadeia a montagem e a contração do anel contrátil

A *RhoA*, uma pequena GTPase da superfamília Ras (ver Tabela 15-5), controla a montagem e o funcionamento do anel contrátil no sítio de clivagem. A RhoA é ativada no córtex celular

no futuro sítio de divisão, onde promove a formação de filamentos de actina, a montagem da miosina II e a contração do anel. Ela promove a formação de filamentos de actina pela ativação de forminas, e promove a montagem e as contrações da miosina II pela ativação de múltiplas proteína-cinases, incluindo a cinase ativada por Rho Rock (**Figura 17-52**). Essas cinases fosforilam a cadeia leve de miosina reguladora (RMLC, *regulatory myosin light chain*), que é uma das subunidades de miosina II. A fosforilação do RMLC estimula a formação bipolar de filamentos de miosina II e a atividade motora, promovendo, com isso, a montagem e a contração do anel de actina-miosina.

Como outras GTPases, a RhoA é inativa quando ligada a GDP e ativa quando ligada a GTP (discutido no Capítulo 15). Acredita-se que a ativação local da RhoA no sulco de clivagem dependa de um fator de troca de nucleotídeos de guanina da RhoA (RhoGEF), o qual é encontrado no córtex celular no futuro sítio de divisão e que estimula a liberação de GDP e a ligação de GTP à RhoA. Sabe-se pouco sobre como o RhoGEF está localizado ou é ativado no sítio de divisão, embora os microtúbulos do fuso da anáfase pareçam estar envolvidos, como discutiremos a seguir.

Os microtúbulos do fuso mitótico determinam o plano de divisão da célula animal

O problema central da citocinese é como garantir que a divisão ocorra na hora certa e no lugar certo. A citocinese deve ocorrer somente após os dois conjuntos de cromossomos terem sido totalmente segregados um do outro, e o sítio de divisão deve ser posicionado entre os dois conjuntos de cromossomos-filhos, assegurando, com isso, que cada célula-filha receba um conjunto completo. A escolha do momento e o posicionamento correto da citocinese em células animais são obtidos por meio de mecanismos elegantes que dependem do fuso mitótico. Durante a anáfase, o fuso gera sinais que iniciam a formação do sulco em uma posição a meio caminho entre os polos do fuso, assegurando, desse modo, que a divisão ocorra entre os dois conjuntos de cromossomos separados. Como esses sinais se originam no fuso da anáfase, esse mecanismo também contribui para a escolha do momento correto da citocinese no final da mitose. A citocinese também ocorre na hora correta porque a desfosforilação de substratos das Cdks, que depende da destruição de ciclinas na metáfase e na

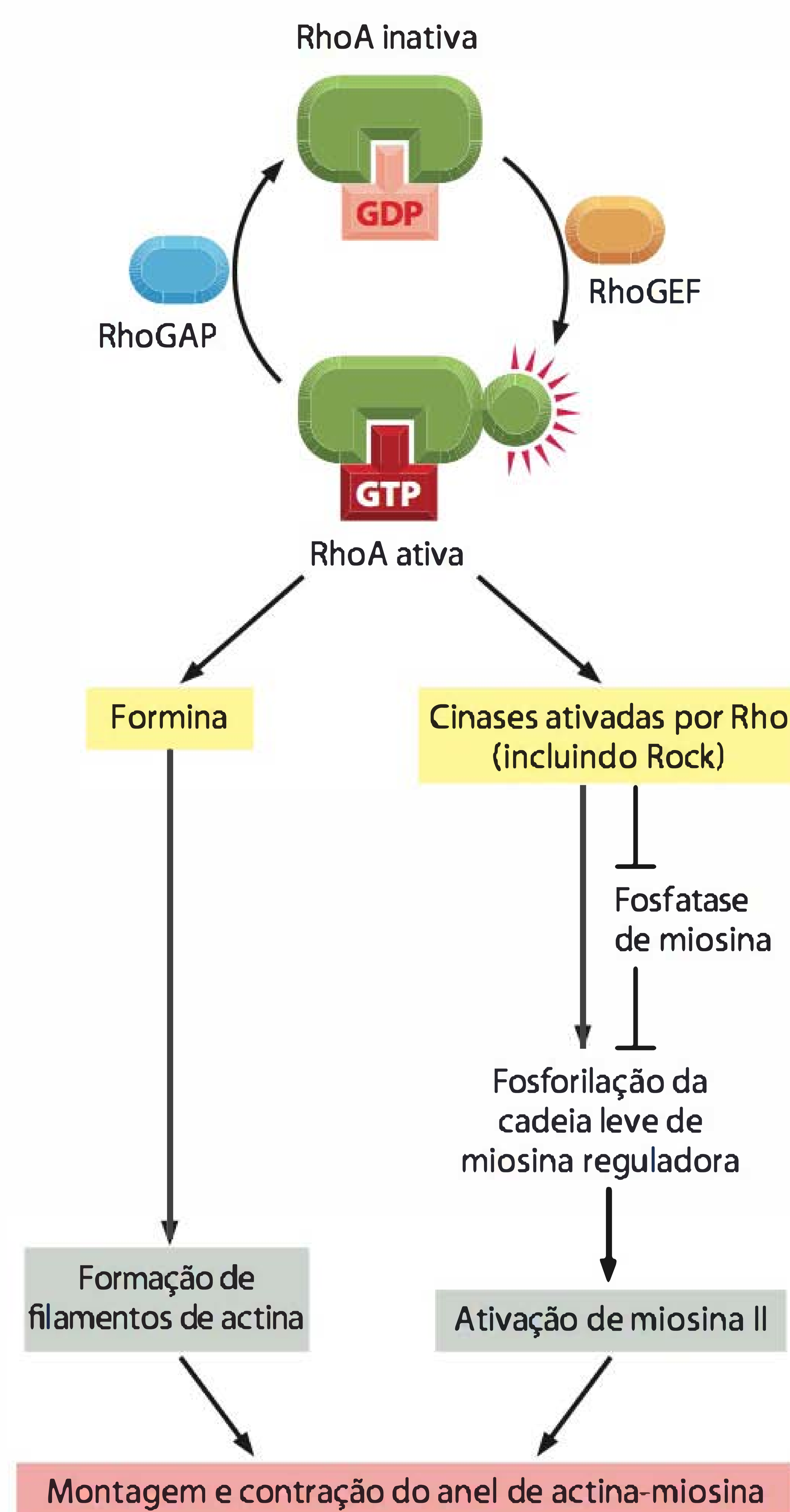


Figura 17-52 Regulação do anel contrátil pela GTPase RhoA. Como outras GTPases da família Rho, a RhoA é ativada por uma proteína RhoGEF e inativada por uma proteína RhoGAP. A forma ativa (ligada a GTP) da RhoA é orientada no futuro sítio de clivagem. Ao se ligar a forminas, a RhoA ativada promove a montagem de filamentos de actina no anel contrátil. Ao ativar proteína-cinases ativadas por RhoA, como a Rock, estimula a formação e a atividade de filamentos de miosina II, promovendo, assim, a contração do anel.

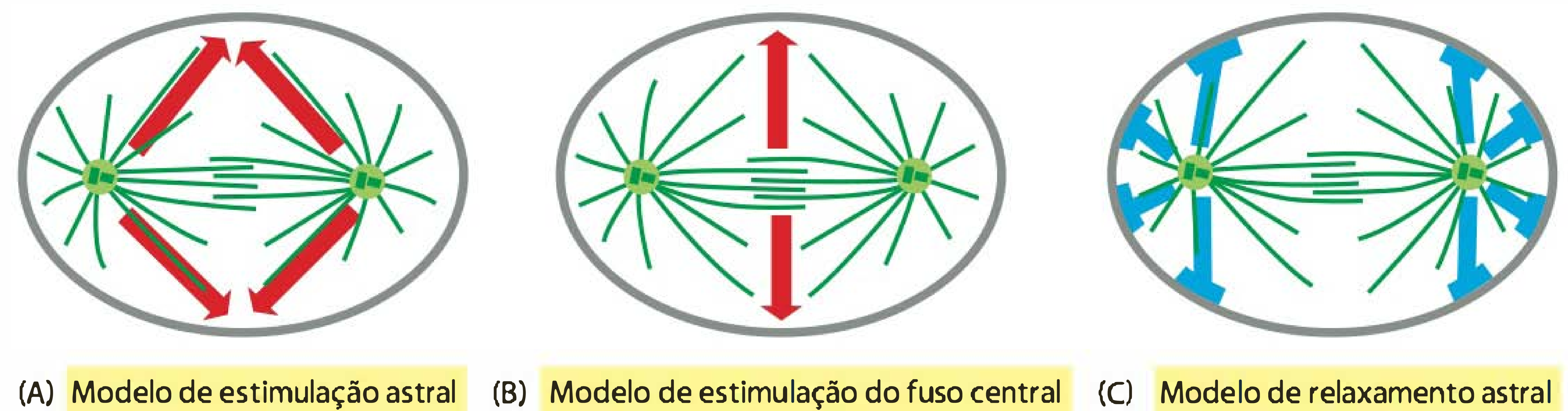


Figura 17-53 Três modelos atuais de como os microtúbulos do fuso anafásico geram sinais que influenciam o posicionamento do anel contrátil. Nenhum modelo único explica todas as observações, sendo provável que o posicionamento do sulco seja determinado por uma combinação desses mecanismos, em que a importância dos diferentes mecanismos varia em diferentes organismos.

anáfase, inicia a citocinese. Descreveremos agora esses mecanismos reguladores em maior detalhe, com ênfase na citocinese em células animais.

Estudos com os óvulos fertilizados de invertebrados marinhos revelaram, pela primeira vez, a importância dos microtúbulos do fuso na determinação da disposição do anel contrátil. Após a fertilização, esses embriões se dividem rapidamente, sem períodos intervenientes de crescimento. Dessa maneira, o ovo original é progressivamente dividido em células cada vez menores. Como o citoplasma é claro, o fuso pode ser observado em tempo real com um microscópio. Se, no início da anáfase, o fuso for puxado com força para uma nova posição com uma fina agulha de vidro, o sulco de clivagem incipiente desaparece, e um novo se desenvolve de acordo com o novo sítio do fuso – substanciando a ideia de que sinais gerados pelo fuso induzem a formação local do sulco.

Como o fuso mitótico especifica o sítio de divisão? Três mecanismos gerais têm sido propostos, e a maioria das células parece empregar uma combinação dos mesmos (**Figura 17-53**). O primeiro é designado *modelo de estimulação astral*, que postula que os microtúbulos astrais transportam sinais indutores do sulco ao córtex celular, onde eles são de alguma maneira orientados em um anel a meio caminho entre os polos do fuso. As evidências para esse modelo provêm de experimentos engenhosos com células embrionárias grandes, que demonstram que um sulco de clivagem se forma a meio caminho entre dois ásteres, mesmo quando os dois centrossomos que nucleiam os ásteres não estão conectados um ao outro por um fuso mitótico (**Figura 17-54**).

Uma segunda possibilidade, chamada de *modelo de estimulação do fuso central*, é que a zona média do fuso, ou fuso central, gera um sinal indutor do sulco que especifica o sítio de formação do sulco no córtex celular. Os microtúbulos interpolares que se sobrepõem no fuso central se associam a numerosas proteínas de sinalização, incluindo proteínas que podem estimular a RhoA (**Figura 17-55**). Defeitos no funcionamento dessas proteínas (p. ex., em mutantes de *Drosophila*) resultam no insucesso da citocinese.

Um terceiro modelo propõe que, em alguns tipos celulares, os microtúbulos astrais promovem o relaxamento local de feixes de actina-miosina no córtex celular. De acordo com este *modelo de relaxamento astral*, o relaxamento cortical é mínimo no equador do fuso, promovendo, desse modo, a contração cortical naquele sítio. Nos embriões jovens de *C. ele-*

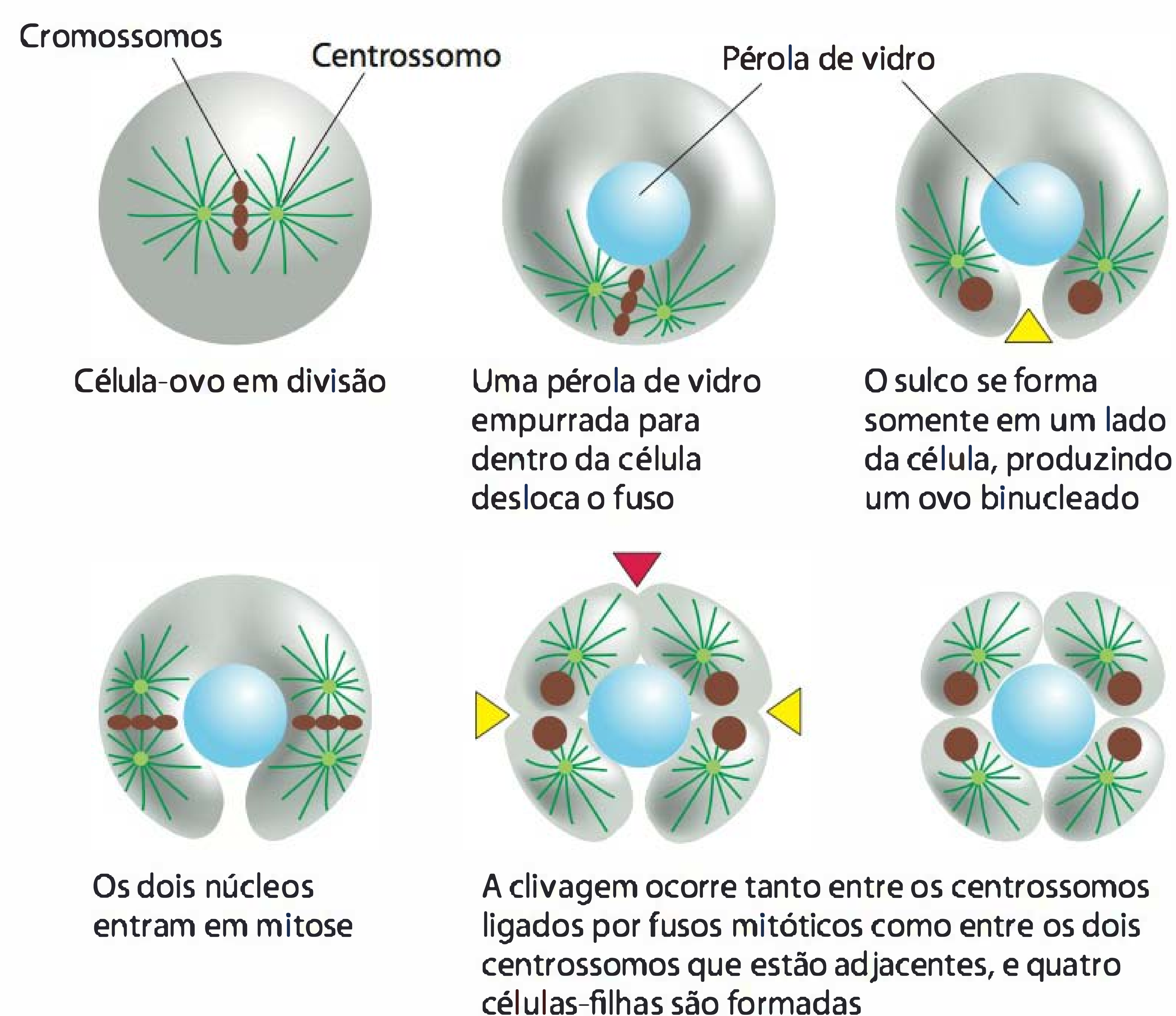


Figura 17-54 Experimento demonstrando a influência da posição dos ásteres dos microtúbulos sobre o subsequente plano de clivagem em uma célula-ovo grande. Se o fuso mitótico é mecanicamente empurrado para um lado da célula com uma pérola de vidro, a formação do sulco na membrana é incompleta, não ocorrendo no lado oposto da célula. Clivagens subsequentes ocorrem não somente na zona média de cada um dos dois fusos mitóticos subsequentes (*setas amarelas*), mas também entre os dois ásteres adjacentes que não estão ligados por um fuso mitótico – mas que, nesta célula anormal, compartilham o mesmo citoplasma (*setas vermelhas*). Aparentemente, o anel contrátil que produz o sulco de clivagem nessas células sempre se forma na região a meio caminho entre os dois ásteres, sugerindo que os ásteres de alguma maneira alteram a região adjacente do córtex celular, a fim de induzir a formação do sulco.

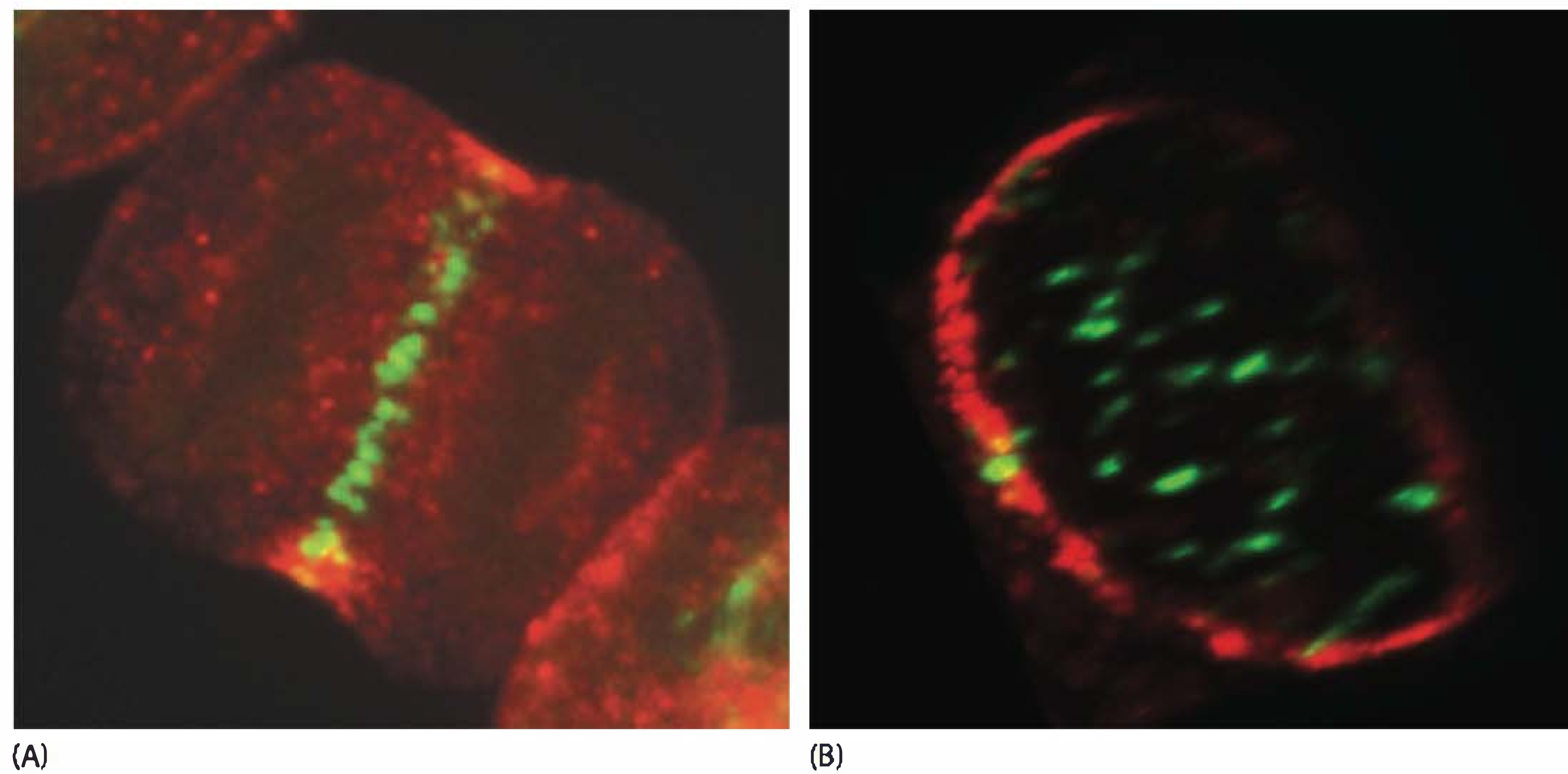


Figura 17-55 Localização de reguladores da citocinese no fuso central da célula humana. (A) A micrografia de fluorescência de uma célula humana cultivada no começo da citocinese revela as localizações da GTPase RhoA (*vermelho*) e de uma proteína chamada de Cyk4 (*verde*), uma das várias proteínas reguladoras que formam complexos nas extremidades mais (+) sobrepostas de microtúbulos interpolares. Acredita-se que essas proteínas gerem sinais que ajudam a controlar a atividade da RhoA no córtex celular (ver Figuras 17-52 e 17-53B). (B) Quando a célula é seccionada transversalmente no plano do anel contrátil, como mostrado aqui, a RhoA (*vermelho*) forma um anel abaixo da superfície celular, enquanto a proteína do fuso central Cyk4 (*verde*) se associa a feixes de microtúbulos espalhados por todo o plano equatorial da célula. (Cortesia de Alisa Piekny e Michael Glotzer.)

gans, por exemplo, tratamentos que resultam na perda dos microtúbulos astrais levam ao aumento da atividade contrátil por todo o córtex celular, consistente com esse modelo.

Em alguns tipos celulares, o sítio de montagem do anel é escolhido antes da mitose. Em leveduras de brotamento, por exemplo, um anel de proteínas chamadas de *septinas* se agrupa no final de G_1 no futuro sítio de divisão. Acredita-se que as septinas formem um esqueleto sobre o qual outros componentes do anel contrátil, incluindo a miosina II, se agrupam. Em células vegetais, uma banda organizada de microtúbulos e filamentos de actina, chamada de **banda da pré-prófase**, se agrupa pouco antes da mitose e marca o sítio onde a parede celular será montada e dividirá a célula em duas, como discutiremos agora.

O fragmoplasto orienta a citocinese nas plantas superiores

Na maioria das células animais, o movimento interno do sulco de clivagem depende de um aumento da área de superfície da membrana plasmática. O material de membrana novo é adicionado à borda interna do sulco de clivagem, sendo em geral fornecido por pequenas vesículas de membrana que são transportadas em microtúbulos do aparelho de Golgi ao sulco.

A deposição de membrana é particularmente importante à citocinese em células de plantas superiores. Essas células são circundadas por uma *parede celular* semirrígida. Em vez de um anel contrátil dividindo o citoplasma de fora para dentro, o citoplasma da célula vegetal é repartido de dentro para fora pela construção de uma nova parede celular, chamada de **placa celular**, entre os dois núcleos-filhos (**Figura 17-56**). A montagem da placa celular começa no final da anáfase e é orientada por uma estrutura denominada **fragmo-**

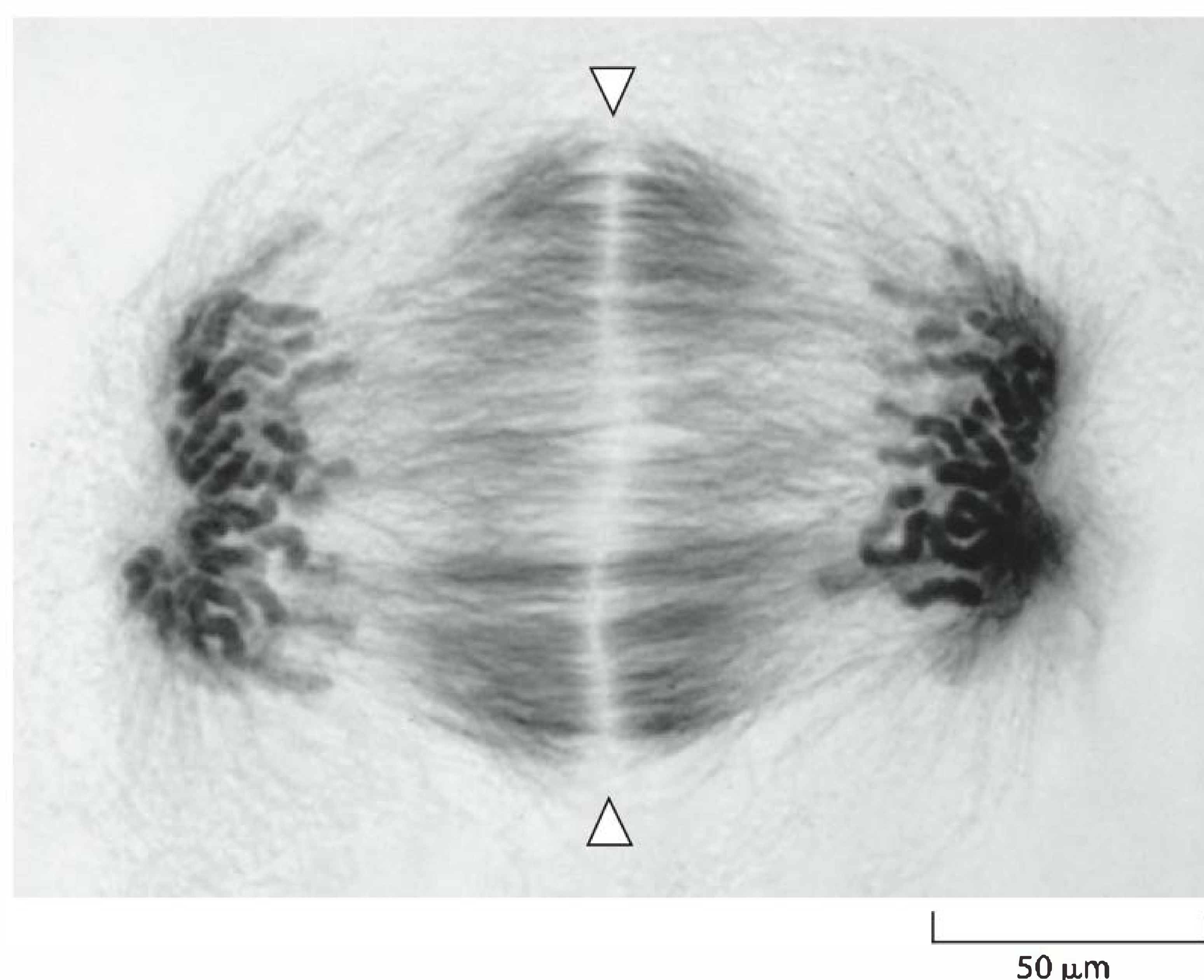


Figura 17-56 Citocinese em uma célula vegetal em telófase. Nesta micrografia óptica, a placa celular inicial (entre as duas *setas*) se formou em um plano perpendicular ao plano da página. Os microtúbulos do fuso estão corados com anticorpos marcados com ouro contra a tubulina, e o DNA nos dois conjuntos de cromossomos-filhos está corado com um corante fluorescente. Observe que não há microtúbulos astrais, pois não existem centrossomos em células de plantas superiores. (Cortesia de Andrew Bajer.)

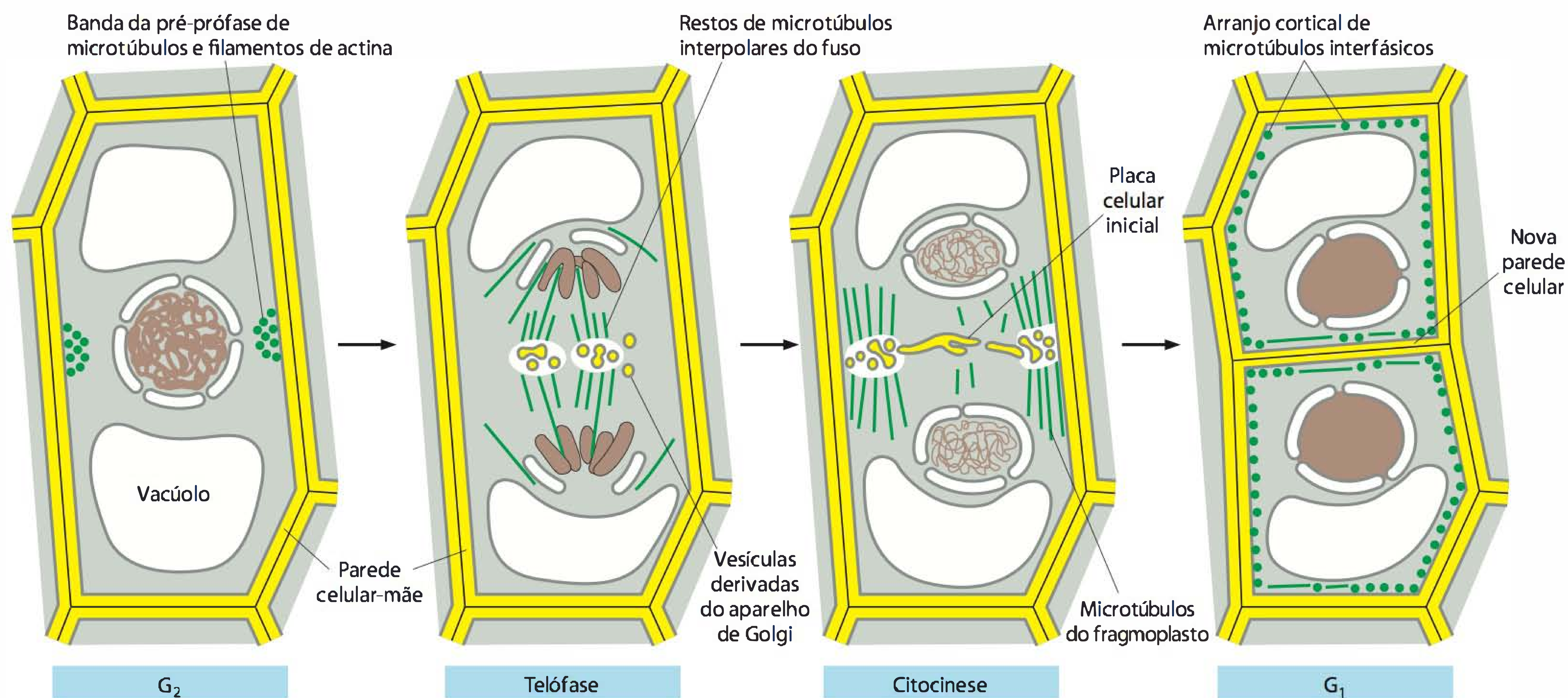


Figura 17-57 Características especiais da citocinese em uma célula de planta superior. O plano de divisão é estabelecido antes da fase M por uma banda de microtúbulos e filamentos de actina (a banda da pré-prófase) no córtex celular. No início da telófase, após os cromossomos terem se segregado, uma nova parede celular começa a ser montada dentro da célula no equador do fuso antigo. Os microtúbulos interpolares do fuso mitótico remanescente na telófase formam o fragmoplasto. As extremidades mais (+) desses microtúbulos não mais se sobrepõem, terminando no equador da célula. Vesículas derivadas do aparelho de Golgi, cheias de material da parede celular, são transportadas ao longo desses microtúbulos e se fundem e formam uma nova parede celular, que cresce para fora até alcançar a membrana plasmática e a parede celular original. A membrana plasmática e a membrana que cerca a nova parede celular se fundem, separando completamente as duas células-filhas.

plasto, que contém microtúbulos derivados do fuso mitótico. Proteínas motoras transportam pequenas vesículas ao longo desses microtúbulos do aparelho de Golgi para o centro da célula. Essas vesículas, cheias de polissacarídeos e glicoproteínas necessárias à síntese da nova parede celular, fundem-se e formam uma estrutura em forma de disco e circundada por membrana, denominada *placa celular inicial*. A placa se expande para fora por meio da fusão de mais vesículas, até alcançar a membrana plasmática e a parede celular original, dividindo a célula em duas. Posteriormente, microfibrilas de celulose são depositadas dentro da matriz da placa celular, completando a construção da nova parede celular (**Figura 17-57**).

Organelas envoltas por membrana devem ser distribuídas às células-filhas durante a citocinese

O processo de mitose garante que cada célula-filha receba um complemento inteiro de cromossomos. Contudo, quando uma célula eucariótica se divide, cada célula-filha também deve herdar todos os outros componentes celulares essenciais, incluindo as organelas envoltas por membrana. Como discutido no Capítulo 12, organelas como mitocôndrias e cloroplastos não podem ser montadas *de novo* a partir de seus componentes individuais; elas podem se originar somente pelo crescimento e pela divisão de organelas preexistentes. Similarmente, as células não podem formar um novo retículo endoplasmático (RE), a menos que uma parte dele já esteja presente.

Como, então, as várias organelas envoltas por membrana são segregadas quando uma célula se divide? Organelas como mitocôndrias e cloroplastos normalmente estão presentes em números suficientemente grandes para serem herdadas sem problema se, em média, seu número aproximadamente dobrar a cada ciclo. O RE em células interfásicas é contínuo à membrana nuclear e se encontra organizado pelo citoesqueleto de microtúbulos. Após a entrada na fase M, a reorganização dos microtúbulos e a desintegração do envelope nuclear liberam o RE. Na maioria das células, o RE permanece em grande parte intacto, sendo cortado em dois durante a citocinese. O aparelho de Golgi é reorganizado e fragmentado durante a mitose. Fragmentos do aparelho de Golgi se associam aos polos do fuso e são, desse modo, distribuídos a polos opostos do fuso, garantindo que cada célula-filha herde os materiais necessários para reconstruir o aparelho na telófase.

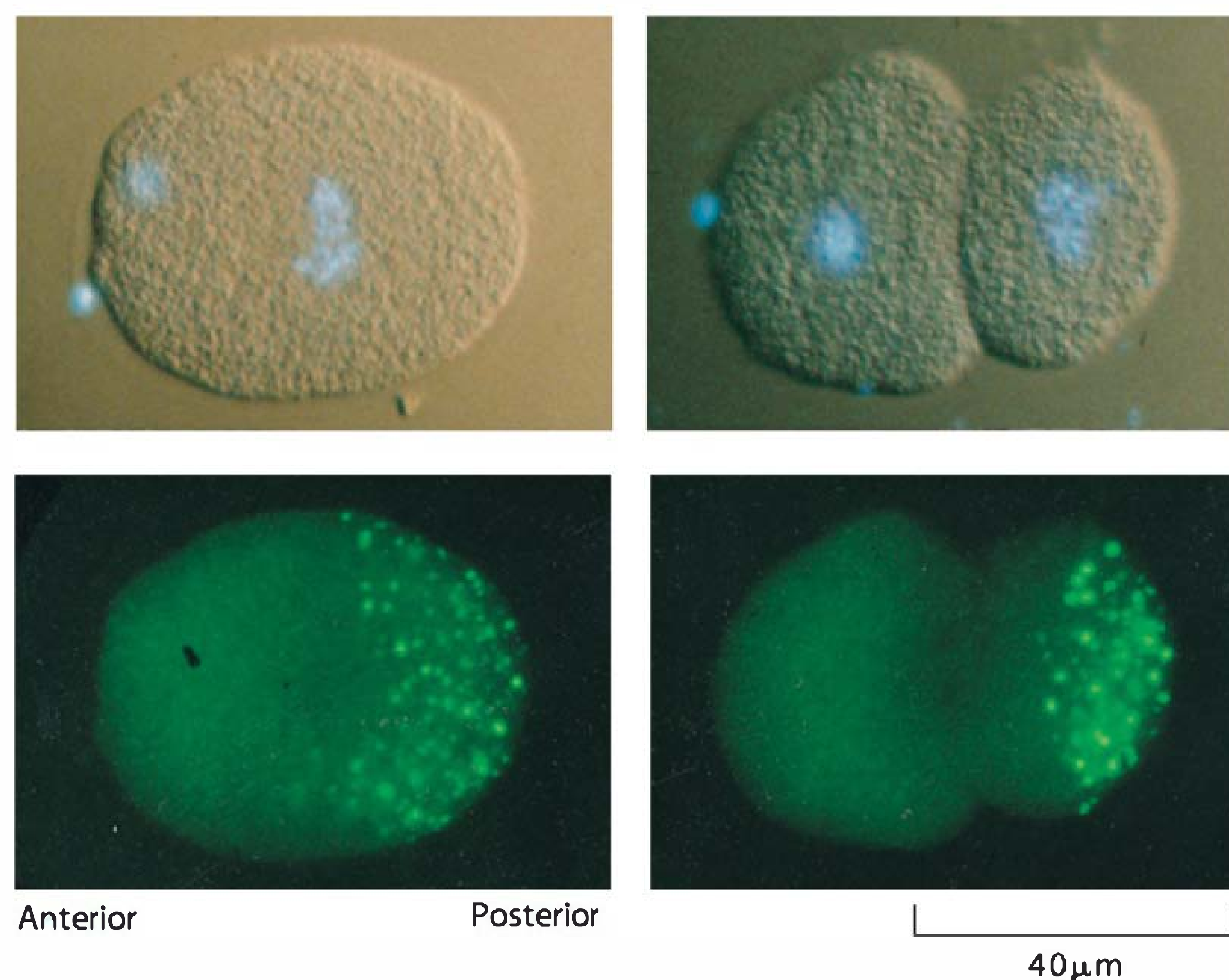


Figura 17-58 Uma divisão celular assimétrica segregando componentes citoplasmáticos somente para uma célula-filha. Estas micrografias ópticas ilustram a segregação assimétrica controlada de componentes citoplasmáticos específicos para uma célula-filha durante a primeira divisão de um óvulo fertilizado do nematódeo *C. elegans*. As células na parte superior foram coradas com um corante fluorescente *azul* que se liga ao DNA, mostrando o núcleo (e os corpúsculos polares); elas são visualizadas tanto por microscopia de contraste de interferência diferencial como por microscopia de fluorescência. As células na parte inferior são as mesmas células coradas com um anticorpo contra grânulos-P e visualizadas por microscopia de fluorescência. Esses pequenos grânulos são feitos de RNA e proteínas e determinam quais células se tornarão as células germinativas. Eles se distribuem ao acaso por todo o citoplasma do óvulo não-fertilizado (não-mostrado), mas ficam restritos ao polo posterior do óvulo fertilizado, como mostrado à *esquerda*. O plano de clivagem é orientado a fim de assegurar que, quando o ovo se dividir, somente a célula-filha posterior receba os grânulos-P, como mostrado à *direita*. O mesmo processo de segregação é repetido em várias divisões celulares subsequentes, de forma que os grânulos-P vão parar somente nas células que dão origem a óvulos e espermatozoides. (Cortesia de Susan Strome.)

Algumas células reposicionam seu fuso para se dividirem assimetricamente

A maioria das células animais se divide simetricamente: o anel contrátil se forma em volta do equador da célula-mãe, produzindo duas células-filhas de tamanho igual e com os mesmos componentes. Essa simetria resulta da disposição do fuso mitótico, que na maioria dos casos tende a se centralizar no citoplasma. Microtúbulos astrais e proteínas motoras que empurram ou puxam esses microtúbulos contribuem para o processo de centralização.

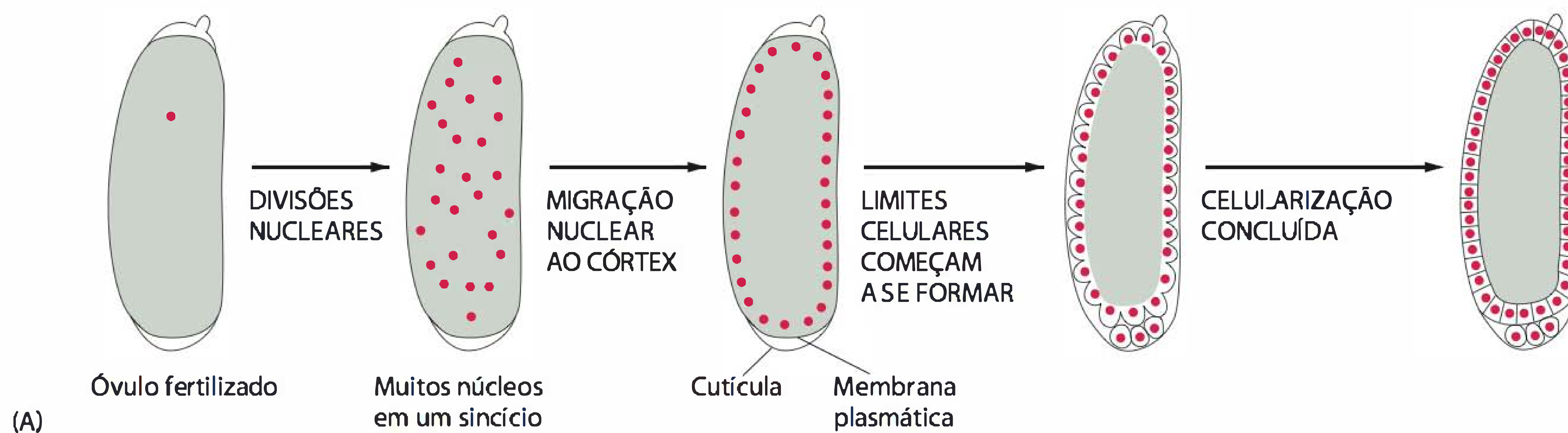
Contudo, existem muitos exemplos no desenvolvimento, quando as células se dividem assimetricamente para produzir duas células que diferem quanto ao tamanho, ao conteúdo citoplasmático herdado ou a ambos os aspectos. Normalmente, as duas células-filhas diferentes são destinadas a se desenvolverem ao longo de diferentes vias. A fim de criar células-filhas com diferentes destinos desta maneira, a célula-mãe deve primeiro segregar certos componentes (denominados *determinantes de destino celular*) para um lado da célula e, então, posicionar o plano de divisão de forma que a célula-filha apropriada herde esses componentes (**Figura 17-58**). Para posicionar o plano de divisão assimetricamente, o fuso tem de ser movido de maneira controlada dentro da célula em divisão. Parece plausível que mudanças nas regiões locais do córtex celular orientem tais movimentos do fuso, e que proteínas motoras lá localizadas puxem um dos polos do fuso, via microtúbulos astrais, para a região apropriada. Análises genéticas em *C. elegans* e *Drosophila* identificaram algumas das proteínas necessárias para tais divisões assimétricas (discutido no Capítulo 22), e algumas dessas proteínas parecem ter papéis similares nos vertebrados.

A mitose pode ocorrer sem citocinese

Embora a divisão nuclear normalmente seja seguida pela divisão citoplasmática, existem exceções. Algumas células sofrem múltiplos ciclos de divisão nuclear sem divisões citoplasmáticas intervenientes. No embrião jovem de *Drosophila*, por exemplo, os primeiros 13 ciclos de divisão nuclear ocorrem sem divisão citoplasmática, resultando na formação de uma única grande célula contendo vários milhares de núcleos, arranjados em uma monocamada próxima à superfície. Uma célula na qual múltiplos núcleos compartilham o mesmo citoplasma é chamada de **sincício**. Esse arranjo acelera imensamente o desenvolvimento inicial, na medida em que as células não têm de gastar tempo passando por todas as etapas da citocinese a cada divisão. Após essas rápidas divisões nucleares, membranas são criadas em volta de cada núcleo em um ciclo de citocinese coordenada denominado *celularização*. A membrana plasmática se estende para dentro e, com a ajuda de um anel de actina-miosina, se contrai com força para envolver cada núcleo (**Figura 17-59**).

A divisão nuclear sem citocinese também ocorre em alguns tipos de células de mamíferos. Os megacariócitos, que produzem as plaquetas sanguíneas, e alguns hepatócitos e células musculares cardíacas, por exemplo, tornam-se multinucleados dessa maneira.

Após a citocinese, a maioria das células entra em G_1, na qual as Cdks estão predominantemente inativas. Terminaremos esta seção discutindo como esse estado é atingido no final da fase M.



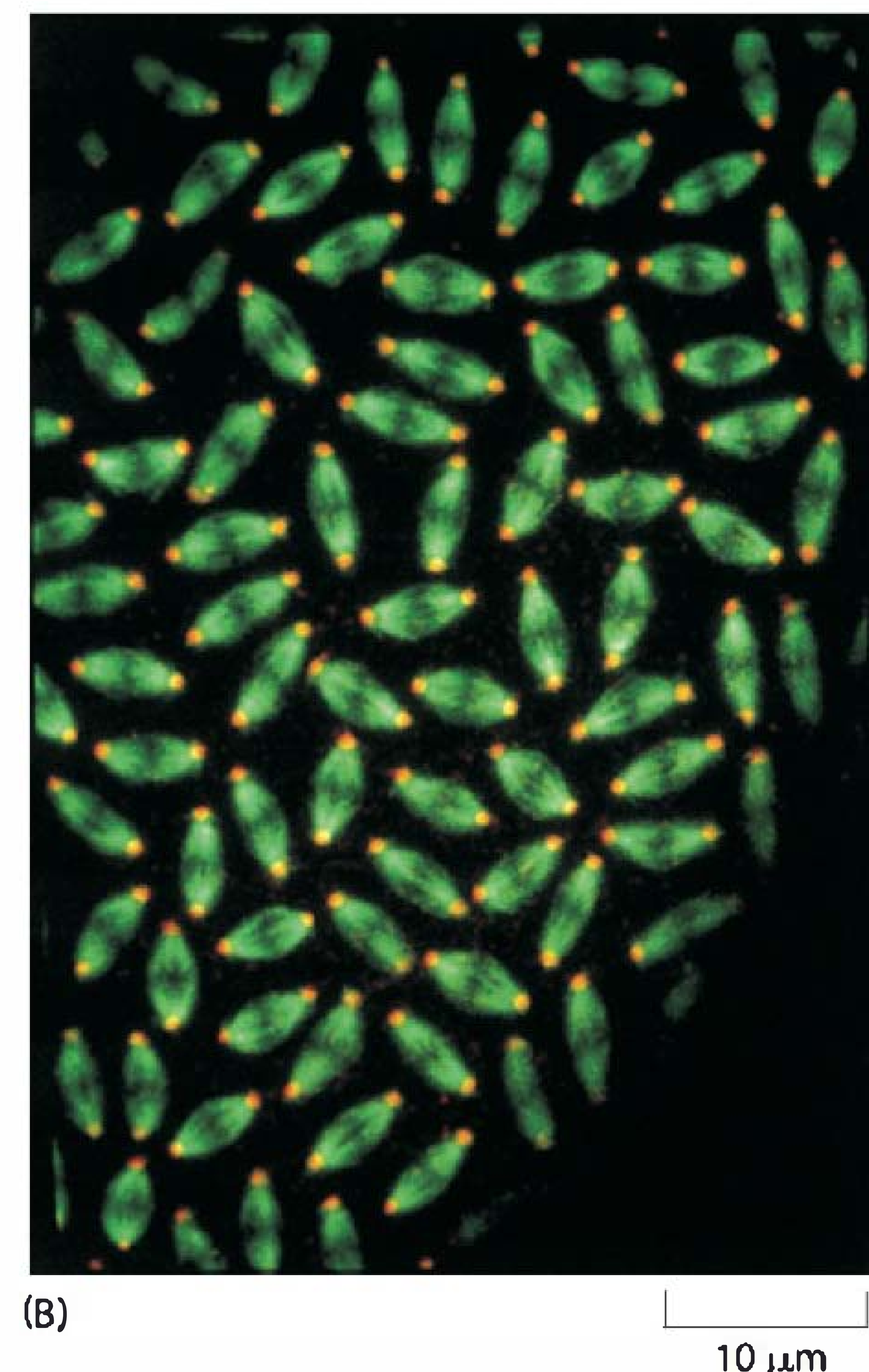


Figura 17-59 Mitose sem citocinese no embrião jovem de *Drosophila*. (A) As primeiras 13 divisões nucleares ocorrem sincronicamente e sem divisão citoplasmática, criando um grande sincício. Em seguida, a maioria dos núcleos migra para o córtex, e a membrana plasmática se estende para dentro e se contrai com força, envolvendo cada núcleo e formando células individuais, em um processo chamado de celularização. (B) Micrografia de fluorescência de múltiplos fusos mitóticos em um embrião de *Drosophila* antes da celularização. Os microtúbulos estão corados em *verde* e os centrômeros em *vermelho*. Note que todos os núcleos passam pelo ciclo sincronicamente; aqui, todos estão em metáfase. (B, cortesia de Kristina Yu e William Sullivan.)

A fase G_1 é um estado estável de inatividade das Cdks

Um evento regulador-chave no final da fase M é a inativação das Cdks, que é primariamente conduzido pela destruição de ciclinas dependentes do APC/C. Como anteriormente descrito neste capítulo, a inativação das Cdks no final da fase M tem muitas funções: desencadeia os eventos do final da mitose, promove a citocinese e possibilita a síntese de complexos pré-replicativos nas origens de replicação do DNA. Ela também proporciona um mecanismo de recomposição do sistema de controle do ciclo celular a um estado de inatividade das Cdks, à medida que a célula se prepara para entrar em um novo ciclo celular. Na maioria das células, esse estado de inatividade das Cdks gera uma fase de intervalo G_1, durante a qual a célula cresce e monitora seu ambiente antes de se comprometer com uma nova divisão.

Em embriões jovens de animais, a inativação da M-Cdk no final da mitose se deve quase que inteiramente à ação do Cdc20-APC/C, discutida anteriormente. Recorde-se, contudo, que a M-Cdk estimula a atividade do Cdc20-APC/C. Consequentemente, a destruição da M-ciclina no final da mitose leva prontamente à inativação de toda a atividade do APC/C em uma célula embrionária. Essa inativação do APC/C imediatamente após a mitose é especial-

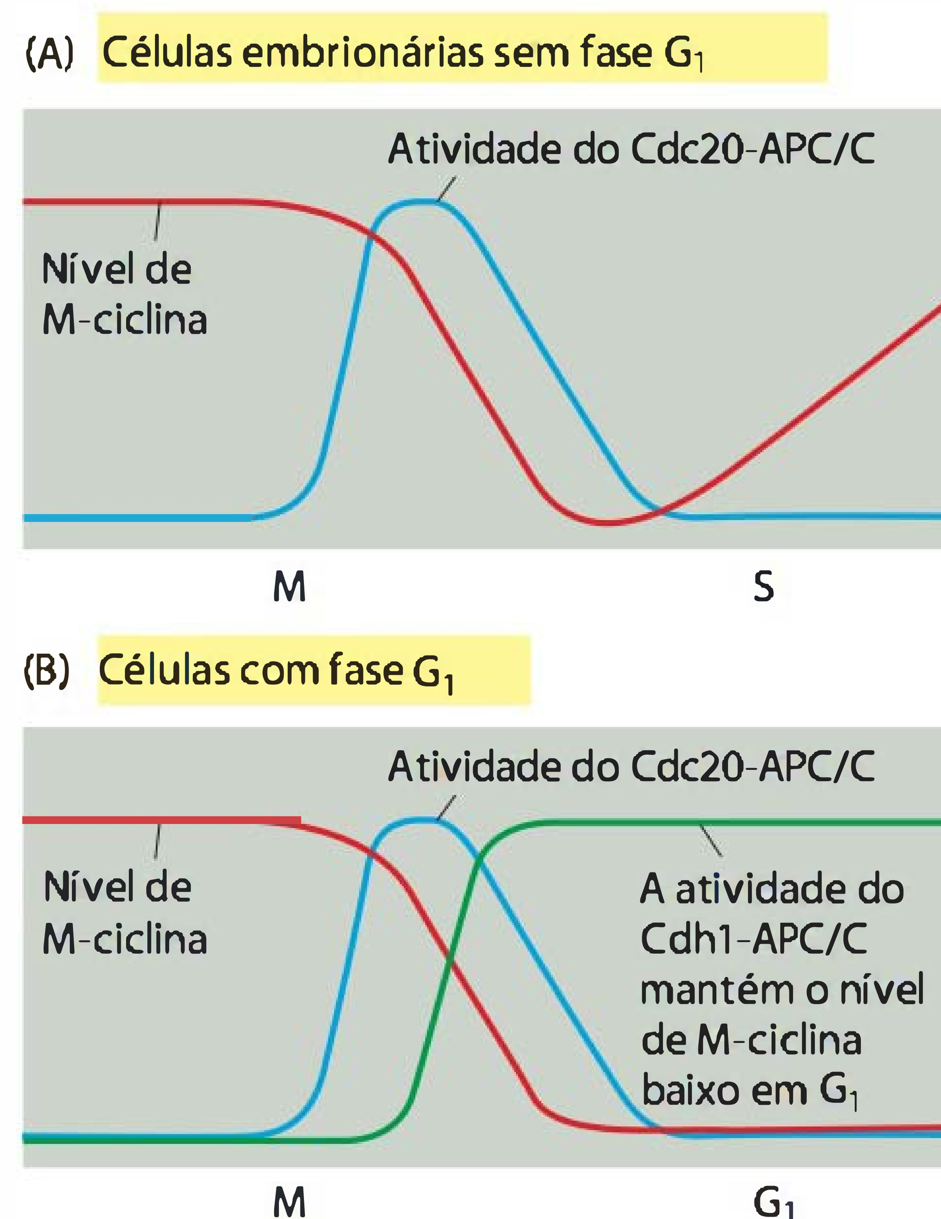


Figura 17-60 Criação de uma fase G_1 pela inibição estável das Cdks após a mitose. (A) Em ciclos celulares de embriões jovens, a atividade do Cdc20-APC/C aumenta no final da metáfase, provocando a destruição da M-ciclina. Como a atividade da M-Cdk estimula a atividade do Cdc20-APC/C, a perda da M-ciclina leva à inativação do APC/C após a mitose, permitindo que as M-ciclinas comecem novamente a se acumular. (B) Em células que contêm uma fase G_1, a queda na atividade da M-Cdk no final da mitose leva à ativação do Cdh1-APC/C (assim como o acúmulo de proteínas inibidoras das Cdks; não-mostrado). Isso garante a supressão contínua da atividade das Cdks após a mitose, necessária a uma fase G_1.

mente útil em ciclos celulares embrionários rápidos, uma vez que permite à célula rapidamente começar a acumular M-ciclina nova para o próximo ciclo (**Figura 17-60**A).

No entanto, o rápido acúmulo de ciclinas imediatamente após a mitose não é útil a células com ciclos celulares que contêm uma fase G_1. Essas células empregam vários mecanismos para impedir a reativação das Cdks após a mitose. Um mecanismo usa outra proteína ativadora do APC/C, denominada Cdh1, um parente próximo da Cdc20. Embora tanto a Cdh1 como a Cdc20 se liguem e ativem o APC/C, elas diferem em um ponto importante. Enquanto o complexo do Cdc20-APC/C é ativado pela M-Cdk, o complexo do Cdh1-APC/C é inibido por ela, por fosforilação direta da Cdh1. O resultado dessa relação é que a atividade do Cdh1-APC/C aumenta no final da mitose após o complexo do Cdc20-APC/C ter iniciado a destruição da M-ciclina. Portanto, a destruição da M-ciclina continua após a mitose: embora a atividade do Cdc20-APC/C tenha decaído, a atividade do Cdh1-APC/C é alta (Figura 17-60B).

Um segundo mecanismo que suprime a atividade das Cdks em G_1 depende do aumento da produção de CKIs, as proteínas inibidoras de Cdk anteriormente discutidas. As células de leveduras de brotamento, nas quais esse mecanismo é melhor compreendido, contêm uma proteína CKI chamada de *Sic1*, que se liga e inativa a M-Cdkno final da mitose e de G_1. Como a Cdh1, a Sic1 é inibida pela M-Cdk, que fosforila a Sic1 durante a mitose e, com isso, promove sua ubiquitinação por SCF. Assim, a Sic1 e a M-Cdk, como a Cdh1 e a M-Cdk, inibem uma à outra. Como resultado, o decréscimo na atividade da M-Cdk que ocorre no final da mitose faz com que a proteína Sic1 se acumule, e essa CKI ajuda a manter a atividade da M-Cdk baixa após a mitose. Uma proteína CKI chamada de *p27* (ver Figura 17-19) pode desempenhar funções similares em células animais.

Na maioria das células, o decréscimo da transcrição dos genes *M-ciclin*a também inativa as M-Cdks no final da mitose. Na levedura de brotamento, por exemplo, a M-Cdk promove a expressão desses genes, resultando em um circuito de retroalimentação positiva. Este circuito é desligado quando as células saem da mitose: a inativação da M-Cdk por Cdh1 e Sic1 leva à diminuição da transcrição do gene da M-ciclina e, assim, à diminuição da síntese de M-ciclina. Proteínas reguladoras gênicas que promovem a expressão de G_1/S-ciclinas e S-ciclinas também são inibidas durante G_1.

Assim, a ativação do Cdh1-APC/C, o acúmulo de CKIs e a diminuição da expressão dos genes de ciclinas atuam em conjunto para garantir que o início da fase G_1 seja um período em que essencialmente toda a atividade das Cdks está suprimida. Como em muitos outros aspectos do controle do ciclo celular, o uso de múltiplos mecanismos reguladores torna o sistema de supressão resistente, de forma que ele ainda opera com eficiência razoável, mesmo se um mecanismo falhar. Então como a célula escapa desse estado estável de G_1 para iniciar um novo ciclo celular? A resposta é que a atividade da G_1/S-Cdk, que aumenta no final de G_1, libera todos os mecanismos de freagem que suprimem a atividade das Cdks, como descreveremos na próxima seção.

Resumo

Após a mitose concluir a formação de um par de núcleos-filhos, a citocinese finaliza o ciclo celular, dividindo a própria célula. A citocinese depende de um anel de actina e miosina que se contrai no final da mitose em um sítio a meio caminho entre os cromossomos segregados. Em células animais, o posicionamento do anel contrátil é determinado por sinais que emanam dos microtúbulos do fuso da anáfase. A desfosforilação de alvos das Cdks, resultante da inativação das Cdks na anáfase, desencadeia a citocinese no momento correto após a anáfase. Depois da citocinese, a célula entra em um estado estável de G_1 de baixa atividade das Cdks, onde aguarda por sinais para entrar em um novo ciclo celular.

CONTROLE DA DIVISÃO E DO CRESCIMENTO CELULAR

Um óvulo fertilizado de camundongo e um óvulo fertilizado humano são similares em tamanho, embora produzam animais de tamanhos muito diferentes. Que fatores no controle do comportamento celular em humanos e camundongos são responsáveis por essas diferenças de tamanho? A mesma questão fundamental pode ser feita para cada órgão e tecido do corpo de um animal. Que fatores no controle do comportamento celular explicam o comprimento da tromba de um elefante ou o tamanho de seu cérebro ou do fígado? Essas questões permanecem basicamente sem resposta, ao menos em parte porque têm recebido relativamente pouca atenção em comparação a outras questões na biologia celular e na biologia do desenvolvimento. Entretanto, é possível dizer quais os ingredientes que uma resposta deve ter.

O tamanho de um órgão ou organismo depende principalmente de sua massa celular total, que depende tanto do número total de células como do tamanho das células. Por sua vez, o número de células depende da quantidade de divisões celulares e mortes celulares. Portanto, o tamanho de órgãos e do corpo é determinado por três processos celulares fundamentais: crescimento, divisão e morte. Cada um é fortemente regulado – tanto por programas intracelulares como por moléculas-sinal extracelulares que controlam esses programas.

As moléculas-sinal extracelulares que regulam o tamanho celular e o número de células geralmente são proteínas secretadas solúveis, proteínas ligadas à superfície das células ou componentes da matriz extracelular. Elas podem ser operacionalmente divididas em três classes principais:

1. *Mitógenos*, que estimulam a divisão celular, fundamentalmente desencadeando uma onda de atividade de G_1/S-Cdk que atenua controles intracelulares negativos que, de outra maneira, bloqueariam a progressão ao ciclo celular.
2. *Fatores de crescimento*, que estimulam o crescimento celular (aumento da massa celular) ao promover a síntese de proteínas e outras macromoléculas e ao inibir sua degradação.
3. *Fatores de sobrevivência*, que promovem a sobrevivência celular ao suprimir a forma de morte celular programada conhecida como *apoptose*.

Muitas moléculas-sinal extracelulares promovem todos esses processos, enquanto outras promovem um ou dois. Na verdade, o termo *fator de crescimento* frequentemente é usado de forma inapropriada para descrever um fator que possui qualquer uma dessas atividades. Pior ainda: o termo *crescimento celular* muitas vezes é usado no sentido de aumento do número de células ou de *proliferação celular*.

Além dessas três classes de sinais estimuladores, existem moléculas-sinal extracelulares que suprimem a proliferação celular, o crescimento celular, ou ambos; em geral, sabe-se menos a respeito delas. Existem também moléculas-sinal extracelulares que ativam a apoptose.

Nesta seção, enfocaremos principalmente como os mitógenos e outros fatores, como danos no DNA, controlam a taxa de divisão celular. Em seguida nos voltaremos a um problema importante, mas muito pouco compreendido: como uma célula em proliferação coordena o crescimento com a divisão celular, de forma a manter seu tamanho adequado. Discutiremos o controle da sobrevivência celular e da morte celular por apoptose no Capítulo 18.

Os mitógenos estimulam a divisão celular

Os organismos unicelulares tendem a crescer e se dividir tão rápido quanto possível e sua taxa de proliferação depende em grande parte da disponibilidade de nutrientes no ambiente. Contudo, as células de um organismo multicelular se dividem somente quando o organismo necessita de mais células. Assim, para que uma célula animal se prolifere, ela deve receber sinais extracelulares estimuladores, sob a forma de **mitógenos**, de outras células, geralmente suas vizinhas. Os mitógenos superam os mecanismos intracelulares de freagem que bloqueiam a progressão ao ciclo celular.

Um dos primeiros mitógenos identificados foi o *fator de crescimento derivado de plaquetas* (*PDGF, platelet-derived growth factor*), sendo característico de muitos outros descobertos desde então. A via para seu isolamento começou com a observação de que fibroblastos em uma placa de cultura se proliferam quando é fornecido *soro*, mas não quando é fornecido *plasma*. O plasma é preparado pela remoção das células do sangue sem que ocorra a coagulação; o soro é preparado permitindo que o sangue coagule e coletando o líquido livre de células que resta. Quando o sangue coagula, as plaquetas incorporadas ao coágulo são estimuladas a liberar o conteúdo de suas vesículas secretoras (**Figura 17-61**). A capacidade superior do soro de manter a proliferação celular sugeriu que as plaquetas contêm um ou mais mitógenos. Essa hipótese foi confirmada pela demonstração de que, ao invés de soro, extratos de plaquetas podiam servir na estimulação da proliferação de fibroblastos. Demonstrou-se que o fator crítico nos extratos era uma proteína, que foi subsequentemente purificada e denominada PDGF. No organismo, o PDGF liberado dos coágulos sanguíneos ajuda a estimular a divisão celular durante a cicatrização de feridas.

O PDGF é apenas uma das mais de 50 proteínas que, sabe-se, atuam como mitógenos. A maioria dessas proteínas tem uma especificidade ampla. O PDGF, por exemplo, pode estimular muitos tipos de células a se dividirem, incluindo fibroblastos, células musculares lisas

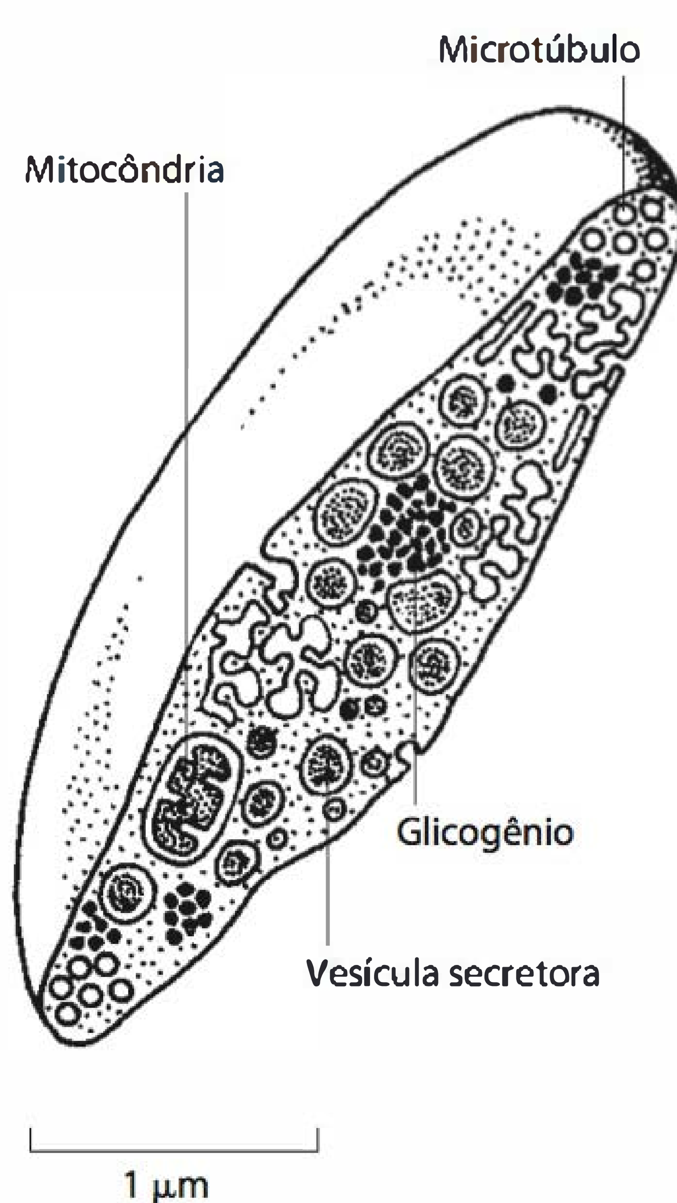


Figura 17-61 Uma plaqueta. As plaquetas são células em miniatura sem núcleo. Elas circulam no sangue e ajudam a estimular a coagulação sanguínea em locais onde houve danos teciduais, impedindo, com isso, o sangramento excessivo. Elas também liberam vários fatores que estimulam a cicatrização. A plaqueta mostrada aqui foi cortada ao meio para mostrar suas vesículas secretoras, algumas das quais contêm o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

e células da neuroglia. Similarmente, o *fator de crescimento epidérmico* (*EGF, epidermal growth factor*) age não somente em células epidérmicas, mas também em muitos outros tipos celulares, incluindo células epiteliais e não-epiteliais. Contudo, alguns mitógenos têm uma especificidade restrita; a *eritropoietina*, por exemplo, induz somente a proliferação de precursores das células sanguíneas vermelhas. Muitos mitógenos, incluindo o PDGF, também desenvolvem outras ações além da estimulação da proliferação celular: podem estimular o crescimento, a sobrevivência, a diferenciação ou a migração celular, dependendo das circunstâncias e do tipo celular.

Em alguns tecidos, proteínas-sinal extracelulares inibidoras se opõem aos reguladores positivos e, desse modo, inibem o crescimento de órgãos. As proteínas-sinal melhor compreendidas são o TGFβ e seus assemelhados. O TGFβ inibe a proliferação de vários tipos celulares, bloqueando a progressão do ciclo celular em G_1 ou estimulando a apoptose.

As células podem retardar a divisão entrando em um estado especializado de não-divisão

Na ausência de um sinal mitogênico para a proliferação, a inibição das Cdks em G_1 é mantida pelos múltiplos mecanismos anteriormente discutidos, e a progressão a um novo ciclo celular é bloqueada. Em alguns casos, as células parcialmente desorganizam seu sistema de controle do ciclo celular e saem do ciclo para um estado especializado de não-divisão chamado de **G_0**.

A maioria das células em nosso organismo está em G_0, porém as bases moleculares e a reversibilidade desse estado variam em diferentes tipos celulares. A maioria de nossos neurônios e células musculares esqueléticas, por exemplo, está em um estado de G_0 *terminalmente diferenciado*, no qual seu sistema de controle do ciclo celular está completamente desmantelado: a expressão dos genes que codificam várias Cdks e ciclinas está permanentemente desligada, e a divisão celular raramente ocorre. Outros tipos celulares se retiram do ciclo celular apenas transitoriamente e retêm a capacidade de remontar o sistema de controle do ciclo celular rapidamente e de reentrar no ciclo. A maioria das células hepáticas, por exemplo, está em G_0, mas pode ser estimulada a se dividir se o fígado sofrer danos. Já outros tipos celulares, incluindo fibroblastos e linfócitos, retiram-se e reentram no ciclo celular repetidamente ao longo de sua vida.

Quase todas as variações na duração do ciclo celular no organismo adulto ocorrem durante o espaço de tempo que a célula passa em G_1 ou G_0. Por outro lado, o tempo que uma célula leva para progredir do início da fase S à mitose normalmente é breve (tipicamente de 12 a 24 horas em mamíferos) e relativamente constante, independentemente do intervalo existente entre uma divisão e a seguinte.

Os mitógenos estimulam as atividades de G_1-Cdk e G_1/S-Cdk

Na grande maioria das células animais, os mitógenos controlam a taxa de divisão celular agindo na fase G_1 do ciclo celular. Como anteriormente discutido, múltiplos mecanismos atuam durante a fase G_1 para suprimir a atividade das Cdks e, desse modo, bloquear a entrada na fase S. Os mitógenos liberam esses freios colocados sobre a atividade das Cdks, permitindo, assim, o começo da fase S.

Como discutimos no Capítulo 15, os mitógenos interagem com receptores de superfície celular a fim de acionar múltiplas vias de sinalização intracelular. Uma importante via age por intermédio da pequena GTPase **Ras**, que leva à ativação de uma *cascata de MAP-cinases*. Isso leva a um aumento da produção de proteínas reguladoras gênicas, incluindo a **Myc**. Acredita-se que a Myc promova a entrada no ciclo celular por meio de vários mecanismos, um dos quais é o aumento da expressão de genes que codificam G_1-ciclinas (D-ciclinas), aumentando, com isso, a atividade da G_1-Cdk (ciclina D-Cdk4). Como discutiremos posteriormente, a Myc também tem um importante papel na estimulação da transcrição de genes que aumentam o crescimento celular.

A função-chave dos complexos de G_1-Cdk em células animais é ativar um grupo de fatores reguladores gênicos denominados **proteínas E2F**, que se ligam a sequências específicas de DNA nos promotores de uma grande variedade de genes que codificam proteínas necessárias à entrada na fase S, incluindo G_1/S-ciclinas, S-ciclinas e proteínas envolvidas na síntese de DNA e na duplicação dos cromossomos. Na ausência de estimulação mitogênica, a expressão gênica dependente de E2F é inibida por uma interação entre E2F e membros da

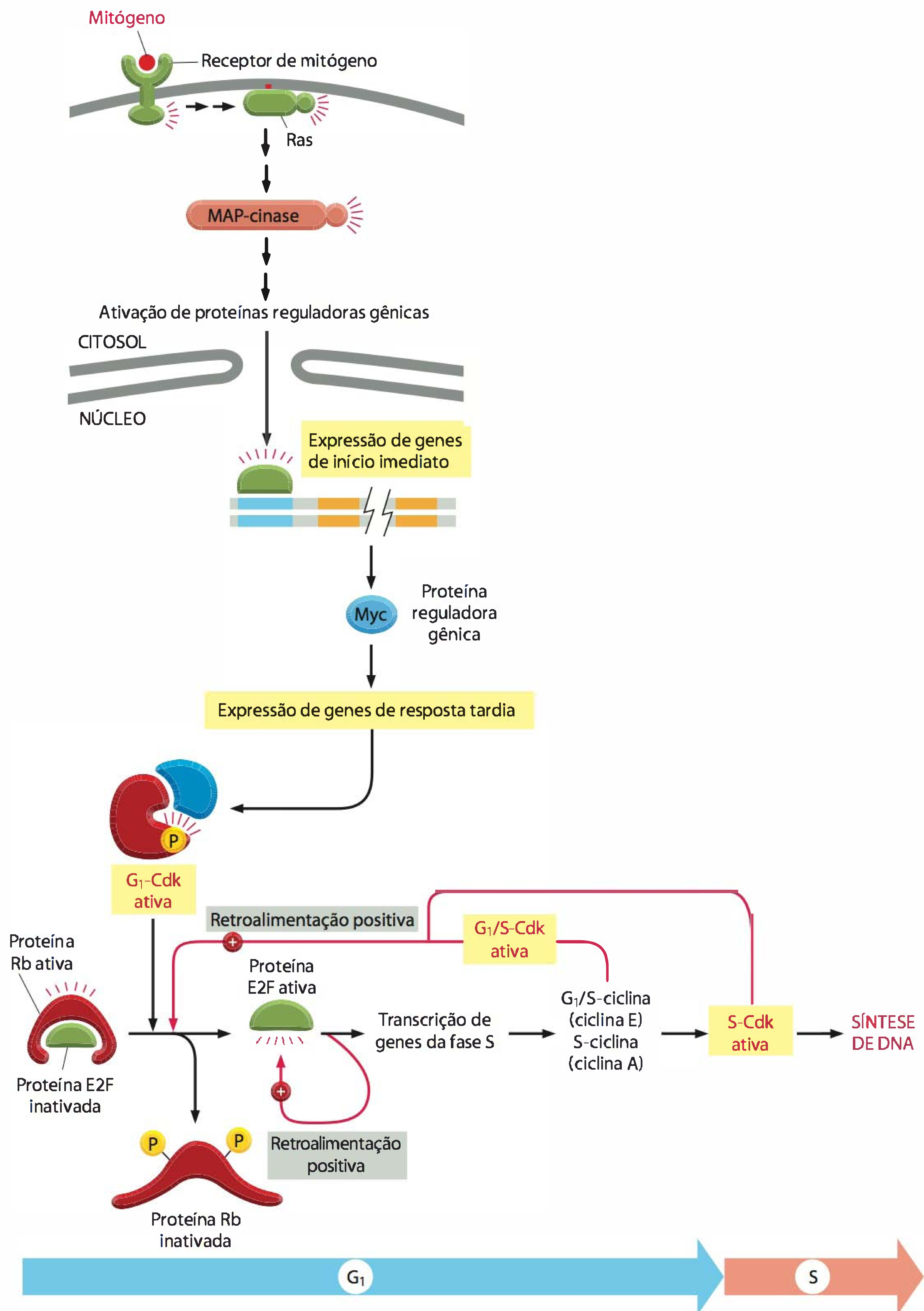


Figura 17-62 Mecanismos que controlam a entrada no ciclo celular e o início da fase S em células animais. Como discutido no Capítulo 15, os mitógenos se ligam a receptores de superfície celular para dar início a vias de sinalização intracelular. Uma das principais vias envolve a ativação da pequena GTPase Ras, que ativa uma cascada de MAP-cinases, levando ao aumento da expressão de numerosos genes *de início imediato*, incluindo o gene que codifica a proteína reguladora gênica Myc. A Myc aumenta a expressão de muitos genes *de resposta tardia*, incluindo alguns que levam ao aumento da atividade da G_1-Cdk (ciclina D-Cdk4), que aciona a fosforilação de membros da família de proteínas Rb. Isso inativa as proteínas Rb, liberando a proteína reguladora gênica E2F para ativar a transcrição de genes de G_1/S, incluindo os genes de uma G_1/S-ciclina (ciclina E) e de uma S-ciclina (ciclina A). As atividades resultantes da G_1/S-Cdk e da S-Cdk estimulam ainda mais a fosforilação da proteína Rb, formando um circuito de retroalimentação positiva. As proteínas E2F também estimulam a transcrição de seus próprios genes, formando outro circuito de retroalimentação positiva.

família de **proteínas do retinoblastoma (Rb)**. Quando as células são estimuladas a se dividir pelos mitógenos, a G_1-Cdk ativa se acumula e fosforila membros da família Rb, reduzindo sua ligação a E2F. As proteínas E2F liberadas ativam, então, a expressão de seus próprios genes-alvo (**Figura 17-62**).

Esse sistema de controle transcricional, como muitos outros sistemas de controle que regulam o ciclo celular, inclui circuitos de retroalimentação que estimulam a transição G_1/S. As proteínas E2F liberadas, por exemplo, aumentam a transcrição de seus próprios genes. Além disso, a transcrição dependente de E2F dos genes da G_1/S-ciclina (ciclina E) e da S-ciclina (ciclina A) leva ao aumento das atividades da G_1/S-Cdk e da S-Cdk, que por sua vez aumentam a fosforilação da proteína Rb e promovem a liberação de mais E2F (ver Figura 17-62).

O membro central da família Rb, a própria proteína Rb, foi originalmente identificado por meio de estudos de uma forma herdável de câncer de olho em crianças, conhecido como *retinoblastoma* (discutido no Capítulo 20). A perda das duas cópias do gene Rb leva à proliferação celular excessiva na retina em desenvolvimento, sugerindo que a proteína Rb é particularmente importante à contenção da divisão celular neste tecido. A perda completa

da Rb não causa imediatamente o aumento da proliferação de células da retina ou de outros tipos celulares, em parte porque a Cdh1 e as CKIs também ajudam a inibir a progressão a G_1, e em parte porque outros tipos celulares contêm proteínas relacionadas à Rb que funcionam como uma cópia de segurança na ausência da Rb. É igualmente provável que outras proteínas, não relacionadas à Rb, ajudem a regular a atividade de E2F.

Níveis adicionais de controle promovem um aumento imenso da atividade da S-Cdk no início da fase S. Mencionamos anteriormente que a Cdh1, ativadora do APC/C, suprime os níveis de ciclinas após a mitose. Contudo, em células animais, as G_1-ciclinas e as G_1/S-ciclinas são resistentes à Cdh1 e podem, portanto, agir de forma oposta ao APC/C, a fim de promover a fosforilação da proteína Rb e a expressão de genes dependente de E2F. A S-ciclina, ao contrário, não é resistente à Cdh1, e seu nível é inicialmente reprimido pela atividade de Cdh1-APC/C. Contudo, a G_1/S-Cdk também fosforila e inativa Cdh1-APC/C, permitindo, com isso, o acúmulo de S-ciclina, promovendo ainda mais a ativação da S-Cdk. A G_1/S-Cdk também inativa as proteínas CKI que reprimem a atividade da S-Cdk. O efeito global de todas essas interações é a ativação rápida e completa dos complexos de S-Cdk necessários ao início da fase S.

Danos no DNA bloqueiam a divisão celular: a resposta a danos no DNA

A progressão ao longo do ciclo celular, e, portanto, a taxa de proliferação celular, é controlada não somente por mitógenos extracelulares, mas também por outros mecanismos extra e intracelulares. Nesse sentido, um dos mais importantes fatores que influenciam são os danos no DNA, que podem ocorrer em resposta a reações químicas espontâneas no DNA, erros na replicação do DNA ou, ainda, exposição à radiação e a certos produtos químicos. É essencial que a célula repare os cromossomos danificados antes de tentar duplicá-los ou segregá-los. O sistema de controle do ciclo celular é capaz de prontamente detectar danos no DNA e interromper o ciclo em dois pontos de verificação – um no Início, no final de G_1, que impede a entrada no ciclo celular e na fase S, e outro no ponto de verificação G_2/M, que impede a entrada na mitose (ver Figura 17-21).

Os danos no DNA dão início a uma via de sinalização pela ativação de um par de proteína-cinases relacionadas chamadas de **ATM** e **ATR**, que se associam ao local do dano e fosforilam várias proteínas-alvo, incluindo duas outras proteína-cinases chamadas de *Chk1* e *Chk2*. Em conjunto, essas várias cinases fosforilam outras proteínas-alvo que levam à interrupção do ciclo celular. Um importante alvo é a proteína reguladora gênica **p53**, que estimula a transcrição do gene que codifica uma proteína CKI denominada *p21*; essa proteína se liga a complexos de G_1/S-Cdk e S-Cdk e inibe suas atividades, ajudando, desse modo, a bloquear a entrada no ciclo celular (**Figura 17-63**).

Os danos no DNA ativam a p53 por um mecanismo indireto. Em células que não foram lesionadas, a p53 é altamente instável e está presente em concentrações muito baixas. Em grande parte, isso se deve a sua interação com outra proteína, a *Mdm2*, que age como uma ubiquitina-ligase que direciona a p53 à destruição nos proteossomos. A fosforilação da p53 após um dano no DNA reduz sua ligação à Mdm2. Isso diminui a degradação da p53, o que resulta em um aumento marcante da concentração de p53 na célula. Além disso, a diminuição da ligação à Mdm2 aumenta a capacidade da p53 de estimular a transcrição gênica (ver Figura 17-63).

As proteína-cinases Chk1 e Chk2 também bloqueiam a progressão do ciclo celular pela fosforilação de membros da família de fosfatases proteicas Cdc25, inibindo, dessa maneira, sua função. Como anteriormente descrito, essas cinases são particularmente importantes à ativação da M-Cdk no início da mitose (ver Figura 17-25). Assim, a inibição da atividade da Cdc25 por danos no DNA ajuda a bloquear a entrada na mitose (ver Figura 17-21).

A resposta a danos no DNA também detecta problemas que surgem quando uma forquilha de replicação falha durante a replicação do DNA. Quando há depleção de nucleotídeos, por exemplo, as forquilhas param durante a fase de alongamento da síntese de DNA. A fim de impedir que a célula tente segregar cromossomos parcialmente replicados, os mesmos mecanismos que respondem a danos no DNA detectam as forquilhas paradas e bloqueiam a entrada na mitose até que os problemas na forquilha estejam resolvidos.

A resposta a danos no DNA não é essencial à divisão celular normal, se as condições ambientais forem ideais. Entretanto, raramente as condições são ideais: um baixo nível de danos no DNA ocorre durante a vida normal de toda célula, e esses danos se acumulam na progênie da célula, se a resposta a danos não estiver funcionando. Em longo prazo, o acúmu-

lo de lesões genéticas em células que não possuem a resposta a danos leva a um aumento da frequência de mutações que promovem o câncer. Na verdade, mutações no gene *p53* ocorrem em pelo menos metade de todos os cânceres humanos (discutido no Capítulo 20). Essa perda de função da p53 permite à célula cancerosa acumular mutações mais facilmente. Similarmente, uma doença genética rara, conhecida como *ataxia telangiectasia*, é ocasionada por um defeito na ATM, uma das proteína-cinases ativada em resposta a danos no DNA induzidos por raios X; pacientes com essa doença são muito sensíveis a raios X e sofrem de taxas elevadas de câncer.

O que acontece se uma lesão no DNA é tão severa que o reparo não é possível? A resposta é diferente para diferentes organismos. Os organismos unicelulares, como a levedura de brotamento, interrompem transitoriamente seu ciclo celular para tentar reparar o dano, mas o ciclo prossegue mesmo que o reparo não tenha sido concluído. Para um organismo de célula única, uma vida com mutações é aparentemente melhor que nenhuma vida. Em organismos multicelulares, porém, a saúde do organismo tem prioridade sobre a vida de uma célula individual. As células que se dividem com danos severos no DNA constituem uma ameaça à vida do organismo, uma vez que danos genéticos podem muitas vezes levar ao câncer e a outras doenças. Assim, células animais com danos severos no DNA não tentam continuar a divisão e, ao invés disso, cometem suicídio, sofrendo apoptose. Assim, a menos que o dano no DNA seja reparado, a resposta a danos no DNA pode levar ou à interrupção do ciclo celular ou à morte celular. Como discutiremos no próximo capítulo, a apoptose induzi-

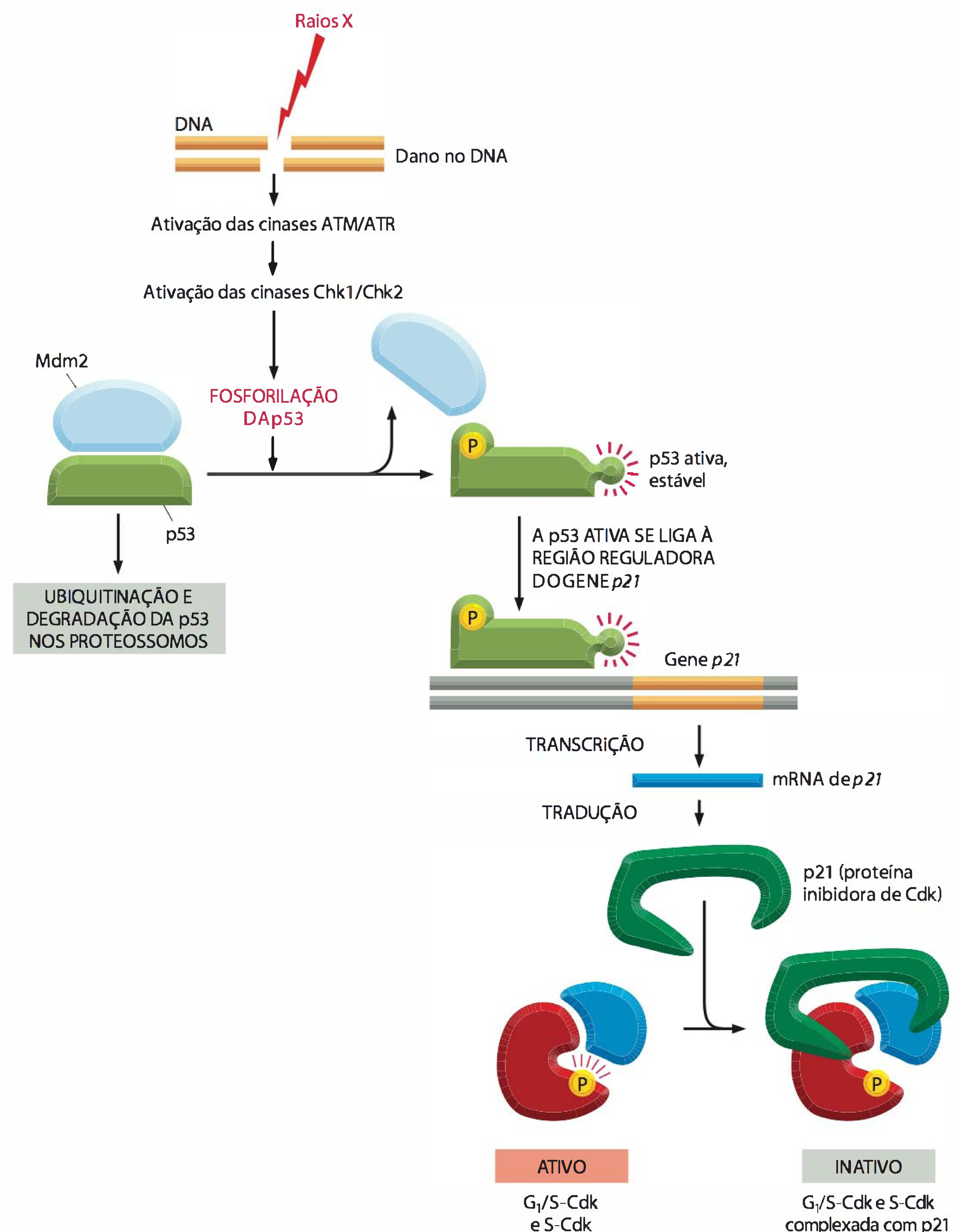


Figura 17-63 Como um dano no DNA interrompe o ciclo celular em G_1. Quando o DNA é lesionado, várias proteína-cinases são recrutadas ao local do dano e dão início a uma via de sinalização que provoca a interrupção do ciclo celular. A primeira cinase no local do dano é a ATM ou a ATR, dependendo do tipo de dano. Outras proteína-cinases, denominadas Chk1 e Chk2, são em seguida recrutadas e ativadas, resultando na fosforilação da proteína reguladora gênica p53. A Mdm2 normalmente se liga à p53 e promove sua ubiquitinação e destruição nos proteossomos. A fosforilação da p53 bloqueia sua ligação à Mdm2; o resultado é o acúmulo de altos níveis de p53, estimulando a transcrição do gene que codifica a proteína CKI p21. A p21 se liga e inativa os complexos de G_1/S-Cdk e S-Cdk, parando a célula em G_1. Em alguns casos, os danos no DNA também induzem ou a fosforilação da Mdm2 ou um decréscimo na produção da Mdm2, o que ocasiona um aumento ainda maior da p53 (não-mostrado).

da por danos no DNA depende, muitas vezes, da ativação da p53. Na verdade, é exatamente essa função promotora de apoptose da p53 que é aparentemente mais importante a nossa proteção contra o câncer.

Muitas células humanas têm um limite embutido do número de vezes que podem se dividir

Muitas células humanas se dividem um número limitado de vezes antes de pararem e sofrerem uma interrupção permanente do ciclo celular. Fibroblastos retirados de tecidos humanos normais, por exemplo, passam por somente cerca de 25 a 50 duplicações populacionais quando cultivados em meios mitogênicos padronizados. Ao final desse período, a proliferação desacelera e finalmente para, e as células entram em um estado de não-divisão do qual nunca mais se recuperam. Esse fenômeno é chamado de **senescência celular replicativa**, embora seja improvável que se trate do mecanismo responsável pela senescência (envelhecimento) do organismo. Acredita-se que a senescência do organismo dependa, em parte, de danos oxidativos progressivos a macromoléculas de vida longa, uma vez que estratégias que reduzem o metabolismo (como a redução da ingestão de comida), e, com isso, reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio, podem prolongar o tempo de vida de animais experimentais.

Em fibroblastos humanos, a senescência celular replicativa parece ser ocasionada por mudanças na estrutura dos **telômeros**, as sequências de DNA repetitivo e proteínas associadas presentes nas extremidades dos cromossomos. Como discutido no Capítulo 5, quando uma célula se divide, as sequências de DNA telomérico não são replicadas da mesma maneira que o restante do genoma e, ao invés disso, são sintetizadas pela enzima **telomerase**. A telomerase também promove a formação de estruturas de capa de proteína que protegem as extremidades dos cromossomos. Como os fibroblastos humanos, e muitas outras células somáticas humanas, são deficientes em telomerase, seus telômeros se tornam mais curtos a cada divisão celular, e suas capas de proteína protetoras se deterioram progressivamente. Finalmente, as extremidades cromossômicas expostas são identificadas como DNA danificado, o que ativa uma interrupção do ciclo celular dependente de p53 que se assemelha à interrupção causada por outros tipos de danos no DNA (ver Figura 17-63). As células de roedores, por outro lado, mantêm a atividade da telomerase quando se proliferam em cultura e, portanto, não possuem tal mecanismo de limitação da proliferação dependente de telômeros. A expressão forçada da telomerase em fibroblastos humanos normais, usando técnicas de engenharia genética, bloqueia essa forma de senescência. Infelizmente, a maioria das células cancerosas readquiriu a capacidade de produzir telomerase e, portanto, manter a função dos telômeros à medida que se proliferam; o resultado é que elas não sofrem o processo de senescência celular replicativa.

Sinais de proliferação anormal ocasionam a interrupção do ciclo celular ou apoptose, exceto em células cancerosas

Muitos componentes das vias de sinalização mitogênicas são codificados por genes que foram originalmente identificados como genes promotores de câncer ou *oncogenes*, pois mutações neles contribuem para o desenvolvimento do câncer. A mutação de um único aminoácido na pequena GTPase Ras, por exemplo, faz com que a proteína se torne permanentemente hiperativa, levando à constante estimulação das vias de sinalização dependentes de Ras, mesmo na ausência de estimulação mitogênica. Similarmente, mutações que causam a superexpressão da proteína Myc estimulam o crescimento e a proliferação celular em excesso, promovendo, desse modo, o desenvolvimento do câncer.

Surpreendentemente, contudo, quando uma forma hiperativada de Ras ou Myc é experimentalmente superproduzida na maioria das células normais, o resultado não é a proliferação excessiva, mas o oposto: as células sofrem a interrupção do ciclo celular ou apoptose. A célula normal parece ser capaz de detectar a estimulação mitogênica anormal, e responde impedindo divisões adicionais. Tais respostas ajudam a impedir tanto a sobrevivência como a proliferação de células com várias mutações que promovem o câncer.

Embora não se saiba como uma célula detecta a estimulação mitogênica excessiva, tal estimulação muitas vezes leva à produção de uma proteína inibidora do ciclo celular chamada de *Arf*, que se liga e inibe a Mdm2. Como discutido anteriormente, a Mdm2 normalmente promove a degradação da p53. A ativação da Arf faz, portanto, com que os níveis de p53 se elevem, induzindo a interrupção do ciclo celular ou apoptose (**Figura 17-64**).

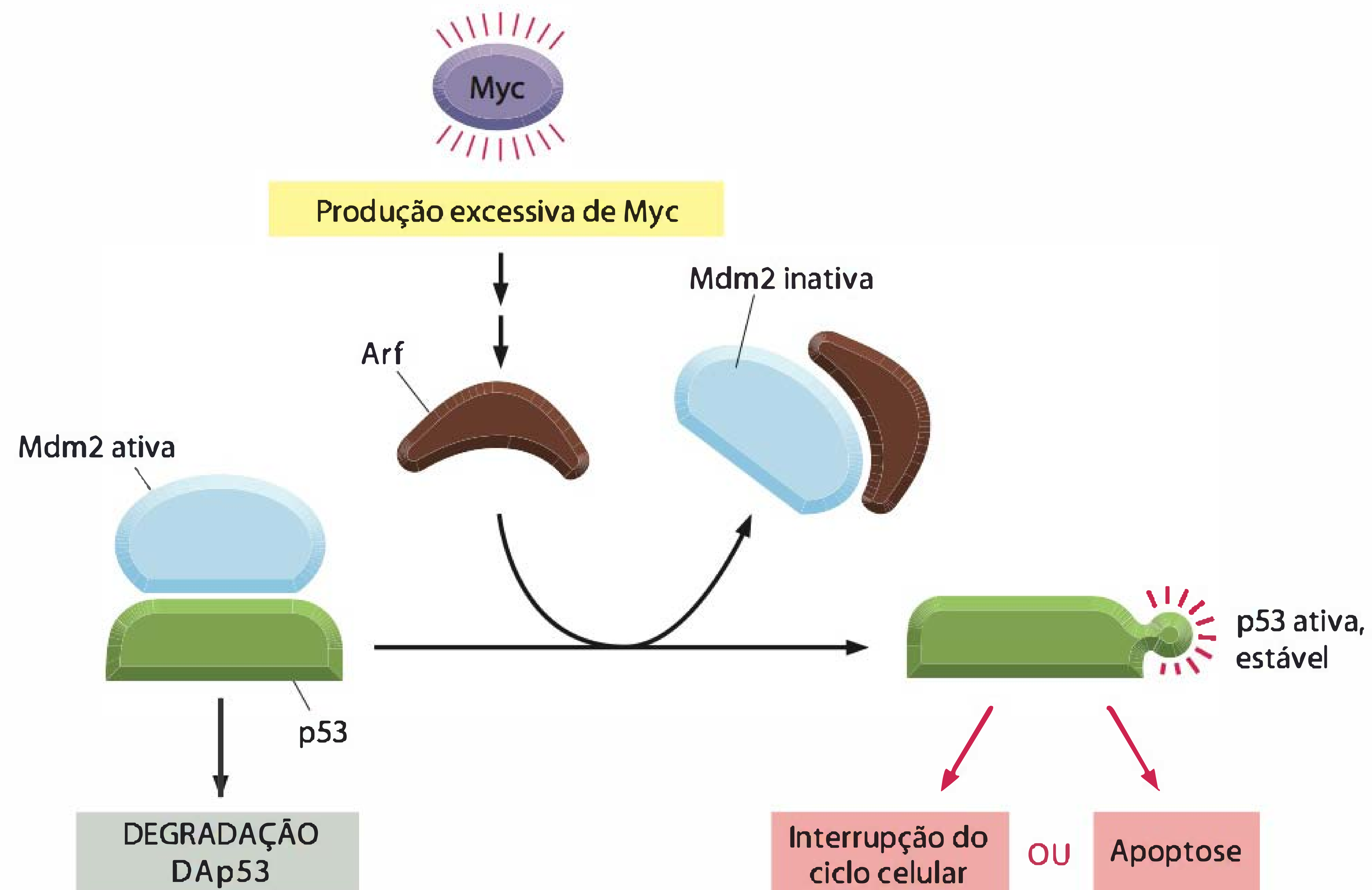


Figura 17-64 Interrupção do ciclo celular ou apoptose induzida pela estimulação excessiva de vias mitogênicas. Níveis anormalmente altos de Myc ocasionam a ativação da Arf, que se liga e inibe a Mdm2, aumentando com isso os níveis de p53 (ver Figura 17-60). Dependendo do tipo celular e das condições extracelulares, a p53 ocasiona, então, a interrupção do ciclo celular ou apoptose.

Como as células cancerosas podem se originar se esses mecanismos bloqueiam a divisão ou a sobrevivência de células mutantes com sinais de proliferação hiperativa? A resposta é que, muitas vezes, o sistema de proteção está inativado nas células cancerosas por mutações nos genes que codificam componentes essenciais das respostas dos pontos de verificação, como a Arf ou a p53 ou, ainda, as proteínas que auxiliam em sua ativação.

O crescimento do organismo e de órgãos depende do crescimento celular

Para que um organismo ou órgão cresça, a divisão celular não é suficiente. Se as células se proliferassem sem crescer, ficariam progressivamente menores e não haveria aumento líquido da massa celular total. Portanto, na maioria das populações de células em proliferação, o crescimento celular acompanha a divisão celular. Em organismos de célula única, como as leveduras, tanto o crescimento celular como a divisão celular necessitam somente de nutrientes. Em animais, por outro lado, tanto o crescimento celular como a divisão celular dependem de moléculas-sinal extracelulares, produzidas por outras células, que denominamos **fatores de crescimento** e mitógenos, respectivamente.

Como os mitógenos, os fatores de crescimento extracelulares que estimulam o crescimento das células animais se ligam a receptores na superfície celular e ativam vias de sinalização intracelular. Essas vias estimulam o acúmulo de proteínas e outras macromoléculas, e o fazem tanto aumentando sua taxa de síntese como diminuindo sua taxa de degradação. Elas também aumentam a absorção de nutrientes e a produção do ATP necessário para abastecer a síntese de proteínas. Uma das mais importantes vias de sinalização intracelular ativada por receptores de fatores de crescimento envolve a enzima *PI3-cinase*, que adiciona um fosfato do ATP à posição 3 dos fosfolipídeos de inositol na membrana plasmática. Como discutido no Capítulo 15, a ativação da PI 3-cinase leva à ativação de uma cinase chamada de *TOR*, que está no núcleo de vias reguladoras de crescimento em todos os eucariotos. Na célula, a TOR ativa muitos alvos que estimulam processos metabólicos e aumentam a síntese de proteínas. Um alvo é uma proteína-cinase chamada de *S6-cinase* (*S6K*), que fosforila a proteína ribossômica S6, aumentando a capacidade dos ribossomos de traduzir um subconjunto de mRNAs que predominantemente codificam componentes ribossômicos. A TOR também ativa indiretamente um fator de iniciação da tradução chamado de *eIF4E*, e ativa diretamente proteínas reguladoras gênicas que promovem o aumento da expressão de genes que codificam subunidades ribossômicas (**Figura 17-65**).

Células em proliferação geralmente coordenam o crescimento com a divisão

Para que células em proliferação mantenham um tamanho constante, elas devem coordenar o crescimento com a divisão celular, a fim de garantir que o tamanho celular dobre a cada divisão: se as células crescerem muito lentamente, ficarão menores a cada divisão, e se cres-

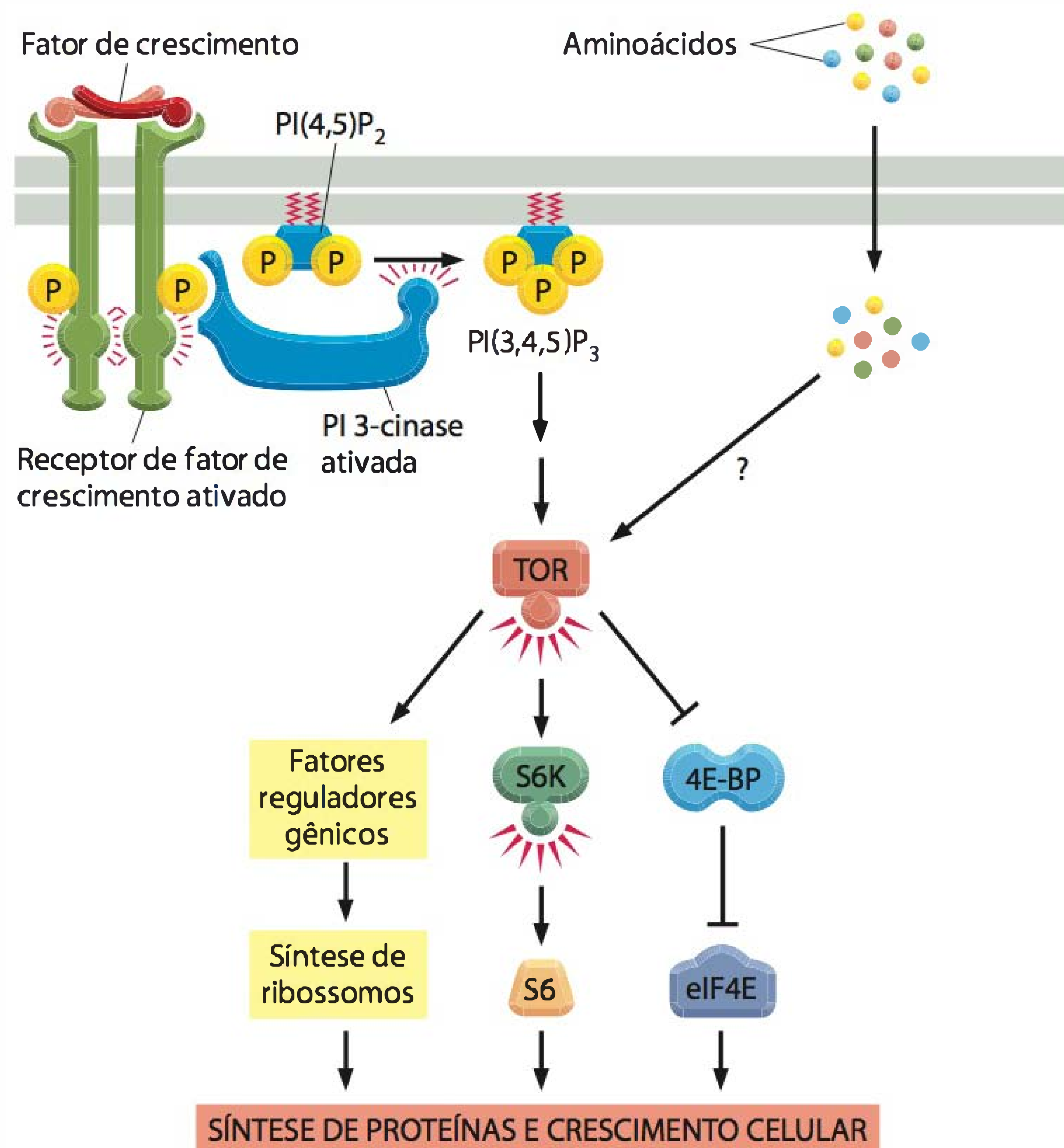


Figura 17-65 Estimulação do crescimento celular por fatores de crescimento extracelulares e nutrientes. Como discutido no Capítulo 15, a ocupação dos receptores de superfície celular por fatores de crescimento leva à ativação da PI 3-cinase, que promove a síntese de proteínas por uma complexa via de sinalização que leva à ativação da proteína-cinase TOR; nutrientes celulares, como aminoácidos, também auxiliam na ativação da TOR, por uma via desconhecida. A TOR emprega múltiplos mecanismos para estimular a síntese de proteínas, como mostrado; ela também inibe a degradação de proteínas (não-mostrado). Fatores de crescimento também estimulam o aumento da produção da proteína reguladora gênica Myc (não-mostrado), que ativa a transcrição de vários genes que promovem o metabolismo e o crescimento celular. A 4E-BP é um inibidor do fator de iniciação da tradução eIF4E.

cerem muito rapidamente, ficarão maiores a cada divisão. Não está claro como as células executam essa coordenação, mas é provável que múltiplos mecanismos estejam envolvidos, os quais variam em diferentes organismos e mesmo em diferentes tipos celulares de um mesmo organismo (**Figura 17-66**).

Entretanto, o crescimento e a divisão das células animais nem sempre são coordenados. Em muitos casos, eles são completamente desacoplados, a fim de permitir o crescimento sem divisão ou a divisão sem crescimento. As células musculares e as células nervosas, por exemplo, podem crescer dramaticamente após terem se retirado permanentemente do ciclo celular. Similarmente, os óvulos de muitos animais crescem até um tamanho extremamente grande sem se dividirem; contudo, após a fertilização, essa relação é invertida, e muitos ciclos de divisão ocorrem sem crescimento (ver Figura 17-9).

Em comparação à divisão celular, existem, curiosamente, poucos estudos acerca de como o tamanho celular é controlado nos animais. O resultado é que ainda é um mistério como o tamanho celular é determinado e por que diferentes tipos celulares no mesmo animal crescem de forma a serem tão diferentes quanto ao tamanho (**Figura 17-67**). Um dos casos melhor compreendidos em mamíferos é o do *neurônio simpático* adulto, que se retirou permanentemente do ciclo celular. Seu tamanho depende da quantidade de *fator de crescimento neuronal* (NGF, *nerve growth factor*) secretado pelas células-alvo que ele enerva;

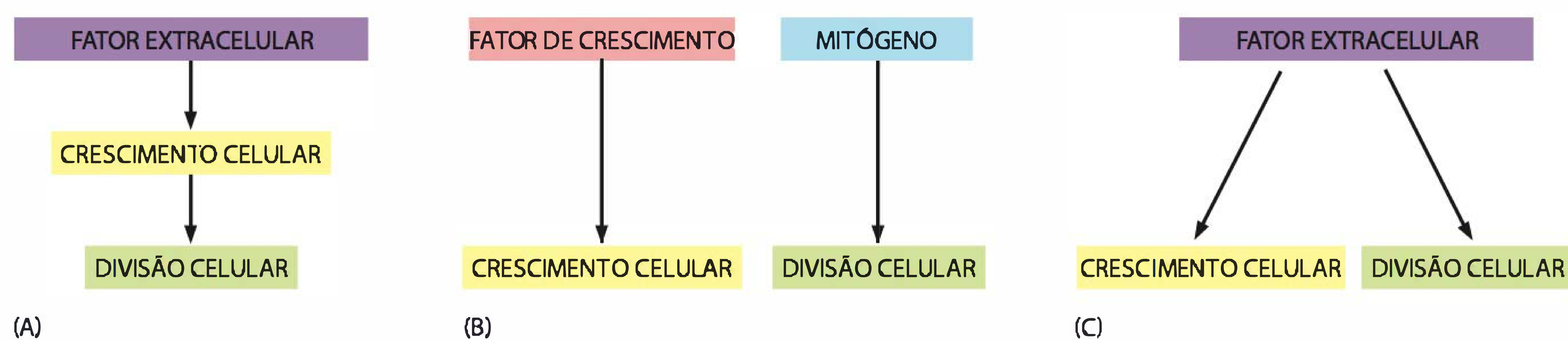


Figura 17-66 Mecanismos em potencial que coordenam o crescimento e a divisão celular. Em células em proliferação, o tamanho celular é mantido por mecanismos que coordenam as taxas de divisão e de crescimento celular. Acredita-se que existam numerosos mecanismos alternativos de acoplamento, e diferentes tipos celulares parecem empregar diferentes combinações desses mecanismos. (A) Em muitos tipos celulares – particularmente nas leveduras – a taxa de divisão celular é regida pela taxa de crescimento celular, de forma que a divisão ocorre somente quando a taxa de crescimento atinge um certo limiar mínimo; em leveduras, são principalmente os níveis de nutrientes extracelulares que regulam a taxa de crescimento e, desse modo, a taxa de divisão celular. (B) Em alguns tipos de células animais, o crescimento e a divisão podem, cada um, ser controlados por fatores extracelulares separados (fatores de crescimento e mitógenos, respectivamente), e o tamanho celular depende dos níveis relativos desses dois tipos de fatores. (C) Alguns fatores extracelulares podem estimular tanto o crescimento como a divisão celular pela ativação simultânea de vias de sinalização que promovem o crescimento e outras vias que promovem a progressão do ciclo celular.

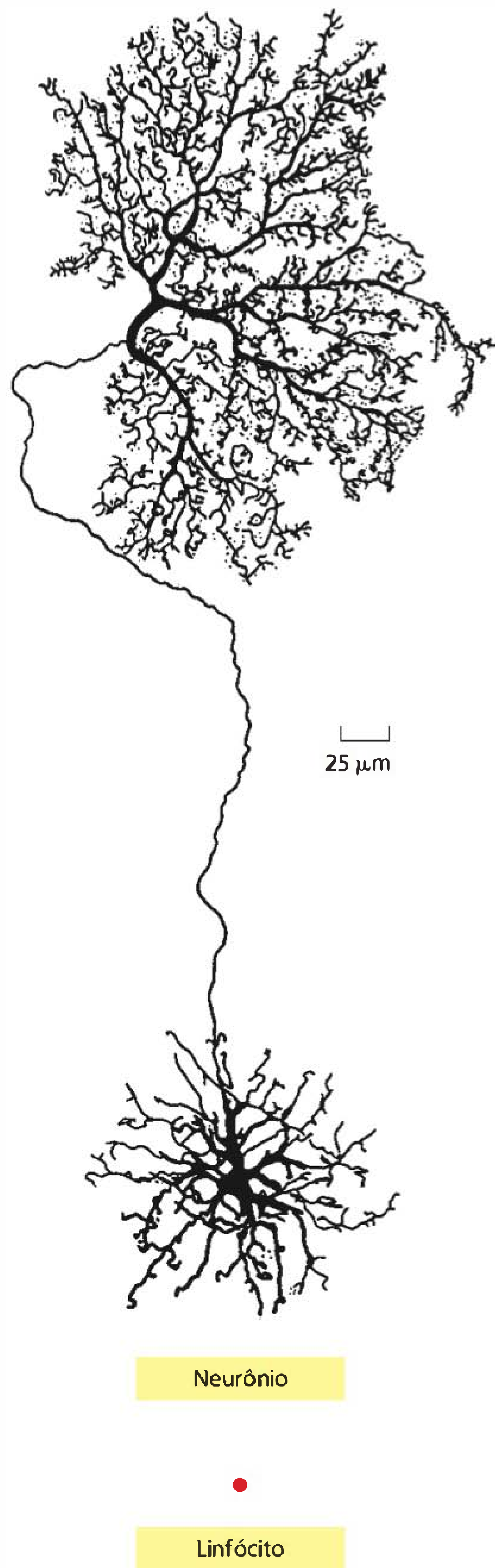


Figura 17-67 Diferença de tamanho entre um neurônio (da retina) e um linfócito de um mamífero. Ambas as células contêm a mesma quantidade de DNA. Um neurônio fica progressivamente maior após ter se retirado permanentemente do ciclo celular. Durante esse período, a razão entre citoplasma e DNA aumenta bastante (por um fator de mais de 10^5 para alguns neurônios). (Neurônio de B. B. Boycott, em Essays on the Nervous System [R. Bellairs e E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

quanto maior a quantidade de NGF à qual o neurônio tem acesso, maior ele se torna. Parece plausível que os genes que uma célula expressa põem limites quanto ao tamanho que ela pode ter, ao passo que moléculas-sinal extracelulares e nutrientes regulam o tamanho dentro desses limites. O desafio é identificar os genes e as moléculas-sinal relevantes a cada tipo celular.

Células vizinhas competem por proteínas-sinal extracelulares

Quando a maioria dos tipos de células de mamíferos é cultivada em uma placa de cultura na presença de soro, elas se aderem ao fundo da placa, se espalham e se dividem até formarem uma monocamada confluente. Cada célula está fixada à placa e em contato com suas vizinhas por todos os lados. Nesse ponto, células normais, diferentemente de células cancerosas, param de se proliferar – um fenômeno conhecido como *inibição da divisão celular dependente de densidade*. Esse fenômeno foi originalmente descrito em termos de "inibição por contato" da divisão celular, mas é improvável que interações por contato célula-célula sejam as únicas responsáveis. A densidade de população celular na qual a proliferação celular cessa na monocamada confluente aumenta à medida que a concentração de soro aumenta no meio. Além disso, se um jato de meio de cultura novo é passado sobre uma camada confluente de fibroblastos, a fim de aumentar o suprimento de mitógenos, as células abaixo do jato são induzidas à divisão (**Figura 17-68**). Assim, a inibição da divisão celular dependente de densidade parece refletir, ao menos em parte, a capacidade de uma célula de esgotar o meio de mitógenos extracelulares à sua volta, privando, desse modo, suas vizinhas.

Esse tipo de competição poderia ser importante para células em tecidos, assim como em cultura, pois impede que as mesmas se proliferem além de uma certa densidade populacional, determinada pelas quantidades disponíveis de mitógenos, fatores de crescimento e fatores de sobrevivência. As quantidades desses fatores nos tecidos normalmente são limitantes, no sentido de que o aumento de sua quantidade resulta em um aumento do número celular, do tamanho celular, ou de ambos. Portanto, as quantidades desses fatores nos tecidos têm um importante papel na determinação do tamanho e do número celular, e possivelmente do tamanho final do órgão ou do tecido.

Em alguns casos, o tamanho total de um tecido também pode ser regido por fatores inibidores extracelulares. A *miostatina*, por exemplo, é um membro da família TGFβ que normalmente inibe a proliferação de mioblastos que se fundem para formar as células musculares esqueléticas. Quando o gene que codifica a miostatina é deletado em camundongos, os músculos crescem e ficam várias vezes maiores que o normal. Notavelmente, duas raças de gado que foram cruzadas para músculos grandes se mostraram ter mutações no gene que codifica a miostatina (**Figura 17-69**).

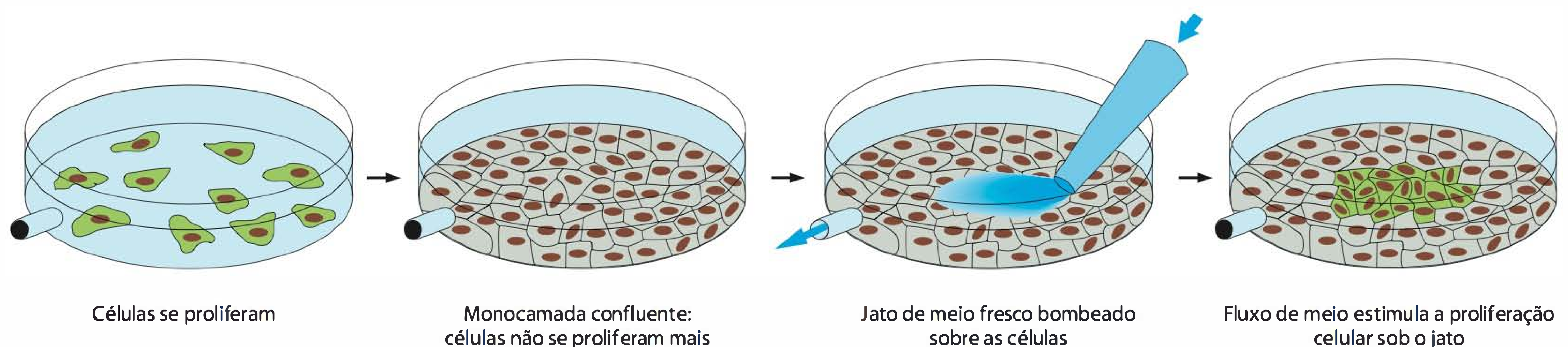


Figura 17-68 Efeito de meio novo sobre uma monocamada celular confluente. As células em uma monocamada confluente não se dividem (*cinza*). As células retomam a divisão (*verde*) quando diretamente expostas a meio de cultura fresco. Aparentemente, na monocamada confluente não-perturbada, a proliferação parou porque o meio próximo às células foi esgotado de mitógenos, pelos quais as células competem.



Figura 17-69 Efeitos de uma mutação na miostatina sobre o tamanho muscular. A mutação leva a um grande aumento na massa de tecido muscular, como ilustrado neste touro Belgian Blue. O Belgian Blue foi produzido por criadores de gado, e só recentemente se descobriu que possui uma mutação no gene *Miostatina*. (De H. L. Sweeney, *Sci. Am.* 291:62, 2004. Com permissão de Scientific American.)

Os animais controlam a massa celular total por mecanismos desconhecidos

O tamanho de um animal ou de um de seus órgãos depende, em grande parte, do número e do tamanho das células que contém – isto é, da massa celular total. Notavelmente, os animais podem, de algum modo, estimar a massa celular total em um tecido ou órgão e regulá-la: em muitas circunstâncias, por exemplo, se o tamanho celular é experimentalmente aumentado ou diminuído em um órgão, os números celulares se ajustam para manter um tamanho normal de órgão. Isso foi dramaticamente exemplificado em experimentos com salamandras, nas quais o tamanho celular foi manipulado por meio da alteração da ploidia (em todos os organismos, o tamanho de uma célula é proporcional a sua ploidia ou ao seu conteúdo genômico). Salamandras de diferentes ploidias são do mesmo tamanho, mas têm diferentes números de células. Células individuais em uma salamandra pentaploide têm cerca de cinco vezes o volume daquelas em uma salamandra haploide, e em cada órgão as pentaploides têm somente um quinto do número de células de suas primas haploides, de forma que os órgãos são aproximadamente do mesmo tamanho nos dois animais (**Figuras 17-70** e **17-71**). Evidentemente, nesse caso (e em muitos outros), o tamanho dos órgãos e do organismo depende de mecanismos que podem de algum modo calcular a massa celular total. Entretanto, como os animais calculam e ajustam a massa total continua sendo um mistério.

O desenvolvimento de membros e órgãos de tamanho e forma específica depende de complexos controles posicionais, assim como de concentrações locais de proteínas-sinal extracelulares que estimulam ou inibem o crescimento, a divisão e a sobrevivência celular. Como discutiremos no Capítulo 22, agora conhecemos muitos genes que ajudam a modelar esses processos no embrião. Contudo, muito ainda deve ser aprendido sobre como esses genes regulam o crescimento, a divisão, a sobrevivência e a diferenciação celular na geração de um organismo complexo.

Os controles que influenciam esses processos no corpo adulto também são pouco entendidos. Quando um ferimento de pele cicatriza em um vertebrado, por exemplo, aproxi-

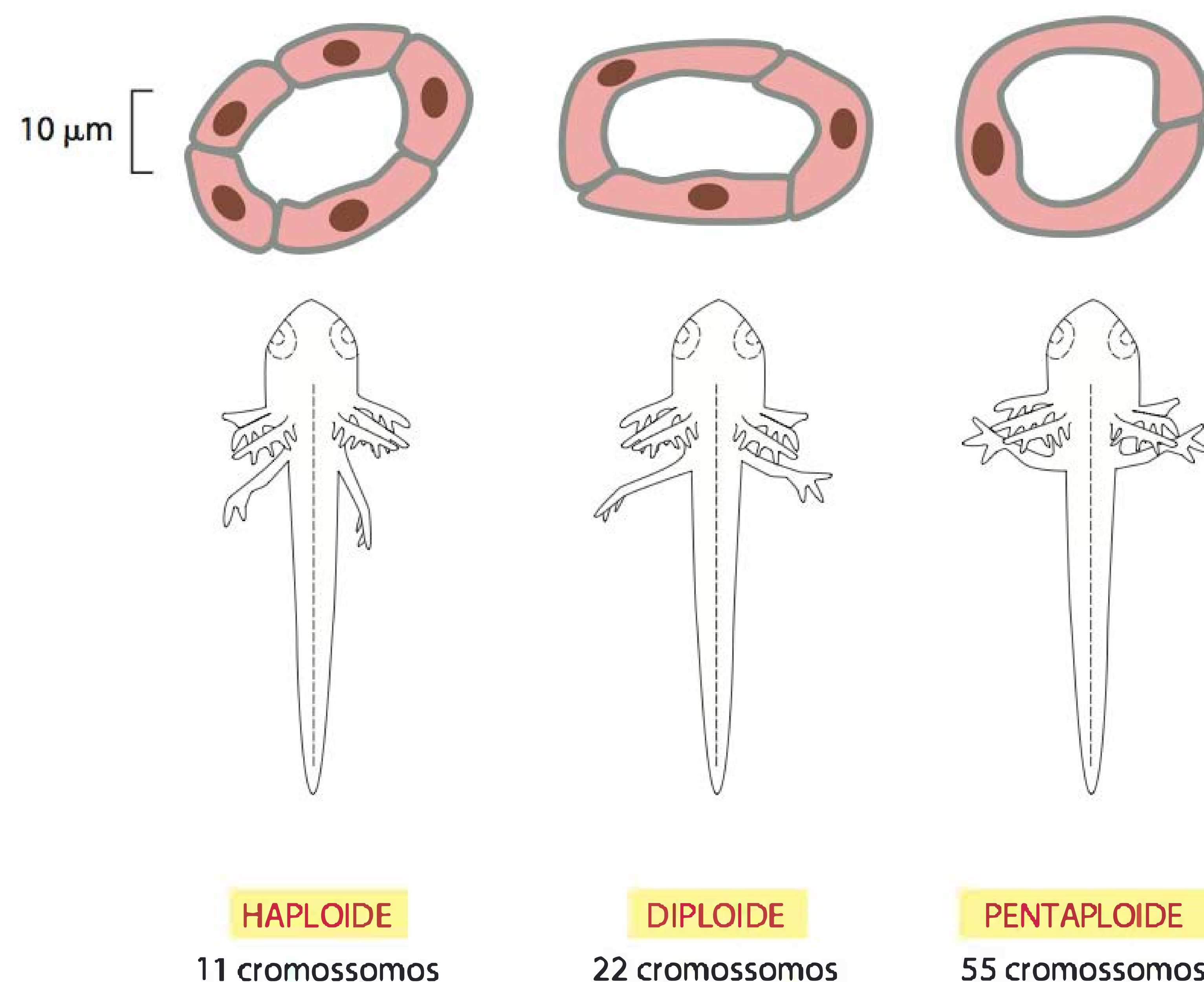


Figura 17-70 Secções de túbulos renais de larvas de salamandra de diferentes ploidias. Em todos os organismos, das bactérias aos humanos, o tamanho celular é proporcional à ploidia. As salamandras pentaploides, por exemplo, possuem células que são muito maiores que aquelas de salamandras haploides. Contudo, os animais e seus órgãos individuais são do mesmo tamanho, porque cada tecido no animal pentaploide contém menos células. Isso indica que o tamanho de um organismo ou órgão não é controlado simplesmente pela contagem de divisões ou números celulares; a massa celular total deve de algum modo ser regulada. (Adaptada de G. Fankhauser, em *Analysis of Development* [B. H. Willier, P. A. Weiss e V. Hamburger, eds.], p. 126-150. Philadelphia: Saunders, 1955.)

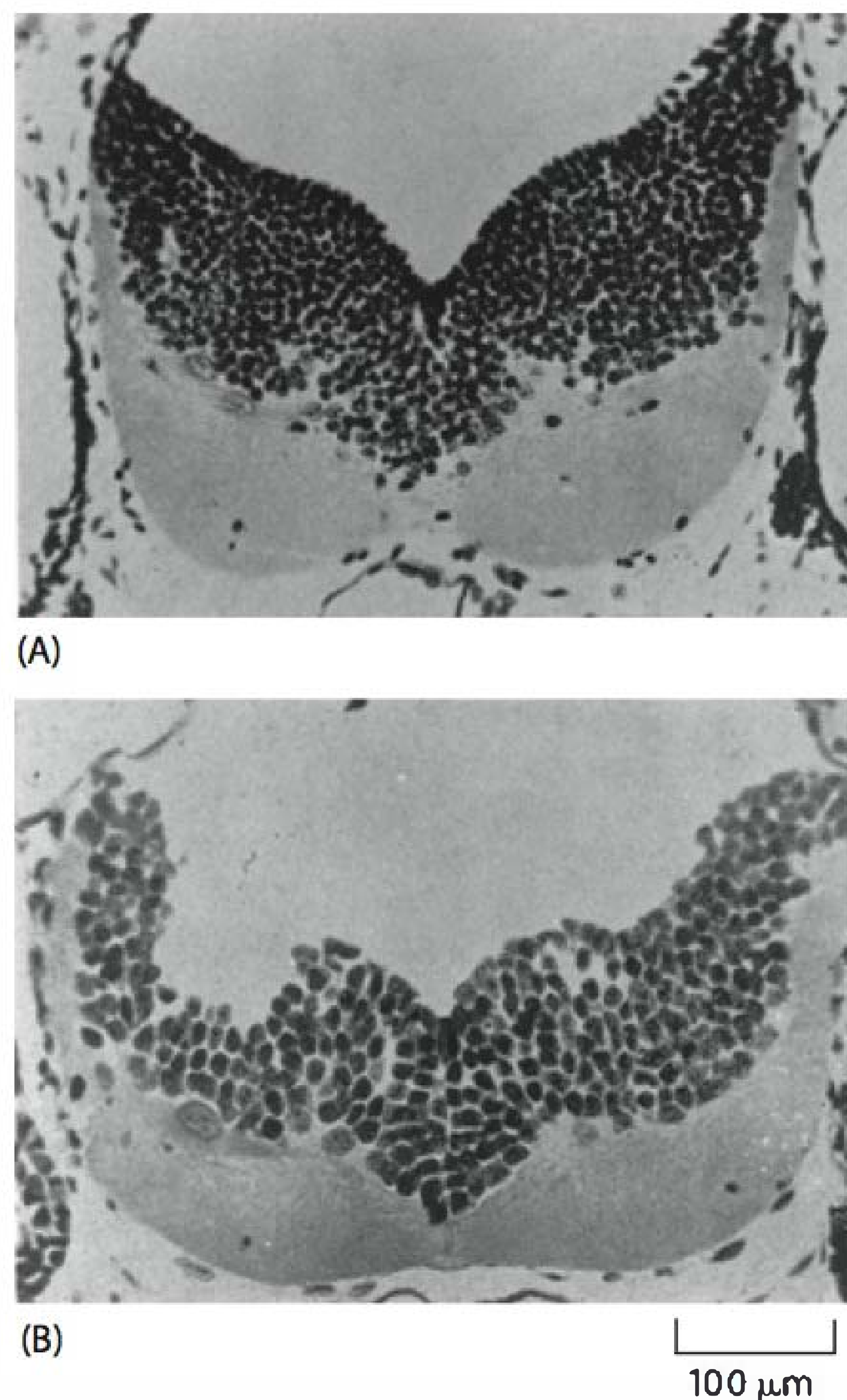


Figura 17-71 O cérebro posterior em uma salamandra haploide e em uma tetraploide. (A) Esta micrografia óptica mostra uma secção transversal do cérebro posterior de uma salamandra haploide. (B) Uma secção transversal correspondente do cérebro posterior de uma salamandra tetraploide, mostrando como números celulares reduzidos compensam o tamanho celular aumentado, de forma que o tamanho total do cérebro posterior é o mesmo nos dois animais. (De G. Fankhauser, *Int. Rev. Cytol.* 1:165-193, 1952. Com permissão de Elsevier.)

madamente doze tipos celulares, que variam de fibroblastos a células de Schwann, devem ser regenerados em números, tamanhos e posições apropriadas para reconstruir o tecido perdido. Os mecanismos que controlam o crescimento e a proliferação celular nos tecidos são igualmente centrais ao entendimento do câncer, uma doença na qual os controles funcionam mal, como discutido no Capítulo 20.

Resumo

Em animais multicelulares, o tamanho, a divisão e a morte celular são cuidadosamente controlados, a fim de assegurar que o organismo e seus órgãos atinjam e mantenham um tamanho apropriado. Os mitógenos estimulam a taxa de divisão celular ao removerem freios moleculares intracelulares que restringem a progressão do ciclo celular em G_1. Os fatores de crescimento promovem o crescimento celular (um aumento da massa celular) pela estimulação da síntese e pela inibição da degradação de macromoléculas. Para que as células em proliferação mantenham um tamanho celular constante, elas empregam múltiplos mecanismos que asseguram que o crescimento seja coordenado com a divisão celular. Os animais mantêm o tamanho normal de seus tecidos e órgãos ajustando o tamanho celular para compensar mudanças no número de células, ou vice-versa. Os mecanismos que possibilitam tal fato não são conhecidos.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

17-1 Uma vez que existem cerca de 10^{13} células em um humano adulto, e cerca de 10^{10} células morrem e são substituídas todos os dias, nos tornamos novas pessoas a cada três anos.

17-2 A regulação dos complexos de ciclina-Cdk depende inteiramente de fosforilação e desfosforilação.

17-3 A fim de que as células em proliferação mantenham um tamanho relativamente constante, a duração do ciclo celular deve condizer com o tempo que a célula leva para dobrar de tamanho.

17-4 Ao passo que outras proteínas vêm e vão durante o ciclo celular, as proteínas do complexo de reconhecimento da origem permanecem ligadas ao DNA o tempo inteiro.

17-5 Os cromossomos são posicionados na placa metafásica por forças iguais e opostas que os puxam em direção aos dois polos do fuso.

17-6 Se pudéssemos ligar a atividade da telomerase em todas as nossas células, poderíamos impedir o envelhecimento.

Discuta as seguintes questões.

17-7 Muitos genes do ciclo celular de células humanas funcionam perfeitamente bem quando expressos em células de levedura. Por que você supõe que isso é considerado notável? Afinal, muitos genes humanos que codificam enzimas de reações metabólicas também funcionam em leveduras, e ninguém considera isso notável.

17-8 Você isolou um novo mutante *Cdc* de levedura de brotamento que forma colônias a 25°C, mas não a 37°C. Agora você gostaria de isolar o gene selvagem que corresponde ao gene defeituoso em seu mutante *Cdc*. Como você poderia isolar o gene mutante usando uma biblioteca de DNA com base em plasmídeos e preparada a partir de células selvagens de levedura?

17-9 Você isolou um mutante sensível à temperatura de levedura de brotamento. Ele se prolifera bem a 25°C, mas a 35°C todas as células desenvolvem um grande broto e, então, param sua progressão ao ciclo celular. A morfologia característica das células no momento em que param de passar por ciclos é conhecida como a morfologia-marco.

É muito difícil obter culturas sincrônicas desta levedura, mas você gostaria de saber exatamente onde, no ciclo celular, o produto do gene sensível à temperatura deve funcionar – seu ponto de execução, na terminologia da área – a fim de que a célula complete o ciclo. Um amigo talentoso, que possui um bom microscópio equipado com uma plataforma aquecida e uma câmera de vídeo, sugere que você faça filmes de uma área das células à medida que elas experienciam o aumento de temperatura, e que acompanhe a morfologia das células quando elas param de passar por ciclos. Uma vez que as células não se movem muito, é relativamente simples estudar células individuais. Para que faça sentido o que você vê, você arranja um círculo de fotografias das células no início do experimento em ordem de tamanho dos brotos-filhos. Você então verifica as fotografias correspondentes àquelas mesmas células seis horas mais tarde, quando o crescimento e a divisão pararam completamente. Os resultados de seu mutante são mostrados na **Figura Q17-1**.

A. Indique no diagrama da Figura Q17-1 onde se situa o ponto de execução de seu mutante.

8. O ponto de execução corresponde ao momento no qual o ciclo celular é interrompido em seu mutante? Como você pode dizer?

17-10 A subunidade Scc1 da coesina de levedura, que é essencial ao pareamento de cromátides-irmãs, pode ser artificialmente regulada para a expressão em qualquer ponto no ciclo celular. Se a

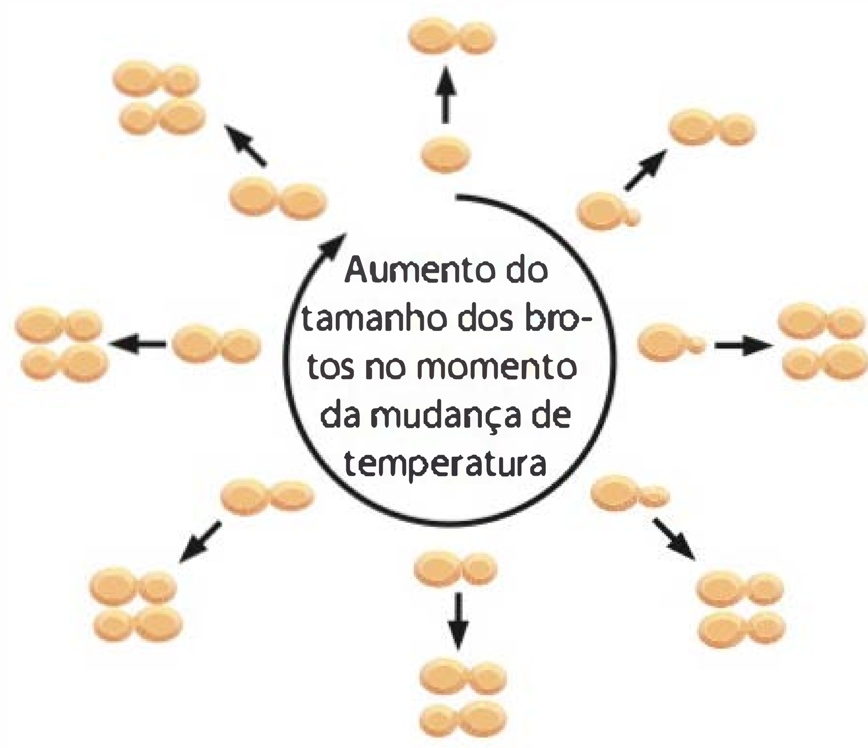


Figura Q17-1 Fotografia em diferentes intervalos de tempo de um mutante de levedura sensível à temperatura (Questão 17-9). As células no *anel interno* estão arranjadas em ordem de tamanho do broto, que corresponde a sua posição no ciclo celular. Após 6 horas a 37°C, elas deram origem às células mostradas no *anel externo*. Nenhum crescimento ou divisão adicional ocorre.

expressão é ligada no começo da fase S, todas as células se dividem razoavelmente e sobrevivem. Por outro lado, se a expressão da Scc1 é ligada somente após a fase S ter sido concluída, as células deixam de se dividir e morrem, ainda que a Scc1 se acumule no núcleo e interaja eficientemente com os cromossomos. Por que você supõe que a coesina deve estar presente durante a fase S para que as células se dividam normalmente?

17-11 Se as coesinas unem as cromátides-irmãs totalmente ao longo de sua extensão, como é possível que as condensinas gerem cromossomos mitóticos como os mostrados na **Figura Q17-2**, que claramente mostra as duas cromátides-irmãs como domínios separados?

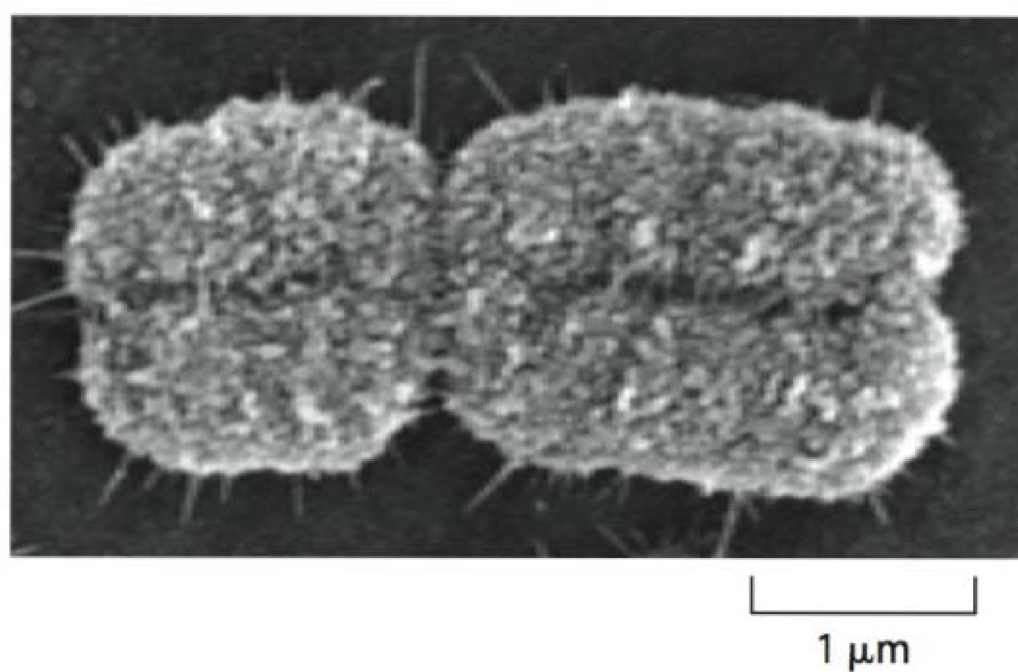


Figura Q17-2 Micrografia eletrônica de varredura de um cromossomo mitótico inteiramente condensado de células de vertebrado (Questão 17-11). (Cortesia de Terry D. Allen.)

17-12 Altas doses de cafeína interferem no mecanismo do ponto de verificação da replicação do DNA em células de mamíferos. Por que, então, você supõe que o médico ainda não emitiu um aviso apropriado para bebedores de café forte e bebidas à base de cola? Uma xícara de café típica (150 mL) contém 100 mg de cafeína (196 g/mol). Quantas xícaras de café você teria de tomar para atingir a dose (10 mM) necessária para interferir no mecanismo do ponto de verificação da replicação do DNA? (Um adulto típico contém cerca de 40 litros de água.)

17-13 Na **Figura Q17-3**, uma célula viva do epitélio pulmonar de um tritão é mostrada em diferentes estágios na fase M. Ordene estas micrografias ópticas na sequência correta e identifique o estágio na fase M que cada uma representa.

17-14 Quantos cinetocoros existem em uma célula humana em mitose?

17-15 Um artigo clássico claramente diferenciou as propriedades dos microtúbulos astrais daquelas dos microtúbulos do cinetocoro.

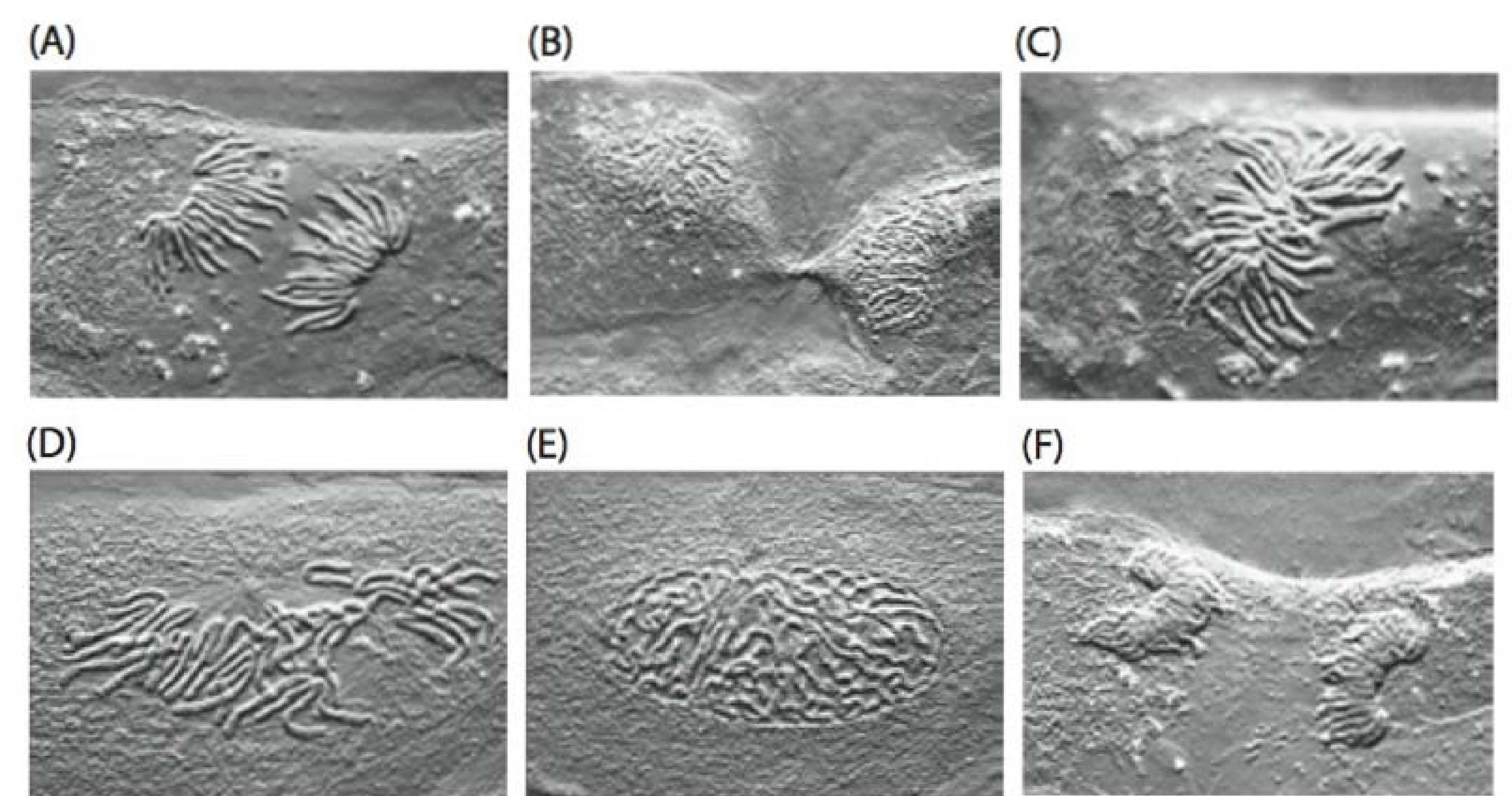


Figura Q17-3 Micrografias ópticas de uma única célula em diferentes estágios da fase M (Questão 17-13). (Cortesia de Conly L. Rieder.)

Usaram-se centrossomos para iniciar o crescimento dos microtúbulos, e depois foram adicionados cromossomos. Os cromossomos se ligaram às extremidades livres dos microtúbulos, como ilustrado na **Figura Q17-4**. Em seguida, os complexos foram diluídos a uma concentração muito baixa de tubulina (bem abaixo da concentração crítica à montagem de microtúbulos) e novamente examinados (Figura Q17-4). Como é evidente, somente os microtúbulos do cinetocoro ficaram estáveis à diluição.

A. Por que você acha que os microtúbulos do cinetocoro são estáveis?

B. Como você explicaria o desaparecimento dos microtúbulos astrais após a diluição? Eles se destacam do centrossomo, se despolimerizam de uma extremidade ou se desintegram ao acaso ao longo de sua extensão?

C. Como um período de tempo após a diluição ajudaria a distinguir entre esses possíveis mecanismos quanto ao desaparecimento dos microtúbulos astrais?

17-16 Quais são as duas diferentes máquinas citoesqueléticas montadas para executar os processos mecânicos de mitose e citocinese em células animais?

17-17 Como os mitógenos, os fatores de crescimento e os fatores de sobrevivência diferem entre si?

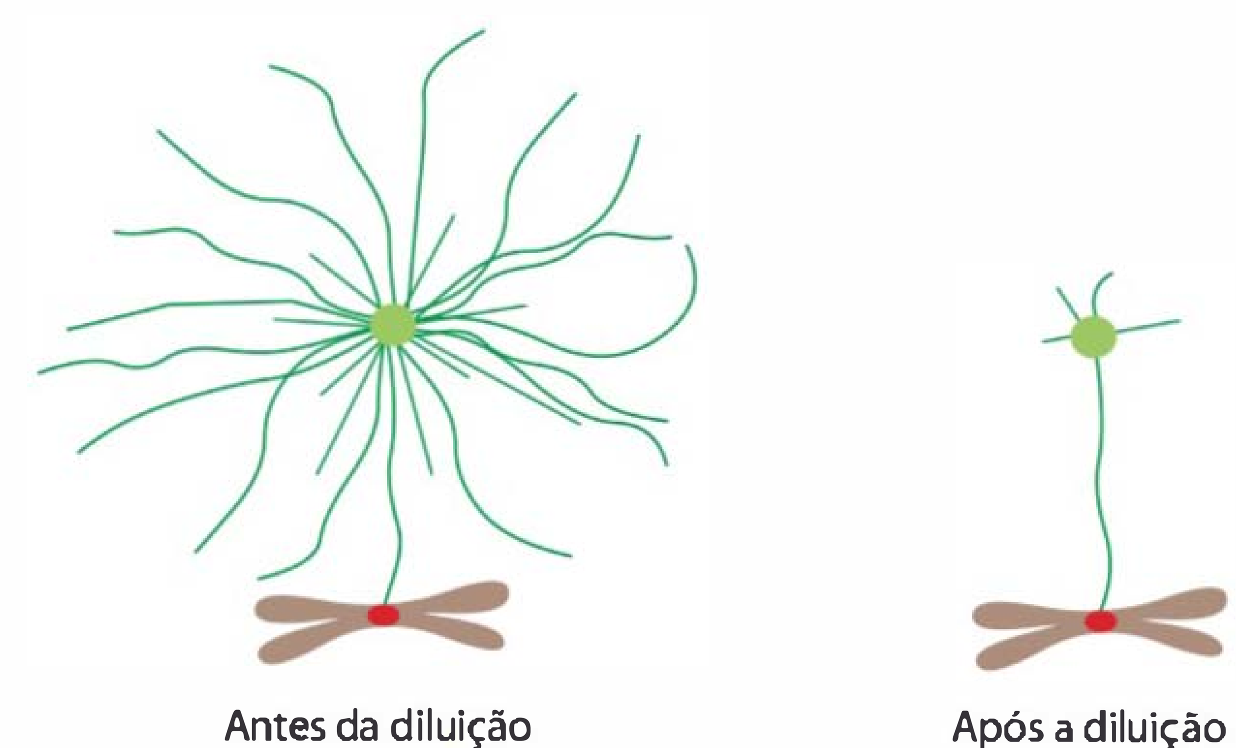


Figura Q17-4 Arranjos de centrossomos, cromossomos e microtúbulos antes e após a diluição a baixa concentração de tubulina (Questão 17-15).

REFERÊNCIAS

Geral

Morgan DO (2007) The Cell Cycle: Principles of Control. London: New Science Press.
Murray AW & Hunt T (1993) The Cell Cycle: An Introduction. New York: WH Freeman and Co.

Panorama geral do ciclo celular

Forsburg SL & Nurse P (1991) Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 7:227–256.
Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR et al (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46–51.
Kirschner M, Newport J & Gerhart J (1985) The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet* 1:41–47.

Nurse P, Thuriaux P & Nasmyth K (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146:167–178.

O sistema de controle do ciclo celular

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J et al (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389–396.
Lohka MJ, Hayes MK & Maller JL (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3009–3013.
Masui Y and Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177:129–146.
Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261–291.
Murray AW & Kirschner MW (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339:275–280.
Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821–828.
Peters JM (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:644–656.
Petroski MD & Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:9–20.
Wittenberg C & Reed SI (2005) Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24:2746–2755.

Fase S

Arias EE & Walter JC (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev* 21:497–518.
Bell SP & Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71:333–374.
Bell SP & Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357:128–134.
Diffley JF (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* 14:R778–R786.
Groth A, Rocha W, Verreault A et al (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721–733.
Tanaka S, Umemori T, Hirai K et al (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445:328–332.
Zegerman P & Diffley JF (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445:281–285.

Mitose

Cheeseman IM, Chappie JS, Wilson-Kubalek EM et al (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127:983–997.
Dong Y, Vanden Beldt KJ, Meng X et al (2007) The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. *Nature Cell Biol* 9:516–522.
Heald R, Tournebize R, Blank T et al (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382:420–425.
Hirano T (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* 15:R265–R275.
Kapoor TM, Lampson MA, Hergert P et al (2006) Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* 311:388–391.
Mitchison T & Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242.
Mitchison TJ (1989) Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol* 109:637–652.
Mitchison TJ & Salmon ED (2001) Mitosis: a history of division. *Nature Cell Biol* 3:E17–E21.
Musacchio A & Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8:379–393.
Nasmyth K (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297:559–565.
Nigg EA (2007) Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol* 17:215–221.
Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503–508.
Page SL & Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789.
Petronczki M, Siomos MF & Nasmyth K (2003) Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112:423–440.
Salmon ED (2005) Microtubules: a ring for the depolymerization motor. *Curr Biol* 15:R299–R302.
Tanaka TU, Stark MJ & Tanaka K (2005) Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:929–942.
Uhlmann F, Lottspeich F & Nasmyth K (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400:37–42.
Wadsworth P & Khodjakov A (2004) E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly. *Trends Cell Biol* 14:413–419.

Citocinese

Albertson R, Riggs B & Sullivan W (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol* 15:92–101.
Burgess DR & Chang F (2005) Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 15:156–162.
Dechant R & Glotzer M (2003) Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Dev Cell* 4:333–344.
Eggert US, Mitchison TJ & Field CM (2006) Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem* 75:543–566.
Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307:1735–1739.
Grill SW, Gonczy P, Stelzer EH et al (2001) Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409:630–633.
Jurgens G (2005) Plant cytokinesis: fission by fusion. *Trends Cell Biol* 15:277–283.
Rappaport R (1986) Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol* 105:245–281.

Controle da divisão e do crescimento celular

Adhikary S & Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:635–645.
Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–522.
Conlon I & Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* 96:235–244.
Frolov MV, Huen DS, Stevaux O et al (2001) Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 15:2146–2160.
Harrison JC & Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40:209–235.
Jorgensen P & Tyers M (2004) How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14:R1014–R1027.
Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.
Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397–400.
Sherr CJ & DePinho RA (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102:407–410.
Sherr CJ & Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512.
Trimarchi JM & Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:11–20.
Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev Cancer* 2:594–604.
Zetterberg A & Larsson O (1985) Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5365–5369.

18

Apoptose

A morte celular desempenha uma parte importante e crucial no desenvolvimento de animais e plantas, e normalmente continua na vida adulta. Em um humano adulto saudável, bilhões de células morrem na medula óssea e nos intestinos a cada hora. Nossos tecidos não encolhem porque, por mecanismos reguladores desconhecidos, a divisão celular é proporcional à morte celular. Sabe-se agora que essas mortes celulares "normais" são suicídios, nos quais as células ativam um programa de morte intracelular e matam a si mesmas de uma maneira controlada – um processo conhecido como **morte celular programada**. A ideia de que as células animais têm um programa de morte embutido foi proposta nos anos de 1970, mas sua aceitação geral levou outros 20 anos e dependeu de estudos genéticos no nematódeo *C. elegans* que identificaram os primeiros genes envolvidos na morte celular programada e em seu controle.

A morte celular programada em animais em geral, mas não exclusivamente, ocorre por **apoptose** (da palavra grega para cair, como folhas caindo de uma árvore). Embora a apoptose seja apenas uma forma de morte celular programada, é de longe a mais comum e melhor entendida e, de maneira confusa, os biólogos frequentemente usam os termos morte celular programada e apoptose da mesma maneira. Células morrem por apoptose sob modificações morfológicas características. Elas se encolhem e condensam, o citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desfaz, e a cromatina nuclear se condensa e se quebra em fragmentos (**Figura 18-1**A). A superfície celular comumente forma bolhas e, se a célula é grande, frequentemente quebra-se em fragmentos envolvidos por membrana chamados de *corpos apoptóticos*. Mais importante, a superfície da célula ou dos corpos apoptóticos torna-se quimicamente alteradas, assim é rapidamente engolfada por uma célula vizinha, ou um macrófago (uma célula fagocítica especializada, discutida no Capítulo 23), antes que ela possam liberar seus conteúdos (Figura 18-1B). Dessa maneira, a célula morre de forma elegante e é rapidamente eliminada, sem causar uma resposta inflamatória prejudicial. Pelo fato de as células serem fagocitadas e digeridas rapidamente, em geral existem poucas células mortas para serem vistas, mesmo quando um grande número de células tenha morrido por apoptose. Talvez tenha sido por isso que os biólogos ignoraram a apoptose por tantos anos e, provavelmente, ainda subestimem sua extensão.

Em contraste à apoptose e a outras formas não tão bem caracterizadas de morte celular programada (as quais implicam a operação de um programa de morte intracelular), a morte acidental de células animais em resposta a uma injúria aguda, como um trauma ou a falta de suprimento de sangue, geralmente é causada por um processo chamado de *necrose celular*. Células necrosadas se expandem e explodem, liberando seus conteúdos sobre os vizinhos e provocando uma resposta inflamatória (Figura 18-1C).

A morte de células programada não está confinada a animais. Em plantas, ela ocorre durante o desenvolvimento e na senescência de flores e folhas, assim como em resposta a injúrias e infecções. A morte celular programada também ocorre em organismos unicelulares, incluindo leveduras e bactérias. Os mecanismos moleculares envolvidos nesses casos são distintos daqueles que fazem a mediação da apoptose em células animais e não serão considerados. Neste capítulo, discutiremos as funções da morte celular programada em animais, os mecanismos moleculares da apoptose e sua regulação, e como a apoptose excessiva ou insuficiente pode contribuir para a doença em humanos.

A morte celular programada elimina células desnecessárias

O número de mortes celulares programadas que ocorrem em tecidos animais adultos e em desenvolvimento pode ser surpreendente. No sistema nervoso de vertebrados em desenvolvimento, por exemplo, mais da metade de tipos distintos de células nervosas normalmente morrem assim que são formados. Parece um grande desperdício que muitas células tenham

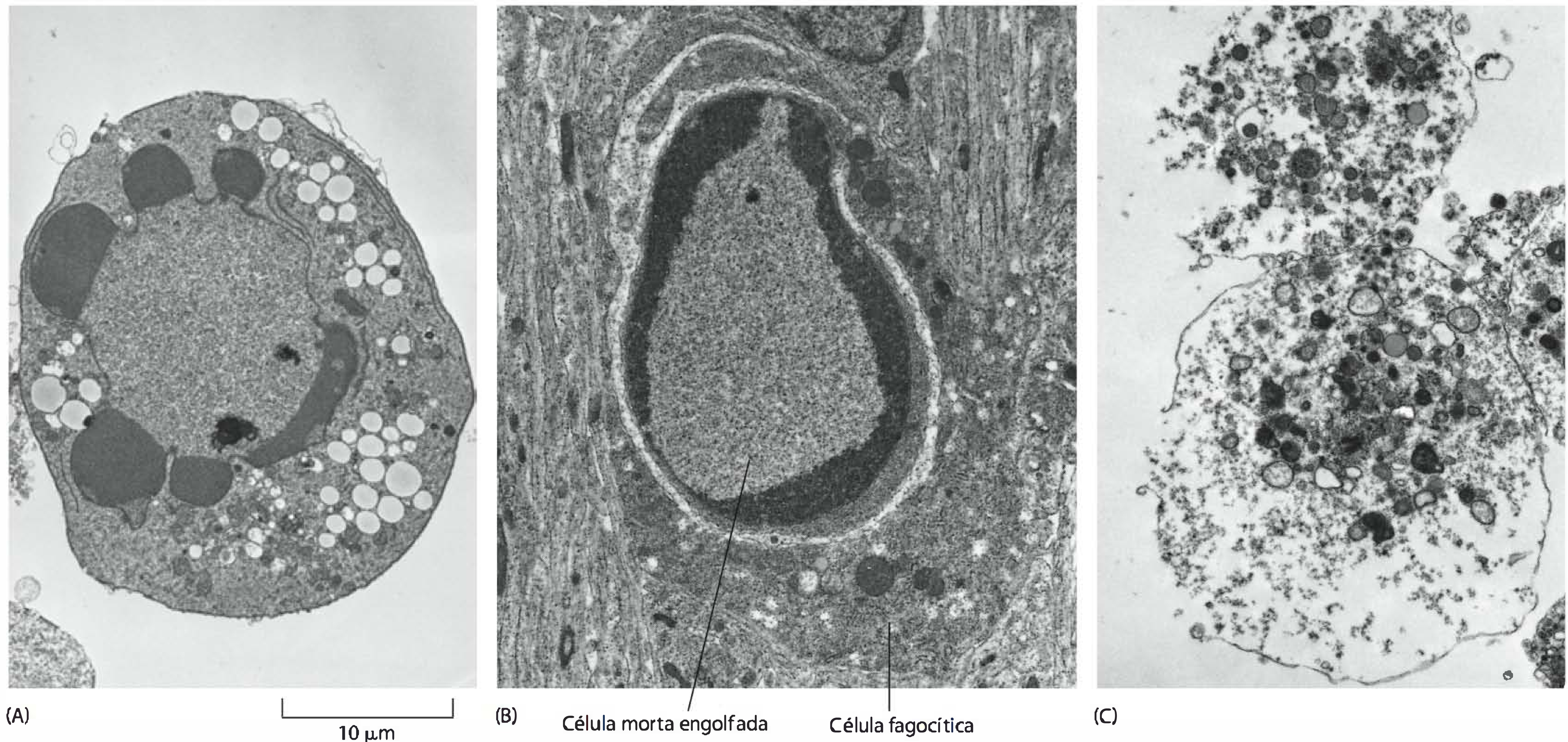


Figura 18-1 Duas formas distintas de morte celular. Essas micrografias eletrônicas mostram células que morreram por apoptose (A e B) ou por um tipo de morte celular acidental chamada de necrose (C). As células em (A) ou (C) morreram em uma placa de cultura, enquanto a célula em (B) morreu em um tecido em desenvolvimento e foi engolfada por uma célula fagocítica. Note que as células em (A) e (B) estão condensadas, mas parecem relativamente intactas, enquanto que a célula em (C) parece ter explodido. Os grandes vacúolos visíveis no citoplasma da célula em (A) são a característica variável da apoptose. (Cortesia de Julia Burne).

que morrer, especialmente sendo a maioria perfeitamente saudável no momento em que se matam. Para que propósito serve essa massiva morte celular?

Em alguns casos, a resposta é clara. No desenvolvimento animal, a morte celular programada elimina células desnecessárias, geralmente por apoptose. A morte celular, por exemplo, ajuda a criar mãos e pés durante o desenvolvimento embrionário: eles começam como estruturas em forma de pá, e os dedos individuais se separam apenas quando as células entre eles morrem, como ilustrado para uma pata de camundongo na **Figura 18-2**. Em outros casos, as células morrem quando a estrutura formada por elas não é mais necessária. Quando um girino se transforma em sapo na metamorfose, as células da cauda morrem, e a cauda, que não é necessária para o sapo, desaparece (**Figura 18-3**). Em muitos casos, a morte celular ajuda a regular o número de células. No desenvolvimento do sistema nervoso, por exemplo, a morte celular ajusta o número celular do nervo para que se iguale ao número de células-alvo que se conectam ao nervo, como discutiremos mais tarde.

A morte celular programada também funciona como um processo de controle de qualidade no desenvolvimento, eliminando células que são anormais, posicionadas incorretamente, não-funcionais ou potencialmente perigosas ao animal. Exemplos surpreendentes ocorrem no sistema imune adaptativo de vertebrados, onde a apoptose elimina o desenvolvimento de linfócitos T e B que falham tanto em produzir receptores antígeno-específicos potencialmente utilizáveis quanto em produzir receptores autorreativos que originam células potencialmente perigosas; ela também elimina muitos dos linfócitos ativados por uma infecção, depois que tenham ajudado a destruir os micróbios responsáveis (discutido no Capítulo 25).

Em tecidos adultos que não estão crescendo nem condensando, a morte celular e a divisão celular devem ser finamente reguladas para assegurar que estejam em exato equilíbrio.

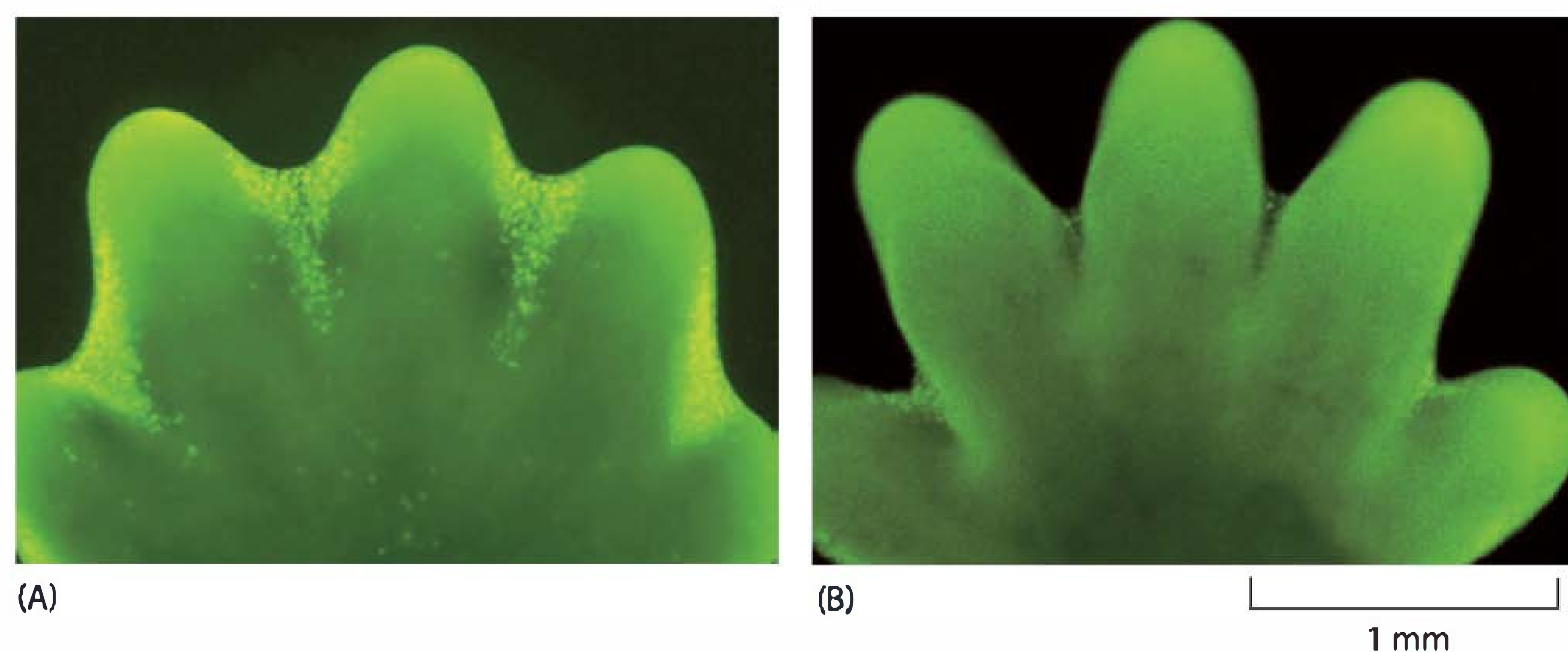


Figura 18-2 Esculpindo por apoptose os dedos na pata do camundongo em desenvolvimento. (A) A pata nesse feto de camundongo foi marcada com um corante que especificamente marca células que sofreram apoptose. As células apoptóticas aparecem como pontos *verdes brilhantes* entre os dedos em desenvolvimento. (B) A morte de células interdigitais eliminou o tecido entre os dedos em desenvolvimento, como visto um dia mais tarde, quando existem poucas células apoptóticas. (De W. Wood et al., *Development* 127:5245-5252, 2000. Com permissão de The Company of Biologists.)

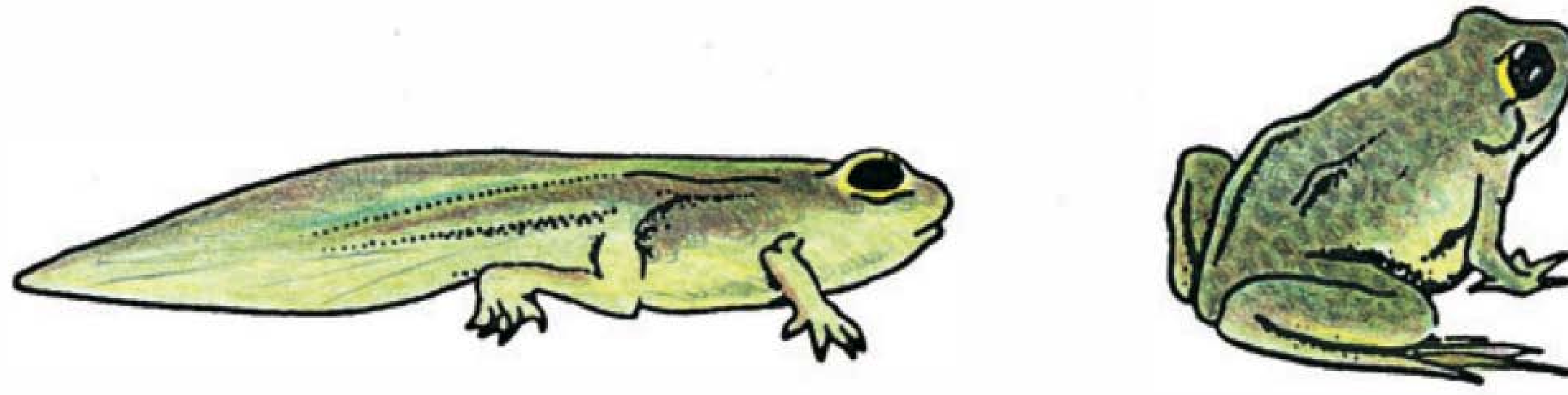


Figura 18-3 Apoptose durante a metamorfose do girino em sapo. Com a transformação do girino em sapo, as células na cauda do girino são induzidas a sofrerem apoptose; como consequência, a cauda é perdida. Um aumento no hormônio da tireoide no sangue estimula todas as mudanças que ocorrem durante a metamorfose, incluindo a apoptose na cauda.

Se parte do fígado é removida em um rato adulto, por exemplo, a proliferação de células do fígado aumenta para compensar a perda. Ao contrário, se o rato é tratado com fenobarbital – que estimula a divisão de células do fígado (e, consequentemente, o aumento do fígado) – e então o tratamento é finalizado, a apoptose no fígado aumenta bastante até que o fígado tenha retornado ao seu tamanho original, geralmente dentro de uma semana. Então, o fígado é mantido em um tamanho constante por meio da regulação da taxa de morte e de nascimento celular, embora os mecanismos de controle responsáveis por tal regulação ainda sejam desconhecidos.

A apoptose ocorre a uma alta taxa escalonada na medula do homem adulto, onde muitas células do sangue são produzidas. Aqui, por exemplo, *neutrófilos* (um tipo de célula branca do sangue, discutido no Capítulo 23) são produzidos continuamente em um grande número, mas a maioria morre por apoptose na medula dentro de poucos dias sem nunca ter funcionado. Esse ciclo aparentemente fútil de produção e destruição serve para manter um suprimento pronto de neutrófilos de vida curta que podem ser rapidamente mobilizados para acabar com a infecção onde quer que ela ocorra no corpo. Em comparação à vida do organismo, células são evidentemente baratas.

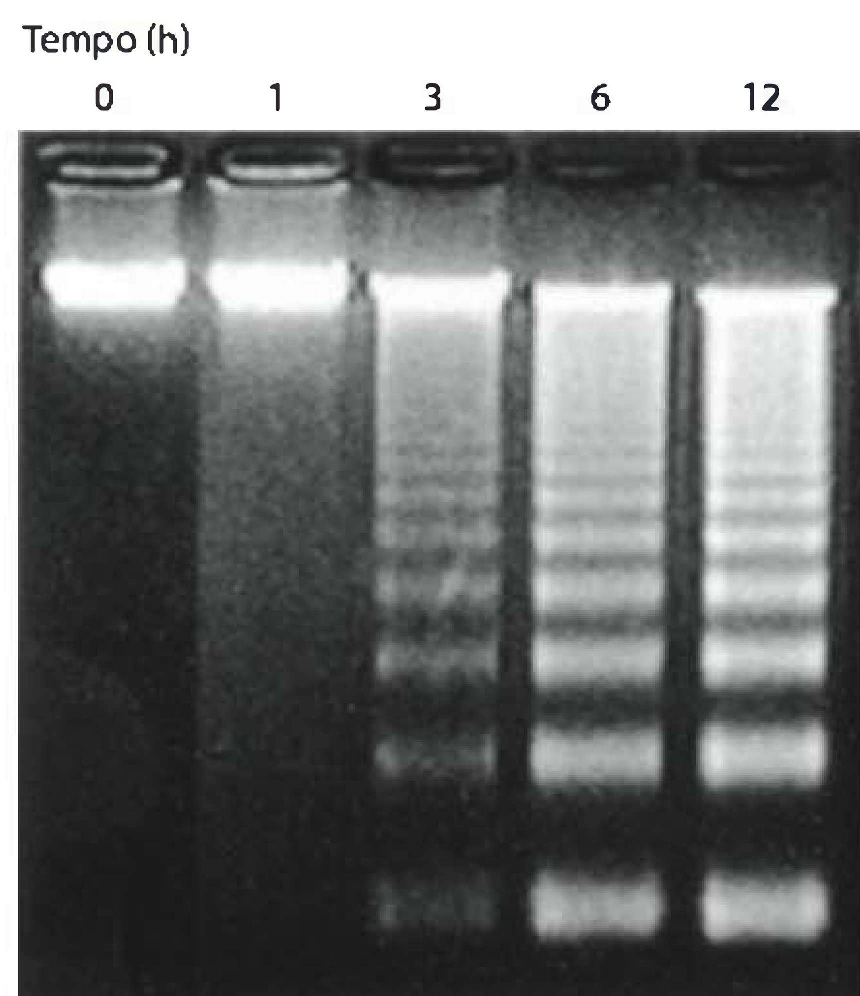
Células animais podem reconhecer dano em suas várias organelas e, se o dano é grande o suficiente, elas podem matar a si mesmas entrando em apoptose. Um exemplo importante é o dano no DNA, o qual pode produzir mutações que promovem câncer se não forem reparadas. As células têm várias maneiras de detectar dano em DNA e, se não podem repará-lo, frequentemente matam a si mesmas entrando em apoptose.

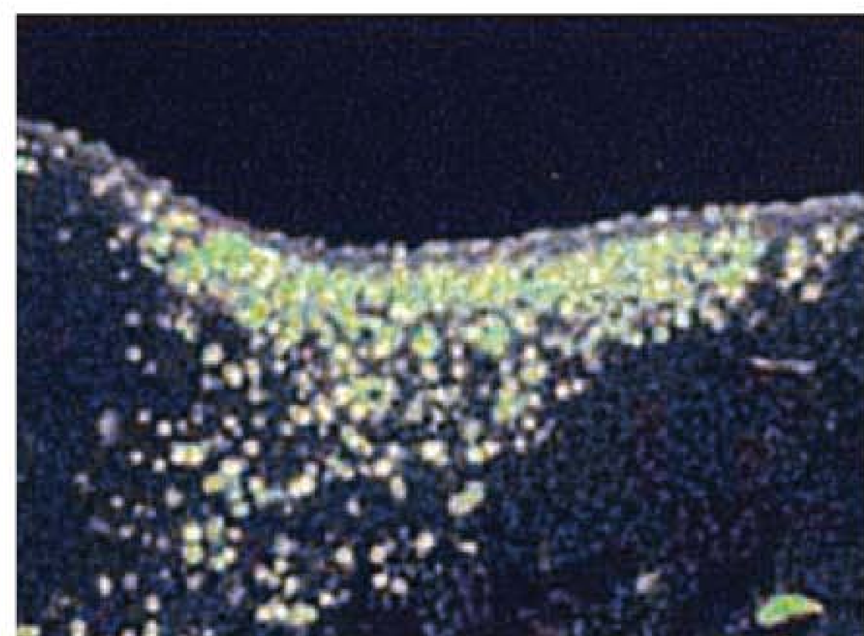
Células apoptóticas são bioquimicamente reconhecíveis

Células sofrendo apoptose não apenas possuem uma característica morfológica, mas também possuem modificações bioquímicas características, que podem ser usadas para identificar células apoptóticas. Durante a apoptose, por exemplo, uma endonuclease cliva o DNA cromossomal em fragmentos de diferentes tamanhos; como as clivagens ocorrem em regiões entre os nucleossomos, os fragmentos são separados em um padrão característico quando analisados por eletroforese em gel (**Figura 18-4**A). Além disso, a clivagem do DNA gera muitos DNAs novos, os quais podem ser marcados em núcleo apoptótico com nucleotídeos marcados usando uma técnica chamada de TUNEL (marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT, de *TdT-Mediated dUTP nick end labeling*) (Figura 18-4B).

Uma mudança especialmente importante ocorre na membrana plasmática de células apoptóticas. O fosfolipídeo *fosfatidilserina* carregado negativamente em geral é localizado exclusivamente na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática (ver Figuras 10-3 e 10-16), mas se desloca para a camada externa nas células apoptóticas, onde pode servir como marcador dessas células. A fosfatidilserina da superfície de células apoptóticas pode ser visualizada com uma forma marcada da proteína *Anexina V*, que se liga especificamente a esse fosfolipídeo. A fosfatidilserina da superfície celular é mais do que um marcador conveniente de apoptose para biólogos; ela sinaliza células vizinhas e macrófagos a fagocitarem a célula morta. Além de servir como um sinal de "coma-me", ela também bloqueia a inflamação frequentemente associada à fagocitose: o engolfamento dependente de fosfatidilserina de células apoptóticas inibe a produção de proteínas sinalizadoras que induzem inflamação (citocinas) por células fagocíticas.

Os macrófagos fagocitarão muitos tipos de partículas pequenas, incluindo gotas de óleo e esferas de vidro, mas não fagocitarão células saudáveis do animal, presumivelmente porque células saudáveis expressam sinais moleculares "não me coma" nas suas superfícies. Então, além de expressarem na sua superfície sinais "coma-me" como fosfatidilserina que estimula fagocitose, células apoptóticas devem perder ou inativar seus sinais "não me coma" com o objetivo de serem ingeridas por macrófagos.





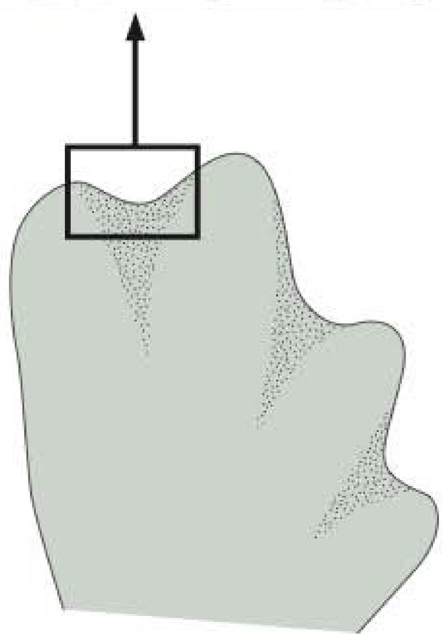


Figura 18-4 Marcadores da apoptose. (A) Clivagem do DNA nuclear em fragmentos de padrão característico. Linfócitos de timo de camundongo foram tratados com um anticorpo contra receptores Fas de superfície de células mortas (discutido mais tarde), induzindo as células a entrarem em apoptose. Depois de algum tempo (indicado em horas no topo da figura), o DNA foi extraído, e os fragmentos foram separados por tamanho por eletroforese em gel de agarose, e corados com brometo de etídeo. (B) A técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) foi usada para marcar as pontas dos fragmentos de DNA no núcleo de células apoptóticas em uma secção de tecido de uma perna de galinha em desenvolvimento; essa secção transversal através da pele e dos tecidos que a cercam é de uma região de dois dedos em desenvolvimento, como indicado no desenho ao lado. O procedimento é chamado de técnica TUNEL porque a enzima desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) adiciona cadeias do desoxinucleotídeo (dUTP) marcado às extremidades 3'-OH dos fragmentos de DNA. (A, de D. McIlroy et al., *Genes Dev.* 14:549-558, 2000. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press; B, de V. Zuzarte-Luís e J. M. Hurlé, *Int. J. Dev. Biol.* 46:871-876, 2002. Com permissão de UBC Press.)

Células que entram em apoptose com frequência perdem o potencial elétrico que normalmente existe através da membrana interna de suas mitocôndrias (discutido no Capítulo 14). Esse potencial de membrana pode ser medido pelo uso de marcadores fluorescentes carregados positivamente acumulados na mitocôndria, atraídos pela carga negativa de dentro da membrana interna. Uma diminuição na marcação das mitocôndrias com esses corantes ajuda a identificar células que entram em apoptose. Como discutiremos mais tarde, proteínas como *citocromo c* em geral são liberadas do espaço entre as membranas interna e externa (*espaço intermembranas*) da mitocôndria durante a apoptose, e a relocação do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol pode ser usada como um outro marcador da apoptose (ver Figura 18-7).

A apoptose depende de uma cascata proteolítica intracelular mediada por caspases

A maquinaria intracelular responsável pela apoptose é similar em todas as células animais. Ela depende de uma família de proteases que têm uma cisteína no seu sítio ativo e clivam suas proteínas-alvo em ácidos aspárticos específicos. Elas foram então chamadas de **caspases** (c para cisteína e asp para ácido aspártico). As caspases são sintetizadas na célula como precursores inativos, ou **procaspases**, as quais são tipicamente ativadas por clivagem proteolítica. A clivagem de procaspases ocorre em um ou dois ácidos aspárticos específicos e é catalisada por outras caspases (já ativas); a procaspase é dividida em uma subunidade grande e uma pequena que formam um heterodímero, e dois desses dímeros se juntam para formar um tetrâmero ativo (**Figura 18-5**A). Uma vez ativadas, as caspases clivam e então ativam outras procaspases, resultando em uma cascata proteolítica amplificada (Figura 18-5B).

Nem todas as caspases medeiam a apoptose. Na verdade, a primeira caspase identificada foi uma proteína humana chamada de *enzima conversora de interleucina-1* (*ICE, interleukin-1-converting enzyme*), que está relacionada à resposta inflamatória mais do que à morte celular; a ICE cliva a citocina *interleucina-1* (*IL1*), que induz inflamação, de uma grande proteína precursora. Subsequentemente à descoberta de ICE, um gene requerido para apoptose em *C. elegans* mostrou codificar uma proteína que é estrutural e funcionalmente similar à ICE, fornecendo a primeira evidência de que proteólise e caspases estão envolvidas em apoptose. Atualmente, está claro que, enquanto várias caspases humanas estão envolvidas em resposta imune e inflamatória, muitas estão envolvidas em apoptose (**Tabela 18-1**).

Como mostrado na Figura 18-5B e na Tabela 18-1, algumas das procaspases que operam na apoptose agem no início da cascata proteolítica e são chamadas de **procaspases iniciadoras**; quando ativadas, elas clivam e ativam **procaspases executoras**, assim como *proteínas-alvo* específicas na célula. Dentre muitas proteínas-alvo clivadas por caspases executoras estão as laminas nucleares (ver Figura 18-5B), cuja clivagem causa uma quebra irreversível da lamina nuclear (discutido no Capítulo 16). Outro alvo é a proteína que normalmente mantém a enzima que degrada DNA, mencionada anteriormente (uma endonuclease), na forma inativa; sua clivagem libera a endonuclease de digerir o DNA no núcleo da

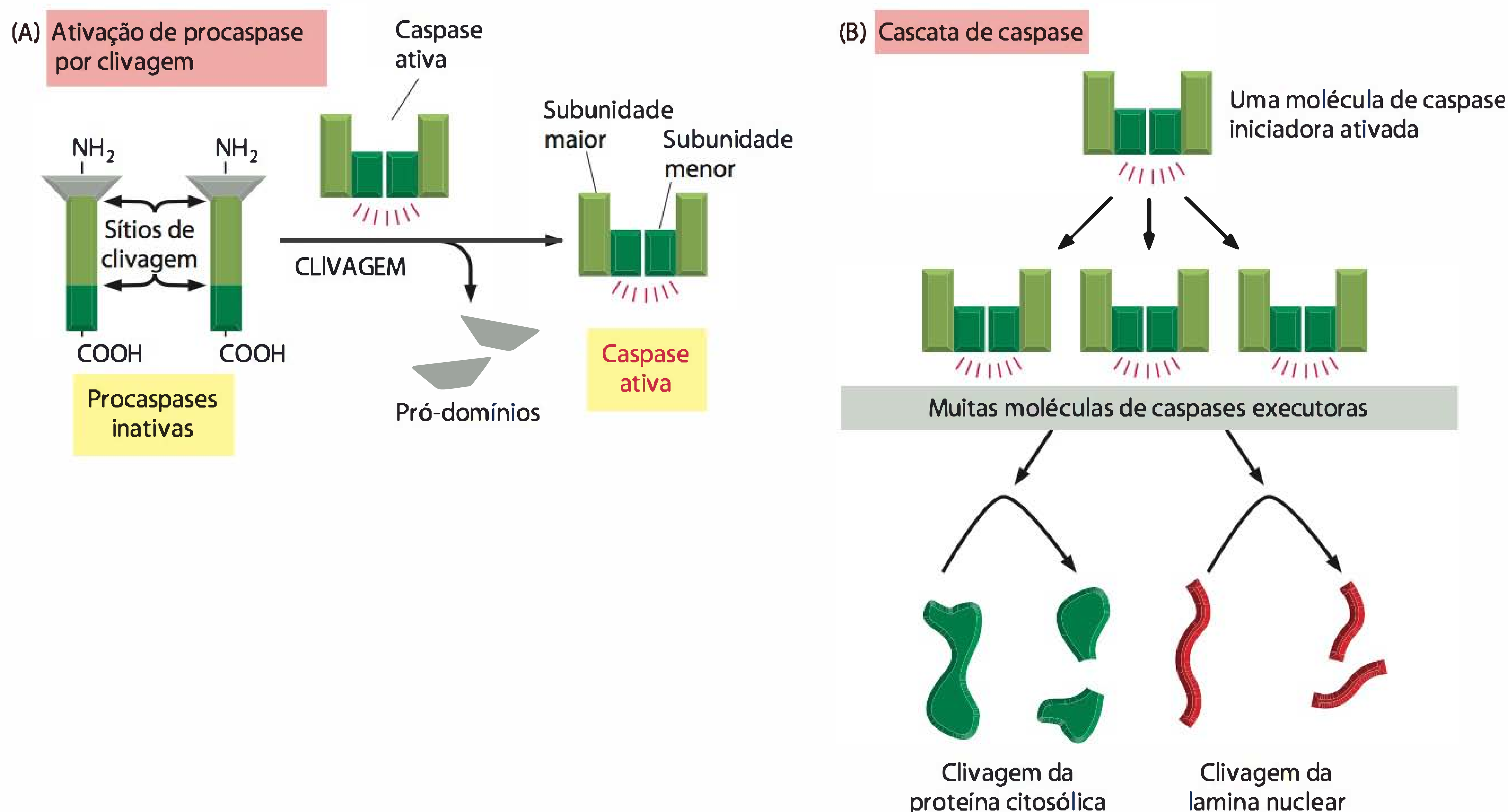


Figura 18-5 Ativação da procaspase durante a apoptose. (A) Cada caspase é produzida inicialmente como uma pró-enzima inativa (procaspase). Algumas procaspases são ativadas por clivagem proteolítica por uma caspase ativada: dois dos fragmentos clivados de cada duas moléculas de procaspases associam-se para formar uma caspase ativa, que é um tetrâmero de duas subunidades pequenas e duas subunidades grandes; os pró-domínios em geral são descartados, como indicado. (B) As primeiras procaspases ativadas são chamadas de *procaspases iniciadoras*, as quais então clivam e ativam muitas moléculas de *procaspases executoras*, produzindo uma reação em cadeia amplificada (uma cascata de caspase proteolítica). Caspases executoras então clivam uma variedade de proteínas-chave na célula, incluindo proteínas citosólicas específicas e laminas nucleares, como mostrado, levando a uma morte controlada da célula. Embora não mostrado aqui, as procaspases iniciadoras são ativadas por proteínas adaptadoras que se juntam com procaspases em uma forte proximidade em um complexo de ativação; embora as procaspases iniciadoras clivem umas às outras dentro do complexo, a clivagem serve apenas para estabilizar a protease ativa.

célula. Outras proteínas-alvo incluem componentes do citoesqueleto e proteínas de adesão célula-célula que ligam as células às suas vizinhas; a clivagem dessas proteínas ajuda a célula apoptótica a arredondar-se e desligar-se das suas vizinhas, tornando mais fácil para uma célula vizinha saudável engolfá-la, ou, no caso de uma célula epitelial, para a célula vizinha retirar a célula apoptótica da camada celular. A cascata de caspase não é apenas destrutiva e autoamplificadora, mas também irreversível; então, uma vez que a célula alcança um ponto crítico ao longo da via de destruição, ela não pode voltar atrás.

As caspases requeridas para apoptose variam de acordo com o tipo celular e o estímulo. A inativação do gene de camundongo que codifica para a caspase-3, uma caspase executora, por exemplo, reduz a apoptose normal no desenvolvimento do cérebro. Como resultado, o camundongo frequentemente morre ao nascer, com um cérebro deformado que contém muitas células. A apoptose ocorre normalmente, entretanto, em muitos outros órgãos deste camundongo.

Dos primeiros estágios de desenvolvimento de um animal, células saudáveis produzem continuamente procaspases e outras proteínas requeridas para a apoptose. Então, a maquinaria da apoptose está sempre pronta; tudo que é necessário é um sinal para ativá-la. Como então a cascata de caspase inicia? Em particular, como a primeira procaspase é ativada? Procaspases iniciadoras têm um *pró-domínio* longo, o qual contém um *domínio de recrutamento da caspase* (*CARD*, *caspase recruitment domain*) que lhe permite ligar-se a proteínas adaptadoras em *complexos de ativação* quando a célula recebe um sinal para entrar em apoptose. Uma vez incorporadas em tais complexos, as procaspases iniciadoras permanecem muito próximas, o que é suficiente para ativá-las; elas então clivam umas às outras, tornando o processo irreversível. As caspases iniciadoras ativadas então clivam e ativam procaspases executoras, iniciando assim uma cascata de caspase proteolítica, que amplifica o sinal de morte e o dissemina através da célula.

As duas vias de sinalização melhor entendidas que podem ativar a cascata de caspase levando à apoptose em células animais são chamadas de *via extrínseca* e *via intrínseca*. Cada uma usa sua própria procaspase iniciadora e seu complexo de ativação, como discutiremos agora.

Tabela 18-1 Algumas caspases humanas

Caspases envolvidas na inflamação	Caspases 1 (ICE), 4, 5
Caspases envolvidas na apoptose	
Caspases iniciadoras	Caspases 2, 8, 9, 10
Caspases executoras	Caspases 3, 6, 7

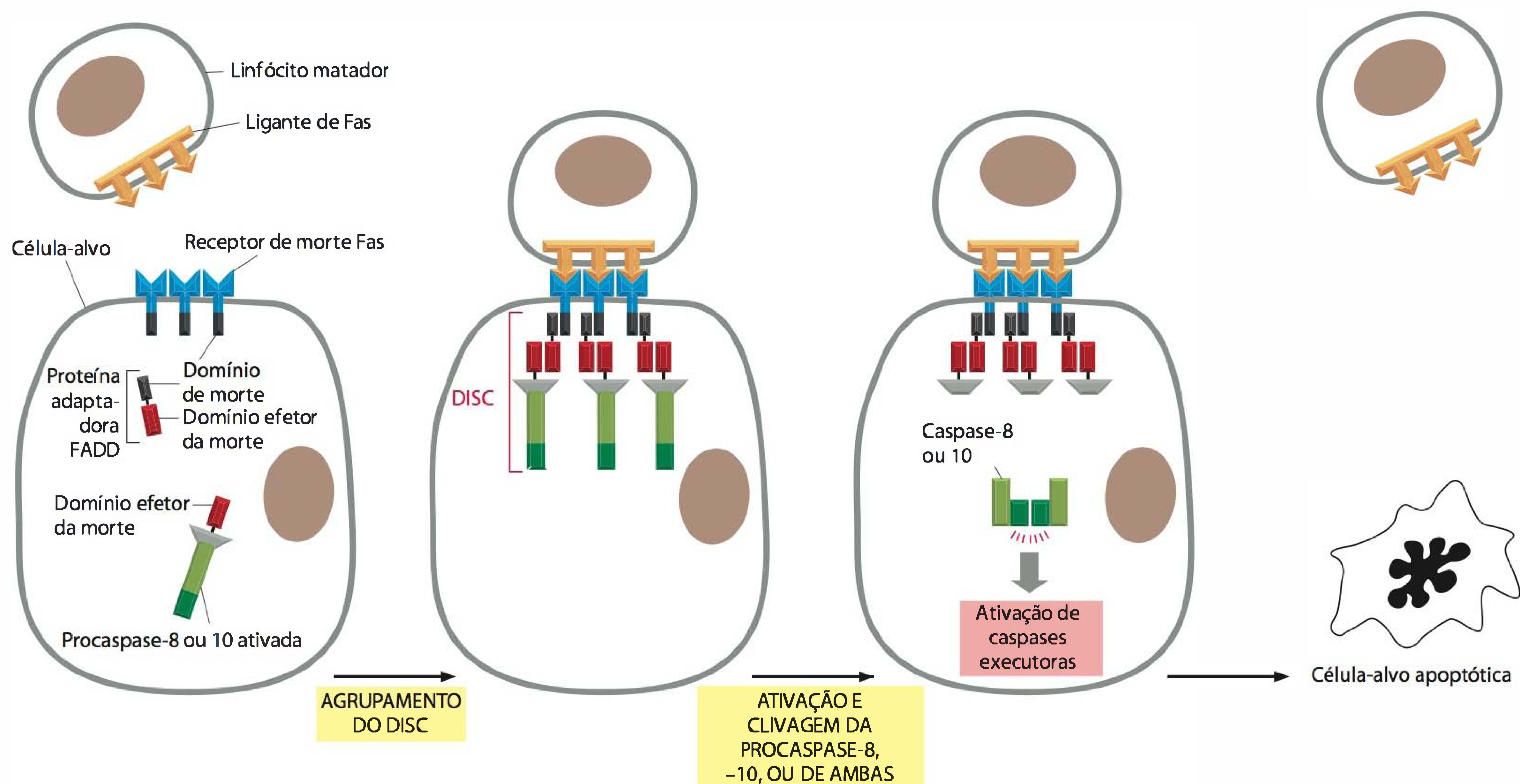


Figura 18-6 A via extrínseca da apoptose ativada por meio de receptores de morte Fas. O ligante Fas na superfície de um linfócito matador ativa receptores de morte Fas na superfície da célula-alvo. Ambos, ligante e receptor, são homotrímeros. A cauda citosólica de Fas recruta então a proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado a Fas, de *Fas-associated death domain*) via domínio de morte de cada proteína. Cada proteína FADD então recruta uma procaspase iniciadora (procaspase-8, procaspase-10, ou ambas) via domínio efetor de morte em FADD e procaspase, formando um complexo DISC. Dentro desse complexo DISC, moléculas procaspases iniciadoras são colocadas em forte proximidade, o que as ativa; as procaspases ativadas clivam então umas às outras para estabilizar a protease ativada, a qual é agora uma caspase. A caspase-8 e a caspase-10 ativadas clivam e ativam procaspases executoras, produzindo uma cascata de caspases, que leva à apoptose.

Receptores da superfície celular ativam a via extrínseca da apoptose

Proteínas de sinalização extracelular ligam-se a **receptores de morte** na superfície celular disparando a **via extrínseca** da apoptose. Receptores de morte são proteínas transmembrana contendo um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembrana único e um *domínio de morte* intracelular, o qual é requerido pelos receptores para ativar o programa apoptótico. Os receptores são homotrímeros e pertencem à família de *receptores do fator de necrose tumoral* (*TNF*, *tumor necrosis factor*), a qual inclui um receptor para o próprio TNF (discutido no Capítulo 15) e o receptor de morte *Fas*. Os ligantes que ativam os receptores de morte também são homotrímeros; eles são estruturalmente relacionados e pertencem à *família TNF* de proteínas sinalizadoras.

Um exemplo bem entendido de como os receptores de morte disparam a via extrínseca da apoptose é a ativação de **Fas** na superfície da célula-alvo pelo **ligante Fas** na superfície de um linfócito (citotóxico) matador (discutido no Capítulo 25). Quando ativados pela ligação ao ligante Fas, os domínios de morte nas caudas citosólicas dos receptores de morte Fas recrutam proteínas adaptadoras intracelulares, as quais por sua vez recrutam procaspases iniciadoras (*procaspase-8, procaspase-10*, ou ambas), formando o **complexo de sinalização indutor de morte (DISC,** *death-inducing signaling complex*). Uma vez ativadas em DISC, caspases iniciadoras ativam procaspases executoras para induzirem apoptose (**Figura 18-6**). Como discutiremos mais tarde, em algumas células a via extrínseca deve recrutar a via apoptótica intrínseca para amplificar a cascata de caspase com o objetivo de matar a célula.

Muitas células produzem proteínas inibidoras que agem tanto extracelular quanto intracelularmente para controlar a via extrínseca. Por exemplo, algumas produzem *receptores armadilha*, que possuem um domínio de ligação ao ligante, mas não um domínio de morte; como podem se ligar ao ligante de morte, mas não podem ativar a apoptose, as armadilhas competitivamente inibem os receptores de morte. As células também podem produzir proteínas bloqueadoras, como *FLIP*, que se parecem com procaspases iniciadoras, mas sem o domínio proteolítico; estas competem com procaspases-8 e procaspases-10 pelos sítios de ligação no complexo DISC e então inibem a ativação dessas procaspases iniciadoras. Tais mecanismos inibidores ajudam a prevenir a ativação inapropriada da via extrínseca da apoptose.

Em algumas circunstâncias, receptores de morte ativam outras vias de sinalização que não levam à apoptose. Receptores TNF, por exemplo, também podem ativar a via NFκB (discutido no Capítulo 15), a qual pode promover a sobrevivência celular e ativar genes envol-

vidos em respostas inflamatórias. Tais respostas dominantes dependem do tipo celular e de outros sinais agindo nestas células.

A via intrínseca da apoptose depende da mitocôndria

As células também podem ativar seus programas de apoptose de dentro da célula, geralmente em resposta a injúria ou outros estresses, como quebra de DNA ou falta de oxigênio, nutrientes, ou sinais de sobrevivência extracelulares (discutido mais tarde). Em células de vertebrados, a ativação intracelular do programa de morte apoptótico ocorre por meio da **via intrínseca** da apoptose, que depende da liberação no citosol de proteínas mitocondriais que normalmente residem no espaço intermembranas dessas organelas (ver Figura 12-21A). Algumas das proteínas liberadas ativam a cascata proteolítica da caspase no citoplasma, levando à apoptose.

Uma proteína crucial liberada da mitocôndria na via intrínseca é o **citocromo *c***, um componente solúvel em água da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. Quando liberado no citosol (**Figura 18-7**), ele tem uma função inteiramente diferente: ele liga-se à proteína adaptadora de ativação da procaspase chamada de **Apaf1** (*fator-1 de ativação da protease apoptótica*, de *apoptotic protease activatino factor-1*), provocando a oligomerização de Apaf1 em um heptâmero em forma arredondada chamado de **apoptossomo**. As proteínas Apaf1 no apoptossomo recrutam então proteínas procaspases iniciadoras (*procaspase-9*), as quais são ativadas por proximidade ao apoptossomo, assim como as proteínas procaspases-8 e –10 são ativadas no complexo DISC. Moléculas caspases-9 ativadas ativam então procaspases executoras para induzir apoptose (**Figura 18-8**).

Como mencionado anteriormente, em algumas células, a via extrínseca deve recrutar a via intrínseca para amplificar o sinal apoptótico para matar a célula. Isso ocorre pela ativação de um membro da família de proteínas *Bcl2*, apresentado a seguir.

Proteínas Bcl2 regulam a via intrínseca da apoptose

A via intrínseca da apoptose é firmemente regulada para assegurar que células matem-se apenas quando for apropriado. A principal classe de reguladores intracelulares da apoptose é a família de proteínas **Bcl2**, a qual, como a família das caspases, tem sido conservada evolutivamente de vermes a humanos; a proteína Bcl2 humana, por exemplo, pode suprimir a apoptose quando expressa em *C. elegans*.

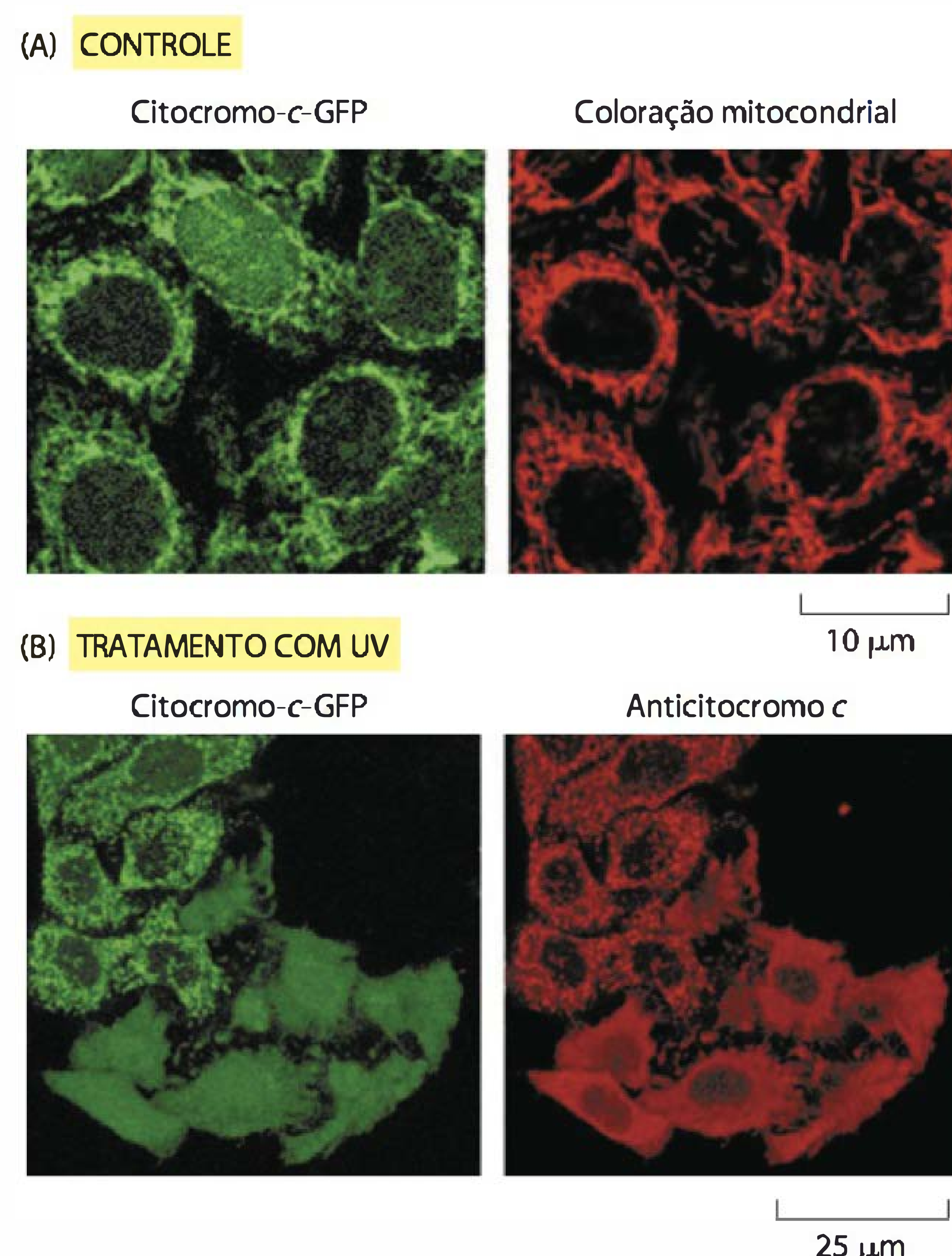


Figura 18-7 Liberação do citocromo c da mitocôndria durante a apoptose. Micrografias de fluorescência de células de câncer humanas em cultura. (A) Células-controle foram transfectadas com um gene que codifica uma proteína de fusão consistindo no citocromo c ligado à proteína fluorescente verde (citocromo-c-GFP); elas também foram tratadas com um corante vermelho carregado positivamente que se acumula na mitocôndria. A distribuição sobreposta de *verde* e *vermelho* indica que o citocromo-c-GFP está localizado na mitocôndria. (B) Células expressando citocromo-c-GFP foram irradiadas com luz ultravioleta para induzir apoptose, e depois de 5 horas elas foram coradas com anticorpos (em *vermelho*) contra citocromo *c*; citocromo-c-GFP também é mostrado (em *verde*). As seis células na metade inferior das micrografias em B liberaram seus citocromos c da mitocôndria no citosol, enquanto as células na metade superior das micrografias ainda não o fizeram. (De J. C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2:156-162, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

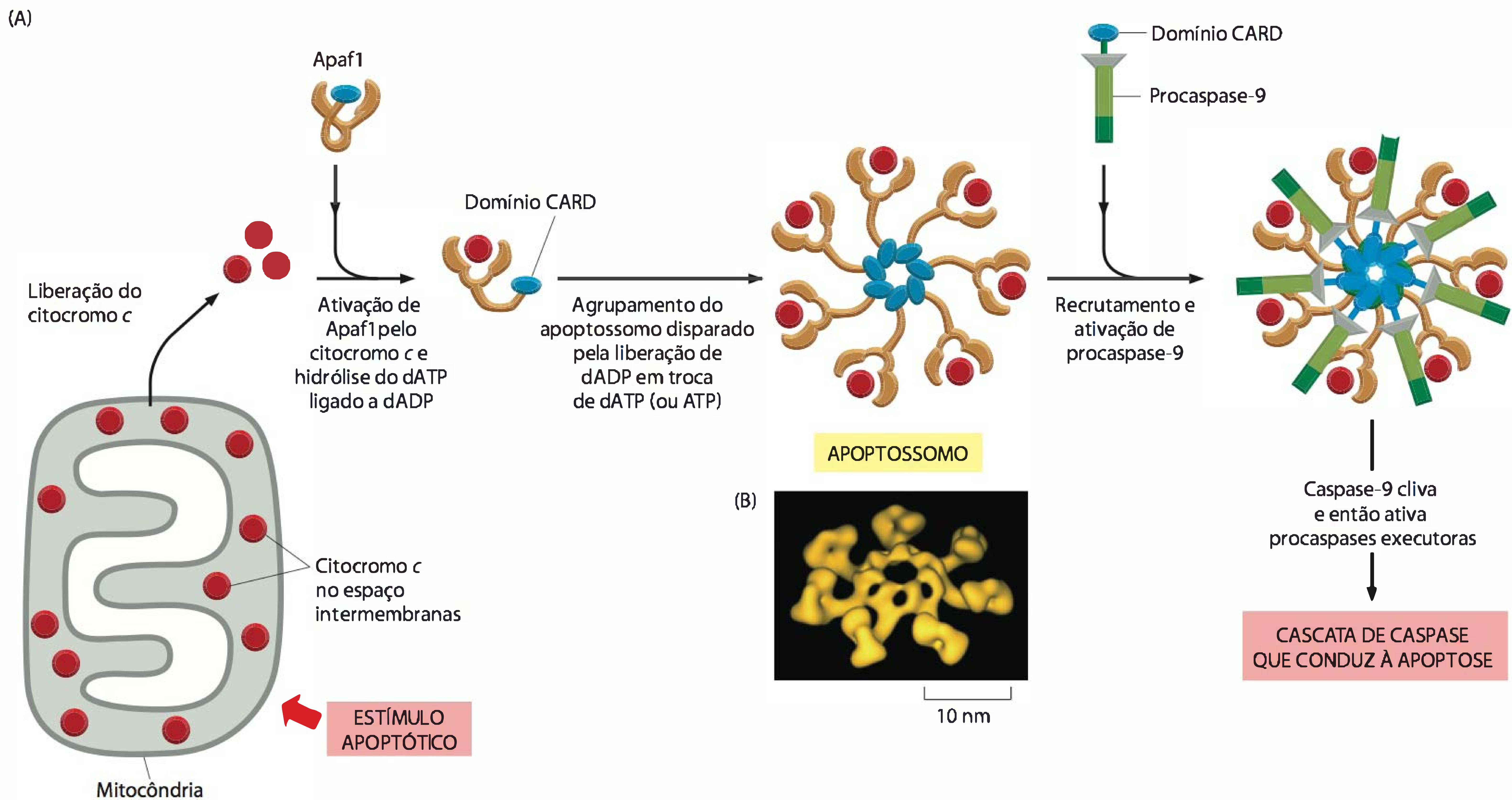


Figura 18-8 A via intrínseca da apoptose. (A) Um desenho esquemático de como o citocromo c liberado da mitocôndria ativa Apaf1. A ligação de citocromo c faz com que Apaf1 hidrolise seu dATP ligado a dADP (não-mostrado). A troca de dADP por dATP ou ATP (não-mostrado) induz então o complexo de Apaf1 e citocromo c a agregar e formar um grande apoptossomo heptamérico, que então recruta procaspase-9 por meio do domínio de recrutamento de caspase (CARD) em cada proteína. Moléculas procaspases-9 são ativadas dentro do apoptossomo e podem agora clivar e ativar procaspases executoras, o que leva à clivagem e à ativação dessas moléculas na cascata de caspase. Outras proteínas liberadas do espaço intermembranas da mitocôndria não são mostradas. (B) Um modelo da estrutura tridimensional de um apoptossomo. Note que alguns cientistas usam o termo "apoptossomo" para se referir ao complexo contendo procaspase-9. (B, de D. Aceham et al., *Mol Cell* 9:423-432, 2002. Com permissão de Elsevier.)

Proteínas Bcl2 de mamíferos regulam a via intrínseca de apoptose principalmente pelo controle da liberação do citocromo *c* e de outras proteínas intermembranas mitocondriais no citosol. Algumas proteínas Bcl2 são *proapoptóticas* e promovem a apoptose pelo aumento da liberação de proteínas, enquanto outras são *antiapoptóticas* e inibem a apoptose bloqueando essa liberação. Proteínas Bcl2 proapoptóticas e antiapoptóticas podem se ligar umas às outras em várias combinações para formar heterodímeros, nos quais as duas proteínas inibem as funções umas das outras. O balanço entre as atividades dessas duas classes funcionais de proteínas Bcl2 determina se células de mamíferos vivem ou morrem pela via intrínseca da apoptose.

Como ilustrado na **Figura 18-9**, proteínas Bcl2 antiapoptóticas, incluindo a própria *Bcl2* (o membro fundador da família Bcl2) e *Bcl-X$_L$*, compartilham quatro diferentes domínios de homologia com Bcl2 (BH, *homology domains*) (BH1-4). Proteínas Bcl2 proapoptóticas consistem em duas subfamílias – as proteínas *BH123* e as proteínas *BH3 – apenas*. As principais proteínas BH123 são *Bax* e *Bak*, as quais são estruturalmente similares a Bcl2, mas sem o domínio BH4. As proteínas BH3 – apenas compartilham homologia de sequência com Bcl2 somente no domínio BH3 (ver Figura 18-9).

Quando um estímulo apoptótico dispara a via intrínseca, **proteínas BH123** proapoptóticas se tornam ativadas e se agregam para formar oligômeros na membrana externa mitocondrial, induzindo a liberação de citocromo *c* e outras proteínas intermembranas por um mecanismo desconhecido (**Figura 18-10**). Em células de mamíferos, **Bax** e **Bak** são as principais proteínas BH123, e ao menos uma delas é requerida para que a via intrínseca da apoptose funcione: células mutantes de camundongo que carecem de ambas as proteínas são resistentes a todos os sinais proapoptóticos que normalmente ativam essa via. Enquanto Bak está firmemente ligada à membrana externa mitocondrial, mesmo na ausência de um sinal apoptótico, Bax está principalmente localizada no citosol e se transloca para a mitocôndria apenas depois que um sinal apoptótico a ativa. Como discutido a seguir, a ativação de Bax e Bak em geral depende de proteínas proapoptóticas BH3-apenas ativadas. Bax e Bak também operam na superfície do retículo endoplasmático (RE) e na membrana nuclear; quando ativadas em resposta ao estresse de RE, elas liberam Ca^{2+} no citosol, o que ajuda a ativar a via intrínseca dependente de mitocôndria da apoptose por um mecanismo ainda pouco entendido.

As **proteínas Bcl2 antiapoptóticas** como a própria **Bcl2** e a **Bcl-X$_L$** estão também localizadas principalmente na superfície citosólica da membrana mitocondrial externa, do RE e do envelope nuclear, onde elas ajudam a preservar a integridade da membrana – im-

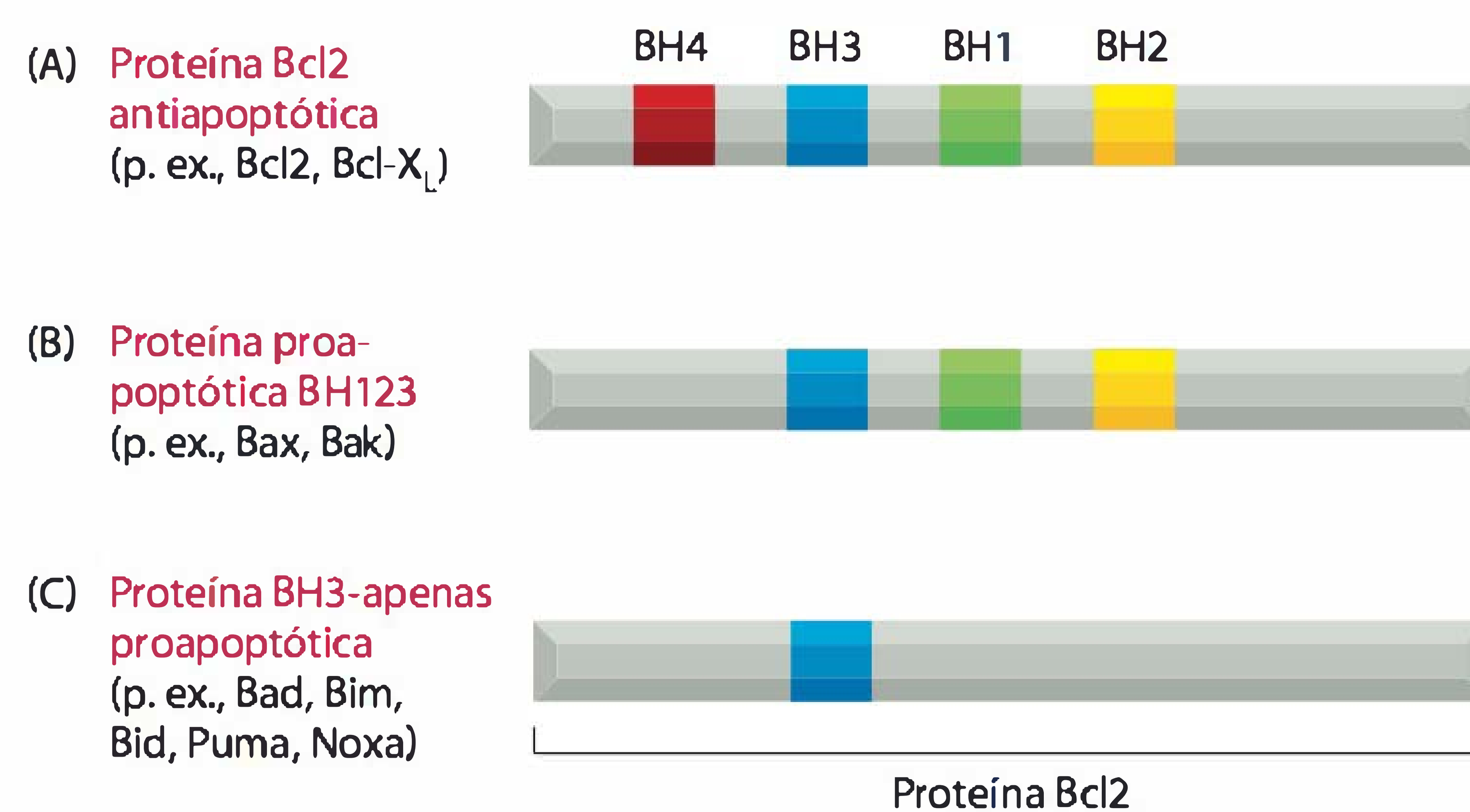


Figura 18-9 As três classes de proteínas Bcl2. Note que o domínio BH3 é o único domínio BH compartilhado por todos os membros da família Bcl2; ele medeia interações diretas entre membros das famílias proapoptótica e antiapoptótica.

pedindo, por exemplo, liberação inapropriada de proteínas da mitocôndria e de Ca^{2+} do RE. Essas proteínas inibem a apoptose principalmente pela ligação a uma proteína Bcl2 proapoptótica inibida – tanto nessas membranas como no citosol. Na membrana mitocondrial externa, por exemplo, elas ligam-se a Bak e previnem a sua oligomerização, consequentemente inibindo a liberação de citocromo *c* e outras proteínas intermembranas. Existem ao menos cinco proteínas Bcl2 antiapoptóticas em mamíferos, e cada célula de mamífero requer ao menos uma para sobreviver. Entretanto, um número dessas proteínas deve ser inibido para que a via intrínseca induza apoptose; proteínas BH3-apenas fazem a mediação da inibição.

Proteínas BH3-apenas são a maior subclasse de proteínas da família Bcl2. A célula tanto as produz como as ativa em resposta a um estímulo apoptótico, e elas são conhecidas por promoverem a apoptose principalmente pela inibição de proteínas antiapoptóticas. Seus domínios BH3 ligam-se a uma fenda hidrofóbica longa nas proteínas Bcl2 antiapoptóticas, neutralizando sua atividade. Por um mecanismo pouco entendido, a ligação e a inibição permitem o agregamento de Bax e Bak na superfície da mitocôndria, a qual dispara a liberação de proteínas mitocondriais intermembranas que induzem a apoptose (**Figura 18-11**). Algumas proteínas BH3-apenas podem se ligar diretamente a Bax e a Bak para ajudar a disparar a ativação e o agregamento dessas proteínas proapoptóticas BH123 na mitocôndria, e então ajudam a liberação de proteínas intermembranas.

Proteínas BH3-apenas proporcionam a ligação crucial entre estímulos apoptóticos e a via intrínseca da apoptose, com diferentes estímulos ativando diferentes proteínas BH3-apenas. Quando algumas células são privadas de sinais de sobrevivência extracelulares, por exemplo, uma via de sinalização intracelular que depende da MAP-cinase *JNK* ativa a transcrição do gene que codifica a proteína BH3-apenas *Bim*, a qual então dispara a via intrínseca. Similarmente, em resposta ao dano no DNA que não pode ser reparado, a proteína supressora tumoral **p53** se acumula (discutido nos Capítulos 17 e 20) e ativa a transcrição de genes que codificam as proteínas BH3-apenas *Puma* e *Noxa*; essas proteínas BH3-apenas então disparam a via intrínseca, consequentemente eliminando a célula potencialmente danosa que poderia em algum momento se tornar cancerosa.

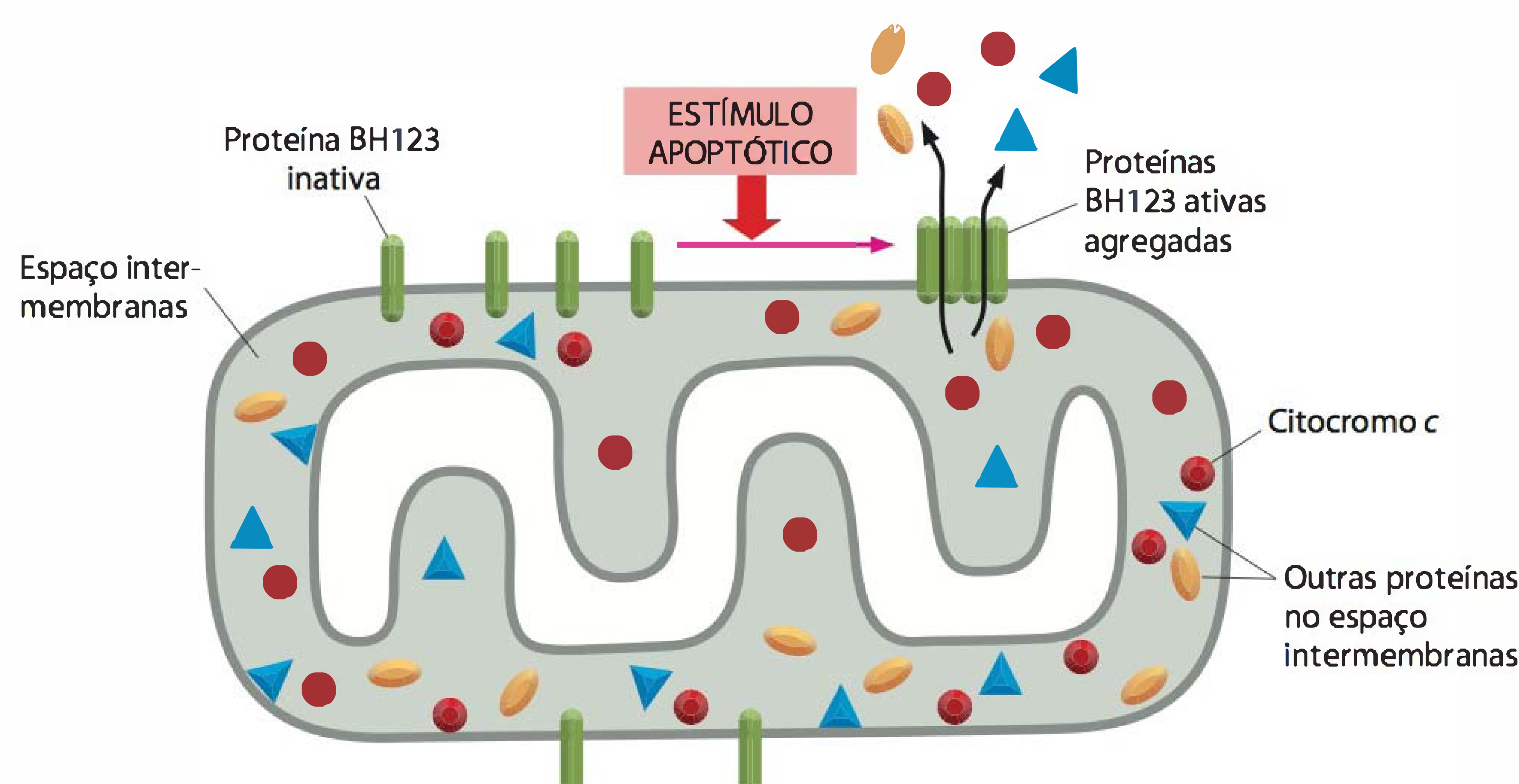


Figura 18-10 O papel de proteínas Bcl2 proapoptóticas BH123 (principalmente Bax e Bak) na liberação de proteínas intermembranas mitocondriais na via intrínseca da apoptose. Quando ativadas por um estímulo apoptótico, proteínas BH123 se agregam à membrana mitocondrial externa e liberam citocromo *c* e outras proteínas do espaço intermembranas no citosol por um mecanismo desconhecido.

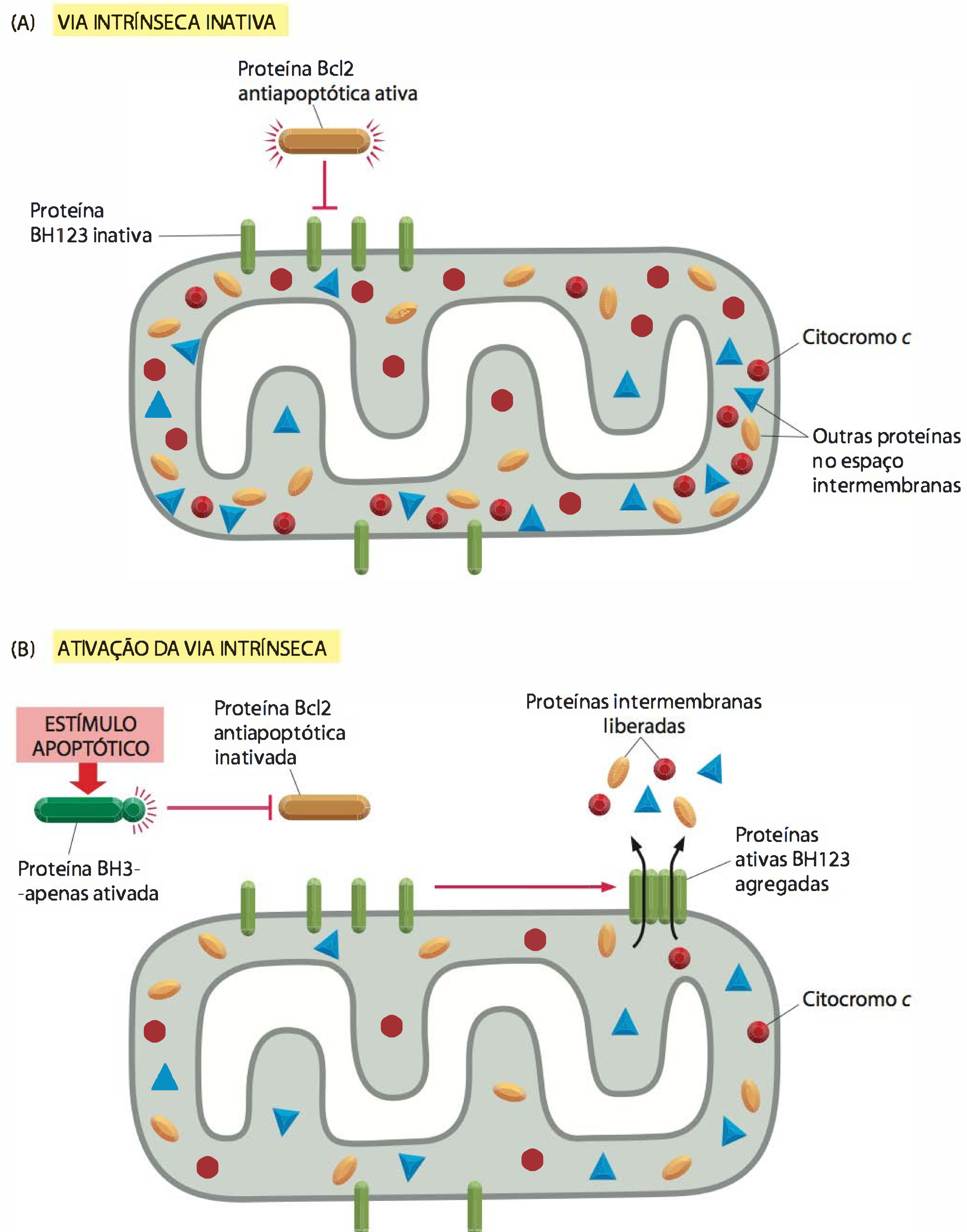


Figura 18-11 Como proteínas Bcl2 antiapoptóticas e BH3-apenas proapoptóticas regulam a via intrínseca da apoptose. (A) Na ausência de um estímulo apoptótico, proteínas Bcl2 antiapoptóticas se ligam e inibem proteínas BH123 na membrana externa mitocondrial (e no citosol – não-mostrado). (B) Na presença de um estímulo apoptótico, proteínas BH3-apenas são ativadas e se ligam a proteínas Bcl2 antiapoptóticas, e então podem inibir rapidamente proteínas BH123, que agora se tornam ativadas e se agregam à membrana mitocondrial externa, promovendo a liberação de proteínas mitocondriais intermembranas no citosol. Algumas proteínas BH3-apenas ativadas podem estimular a liberação de proteínas mitocondriais mais diretamente pela ligação e ativação de proteínas BH123. Embora não mostradas, proteínas Bcl2 antiapoptóticas são ligadas à superfície mitocondrial.

Como mencionado anteriormente, em algumas células, a via apoptótica extrínseca recruta a via intrínseca para amplificar a cascata de caspase para matar a célula. A proteína BH3-apenas *Bid* é a conexão entre as duas vias. Quando receptores de morte ativam a via extrínseca nessas células, a caspase iniciadora, caspase-8, cliva Bid, produzindo uma forma truncada de Bid chamada de *tBid*. A tBid se transloca para a mitocôndria, onde inibe proteínas Bcl2 antiapoptóticas e causa a agregação de proteínas BH123 proapoptóticas que liberam citocromo *c* e outras proteínas intermembranas, amplificando assim o sinal de morte.

As proteínas BH3-apenas Bid, Bim e Puma (ver Figura 18-9) podem inibir todas as proteínas Bcl2 antiapoptóticas, enquanto outras proteínas BH3-apenas podem inibir somente um pequeno conjunto de proteínas antiapoptóticas. Então, Bid, Bim e Puma são os ativadores mais potentes da apoptose na subfamília BH3-apenas de proteínas Bcl2.

Proteínas Bcl2 não são os únicos reguladores intracelulares da apoptose. Proteínas inibidoras de apoptose (IAP, *inhibitor of apoptosis*) também desempenham um importante papel na supressão da apoptose, especialmente em *Drosophila*.

Caspases inibem IAPs

Inibidores de apoptose (IAPs) foram primeiramente identificados em certos vírus de insetos (baculovírus), os quais decodificam proteínas IAP para evitar que a célula hospedeira infectada pelo vírus se mate por apoptose. (Células animais infectadas por vírus frequentemente se matam para evitar que o vírus se replique e infecte outras células.) Sabe-se atualmente que muitas células animais também produzem proteínas IAP.

Todas IAPs têm um ou mais domínios BIR (repetidos IAP de baculovírus, de *baculovirus IAP repeat*), que permitem a elas ligarem-se e inibirem caspases ativadas. Algumas IAPs também fazem a poliubiquitinação das caspases, marcando as caspases para destruição pelos proteossomos. Dessa maneira, as IAPs estabelecem um limiar inibidor que caspases ativadas devem cruzar para disparar a apoptose.

Ao menos em *Drosophila*, essa barreira inibidora proporcionada pelas IAPs pode ser neutralizada por proteínas **antiIAP**, as quais são produzidas em resposta a vários estímulos apoptóticos. Existem cinco antiIAPs em moscas, incluindo *Reaper*, *Grim* e *Hid*, apenas com similaridade estrutural no seu pequeno motivo N-terminal, de ligação a IAP, que se liga ao domínio BIR de IAPs, impedindo a ligação do domínio a uma caspase. A deleção dos três genes que codificam Reaper, Grim e Hid bloqueia a apoptose em moscas. Inversamente, a inativação de um dos dois genes que codificam IAPs em *Drosophila* faz com que todas as células do embrião da mosca em desenvolvimento entrem em apoptose. Claramente, o balanço entre IAPs e antiIAPs é firmemente regulado, sendo crucial para o controle da apoptose em moscas.

O papel de proteínas antiIAP de mamíferos na apoptose é mais controverso. Como ilustrado na **Figura 18-12**, antiIAPs são liberadas do espaço intermembranas mitocondrial no citosol quando a via intrínseca da apoptose é ativada, bloqueando IAPs no citosol e então promovendo a apoptose. Quando, entretanto, os genes que codificam duas antiIAPs conhecidas de mamíferos, chamadas de *Smac* (também chamada de *DIABLO*) e *Omi*, são inativadas em células de camundongos, a apoptose aparentemente não é afetada – por isso a controvérsia sobre seus papéis normalmente na regulação da apoptose.

Em resumo, as atividades combinadas de proteínas Bcl2, IAPs e antiIAPs determinam a sensibilidade de uma célula animal a estímulos indutores de apoptose, com IAPs e antiIAPs dominantes em moscas e proteínas Bcl2 dominantes em mamíferos.

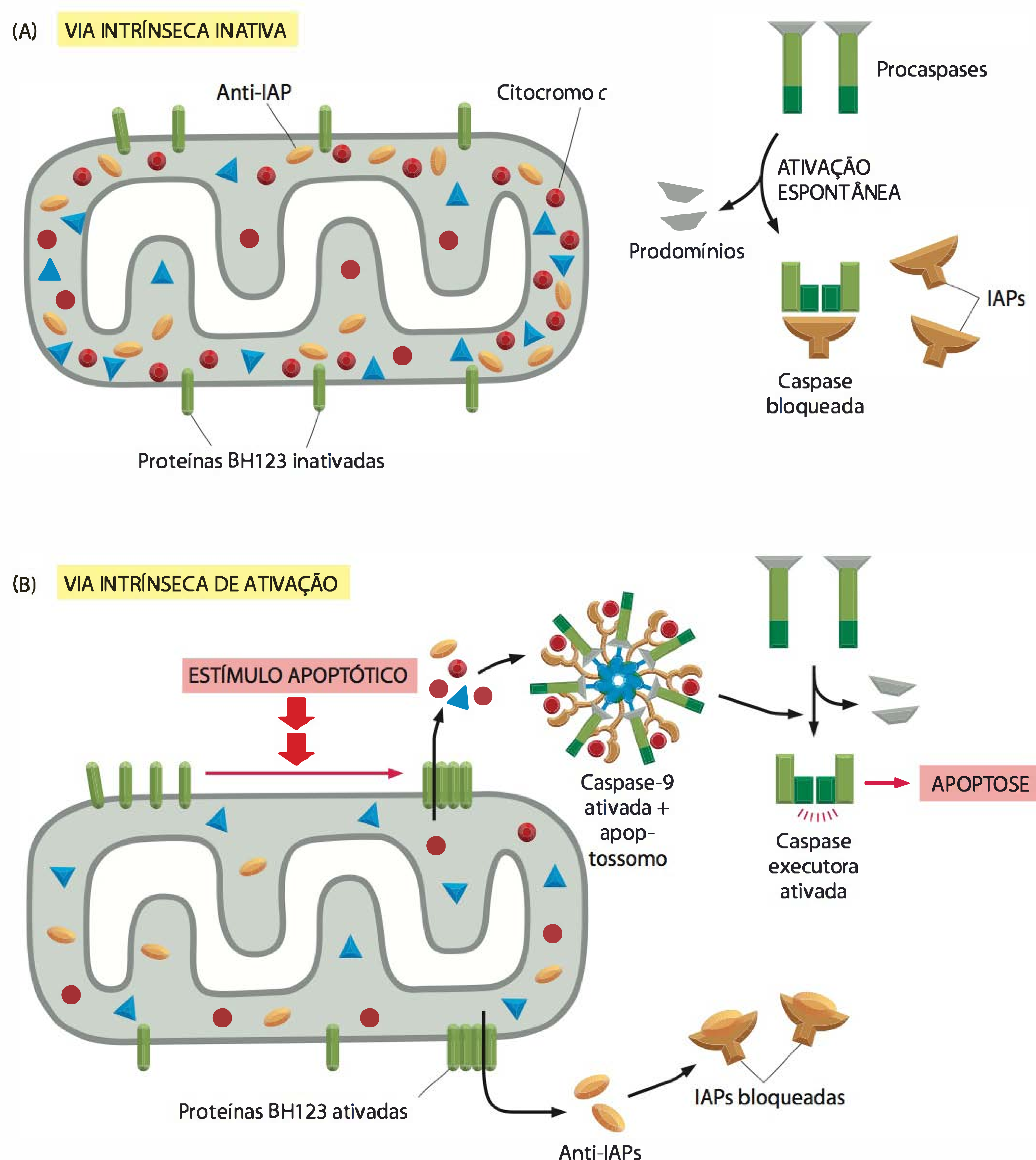


Figura 18-12 Um modelo proposto para os papéis de IAPs e anti-IAPs no controle da apoptose em células de mamíferos. (A) Na ausência de estímulos apoptóticos, as IAPs evitam apoptoses acidentais causadas por ativação espontânea de procaspases. As IAPs estão localizadas no citosol e se ligam e inibem qualquer caspase ativada espontaneamente. Algumas IAPs também são ligases ubiquitinadas que ubiquitinam as caspases às quais se ligam, marcando-as para degradação em proteossomos (não-mostrado). (B) Quando um estímulo apoptótico ativa a via intrínseca, entre as proteínas liberadas do espaço intermembranas mitocondrial estão as proteínas anti-IAPs, as quais se ligam e bloqueiam a atividade inibidoras das IAPs. Ao mesmo tempo, a liberação de citocromo *c* dispara o agrupamento de apoptossomos, que podem então ativar a cascata de caspase, levando à apoptose.

Fatores de sobrevivência extracelulares inibem a apoptose em várias vias

Como discutido no Capítulo 15, sinais intracelulares regulam muitas atividades em células animais, incluindo a apoptose. Esses sinais extracelulares fazem parte dos controles "sociais" normais que asseguram que células individuais se comportem para o bem do organismo como um todo – e, nesse caso, pela sobrevivência quando são necessárias e se matando quando não são necessárias. Algumas moléculas de sinalização extracelular estimulam a apoptose, enquanto outras a inibem. Apresentamos proteínas-sinal como Fas ligante que ativam receptores de morte e então disparam a via extrínseca da apoptose. Outras moléculas de sinalização extracelular que estimulam a apoptose são especialmente importantes durante o desenvolvimento animal: um aumento no hormônio da tireoide na corrente sanguínea, por exemplo, sinaliza a células no girino para entrarem em apoptose na metamorfose (ver Figura 18-3), enquanto proteínas morfogenéticas do osso produzidas localmente (BMPs, *Bone morphogenic proteins*, discutido nos Capítulos 15 e 22) estimulam células em desenvolvimento de dedos da mão e dedos do pé a matarem-se (ver Figura 18-2). Aqui, entretanto, enfocamos moléculas de sinalização extracelular que inibem a apoptose, as quais juntas são chamadas de **fatores de sobrevivência**.

Muitas células animais requerem sinalização contínua de outras células para evitar a apoptose. Essa surpreendente combinação aparentemente ajuda a assegurar que células sobrevivam apenas quando e onde são necessárias. Células nervosas, por exemplo, são produzidas em excesso no desenvolvimento do sistema nervoso e então competem por quantidades limitadas de fatores de sobrevivência que são secretados pelas células-alvo às quais elas normalmente se conectam. Células nervosas que recebem o tipo apropriado de sinal de sobrevivência suficiente vivem, enquanto outras morrem. Dessa maneira, o número de neurônios sobreviventes é automaticamente ajustado, sendo apropriado para o número de células-alvo conectadas (**Figura 18-13**). Uma competição similar por quantidades limitadas de fatores de sobrevivência produzidos por células vizinhas é conhecida por controlar o número celular em outros tecidos, durante o desenvolvimento e a idade adulta.

Fatores de sobrevivência geralmente se ligam a receptores da superfície celular, que ativam vias de sinalização intracelulares que suprimem o programa apoptótico, frequentemente por membros reguladores de proteínas da família Bcl2. Alguns fatores de sobrevivência, por exemplo, estimulam um aumento na produção de proteínas Bcl2 antiapoptóticas como a própria Bcl2 ou a Bcl-X_L (**Figura 18-14A**). Outros agem inibindo a função de proteínas Bcl2 proapoptóticas BH3-apenas como *Bad* (Figura 18-14B). Em *Drosophila*, alguns fatores de sobrevivência agem fosforilando e inativando proteínas antiIAP, consequentemente permitindo que proteínas IAP suprimam apoptose (Figura 18-14C).

Quando células de mamíferos são privadas de fatores de sobrevivência, elas se matam produzindo e ativando proteínas BH3-apenas proapoptóticas, as quais ativam a via intrínseca da apoptose desconsiderando proteínas Bcl2 antiapoptóticas que são requeridas para manter a célula viva. Células de camundongo com a ausência de Bax e Bak não são capazes de ativar a via intrínseca e podem então viver por semanas em cultura na ausência de fatores de sobrevivência; sem sinais de sobrevivência, entretanto, as células não podem importar nutrientes de forma eficiente. Tais células suprem suas necessidades metabólicas por meio de *autofagia*, na qual as células sequestram organelas e as fagocitam para seus citoplasmas dentro de autofagossomos, que então se fusionam com lisossomos (discutido no Capítulo 13). As células finalmente morrem de fome, mas não por apoptose.

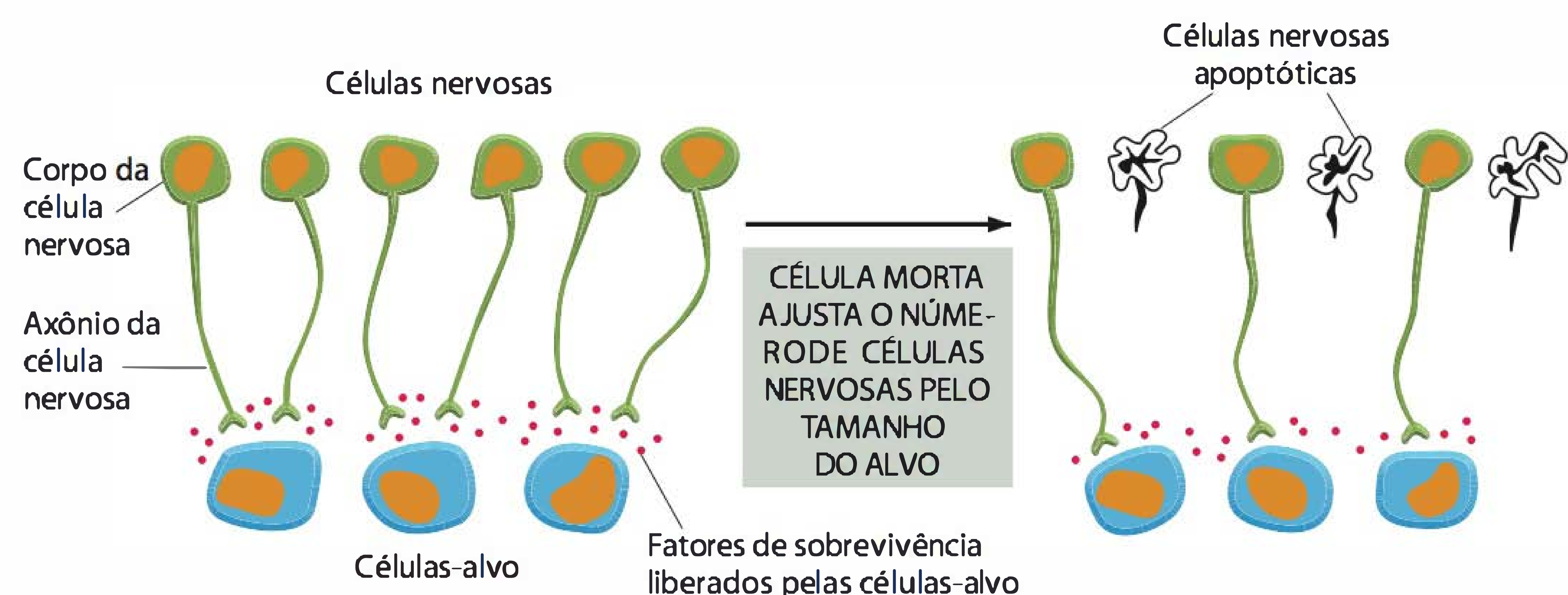


Figura 18-13 O papel dos fatores de sobrevivência e morte celular no ajuste do número de células nervosas em desenvolvimento para a quantidade de tecido-alvo. Mais células nervosas são produzidas do que podem ser mantidas pela quantidade limite de fatores de sobrevivência liberados por células-alvo. Por conseguinte, algumas células recebem uma quantidade insuficiente de fatores de sobrevivência para evitar a apoptose. Essa estratégia de superprodução seguida por seleção assegura que todas as células-alvo sejam contactadas por células nervosas e que as células nervosas extras sejam automaticamente eliminadas.

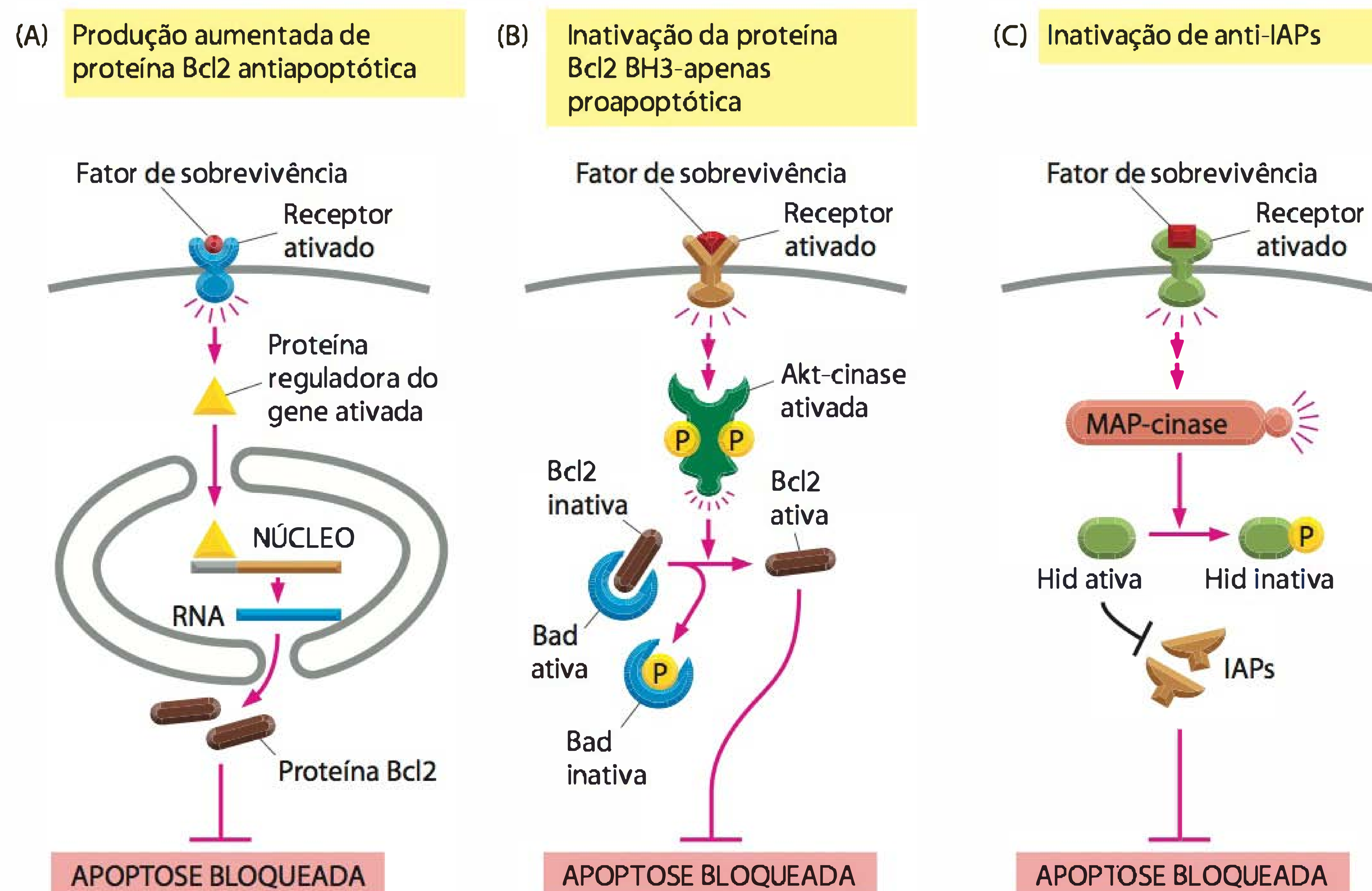


Figura 18-14 Três maneiras pelas quais os fatores de sobrevivência extracelulares podem inibir a apoptose. (A) Alguns fatores de sobrevivência suprimem a apoptose estimulando a transcrição de genes que codificam proteínas Bcl2 antiapoptóticas tais como a própria Bcl2 ou a Bcl-X_L. (B) Muitas outras ativam a proteína-cinases serina/treonina Akt, que, entre muitos outros alvos, fosforila e inativa as proteínas Bad e Bcl2 proapoptóticas BH3-apenas (ver Figura 15-64). Quando não-fosforilada, Bad promove a apoptose ligando-se e inibindo Bcl2; uma vez fosforilada, Bad dissocia-se, liberando Bcl2 de suprimir a apoptose. A Akt também suprime a apoptose fosforilando e inativando proteínas reguladoras gênicas da família Forkhead que estimula a transcrição de genes codificando proteínas que promovem a apoptose (não-mostrado). (C) Em *Drosophila*, alguns fatores de sobrevivência inibem a apoptose estimulando a fosforilação da proteína anti-IAP Hid. Quando não-fosforilada, Hid promove a morte celular inibindo IAPs. Uma vez fosforilada, Hid rapidamente inibe IAPs, que se tornam ativas e bloqueiam a apoptose.

Apoptose excessiva ou insuficiente pode contribuir para doenças

Existem muitas doenças humanas nas quais o número excessivo de células que entram em apoptose contribuem para o dano no tecido. Entre os exemplos mais dramáticos estão ataque do coração e derrame. Nessas condições agudas, muitas células morrem por necrose como resultado de isquemia (suprimento inadequado de sangue), mas algumas das células menos afetadas morrem por apoptose. Espera-se que, no futuro, fármacos como inibidores de caspases que bloqueiam a apoptose se tornem úteis salvando células nessas condições.

Existem outras circunstâncias onde poucas células morrem por apoptose. Mutações em camundongos e humanos, por exemplo, que inativam genes que codificam o receptor de morte Fas ou o ligante Fas, impedem a morte normal de alguns linfócitos, causando o acúmulo excessivo do número dessas células no baço e nas glândulas linfáticas. Em muitos casos, isso leva à doença autoimune, na qual os linfócitos reagem contra tecidos do próprio indivíduo.

A apoptose diminuída também faz uma importante contribuição a muitos tumores, visto que células de câncer frequentemente regulam o programa apoptótico anormalmente. O gene *Bcl2*, por exemplo, foi primeiramente identificado em uma forma comum de linfócitos de câncer em humanos, onde uma translocação cromossômica causa uma produção excessiva da proteína Bcl2; de fato, Bcl2 recebeu seu nome desse *linfoma de célula B*. O alto nível da proteína Bcl2 em linfócitos que carregam a translocação promove o desenvolvimento de câncer pela inibição da apoptose, prolongando a sobrevivência e aumentando o número celular; isso também diminui a sensibilidade dessas células a fármacos anticâncer, que comumente funcionam levando as células de câncer a entrarem em apoptose.

Similarmente, o gene codificando a proteína supressora de tumor p53 é mutado em 50% dos cânceres humanos, sendo que isso não promove mais a apoptose ou a parada do ciclo celular em resposta ao dano no DNA. A falta da função de p53 permite que a célula de câncer sobreviva e prolifere mesmo quando seu DNA está danificado; dessa maneira, as células acumulam mais mutações, algumas das quais produzem câncer mais maligno (discutido no Capítulo 20). Como muitos fármacos anticâncer induzem a apoptose (e a parada do ciclo celular) por um mecanismo dependente de p53 (discutido nos Capítulos 17 e 20), a perda da função de p53 também produz células de câncer menos sensíveis a esses fármacos.

Muitos cânceres humanos surgem em tecidos epiteliais como no pulmão, no trato intestinal, na mama e na próstata. Tais células de câncer exibem muitas anormalidades em seu comportamento, incluindo uma diminuição na habilidade de aderência à matriz extracelular e aderência umas às outras nas junções especializadas entre células. No próximo capítulo, discutiremos notáveis estruturas e funções da matriz extracelular e das junções celulares.

Resumo

As células podem ativar um programa de morte intracelular e matarem-se de uma maneira controlada – um processo chamado de morte celular programada. Dessa maneira, células animais que são irreversivelmente danificadas, não mais necessárias, ou que sejam uma ameaça ao organismo podem ser eliminadas rápida e elegantemente. Em muitos casos, essas mortes ocorrem por apoptose: a células se contraem, condensam-se, frequentemente se fragmentam, e células vizinhas ou macrófagos rapidamente fagocitam essas células ou fragmentos antes do vazamento do conteúdo citoplasmático. A apoptose depende de enzimas proteolíticas chamadas de caspases, as quais clivam especificamente proteínas intracelulares para ajudar a matar a célula. As caspases estão presentes em todas as células animais nucleadas como precursores inativos chamados de procaspases. Procaspases iniciadoras são ativadas quando estão próximas de complexos de ativação: uma vez ativadas, elas clivam e ativam procaspases executoras "downstream"*, as quais ativam outras procaspases executoras (e várias outras proteínas-alvo na célula), produzindo uma amplificação irreversível da cascata proteolítica.*

As células usam ao menos duas vias distintas para ativar procaspases iniciadoras e disparar a cascata de caspase levando à apoptose: a via extrínseca é ativada pela ligação de ligantes extracelulares a receptores de morte na superfície celular; a via intrínseca é ativada por sinais intracelulares gerados quando as células são estressadas. Cada via usa suas procaspases iniciadoras, as quais são ativadas em distintos complexos de ativação, chamados de DISC e apoptossomos, respectivamente. Na via extrínseca, receptores de morte recrutam procaspases-8 e 10 por meio de proteínas adaptadoras para formar o complexo DISC; na via intrínseca, o citocromo c liberado do espaço intermembranas de mitocôndrias ativa Apaf1, que se junta ao apoptossomo e recruta e ativa a procaspase-9.

Proteínas de sinalização extracelular, proteínas Bcl2 intracelulares e proteínas IAP regulam firmemente o programa de apoptose para assegurar que as células normalmente matem-se apenas quando isso beneficiar o animal. Ambas as proteínas Bcl2 antiapoptóticas e proapoptóticas regulam a via intrínseca controlando a liberação de proteínas intermembranas mitocondriais, enquanto as proteínas IAP inibem caspases ativadas e promovem sua degradação.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

18-1 Em tecidos adultos normais, a morte celular em geral é contrabalançada pela divisão celular.

18-2 Células de mamíferos que não possuem citocromo *c* poderiam ser resistentes à apoptose induzida pela luz UV.

Discuta as seguintes questões.

18-3 Um importante papel de Fas e do ligante Fas é intervir na eliminação de células tumorais por meio de linfócitos matadores. Em um estudo de 35 tumores primários de cólon e pulmão, metade dos tumores foi encontrada por ter um gene que codifica uma proteína secretada que se liga ao ligante Fas, amplificado e superexpresso. Como você supõe que a superexpressão dessa proteína poderia contribuir para a sobrevivência dessas células tumorais? Justifique.

18-4 O desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans* gera exatamente 959 células somáticas; ele também produz um adicional de 131 células que são eliminadas mais tarde por morte celular programada. Experimentos genéticos clássicos em *C. elegans* isolaram mutantes que identificaram os primeiros genes envolvidos na apoptose. Dos muitos genes mutantes afetando a apoptose em nematódeos, nenhum jamais foi encontrado no gene para o citocromo *c*. Por que você supõe que uma molécula efetora central na apoptose não foi encontrada em muitas prospecções genéticas por genes de "morte" que tenham sido realizadas em *C. elegans*?

18-5 Imagine que você possa microinjetar citocromo *c* no citosol de células do tipo selvagem e em células duplamente defectivas para Bax e Bak. Você esperaria que um, ambos ou nenhum tipo celular entrasse em apoptose? Justifique.

18-6 Em contraste com suas anormalidades cerebrais similares, camundongos recém-nascidos deficientes em Apaf1 ou caspase-9 possuem diferentes anormalidades em suas patas. Camundongos deficientes em Apaf1 falham em eliminar as membranas entre seus dedos em desenvolvimento, enquanto que camundongos deficientes em caspase-9 têm dedos formados normalmente (**Figura Q18-1**). Se Apaf1 e caspase-9 funcionam na mesma via apoptótica, como é possível para esses camundongos deficientes mostrarem diferenças na célula da membrana em apoptose?

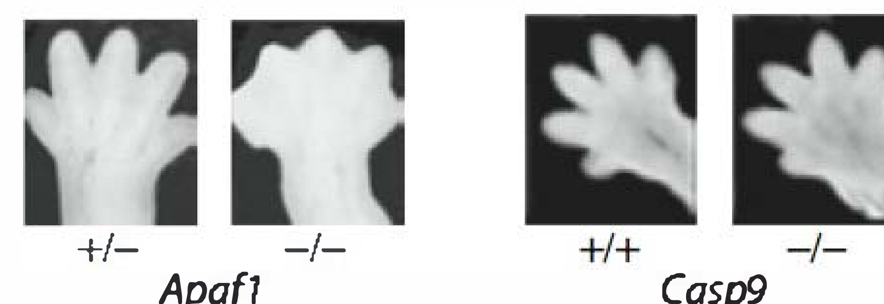


Figura Q18-1 A aparência das patas de *Apaf1*$^{-/-}$ e *Casp9*$^{-/-}$ de camundongos recém-nascidos comparada com a de camundongos recém-nascidos normais (Questão 18-6). (De H. Yoshida et al., *Cell* 94:739-750, 1998. Com permissão de Elsevier.)

18-7 Quando células (HeLa) de câncer humano são expostas à luz UV a 90 mJ/cm^2, muitas das células entram em apoptose dentro de 24 horas. A liberação do citocromo *c* de mitocôndrias pode ser detectada apenas 6 horas depois da exposição de uma população de células à luz UV, e ela continua aumentando por mais de 10 horas. Isso significa que células individuais lentamente liberam seu citocromo *c* nesse período de tempo? Ou, alternativamente, células individuais liberam seu citocromo *c* rapidamente, mas com diferentes células sendo disparadas em um período de tempo maior?

Para responder essa questão fundamental, você fusionou o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) ao gene que codifica o citocromo *c*, então você pode observar o comportamento de células individuais por microscopia confocal de fluorescência. Em células que estão expressando a fusão citocromo *c*-GFP, a fluorescência mostra um padrão pontual típico de proteínas mitocondriais. Você então irradia essas células com luz UV e observa as trocas no padrão pontual em células individuais. Duas dessas células (circuladas em branco) são mostradas na **Figura Q18-2A** e B. A liberação do citocromo *c*-GFP é detectada como uma troca do padrão de fluorescência pontual para difuso. O tempo após a exposição à UV está indicado em horas:minutos abaixo dos painéis individuais.

Que modelo para a liberação do citocromo *c* pode ser obtido a partir dessas observações? Explique seu raciocínio.

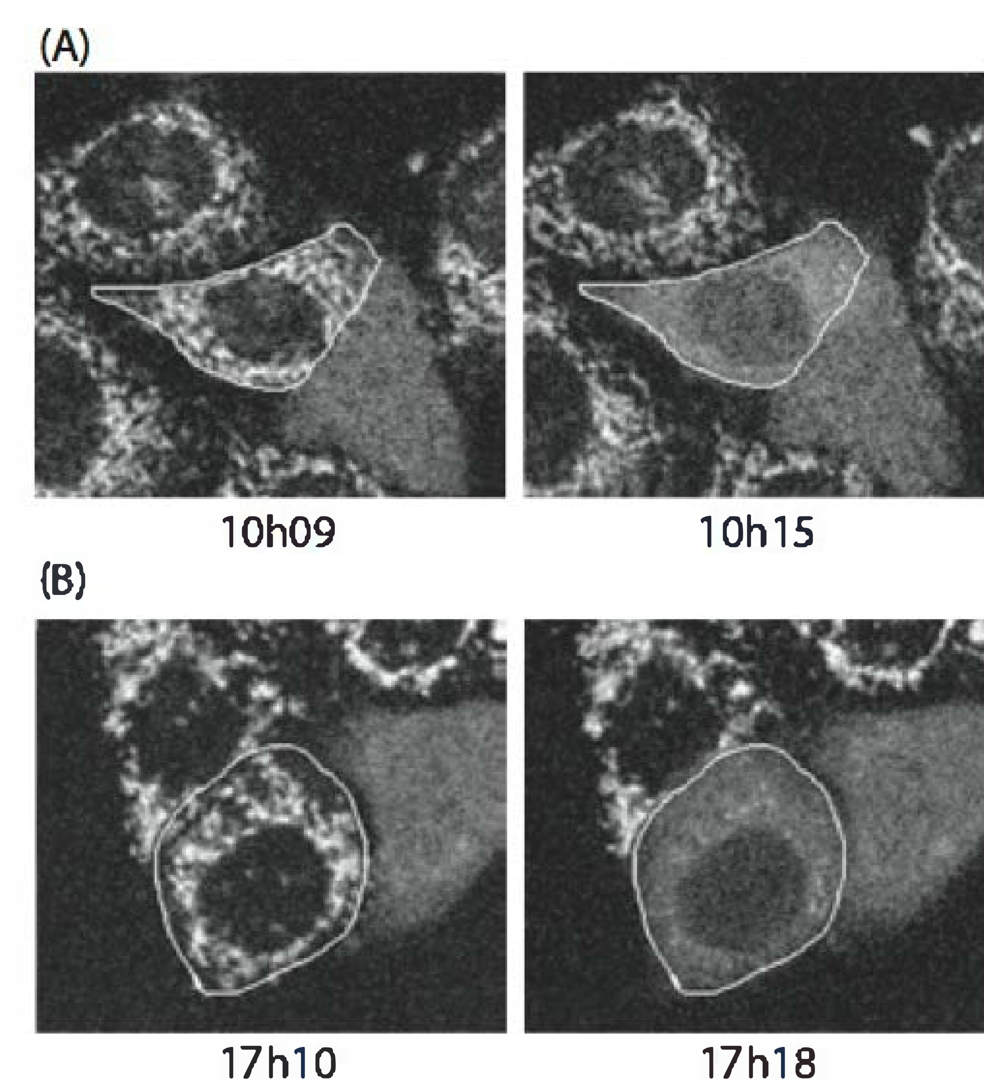


Figura Q18-2 Vídeo em sequência, análise por microscopia de fluorescência da liberação do citocromo *c*-GFP de mitocôndrias de células individuais (Questão 18-7). (A) Células observadas por 8 minutos, 10 horas após a irradiação com luz UV. (B) Células observadas por 6 minutos, 17 horas após a irradiação com luz UV. Uma célula em (A) e uma em (B), cada uma *circulada em branco*, liberou seu citocromo *c*-GFP durante o tempo de observação, que é mostrado em horas:minutos abaixo de cada painel. (De J. C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2:156-162, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

REFERÊNCIAS

Adams JM, Huang DC, Strasser A et al (2005) Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:469–77.

Boatright KM & Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725–731.

Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116:205–219.

Ellis RE, Yuan JY & Horvitz RA (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663–698.

Fadok VA & Henson PM (2003) Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist—with a twist. *Curr Biol* 13:R655–R657.

Galonek HL & Hardwick JM (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nature Cell Biol* 8:1317–1319.

Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671–674.

Horvitz HR (2003) Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem* 4:697–711.

Hyun-Eui K, Fenghe D, Fang M & Wang X (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17545–17550.

Jacobson MD, Weil M & Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347–354.

Jiang X & Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73:87–106.

Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B J Cancer* 26:239–257.

Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14:32–43.

Lavrik I, Golks A & Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265–267.

Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.

Lum JJ, Bauer DE, Kong M et al (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120:237–48.

McCall K & Steller H (1997) Facing death in the fly: genetic analysis of apoptosis in *Drosophila*. *Trends Genet* 13:222–226.

Nagata S (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33:29–55.

Nagata S (2005) DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 23:853–875.

Pop C, Timmer J, Sperandio S & Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 22:269–275.

Raff MC (1999) Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119–122.

Rathmell JC & Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109:S97–107.

Tittel JN & Steller H (2000) A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol* 1.

Verhagen AM, Coulson EJ & Vaux DL (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2:3009.1–3009.10.

Vousden KH (2005) Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309:1685–1686.

Willis SN & Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617–625.

V

AS CÉLULAS EM SEU CONTEXTO SOCIAL

Parte V
Capítulos

19 Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular

20 Câncer

No CD-ROM:

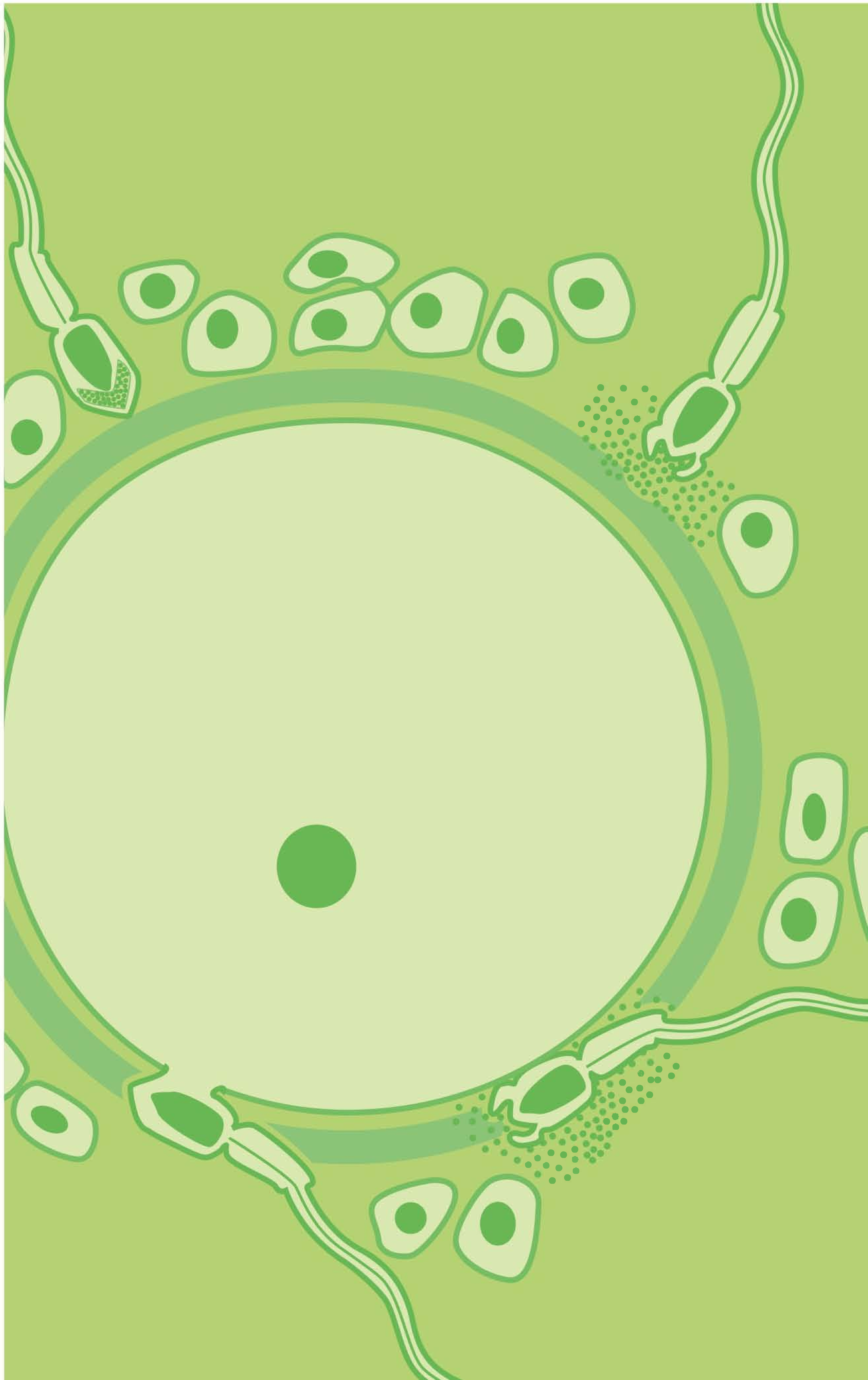
21 Reprodução Sexual: Meiose, Células Germinativas e Fecundação

22 Desenvolvimento de Organismos Multicelulares

23 Tecidos Especializados, Células-Tronco e Renovação de Tecidos

24 Patógenos, Infecção e Imunidade Inata

25 O Sistema Imune Adaptativo



Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular

19

Entre todas as interações sociais que ocorrem entre as células de um organismo multicelular, a fundamental é aquela que mantém as células unidas. As células podem ser unidas por meio de interações diretas célula-célula ou ligarem-se por meio dos materiais que elas secretam, mas, de uma forma ou de outra, devem estar coesas para formar uma estrutura multicelular organizada.

O mecanismo de coesão governa a arquitetura do organismo, sua forma e o arranjo dos diferentes tipos celulares. As junções entre as células criam vias para comunicação, permitindo que as células compartilhem sinais que coordenam seu comportamento e regulam seu padrão de expressão gênica. As ligações a outras células e à matriz extracelular controlam a orientação da estrutura interna de cada célula. A formação e a destruição das ligações e a modelagem da matriz governam o modo como as células se movem no organismo, orientando-as durante o crescimento, o desenvolvimento e o reparo. Assim, o aparato das junções celulares, os mecanismos de adesão celular e a matriz extracelular são críticos para cada um dos aspectos da organização, função e dinâmica das estruturas multicelulares. Defeitos neste aparato são responsáveis por uma grande variedade de doenças.

Exemplos surpreendentes de engenharia estrutural são os organismos multicelulares. As células são pequenas, deformáveis e frequentemente móveis, preenchidas por um meio aquoso e circundadas por uma fina membrana plasmática. Milhões de células podem combinar-se para formar estruturas maciças, fortes e extremamente ordenadas como um cavalo ou uma árvore. Como isso é possível?

A resposta reside em duas estratégias de construção básicas, que correspondem às duas formas pelas quais o estresse pode ser transmitido através da estrutura multicelular. Uma estratégia depende da força da *matriz extracelular*, uma rede complexa de proteína e cadeias de polissacarídeos secretadas pelas células. A outra estratégia depende da força do citoesqueleto no interior das células e das *adesões célula-célula* que unem o citoesqueleto de células vizinhas. Nas plantas, a matriz extracelular também é muito importante. Os tecidos das plantas devem sua força às paredes celulares que circundam cada célula. Nos animais, os dois tipos de estratégia arquitetônica são usados, mas com diferente extensão nos diferentes tecidos.

Os tecidos animais são extraordinariamente variados, como veremos no Capítulo 23, mas a maioria é classificada em uma de duas categorias mais amplas, representando dois extremos arquitetônicos (**Figura 19-1**). Nos **tecidos conectivos**, tais como ossos ou tendões, a matriz extracelular é abundante e as células se encontram esparsamente distribuídas. A matriz é rica em polímeros fibrosos, especialmente *colágeno*, sendo que é a matriz que sofre a maior parte do estresse mecânico ao qual o tecido está sujeito, e não as células. Ligações diretas entre as células são relativamente raras, mas as células apresentam importantes ligações à matriz que as permitem esticar a matriz e ser por ela esticadas.

Por outro lado, no **tecido epitelial**, como aquele que reveste o intestino ou a epiderme, as células são fortemente ligadas em camadas chamadas de **epitélio**. A matriz extracelular é escassa e consiste principalmente em uma fina camada denominada *lâmina basal* (ou *membrana basal*), a qual se situa subjacente ao epitélio. As células estão ligadas umas às outras diretamente, por adesões célula-célula, onde os filamentos do citoesqueleto estão ancorados, transmitindo o estresse pelo interior das células de um local de adesão a outro.

A ligação física é crítica, tanto no tecido epitelial quanto em tecidos não-epiteliais, mas as junções entre as células ou entre as células e a matriz são distintas em estrutura e fazem

Neste capítulo

CADERINAS E ADESÃO CÉLULA-CÉLULA 1133

JUNÇÕES COMPACTAS E A ORGANIZAÇÃO DO EPITÉLIO 1150

PASSAGEM DE CÉLULA PARA CÉLULA: JUNÇÕES TIPO FENDA E PLASMODESMATA 1158

A LÂMINA BASAL 1164

INTEGRINAS E ADESÃO CÉLULA-MATRIZ 1169

A MATRIZ EXTRACELULAR DOS TECIDOS CONECTIVOS ANIMAIS 1178

A PAREDE CELULAR DAS PLANTAS 1195

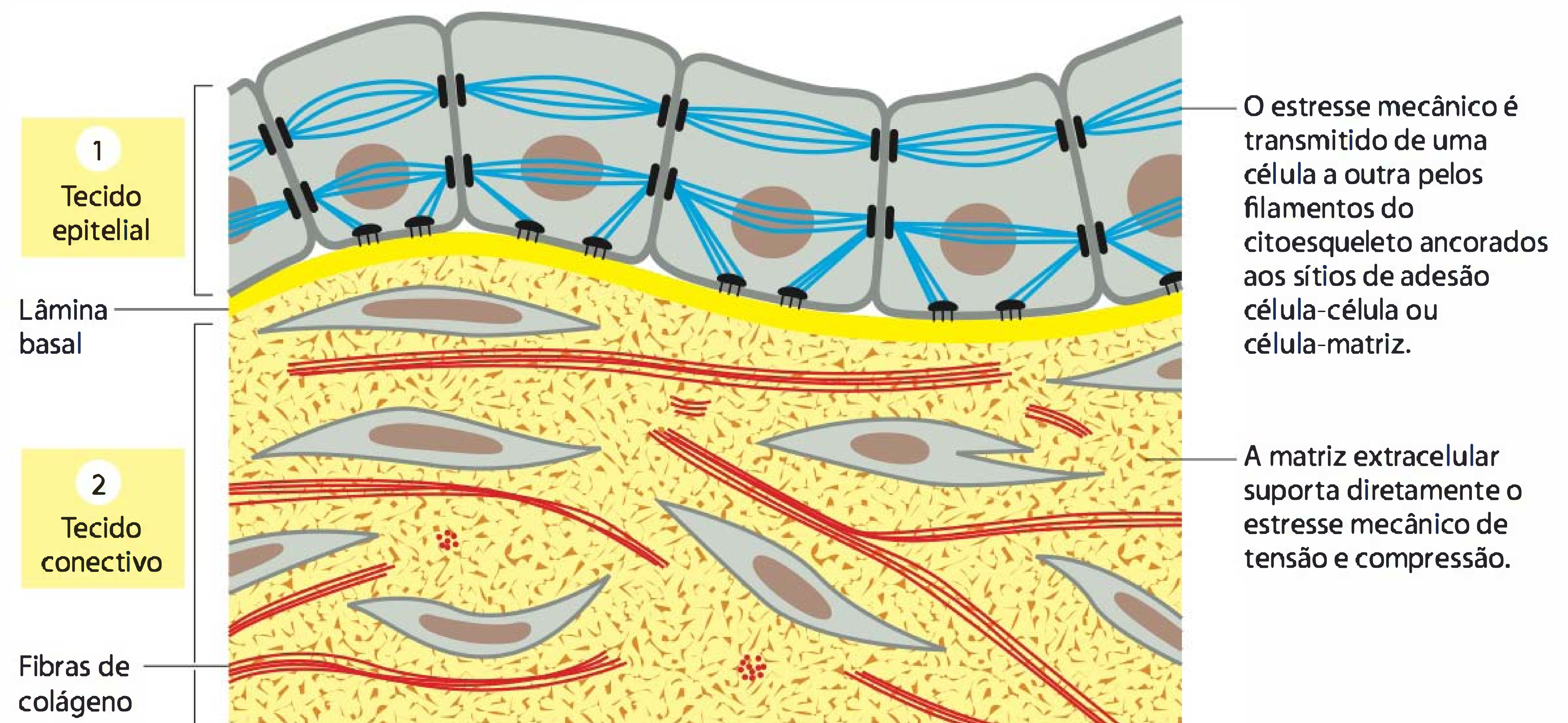


Figura 19-1 Duas principais maneiras pelas quais as células animais são unidas. No tecido conectivo, o principal componente que suporta o estresse é a matriz extracelular. No tecido epitelial, é o citoesqueleto das próprias células, ligado de uma célula à outra por junções de ancoramento. As adesões célula-matriz conectam o tecido epiltelial ao tecido conectivo subjacente.

mais do que apenas transmitir forças físicas. Quatro principais funções podem ser distinguidas, cada uma com base molecular distinta (**Figura 19-2** e **Tabela 19-1**):

1. **Junções de ancoramento**, incluindo as *adesões célula-célula* e as *adesões matriz-célula*, transmitem o estresse e estão imbricadas aos filamentos do citoesqueleto.
2. **Junções ocludentes** selam os espaços entre as células do epitélio, tornando-o uma barreira impermeável (ou seletivamente permeável).
3. **Junções comunicantes** criam passagens ligando citoplasmas de células adjacentes.
4. **Junções sinalizadoras** permitem que os sinais sejam transmitidos entre as células através de sua membrana plasmática nos locais de contato célula-célula.

As sinapses químicas no sistema nervoso (discutido no Capítulo 11) e as sinapses imunes, onde os linfócitos T interagem com as células apresentadoras de antígenos (discutido no Capítulo 25), são os exemplos mais óbvios de junções sinalizadoras, mas não são os únicos. Sítios de comunicação célula-célula com pares de ligante-receptor transmembrana como Delta e Notch, ou receptores para efrinas e Eph, como discutido no Capítulo 15, pertencem a essa categoria: as membranas celulares são mantidas em contato umas com as outras para que o ligante ative o receptor. Além disso, veremos que as junções de ancoramento, as junções ocludentes e as junções comunicantes, de maneira distinta, desempenham importante papel na transmissão de sinais.

Na primeira parte deste capítulo discutiremos primeiramente os tecidos das células animais, iniciando com as adesões célula-célula, as junções ocludentes e as junções comuni-

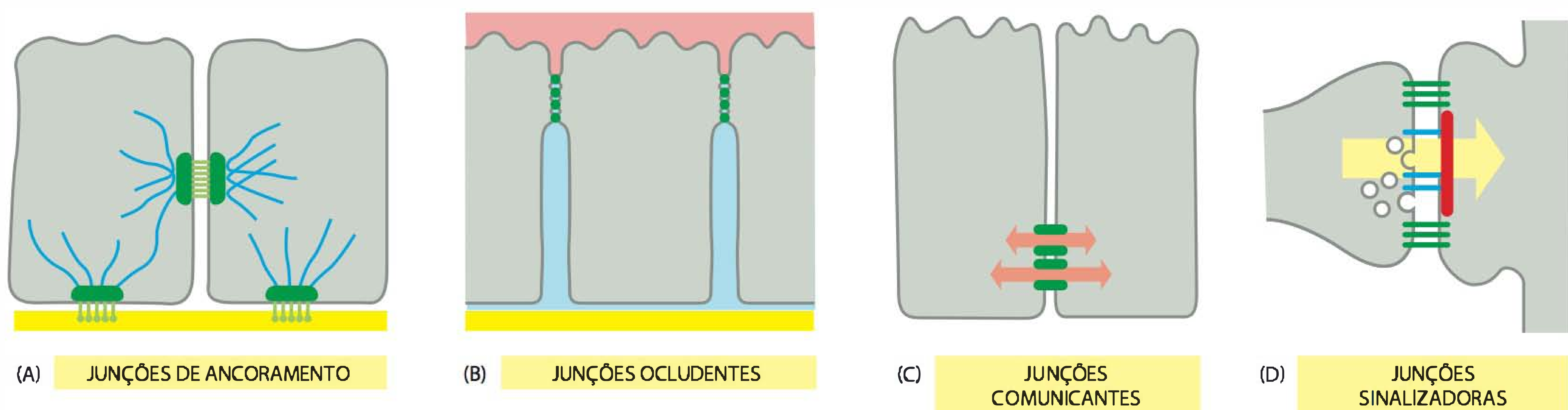


Figura 19-2 Quatro classes funcionais de junções celulares dos tecidos animais. (A) As junções de ancoramento ligam célula à célula (pelas proteínas transmembrana *caderinas*) ou célula à matriz (tipicamente pelas proteínas transmembrana *integrinas*). (B) As junções ocludentes (envolvendo a proteína *claudina*) selam os espaços entre as células epiteliais. (C) As junções comunicantes (compostas por proteínas *conexinas* ou *inexinas*) formam passagens por pequenas moléculas e íons entre as células. (D) As junções sinalizadoras são estruturas complexas, envolvendo proteínas de ancoramento juntamente com proteínas mediadoras de transdução de sinais.

Tabela 19-1 Classificação funcional das junções celulares

JUNÇÕES DE ANCORAMENTO	
Sítios de ligação de filamentos de actina	
1.	Junções célula-célula (junções aderentes)
2.	Junções célula-matriz (adesões célula-matriz ligadas por filamentos de actina)
Sítios de ligação de filamentos intermediários	
1.	Junções célula-célula (desmossomos)
2.	Junções célula-matriz (hemidesmossomos)
JUNÇÕES OCLUDENTES	
1.	Junções compactas (em vertebrados)
2.	Junções septadas (em invertebrados)
JUNÇÕES COMUNICANTES	
1.	Junções tipo fenda (em animais)
2.	Plasmodesmata (em plantas)
JUNÇÕES SINALIZADORAS	
1.	Sinapses químicas (no sistema nervoso)
2.	Sinapses imunológicas (no sistema imune)
3.	Contatos de sinalização célula-célula receptor-ligante transmembrana (Delta-Notch, efrina-Eph, etc.). Junções ocludentes, de ancoramento e comunicantes podem apresentar funções sinalizadoras além de seus papéis estruturais.

cantes que ligam diretamente uma célula à outra. Como exemplo de junções sinalizadoras, veremos brevemente as sinapses neuronais do ponto de vista de seu mecanismo de adesão e reunião. Veremos como os diferentes tipos de junções organizam as células em camadas epiteliais polarizadas. Discutiremos então a matriz extracelular dos animais e a forma de interação com as células pelas adesões célula-matriz. Finalmente, discutiremos o papel central da parede celular na formação da planta.

CADERINAS E ADESÃO CÉLULA-CÉLULA

As estruturas das **adesões célula-célula** são mais claramente observadas no epitélio maduro e em alguns outros tecidos, como o músculo cardíaco, unidos por um forte ancoramento direto de uma célula com outra. O estudo desses tecidos, por microscopia eletrônica, permitiu a primeira classificação geral das junções celulares. Desde então a bioquímica e a biologia molecular têm mostrado que diferentes estruturas vistas em microscopia eletrônica estão relacionadas a sistemas distintos de moléculas, importantes não somente no epitélio adulto, mas também em outros tecidos onde as especializações juncionais não são facilmente visíveis.

A **Figura 19-3** ilustra de forma esquemática os tipos de junções reveladas pela microscopia eletrônica de um corte de epitélio maduro e mostra como as adesões célula-célula (junções de ancoramento), que serão o foco desta seção, estão distribuídas em relação aos outros tipos de junções discutidos mais adiante. O diagrama mostra o arranjo típico de um epitélio *colunar simples* como o revestimento do intestino delgado dos vertebrados. Aqui, uma única camada de células altas todas apoiadas em uma lâmina basal com sua superfície mais apical, ou *ápice*, livre e exposta ao meio extracelular. Nos seus lados, ou superfícies *laterais*, as células formam as junções umas com as outras. Próximo à porção apical, localizam-se as junções ocludentes (conhecidas como *junções compactas* nos vertebrados), que impedem o vazamento de moléculas nos espaços entre as células do epitélio. Abaixo delas há dois tipos de adesões célula-célula. As **junções aderentes** são sítios de ancoramento para os filamentos de actina; os **desmossomos** são sítios de ancoramento para os filamentos intermediários. Ainda mais abaixo, frequente-

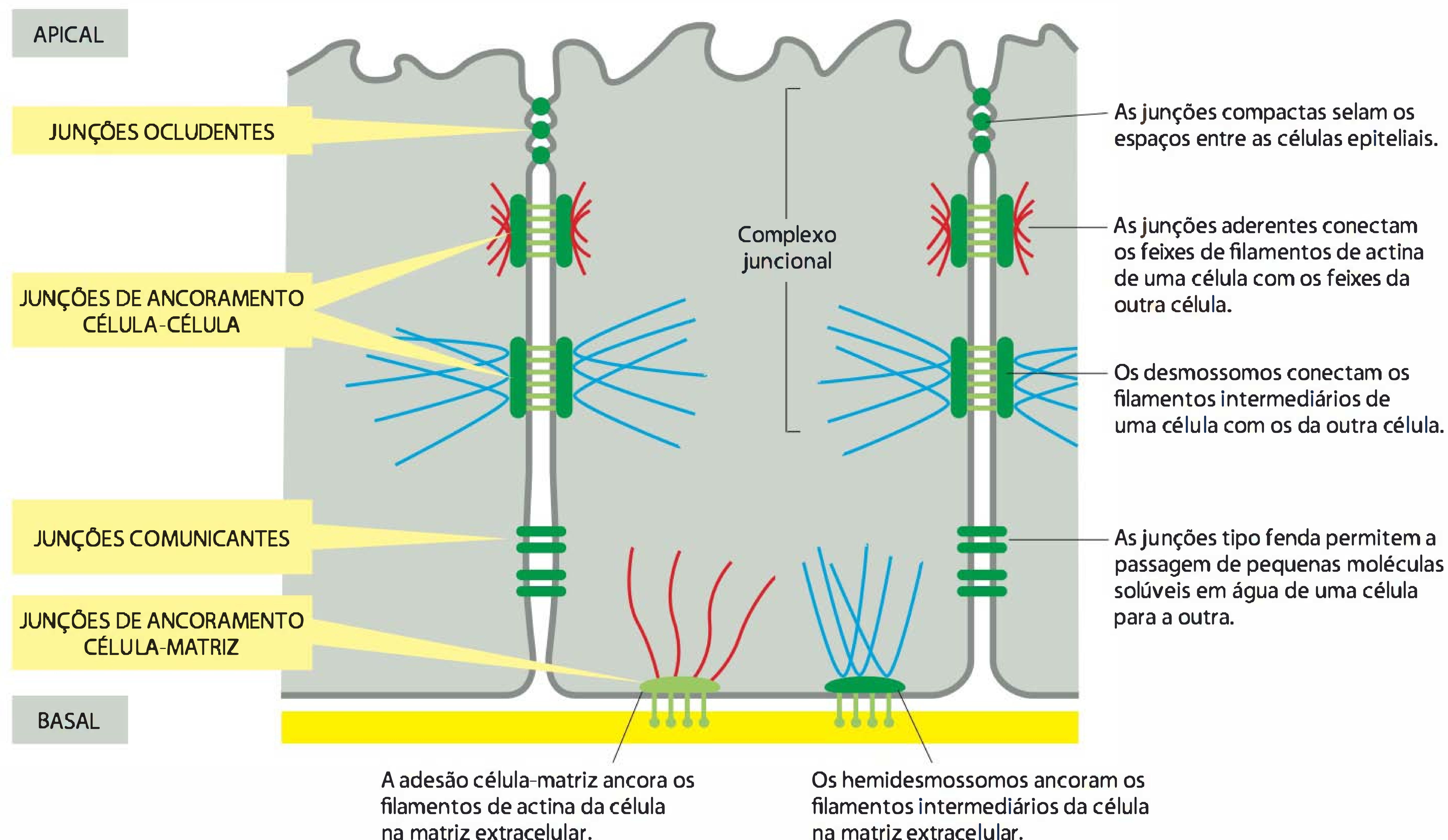


Figura 19-3 Resumo das várias junções celulares encontradas nas células epiteliais dos vertebrados, classificadas de acordo com sua função primária. Na porção mais apical da célula, a posição das junções é a mesma em praticamente todo epitélio de vertebrados. As junções compactas ocupam a porção mais apical, seguidas pelas junções aderentes (cinturão de adesão), e então por uma linha paralela especial de desmossomos. Juntas, estas estruturas são denominadas complexo juncional. As junções tipo fenda e os desmossomos adicionais são menos organizados. O desenho tem como base as células epiteliais do intestino delgado. Junções sinalizadoras especializadas serão discutidas mais adiante neste capítulo.

mente entremeadas com desmossomos adicionais, encontram-se as *junções tipo fenda* que formam canais entre as células.

Uma série adicional de adesões liga as células epiteliais à lâmina basal e será discutida posteriormente. Classificamos essas adesões célula-matriz, assim como as adesões célula-célula, de acordo com suas conexões do citoesqueleto: *adesões célula-matriz ligadas por actina* (indistintas no intestino liso, mas notáveis em outros locais) que ancoram os filamentos de actina à matriz, enquanto os *hemidesmossomos* ancoram os filamentos intermediários à matriz.

Em cada um dos quatro tipos de junções de ancoramento, o papel central é desempenhado pelas **proteínas de adesão transmembrana** que atravessam a membrana, com uma extremidade ligada ao citoesqueleto no interior da célula e a outra extremidade ligando as outras estruturas fora dela (**Figura 19-4**). Essas moléculas transmembrana ligadas ao citoesqueleto classificam-se em duas superfamílias, correspondendo aos dois tipos básicos de ligação externa (**Tabela 19-2**). As proteínas da superfamília das **caderinas** medeiam as ligações célula-célula, e as proteínas da superfamília das **integrinas** medeiam as ligações célula-matriz. Em cada família, ocorrem especializações: algumas caderinas se ligam à actina e formam as junções aderentes, enquanto outras se ligam aos filamentos intermediários

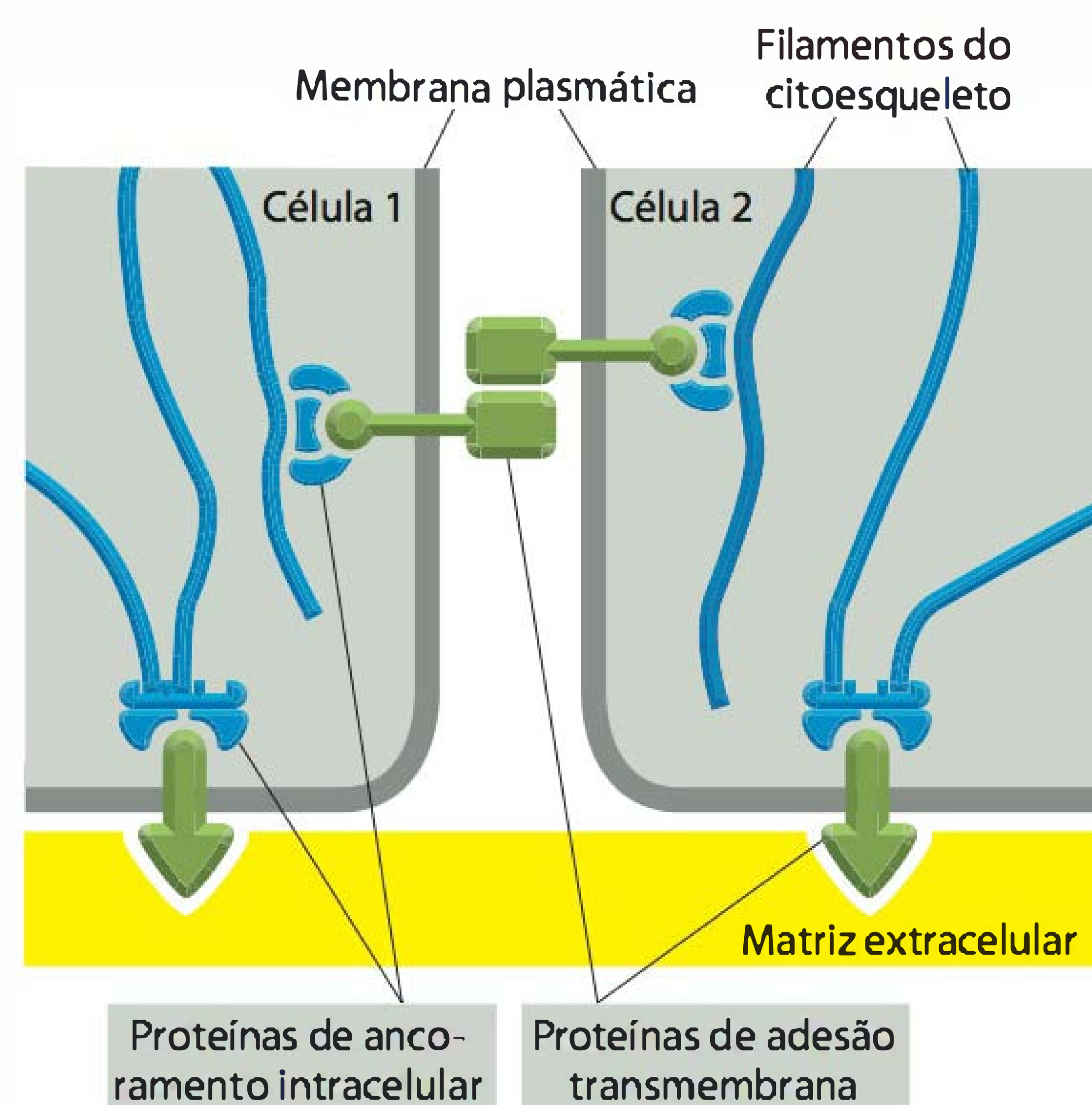


Figura 19-4 Proteínas de adesão transmembrana ligam o citoesqueleto a estruturas extracelulares. A ligação externa pode ser com partes de outra célula (ancoramento célula-célula, mediado por caderinas) ou à matriz extracelular (ancoramento célula-matriz, mediado por integrinas). A ligação interna ao citoesqueleto em geral é indireta, via proteínas de ancoramento intracelular, discutido mais adiante.

Tabela 19-2 Junções de ancoramento

JUNÇÃO	PROTEÍNA DE ADESÃO TRANSMEMBRANA	LIGANTE EXTRACELULAR	LIGAÇÃO AO CITOESQUELETO INTRACELULAR	PROTEÍNA DE ANCORAMENTO INTRACELULAR
Célula-Célula				
Junções aderentes	Caderina (caderina clássica)	Caderina da célula vizinha	Filamentos de actina	α-catenina, β-catenina, placoglobina (γ-catenina), catenina p120, vinculina, α-actinina
Desmossomos	Caderina (desmogleína, desmocolina)	Desmogleína e desmocolina da célula vizinha	Filamentos intermediários	Placoglobina (γ-catenina), placofilina, desmoplaquina
Célula-Matriz				
Adesão célula-matriz ligada à actina	Integrina	Proteínas da matriz extracelular	Filamentos de actina	Talina, vinculina, α-actinina, filamina, paxilina, cinase de adesão focal (FAK)
Hemidesmossomos	Integrina α6β4, colágeno tipo XVII (BP180)	Proteínas da matriz extracelular	Filamentos intermediários	Plectina, distonina (BP230)

e formam os desmossomos. Igualmente, algumas integrinas se ligam à actina e formam as adesões matriz-célula ligadas por actina, enquanto outras se ligam aos filamentos intermediários e formam os hemidesmossomos.

Há algumas exceções a essas regras. Algumas integrinas, por exemplo, medeiam ligações célula-célula ao invés de célula-matriz. Além disso, há outros tipos de moléculas de adesão celular que podem proporcionar uma ligação mais frágil do que as junções de ancoramento, mas suficiente para manter as células unidas em circunstâncias especiais. As adesões célula-célula com base na caderina, entretanto, parecem ser a classe mais importante, e iniciaremos a discussão sobre as adesões célula-célula com elas.

As caderinas fazem a mediação da adesão célula-célula dependente de Ca^{2+} em todos os animais

As caderinas estão presentes em todos os animais multinucleados cujos genomas já foram analisados e em um outro grupo conhecido, os coanoflagelados. Estas criaturas podem existir como um organismo unicelular de vida livre ou como colônias multicelulares, e acredita-se que sejam representativas do grupo dos protistas do qual evoluíram todos os animais. Outros eucariotos, incluindo fungos e plantas, não possuem caderinas, e elas também estão ausentes nas arquibactérias e nas bactérias. Portanto, as caderinas parecem ser uma parte essencial do que é ser um animal.

As caderinas receberam este nome por sua dependência de íons Ca^{2+}: a remoção do Ca^{2+} do meio extracelular causa a perda da adesão mediada pela caderina. Algumas vezes, principalmente nos tecidos embrionários, isso é suficiente para deixar que os tecidos sejam facilmente separados. Em outros casos, um tratamento mais severo é necessário, como a combinação da remoção do Ca^{2+} e a exposição a proteases como a tripsina. As proteases liberam as conexões adicionais mediadas pela matriz extracelular e por outras moléculas de adesão que não dependem de Ca^{2+}. Em todos os casos, quando as células dissociadas são colocadas novamente em meio de cultura normal, em geral elas se unem novamente, reconstruindo suas adesões.

Este tipo de associação célula-célula permitiu o desenvolvimento de um dos primeiros ensaios para a identificação das moléculas de adesão célula-célula. Nestes experimentos, anticorpos monoclonais foram produzidos contra as células de interesse, e cada anticorpo foi testado por sua capacidade de impedir que as células se ligassem novamente após terem sido dissociadas. Os raros anticorpos que se ligaram às moléculas de adesão célula-célula apresentaram esse efeito bloqueador. Esses anticorpos foram então usados para isolar as moléculas de adesão por eles reconhecidas.

Praticamente todas as células dos vertebrados, e provavelmente de outros animais, parecem expressar uma ou mais proteínas da família das caderinas, de acordo com o tipo celular. Várias evidências indicam que elas são as principais moléculas de adesão que mantêm as células unidas nos tecidos embrionários. Por exemplo, os tecidos embrioná-

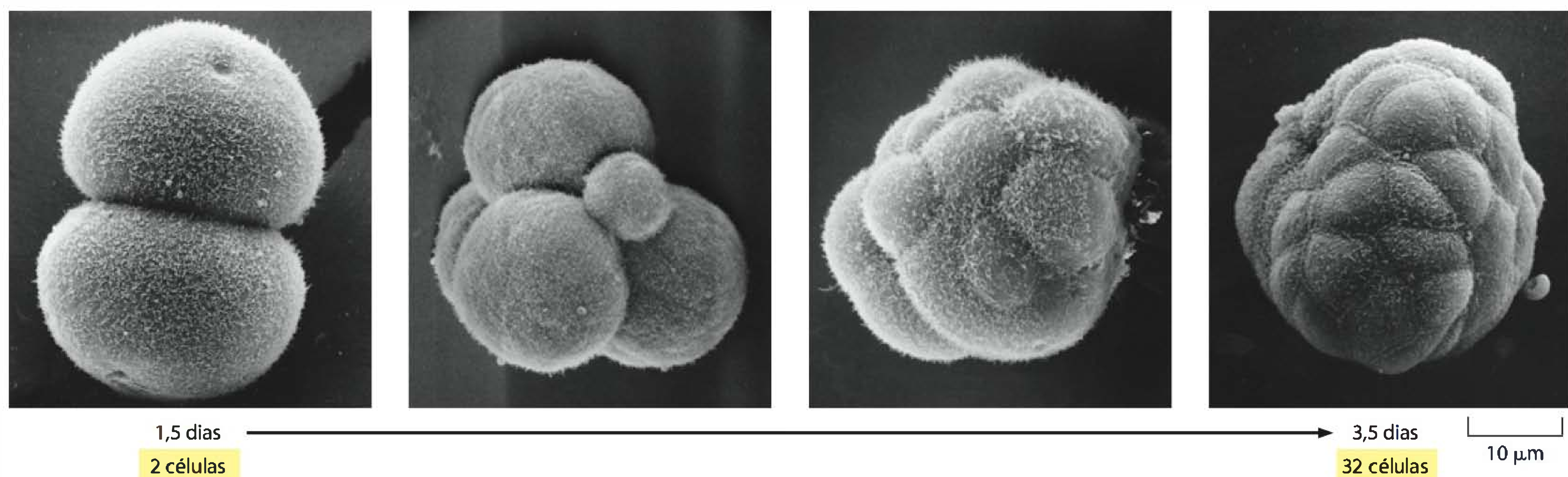


Figura 19-5 Compactação do embrião jovem de camundongo. As células do embrião jovem inicialmente se unem fracamente. Próximo ao estágio de oito células, elas iniciam a expressão de caderina-E e, como resultado, aderem-se fortemente e muito próximas umas às outras. (Micrografia eletrônica de varredura cortesia de Patricia Calarco; o estágio 16-32 células é de P. Calarco e C. J. Epstein, *Dev. Biol.* 32:208-213, 1973. Com permissão da Academic Press.)

rios em cultura se rompem quando tratados com anticorpos anticaderinas e, se a adesão mediada pela caderina se mantém intacta, anticorpos contra outras moléculas de adesão exercem pouco efeito. Estudos sobre o início da embriogênese em camundongos ilustram o papel das caderinas no desenvolvimento. Até o estágio de oito células, as células do embrião de camundongo são frouxamente unidas, permanecendo mais ou menos esféricas e, de repente, em um processo denominado compactação, elas tornam-se fortemente unidas e ligadas por junções célula-célula de modo que a superfície externa do embrião torna-se mais lisa (**Figura 19-5**). Anticorpos contra uma caderina específica, denominada *caderina E*, bloqueiam a compactação, enquanto anticorpos que reagem com várias outras moléculas de superfície celular destas células não têm efeito. Mutações que inativam a função da caderina E levam à dissociação e à morte de embriões de camundongos no início do desenvolvimento.

A superfamília das caderinas nos vertebrados abrange centenas de diferentes proteínas, incluindo muitas com funções de sinalização

As três primeiras caderinas descobertas foram denominadas de acordo com os principais tecidos onde foram encontradas: a *caderina E* está presente em muitos tipos de células epiteliais, a *caderina N* no nervo, no músculo e nas células do cristalino; e a *caderina P* nas células da placenta e da epiderme. Todas também são encontradas em outros tecidos. A caderina N, por exemplo, é expressa em fibroblastos, e a caderina E é expressa em alguns locais do cérebro (**Figura 19-6**). Essas e outras **caderinas clássicas** possuem sequências relacionadas nos seus domínios intra e extracelulares. Todas possuem funções de adesão bem-definidas e também são importantes na sinalização. Por meio de seus domínios intracelulares, veremos mais adiante que elas transmitem informações para o interior da célula, permitindo que a célula adapte seu comportamento conforme ela tenha se ligado ou dissociado de outras células.

Há também um grande número de **caderinas não-clássicas** com sequências mais distintas, sendo que mais de 50 são expressas no cérebro. As caderinas não-clássicas incluem proteínas com funções de adesão, como as várias *protocaderinas* encontradas no cérebro e as *desmocolinas* e *desmogleínas* que formam as junções dos desmossomos. Elas também incluem proteínas que parecem ter funções de sinalização, como a *caderina T*, que não possui domínio transmembrana e é ligada à membrana plasmática das células do nervo e do

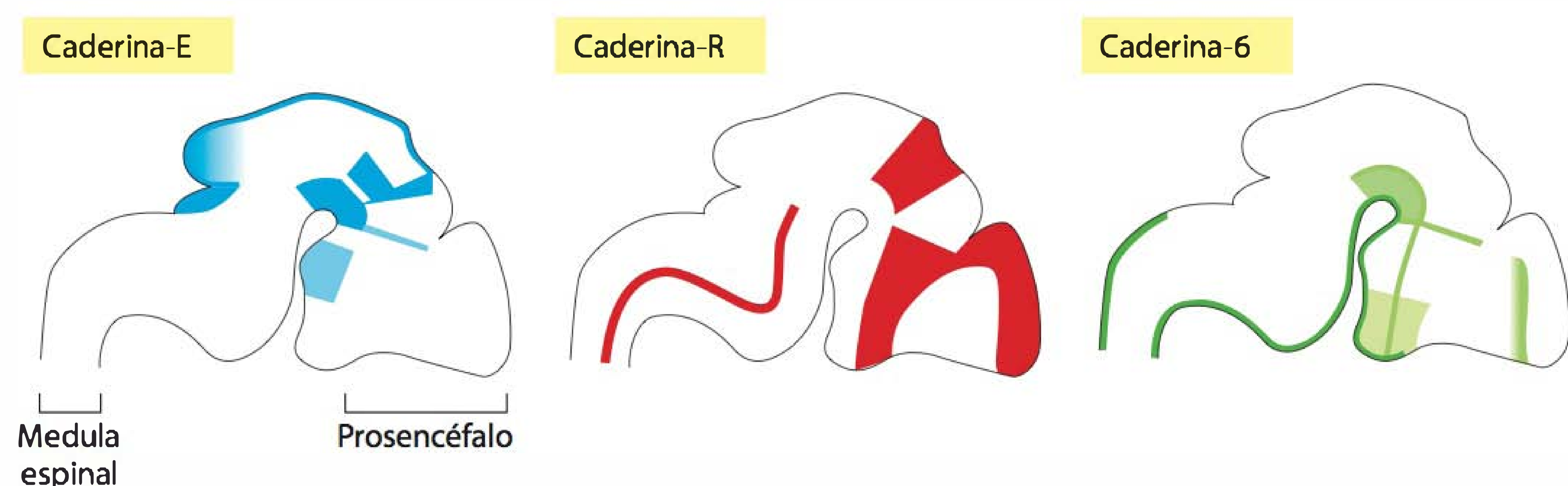


Figura 19-6 Diversidade das caderinas no sistema nervoso central. O diagrama apresenta o padrão de expressão de três caderinas clássicas diferentes no cérebro do embrião de camundongo. Mais de 70 caderinas, clássicas e não-clássicas, também são expressas no cérebro em padrões complexos, e acredita-se que elas desempenhem uma função de guiar e manter a organização desse órgão complexo.

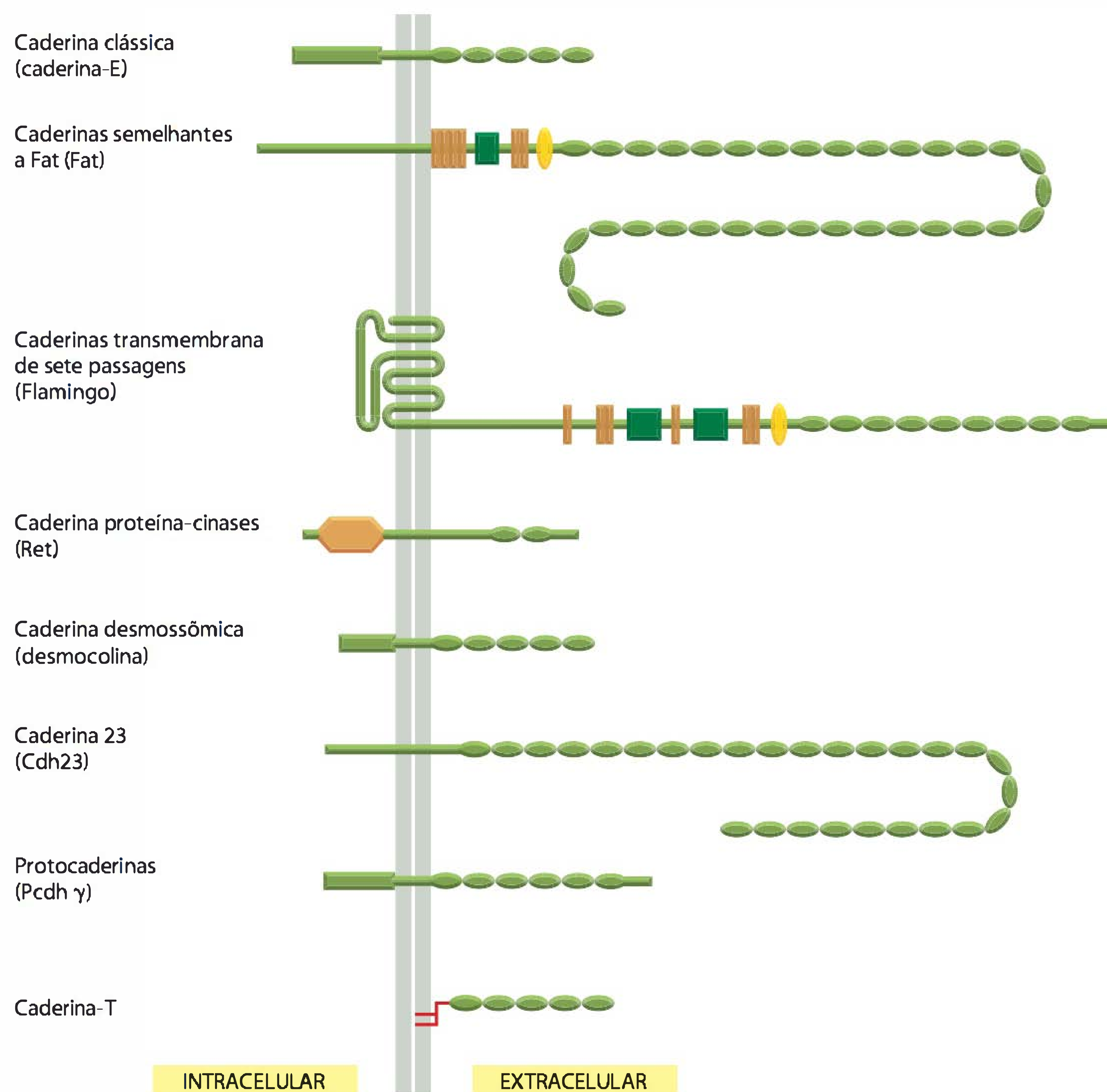


Figura 19-7 A superfamília das caderinas. O diagrama apresenta a diversidade entre os membros da superfamília das caderinas. Todas essas proteínas possuem uma porção extracelular contendo múltiplas cópias dos motivos dos domínios das caderinas (*ovais verdes*), mas suas porções intracelulares são mais variadas, refletindo suas interações com uma ampla variedade de ligantes intracelulares, incluindo moléculas sinalizadoras, bem como componentes que ancoram as caderinas ao citoesqueleto. Os motivos de cores diferentes em Fat, Flamingo e Ret representam domínios conservados também encontrados em outras famílias de proteínas.

músculo pelo ancoramento do glicosilfosfatidilinositol (GPI), e às proteínas *Fat* e *Flamingo,* inicialmente identificadas como produtos de genes de *Drosophila,* que regulam, respectivamente, o crescimento epitelial e a polaridade celular. Juntas, as caderinas clássica e não-clássica formam a **superfamília das caderinas** (**Figura 19-7** e **Tabela 19-3**), com mais de 180 membros em humanos. Como as estruturas dessas proteínas se relacionam a suas funções e por que existem tantas dessas proteínas?

As caderinas fazem a mediação da adesão homofílica

Normalmente, as junções de ancoramento entre as células são surpreendentemente simétricas. Por exemplo, se a ligação é com a actina na célula de um lado da junção, será com a actina na célula do outro lado da junção. De fato, a ligação entre as caderinas é **homofílica** (igual a igual, **Figura 19-8**): as moléculas de caderina de um subtipo específico de uma célula se ligam a moléculas de caderina – do mesmo subtipo ou de um subtipo muito semelhante na célula adjacente. De acordo com o modelo atual, a ligação ocorre nas extremidades N-terminais das moléculas de caderina, as regiões que se encontram mais distantes da membrana. Ali, a cadeia proteica forma um botão terminal e uma bolsa próxima a ele e as moléculas de caderinas que se projetam da membrana da célula oposta se ligam, inserindo o botão uma na bolsa da outra (**Figura 19-9**A).

O espaçamento entre as membranas celulares nas junções de ancoramento é precisamente definido e depende da estrutura das moléculas de caderina que participam da junção. Todos os membros da superfamília, por definição, possuem uma porção extracelular que consiste em várias cópias de um motivo chamado de *domínio de caderina*. Nas caderinas clássicas de vertebrados, existem cinco dessas repetições, e nas desmogleínas e desmocolinas existem 4 ou 5, mas algumas caderinas não-clássicas possuem mais de 30. Cada domínio de caderina forma uma unidade mais ou menos rígida, ligada ao próximo domínio de caderina por uma dobradiça (Figura 19-9B). Íons Ca^{2+} se ligam aos sítios, próximo a cada dobradiça, impedindo sua flexão, de modo que toda a série de domínios de caderina comporta-se como um bastão levemente curvo e rígido. Quando o Ca^{2+} é removido, as dobradiças podem

Tabela 19-3 Alguns membros da superfamília das caderinas

NOME	PRINCIPAL LOCALIZAÇÃO	ASSOCIAÇÃO COM JUNÇÃO	FENÓTIPO QUANDO INATIVADO EM CAMUNDONGOS
Caderinas clássicas			
Caderina-E	Muitos epitélios	Junções aderentes	Morte em estágio de blastocisto; embriões não fazem compactação
Caderina-N	Neurônios, coração, músculo esquelético, lente e fibroblastos	Junções aderentes e sinapses químicas	Embriões morrem por defeitos cardíacos
Caderina-P	Placenta, epiderme e epitélio da mama	Junções aderentes	Desenvolvimento anormal da glândula mamária
Caderina-VE	Células endoteliais	Junções aderentes	Desenvolvimento vascular anormal (apoptose de células endoteliais)
Caderinas não-clássicas			
Desmocolina	Pele	Desmossomos	Bolhas na pele
Desmogleína	Pele	Desmossomos	Doença de bolhas na pele devido à perda da adesão célula-célula dos queratinócitos
Caderina-T	Neurônios, músculo e coração	Nenhuma	Desconhecido
Caderina 23	Ouvido interno e outros epitélios	Ligação entre os estereocílios e as células pilosas sensoriais	Surdez
Fat (em *Drosophila*)	Epitélio e sistema nervoso central	Junção sinalizadora (polaridade planar celular)	Discos marginais aumentados e tumores, rompimento da polaridade planar celular
Fat 1 (em mamíferos)	Vários epitélios e sistema nervoso central	Fenda do diafragma no glomérulo renal e outras junções celulares	Perda da fenda do diafragma; mal formação do prosencéfalo e dos olhos
Protocaderinas α, β e γ	Neurônios	Sinapses químicas e outras membranas não-sinápticas	Degeneração neuronal
Flamingo	Epitélios sensorial e outros	Junções célula-célula	Rompimento da polaridade planar celular e defeitos no tubo neural

flexionar, e a estrutura torna-se flexível. Ao mesmo tempo, acredita-se que a conformação na porção N-terminal mude levemente, enfraquecendo a afinidade de ligação com a molécula de caderina da célula oposta. As moléculas de caderina desestabilizadas dessa maneira pela perda do Ca^{2+} são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas.

Diferentemente dos receptores para moléculas solúveis, os quais se ligam aos seus ligantes com alta afinidade, as caderinas (e a maioria das proteínas de adesão célula-célula) ligam-se tipicamente a seus parceiros com afinidade relativamente baixa. Uma forte ligação resulta da formação de muitas dessas ligações fracas em paralelo. Quando ligadas a padrões de orientação opostos na outra célula, as moléculas de caderina frequentemente agregam-se lado a lado com muitas outras moléculas de caderina da mesma célula. Muitas moléculas de caderina agrupadas dessa maneira, lado a lado, colaboram para formar as junções de ancoramento (Figura 19-9C). A força dessa junção é muito maior do que aquela das pontes intermoleculares individuais e, mesmo assim, pode ser facilmente rompida pela separação sequencial das moléculas, assim como duas peças de tecidos podem ser fortemente unidas por velcro e ser facilmente separadas. Um "princípio similar ao velcro" também atua nas adesões célula-célula e célula-matriz formadas por outros tipos de proteínas de adesão

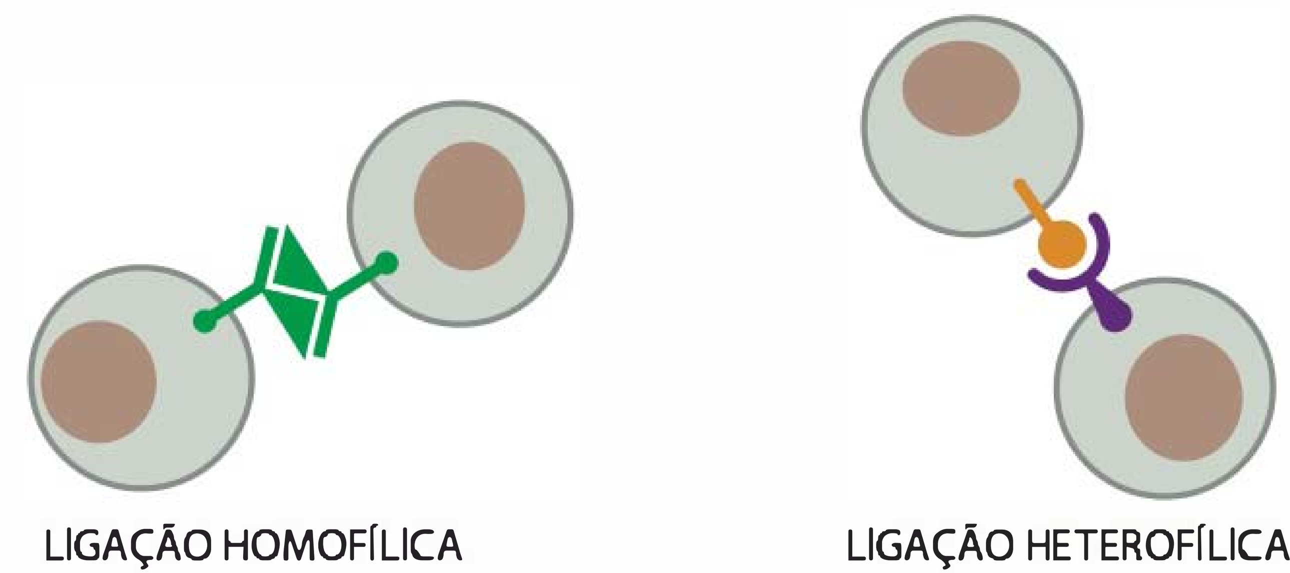


Figura 19-8 Ligação homofílica *versus* heterofílica. As caderinas, em geral, fazem ligações homofílicas. Outras moléculas de adesão se ligam heterofilicamente, como discutido mais adiante.

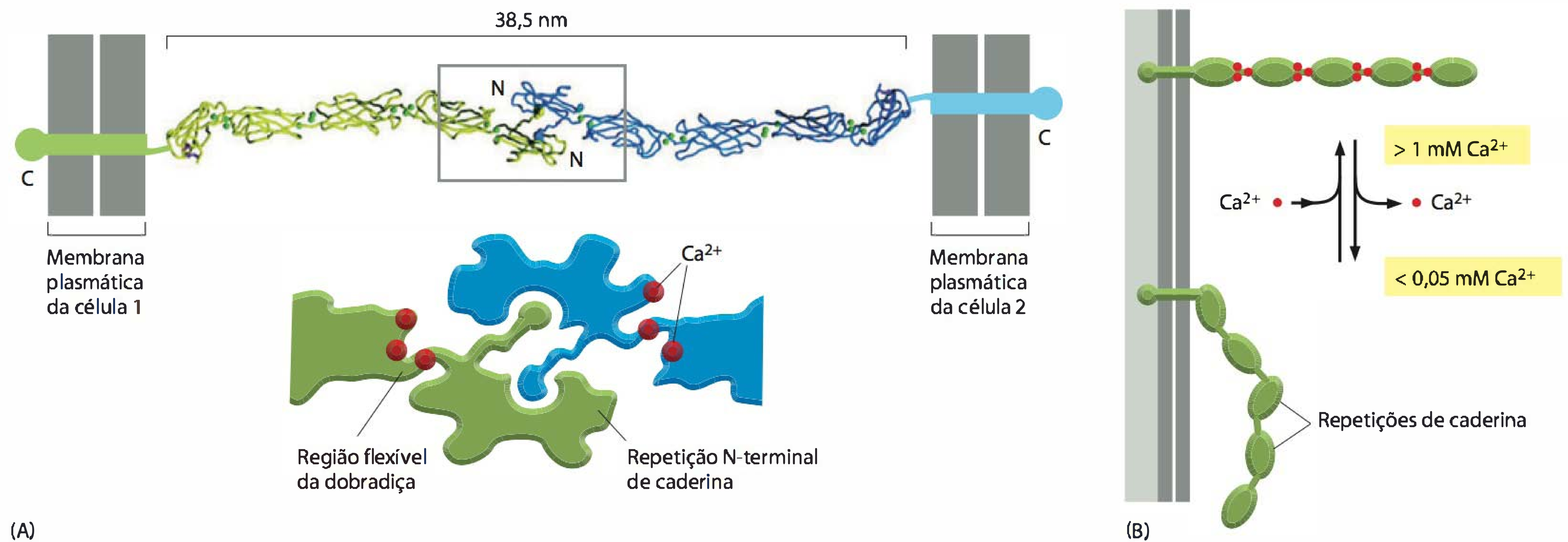


Figura 19-9 Estrutura e função da caderina. (A) O domínio extracelular de uma caderina clássica (caderina-C) está representado, ilustrando como tais moléculas em células opostas se ligam homofilicamente por suas extremidades. A estrutura foi determinada por difração de raios X do domínio extracelular cristalizado da caderina-C. (B) A porção extracelular de cada polipeptídeo consiste em uma série de domínios compactos denominados repetições de caderinas, unidos por regiões de dobradiça flexíveis. O Ca^{2+} se liga nas vizinhanças de cada dobradiça, impedindo sua flexão. Na ausência de Ca^{2+}, a molécula torna-se flexível e não adere. (C) Em uma junção típica, muitas moléculas de caderina são arranjadas em paralelo, atuando como um velcro para manter as células unidas. Acredita-se que as caderinas da mesma célula liguem-se por interações lado a lado entre as regiões das cabeças N-terminais e por ligações de suas caudas intracelulares a uma rede de proteínas (não apresentado). (Com base em T. J. Boggon et. al, *Science* 296:1308-1313, 2002. Com permissão da AAAS).

transmembrana. A ligação e a separação das junções de ancoramento desempenham um papel vital no desenvolvimento e na constante regeneração dos tecidos de muitas regiões do corpo.

Adesões seletivas célula-célula permitem que as células dissociadas dos vertebrados reunam-se em tecidos organizados

As caderinas formam ligações homofílicas específicas e isso explica por que há tantos membros diferentes na família. As caderinas não são como colas que tornam a superfície das células pegajosas, ao contrário, elas medeiam um reconhecimento altamente seletivo, permitindo que as células de tipos similares mantenham-se unidas e segregadas de outros tipos celulares.

Esta seletividade na forma com que as células animais se associam umas às outras foi demonstrada há mais de 50 anos, muito antes da descoberta das caderinas, em experimentos nos quais embriões de anfíbios foram dissociados em células individuais. Essas células foram então misturadas e puderam se reassociar. Extraordinariamente, as células dissociadas frequentemente se reassociavam *in vitro* em estruturas que se assemelhavam ao embrião original (**Figura 19-10**). O mesmo fenômeno ocorria quando as células dissociadas de

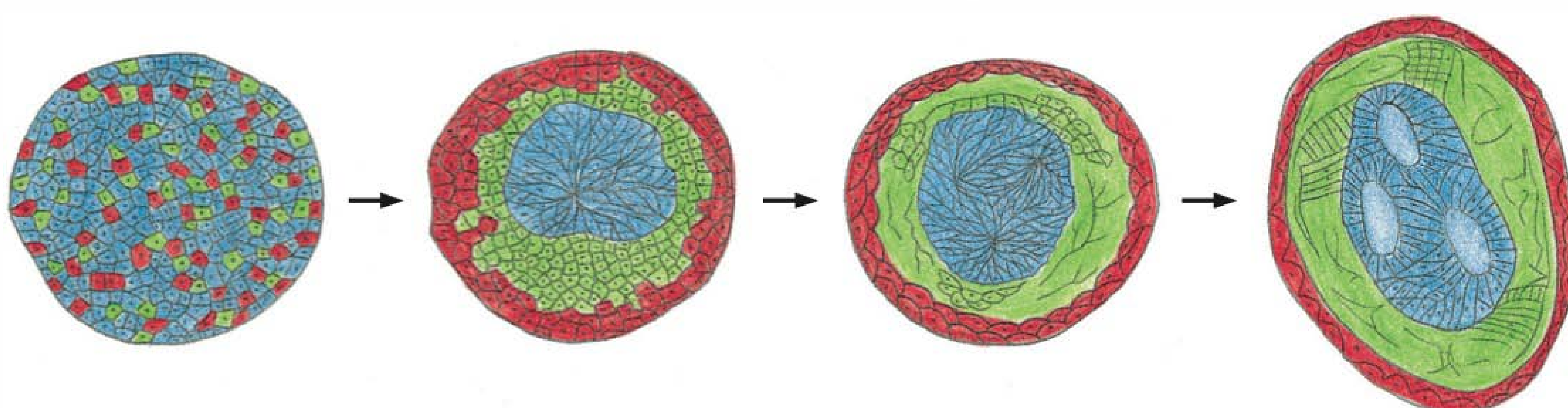


Figura 19-10 Organização celular. Células de diferentes partes do embrião inicial de um anfíbio se organizarão de ocordo com sua origem. Neste experimento clássico apresentado aqui, as células do mesoderma (*verde*), as células da placa neural (*azul*) e as células da epiderme (*vermelho*) foram desagregadas e então agregadas ao acaso. Elas se organizam de maneira similar a um embrião normal, com o "tubo neural" internamente, a epiderme externamente e o mesoderma entre eles. (Modificada de P. L. Townes e J. Holtfreter, *J. Exp. Zool.* 128:53-120, 1955. Com permissão de Wiley-Liss.)

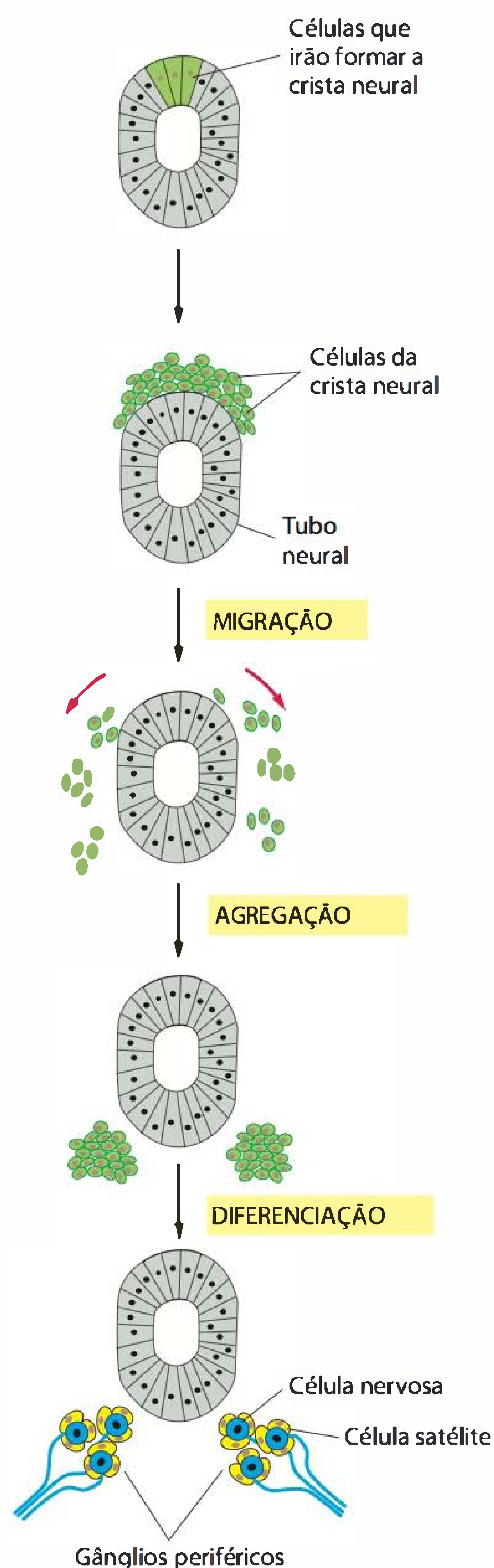


Figura 19-11 Dispersão seletiva e reunião das células para formar os tecidos em um embrião de vertebrado. Algumas células que são inicialmente parte do epitélio do tubo neural alteram suas propriedades de adesão e descolam-se do epitélio para formar a crista neural na superfície superior do tubo neural. As células então migram e formam vários tipos celulares e tecidos do embrião. Aqui estão representadas a reunião e a diferenciação para formar dois agrupamentos de células nervosas, denominados gânglios, no sistema nervoso periférico. Enquanto algumas células da crista neural se diferenciam no gânglio e tornam-se neurônios, outras tornam-se células satélites (células gliais de sustentação) ao redor de neurônios. A mudança no padrão de expressão de moléculas de adesão celular é responsável portoda essa reorganização da arquitetura.

dois órgãos embrionários de vertebrado, como o fígado e a retina, eram misturadas e formavam um precipitado artificialmente. Os agregados gradualmente se organizavam de acordo com seu órgão de origem. Genericamente, as células desagregadas aderem mais facilmente a agregados do seu próprio órgão do que a agregados de outros órgãos. Evidentemente, existe um sistema de reconhecimento célula-célula que faz as células de um mesmo tecido diferenciado preferencialmente se aderirem umas às outras.

Estas observações sugeriram que a arquitetura dos tecidos animais não é apenas um produto da história, mas é ativamente organizada e mantida por um sistema de afinidades que as células possuem umas com as outras e com a matriz extracelular. No embrião em desenvolvimento, podemos ainda observar as células durante sua diferenciação e ver como elas se movem e se reagrupam para formar novas estruturas guiadas por adesão seletiva. Alguns desses movimentos são sutis, outros mais abrangentes envolvendo grandes distâncias de migração, como descreveremos no Capítulo 22. Nos embriões de vertebrados, por exemplo, as células da *crista neural* se separam do epitélio do tubo neural, do qual inicialmente faziam parte, e migram por vias específicas para diversas regiões. Ali elas agregam-se a outras células e umas às outras para formar vários tecidos, incluindo aqueles do sistema nervoso periférico (**Figura 19-11**). As células dependem dos tecidos embrionários para guiá-las em seu caminho. Isto pode envolver *quimiotaxia* ou *quimiorrepulsão*, isto é, o movimento sob a influência de químicos solúveis que atraem ou repelem as células migratórias. Pode também envolver a *orientação por contato*, na qual as células migratórias fazem contato com outras células ou com componentes da matriz extracelular, fazendo adesões transitórias que orientam seu caminho. Assim, uma vez que tenham atingido seu destino, as células migratórias devem reconhecer e se ligar a outras células do tipo adequado, formando o tecido. Em todos estes processos, na orientação por contato e na formação dos tecidos, as caderinas desempenham um papel fundamental.

As caderinas controlam a organização seletiva das células

O aparecimento e o desaparecimento das caderinas específicas correlacionam-se às etapas do desenvolvimento embrionário onde as células se reagrupam e mudam seus contatos criando novas estruturas de tecidos. Quando se forma o tubo neural e libera-se do ectoderma, as células do tubo neural perdem a caderina E e adquirem outras caderinas, incluindo a caderina N, enquanto que as células do ectoderma continuam expressando a caderina E (**Figura 19-12**A). Quando as células da crista neural migram para fora do tubo neural, essas caderinas tornam-se fracamente detectáveis, e outras caderinas (caderina-7) parecem auxiliar a manter as células migratórias unidas como um grupo de células frouxamente associadas (Figura 19-12C). Finalmente, quando as células agregam para formar um gânglio, elas voltam a expressar a caderina N (ver Figura 19-11). A superexpressão da caderina N nas células da crista neural emergentes impede que as células deixem o tubo neural.

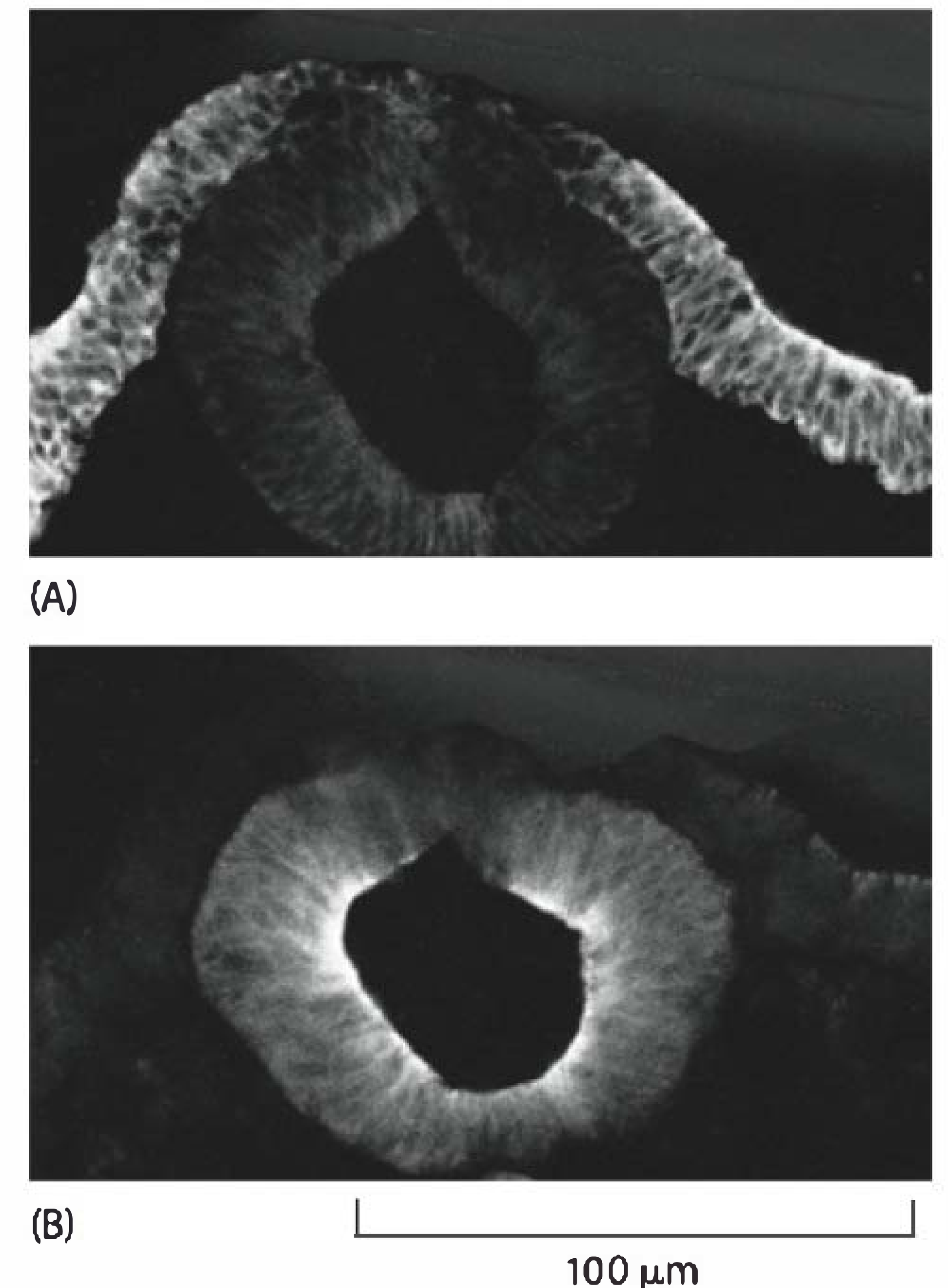
Estudos com células em cultura apoiam a sugestão de que as ligações homofílicas das caderinas controlam os processos de segregação de tecidos. Em uma linhagem de fibroblastos denominados *células L*, não há expressão de caderinas e, portanto, as células não se unem umas às outras. Quando as células L são transfectadas com o DNA que codifica a caderina E, as células tornam-se aderentes umas às outras, e a adesão é inibida por anticorpos anticaderina E. As células transfectadas não se ligam às células não-transfectadas, o que

indica que a união é dependente das caderinas E de uma célula se liguem às caderinas E da outra célula. Se as células L que expressam diferentes caderinas são misturadas, elas se separam e agregam indicando que diferentes caderinas ligam-se preferencialmente a caderinas de seu tipo (**Figura 19-13**A), mimetizando o que acontece quando as células derivadas de tecidos que expressam diferentes caderinas são misturadas. Uma segregação celular similar ocorre se as células L expressando diferentes quantidades da mesma caderina são misturadas (Figura 19-13B). Portanto parece provável que as diferenças quantitativas e qualitativas na expressão das caderinas atuam na organização dos tecidos.

Twist regula as transições epitélio-mesenquimais

A reunião das células em um epitélio é um processo reversível. Pela alteração da expressão das moléculas de adesão, as células isoladas e dispersas, frequentemente denominadas *células mesenquimais*, podem unir-se para formar o epitélio. Por outro lado, as células epiteliais podem mudar suas características, dissociarem-se e migrar para fora do tecido epitelial original como células individuais. Tais *transições epitélio-mesequimais* desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário normal. A origem da crista neural é um exemplo (ver Figura 19-11). Um sistema de controle envolvendo uma série de genes reguladores denominados Slug, Snail e Twist com a caderina E como componente anterior parece ser crítico para tais transições. Em vários tecidos, tanto em moscas quanto em vertebrados, a expressão de Twist, por exemplo, converte o caráter das células epiteliais para mesenquimais, e a inibição de sua expressão faz o contrário.

Transições epitélio-mesequimais também ocorrem em eventos patológicos durante a vida adulta, no câncer. Em sua maioria os cânceres se originam no epitélio, mas tornam-se perigosamente suscetíveis a se espalharem, isto é, tornarem-se *malignos*, somente quando as células cancerosas escapam do epitélio de origem e invadem outros tecidos. Experimentos com células de câncer de mama malignas em cultura mostraram que o bloqueio do Twist pode convertê-las para o caráter não-maligno. Por outro lado, a expressão forçada do Twist pode fazer com que células epiteliais normais sofram a transição epitélio-mesequimal e comportem-se como células malignas. O Twist exerce seus efeitos, pelo menos em parte, pela inibição da expressão das caderinas que mantêm as células epiteliais unidas. A caderina E, principalmente, é um alvo. Mutações que rompem a produção ou a função da caderina E são, de fato, frequentemente encontradas em células cancerosas e acredita-se que auxiliem a torná-las malignas, como veremos no Capítulo 20.



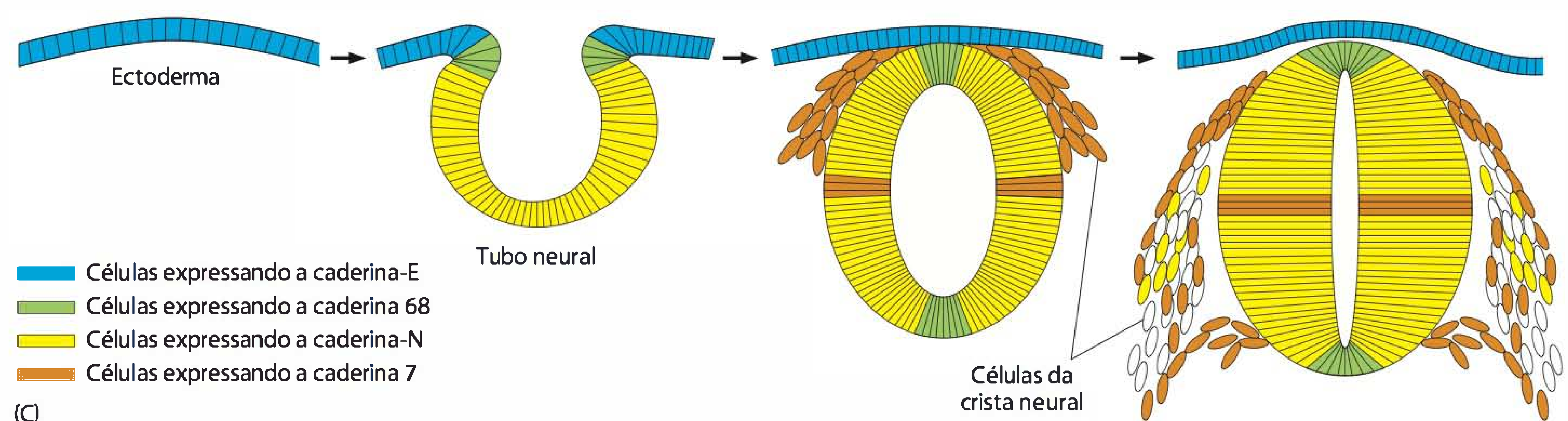


Figura 19-12 Mudança no padrão de expressão de caderinas durante a formação do sistema nervoso. A figura mostra um corte transversal do embrião inicial de galinha quando o tubo neural se separa do ectoderma e então as células da crista neural se separam do tubo neural. (A, B) Micrografia de imunofluorescência mostrando o desenvolvimento do tubo neural marcado com anticorpos contra (A) caderina-E e (B) caderina-N. (C) Com a mudança no padrão de expressão gênica, os diferentes grupos de células segregam-se de acordo com as caderinas que expressam. (Micrografia cortesia de Kohei Hatta e Masatoshi Takeichi.)

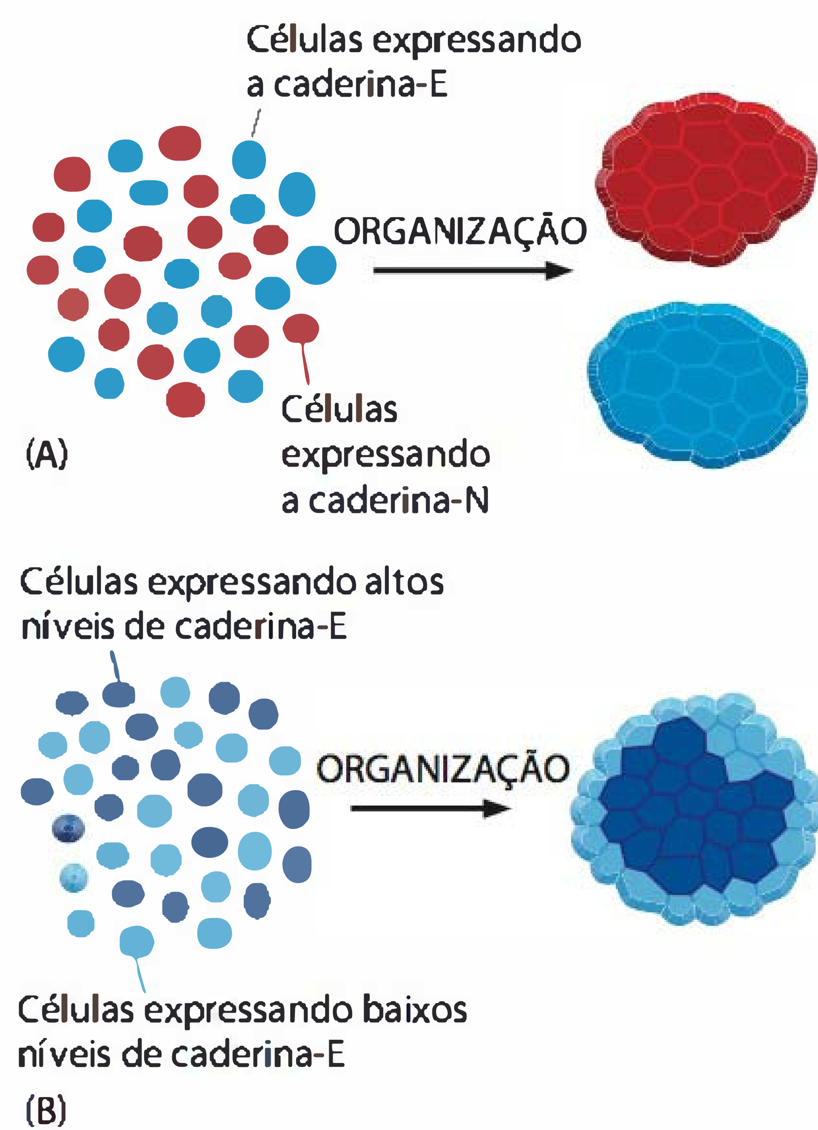


Figura 19-13 Separação celular dependente de caderina. As células em cultura podem se organizar de acordo com seu tipo e os níveis de caderinas que expressam. Isto pode ser visto pela marcação de diferentes populações de células com corantes de cores distintas. (A) As células que expressam a caderina-N separam-se das células que expressam a caderina-E. (B) As células que expressam altos níveis de caderina-E separam-se das células que expressam baixos níveis de caderina-E.

As cateninas ligam as caderinas clássicas ao citoesqueleto de actina

Os domínios extracelulares das caderinas fazem a mediação das ligações homofílicas. Os domínios intracelulares das caderinas típicas, incluindo todas as clássicas e algumas não-clássicas, proporcionam um ancoramento para os filamentos do citoesqueleto: o ancoramento da actina às junções aderentes e aos filamentos intermediários nos desmossomos, como mencionado anteriormente (ver Figura 19-3). A ligação ao citoesqueleto é indireta e depende de um grupo de *proteínas de ancoramento intracelular* que se reúnem na cauda da caderina. Esta ligação, conectando os membros da família das caderinas à actina ou aos filamentos intermediários, inclui vários componentes diferentes (**Figura 19-14**). Esses componentes variam de acordo com o tipo de ancoramento, mas em geral um papel central é desempenhado pela *β-catenina* e/ou sua semelhante, a *γ-catenina* (*placoglobina*).

Nas junções aderentes, um parente remoto deste par de proteínas, a *p120-catenina*, também está presente e auxilia a regular a reunião de todo o complexo. Quando a p120-catenina é artificialmente inibida, as proteínas caderinas são rapidamente degradadas, e a adesão célula-célula é perdida. O aumento artificial dos níveis de p120-catenina tem efeito oposto. É possível que células usem mudanças nos níveis da expressão da p120-catenina ou na sua fosforilação como uma maneira de regular sua força de adesão. Em qualquer um dos casos, parece que a ligação à actina é essencial para a eficiente adesão célula-célula, pois as caderinas clássicas que não possuem seus domínios citoplasmáticos não podem manter as células fortemente unidas.

As junções aderentes coordenam a mobilidade entre células adjacentes com base na actina

As junções aderentes são parte essencial da maquinaria de modelagem da forma das estruturas dos organismos multicelulares do corpo de um animal. A ligação indireta dos filamentos de actina de uma célula com as células vizinhas permite que as células dos tecidos usem seu citoesqueleto de actina de maneira coordenada.

As junções aderentes ocorrem de várias formas. Em muitos tecidos não-epiteliais, elas se apresentam na forma de pequenos pontos ou linhas que indiretamente conectam os filamentos de actina cortical, abaixo da membrana plasmática entre duas células vizinhas. No músculo cardíaco (discutido no Capítulo 23), elas ancoram os feixes de actina do aparelho contrátil e atuam em paralelo com os desmossomos para conectar as células contráteis de ponta a ponta. (As interfaces célula-célula no músculo onde ocorrem essas adesões são tão evidentes que são observadas claramente em cortes corados em microscopia de luz direta como os denominados *discos intercalares*.) O modelo de junções aderentes ocorre no epitélio onde elas frequentemente formam um **cinto de adesão** contínuo (ou *zona aderente*) logo abaixo da face apical do epitélio, circundando cada célula da camada (**Figura 19-15**). Em cada célula, um feixe contrátil de filamentos de actina permanece adjacente ao cinto de adesão, orientado paralelamente à membrana plasmática e preso a ela pelas caderinas e suas proteínas de ancoramento intracelular associadas. Os feixes de actina são ligados através das caderinas e proteínas de ancoramento em uma extensa rede transcelular. Essa rede pode contrair-se com o auxílio de proteínas motoras como a miosina (discutida no Capítulo 16), e acredita-se que auxilie o processo fundamental da morfogênese animal, o dobramento das camadas epiteliais em tubos, vesículas e outras estruturas relacionadas (**Figura 19-16**).

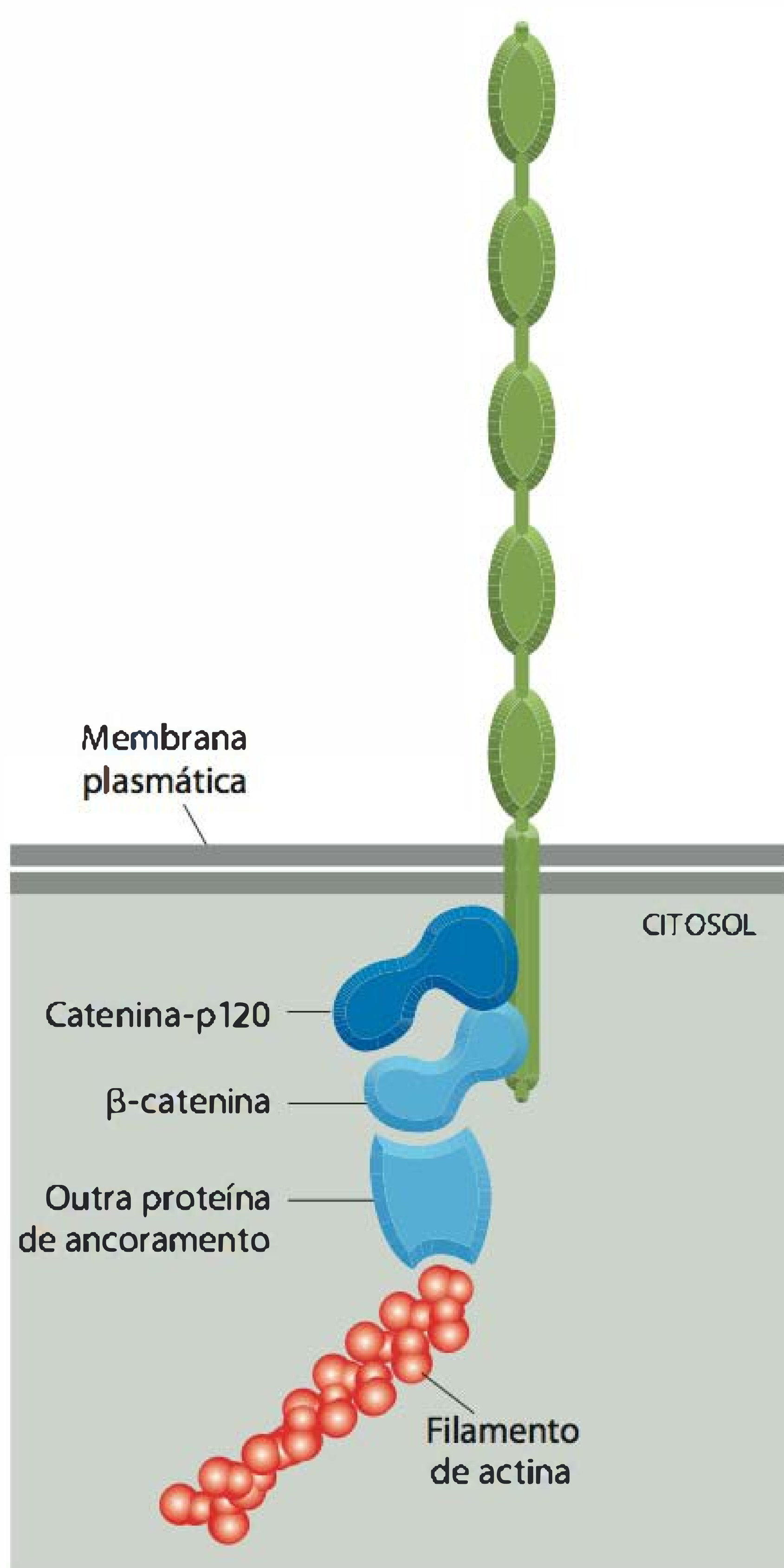


Figura 19-14 A ligação das caderinas clássicas aos filamentos de actina. As caderinas são ligadas indiretamente aos filamentos de actina pelas β-cateninas e por outras proteínas de ancoramento. A α-catenina, a vinculina e a placoglobina (relacionada à β-catenina, também denominada γ-catenina) provavelmente também estejam presentes na ligação envolvida no controle desta reunião, mas os detalhes do ancoramento ainda não são muito bem entendidos. Uma terceira proteína intracelular, denominada catenina-p120, também liga-se à cauda citoplasmática da caderina e regula sua função. A β-catenina tem uma segunda função importante na sinalização intracelular, como visto no Capítulo 15 (ver Figura 15-77).

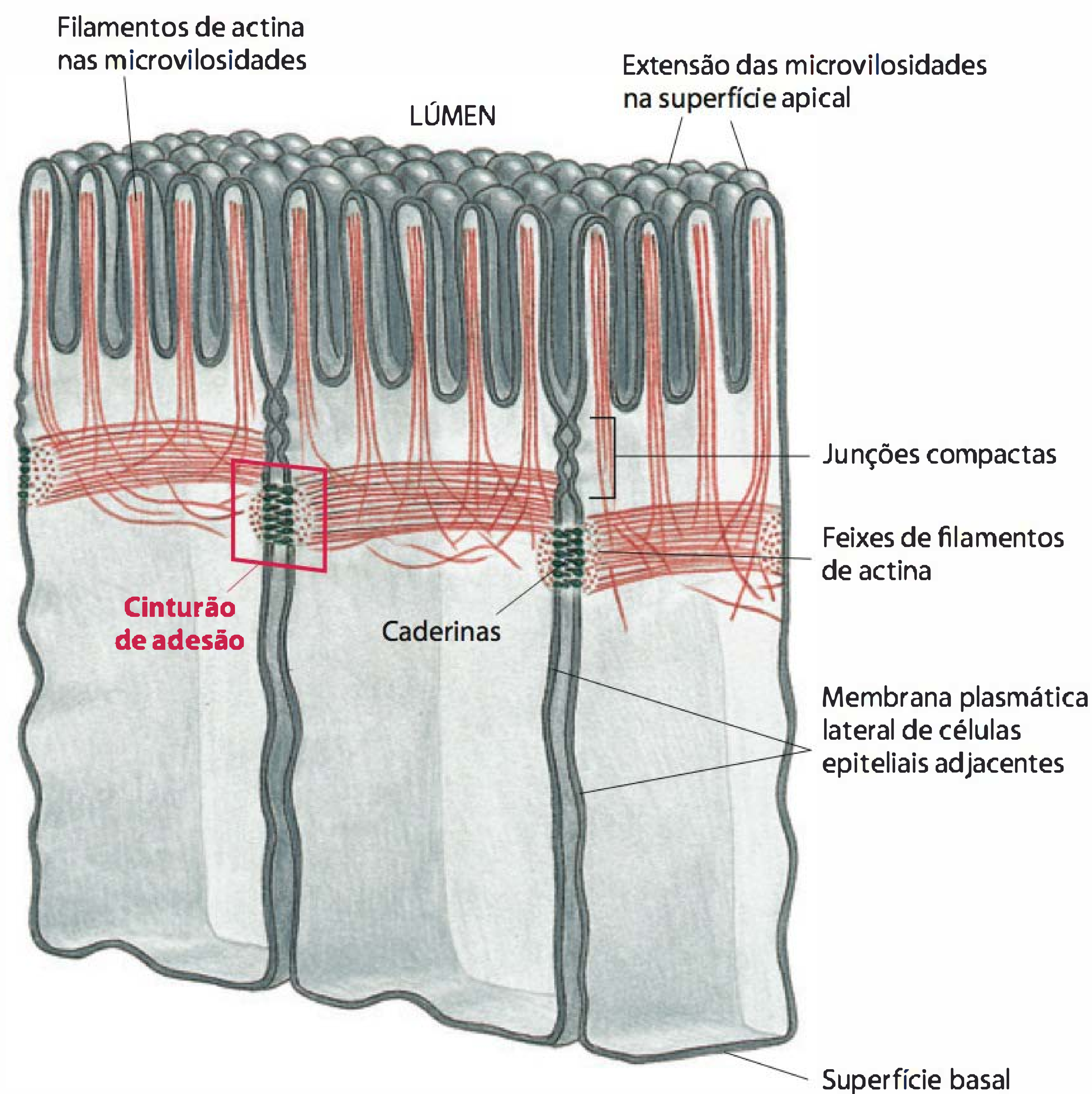


Figura 19-15 Junções aderentes entre células epiteliais do intestino delgado. Essas células são especializadas na absorção de nutrientes. No seu ápice, voltado para o lúmen do intestino, elas possuem muitas microvilosidades (protusões que servem para aumentar a superfície da área de absorção). As junções aderentes tomam a forma de um *cinturão de adesão*, circulando cada uma das células. Sua característica mais óbvia é o feixe contrátil de actina, localizado na superfície citoplasmática da membrana plasmática juncional. Os feixes de filamentos de actina são fixados por proteínas de ancoramento intracelular às caderinas. As caderinas atravessam a membrana plasmática, e seus domínios extracelulares se ligam homofilicamente às caderinas das células adjacentes. Dessa maneira, os feixes de filamentos de actina das células adjacentes são unidos.

Os desmossomos proporcionam a força mecânica ao epitélio

Os desmossomos são estruturalmente similares às junções aderentes, mas ligam os filamentos intermediários ao invés da actina. Sua principal função é proporcionar força mecânica. Os desmossomos são importantes nos vertebrados, mas não são encontrados, por exemplo, em *Drosophila*. Eles estão presentes na maioria do epitélio de vertebrados maduros e são abundantes na epiderme, o epitélio que forma a camada externa da pele; uma fonte preferida para estudos bioquímicos é a epiderme do focinho do gado, o qual deve suportar danos constantes quando o animal pasta.

A **Figura 19-17**A apresenta a estrutura geral de um desmossomo, e a Figura 19-17B apresenta algumas de suas proteínas. Os desmossomos aparecem como pontos de contato

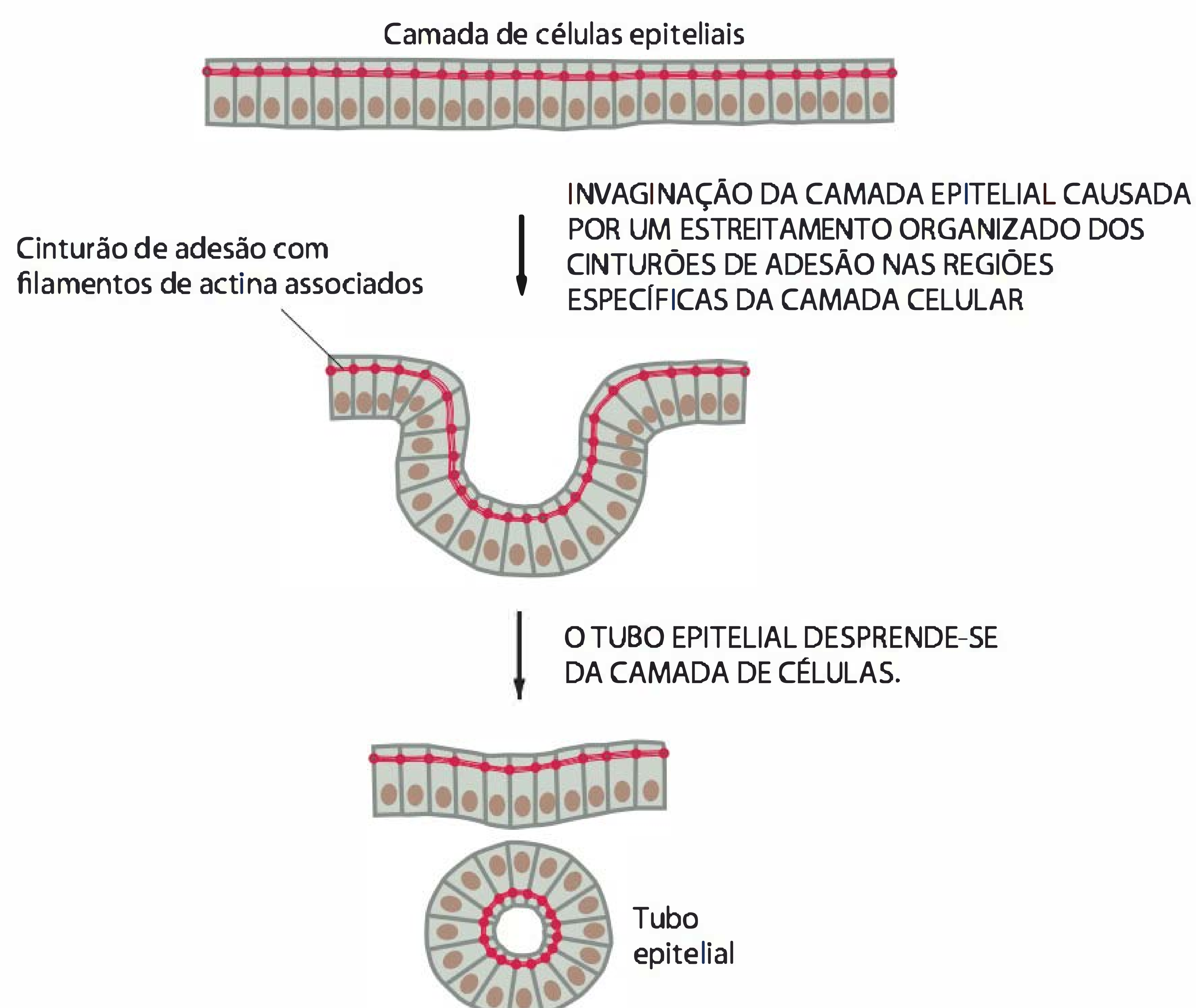


Figura 19-16 O dobramento de uma lâmina epitelial para formar um tubo epitelial. Acredita-se que as contrações orientadas dos feixes de filamentos de actina ao longo dos cintos de adesão provoquem o estreitamento do ápice das células epiteliais, ajudando a camada epitelial a formar o tubo. Um exemplo é a formação do tubo neural nos estágios iniciais do desenvolvimento dos vertebrados (ver Figura 19-12 e Capítulo 22). Embora não mostrado aqui, o rearranjo das células da camada epitelial também tem um papel importante nesse processo.

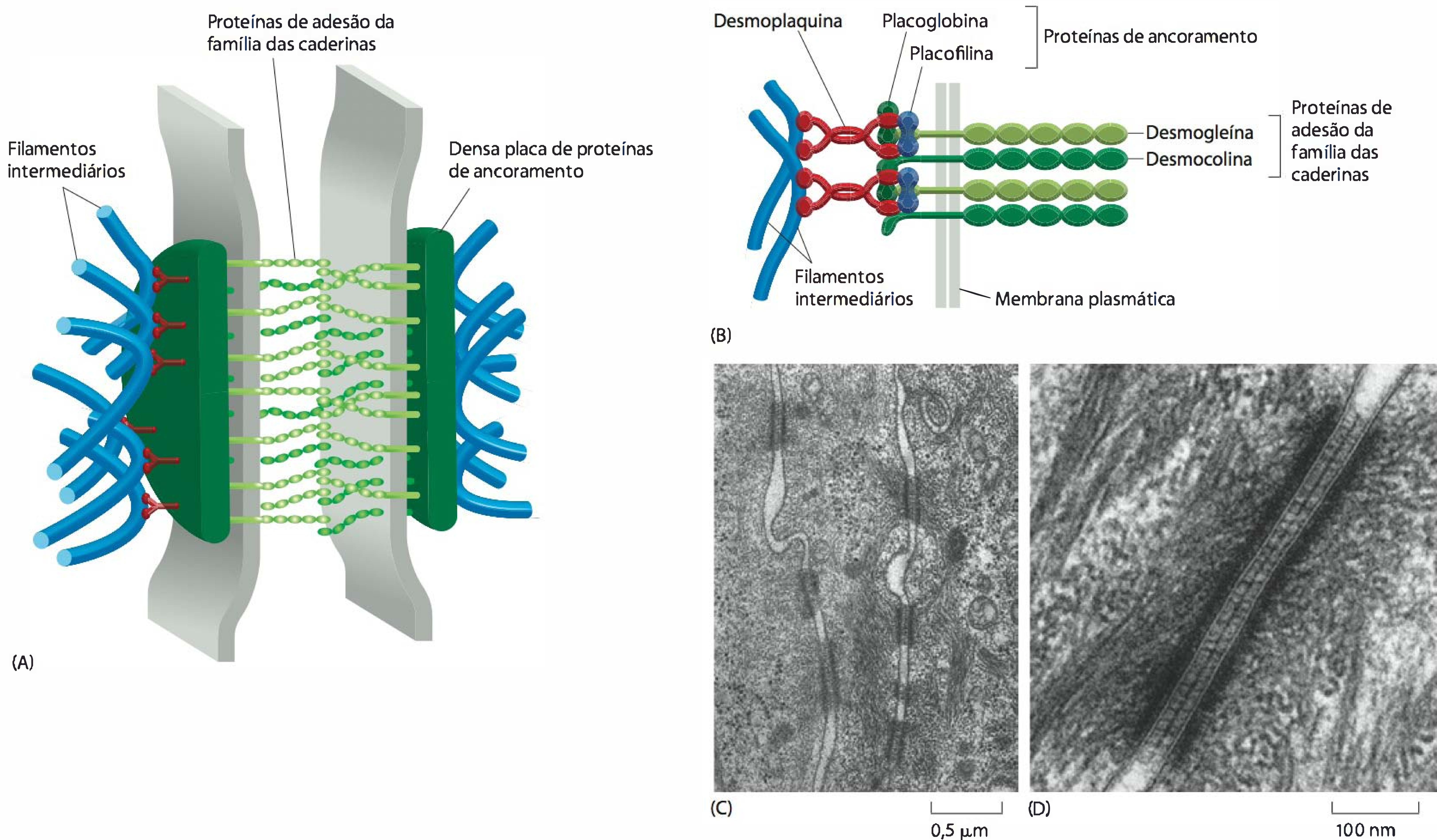


Figura 19-17 Desmossomos. (A) Componentes estruturais do desmossomo. Na superfície citoplasmática de cada membrana plasmática em interação há uma densa placa composta por uma mistura de proteínas de ancoramento intracelular. Um feixe de filamentos de queratina é ligado à superfície de cada placa. Proteínas de adesão transmembrana da família das caderinas se ligam às placas e interagem por meio de seus domínios extracelulares para manter unidas as membranas adjacentes por um mecanismo dependente de Ca^{2+}. (B) Alguns dos componentes moleculares dos desmossomos. A desmogleína e a desmocolina são membros da família das caderinas de proteínas de adesão. Suas caudas citoplasmáticas se ligam à *placoglobina* (γ-catenina) e à *placofilina* (relacionada remotamente a catenina-p120), a qual por sua vez se liga à *desmoplaquina*. A desmoplaquina se liga às laterais dos filamentos intermediários, prendendo os desmossomos a esses filamentos. (C) Micrografia eletrônica da junção desmossômica entre células epiteliais da pele de um filhote de camundongo. (D) Parte do mesmo tecido em maior aumento, mostrando um único desmossomo, com os filamentos intermediários ligados a ele. (C e D, de W. He, P. Cowin e D. L. Stokes, *Science* 302:109-113, 2003. Com permissão da AAAS.)

intercelular em forma de botões que fixam as células (Figura 19-17C). No interior da célula, eles atuam como sítios de ancoramento para filamentos intermediários semelhantes a cordas que formam uma rede estrutural de grande força tensora (Figura 19-17D). Através dos desmossomos, os filamentos intermediários de células adjacentes são ligados a uma rede que se estende por muitas células de um tecido (**Figura 19-18**). O tipo específico de fllamento intermediário ligado aos desmossomos depende do tipo celular: eles são formados por *filamentos de queratina* na maioria das células epiteliais, e *filamentos de desmina* nas células do músculo cardíaco.

A importância das junções desmossômicas é demonstrada por algumas formas de uma doença de pele potencialmente fatal, o *pênfigo*. Indivíduos afetados produzem anticorpos contra uma de suas próprias proteínas caderinas dos desmossomos. Esses anticorpos ligam-se e rompem os desmossomos que mantêm as células epiteliais (queratinócitos) unidas, resultando na formação de bolhas na pele com extravasamento de fluidos para o epitélio frouxo.

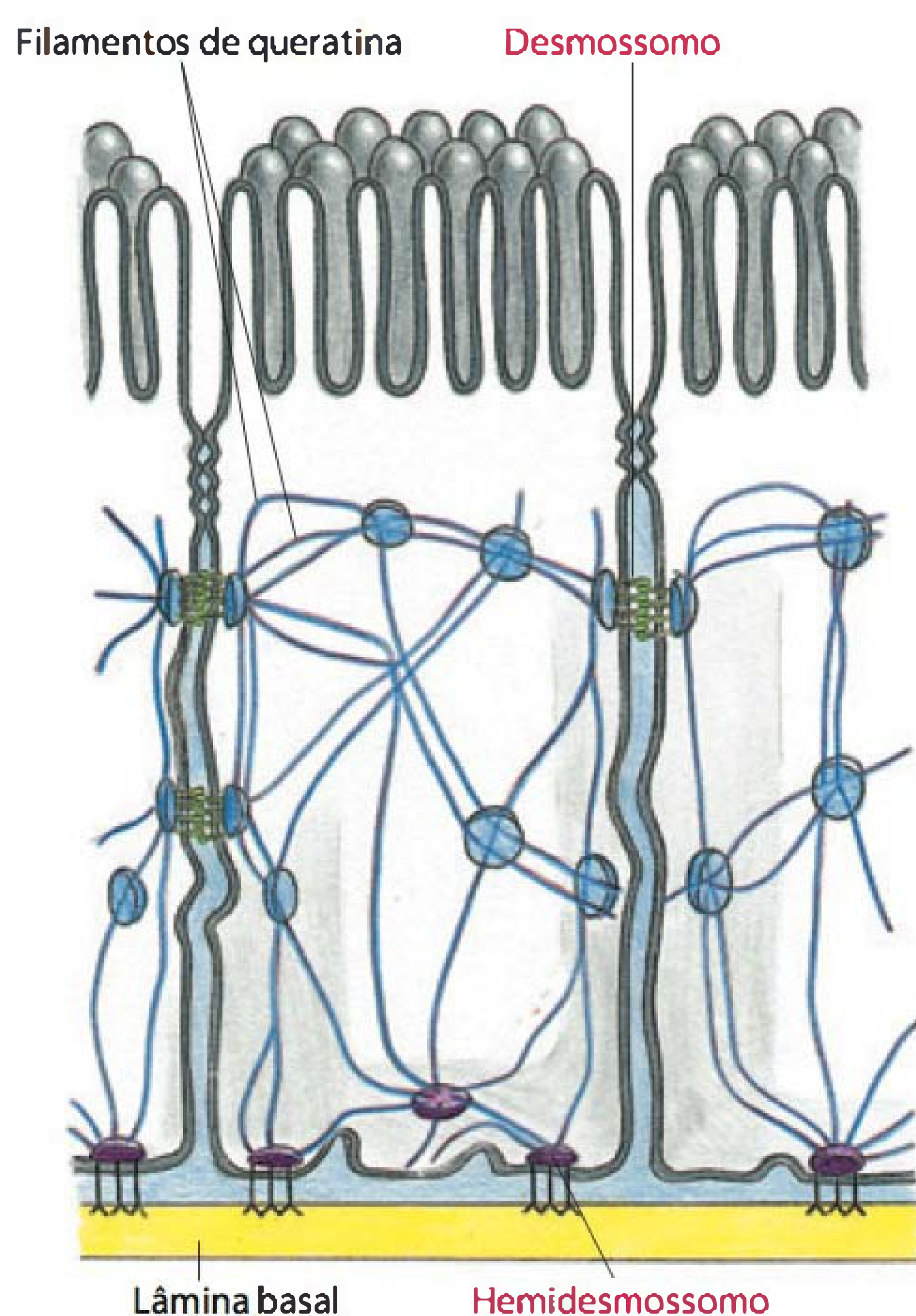


Figura 19-18 Desmossomos, hemidesmossomos e rede de filamentos intermediários. As redes de filamentos intermediários de queratina de células adjacentes – neste exemplo, células epiteliais do intestino delgado – são diretamente conectadas umas às outras por meio dos desmossomos e à lâmina basal por meio dos hemidesmossomos.

As junções célula-célula enviam sinais para o interior da célula

A formação e a quebra das adesões são importantes eventos na vida das células e provocam grandes mudanças internas. Ao contrário, mudanças no estado interno de uma célula devem ser capazes de ativar a formação e a quebra das adesões. Assim, há uma interação complexa entre a maquinaria de adesão e as vias de sinalização química. Já descrevemos, por exemplo, como as mudanças na p120-catenina podem regular a formação das junções aderentes, e várias vias de sinalização intracelular podem controlar a formação das junções pela fosforilação desta e de outras proteínas juncionais. Mais adiante, discutiremos como a formação e a quebra celular através de mecanismos envolvendo as *proteínas de sustentação* de adesões podem enviar sinais ao interior da porção intracelular da junção.

Acredita-se que outra proteína importante na interação de duas vias entre a adesão e a sinalização seja a β-catenina. Neste capítulo, mencionamos essa catenina como uma proteína de ancoramento intracelular essencial nas junções aderentes, ligando as caderinas aos filamentos de actina. No Capítulo 15, vimos esta proteína desempenhando outra função, como um componente da via de sinalização célula-célula Wnt, movendo-se do citoplasma para o núcleo de forma a ativar os genes-alvo de transcrição. Regiões separadas da molécula são responsáveis pelas funções reguladoras e de adesão, mas uma única molécula não pode realizar as duas funções ao mesmo tempo. A desintegração de uma junção aderente pode liberar uma molécula de β-catenina para se mover livremente da superfície celular para o núcleo como uma molécula de sinalização, e, por outro lado, a atividade dos componentes da via de sinalização Wnt (a qual regula a fosforilação e a degradação da β-catenina) pode controlar a disponibilidade da β-catenina para formar as junções aderentes.

Algumas caderinas clássicas transmitem sinais para o interior da célula de outras maneiras. Os membros da subfamília Flamingo, por exemplo, possuem um domínio transmembrana de sete passagens, sugerindo que podem atuar como receptores ligados à proteína G. A caderina do endotélio vascular (VE-caderina) é outro exemplo. Essa proteína medeia a adesão entre as células endoteliais, sendo necessária à sua sobrevivência. Embora as células endoteliais que não expressem a VE-caderina ainda possam aderir uma à outra através da caderina N, elas não sobrevivem, pois são incapazes de responder a uma proteína extracelular denominada *fator de crescimento endotelial vascular* (*VEGF*, *vascular endothelial growth factor*) que atua como sinal de sobrevivência. O VEGF se liga a um receptor de tirosina-cinase (discutido no Capítulo 15) que requer a VE-caderina como correceptor.

As selectinas fazem a mediação das adesões transientes célula-célula na corrente sanguínea

A superfamília das caderinas é central para a adesão célula-célula dos animais, mas pelo menos outras três superfamílias de proteínas de adesão célula-célula também são importantes: as *integrinas*, as *selectinas* e os membros da *superfamília das imunoglobulinas* de adesão. Discutiremos com mais detalhes as integrinas mais adiante: sua principal função ocorre na adesão célula-matriz, mas algumas delas medeiam a adesão célula-célula em circunstâncias especiais. A dependência de Ca^{2+} proporciona uma maneira simples de distinguir experimentalmente entre as três classes de proteínas. As selectinas, como as caderinas e as integrinas, requerem Ca^{2+} para suas funções de adesão, ao contrário dos membros da superfamília das Igs.

As **selectinas** são proteínas de superfície celular ligadoras de carboidratos (*lecitinas*) que medeiam uma variedade de interações de adesão transientes célula-célula na circulação sanguínea. Sua principal função, pelo menos nos vertebrados, é na resposta inflamatória e na coordenação do tráfego dos leucócitos. Os leucócitos têm vida nômade, vagando entre a circulação sanguínea e os tecidos, o que requer um comportamento especial de adesão. As selectinas controlam a ligação dos leucócitos às células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, permitindo que as células sanguíneas migrem da circulação para os tecidos.

Cada selectina é uma proteína transmembrana com um domínio lecitina altamente conservado que se liga a oligossacarídeos específicos em outra célula (**Figura 19-19**A). Há pelo menos três tipos de selectinas: a *selectina L*, nos leucócitos, a *selectina P*, nas plaquetas e nas células endoteliais que tenham sido localmente ativadas por uma resposta inflamatória,

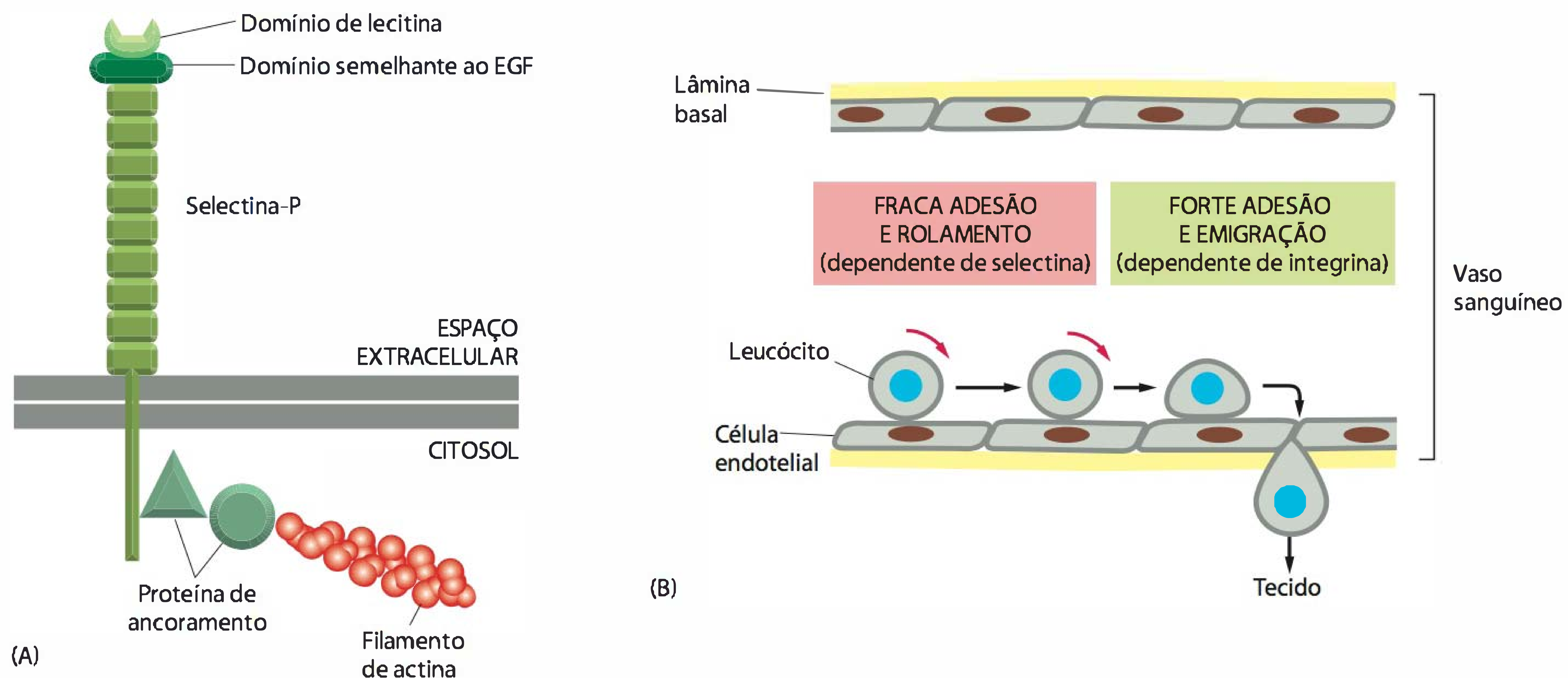


Figura 19-19 Estrutura e função das selectinas. (A) Estrutura da selectina-P. A selectina liga-se ao citoesqueleto de actina através de proteínas de ancoramento que ainda são pouco conhecidas. (B) Adesões célula-célula mediadas pelas selectinas e integrinas necessárias à migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos. Primeiro, as selectinas das células endoteliais se ligam aos oligossacarídeos dos leucócitos, que se tornam fracamente ligados à parede do vaso. A seguir, o leucócito ativa uma integrina (normalmente denominada LFA1) na sua membrana plasmática, permitindo que essa integrina se ligue a uma proteína da membrana da célula endotelial denominada ICAM1, pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Isso cria uma ligação muito forte que permite que o leucócito passe para fora do vaso.

e a *selectina E,* nas células endoteliais ativadas. Nos órgãos linfoides, as células endoteliais expressam oligossacarídeos que são reconhecidos pela selectina L nos linfócitos, fazendo com que estes linfócitos sejam aprisionados. As células endoteliais, no local da inflamação, alteram a expressão de selectinas que reconhecem os oligossacarídeos nos leucócitos e nas plaquetas, marcando as células para que elas atuem no local da emergência. As selectinas não atuam sozinhas, elas colaboram com as integrinas, que intensificam a ligação das células sanguíneas ao endotélio. As adesões célula-célula mediadas pelas selectinas e integrinas são *heterofílicas*, isto é, a ligação é a uma molécula diferente. As selectinas ligam-se a oligossacarídeos específicos nas glicoproteínas e nos glicolipídeos, enquanto que as integrinas se ligam a proteínas específicas.

As selectinas e as integrinas atuam em sequência permitindo que os leucócitos deixem a circulação e migrem para os tecidos (Figura 19-19B). As selectinas medeiam uma fraca adesão porque a ligação do domínio de lecitina da selectina ao seu ligante carboidrato é de baixa afinidade. Isso permite que os leucócitos se liguem de forma fraca e reversível ao endotélio, rolando na superfície dos vasos, impelidos pelo fluxo sanguíneo. O rolamento continua até que a célula sanguínea ative suas integrinas. Como veremos mais adiante, essas moléculas transmembrana podem ser alteradas para uma conformação adesiva que permite que elas se encaixem com outras moléculas externas à célula, neste caso, com as proteínas da superfície das células endoteliais. Uma vez ligados dessa forma, os leucócitos escapam da circulação sanguínea para os tecidos, esgueirando entre as células endoteliais adjacentes e deixando a circulação sanguínea.

Proteínas que pertencem à superfamília das imunoglobulinas fazem a mediação da adesão célula-célula independente de Ca^{2+}

A principal proteína da célula endotelial reconhecida pelas integrinas dos leucócitos é denominada *molécula de adesão de células intercelular* (ICAM, *intercellular cell adhesion molecule*) ou *molécula de adesão de células vascular* (VCAM, *vascular cell adhesion molecule*). Elas são membros de uma outra grande e antiga família de moléculas de superfície celular, a **superfamília das imunoglobulinas (Igs)**. Essas proteínas contêm um ou mais domínios extracelulares semelhantes às Igs, característicos das moléculas de anticorpos (discutido no Capítulo 25). Elas possuem várias funções fora do sistema imune que não estão relacionadas às defesas imunes.

Enquanto as ICAMs e as VCAMs das células endoteliais medeiam ligações heterofílicas às integrinas, muitos outros membros da superfamília das Igs parecem mediar ligações homofílicas. Um exemplo é a *molécula de adesão de células neural* (*NCAM, neural cell adhesion molecule*), a qual é expressa por uma variedade de tipos celulares, incluindo a maioria das células nervosas, e pode assumir diversas formas, produzidas pelo *splicing* alternativo de um transcrito de RNA produzido por um único gene (**Figura 19-20**). Algumas formas de NCAM possuem uma quantidade pouco comum de ácido siálico (com as cadeias contendo

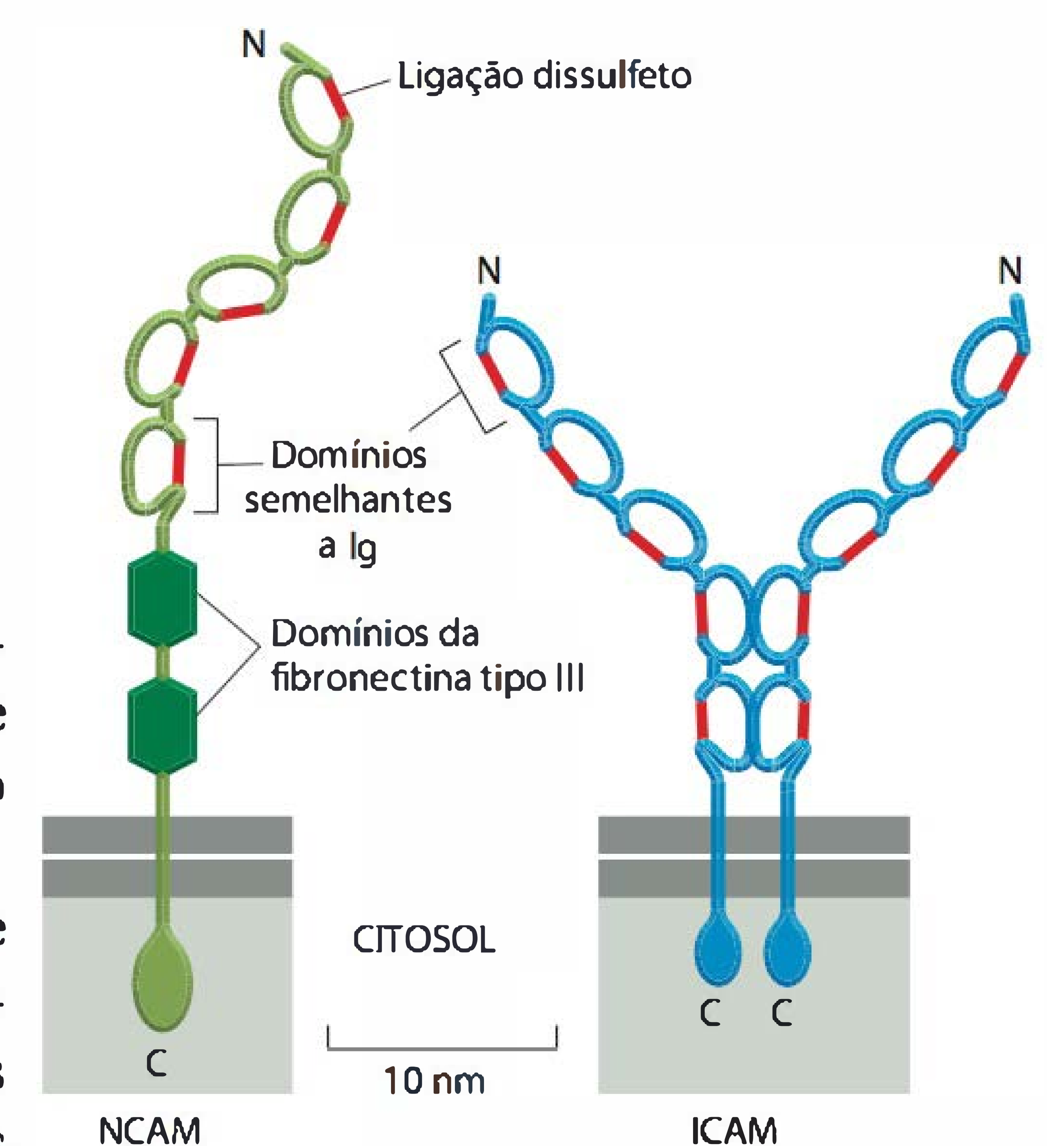


Figura 19-20 Dois membros da superfamília das Igs de moléculas de adesão célula-célula. A NCAM é expressa em neurônios e outros tipos celulares e medeia uma ligação homofílica. Somente a estrutura da NCAM está representada. Ela normalmente possui cadeias laterais de ácido siálico (um polissacarídeo) ligadas covalentemente, impedindo a adesão. A ICAM é expressa nas células endoteliais e em alguns outros tipos celulares, ligando-se heterofilicamente a uma integrina dos leucócitos.

centenas de unidades repetidas de ácido siálico). Devido a suas cargas negativas, essas longas cadeias polissiálicas podem interferir com a adesão celular. Há evidências crescentes de que as NCAMs carregadas de ácido siálico atuam para inibir ao invés de promover a adesão celular.

Uma célula de um determinado tipo em geral usa uma variedade de proteínas de adesão distintas para interagir com outras células, assim como cada célula usa uma variedade de receptores diferentes para responder a muitas moléculas-sinal extracelulares solúveis, como hormônios e fatores de crescimento em seu ambiente. Embora as caderinas e os membros da família das Igs sejam frequentemente expressos nas mesmas células, as adesões mediadas pelas caderinas são muito mais fortes e responsáveis por manterem as células unidas, segregando grupos de células e mantendo a integridade dos tecidos. Moléculas como a NCAM parecem contribuir para a regulação fina dessas interações adesivas durante o desenvolvimento e a regeneração, atuando em vários fenômenos de adesão como os discutidos para as células sanguíneas e endoteliais. Camundongos mutantes que não possuem caderina N morrem logo no início do desenvolvimento, e mutantes que não possuem NCAM se desenvolvem normalmente, mas apresentam algumas anormalidades no desenvolvimento de determinados tecidos específicos, incluindo partes do sistema nervoso.

Muitos tipos de moléculas de adesão celular atuam em paralelo para criar uma sinapse

As células do sistema nervoso baseiam-se em sistemas complexos de moléculas de adesão, bem como na quimiotaxia de fatores de sinalização solúveis, para guiar os axônios em crescimento ao longo de um caminho preciso e para direcionar a formação das conexões nervosas específicas (discutido no Capítulo 22). As proteínas de adesão da superfamília das Igs, juntamente com muitas outras classes de moléculas de adesão e sinalização, desempenham funções importantes nesses processos. Assim, por exemplo, nas moscas com uma mutação no *Fasciclina2*, relacionado à NCAM, alguns axônios seguem vias aberrantes e não atingem seus alvos adequados.

Outro membro da superfamília das Igs, a *Fasciclina3*, permite que os cones de crescimento neuronal reconheçam seus alvos adequados quando os encontram. Essa proteína é expressa temporariamente em alguns neurônios motores de *Drosophila*, bem como nas células musculares por eles impulsionadas. Se a Fasciclina3 é geneticamente removida dos neurônios motores, eles não reconhecem seus músculos-alvo e não fazem sinapses com eles. Por outro lado, se um neurônio motor, que normalmente não expressa a Fasciclina3, é construído para expressar essa proteína, ele fará a sinapse com a célula muscular expressando a Fasciclina3, com a qual ele normalmente não se conecta. Parece que a Fasciclina3 medeia essas conexões sinápticas por mecanismos de reconhecimento homofílico. As proteínas da superfamília das Igs possuem um papel similar nos vertebrados. Proteínas da subfamília *Sidekicks*, por exemplo, medeiam adesões homofílicas, e diferentes proteínas Sidekicks são expressas em diferentes camadas da retina, com sinapses entre grupos de neurônios da retina que compartilham a expressão do mesmo membro da família. Quando o padrão de expressão de proteínas é artificialmente alterado, os padrões de conexões sinápticas mudam.

Esses membros da superfamília das Igs não são as únicas moléculas de adesão envolvidas no início da formação das sinapses. A expressão errônea de determinadas proteínas de adesões sinápticas, não-relacionadas a qualquer um dos tipos mencionados até agora, pode mesmo enganar o crescimento dos cones em sinapses com células não-neuronais que normalmente nunca seriam enervadas. Assim, se as células não-neuronais são forçadas a expressar a *neuroligina*, uma proteína transmembrana evolutivamente relacionada à enzi-

ma acetilcolinesterase, os neurônios irão fazer sinapse com elas como consequência da ligação das neuroliginas a uma proteína denominada *neurexina* da membrana dos neurônios pré-sinápticos.

As proteínas de sustentação organizam os complexos juncionais

Para fazer uma sinapse, as células pré e pós-sinápticas devem fazer mais do que apenas reconhecerem e se aderirem umas às outras. Elas têm que reunir um sistema complexo de receptores de sinalização, canais iônicos, vesículas sinápticas, proteínas de ancoramento e outros componentes, como descrito no Capítulo 11. Este mecanismo de sinalização sináptica não existiria sem as moléculas de adesão celular para ligar firmemente as membranas pré e pós-sinápticas e para auxiliar na manutenção de todos os componentes da maquinaria de sinalização nas posições adequadas. Assim, as caderinas geralmente estão presentes, concentradas nos pontos ao redor da periferia das sinapses e dentro delas, bem como os membros da superfamília das Ig e vários outros tipos de moléculas de adesão. De fato, cerca de 20 caderinas clássicas diferentes são expressas no sistema nervoso dos vertebrados em diferentes combinações em grupos de neurônios distintos, sendo provável que a ligação seletiva dessas moléculas também desempenhe um papel importante, assegurando que os neurônios realizem as sinapses com seus parceiros corretos.

Contudo, como uma variedade de moléculas de adesão recruta seus componentes das sinapses e os mantêm no lugar? Acredita-se que as **proteínas de sustentação** desempenhem um papel importante nessa função. Essas moléculas intracelulares consistem em fileiras de domínios de ligação de proteínas, incluindo vários **domínios PDZ** – segmentos com cerca de 70 aminoácidos de comprimento que podem reconhecer e ligar a porção C-terminal das caudas intracelulares de moléculas transmembrana específicas (**Figura 19-21**). Um domínio de uma proteína de sustentação pode ligar uma proteína de adesão célula-célula, por exemplo, enquanto outro prende um canal iônico direcionado pelo ligante, e ainda outro se liga a uma proteína que regula a exocitose ou a endocitose, ou permite a ligação ao citoesqueleto. Além disso, uma molécula de proteína de sustentação pode se ligar a outra. Dessa maneira, a célula pode reunir um emaranhado de proteínas com todos os componentes necessários nas sinapses trançando sua estrutura (**Figura 19-22**). Centenas de diferentes tipos de proteínas participam dessa estrutura complexa. Mutações nas proteínas de sustentação sinápticas alteram o tamanho e a estrutura das sinapses e podem ter consequências severas para a função do sistema nervoso. Entre outras coisas, tais mutações podem danificar a maquinaria molecular responsável pelo aprendizado e a memória, que dependem da capacidade da atividade elétrica de deixar um traço de longa duração na forma de alterações na arquitetura sináptica.

As proteínas de sustentação, com seus múltiplos parceiros de ligação possíveis, estão envolvidas na organização de outras estruturas e funções juntamente com as sinapses e sinalizações sinápticas. A proteína *Discs large* (*Dlg*) de *Drosophila* é um exemplo (ver Figura 19-21). A Dlg é necessária à construção de sinapses normais, mas veremos que ela, juntamente com uma série de outras proteínas de sustentação relacionadas, também desempenha um

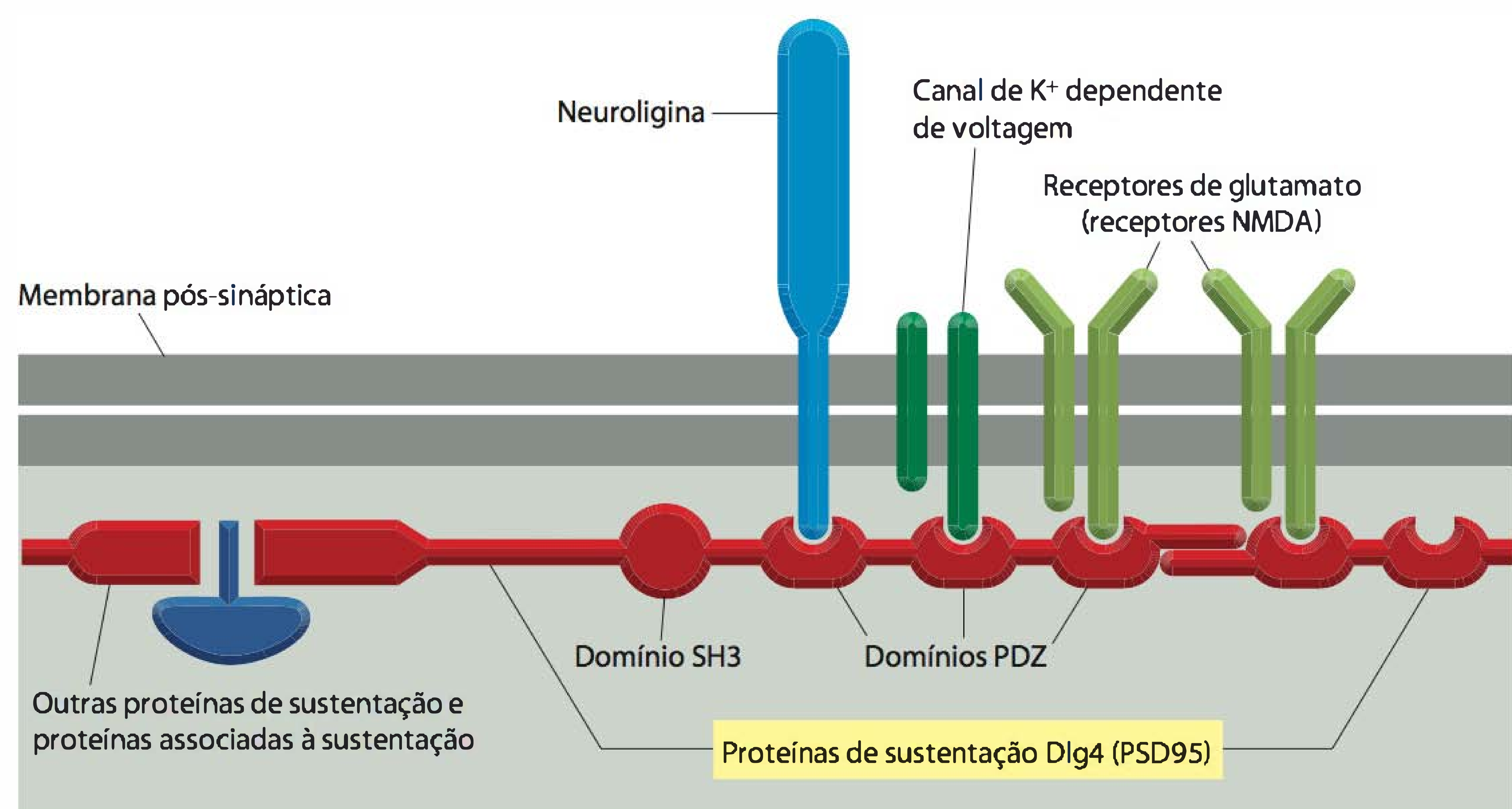


Figura 19-21 Proteína de sustentação. O diagrama mostra a estrutura do domínio da Dlg4 de mamífero, homóloga à proteína Disc-large de *Drosophila*, e algumas proteínas que se ligam a ela. A Dlg4 está concentrada abaixo da membrana pós-sináptica das sinapses, sendo também conhecida como proteína de densidade pós-sináptica 95, ou PSD95. Com seus múltiplos domínios de ligação de proteínas, ela pode unir diferentes componentes da sinapse. Uma molécula de Dlg4 também pode se ligar a outra ou a moléculas de sustentação de outros tipos, criando uma grande rede que mantém todos os componentes da sinapse juntos. As proteínas de sustentação também desempenham um papel importante em outros tipos de junções celulares.

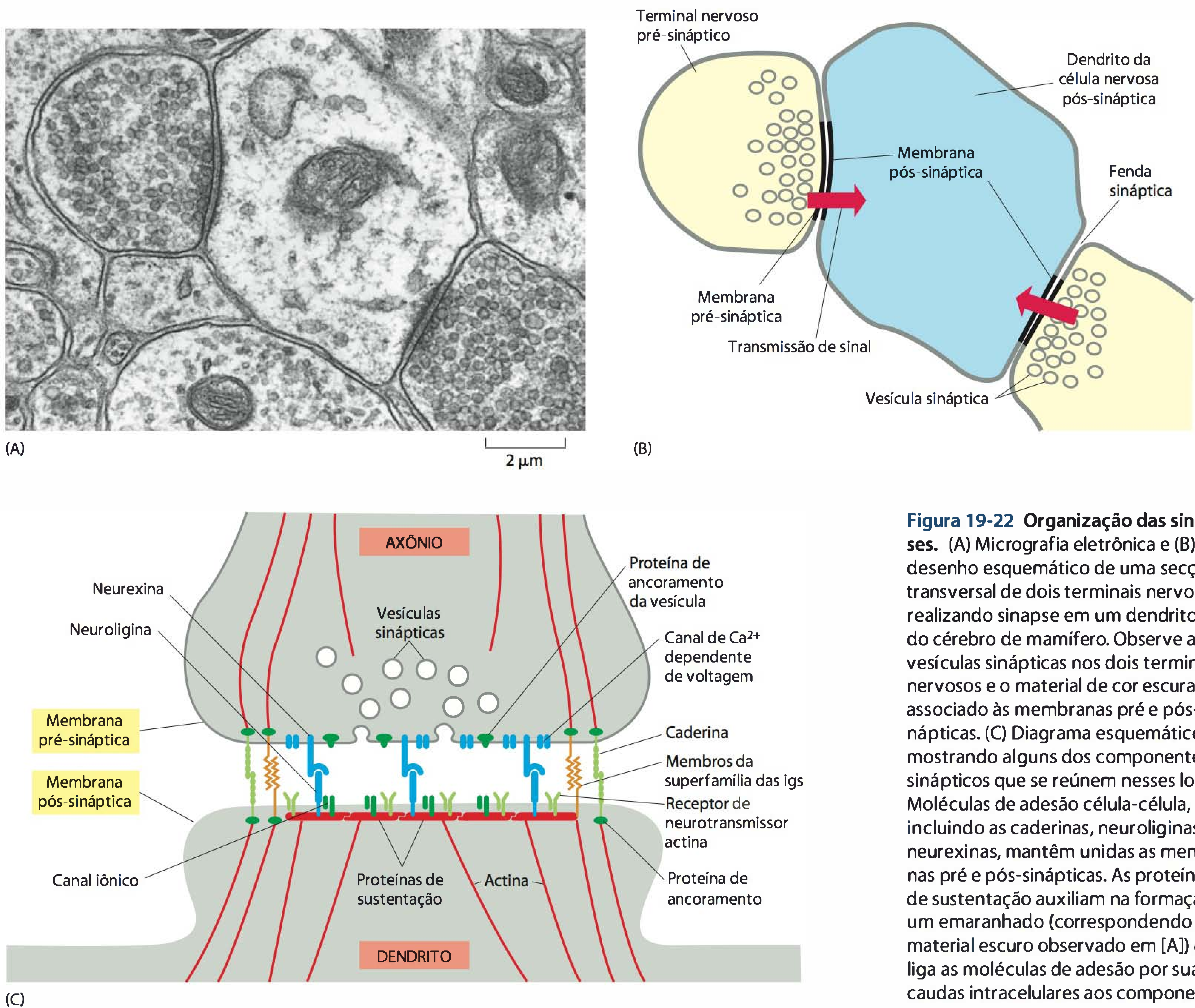


Figura 19-22 Organização das sinapses. (A) Micrografia eletrônica e (B) desenho esquemático de uma secção transversal de dois terminais nervosos realizando sinapse em um dendrito do cérebro de mamífero. Observe as vesículas sinápticas nos dois terminais nervosos e o material de cor escura associado às membranas pré e pós-sinápticas. (C) Diagrama esquemático mostrando alguns dos componentes sinápticos que se reúnem nesses locais. Moléculas de adesão célula-célula, incluindo as caderinas, neuroliginas e neurexinas, mantêm unidas as membranas pré e pós-sinápticas. As proteínas de sustentação auxiliam na formação de um emaranhado (correspondendo ao material escuro observado em [A]) que liga as moléculas de adesão por suas caudas intracelulares aos componentes da maquinaria sináptica de transmissão de sinal, como os canais iônicos e os receptores de neurotransmissores. A estrutura deste grande complexo multiproteico ainda não é conhecida em detalhes. Ela inclui sítios de ancoramento para centenas de componentes adicionais, não apresentados, incluindo moléculas do citoesqueleto e várias cinases e fosfatases reguladoras. (A, cortesia de Cedric Raine.)

papel essencial em quase todos os aspectos da organização do epitélio, incluindo a formação das junções ocludentes entre as células, o controle da polaridade celular e até mesmo o controle da proliferação celular. Todos esses processos possuem uma dependência compartilhada da mesma maquinaria, não somente nas moscas, mas também nos vertebrados.

Resumo

No epitélio, bem como em outros tipos de tecidos, as células estão diretamente ligadas umas às outras através de fortes adesões célula-célula, mediadas por proteínas transmembrana que estão ancoradas intracelularmente ao citoesqueleto. Nas junções aderentes, o ancoramento ocorre aos filamentos de actina, nos desmossomos, aos filamentos intermediários. Nessas duas estruturas, e em outras junções célula-célula menos evidentes, as proteínas de adesão transmembrana são membros da superfamília das caderinas. As caderinas geralmente se ligam umas às outras homofilicamente: a cabeça de uma molécula de caderina se liga à cabeça de uma caderina similar na célula oposta. Esta seletividade permite que populações mistas de células de diferentes tipos selecionem-se de acordo com a caderina específica que expressam, auxiliando no controle do rearranjo celular durante o desenvolvimento, onde diferentes caderinas são expressas em um complexo, alterando padrões. Mudanças na expressão das caderinas podem fazer com que as células sofram transições entre um estado epitelial coesivo e um estado mesenquimal separado, um fenômeno importante no câncer, bem como no desenvolvimento embrionário.

As caderinas "clássicas" estão ligadas ao citoesqueleto de actina por proteínas intracelulares denominadas cateninas. Estas proteínas formam um complexo de ancoramento na cauda intracelular da molécula de caderina e estão envolvidas não somente no ancoramento físico, mas também na gênese dos sinais intracelulares. Por outro lado, os sinais intracelulares podem regular a formação das adesões mediadas por caderinas. A β-catenina, por exemplo, também é uma componente-chave na via de sinalização celular por Wnt.

Além das caderinas, pelo menos três outras classes de moléculas transmembrana também são importantes mediadoras das adesões célula-célula: as selectinas, os membros da superfamília das imunoglobulinas (Igs) e as integrinas. As selectinas são expressas em leucócitos, plaquetas e células endoteliais e se ligam de forma heterofílica a carboidratos da superfície celular. Elas auxiliam no aprisionamento dos leucócitos circulantes para os locais de inflamação. As proteínas da superfamília das Igs também desempenham um papel importante no aprisionamento, bem como em muitos outros processos de adesão. Algumas delas se ligam de forma homofílica, e outras de forma heterofílica. As integrinas, embora sua principal função seja a de ligar as células à matriz extracelular, também podem mediar adesões célula-célula ligando-se aos membros da superfamília das Igs.

Muitos membros distintos da superfamília das Igs, as caderinas e outras moléculas de adesão célula-célula guiam a formação das conexões nervosas e mantêm as membranas neuronais unidas nas sinapses. Nestas estruturas complicadas, bem como em outros tipos de junções célula-célula, as proteínas de sustentação intracelular contendo múltiplos domínios de ligação de proteínas PDZ desempenham um papel importante na manutenção de diferentes moléculas de sinalização e de adesão em sua organização adequada.

JUNÇÕES COMPACTAS E A ORGANIZAÇÃO DO EPITÉLIO

Uma camada epitelial, com suas células ligadas lado a lado e se sustentando sobre uma lâmina basal, parece um tipo especializado de estrutura, mas é central para a construção dos animais multicelulares. De fato, mais de 60% dos tipos celulares do corpo dos vertebrados são células epiteliais. Assim como a membrana celular envolve e divide o interior da célula eucariótica, o epitélio envolve e divide o corpo dos animais, revestindo todas as suas superfícies e cavidades, criando compartimentos internos onde ocorrem processos especializados. As camadas epiteliais parecem ser uma invenção que remonta a origem da evolução animal, diversificando uma grande variedade de formas (como veremos no Capítulo 23), mas retendo uma organização com base em uma série de mecanismos moleculares conservados presente em praticamente todos os epitélios.

Essencialmente, todos os epitélios são ancorados a outros tecidos em um lado, a porção **basal**, e livres de qualquer ligação no lado oposto, a porção **apical**. A lâmina basallocaliza-se na interface com o tecido subjacente, mediando a ligação, enquanto a superfície apical do epitélio em geral é banhada por um fluido extracelular (mas algumas vezes coberto por material secretado pela célula na sua porção apical). Assim, todos os epitélios são estruturalmente **polarizados**, assim como suas células individuais: a porção basal da célula, aderida à lâmina basal abaixo, difere da porção apical, exposta ao meio.

Todo o epitélio possui pelo menos uma função importante em comum: ele atua como uma barreira de permeabilidade seletiva, separando os fluidos que permeiam os tecidos na sua porção basal dos fluidos com diferente composição química na sua porção apical. Esta função de barreira requer que as células adjacentes sejam seladas por **junções ocludentes**, de modo que as moléculas não possam passar livremente pela camada celular. Nesta seção, veremos como as junções ocludentes são formadas e como a arquitetura polarizada do epitélio é mantida. Esses dois aspectos fundamentais do epitélio estão relacionados: as junções desempenham uma função essencial na organização e na manutenção da polaridade das células da camada.

As junções compactas formam uma barreira entre as células e um obstáculo entre os domínios de membrana

As junções bloqueadoras encontradas no epitélio dos vertebrados são denominadas **junções compactas**. O epitélio do intestino delgado fornece um bom exemplo de sua estrutura e função (ver Figura 19-3). Este epitélio possui uma estrutura *colunar simples*, isto é, consiste em uma única camada de células altas (colunares). Elas são de diversos tipos diferenciados, mas em sua maioria são células absorventes, especializadas na absorção de nutrientes da cavidade interna, ou *lúmen*, do intestino.

Ao mesmo tempo, porém, as células devem transportar nutrientes selecionados através do epitélio do lúmen para o fluido extracelular que permeia o tecido conectivo no outro lado. De lá, esses nutrientes serão difundidos para os pequenos vasos sanguíneos que irão nutrir o organismo. Esse *transporte transcelular* depende de dois grupos de proteínas de transporte na membrana plasmática de células de absorção. Um grupo está restrito à superfície apical da célula epitelial (a superfície que fica voltada para o lúmen) e transporta ativamente moléculas selecionadas do intestino para a célula. O outro grupo está restrito à superfície *basolateral* (basal e lateral), permitindo que a mesma molécula deixe a célula pela difusão facilitada para o fluido extracelular no outro lado do epitélio. Para manter este transporte direcional, os espaços entre as células epiteliais devem ser selados, de modo que as moléculas transportadas não possam difundir novamente para o lúmen do intestino através desses espaços (**Figura 19-23**). Além disso, as proteínas que formam as bombas e os canais devem estar corretamente distribuídas nas membranas celulares: o grupo apical de proteínas de transporte ativo deve ser localizado no ápice da célula (como discutido no Capítulo 13) e não deve migrar para as porções basolaterais. O grupo de proteínas basolaterais formadoras de canais deve estar presente somente na superfície basolateral e não deve migrar para a porção apical. As junções compactas entre as células epiteliais, juntamente com as junções septadas entre as células, podem atuar como "barreiras", auxiliando na separação dos domínios da membrana plasmática de cada célula e impedindo a difusão de algumas proteínas de membrana (e lipídeos) entre os domínios apicais e basolaterias da membrana plasmática (ver Figura 19-23).

A função de barreira das junções compactas é facilmente demonstrada experimentalmente: uma proteína de baixo peso molecular marcada, adicionada em um lado do epitélio, não passará além da junção compacta (**Figura 19-24**). Porém, a selagem não é absoluta. Embora as junções compactas sejam impermeáveis a macromoléculas, sua permeabilidade a pequenas moléculas varia em diferentes epitélios. As junções compactas no epitélio que reveste o intestino delgado, por exemplo, são 10.000 vezes mais permeáveis a íons inorgânicos, como o Na^+, do que as junções compactas no epitélio que reveste a bexiga. Essas diferenças refletem as diferenças nas proteínas que formam as junções compactas.

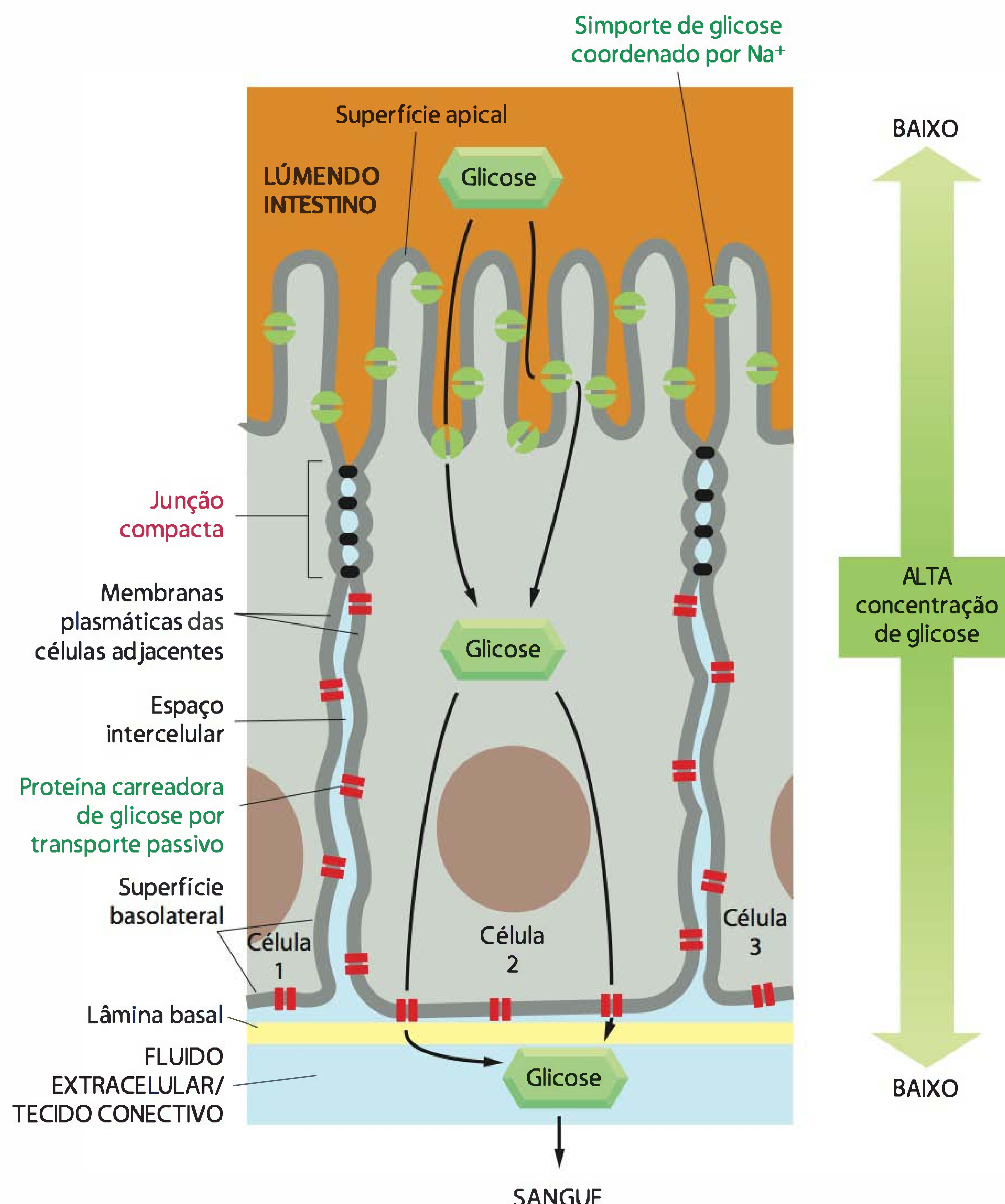


Figura 19-23 O papel das junções compactas no transporte transcelular. As proteínas de transporte estão limitadas a regiões distintas da membrana plasmática nas células epiteliais do intestino delgado. Esta segregação permite a transferência vetorial de nutrientes através da camada epitelial do lúmen intestinal para o sangue. No exemplo representado, a glicose é transportada ativamente para dentro da célula por simporte de glicose dirigido por Na^+ na superfície apical, e difunde-se para fora da célula por difusão facilitada mediada por carreadores de glicose na membrana basolateral. As junções compactas parecem confinar as proteínas de transporte aos domínios da membrana apropriados, atuando como barreiras à difusão dentro da bicamada lipídica da membrana plasmática; estas junções também bloqueiam o refluxo de glicose do lado basal do epitélio para o lúmen intestinal.

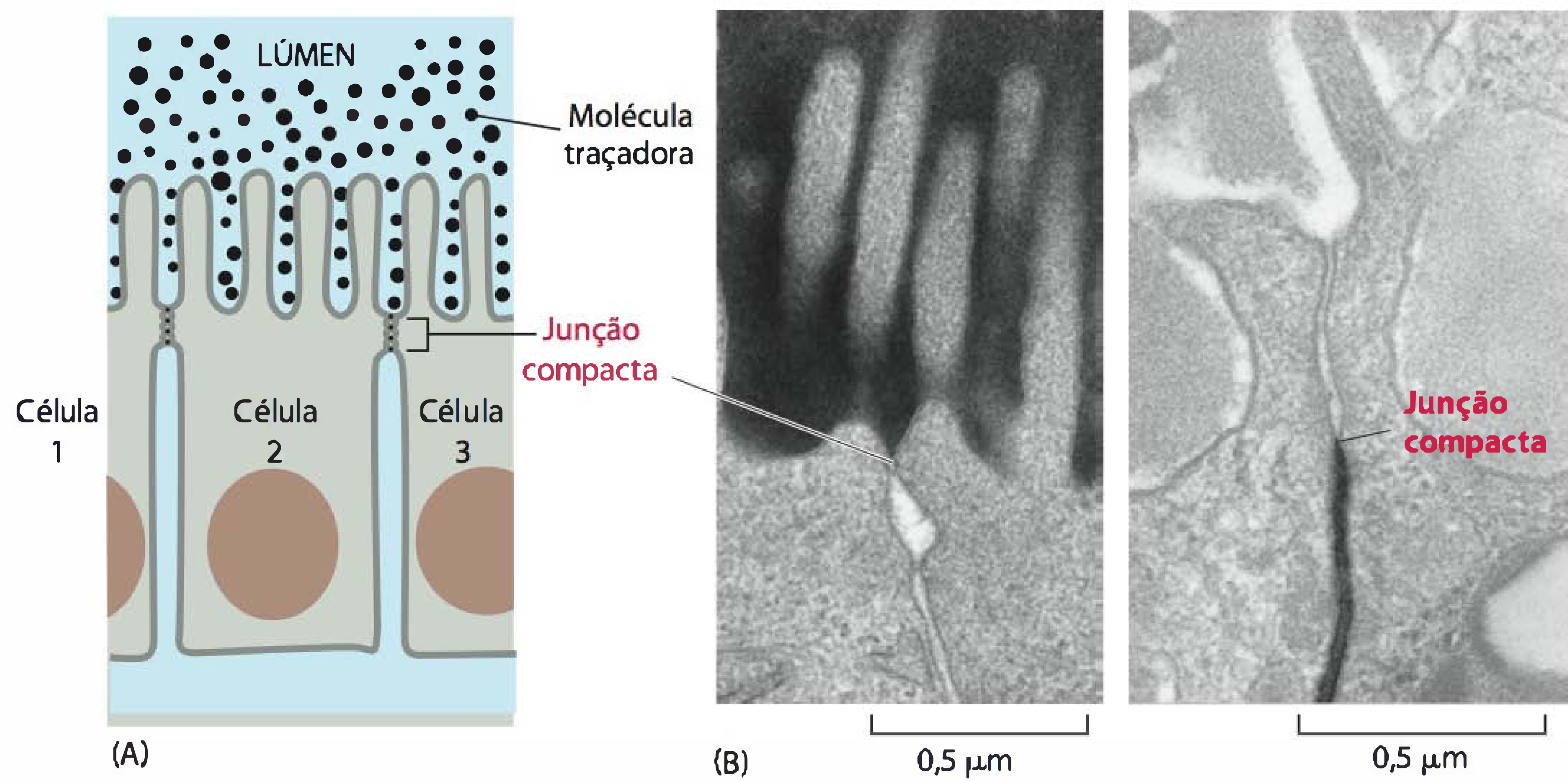


Figura 19-24 **As junções compactas permitem que o epitélio atue como barreira na difusão de solutos.** (A) Desenho esquemático mostrando como uma pequena molécula traçadora adicionada em um lado do epitélio é impedida de atravessar o epitélio pelas junções compactas que selam as células adjacentes. (B) Eletromicrografias de células em um epitélio onde uma pequena molécula traçadora eletrodensa extracelular foi adicionada à região apical (esquerda) ou à região basolateral (direita); nos dois casos, a molécula traçadora é retida na junção compacta. (B, cortesia de Daniel Friend.)

As células epiteliais também podem alterar suas junções compactas temporariamente para permitir um aumento do fluxo de solutos e água através de aberturas nas barreiras juncionais. Tal *transporte paracelular* é especialmente importante na absorção de aminoácidos e monossacarídeos do lúmen do intestino, onde a concentração desses nutrientes pode estar aumentada após a refeição para direcionar o transporte passivo.

Quando as junções compactas são visualizadas por microscopia eletrônica de criofratura, elas parecem compostas de uma anastomose de *fitas que selam* e circundam a porção apical de cada célula da camada epitelial (**Figura 19-25**A e B). Na micrografia eletrônica convencional, as folhas externas das duas membranas plasmáticas estão fortemente uni-

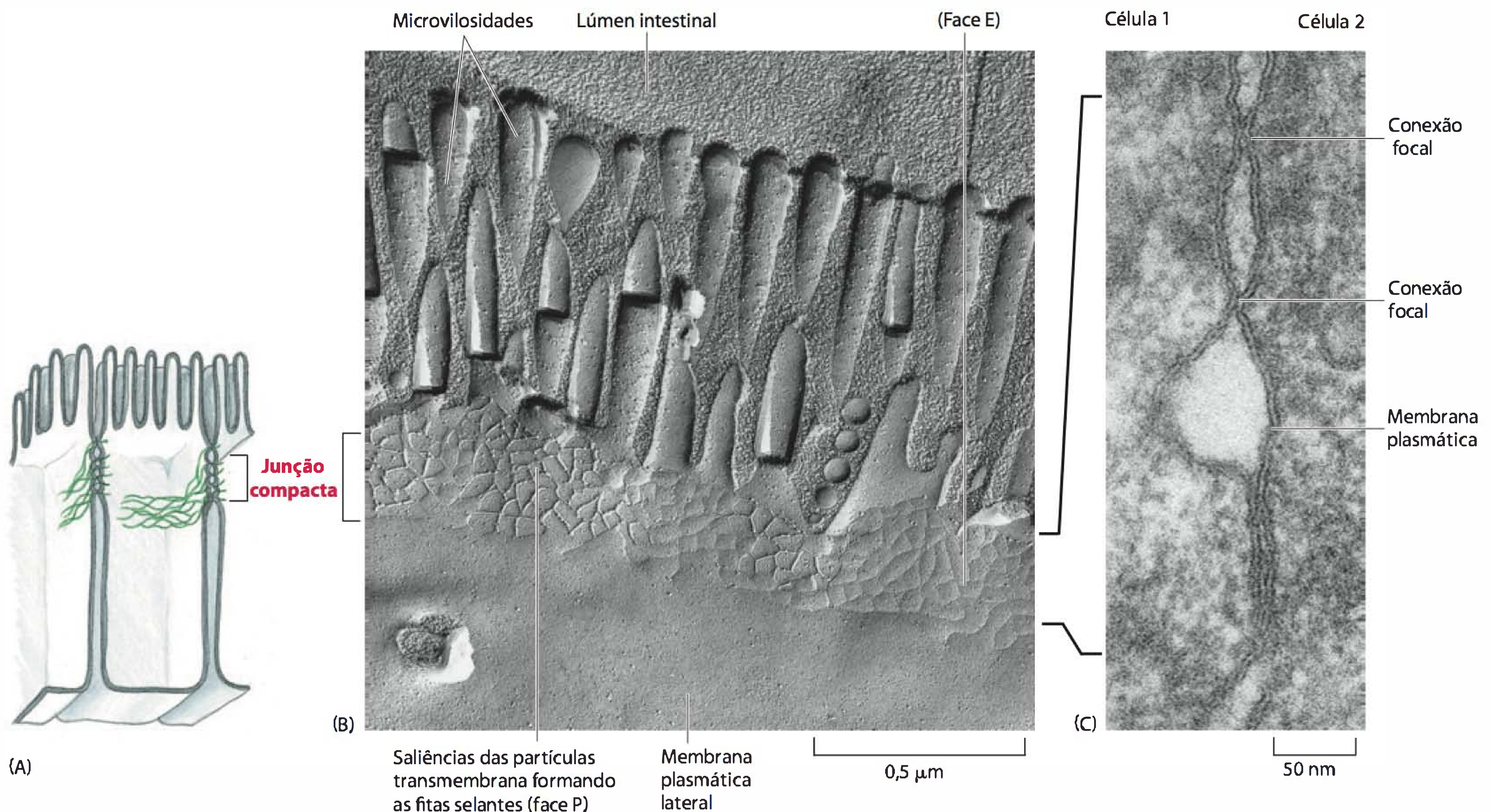


Figura 19-25 **Estrutura de uma junção compacta entre células epiteliais do intestino delgado.** As junções são mostradas esquematicamente em (A), em microscopia eletrônica de uma criofratura em (B) e em microscopia eletrônica convencional em (C). Observe que as células são orientadas com as extremidades apicais para baixo. Em (B), o plano da micrografia é paralelo ao plano da membrana, e as junções compactas parecem com uma banda, semelhante a uma cinta de fitas selantes anastomosadas que circundam cada célula da camada. As fitas selantes são visualizadas como saliências enrugadas de partículas intramembrana na fratura de face citoplasmática da membrana (face P), ou como sulcos complementares na face externa da membrana (face E) (ver Figura 19-26A). Em (C), a junção é vista como uma série de conexões focais entre a camada externa de duas membranas plasmáticas interagindo, cada conexão correspondendo a uma fita selante em secção transversal. (B e C, de N. B. Gilula, em Cell Communication [R. P. Cox, ed.], p.1-29. New York: Wiley, 1974.)

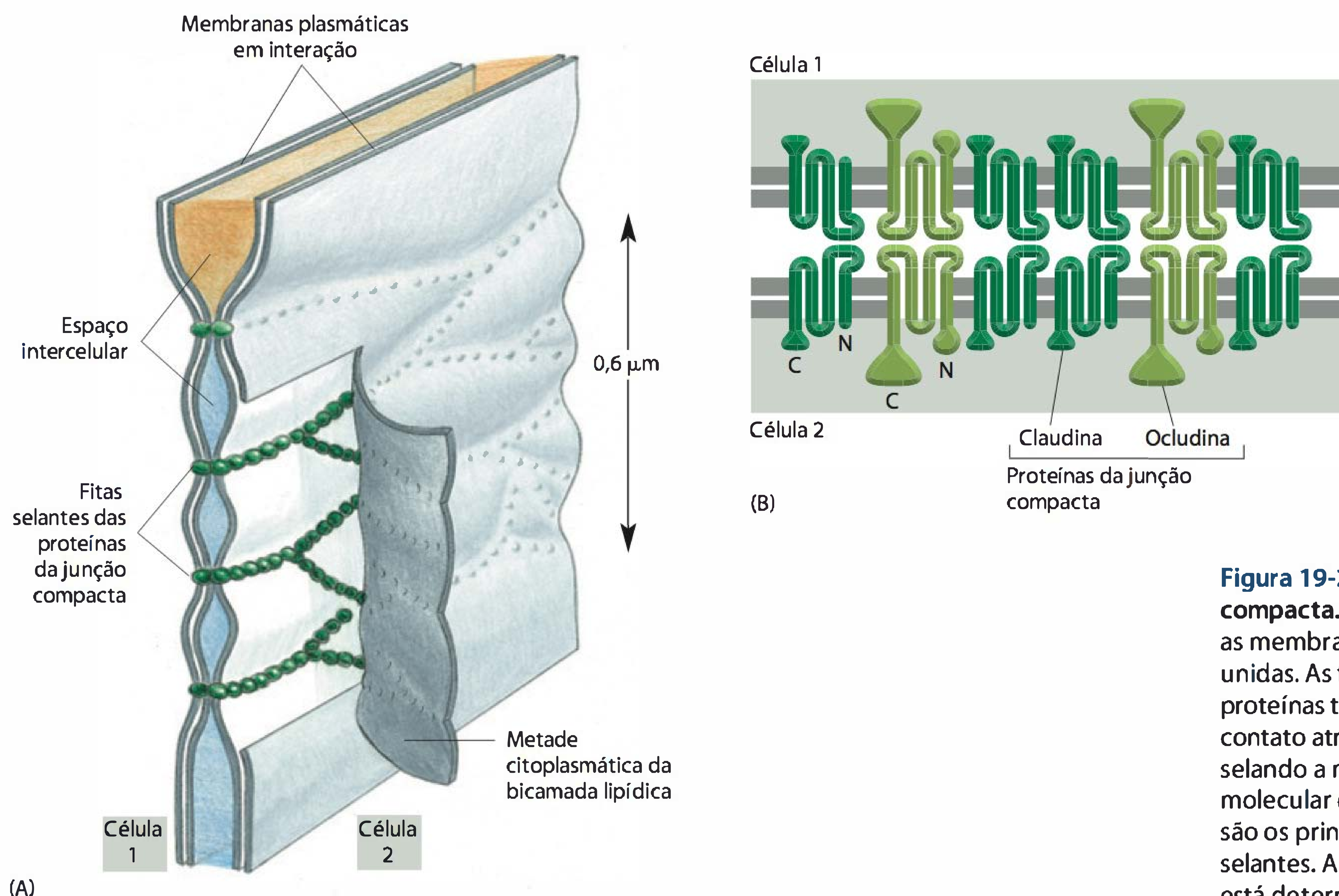


Figura 19-26 Modelo de uma junção compacta. (A) As fitas selantes mantêm as membranas plasmáticas adjacentes unidas. As fitas são compostas por proteínas transmembrana que fazem contato através do espaço intercelular, selando a membrana. (B) Composição molecular da fita selante. As claudinas são os principais componentes das fitas selantes. A função das ocludinas não está determinada.

das na região das fitas (Figura 19-25C). Cada fita da junção compacta é composta por um longo segmento de proteínas de adesão transmembrana embebidas em cada uma das duas membranas plasmáticas que estão interagindo. Os domínios extracelulares dessas proteínas ligam-se diretamente uns aos outros para bloquear o espaço intercelular (**Figura 19-26**).

As principais proteínas transmembrana da junção compacta que forma essas fitas são as *claudinas*, as quais são essenciais na formação e na função da junção compacta. Por exemplo, um camundongo que não possui o gene da *claudina-1* não forma junções compactas entre as células da camada epitelial da pele e, como resultado, as crias perdem água rapidamente por evaporação pela pele e morrem em poucos dias após o nascimento. Por outro lado, se células não-epiteliais com os fibroblastos são artificialmente forçadas a expressar o gene da claudina, elas irão formar junções compactas umas com as outras. Junções compactas normais também contêm uma segunda proteína transmembrana importante denominada *ocludina*, cuja função não está determinada e não parece ser tão essencial como a claudina. Uma terceira proteína transmembrana, a *tricelulina* (relacionada à ocludina), é necessária para selar as membranas celulares e impedir o vazamento transepitelial nos locais de encontro de três células.

A família de proteínas claudinas possui muitos membros (24 no homem) e são expressas em diferentes combinações em diferentes epitélios para proporcionar propriedades específicas de permeabilidade das camadas epiteliais. Acredita-se que elas formem *poros paracelulares*, canais seletivos que permitem que íons específicos cruzem a barreira das junções compactas de um espaço extracelular para outro. Uma claudina específica encontrada nas células epiteliais renais, por exemplo, precisa deixar passar íons Mg^{2+} entre as células dessa camada de modo que o íon possa ser reabsorvido da urina para o sangue. Uma mutação no gene que codifica esta claudina resulta na perda excessiva de Mg^{2+} na urina.

As proteínas de sustentação dos complexos juncionais desempenham uma função fundamental no controle da proliferação celular

As claudinas e as ocludinas devem estar nas posições corretas em cada célula, para formar uma rede de junções compactas de fitas selantes. Normalmente esta rede localiza-se na porção apical aos desmossomos e às junções aderentes que mantêm as células unidas mecanicamente, e todo esse conjunto é denominado *complexo juncional* (**Figura 19-27**). As partes desse complexo juncional dependem umas das outras para a sua formação. Por exemplo, an-

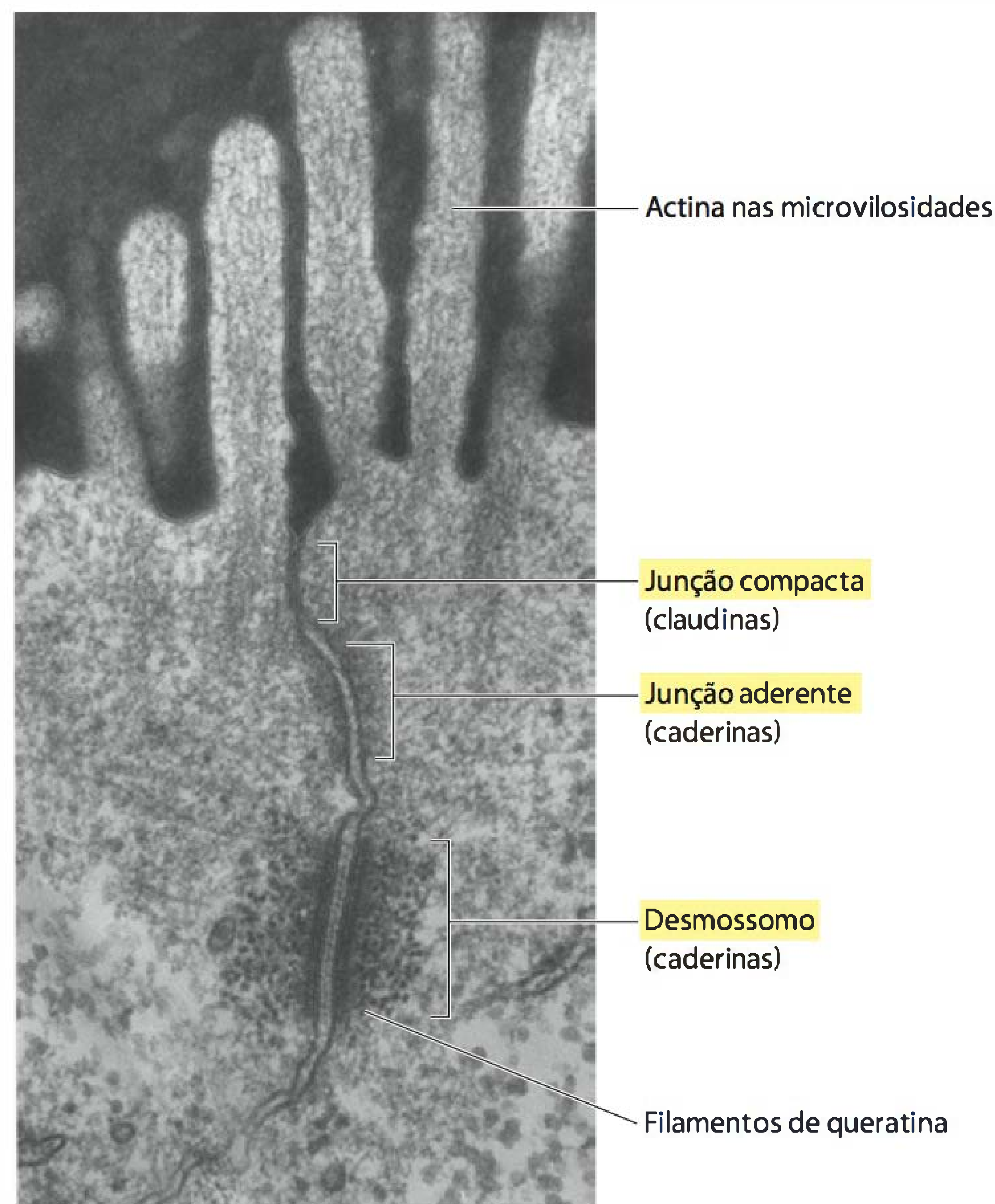


Figura 19-27 Complexo juncional entre duas células epiteliais que revestem o intestino. Na porção mais apical se encontra a junção compacta; abaixo dela, uma junção aderente; e abaixo da junção aderente, um desmossomo. Este exemplo é de vertebrado; nos insetos o arranjo é diferente. (Cortesia de Daniel S. Friend.)

ticorpos anticaderina que bloqueiam a formação das junções aderentes também bloqueiam a formação das junções compactas. Acredita-se que o posicionamento e a organização das junções compactas, em relação a essas outras estruturas, dependem da associação com as proteínas de sustentação intracelulares da família *Tjp* (*tight junction protein*), também denominadas *proteínas ZO* (uma junção compacta também é conhecida como *zona ocludente*). As proteínas Tjp dos vertebrados pertencem à mesma família das proteínas Discs-large mencionadas anteriormente por seu papel nas sinapses, e elas ancoram as fitas das junções compactas aos outros componentes, incluindo o citoesqueleto de actina.

Nos invertebrados, como os insetos e os moluscos, as junções ocludentes possuem diferentes aparências e são denominadas **junções septadas.** Como as junções compactas, elas formam um cinturão contínuo ao redor de cada célula epitelial, mas com estrutura mais regular, e as membranas plasmáticas que interagem são ligadas por proteínas organizadas em linhas paralelas com periodicidade regular (**Figura 19-28**). Todavia, as junções septadas têm como base em proteínas homólogas as claudinas dos vertebrados e dependem de proteínas de sustentação de maneira similar, incluindo a mesma proteína Discs-large presente nas sinapses. Moscas mutantes deficientes dessa proteína apresentam junções septadas defeituosas.

Surpreendentemente, estes mutantes também desenvolvem tumores epiteliais, na forma de grandes discos imaginários – as estruturas da larva da mosca das quais as regiões do corpo do adulto derivam (como descrito no Capítulo 22). O gene recebe este nome por esse efeito marcante, o qual depende da presença de sítios de ligação para os reguladores do crescimento da proteína Discs-large. No entanto, por que a estrutura de adesão célula-célula

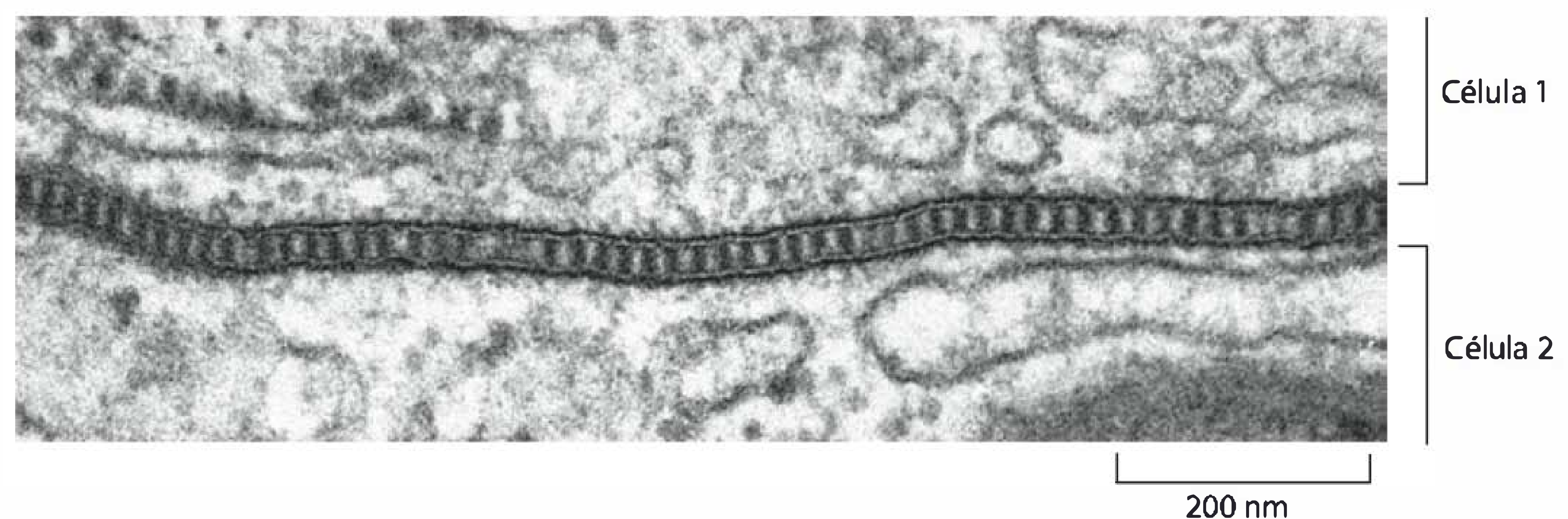


Figura 19-28 Uma junção septada. Eletromicrografia convencional de uma junção septada entre duas células epiteliais de um molusco. As membranas plasmáticas em interação, vistas em secção transversal, são ligadas por fileiras paralelas de proteínas juncionais. As fileiras, que apresentam periodicidade regular, são vistas como barras densas, ou septos. (De N. B. Gilula, em Cell Communication [R. P. Cox, ed.], pp. 1-29. New York: Wiley, 1974.)

deve estar ligada dessa maneira com o controle de proliferação celular? Este relacionamento parece ser fundamental: também nos vertebrados, genes homólogos ao *Discs-large* apresentam esta dupla função. Uma possibilidade é que ela reflete o mecanismo básico para o reparo e manutenção do epitélio. Se uma célula epitelial é destituída de contatos adesivos com suas vizinhas, seu programa de crescimento e a proliferação é ativado, criando novas células para reconstruir uma camada multicelular contínua. De fato, muitas evidências indicam que os complexos juncionais são importantes locais de sinalização célula-célula não somente pela proteína Discs-large mas também por outros componentes dessas estruturas, incluindo as caderinas já descritas.

As junções célula-célula e a lâmina basal governam a polaridade ápico-basal do epitélio

Em sua maioria, as células dos tecidos animais são altamente polarizadas. Elas possuem uma porção frontal, distinta da porção traseira, ou uma porção apical que difere da basal. Como exemplo, podemos citar todas as células epiteliais, como já discutido, bem como os neurônios com sua polaridade dendrito-axônio, os fibroblastos em migração e os leucócitos, com sua porção locomotora à frente e sua porção traseira sendo arrastada, e outras células nos embriões quando preparam-se para dividir assimetricamente criando células-filhas diferentes. Um grupo fundamental de componentes é crítico para a polaridade celular em todos esses casos, por todo o reino animal, desde os vermes e as moscas até os mamíferos.

No caso das células epiteliais, esses geradores fundamentais da polaridade celular devem estabelecer as diferenças entre os polos apical e basal, e devem fazê-lo de forma adequadamente orientada, de acordo com o que circunda a célula. O fenômeno básico é elegantemente ilustrado por experimentos com culturas de linhagens de células epiteliais denominadas células MDCK (**Figura 19-29**A). Elas podem ser separadas umas das outras e cultivadas em suspensão em um gel de colágeno. Uma única célula isolada nessas circunstâncias não apresenta uma polaridade óbvia, mas se puder se dividir para formar uma pequena colônia de células, elas se organizarão em vesículas epiteliais com um centro vazio, onde a polaridade de cada célula é claramente visível. A vesícula torna-se circundada por uma lâmina basal, e todas as células orientam-se da mesma maneira, com moléculas marcadoras específicas do ápice voltado para o lúmen. Evidentemente, as células MDCK possuem uma tendência espontânea de tornarem-se polarizadas, mas o mecanismo é cooperativo e depende do contato com as células vizinhas.

Para definir como os mecanismos moleculares subjacentes atuam, o primeiro passo é identificar seus componentes. Estudos com o verme *C. elegans* e com *Drosophila* têm sido muito informativos. No verme, a procura por mutações que perturbam a organização inicial do embrião revelou uma série de genes essenciais à polaridade e à assimetria normal das células durante a divisão celular (como discutido no Capítulo 22). Há pelo menos seis desses genes, denominados genes *Par* (*partitioning defective*). Em todas as espécies de animais estudadas, eles e seus homólogos (juntamente com outros genes descobertos em estudos com *Drosophila* e vertebrados) desempenham um papel fundamental não somente na divisão celular assimétrica no embrião inicial, mas em muitos outros processos de polarização celular, incluindo a polarização das células epiteliais. O gene *Par4* de *C. elegans*, por exemplo, é homólogo ao gene denominado *Lkb1* de mamíferos e *Drosophila*, que codifica para uma

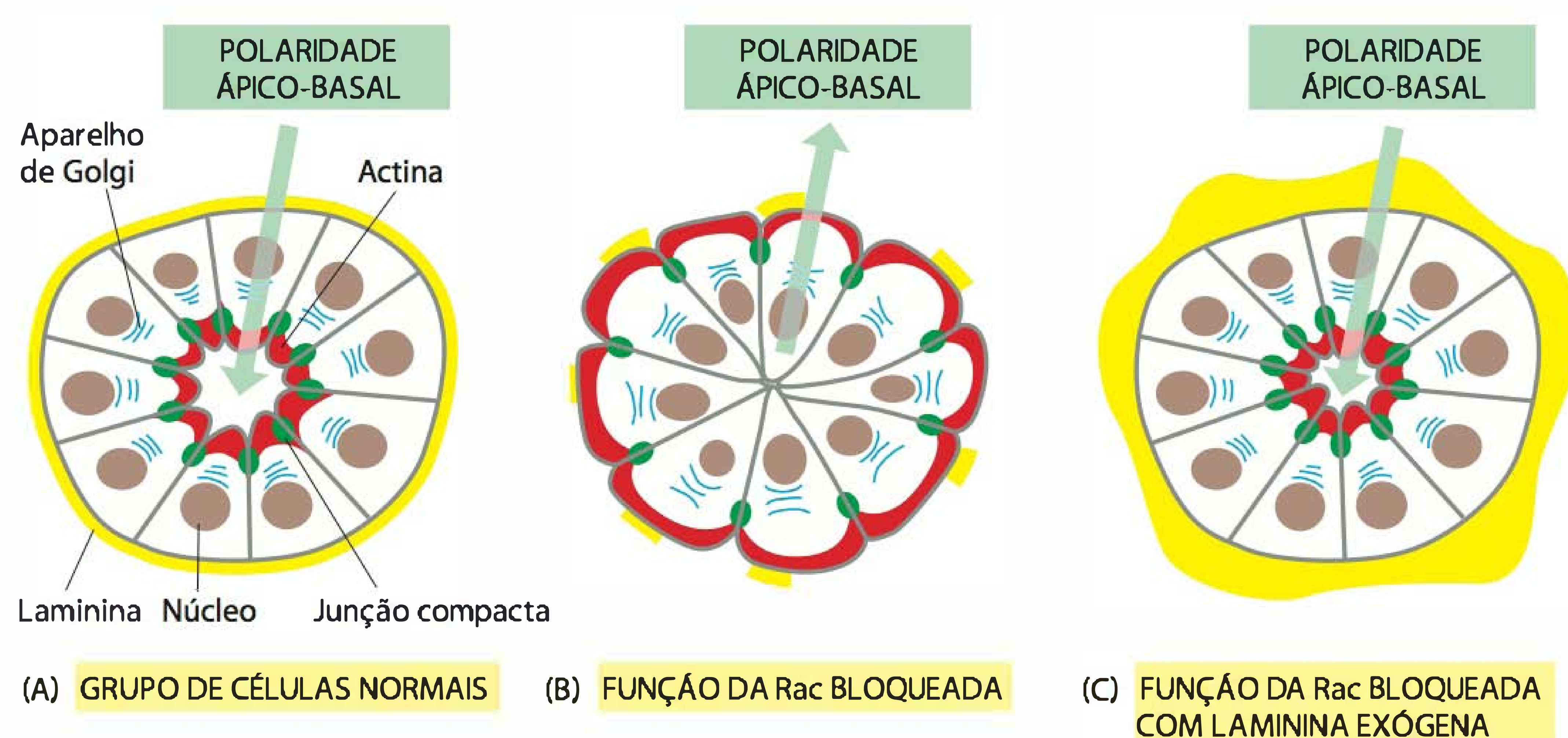


Figura 19-29 Polarização coordenada de um grupo de células epiteliais em cultura e sua dependência de Rac e laminina. As células da linhagem MDCK, derivadas do epitélio renal de cachorro, foram dissociadas, embebidas em matriz rica em colágeno e puderam proliferar, criando pequenas colônias isoladas representadas esquematicamente em uma secção transversal. (A) As células dessas colônias normalmente irão se organizar espontaneamente em um epitélio circundando uma cavidade central. A coloração para actina (a qual marca as microvilosidades apicais), proteína ZO1 (uma proteína da junção compacta), aparelho de Golgi e laminina (um componente da lâmina basal) mostra que as células tornam-se coordenadamente polarizadas, com os componentes apicais voltados para o lúmen da cavidade e os componentes basais voltados para o gel de colágeno. (B) Quando a função de Rac é bloqueada pela expressão de uma forma negativa dominante da proteína, as células apresentam uma polaridade invertida, não formam cisto com cavidade central e não depositam laminina de maneira normal ao redor da periferia do grupo de células. (C) Quando o cisto é embebido em uma matriz rica em laminina exógena, uma polaridade próxima do normal é restaurada, mesmo que a função da Rac ainda esteja bloqueada. (Com base em L. E. O'Brien et al., *Nat. Cell Biol.* 3:831-838, 2001. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

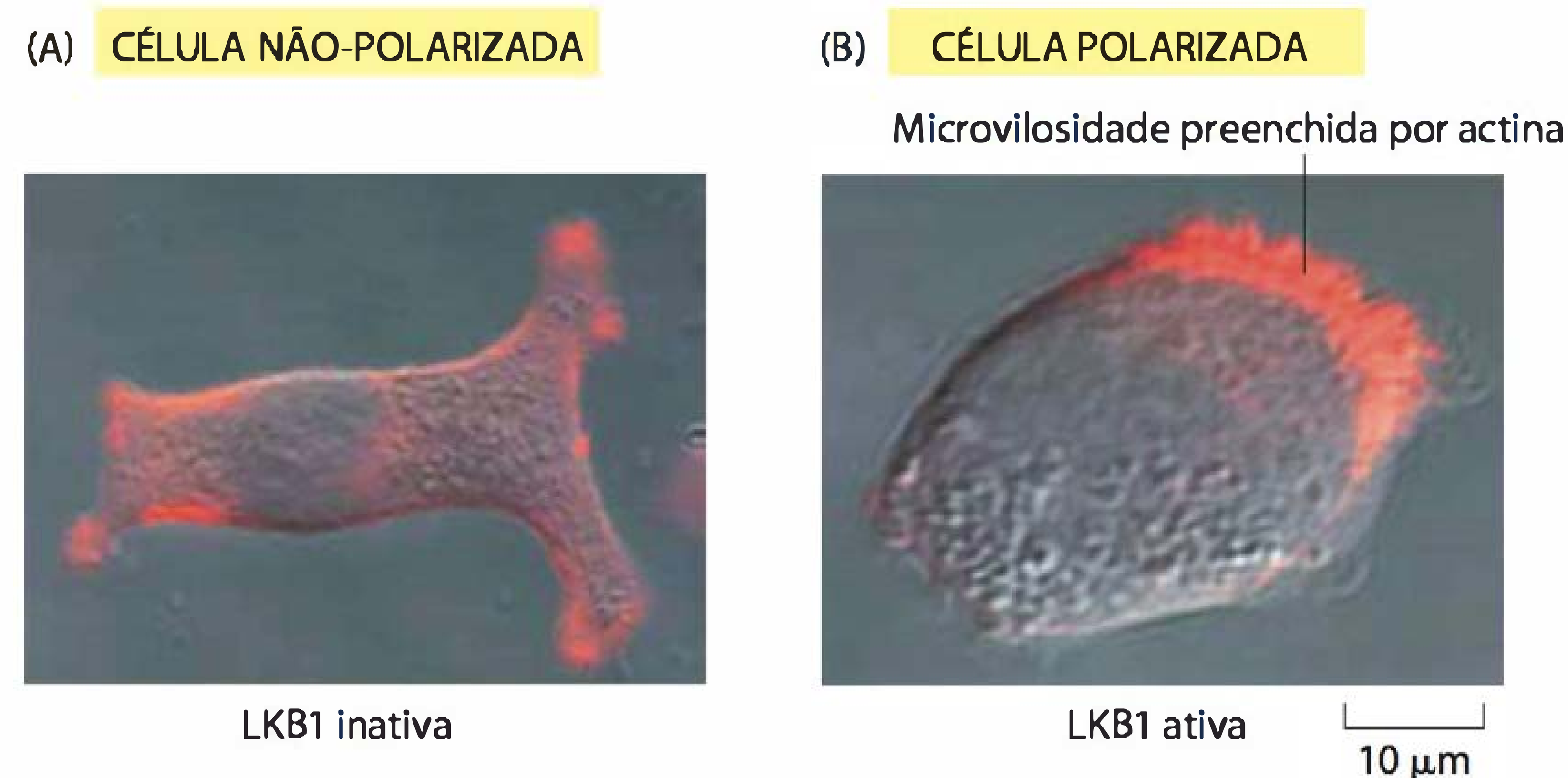


Figura 19-30 Desenvolvimento da polaridade em uma única célula epitelial. Células de uma linhagem derivada do epitélio intestinal foram transfectadas com DNA que codifica componentes reguladores pelos quais a atividade da proteína LKB1 pode ser ativada e desativada, mudando-se a composição do meio de cultura. Quando a atividade da LKB1 é baixa, as células não polarizam; quando a atividade é alta, elas tornam-se polarizadas. Sua polaridade está de acordo com a distribuição das proteínas da junção compacta (ZO1) e das junções aderentes (catenina p120), as quais se acumulam em um lado da célula, ao redor de uma microvilosidade preenchida por actina, mesmo que as células estejam isoladas e não façam adesão célula-célula. Essa polarização celular autônoma ocorre mesmo quando as células são cultivadas em suspensão, sem contato com qualquer substrato que possa sinalizar o lado superior. (De A. F. Baas et al., *Cell* 116:457-466, 2004. Com permissão de Elsevier.)

cinase serina/treonina. Nas moscas, mutações nesse gene destroem a polaridade da célula-ovo e das células epiteliais. No homem, tais mutações dão origem à *síndrome de Peutz-Jeghers*, envolvendo o crescimento anormal desordenado do revestimento do intestino e uma predisposição a certos tipos raros de câncer. Quando as células epiteliais do cólon humano são cultivadas, elas não expressam LKB1 e não polarizam normalmente. Além disso, quando tais células em cultura são artificialmente forçadas a expressar níveis de atividade anormalmente altos de LKB1, elas tornam-se individualmente polarizadas, mesmo quando isoladas das outras células e circundadas por um meio uniforme (**Figura 19-30**). Isso sugere que a polaridade do epitélio normal depende de dois mecanismos relacionados: um que confere uma tendência das células individuais tornarem-se polarizadas autonomamente, e outro que orienta seu eixo de polaridade em relação as suas vizinhas e à lâmina basal. Este último mecanismo pode ser peculiar ao epitélio, e o primeiro pode ser mais geral, atuando também em outros tipos de células polarizadas.

As moléculas certamente necessárias à polaridade do epitélio podem ser classificadas em relação a esses dois mecanismos gerais. Uma série de três proteínas associadas à membrana é fundamental para a polaridade das células animais individuais: **Par3**, **Par6** e a **proteína-cinase C atípica** (**aPKC**, ***atypical protein kinase C***). A Par3 e a Par6 são proteínas de sustentação que contêm domínios PDZ e ligam-se uma à outra e à aPKC. O complexo desses três componentes também possui sítios de ligação para várias outras moléculas, incluindo as pequenas GTPases Rac e Cdc42. Essas últimas são fundamentais. Assim, por exemplo, quando a função da Rac é bloqueada em um grupo de células MDCK, as células desenvolvem-se com uma polaridade invertida (ver Figura 19-29B). A Rac e a Cdc42 são reguladoras-chave na reunião da actina, como explicado no Capítulo 16. Parece que através delas a formação do complexo Par3-Par6-aPKC em uma região específica do córtex celular está associada à polarização do citoesqueleto para aquela região. O processo de reunião é evidentemente cooperativo e envolve uma resposta positiva e sinalização espacial, de modo que um pequeno grupo inicial desses componentes é capaz de recrutar mais componentes e inibir o desenvolvimento de grupos desse mesmo tipo em outros locais da célula. Uma fonte de resposta positiva pode ser decorrente do comportamento da Cdc42 ou da Rac. Uma alta atividade dessas moléculas em um determinado local, na organização do citoesqueleto, pode direcionar o transporte intracelular de modo a recrutar ainda mais Cdc42 ou Rac, ou mais de seus ativadores para o mesmo local. Esse fato parece ser essencial no mecanismo de polarização em células de levedura em brotamento, podendo ser o modo como os fibroblastos em migração estabelecem as diferenças entre sua extremidade locomotora frontal e o restante da periferia. Isso pode ser central à maquinaria de polarização das células eucarióticas, pelo menos em termos evolutivos.

O complexo Par3-Par6-aPKC, combinado com Cdc42 ou Rac, parece controlar a organização de outros complexos de proteínas associados à face interna da membrana celular. Em particular, nas células epiteliais, forma o *complexo Crumbs,* unido pelas proteínas de sustentação de domínio PDZ Discs-lost e Stardust, para posicionarem-se no ápice da célula enquanto que um terceiro complexo semelhante, denominado *complexo Scribble*, unido pelas proteínas de sustentação Scribble e Discs-large (a mesma proteína descrita anteriormente) localiza-se na porção mais basal (**Figura 19-31**). Essas várias proteínas reunidas interagem umas com as outras e com outros componentes celulares de maneira que apenas agora começamos a entender.

Mas como este sistema elaborado é orientado corretamente em relação às células vizinhas? Em um epitélio, o complexo Par3-Par6-aPKC reúne-se nas junções célula-célula – jun-

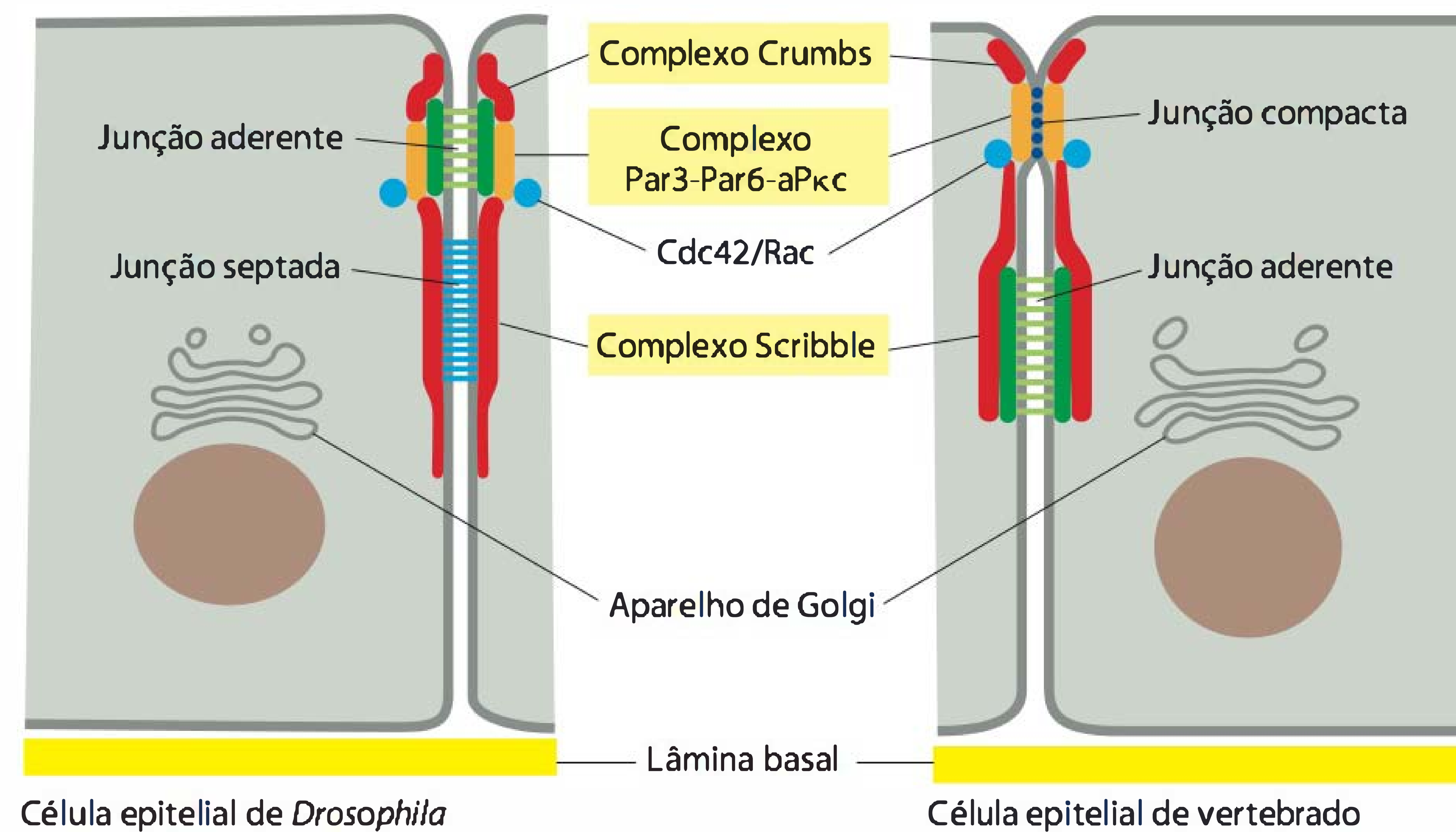


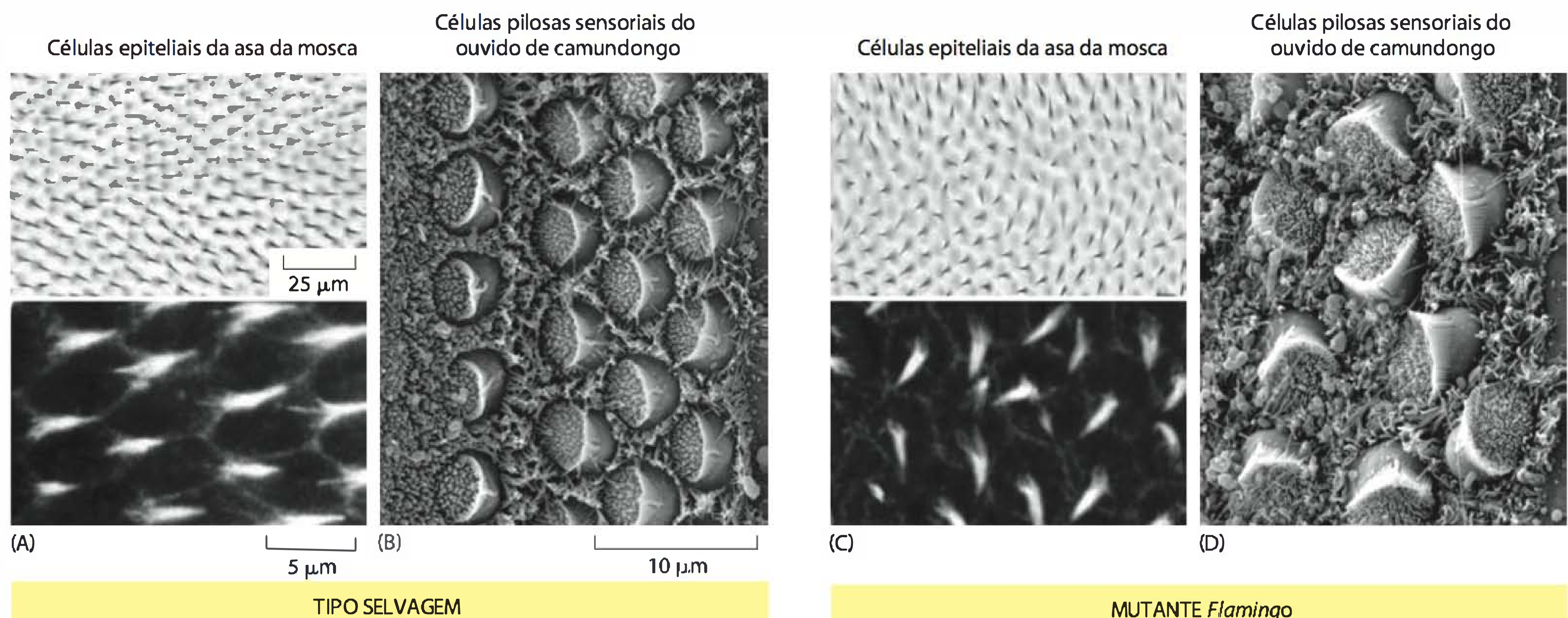
Figura 19-31 Arranjo coordenado do complexo de três proteínas de membrana associadas que é crítico para a polaridade epitelial. Uma célula epitelial de *Drosophila* é apresentada esquematicamente à esquerda, e uma célula epitelial de vertebrado, à direita. Todos os três complexos – o complexo Par3-Par6-aPκc, o complexo Crumbs e o complexo Scribble – estão organizados ao redor das proteínas de sustentação contendo domínios PDZ. A distribuição detalhada do complexo varia de acordo com o tipo celular.

ções compactas nos vertebrados, junções aderentes na *Drosophila* – porque as proteínas de sustentação do complexo ligam-se às caudas de certas proteínas de adesão transmembrana juncionais. Enquanto isso, o citoesqueleto, sob a influência de Rac e proteínas relacionadas, direciona os componentes da lâmina basal para a extremidade oposta da célula. Essas moléculas de matriz extracelular então atuam na célula conferindo uma característica basal a essa região (ver Figura 19-29C). Dessa maneira, a polaridade da célula é associada a sua orientação na camada epitelial em relação à lâmina basal.

Um sistema de sinalização independente controla a polaridade celular planar

A polaridade ápico-basal é uma característica universal do epitélio, mas as células de alguns epitélios apresentam uma polaridade adicional em ângulos retos com relação ao seu eixo. É como se elas possuíssem uma seta apontando em uma direção específica no plano do epitélio. Esse tipo de polaridade é denominado **polaridade celular planar** (**Figura 19-32**A e B). Nas asas das moscas, por exemplo, cada célula epitelial possui uma pequena projeção assimétrica, denominada pelo da asa, em sua superfície, e os pelos todos apontam em direção à ponta da asa. Igualmente, no ouvido interno dos vertebrados, cada célula pilosa mecanossensorial possui feixe assimétrico de estereocílios (protusões em forma de bastão preenchidas por actina) apontando a partir de sua superfície apical. O toque de um feixe em uma direção faz os canais iônicos se abrirem, estimulando a célula eletricamente, e o toque em outra direção tem efeito oposto. Para que o ouvido funcione corretamente, é preciso que suas células pilosas estejam orientadas corretamente. A polaridade celular planar também é importante no trato respiratório, por exemplo, onde cada célula ciliada deve

Figura 19-32 Polaridade celular planar. (A) Pelos na asa de uma mosca. Cada célula do epitélio piloso forma uma dessas pequenas protusões, ou "pelos", no seu ápice, e todos os pelos posicionam-se em direção à ponta da asa. Isso reflete a polarização planar na estrutura de cada célula. (B) Células pilosas sensoriais do ouvido interno de camundongo também apresentam uma polaridade planar bem-definida, por meio do padrão de orientação dos estereocílios (protusões preenchidas com actina) em sua superfície. A detecção do som depende da orientação coordenada e correta das células pilosas. (C) Uma mutação no gene *Flamingo* da mosca, que codifica uma caderina não-clássica, rompe o padrão de polaridade celular planar das asas. (D) Uma mutação em um gene homólogo ao *Flamingo*, em camundongo, randomiza a orientação vetorial da polaridade celular planar das células pilosas do ouvido. O animal mutante é surdo. (A e C, de J. Chae et al., *Development* 126:5421-5429, 1999. Com permissão de The Company of Biologists; B e D, de J. A. Curtin et al., *Curr. Biol.* 13:1129-1133, 2003. Com permissão de Elsevier.)



orientar seus pelos de modo que varram o muco para fora dos pulmões e não para dentro deles (ver Capítulo 23).

O estudo de mutantes com alterações no pelo das asas em *Drosophila* permitiu a identificação de uma série de genes críticos à polaridade celular planar das moscas. Alguns deles, como o *Frizzled* e o *Dishevelled*, codificam proteínas que são componentes da via de sinalização Wnt (discutido no Capítulo 15). Outros dois, o *Flamingo* (ver Figura 19-32C) e o *Dachsous*, codificam membros da superfamília das caderinas. Outros ainda são mais difíceis de serem classificadas funcionalmente, mas está claro que a polaridade celular planar é organizada por uma maquinaria formada por esses componentes e reunida nas junções célula-célula de modo que a influência da polarização pode se propagar de célula a célula. Essencialmente, o mesmo sistema de proteínas controla a polaridade celular planar nos vertebrados. Camundongos com mutações em genes homólogos ao *Flamingo*, por exemplo, possuem células com pelos na orientação incorreta em seus ouvidos (entre outros defeitos) e, portanto, são surdos (ver Figura 19-32D).

Resumo

As junções ocludentes e as junções compactas nos vertebrados e as junções septadas nos insetos e nos moluscos fecham os espaços entre as células do epitélio, criando uma barreira contra a difusão de moléculas através da camada celular. Elas também formam uma barreira contra a difusão de proteínas no plano da membrana, auxiliando na manutenção das diferentes populações de proteínas nos domínios de membrana apicais e basolaterais da célula epitelial. A principal proteína transmembrana formadora das junções ocludentes é a claudina, e diferentes membros dessa família são expressos em diferentes tecidos, conferindo permeabilidades distintas às várias camadas epiteliais.

As proteínas de sustentação intracelular ligam-se aos componentes da membrana nas junções ocludentes e coordenam estas junções com as junções de ancoramento com base em caderinas, de modo a criar um complexo juncional. As proteínas de sustentação juncional possuem pelo menos mais duas funções cruciais. Elas atuam no controle da proliferação das células epiteliais e, juntamente com outras moléculas reguladoras como a Rac e Cdc42, governam a polaridade celular. As células epiteliais possuem uma tendência intrínseca de desenvolver um eixo de polaridade ápico-basal. A orientação desse eixo, com relação às células vizinhas da camada epitelial, depende de um complexo de proteínas envolvendo proteínas de sustentação que se reúnem nas junções célula-célula, bem como da polarização do citoesqueleto controlada por Rac/Cdc42 e da influência da lâmina basal.

As células de alguns epitélios possuem uma polaridade adicional no plano do epitélio, em ângulos retos com relação ao eixo ápico-basal. Uma série independente de proteínas conservadas, que atuam de forma similar em vertebrados e insetos, controla esta polaridade celular planar por meio de processos de sinalização ainda não muito bem compreendidos, que também têm como base as junções célula-célula.

PASSAGEM DE CÉLULA PARA CÉLULA: JUNÇÕES TIPO FENDA E PLASMODESMATA

As junções compactas bloqueiam a passagem pelos espaços entre as células, impedindo que moléculas extracelulares passem de um lado do epitélio para o outro. Um outro tipo de estrutura juncional possui uma função radicalmente diferente: ele faz pontes entre células adjacentes criando passagens diretas do citoplasma de uma célula para o de outra. Essas passagens são muito diferentes nos tecidos animais, onde recebem o nome de *junções tipo fenda,* e nas plantas, onde recebem o nome de *plasmodesmata* (plasmodesma no singular). Entretanto, nos dois casos, a função é similar: as conexões permitem que as células vizinhas troquem pequenas moléculas, mas não macromoléculas (com algumas exceções para os plasmodesmata). Muitas das implicações dessas ligações celulares somente agora estão sendo mais bem compreendidas.

As junções tipo fenda ligam as células de forma elétrica e metabólica

As junções tipo fenda estão presentes na maioria dos tecidos animais, incluindo o tecido conectivo e o epitelial, e permitem que as células se comuniquem com as células vizinhas.

Cada junção tipo fenda aparece nas micrografias eletrônicas convencionais como uma mancha onde as membranas das duas células adjacentes estão separadas por um espaço uniforme de cerca de 2 a 4 nm. A fenda é formada por proteínas formadoras de canais de duas famílias distintas denominadas *conexinas* e *inexinas*. Essas proteínas não são similares em sequência, mas sim na forma e na função. As duas famílias estão presentes nos vertebrados com o predomínio das conexinas, apresentando 21 membros no homem. Na *Drosophila* e em *C. elegans,* ocorrem apenas as inexinas, com 15 membros nas moscas e 25 nos vermes.

Os canais formados pelas proteínas das junções tipo fenda permitem que íons inorgânicos e outras pequenas moléculas solúveis em água passem diretamente do citoplasma de uma célula para o citoplasma de outra, conectando as células de forma elétrica e metabólica. Assim, quando um corante adequado é injetado em uma célula, ele se difunde facilmente para a outra sem escapar para o espaço extracelular. Igualmente, uma corrente elétrica injetada em um célula com o auxílio de um microeletrodo causa um distúrbio elétrico quase instantâneo na célula vizinha, devido ao fluxo de íons carregando a carga elétrica através da junção tipo fenda. Com microeletrodos inseridos nas duas células, pode-se monitorar facilmente esse efeito e medir as propriedades das junções tipo fenda como a resistência elétrica e o modo como a ligação muda com a mudança nas condições. De fato, uma das primeiras evidências das comunicações juncionais tipo fenda foi obtida em estudos eletrofisiológicos que demonstraram esse tipo de conexão elétrica direta e rápida entre alguns tipos de neurônios. Métodos similares foram usados para identificar as conexinas como proteínas que medeiam a comunicação das junções tipo fenda. Quando o RNA mensageiro (mRNA) da conexina era injetado em oócitos de sapo ou em células em cultura deficiente em junções tipo fenda, canais com as propriedades esperadas para as junções tipo fenda podiam ser eletrofisiologicamente comprovados nos contatos entre pares de células injetadas.

Experimentos com injeção de moléculas corantes de diferentes tamanhos mostraram que o maior tamanho do poro funcional dos canais das junções tipo fenda é de 1,5 nm. Assim, as células ligadas compartilham pequenas moléculas (como íons inorgânicos, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e mediadores de AMP cíclico e trifosfato de inositol), mas não macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos) (**Figura 19-33**).

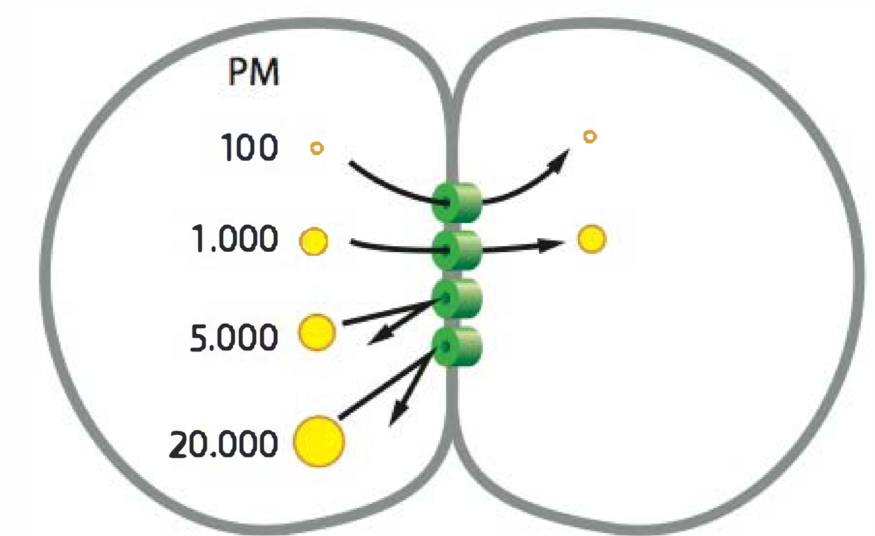


Figura 19-33 Determinação do tamanho de um canal de junção tipo fenda. Quando moléculas fluorescentes de vários tamanhos são injetadas em uma das duas células ligadas por uma junção do tipo fenda, apenas as moléculas menores que 1.000 dáltons podem passar para a outra célula; as moléculas maiores não passam.

A conexão da junção tipo fenda é constituída por até seis subunidades de conexinas transmembrana

As **conexinas** são proteínas com quatro porções transmembrana, seis das quais se unem para formar um *hemicanal*, ou **conéxon**. Quandos os conéxons na membrana plasmática de duas células em contato são alinhados, eles formam um canal aquoso contínuo que conecta os dois interiores celulares (**Figuras 19-34A** e **19-35**). As junções tipo fenda consistem em muitos de tais pares de conexons em paralelo que formam um tipo de peneira molecular. Os conéxons mantêm as membranas plasmáticas de células vizinhas a uma distância fixa – por isso, fenda.

As junções tipo fenda de diferentes tecidos podem ter propriedades distintas porque são formadas de diferentes combinações de conexinas, criando canais que diferem em permeabilidade. A maioria dos tipos celulares expressa mais de um tipo de conexina, e duas proteínas conexinas diferentes podem se unir em uma conexão heteromérica com suas próprias

Figura 19-34 Junções tipo fenda. (A) O desenho tridimensional mostra as membranas plasmáticas de duas células adjacentes interagindo. Cada bicamada lipídica é apresentada como um par de folhas vermelhas. Os agrupamentos de proteínas são chamados de conéxons (*verde*), cada um formado por seis subunidades de conexinas, penetram a bicamada oposta (*vermelho*). Dois conéxons unem-se pelo espaço intercelular, formando um canal aquoso contínuo que conecta as duas células. (B) A organização das conexinas em conéxons e dos conéxons em canais intercelulares. Os conéxons podem ser heteroméricos ou homoméricos, e os canais intercelulares podem ser homotípicos ou heterotípicos.



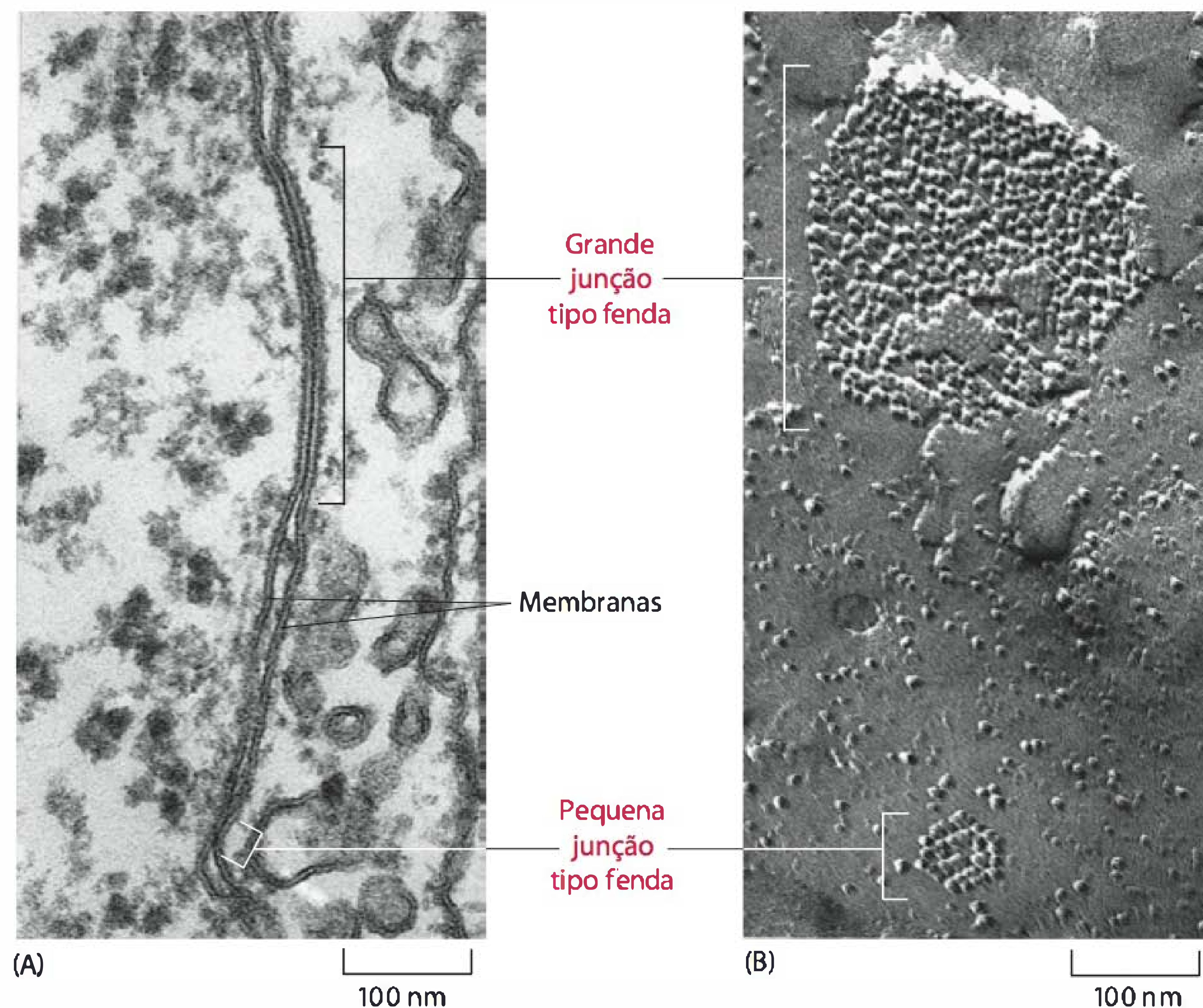


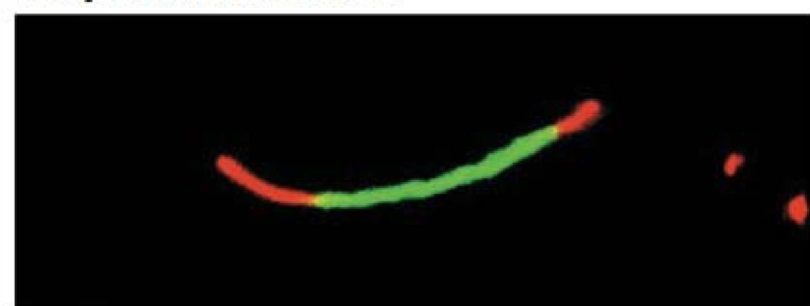
Figura 19-35 Junções tipo fenda vistas ao microscópio eletrônico. Eletromicrografia em secção fina (A) e criofratura (B) de duas junções tipo fenda, pequena e grande, entre fibroblastos em cultura. Em (B), cada junção é visualizada como um aglomerado de partículas homogêneas intramembrana associadas exclusivamente à face citoplasmática. Cada partícula intramembrana corresponde a um conéxon. (De N. B. Gilula, em Cell Communication [R. P. Cox, ed.], p. 1-29. New York: Wiley, 1974.)

propriedades distintas. Além disso, células adjacentes que expressam diferentes conexinas podem formar canais intercelulares nos quais os dois hemicanais alinhados são diferentes (Figura 19-34B).

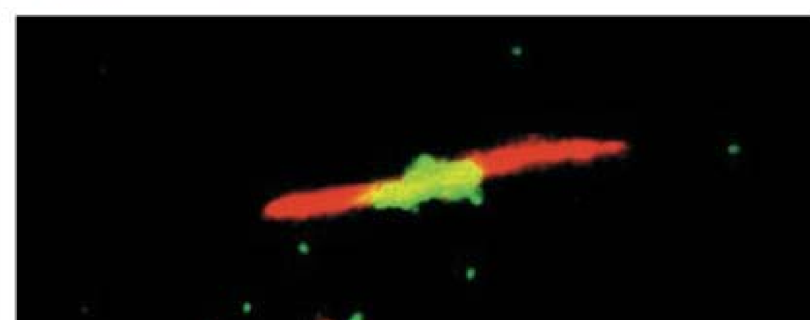
Cada placa de junção tipo fenda é uma estrutura dinâmica que pode reunir-se facilmente e dissociar-se ou ser remodelada, podendo ser formada por agrupamentos de poucos ou até centenas de conéxons (Figura 19-35B). Estudos com conexinas marcadas com fluoróforos em células vivas mostraram que novos conéxons são constantemente adicionados à periferia de uma placa juncional, enquanto os velhos conéxons são removidos do interior e destruídos (**Figura 19-36**). Esta renovação é rápida: as moléculas de conexinas têm meia-vida de poucas horas.

O mecanismo de remoção dos velhos conéxons do meio interior da placa não é conhecido, mas a via de liberação de novos conéxons para a periferia parece clara. Eles são inseridos na membrana plasmática por exocitose, como as outras proteínas integrais de mem-

SECÇÃO TRANSVERSAL

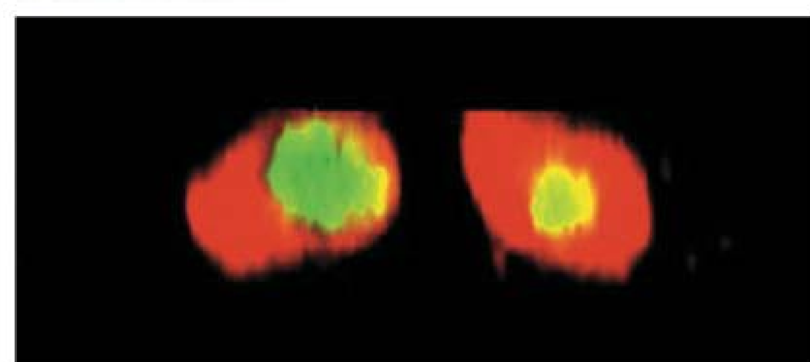


4 h de incubação



8 h de incubação
1 μm

VISTA SUPERIOR



8 h de incubação
2 μm

Figura 19-36 Renovação das conexinas na junção tipo fenda. As células foram transfectadas com um gene de conexina levemente modificado, que codifica uma conexina com uma pequena cauda de aminoácido contendo quatro cisteínas em sua sequência ...Cys-Cys-X-X-Cys-Cys (onde X significa qualquer aminoácido). Esta *cauda de tetracisteína* pode realizar uma ligação forte e irreversível a determinadas pequenas moléculas de corantes fluorescentes que podem ser adicionadas ao meio de cultura e entrar facilmente na célula por difusão através da membrana plasmática. No experimento apresentado, primeiro foi adicionado um corante verde, e as células foram lavadas e incubadas por 4 ou 8 horas. Após este período, foi adicionado um corante vermelho, e as células foram novamente lavadas e fixadas. As moléculas de conexina presentes no início do experimento eram marcadas em verde (e não absorviam corante vermelho porque suas caudas de tetracisteína já estavam saturadas com o corante verde), enquanto que as conexinas sintetizadas subsequentemente, durante as 4 a 8 horas de incubação, eram marcadas em vermelho. As imagens de fluorescência mostram secções ópticas das junções tipo fenda entre os pares de células preparadas dessa forma. A porção central da junção tipo fenda é *verde*, indicando que é formada por moléculas de conexinas antigas, enquanto que a periferia é *vermelha*, indicando que é formada por moléculas de conexina sintetizadas durante as últimas 4 ou 8 horas de incubação. Quanto maior o tempo de incubação, menor a mancha verde central das velhas moléculas e maior é o anel vermelho das novas moléculas na periferia, recrutadas para substituí-las. (De G. Gaietta et al. *Science* 296:503-507, 2002. Com permissão de AAAS.)

brana, e então se difundem no plano da membrana até chegaram à periferia de uma placa e tornarem-se aprisionados. Como resultado, a membrana plasmática distante da junção tipo fenda deve ter conéxons, hemicanais, que ainda não parearam com seus correspondentes na outra célula. Acredita-se que esses hemicanais ainda não-pareados sejam mantidos em uma conformação muito próxima, impedindo que a célula perca suas pequenas moléculas pelo vazamento entre eles. No entanto, também há evidências de que, em algumas circunstâncias fisiológicas, eles podem se abrir e servir como canais para a liberação de pequenas moléculas, como o neurotransmissor glutamato, para o exterior ou para a entrada de pequenas moléculas para o interior da célula.

As junções tipo fenda possuem diversas funções

Nos tecidos contendo células eletricamente excitáveis, a ligação através das junções tipo fenda tem uma função óbvia. Algumas células nervosas, por exemplo, são ligadas eletricamente, permitindo que ações potenciais espalhem-se rapidamente de uma célula à outra, sem a demora que ocorre nas sinapses químicas. Isso é vantajoso quando a velocidade e a precisão são cruciais, como no caso de certas respostas de escape nos peixes e nos insetos. Igualmente, nos vertebrados, a ligação elétrica através das junções tipo fenda sincroniza as contrações das células do músculo cardíaco e do músculo liso, responsáveis pelos movimentos peristálticos do intestino.

As junções tipo fenda também ocorrem em muitos tecidos que não contêm células eletricamente excitáveis. Em princípio, compartilhar pequenos metabólitos e íons confere mecanismos para coordenar as atividades das células individuais em determinados tecidos e homogeneizar flutuações ao acaso na concentração de pequenas moléculas em diferentes células. As junções tipo fenda são necessárias no fígado, por exemplo, para coordenar a resposta dos hepatócitos aos sinais nos terminais nervosos que contactam somente uma parte da população celular (ver Figura 15-7). O desenvolvimento normal dos folículos ovarianos também depende das comunicações mediadas pelas junções tipo fenda, nesse caso, entre os oócitos e as células circundantes da granulosa. Uma mutação no gene que codifica a conexina que, normalmente, conecta estes dois tipos celulares causa infertilidade.

Mutações nas conexinas, principalmente na conexina-26, são as mais comuns de todas as causas genéticas da surdez congênita: elas resultam na morte das células do órgão de Corti, provavelmente porque rompem importantes vias funcionais para o fluxo de íons de uma célula a outra neste epitélio sensorial eletricamente ativo. As mutações nas conexinas são responsáveis por muitas outras desordens além da surdez, variando desde catarata na lente dos olhos até uma forma de doença desmielinizante nos nervos periféricos.

As ligações celulares através das junções tipo fenda também parecem importantes na embriogênese. No embrião dos vertebrados, iniciando no final do estágio de oito células do embrião de camundongo, em sua maioria as células estão eletricamente ligadas umas às outras. À medida que grupos específicos de células no embrião desenvolvem suas identidades distintas e se diferenciam, eles se desconectam dos tecidos vizinhos. Quando a placa neuronal começa a dobrar e emitir protuberâncias, para formar o tubo neural (ver Figura 19-16), suas células se desconectam das camadas ectodérmicas subjacentes. Enquanto isso, as células de cada grupo permanecem conectadas umas às outras e tendem a se comportar como uma união cooperativa, todas seguindo uma via de desenvolvimento similar de forma coordenada.

As células podem regular a permeabilidade das junções tipo fenda

Como os canais iônicos convencionais (discutido no Capítulo 11), os canais das junções tipo fenda individuais não permanecem abertos continuamente; ao invés disso, eles abrem e fecham continuamente. Além disso, a permeabilidade das junções tipo fenda é reduzida de forma rápida (em segundos) e reversível por manipulações experimentais que diminuem o pH citoplasmático ou aumentam as concentrações de Ca^{2+} livre para níveis elevados.

O propósito da permeabilidade da junção tipo fenda na regulação do pH é desconhecido. Em um caso, o propósito do controle do Ca^{2+} está claro. Quando a célula é danificada, sua membrana plasmática torna-se permeável. Os íons presentes em altas concentrações no fluido extracelular, como Ca^{2+} e Na^{+}, entram para o interior da célula, e os metabólitos importantes vazam delas. Se a célula permanece conectada a sua vizinha saudável, esta

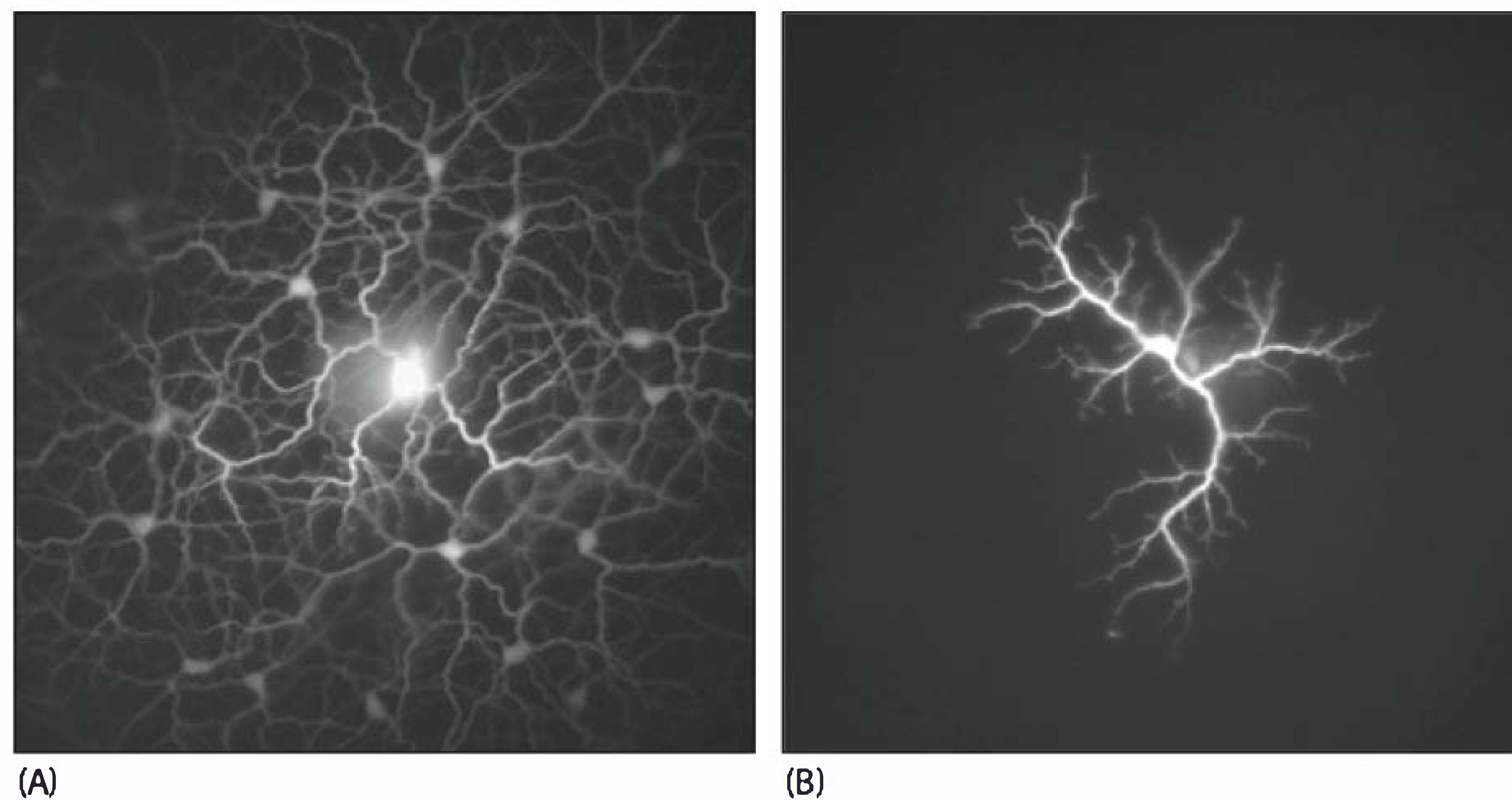


Figura 19-37 Regulação da junção tipo fenda por um neurotransmissor. (A) Um neurônio da retina de coelho foi injetado com o corante amarelo Lúcifer, o qual passa facilmente pelas junções tipo fenda e marca outros neurônios do mesmo tipo que estão conectados à célula injetada por junções tipo fenda. (B) A retina foi tratada com o neurotransmissor dopamina, antes de se injetar o corante. Como pode ser observado, o tratamento com dopamina diminui a permeabilidade das junções tipo fenda. A dopamina atua aumentando os níveis do AMP cíclico intracelular. (Cortesia de David Vaney.)

também irá sofrer grandes distúrbios em sua composição química interna. O grande influxo de Ca^{2+} para o interior da célula danificada causa o fechamento imediato dos canais das junções tipo fenda, isolando a célula e prevenindo que o dano se espalhe para as outras células.

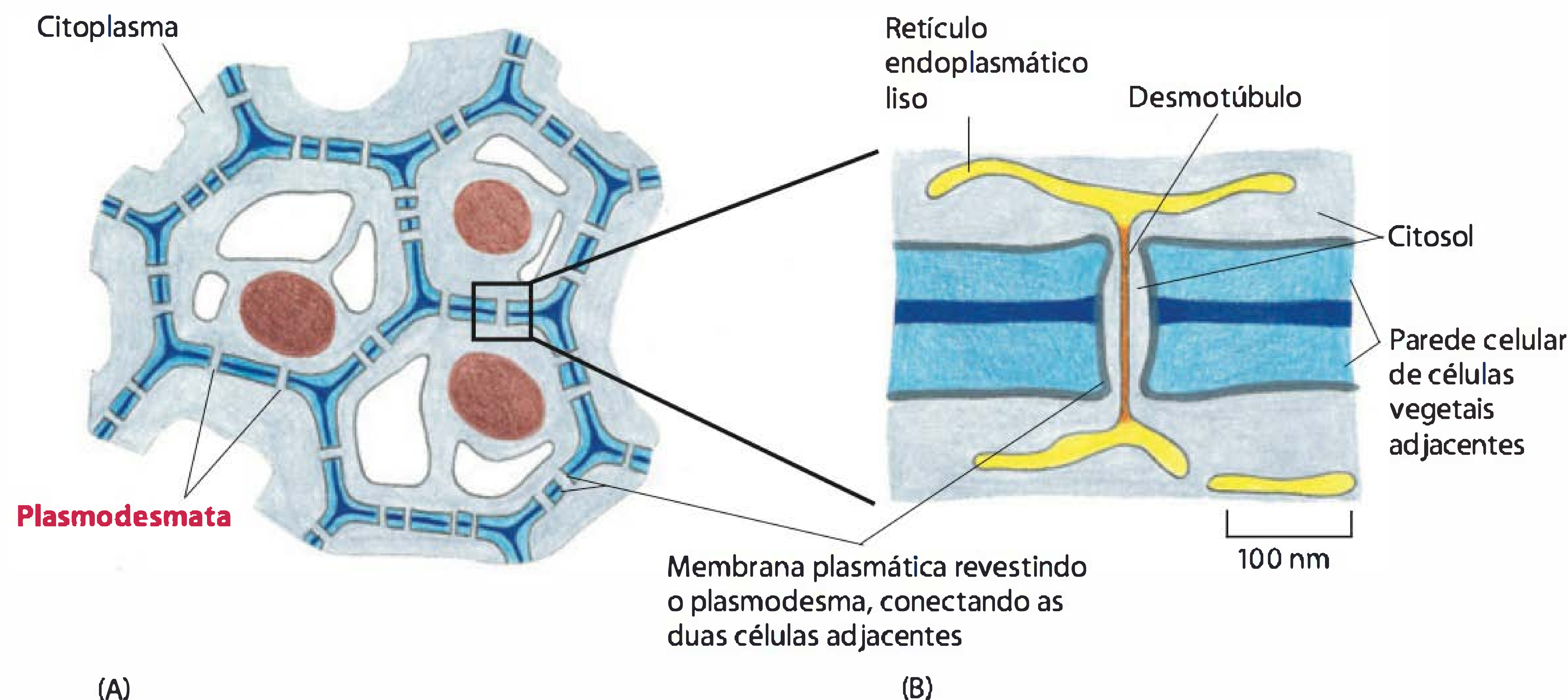
As comunicações das junções tipo fenda também podem ser reguladas por sinais extracelulares. O neurotransmissor *dopamina*, por exemplo, reduz a comunicação da junção tipo fenda entre uma classe de neurônios da retina em resposta ao aumento da intensidade da luz (**Figura 19-37**). Essa redução na permeabilidade na junção tipo fenda auxilia a retina a intercalar o uso de fotorreceptores em bastão, os quais são bons receptores para pouca luz, com o uso de fotorreceptores cônicos, os quais detectam a cor e detalhes finos na luz brilhante.

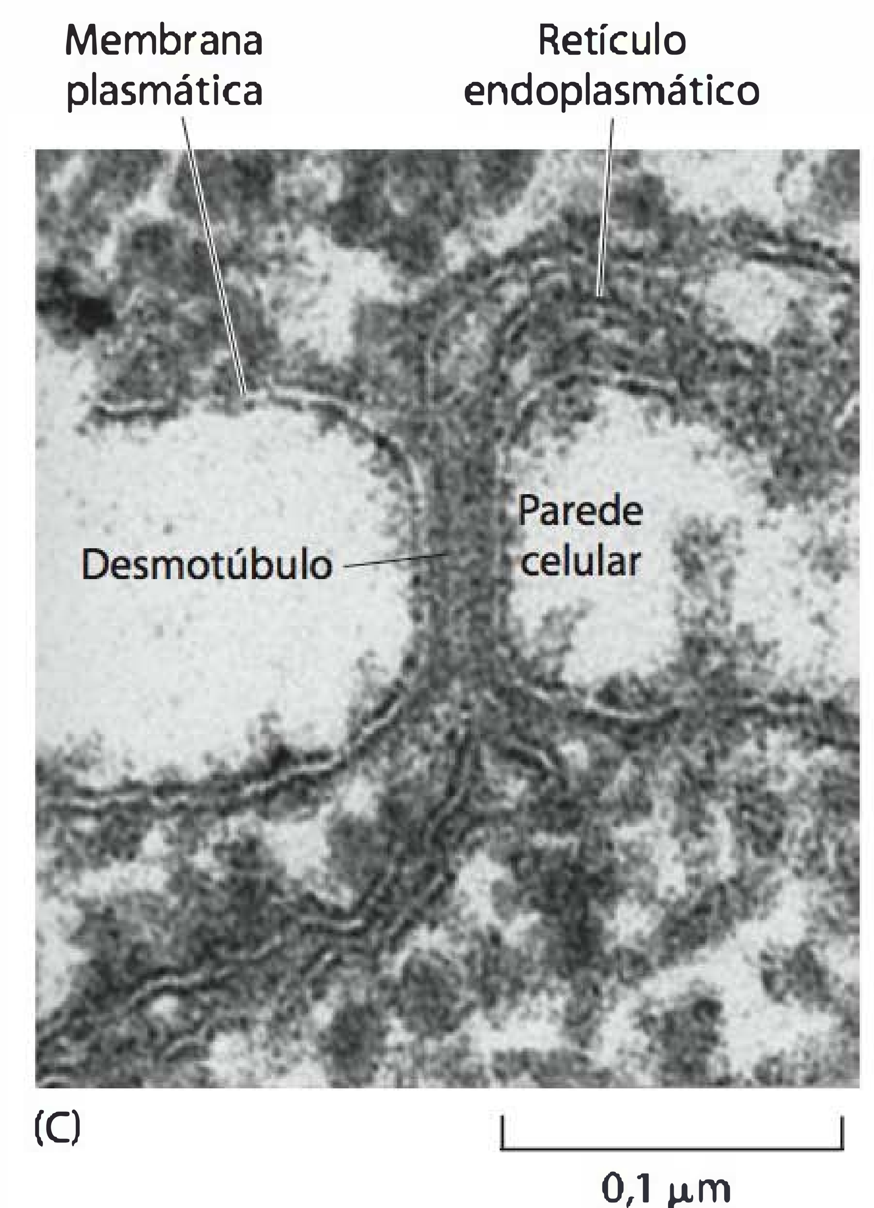
Nas plantas, os plasmodesmata realizam muitas das funções das junções tipo fenda

Os tecidos de uma planta estão organizados por princípios diferentes daqueles dos animais. Isso ocorre porque as células das plantas estão aprisionadas dentro de uma *parede celular* rígida composta por uma matriz extracelular rica em celulose e outros polissacarídeos, como veremos mais tarde. A parede celular das células adjacentes é firmemente fixada às suas vizinhas, eliminando a necessidade de as junções de ancoramento manterem as células no lugar. No entanto, a necessidade de contato célula-célula permanece. Assim, as células vegetais possuem somente uma classe de junções intercelulares, os **plasmodesmata**. Como as junções tipo fenda, eles conectam diretamente o citoplasma de duas células adjacentes.

Nas plantas, entretanto, a parede celular entre um típico par de células adjacentes tem pelo menos 0,1 μm de espessura, e assim uma estrutura muito diferente da junção tipo fenda é necessária para mediar a comunicação através dela. Os plasmodesmata solucionam o problema. Com poucas exceções especializadas, cada célula viva em uma planta superior é conectada a sua vizinha por essas estruturas, as quais formam finos canais citoplasmáticos através da parede celular. Como mostrado na **Figura 19-38**A, a membrana plasmática de uma célula é contínua com a de sua vizinha em cada plasmodesma, e o citoplasma das duas células é conectado por um canal mais ou menos cilíndrico, com um diâmetro de 20 a 40 nm.

No interior do canal da maioria dos plasmodesmata há uma estrutura cilíndrica mais estreita, o *desmotúbulo*, o qual é contínuo com o retículo endoplasmático liso de cada célula (Figura 19-38B-D). Entre a porção externa do desmotúbulo e a face interna do canal cilíndrico formado pela membrana plasmática há um anel de citosol através do qual pequenas moléculas passam de uma célula a outra. Como cada parede celular é formada na fase de citocinese durante a divisão celular, os plasmodesmata também são criados nesta fase. Eles se formam ao redor do retículo endoplasmático liso que se torna aprisionado na placa celular em desenvolvimento (discutido no Capítulo 17). Eles também podem se inserir *de novo* em paredes celulares preexistentes, onde normalmente são encontrados como agrupamentos denominados *campos minados*. Os plasmodesmata podem ser removidos quando não são mais necessários.





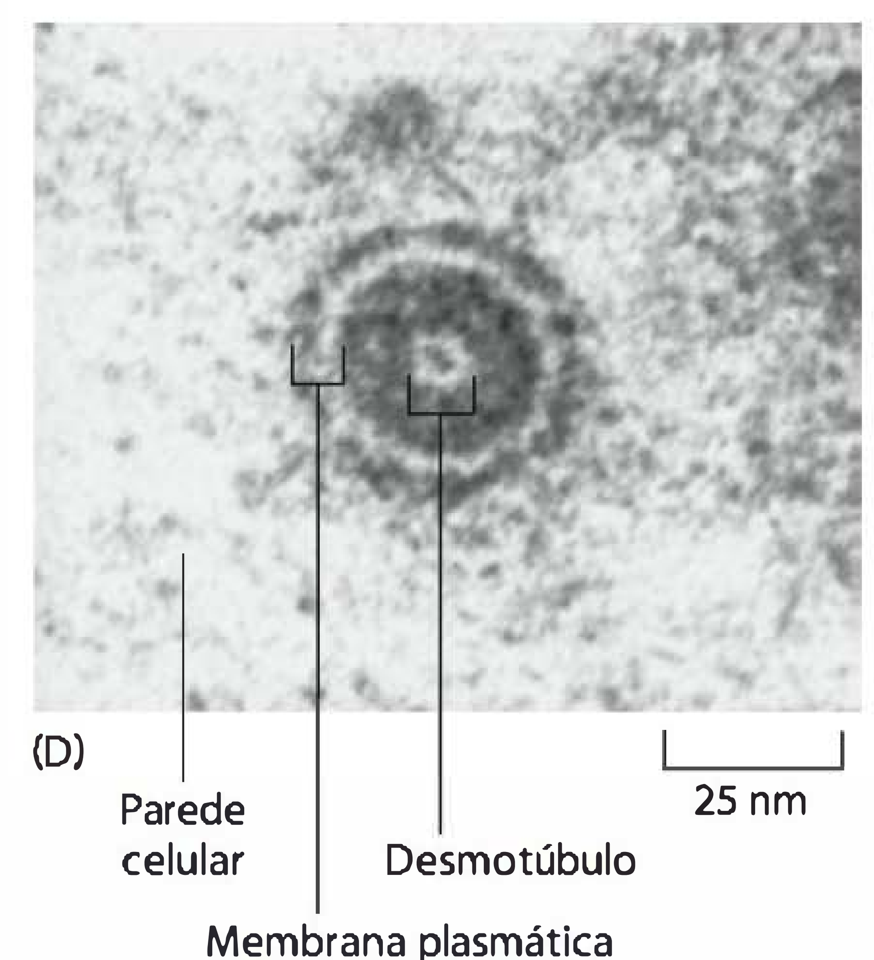


Figura 19-38 Plasmodesmata. (A) Os canais citoplasmáticos dos plasmodesmata furam a parede da célula vegetal e conectam todas as células da planta. (B) Cada plasmodesma é revestido com uma membrana plasmática comum às duas células ligadas. Normalmente, o plasmodesma também contém uma estrutura tubular fina, o desmotúbulo, derivado do retículo endoplasmático liso. (C) Eletromicrografia de uma secção longitudinal de um plasmodesma de samambaia. A membrana plasmática forra os poros e é contínua entre as células. Pode-se observar a associação do retículo endoplasmático com os desmotúbulos centrais. (D) Plasmodesma similar visto em secção transversal. (C e D, de R. Overall, J. Wolfe e B. E. S. Gunning, em Protoplasma 9, p. 137 e 140. Heidelberg, Springer-Verlag, 1982.)

Apesar da diferença radical em estrutura entre os plasmodesmata e as junções tipo fenda, eles parecem atuar de forma similar. Evidências obtidas em experimentos onde são injetadas moléculas marcadoras de diferentes tamanhos sugerem que os plasmodesmata permitem a passagem de moléculas com peso molecular abaixo de 800, o que é similar ao tamanho permitido pelas junções tipo fenda. O transporte através dos plasmodesmata é regulado como nas junções tipo fenda. Experimentos com injeção de corantes mostram que podem haver barreiras à passagem mesmo de moléculas de baixo peso molecular entre certas células ou um grupo de células conectadas por plasmodesmata aparentemente normais. O mecanismo que restringe a comunicação nesses casos não é conhecido.

Durante o desenvolvimento da planta, grupos de células do meristema dos brotos e da raiz sinalizam uns aos outros no processo de definição de seu futuro (discutido no Capítulo 22). Alguns genes de proteínas reguladoras envolvidas neste processo de determinação do destino celular passam de célula a célula através dos plasmodesmata. Eles se ligam aos componentes dos plasmodesmata e desconsideram o mecanismo de exclusão de tamanho que deveria prevenir sua passagem. Em alguns casos, o mRNA que codifica a proteína também pode passar. Alguns vírus de plantas exploram esta via. O RNA viral infeccioso ou mesmo o vírus intacto pode passar de uma célula a outra por essa via. Esses vírus produzem proteínas que se ligam aos componentes do plasmodesmata para aumentar dramaticamente o tamanho do poro do canal. Como os componentes funcionais dos plasmodesmata são desconhecidos, ainda não está claro como macromoléculas virais ou endógenas regulam as propriedades de transporte do canal para passarem por eles.

Resumo

As células de muitos tecidos animais, tanto epiteliais como não-epiteliais, são ligadas por junções formadoras de canais denominadas junções tipo fenda. Estas junções possuem a forma de agregados de conéxons que permitem que pequenas moléculas, menores que 1.000 dáltons, passem diretamente do interior de uma célula para o interior de outra célula. As células podem regular a permeabilidade dessas junções. As junções tipo fenda são estruturas dinâmicas: novos conéxons são continuamente recrutados da periferia para a placa, enquanto os conéxons velhos são continuamente removidos do centro.

As células conectadas pelas junções tipo fenda compartilham muito de seus íons inorgânicos e outras pequenas moléculas, estando, portanto, química e eletricamente conectadas. As junções tipo fenda são importantes na coordenação das atividades de células eletricamente ativas e possuem um papel de coordenação em outros grupos de células. Os plasmodesmata são as únicas junções intercelulares nas plantas. Embora sua estrutura seja muito diferente e possa algumas vezes transportar macromoléculas informacionais, em geral eles atuam como as junções tipo fenda, permitindo a passagem de pequenas moléculas de uma célula para a outra e impedindo a passagem da maioria das moléculas grandes.

A LÂMINA BASAL

Os tecidos não são feitos somente de células. Uma parte de seu volume, algumas vezes uma grande parte, é o *espaço extracelular*, o qual é ocupado por uma intrincada rede de macromoléculas constituindo a *matriz extracelular*. Essa matriz é composta por várias proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e reunidos em uma rede organizada e em estreita associação com a superfície das células que os produzem.

Em nossos corpos, a forma mais abundante de matriz extracelular é encontrada em tecido conectivo volumoso como os ossos, o tendão e a camada dérmica da pele. Entretanto, nos animais em geral, do ponto de vista evolutivo, o lugar de honra é a matriz extracelular que forma uma estrutura relativamente óbvia, a **lâmina basal** (também referida como **membrana basal**). Essa camada extremamente fina, embora flexível, de moléculas de matriz é o suporte de todo o epitélio. Tão pequena quanto seu volume, possui um papel crítico na arquitetura do corpo. Como as caderinas, parece ser uma das características definitivas comum a todos os animais multicelulares. Outras formas de matriz extracelular são mais variáveis de um filo animal para outro, tanto na composição quanto na quantidade.

Nesta seção discutiremos a lâmina basal. Na próxima seção, veremos como ocorre a interação entre as células epiteliais e a lâmina basal através das *proteínas integrinas* na membrana das células epiteliais, e veremos que as integrinas também estão presentes em outros tipos celulares, mediando suas interações com vários tipos de matriz extracelular encontrados nos tecidos conectivos. Essas outras formas de matriz extracelular serão discutidas em detalhes mais adiante.

A lâmina basal forma a base de todo o epitélio e circunda alguns tipos de células não-epiteliais

A lâmina basal possui de 40 a 120 nm de espessura. Uma camada de lâmina basal não somente sustenta todo o epitélio, mas também circunda as células musculares individuais, as células adiposas e as células de Schwann (as quais rodeiam o axônio das células nervosas periféricas para formar a mielina). A lâmina basal separa essas células e o epitélio das camadas celulares do tecido conectivo subjacente. Em outras localizações, como o glomérulo renal, a lâmina basal situa-se entre duas camadas celulares e atua como um filtro altamente seletivo (**Figura 19-39**). A lâmina basal possui outras atividades além das funções estruturais e filtrantes. Ela é capaz de determinar a polaridade celular, influenciar o metabolismo celular, organizar as proteínas na membrana plasmática das células adjacentes, promover a sobrevivência, a proliferação ou a diferenciação celular atuando também, como vias para a migração celular.

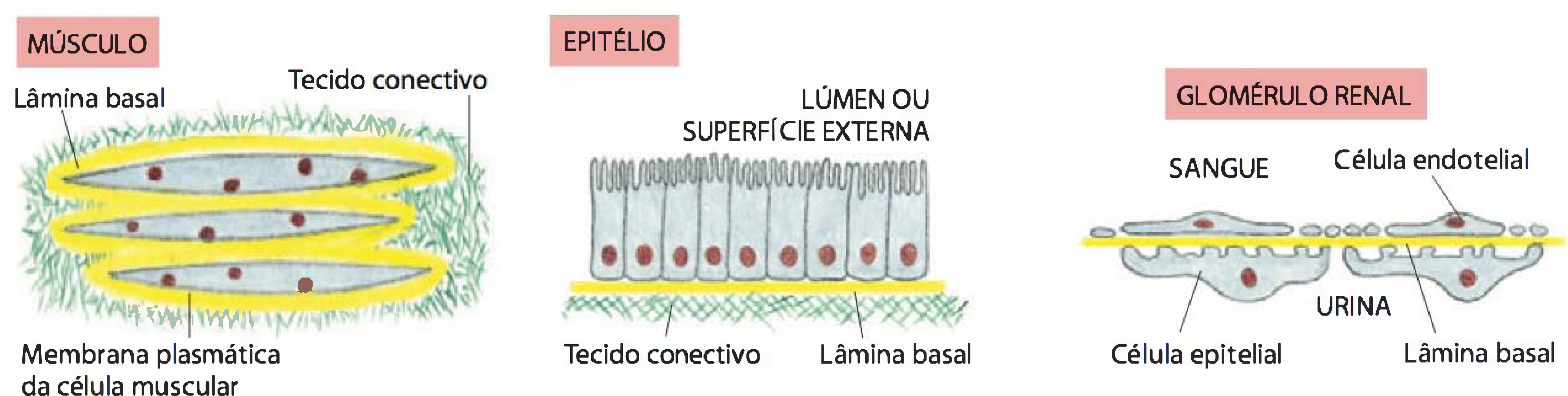


Figura 19-39 Três modos de organização das lâminas basais. A lâmina basal (*amarelo*) circunda certas células (como células musculares), localiza-se abaixo do epitélio e está interposta entre duas camadas celulares (como nos glomérulos renais). Observe que nos glomérulos renais ambas as camadas celulares possuem fendas, de modo que a lâmina basal atua como um filtro e como um suporte, determinando quais moléculas passarão do sangue para a urina. A filtração também depende de outras estruturas com base em proteínas, denominadas *fendas do diafragma*, que se estendem pelas fendas intercelulares na camada epitelial.

Contudo, o papel mecânico é essencial. Na pele, por exemplo, a camada externa do epitélio, a epiderme, depende da força da lâmina basal para mantê-lo ligado ao tecido conectivo subjacente, a derme. Em pessoas com defeito genético em determinadas proteínas da lâmina basal ou em um tipo especial de colágeno que ancora a lâmina basal ao tecido conectivo subjacente, a epiderme se descola da derme. Isso causa a formação de bolhas, uma doença denominada *epidermólise bolhosa juncional*, uma condição severa e algumas vezes letal.

A laminina é o principal componente da lâmina basal

A lâmina basal é sintetizada, principalmente, pelas células em todos os seus lados. As células epiteliais contribuem com uma série de componentes da lâmina basal, enquanto as células da camada de tecido conectivo subjacente (denominado *estroma*, grego para lençóis) contribuem com outra série (**Figura 19-40**). Como as outras matrizes extracelulares dos tecidos animais, a lâmina basal é constituída por duas principais classes de moléculas extracelulares: (1) proteínas fibrosas (normalmente glicoproteínas, as quais possuem pequenas cadeias laterais de oligossacarídeos) e (2) cadeias de polissacarídeos de um tipo denominado *glicosaminoglicano* (GAG), as quais normalmente são encontradas covalentemente ligadas a *proteínas centrais* específicas para formar os *proteoglicanos* (**Figura 19-41**). Na última seção, discutiremos estas duas grandes e variadas classes de moléculas de matriz em maior detalhe. Discutiremos aqui o subgrupo especial que é encontrado na lâmina basal.

Embora a composição precisa da lâmina basal madura varie de tecido para tecido, e mesmo de região para região na mesma lâmina, a maior parte da lâmina basal madura contém as glicoproteínas *laminina*, *colágeno tipo IV* e *nidogênio*, juntamente com o proteoglicano *perlecana*. Juntamente com esses componentes-chave presentes na lâmina basal de quase todos os animais desde as medusas até os mamíferos, ela mantém em sua rede várias outras moléculas, ou está estreitamente associada a elas. Entre essas moléculas estão o *colágeno tipo XVIII* (um membro atípico da família do colágeno, que forma a proteína central do proteoglicano) e a *fibronectina*, uma importante proteína fibrosa na adesão da célula do tecido conectivo com a matriz.

Acredita-se que a laminina seja o organizador primário da estrutura de camadas, e logo no início do desenvolvimento a lâmina basal consiste principalmente em moléculas de laminina. A **laminina-1** (laminina clássica) é uma proteína flexível grande composta de três

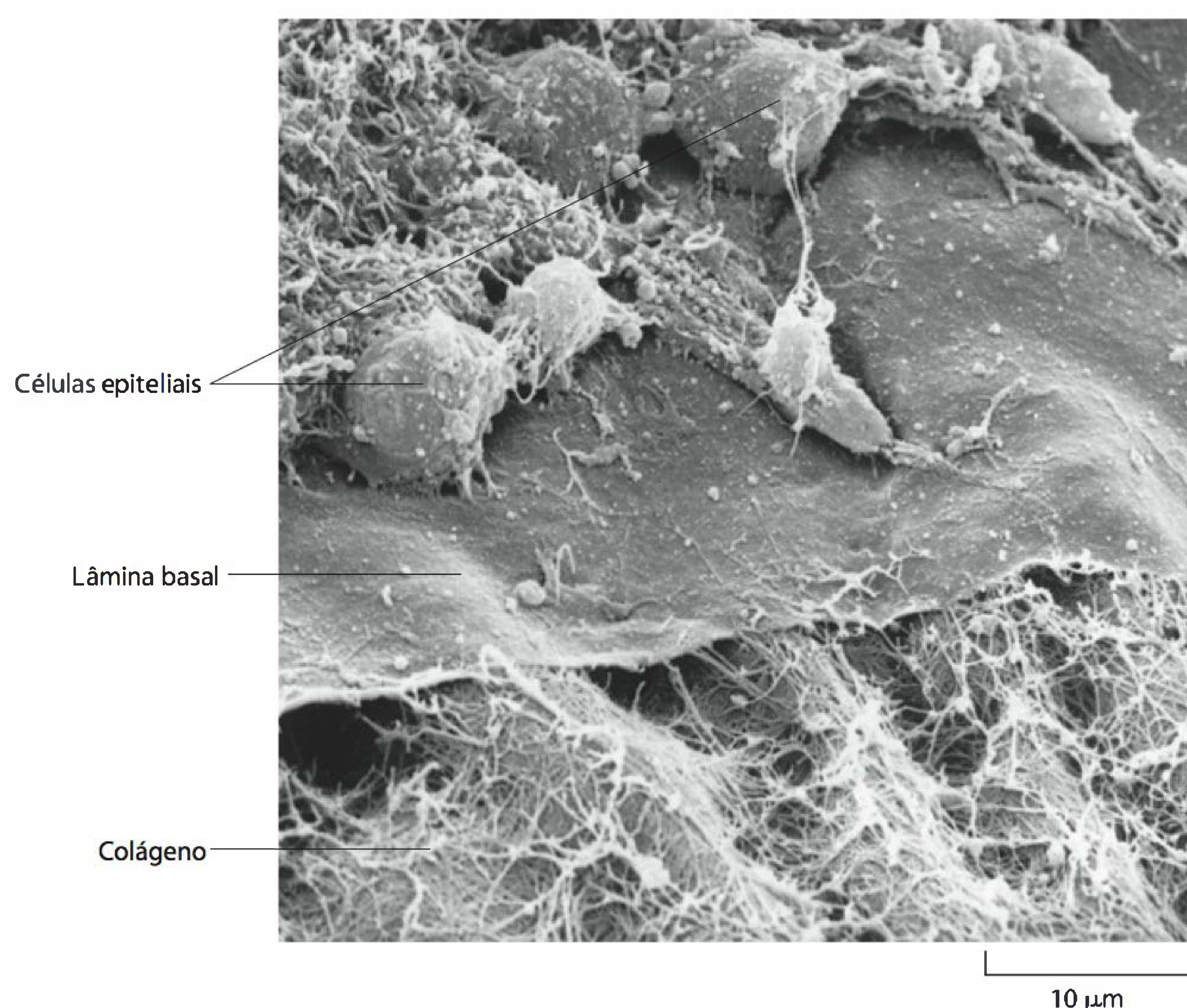


Figura 19-40 Lâmina basal da córnea de um embrião de galinha. Nesta micrografia eletrônica de varredura, algumas das células epiteliais foram removidas para expor a superfície superior da lâmina basal. Uma rede de fibrilas de colágeno no tecido conectivo subjacente interage com a face inferior da lâmina. (Cortesia de Robert Trelstad.)

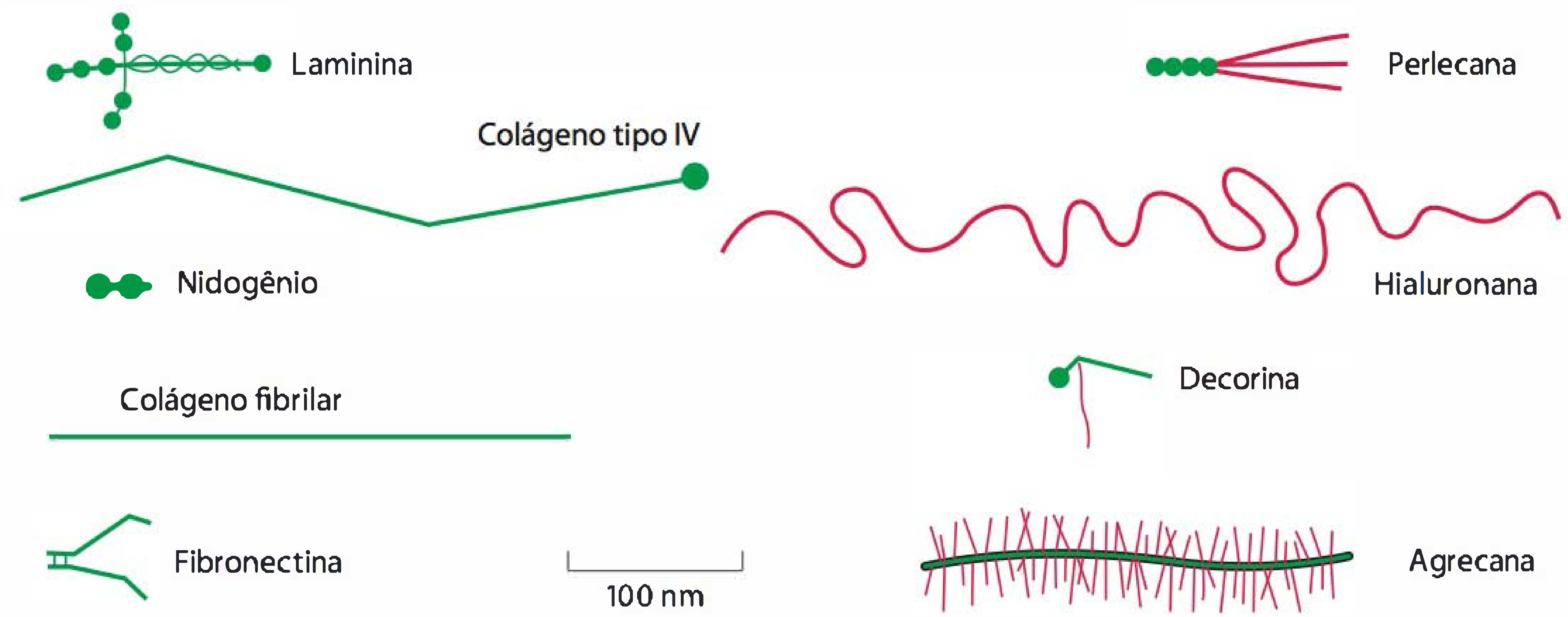


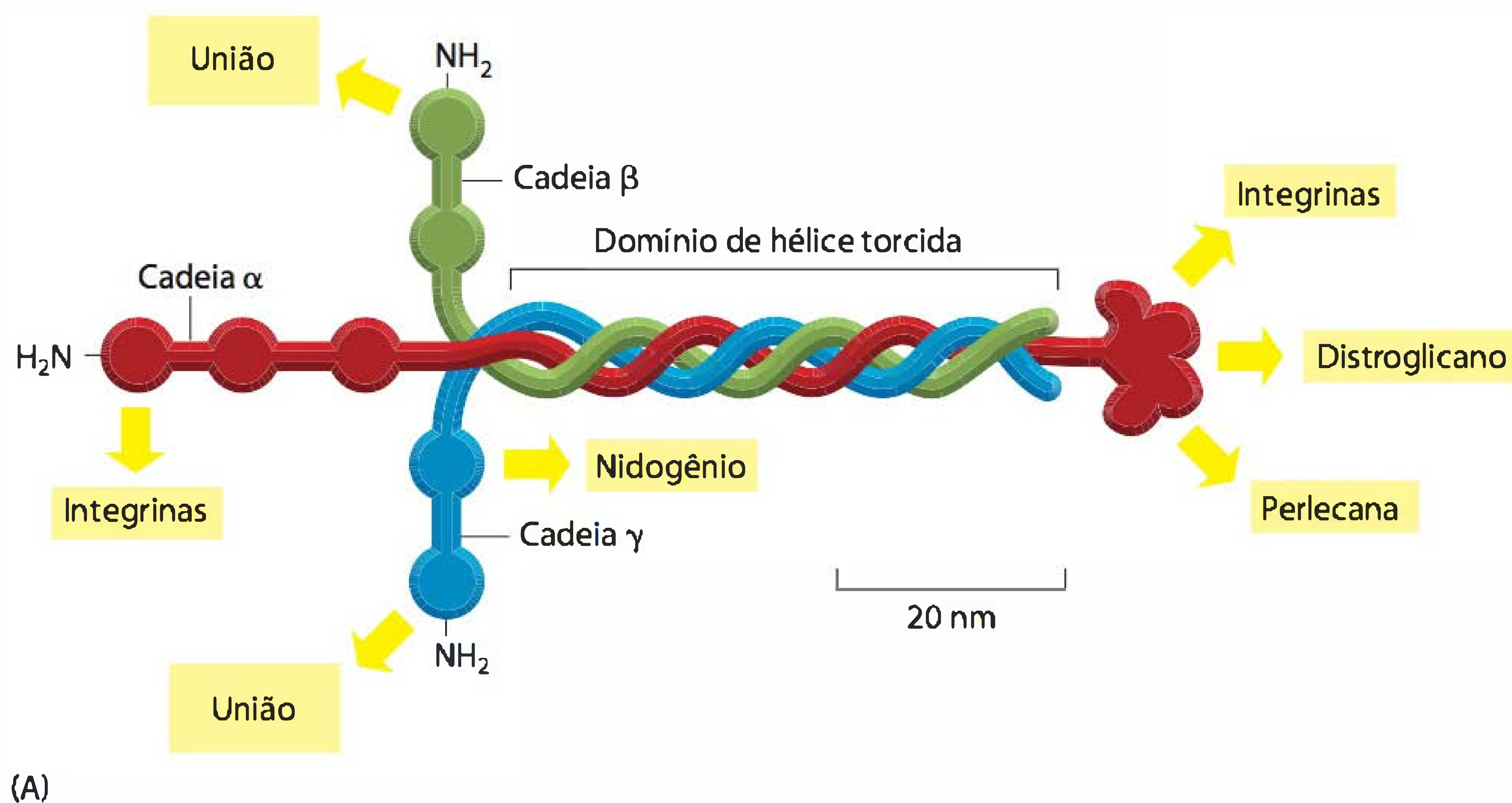
Figura 19-41 Comparação entre as formas e os tamanhos de algumas das principais macromoléculas da matriz extracelular. As proteínas são mostradas em *verde*, os glicosaminoglicanos, em *vermelho*.

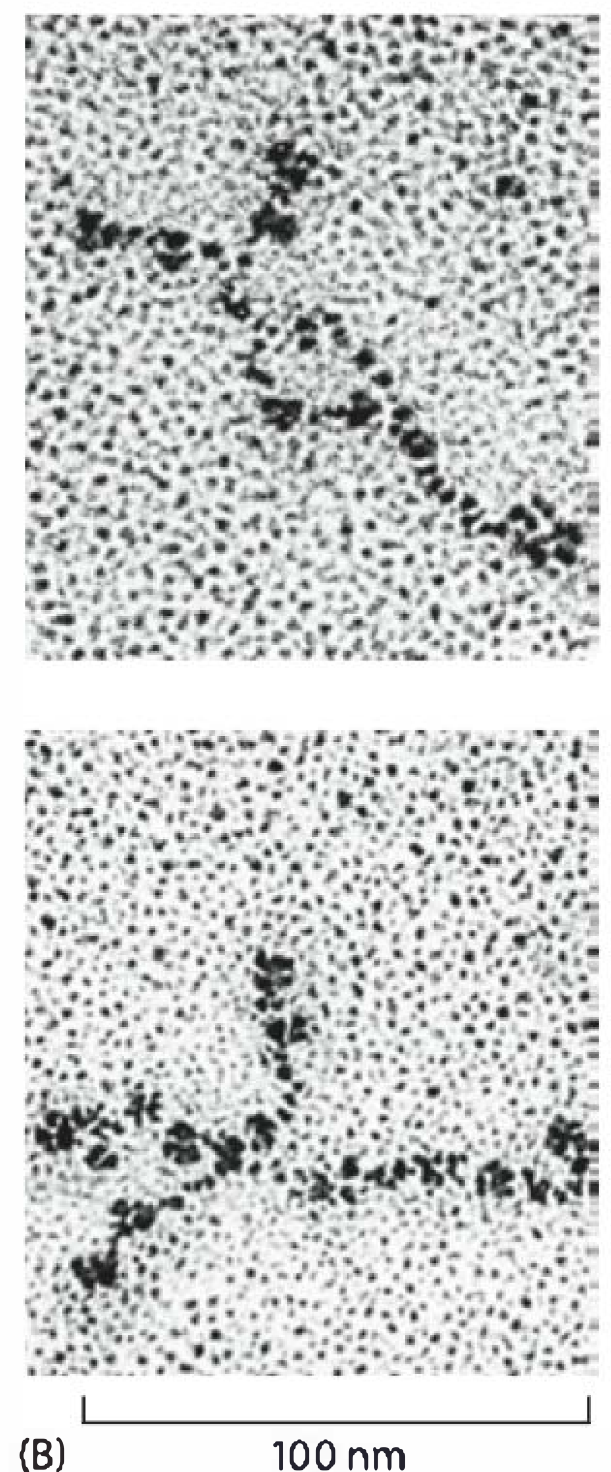
cadeias polipeptídicas muito longas (α, β e γ) unidas por ligações dissulfeto e arranjadas na forma de um buque assimétrico, como um arranjo de três flores cujas hastes são torcidas, mas as flores mantidas separadas (**Figura 19-42**). Esses heterotrímeros podem se associar *in vitro* em uma rede, principalmente por interações entre as cabeças, embora as interações com as células sejam necessárias para organizar a rede em camadas ordenadas. Como há várias isoformas de cada tipo de cadeia, e que podem associar-se em diferentes combinações, diferentes lamininas podem ser produzidas, criando lâminas basais com propriedades distintas. A cadeia de laminina γ-1 é a componente da maioria dos heterotrímeros de laminina, e camundongos que não produzem essa cadeia morrem durante a embriogênese, pois são incapazes de formar a lâmina basal.

O colágeno tipo IV confere força tensora à lâmina basal

O **colágeno tipo IV** é o segundo componente essencial da lâmina basal madura e também existe em várias isoformas. Como os *colágenos fibrilares* que constituem a maioria das proteínas do tecido conectivo, como osso e tendões (discutidos mais adiante), as moléculas de colágeno tipo IV consistem em três longas cadeias proteicas sintetizadas separadamente que se associam formando uma estrutura em forma de corda supertorcida. No entanto, diferem do colágeno fibrilar, pois sua fita helicoidal tripla é interrompida em mais de 20 regiões, permitindo múltiplas dobraduras. As moléculas de colágeno tipo IV interagem com seus domínios terminais para reunirem-se extracelularmente em uma rede de múltiplas camadas flexíveis e planas.

Contudo, como a rede de laminina e o colágeno tipo IV se ligam um ao outro e à superfície das células que se apoiam na lâmina basal? Por que formam uma camada bidimensional e não um gel tridimensional? As moléculas de laminina possuem vários domínios funcionais, incluindo aqueles que se ligam ao proteoglicano perlecana, ao nidogênio e dois ou mais que se ligam à proteína receptora de laminina na superfície das células. O colágeno tipo IV também possui domínios que se ligam ao nido-





19-42 Estrutura da laminina. (A) As subunidades da molécula da laminina-1 e alguns de seus sítios de ligação para outras moléculas (*retângulos amarelos*). A laminina é uma glicoproteína multidomínio, composta de três polipeptídeos (α, β e γ) que são ligados por ligações dissulfeto em uma estrutura assimétrica em forma cruzada. Cada cadeia polipeptídica possui mais de 1.500 aminoácidos. Cinco tipos de cadeias α, três tipos de cadeias β e três tipos de cadeias γ são conhecidos. Em princípio, elas podem se reunir para formar 45 (5 x 3 x 3) isoformas de laminina. Várias isoformas já foram encontradas, cada uma com distribuição característica para cada tecido. Por meio de seus sítios de ligação para outras proteínas, as moléculas de laminina desempenham um papel central, organizando e reunindo a lâmina basal e ancorando-a às células. (B) Micrografia eletrônica das moléculas de laminina sombreadas com platina. (B, de J. Engel et al., *J. Mol. Biol.* 150:97-120, 1981. Com permissão da Academic Press.)

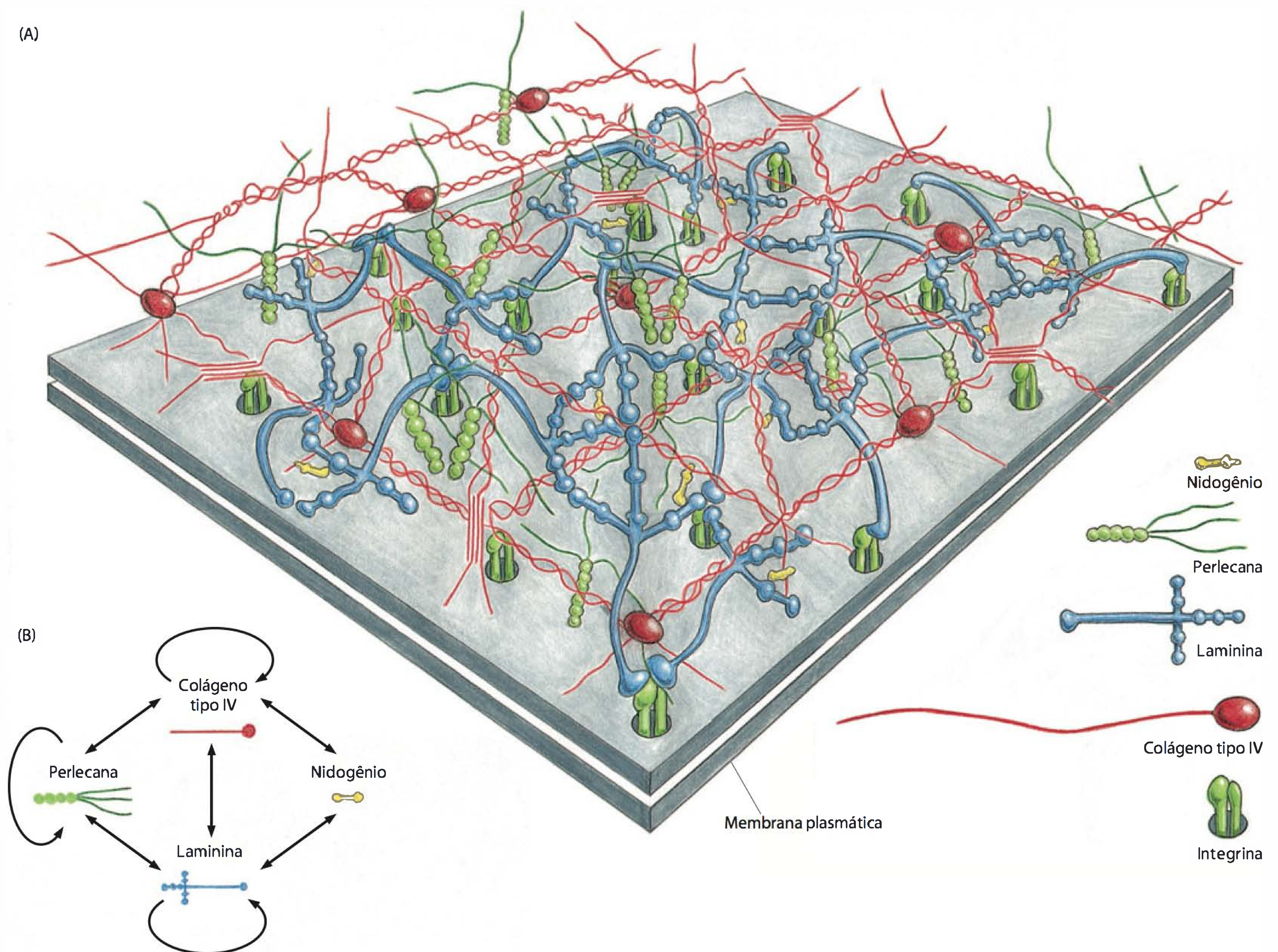


Figura 19-43 Modelo da estrutura molecular da lâmina basal. (A) A lâmina basal é formada por interações específicas entre as proteínas colágeno tipo IV, laminina e nidogênio (B) e o proteoglicano perlecana. As setas em (B) conectam moléculas que podem ligar-se diretamente uma à outra. Há várias isoformas de colágeno tipo IV e laminina, cada uma com distribuição distinta nos tecidos. Os receptores de laminina transmembrana (integrinas e distroglicano) na membrana plasmática organizam a reunião da lâmina basal. Somente as integrinas são apresentadas. (Com base em H. Colognato e P. D. Yurchenco, *Dev. Dyn.* 218:213-234, 2000. Com permissão de Wiley-Liss.)

gênio e à perlecana. Acredita-se, portanto, que o nidogênio e a perlecana conectem as redes de colágeno e laminina (**Figura 19-43**).

As moléculas de laminina que produzem a camada inicial primeiro ligam-se umas às outras e a receptores de superfície das células que produzem a proteína. Os receptores de superfície celular são de vários tipos, e muitos membros deles são membros da família das integrinas. Um outro tipo importante de receptor de laminina é a proteína transmembrana *distroglicana*, um proteoglicano com uma proteína central que se estende pela membrana celular, pendurando suas cadeias polissacarídicas de glicosaminoglicano no espaço extracelular. Elas prendem as moléculas de laminina por uma extremidade, deixando suas cabeças posicionadas para interagir de modo a formar uma rede bidimensional. Esta rede de laminina provavelmente coordena a reunião de outros componentes da lâmina basal.

As lâminas basais realizam diversas funções

Como mencionado, nos glomérulos renais, uma lâmina basal mais espessa atua como um filtro molecular, prevenindo a passagem de macromoléculas do sangue para a urina quando a urina é formada (ver Figura 19-39). O proteoglicano da lâmina basal parece ser importante para essa função. Quando as suas cadeias de GAG são removidas por enzimas específicas, as propriedades filtrantes da lâmina basal são destruídas. O colágeno tipo IV também possui uma função, como na doença renal hereditária humana (*síndrome de Alport*) que resulta da mutação nos genes do colágeno tipo IV, causando um espessamento irregular e disfuncional do filtro glomerular. As mutações na laminina também impedem as funções dos filtros renais, mas de maneira distinta, interferindo com a diferenciação das células que fazem contato e que sustentam sua estrutura.

A lâmina basal também pode atuar como uma barreira seletiva ao movimento das células. A laminina basal abaixo do epitélio, por exemplo, impede que os fibroblastos, localizados no tecido conectivo adjacente, façam contato com as células epiteliais. Entretanto, isto não impede que macrófagos, linfócitos ou processos nervosos passem através dela. A lâmina basal também é importante na regeneração do tecido após uma lesão. Quando os tecidos, como o muscular, o nervoso ou o epitelial, são danificados, a lâmina basal sobrevive e fornece a estrutura sobre a qual as células em regeneração poderão migrar. Dessa forma, a arquitetura original do tecido é facilmente reconstruída.

Um exemplo extraordinário do papel da estrutura da lâmina basal na regeneração vem de estudos das *junções neuromusculares*, o local onde os terminais nervosos de um neurônio motor formam uma sinapse química com a célula muscular esquelética (discutido no Capítulo 11). Em vertebrados, a lâmina basal que circunda a célula muscular separa a membrana plasmática do nervo e do músculo nas sinapses, e a lâmina basal na região da sinapse possui característica química distinta, com isoformas especiais de colágeno tipo IV, laminina e o proteoglicano denominado *agrina*.

Esta lâmina basal na sinapse possui um papel central na reconstrução da sinapse após uma lesão no nervo ou no músculo. Se o músculo de rã e seu nervo motor forem destruídos, a lâmina basal ao redor de cada célula muscular permanece intacta, sendo ainda reconhecível nos locais da antiga junção neuromuscular. Se o nervo motor, mas não o músculo, puder regenerar, os axônios nervosos seguirão em direção aos botões sinápticos originais na lâmina basal vazia e ali se diferenciarão para formar um terminal nervoso motor de aparência normal. Assim, a lâmina basal juncional pode, sozinha, guiar a regeneração dos terminais dos nervos motores.

Experimentos similares mostram que a lâmina basal também controla a localização dos receptores de acetilcolina que agregram-se na membrana plasmática da célula muscular na junção neuromuscular. Se o músculo e os nervos forem destruídos, mas somente o músculo puder se regenerar, os receptores de acetilcolina sintetizados pela célula muscular regenerada localizam-se predominantemente no local da antiga junção, mesmo na ausência do nervo (**Figura 19-44**). Assim, a lâmina basal juncional aparentemente coordena a organização espacial local dos componentes de cada uma das células que formam as junções neuromusculares. Algumas das moléculas responsáveis por esses efeitos já foram identificadas. Os axônios dos neurônios motores, por exemplo, depositam a agrinina na lâmina basal juncional, onde ela ativa a reunião dos receptores de acetilcolina e outras proteínas na membrana

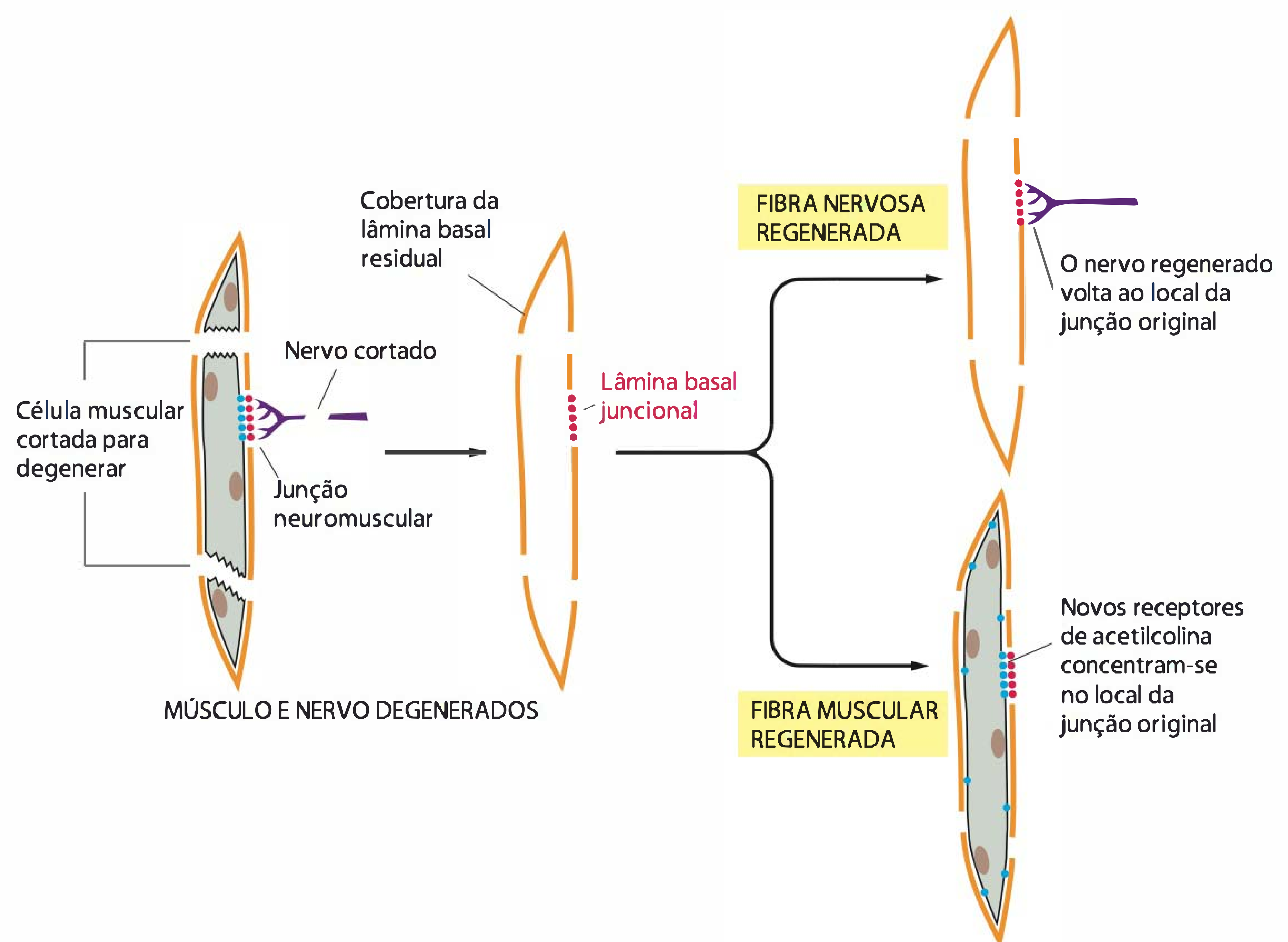


Figura 19-44 Experimentos de regeneração indicam o caráter especial da lâmina basal juncional na junção neuromuscular. Quando o nervo, mas não o músculo, regenera após uma lesão tanto do nervo como do músculo (*parte superior* da figura), a lâmina basal juncional direciona o nervo regenerado para o sítio sináptico original. Quando a regeneração do músculo, mas não do nervo, é permitida (*parte inferior* da figura), a lâmina basal juncional provoca o acúmulo de receptores de acetilcolina recém-sintetizados (*azul*) no local original da sinapse. O músculo regenera a partir de células-satélite (discutido no Capítulo 23) localizadas entre a lâmina basal e o músculo original (não-mostrado). Estes experimentos mostram que a lâmina basal juncional controla a localização dos outros componentes da sinapse dos dois lados da lâmina.

plasmática juncional da célula muscular. Reciprocamente, as células musculares depositam uma isoforma particular de laminina na lâmina basal juncional, e algumas evidências sugerem que se ligam diretamente ao domínio extracelular de canais de Ca^{2+} na membrana pré-sináptica da célula nervosa, auxiliando a mantê-la na sinapse onde é necessária. A agrina e esta isoforma sináptica de laminina são essenciais para a formação das junções neuromusculares normais. Defeitos nesses componentes da lâmina basal ou nas proteínas que prendem os componentes das células musculares a eles nas sinapses são responsáveis por várias formas de distrofia muscular, na qual os músculos inicialmente se desenvolvem normalmente, mas degeneram nos últimos anos de vida.

Resumo

A lâmina basal é uma forte camada fina de matriz extracelular que sustenta o epitélio em todos os animais multicelulares. Ela também circunda outros tipos celulares, como as células musculares. Toda a lâmina basal está organizada em uma rede de moléculas de laminina, ligadas por seus braços laterais e mantidas próximo à porção basal das células epiteliais, ligando-se às integrinas e a outros receptores da membrana plasmática basal. As moléculas de colágeno tipo IV são recrutadas para essa estrutura, reunindo-se em uma malha plana, componente essencial de toda a lâmina basal madura. A rede de colágeno e laminina na lâmina basal madura são ligadas pela proteína nidogênio e um grande proteoglicano sulfato de heparan, a perlecana.

A lâmina basal proporciona um suporte mecânico para o epitélio; ela forma a interface e a aderência entre o epitélio e o tecido conectivo, atua como um filtro no rim, como uma barreira para manter as células em seu próprio compartimento, infiuencia a polaridade e a diferenciação celular, guia a migração celular, e as moléculas nela embebidas auxiliam na organização de estruturas elaboradas como as sinapses neuromusculares. Quando as células são danificadas ou mortas, frequentemente a lâmina basal sobrevive e auxilia na coordenação da regeneração do tecido.

INTEGRINAS E ADESÃO CÉLULA-MATRIZ

As células produzem, organizam e degradam a matriz extracelular. Por sua vez, a matriz exerce uma poderosa influência sobre as células. As influências são exercidas principalmente pelas proteínas de adesão celular transmembrana que atuam como *receptores de matriz*. Eles prendem a matriz do exterior da célula ao citoesqueleto do interior da célula, mas seu papel vai além dessa simples ligação mecânica passiva. Através deles, os componentes da matriz podem afetar qualquer aspecto do comportamento celular. Os receptores da matriz desempenham um papel fundamental nas células epiteliais mediando suas interações com a lâmina basal, sendo também importantes no tecido conectivo por suas interações com a matriz circundante.

Vários tipos de moléculas podem atuar como receptores de matriz ou correceptores, incluindo os proteoglicanos transmembrana. No entanto, os principais receptores das células animais para a ligação da maioria das proteínas de matriz extracelulares são as **integrinas**. Como as caderinas e os componentes-chave da lâmina basal, as integrinas são parte do conjunto de equipamentos da arquitetura fundamental característico dos animais multicelulares. Os membros dessa grande família de moléculas de adesão transmembrana homólogas possuem uma capacidade surpreendente de transmitir sinais em ambas as direções através da membrana celular. A ligação de um componente da matriz a uma integrina pode enviar uma mensagem para o interior da célula, e as condições do interior celular podem enviar sinais para fora para controlar a ligação da integrina à matriz (ou, em alguns casos, de uma molécula de superfície celular para outra, como veremos no caso dos leucócitos ligando-se às células endoteliais). A tensão aplicada a uma integrina pode fazer com que ela se fixe mais fortemente à estrutura intracelular e extracelular, e a perda da tensão pode soltá-la, de modo que complexos de sinalização molecular se dissociam nos dois lados da membrana. Desse modo, as integrinas podem servir não somente para transmitir sinais moleculares e mecânicos, mas também para converter um tipo de sinal em outro. Estudos da estrutura da molécula das integrinas começaram a revelar como elas realizam essas funções.

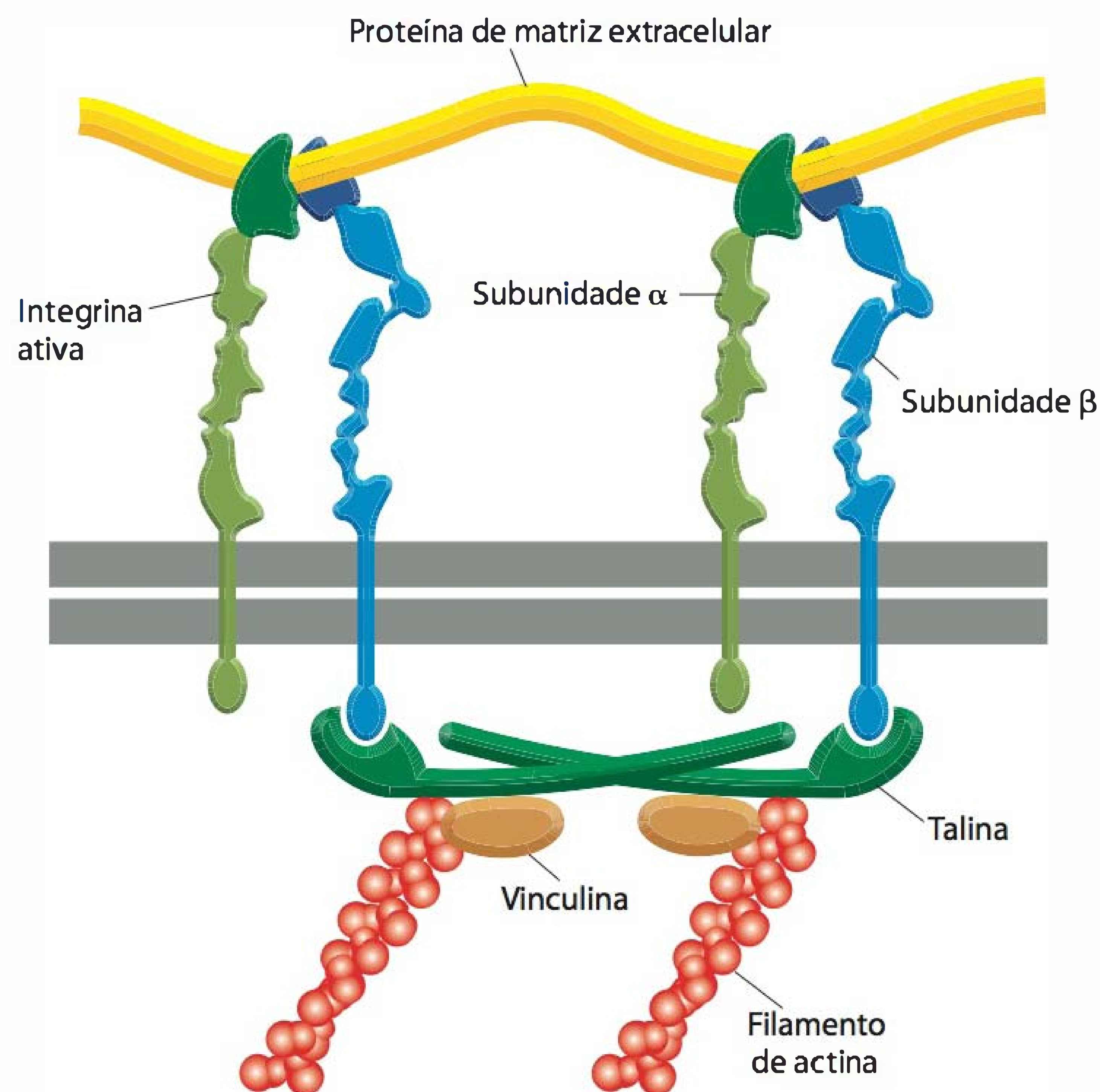


Figura 19-45 Estrutura da subunidade de uma molécula de integrina ativa, ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. A cabeça da molécula de integrina liga-se diretamente a uma proteína extracelular como a fibronectina. A cauda intracelular da integrina se liga à talina, a qual, por sua vez, liga-se aos filamentos de actina. Uma série de outras proteínas de ancoramento intracelular, incluindo a α-actinina, a filamina e vinculina, auxilia a reforçar a ligação.

As integrinas são heterodímeros transmembrana que se ligam ao citoesqueleto

Há muitas variedades de integrinas, pelo menos 24 no homem, mas todas estão de acordo com um plano comum. Uma molécula de integrina é composta de duas subunidades de glicoproteínas transmembrana associadas não-covalentemente, denominadas α e β. As duas subunidades atravessam a membrana celular, com uma pequena cauda C-terminal intracelular e um grande domínio extracelular N-terminal. A porção extracelular do dímero de integrina se liga a sequências específicas de aminoácidos nas proteínas da matriz extracelular, como a laminina ou a fibronectina, ou em alguns casos, a ligantes da superfície de outras células. A porção intracelular se liga a um complexo de proteínas formando uma ligação com o citoesqueleto.

Para todas menos uma das 24 variedades de integrinas humanas, esta ligação intracelular ocorre nos filamentos de actina via uma *talina* e uma série de outras proteínas de ancoramento intracelular (**Figura 19-45**). A talina, como veremos depois, parece ser o componente-chave dessa ligação. Como as junções célula-célula ligadas por actina formadas pelas caderinas, as junções célula-matriz ligadas pela actina formada pelas integrinas podem ser pequenas, imperceptíveis e transitórias, ou grandes, proeminentes e duráveis. Exemplos dessas últimas são as *adesões focais*, que se formam quando os fibroblastos possuem tempo suficiente para formar ligações fortes à superfície rígida dos recipientes de cultura, e as *junções miotendinosas*, que ligam as células musculares aos tendões.

No epitélio, os sítios de ligação célula-matriz mais proeminentes são os hemidemossomas, onde um tipo específico de integrina (α6β4) ancora a célula à laminina da lâmina basal. Somente aqui, a ligação intracelular ocorre aos filamentos de actina, através das proteínas de ancoramento plectina e distonina (**Figura 19-46**).

As integrinas podem mudar de uma conformação ativa para uma conformação inativa

Uma célula deslizando em um tecido – um fibroblasto ou um macrófago, por exemplo, ou uma célula epitelial migrando sobre a lâmina basal – tem que ser capaz de fazer e desfazer ligações com a matriz, e fazer isso rapidamente no caso de ter que se movimentar ligeiro. Igualmente, um leucócito circulante tem que ser capaz de ativar e desativar sua tendência de se ligar às células endoteliais para sair do vaso sanguíneo nos locais de inflamação sob condições adequadas. Além disso, se uma força é aplicada no local necessário, a ligação e a quebra das interações extracelulares em todos esses casos devem estar ligadas à reunião e

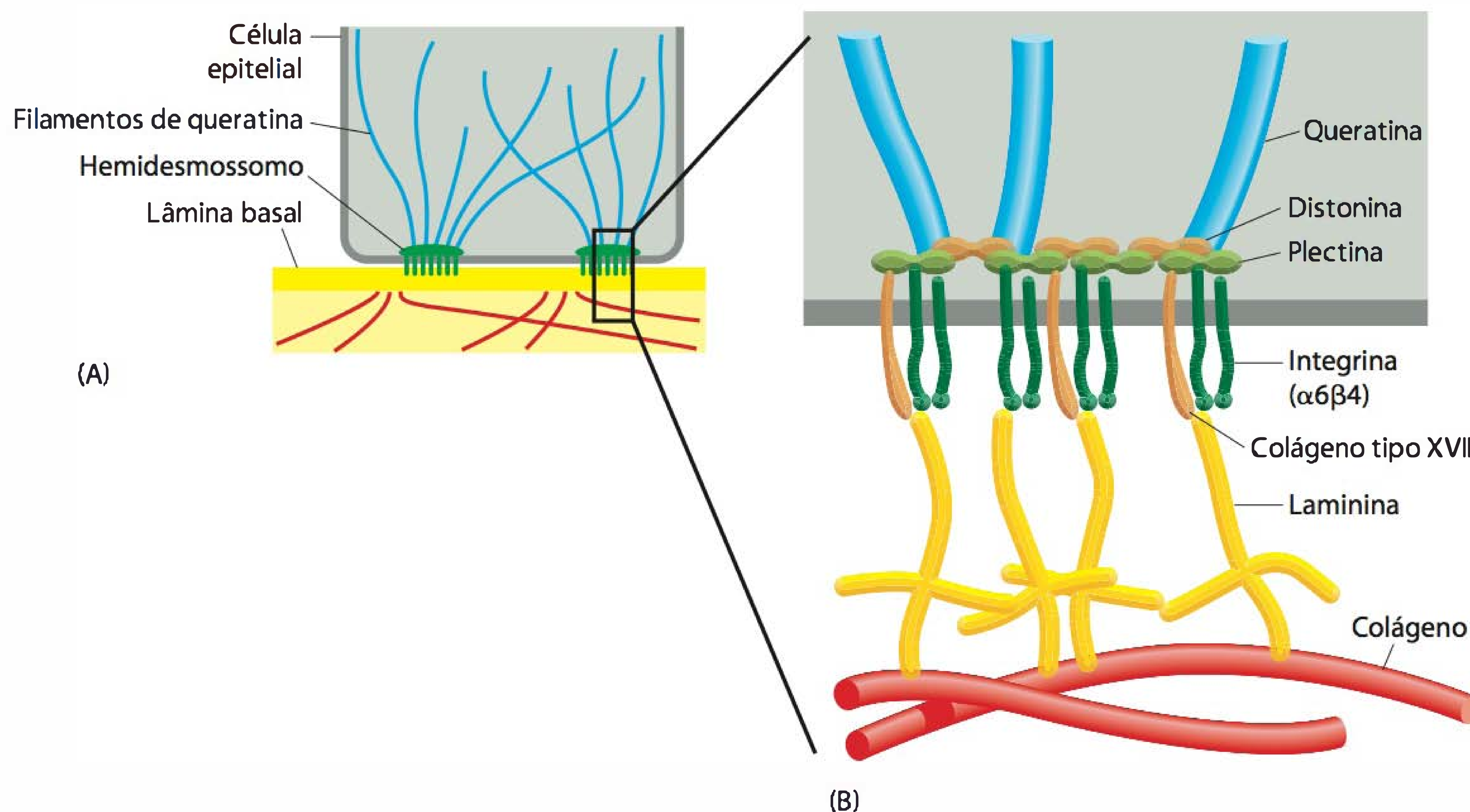


Figura 19-46 Hemidesmossomos. (A) As células epiteliais são presas à lâmina basal por meio dos hemidesmossomos, ligando os filamentos de queratina do interior da célula à laminina do lado de fora da célula. (B) Componentes moleculares do hemidesmossomo. Uma integrina especializada ($\alpha6\beta4$) atravessa a membrana, ligando os filamentos de queratina intracelulares por meio de proteínas de ancoramento denominadas plectina e distonina à laminina extracelular. O complexo adesivo também contém, em paralelo com a integrina, um membro pouco comum da família do colágeno, o colágeno tipo XVII, o qual possui um domínio que atravessa a membrana, ligado a sua porção colagenosa extracelular. Defeitos em qualquer um desses componentes podem dar origem a uma doença que causa bolhas na pele.

à dissociação rápida das ligações ao citoesqueleto no interior das células. As moléculas de integrina que atravessam a membrana e medeiam as ligações não podem simplesmente ser passivas, rígidos objetos com porções protundentes nas suas duas extremidades. Elas devem ser capazes de mudar entre um estado ativo, quando formam ligações, e um estado inativo, quando não o fazem, e a ligação a seus ligantes em um lado da membrana deve alterar sua propensão de se ligar a um grupo diferente de ligantes no lado oposto.

A base desse fenômeno dinâmico é uma regulação alostérica: quando uma integrina se liga ou se dissocia de seu ligante, ela sofre mudanças conformacionais que afetam tanto a extremidade intracelular quanto a extremidade extracelular da molécula. Mudanças estruturais em uma extremidade estão ligadas a mudanças estruturais em outra, de modo que a influência pode ser transmitida em ambas as direções através da membrana celular. As pinças para madeira que os lenhadores utilizam para pegar as toras fornecem uma simples analogia mecânica (**Figura 19-47**).

As mudanças estruturais nas integrinas podem ser demonstradas examinando-se uma preparação purificada de moléculas de integrina e analisando-as com microscopia eletrônica de alta resolução. Se as integrinas são mantidas em um meio rico em cálcio, semelhante ao líquido extracelular normal, mas sem qualquer ligante extracelular, e rapidamente preparadas para microscopia, elas parecem objetos em forma de V muito dobrados. No entanto, se um pequeno peptídeo sintético contendo uma sequência que mimetiza o domínio de ligação da integrina de uma proteína de matriz extracelular natural for adicionado ao meio, a integrina se liga a esta molécula e se estende em uma forma diferente, com duas pernas que não estão mais tão dobradas, mas agora estão separadas e estendidas, sustentando a cabeça bem acima delas (**Figura 19-48**A). Este par de estruturas pode ser comparado com dados mais detalhados de cristalografia por raios X que revelaram que as duas pernas correspondem às cadeias de integrina α e β. A região da cabeça, onde elas se encontram, contém o sítio de ligação para o ligante extracelular. A ligação do ligante distorce esta região, de modo a favorecer uma posição mais estendida, "ativa". Por outro lado, a conformação estendida cria um sítio de ligação mais favorável, com uma alta afinidade pelo ligante (Figura 19-48B).

Contudo, como essas mudanças na região extracelular da integrina se relacionam com os eventos na extremidade intracelular da molécula de integrina? Em seu estado do-

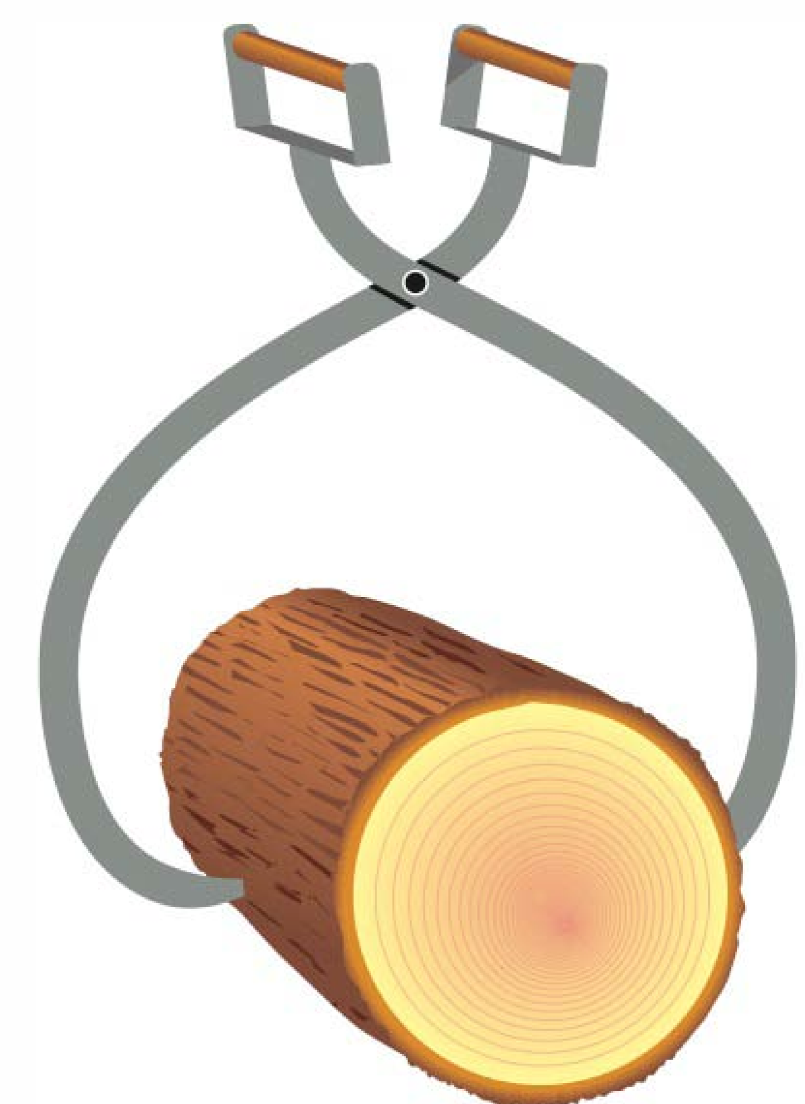


Figura 19-47 Pinças de lenhador. Juntar as alças faz com que as garras prendam a tora; quando as garras prendem a tora, as alças se aproximam. Além disso, quanto mais apertam as pinças, mais presas ficam as duas extremidades. Em uma molécula de integrina, os detalhes dessa ligação são diferentes, mas os princípios mecânicos são similares: mudanças conformacionais nas extremidades opostas da molécula estão associadas, e, quanto mais são puxadas, mais fortemente se prendem.

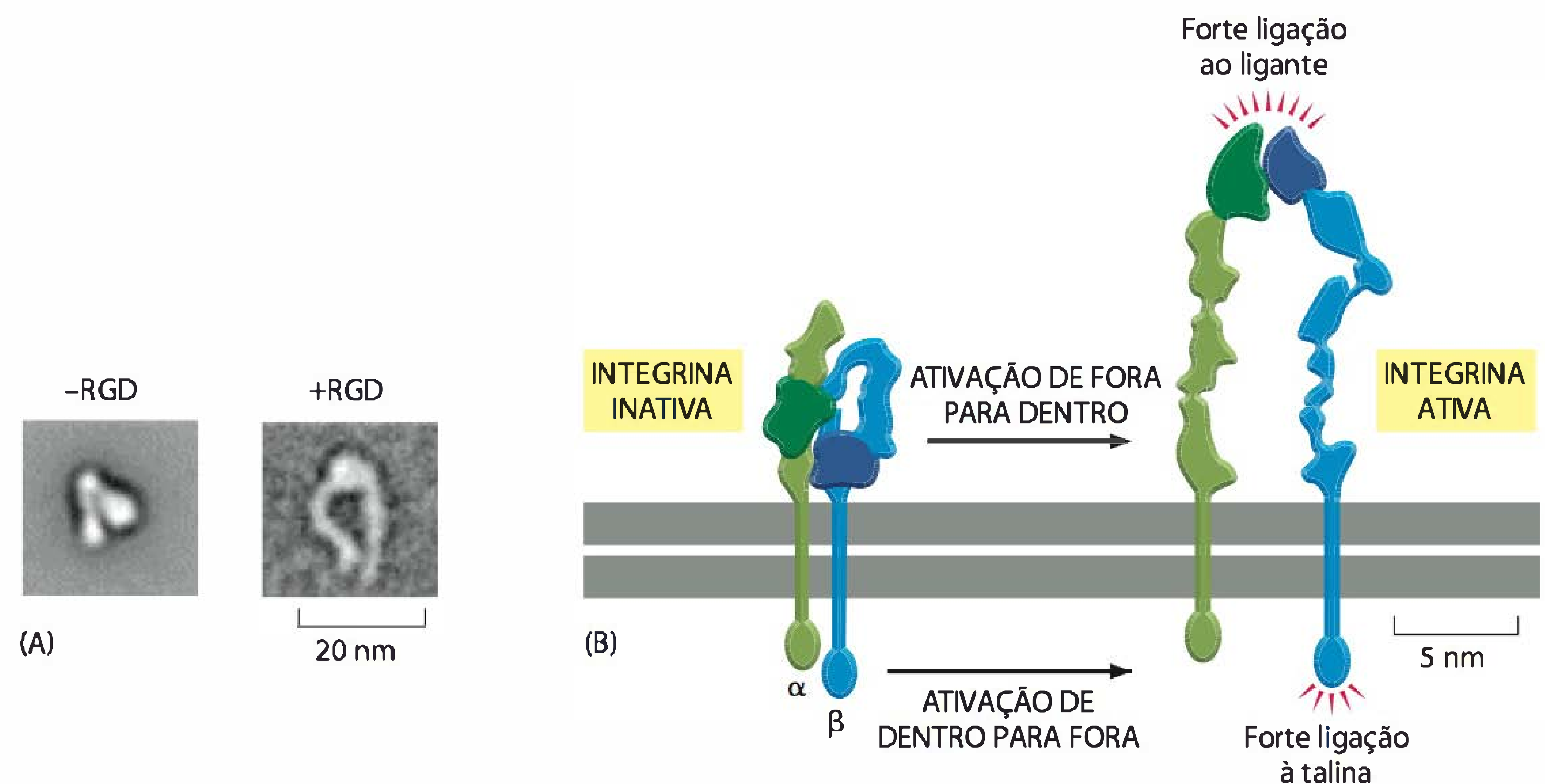


Figura 19-48 Mudanças na conformação de uma molécula de integrina quando ela se liga ao seu ligante. (A) As imagens foram produzidas pelo alinhamento da média de várias eletromicrografias de moléculas de integrina. Na ausência de ligante extracelular, a molécula de integrina parece pequena e dobrada. Quando incubada com o peptídeo RDG, a integrina adquire uma conformação estendida com duas pernas distintas. (B) Estruturas ativas (estendidas) e inativas (dobradas) de uma molécula de integrina, com base em dados de cristalografia por raios X. Embora seja difícil de cristalizar a molécula intacta em sua conformação natural, com e sem ligante, a estrutura completa pode ser deduzida com confiança razoável a partir de fragmentos moleculares bem-definidos por cristalografia por raios-x. (A, de J. Takaji et al., *Cell* 110:599-611, 2002. Com permissão de Elsevier; B, com base em T. Xiao et al., *Nature* 432:59-67, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

brado inativo, as porções intracelulares das cadeias α e β ficam próximas e aderem-se uma à outra. Quando o domínio extracelular se desdobra, este contato é quebrado e as porções intracelulares (e transmembrana) dessas cadeias se separam. Como resultado, o sítio de ligação da talina na cauda da cadeia β fica exposto. A ligação da talina leva à reunião dos filamentos de actina ancorados à extremidade intracelular da molécula de integrina (ver Figura 19-45). Dessa forma, quando uma integrina se liga ao seu ligante fora da célula, a célula reage ligando seu citoesqueleto à molécula de integrina, de maneira que é possível se aplicar uma força no ponto de ligação. Isso é denominado "ativação de fora para dentro".

Uma cadeia de causa e efeito também pode atuar de maneira inversa, de dentro para fora. A talina compete com a cadeia α da integrina por seu sítio de ligação na cauda da cadeia β. Assim, quando a talina se liga à cadeia β, ela desfaz a ligação α-β intracelular, permitindo que as duas pernas da molécula de integrina se separem. Isso faz com que a porção extracelular da integrina adquira sua conformação ativa estendida.

Essa "ativação de dentro para fora" é ativada por moléculas reguladoras intracelulares, que incluem o fosfoinositídeo PIP_2 (discutido no Capítulo 15), o qual acredita-se ser capaz de ativar a talina para que ela se ligue firmemente à cadeia β da integrina. Dessa maneira, um sinal gerado dentro da célula pode ativar sua molécula de integrina, permitindo que ela alcance e prenda seu ligante extracelular.

Moléculas-sinal intracelulares, como o PIP_2, são produzidas em resposta a sinais recebidos de fora da célula via outros tipos de receptores de superfície celular, como os receptores ligados à proteína G e os receptores de tirosina-cinases, os quais podem controlar a ativação da integrina (**Figura 19-49**). De modo inverso, a ativação das integrinas pela ligação à matriz pode influenciar a recepção de sinais por outras vias. A interação entre todas essas vias de comunicação, transmitindo sinais em ambas as direções através da membrana celular, permite a interação de complexos entre a célula e seu ambiente químico e físico.

Defeitos na integrina são responsáveis por muitas doenças genéticas

Os 24 tipos de integrina encontrados no homem são formados pelo produto de 8 genes de cadeia β e 18 genes de cadeia α diferentes, dimerizados em combinações distintas. Cada integrina possui propriedades e funções distintas. Além disso, como a mesma molécula de integrina em diferentes tipos celulares pode apresentar distintas especificidades de ligação a ligantes, parece que fatores adicionais específicos de tipos celulares podem interagir com as integrinas para modular sua atividade de ligação. A ligação das integrinas aos seus ligantes também é afetada pela concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio extracelular, refletindo a presença de domínios de ligação a cátions divalentes nas porções extracelulares das subunidades α e β. Os tipos de cátions divalentes podem influenciar a afinidade e a especificidade da ligação de uma integrina a seus ligantes.

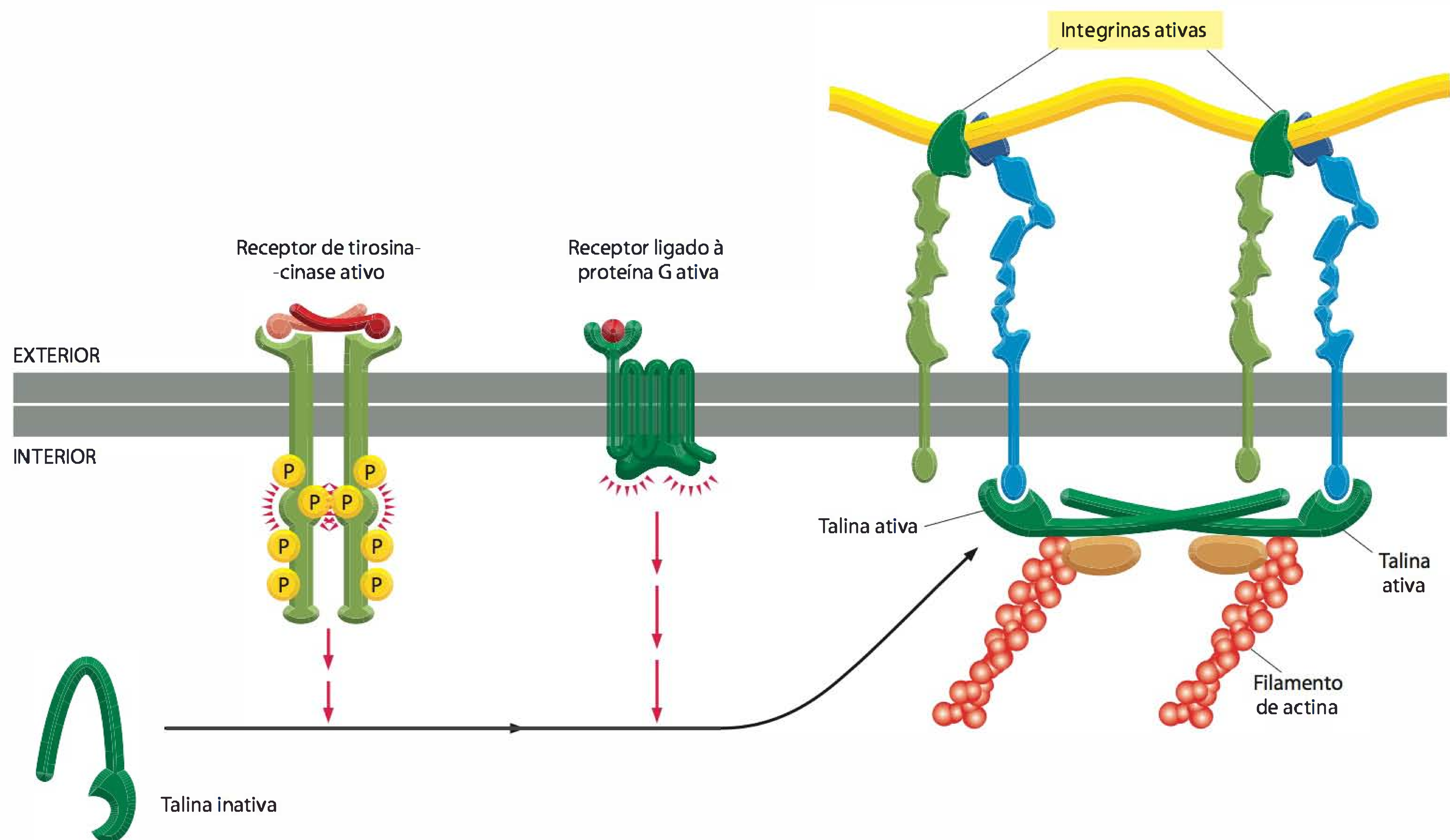


Figura 19-49 Ativação das integrinas pela interação cruzada com outras vias de sinalização. Sinais recebidos de fora da célula por outros tipos de receptores de superfície celular como os receptores ligados à proteína G e os receptores de tirosina-cinases podem alterar a conformação da talina e, portanto, ativar as integrinas celulares.

Embora exista uma sobreposição na atividade de diferentes integrinas – por exemplo, pelo menos cinco se ligam à laminina – é a diversidade de função das integrinas que é mais marcante. A **Tabela 19-4** descreve algumas variedades de integrinas e os problemas resultantes quando as cadeias α ou β são defeituosas.

As subunidades β1 formam dímeros com pelo menos 12 subunidades α distintas. Elas são encontradas na maioria das células dos vertebrados: α5β1, por exemplo, é um receptor

Tabela 19-4 Alguns tipos de integrinas

INTEGRINA	LIGANTE*	DISTRIBUIÇÃO	FENÓTIPO QUANDO A SUBUNIDADE α É MUTADA	FENÓTIPO QUANDO A SUBUNIDADE β É MUTADA
α5β1	Fibronectina	Diversa	Morte do embrião; defeitos nos vasos sanguíneos, somitos e crista neural	Morte precoce do embrião (na implantação)
α6β1	Laminina	Diversa	Severas bolhas na pele; defeito em outros epitélios	Morte precoce do embrião (na implantação)
α7β1	Laminina	Músculo	Distrofia muscular; defeitos nas junções miotendinosas	Morte precoce do embrião (na implantação)
αLβ2 (LFA1)	Contra-receptores da superfamília das Igs (ICAM)	Leucócitos	Redução no recrutamento dos leucócitos	Deficiência na adesão dos leucócitos (LAD); resposta inflamatória reduzida; infecções recorrentes com risco de morte
αIIbβ3	Fibrinogênio	Plaquetas	Sangramento, não-agregação das plaquetas (doença de Glanzmann)	Sangramento; não-agregação das plaquetas (Doença de Glanzmann); osteoporose moderada
α6β4	Laminina	Hemidesmossomos do epitélio	Severas bolhas na pele; defeitos em outros epitélios	Severas bolhas na pele; defeitos em outros epitélios

* Nem todos os ligantes estão listados.

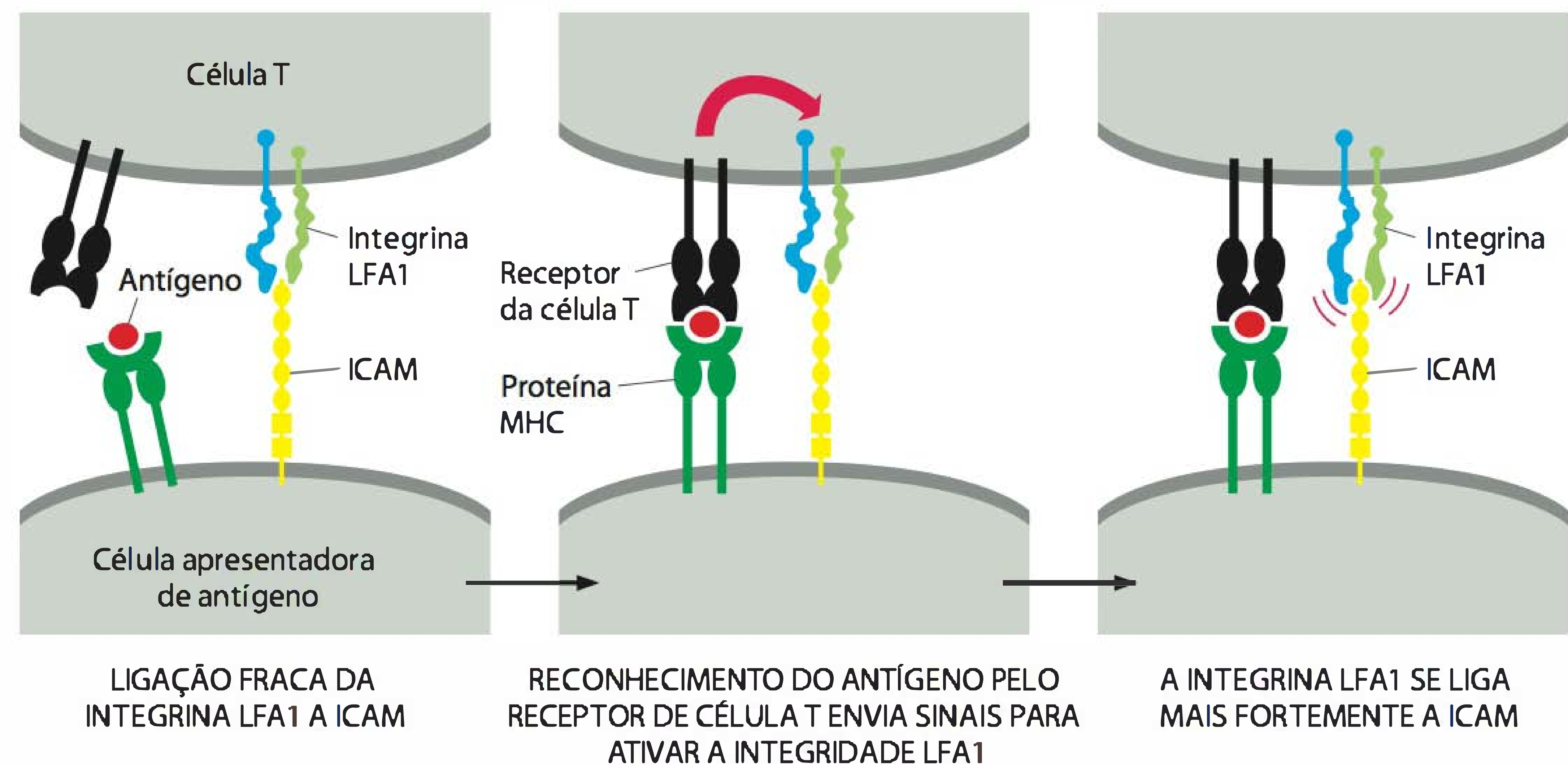


Figura 19-50 Ativação da integrina durante o encontro de um linfócito T com uma célula apresentadora de antígeno. Inicialmente, as duas células se aderem fracamente por meio da ligação da integrina LFA1 da célula T com a ICAM, uma molécula da superfamília das Igs, na membrana da célula apresentadora de antígeno. Se o receptor de célula T reconhece, ao mesmo tempo, o antígeno apresentado por uma molécula do MHC da célula apresentadora de antígeno, é produzido um sinal intracelular do receptor de célula T para ativar a integrina LFA1. Como resultado, a LFA1 realiza uma ligação mais forte e persistente à ICAM e dá mais tempo para a célula apresentadora de antígeno ativar a célula T e desencadear uma resposta imune específica. (Adaptada de K. Murphy et al., Janeway´s Immunobiology, 7th Ed. New York: Garland Science, 2008.)

de fibronectina, é e α6β1, um receptor de laminina em muitos tipos celulares. Camundongos mutantes que não produzem integrinas β1 morrem durante a implantação, enquanto camundongos que não produzem apenas a subunidade α7 (complementar à β1 no músculo) sobrevivem, mas desenvolvem distrofia muscular (assim como os camundongos que não produzem os receptores para a integrina α7β1).

As subunidades $β_2$ formam dímeros com pelo menos quatro tipos de subunidade α. Elas são expressas exclusivamente na superfície dos leucócitos, onde atuam capacitando essas células a combater infecções. As integrinas β2 medeiam, principalmente, as interações célula-célula, ao invés das interações célula-matriz, ligando-se a ligantes específicos na outra célula, como uma célula endotelial. Os ligantes, algumas vezes denominados *contra-receptores*, são membros da superfamília das Igs de moléculas de adesão célula-célula já fornecemos um exemplo sobre isso neste capítulo: uma integrina dessa classe (αLβ2, também conhecida como LFA1) capacita os leucócitos a ligarem-se firmemente a uma proteína ICAM da família das Igs nas células endoteliais de locais com infecção e, por meio dessa ligação, a migrar para fora da corrente sanguínea em direção ao local da infecção (ver Figura 19-19B). Pessoas com a doença genética chamada de *deficiência da adesão de leucócitos* são incapazes de sintetizar subunidades β2. Como consequência, seus leucócitos não possuem toda a família de receptores β2 e sofrem repetidas infecções bacterianas.

As integrinas β3 são encontradas em uma variedade de células, incluindo as plaquetas sanguíneas. Elas ligam várias proteínas de matriz, incluindo o *fibrinogênio*. As plaquetas interagem com o fibrinogênio durante a coagulação, e pessoas com a *doença de Glanzmann*, que possuem deficiência genética da integrina β3, sangram em excesso.

Tanto nos leucócitos quanto nas plaquetas, a capacidade de regular a atividade da integrina pela sinalização de dentro para fora é particularmente importante. A adesão regulada permite que as células circulem livremente até que sejam ativadas por um estímulo adequado. As integrinas não precisam ser sintetizadas *de novo*, assim a resposta de adesão à sinalização pode ser rápida. As plaquetas, por exemplo, respondem ao contato com a parede danificada de um vaso sanguíneo e a várias moléculas de sinalização solúveis, desencadeando a ativação da integrina β3 na membrana da plaqueta. A interação resultante das plaquetas com o fibrinogênio leva à formação de um tampão de plaquetas que auxilia a parar o sangramento exatamente no local necessário. Igualmente, a ligação de um linfócito T ao seu antígeno específico na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (discutido no Capítulo 25) ativa vias de sinalização intracelular na célula T que ativa suas integrinas β2 (**Figura 19-50**). As integrinas ativadas permitem que a célula T se ligue fortemente à célula apresentadora de antígeno, permanecendo em contato por tempo suficiente para que se torne completamente estimulada. As integrinas podem então, por sua vez, retornar ao estado inativo, permitindo que a célula T se dissocie.

As integrinas se agregam para formar adesões fortes

As integrinas, como outras moléculas de adesão celular, diferem dos receptores de superfície celular para hormônios ou para outras moléculas sinalizadoras solúveis extracelulares porque geralmente se ligam aos seus ligantes com baixa afinidade e em geral estão presen-

tes em concentrações 10 a 100 vezes maiores na superfície celular. O princípio do Velcro, mencionado anteriormente, também atua aqui. A forte adesão depende da agregação das integrinas, criando uma placa na qual muitos filamentos do citoesqueleto ficam ancorados, como um hemidesmossomo na epiderme ou uma adesão focal dos fibroblastos em cultura. Nas adesões focais e, de maneira menos proeminente, nas adesões célula-matriz ligadas à actina que as células realizam nos tecidos normais, a ativação da pequena GTPase Rho está envolvida na maturação do complexo de adesão, promovendo o recrutamento dos filamentos de actina e das integrinas para o local de contato. Integrinas artificialmente mutadas que não possuem cauda intracelular e que não se conectam com os filamentos do citoesqueleto não agregam e são incapazes de formar adesões fortes.

A ligação à matriz extracelular através das integrinas controla a proliferação e a sobrevivência celular

Como outras proteínas de adesão celular transmembrana, as integrinas fazem mais do que somente ligação. Elas também ativam vias de sinalização intracelular, permitindo o controle de qualquer aspecto do comportamento celular de acordo com a natureza da matriz circundante e o estado de ligação da célula a essa matriz.

Estudos em cultura mostraram que muitas células não irão crescer ou proliferar a não ser que estejam ligadas à matriz extracelular, pois os nutrientes e os fatores de crescimento solúveis do meio de cultura não são suficientes. Para alguns tipos celulares, incluindo as células epiteliais, endoteliais e musculares, até mesmo a sobrevivência celular depende de tal ligação. Quando essas células perdem o contato com a matriz extracelular, elas sofrem morte celular programada ou apoptose. Esta dependência de adesão a um substrato para o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular é conhecida como **dependência de ancoramento**, sendo mediada principalmente por integrinas e pelos sinais intracelulares por elas gerados. Acredita-se que a dependência de ancoramento auxilie a assegurar que cada tipo de célula sobreviva e prolifere somente quando se encontra em situação adequada. Mutações que rompem ou dominam esta forma de controle, permitindo que as células escapem da dependência de ancoramento, ocorrem em células cancerosas e desempenham um importante papel no comportamento invasivo.

A expansão física de uma célula na matriz também tem grande influência nos eventos intracelulares. Células que são forçadas a se espalhar sobre uma grande superfície pela formação de adesões múltiplas em diversos locais sobrevivem melhor e proliferam mais rapidamente do que aquelas não tão espalhadas (**Figura 19-51**). O efeito estimulante do espalhamento da célula auxilia a regeneração do tecido após um dano. Se as células de um epitélio, por exemplo, forem perdidas, a propagação das células remanescentes nos espaços vazios auxiliará a estimular essas sobreviventes a proliferar até que preencham o espaço. Não se sabe ao certo como uma célula detecta sua área de expansão e ajusta seu comportamento de acordo, mas a capacidade de se espalhar depende das integrinas, e os sinais gerados pelas integrinas nos locais de adesão devem desempenhar um papel importante fornecendo o estímulo para a expansão.

A compreensão da dependência de ancoramento e dos efeitos da expansão celular é decorrente de estudos de células em divisão em recipiente de cultura recobertos com matriz.

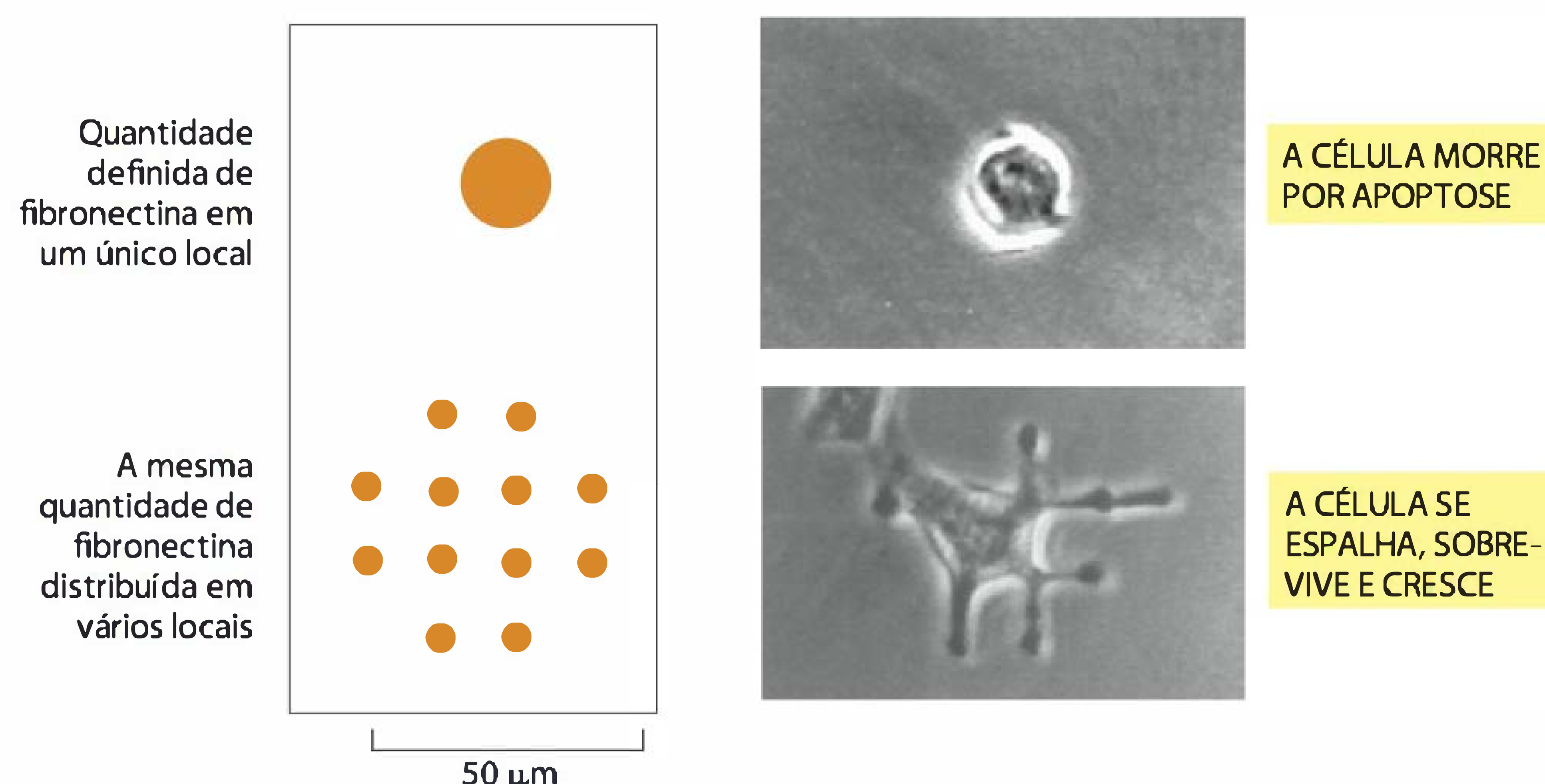


Figura 19-51 Importância do espalhamento celular. Neste experimento, o crescimento e a sobrevivência celular dependem da extensão do espalhamento a um substrato, e não do número de moléculas de matriz extracelular com que as células fazem contato. (Com base em C. S. Chen et al., *Science* 276:1425-1428, 1997. Com permissão de AAAS.)

Para as células de tecido conectivo que normalmente são circundadas por matriz em todos os lados, isto é muito diferente de seu ambiente natural. Caminhar pelo campo é diferente de se esgueirar pela mata. Os tipos de contato realizados pelas células em um substrato rígido não são os similares àqueles, menos conhecidos, que elas fazem com uma rede de fibras deformáveis da matriz extracelular, e há diferenças substanciais no comportamento celular nestes dois contextos. Apesar disso, é provável que os mesmos princípios básicos se apliquem. Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os sinais intracelulares produzidos nos locais de adesão célula-matriz, por complexos moleculares organizados ao redor das integrinas, são cruciais à proliferação e à sobrevivência celular.

As integrinas recrutam as proteínas sinalizadoras intracelulares para os locais de adesão célula-substrato

Os mecanismos pelos quais as integrinas sinalizam para o interior da célula são complexos, envolvendo várias vias diferentes, e integrinas e receptores de sinalização convencionais frequentemente influenciam um ao outro e atuam juntos para regular o comportamento celular, como já enfatizado. A via das cinases Ras/MAP (ver Figura 15-61), por exemplo, pode ser ativada tanto por receptores de sinalização convencionais quanto por integrinas, mas as células frequentemente necessitam dos dois tipos de estímulo dessa via, ao mesmo tempo, para receber ativação suficiente para induzir a proliferação celular. As integrinas e os receptores de sinalização convencionais também cooperam na ativação de vias similares para promover a sobrevivência celular (como discutido nos Capítulos 15 e 17).

Uma das maneiras mais bem estudadas da sinalização das integrinas depende de uma proteína tirosina-cinase denominada **cinase de adesão focal** (**FAK**, ***focal adhesion kinase***). As adesões focais frequentemente são mais proeminentes nos locais de fosforilação das tirosinas nas células em cultura (**Figura 19-52**A), e a FAK é uma das principais proteínas tirosina fosforiladas encontrada nesses locais. Quando as integrinas se agregam nos locais de contato célula-matriz, a FAK é recrutada por proteínas de ancoramento intracelular como a talina, a qual liga-se à subunidade β da integrina, ou a *paxilina*, a qual liga-se a um tipo de subunidade α da integrina. As moléculas FAK agregadas fazem a fosforilação cruzada umas das outras em tirosinas específicas, criando um sítio de encaixe para os membros da família Src de tirosina-cinases citoplasmáticas. Estas cinases fosforilam as FAKs em tirosinas adicionais, criando sítios de encaixe para inúmeras proteínas sinalizadoras intracelulares. Dessa forma, de fora para dentro, a sinalização das integrinas, via FAKs ou cinases da família Src, é passada adiante na célula (como discutido no Capítulo 15).

Uma forma de analisar a função das FAKs é examinar as adesões focais em células de camundongos mutantes que não possuem a proteína. Fibroblastos deficientes de FAK

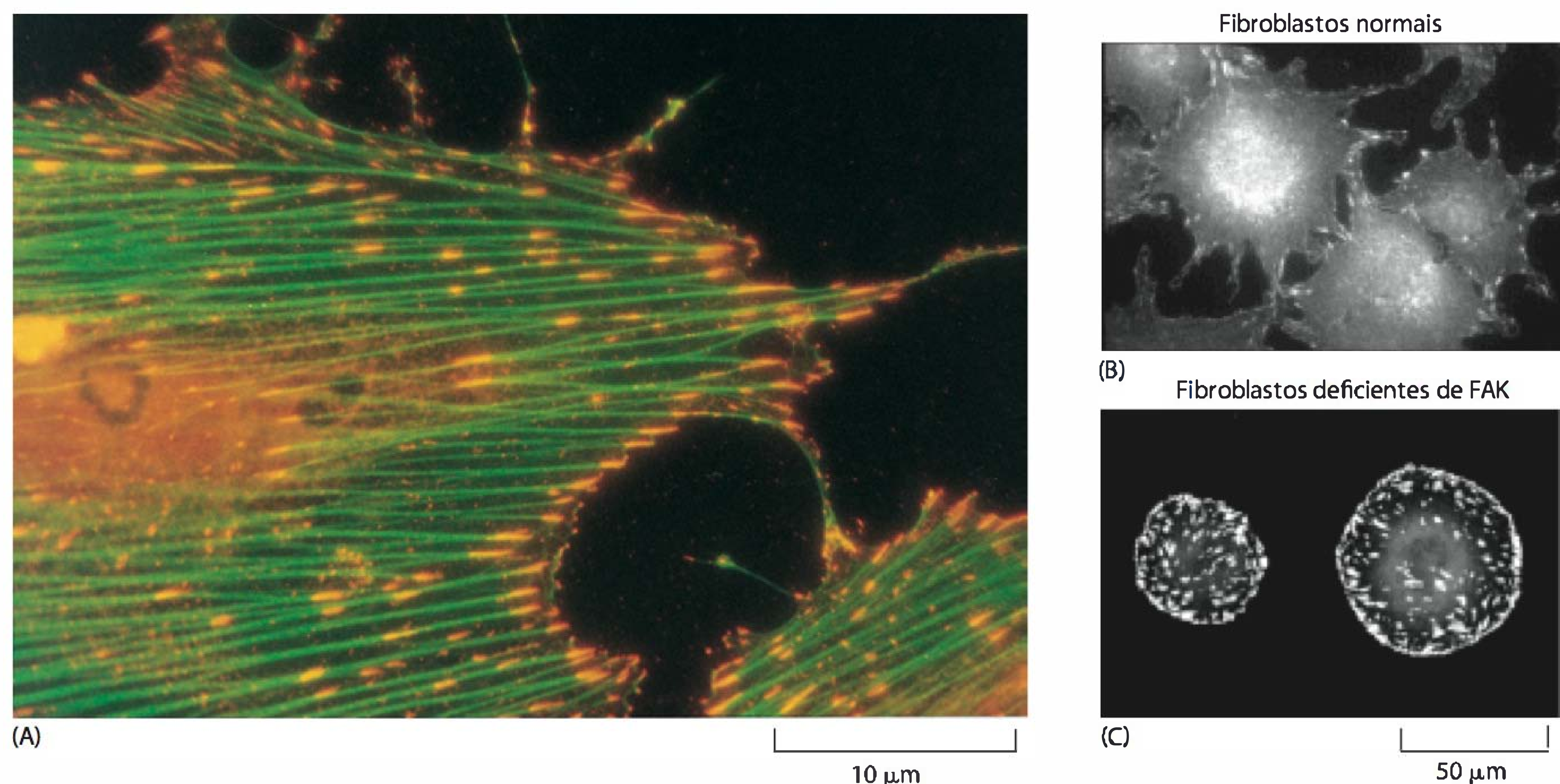


Figura 19-52 Adesões focais e o papel da cinase de adesão focal (FAK). (A) Cultura de fibroblasto em um substrato revestido com fibronectina e corada com anticorpo fluorescente: os filamentos de actina são corados em *verde*, e as proteínas ativadas que contêm fosfotirosina, em *vermelho*, conferindo uma coloração *laranja* na sobreposição dos dois componentes. Os filamentos de actina terminam nas adesões focais, onde as células aderem ao substrato por meio das integrinas. As proteínas contendo fosfotirosinas também estão concentradas nesses locais, refletindo a ativação local da FAK e de outras proteína-cinases. A sinalização gerada nesses locais de adesão auxilia a regular a divisão, o crescimento e a sobrevivência celular. (B, C) A influência da FAK na formação das adesões focais é apresentada pela comparação de fibroblastos normais e deficientes em FAK corados com anticorpos contra vinculina para revelar as adesões focais. (B) O fibroblasto normal apresenta poucas adesões focais e espalha-se após duas horas em cultura. (C) No mesmo local, os fibroblastos deficientes em FAK possuem mais adesões focais e não se espalham. (A, cortesia de Keith Burridge; B, C, de D. Ilic et al., *Nature* 377:539-544, 1995. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

ainda se aderem à fibronectina e formam adesões focais. Surpreendentemente, eles formam muitas adesões focais. Como resultado, o espalhamento celular e a migração são mais lentos (Figura 19-52B e C). Esses achados inesperados sugerem que as FAKs normalmente auxiliam a dissociação das adesões focais e que esta perda de adesão é necessária à migração celular normal. Muitas células cancerosas possuem elevados níveis de FAK que auxiliam a explicar por que elas frequentemente são mais móveis do que suas similares normais.

As integrinas podem produzir efeitos intracelulares localizados

As integrinas ativadas pela FAK ou por outras vias, como receptores de sinalização, podem induzir uma resposta celular global, frequentemente incluindo mudanças na expressão gênica. Contudo, as integrinas são particularmente adeptas a estimular as mudanças localizadas no citoplasma próximo ao contato célula-matriz. Já mencionamos um exemplo importante durante a discussão da polaridade da célula epitelial: é através das integrinas que a lâmina basal atua coordenando a organização ápico-basal das células epiteliais.

Efeitos intracelulares localizados podem ser uma característica comum da sinalização por proteínas de adesão transmembrana em geral. No sistema nervoso em desenvolvimento, por exemplo, a ponta de um axônio em crescimento é guiada principalmente por suas respostas de adesão (e repulsão) localizadas no ambiente que são reconhecidas pelas proteínas de adesão transmembrana, como discutido no Capítulo 22. Os efeitos primários das proteínas de adesão podem ser resultado da ativação de vias de sinalização intracelular que atuam localmente na ponta dos axônios, ao invés da própria adesão célula-célula ou sinais transmitidos para o corpo celular. Pela ativação localizada da família das pequenas GTPases Rho, por exemplo (como discutido nos Capítulos 15 e 16), as proteínas de adesão transmembrana podem controlar a mobilidade e guiar o movimento adiante. Dessa maneira, praticamente todas as classes de moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz que mencionamos, incluindo as integrinas, são organizadas para auxiliar a guiar o axônio em crescimento no sistema nervoso em desenvolvimento.

A **Tabela 19-5** resume as categorias de moléculas de adesão que consideramos neste capítulo. Na próxima seção, passaremos das moléculas de adesão das membranas celulares para análise em detalhes da matriz extracelular que circunda as células do tecido conectivo.

Tabela 19-5 Famílias das moléculas de adesão celular

	ALGUNS MEMBROS DA FAMÍLIA	DEPENDÊNCIA DE Ca^{2+} OU Mg^{2+}	HOMOFÍLICA OU HETEROFÍLICA	ASSOCIAÇÕES AO CITOESQUELETO	ASSOCIAÇÕES COM AS JUNÇÕES CELULARES
Adesãocélula-célula					
Caderinas clássicas	E, N, P, VE	Sim	Homofílica	Filamentos de actina (via cateninas)	Junções aderentes, sinapses
Caderinas desmossômicas	Desmogleína, desmocolina	Sim	Homofílica	Filamentos intermediários (via desmoplaquina, placoglobina e placofilina)	Desmossomos
Membros da família das Igs	N-CAM, ICAM	Não	Ambas	Desconhecido	Sinapses neurológicas e imunológicas
Selectinas (células sanguíneas e endoteliais)	Selectinas L, E e P	Sim	Heterofílica	Filamentos de actina	(sem estrutura juncional proeminente)
Integrinas nas células sanguíneas	$\alpha L\beta 2$ (LFA1)	Sim	Heterofílica	Filamentos de actina	Sinapses imunológicas
Adesão célula-matriz					
Integrinas	Muitos tipos	Sim	Heterofílica	Filamentos de actina (via talina, paxilina, filamina, α-actinina e vinculina)	Adesões focais
	$\alpha 6\beta 4$	Sim	Heterofílica	Filamentos intermediários (via pactina e distonina)	Hemidesmossomos
Proteoglicanos transmembrana	Sindecanas	Não	Heterofílica	Filamentos de actina	(sem estrutura juncional proeminente)

Resumo

As integrinas são os principais receptores usados pelas células animais para ligarem-se à matriz extracelular. Elas atuam como ligantes transmembrana entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, conectando-se normalmente à actina, mas ligam-se aos filamentos intermediários pelas integrinas especializadas nos hemidesmossomos. As moléculas de integrina são heterodímeros, e a ligação ao ligante está associada a uma dramática mudança na conformação. Isso cria uma associação alostérica entre a ligação da matriz fora da célula e a ligação ao citoesqueleto no interior da célula, permitindo que a integrina emita sinais nas duas direções através da membrana plasmática, de dentro para fora e de fora para dentro. A ligação de uma proteína de ancoramento, a talina, à cauda da integrina tende a levar a integrina a uma conformação estendida com aumento da afinidade por seu ligante extracelular. Reciprocamente, a ligação a um ligante extracelular, ao promover a mesma mudança na conformação, leva à ligação da talina e à formação de uma ligação ao citoesqueleto de actina. A complexa reunião de proteínas torna-se organizada ao redor das caudas intracelulares das integrinas, produzindo sinais intracelulares que podem influenciar quase todos os aspectos do comportamento celular, desde a proliferação e a sobrevivência, como no fenômeno da dependência de ancoramento, até a polaridade celular e a orientação para a migração.

A MATRIZ EXTRACELULAR DOS TECIDOS CONECTIVOS ANIMAIS

Já discutimos a lâmina basal com um exemplo de protótipo de matriz extracelular, comum a praticamente todos os animais multicelulares e como uma característica essencial do tecido epitelial. Agora veremos uma maior variedade de formas de matriz extracelular encontrada no tecido conectivo (**Figura 19-53**). Aqui a matriz extracelular geralmente é mais abundante do que as células que a circundam, e ela determina as propriedades físicas dos tecidos.

As classes de macromoléculas que constituem a matriz extracelular nos tecidos animais são grosseiramente similares, se considerarmos a lâmina basal ou outras formas que a matriz pode ter, mas as variações nas quantidades relativas dessas diferentes classes de moléculas e no modo como elas estão organizadas dão origem a uma surpreendente diversidade de materiais. A matriz pode tornar-se calcificada para formar estruturas rígidas como os ossos e os dentes, ou pode formar a matriz transparente da córnea, ou ainda adotar a forma de cordões que originam os tendões e sua grande força tensora. Ela forma a gelatina das águas-vivas. Cobrindo o corpo de um besouro ou uma lagosta, forma uma rígida carapaça. Além disso, a matriz extracelular é mais do que uma sustentação passiva que fornece um suporte físico. Ela desempenha um papel complexo ativo na regulação do comportamento das células que fazem contato, influenciando o desenvolvimento, a migração, a proliferação, a forma e a função.

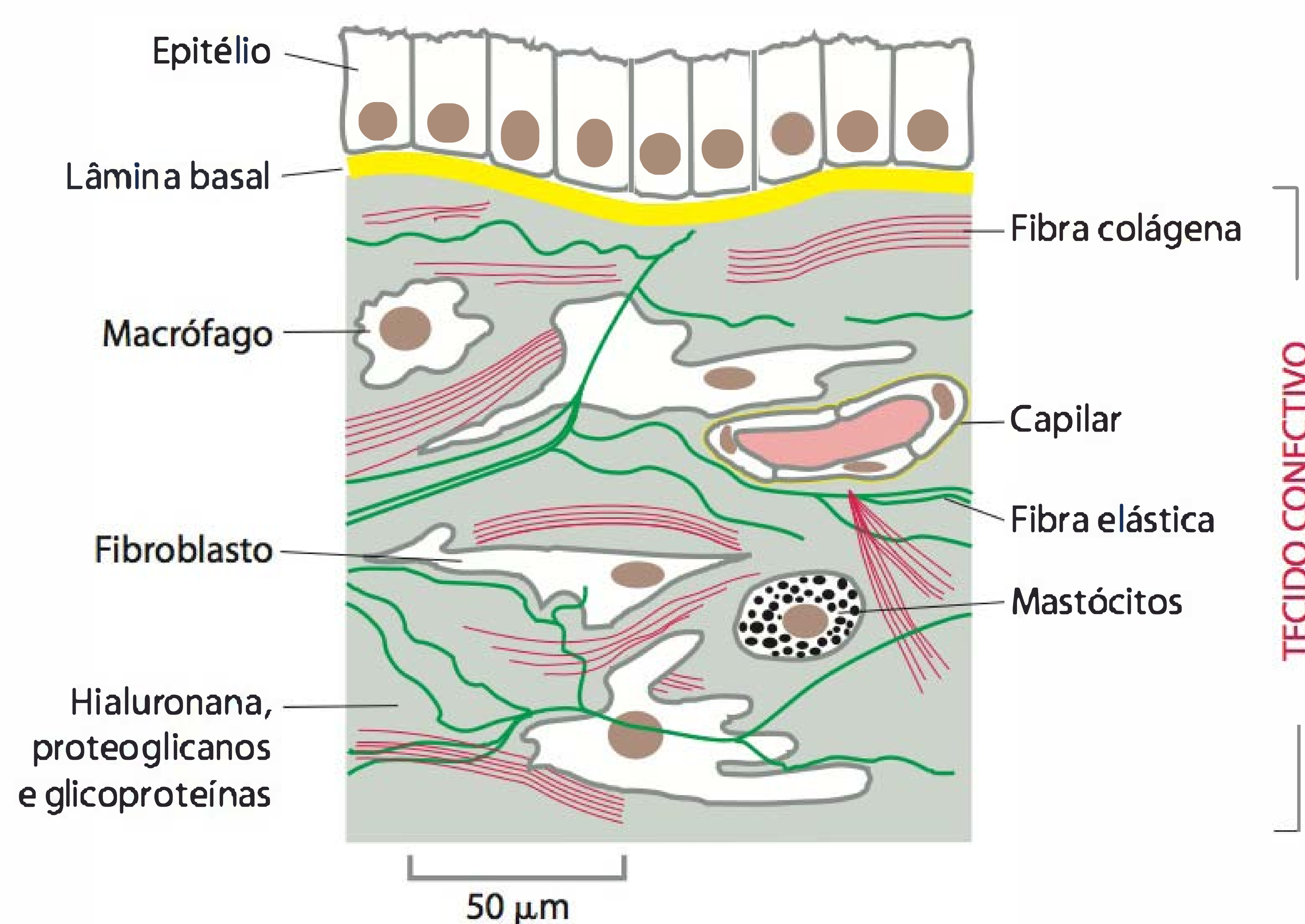


Figura 19-53 Tecido conectivo subjacente à camada de células epiteliais. Este tecido contém uma variedade de células e componentes da matriz extracelular. O tipo de célula predominante é o fibroblasto, que secreta matriz extracelular abundante.

Nesta seção, direcionaremos nossa discussão à matriz extracelular do tecido conectivo dos vertebrados; no entanto, grande parte da matriz extracelular desempenha um importante papel em quase todos os organismos multicelulares. Os exemplos incluem a cutícula de vermes e insetos, a concha dos moluscos, a parede celular dos fungos e, como será discutido mais tarde, a parede celular das plantas.

A matriz extracelular é produzida e orientada pelas células

As macromoléculas que constituem a matriz extracelular são produzidas localmente pelas células na matriz. Como discutiremos mais tarde, essas células também auxiliam a organizar a matriz. A orientação do citoesqueleto no interior da célula pode controlar a orientação da matriz do lado de fora. Na maioria dos tecidos conectivos, as macromoléculas da matriz são secretadas, principalmente por células denominadas **fibroblastos** (**Figura 19-54**). Em certos tipos especializados de tecido conectivo, como osso e cartilagem, elas são secretadas por células da família dos fibroblastos que possuem nomes mais específicos, os *condroblastos*, por exemplo, para a cartilagem, e os *osteoblastos*, para o osso.

A matriz no tecido conectivo é formada pelas duas principais classes de macromoléculas da lamina basal: (1) as cadeias de polissacarídeos de glicosaminoglicanos, as quais estão, normalmente, covalentemente ligadas a proteínas na forma de proteoglicanos, e (2) as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno. Veremos que os membros das duas classes são compostos por uma grande variedade de formas e tamanhos.

As moléculas de proteoglicanos no tecido conectivo tipicamente formam uma substância grosseira semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão embebidas as fibras proteicas. O gel de polissacarídeos resiste a forças de compressão na matriz ao mesmo tempo que permite a rápida difusão dos nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células dos tecidos. As fibras colágenas fortalecem e auxiliam a organizar a matriz, e as fibras de *elastina*, semelhantes à borracha, fornecem a resistência. Finalmente, muitas proteínas da matriz auxiliam as células a aderirem nos locais apropriados.

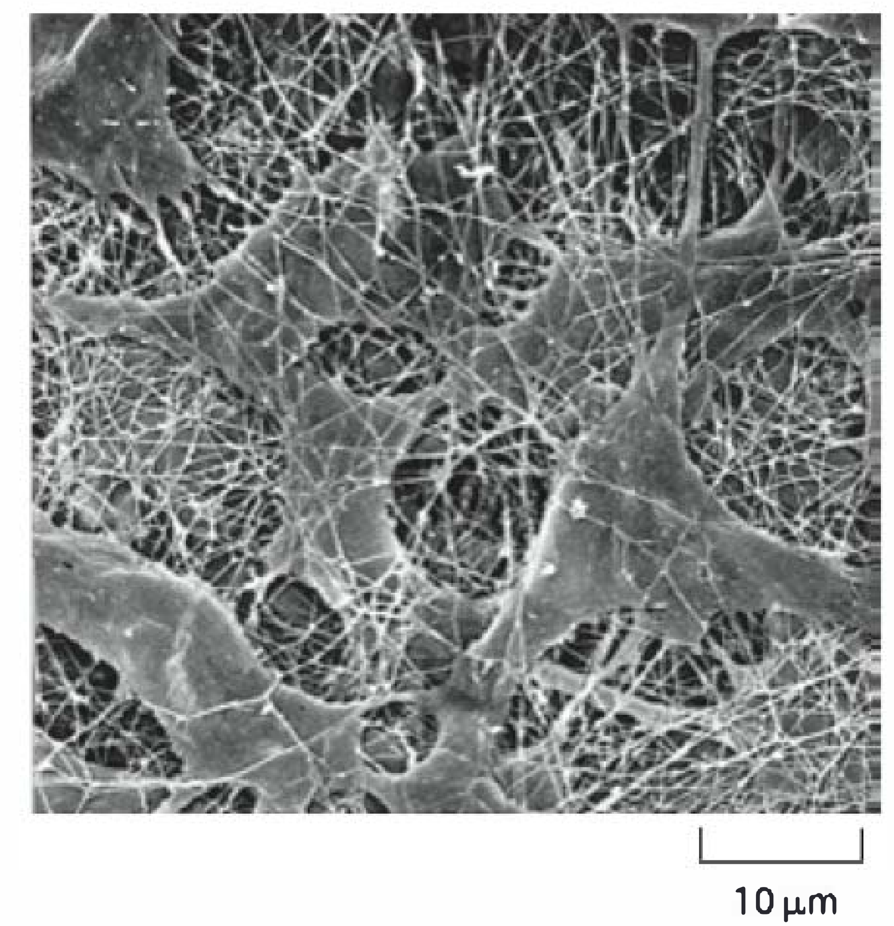


Figura 19-54 Fibroblastos no tecido conectivo. Esta micrografia eletrônica mostra o tecido da córnea de rato. A matriz extracelular circundando os fibroblastos é composta principalmente por fibrilas de colágeno. As glicoproteínas, os hialuronana, e os proteoglicanos, que normalmente formam o gel hidratado preenchendo os interstícios da rede fibrosa, foram removidos por tratamento ácido e enzimático. (De T. Nishida et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:1887-1890, 1988. Com permissão da Association for Research in Vision and Opthalmology.)

As cadeias de glicosaminoglicanos ocupam grande parte do espaço e formam géis hidratados

Os **glicosaminoglicanos** (**GAGs**) são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas. Eles são chamados de GAGs porque um dos dois açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar (*N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina), o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar normalmente é um ácido urônico (glicurônico ou idurônico). Grupos sulfato ou carboxila ocorrem na maioria dos açúcares, e por isso os GAGs são negativamente carregados (**Figura 19-55**). Eles são as moléculas mais aniônicas produzidas pelas células animais. Quatros principais grupos de GAGs são distinguidos de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação entre os açúcares e o número e localização dos grupos sulfato: (1) *hialuronana*, (2) *sulfato de codroitina* e *sulfato de dermatana*, (3) *sulfato de heparana* e (4) *sulfato de queratana*.

As cadeias polissacarídicas são muito rígidas para dobrarem-se em estruturas globulares compactas como as formadas pelas cadeias polipeptídicas. Além disso, elas são fortemente hidrofílicas. Assim, os GAGs tendem a adotar uma conformação altamente estendida, que

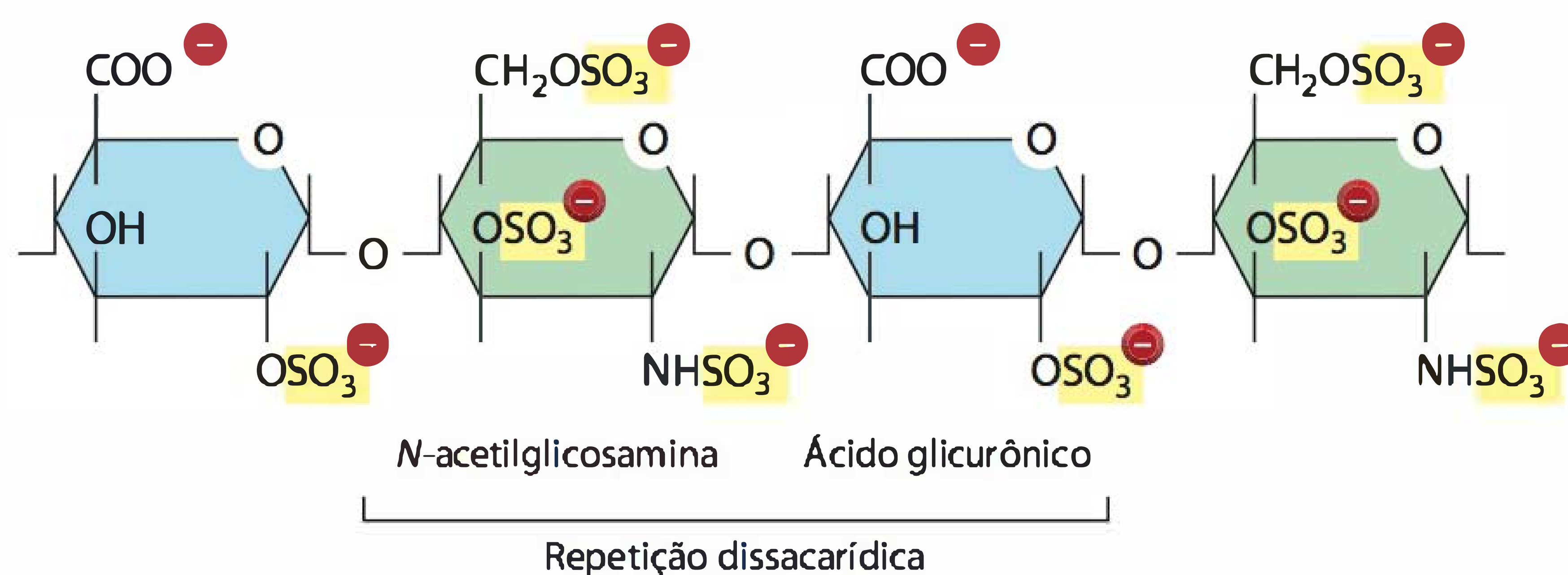


Figura 19-55 Sequência repetida de dissacarídeos da cadeia de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de heparana. Essas cadeias podem ser compostas por até 200 moléculas de unidades de dissacarídeos, mas tipicamente têm metade do tamanho. Há uma alta densidade de cargas negativas ao longo da cadeia, resultante da presença dos grupos sulfato e carboxila. Os proteoglicanos da lâmina basal – a perlecana, o distroglicano e o colágeno XVII – possuem GAGs com sulfato de heparana. A molécula é representada aqui com o número máximo de grupos sulfato. *In vivo*, a proporção de grupos sulfatados e não-sulfatados é variável. A heparina possui, tipicamente, > 70% de sulfatação, enquanto o sulfato de heparana possui < 50%.

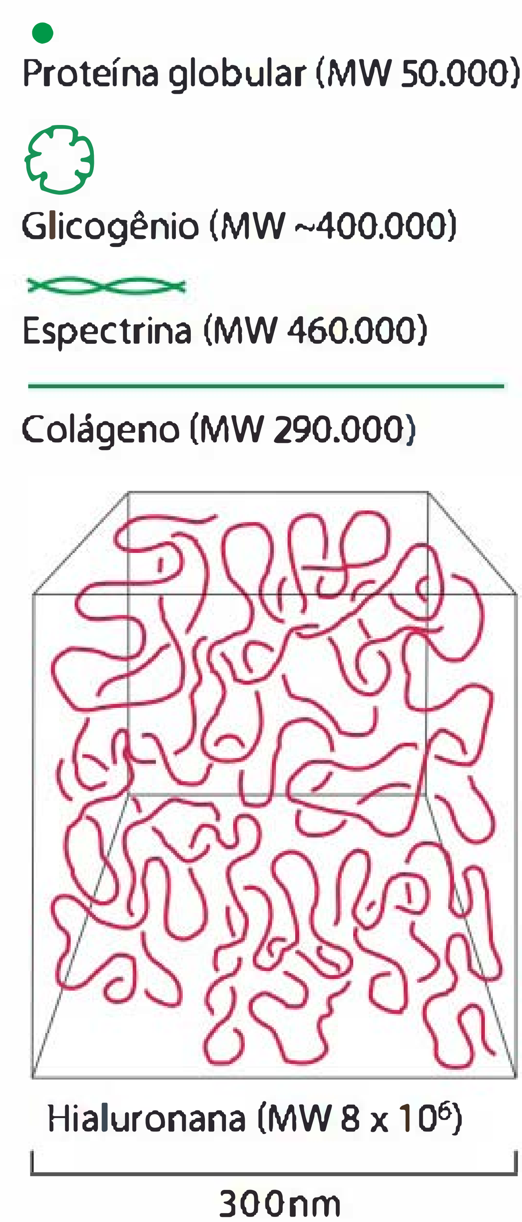


Figura 19-56 Dimensões relativas e volumes ocupados por várias macromoléculas. Várias proteínas, um grânulo de glicogênio e uma molécula de hialuronana simples hidratada são mostrados.

ocupa um grande volume com relação a sua massa (**Figura 19-56**), e formam géis a concentrações muito baixas. As altas densidades de cargas negativas atraem uma nuvem de cátions, principalmente Na^+, que são osmoticamente ativos, fazendo com que grande quantidade de água seja absorvida pela matriz. Isso cria uma pressão por inchaço, ou turgor, que permite que a matriz suporte forças de compressão (ao contrário das fibras colágenas, que resistem às forças de distensão). A matriz da cartilagem que forma as articulações dos joelhos, por exemplo, pode suportar pressões de centenas de atmosferas.

Defeitos na produção de GAGs podem afetar muitos sistemas do organismo. Em uma doença genética humana rara, há uma severa deficiência na síntese do dissacarídeo sulfato de dermatana. O indivíduo afetado possui baixa estatura, aparência prematuramente envelhecida e defeitos generalizados na pele, nas articulações, nos músculos e nos ossos.

Em invertebrados, plantas e fungos, outros tipos de polissacarídeos, diferentes dos GAGs, frequentemente dominam a matriz extracelular. Assim, nas plantas superiores, como veremos mais tarde, cadeias de celulose (poliglicose) são fortemente compactadas em arranjos cristalinos de fitas, para formar o principal componente da parede celular. Em insetos, crustáceos e outros artrópodes, a quitina (poli-*N*-acetilglicosamina) forma o principal componente do exoesqueleto. Juntos, a quitina e a celulose são os biopolímeros mais abundantes do planeta.

A hialuronana atua como um preenchedor de espaços e facilita a migração celular durante a morfogênese e o reparo

A **hialuronana** (também chamada de *ácido hialurônico* ou *hialuronato*) é o mais simples dos GAGs (**Figura 19-57**). Ela consiste em uma sequência repetida regular de até 25.000 unidades dissacarídicas não-sulfatadas, encontrada em quantidades variáveis em todos os tecidos e fluidos adultos animais, sendo especialmente abundante no embrião no início do desenvolvimento. A hialuronana não é típica da maioria dos GAGs. Essa proteína não contém açúcares sulfatados, diferente dos outros GAGs, todas suas unidades dissacarídicas são idênticas, o tamanho de sua cadeia é enorme (milhares de monômeros de açúcar) e em geral não está covalentemente ligada a qualquer proteína central. Além disso, enquanto outros GAGs são sintetizados dentro da célula e liberados por exocitose, a hialuronana é liberada diretamente da superfície celular por um complexo enzimático embebido na membrana plasmática.

A hialuronana possui uma função de resistência a forças de compressão nos tecidos e nas articulações. É também importante como preenchimento de espaço durante o desenvolvimento embrionário, onde pode ser usada para forçar a mudança da forma e da estrutura, pois pequenas quantidades se expandem com a água para ocupar um grande volume (ver Figura 19-56). A hialuronana sintetizada na porção basal do epitélio, por exemplo, frequentemente serve para criar um espaço livre de células para o qual as células irão migrar. Na formação do coração, por exemplo, a síntese de hialuronana auxilia na formação das válvulas e dos septos que separam as câmaras cardíacas. Um processo similar ocorre em vários outros órgãos. Quando a migração celular termina, o excesso de hialuronana em geral é degradado pela enzima *hialuronidase*. A hialuronana também é produzida em grandes quantidades

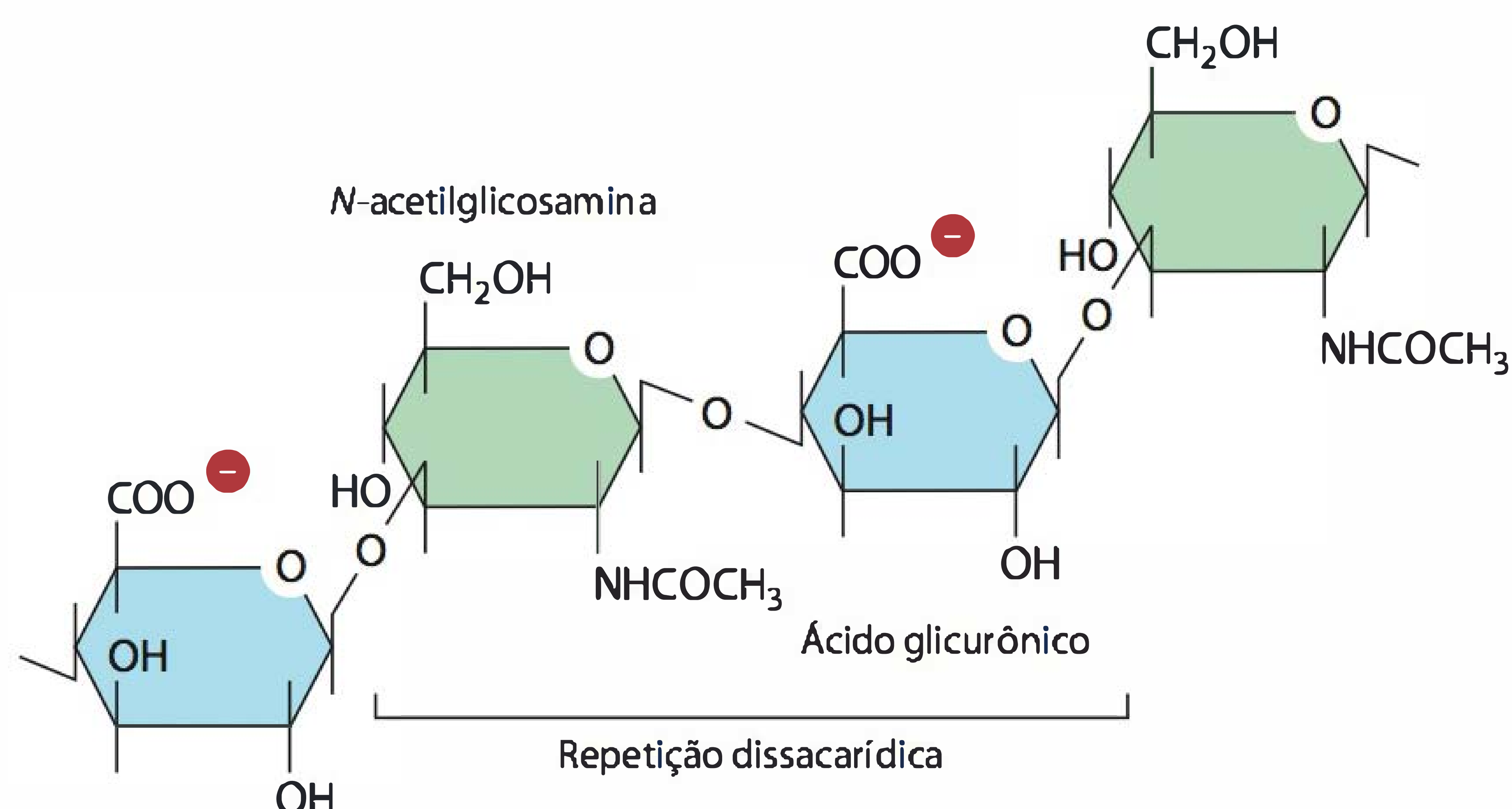


Figura 19-57 Sequência de dissacarídeo repetido na hialuronana, um GAG relativamente simples. Esta molécula ubiquoa nos vertebrados consiste em uma única cadeia longa de até 25.000 monômeros de açúcar. Observe a ausência de grupos sulfato.

durante a cicatrização, sendo um importante constituinte do fluido das articulações, onde atua como um lubrificante.

Muitas das funções da hialuronana dependem de interações específicas com outras moléculas, incluindo proteínas e proteoglicanos. Algumas dessas moléculas que se ligam à hialuronana são constituintes da matriz extracelular, enquanto outras são componentes integrais da superfície celular.

Os proteoglicanos são compostos de cadeias de GAGs covalentemente ligadas a um núcleo proteico

Com exceção da hialuronana, todos os GAGs são covalentemente ligados a uma proteína na forma de **proteoglicanos**, os quais são produzidos pela maioria das células animais. A cadeia polipeptídica, ou *núcleo proteico*, de um proteoglicano é produzida pelos ribossomos ligados à membrana e liberados no lúmen do retículo endoplasmático. As cadeias polissacarídicas são principalmente reunidas neste núcleo proteico no aparelho de Golgi. Um ligante especial tetrassacarídico é unido a uma serina na cadeia lateral do núcleo proteico para atuar como um iniciador para o crescimento do polipeptídeo, e então um açúcar é adicionado de cada vez por transferases glicosil específicas (**Figura 19-58**). Ainda no aparelho de Golgi, muitos dos açúcares polimerizados são covalentemente modificados por uma série de reações sequenciais coordenadas. As epimerizações alteram a configuração dos substituintes ao redor de átomos de carbono individuais na molécula de açúcar, e a sulfatação aumenta a carga negativa.

Os proteoglicanos são facilmente distinguíveis das outras glicoproteínas pela natureza, quantidade e arranjo de suas cadeias laterais de açúcares. Por definição, pelo menos uma cadeia lateral de açúcar de um proteoglicano deve ser um GAG. As glicoproteínas contêm 1 a 60% do peso em carboidratos na forma de numerosas e relativamente pequenas cadeias de oligossacarídeos ramificadas, ao passo que os proteoglicanos podem conter até 95% do peso em carboidratos, a maioria na forma de longas cadeias de GAGs não-ramificadas, cada uma com cerca de 80 açúcares.

Em princípio, os proteoglicanos possuem um potencial quase ilimitado de heterogeneidade. Mesmo um único tipo de núcleo proteico pode variar bastante no número e nos tipos de cadeias de GAGs a ele ligadas. Além disso, o padrão de repetição dos dissacarídeos em cada GAG pode ser modificado por um padrão complexo de grupos sulfato. Os núcleos proteicos também são diversos, embora muitos compartilhem alguns domínios característicos, como o domínio LINK envolvido na ligação dos GAGs.

Os proteoglicanos podem ser enormes. O proteoglicano *agrecan*, por exemplo, o principal componente da cartilagem, possui uma massa de 3×10^6 dáltons com mais de 100 cadeias de GAGs. Outros proteoglicanos são muito menores e possuem somente 1 a 10 cadeias de GAGs. Um exemplo é a *decorina*, a qual é secretada por fibroblastos e possui somente uma

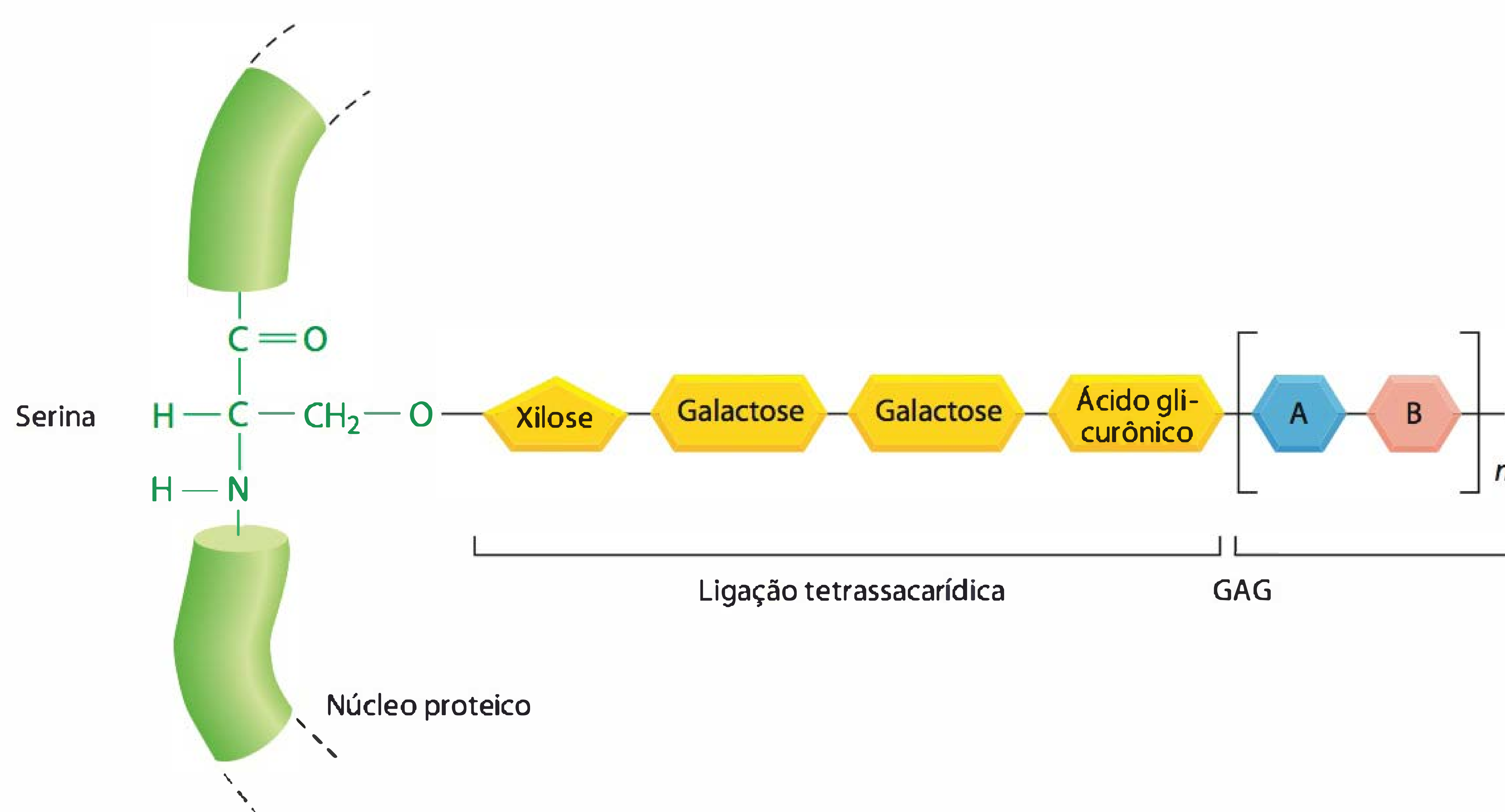


Figura 19-58 Ligação entre a cadeia de GAGs e o seu núcleo proteico na molécula de proteoglicano. Um tetrassacarídeo específico de ligação é primeiramente reunido em uma cadeia lateral de serina. Na maioria dos casos, não está claro como o resíduo de serina é selecionado, mas parece haver um reconhecimento de uma conformação específica local na cadeia polipeptídica, ao invés de uma sequência linear específica de aminoácidos. O resto da cadeia de GAGs, que consiste primariamente em unidades de dissacarídeos repetidas, é então sintetizado, com um açúcar sendo adicionado a cada vez. No sulfato de condroitina, o dissacarídeo é composto por D-ácidoglicurônico e *N*-acetil-D-galactosamina; no sulfato de heparana, é a D-glicosamina (ou o ácido L-indurônico) e a *N*-acetil-D-glicosamina; no sulfato de queratana, é a D-galactose e a *N*-acetil-D-glicosamina.

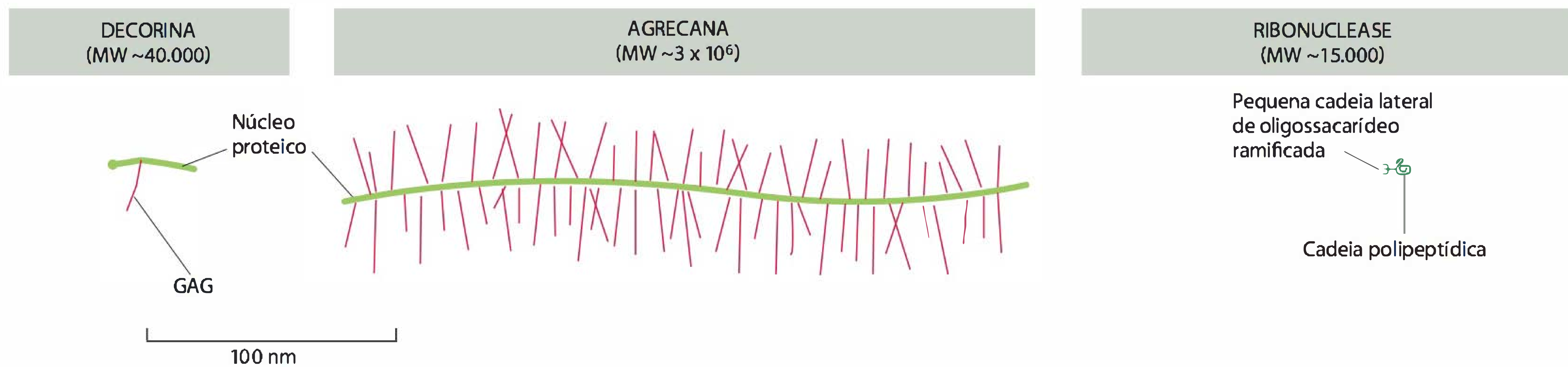


Figura 19-59 Exemplos de um proteoglicano grande (agrecana) e um pequeno (decorina), encontrados na matriz extracelular. Eles são comparados a uma molécula secretada de glicoproteína típica, a ribonuclease B pancreática. Todos estão desenhados em escala. Os núcleos proteicos de ambos os proteoglicanos, agrecana e decorina, contêm cadeias de oligossacarídeos, bem como as cadeias de GAGs, mas estas não são mostradas. A agrecana consiste de cerca de 100 cadeias de sulfato de condroitina e cerca de 30 cadeias de sulfato de queratana ligadas a um núcleo proteico rico em serina de aproximadamente 3.000 aminoácidos. A decorina "decora" a superfície das fibrilas de colágeno (daí o nome).

cadeia de GAGs (**Figura 19-59**). A decorina se liga às fibrilas de colágeno e regula a união e o diâmetro das fibrilas. Camundongos que não produzem decorinas possuem pele frágil com força tensora reduzida. Os GAGs e os proteoglicanos desses vários tipos podem se associar para formar complexos poliméricos ainda maiores na matriz extracelular. Moléculas de agrecan, por exemplo, unem-se à hialuronana na matriz da cartilagem para formar agregados do tamanho de uma bactéria (**Figura 19-60**). Além da associação de um com o outro, os GAGs e os proteoglicanos se associam a proteínas fibrosas da matriz como o colágeno, criando compostos extremamente complexos (**Figura 19-61**).

Os proteoglicanos podem regular a atividade das proteínas secretadas

Os proteoglicanos são tão diversos em função quanto em estrutura e química. Suas cadeias de GAGs, por exemplo, podem formar géis de tamanho de poro e densidade de cargas va-

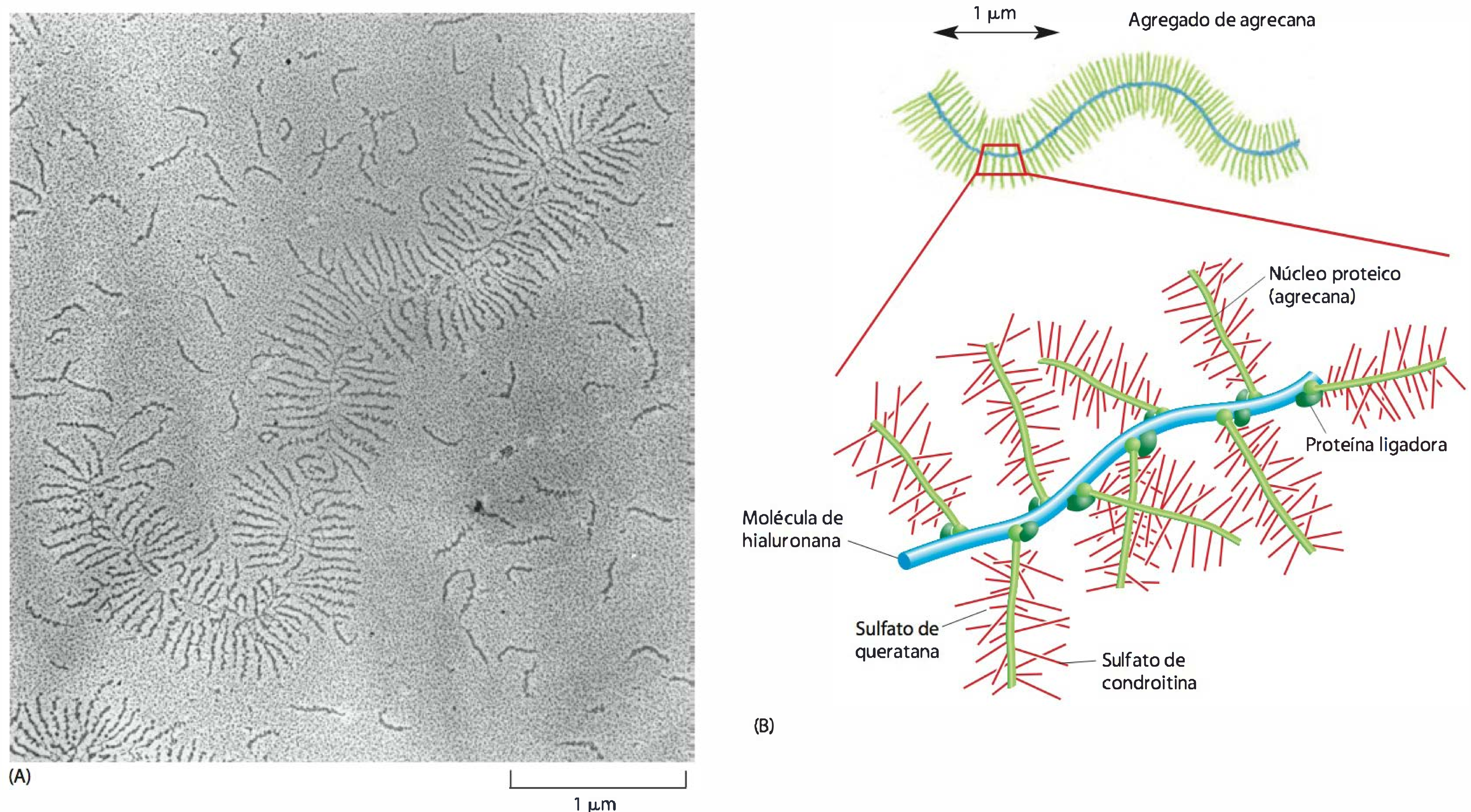


Figura 19-60 Agregado de agrecana da cartilagem de um feto bovino. (A) Micrografia eletrônica de um agregado de agrecana sombreado com platina. Várias moléculas de agrecana livres também são visualizadas. (B) Desenho esquemático do agregado de agrecana gigante mostrado em (A). O agregado consiste em aproximadamente 100 monômeros de agrecana (cada um como o mostrado na Figura 19-59) ligados não-covalentemente pelo domínio N-terminal ao núcleo proteico de uma única cadeia de hialuronana. As proteínas de ligação são membros da família das proteínas de ligação de hialuronana, algumas das quais são proteínas de superfície celular. O peso molecular do complexo pode ser de 10^8 ou mais, e ocupa um volume equivalente ao de uma bactéria, que é de cerca de 2×10^{-12} cm^3. (A, cortesia de Lawrence Rosenberg.)

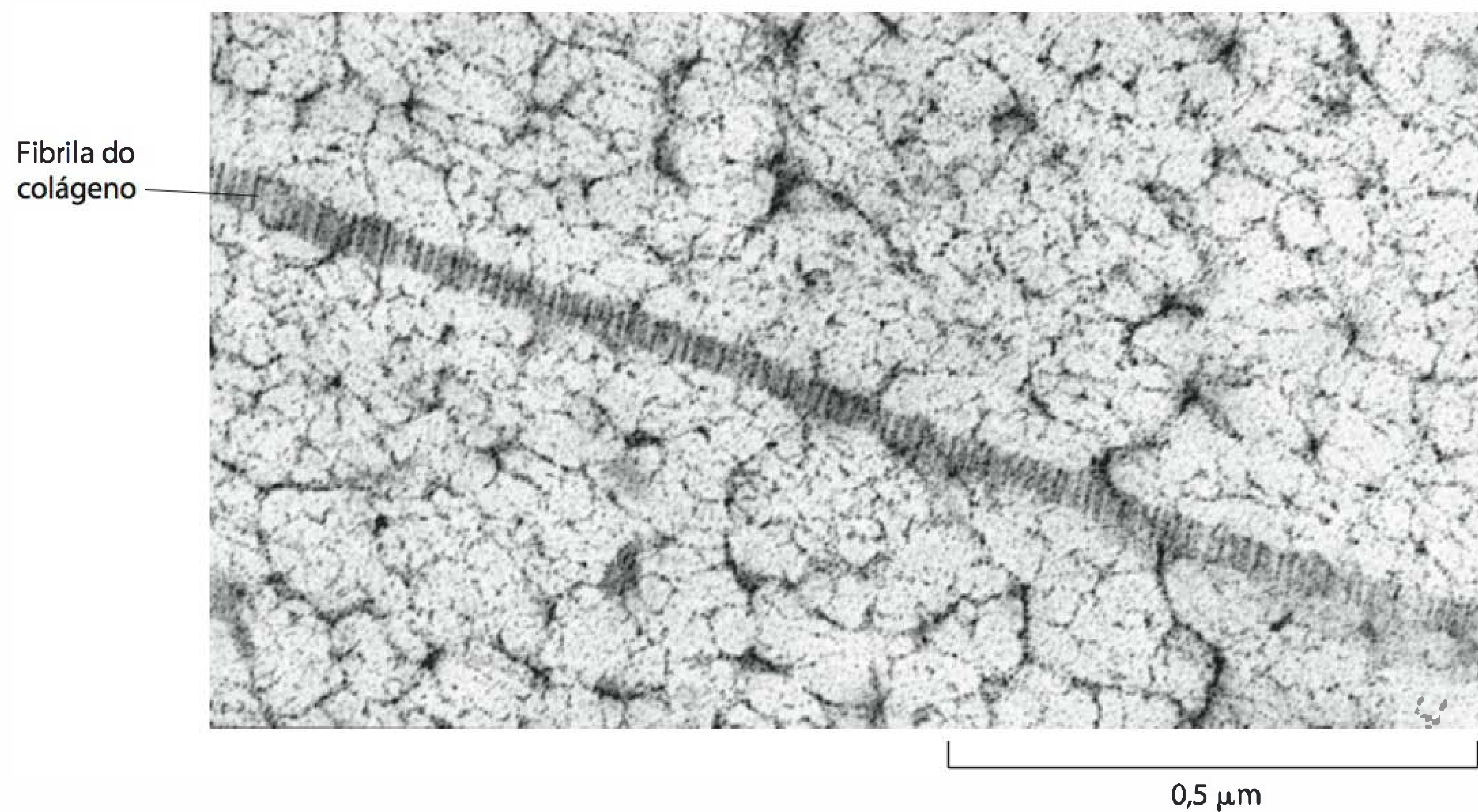


Figura 19-61 Proteoglicanos na matriz extracelular da cartilagem de rato. O tecido foi rapidamente congelado a –196°C, fixado e corado ainda congelado (por um processo chamado de criossubstituição) para evitar o colapso das cadeias de GAGs. Nesta eletromicrografia, as moléculas de proteoglicano são vistas formando uma rede de filamentos finos, na qual uma única fibrila de colágeno estriado está embutida. As partes mais coradas (escuras) das moléculas de proteoglicanos são o núcleo proteico; os fios menos corados são as cadeias de GAGs. (Reproduzidas de E. B. Hunziker e R. K. Schenk, *J. Cell Biol.* 98:277-282, 1984. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

riados. Portanto, uma possível função seria a de servir como um filtro seletivo para regular o tráfego de moléculas e células de acordo com seu tamanho, carga, ou ambos, como na espessa lâmina basal do glomérulo renal (ver p. 1167).

Os proteoglicanos possuem um papel importante na sinalização química entre as células. Eles ligam várias moléculas sinalizadoras secretadas, como certos fatores de crescimento, e podem aumentar ou inibir sua atividade sinalizadora. Por exemplo, as cadeias de sulfato de heparana dos proteoglicanos se ligam aos *fatores de crescimento de fibroblastos* (*FGFs, fibroblast growth factors*), os quais estimulam a proliferação de uma variedade de tipos celulares. Essa interação oligomeriza as moléculas do fator de crescimento, capacitando-as a realizar ligações cruzadas e ativar receptores de superfície celular, os quais são tirosina-cinases transmembrana (ver Figura 15-54A). Na resposta inflamatória, os proteoglicanos sulfato de heparana imobilizam moléculas quimiotáxicas secretadas denominadas *quimiocinas* (discutido no Capítulo 25) para a superfície da célula endotelial do vaso sanguíneo no local de inflamação. Isso permite que as quimiocinas permaneçam ali por um período mais prolongado, estimulando os leucócitos a deixar a corrente sanguínea e a migrar para o tecido inflamado. Na maioria dos casos, as moléculas-sinal ligam-se às cadeias de GAGs dos proteoglicanos, mas algumas vezes isso não acontece. Alguns membros da família do *fator de crescimento e transformação* β (*TGF, transforming gruowth factor* β) ligam-se ao núcleo proteico de vários proteoglicanos da matriz, incluindo a decorina, e ligando-se à decorina inibem a atividade dos fatores de crescimento. Moléculas-sinal (incluindo o TGFβ) também podem se ligar às proteínas da matriz. O *fator de crescimento do endotélio vascular* (*VEGF, vascular endothelial growth factor*), por exemplo, liga-se a fibronectina.

Os proteoglicanos também se ligam e regulam as atividades de outros tipos de proteínas secretadas, incluindo enzimas proteolíticas (proteases) e inibidores de proteases. A ligação ao proteoglicano pode controlar tanto a reunião quanto a degradação de outros componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno.

Os proteoglicanos de superfície celular atuam como receptores

Nem todos os proteoglicanos são componentes secretados na matriz extracelular. Alguns são componentes integrais das membranas plasmáticas e possuem seu núcleo proteico inserido na bicamada lipídica ou ligado à bicamada lipídica ancorado pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI). Alguns destes proteoglicanos da membrana plasmática atuam como *correceptores* que colaboram com receptores de superfície celular convencionais na ligação da célula às matrizes extracelulares e iniciando a resposta celular a alguma proteína sinalizadora extracelular. Além disso, alguns receptores convencionais possuem uma ou mais cadeias de GAGs e, portanto, são proteoglicanos.

Entre os proteoglicanos de membrana plasmática melhor caracterizados estão as *sindecanas*, as quais possuem um núcleo proteico que atravessa a membrana. Os domínios extracelulares destes proteoglicanos transmembrana possuem até três de cadeias de GAGs com sulfato de condroitinas e sulfato de heparana, enquanto que seus domínios intracelu-

Tabela 19-6 Alguns proteoglicanos comuns

PROTEOGLICANO	PESO MOLECULAR APROXIMADO DO NÚCLEO PROTEICO	TIPO DE CADEIAS DE GAGs	NÚMERO DE CADEIAS DE GAGs	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÕES
Agrecana	210.000	Sulfato de condroitina + sulfato de queratana (em cadeias separadas)	~130	Cartilagem	Suporte mecânico; forma agregados grandes com a hialuronana
Betaglicano	36.000	Sulfato de condroitina/ sulfato de dermatana	1	Superfície e matriz celular	Liga TGFβ
Decorina	40.000	Sulfato de condroitina/ sulfato de dermatana	1	Amplamente distribuída nos tecidos conectivos	Liga-se a fibrilas de colágeno tipo I e TGFβ
Perlecana	600.000	Sulfato de heparana	2-15	Lâmina basal	Funções estruturais e filtrantes na lâmina basal
Sindecana-1	32.000	Sulfato de condroitina + sulfato de heparana (em cadeias separadas)	1-3	Superfície celular	Adesão celular; liga FGF e outros fatores de crescimento
Dally (em *Drosophila*)	60.000	Sulfato de heparana	1-3	Superfície celular	Correceptor para as proteínas sinalizadoras Wingless e Decapentaplégica

lares interagem com o citoesqueleto de actina no córtex celular. As sindecanas estão localizadas na superfície de muitos tipos celulares, incluindo fibroblastos e células epiteliais onde atuam como receptores para as proteínas da matriz. Nos fibroblastos, as sindecanas podem ser encontradas nas adesões focais, onde modulam a função da integrina pela interação com a fibronectina na superfície celular e com o citoesqueleto e proteínas sinalizadoras do interior da célula. As sindecanas também ligam FGFs e os apresentam aos receptores de FGF da mesma célula. Igualmente, há um outro proteoglicano de membrana plasmática chamado de *betaglicano* que liga o TGFβ e pode apresentá-lo ao receptor TGFβ.

A importância dos proteoglicanos como correceptores é ilustrada pelo severo defeito de desenvolvimento que ocorre quando proteoglicanos específicos são inativados por mutações. Em *Drosophila*, por exemplo, os produtos do gene *Dally* e do gene *semelhante ao Dally*, as codificam membros da família *glipican*, com uma cadeia lateral de sulfato de heparana, são necessários à sinalização de não menos que quatro das principais proteínas sinalizadoras que coordenam o padrão de desenvolvimento do embrião (Wingless, Hedgehog, FGF e Decapentaplégica [DPP], como discutido no Capítulo 22). Em algumas dessas vias de sinalização, mutações no *Dally*, ou no gene *semelhante ao Dally*, mimetizam o efeito de mutações nos genes que codificam as próprias proteínas-sinal.

A estrutura, a função e a localização de alguns dos proteoglicanos discutidos neste capítulo estão resumidas na **Tabela 19-6**.

Os colágenos são as principais proteínas da matriz extracelular

As proteínas fibrosas não são menos importantes do que os proteoglicanos como componentes da matriz extracelular. Entre elas estão os **colágenos**, uma família de proteínas fibrosas encontrada em todos os animais multicelulares. Eles são secretados pelas células do tecido conectivo e por uma variedade de outros tipos celulares. Como principal componente da pele e dos ossos, eles são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo 25% da massa proteica total desses animais.

A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, denominadas *cadeias* α, são enroladas umas nas outras formando um tipo de corda supertorcida (**Figura 19-62**). Os colágenos são extremamente ricos em prolina e glicina, importantes na formação da fita tripla helicoidal. Devido à estrutura em anel, a prolina estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α, enquanto que a glicina é espaçada regularmente a cada dois resíduos por toda a região central da cadeia α. A glicina, sendo o menor aminoácido (possui apenas um átomo de hidrogênio como cadeia lateral), permite que as três hélices de cadeia α se agrupem firmemente para formar a super-hélice final de colágeno.

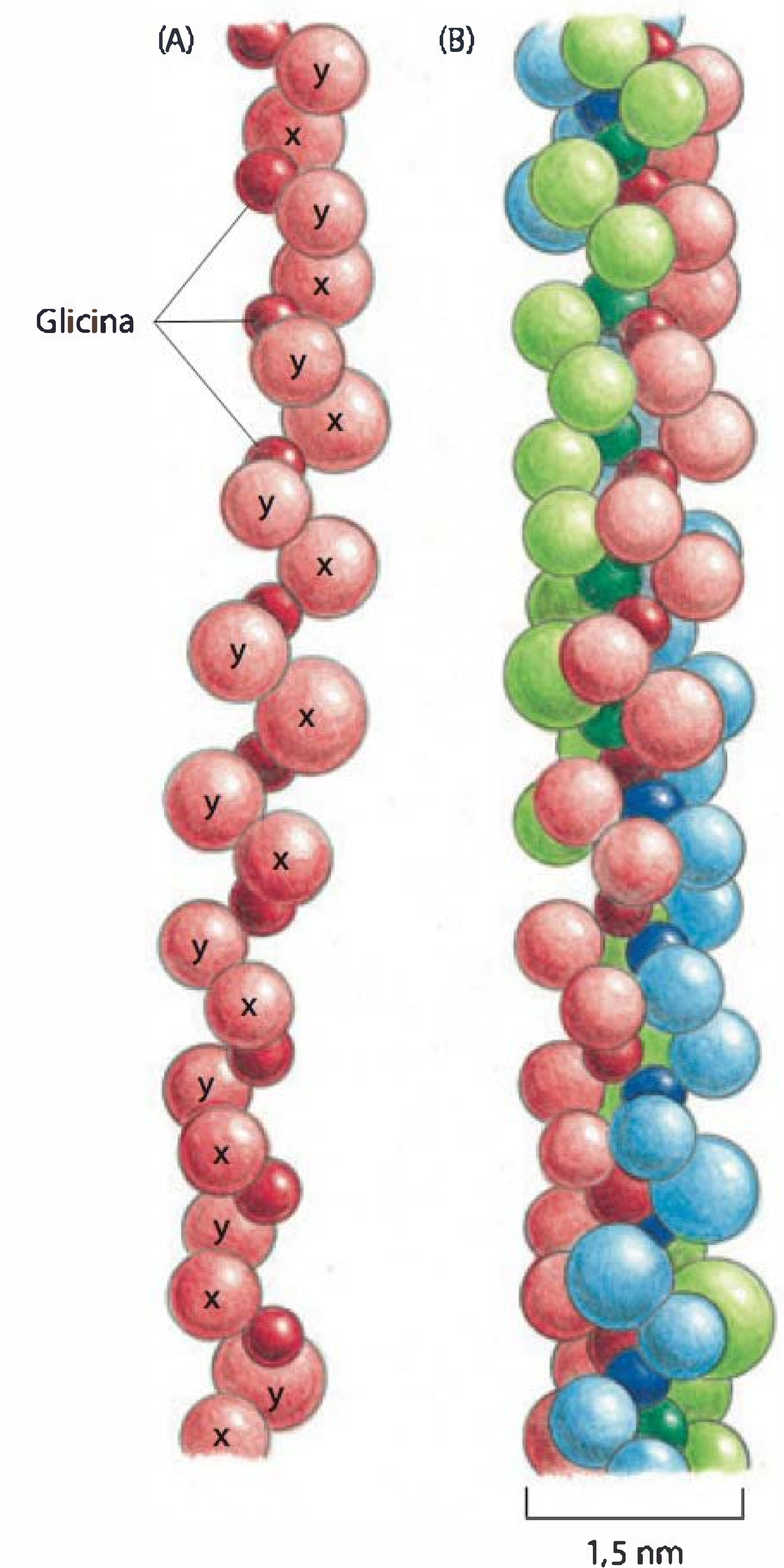


Figura 19-62 Estrutura de uma molécula típica de colágeno. (A) Modelo parcial de uma única cadeia α de colágeno na qual cada aminoácido é representado por uma esfera. A cadeia contém cerca de 1.000 aminoácidos e é organizada com uma hélice para a esquerda, contendo três aminoácidos por volta, sendo que o terceiro é sempre uma glicina. Dessa maneira, a cadeia α é composta de vários tripletes de sequências Gly-X-Y, nas quais X e Y podem ser quaisquer aminoácidos (porém, comumente, X é uma prolina e Y é uma hidroxiprolina). (B) Modelo parcial de uma molécula de colágeno na qual as três cadeias α, cada uma representada por uma cor diferente, são enroladas umas nas outras, formando a hélice de fita tripla em forma de bastão. A glicina é o único aminoácido pequeno o suficiente para ocupar o interior da tripla hélice. Apenas um curto segmento da molécula está representado; o comprimento total da molécula é de 300 nm. (Modelo de B. L. Trus.)

O genoma humano contém 42 genes distintos que codificam diferentes cadeias α de colágeno. Diferentes combinações desses genes são expressas em diferentes tecidos. Embora em princípio milhares de tipos de moléculas de colágeno de tripla hélice possam ser reunidos pelas várias combinações possíveis entre as 42 cadeias α, somente um número limitado de moléculas de colágeno foram encontradas. O colágeno tipo I é o mais comum, sendo o principal encontrado na pele e nos ossos. Ele pertence à classe de **colágenos fibrilares**, ou colágenos formadores de fibrilas, com estrutura semelhante a uma corda com pouca ou nenhuma interrupção. Após serem secretadas para o espaço extracelular, essas moléculas de colágeno reúnem-se em polímeros de ordem maior denominados *fibrilas de colágeno*, as quais são estruturas finas (10 a 300 nm em diâmetro) com centenas de micrômetros de comprimento nos tecidos maduros e claramente visíveis ao microscópio eletrônico (**Figura 19-63**; ver também Figura 19-61). As fibrilas de colágeno frequentemente se agregam em feixes semelhantes a cabos, muito maiores, com vários micrômetros de diâmetro, os quais podem ser vistos ao microscópio óptico como *fibras colágenas*.

Os colágenos tipo IX e XII são denominados *colágenos associados a fibrilas* porque decoram a superfície das fibrilas de colágeno. Eles ligam essas fibrilas umas às outras e a outros componentes na matriz extracelular. O tipo IV, como já é um *colágeno formador de rede*, constituindo a maior parte da lâmina basal, mencionado, enquanto as moléculas do tipo VII formam dímeros que se reúnem em estruturas especializadas denominadas *fibrilas ancoradouras*. As fibrilas ancoradouras auxiliam a conexão da lâmina basal do epitélio de múltiplas camadas ao tecido conectivo subjacente e, portanto, são especialmente abundantes na pele.

Há também inúmeras proteínas semelhantes ao colágeno, incluindo o tipo XVII, o qual possui um domínio transmembrana e é encontrado nos hemidesmossomos, e o tipo XVIII, mencionado anteriormente como um núcleo proteico de um proteoglicano da lâmina basal.

Muitas proteínas que contêm um padrão repetido de aminoácidos evoluíram de duplicações das sequências de DNA. Os colágenos fibrilares, aparentemente surgiram dessa forma. Assim, os genes que codificam as cadeias α da maioria desses colágenos são muito grandes (até 44 quilobases de comprimento) e contêm cerca de 50 éxons. A maioria dos

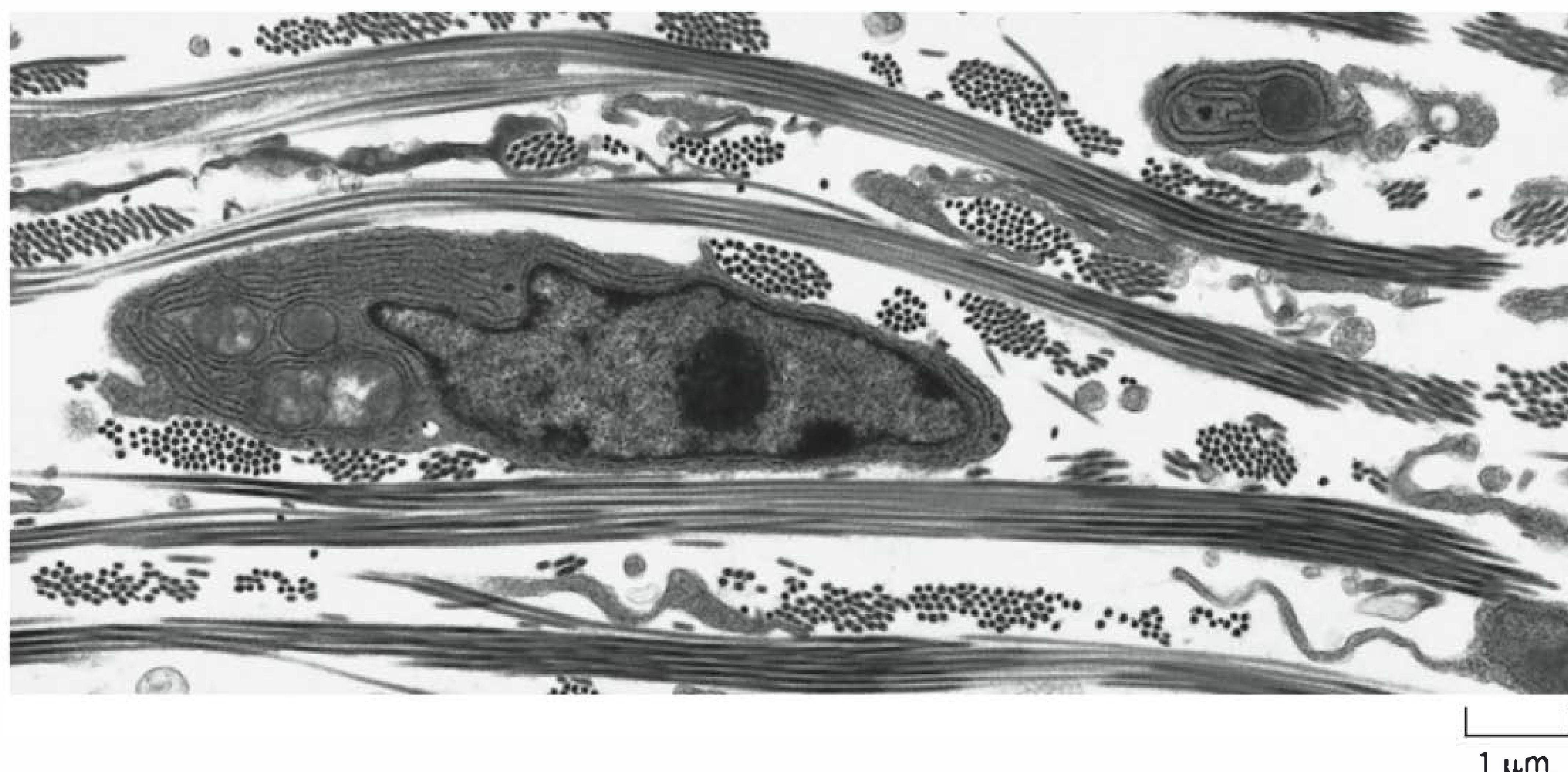


Figura 19-63 Fibroblasto circundado por fibrilas de colágeno no tecido conectivo embrionário da pele de ave. Neste micrografia eletrônica, as fibrilas estão organizadas em feixes que correm aproximadamente em ângulo de 90° entre si. Assim, alguns feixes estão orientados longitudinalmente, enquanto outros são vistos em corte transversal. As fibrilas de colágeno são produzidas pelos fibroblastos, que contêm um retículo endoplasmático abundante, no qual as moléculas de proteínas secretadas, como o colágeno, são sintetizadas. (De C. Ploetz, E. I. Zycband e D. E. Birk, *J. Struct. Biol.* 106:73-81, 1991. Com permissão de Elsevier.)

Tabela 19-7 Alguns tipos de colágeno e suas propriedades

	TIPO	FORMA POLIMERIZADA	DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS	FENÓTIPO MUTANTE
Formador de fibrila (fibrilar)	I	Fibrila	Ossos, pele, tendões, ligamentos, córnea, órgãos internos (constituem cerca de 90% do colágeno do corpo)	Defeitos severos nos ossos, fraturas
	II	Fibrila	Cartilagem, disco intervertebral, notocorda, humor vítreo do olho	Deficiência de cartilagem, nanismo
	III	Fibrila	Pele, vasos sanguíneos, órgãos internos	Pele frágil, articulações frouxas, vasos sanguíneos fáceis de romper
	V	Fibrila (com tipo I)	O mesmo para o tipo o I	Pele frágil, articulações frouxas, vasos sanguíneos fáceis de romper
	XI	Fibrila (com tipo II)	O mesmo para o tipo o II	Miopia, cegueira
Associado a fibrilas	IX	Associação lateral com fibrilas tipo II	Cartilagem	Osteoartrite
Formador de rede	IV	Rede em forma de camada	Lâmina basal	Doença renal (glomerulonefrite), surdez
	VII	Fibrilas ancoradouras	Abaixo do epitélio escamoso estratificado	Bolhas na pele
Transmembrana	XVII	Não-fibrilar	Hemidesmossomos	Bolhas na pela
Núcleo proteico de proteoglicano	XVIII	Não-fibrilar	Lâmina basal	Miopia, descolamento da retina, hidrocefalia

Note que tipos I, IV, V, IX e XI são compostos de dois ou três tipos de cadeias α (distintas, grupos que não se sobrepõem em cada caso), enquanto os tipos II, III, VII, XII, XVII e XVIII são compostos de apenas um tipo de cadeia α. Apenas dez tipos de colágenos estão mostrados, mas cerca de 27 tipos de colágeno e 42 tipos de cadeias α foram identificados em humanos.

éxons possui 54 ou múltiplos de 54 nucleotídeos de comprimento, sugerindo que esses colágenos surgiram por duplicações múltiplas de um gene primordial contendo 54 nucleotídeos e codificando exatamente 6 repetições Gly-X-Y (ver Figura 19-62).

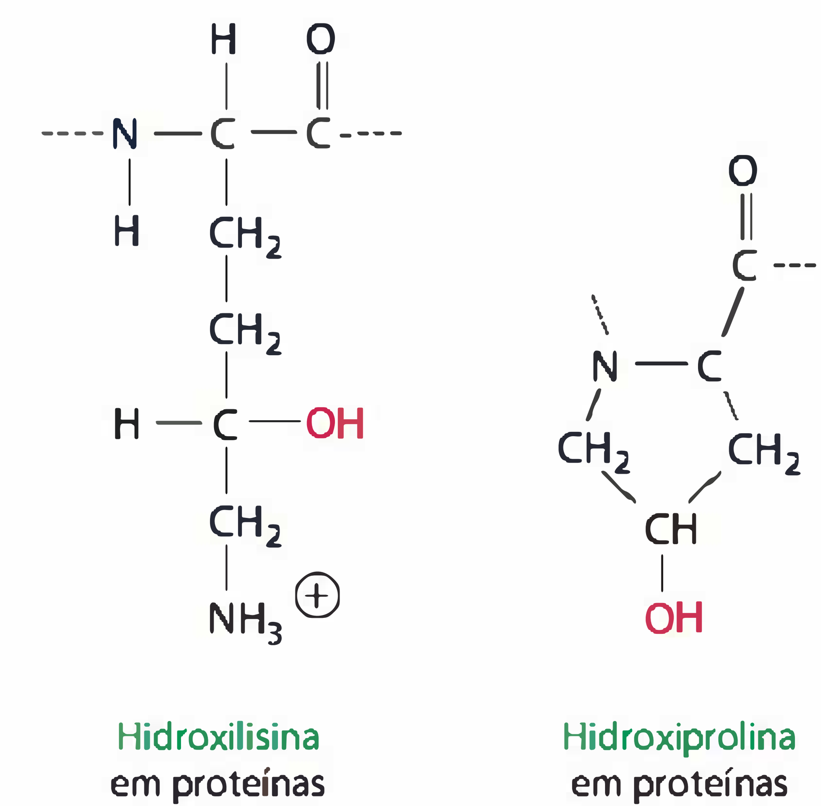
A **Tabela 19-7** apresenta detalhes adicionais de alguns tipos de colágeno discutidos neste capítulo.

As cadeias de colágeno sofrem uma série de modificações pós-tradução

Cadeias polipeptídicas individuais de colágeno são sintetizadas pelos ribossomos ligados às membranas e liberados no lúmen do retículo endoplasmático (RE) como precursores maiores, denominados *pró-cadeia* α. Esses precursores não somente possuem pequenos peptídeos-sinal aminoterminais necessários para dirigir o polipeptídeo nascente para o RE, mas também possuem aminoácidos adicionais denominados *pró-peptídeos* nas extremidades N e C terminais. No lúmen do RE, prolinas e lisinas selecionadas são hidroxiladas para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente, e algumas das hidroxilisinas são glicosiladas. Cada pró-cadeia α combina-se com outras duas para formar uma molécula helicoidal de três fitas ligadas por ligações de hidrogênio chamada de *pró-colágeno*.

Hidroxilisinas e *hidroxiprolinas* (**Figura 19-64**) raramente são encontradas em outras proteínas animais, embora a hidroxiprolina seja abundante em algumas proteínas da parede celular das plantas. No colágeno, os grupos hidroxila desses aminoácidos formam ligações de hidrogênio intercadeias que auxiliam a estabilizar a hélice de fita tripla. Condições que previnem a hidroxilação da prolina, como a deficiência do ácido ascórbico (vitamina C), apresentam sérias consequências. No *escorbuto*, uma doença causada por uma dieta deficiente de vitamina C comum em marinheiros até o século XIX, as pró-cadeias α sintetizadas não formam a ligação estável da fita tripla helicoidal e são imediatamente degradadas no interior da célula, e a síntese de novo colágeno é inibida. Nos tecidos saudáveis, o colágeno é constantemente degradado e substituído (em períodos de meses a anos, dependendo do tecido). No escorbuto, não há substituição, e, dentro de poucos meses, com a gradual perda do colágeno preexistente na matriz, os vasos sanguíneos tornam-se extremamente frágeis, causando o afrouxamento dos dentes e a ausência de cicatrização.

Figura 19-64 Hidroxilisina e hidroxiprolina. Estes aminoácidos modificados são comuns no colágeno. Eles são formados por enzimas que atuam após a incorporação da lisina e da prolina nas moléculas de pró-colágeno.



Os pró-peptídeos são clivados em pró-colágeno após sua secreção, para permitir a montagem de fibrilas

Após a secreção, os pró-peptídeos das moléculas de pró-colageno fibrilares são removidos por enzimas proteolíticas específicas fora das células. Isso converte as moléculas de pró-colágeno em moléculas de colágeno, as quais se reúnem no espaço extracelular para formar uma **fibrila de colágeno** bem maior. Os pró-peptídeos realizam pelo menos duas funções. Primeiro, eles guiam a formação intracelular das moléculas de colágeno de três fitas. Segundo, eles previnem a formação intracelular de grandes fibrilas de colágeno, pois são removidos apenas após secreção, caso contrário seria desastroso para a célula.

O processo de formação das fibrilas é dirigido, em parte, pela tendência das moléculas de colágeno, as quais são mais de mil vezes menos solúveis que as moléculas de pró-colágeno, de se autorreunirem. As fibrilas iniciam sua formação próximo à superfície celular, frequentemente nos profundos bolsos da membrana plasmática formados pela fusão de vesículas secretoras com a superfície celular. O citoesqueleto cortical subjacente pode influenciar os locais, a proporção e a orientação da reunião das fibrilas.

Quando vistas ao microscópio eletrônico, as fibrilas de colágeno possuem estriações transversais características a cada 67 nm, refletindo a alternância regular das moléculas de colágeno na fibrila. Após a formação das fibrilas no espaço extracelular, elas são reforçadas pela formação de ligações covalentes cruzadas entre as lisinas das moléculas de colágeno (**Figura 19-65**). Esses tipos de ligações covalentes são encontrados somente no colágeno e na elastina. Se a ligação cruzada é inibida, a força tensora das fibrilas é drasticamente reduzida, o tecido colagenoso torna-se frágil e as estruturas como a pele, os tendões e os vasos sanguíneos tendem a romper-se. A quantidade e o tipo de ligação cruzada variam de tecido a tecido. O colágeno possui grande número de ligações cruzadas, por exemplo, no tendão de Aquiles, onde a força tensora é essencial.

A **Figura 19-66** resume os vários passos na síntese e na reunião das fibrilas de colágeno. Devido ao grande número de passos enzimáticos envolvidos, não é surpreendente que haja muitas doenças genéticas humanas que afetem a formação das fibrilas. Mutações afetando o colágeno tipo I causam *osteogênese imperfeita*, caracterizada por fraqueza dos ossos e facilidades de fraturas. Mutações afetando o colágeno tipo II causam *condrodisplasia*, caracterizada pela cartilagem anormal que leva a deformações nos ossos e nas articulações. Mutações afetando o colágeno tipo III causam a *síndrome de Ehlers-Danlos*, caracterizada por pele frágil e vasos sanguíneos e articulações hiperflexíveis.

Os colágenos associados às fibrilas secretadas auxiliam na organização das fibrilas

Ao contrário dos GAGs, que resistem às forças compressoras, as fibrilas de colágeno formam estruturas que resistem às forças tensoras. As fibrilas possuem vários diâmetros e estão organizadas de diferentes formas em diferentes tecidos. Na pele dos mamíferos, por exemplo, elas estão entrelaçadas, como no vime, para resistir às tensões em múltiplas direções. Nos tendões, elas estão organizadas em feixes paralelos alinhados ao longo do eixo principal de tensão. No osso maduro e na córnea, elas estão arranjadas em camadas ordenadas como em madeira compensada, com as fibrilas de cada camada paralelas entre si e quase em ângulo

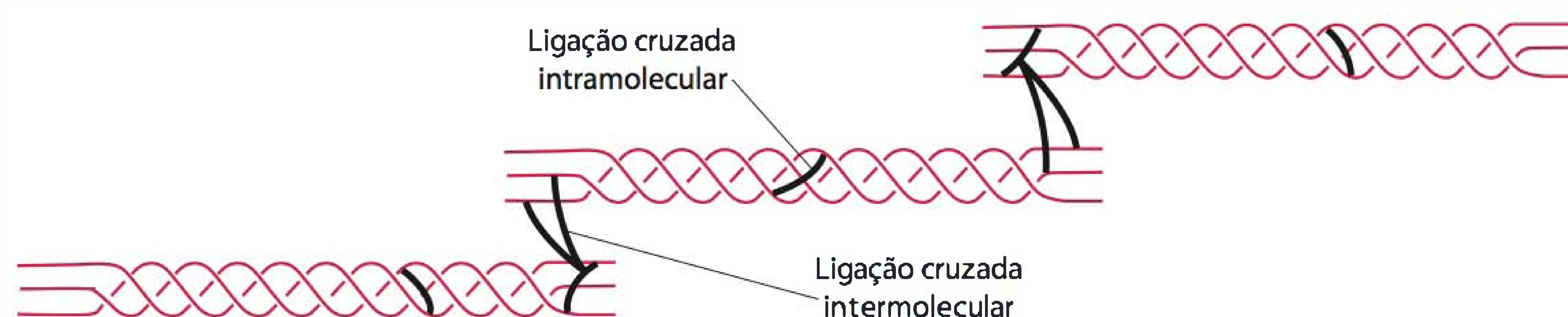
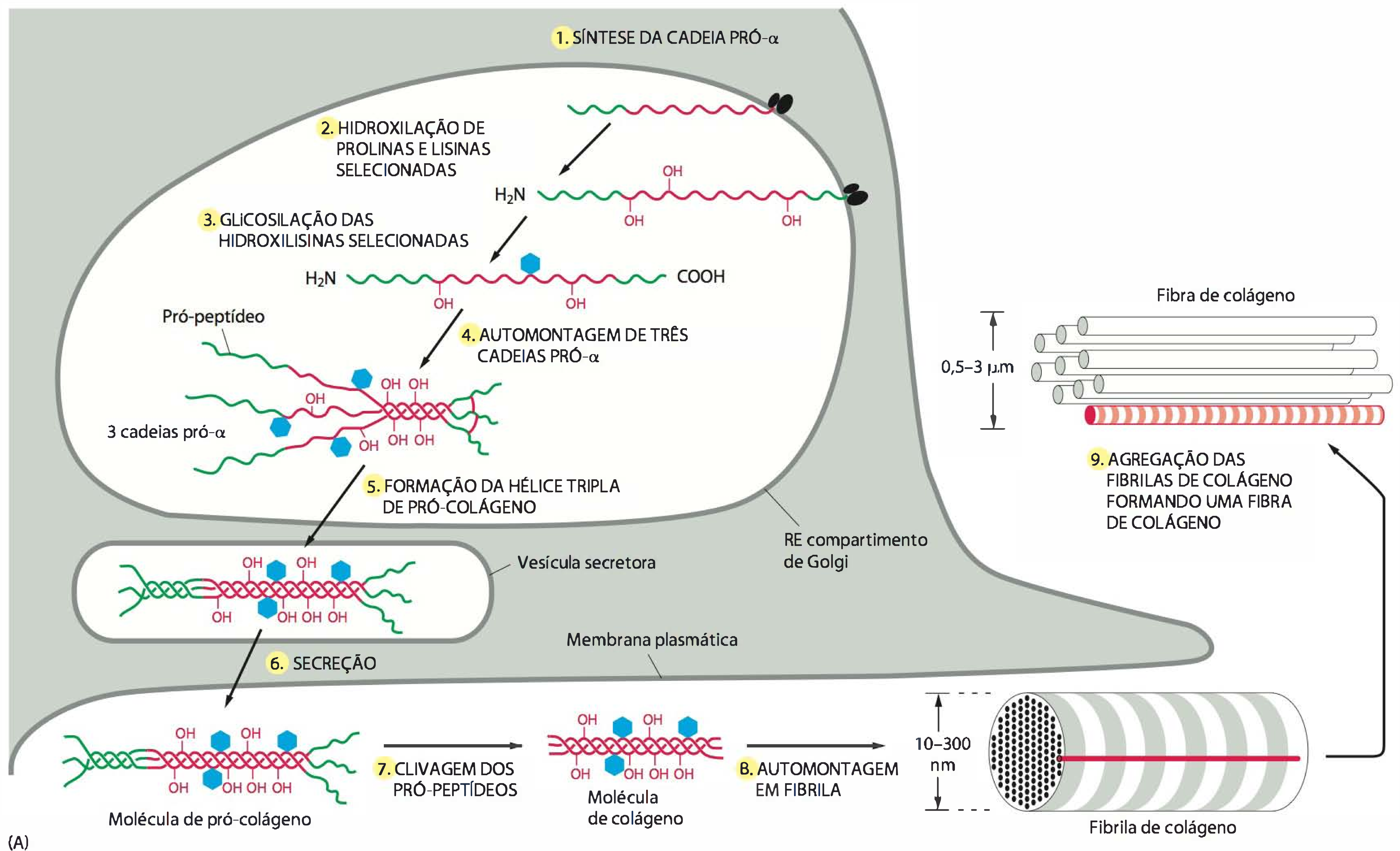


Figura 19-65 Ligações cruzadas formadas entre as cadeias laterais de lisinas modificadas com a fibrila de colágeno. As ligações cruzadas intra e intermolecular covalentes são formadas em vários passos. Primeiro, certas lisinas e hidroxilisinas são desaminadas pela enzima lisil-oxidase, produzindo um grupo aldeído altamente reativo. Os aldeídos, então, reagem espontaneamente, formando ligações covalentes entre si ou com outras lisinas ou hidroxilisinas. A maioria das ligações cruzadas forma-se entre os segmentos curtos não-helicoidais em cada extremidade da molécula de colágeno.



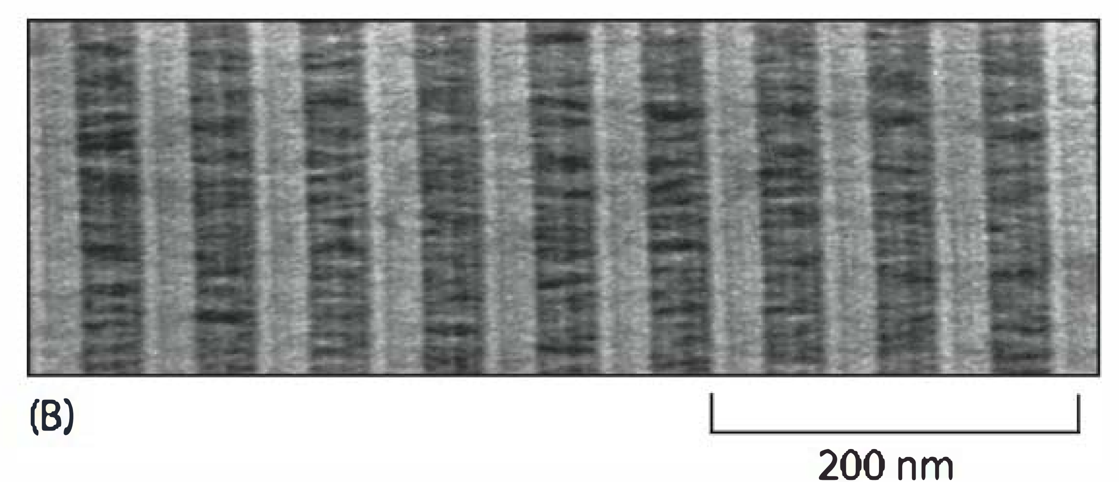


Figura 19-66 Eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno. (A) Observe que o pró-colágeno reúne-se em fibrilas de colágeno no espaço extracelular, frequentemente dentro de uma grande invaginação da membrana plasmática (não-apresentado). Como exemplo de como as fibrilas de colágeno podem produzir um arranjo ordenado no espaço extracelular, elas são mostradas em fase de montagem em grandes fibras de colágeno, visíveis ao microscópio óptico. As ligações cruzadas covalentes que estabilizam a formação extracelular não são mostradas. (B) Micrografia eletrônica de uma fibrila de colágeno corada negativamente, mostrando o aspecto estriado típico. (B, cortesia de Robert Horne.)

reto com as fibrilas nas camadas dos dois lados. O mesmo arranjo ocorre na pele de girinos (**Figura 19-67**).

As próprias células do tecido conectivo devem determinar o tamanho e o arranjo das fibrilas de colágeno. As células podem expressar um ou mais genes para diferentes tipos de moléculas de pró-colágeno fibrilares. Mesmo as fibrilas compostas pela mesma mistura de moléculas de colágeno fibrilares possuem diferentes arranjos em diferentes tecidos. Como isso é alcançado? Parte da resposta é que as células podem regular a disposição das moléculas de colágeno após a secreção, conduzindo a formação das fibrilas de colágeno em íntima associação com a membrana plasmática (ver Figura 19-66). Além disso, as células podem influenciar esta organização secretando, juntamente com suas fibrilas de colágeno, diferentes quantidades de outras macromoléculas de matriz. Em particular, elas secretam a proteína fibrosa fibronectina, vista mais adiante, o que precede a formação das fibrilas de colágeno e auxilia na sua organização.

Os **colágenos associados às fibrilas**, como os colágenos tipo IX e XII, parecem ser especialmente importantes. Eles diferem dos colágenos fibrilares em vários aspectos:

1. Sua estrutura de hélice de fita tripla é interrompida por um ou dois pequenos domínios não-helicoidais que tornam a molécula mais flexível que as moléculas de fibrilas de colágeno.
2. Eles não são clivados após a secreção e, portanto, retêm suas propriedades.

3. Eles não se agregam uns aos outros para formar fibrilas no espaço extracelular. Ao contrário, eles se ligam à superfície das fibrilas formadas pelo colágeno fibrilar de forma periódica. Moléculas do tipo IX ligam-se às fibrilas contendo colágeno tipo II nas cartilagens, na córnea e no humor vítreo (**Figura 19-68**), enquanto que as moléculas do tipo XII ligam-se às fibrilas contendo colágeno tipo I nos tendões e em vários tecidos.

Os colágenos associados às fibrilas parecem mediar as interações das fibrilas de colágeno umas com as outras e com outras macromoléculas da matriz. Dessa forma, eles atuam na determinação da organização das fibrilas na matriz.

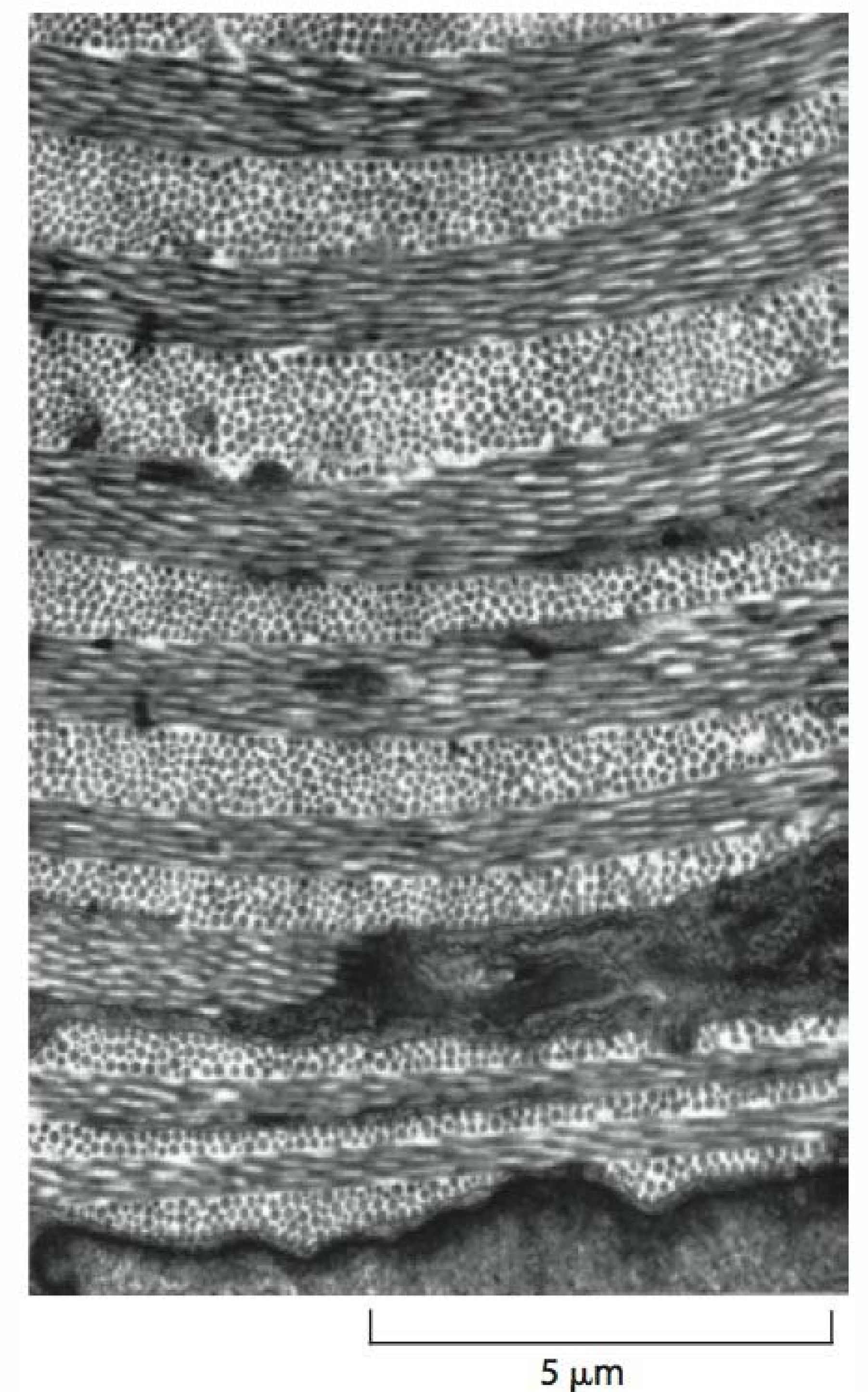


Figura 19-67 Fibrilas de colágeno da pele de um girino. Esta micrografia eletrônica mostra o arranjo contínuo e entrecruzado das fibrilas de colágeno, nas quais camadas sucessivas de fibrilas se posicionam, umas em relação às outras, em ângulos retos. Este arranjo é também encontrado em ossos maduros e na córnea. (Cortesia de Jerome Gross.)

As células auxiliam na organização das fibrilas de colágeno que secretam, exercendo tensão na matriz

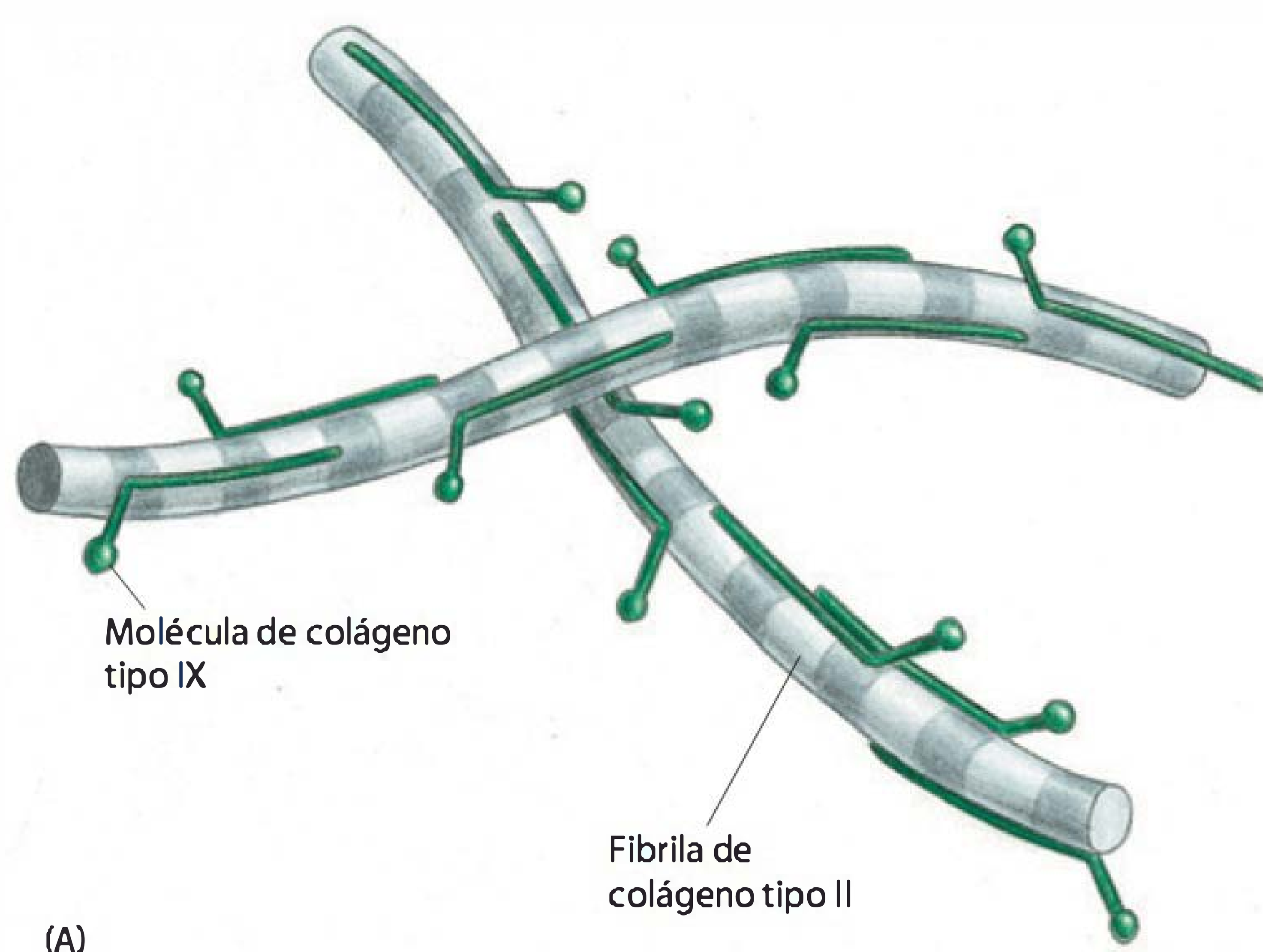
As células interagem mecânica e quimicamente com a matriz extracelular, e estudos em cultura sugerem que essa interação mecânica pode ter efeitos dramáticos na arquitetura do tecido conectivo. Assim, quando os fibroblastos são misturados com uma rede de fibrilas de colágeno orientadas ao acaso que forma um gel nas placas de cultura de células, os fibroblastos exercem uma pressão nesta rede, empurrando o colágeno para as vizinhanças e causando a contração do gel em frações bem menores que seu volume inicial. Por atividades similares, um agrupamento de fibroblastos circunda a si mesmo com uma cápsula densa de fibras de colágeno orientadas ao seu redor.

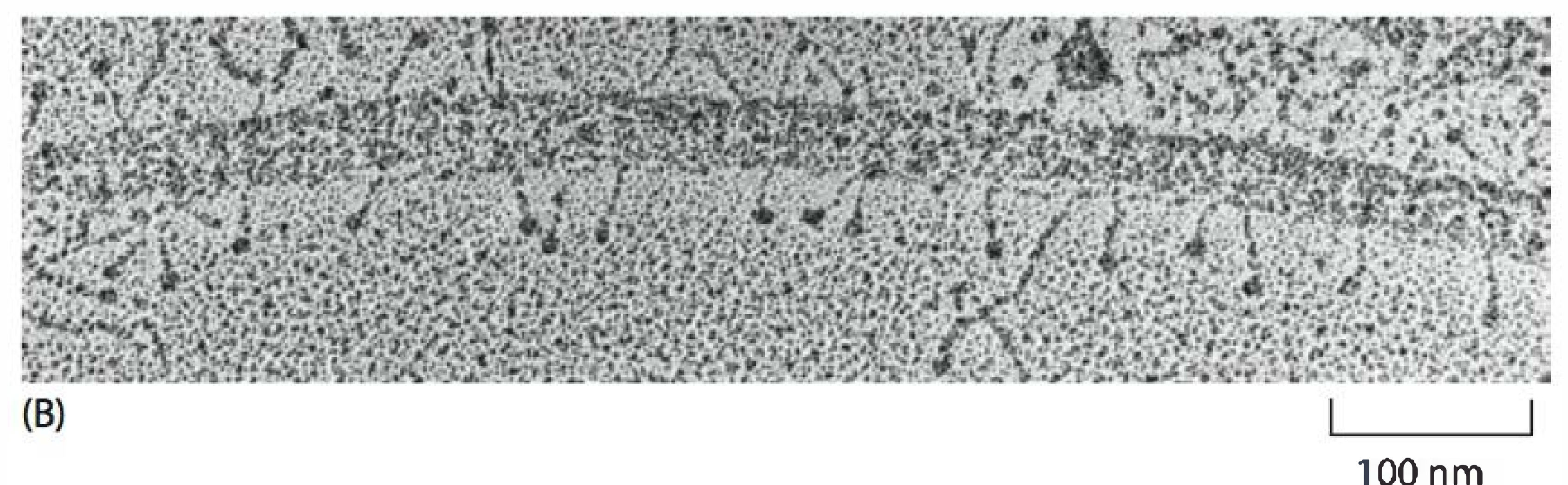
Se dois pequenos pedaços de tecido embrionário contendo fibroblastos são colocados longe do gel de colágeno, o colágeno interveniente torna-se organizado em uma banda compacta de fibras alinhadas que conectam os dois explantes (**Figura 19-69**). Os fibroblastos migram, subsequentemente, para fora dos explantes juntamente com as fibras de colágeno alinhadas. Assim, os fibroblastos influenciam o alinhamento das fibras de colágeno, as quais por sua vez, afetam a distribuição dos fibroblastos.

Os fibroblastos desempenham um papel semelhante na organização da matriz extracelular no interior do organismo, sintetizando as fibrilas de colágeno e depositando-as na orientação correta, e depois trabalhando na matriz que secretaram, rolando sobre ela e compactando-a para criar os tendões e os ligamentos, por exemplo, e as rígidas e densas camadas de tecido conectivo que recobrem e ligam muitos órgãos.

A elastina confere elasticidade aos tecidos

Muitos tecidos de vertebrados, como a pele, os vasos sanguíneos e os pulmões, necessitam de força elástica para exercerem sua função. Uma rede de **fibras elásticas** na matriz celular desses tecidos fornece a resistência necessária, de modo que eles possam voltar à forma original após uma distensão temporária (**Figura 19-70**). As fibras elásticas são, pelo menos, cinco vezes mais extensíveis que a borracha de mesma área transversal. As longas e inelás-





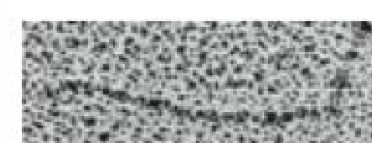


Figura 19-68 Colágeno tipo IX. (A) Desenho esquemático de moléculas de colágeno tipo IX em padrão periódico, ligando-se à superfície de uma fibrila contendo colágeno tipo II. (B) Micrografia eletrônica com sombreamento rotatório de uma fibrila contendo colágeno tipo II de cartilagem, revestida em moléculas de colágeno tipo IX. (C) Uma molécula individual de colágeno tipo IX. (B e C, de L. Vaughan et al., *J. Cell Biol.* 106:991-997, 1988. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

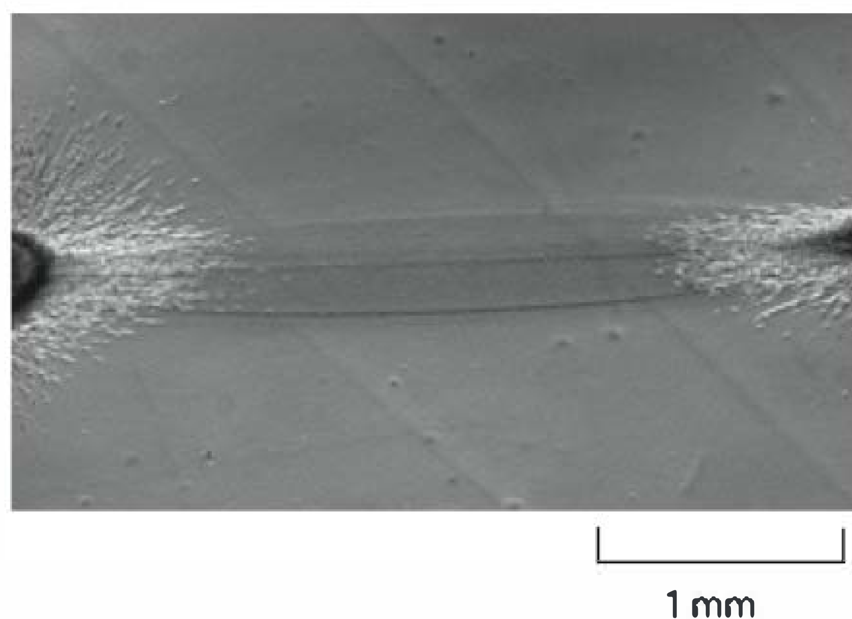


Figura 19-69 Organização da forma da matriz extracelular pelas células. Esta micrografia mostra uma região entre dois pedaços de coração embrionário de ave (rico em fibroblastos, como as células do músculo cardíaco) cultivados sobre um gel de colágeno, durante quatro dias. Um cordão denso de fibras de colágeno alinhadas foi formado entre os explantes, supostamente como resultado dos "puxões" dos fibroblastos do explante no colágeno. (De D. Stopak e A. K. Harris, *Dev. Biol.* 90:383- 398, 1982. Com permissão de Academic Press.)

ticas fibrilas de colágeno são entrelaçadas com as fibras elásticas para limitar a distensão e evitar que o tecido rasgue.

O principal componente das fibras elásticas é a **elastina**, uma proteína altamente hidrofóbica (com cerca de 750 aminoácidos de comprimento), a qual, como o colágeno, é rica em prolina e glicina, mas ao contrário do colágeno, não é glicosilada e contém pouca hidroxiprolina e nenhuma hidroxilisina. A *tropoelastina* solúvel (o precursor biossintético da elastina) é secretada no espaço extracelular e reunida em fibras elásticas próximo à membrana plasmática, geralmente nas invaginações da membrana. Após a secreção, as moléculas da tropoelastina tornam-se altamente intercruzadas umas às outras, formando uma extensa rede de fibras e camadas de elastina. As ligações cruzadas são formadas entre as lisinas por um mecanismo similar ao que ocorre nas fibras de colágeno, como visto anteriormente.

A proteína elastina é composta, principalmente, por dois tipos de pequenos segmentos que se alternam na cadeia polipeptídica: segmentos hidrofóbicos, os quais são responsáveis pelas propriedades elásticas da molécula, e segmentos de hélice α ricos em lisina e alanina, os quais fazem a ligação cruzada entre moléculas adjacentes. Cada segmento é codificado por um éxon independente. Ainda há controvérsias a respeito da conformação das moléculas de elastina nas fibras elásticas, e como a estrutura dessas fibras confere estas propriedades de elasticidade. Para alguns, a cadeia polipeptídica de elastina, como as cadeias de polímeros na borracha comum, adota uma conformação frouxa e aleatória, sendo esta estrutura de mola das moléculas componentes com ligação cruzada nas fibras elásticas da rede que permite que toda a rede se distenda e volte à forma original como uma borracha (**Figura 19-71**).

A elastina é a proteína de matriz extracelular predominante nas artérias e compreende 50% do peso seco da maior artéria, a aorta. Mutações no gene da elastina causam deficiência da proteína em camundongos e no homem, resultando em um estreitamento da aorta e de outras artérias como resultado da proliferação excessiva das células do músculo liso na parede arterial. Aparentemente, a elasticidade da artéria normal é necessária para frear a proliferação dessas células.

As fibras de elastina não são compostas somente de elastina. O núcleo de elastina é coberto por uma camada de *microfibrilas*, cada uma apresentando um diâmetro de cerca de 10 nm. Elas são produzidas, durante o desenvolvimento dos tecidos, antes da elastina, e parecem formar um suporte no qual as moléculas de elastina secretadas são depositadas. Arranjos de microfibrilas são elásticos e em alguns locais persistem na ausência de elastina: eles mantêm a lente dos olhos no lugar, por exemplo. As microfibrilas são compostas de inúmeras glicoproteínas distintas, incluindo uma grande glicoproteína, a *fibrilina*, a qual liga-se à elastina e é essencial para a integridade das fibras elásticas. Uma mutação no gene da fibrilina resulta na *síndrome de Marfan*, uma doença genética humana relativamente comum. Nos indivíduos mais afetados, a aorta está sujeita a rupturas; outro efeito comum é o deslocamento das lentes e anormalidades no esqueleto e nas articulações. Os indivíduos

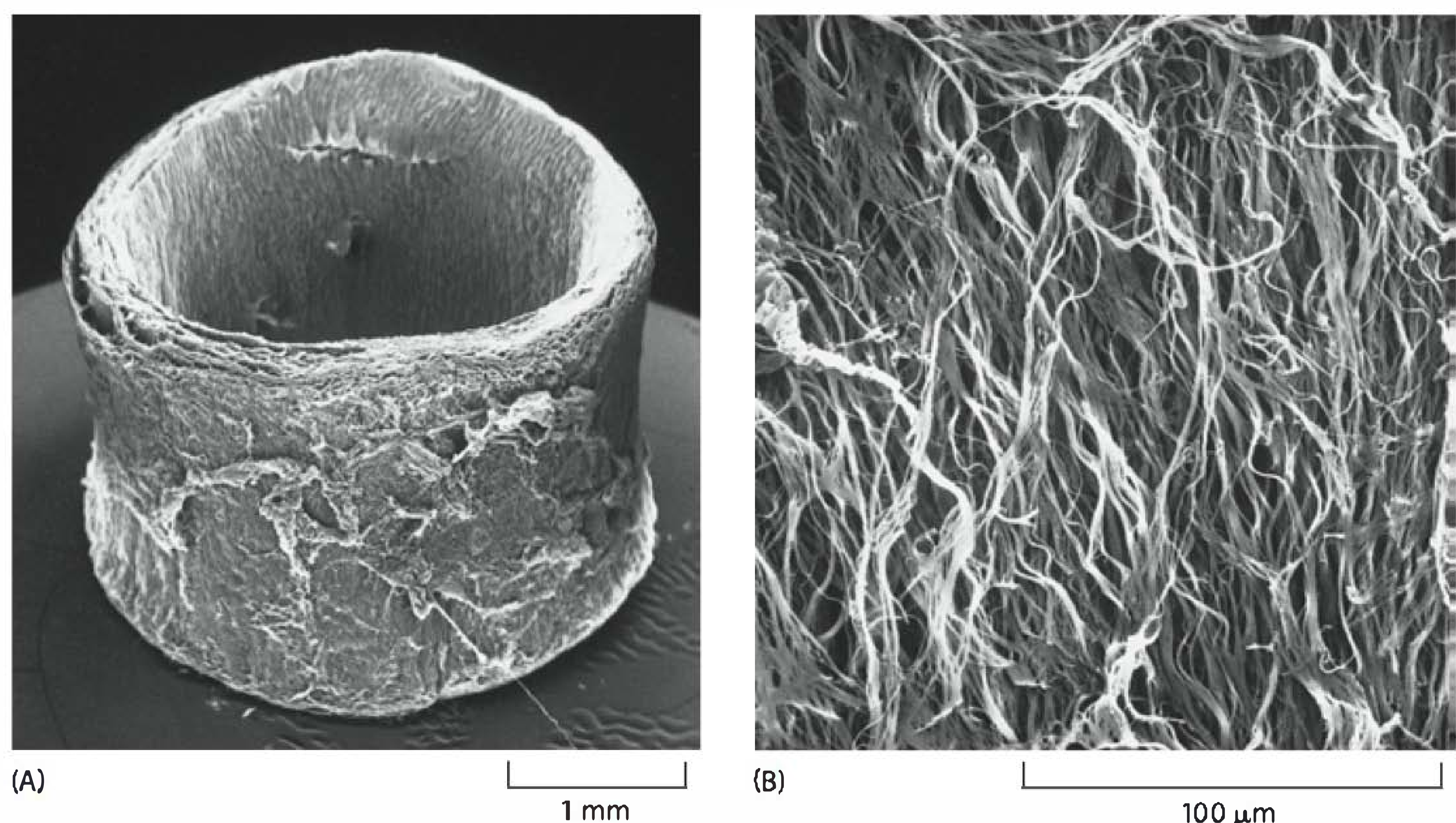


Figura 19-70 Fibras elásticas. Estas micrografias eletrônicas de varredura mostram uma parte de um segmento da aorta de cachorro em pequeno aumento (A), e uma vista em alta resolução da densa rede de fibras elásticas orientadas longitudinalmente na camada externa do mesmo vaso sanguíneo (B). Todos os outros componentes foram removidos pela ação de enzimas e ácido fórmico. (De K. S. Haas et al., *Anat. Rec.* 230:86-96, 1991. Com permissão de Wiley-Liss.)

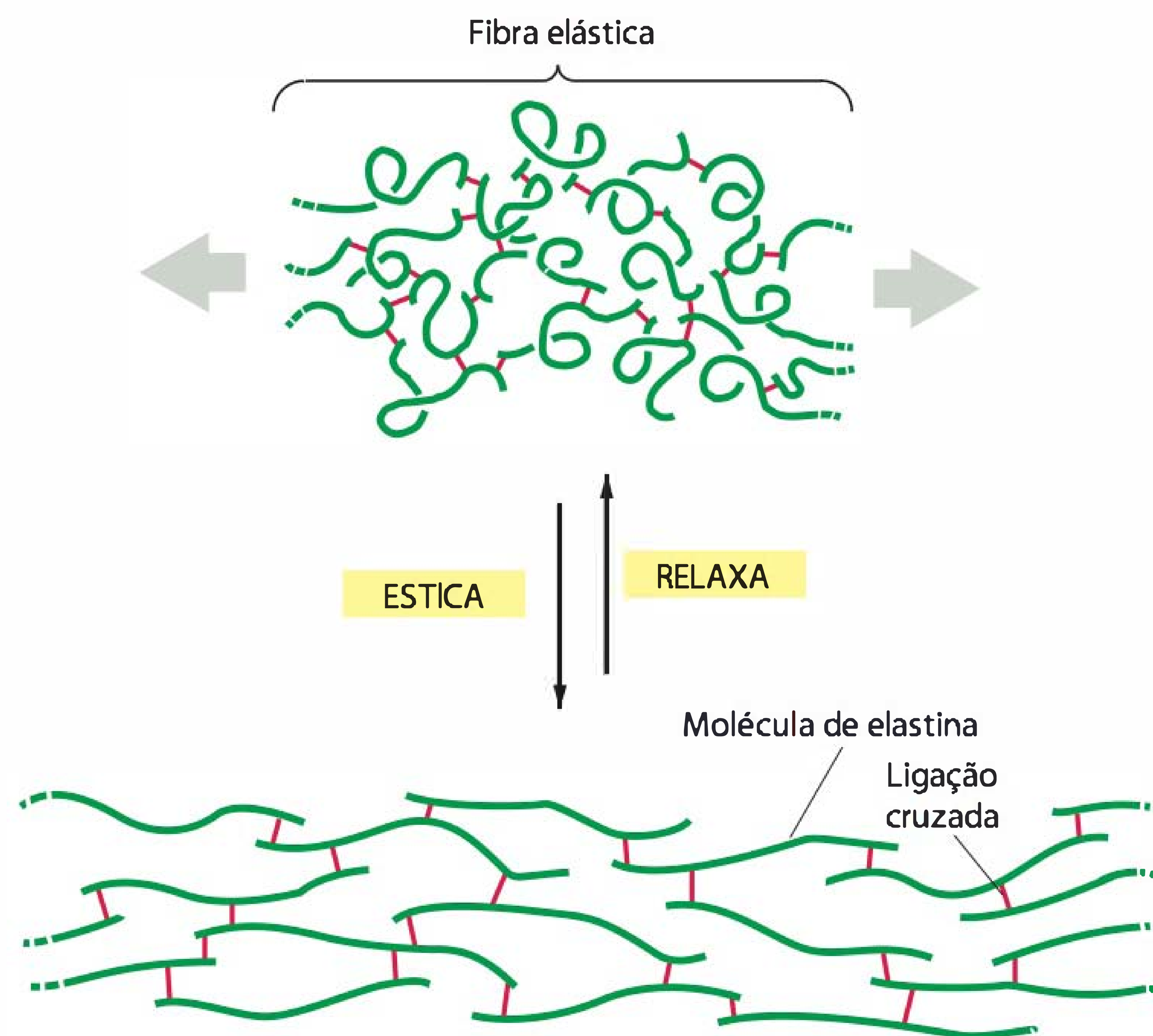


Figura 19-71 Distensão de uma rede de moléculas de elastina. As moléculas são unidas por ligações covalentes (*vermelho*), produzindo uma rede entrecruzada. No modelo mostrado, cada molécula de elastina da rede pode expandir-se e contrair-se aleatoriamente, como uma mola, de modo que toda a estrutura pode ser distendida e retornar à forma original, como uma fita elástica.

afetados são frequentemente altos e magros. Suspeita-se que Abraham Lincoln apresentasse essa alteração.

A fibronectina é uma proteína extracelular que auxilia a ligação das células à matriz

A matriz extracelular contém inúmeras proteínas de colágeno que tipicamente possuem múltiplos domínios, cada um com um sítio de ligação específico a outra macromolécula da matriz e a receptores de superfície celular. Essas proteínas contribuem para a organização da matriz, auxiliando a ligação das células. Como os proteoglicanos, elas também guiam o movimento celular nos tecidos em desenvolvimento, servindo como trilhos, ao longo dos quais as células podem migrar, ou como repelentes, mantendo as células longe das áreas proibidas.

A primeira dessa classe de proteínas de matriz a ser caracterizada foi a **fibronectina**, uma grande glicoproteína encontrada em vertebrados e importante para muitas interações célula-matriz. Assim, por exemplo, camundongos mutantes incapazes de produzir fibronectina morrem no início da embriogênese, pois suas células endoteliais não formam vasos sanguíneos adequados. Acredita-se que esse defeito resulte de anormalidades nas interações dessas células com a matriz extracelular circundante, a qual, normalmente, contém fibronectina.

A fibronectina é um dímero composto de duas grandes subunidades ligadas por ligações dissulfeto em uma extremidade. Cada subunidade é dobrada em uma série de domínios distintos funcionais separados por regiões de cadeia polipeptídica flexível (**Figura 19-72**). Os domínios, por sua vez, consistem em módulos menores e cada um é serialmente repetido, sendo em geral codificado por um éxon separado, sugerindo que o gene da fibronectina, como os genes de colágeno, evoluiu por várias duplicações de éxons. No genoma humano, há somente um gene de fibronectina, contendo cerca de 50 éxons de tamanho similar. A transcrição produz uma única grande molécula de RNA que pode ser processada de forma alternativa para produzir as várias isoformas da fibronectina. O principal módulo, denominado **repetição de fibronectina tipo III**, liga-se à integrina e, portanto, a superfícies celulares. Esse módulo possui cerca de 90 aminoácidos de comprimento e ocorre pelo menos 15 vezes em cada subunidade. A repetição de fibronectina tipo III está entre os mais comuns de todos os domínios proteicos de vertebrados.

A tensão exercida pelas células regula a reunião das fibrilas de fibronectina

As fibronectinas podem estar na forma solúvel, circulando no sangue e outros fluidos corporais, e na forma insolúvel como *fibrilas de fibronectina*, onde os dímeros de fibronectina

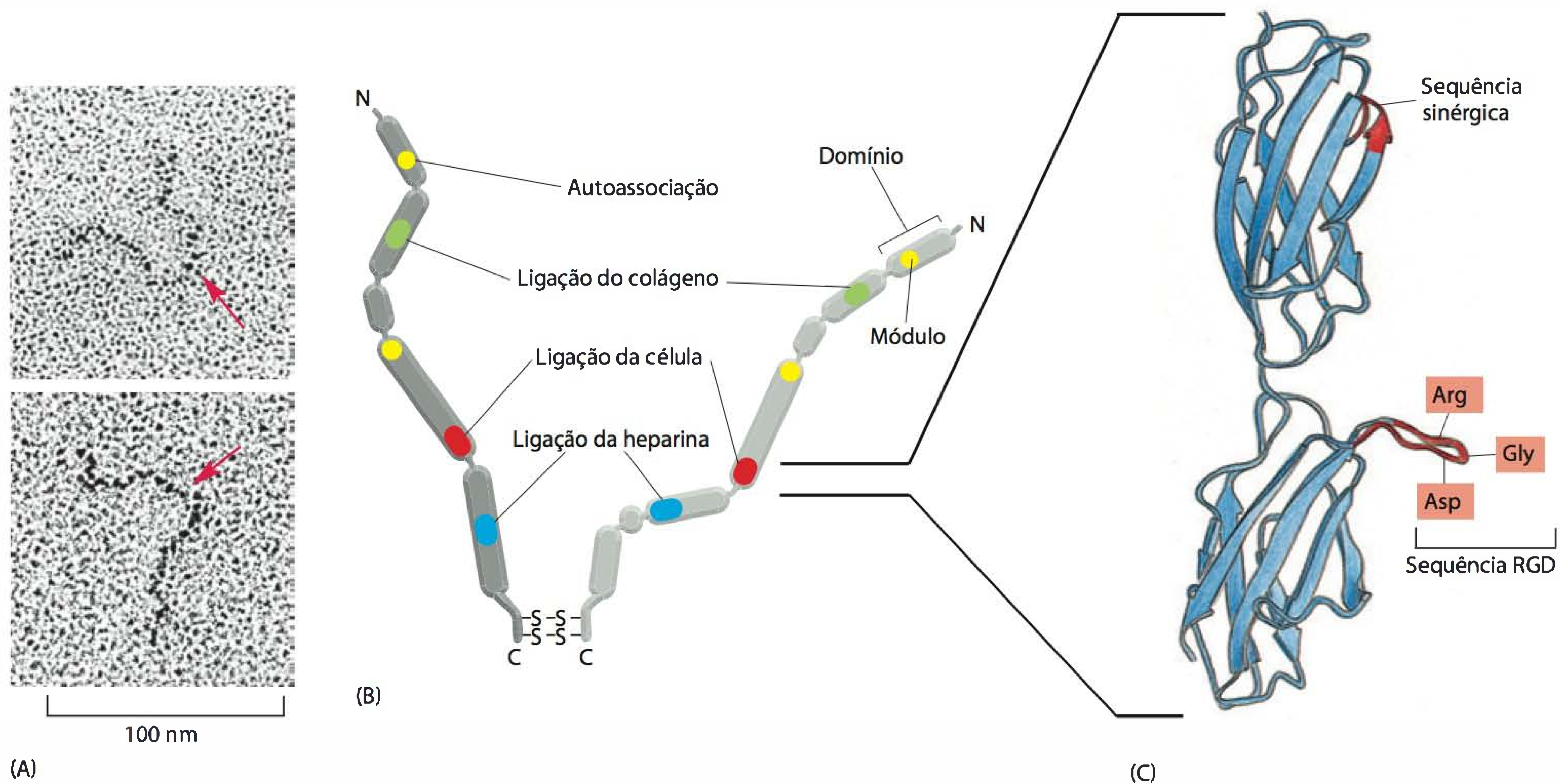


Figura 19-72 Estrutura do dímero de fibronectina. (A) Micrografia eletrônica de moléculas sombreadas com platina; as *setas vermelhas* marcam a porção C-terminal. (B) As duas cadeias polipeptídicas são similares, mas geralmente não são idênticas (codificadas pelo mesmo gene, mas com *splicing* dos mRNAs diferente). Elas são ligadas por duas ligações dissulfeto próximas ao C-terminal. Cada cadeia tem cerca de 2.500 aminoácidos de extensão, sendo dobrada em cinco ou seis domínios conectados por segmentos de polipeptídeos flexíveis. Cada domínio é especializado para se ligar a uma determinada molécula ou célula, como indicado nos cinco domínios. Por questão de simplificação, nem todos os sítios de ligação conhecidos estão mostrados (p. ex., há outros sítios de ligação à célula). (C) Estrutura tridimensional dos dois tipos de repetições de fibronectina tipo III determinada por cristalografia por raios X. As repetições tipo III são o principal módulo de repetição na fibronectina. As sequências Arg-Gly-Asp (RGD) e as sequências sinérgicas, mostradas em *vermelho* formam parte do principal sítio de ligação celular, e são importantes para a ligação. (A, de J. Engel et al., *J. Mol. Biol.* 150:97-120, 1981. Com permissão da Academic Press; C, Daniel J. Leahy, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:363-393, 1997. Com permissão de Annual Reviews.)

são ligados um ao outro de maneira cruzada por ligações dissulfeto adicionais e formam parte da matriz extracelular. Diferentemente das moléculas de colágeno fibrilares, as quais podem ser reunidas em fibrilas em tubos de ensaio, as moléculas de fibronectina reúnem-se em fibrilas somente na superfície de certas células. Isso ocorre porque proteínas adicionais são necessárias à formação das fibrilas, especialmente as integrinas ligadoras de fibronectina. As integrinas fornecem uma ligação para a fibronectina de fora da célula ao citoesqueleto de actina do interior da célula. Essa ligação transmite tensão às moléculas de fibronectina, desde que elas também tenham se ligado a alguma estrutura, e distendem a molécula, expondo os sítios de ligação escondidos (crípticos) da molécula de fibronectina (**Figura 19-73**). Isso permite que elas se liguem diretamente uma à outra e recrutem moléculas de fibronectina adicionais para formar a fibrila (**Figura 19-74**). Esta dependência de tensão e interação com a superfície celular assegura que as fibrilas de fibronectina

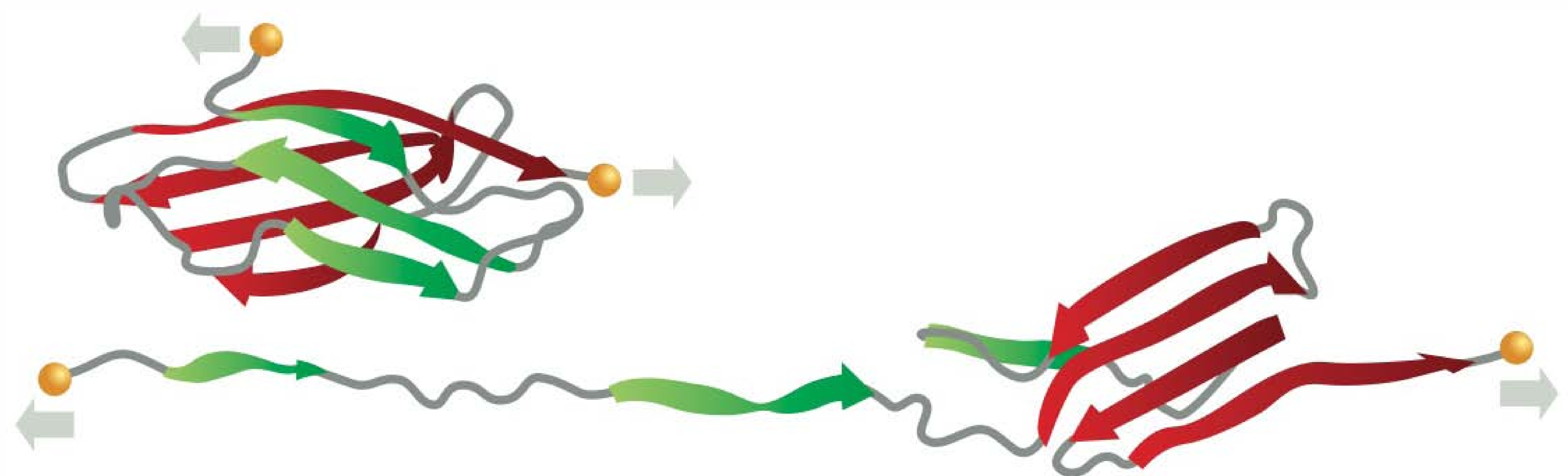


Figura 19-73 Desdobramento do domínio de fibronectina tipo III em resposta à tensão. O estiramento da fibronectina expõe sítios de ligação que estão escondidos que fazem com que a molécula estendida reúna-se em filamentos, como mostra a Figura 19-74. (De V. Vogel e M. Sheetz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:265-275, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

reúnam-se onde há necessidade mecânica delas e não em locais inadequados como a corrente sanguínea.

Muitas outras proteínas de matriz extracelular possuem múltiplas repetições como a fibronectina tipo III, sendo possível que a tensão exercida nessas proteínas exponha sítios de ligação crípticos, influenciando sua polimerização.

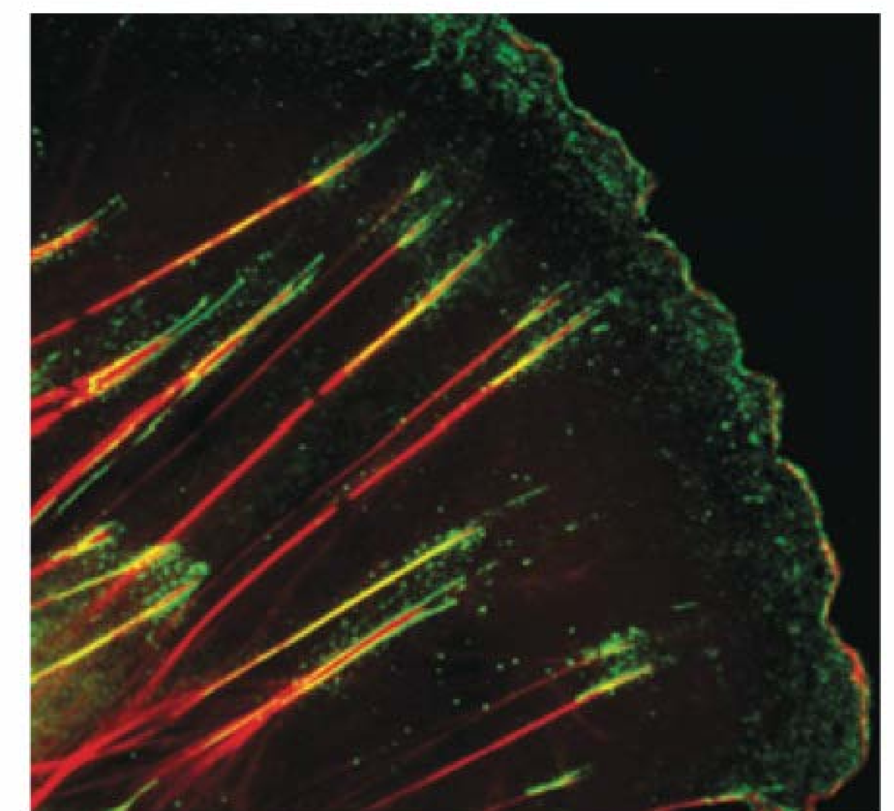


Figura 19-74 Organização da fibronectina em fibrilas na superfície celular. A figura mostra a extremidade frontal de um fibroblasto de camundongo em migração. A proteína de adesão fibronectina é corada em *verde,* e os filamentos intracelulares de actina, em *vermelho*. Inicialmente, a fibronectina está presente como um agregado de pequenos pontos próximos à extremidade frontal da célula. Eles se acumulam nas adesões focais (sítios de ancoramento dos filamentos de actina) e organizam-se em fibrilas paralelas aos filamentos de actina. As moléculas de integrina atravessam a membrana celular, ligando a fibronectina de fora da célula com os filamentos de actina do interior da célula. Acredita-se que a tensão exercida por essa ligação nas moléculas de fibronectina estique a molécula, expondo seus sítios de ligação e promovendo a formação da fibrila. (Cortesia de Roumen Pankov e Kenneth Yamada.)

A fibronectina se liga às integrinas pelo motivo RGD

Uma forma de analisar a molécula de proteína complexa multifuncional como a fibronectina é cortá-la em pedaços e determinar a função de seus domínios individuais. Quando a fibronectina é tratada com baixa concentração de uma enzima proteolítica, a cadeia polipeptídica é cortada nas regiões que conectam os domínios, mantendo os domínios intactos. Podemos mostrar que um dos domínios liga-se ao colágeno, outro à heparina, outro a receptores de superfície específicos de vários tipos celulares, e assim por diante (ver Figura 19-72B). Peptídeos sintéticos correspondentes aos diferentes segmentos dos domínios de ligação às células têm sido usados para identificar uma sequência tripeptídica específica (*Arg-Gly-Asp* ou *RGD*), a qual é encontrada em uma das repetições do tipo III (ver Figura 19-72C), como uma característica central do sítio de ligação. Mesmo pequenos peptídeos contendo esta **sequência RGD** podem competir com a fibronectina pelo sítio de ligação à célula e, portanto, inibir a ligação da célula com a fibronectina da matriz. Se esses peptídeos são ligados a uma superfície sólida, eles causam aderência celular.

Inúmeras proteínas extracelulares, além da fibronectina, também possuem uma sequência RDG que faz a mediação da ligação à superfície celular. Algumas estão envolvidas na coagulação sanguínea, e peptídeos contendo esta sequencia RGD têm sido úteis no desenvolvimento de fármacos anticoagulação. As cobras usam uma estratégia similar para causar sangramento em suas vítimas: elas secretam, no veneno, proteínas anticoagulantes contendo RGD denominadas *desintegrinas*.

Os receptores de superfície celular que ligam proteínas contendo a sequência RGD são membros da família das integrinas. Entretanto, cada integrina reconhece especificamente seu próprio grupo limitado de moléculas da matriz, indicando que a forte ligação requer outros elementos além da sequência RGD. Além disso, as sequências RGD não são as únicas sequências motivo usadas para a ligação das integrinas: muitas integrinas reconhecem e se ligam a outros motivos.

As células devem ser capazes de degradar e produzir matriz

A capacidade das células de degradar e destruir a matriz extracelular é tão importante quanto sua habilidade de produzi-la e ligar-se a ela. Uma rápida degradação da matriz é necessária em processos como o reparo de tecidos, e mesmo na matriz extracelular aparentemente estática dos animais adultos há uma renovação contínua com a degradação e a síntese das macromoléculas da matriz. Isso permite que o osso, por exemplo, seja remodelado para se adaptar ao estresse, como discutido no Capítulo 23.

Do ponto de vista das células individuais, a capacidade de passar através da matriz é crucial em duas situações: permite que elas se dividam enquanto embebidas na matriz e permite que passem por ela. Como mencionamos anteriormente, as células do tecido conectivo geralmente precisam ser capazes de se esticar para se dividir. Se uma célula não possui a enzima necessária para cortar a matriz circundante ou está embebida em uma matriz que resiste a sua ação, ela permanece redonda, incapaz de continuar o processo porque a matriz é impenetrável. Como resultado, a célula é impedida de se dividir e de migrar.

A degradação localizada dos componentes da matriz também é necessária sempre que as células precisem escapar do confinamento pela lâmina basal. Isso é necessário durante o crescimento ramificado normal do epitélio para formar as estruturas como as glândulas, para permitir que o epitélio se expanda e também quando os leucócitos migram através da lâmina basal dos vasos sanguíneos para os tecidos em resposta a uma infecção ou dano. Menos adequada é a degradação da matriz para que as células cancerosas se espalhem através do corpo e proliferem nos tecidos invadidos (discutido no Capítulo 20).

A degradação da matriz é localizada nas vizinhanças das células

Em geral, os componentes da matriz são degradados por enzimas proteolíticas (proteases) que atuam próximo às células que as produzem. Assim, anticorpos que reconhecem o produto da clivagem proteolítica coram a matriz somente ao redor das células. Muitas dessas proteases pertencem a uma de duas classes gerais. Em sua maioria são **metaloproteases de matriz**, as quais dependem da ligação de Ca^{2+} ou Zn^{2+} para sua atividade. As outras são as **serina-proteases**, as quais possuem uma serina altamente reativa no seu sítio ativo. Juntas, as metaloproteases e serina-proteases cooperam para degradar as proteínas de matriz, como o colágeno, a laminina e a fibronectina. Algumas metaloproteases, como a *colagenase*, são altamente específicas, clivando proteínas particulares em poucos locais. Dessa forma, a integridade estrutural da matriz é preservada, mas a migração celular pode ser facilitada pela pouca quantidade de proteólise. Outras metaloproteases podem ser menos específicas, mas por estarem ancoradas à membrana plasmática elas podem atuar somente onde forem necessárias. Este é o tipo de metaloprotease crucial para a capacidade da célula de dividir quando embebida em uma matriz.

Claramente, a atividade das proteases que degradam os componentes da matriz é rigidamente controlada, caso contrário o corpo colapsa. Três mecanismos básicos atuam para assegurar o controle das proteases que degradam os componentes da matriz extracelular:

Ativação local: muitas proteases são secretadas como precursores inativos que podem ser ativados localmente quando forem necessários. Um exemplo é o *plasminogênio*, uma protease precursora inativa abundante no sangue. Ela é clivada localmente por outras proteases, denominadas *ativadoras de plasminogênio*, para produzir a serina-protease ativa *plasmina*, a qual auxilia a destruição dos coágulos sanguíneos. O *ativador de plasminogênio tipo tecido* (*tPA*, *tissue-type plasminogen activador*) frequentemente é administrado em pacientes logo após ataque cardíaco ou trombose, auxiliando a dissolver o coágulo arterial causador do ataque, restaurando o fluxo sanguíneo no tecido.

Confinamento por receptores de superfície celular: muitas células possuem receptores em sua superfície que ligam proteases, confinado-as ao local onde são necessárias. Um segundo tipo de ativador de plasminogênio denominado *ativador de plasminogênio tipo urocinase* (*uPA*, *urokinase-type plasminogen activador*) é um exemplo. Ele é encontrado ligado a receptores nas extremidades dos axônios em crescimento e nas bordas da porção-líder das células em migração, onde pode atuar para abrir o caminho para a migração. O uPA ligado ao receptor também pode auxiliar na metástase de algumas células cancerosas (**Figura 19-75**).

Secreção de inibidores: A ação das proteases é restrita a áreas específicas pela secreção de vários inibidores de proteases, incluindo o *inibidores de tecidos de metaloproteases* (*TIMPs*, *tissue inhibitors of metalloproteases*) e os inibidores de serina-proteases conhecidos como *serpinas*. Esses inibidores são proteases específicas e ligam-se fortemente à enzima ativada, bloqueando sua atividade. Uma ideia atraente é que os inibidores são secretados por células nas vizinhanças das áreas de degradação ativa de proteínas, para proteger a matriz não-envolvida. Eles também protegem as proteínas de superfície celular necessárias à migração e à adesão celular. A superexpressão de TIMPs inibe a migração de alguns tipos celulares, indicando a importância das metaloproteases para a migração.

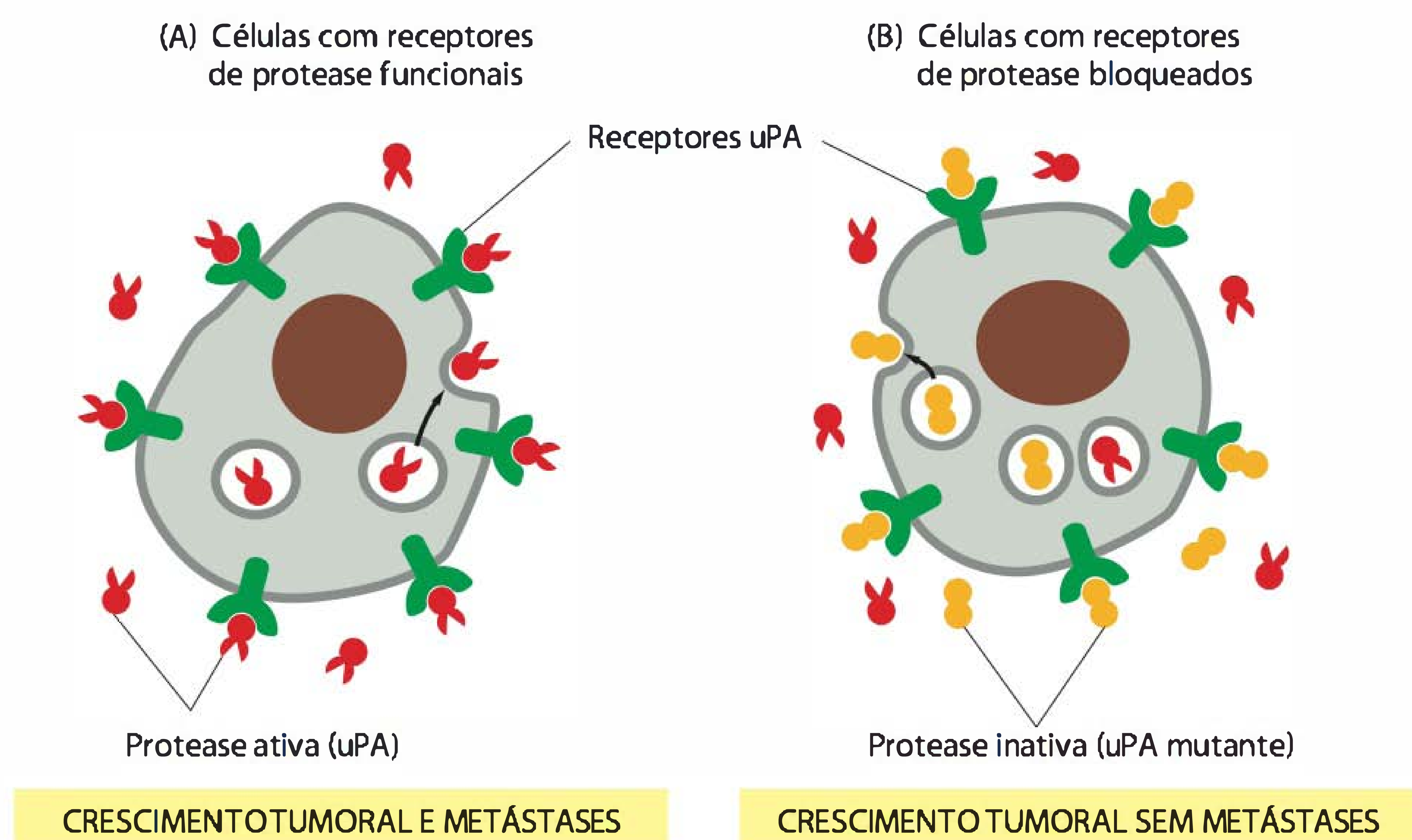


Figura 19-75 Importância das proteases ligadas aos receptores de superfície celular. (A) As células humanas de câncer da próstata produzem e secretam a serina-protease uPA, que se liga a receptores de uPA na superfície da célula. (B) As mesmas células foram transfectadas com um DNA codificando um excesso de uPA inativa, que se liga aos receptores, mas não tem atividade proteásica. Assim, pela ocupação da maioria dos receptores, a uPA inativa evita que a protease ativa ligue-se à superfície da célula. Os dois tipos de células secretam uPA ativa, crescem rapidamente e produzem tumores quando injetados em animais de laboratório. No entanto, as células em (A) formam grandes metástases, enquanto as células em (B) não. Para formar metástases, as células tumorais devem rastejar pela lâmina basal e outras matrizes extracelulares na migração para a corrente sanguínea e, de lá, para outros sítios. Este experimento sugere que as proteases devem estar ligadas à superfície celular para mediar a migração através da matriz.

Resumo

As células do tecido conectivo estão embebidas em uma matriz extracelular complexa que não somente liga as células, mas também influencia a sobrevivência, o desenvolvimento, a forma, a polaridade e o comportamento migratório. A matriz contém várias proteínas fibrosas entrelaçadas em um gel hidratado composto por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs).

Os GAGs são um grupo heterogêneo de cadeias polissacarídicas carregadas negativamente que (com exceção da hialuronana) são ligados covalentemente à proteína para formar moléculas de proteoglicanos. Eles ocupam um grande volume e formam um gel hidratado no espaço extracelular. Os proteoglicanos também são encontrados na superfície das células, onde atuam como correceptores para auxiliar as células a responderem a proteínas-sinal secretadas.

As proteínas formadoras de fibras conferem força e resistência à matriz. Elas também formam uma estrutura na qual as células podem se ancorar, frequentemente por um grande multidomínio de glicoproteínas como a laminina e a fibronectina, que possuem múltiplos sítios de ligação para a integrina na superfície celular. As moléculas de elastina formam uma extensa rede entrelaçada de fibras e camadas que podem ser estendidas e retraídas, concedendo elasticidade à matriz. Os colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V e XI) possuem a forma de cordas, com moléculas helicoidais de fita tripla que se agregam em longas fibrilas no espaço extracelular. As fibrilas, por sua vez, podem reunir-se em vários arranjos altamente organizados. As moléculas de colágeno, associadas a fibrilas, como os tipos IX e XII, decoram a superfície das fibrilas de colágeno e influenciam na interação das fibrilas umas com as outras e com outros componentes da matriz.

Os componentes da matriz são degradados por enzimas proteolíticas extracelulares. Em sua maioria, essas enzimas são metaloproteases de matriz, as quais dependem de ligação de Ca^{2+} *ou* Zn^{2+} *para sua atividade, enquanto outras são serina-proteases, as quais possuem uma serina reativa em seu sítio ativo. Vários mecanismos atuam para assegurar que a degradação dos componentes da matriz sejam precisamente controlados. As células podem, por exemplo, causar uma degradação localizada nos componentes da matriz para nela abrir caminho.*

A PAREDE CELULAR DAS PLANTAS

A *parede celular das plantas* é uma matriz extracelular elaborada que circunda cada célula da planta. Foi a parede celular espessa da cortiça, visível em um microscópio primitivo, que permitiu que Robert Hooke, em 1663, distinguisse e denominasse as células pela primeira vez. As paredes das células vizinhas das plantas são cimentadas para formar a planta intacta (**Figura 19-76**), geralmente são espessas e fortes, sendo mais importantes e mais rígidas do que a matriz extracelular das células animais. Ao envolver as paredes relativamente rígidas, que podem ter até alguns micrômetros de espessura, as células precoces das plantas perderam a capacidade de movimento e adotaram uma vida sedentária, apresentada por todas as plantas atuais.

A composição da parede celular depende do tipo celular

Todas as paredes celulares de plantas originaram-se das células em divisão, à medida que ocorre a formação da placa celular durante a citocinese para criar uma nova separação da parede entre as duas células-filhas (discutido no Capítulo 17). As novas células são produzidas em regiões especiais denominadas *meristemas* (discutido no Capítulo 22), sendo pequenas quando comparadas com seu tamanho final. Para acomodar o subsequente crescimento celular, suas paredes, denominadas **paredes celulares primárias**, são finas e flexíveis, embora rígidas. Uma vez que elas param de crescer, a parede celular não precisa mais ser flexível. Algumas vezes, a parede celular primária é mantida sem modificações, mas, mais comumente, uma **parede celular secundária** rígida é produzida pela deposição de novas camadas no interior das antigas. As novas camadas podem ter a composição similar à da parede celular primária ou ser muito diferentes. O polímero adicional mais comum da parede secundária é a **lignina**, uma complexas rede de compostos fenólicos encontrada na parede dos vasos do xilema e nas células fibrosas dos tecidos da madeira.

Embora as paredes celulares das plantas superiores variem em composição e organização, todas são formadas, como a matriz extracelular das células animais, por um princípio estrutural comum a todas as fibras compostas, incluindo a fibra de vidro e o concreto reforçado. Um componente fornece a força tensora e o outro, no qual o primeiro se encontra

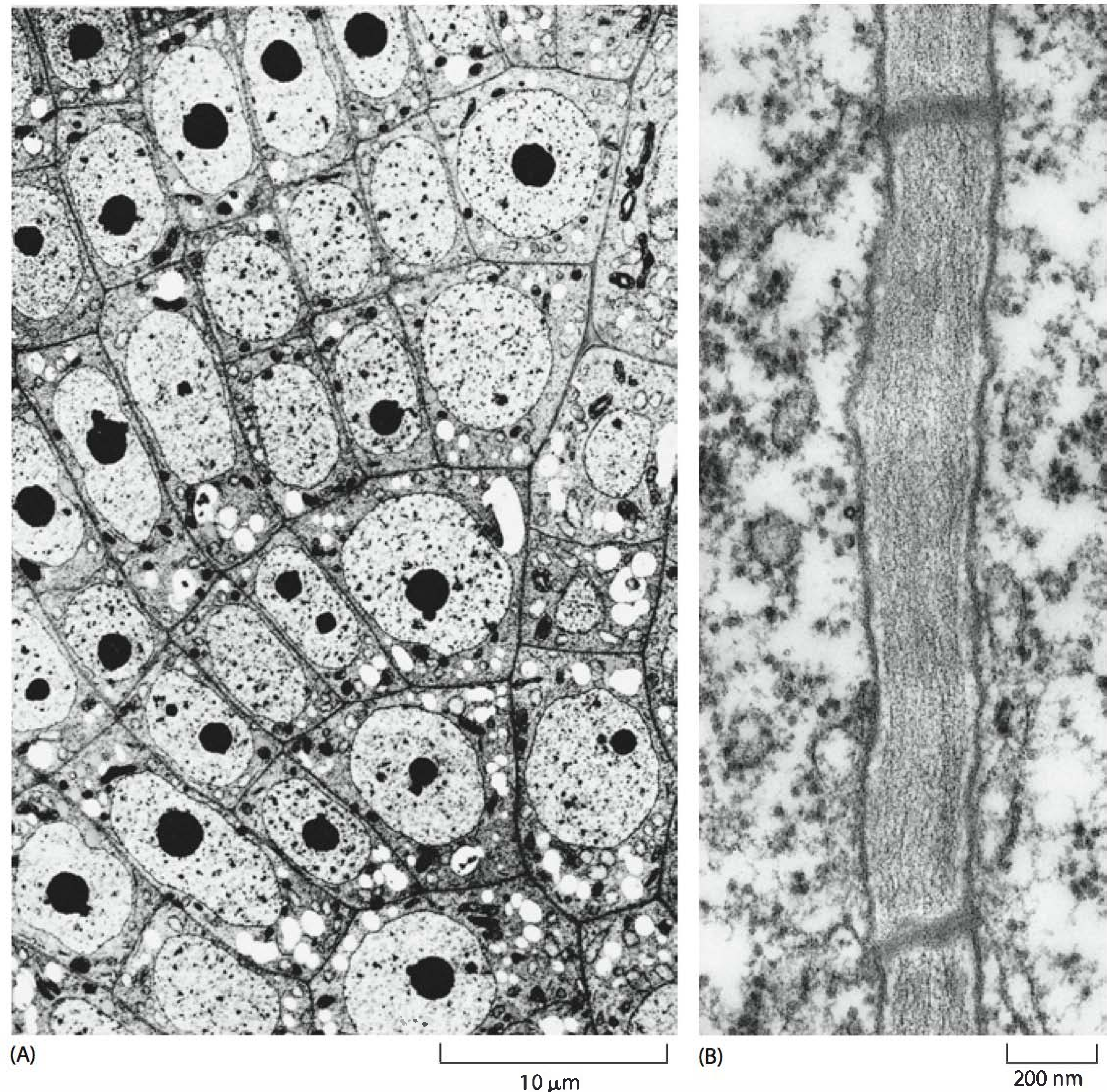


Figura 19-76 Paredes das células vegetais. (A) Micrografia eletrônica da ponta da raiz de um junco, mostrando o padrão organizado de células que resultam de uma sequência ordenada de divisões celulares em células com parede celular rígida. Neste tecido em crescimento, a parede celular ainda estão relativamente finas parecendo como finas linhas pretas entre as células da micrografia. (B) Secção de uma parede celular típica separando duas células vegetais adjacentes. As duas bandas transversais escuras correspondem aos plasmodesmata distribuídos pela parede (ver Figura 19-38). (A, cortesia de C. Busby e B. Gunning, *Eur. J. Cell Biol*. 21:214-233, 1980. Com permissão de Elsevier; B, cortesia de Jeremy Burgess.)

embebido, fornece a resistência à compressão. O princípio é o mesmo em plantas e animais, no entanto a química é diferente. Diferentemente da matriz extracelular das células animais, que é rica em proteínas e outros polímeros contendo nitrogênio, a parede celular das plantas é constituída quase que inteiramente por polímeros que não contêm nitrogênio, incluindo a *celulose* e a lignina. Para um organismo sedentário que depende de CO_2, H_2O e luz solar, esses dois abundantes biopolímeros representam uma forma de baixo custo com base em carbono de um material estrutural, que auxilia a conservar o nitrogênio escasso disponível no solo que geralmente limita o crescimento da planta. Assim, as árvores, por exemplo, fazem um grande investimento em celulose e lignina que compreende grande parte de sua biomassa.

Na parede celular das plantas superiores, as fibras tensoras são formadas por um polissacarídeo de celulose, a macromolécula orgânica mais abundante da Terra, fortemente ligada em uma rede de *glicanos com ligação cruzada*. Na parede celular primária, a matriz na qual a rede de celulose é embebida é composta de *pectina*, uma rede de polissacarídeos altamente hidratada, rica em ácido galacturônico. As paredes celulares secundárias contêm componentes adicionais como a lignina, a qual é dura e ocupa os interstícios entre os outros componentes, tornando a parede rígida e permanente. Todas essas moléculas são mantidas juntas por uma combinação de ligações covalentes e não-covalentes para formar uma estrutura altamente complexa, cuja composição, espessura e arquitetura dependem do tipo celular.

A parede celular das plantas possui uma função de sustentação da estrutura da planta como um todo, uma função protetora como um cercado ao redor de cada célula e uma função de transporte, auxiliando a formar os canais para o movimento dos fluidos da planta. Quando as células da planta tornam-se especializadas, elas em geral adotam uma forma específica e produzem tipos de parede celular especialmente adaptados, de acordo com os

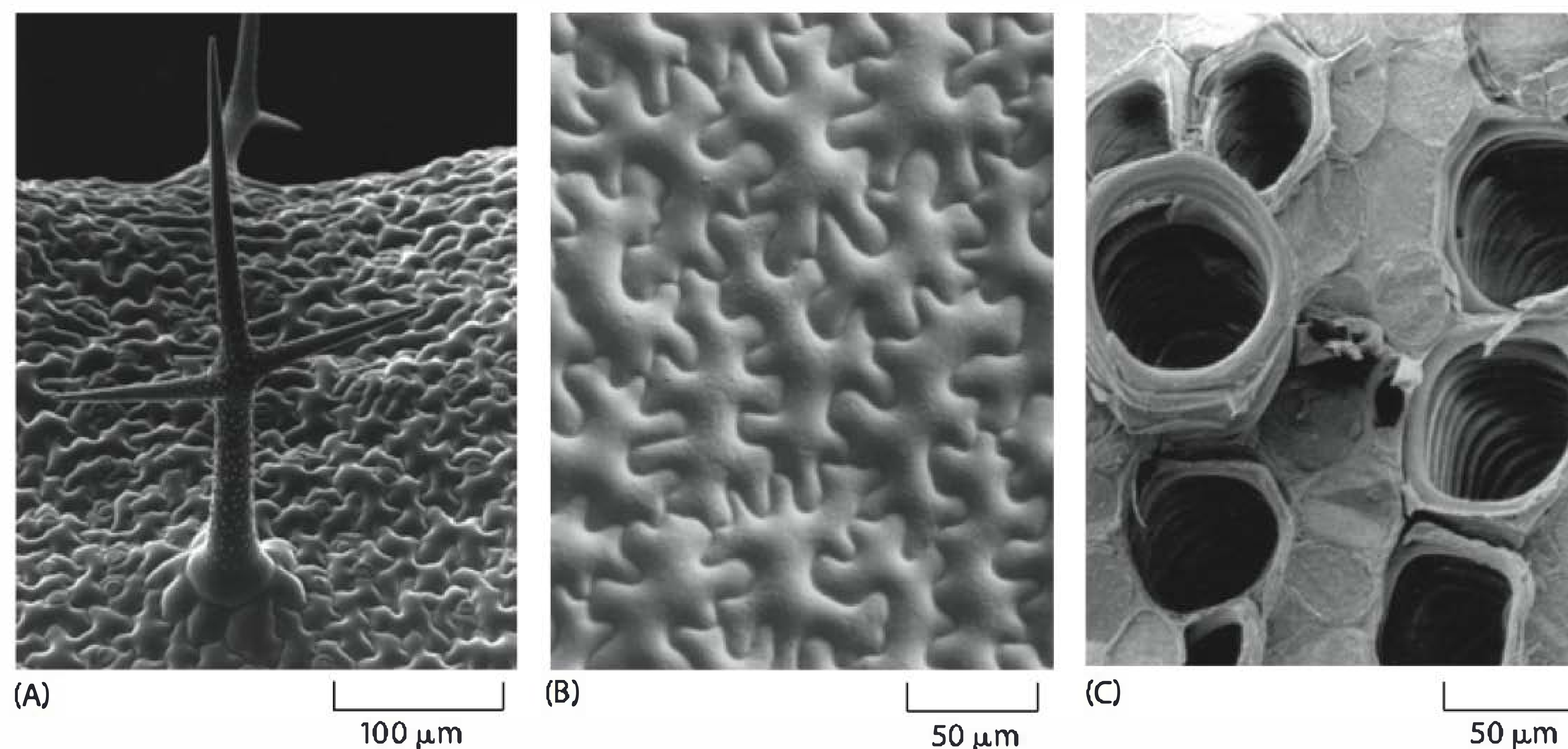


Figura 19-77 Tipos celulares especializados com paredes celulares apropriadamente modificadas. (A) Um tricoma, ou pelo, na superfície superior de uma folha de *Arabidopsis*. Esta espícula, célula protetora, é formada pela deposição local de uma parede rígida de celulose. (B) Vista das células epidérmicas da superfície da folha de tomate. As células encaixam-se como as peças de um quebra-cabeças fornecendo uma forte cobertura externa para a folha. A parede celular externa é reforçada com cutícula e cera, que tornam a folha a prova d'água e auxiliam na defesa contra os patógenos. (C) Esta vista dos elementos do xilema jovem mostra uma parede celular secundária espessa, lignificada e reforçada por arcos, que cria um tubo robusto para o transporte de água através da planta. (A, cortesia de Paul Linstead; B e C, cortesia de Kim Findlay.)

diferentes tipos de células que podem ser reconhecidos e classificados (**Figura 19-77**; ver também Painel 22-2, p. 1404-1405). Vamos nos deter na parede celular primária e na arquitetura molecular que faz essa marcante combinação de força, resistência e plasticidade vista nas porções em crescimento das plantas.

A força tensora da parede celular permite que as células vegetais desenvolvam pressão de turgor

O ambiente extracelular aquoso da célula vegetal consiste no fluido contido na parede celular que circunda a célula. Embora o fluido da parede celular da planta contenha mais solutos do que a água na parte externa do ambiente da planta (p. ex., o solo), é ainda hipotônico em comparação ao interior da célula. Esse desequilíbrio osmótico faz com que a parede celular desenvolva uma grande pressão hidrostática, ou **pressão de turgor**, empurrando a parede celular como a câmara empurra o pneu. A pressão de turgor aumenta até o ponto em que a célula atinge o equilíbrio osmótico, com nenhum influxo de água apesar do desequilíbrio de sal (ver o Painel 11-1, p. 664). Esta pressão é vital às plantas porque é a principal força que dirige a expansão celular durante o crescimento e fornece grande parte da rigidez mecânica dos tecidos vivos das plantas. Compare a folha de uma planta desidratada, por exemplo, com a folha túrgida de uma planta bem-hidratada. É a força mecânica da parede celular que permite que a célula vegetal mantenha essa pressão interna.

A parede celular primária é constituída por microfibrilas de celulose estrelaçadas com uma rede de polissacarídeos pectínicos

As moléculas de celulose fornecem a força tensora à parede celular primária. Cada molécula consiste em uma cadeia linear de pelo menos 500 resíduos de glicose covalentemente ligados uns aos outros para formar uma estrutura em forma de fita, a qual é estabilizada por ligações de hidrogênio intracadeias (**Figura 19-78**). Além disso, as ligações de hidrogênio intermoleculares, entre as moléculas de celulose adjacentes, causam uma forte adesão entre as moléculas sobrepostas e dispostas paralelamente, formando feixes de cerca de 40 cadeias de celulose, todas com a mesma polaridade. Estes agregados cristalinos altamente organizados de muitos micrômetros de extensão são denominados **microfibrilas de celulose** e apresentam uma força tensora comparável ao aço (ver Figura 19-78). Grupos de microfibrilas são arranjados em camadas, ou lamelas, com cada microfibrila a 20 a 40 nm de distância de sua vizinha e conectada e ela por ligações cruzadas das moléculas de glicano ligadas por ligações de hidrogênio à superfície das microfibrilas. A parede celular primária consiste em várias lamelas organizadas em uma rede conglomerada (**Figura 19-79**).

Os **glicanos com ligação cruzada** são um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam fortemente à superfície de cada microfibrila de celulose, auxiliando na li-

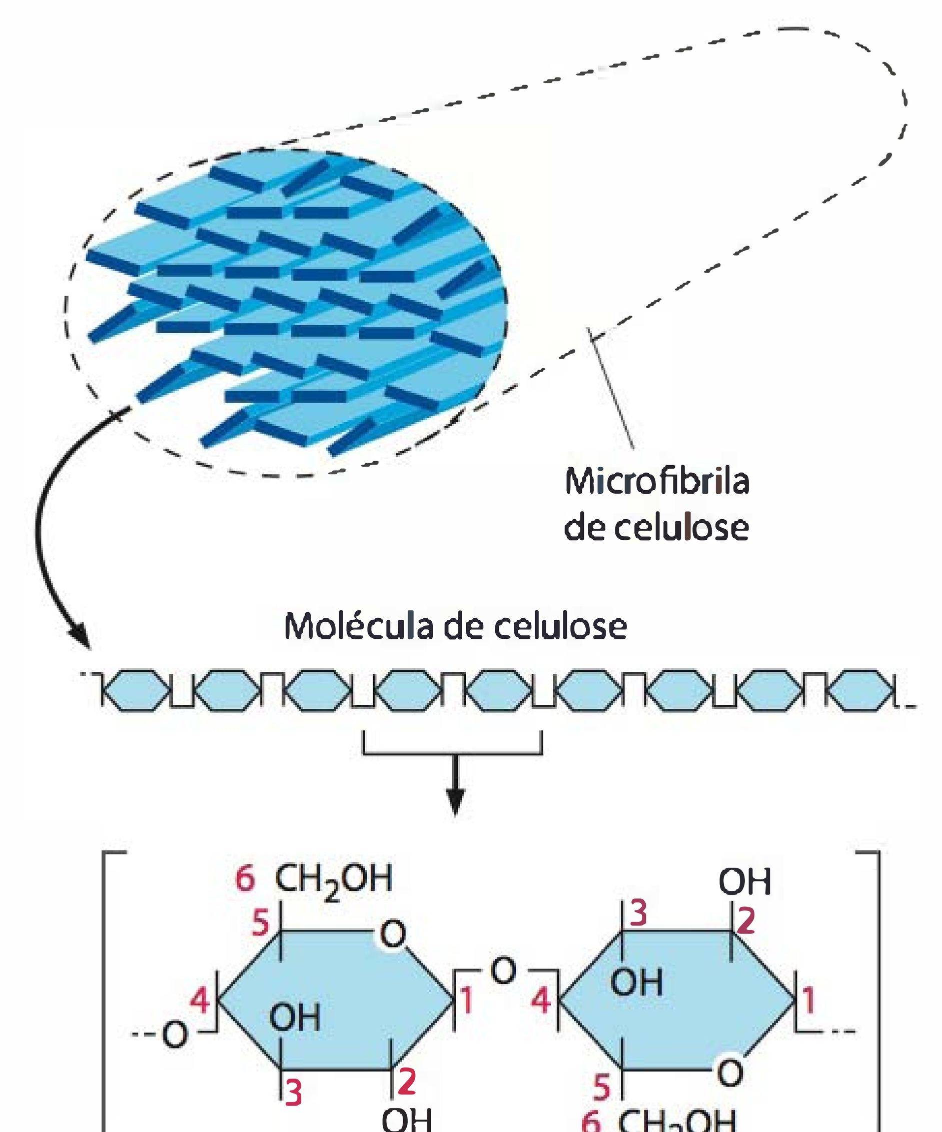


Figura 19-78 Celulose. As moléculas de celulose são longas, não-ramificadas e constituídas por unidades de glicose com ligações β1,4. Cada resíduo de glicose é invertido com relação a seu vizinho, e as repetições dissacarídicas resultantes ocorrem centenas de vezes em uma única molécula de celulose. Cerca de 40 moléculas de celulose reúnem-se para formar uma forte microfibrila de celulose ligada por ligações de hidrogênio.

gação cruzada das microfibrilas em uma rede complexa. Sua função é análoga à do colágeno associado a fibrilas, discutido anteriormente (ver Figura 19-68). Há muitas classes de glicanos, mas todas possuem uma longa estrutura central linear composta de um tipo de açúcar (glicose, xilose ou manose) de onde saem as pequenas cadeias laterais de outros açúcares. São as moléculas de açúcar na cadeia principal que formam as ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose. A cadeia principal e as cadeias laterais variam de acordo com a espécie da planta e o estágio de desenvolvimento.

Juntamente com esta rede de microfibrilas de celulose e glicanos com ligações cruzadas há uma outra rede de polissacarídeos com ligações cruzadas com base em **pectina** (ver Figura 19-79). As pectinas são um grupo heterogênio de polissacarídeos ramificados que contém muitas unidades de ácido galacturônico negativamente carregadas. Devido a sua carga negativa, as pectinas são altamente hidratadas e associadas a uma nuvem de cátions, semelhantemente aos glicosaminoglicanos das células animais devido ao grande espaço que ocupam (ver Figura 19-56). Quando o Ca^{2+} é adicionado à solução de moléculas de pectina, várias ligações cruzadas ocorrem dando origem a um gel semirrígido (é a pectina que é adicionada ao suco de fruta para produzir geleias). Certas pectinas são particularmente abundantes na *lamela média*, uma região especializada que fixa as paredes celulares das células adjacentes (ver Figura 19-79), e as ligações cruzadas causadas pelo Ca^{2+} parecem auxiliar a manter unidos os componentes da parede celular. Embora as pontes covalentes também sejam responsáveis por manterem juntos os componentes da parede celular, pouco é conhecido sobre sua natureza. O controle da separação das células da lamela média está relacionado com o processo de amadurecimento do tomate e a queda das folhas no outono.

Além das duas redes de polissacarídeos, presentes em todas as paredes celulares primárias das plantas, há proteínas que podem contribuir com cerca de 5% da massa seca da parede. Muitas dessas proteínas são enzimas responsáveis pela renovação e o remodelamento da parede, principalmente durante o crescimento. Uma outra classe de proteínas de parede contém grandes quantidades de hidroxiprolina, como no colágeno. Essas proteínas fortalecem a parede e são produzidas em quantidades aumentadas como resposta ao ataque por patógenos. Com base na sequência genômica de *Arabdopsis*, estimou-se que mais de 700 genes são necessários para sintetizar, reunir e remodelar a parede celular da planta. Alguns dos principais polímeros encontrados nas paredes primária e secundária estão descritos na **Tabela 19-8**.

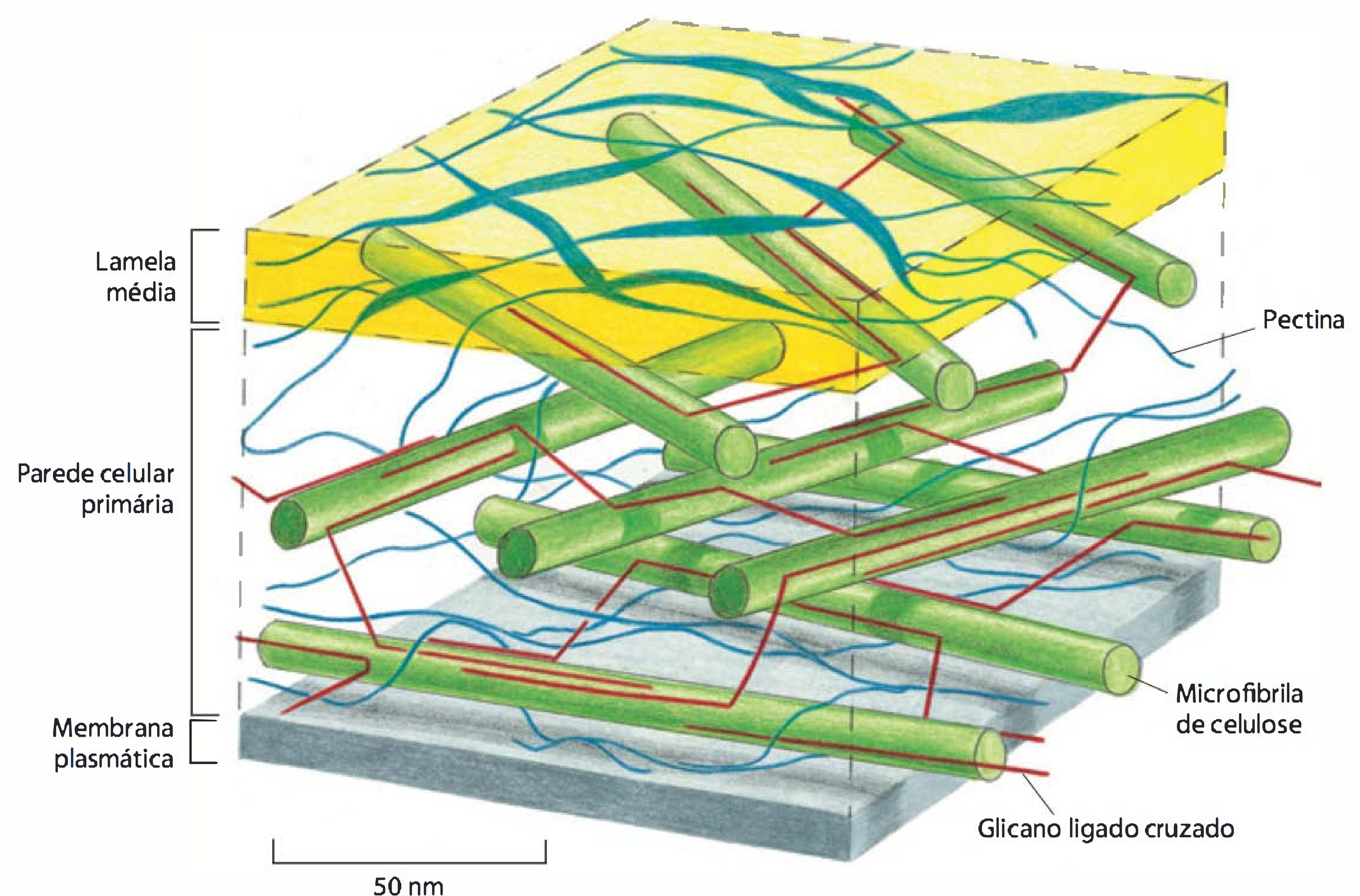


Figura 19-79 Modelo em escala de uma porção da parede celular primária, mostrando as duas redes principais de polissacarídeos. As camadas de microfibrilas de celulose (*verde*) em arranjo ortogonal são entrecruzadas por ligações de hidrogênio a uma rede de hemicelulose (*vermelho*). Esta rede coexiste com uma rede de polissacarídeos de pectina (*azul*). A rede de celulose e hemicelulose fornece força tensora, enquanto a rede de pectina resiste à compressão. A celulose, a hemicelulose e a pectina estão presentes em quantidades equivalentes na parede celular primária. A lamela média é rica em pectina e fixa as células adjacentes.

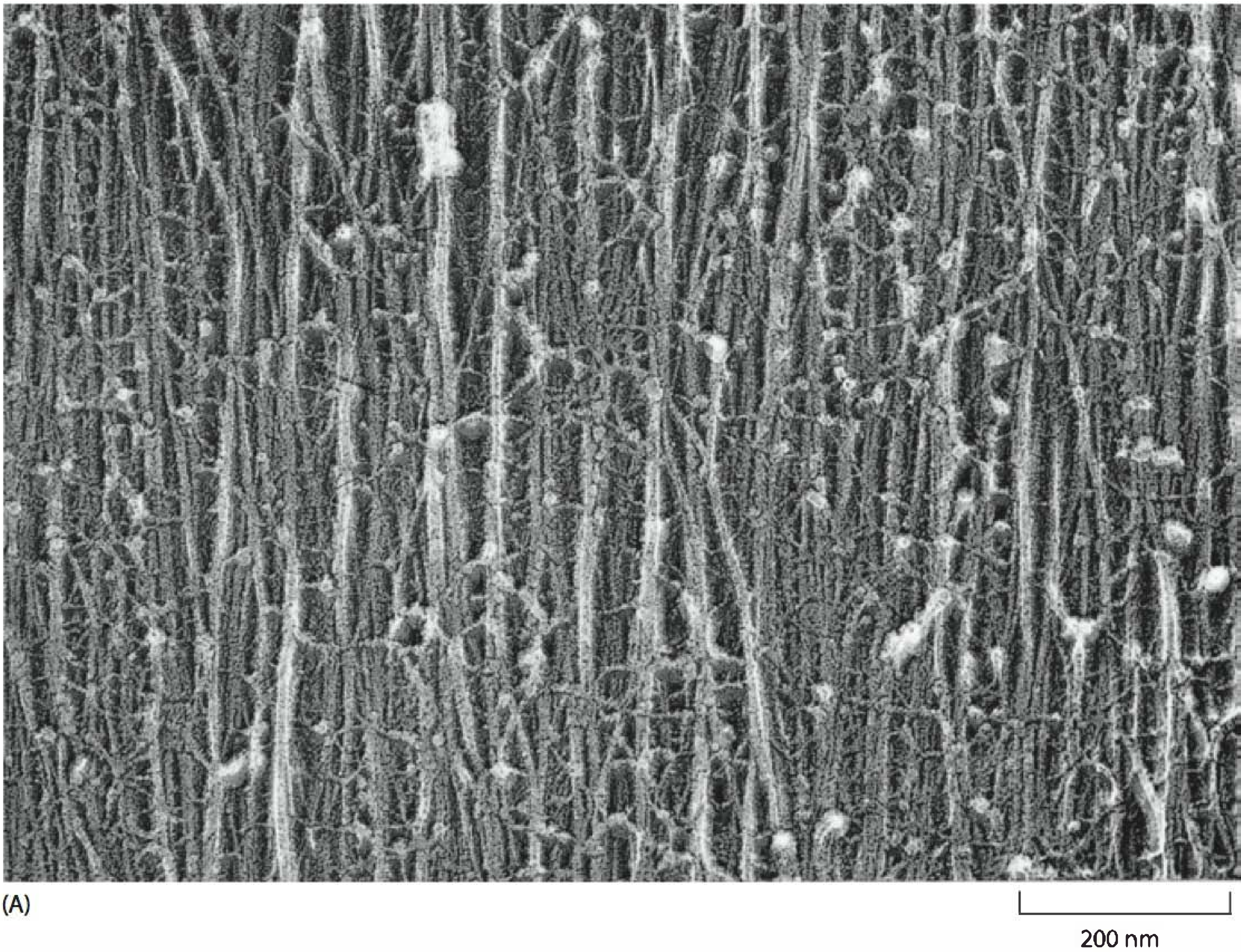
Tabela 19-8 **Polímeros da parede celular vegetal**

POLÍMERO	COMPOSIÇÃO	FUNÇÃO
Celulose	Polímero linear de glicose	As fibrilas conferem força tensora a todas as paredes
Glicano ligado cruzado	Xiloglicano, glicuroarabinoxilano e manano	Ligação cruzada das fibrilas de celulose em uma rede robusta.
Pectina	Homogalacturonano e ramnogalacturonano	Formas negativamente carregadas, rede hidrofílica que fornece a força de compressão à parede celular primária; adesão célula-célula.
Lignina	Coumaril, coniferil e álcool sinapil	Formam fortes polímeros a prova d'água, que reforçam a parede celular secundária.
Proteínas e glicoproteínas	Enzimas e proteínas ricas em prolina	Responsáveis pela renovação e pelo remodelamento da parede; auxiliam na defesa contra patógenos.

A deposição orientada da parece celular controla o crescimento da planta

Uma vez que a planta deixou o meristema onde foi gerada, ela pode crescer dramaticamente, em geral mais de mil vezes o seu volume. Essa expansão determina a forma final de cada célula e, consequentemente, a forma final da planta. A expansão ocorre em resposta à pressão de turgor, mas é o comportamento da parede celular que governa sua extensão e direção. A atividade complexa de remodelamento da parede e a deposição de novo material de parede celular são necessárias. Devido a sua estrutura cristalina, as microfibrilas de celulose são incapazes de esticar, conferindo a elas um papel fundamental nesse processo. Assim, a elasticidade e a deformação da parede celular devem envolver o deslizamento das microfibrilas umas sobre as outras, a separação das microfibrilas, ou ambos. A orientação das microfibrilas nas camadas mais internas da parede governa a direção na qual a célula expande. As células, portanto, antecipam sua morfologia futura pelo controle da orientação das microfibrilas que elas depositam na parede (**Figura 19-80**).

Ao contrário da maioria das macromoléculas da matriz produzidas no retículo endoplasmático e no Golgi e então secretadas, a celulose, como a hialuronana nos animais, secretada na superfície da célula por um complexo de enzimas ligadas à membrana plasmática



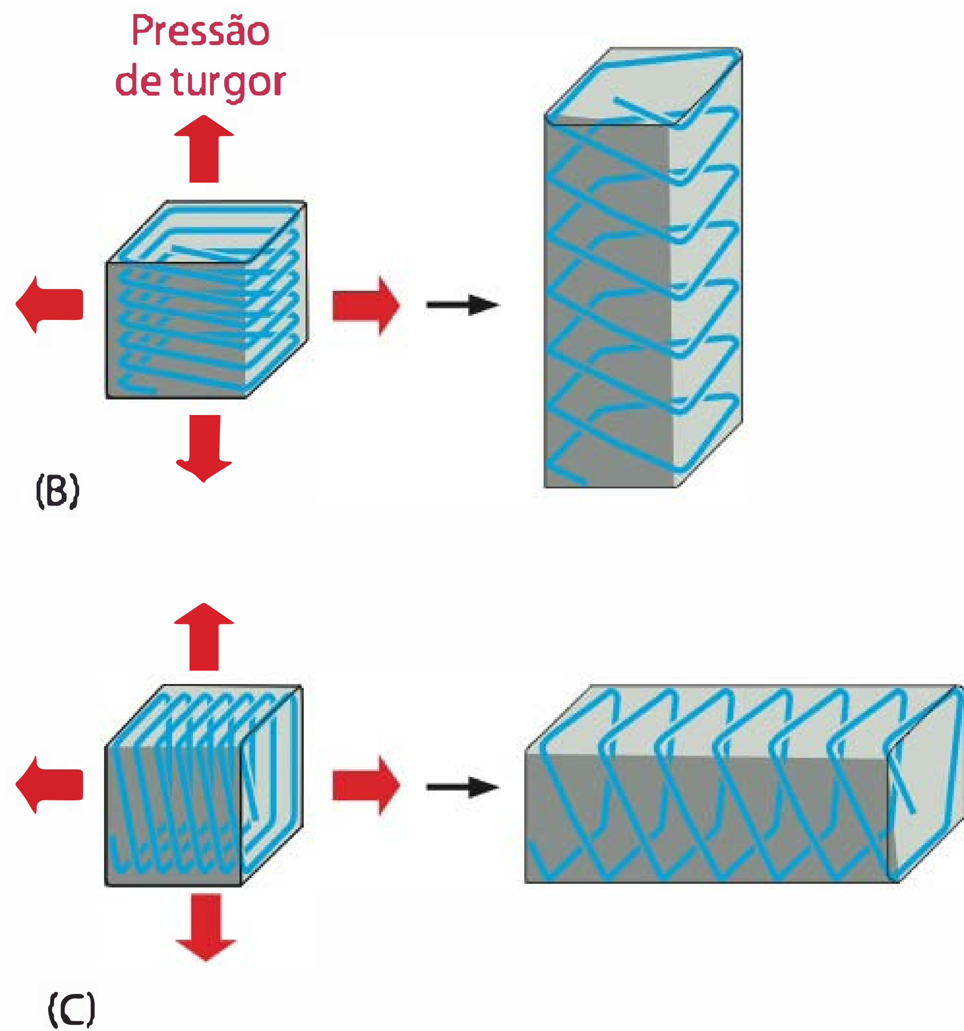


Figura 19-80 **As microfibrilas de celulose influenciam a direção do alongamento celular.** (A) A orientação das microfibrilas de celulose na parede celular primária de uma célula de cenoura durante o alongamento é mostrada nesta micrografia eletrônica de uma réplica sombreada de uma parede celular rapidamente congelada e copiada. As microfibrilas de celulose estão em disposiçõa paralela, orientadas perpendicularmente ao eixo de alongamento celular. As microfibrilas são interligadas e entrelaçadas por uma rede complexa de moléculas da matriz (compare com a Figura 19-79). (B, C) As células em (A) e (B) iniciaram com formas idênticas (representadas como cubos), mas com diferentes orientações das microfibrilas de celulose da parede celular. Apesar de a pressão de turgor ser uniforme em todas as direções, o enfraquecimento da parede celular faz com que cada célula seja alongada perpendicularmente à orientação das microfibrilas, que possuem uma força tensora bastante forte. A expansão celular ocorre junto com a inserção de material para uma nova parde. A forma final de um órgão, como um broto, é determinada pela direção na qual suas células expandem-se. (A, Cortesia de Brian Wells e Keith Roberts.)

(celulose-sintase), que usa como substrato o nucleotídeo de açúcar UDP-glicose fornecido pelo citoplasma. Cada complexo enzimático, ou *roseta*, possui simetria sextavada e contém o produto proteico de três genes separados de sintases de celulose (*CESA*, *cellulose synthase*). Cada CESA é essencial para a produção da microfibrila de celulose. Três genes CESA são necessários para a síntese da parede celular primária e outros três genes para a síntese da parede celular secundária.

Assim que é sintetizada, a celulose nascente reúne-se espontaneamente em microfibrilas que formam a superfície extracelular da membrana plasmática, formando uma camada, ou lamela, na qual todas as microfibrilas apresentam mais ou menos o mesmo alinhamento (ver Figura 19-79). Cada nova lamela forma-se internamente à anterior, de forma que a parede consiste em camadas de lamelas concêntricas, sendo a mais velha localizada na porção mais externa. As microfibrilas depositadas mais recentemente em células que estão sendo alongadas normalmente são perpendiculares ao eixo do alongamento celular, embora a orientação das microfibrilas das lamelas externas depositadas anteriormente possa ser diferente (ver Figura 19-80B e C).

Os microtúbulos orientam a deposição da parede celular

Uma pista importante para o mecanismo que dita esta orientação vem de observações dos microtúbulos nas células vegetais. Eles são arranjados no citoplasma cortical com a mesma orientação das microfibrilas de celulose que estão sempre sendo depositadas na parede ce-

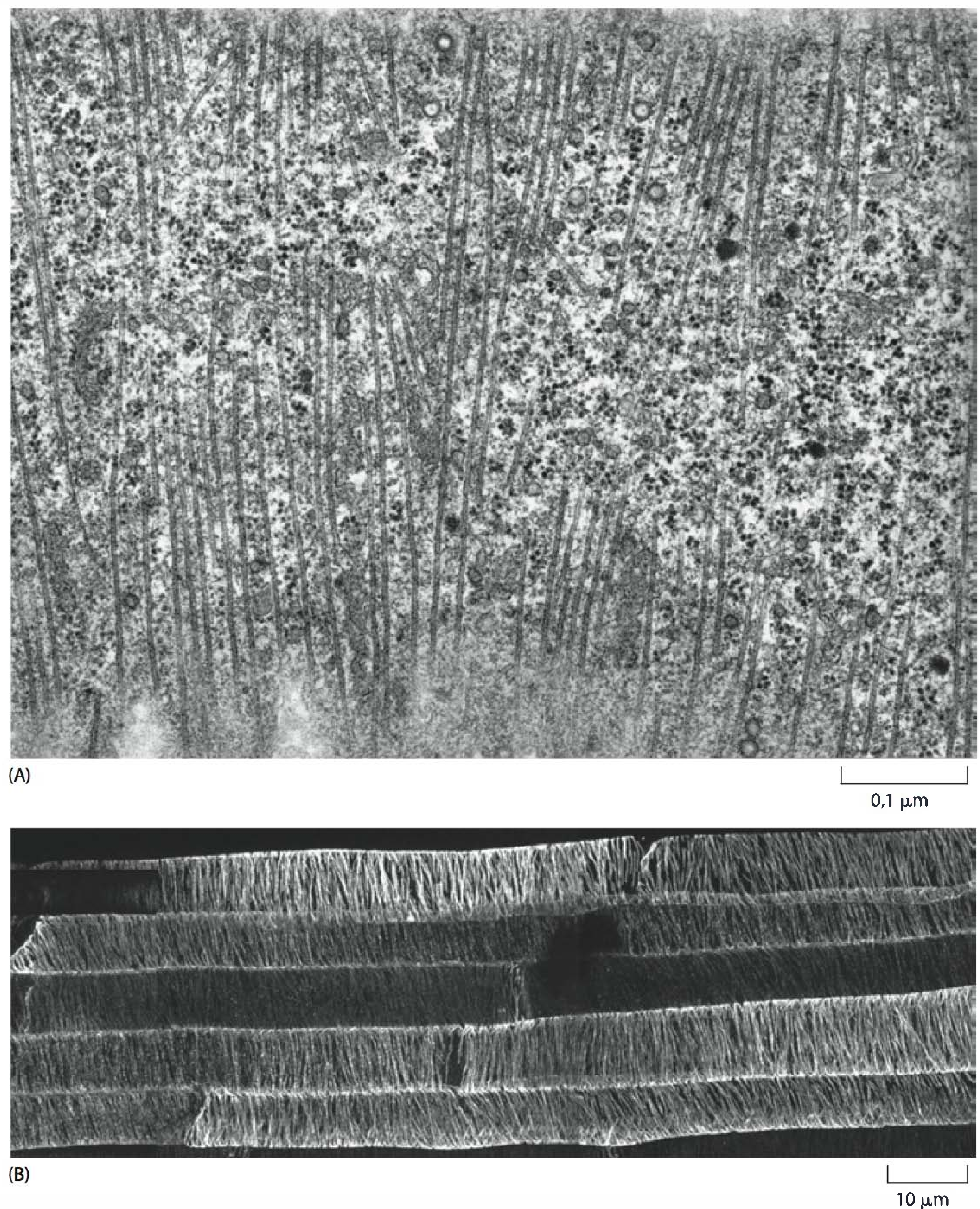


Figura 19-81 Disposição cortical dos microtúbulos em uma célula vegetal. (A) Secção de uma célula da extremidade da raiz de grama Timothy, que teve sua membrana plasmática removida, mostrando a disposição cortical dos microtúbulos abaixo da membrana plasmática. Estes microtúbulos têm orientação perpendicular ao eixo longo da célula. (B) Uma célula epidérmica isolada da ponta da raiz da cebola corada por imunofluorescência, mostrando a organização cortical transversal dos microtúbulos nestas células de alongamento rápido. Os claros arranjos transversais formam ângulos retos com o eixo de alongamento da raiz. (A, cortesia de Brian Gunning; B, cortesia de Keiko Sugimoto-Shirasu.)

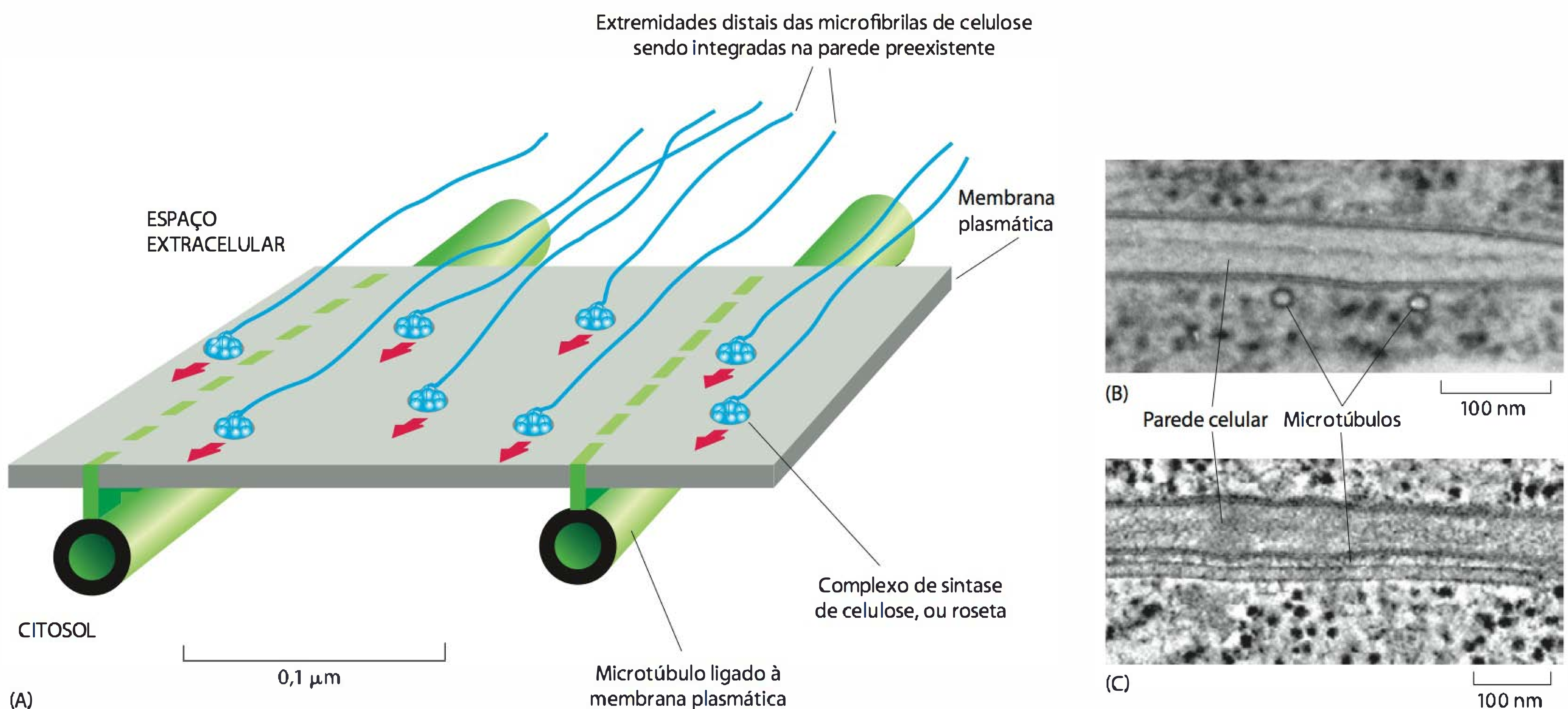


Figura 19-82 Modelo de como a orientação das microfibrilas de celulose recém-depositadas pode ser determinada pela orientação dos microtúbulos corticais. (A) Os grandes complexos de sintase de celulose são proteínas integrais da membrana que sintetizam microfibrilas de celulose continuamente, na face externa da membrana plasmática. As extremidades distais das microfibrilas rígidas tornam-se integradas à textura da parede, e seu alongamento na extremidade proximal empurra o complexo sintase ao longo do plano da membrana. Como a disposição cortical dos microtúbulos está conectada à membrana plasmática, de forma a restringir o complexo a canais definidos da membrana, a orientação dos microtúbulos, quando presentes, determina o eixo ao longo do qual as novas microfibrilas são depositadas. (B, C) Duas eletromicrografias mostrando a associação compacta dos microtúbulos corticais à membrana plasmática. Uma mostra uma secção transversal dos microtúbulos e a outra uma secção longitudinal. Ambas enfatizam os espaços constantes de cerca de 20 nm entre a membrana e o microtúbulo. As moléculas responsáveis pela conexão ainda não são conhecidas. (B e C, cortesia de Andrew Staehelin.)

lular. Estes microtúbulos corticais formam um *arranjo cortical* próximo à face citoplasmática da membrana plasmática, mantidos ali por proteínas ainda não-caracterizadas (**Figura 19-81**). A orientação congruente do arranjo cortical dos microtúbulos (localizados logo abaixo da membrana plasmática) e das microfibrilas de celulose (localizadas do lado de fora da membrana) é encontrada em muitos tipos e formas de células vegetais, estando presente durante a deposição das paredes primária e secundária.

Se todo o sistema de microtúbulos for dissociado pelo tratamento com substâncias despolimerizadoras de microtúbulos, as consequências para a subsequente deposição de celulose não são tão óbvias como seria esperado. O tratamento com a substância não tem efeito na produção de novas microfibrilas de celulose e, em alguns casos, a célula pode continuar a depositar novas microfibrilas na orientação preexistente. Qualquer mudança no padrão de microfibrilas, que normalmente ocorrem entre lamelas sucessivas, é bloqueada. Parece que uma orientação preexistente das microfibrilas pode ser propagada mesmo na ausência dos microtúbulos, mas qualquer mudança na deposição das microfibrilas de celulose requer que os microtúbulos intactos estejam presentes para determinar a nova orientação.

Estas observações são consistentes com o seguinte modelo. As rosetas, embebidas na membrana plasmática, que sintetizam celulose, parecem produzir moléculas longas de celulose. A medida que a síntese de moléculas de celulose e seu autoagrupamento em microfibrilas inicia, a extremidade distal de cada microfibrila forma ligações cruzadas indiretas com a camada prévia do material da parede, orientando a nova microfibrila em parelelo com as antigas, à medida que ela se torna integrada na textura da parede. Uma vez que a microfibrila é rígida, a roseta deve se mover, na sua extremidade proximal crescente, à medida que deposita seu material novo deslocando-se no plano da membrana na direção definida pela via na qual a extremidade distal da microfibrila está ancorada na parede existente. Dessa forma, cada camada de microfibrilas tenderia a se projetar para fora da membrana, na mesma orientação da camada depositada previamente, com as rosetas seguindo a direção das microfibrilas orientadas pré-existentes, fora da célula. Entretanto, os microtúbulos orientados dentro da célula podem forçar uma alteração na direção na qual as rosetas se movem: eles podem criar ligações na membrana plasmática que atuam como bancos de um canal para limitar o movimento das rosetas (**Figura 19-82**). Nesta visão, a síntese de celulose pode ocorrer independentemente dos microtúbulos. Contudo, está limitada espacialmente quando os microtúbulos corticais estão presentes para definir os microdomínios da membrana dentro dos quais o complexo enzimático pode se movimentar.

Desta forma, as células vegetais podem mudar a direção de expansão por mudanças súbitas na orientação do feixe de microtúbulos corticais. Como as células vegetais não podem se movimentar (limitadas por sua parede), a morfologia da planta multicelular depende de um controle coordenado e altamente padronizado de orientação dos microtúbulos corticais durante o desenvolvimento. Não se sabe como a organização dos microtúbulos é controlada,

embora tenha sido mostrado que os microtúbulos podem reorientar rapidamente em resposta a estímulos extracelulares, incluindo reguladores do crescimento de plantas de baixo peso molecular como o etileno e o ácido giberélico (ver Figura 22-119).

Os microtúbulos não são, entretanto, os únicos elementos do citoesqueleto que influenciam a deposição da parede. Filamentos de actina cortical e focal também podem direcionar a deposição da nova parede em locais específicos na superfície celular, contribuindo para a forma final elaborada de muitas células vegetais diferenciadas, como os tricomas das folhas e as células epidérmicas apresentadas na Figura 19-77. Nas células que não podem organizar sua rede de actina cortical, como nos mutantes *Arp2/3*, as células perdem sua forma característica, como mostra a Figura 16-35.

Resumo

As células vegetais são cercadas por uma matriz extracelular rígida na forma de parede celular, a qual é responsável por muitas das características típicas do estilo de vida vegetal. A parede celular é composta de uma rede de microfibrilas de celulose e glicanos com ligações cruzadas, embebidos em uma matriz de polissacarídeos de pectina. Nas paredes celulares secundárias, a lignina pode ser depositada, tornando-as impermeáveis à água, duras e fibrosas. Um arranjo cortical de microtúbulos pode determinar a orientação da nova microfibrila de celulose recém-depositada, a qual, por sua vez, determina a direção da expansão celular e, portanto, a forma final da célula e da planta como um todo.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

19-1 Devido aos numerosos processos intracelulares regulados pelas alterações nas concentrações de Ca^{2+}, parece provável que as adesões célula-célula dependentes de Ca^{2+} também sejam reguladas por alterações nas concentrações de Ca^{2+}.

19-2 As junções compactas desempenham duas funções distintas: elas bloqueiam o espaço entre as células, restringindo o fluxo paracelular, e cercam os domínios da membrana, impedindo a mistura entre as proteínas da porção apical e basolateral.

19-3 As integrinas podem converter sinais mecânicos em sinais moleculares.

19-4 A elasticidade da elastina deve-se a seu alto conteúdo de hélices α, as quais atuam como molas moleculares.

Discuta as seguintes questões.

19-5 Comente a seguinte citação de Warren Lewis (1922), um dos pioneiros da biologia celular. "Se os vários tipos de células perdessem sua rigidez uns com os outros e com a matriz extracelular, nossos corpos se desintegrariam e desmoronariam como um amontoado de células".

19-6 As moléculas de adesão célula-célula foram originalmente identificadas com o uso de anticorpo contra componentes de superfície celular para bloquear a agregação celular. Neste ensaio de bloqueio da adesão, os pesquisadores acharam necessário usar fragmentos de anticorpos, cada um com um único sítio de ligação (denominados fragmentos FAB), ao invés de anticorpos IgG intactos, os quais possuem a forma de Y com dois sítios de ligação idênticos. Os fragmentos FAB foram produzidos pela digestão de anticorpos IgG com papaína, uma protease, para separar os dois sítios de ligação (**Figura Q19-1**). Por que você acha que foi necessário usar os fragmentos FAB para bloquear a agregação celular?

19-7 A intoxicação alimentar pela bactéria *Clostridium perfringens* produz uma toxina que se liga aos membros da família das claudinas, as quais são as principais constituintes das junções compactas. Quando ligada à claudina, a porção C-terminal da toxina permite que a porção N-terminal se insira na membrana da célula adjacente, formando buracos que matam a célula. A porção da toxina que se liga à claudina mostrou ser um valioso reagente para a investigação das propriedades das junções compactas. As células MDCK são a escolha comum para estudos das junções compactas, pois podem formar uma camada epitelial intacta com grande resistência transepitelial. As células MDCK expressam duas claudinas: a claudina-1, que não se liga à toxina, e a claudina-4, que se liga.

Quando uma camada epitelial intacta de células MDCK é incubada com o fragmento C-terminal da toxina, a claudina-4 desaparece, tornando-se indetectável 24 horas após. Na ausência da claudina-4, as células permanecem saudáveis, e a camada epitelial permanece intacta. O número médio de filamentos nas junções compactas que ligam as células também diminui de 4 para 2 após 24 horas, e eles são menos ramificados. Um ensaio funcional para integridade das junções compactas mostra que a resistência transepitelial é reduzida dramaticamente na presença da toxina, mas pode ser restaurada com lavagem (**Figura Q19-2A**). Curiosamente, a toxina produz esses efeitos somente quando é adicionada à porção basolateral da camada. Ela não tem efeito quando adicionada à superfície apical (Figura Q19-2B).

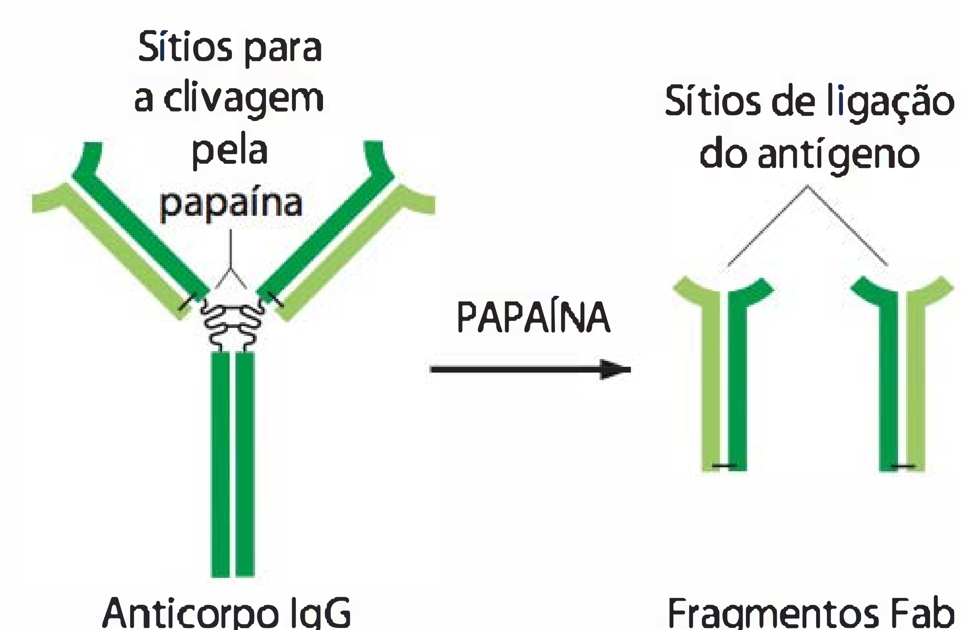


Figura Q19-1 Produção do fragmento Fab de anticorpos IgG pela digestão com papaína (Questão 19-6).

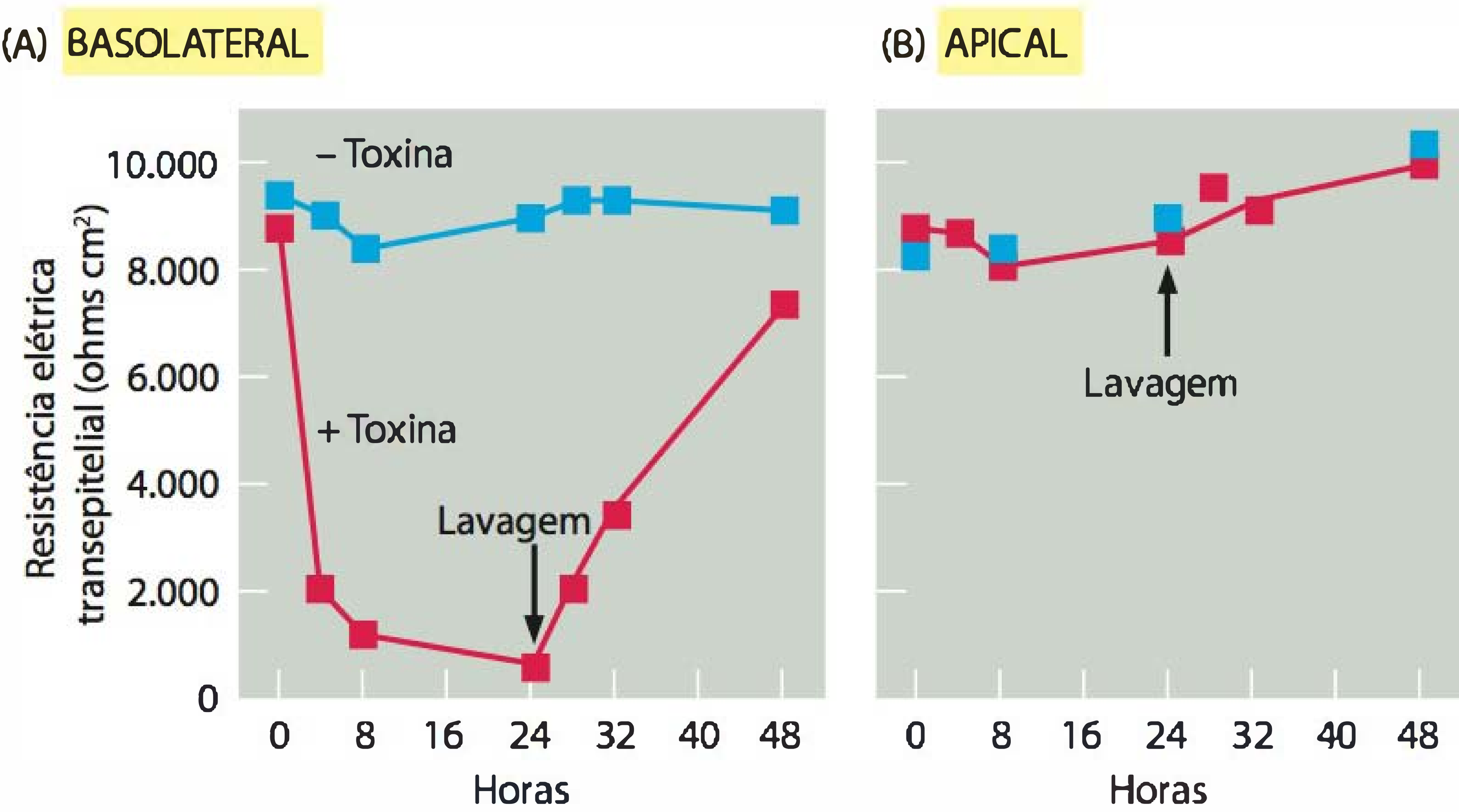


Figura Q19-2 Efeitos da toxina *Clostridium* na função de barreira das células MDCK (Questão 19-7). (A) Adição da toxina na porção basolateral da camada epitelial. (B) Adição da toxina na porção apical da camada epitelial. Quanto maior a resistência (ohms cm^2), menor a corrente paracelular para uma determinada voltagem.

A. Como os dois filamentos da junção compacta podem permanecer mesmo que toda a claudina-4 tenha desaparecido?
B. Como você acha que o fragmento da toxina faz com que os filamentos da junção compacta se desintegrem?
C. Por que você acha que a toxina atua quando adicionada à porção basolateral da camada epitelial, mas não à porção apical?

19-8 Não é uma tarefa fácil identificar funções particulares para os componentes específicos da lâmina basal, pois a estrutura como um todo é um material composto complicado com propriedades mecânicas e de sinalização. O nidogênio, por exemplo, se liga de forma cruzada a dois componentes centrais da lâmina basal, a laminina-γ1 e ao colágeno tipo IV. Considerando tal função, é surpreendente que camundongos nocautes homozigotos para o gene do nidogênio-1 são saudáveis sem fenótipo anormal. Igualmente, camundongos nocautes homozigotos para o gene do nidogênio-2 também parecem completamente normais. Por outro lado, camundongos com uma mutação definida no gene da laminina-γ1, que elimina somente o sítio de ligação do nidogênio, morrem ao nascimento com defeitos severos na formação dos pulmões e dos rins. Acredita-se que a porção mutante da cadeia da laminina-γ1 não tenha outra função a não ser se ligar ao nidogênio, e não afeta a estrutura da laminina ou sua capacidade de se reunir na lâmina basal. Como você explica as observações genéticas resumidas na **Tabela Q19-1**? O que você espera do fenótipo de camundongos nocautes homozigotos para os dois genes do nidogênio?

19-9 Discuta a seguinte afirmativa: "A lâmina basal das fibras musculares atua como uma quadro de avisos no qual células podem colocar suas mensagens que dirigem a diferenciação e a função das células subjacentes".

Tabela Q19-1 Fenótipo dos camundongos com defeitos genéticos nos componentes da lâmina basal (Questão 19-8).

PROTEÍNA	DEFEITO GENÉTICO	FENÓTIPO
Nidogênio-1	Nocaute gênico (–/–)	Nenhum
Nidogênio-2	Nocaute gênico (–/–)	Nenhum
Laminina-γ1	Deleção no sítio de ligação do nidogênio (+/–)	Nenhum
Laminina-γ1	Deleção no sítio de ligação do nidogênio (–/–)	Morte ao nascer

+/– para hetorozigoto, –/– para homozigoto.

19-10 A afinidade das integrinas pelos componentes da matriz pode ser modulada por mudanças nos seus domínios citoplasmáticos: um processo conhecido como sinalização de dentro para fora. Você identificou regiões-chave nos domínios citoplasmáticos da integrina αIIbβ3 que parecem ser necessárias à sinalização de dentro para fora (**Figura Q19-3**). A substituição de uma alanina por D723 na cadeia β ou R995 na cadeia α leva a altos níveis de ativação espontânea, sob condições nas quais o tipo normal está inativo. Seu orientador sugere que você converta o aspartato da cadeia β para uma arginina (D723R) e a arginina da cadeia α para um aspartato (R995D). Você compara as três cadeias α (R995, R995A e R995D) contra todas as três cadeias β (D723, D723A e D723R). Você observa que todos os pares possuem altos níveis de ativação espontânea, exceto D723 *versus* R995 (normal) e D723R *versus* R995D, os quais apresentam baixos níveis. Com base nesses resultados, como você acha que a integrina αIIbβ3 mantém seu estado inativo?

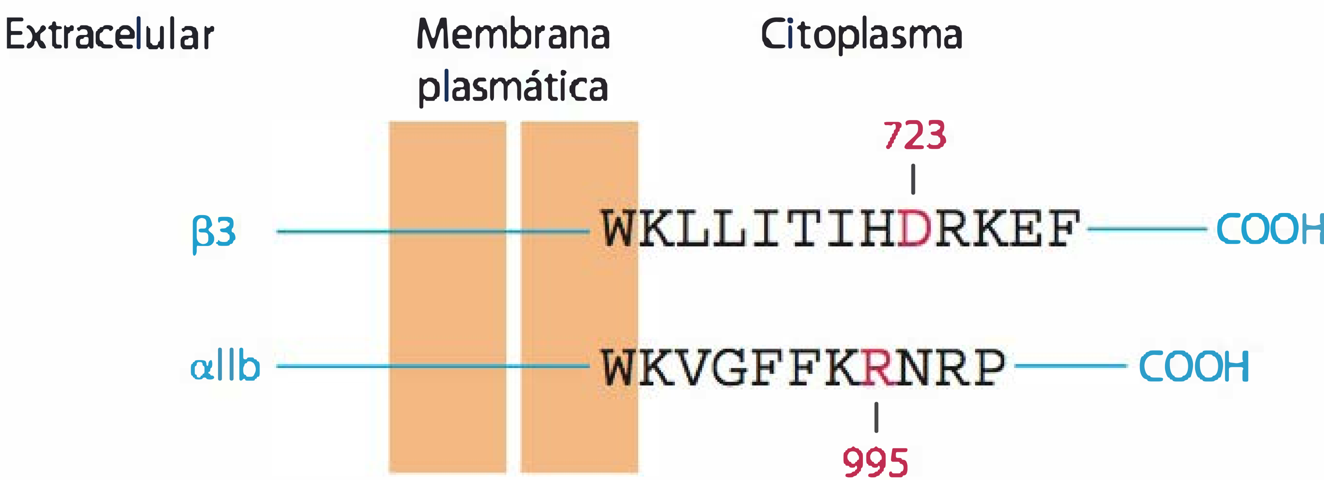


Figura Q19-3 Representação esquemática da integrina αIIbβ3 (Questão 19-10). Os resíduos D723 e R995 estão indicados. (De P. E.Hughes et al. *J. Biol. Chem.* 271:6571-6574, 1996. Com permissão da American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

19-11 A Sephadex Carboximetil é um dextrano carregado negativamente em geral usado para purificar proteínas. Ela vem na forma em pó que incha muito logo que se adiciona água. Você empacotou uma coluna de cromatografia com o gel inchado. Quando você começa a equilibrar a coluna com um tampão contendo 50 mM de NaCl em pH neutro, fica espantado ao ver uma grande redução no volume do gel. Por que a sephadex seca incha tão rapidamente quando colocada em água? Por que o gel reduz tanto de volume quando a solução de sal é adicionada?

19-12 Na temperatura corporal, o L-aspartato racemiza em D-aspartato a uma taxa apreciável. A maioria das proteínas do organismo possui baixos níveis de D-aspartato, se detectável. Entretanto, a elastina possui níveis relativamente altos de D-aspartato. Além disso, a quantidade de D-aspartato aumenta na proporção direta com a idade da pessoa da qual a amostra foi colhida. Por que você acha que a maioria das proteínas possui tão pouco D-aspartato, quando presente, enquanto que a elastina possui níveis tão altos e dependentes da idade?

19-13 Seu patrão aparece para jantar! Tudo o que você tem é uma alface murcha. Você lembra vagamente que há um truque para rejuvenescer uma alface murcha, mas não lembra qual é. Você deve mergulhar a alface em água salgada ou em água com açúcar, ou talvez só colocar uma luz clara e intensa e esperar que a fotossíntese recupere a alface?

19-14 A condutividade hidráulica de um único canal de água é de $4{,}4 \times 10^{-22}$ m^3 por segundo por MPa (megapascal) de pressão. A que isso corresponde em termos de moléculas de água por segundo a pressão atmosférica? (A pressão atmosférica é 0,1 MPa [1 bar] e a concentração da água é 55,5 M.)

REFERÊNCIAS

Gerais

Beckerle M (ed) (2002) Cell Adhesion. Oxford: Oxford University Press.
Kreis T & Vale R (ed) (1999) Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
Miner JH (ed) (2005) Extracellular Matrix in Development and Disease (Advances in Developmental Biology, Vol 15). Elsevier Science.

Caderinas e adesão célula-célula

Garrod DR, Merritt AJ & Nie Z (2002) Desmosomal cadherins. *CurrOpin Cell Biol* 14:537–545.
Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:622–634.
King N, Hittinger CT & Carroll SB (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301:361–363.
Kowalczyk AP & Reynolds AB (2004) Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 16:522–527.
Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.
Pokutta S & Weis WI (2007) Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu RevCell Dev Biol*. in press.
Rosen SD (2004) Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22:129–156.
Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R & Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657–669.
Shapiro L, Love J & Colman DR (2007) Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci* 30:451–474.
Sheng M & Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823–847.
Takeichi M (2007) The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Rev Neurosci* 8:11–20.
Vestweber D (2002) Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14:587–593.
Yamagata M, Sanes JR & Weiner JA (2003) Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:621–632.
Yang J, Mani SA, Donaher JL et al (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927–939.

Junções compactas e a organização do epitélio

Furuse M, Hata M, Furuse K et al (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099–1111.
Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K et al (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939–945.
Henrique D & Schweisguth F (2003) Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *CurrOpin Genet Dev* 13:341–350.
Nelson WJ (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422:766–774.
O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL et al (2001) Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nature Cell Biol* 3:831–838.
Seifert JR & Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Rev Genet* 8:126–138.
Shin K, Fogg VC & Margolis B (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207–236.

Passagem de célula para célula: junções tipo fenda e plasmodesmata

Cilia ML & Jackson D (2004) Plasmodesmata form and function. *CurrOpin Cell Biol* 16:500–506.
Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR et al (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503–507.
Goodenough DA & Paul DL (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:285–294.
Segretain D & Falk MM (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662:3–21.
Wei CJ, Xu X & Lo CW (2004) Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu RevCell Dev Biol* 20:811–838.

A lâmina basal

Miner JH & Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255–284.
Sanes JR. (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278:12601–12604.
Sasaki T, Fassler R & Hohenester E (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164:959–963.
Yurchenco PD, Amenta PS & Patton BL (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22:521–538.

Integrinas e adesão célula-matriz

Galbraith CG, Yamada KM & Sheetz MP (2002) The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* 159:695–705.
Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673–687.
Luo BH & Springer TA (2006) Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18:579–586.
Nayal A, Webb DJ & Horwitz AF (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16:94–98.
Vogel V & Sheetz M (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7:265–275.

A matriz extracelular dos tecidos conectivos animais

Aszodi A, Legate KR, Nakchbandi I & Fassler R (2006) What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:591–621.
Bulow HE & Hobert O (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:375–407.
Couchman JR (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Rev Mol Cell Biol* 4:926–937.
Hotary KB, Allen ED, Brooks PC et al (2003) Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114:33–45.
Kielty CM, Sherratt MJ & Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* 115:2817–2828.
Larsen M, Artym VV, Green JA & Yamada KM (2006) The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18:463–471.
Lin X (2004) Functions ofheparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131:6009–6021.
Mott JD & Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558–564.
Prockop DJ & Kivirikko KI (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403–434.
Toole BP (2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12:79–87.

A parede celular das plantas

Carpita NC & McCann M (2000) The Cell Wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants (Buchanan BB,Gruissem W & Jones RL eds), pp 52–108. Rockville, MD: ASPB.
Carpita NC, Campbell M & Tierney M (eds) (2001) Plant cell walls. *Plant Mol Biol* 47:1–340. (special issue)
Dhugga KS (2001) Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr Opin Plant Biol* 4:488–493.
McCann MC & Roberts K (1991) Architecture of the primary cell wall. In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form (Lloyd CW ed), pp 109–129. London: Academic Press.
Smith LG & Oppenheimer DG (2005) Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annu RevCell Dev Biol* 21:271–295.
Somerville C (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53–78.

Câncer

20

Cerca de um quinto da espécie humana perecerá de câncer, porém esta não é a razão de dedicarmos um capítulo inteiro desta edição à doença. As células cancerosas violam as regras mais básicas de comportamento pelas quais os organismos multicelulares são construídos e mantidos, e exploram todos os tipos de oportunidades para fazê-lo. No estudo destas transgressões, vamos descobrir quais são as regras normais e como elas são mantidas. Assim, no contexto da biologia celular, o câncer tem uma importância ímpar. A ênfase dada a sua pesquisa tem beneficiado profundamente uma ampla área do conhecimento médico, que vai além da área do câncer.

As tentativas de combater o câncer levaram a muitas descobertas fundamentais na biologia celular. Muitas proteínas foram descritas a partir de anomalias observadas nas suas funções que levam sempre à proliferação descontrolada, ao aumento na divisão, à diminuição da morte ou a outras características aberrantes das células cancerosas. Dentre as proteínas descritas estão aquelas envolvidas no reparo do DNA (Capítulo 5), na sinalização celular (Capítulo 15), no ciclo e no crescimento celular (Capítulo 17), na morte celular programada (apoptose, Capítulo 18) e na arquitetura tecidual (Capítulo 19).

Neste capítulo, será examinada a natureza do câncer pela descrição da sua história natural sob o ponto de vista celular. A seguir, serão discutidas as alterações moleculares que fazem com que uma célula seja cancerosa e, por fim, como o conhecimento crescente das bases moleculares do câncer está levando ao aperfeiçoamento dos métodos de prevenção e tratamento da doença.

Neste capítulo

CÂNCER COMO UM PROCESSO MICROEVOLUTIVO 1205

CAUSAS EVITÁVEIS DO CÂNCER 1224

DESCOBRINDO OS GENES CRÍTICOS PARA O CÂNCER 1230

AS BASES MOLECULARES DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS CANCEROSAS 1241

TRATAMENTO DO CÂNCER: PRESENTE E FUTURO 1256

CÂNCER COMO UM PROCESSO MICROEVOLUTIVO

O corpo animal funciona como uma sociedade ou um ecossistema cujos integrantes são as células, que se reproduzem por divisão celular e organizam-se em conjuntos que colaboram entre si (os tecidos). A sociedade tecidual, no entanto, é muito peculiar, dado que o autossacrifício, em contraposição à sobrevivência do mais forte, é a regra. Essencialmente, todas as células das linhagens somáticas estão determinadas a morrer. Elas não deixam descendentes e a sua existência é dedicada a manter as células germinativas, as únicas com chance de sobrevivência (discutido no Capítulo 21). Não há mistério algum nisso, pois o corpo é um clone derivado de um óvulo fertilizado, e o genoma das células somáticas é o mesmo das células germinativas que originam os espermatozoides e os óvulos. Graças a essa autoimolação em benefício das células germinativas, as células somáticas contribuem para a propagação das cópias de seus próprios genes.

Assim, ao contrário de células de vida livre, como as bactérias, que competem pela sobrevivência, as células de um organismo multicelular têm o compromisso de colaborar entre si. Para coordenarem este comportamento, as células enviam, recebem e interpretam um conjunto sofisticado de sinais que servem como *controles sociais,* que ditam a cada uma como devem atuar (discutido no Capítulo 15). Disso resulta que cada célula comporta-se de uma maneira socialmente correta, repousando, dividindo-se, diferenciando-se ou morrendo, quando necessário, para o bem-estar do organismo. As alterações moleculares que perturbam essa harmonia são problemáticas para a sociedade multicelular. No corpo humano com mais de 10^{14} células, bilhões de células sofrem mutações que podem romper o controle social. Mais perigoso ainda, uma mutação pode dar certa vantagem seletiva a uma célula, possibilitando que ela cresça e se divida mais vigorosamente e sobreviva mais facilmente que suas vizinhas, vindo a se tornar a fundadora de um clone mutante que passe a crescer

fora do contexto. Uma mutação que leve um dos indivíduos que participam da cooperação a ter este tipo de comportamento egoísta pode comprometer o futuro de todo o conjunto. Com o tempo, os ciclos repetidos de mutação, de competição e de seleção natural, operando dentro de uma população de células somáticas, podem evoluir de uma situação não muito boa para uma pior. Esses são os ingredientes básicos do câncer: uma doença na qual um clone individual mutado passa a prosperar às custas das células vizinhas e, por fim, os descendentes de tal clone levam à completa destruição da sociedade celular.

Nesta seção, será discutido o desenvolvimento do câncer como um processo microevolutivo. Esse processo, em uma subpopulação de células do corpo, ocorre em uma escala de tempo de anos ou décadas. Porém, o resultado final depende dos mesmos princípios de mutação e seleção natural que governam a evolução dos organismos vivos há bilhões de anos.

As células cancerosas reproduzem-se desenfreadamente e colonizam outros tecidos

As células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: (1) reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e (2) invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células. É a combinação dessas duas atividades que faz com que o câncer seja particularmente perigoso. Uma célula anormal que cresce (aumenta de massa) e prolifera (divide-se) fora de controle dará origem a um tumor, ou *neoplasia* – literalmente, crescimento novo. Entretanto, desde que as células neoplásicas não se tornem invasivas, o tumor é considerado **benigno**. Normalmente, neste estágio, é possível haver remissão completa pela destruição ou remoção cirúrgica da massa tecidual localizada. Um tumor é considerado um câncer apenas se for **maligno**, ou seja, se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir tecidos adjacentes. A invasividade é uma característica das células cancerosas que permite à célula maligna se desprender do tecido, penetrar a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos e formar tumores secundários, denominados **metástases**, em outros locais do corpo (**Figura 20-1**). Quanto mais um tumor se dispersar, mais difícil será erradicá-lo, e em geral são as metástases que matam o paciente.

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os cânceres derivados de células epiteliais são denominados **carcinomas** e são o tipo de câncer mais comum em humanos. **Sarcomas** são os tumores derivados do tecido conectivo ou de células musculares. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas duas amplas categorias incluem as várias **leucemias** e **linfomas**, derivados de células da linhagem branca ou de suas precursoras (células hematopoiéticas), assim como os cânceres derivados de células do sistema nervoso. A **Figura 20-2** mostra os tipos de câncer mais comuns nos Estados Unidos, suas incidências e as respectivas taxas de mortalidade. Cada uma dessas grandes categorias tem muitas subdivisões, de acordo com os tipos específicos de células, a localização no corpo e a aparência microscópica do tumor.

Paralelamente ao conjunto de nomes para os tumores malignos, existem nomes apropriados para os tumores benignos. Um *adenoma*, por exemplo, é um tumor epitelial benigno com uma estrutura do tipo glandular, e o tipo de tumor maligno correspondente é um *adenocarcinoma* (**Figura 20-3**). Do mesmo modo, um *condrioma* e um *condriossarcoma* são tumores benigno e maligno do tecido cartilaginoso, respectivamente.

A maioria dos cânceres tem características que refletem sua origem. Assim, por exemplo, as células de um *carcinoma de célula basal*, derivadas das células-tronco que originam os queratinócitos, geralmente continuam a sintetizar os filamentos intermediários da citoqueratina, ao passo que as células de um *melanoma*, derivadas das células pigmentosas da pele, geralmente (mas nem sempre) continuam a produzir grânulos de pigmento. Os cânce-

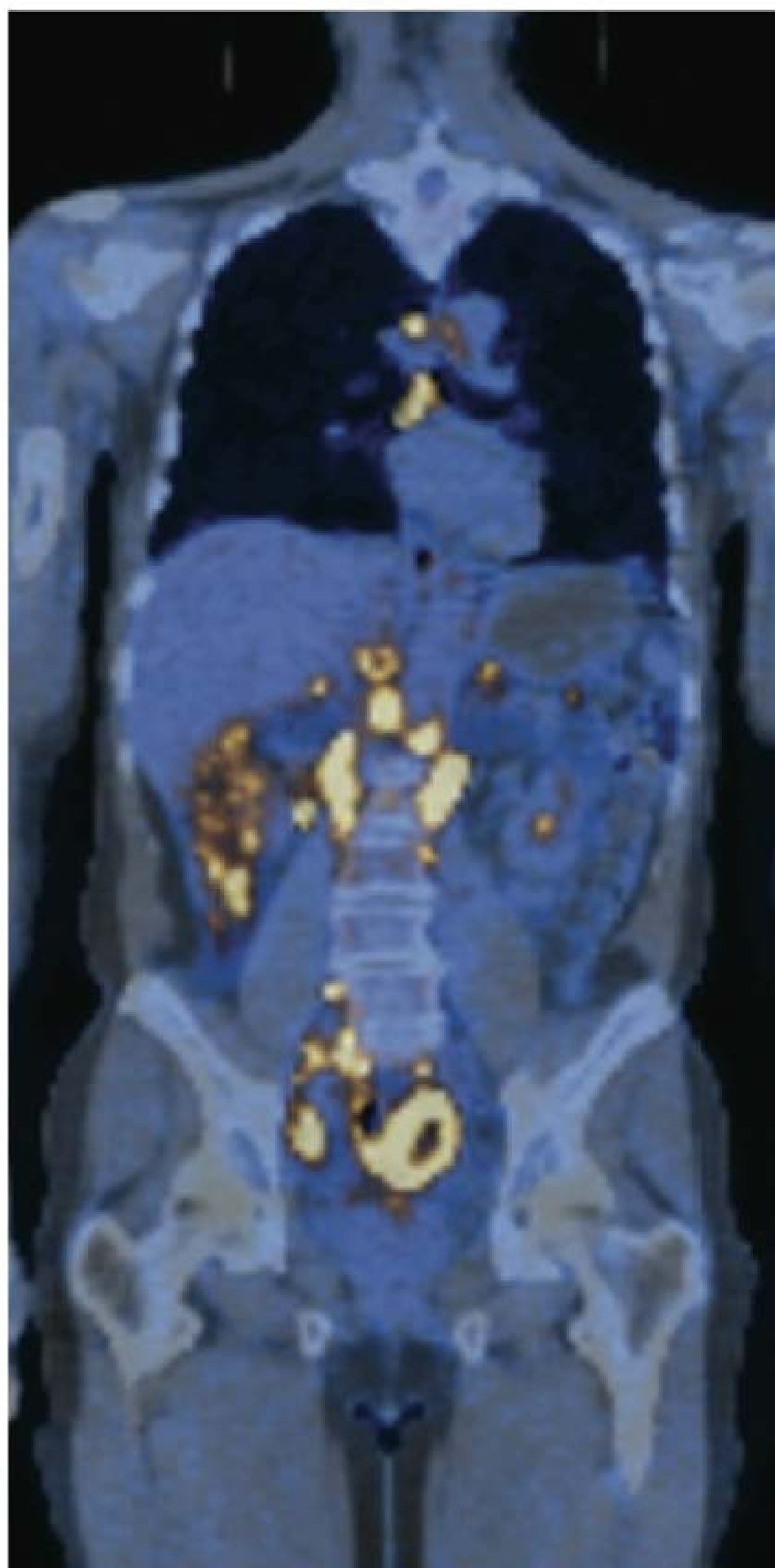


Figura 20-1 Metástase. Tipicamente, os tumores malignos desenvolvem metástases, tornando o câncer difícil de ser erradicado. A imagem composta mostra o corpo de um paciente com um linfoma metastático do tipo não-Hodgkin (NHL, *non-Hodgkings lymphoma*). A imagem de fundo dos tecidos corporais foi obtida por TC (tomografia de raios X computadorizada). Sobreposta a esta, uma imagem obtida por tomografia por emissão de pósitrons (PET, *position emission tomography*) que detecta a entrada de fluorodexosiglicose (FDG) radiativa em vários tecidos revela os tecidos tumorais (*amarelo*). A entrada excessiva de FDG indica células com metabolismo de glicose exacerbado, característica de tumores. Os sinais amarelos na região abdominal revelam metástases múltiplas do linfoma. (Cortesia de S. Gambhir.)

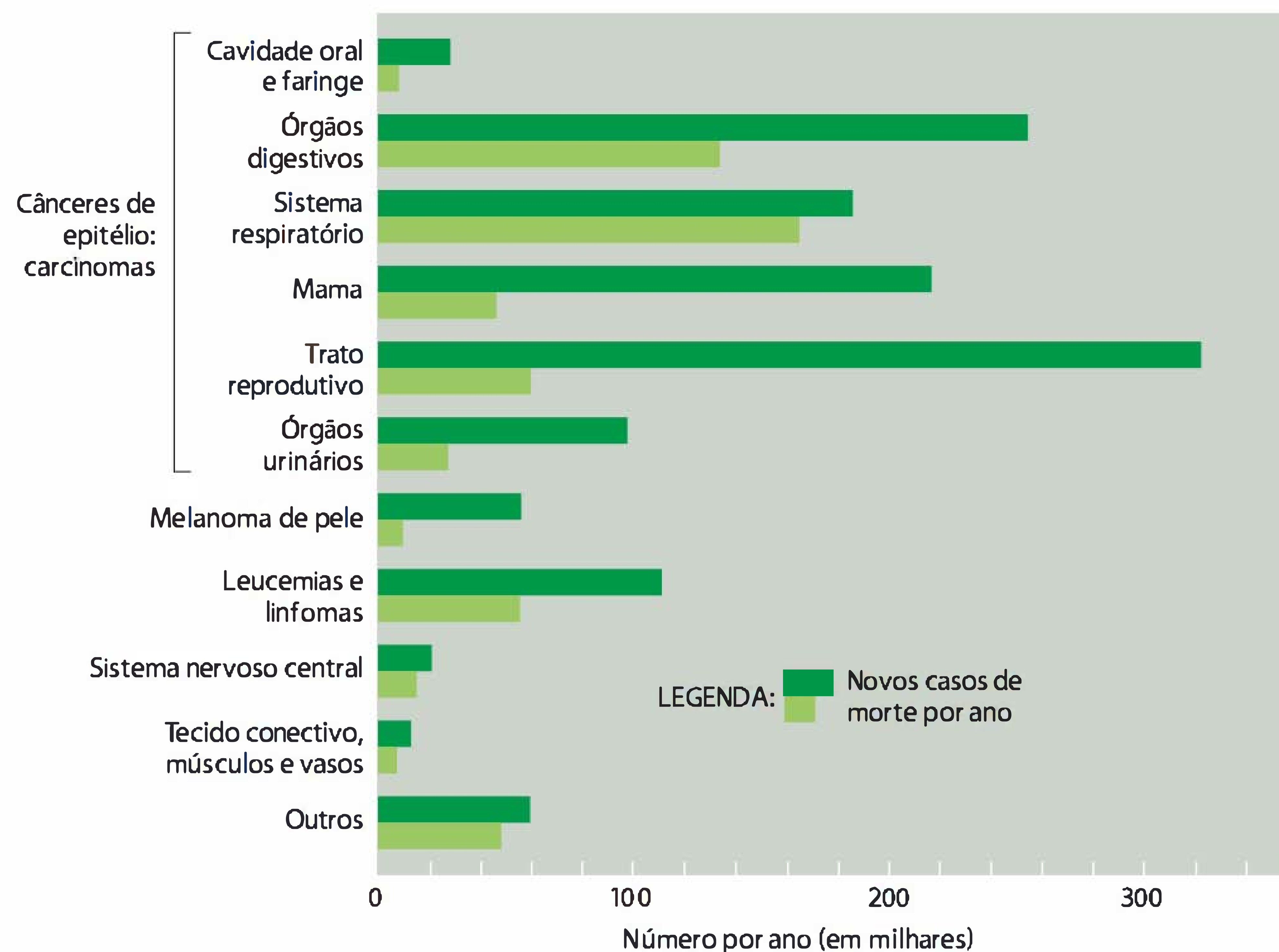


Figura 20-2 Incidência e mortalidade de câncer nos Estados Unidos. O total de novos casos diagnosticados nos Estados Unidos em 2004 foi de 1.368.030, e o total de mortes por câncer foi de 563.700. Note que os óbitos refletem casos diagnosticados em tempos diferentes e que menos da metade das pessoas que desenvolve câncer morre da doença. No mundo todo, os cinco cânceres mais comuns são os de pulmão, de estômago, de mama, colorretal e cérvice uterina (incluídos na figura como câncer do trato reprodutivo). O total de novos casos de câncer registrados por ano é de pouco mais de seis milhões. Os cânceres de pele que não os melanomas não estão incluídos nos dados, porque praticamente todos são curados com facilidade e muitos não são registrados. (Dados da American Cancer Society, Cancer Facts and Figures, 2004.)

res originados de tipos celulares distintos geralmente são doenças muito diferentes. O carcinoma de célula basal, por exemplo, é apenas localmente invasivo e raramente forma metástases, enquanto os melanomas podem tomar-se muito mais malignos e frequentemente produzir metástases (refletindo o comportamento migratório das células normais produtoras de pigmentos durante o desenvolvimento, discutido no Capítulo 22). Os carcinomas de célula basal são prontamente curados por cirurgia ou radiação local, enquanto o melanoma maligno com metástases geralmente é fatal.

Cerca de 80% dos cânceres humanos são carcinomas, possivelmente devido a uma maior proliferação epitelial em adultos ou então porque os tecidos epiteliais são expostos muito mais frequentemente às várias formas de danos causados por agentes físicos e químicos, o que favorece o desenvolvimento do câncer.

Muitos cânceres originam-se de uma única célula anormal

Mesmo após produzir metástase, as origens de um câncer podem ser traçadas até um simples **tumor primário** existente em um órgão específico. Supõe-se que o tumor primário seja derivado da divisão celular de uma única célula que inicialmente sofreu alguma alteração hereditária. Subsequentemente, mudanças adicionais se acumulam em alguns dos descendentes da célula, determinando crescimento e divisão de maneira aberrante e com frequência permitindo que tais células sobrevivam à morte das vizinhas. No primeiro momento em que for detectado, entretanto, um tumor característico já conterá cerca de um ou mais bilhões de células (**Figura 20-4**). Tumores em geral contém uma variedade de outros tipos celulares – fibroblastos, por exemplo, no tecido conectivo de suporte que

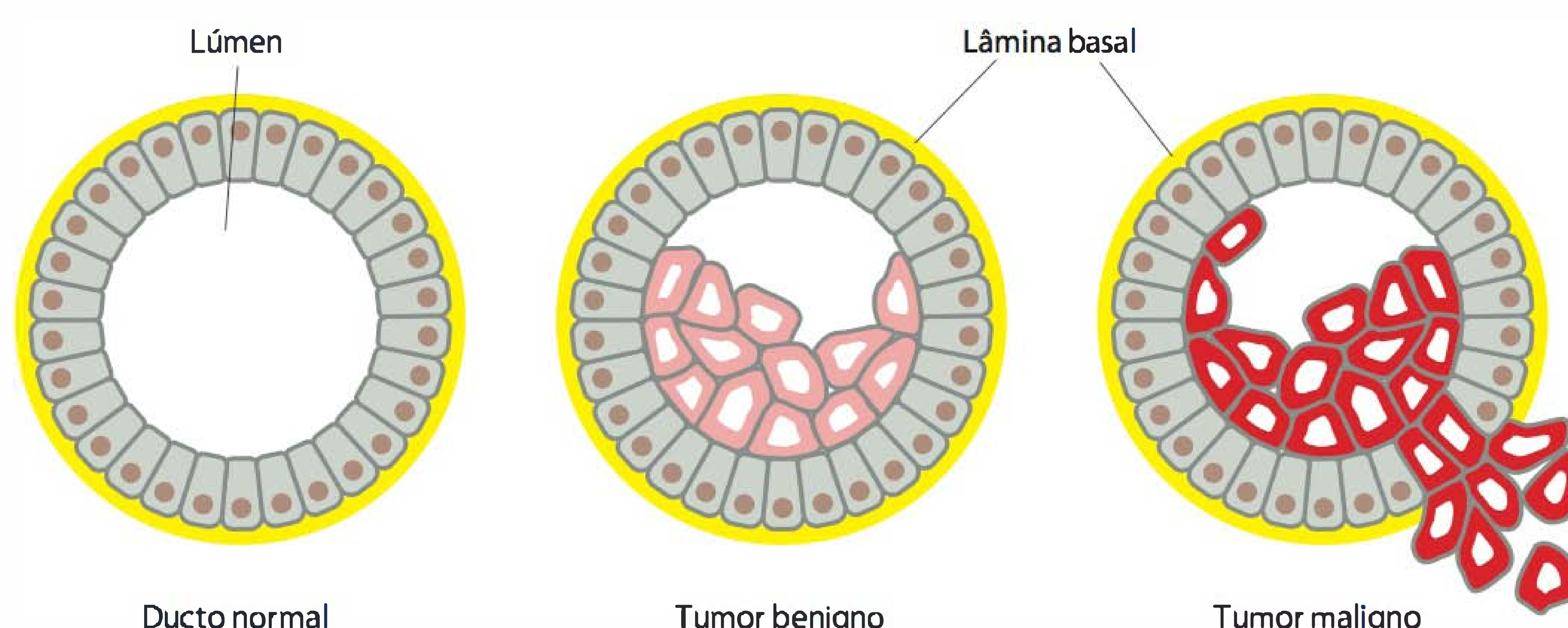


Figura 20-3 Tumores benignos *versus* tumores malignos. Um tumor glandular benigno (adenoma) permanece dentro da lâmina basal que delimita uma estrutura normal (um ducto no exemplo), enquanto que um tumor glandular maligno (adenocarcinoma) destrói a integridade do ducto, como mostrado na figura. São várias as formas que tal tumor pode apresentar.

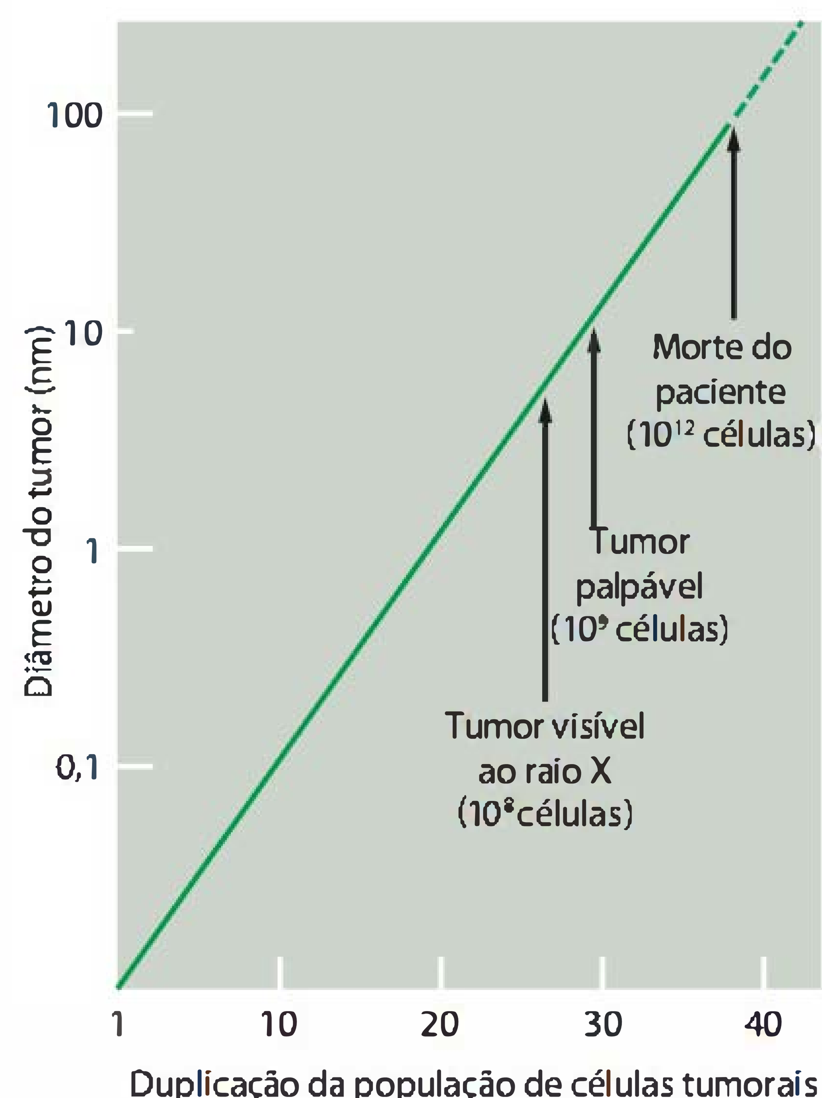


Figura 20-4 Crescimento de um tumor humano típico, como o tumor de mama. O diâmetro de um tumor está representado em um gráfico com escala logarítmica. Podem-se passar anos antes que um tumor seja notado. O tempo de duplicação de um tumor de mama típico, por exemplo, é de cerca de cem dias.

está associado ao carcinoma, assim como a células inflamatórias. Qual é a evidência que se tem de que as células de um câncer sejam realmente um clone que descende de uma única célula anormal?

Uma demonstração clara da evolução clonal baseia-se na análise dos cromossomos das células tumorais. Em praticamente todos os pacientes com *leucemia mieloide crônica* (CML, *chronic myelogenous leukemia*), os glóbulos brancos leucêmicos podem ser distinguidos dos glóbulos normais devido a uma anomalia cromossômica específica: o assim denominado *cromossomo Filadélfia*, criado por uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (**Figura 20-5**). Quando o DNA de um sítio de translocação é clonado e sequenciado, verifica-se que o sítio de quebra e de religação dos fragmentos translocados é idêntico em todas as células leucêmicas de um paciente, apenas diferindo levemente (por somente algumas centenas ou milhares de pares de bases) entre um paciente e outro. Este é o esperado em uma situação na qual cada caso de leucemia origina-se de um único acidente que tenha ocorrido em apenas uma célula. Posteriormente, será visto como esta translocação promove o desenvolvimento de CML pela criação de um gene híbrido novo que codifica para uma proteína que promove a proliferação celular.

Muitas outras linhas de evidência, em uma grande variedade de cânceres, apontam para a mesma conclusão: a maioria dos cânceres origina-se de uma única célula anormal (**Figura 20-6**).

As células cancerosas possuem mutações somáticas

Caso uma única célula anormal origine um tumor, ela deve transmitir essa anormalidade à sua progênie, isto é, a aberração deve ser herdável. Um primeiro problema para a compreensão de um câncer é descobrir se a aberração hereditária é causada por uma alteração genética – isto é, uma alteração na sequência de DNA – ou se ela é causada por uma alteração *epigenética* – isto é, uma alteração no padrão de expressão dos genes sem que haja mudança na sequência de DNA. As alterações epigenéticas, que refletem a memória celular, ocorrem durante o desenvolvimento normal, e são responsáveis pela estabilidade do estado diferenciado e por fenômenos como a inativação do cromossomo X e impressão genômica (discutido no Capítulo 7). Como se discutirá mais tarde, as modificações epigenéticas também participam no desenvolvimento de certos cânceres.

Existem, entretanto, boas razões para se pensar que a maioria dos cânceres inicia-se por alterações genéticas. Primeiro, as células de uma grande variedade de cânceres mostram, em comum, certas anormalidades nas suas sequências de DNA que as distinguem das células normais que cercam o tumor, como no caso da leucemia mieloide crônica, descrita anteriormente, e avanço na análise do DNA identificaram estas falhas genéticas em uma grande proporção de tipos de cânceres, o que concorda com os achados de que muitos agentes que provocam o aparecimento de um câncer também causam mudanças genéticas. Assim, a **carcinogênese** (a geração de um câncer) parece ter relação com a *mutagênese* (produção de alterações na sequência de DNA). Essa relação é bastante clara no caso de três classes de agentes: **carcinógenos químicos** (que tipicamente causam uma alteração simples localizada na sequência de nucleotídeos), *radiação,* como os raios X (que caracteristicamente causam quebras cromossômicas e translocações), ou luz ultravioleta (que causa alterações específicas nas bases do DNA). Tais agentes carcinogênicos serão discutidos em detalhe mais adiante.

A conclusão de que o desenvolvimento de um câncer depende das mutações somáticas é apoiada por estudos realizados com pessoas que herdaram um defeito genético em um dos diversos mecanismos de reparo do DNA, o que permite que suas células acumulem mutações em uma taxa elevada, e deste modo mostram uma forte predisposição para desenvolver câncer. As pessoas com a doença *xeroderma pigmentosa*, por exemplo, têm defeitos nos sistemas celulares de reparo de danos do DNA induzidos por luz ultravioleta e estão sujeitas a uma incidência de câncer de pele extremamente grande.

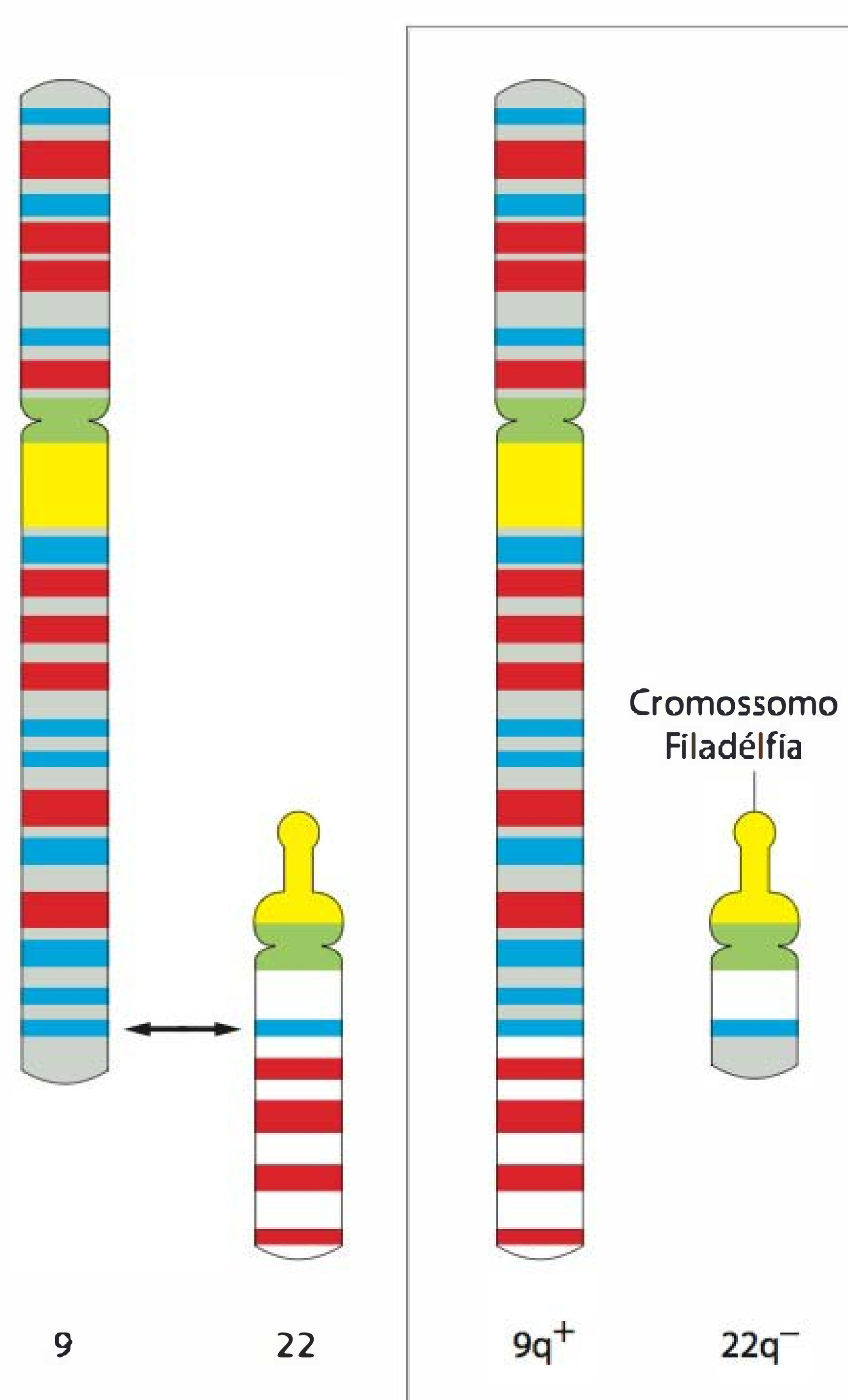


Figura 20-5 A translocação entre os cromossomos 9 e 22, responsáveis pela leucemia mieloide crônica. A estrutura normal dos cromossomos 9 e 22 é mostrada à esquerda. Quando ocorre uma translocação no sítio indicado, o resultado é o par aberrante visto à direita. O menor dos dois cromossomos anormais resultantes (22q–) é denominado cromossomo Filadélfia, com referência à cidade onde a anormalidade foi observada pela primeira vez.

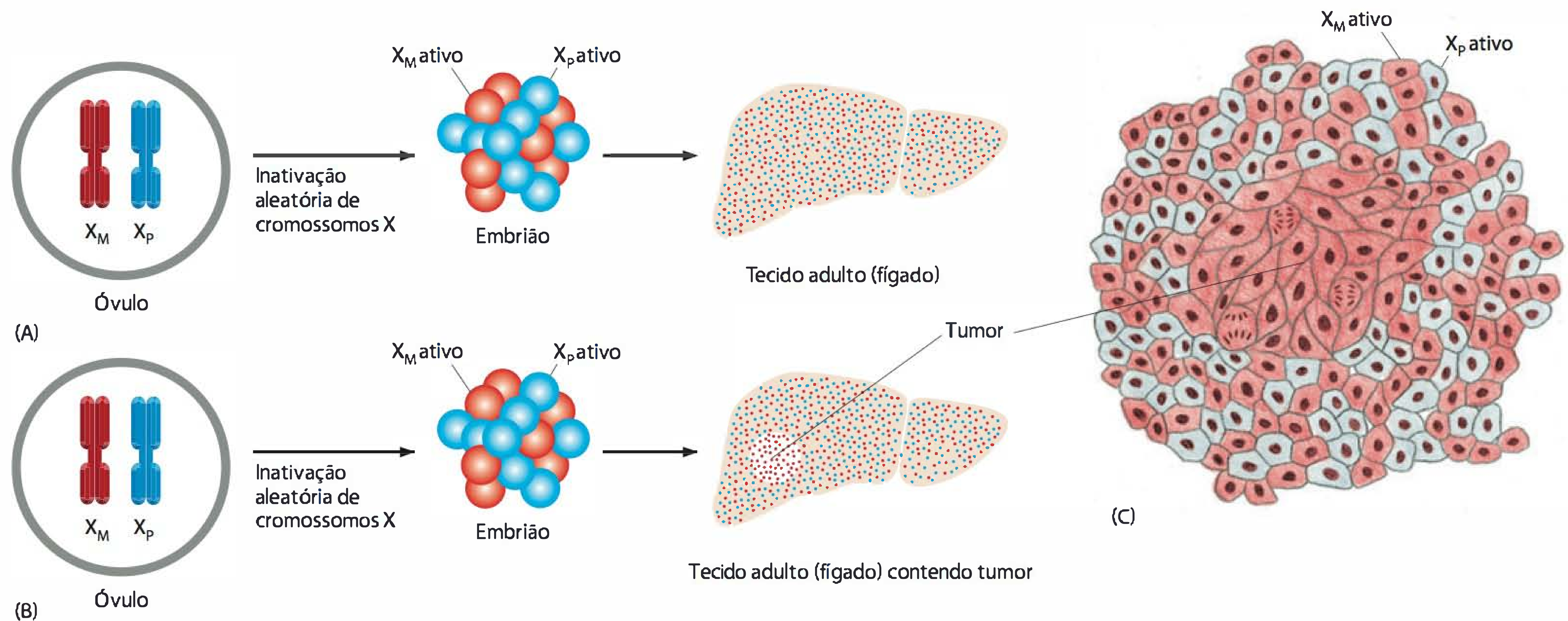


Figura 20-6 As evidências de mosaicos originados pela inativação do cromossomo X demonstram a origem monoclonal dos cânceres. (A) Como resultado de processos aleatórios que ocorrem nos estágios iniciais do embrião, quase todos os tecidos normais de uma mulher são uma mistura de células com diferentes heranças de inativação do cromossomo X (indicado na figura pela mistura de células *vermelhas* e células *azuis em* um tecido normal). (8) Entretanto, quando as células de um câncer são analisadas quanto à expressão de genes marcadores ligados ao X (uma forma específica da enzima G6PD), normalmente verifica-se que todas têm o mesmo cromossomo X inativado, como mostrado em (C). Isso mostra que todas são derivadas de uma única célula cancerosa inicial.

Uma única mutação não é suficiente para causar câncer

Estima-se que durante toda a vida ocorram cerca de 10^{16} divisões celulares em um organismo humano normal; no camundongo, com um número menor de células e uma longevidade menor, esse número é de cerca de 10^{12}. Mesmo em um ambiente isento de agentes mutagênicos, ocorrem mutações espontâneas a uma taxa que é estimada em cerca de 10^{-6} mutações por gene por cada divisão celular, isso devido às limitações intrínsecas da acuidade da replicação e do reparo do DNA. Assim, durante o tempo de vida de cada ser humano, cada um de seus genes deve sofrer mutações em cerca de 10^{10} ocasiões independentes, ou cerca de 10^{6} ocasiões no camundongo. Entre as células mutantes que são produzidas, estima-se que um grande número delas tenha mutações deletérias em genes que regulam o crescimento e a divisão celular, fazendo com que as células desobedeçam as restrições normais à proliferação celular. Sob este ponto de vista, parece que o problema não é saber por que o câncer ocorre, mas por que ele é tão pouco frequente.

Evidentemente, se apenas uma única mutação fosse suficiente para converter uma célula saudável em uma célula cancerosa que prolifera sem nenhuma restrição, não seríamos organismos viáveis. Evidências indicam que a gênese de um câncer típico necessita que vários acidentes raros e independentes uns dos outros ocorram na linhagem de uma célula. Uma das evidências vem de estudos epidemiológicos sobre a incidência de câncer em função da idade (**Figura 20-7**). Se o responsável fosse uma única mutação que ocorresse com a probabilidade de uma vez por ano, a chance de desenvolver câncer em um determinado ano não dependeria da idade da pessoa. Na realidade, no caso de muitos tipos de câncer, a incidência aumenta gradativamente com a idade, o que corresponde ao esperado para o caso de o câncer ser causado pelo acúmulo lento de um grande número de mutações aleatórias em determinada linhagem celular.

Atualmente, uma vez que um grande número de mutações específicas responsáveis por cânceres já foi identificado, a presença dessas mutações pode ser testada diretamente no genoma de um tipo particular de célula cancerosa. Os testes deste tipo têm revelado que toda célula maligna tem mutações múltiplas. Os modelos animais também confirmam que apenas uma única alteração genética é insuficiente para causar um câncer: quando uma mutação que sabemos *a priori* ser causadora de câncer é introduzida por engenharia gené-

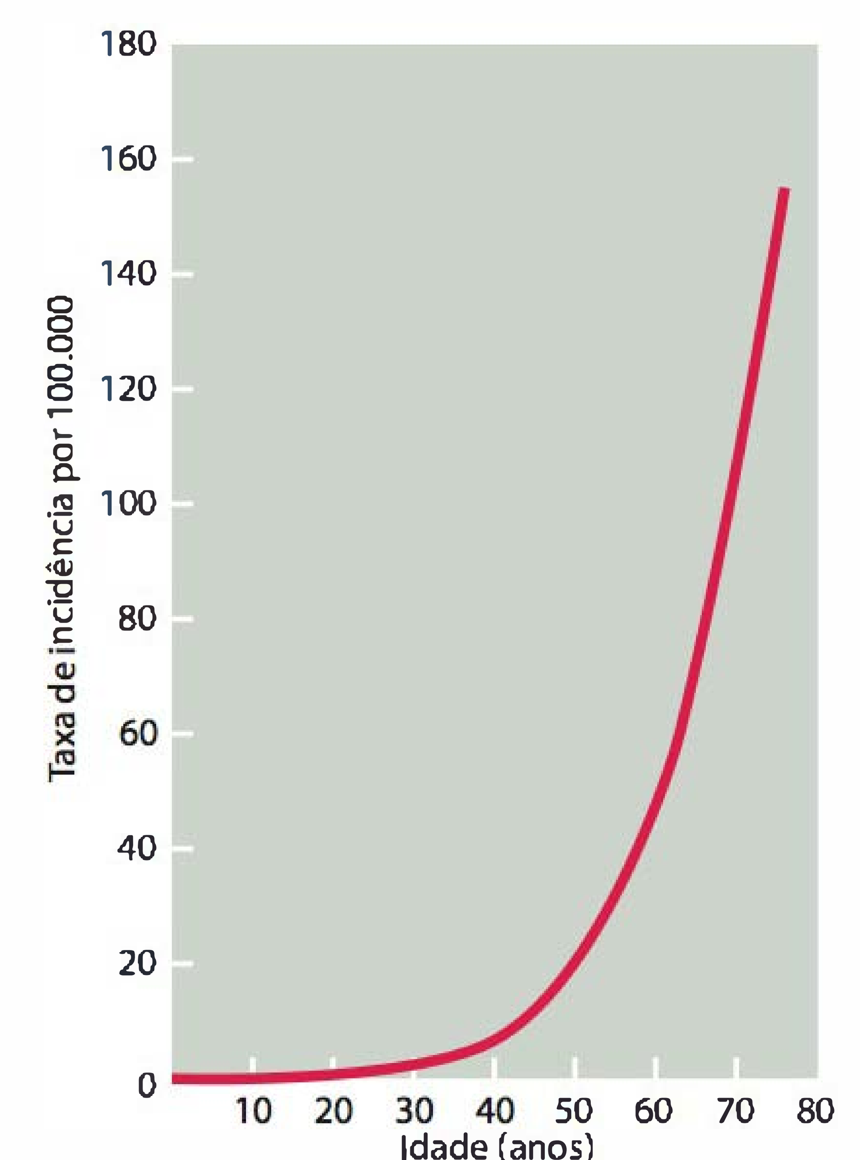


Figura 20-7 Incidência de câncer em função da idade. O número de novos casos diagnosticados de câncer de cólon em mulheres na Inglaterra e no País de Gales em um ano está plotado em função da idade ao diagnóstico e expresso com relação ao número total de indivíduos em cada faixa etária. A incidência de câncer aumenta acentuadamente em função da idade. Se apenas uma única mutação fosse necessária para desencadear o câncer, e esta mutação tivesse uma mesma chance de ocorrer a qualquer momento, a incidência ocorreria independentemente da idade. (Dados de C. Muir et al., Cancer Incidence in Five Continents, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.)

tica em camundongos, a doença somente aparece após meses e surge apenas em algumas células do organismo, o que implica que outros eventos genéticos são necessários ao desenvolvimento do câncer.

Por outro lado, camundongos transgênicos com mutações introduzidas em mais de um gene crítico para o câncer desenvolvem câncer mais rapidamente do que aqueles com uma única mutação, demonstrando que eventos genéticos múltiplos em uma célula podem cooperar entre si para promover o crescimento da célula cancerosa e o desenvolvimento do tumor.

Cânceres se desenvolvem gradualmente pelo aumento de células aberrantes

No caso dos cânceres que têm uma causa externa identificada, a doença geralmente não é aparente até que tenha ocorrido um longo tempo após a exposição ao agente causal. A incidência do câncer de pulmão não inicia seu crescimento gradativo antes de 20 anos de tabagismo intenso. De maneira semelhante, a incidência de leucemias em Hiroshima e Nagasaki não apresentou crescimento acentuado até que se passassem cinco anos das explosões das bombas atômicas. Operários industriais expostos a carcinógenos químicos por apenas um período de tempo limitado geralmente não desenvolvem cânceres característicos de suas atividades a menos que tenham-se passado 10, 20, ou mesmo mais anos, após a exposição (**Figura 20-8**). Durante esse longo tempo de incubação, as futuras células cancerosas sofrem uma sucessão de mudanças genéticas e epigenéticas. O mesmo se aplica aos cânceres nos quais a lesão genética inicial não tem uma causa externa definida.

O conceito que postula que o desenvolvimento de um câncer requer um acúmulo gradual de mutações em um número de genes diferentes – diferentes para cânceres diferentes, porém em geral em número de pelo menos cinco – ajuda a explicar o fenômeno bem conhecido da **progressão do tumor**, onde uma desordem inicial pouco severa no comportamento celular evolui para um câncer com todas as suas consequências. A leucemia mieloide crônica é um exemplo claro. Esta doença começa como uma desordem caracterizada pela superprodução não-letal de células brancas, e assim continua ao longo dos anos antes de mudar para uma doença que progride mais rapidamente e, de modo geral, termina em óbito em poucos meses. Na fase crônica precoce, as células leucêmicas no corpo são identificadas principalmente pela presença de uma translocação cromossômica (o cromossomo Filadélfia) mencionada anteriormente, apesar de poderem existir outras alterações genéticas ou epigenéticas menos visíveis. Na fase aguda subsequente, células que apresentam translocações e também outras aberrações cromossômicas suplantam o sistema hematopoiético. Isto está de acordo com a suposição de que os membros do clone mutante inicial sofrem mais mutações, as quais determinam que eles proliferem com mais rapidez, de modo a suplantar o número de células normais do sangue e também a célula ancestral com apenas uma translocação cromossômica primária.

Imagina-se que os carcinomas e outros tumores sólidos evoluam de maneira semelhante. Embora muitos desses cânceres humanos não sejam diagnosticados antes de atingir um estágio relativamente avançado, é possível observar, em alguns casos, as etapas

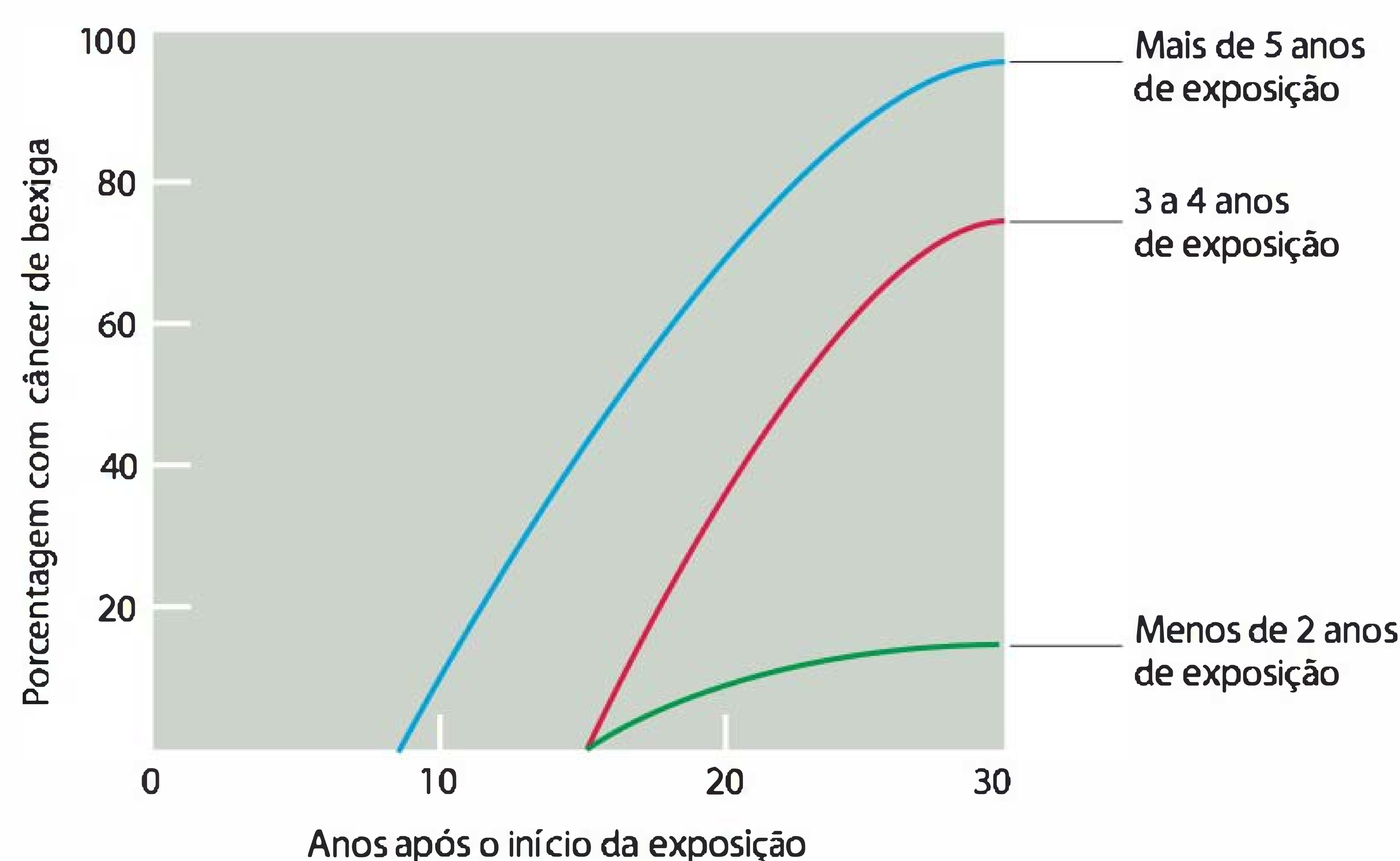


Figura 20-8 Atraso no aparecimento dos sintomas de câncer após a exposição a um carcinógeno. Este gráfico mostra o tempo para o aparecimento dos sintomas de câncer de bexiga em um grupo de 78 operários da indústria química que foram expostos ao carcinógeno 2-naftilamina, agrupados segundo a duração da exposição. (Modificada de J. Cairns: Science and Society. San Francisco: W. H. Freeman, 1978. De acordo com M. H. C. Willians, in Cancer, Vol. III [R.W. Raven, ed.]. London: Butterworth Heinemann, 1958.)

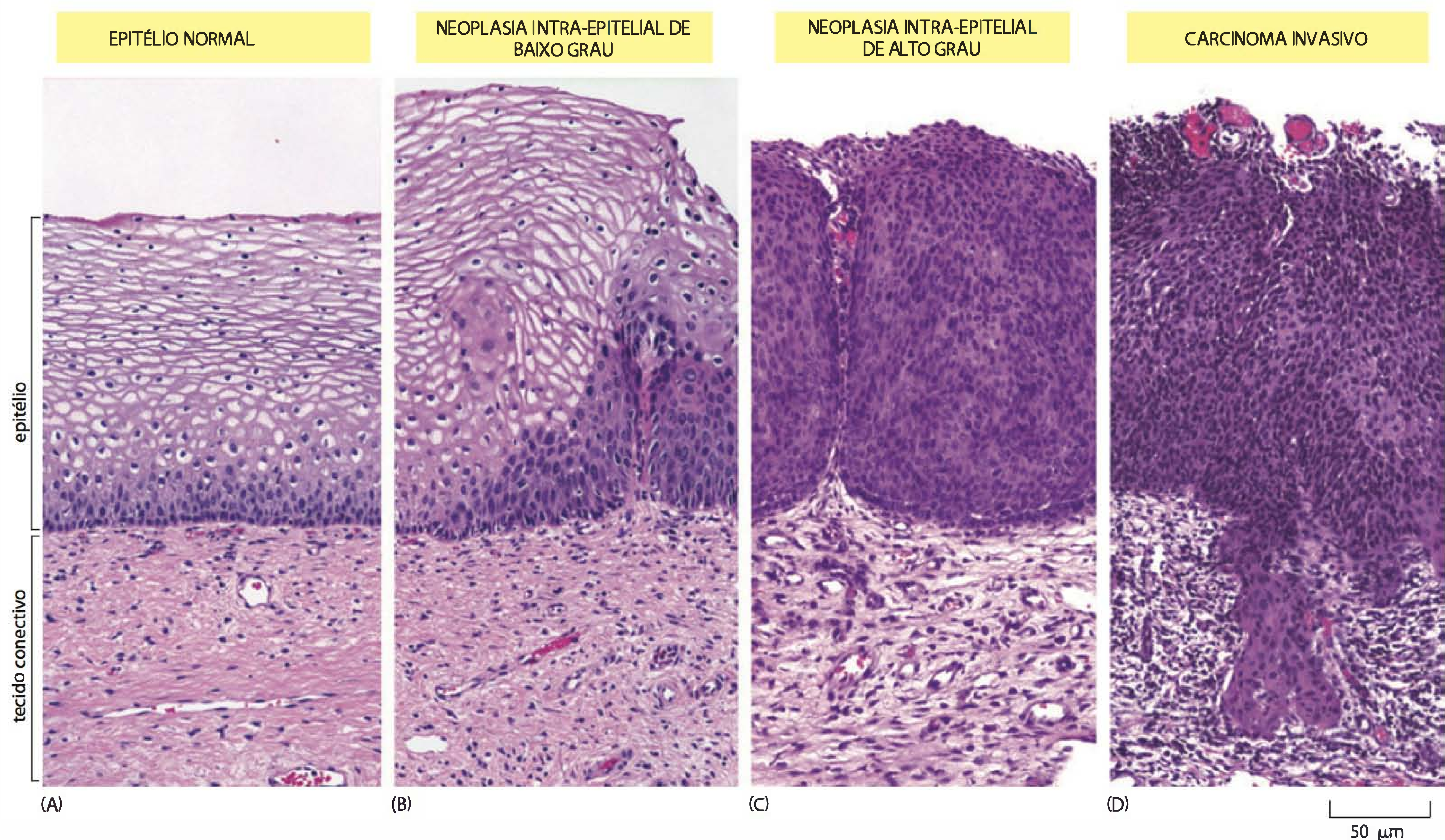


Figura 20-9 Os estágios da progressão no desenvolvimento de câncer do epitélio da cérvice uterina. Os patologistas usam uma terminologia-padrão para classificar os tipos de alterações observados, de modo a guiar a escolha do tratamento. (A) No epitélio escamoso normal estratificado, as células em divisão estão confinadas à lâmina basal. (8) Em uma neoplasia intra-epitelial de baixo grau, as células em divisão podem ser encontradas no terço inferior do epitélio; as células superficiais ainda são achatadas e mostram sinais de diferenciação, mas esta é incompleta. (C) Na neoplasia intra-epitelial de alto grau, as células de todas as camadas epiteliais estão proliferando e não apresentam sinais de diferenciação aberrante. (D) A verdadeira malignidade inicia-se quando as células atravessam ou destroem a lâmina basal do epitélio e invadem o tecido conectivo adjacente. (As fotografias são uma cortesia de Andrew J. Connolly.)

iniciais do desenvolvimento da doença. O câncer da *cérvice uterina* (cólon do útero) é um bom exemplo, devido aos exames rotineiros para presença do câncer realizados por raspagem cervical.

A detecção precoce previne o câncer de cérvice

O epitélio que cobre a cérvice é inicialmente organizado como epitélio escamoso estratificado (várias camadas) (**Figura 20-9**A), que é estruturalmente semelhante à epiderme da pele (ver Figura 23-3). No epitélio estratificado, a proliferação celular normalmente ocorre apenas na camada basal, gerando células que param de se dividir e se movem para a superfície externa, diferenciando-se à medida que se movem para formar células achatadas, ricas em queratina, que eventualmente são descamadas quando alcançam a superfície mais externa. Porém, quando espécimes de epitélio cervical de diferentes mulheres são examinados, é comum encontrar-se segmentos teciduais nos quais este tipo de organização está alterado, o que sugere o início de uma transformação cancerosa. Os patologistas descrevem tais mudanças como *neoplasias intra-epiteliais* e as classificam como de baixo grau (moderado) ou alto grau (de moderado a severo).

Nas lesões de baixo grau, as células indiferenciadas em divisão não são mais confinadas à lâmina basal e começam a ocupar outras camadas do epitélio; apesar de a diferenciação prosseguir nas camadas mais externas, é de uma maneira geral desorganizada (Figura 20-9B). Mesmo sem intervenção, a maioria das lesões moderadas desaparece espontaneamente, porém cerca de 10% progride para um estágio onde tornam-se lesões de alto grau, nas quais camadas epiteliais são, em sua maioria, ocupadas por células indiferenciadas em divisão que as são em geral altamente variáveis em forma e tamanho. Estruturas mitóticas

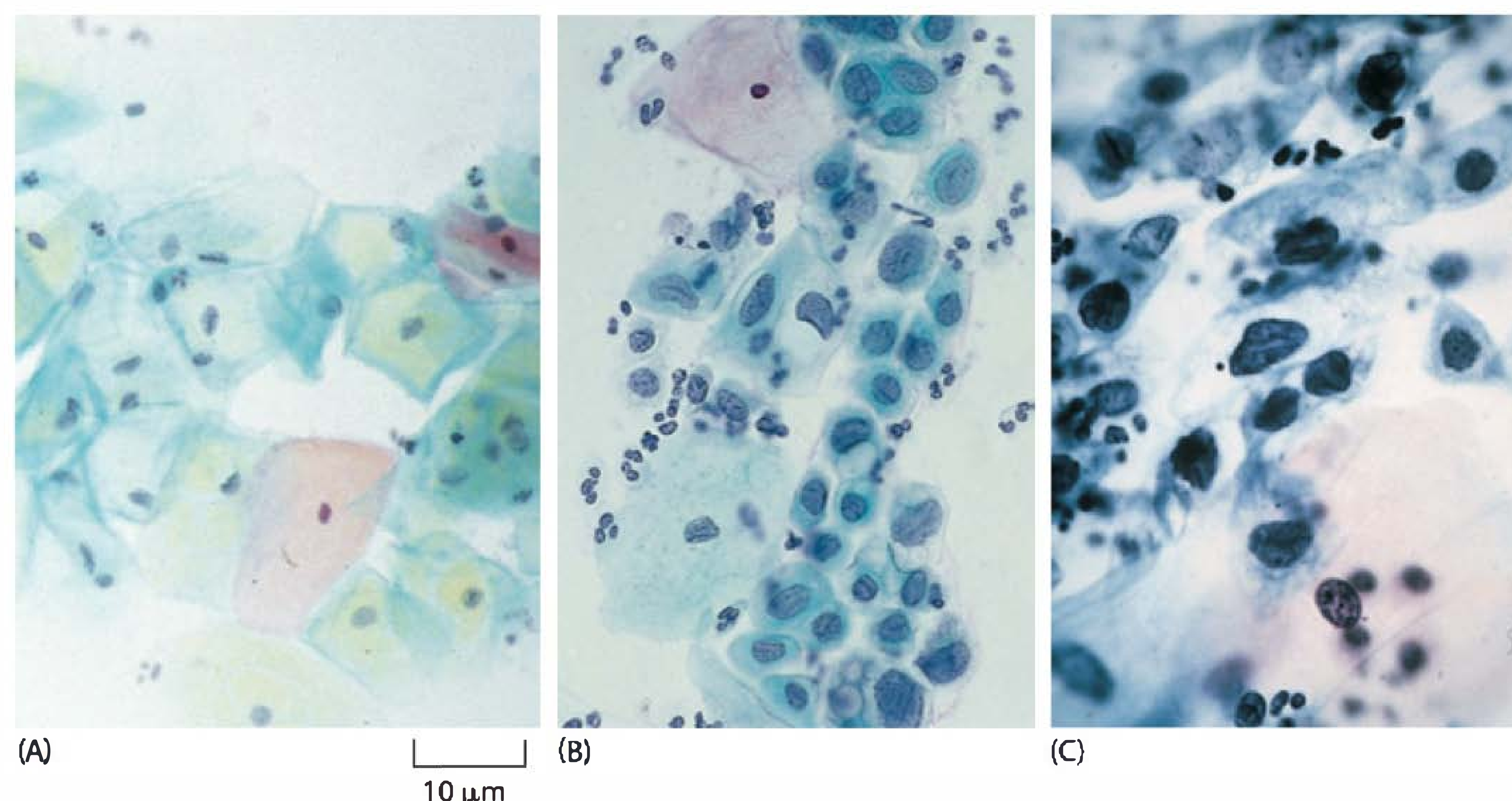


Figura 20-10 Fotografia de células coletadas por raspagem da superfície da cérvice uterina (exame de Papanicolau). (A) Normal: as células são grandes e bem diferenciadas, com o núcleo altamente condensado. (8) Lesões pré-cancerosas: a diferenciação e a proliferação são anormais, porém as lesões ainda não são invasivas; as células estão em vários estágios de diferenciação, algumas bem imaturas. (C) Carcinoma invasivo: as células se mostram indiferenciadas, com o citoplasma reduzido e um núcleo relativamente grande. Nos três painéis, os depósitos vistos na parte posterior das lâminas incluem alguns leucócitos. (Cortesia de Winifred gray.)

anormais são frequentes, e o *cariótipo* (conjunto dos cromossomos) em geral é aberrante. No entanto, as células aberrantes ainda estão confinadas ao lado epitelial da lâmina basal (Figura 20-9C). Nesse estágio, ainda é fácil curar a patologia por remoção cirúrgica ou destruição dessas células por radiação. Felizmente, uma pequena raspagem na superfície da cérvice, seguida por um exame microscópico (exame de Papanicolau – **Figura 20-10**), tem salvo muitas vidas.

Sem tratamento, os segmentos teciduais anormais podem simplesmente persistir sem progressão ou podem regredir de forma espontânea. No entanto, em pelo menos 30 a 40% dos casos, ocorre a progressão, que com o decorrer dos anos dará origem ao carcinoma realmente invasivo (ver Figura 20-9D): as células cancerosas cruzam ou destroem a camada basal, invadem os tecidos adjacentes e chegam ao linfonodo (metástase) via vasos linfáticos. A cura por remoção cirúrgica torna-se mais difícil à medida que o crescimento invasivo se espalha.

A progressão dos tumores envolve sucessivos ciclos de mutação e de seleção natural

Todas as evidências indicam que os cânceres em geral desenvolvem-se por um processo no qual uma população inicial de células levemente anormais, descendentes de uma célula ancestral com uma única mutação, evolui de mal a pior em ciclos sucessivos de mutação e de seleção natural. Em cada estágio, uma célula adquire mais uma mutação ou mudança epigenética que lhe confere uma vantagem seletiva em relação às células vizinhas, tornando-a mais apta a vicejar no ambiente: um ambiente que, dentro do tumor, pode ser inóspito, com baixo nível de oxigênio, escassez de nutrientes e com barreiras naturais ao crescimento antepostas pelo tecido normal adjacente. A descendência dessas células muito bem-adaptadas continuará a dividir-se, chegando a tomar conta do tumor e a tornar-se o clone dominante da lesão em desenvolvimento (**Figura 20-11**). Desse modo, o tumor torna-se mais adaptado, inicia seu crescimento e cresce vigorosamente à medida que surgem mais mutações vantajosas às células que as contêm. A evolução do tumor necessita de uma grande dose de chance e normalmente leva muitos anos. A maioria das pessoas morre de outros males antes que haja tempo para que algum tumor possa se desenvolver.

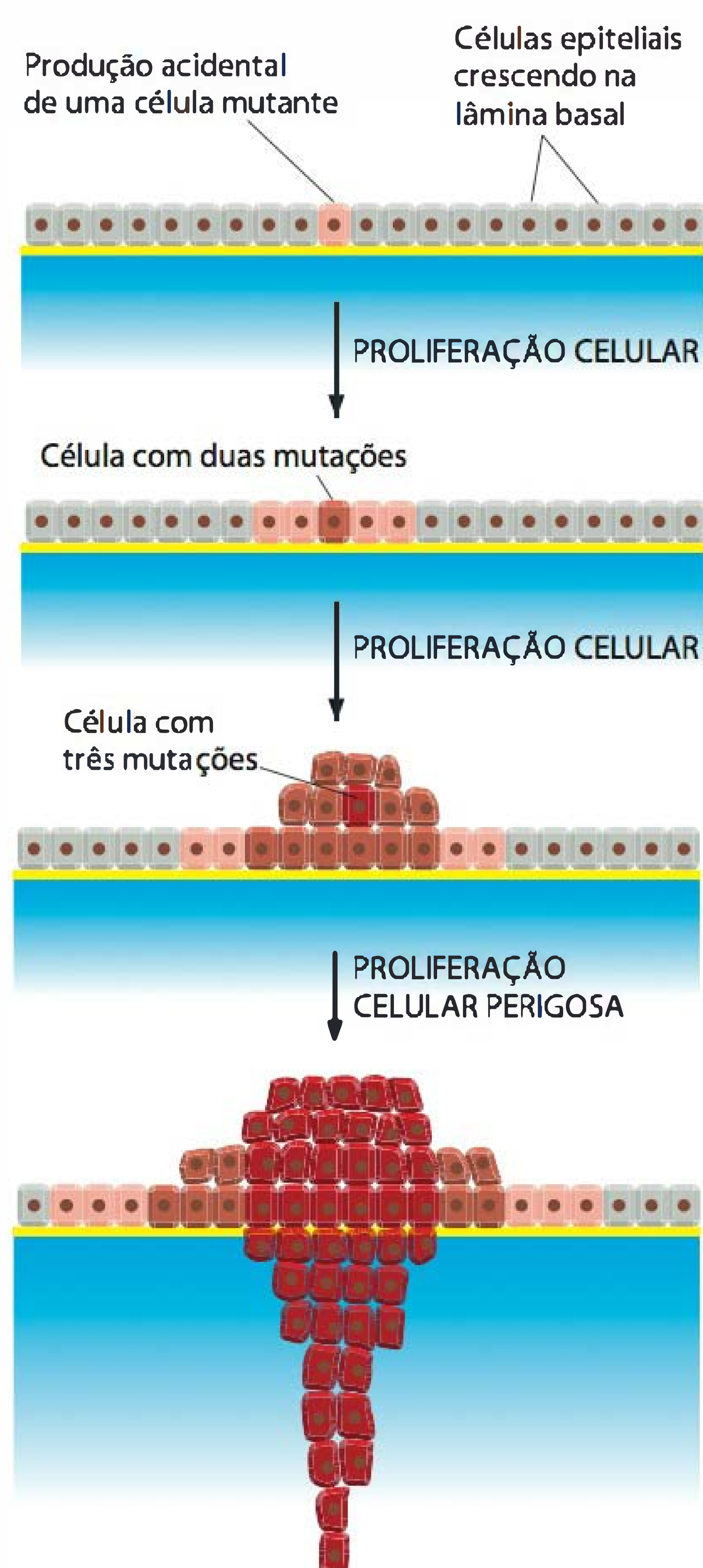


Figura 20-11 Evolução clonal. O diagrama mostra o desenvolvimento tumoral a partir de ciclos repetitivos de mutação e de proliferação, originando um clone de células cancerosas totalmente malignas. Em cada etapa, apenas uma única célula sofre alguma mutação que potencializa a proliferação celular ou diminui a morte celular, de modo que sua progênie torna-se o clone dominante no tumor. A proliferação deste clone, então, acelera a ocorrência da próxima etapa da evolução do tumor pelo aumento no tamanho da população de células que podem sofrer uma nova mutação. A etapa final mostrada no diagrama é a invasão através da membrana basal, etapa inicial da metástase. Na realidade, existem mais etapas do que as mostradas no diagrama, e uma combinação de mudanças genéticas e epigenéticas está envolvida.

Por que há necessidade de tantas mutações? Uma das razões é que os grandes animais desenvolveram conjuntos complexos de mecanismos reguladores para manter suas células sob um rígido controle. Sem os controles múltiplos, erros inevitáveis na manutenção das sequências de DNA produziriam numerosos tumores na vida jovem e rapidamente destruiriam qualquer organismo multicelular. Assim, não é surpresa o fato de as células empregarem mecanismos reguladores múltiplos para manter um controle rígido e preciso sobre seu comportamento. Por isso, um grande número de sistemas reguladores diferentes deve ser perturbado antes que a célula possa perder seus condicionantes normais e tornar-se uma célula cancerosa, por natureza aberrante. Além disso, a cada estágio do processo evolutivo, as células tumorais vão encontrar novas barreiras à sua expansão. Por exemplo, o oxigênio e os nutrientes podem não ser limitantes até o momento em que o tumor atinja um ou dois milímetros de diâmetro, quando então as células situadas no interior do tumor poderão não ter um acesso adequado a esses recursos indispensáveis. As células devem adquirir mutações adicionais ou mudanças epigenéticas (ou ambas) para suplantar cada nova barreira, tanto física quanto fisiológica, que surge.

Geralmente, espera-se que em qualquer população a velocidade de evolução de um tumor dependa de quatro parâmetros principais: (1) a *taxa de mutação*, isto é, a probabilidade, por gene e por unidade de tempo, de um dado membro da população sofrer alteração genética; (2) o *número de indivíduos que se reproduzem* naquela população; (3) a *taxa de reprodução*, isto é, o número médio de gerações de descendentes produzidos por unidade de tempo, e (4) a *vantagem seletiva* que cada indivíduo mutante sucessivo tem, isto é, a razão entre o número de indivíduos férteis sobreviventes na sua descendência por unidade de tempo em relação ao número de descendentes férteis produzido pelos indivíduos não-mutantes. Os mesmos tipos de fatores são cruciais para a evolução de uma célula cancerosa em um organismo multicelular, exceto que ambas as mudanças, genéticas e epigenéticas, ajudam a dirigir o processo evolutivo.

As mudanças epigenéticas que se acumulam nas células cancerosas envolvem a estrutura da cromatina herdada e a metilação do DNA

Como visto anteriormente, a progressão em direção ao câncer difere da evolução biológica normal em um aspecto importante: mudanças epigenéticas também ocorrem e suprem as células de vantagens seletivas.

Por muitos anos, patologistas vêm usando a aparência anormal do núcleo celular para identificar e classificar células cancerosas em biopsias de tumores. Por exemplo, as células cancerosas por vezes contêm uma quantidade anormal de heterocromatina – uma forma condensada de cromatina na interfase que silencia genes (ver p. 238). Agora alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na formação desse tipo de cromatina são entendidos, o que tornou possível a associação da formação da heterocromatina condensada com o silenciamento de genes específicos envolvidos no bloqueio da progressão tumoral.

A formação da heterocromatina e sua manutenção envolvem de maneira específica a modificação covalente de histonas, que por seu turno atrai complexos de proteínas ligadoras de cromatina que são estavelmente mantidas após a replicação do DNA (discutido no Capítulo 4). Assim, genes poderão ser desligados na célula sem que ocorram modificações na sequência do DNA. Tal forma de regulação epigenética do gene tem um papel preponderante em conduzir os padrões ordenados da especialização celular que ocorre durante o desenvolvimento embrionário (discutido no Capítulo 22). Erros que ocorrem no processo são potencialmente perigosos porque podem ser transmitidos à progênie da célula na qual a modificação original ocorreu.

Sabe-se agora que muitas das mutações que tornam uma célula cancerosa alteram as proteínas que determinam a estrutura da cromatina, incluindo as enzimas que modificam as histonas no nucleossomo e também as proteínas do complexo "leitura do código-escrita" que interpretam o código das histonas (ver Figura 4-43). Tais achados trouxeram fortes evidências para a importância das modificações epigenéticas da cromatina na progressão dos tumores.

Durante os processos de desenvolvimento normal, um padrão hereditário de metilação do DNA reforça muitos dos eventos do silenciamento de genes causados pelo empacotamento de genes na heterocromatina (ver p. 467). Análises revelaram que uma grande quantidade de metilação do DNA também ocorre seletivamente em alguns genes durante a progressão tumoral. Em resumo, apesar da descoberta relativamente recente, é aparente que o silenciamento epigenético anormal de genes é tão importante no desenvolvimento da maioria dos cânceres quanto as mutações nas sequências de DNA (**Figura 20-12**).

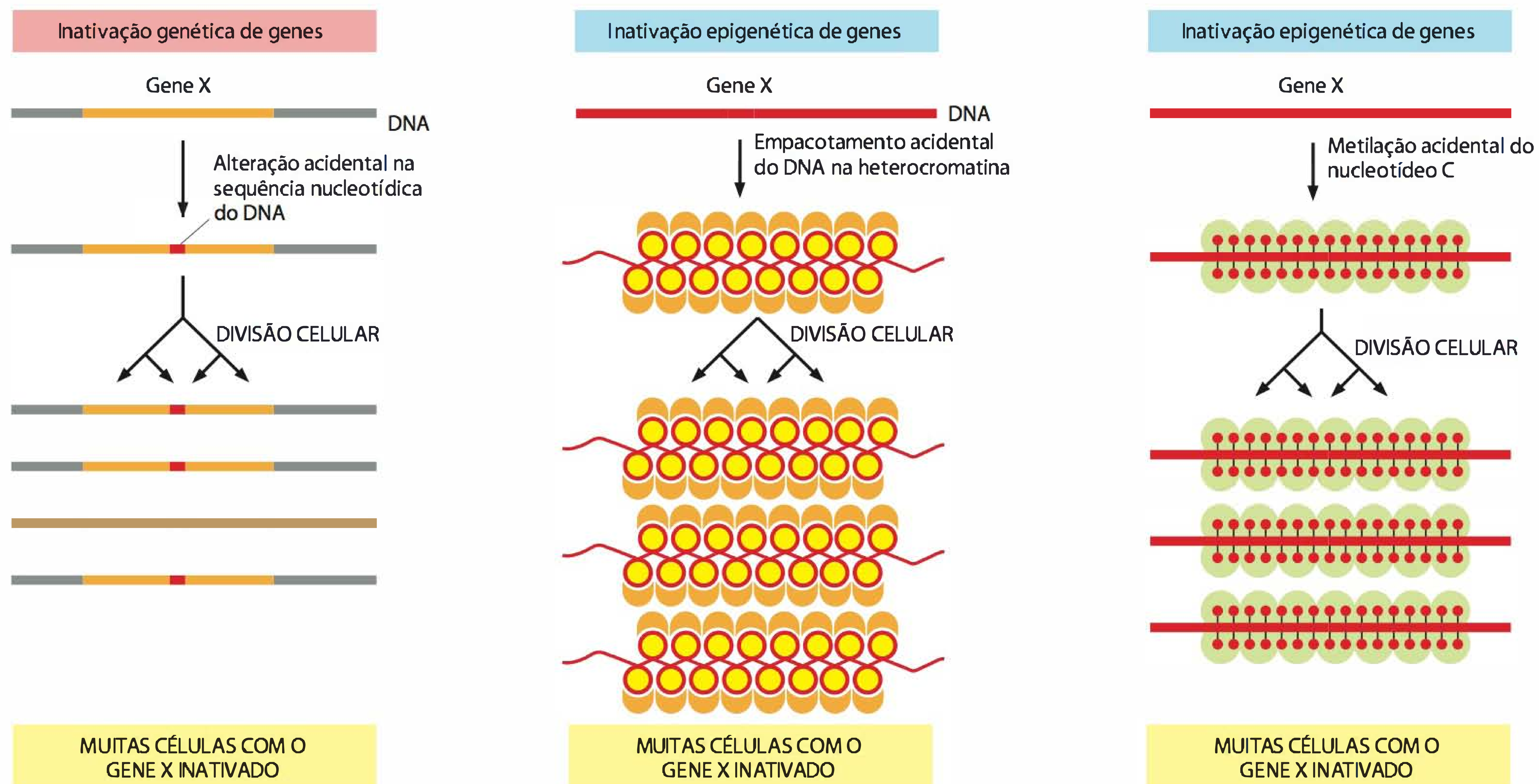


Figura 20-12 Comparações das alterações genéticas e epigenéticas observadas em tumores. A mutação é resultante de uma alteração irreversível na sequência do DNA. Em contraste com tal alteração genética, as alterações epigenéticas têm como base alterações que apesar de transmitidas célula-célula podem ser revertidas por mudanças sítio-específicas na modificação de histonas (via da heterocromatina) ou então na desmetilação sítio-específica do DNA (via da metilação). Como as marcas epigenéticas nos genes normalmente são passíveis de reversão durante a formação do óvulo e também do esperma, elas não são transmitidas entre gerações e por isso não são estudadas extensivamente pelos geneticistas.

Como discutido no Capítulo 7, supõe-se que a metilação do DNA (padrão hereditário de metilação do nucleotídeo C na sequência CpG) é um mecanismo usado para silenciar de maneira mais permanente genes que foram desligados, e a metilação do DNA parece ser um mecanismo de silenciamento que normalmente segue a formação da heterocromatina. Por outro lado, a regulação errônea que se manifesta durante a progressão do tumor talvez produza o silenciamento gênico independentemente da formação da heterocromatina, como ilustrado na figura.

Células cancerosas humanas são geneticamente instáveis

A maioria das células humanas cancerosas acumula alterações genéticas em uma taxa anormalmente rápida: diz-se que as células são **geneticamente instáveis**. Esta instabilidade pode tomar várias formas. Algumas células cancerosas são incapazes de reparar certos tipos de danos no DNA ou de corrigir erros de replicação de vários tipos. Essas células têm a tendência de acumular mais mutações pontuais e maior número de pequenas alterações em sequências localizadas de DNA do que as células normais. Outras células cancerosas falham na manutenção da integridade dos cromossomos; consequentemente, apresentam anomalias grosseiras nos seus cariótipos que são visíveis na mitose (**Figura 20-13**). A instabilidade genética é então amplificada quando algumas das modificações no DNA alteram os mecanismos de controle epigenético de forma a produzir heterocromatina extra e metilação no DNA. Também as mudanças epigenéticas, que surgem de forma acidental e independente a priori das alterações genéticas, podem – a princípio pelo menos – desestabilizar os padrões normais da herança celular, facilitando outras alterações em nível genético ou epigenético. Sob uma perspectiva evolutiva, esses fatos não surpreendem: qualquer coisa que aumente a probabilidade de alterações aleatórias na função gênica que sejam transmissíveis de uma geração celular à outra aumenta a velocidade na evolução de um clone celular em direção à malignidade.

Apesar de as alterações epigenéticas nas células cancerosas não serem ainda esclarecidas com acuidade, as alterações genéticas, no entanto, são melhor entendidas. Diferentes tumores – mesmo que sejam de um mesmo tecido – poderão apresentar diferentes tipos de instabilidades genéticas, causadas por alterações transmissíveis em qualquer dos numerosos *genes de manutenção do DNA* envolvidos na propagação do DNA ou dos cromossomos. É raro para uma pessoa herdar uma mutação em um desses genes, mas aquelas pessoas que herdam uma mutação destas possuem uma incidência aumentada de câncer, confirmando que uma perda da estabilidade genética pode causar câncer. Geralmente, as muta-

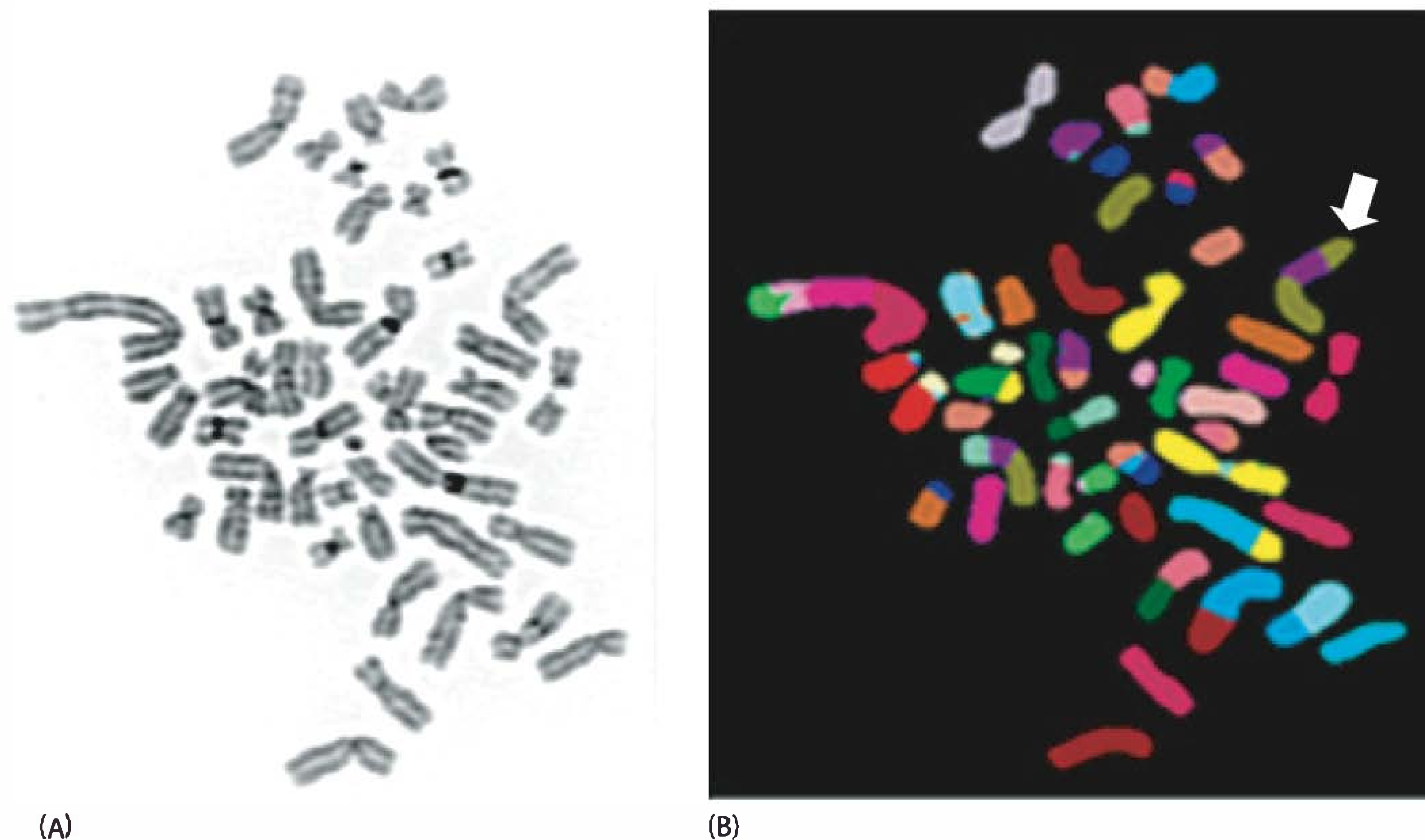


Figura 20-13 Cromossomos de um tumor de mama mostrando anormalidades na estrutura e no número. Cromossomos foram preparados de uma célula de tumor de mama em metáfase, espalhados em uma lâmina de vidro e corados com: (A) um corante para DNA ou (B) uma combinação de corantes fluorescentes que colorem os cromossomos normais de maneira diferente. A coloração (mostrada em cor falsa) mostra múltiplas translocações, incluindo um cromossomo duplamente translocado (*seta branca*) feito de duas porções do cromossomo 8 (*marrom*) e uma porção do cromossomo 17 (*violeta*). O cariótipo também contém 48 cromossomos, em vez dos 46 (número normal). (Cortesia de Joanne Davidson e Paul Edwards.)

ções desestabilizadoras não são herdadas, mas aparecem *de novo* à medida que o tumor se desenvolve, fazendo com que a célula cancerosa acumule mutações mais rapidamente do que suas vizinhas. Trabalhos recentes mostram que células em uma variedade de cânceres humanos experimentam substituição de um nucleotídeo em uma taxa que é 10 a 20 vezes maior do que em células normais. O resultado do sequenciamento de mais de 10.000 genes em cânceres de mama e colorretal mostrou que as células cancerosas acumularam muitas mutações, o que permitiu a troca de um aminoácido na proteína de aproximadamente 100 genes. Em sua maioria, as alterações são aleatórias e afetam diferentes genes em tumores diferentes. No entanto, uma subclasse de genes é encontrada repetidamente mutada em determinado tipo de câncer, sugerindo que alterações em pelo menos 20 genes são necessárias para promover a progressão tumoral.

A instabilidade genética por si só não fornece à célula uma vantagem seletiva. Ao que parece, de alguma maneira existe um nível ótimo de instabilidade genética para o desenvolvimento do câncer, fazendo com que a célula acumule mutações suficientes para desenvolver-se rapidamente, mas não com um acúmulo exagerado que leve a célula à morte. Assim, para ser favorecida pela seleção natural, uma célula geneticamente instável deve adquirir propriedades que confiram a ela alguma vantagem competitiva.

O crescimento do câncer depende de um controle deficiente da morte celular, da diferenciação celular, ou de ambos

Tanto um aumento na taxa de mutação por célula quanto qualquer circunstância que aumente o número de células em proliferação capazes de mutar pode aumentar a probabilidade de câncer. Pessoas clinicamente obesas, por exemplo, têm um risco fortemente aumentado para desenvolver muitos tipos de câncer, em comparação a pessoas de peso normal; tal fato é presumivelmente devido, pelo menos em parte, a um aumento de células no corpo e à taxa pela qual as células se dividem quando sobrealimentadas ou sobrestimuladas por fatores de crescimento. O mesmo princípio se aplica tanto para o começo de um câncer quanto para sua progressão: quanto maior o clone de células alteradas resultantes de uma alteração precoce transmissível, maior a chance de pelo menos uma das células do clone passar por uma nova mutação ou alteração epigenética, o que permitirá ao câncer progredir. Assim, em cada estágio do desenvolvimento do câncer, qualquer condição que favoreça à célula alterada aumentar em número favorecerá a progressão do tumor.

Uma mutação precoce ou uma alteração epigenética poderá ter este efeito pelo aumento da taxa pela qual um clone celular irá proliferar, como será discutido em detalhes mais adiante. Tais alterações, no entanto, não são as únicas – ou necessariamente o mais importante – para aumentar o número de células. Em tecido adulto normal, especialmente aqueles em risco de câncer, as células podem proliferar continuamente; porém seu número permanecerá estacionário porque a produção celular é balanceada pela perda celular, como parte do mecanismo de controle homeostático do corpo. A morte celular programada por *apoptose* em geral tem um papel essencial no balanço, como discutiremos nos Capítulos 18

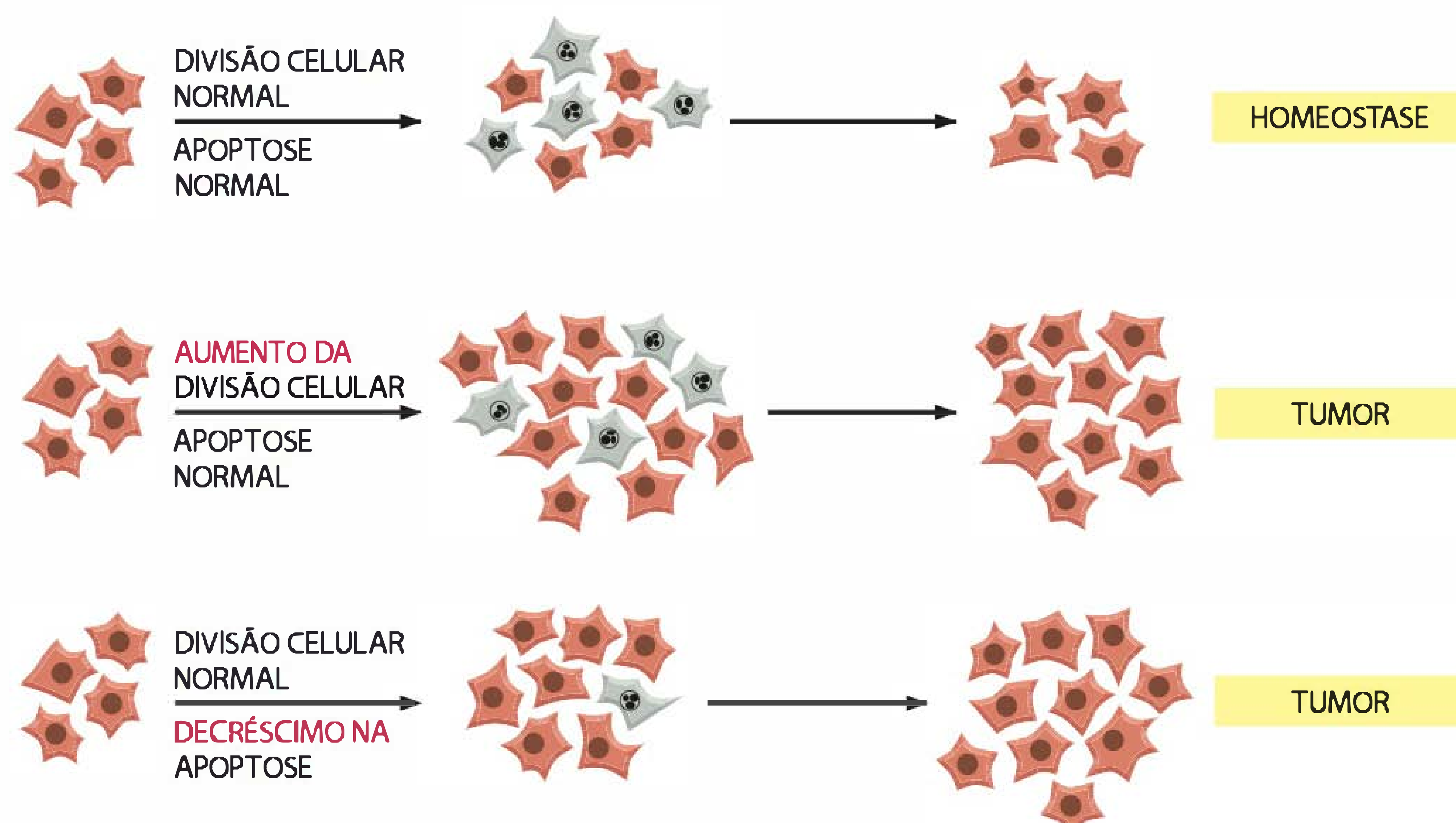


Figura 20-14 O aumento na divisão e o decréscimo na apoptose podem contribuir para a tumorigênese. Em tecidos normais, a apoptose faz o balanço da divisão celular para manter a homeostase. Durante o desenvolvimento do câncer, o aumento da divisão celular ou a inibição da apoptose poderá levar ao aumento do número de células, importante para a tumorigênese. Células destinadas à apoptose são mostradas em *cinza*.

e 23. Se muitas células são geradas, a taxa de apoptose aumentará para eliminar o excesso. Uma das mais importantes propriedades de muitos tipos de células cancerosas é que elas falham ao entrar em apoptose quando as células normais o fazem normalmente, o que contribui bastante para o crescimento do tumor (**Figura 20-14**).

Alterações genéticas também podem aumentar o tamanho de um clone de células mutantes por alterarem a habilidade de diferenciação, como ilustrado pela situação na cérvice uterina, discutido anteriormente. Quando uma célula-tronco da lâmina basal se divide, cada célula-filha tem uma escolha – de permanecer como célula-tronco ou iniciar uma via que a levará à diferenciação. As células comprometidas com a diferenciação inicialmente proliferam e então param de dividir-se e se diferenciam (as células comprometidas com a diferenciação são chamadas de *células amplificadoras transitórias*). Se o programa de diferenciação é bloqueado em algum dos estágios, as células em proliferação se acumulam, contribuindo para a progressão de neoplasia intra-epitelial de baixo grau da cérvice para neoplasia intra-epitelial e câncer maligno (ver Figura 20-9). Considerações semelhantes se aplicam ao desenvolvimento de câncer em outros tecidos que dependem de células-tronco, como a pele, o forro do sistema digestivo e o sistema hemopoiético. Diversas formas de leucemias, por exemplo, parecem ter origem na ruptura do programa normal de diferenciação, de tal modo que uma célula progenitora de um tipo particular de célula sanguínea eventualmente torna-se capaz de dividir-se indefinidamente, em vez de progredir para a diferenciação terminal normal e morrer após um número limitado de divisões (como discutido no Capítulo 23).

Assim, a acumulação de mutações e mudanças epigenéticas que levam a defeitos no controle normal da divisão celular, apoptose e diferenciação podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão dos cânceres.

As células cancerosas em geral são alteradas em resposta a danos no DNA e a outras formas de estresse

Como discutido, muitas células normais permanentemente param de se dividir quando se diferenciam em células especializadas. A diferenciação, no entanto, não é a única razão para células em proliferação pararem de se dividir; elas também podem parar em resposta a estresse ou devido a danos no seu DNA. Como descrito no Capítulo 17, células normais contêm um conjunto de mecanismos de *controle de pontos de verificação*. Tais mecanismos param temporariamente o ciclo celular quando pressentem que alguma coisa não vai bem, utilizando o tempo para corrigir o problema. Quebras cromossômicas e outros tipos de danos no DNA geram sinais intracelulares que ativam o conjunto de mecanismos de pontos de verificação, causando uma parada no ciclo e, desse modo, permitindo o reparo ao dano antes de progredir no ciclo e se dividir. Se o dano é irreparável, uma célula normal ou sai permanentemente do ciclo ou comete suicídio por apoptose para evitar uma geração de células-filhas com danos no genoma.

Células cancerosas em geral adquirem mutações e mudanças epigenéticas que inativam a resposta a danos causados no DNA. Sob o ponto de vista da célula cancerosa, a perda

de tais freios confere uma vantagem, permitindo que elas continuem a se multiplicar mesmo com o DNA lesionado. Ao mesmo tempo, isso acelera as taxas nas quais as mutações se acumulam na célula tumoral, levando assim a uma progressão de malignidade. As células cancerosas são também deficientes em outros mecanismos de controle de pontos de verificação que ajudam a regular o ciclo celular. Assim, elas frequentemente pulam fases do ciclo quando as coisas não vão bem e, dessa maneira, se autoinfligem outros danos genéticos, contribuindo para as anormalidades cromossômicas que geralmente mostram. Mesmo que as células com danos genéticos levem mais tempo para completar o ciclo celular do que as células normais, elas acumulam tempo extra, pois mostram grande propensão para proliferar. É digno de nota que tais células têm a capacidade de ser dominantes quando se misturam a células normais.

Células cancerosas humanas escapam do limite interno de proliferação celular

Muitas células humanas possuem um limite interno para o número de vezes que podem se dividir quando estimuladas a proliferar em cultura: elas permanentemente param de se dividir após um certo número de ciclos (p. ex., 25 a 50 para fibroblastos humanos), um fenômeno conhecido por **senescência celular replicativa** (discutido no Capítulo 17). Este mecanismo de contagem de ciclos de divisão geralmente depende do encurtamento progressivo dos telômeros situados no fim dos cromossomos, o que eventualmente muda suas estruturas. Como discutido no Capítulo 5, a replicação do DNA telomérico durante a fase S depende da enzima **telomerase,** que mantém a estrutura da sequência telomérica e promove a formação de proteínas com estrutura de quepe que protegem as extremidades dos cromossomos. Como muitas células humanas proliferativas (exceto células-tronco) são deficientes em telomerase, seus telômeros encurtam a cada divisão celular, e o quepe protetor se deteriora. Eventualmente, as extremidades alteradas dos cromossomos engatilham a parada permanente do ciclo celular.

O mecanismo de contagem dos ciclos de divisão descrito anteriormente organiza o limite fisiológico da proliferação celular para a maioria dos tipos celulares do corpo. Células humanas cancerosas de alguma maneira evitam ou se sobrepõem a esta barreira para formar grandes tumores. Algumas células de roedores, no entanto quando proliferam mantêm a atividade da telomerase e de telômeros normais e, portanto, não possuem a barreira. Foi proposto que os humanos necessitam da senescência celular replicativa para ajudar a prevenir cânceres, visto que a nossa expectativa de vida comparativamente longa propiciaria uma enorme oportunidade para a progressão tumoral.

Células humanas cancerosas evitam a senescência celular replicativa de duas maneiras. Primeiro, elas adquirem alterações genéticas e epigenéticas que desarmam o controle de pontos de verificação, o que permite que as células continuem no ciclo mesmo quando os telômeros perdem a proteção proteica do quepe. Mutações que inativam a via da p53 possuem este efeito, sendo muito comuns em células cancerosas, como discutiremos a seguir. Outra estratégia para escapar à senescência replicativa é que as células cancerosas frequentemente mantêm atividade telomerásica durante a proliferação, evitando que seus telômeros encurtem ou fiquem desprotegidos do quepe. Em alguns casos, a célula cancerosa poderá manter a atividade telomerásica, pois o câncer originário de células-tronco tem esta atividade. Em outros casos, apesar de o câncer ter se originado em células sem uma atividade telomerásica apreciável, a célula cancerosa adquiriu a atividade como resultado de mudanças genéticas ou epigenéticas que foram selecionadas à medida que seus telômeros encurtavam. Ainda, outras células cancerosas desenvolveram um mecanismo para alongar as extremidades dos cromossomos. Sem levar em conta a estratégia usada, o resultado é que a célula cancerosa continua a proliferar sob condições onde células normais não cresceriam.

Uma pequena população de células-tronco mantém muitos tumores

Como discutido no Capítulo 23, em uma linhagem normal de células adultas com reciclagem substancial, como as linhagens do sistema hematopoiético, as células estão organizadas de maneira hierárquica: raramente, células-tronco de divisão lenta produzem células-filhas (células amplificadoras transitórias) que proliferam extensivamente e eventualmente se diferenciam em células especializadas com característica da linhagem. As células-tronco man-

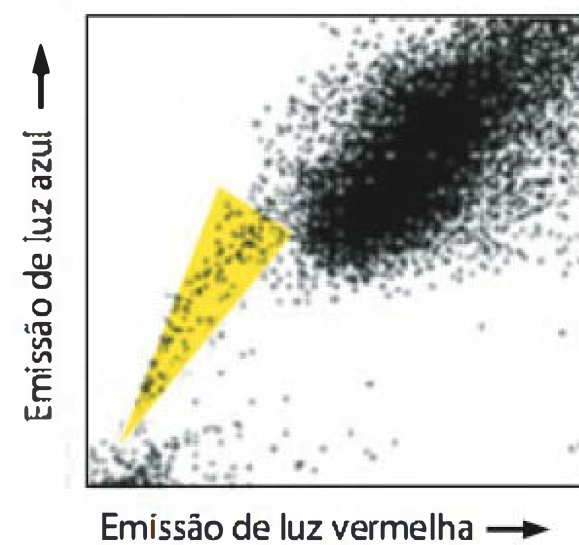


Figura 20-15 Citometria de fluxo revela células-tronco cancerosas em uma pequena população lateral de células. No exemplo, as células de uma linhagem estabelecida de um glioma de rato foram tratadas com um corante que atravessa a membrana plasmática (Hoechst 33342) e em seguida analisadas por citometria de fluxo. Cerca de 0,4% das células faz o efluxo do corante e, portanto, está fracamente corada, como indicado em *amarelo*.

Experimentos comparando as células da população lateral (PL) com o restante das células mostraram que apenas as células da população lateral poderiam proliferar extensivamente e formar tumores. Desse modo, enquanto as células PL produziram células SP e não-SP, as células não-SP não produziram células SP. (Adaptada de T. Kondo, T. Setoguchi e T. Taga, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101:781-786, 2004. Com permissão da National Academy of Sciences.)

têm a linhagem produzindo algumas células-filhas que permanecem como células-tronco (processo chamado de *renovação intrínseca*), enquanto produzem outras que se comprometem com vias que levam à diferenciação. Existem evidências crescentes que muitos cânceres se organizam também de maneira hierárquica, com raras **células-tronco cancerosas** no topo da hierarquia responsável pela manutenção da população de células no tumor. Tais células-tronco são capazes de se renovar indefinidamente e também originar células que se dividem rapidamente e com trânsito amplificado que possuem uma capacidade limitada de renovação intrínseca. Recentemente, tornou-se amplamente reconhecido o fato de que células com potencial limitado de crescimento constituem a maioria predominante em muitos cânceres.

Há cerca de 40 anos, sabe-se que existe apenas uma pequena possibilidade – menos de 1% – que ao retirar-se ao acaso uma célula individual de um câncer, esta gere um novo tumor – por exemplo, implantando-a em um camundongo imunodeficiente. Novas tecnologias para classificação celular mostraram que em muitos casos isso acontece porque as células cancerosas são heterogêneas e somente um pequeno subgrupo possui a propriedade especial requerida à propagação do tumor. Um método usado para enriquecer a população diminuta de células-tronco cancerosas dá-se pelo uso de corantes fluorescentes detectáveis por um equipamento de citometria de fluxo (ver Figura 8-2). Quando uma suspensão celular preparada a partir de tecidos normais é exposta ao corante e então classsificada por citometria de fluxo, as células-tronco do tecido são encontradas altamente enriquecidas em uma *população lateral* fracamente fluorescente. As células-tronco são fracamente fluorescentes porque possuem na membrana plasmática uma proteína de transporte tipo ABC (de *ATP binding cassete*, cassete de ligação ao ATP) (discutido no Capítulo 11) responsável pelo bombeamento do corante para fora da célula.

Quando células cancerosas são analisadas da mesma maneira, uma pequena fração da população com a proteína de membrana tipo ABC contém praticamente todas as células capazes de formar tumores quando transplantadas em camundongos imunodeficientes. É importante notar que este fato também é verdadeiro para certas linhagens celulares propagadas em laboratório por mais de trinta anos em cultura: a população classificada como fracamente fluorescente forma tumores após transplantada, enquanto a população altamente fluorescente, que inclui a vasta maioria das células, é incapaz de formar tumores após transplante para camundongos imunodeficientes (**Figura 20-15**). Entretanto, quando a população lateral (fracamente fluorescente) retorna à cultura *in vitro*, uma pequena população lateral rapidamente reaparece, sendo mantida indefinidamente, enquanto que uma população lateral não se desenvolve na cultura das células remanescentes.

Em outros estudos, um fracionamento celular usando anticorpos monoclonais que reconhecem células-tronco normais no tecido de origem do tumor mostrou resultados semelhantes.

Como surgem as células-tronco cancerosas?

A descoberta de que muitos cânceres são mantidos por uma pequena população de células-tronco malignas teve implicações importantes, tanto para entender o câncer em si quanto para tratá-lo, e também porque levantou um número de questões intrigantes – por exemplo, como surgiram as células-tronco? Qual é a natureza da célula-tronco cancerosa e o que a distingue em termos moleculares da maioria das células no câncer? Dos resultados com cultura de células cancerosas descritos anteriormente, a maioria das diferenças reflete mais mudanças epigenéticas do que alterações genéticas.

Para muitos tumores, fica claro que o câncer se originou em células-tronco de tecidos normais, que gradualmente acumulam mutações e mudanças epigenéticas responsáveis pelo comportamento antissocial do câncer. Por exemplo, esta sequência de eventos certamente é determinante para o surgimento da leucemia mieloide crônica. Assim, quando as células-tronco hematopoiéticas totipotentes (ver p. 1456) são purificadas da medula óssea destes pacientes, muitas contêm o cromossomo Filadélfia com a translocação característica deste câncer. Assim, é provável que muitos cânceres humanos surjam de células-tronco normais, pois se desenvolvem no epitélio que tem uma alta reciclagem. Nestes tecidos, apenas células-tronco permanecem no corpo e proliferam o bastante para acumular o número de mutações requerido para o desenvolvimento de um câncer.

A segunda maneira pela qual uma célula-tronco poderá surgir é através da mudança em uma célula proliferativa mais diferenciada, como as células amplificadoras transitórias. As

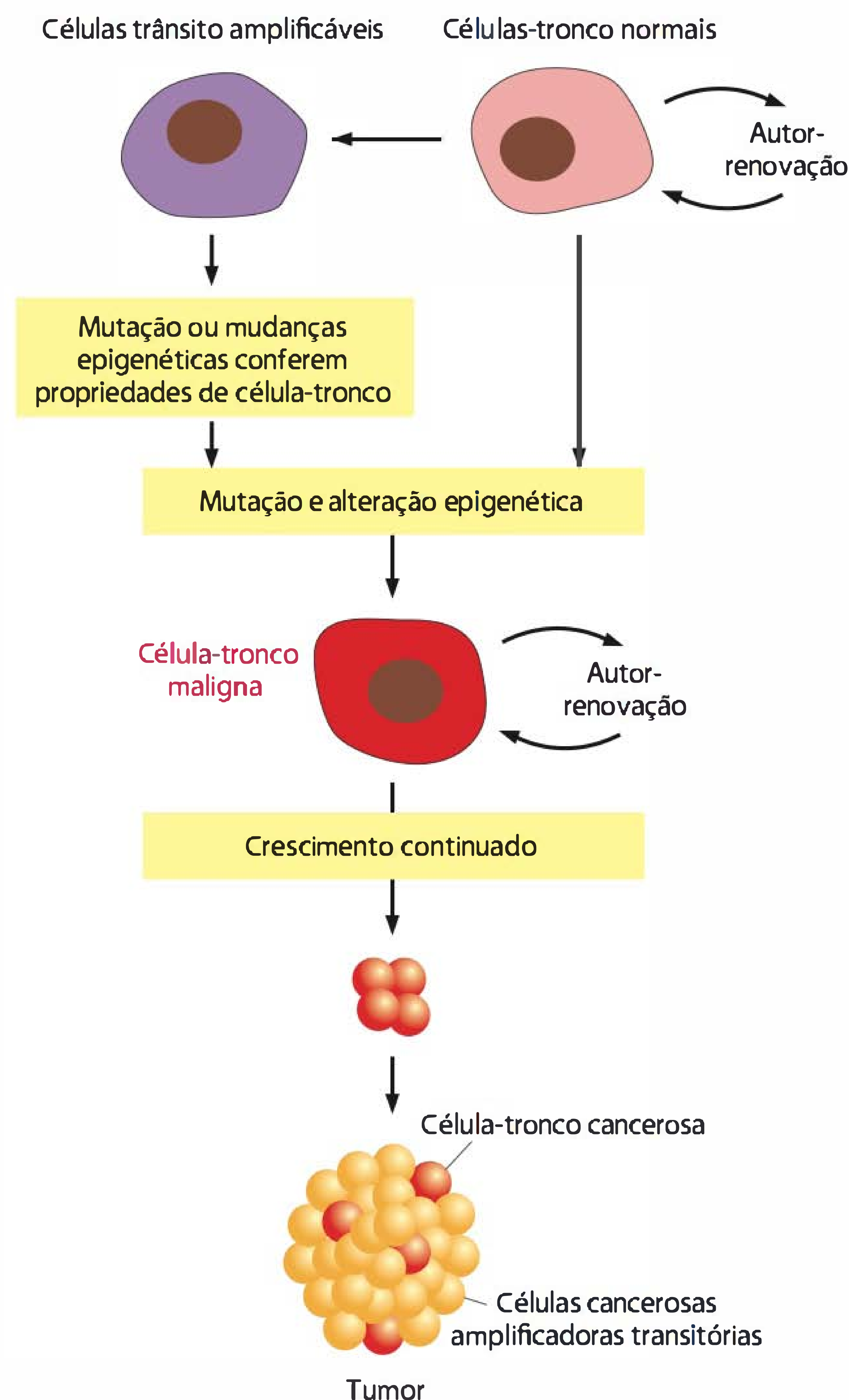


Figura 20-16 Cânceres podem surgir de células-tronco. Células-tronco cancerosas são definidas como células malignas capazes de autorrenovação para produzir células-tronco malignas adicionais e ao mesmo tempo gerar células normais, como as células amplificadoras transitórias. Células-tronco cancerosas podem se originar de células-tronco normais que sofreram várias mutações que as tornaram cancerosas; ou a partir de células mais diferenciadas que sofreram mutações ou alterações epigenéticas que lhes conferiram características de células-tronco.

modificações devem conferir as duas propriedades cruciais das células-tronco: a habilidade de ser retida no corpo e a capacidade de renovação intrínseca. Assim, e somente assim, a célula alterada terá tempo suficiente para acumular outras mutações e modificações epigenéticas necessárias para se tornar uma célula cheia de malignidade. Algumas leucemias de linfócitos B, por exemplo, ao que parece originam-se desta maneira. Todas as células neste tipo de leucemia contêm o mesmo rearranjo genético nos genes codificadores de anticorpos (discutido no Capítulo 25), sugerindo que o câncer originou-se em uma célula precursora de linfócito B comprometida e não em uma célula-tronco não-comprometida. Assim, é mais provável que a maioria dos cânceres humanos se origine de células-tronco e outros sejam originários de células que adquiriram a capacidade de crescer continuamente através de mutações, mudanças epigenéticas, ou ambas (**Figura 20-16**).

A maioria das terapias correntes para o tratamento de câncer, como radiação ou fármacos citotóxicos, ao que parece mata preferencialmente as células que crescem mais rápido no tumor. Como as células-tronco, via de regra, dividem-se mais lentamente, elas se tornam menos sensíveis a esse tipo de tratamento. Além disso, nos anos de 1970 foi proposto que a evolução teria selecionado mecanismos que protegem as células-tronco de acumular mutações. Particularmente, como a maioria das mutações aparece durante a replicação do DNA, seria possível em cada divisão uma célula-tronco utilizar um mecanismo especial que permitisse que a fita-molde de DNA em cada cromossomo fosse segregada em uma célula-filha que permaneceria como uma célula-tronco? Experimentos recentes sugerem que somente as células-tronco poderão coordenar a segregação dos seus cromossomos desta maneira (ver Figura 23-16). Se este for o caso para células-tronco cancerosas, elas seriam então, de maneira incomum, mais resistentes à maioria dos tratamentos que matam as outras células.

Se as células-tronco não são erradicadas, elas com certeza irão regenerar o câncer. Isto talvez seja a maior razão de os cânceres comumente recrudescerem após uma resposta inicial dramática à terapia. Para cura do câncer, é claramente crucial encontrar-se uma melhor maneira de alvejar a célula-tronco cancerosa e eliminá-la.

Para estabelecer metástases, as células cancerosas malignas devem sobreviver e proliferar em um ambiente inóspito

A metástase é o aspecto do câncer mais temido e menos compreendido, sendo responsável por 90% das mortes associadas ao câncer Ao disseminar-se pelo corpo, o câncer torna-se praticamente impossível de ser erradicado por cirurgia ou por irradiação localizada. A metástase também é um processo de muitas etapas: as células devem despregar-se do tumor primário, invadir o tecido local e os vasos, mover-se através da circulação, deixar os vasos e então estabelecer uma nova colônia em locais distantes. Cada um dos eventos é por si mesmo complexo, e a maioria dos mecanismos moleculares envolvidos não está bem esclarecida.

Para uma célula cancerosa formar metástase, ela deve se livrar dos freios que controlam a célula normal, mantendo-a no seu local e não permitindo que invada tecidos vizinhos. Invasibilidade é assim uma propriedade definida de tumores malignos que se apresentam com um padrão de crescimento desorganizado com bordas irregulares e com extensões nos tecidos circunvizinhos (ver exemplo na Figura 20-9). Apesar de os mecanismos moleculares não serem bem entendidos, invasibilidade certamente requer a ruptura dos mecanismos de adesão que normalmente conservam as células grudadas as suas vizinha e à matriz extracelular. Como será discutido adiante, para os carcinomas a mudança lembra a *transição epitelial a mesenquimal* (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*), que ocorre em alguns tecidos epiteliais durante o desenvolvimento normal (ver Figura 19-12).

A próxima etapa na metástase – o estabelecimento de colônias em um órgão distante – é uma operação complexa, lenta e ineficiente: poucas células são capazes de realizar. Antes de estabelecer com sucesso a metástase, a célula deve penetrar um vaso sanguíneo ou um vaso linfático cruzando a lâmina basal e o revestimento endotelial, e da mesma forma sair do vaso em um ponto distante do corpo, fixar-se e crescer no novo sítio, formando primeiro um pequeno grumo de células conhecidas como micrometástase. Para completar o processo metastático, algumas micrometástases produzem células que sobrevivem e proliferam extensivamente no novo ambiente, um processo um tanto difícil conhecido como colonização (**Figura 20-17**).

A vasculatura que cresce no tumor é frágil, e muitas células do tumor escapam para vasos linfáticos e mesmo para vasos sanguíneos adjacentes. No entanto, experimentos mostraram que apenas uma porção ínfima de células, uma em mil, ou talvez uma em um milhão, sobrevive e então forma uma metástase. Muitos cânceres são descobertos antes de formarem colônias metastáticas, podendo ser curados se o tumor primário for removido.

Embora a princípio seja possível que cada célula cancerosa que entra na corrente sanguínea tenha a mesma chance, ainda que diminuta, de sobreviver, colonizar e crescer em um ambiente inóspito, na realidade não é o que se observa. É provável que a baixa taxa de colonização reflita a raridade de células que possuem as propriedades para tal, o que quer dizer que apenas uma pequena proporção de células em um câncer típico tenha as propriedades de célula-tronco com propensões a se dividir sem limites e a habilidade de colonizar e sobreviver em um ambiente hostil. A raridade de células-tronco cancerosas explica por que somente uma quantidade ínfima de células colonizam outros tecidos, mesmo após formar micrometástases.

A necessidade de capacidades especiais para a sobrevivência parece ser um freio adicional. Células normais dependem de sinais extracelulares de sobrevivência que são abundantes no ambiente onde vivem; porém, quando privadas destes sinais, ela ativam a maquinaria de morte celular programada e entram em apoptose (discutido no Capítulo 18). Células cancerosas capazes de formar metástase são, via de regra, resistentes à apoptose quando comparadas a células normais e, assim, poderão sobreviver fora do seu ambiente após escape. Elas também são menos dependentes de sinais de outras células para crescer e se multiplicar.

Tumores induzem angiogênese

Em adição a todos os requerimentos descritos anteriormente, para crescer, o tumor tem que recrutar um suprimento de sangue adequado para ter uma quantidade desejável de oxigênio e nutrientes. Assim, *angiogênese*, a formação de novos vasos sanguíneos, é requerida para que o tumor cresça além de um determinado tamanho. Como os tecidos normais, os tumores atraem o suprimento sanguíneo pela secreção de sinais angiogênicos. Tais sinais são produzidos em resposta à hipoxia, que começa a afetar as células à medida que o tumor se expande além de um milímetro ou dois em diâmetro. A hipoxia ativa uma *alteração angiogênica,* que aumenta o suprimento de sangue pelo aumento do nível de *fator induzível de*

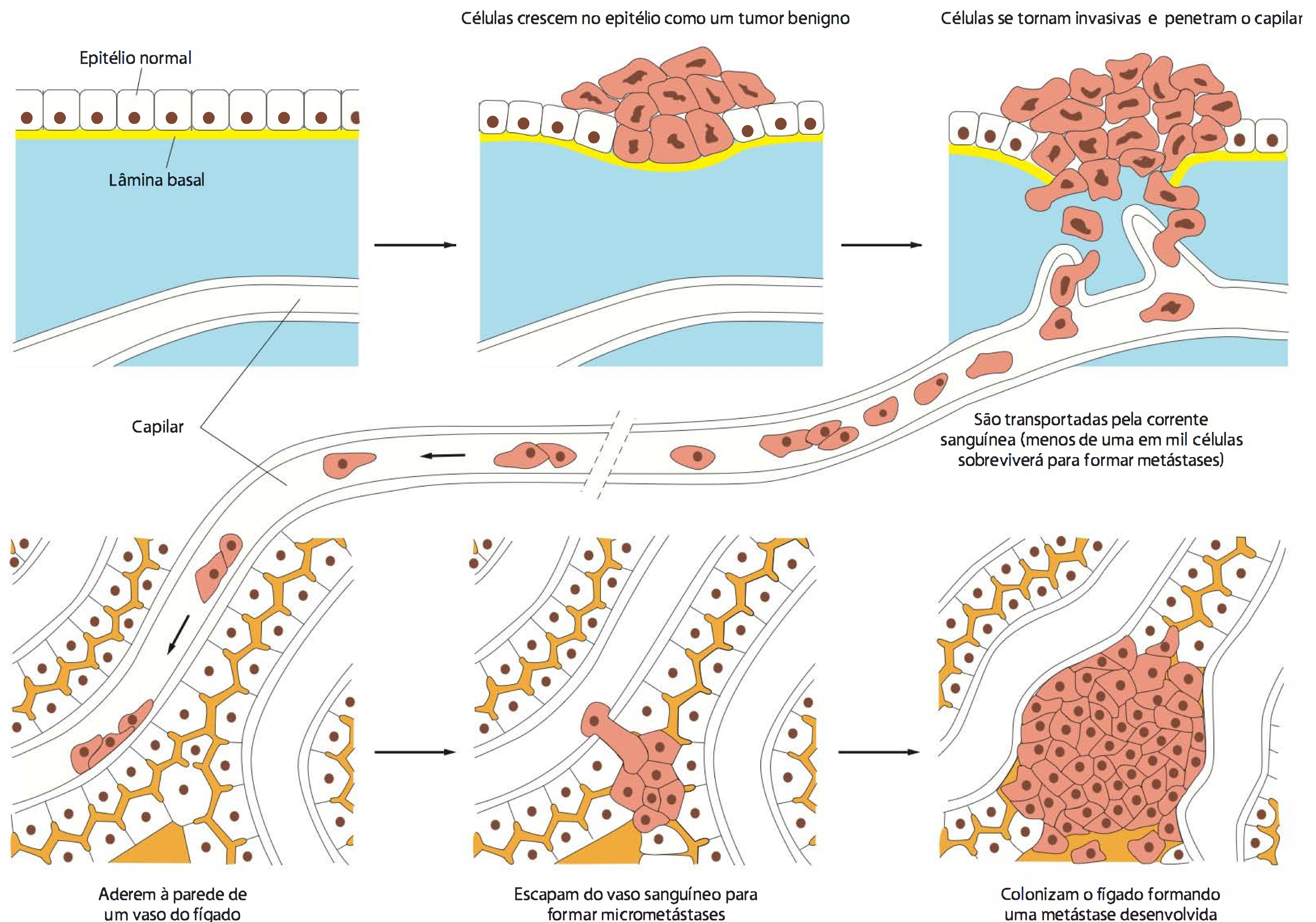


Figura 20-17 Etapas no processo de metástase O exemplo ilustra o espalhamento de um tumor de um órgão como a bexiga para o fígado. As células tumorais entram na corrente sanguínea de maneira direta, pela invasão da parede de um vaso sanguíneo, como mostra o diagrama, ou mais comumente talvez pela invasão da parede de um vaso linfático cujo conteúdo linfático é despejado na corrente sanguínea. As células tumorais que penetram o vaso linfático frequentemente são segregadas no linfonodo e dão origem a metástases no linfonodo. Estudos em animais mostraram que pouquíssimas células malignas, menos de uma por mil, que penetram a corrente sanguínea são capazes de estabelecer um tumor detectável no novo sítio.

hipoxia (HIF-1α, hypoxia inducible factor-1α) um gene de uma proteína reguladora descrita no Capítulo 23; esta proteína, por sua vez, ativa a transcrição de genes que codificam fatores pró-angiogênicos, como o *fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, vascular endothelial growth factor)*. Essas proteínas secretadas atraem células endoteliais e estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos (ver Figura 23-34). Tais vasos não só ajudam o tumor no suprimento de oxigênio e nutrientes, como também criam uma via de escape para as células cancerosas formarem metástase.

No entanto, os novos vasos são malfeitos, heterogêneos em diâmetro e frágeis, e ainda possuem muitas ramificações com extremidades mortas. Tais anormalidades, que provavelmente resultam de um balanço anormal de moléculas sinalizadoras, levam a um suprimento irregular de sangue para o tumor, ajudando a criar novas regiões de hipoxia (**Figura 20-18**). Hipoxia, por sua vez, seleciona células cancerosas mutantes que são melhor adaptadas para sobreviver em um ambiente inóspito e estressante, o que significa células com maior malignidade. Finalmente, o crescimento tumoral depende de um suprimento adequado de sangue, e os vasos defeituosos que são atraídos para o tumor são um alvo óbvio para quimioterapia, como discutiremos adiante.

O microambiente do tumor influencia o desenvolvimento do câncer

Como mencionado anteriormente, carcinomas são entidades complexas, contendo muitos tipos celulares em adição às células cancerosas. Enquanto as células cancerosas são gros-

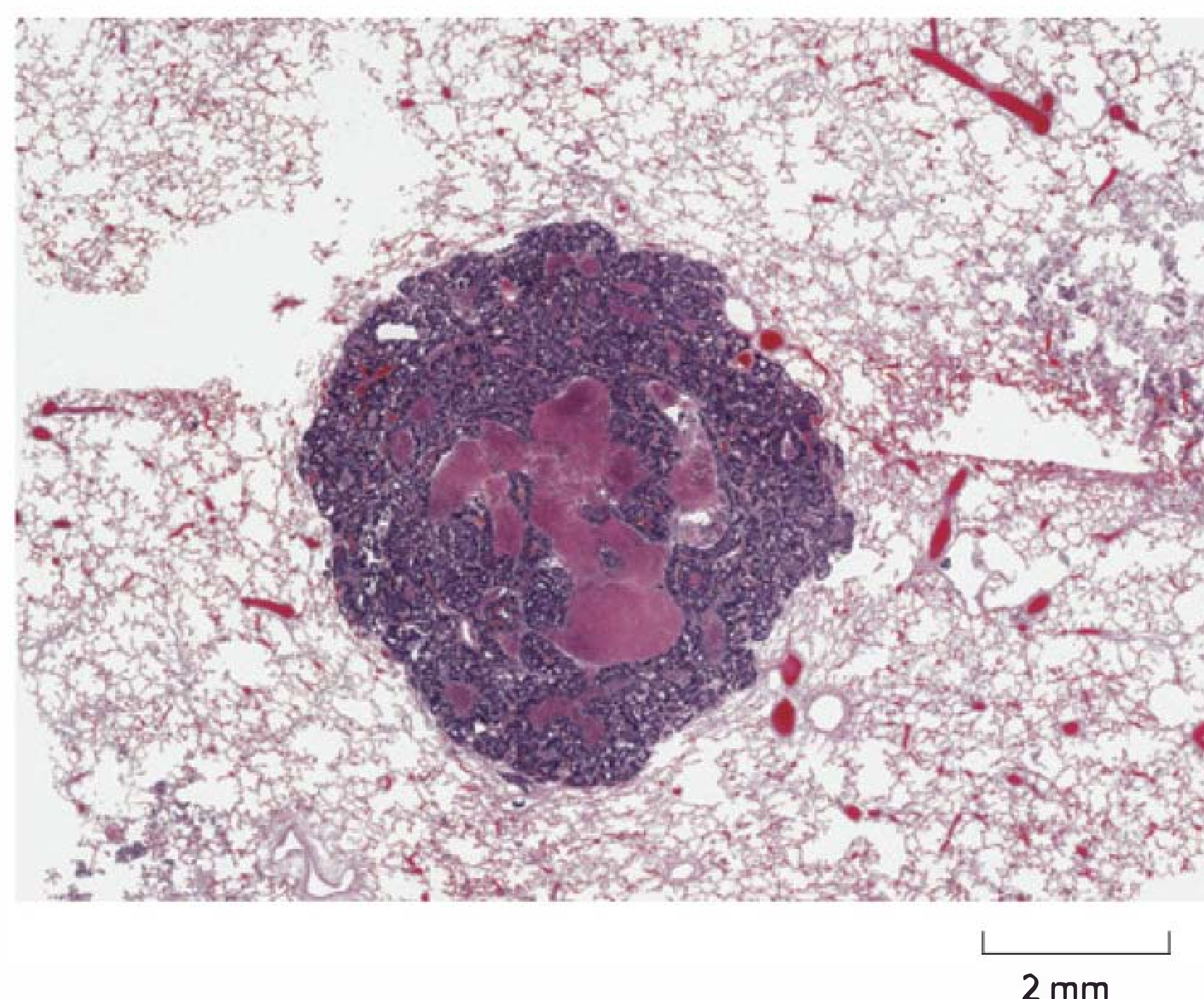


Figura 20-18 Metástase de adenocarcinoma de cólon no pulmão. O corte de tecido mostra células de câncer colorretal bem-diferenciadas formando glândulas coesivas no pulmão. A metástase possui áreas de necrose (em rosa) onde o suprimento de sangue foi inferior ao desejado pelo tumor. (Cortesia de Andrew J. Connolly.)

seiramente anormais devido às mutações que sofreram nos tumores, as outras células no tumor, especialmente as de tecido conectivo de suporte, ou **estroma,** estão longe de serem inocentes observadoras. Isto porque o desenvolvimento de um tumor é devido a uma espécie de conversação cruzada, ou diafonia, entre as células cancerosas e o estroma tumoral, semelhante ao desenvolvimento normal de órgãos epiteliais onde existe diafonia entre as células epiteliais e as células mesenquimais (discutido no Capítulo 22).

O estroma é o arcabouço do tumor, sendo composto de tecido conectivo normal contendo fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos inflamatórios, células endoteliais do sangue e dos vasos linfáticos, suas células periféricas atendentes e células musculares lisas (**Figura 20-19**). Com a progressão do carcinoma, as células cancerosas induzem modificações no estroma pela secreção de proteínas-sinal que alteram o comportamento das células do estroma e também enzimas proteolíticas que modificam a matriz extracelular. As células do estroma, por sua vez, atuam nas células tumorais de várias maneiras. Elas secretam proteínas-sinal que estimulam o crescimento e a divisão das células malignas, e secretam proteases que remodelam a matriz extracelular. Desse modo, o tumor e seu estroma se desenvolvem juntos, e o tumor se toma dependente das células do estroma. Experimentos com camundongos indicam que o crescimento de alguns carcinomas depende dos fibroblastos associados ao tumor, o que não acontece com os fibroblastos normais. Um outro exemplo, o crescimento de tumores de pele, é significantemente retardado em camundongos deficientes na produção de uma metaloproteinase que normalmente é secretada por mastócitos do estroma; a protease é responsável pela liberação de fatores angiogênicos da matriz extracelular que estimula a angiogênese requerida ao crescimento do tumor. Este e outros resultados sugerem que o tratamento do câncer poderia ser direcionado para inibir a atividade do estroma, em adição às células cancerosas.

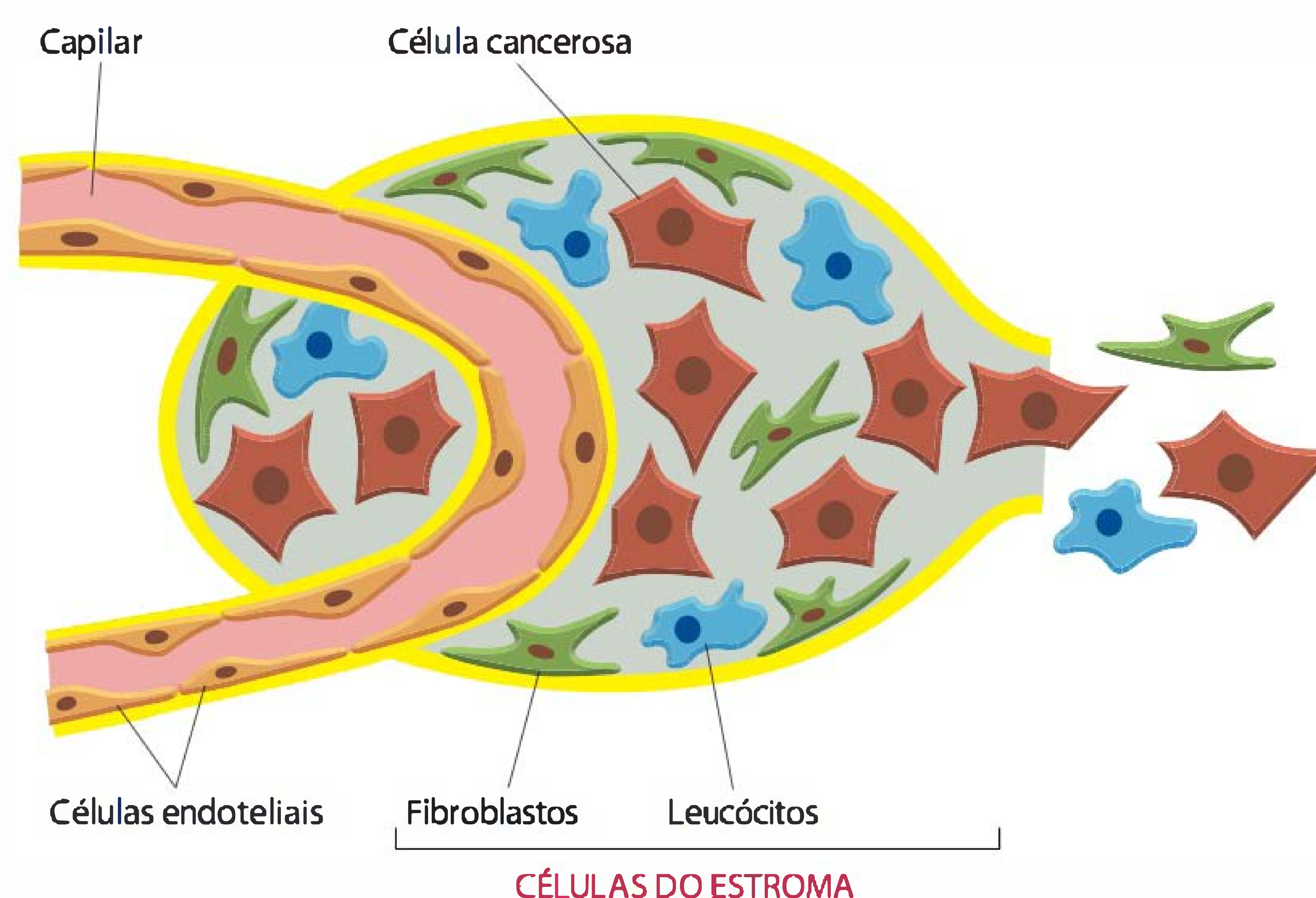


Figura 20-19 O microambiente do tumor tem um papel importante na tumorigênese. Os tumores consistem em muitos tipos de células, incluindo as células cancerosas, as células epiteliais vasculares, os fibroblastos e os leucócitos inflamatórios. Conversações cruzadas entre as células cancerosas com os outros tipos de células têm um importante papel no desenvolvimento do tumor.

Diversas propriedades contribuem para o crescimento canceroso

Claramente, para produzir um câncer, a célula deve adquirir um conjunto de propriedades aberrantes – uma coleção de novas habilidades subversivas – à medida que se desenvolve. Diferentes cânceres requerem diferentes combinações destas propriedades. Mesmo assim, pode-se traçar uma lista sucinta de comportamentos de células cancerosas em geral:

1. São mais independentes do que as células normais para o crescimento e a proliferação. Por exemplo, diferentemente da maioria das células normais, elas podem sobreviver e proliferar em cultivo mesmo quando não aderem a um substrato e flutuam livres em suspensão.
2. São relativamente insensíveis aos sinais antiproliferativos extracelulares.
3. São menos predispostas à apoptose.
4. São menos falíveis nos mecanismos de controle intracelular que normalmente param a divisão celular permanentemente em resposta ao estresse (p. ex., hipoxia) ou a danos no DNA.
5. Induzem socorro das células normais do estroma no seu local de desenvolvimento.
6. Induzem angiogênese.
7. Escapam dos tecidos aos quais pertencem (ou seja, são invasivas) e sobrevivem e proliferam em sítios estranhos (ou seja, formam metástase).
8. São geneticamente instáveis.
9. Produzem telomerase ou adquirem outra maneira de estabilizar seus telômeros.

Nas últimas seções deste capítulo, examinaremos as mutações e os mecanismos moleculares que governam algumas destas propriedades, assim como os fatores ambientais que promovem o desenvolvimento do câncer.

Resumo

As células cancerosas, por definição, proliferam desobedecendo aos controles normais (isto é, elas são neoplásicas) e são capazes de invadir e colonizar os tecidos circundantes (isto é, elas são malignas). Por originarem tumores secundários, ou metástases, fica difícil erradicá-las cirurgicamente ou por irradiação local. Sabe-se que a maioria dos cânceres origina-se de uma única célula que sofreu uma mutação inicial, mas a descendência desta célula deve sofrer ainda outras alterações, necessitando de numerosas mutações e eventos epigenéticos para tornar-se cancerosa. A célula de origem de um câncer pode ser ou uma célula-tronco do tecido dotada da habilidade de se autorrenovar indefinidamente, ou uma célula mais diferenciada que adquire a propriedade de se autorrenovar indefinidamente. A progressão do tumor em geral leva muitos anos e reflete a operação de um processo evolutivo Darwiniano no qual células somáticas sofrem mutações e alterações epigenéticas acompanhadas de seleção natural.

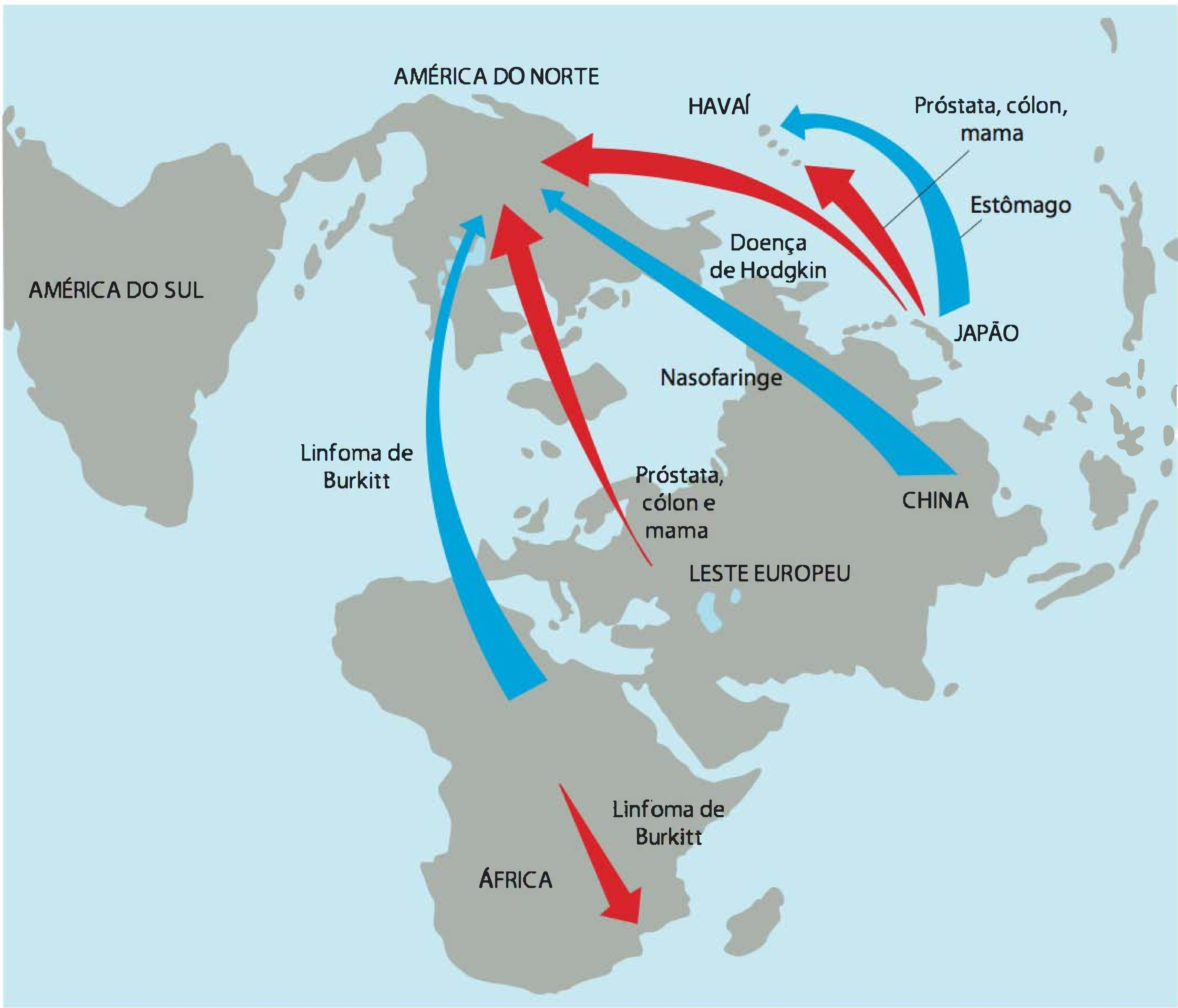
Células cancerosas adquirem uma variedade de propriedades especiais à medida que se desenvolvem, se multiplicam e se espalham. As propriedades incluem alterações na via de sinalização celular, que permite à célula ignorar os sinais do meio ambiente que normalmente controlam a proliferação celular rigidamente. Como parte do processo evolutivo da progressão tumoral, as células cancerosas adquirem defeitos na diferenciação e nos mecanismos de controle que param de maneira permanente a divisão celular ou induzem apoptose em resposta ao estresse celular ou a danos no DNA. Todas estas mudanças aumentam a habilidade das células cancerosas de sobreviver, crescer e se dividir em seus tecidos originais, e em seguida formar metástases – o que requer uma capacidade de sobrevivência e proliferação em ambientes estranhos. Por outro lado, a evolução de um tumor não significa simplesmente mudanças nas células cancerosas; também depende de outras células presentes no microambiente do tumor e que são coletivamente chamadas de estroma, o que inclui novos vasos sanguíneos que permitem que o tumor aumente de tamanho e cause metástase via corrente sanguínea.

Como muitas mutações e mudanças epigenéticas são necessárias para conferir esta coleção de comportamento antissocial, não é surpresa que quase todas as células cancerosas sejam geneticamente instáveis. A instabilidade genética pode surgir de defeitos na habilidade de reparar o DNA lesionado ou corrigir erros de replicação de vários tipos, que levam a alterações na sequência do DNA. Também muito comuns são os defeitos na segregação do cromossomo durante a mitose, o que leva à instabilidade do cromossomo e a alterações no cariótipo. Esta instabilidade genética é selecionada nos clones de células aberrantes que são capazes de produzir tumores, pois aceleram bastante o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas ulteriores que são requeridas para a progressão do tumor.

CAUSAS EVITÁVEIS DO CÂNCER

O desenvolvimento de um câncer geralmente requer muitas etapas, sendo que cada uma delas é governada por múltiplos fatores – alguns dependem da constituição genética de cada indivíduo, outros dependem do ambiente onde ele vive e de respectivo estilo de vida. Independentemente das circunstâncias específicas, considera-se que há uma incidência de câncer básica que não pode ser reduzida: as mutações não podem ser totalmente evitadas, pois elas são consequência inescapável das limitações naturais da precisão da replicação do DNA, conforme foi discutido no Capítulo 5. Se um ser humano viver tempo suficiente, é inevitável que ao menos uma de suas células chegue ao ponto de acumular um conjunto de mutações para desenvolver um câncer.

Mesmo assim, existem evidências de que alguns fatores ambientais, incluindo a comida, podem acelerar o estabelecimento de muitos cânceres. Isso é demonstrado com mais clareza comparando-se a incidência de câncer em diversos países. Para praticamente todo o câncer que for muito comum em um país, existe um outro país onde esta incidência é muitas vezes menor. Essas diferenças parecem ser causadas mais por fatores ambientais do que por fatores genéticos, pois as populações de migrantes têm a tendência de adotar o padrão de incidência de câncer característico do novo país. Estima-se, a partir desses dados, que de 80 a 90% dos cânceres poderiam ser evitados, ou ao menos postergados (**Figura 20-20**). Infelizmente, os vários cânceres têm diferentes fatores de risco ambiental, e uma população que escapa de um perigo geralmente fica exposta a outro. Isso, porém, não é inevitável. Existem alguns subgrupos cujos estilos de vida reduzem substancialmente a taxa de morte por câncer entre indivíduos de determinadas idades. Nos Estados Unidos e na Europa, nas condições atuais, aproximadamente uma em cada cinco pessoas morre de câncer. Contudo



Fatores ambientais e de estilo de vida	Câncer	% dos casos
• Exposição ocupacional	Vários tipos	1–2
• Relacionados ao tabagismo	Pulmões, rins, bexiga	24
• Dieta: baixa em vegetais, alta em sal e nitrato	Estômago e esôfago	5
• Dieta: alta em gorduras, baixa fibra, frituras e fervidos	Intestinos, pâncreas, próstata, mama	37
• Tabaco e álcool	Boca e garganta	2

(B)

Figura 20-20 A incidência de câncer é relacionada a influências ambientais. (A) O mapa do mundo mostra as taxas de câncer aumentando (*setas vermelhas*) ou diminuindo (*setas azuis*) quando populações específicas migram de um local para outro. Tais observações sugerem a importância dos fatores ambientais, incluindo a dieta, que ditam os riscos de câncer. (B) Alguns efeitos estimados do ambiente e do estilo de vida nos Estados Unidos. A tabela mostra a porcentagem do total de casos de câncer atribuídos a cada fator específico. (B, adaptada de Cancer Facts and Figures, American Cancer Society, 1990. Com permissão da American Cancer Society.)

a incidência de câncer entre os mórmons praticantes do estado de Utah (mas é importante notar que não entre os não-praticantes pertencentes a uma mesma família), que evitam álcool, café, cigarros, drogas e sexo casual, é apenas cerca de metade daquela entre os americanos como um todo. A incidência de câncer também é baixa em certas populações africanas relativamente ricas. Embora essas observações realizadas em populações humanas indiquem que certa proporção de câncer pode ser evitada, em muitos casos – com exceção do tabagismo – é difícil identificar os fatores de risco ambientais específicos ou saber como eles agem. Primeiramente, será abordado o que se sabe sobre os agentes externos causadores de câncer que já foram identificados. Depois, serão considerados alguns dos triunfos e das dificuldades na busca de meios de prevenir o câncer. O problema do tratamento será discutido na última seção, depois do exame da biologia molecular da doença.

Muitos dos agentes causadores de câncer, mas nem todos, lesionam o DNA

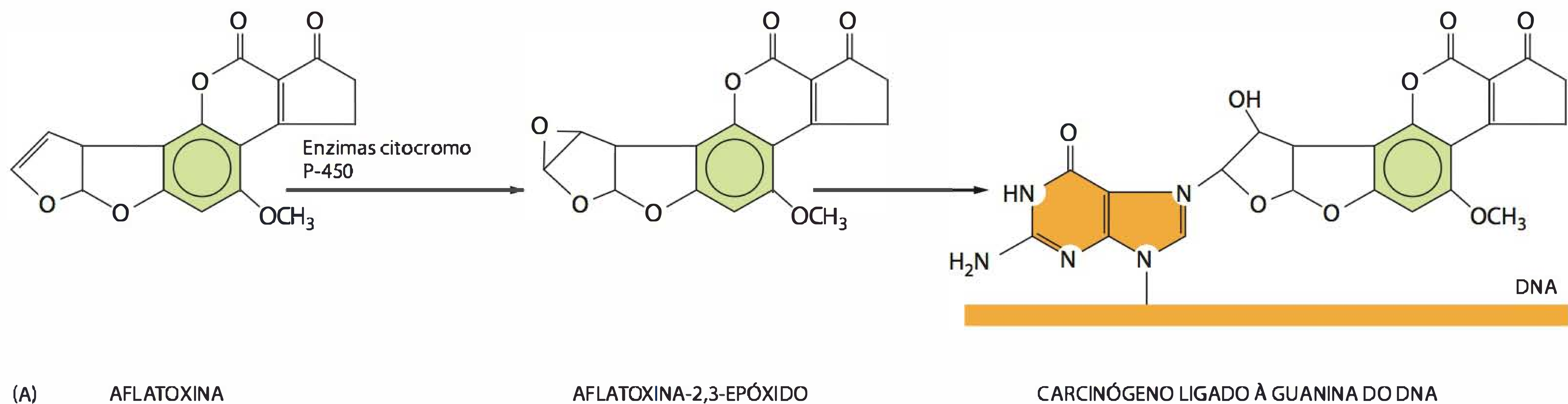
Os agentes que causam câncer, conhecidos por **carcinógenos,** são muitos e variados, mas os mais fáceis de serem entendidos são aqueles que causam dano ao DNA, gerando mutações. Entre os agentes mutagênicos que causam câncer, incluem-se os carcinógenos químicos, os vírus e as várias formas de radiação – luz ultravioleta do sol e radiações ionizantes, como os raios γ e as partículas α do decaimento radiativo.

Muitas substâncias químicas díspares mostraram-se carcinogênicas, quando usadas para alimentar animais experimentais ou aplicadas repetidamente na pele. Os exemplos incluem diversos hidrocarbonetos aromáticos e seus derivativos como as aminas aromáticas, nitrosaminas e agentes alquilantes, como o gás de mostarda. Embora esses carcinógenos químicos tenham estruturas diferentes, eles têm ao menos uma propriedade em comum: causam mutações. Em um teste muito utilizado para a avaliação de mutagenicidade, o carcinógeno misturado com um extrato ativador preparado com células de fígado de rato (para mimetizar o processamento bioquímico que ocorre no animal intacto – discutido a seguir) é adicionado a uma cultura de bactéria selecionada para o teste, e então a taxa de mutações da bactéria é avaliada (**Figura 20-21**). A maioria dos compostos classificados como mutagênicos neste rápido e conveniente teste em bactérias também causa mutações ou aberrações cromossômicas em testes realizados com células de mamíferos. A análise dos dados obtidos de diferentes fontes leva à conclusão de que a maioria dos carcinógenos conhecidos é mutagênica.

Poucos desses carcinógenos agem diretamente sobre o DNA ou o tem como alvo, mas geralmente os mais potentes são relativamente inertes quimicamente e tornam-se perigosos somente depois de modificados para uma forma mais reativa por processos fisiológicos, notadamente por um conjunto de enzimas intracelulares conhecidas como *oxidases do citocromo P-450.* Normalmente, essas enzimas contribuem para converter as toxinas ingeridas em compostos menos perigosos e de fácil excreção. Infelizmente, suas atividades sobre determinadas substâncias químicas levam a produtos altamente mutagênicos. Entre os exemplos de carcinógenos ativados dessa maneira incluem-se a toxina fúngica *aflatoxina B1* e o *benzo[a]pireno,* um agente químico causador de cânceres que está presente na fumaça do cigarro e na fuligem (**Figura 20-22**).



Figura 20-21 Teste de Ames para mutagenicidade. Este teste usa uma cepa da bactéria *Salmonella* que necessita da presença de histidina no meio de cultura devido a um defeito no gene necessário à síntese de histidina. As substâncias mutagênicas podem provocar alterações neste gene que levam à reversão do defeito, criando, assim, uma bactéria revertente que não necessita de histidina. Para aumentar a sensibilidade do teste, a bactéria também deve ter um defeito na sua maquinaria de reparo do DNA que faça com que ela seja extremamente suscetível a agentes que danifiquem o DNA. A maioria dos compostos mutagênicos em testes como este também é carcinogênica.



- CLORETO DE VINILA:
  Angiossarcoma do fígado
- BENZENO:
  Leucemias agudas
- ARSÊNICO:
  Carcinoma da pele, câncer de bexiga
- ASBESTO:
  Mesotelioma
- RADIUM:
  Osteossarcoma

(B)

Figura 20-22 Alguns carcinógenos conhecidos. (A) Ativação do carcinógeno. Uma transformação metabólica ativa muitos carcinógenos químicos antes de eles causarem mutações por reagirem com o DNA. O composto ilustrado é a *aflatoxina B1*, uma toxina de um fungo (*Aspergillus flavus oryzae*) que cresce em grãos, sobretudo no amendoim, quando são estocados sob condições tropicais úmidas. Ao que parece, contribui com as causas de câncer de fígado nos trópicos, sendo associado a mutações características do gene supressor de tumor *p53*. (B) Diferentes carcinógenos causam diferentes tipos de câncer. (B, dados de Cancer and Environment: Gene Environment Interactions, National Academies Press, 2002. Com permissão da National Academies Press.)

Os iniciadores de tumor lesionam o DNA; os promotores de tumor não

Nem todas as substâncias que favorecem o desenvolvimento de um câncer são mutagênicas. Algumas das evidências mais esclarecedoras vêm de estudos, realizados há muito tempo, dos efeitos de substâncias químicas sobre a pele de camundongos, na qual a observação dos estágios da progressão do tumor é fácil. Os cânceres de pele podem ser provocados em camundongos espalhando-se repetidamente substâncias químicas mutagênicas e carcinogênicas, como o benzo[a]pireno ou o composto assemelhado dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA). Uma única aplicação de carcinógeno, entretanto, geralmente não dá origem a um tumor ou a alguma outra anomalia permanente. Mesmo assim, a exposição causa um dano genético latente, ou seja, mutações que levam a uma situação de aumento na incidência de câncer quando da exposição tanto à mesma substância quanto a outro tipo de agressão. Um carcinógeno que apresente as sementes de um câncer é denominado **iniciador de tumor.**

Apenas ferindo-se a pele que, por uma única vez, tenha sido exposta a um desses iniciadores, pode-se provocar o desenvolvimento de um câncer que se origine de uma das células dos bordos da ferida. Leucócitos inflamatórios são atraídos ao ferimento, e ao que parece tais células têm um papel importante em promover o desenvolvimento do câncer, como mencionado anteriormente. Alternativamente, a exposição repetida, por um período de meses, a certas substâncias conhecidas como **promotores de tumor**, que não são mutagênicos por si mesmos, pode causar câncer em peles que previamente tenham sido expostas a iniciadores de tumor. Os promotores de tumor mais amplamente estudados são os *ésteres de forbol*, como o acetato de tetradecanoilforbol (TPA), que se comporta como um ativador artificial da *proteína-cinase C (PCK)* e, assim, aceita parte da via de sinalização intracelular do fosfatidilinositol (discutido no Capítulo 15). Essas substâncias causam uma alta incidência de câncer somente se aplicadas após o tratamento com um iniciador mutagênico (**Figura 20-23**).

O efeito imediato de um promotor de tumor aparentemente é induzir uma resposta inflamatória, causando a secreção de fatores de crescimento e proteases no ambiente local, que por sua vez agiriam direta ou indiretamente nas células estimulando a divisão (ou estimulando células que normalmente se diferenciariam e parariam a divisão a continuar a se dividir). Em uma região da pele que foi exposta a um iniciador, tal proliferação resulta no desenvolvimento de pequenas verrugas denominadas *papilomas*. Quanto maior for a dose do iniciador, maior o número de papilomas induzidos, o que leva-nos a acreditar que cada papiloma consiste em um clone celular descendente de uma célula mutante que o iniciador

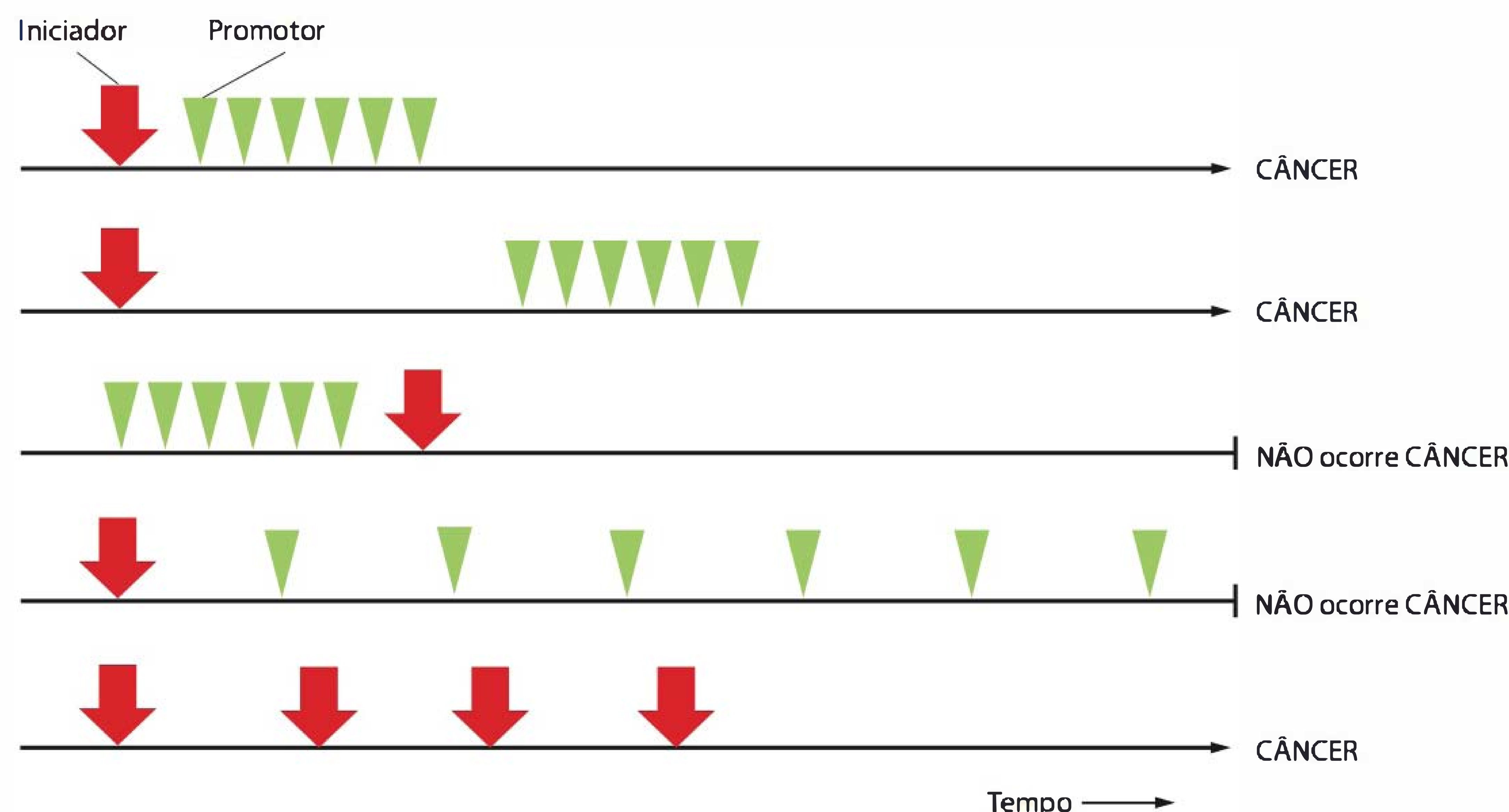


Figura 20-23 Alguns dos possíveis esquemas da exposição a um iniciador de tumor (mutagênico) e a um promotor de tumor (não-mutagênico) e suas decorrências. O resultado é um câncer somente se a exposição a um promotor seguir-se à exposição a um iniciador e somente se a intensidade da exposição ao promotor de câncer superar um certo limite. O câncer também pode ocorrer como resultado de exposições repetidas apenas ao iniciador.

produziu. Como seria esperado para danos genéticos, as perturbações causadas pelos iniciadores seriam irreversíveis; por esta razão, mesmo depois de longo lapso de tempo, elas poderão se manifestar através de um tratamento com um promotor de tumor.

Ainda não há total entendimento de como os promotores atuam, e diferentes promotores atuem de maneiras distintas. Uma possibilidade é que eles simplesmente provoquem a expressão de genes indutores de proliferação que foram previamente mutados, mas não expressos antes da aplicação do promotor: uma mutação que torna um produto gênico superativo não mostrará seus efeitos até que o gene seja expresso. Alternativamente, o promotor de tumor poderá alterar a maneira de como a célula reagirá ao produto do gene mutado, tanto pela neutralização de uma influência inibidora quanto desencadeando a produção de um cofator necessário à proliferação do produto do gene mutado. Seja qual for o mecanismo, o resultado é a habilitação da célula mutante para o crescimento e a divisão com a finalidade de produzir um aglomerado de células (**Figura 20-24**).

Um papiloma típico poderá conter cerca de 10^5 células. Se a exposição ao promotor é interrompida, a maioria dos papilomas regride, e a pele volta a ter uma aparência normal. Entretanto, nos poucos papilomas que não regrediram, ocorrem outras alterações que habilitam o crescimento e a divisão descontrolados, mesmo após a remoção do promotor. Tais mudanças ao que parece se originam ocasionalmente em uma única célula do papiloma a uma frequência esperada para mutações espontâneas. Deste modo, uma pequena proporção dos papilomas progride para tornar-se um câncer. Assim, o promotor de tumor aparentemente favorece o desenvolvimento do câncer pela expansão da população celular que transporta uma mutação inicial: quanto maior o número de células e quanto mais se dividirem, maior será a chance de pelo menos uma delas sofrer uma nova mutação ou uma alteração epigenética que a coloque um passo à frente a caminho da malignidade.

Apesar de os cânceres que ocorrem de forma natural não necessariamente ocorrerem de sequências específicas de passos distintos de iniciação e promoção descritos anteriormente, sua evolução, no entanto, pode ser governada por princípios semelhantes. Eles se desenvolverão em uma taxa que dependerá não somente da frequência das alterações genéticas ou epigenéticas, mas também da influência local que afetem a sobrevivência, o crescimento, a proliferação e o espalhamento das células alteradas.



Figura 20-24 Efeito de um promotor de tumor. O promotor de tumor cria um ambiente favorável à expansão de uma população de células mutantes, aumentando assim a possibilidade da progressão do tumor por novas alterações genéticas.

Vírus e outras infecções contribuem para uma proporção significativa de cânceres humanos

Uma pequena, porém significativa, proporção de cânceres humanos, talvez cerca de 15%, considerando o mundo todo, aparece por mecanismos que envolvem a participação de vírus, bactérias e parasitas. Os principais ofensores, como mostrado na **Tabela 20-1**, são os vírus de DNA. As evidências de sua participação vêm, em parte, da detecção de vírus em pacientes com câncer e, em parte, da epidemiologia. O câncer de fígado, por exemplo, é comum em certas partes do mundo (África e Sudoeste da Ásia) onde a infecção por hepatite

Tabela 20-1 Vírus associados a cânceres humanos

VÍRUS	CÂNCER ASSOCIADO	ÁREAS DE ALTA INCIDÊNCIA
Vírus de DNA		
Família dos papovavírus		
Papilomavírus (muitas cepas diferentes)	Verrugas (benigno carcinoma da cérvice uterina)	Universal Universal
Família dos hepadnavírus		
Vírus da hepatite B	Câncer de fígado (carcinoma hepatocelular)	Sudeste da Ásia, África Tropical
Família dos herpesvírus*		
Vírus Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt (câncer de linfócitos B) carcinoma nasofaringeal	África Ocidental, Nova Guiné (Papua) Sul da China, Groelândia
Vírus de RNA		
Família dos retrovírus		
Vírus da leucemia das células T humanas tipo 1 (HTLV-1)	Leucemia/Linfoma de célula T adulta	Japão, Antilhas
Vírus da imunodeficiência humana (HIV, o vírus da AIDS)	Sarcoma de Kaposi	Países do Sul e do Centro da África
Família dos flavivírus		
Vírus da hepatite C	Câncer de fígado (carcinoma hepato-celular)	Universal

No caso de todos os vírus acima, o número de pessoas infectadas é muito maior do que o número de cânceres que se desenvolvem. Os vírus devem atuar em conjunto com outros fatores. Além disso, alguns dos vírus contribuem apenas indiretamente. Por exemplo, o HIV destrói os linfócitos T auxiliares, o que possibilita que um herpesvírus transforme células endoteliais. De maneira semelhante, o vírus da hepatite C causa hepatite crônica, o que promove o desenvolvimento de um hepatocarcinoma.

B viral é comum, sendo que nessas regiões o câncer ocorre quase que exclusivamente em pessoas que mostram sintomas de infecção crônica por hepatite B. A infecção crônica com o vírus da hepatite C, com 170 milhões de infectados no planeta, claramente é associada ao desenvolvimento de câncer hepático.

O papel preciso de um vírus associado a um câncer frequentemente é difícil de ser decifrado porque há um retardo de muitos anos entre a infecção viral e o desenvolvimento do câncer. Além disso, os vírus são responsáveis por apenas uma de diversas etapas de evolução do câncer, e outros fatores ambientais e acidentes genéticos também estão envolvidos. Como explicaremos adiante, os vírus de DNA com frequência carregam genes que podem subverter o controle da divisão celular das células que os hospedam, causando uma proliferação descontrolada. Os vírus de DNA que agem dessa forma incluem os vírus dos papilomas humanos. Alguns desses vírus causam verrugas, enquanto outros infectam o cólon do útero e estão implicados no desenvolvimento dos carcinomas de cólon de útero.

Em alguns cânceres, os vírus parecem possuir ações adicionais de promoção de tumores, apesar de indiretas. O vírus da hepatite B, por exemplo, favorece o desenvolvimento de câncer de fígado tanto por causar danos que provocam a divisão das células hepáticas como por alterar diretamente o controle do crescimento celular. Na AIDS, o vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV, *human immunodeficiency virus*) promove o desenvolvimento de um câncer que, de outra maneira, seria muito raro, denominado sarcoma de Kaposi, ao destruir o sistema imunológico, permitindo assim a instalação de uma infecção secundária, como o vírus do herpes humano (HHV-8, *human herpes virus*), que tem uma ação carcinogênica direta. As infecções crônicas por parasitas e bactérias também podem promover o desenvolvimento de alguns cânceres. Por exemplo, as infecções do estômago causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*, que causa úlcera, acredita-se constituírem-se na principal causa do câncer de estômago. Além disso, o câncer de vesícula biliar está associado, em algumas partes do mundo, à infecção crônica pelo parasita *Schistosoma haematobium*, trematódeo hepático.

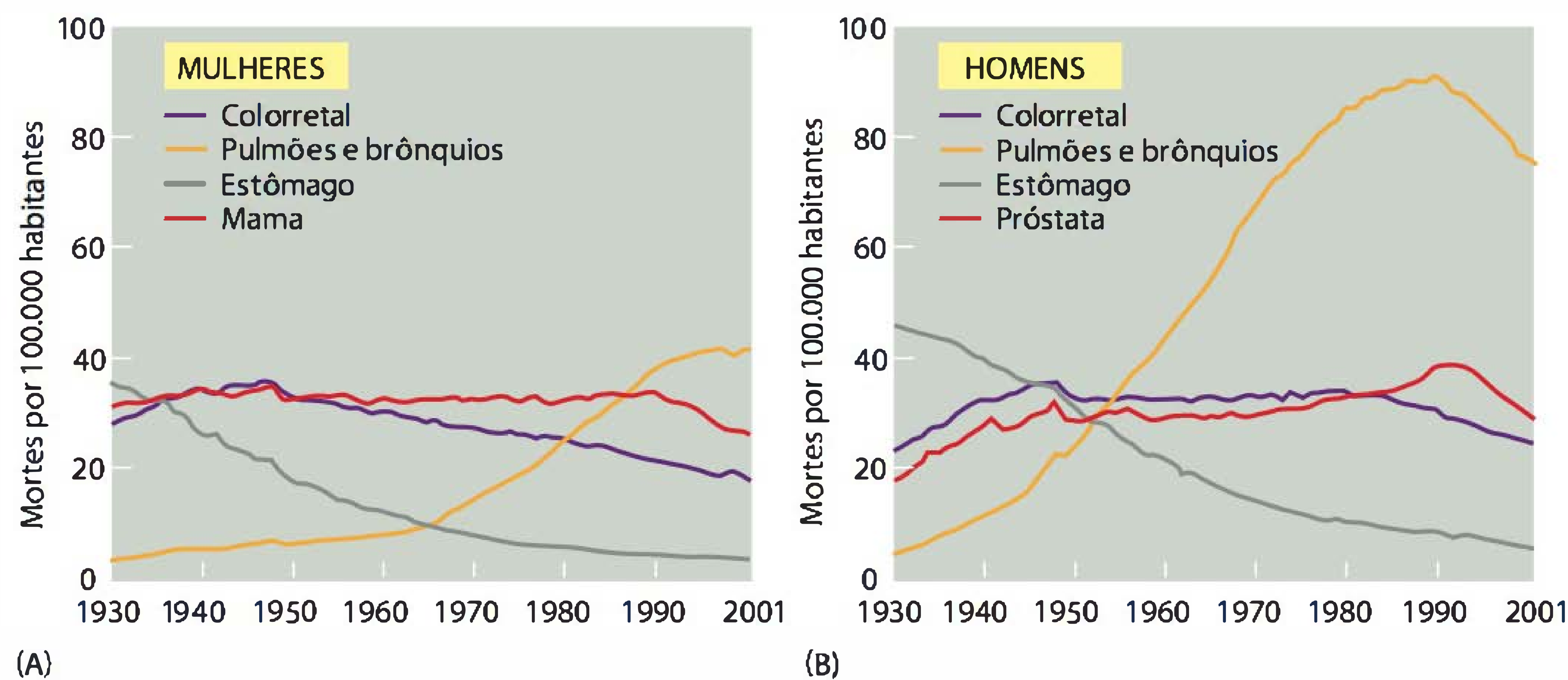


Figura 20-25 Taxas de mortalidade por câncer nos Estados Unidos, 1930-2001. Seleção de algumas taxas de mortalidade da população dos Estados Unidos ajustadas pela distribuição etária em 1970, para mulheres (A) e homens (B). Observar o dramático aumento do câncer de pulmão em ambos os sexos seguindo o padrão do hábito de fumar e a diminuição das mortes por câncer de estômago, possivelmente relacionada a mudanças na dieta e nos padrões de infecção por *Helicobacter*. As recentes reduções nas taxas de mortalidade por outros cânceres podem corresponder aos avanços ocorridos na detecção e no tratamento do câncer. Dados ajustados por faixa etária são necessários para compensar o aumento inevitável nas taxas de câncer à medida que a população aumenta a média de vida. (Adaptada de Cancer Facts and Figures, 2005. Com permissão da American Cancer Society.)

A identificação dos carcinógenos revela maneiras de evitar o câncer

No mundo atual, o tabagismo certamente é a causa ambiental mais importante do câncer. O tabaco contém tanto carcinógenos como promotores do tumor. Ainda não foram identificadas outras substâncias químicas que tenham uma importância comparável como causadoras de câncer. Imagina-se, às vezes, que as principais causas ambientais do câncer sejam produto de um estilo de vida altamente industrializado, o crescimento da poluição, o crescente uso de aditivos nos alimentos, e assim por diante, mas existem poucas evidências que suportem tal ponto de vista. Essa ideia deve ter surgido, ao menos em parte, da identificação de alguns materiais industriais altamente carcinogênicos, como a 2-naftilamina e o amianto. Na realidade, exceto pelo aumento dos cânceres provocados pelo fumo e pelo decréscimo considerável no câncer de estômago, que talvez reflita o decréscimo na infecção por *Helicobacter pylori*, a incidência dos cânceres mais comuns em indivíduos de diferentes faixas etárias não tem mudado muito durante os últimos cem anos (**Figura 20-25**).

A maior parte dos fatores carcinogênicos que certamente são os de maior importância não é de modo algum peculiar ao mundo moderno. O carcinógeno mais potente é, por certos ensaios, a aflatoxina B1 (ver Figura 20-22), produzida por um fungo que contamina naturalmente alimentos como o amendoim tropical, sendo uma importante causa de câncer de fígado na África e na Ásia. Alguns fatores que aceleram o câncer são intrínsecos ao nosso corpo. Além disso, nas mulheres, o risco de câncer é muito influenciado pelos hormônios sexuais que circulam pelo organismo nas diferentes fases da vida. Assim, existe uma correlação direta entre a história reprodutiva e a ocorrência de câncer de mama (**Figura 20-26**). Os hormônios sexuais, supõem-se, afetam a incidência de câncer de mama por sua influência na proliferação das células do seio. Está claro que para se tentar identificar causas do câncer no ambiente deve-se ter a mente aberta.

A epidemiologia – a análise da frequência das doenças nas populações – ainda é a principal ferramenta para se determinar as causas ambientais do câncer humano. Essa abordagem teve um sucesso extremamente notável e promete mais ainda nos tempos que estão por vir. Simplesmente por revelar o papel do tabagismo, a epidemiologia levou à redução de cerca de 25% no número de mortes por câncer na América do Norte e na Europa. Essa abordagem funciona melhor quando é aplicada a uma população uniforme na qual seja fácil distinguir entre os indivíduos que foram expostos ao agente e os que não foram e, ainda, quando o agente em questão for responsável pela maioria dos casos de certo tipo de câncer. Por exemplo, na primeira metade do século passado, em determinada fábrica na Inglaterra, todos os homens que trabalhavam na destilação de 2-naftilamina (portanto, submetidos a

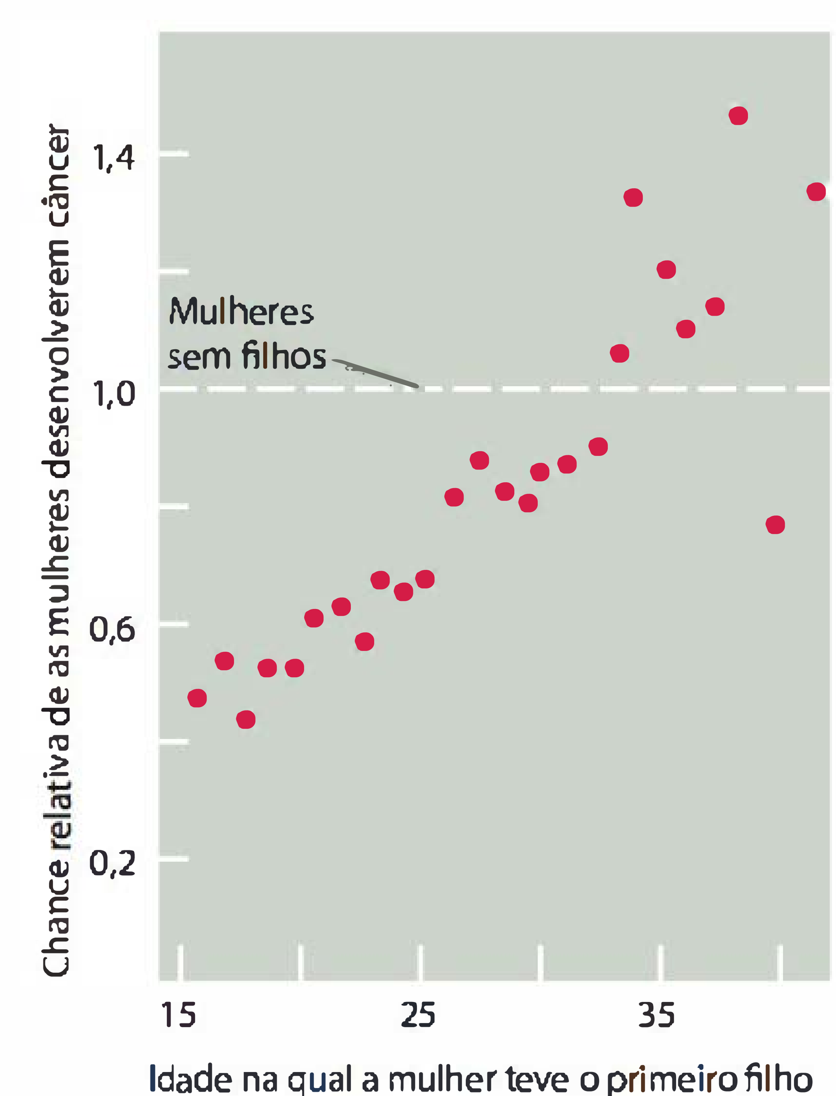


Figura 20-26 Efeitos da gravidez no risco de câncer de mama. A probabilidade relativa de desenvolver um câncer de mama em determinados momentos da vida de uma mulher está colocada no gráfico em função da sua idade ao ter o primeiro filho. O gráfico mostra os valores da probabilidade em relação àquela de uma mulher sem filhos. Quanto maior for o período de exposição aos hormônios reprodutivos antes do nascimento do primeiro filho, maior será o risco. Ao que parece, a primeira gravidez levada a termo pode levar a uma alteração permanente no estado de diferenciação das células da mama, alterando sua subsequente resposta aos hormônios. Várias outras linhas de evidências epidemiológicas também dão sustentação à ideia de que a exposição a certa combinação de hormônios da reprodução, especialmente aos estrógenos, pode levar ao desenvolvimento de câncer de mama. (J. Cairns, Cancer: Science and Society. São Francisco: W.H. Freeman, 1978. Com base em B. MacMahon, P. Cole e J. Brown, *J. Natl Cancer Inst.* 50:21-42, 1973. Com permissão de Oxford University Press.)

uma exposição prolongada) desenvolveram câncer de bexiga (ver Figura 20-8); assim, foi relativamente fácil estabelecer uma relação entre os dois fatos, porque tanto a substância química como a forma de câncer não eram comuns na população daquele país.

Por outro lado, apenas por meios epidemiológicos é muito difícil identificar os fatores ambientais presentes na vida cotidiana que favorecem o desenvolvimento dos cânceres mais comuns. A maioria desses fatores, provavelmente, constitui-se de agentes aos quais se está exposto em certa medida, e muitos deles provavelmente contribuem em conjunto para a incidência de determinado tipo de câncer. Se for dito que comer laranjas duplica ou reduz pela metade o risco de câncer colorretal, é improvável que isso possa ser confirmado, a menos que se tenha alguma razão anterior para suspeitar dessa relação. O mesmo se aplica a diversas outras substâncias que entram no organismo humano por alimentos, bebidas e respiração. As evidências epidemiológicas são relativamente claras no que diz respeito à dieta: como mencionado anteriormente, muita comida, o que leva à obesidade, significativamente aumenta o risco de câncer.

Mesmo quando se obtém alguma evidência de que determinada substância possa ser carcinogênica, por meio da epidemiologia ou de testes de laboratório, pode ser difícil decidir quais os níveis aceitáveis para exposição humana. Se já é difícil estimar quantos casos de cânceres humanos uma certa quantidade de substância pode causar, mais difícil ainda é o equilíbrio entre o risco e o benefício dessa substância. Por exemplo, certos fungicidas de uso agrícola parecem ser levemente carcinogênicos em altas doses, quando testados em animais. Entretanto, calcula-se que, se eles não fossem usados na agricultura, a contaminação dos alimentos com metabólitos, como a aflatoxina B1, causaria um número de casos de câncer muito maior do que aquele que os resíduos de fungicida nos alimentos possam causar.

Mesmo assim, os esforços para identificar possíveis carcinógenos ainda têm um papel central na luta contra o câncer. A prevenção não é somente melhor do que a cura, para muitos tipos de câncer, como também é prontamente atingível.

Resumo

Agentes ambientais aceleram a progressão e a taxa de desenvolvimento do tumor. Tais fatores podem agir como iniciadores ou promotores de tumor. Os promotores induzem uma resposta inflamatória e criam um ambiente local que altera a expressão gênica, estimula a proliferação celular e aumenta a população de células mutantes criadas pelo iniciador tumoral. Em sua maioria, os agentes ambientais conhecidos que aumentam o desenvolvimento do câncer são mutagênicos, incluindo os carcinógenos químicos e várias formas de radiação, como a ultravioleta e a ionizante. Como muitos dos fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento de um determinado câncer e alguns deles estão sob nosso controle, uma grande proporção de cânceres a princípio pode ser prevenida.

Os achados de que uma população imigrante adota os padrões de câncer do seu novo país sugerem fortemente que a maioria dos cânceres pode ser evitada pela mudança na alimentação e na exposição a outros fatores ambientais. A epidemiologia pode ser uma ferramenta poderosa na identificação dos efeitos dos fatores ambientais no câncer humano. A abordagem epidemiológica não requer o conhecimento de como um agente ambiental age, podendo também descobrir fatores que não são entidades químicas, como estilo de vida e certos padrões de gravidez. Os indivíduos poderão então evitar muitos dos fatores de risco ambientais que são assim identificados, incluindo o tabagismo e certas práticas que levam à infecção com vírus causadores de câncer, como o papiloma vírus e os vírus da hepatite B e C. Entretanto, como os diversos fatores que afetam o risco de câncer são difíceis de identificar, ainda não são conhecidos os principais fatores ambientais que afetam a incidência do câncer.

DESCOBRINDO OS GENES CRÍTICOS PARA O CÂNCER

Como vimos, o câncer depende do acúmulo de alterações hereditárias em células somáticas. Para compreendê-lo em nível molecular é necessário identificar as mutações e as alterações epigenéticas envolvidas e descobrir como elas levam a um comportamento celular canceroso. Encontrar as células relevantes é fácil; elas são favorecidas pela seleção natural e chamam a atenção por originarem tumores. Porém, como identificar o pequeno número de genes com as alterações promotoras de câncer entre todos os outros genes em uma célula

cancerosa? Semelhante a achar uma agulha no palheiro é a busca de um gene que dá origem a um determinado fenótipo com câncer, mas a tarefa é particularmente complexa. Um câncer típico depende da soma de um conjunto de mutações e alterações epigenéticas – em geral diferentes em cada paciente canceroso – e a introdução de um conjunto em uma célula normal não é suficiente para torná-la cancerosa. Em adição, a cooperação entre diferentes genes afetados faz com que seja trabalhoso testar a significância de uma alteração herdável em um gene individual. Para piorar a situação, uma determinada célula cancerosa também contém um grande número de mutações somáticas que são produtos secundários acidentais da instabilidade genética, e poderá ser difícil diferenciá-las das mutações que têm papel determinante na doença.

Apesar dessas dificuldades, muitos dos genes repetidamente alterados nos cânceres humanos foram identificados – algumas centenas deles –, embora esteja claro que ainda faltam muitos a ser descobertos. Na falta de um termo mais apropriado para denominar todos aqueles genes cujas alterações contribuem para a causa do câncer, será usada a denominação **genes críticos para o câncer**. O conhecimento desses genes tem-se acumulado, passo a passo, através de diferentes abordagens derivadas de outros estudos, desde os primeiros estudos sobre câncer em galinhas até a investigação do desenvolvimento embrionário. A análise de casos raros de formas hereditárias de câncer também tem contribuído para o nosso entendimento. Recentemente, o sequenciamento do DNA de múltiplos casos específicos de câncer começou a delinear uma figura mais sistemática das alterações genéticas que são um apanágio destas doenças.

Nesta seção, serão discutidos os métodos utilizados para identificar os genes críticos para o câncer e os vários tipos de alterações herdadas que ocorrem nas células durante o desenvolvimento do câncer.

A identificação de mutações determinantes de ganho ou de perda de função requer métodos distintos

Os genes críticos para o câncer são agrupados em duas classes mais abrangentes segundo o risco de o câncer decorrer de uma atividade muito aumentada ou diminuída do produto do gene. Os genes da primeira classe, nos quais uma mutação que cause aumento de função leva a um câncer, são denominados **proto-oncogenes**, e os seus mutantes, as formas hiperativas, são denominados **oncogenes**. Os genes da segunda categoria, nos quais as mutações que levam à perda de função podem contribuir com o câncer, são denominados **genes supressores de tumor**. Uma terceira classe, cujos efeitos são mais indiretos, inclui aqueles genes cujas mutações resultam em uma instabilidade genômica, classe descrita como genes de manutenção do DNA.

Como será visto, mutações nos oncogenes e nos genes supressores de tumor podem ter efeitos semelhantes em aumentar a proliferação celular e a sobrevivência, assim como promover o desenvolvimento do tumor. Assim, do ponto de vista da célula cancerosa, os oncogenes e os supressores de tumor – e as mutações que os afetam – são os dois lados de uma mesma moeda. As técnicas necessárias para encontrar esses genes, entretanto, são diferentes, sendo determinadas dependendo de o gene ser hiperativo ou hipoativo no câncer.

As mutações em uma única cópia de um proto-oncogene que o converte em um oncogene podem ter um efeito dominante em promover o crescimento celular (**Figura 20-27**A). Assim, podemos identificar o oncogene pelo seu efeito quando é *adicionado* – por transfecção do DNA, por exemplo, ou por uma infecção com um vetor viral – ao genoma de uma célula-teste. Por outro lado, no caso do gene supressor de tumor, os alelos causadores de câncer produzidos pela alteração em geral são recessivos: com frequência (mas nem sempre) ambas as cópias do gene normal devem ser removidas ou inativadas na célula diploide somática antes que um efeito seja visto (Figura 20-27B). Tal fato necessita de uma abordagem diferente direcionada à detecção do que é *perdido* em uma célula cancerosa.

Em alguns casos, uma anomalia cromossômica grosseira, visível ao microscópio, está repetidamente associada a determinado tipo de câncer. Isso pode dar uma pista sobre a localização de um oncogene que tenha sido ativado devido a algum rearranjo cromossômico (como no caso da translocação cromossômica responsável pela leucemia mieloide crônica, discutida anteriormente). Alternativamente, uma deleção visível de um segmento cromossômico poderá revelar o local da deleção de um gene supressor de tumor.

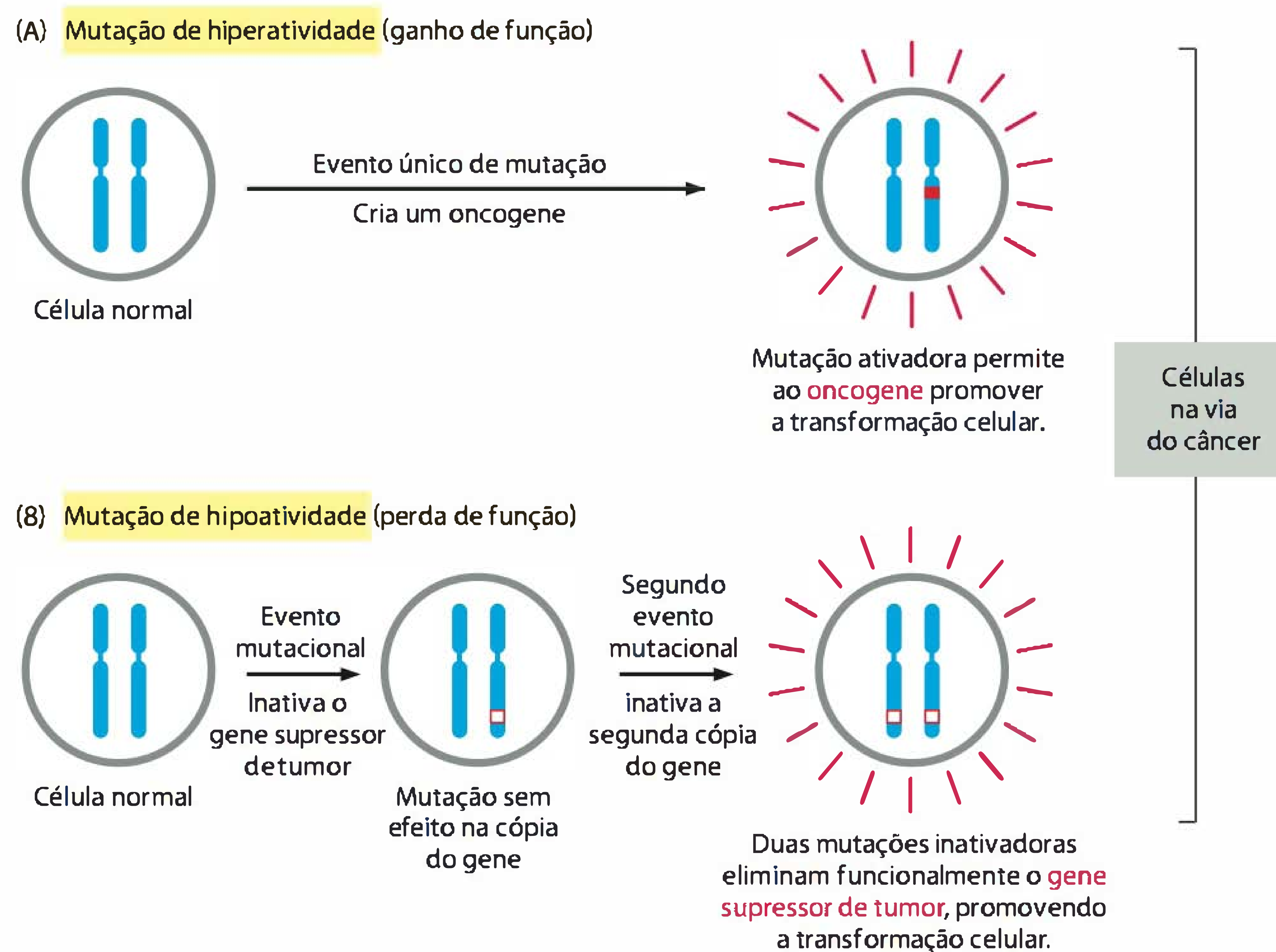


Figura 20-27 As mutações críticas do câncer situam-se em duas categorias completamente distintas, dominante e recessiva. No diagrama, mutações ativadoras são representadas por *caixas vermelhas sólidas*, e mutações inativadoras, por *pequenas caixas vermelhas*. (A) Oncogenes agindo de uma maneira dominante: uma mutação para ganho de função em uma das cópias do gene crítico para o câncer conduz a célula em direção à malignidade. (B) por outro lado, mutações em genes supressores de tumor geralmente agem de maneira recessiva: a função de ambos os alelos dos genes críticos para o câncer deve ser perdida para conduzir a célula em direção ao câncer. Apesar de o diagrama mostrar que o segundo alelo do gene supressor de tumor é inativado pela mutação, frequentemente é inativado pela perda do segundo cromossomo. Não é mostrado o fato de que a mutação de alguns genes supressores de tumor pode ter um efeito mesmo que apenas uma cópia de um dos dois genes seja lesionada.

Retrovírus podem agir como vetores de oncogenes que alteram o comportamento celular

Os **vírus tumorais** desempenharam um papel marcante na busca das causas genéticas dos cânceres humanos. Apesar de os vírus não possuírem função na maioria dos cânceres humanos mais comuns, eles são mais proeminentes como causa de câncer em algumas espécies animais. Análises dos vírus tumorais de origem animal trouxeram um componente crítico para o entendimento do mecanismo do câncer em geral e também para a descoberta dos oncogenes em particular.

Um dos primeiros vírus de animal a ser implicado em câncer foi descoberto há mais de cem anos em galinhas, que estão sujeitas a infecções que causam tumores no tecido conectivo, ou sarcoma. O agente infeccioso foi caracterizado como um vírus – o *vírus do sarcoma de Rous*, que agora sabemos ser um vírus de RNA. Como todos os outros *vírus de RNA tumorais* descobertos desde então, é um **retrovírus**. Quando infecta uma célula, o seu RNA é transcrito em DNA por um processo de transcrição reversa, e o DNA é inserido no genoma celular, onde poderá persistir e ser transmitido para gerações celulares subsequentes. O vírus do sarcoma de Rous carrega um oncogene que causa câncer em galinhas. O oncogene não é essencial à sobrevivência e à replicação viral, como demonstrado com a descoberta de formas mutantes do vírus que se multiplicam normalmente, sem no entanto tornar a célula hospedeira cancerosa – por um processo chamado de *transformação* celular. Alguns dos mutantes perderam parte do gene ou o próprio gene que codifica uma proteína denominada **Src** (pronuncia-se "sarc"). Outras mutações no gene foram determinantes para tornar o princípio transformante sensível à temperatura: células infectadas mostram um fenótipo transformante quando cultivadas a 34°C, porém retornam ao fenótipo normal dentro de poucas horas quando a temperatura alcança 39°C.

Qual a origem do gene? Em 1975, quando uma cópia radiativa de sequências do DNA do gene *Src* foi usada como sonda para a busca de sequências relacionadas por hibridização DNA-DNA (ver Figura 8-36), o genoma de células de vertebrados mostrou sequências muito próximas, mas não idênticas ao gene viral. O oncogene viral evidentemente foi incorporado de forma acidental ao retrovírus a partir do genoma de uma célula hospedeira previamente infectada, mas o proto-oncogene da célula hospedeira (*c-Src*) sofreu mutações durante o processo e tornou-se um oncogene (*v-Src*) (**Figura 20-28**). A descoberta de que o câncer poderia se originar de mutações de um gene específico presente no genoma de um animal normal alterou profundamente o campo da pesquisa em câncer.

Desde então, um amplo número de outros oncogenes foi identificado em outros retrovírus e analisado de maneira semelhante. Cada análise levou à descoberta de um proto-oncogene correspondente presente em células normais do animal.

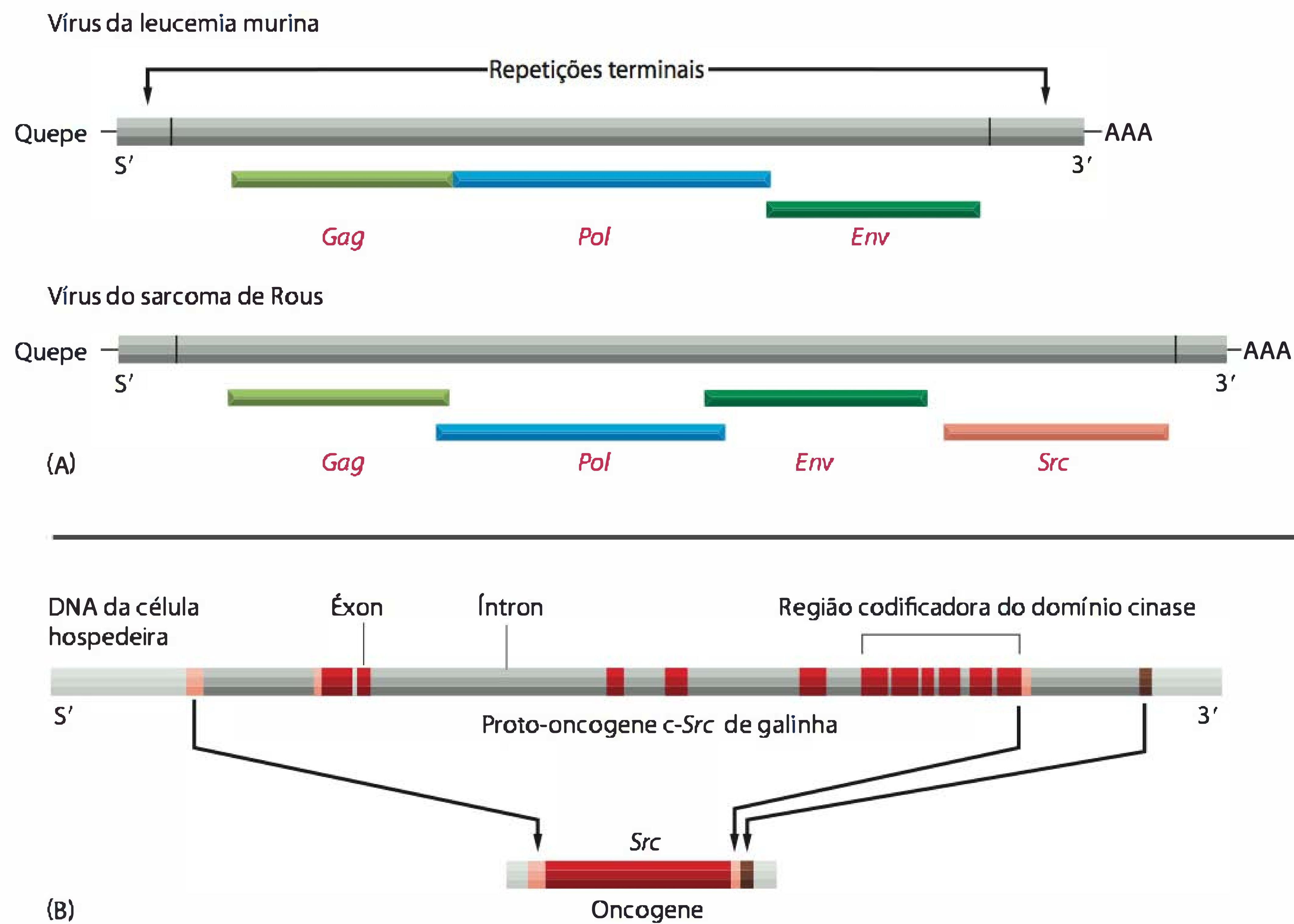


Figura 20-28 Estrutura do vírus do sarcoma de Rous. (A) A organização do genoma viral em comparação a um retrovírus mais típico (vírus da leucemia murina). O vírus do sarcoma de Rous é atípico entre os retrovírus que transportam oncogenes porque retém os três genes necessários para o ciclo da reprodução viral: *Gag* (que produz uma poliproteína clivada para gerar as proteínas do capsídeo), *Pol* (que produz a transcriptase reversa e uma outra enzima envolvida na integração do cromossomo viral ao genoma celular) e *Env* (que produz a glicoproteína do envelope.) Em outros retrovírus oncogênicos, um ou mais destes genes são total ou parcialmente perdidos quando o retrovírus adquire o oncogene transformante. Desse modo, o vírus transformante poderá gerar partículas infecciosas somente em células infectadas simultaneamente com um outro vírus não-defectivo e não-transformante *(helper vírus)*, que supre as funções perdidas. (B) A relação entre o oncogene *v-Src* e o proto-oncogene celular *Src* do qual foi derivado. Os íntrons presentes no *Src* celular foram removidos (*splice*) do *v-Src*; em adição, o *v-Src* contém mutações que alteram a sequência de aminoácidos na proteína (dados não-mostrados), tornando-o hiperativo e desregulado como uma proteína-cinase tirosina-específica (ver Figura 3-69). A proteína v-Src também é superproduzida porque o vírus faz uma grande quantidade de RNA.

Diferentes buscas por oncogenes sempre convergem para o mesmo gene – Ras

Enquanto alguns investigadores procuraram oncogenes em retrovírus, outros em uma abordagem mais direta procuraram por sequências de DNA em células cancerosas humanas que pudessem provocar proliferação sem controle quando introduzidas em linhagens celulares normais. Como células-teste para os ensaios, foram usadas linhagens derivadas de fibroblastos de camundongo. Tais células, previamente selecionadas para proliferar indefinidamente em cultivo, ao que parece, contêm alterações genéticas que as colocam no caminho da malignidade. Por essa razão, a adição de um único oncogene poderá ser o suficiente para causar um efeito dramático.

Para se detectar um oncogene, o DNA é extraído de células tumorais, fragmentado e introduzido em células em cultivo. Se algum dos fragmentos de DNA contiver um oncogene, pequenas colônias de células com proliferação anormal começarão a aparecer; as células formadoras de colônias que expressam propriedades de câncer são consideradas *transformadas*, ou seja, sofreram **transformação**. Cada colônia é um clone celular originário de uma célula única, transportando um gene adicionado que libera a célula de alguns dos controles de proliferação; as células transformadas formadoras de colônias crescem sem controle, ultrapassam as células não-transformadas na cultura e começam a se empilhar em camadas uma atrás da outra à medida que proliferam (**Figura 20-29**).

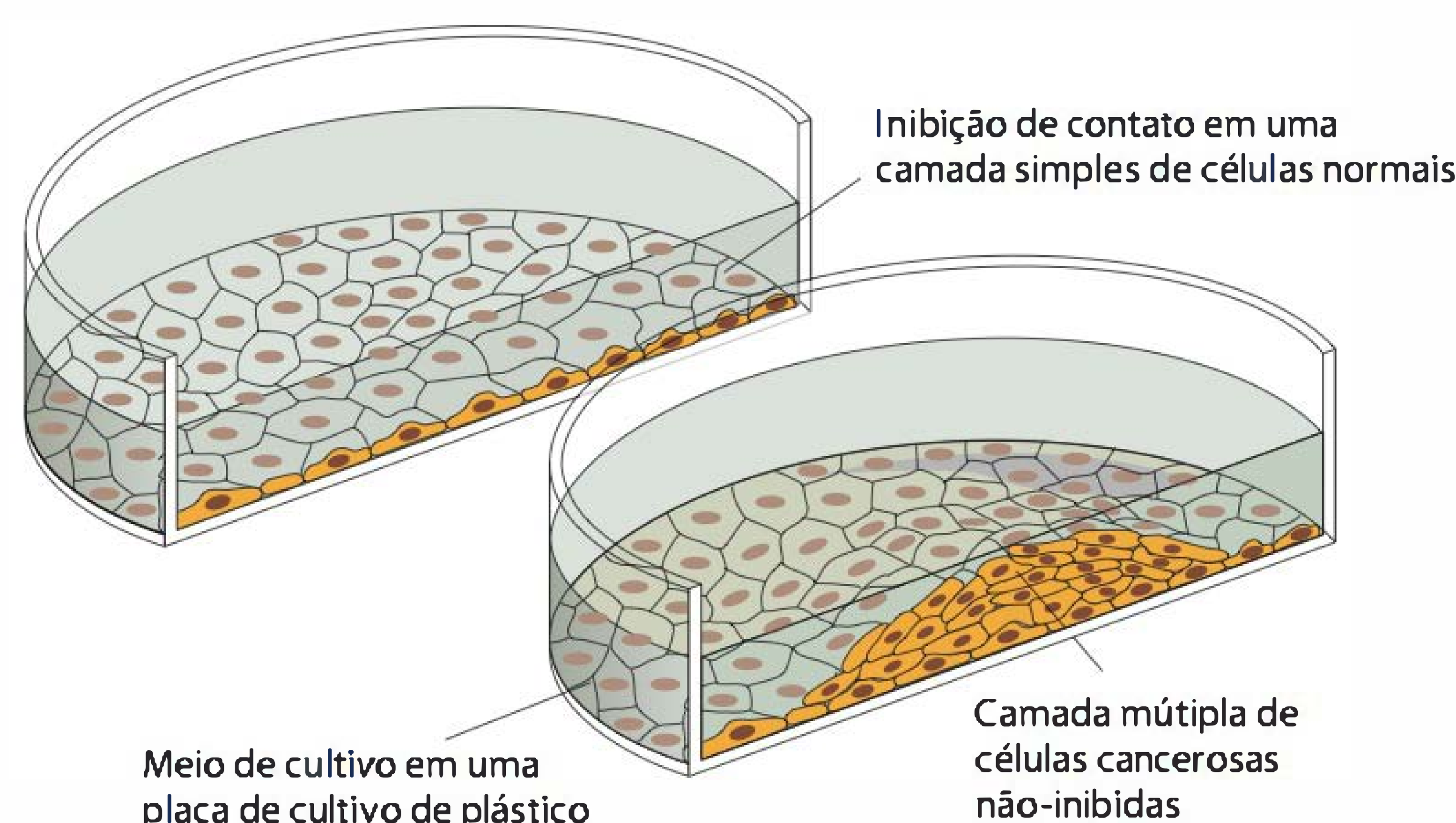


Figura 20-29 Perda da inibição de contato em uma cultura celular. A maioria das células normais para a proliferação assim que forma uma camada única de células na placa de cultivo: a proliferação, ao que parece, depende do contato com a placa, e, para ser inibida, depende do contato com outras células – fenômeno conhecido como "inibição de contato". Células cancerosas, no entanto, não cumprem tal preceito e continuam a crescer, formando camadas sobre camadas.

Este ensaio levou ao isolamento e ao sequenciamento do primeiro oncogene humano, uma versão mutada do proto-oncogene ***Ras***. O gene *Ras*, sabe-se agora, está mutado uma vez em cada cinco cânceres humanos. A descoberta do oncogene humano *Ras* foi dramática porque, pouco tempo antes, um gene *Ras* mutado foi caracterizado como um gene causador de tumor em um retrovírus que causa sarcoma em roedores. A descoberta na primeira metade de 1980 do mesmo retrovírus em células tumorais humanas e em um vírus causador de tumor em animais foi muito importante. A implicação de que os cânceres são causados por mutações em um número limitado dos genes críticos para o câncer mudou completamente nosso entendimento da biologia molecular do câncer.

Como discutido no Capítulo 15, as proteínas Ras normais são GTPases monoméricas que ajudam a transmitir sinais dos receptores da superfície celular para o interior da célula. Os oncogenes *Ras* isolados de tumores humanos contêm mutações pontuais que criam uma hiperatividade nas proteínas Ras que não pode ser desligada mesmo pela hidrólise do GTP ligado em GDP. Devido à hiperatividade da proteína, o efeito é dominante – isto é, apenas uma cópia das duas existentes no gene precisa ser alterada para o efeito ser produzido. Devido ao gene *Ras* ser mutado em uma ampla variedade de cânceres humanos, permanece sendo um dos mais importantes exemplos de genes críticos para o câncer.

Por meio de métodos como os descritos há pouco, além de várias outras vias, agora conhecemos centenas de proto-oncogenes – isto é, genes que podem ser convertidos pela ativação de mutações no oncogene que ajuda a causar o câncer.

Estudos de síndromes cancerosas hereditárias raras identificaram os genes supressores de tumor

A identificação do gene que foi inativado necessita de uma estratégia diferente da usada para identificar um gene que tenha se tornado hiperativo. Não se pode, por exemplo, usar os testes de transformação de células para identificar algo que simplesmente não está presente. O raciocínio básico que levou à descoberta do primeiro gene supressor de tumor veio dos estudos de um tipo raro de câncer humano, denominado **retinoblastoma,** que surge de células da retina ocular que são convertidas ao estado canceroso por um pequeno número de mutações. Como frequentemente acontece em biologia, a descoberta surgiu pelo exame de um caso especial, que revelou um gene de relevância amplamente difundida. De fato, genes identificados em casos raros de síndrome cancerosa familiar comumente são relevantes em casos de cânceres esporádicos, mas comuns, onde com frequência servem como supressores de tumor.

O retinoblastoma ocorre na infância, afetando 1 a cada 20 mil crianças. O tumor desenvolve-se a partir de células precursoras neurais presentes na retina imatura. Existem duas formas da doença, uma sendo hereditária e a outra não. Na forma hereditária geralmente há o aparecimento independente de muitos tumores, afetando ambos os olhos. Na forma não-hereditária, apenas um olho é afetado e por apenas um tumor. Alguns indivíduos com retinoblastoma hereditário têm um cariótipo nitidamente anormal, com deleção em uma banda específica do cromossomo 13. As deleções no mesmo lócus também são encontradas em alguns pacientes com a forma não-hereditária da doença, indicando que o câncer pode ter sido causado pela perda de um gene crítico localizado naquela região do cromossomo.

Com o conhecimento da localização da deleção associada ao retinoblastoma, foi possível clonar e sequenciar o gene cuja perda parecia ser decisiva para o desenvolvimento do câncer, o **gene *Rb***. Como previsto, nos indivíduos que sofrem da forma hereditária da doença, há uma deleção ou uma mutação que leva à perda da função em uma das cópias do gene *Rb* em cada uma das células somáticas. Assim, essas células estão predispostas a ser cancerosas, mas não seriam efetivamente cancerosas se uma das cópias do gene fosse a cópia boa. As células da retina que se tornam cancerosas têm defeito em ambas as cópias do gene Rb pois o evento somático eliminou a função da cópia previamente boa.

Diferentemente, em pacientes com a forma não-hereditária da doença, as células não-cancerosas não mostram defeito algum em qualquer das cópias do *Rb*, enquanto as células cancerosas novamente têm ambas as cópias defeituosas. Esses retinoblastomas não-hereditários são muito raros porque, para que ambas as cópias do gene *Rb* sejam destruídas, é necessário que ocorram duas mutações somáticas coincidentes em uma única linhagem de células da retina (**Figura 20-30**). O gene *Rb*, em seguida, revelou ser muito mais do que um gene mutado em uma doença infantil rara. Ele também está faltando em vários tipos de câncer bastante comuns, incluindo os carcinomas de pulmão, de mama e de bexiga. Esses

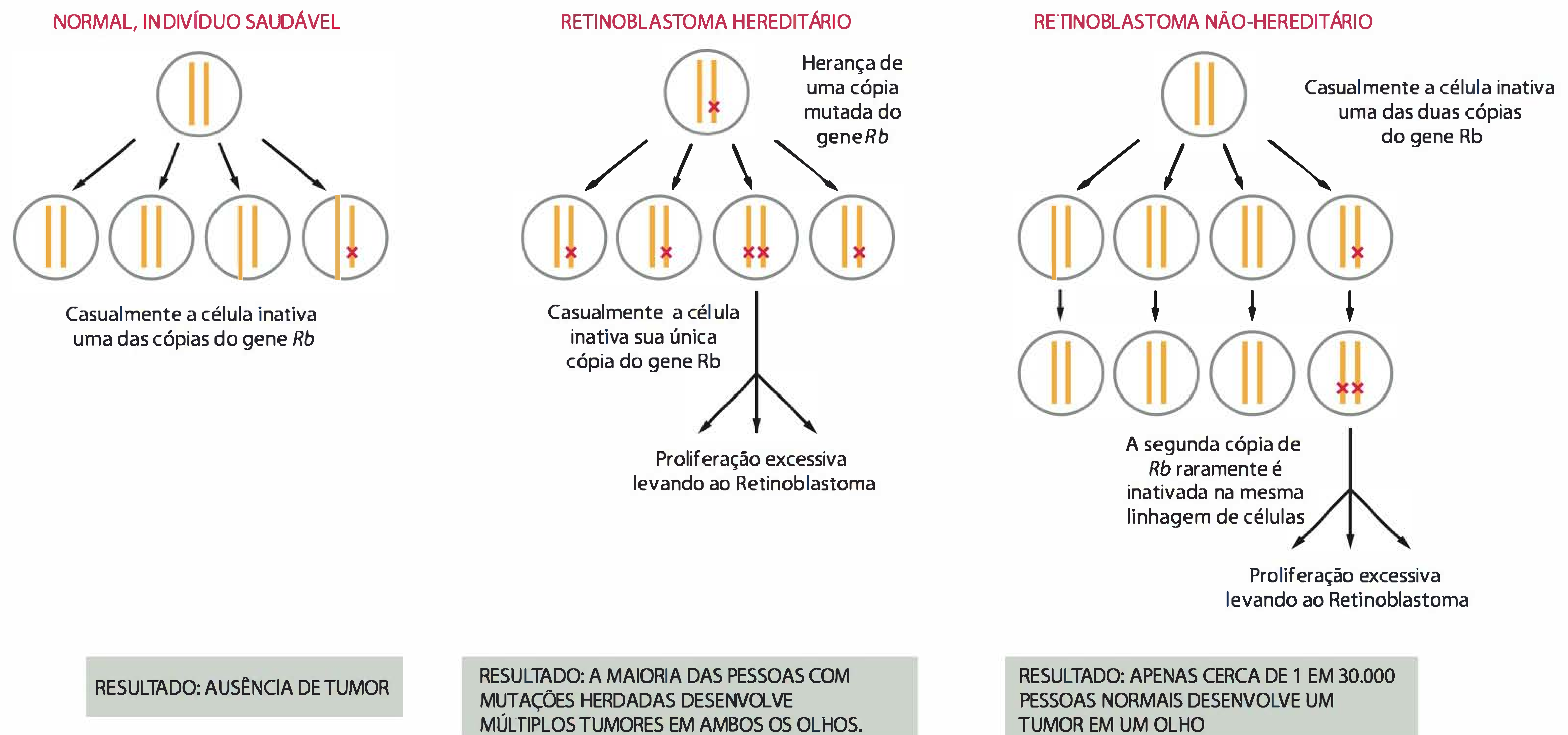


Figura 20-30 Os mecanismos genéticos que causam retinoblastoma. Na forma hereditária, todas as células do corpo perdem uma das duas cópias do gene supressor de tumor *Rb*, e tumores ocorrem onde a cópia remanescente é perdida ou inativada, por um evento somático (mutação ou silenciamento epigenético). Na forma não-hereditária, todas as células inicialmente contêm duas cópias funcionais do gene, e o tumor surge porque ambas as cópias são perdidas ou inativadas pela coincidência de dois eventos somáticos em uma linhagem celular.

cânceres mais comuns, entretanto, são produzidos por uma série de mudanças genéticas muito mais complexas do que aquelas do retinoblastoma, aparecendo em fases mais tardias da vida e em outros tecidos corporais. Parece, no entanto, que em todos eles a perda do *Rb* frequentemente é a principal etapa em direção à malignidade.

O gene *Rb* codifica para a **proteína Rb**, que é uma reguladora universal do ciclo celular e normalmente é expressa em praticamente todas as células do organismo (ver Figura 17-62). Devido ao fato de o *Rb* ser um dos principais interruptores do progresso da divisão celular, sua perda pode possibilitar que as células entrem inapropriadamente em ciclos de divisão celular, como será discutido mais tarde.

Os genes supressores podem ser identificados no estudo de tumores

A história do Rb ilustra como uma síndrome cancerosa hereditária e rara pode ser utilizada para descobrir os genes supressores de tumor relevantes aos cânceres esporádicos comuns. No entanto, somente poucos genes supressores de tumor certamente importantes foram descobertos dessa maneira. Uma abordagem mais direta para a identificação de tais genes envolve a comparação de células tumorais com células normais do mesmo paciente para descobrir exatamente quais nucleotídeos dos 3 bilhões do genoma humano se perderam, estão funcionalmente defectivos ou anormalmente silenciados. Dada a instabilidade genética das células cancerosas, as alterações são intensas. A maioria das alterações ocorre ao acaso e acidentalmente por produtos gerados pela instabilidade genética. Portanto, um gene supressor de tumor relevante somente poderá ser identificado pelo critério de perdas repetidas, ser defeituoso ou silenciado em muitos casos de um dado tipo de câncer. Seguir uma pista de um gene supressor de tumor, deste modo, é uma tarefa árdua, mas realizável com as técnicas modernas de análise de DNA em larga escala (como será explicado a seguir). Dezenas de genes supressores de tumor já foram caracterizados e muitos mais são conhecidos.

Os genes supressores de tumor podem ser inativados por mecanismos genéticos e epigenéticos

A inativação de genes supressores de tumor é perigosa. Tal inativação pode ocorrer de diferentes maneiras, com diferentes combinações de infortúnios que convergem para eliminar ou mutilar ambas as cópias do gene. A primeira cópia poderá, por exemplo, ser perdida por uma pequena deleção cromossômica ou inativado por uma mutação pontual. A se-

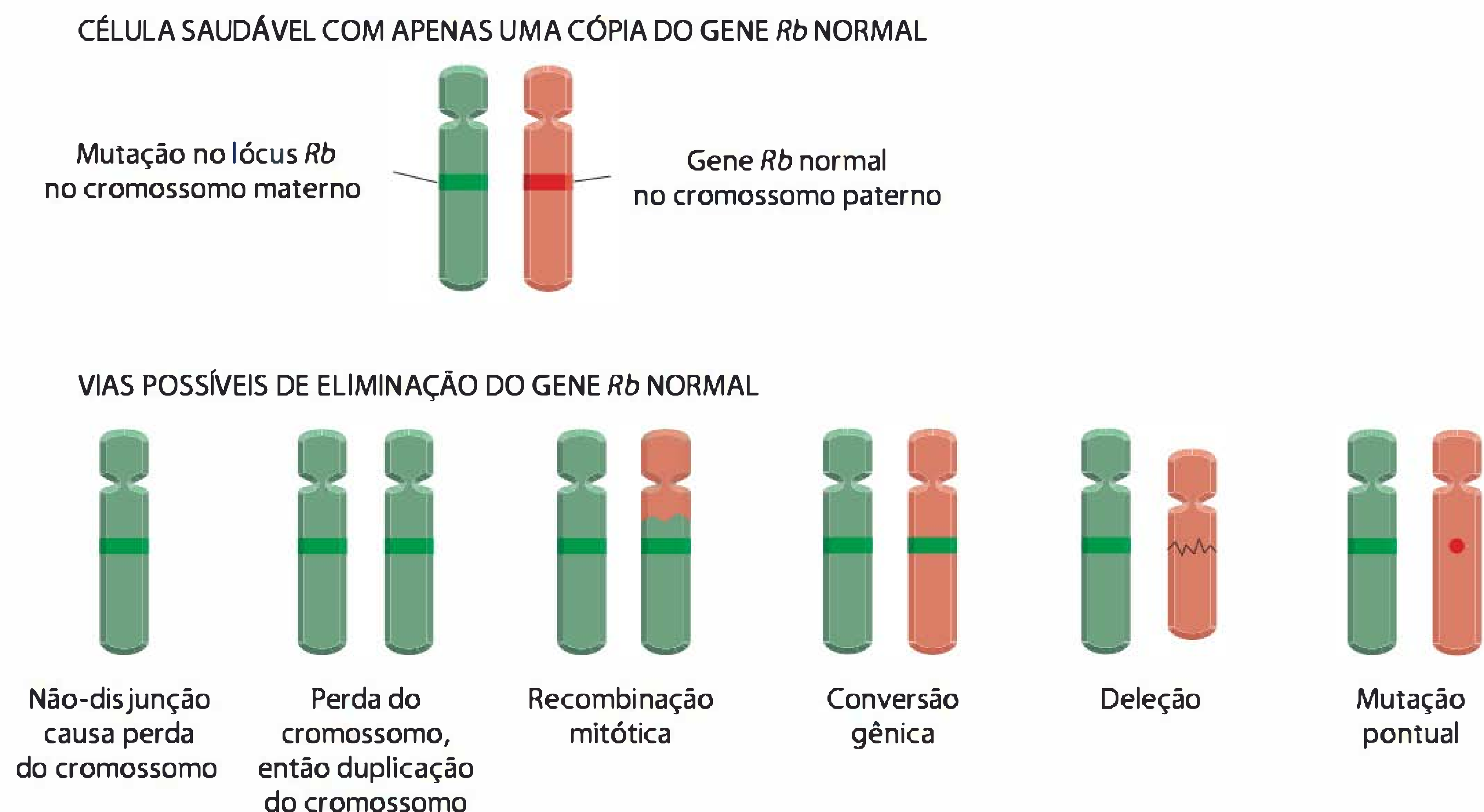


Figura 20-31 Seis vias de perda da cópia boa remanescente de um gene supressor de tumor por meio de alterações nas sequências de DNA. Uma célula defectiva em apenas uma das suas duas cópias de um gene supressor de tumor – por exemplo, o gene *Rb* – normalmente se comporta como uma célula saudável normal; os diagramas abaixo mostram como esta célula também pode perder a função da outra cópia do gene e assim progredir para o câncer. Uma sétima possibilidade, frequentemente encontrada em alguns supressores de tumor, é de que o gene pode ser silenciado por uma alteração epigenética, sem alteração da sequência de DNA, como ilustrado na Figura 20-32. (Segundo W. K. Cavenee et al., *Nature* 305:779-784, 1983. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

gunda cópia comumente é eliminada por um mecanismo menos específico, porém mais provável: o cromossomo que carrega a cópia normal remanescente poderá ser perdido pela célula durante a segregação cromossômica, ou o gene normal poderá ser substituído por uma versão mutante por meio de recombinação mitótica ou por um evento de conversão gênica.

A **Figura 20-31** resume o leque de possibilidades de como a cópia remanescente de um gene supressor de tumor através do sequenciamento muda, usando-se o gene *Rb* como um exemplo. É importante salientar que, exceto pelo mecanismo de mutação pontual bem à direita da figura, estas vias produzem células que transportam somente um único tipo de sequência de DNA na região cromossômica contendo os seus genes *Rb* – uma sequência que é idêntica à sequência existente no cromossomo mutante original.

Como discutido no Capítulo 4, as variações genéticas humanas normais tornam os conjuntos dos nossos cromossomos maternos e paternos perceptivelmente diferentes. Em média, as sequências de DNA humanas diferem – isto é, somos heterozigotos – aproximadamente um em cada mil nucleotídeos. Onde um grande segmento de um cromossomo foi perdido ou convertido a uma sequência de DNA do cromossomo homólogo, como no exemplo da Figura 20-31, existe uma *perda da heterozigose*: apenas uma versão de cada sequência variável do DNA na vizinhança permanece. Milhões de sítios comuns de heterozigose no genoma humano foram mapeados como parte do Projeto Genoma Humano: cada um dos sítios é caracterizado por uma sequência específica de DNA que é polimórfica – o que significa que em geral ocorrem em duas ou mais versões levemente diferentes da população humana. A partir de uma amostra do DNA do tumor, pode-se verificar qual das versões das sequências polimórficas estará presente. O mesmo procedimento pode ser feito com uma amostra de DNA de tecido não-canceroso do mesmo paciente para comparação. Uma perda da heterozigose de uma região do genoma contendo um ou mais sítios polimórficos, ou uma perda da sequência de uma marca genética que é vista no DNA do controle normal, pode apontar o caminho para uma região cromossômica que contém um gene supressor de tumor relevante. Entretanto, devido a sua instabilidade genética, as células cancerosas frequentemente exibem uma perda de heterogeneidade para muitas das diferentes regiões cromossômicas. Logo, a detecção de genes supressores de tumor por esta abordagem geralmente requer a subtração de grande número de eventos ao acaso.

As alterações epigenéticas fornecem um outro caminho importante para inativar permanentemente um gene supressor. Mais comumente, o gene poderá ser empacotado na heterocromatina, e o nucleotídeo C na sequência CpG do seu promotor poderá ser metilado de uma maneira herdável (ver Figura 20-12). Tais mecanismos podem silenciar irreversivelmente o gene em uma célula e em sua progênie. Dado um catálogo de possíveis genes supressores de tumor, é relativamente fácil testar os seus promotores para uma quantidade anormal de metilação de DNA. Tais tipos de estudos sugerem que o silenciamento gênico por fatores epigenéticos é um evento frequente na progressão do tumor e assim, ao que parece, os mecanismos epigenéticos ajudam a inativar muitos genes supressores diferentes na maioria dos cânceres humanos (**Figura 20-32**).

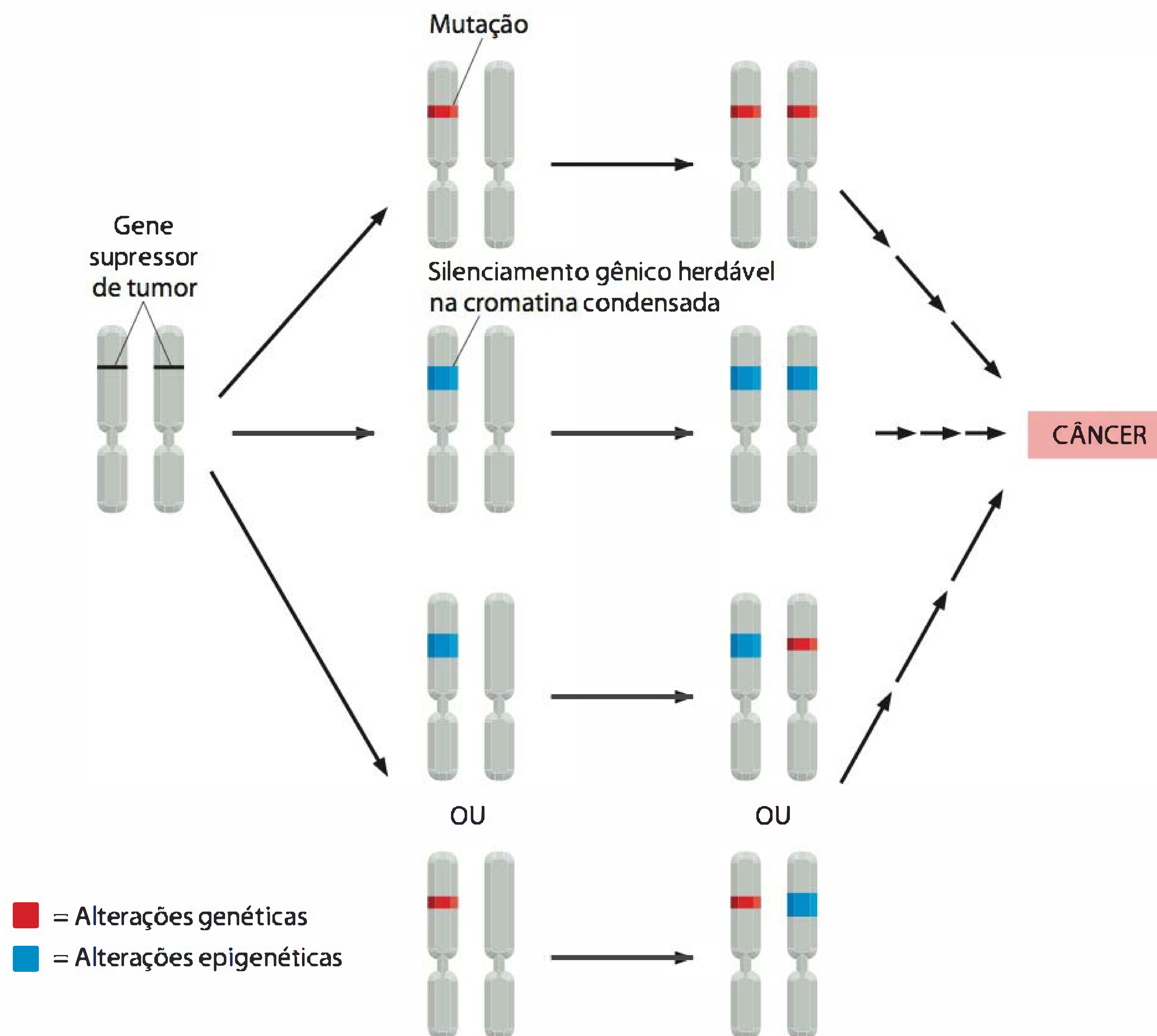


Figura 20-32 **As vias que levam à perda de função do gene supressor de tumor em câncer envolvem alterações genéticas e epigenéticas.** Como discutido no Capítulo 4, o empacotamento de um gene na cromatina condensada poderá prevenir a sua expressão em um modo que é herdado quando a célula se divide (ver Figura 4-52.) Como indicado, as alterações que silenciam o gene supressor de tumor podem ocorrer em qualquer ordem.

Genes mutados no câncer podem se tornar hiperativos de várias maneiras

No caso de um proto-oncogene, é uma ativação gênica que leva ao câncer. A **Figura 20-33** resume os tipos de acidentes que poderão converter um proto-oncogene em um oncogene. (1) Uma pequena alteração da sequência de DNA, como uma mutação pontual ou uma deleção, poderá produzir uma proteína hiperativa quando ocorre dentro de uma sequência codificante ou levar à superprodução da proteína quando ocorre dentro de uma sequência reguladora do gene. (2) Os eventos da amplificação gênica, como os que podem ser causados por erros na replicação do DNA, poderão produzir cópias extras do gene, e isso poderá levar à superprodução da proteína (**Figura 20-34**). (3) Um rearranjo cromossômico, envolvendo a quebra e o rejunte das hélices do DNA, poderá alterar a região codificadora da proteína, resultando em uma proteína de fusão hiperativa, ou alterar a região controladora do gene de modo que a proteína normal seja super produzida.

Tipos específicos de anormalidades são característicos de alguns genes e da resposta a um carcinógeno em particular. Por exemplo, 90% dos cânceres de pele produzidos em

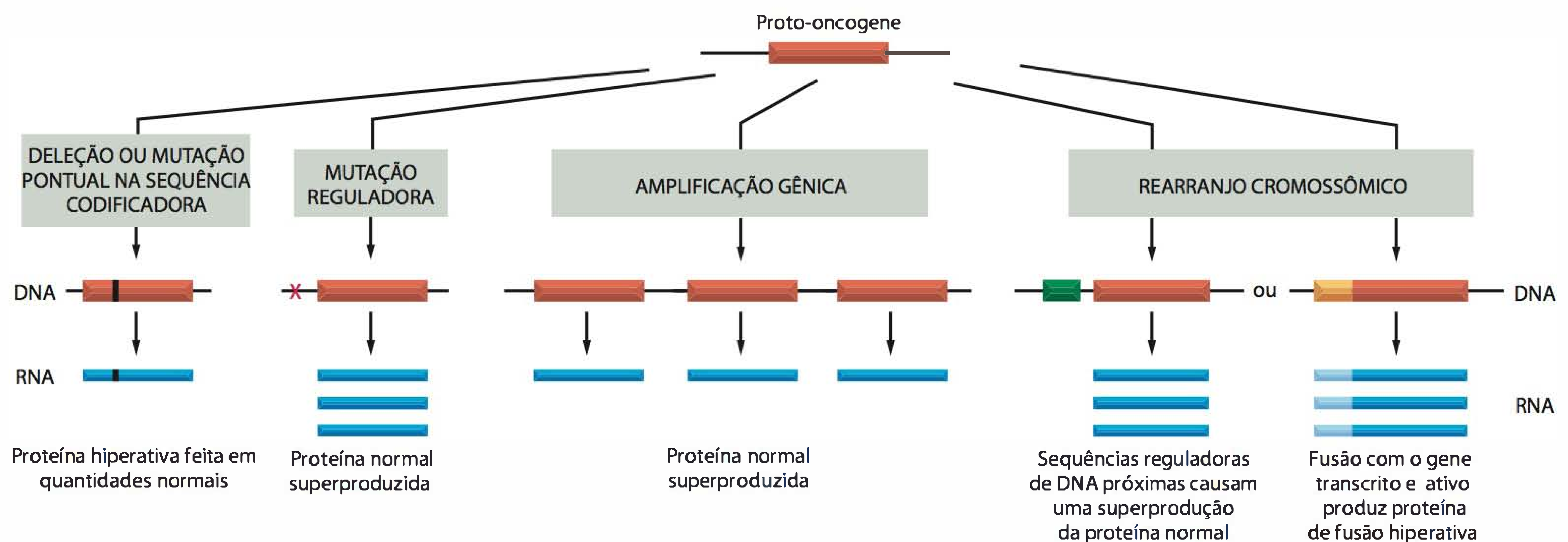


Figura 20-33 **Os tipos de acidentes que tornam um proto-oncogene hiperativo e o convertem em um oncogene.**

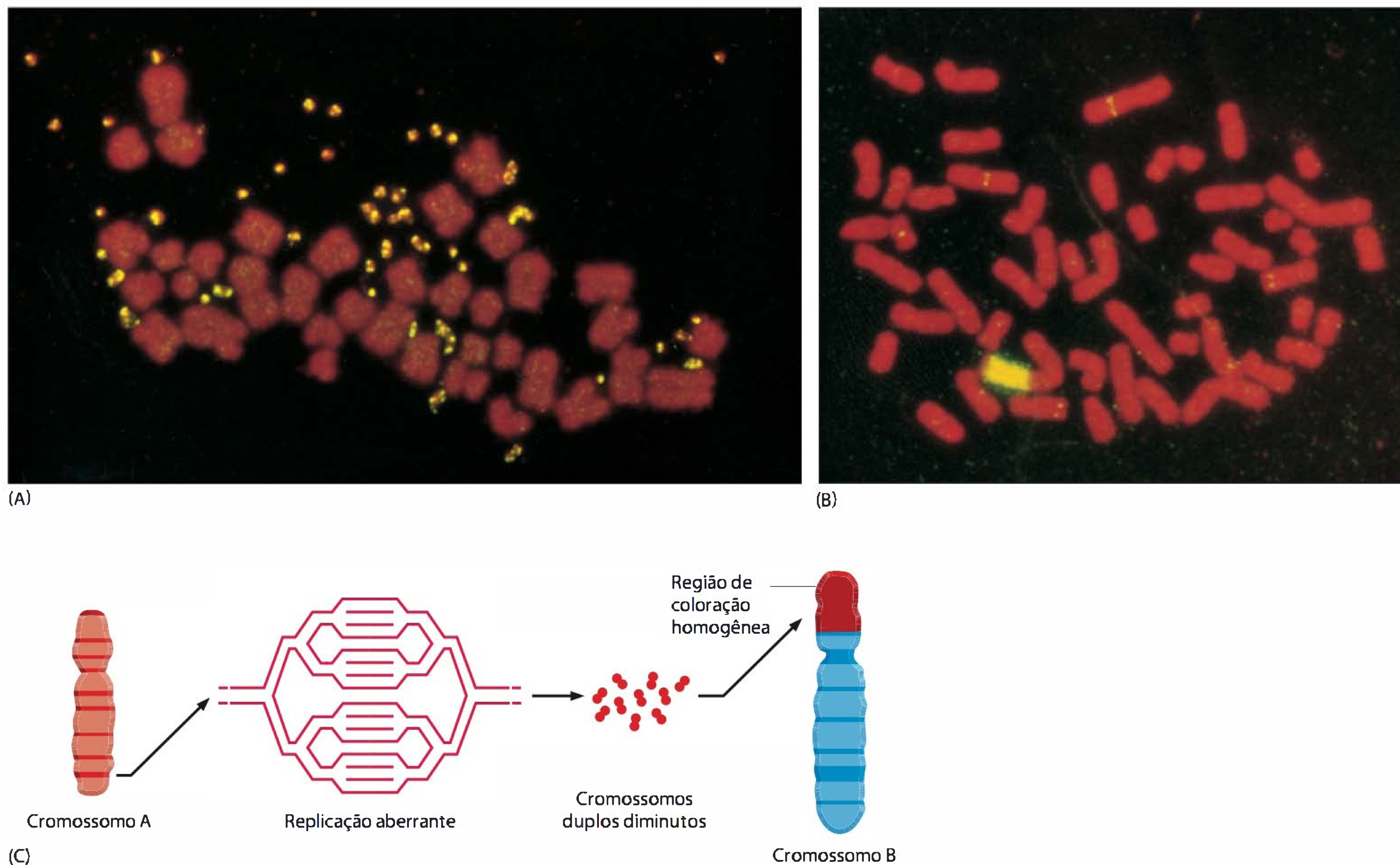


Figura 20-34 Alterações cromossômicas em uma célula cancerosa resultantes de amplificação gênica. Nestes exemplos, os números de cópias do proto-oncogene *Myc* foram amplificados. A amplificação de oncogenes é comum em carcinomas, sendo frequentemente visível como uma alteração curiosa no cariótipo: as células são visualizadas contendo pares adicionais de cromossomos em miniatura – chamados de *cromossomos duplos diminutos* – ou possuindo *região corada homogeneamente* interpolada no padrão de bandeamento de um dos cromossomos regulares. Ambas as aberrações consistem em um número de cópias de um pequeno segmento do genoma massivamente amplificadas. Os cromossomos são corados com um corante fluorescente *vermelho*, enquanto as cópias múltiplas do gene *Myc* são detectadas por hibridização *in situ* com uma sonda fluorescente *amarela*. (A) Cariótipo de uma célula onde as cópias do gene Myc estão presentes como cromossomos duplos diminutos (*manchas amarelas* pareadas). (B) Cariótipo de uma célula na qual as múltiplas cópias do gene *Myc* aparecem como uma região corada de forma homogênea (*amarela*) interpolada em um dos cromossomos regulares. (Cópias únicas do gene *Myc* podem ser detectadas como pequenos pontos *amarelos* no genoma.) (C) Esquema mostrando como ocorre a amplificação gênica. Ao que parece, um evento raro de replicação anormal do DNA produz um cromossomo com cópias extras de uma região cromossoma, como mostrado. A tentativa de reparo de tais estruturas libera círculos de DNA que podem se replicar para formar sequências que se organizam em série (*tandem*), produzindo os cromossomos duplos diminutos. Como resultado de um segundo evento também raro, o DNA de um destes cromossomos pode se integrar em um novo sítio de um cromossomo normal para produzir uma região que é corada de maneira homogênea. Outras vias também podem amplificar genes, como as descritas na Figura 20-41. (A e B, cortesia de Denise Sheer.)

camundongos pela aplicação em forma de pintura do iniciador de tumor dimetilbenzo[a] antraceno (DMBA) possuem uma alteração A-T exatamente no mesmo sítio em um gene *Ras* mutante; presumivelmente, das muitas mutações causadas pelo DMBA, apenas aquelas que ocorrem em tal sítio estimulam de maneira eficiente uma célula epitelial a formar um tumor.

O receptor do sinal extracelular da proteína *fator de crescimento epidérmico* (EGF, *epidermal growth factor*), ao contrário, poderá ser ativado por uma deleção que remove parte do domínio extracelular. Tais receptores mutados são capazes de formar dímeros ativos mesmo na ausência de EGF, e assim produzem um sinal estimulador inapropriado, análogo a uma campainha que soa o alarme mesmo sem ter o botão pressionado para tal. Mutações deste tipo são encontradas no tipo mais comum de tumor cerebral, chamado de glioblastoma.

A proteína Myc, por outro lado, em geral contribui para o câncer por ser superproduzida na sua forma normal. A proteína Myc age no núcleo para estimular o crescimento e a divisão da célula, como discutido no Capítulo 17; assim, quantidades excessivas de Myc fazem a célula proliferar em circunstâncias onde uma célula normal pararia. Superprodução de Myc pode ocorrer de várias maneiras. Em alguns casos, o gene é amplificado – isto é, erros

na replicação do DNA levam à criação de um grande número de cópias do gene em uma única célula (ver Figura 20-34). Mais comumente, a superprodução parece ocorrer devido a uma alteração em um elemento regulador que age no gene. Por exemplo, uma translocação cromossômica poderá de maneira imprópria trazer sequências reguladoras poderosas próximo da sequência codificadora da proteína Myc e assim produzir de maneira incomum uma grande quantidade de RNA mensageiro (mRNA) *Myc*. Assim, no linfoma de Burkitt, uma translocação traz o gene *Myc* sob o controle de uma sequência que normalmente dirige a expressão de genes de anticorpos em linfócitos B. Como resultado, as células B mutantes tendem a proliferar excessivamente e formar um tumor. De forma similar, outras translocações específicas são comuns em outros linfomas e em leucemias.

A busca por genes críticos para o câncer continua

O sequenciamento do genoma humano abriu novos caminhos para a descoberta sistemática de genes críticos para o câncer. Agora é possível, a princípio, examinar cada um dos aproximadamente 25.000 genes humanos em determinada linhagem celular cancerosa, ou em amostras de tecido de um conjunto de cânceres de um determinado tipo, em busca de anormalidades potencialmente significantes, usando análise automática do DNA genômico ou dos mRNAs que a célula produz. Pela análise de uma quantidade substancial de diferentes tipos de câncer é possível identificar eventualmente todos os genes que comumente são alterados no câncer humano. Apesar de economicamente custoso, o sequenciamento de DNA em grande escala começou a identificar novos oncogenes humanos. Um exemplo é a descoberta de que a forma hiperativa da proteína-cinase Raf (discutida no Capítulo 15) está presente em um alto percentual de melanomas e em baixa frequência em outros tipos de câncer.

O sequenciamento direto não é a única maneira de abordar o problema, no entanto existem novos métodos poderosos para a identificação de novos oncogenes e genes supressores de tumores que parecem mais eficientes. Três diferentes abordagens parecem particularmente promissoras:

1. *Hibridização genômica comparativa (CGH, comparative genomic hybridization)* usa a marcação fluorescente de fragmentos de DNA extraídos de células normais e de células cancerosas para identificar regiões do genoma que são amplificadas ou perdidas em um determinado tipo de câncer (**Figura 20-35**). Os fragmentos marcados

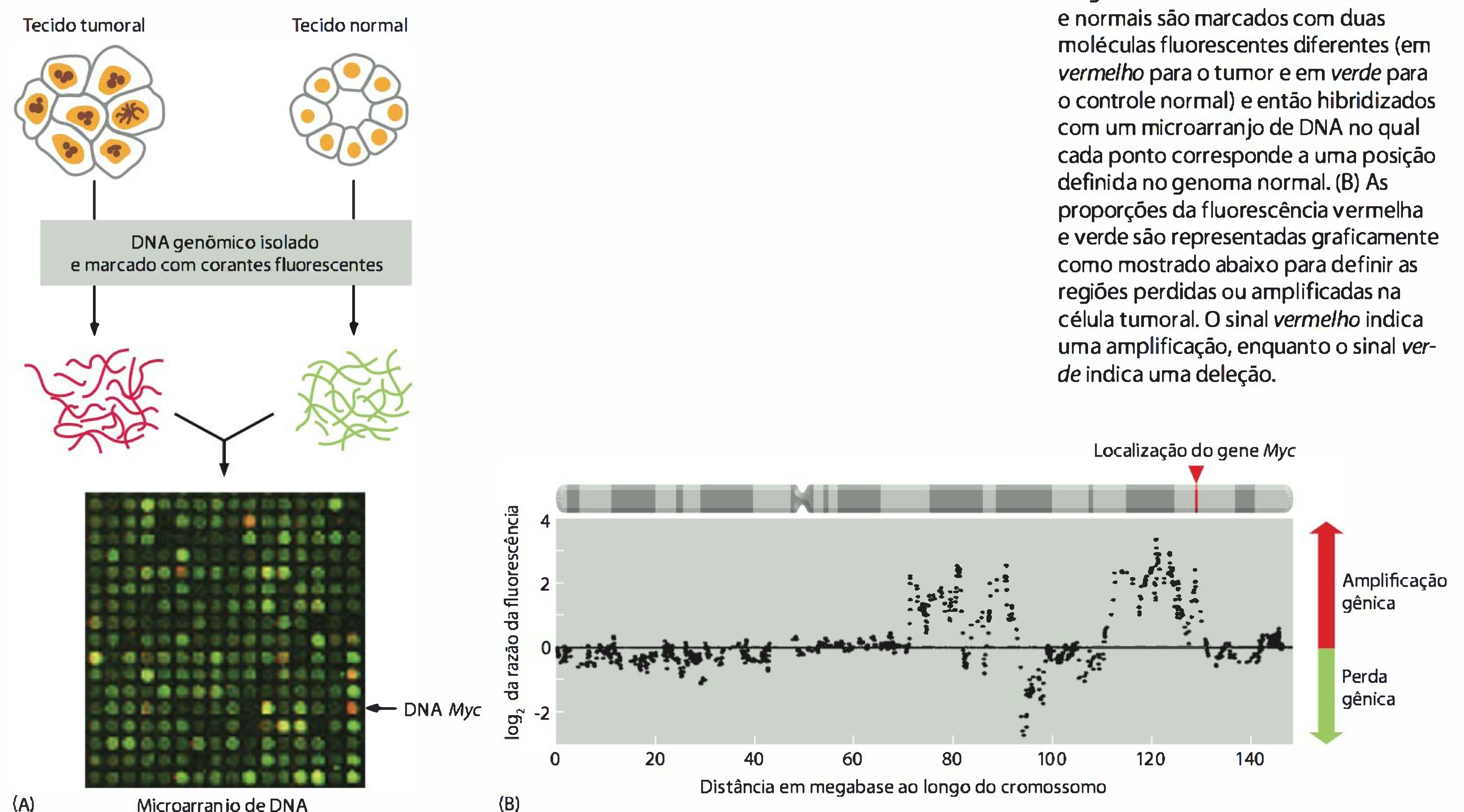


Figura 20-35 Hibridização genômica comparativa para detecção das alterações no DNA em células tumorais. (A) Fragmentos de DNA de células tumorais e normais são marcados com duas moléculas fluorescentes diferentes (em *vermelho* para o tumor e em *verde* para o controle normal) e então hibridizados com um microarranjo de DNA no qual cada ponto corresponde a uma posição definida no genoma normal. (B) As proporções da fluorescência vermelha e verde são representadas graficamente como mostrado abaixo para definir as regiões perdidas ou amplificadas na célula tumoral. O sinal *vermelho* indica uma amplificação, enquanto o sinal *verde* indica uma deleção.

são então hibridizados com microarranjo de DNA, no qual cada ponto corresponde a uma locação conhecida no genoma normal. Diferentes pontos são iluminados por diferentes cores fluorescentes de acordo com a taxa de ligação existente entre os fragmentos normais e os fragmentos fluorescentes do tecido canceroso. Dessa maneira, podem ser identificadas regiões do genoma da célula cancerosa que foram amplificadas ou perdidas. Ainda, pode-se examinar mais acuradamente genes dessas regiões que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer.

2. Microarranjos de DNA também podem ser usados para revelar alterações específicas na expressão gênica associada a câncer. Nesse caso, em vez do DNA cromossômico, uma população de mRNA celular é usada para preparar a sonda para hibridização.
3. Finalmente, a busca direcionada em larga escala com base na tecnologia do RNA de interferência (RNAi, discutido no Capítulo 8) trouxe uma nova e poderosa abordagem para identificar genes supressores de tumor. A expressão do pequeno RNA de interferência (siRNA, *small interfering RNA*) em uma célula poderá inativar ambas as cópias pela destruição do mRNA correspondente ou pela inibição da tradução (ver p.571), o que traz a princípio uma maneira eficiente de identificar qualquer gene supressor de tumor cuja perda promove a transformação cancerosa em um determinado animal ou em uma linhagem celular em teste.

Qualquer abordagem usada para identificar um candidato a gene crítico para o câncer tem o desafio de determinar se o gene realmente contribui para a causa do câncer. Testar os efeitos da superexpressão do oncogene candidato, ou a inibição do candidato a gene supressor de tumor em ensaios com células em cultivo, poderá ajudar. Porém, um ensaio mais convincente usa camundongos transgênicos que superexpressam candidatos a oncogenes e camundongos nocaute que não possuem o candidato a gene supressor de tumor. Em ambos os tipos de camundongos, o desenvolvimento do câncer será acelerado se de fato os genes forem os verdadeiros responsáveis.

Para a busca de novos genes críticos para o câncer da maneira descrita, não é necessário a princípio saber qual a função normal do gene ou como a sua alteração promove o desenvolvimento do câncer. No entanto, com o aumento do nosso entendimento em biologia celular, tornou-se fácil supor quais genes são suspeitos e testar o seu papel pela determinação direta de sua alteração frequente em cânceres específicos. A tarefa de encontrar genes críticos para o câncer é, dessa forma, intrincada com o problema de descobrir o que eles normalmente fazem, e como, quando alterados, contribuem para o desenvolvimento do câncer. Este é o tópico da próxima seção.

Resumo

Os genes críticos para o câncer podem ser classificados em dois grupos, tendo como base se o ganho ou a perda de função contribuem para o desenvolvimento do câncer. Mutações do tipo ganho de função que convertem proto-oncogenes em oncogenes estimulam a célula a aumentar o seu número quando não devia; as mutações do tipo perda de função em genes supressores de tumor, abolem os controles inibidores que normalmente ajudam a manter o crescimento celular sob controle. Os oncogenes possuem um efeito genético dominante, e muitos deles foram descobertos por causarem câncer em animais quando introduzidos por um retrovírus que incorporou uma forma normal do gene (o proto-oncogene) de uma célula hospedeira. Oncogenes também podem ser identificados por aberrações cromossômicas características que podem ativar um proto-oncogene.

Mutações em um gene supressor de tumor geralmente são recessivas, e as células possuem um comportamento normal até que ambas as cópias gênicas sejam perdidas, inativadas ou epigeneticamente silenciadas. Muitos desses genes foram inicialmente identificados em síndromes cancerosas raras e hereditárias, porém sua perda ou inativação é um atributo comum a muitos cânceres esporádicos. Indivíduos que herdam uma cópia defectiva e uma cópia funcional de um gene supressor de tumor têm uma predisposição aumentada para desenvolver câncer, pois uma simples alteração em qualquer lugar do corpo que elimine ou inative a cópia boa do gene é o suficiente para produzir uma célula totalmente desprovida da função supressora de tumor.

A busca por genes críticos para o câncer continua com ferramentas poderosas disponíveis para localizar sistematicamente mutações ou expressão alterada no DNA ou em mRNAs de células cancerosas. Uma vez que um gene candidato tenha sido identificado, sua importância para o desenvolvimento de câncer poderá ser investigada em camundongos – pela superexpressão no caso de um candidato a oncogene, ou pela inativação no caso de um gene supressor de tumor.

AS BASES MOLECULARES DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS CANCEROSAS

Os caçadores de genes determinantes de câncer visualizam oncogenes e genes supressores de tumor – assim como as mutações e as alterações epigenéticas que as afetam – de maneira diferente. Porém, sob o ponto de vista da célula cancerosa, eles são os dois lados de uma mesma moeda. Os mesmos tipos de efeito no comportamento celular podem resultar de mutações em qualquer dos genes, pois a maioria dos mecanismos de controle celular possui ambos os componentes, estimuladores (proto-oncogenes) e inibidores (supressores de tumor). Se o objetivo é entender como as células cancerosas funcionam e fazê-lo em termos da genética moleculares, a distinção importante não é entre genes supressores de tumor e proto-oncogenes, mas entre genes críticos para o câncer que agem em vias bioquímicas e reguladoras diferentes.

Algumas das vias importantes no câncer enviam sinais do ambiente celular (discutido no Capítulo 15); outras são responsáveis pelos programas internos das células, como os que controlam o ciclo celular (discutido no Capítulo 17) ou a morte celular (discutido no Capítulo 18); ainda, outras governam os movimentos celulares (discutido no Capítulo 16) ou a interação mecânica com os vizinhos (discutido no Capítulo 19). As várias vias são ligadas e interdependentes de maneira complexa. Muito do que sabemos a respeito dessas vias foi aprendido como um subproduto da pesquisa em câncer. Ao contrário, a pesquisa nos aspectos básicos da biologia celular transformou nosso entendimento sobre o câncer.

Na primeira seção deste capítulo, vamos resumir as propriedades gerais que tornam uma célula cancerosa e listar os tipos de comportamentos inadequados que uma célula cancerosa mostra. Nesta seção, consideraremos como tais características comportamentais aparecem a partir de mutações em genes críticos para o câncer e como as funções destes genes no contexto do câncer podem ser determinadas. A seção termina com a discussão sobre câncer de cólon como exemplo ampliado, mostrando como uma sucessão de alterações nos genes críticos para o câncer permite ao tumor evoluir de um padrão ruim de comportamento para outro pior.

Estudos tanto de embriões em desenvolvimento como de camundongos geneticamente modificados ajudaram a descobrir a função dos genes críticos para o câncer

Dado um gene que é mutado em um câncer, precisamos entender como o gene funciona em uma célula normal e como mutações no gene contribuem para as características aberrantes de comportamento das células cancerosas. Quando o gene *Rb* foi originalmente clonado, por exemplo, tudo que se sabia é que ele era mutado em retinoblastomas. No caso de *Ras*, o gene mutante ficou conhecido por direcionar as células em cultura a proliferar excessiva e inapropriadamente, porém como a proteína Ras funcionava em células normais e cancerosas era um mistério. Para Rb e Ras, a pesquisa em câncer foi o ponto de partida para estudos que revelaram o papel-chave dessas proteínas em células normais – Rb como inibidor do ciclo celular e Ras como um componente da via de sinalização intracelular.

Hoje sabemos muito mais sobre as células, de modo que, quando um gene é identificado como crítico para o câncer, frequentemente já é familiar devido a estudos em outro contexto. Muitos oncogenes e genes supressores de tumor, por exemplo, são homólogos de genes já conhecidos por seus papéis no desenvolvimento embrionário. Exemplos incluem componentes de praticamente todas as vias de sinalização importantes através das quais as células se comunicam durante o desenvolvimento (discutido nos Capítulos 15 e 22): Wnt, Hedgehog, TGFβ, Notch, e todas as vias de sinalização do receptor da tirosina-cinase incluem componentes codificados por genes críticos para o câncer – com Ras sendo parte da última das vias.

Mesmo tardiamente entendido, não existe surpresa. Como discutiremos no Capítulo 23, os mesmos mecanismos de sinalização que controlam o desenvolvimento embrionário operam no corpo adulto normal para controlar os turnos celulares e manter a homeostase. O desenvolvimento de um animal multicelular e sua manutenção como um adulto depende da comunicação célula-célula e da regulação do crescimento celular, da divisão celular, da diferenciação celular, da morte celular, do movimento celular e da adesão celular – em

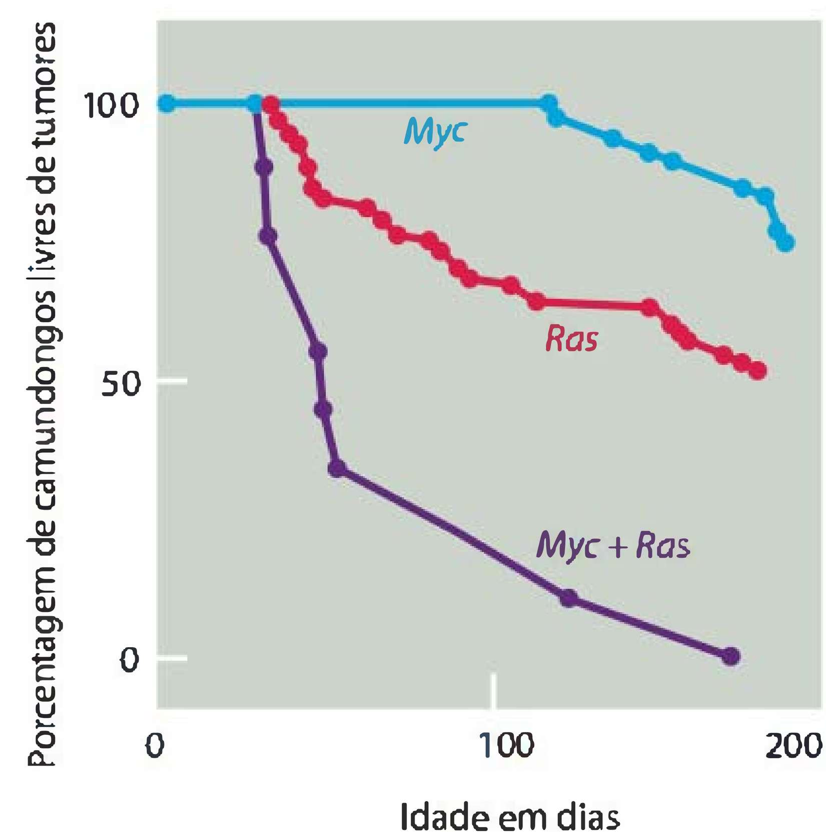


Figura 20-36 Colaboração de oncogenes em camundongos transgênicos. Os gráficos mostram a incidência de tumores em três cepas de camundongos transgênicos, um transportando o oncogene *Myc*, um outro transportando o oncogene *Ras* e um terceiro transportando ambos os oncogenes. Para este experimento, duas linhagens de camundongos transgênicos foram geradas. Uma carrega uma cópia de um oncogene criado pela fusão do proto-oncogene *Myc* à sequência reguladora de DNA do vírus do tumor de mama em camundongos (que direciona para a superexpressão de *Myc* na glândula mamária). A outra linhagem possui uma cópia do gene *Ras* inserido e sob o controle do mesmo elemento regulador. Ambas as linhagens desenvolvem tumores com mais frequência do que a linhagem normal, e a maioria dos tumores surge nas glândulas mamárias ou salivares. Camundongos possuindo ambos os oncogenes são obtidos cruzando-se as duas linhagens. Tais híbridos desenvolvem tumores a taxas mais elevadas do que a soma das taxas para os oncogenes separadamente. Todavia, os tumores surgem somente após um retardo e mesmo assim em uma pequena proporção de células dos tecidos onde os dois genes são expressos. Alterações posteriores em adição à presença dos dois oncogenes são aparentemente necessárias para o desenvolvimento do câncer. (De E. Sinn et al., *Cell* 49:465-475, 1987. Com permissão de Elsevier.)

outras palavras, de todos os aspectos do comportamento celular que estão desarranjados no câncer. A biologia do desenvolvimento, frequentemente usando modelos animais como *Drosophila* e *C. elegans,* fornece a chave para as funções normais de muitos genes críticos para o câncer.

Basicamente, no entanto, queremos saber o que as alterações nesses genes fazem nas células dos tecidos para originar cânceres. Algumas informações podem ser pelo obtidas pelo estudo de células em cultivo ou pelo exame de amostras de pacientes cancerosos. Porém, para investigar como as mutações em genes críticos para o câncer afetam tecidos de um organismo, camundongos transgênicos ou nocaute são particularmente úteis.

Camundongos transgênicos que transportam um oncogene em todas as suas células poderão ser gerados através dos métodos descritos no Capítulo 8. Oncogenes introduzidos dessa maneira poderão ser expressos na maioria dos tecidos ou em alguns selecionados dependendo do DNA regulador associado ao transgene. Estudos em tais camundongos confirmam que um único oncogene geralmente não é suficiente para transformar uma célula normal em cancerosa. Tipicamente, em camundongos transgênicos que expressam os oncogenes *Myc* ou *Ras*, alguns dos tecidos que expressam o oncogene poderão apresentar uma exacerbação na proliferação celular e, com o tempo, as células ocasionalmente podem sofrer novas alterações e originar cânceres. A maioria das células, no entanto, não dará origem a cânceres. Contudo, do ponto de vista do animal como um todo, o oncogene herdado é uma série ameaça, pois cria um risco enorme de surgimento de um câncer em algum lugar do corpo. Camundongos que expressam os oncogenes *Myc* e *Ras* simultaneamente (obtidos pelo cruzamento de um camundongo transgênico que transporta o oncogene *Myc* com uma contraparte que transporta o oncogene *Ras*) desenvolvem câncer mais cedo e a taxas mais altas do que as linhagens parentais (**Figura 20-36**); porém, novamente, os cânceres se originam como tumores espalhados entre células não-cancerosas. Assim, mesmo células expressando simultaneamente os dois oncogenes devem passar por novas alterações ao acaso para tornarem-se cancerosas, sugerindo fortemente que múltiplas mutações são necessárias à tumorigênese, conforme outras evidências discutidas anteriormente.

Numerosos genes supressores de tumor foram nocauteados em camundongos, incluindo o *Rb*. Como antecipado, muitos dos mutantes que perdem uma cópia do gene supressor são propensos ao câncer, e os tumores que se desenvolvem mostram uma perda da heterozigose, isto é, eles perderam ou inativaram a segunda cópia do gene. Deleção de ambas as cópias de um gene supressor de tumor frequentemente leva à morte do embrião em um dos estágios de desenvolvimento, refletindo o papel essencial destes genes no desenvolvimento embrionário normal. Para superar este problema e testar o efeito da mutação homozigota no tecido adulto, camundongos transgênicos podem ser obtidos carregando mutações condicionais (ver Figura 5-79), de maneira que somente um órgão ou tecido, por exemplo o fígado, mostra o defeito genético. Alternativamente, camundongos transgênicos podem ser obtidos de maneira que o defeito é criado em resposta a um sinal experimental (p. ex., uma substância) provido em um dado tempo. Pelo uso de tais técnicas, camundongos fornecem informações sobre o mecanismo de formação do tumor e também modelos para testar e desenvolver novas terapias anticâncer.

Muitos genes críticos para o câncer regulam a proliferação celular

Muitos genes críticos para o câncer codificam componentes de vias bioquímicas que regulam o comportamento social das células em um animal – em particular, componentes das vias de sinalização através dos quais influências de células vizinhas controlam se uma célula vai crescer, dividir-se, diferenciar-se ou morrer (**Figura 20-37**). De fato, muitos dos componentes das vias de sinalização foram identificados pela busca de genes causadores de câncer, e uma lista ampliada das proteínas codificadas por proto-oncogenes e genes supressores de tumor inclui exemplos de praticamente todos os tipos de proteínas envolvidas em sinalização celular: proteínas-sinal secretadas, receptores transmembrana, proteínas ligadoras de GTP intracelulares, proteína-cinases, proteínas reguladoras de genes, e muitas outras proteínas. No câncer, mutações alteram tais componentes de modo a criar sinais proliferativos mesmo quando não há necessidade de novas células, de maneira imprópria, comutando o crescimento celular, a replicação do DNA e a divisão celular. Exemplos incluem mutações para ganho de função que, de maneira imprópria, ativam o receptor de EGF e a proteína Ras, discutidos anteriormente.

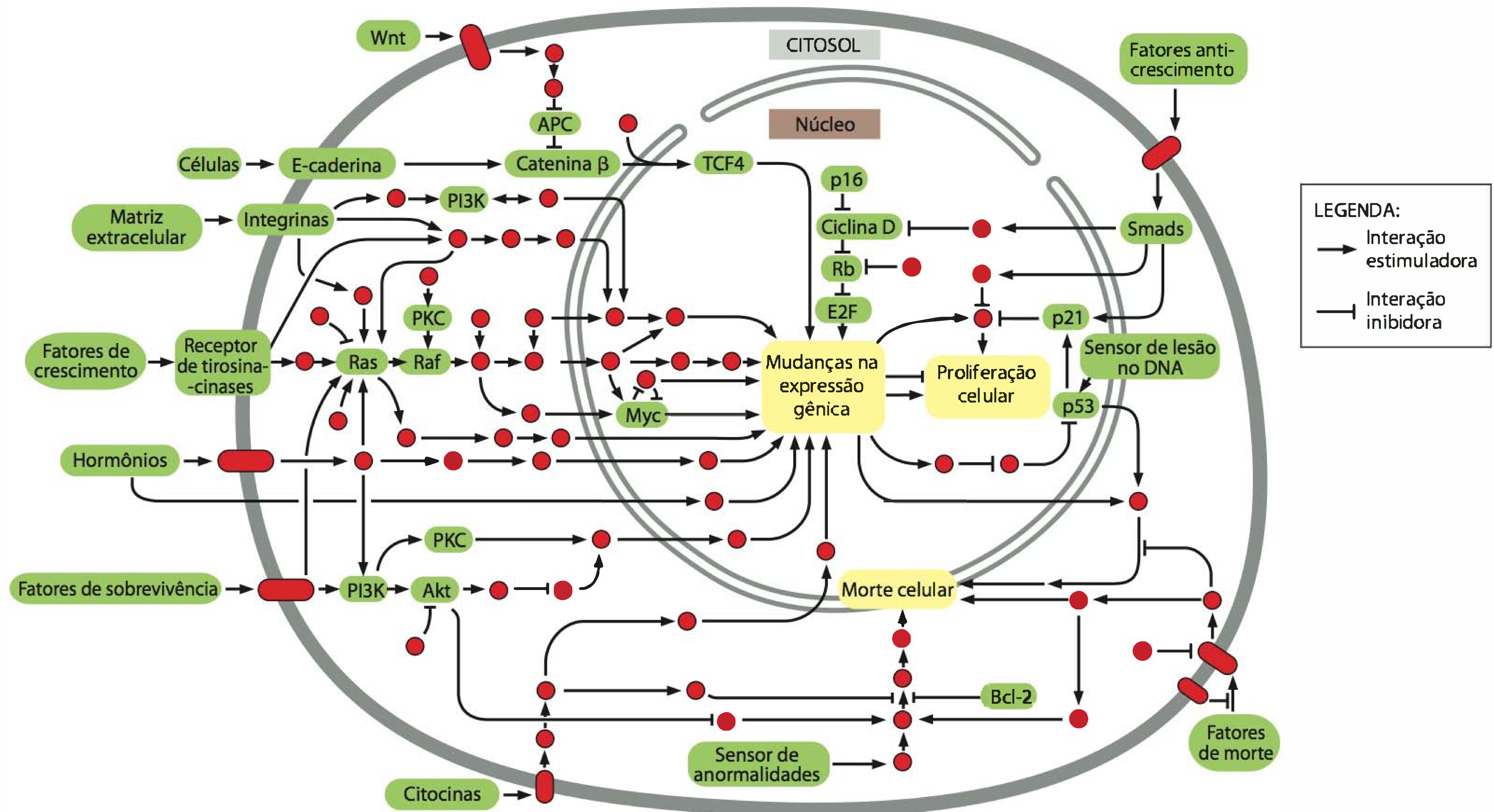


Figura 20-37 Figura esquemática das principais vias de sinalização relevantes para o câncer em células humanas, indicando a localização celular de algumas proteínas modificadas por mutações em cânceres. Produtos dos oncogenes e dos supressores de tumor frequentemente agem dentro da mesma via de sinalização. Proteínas de sinalização individuais são indicadas por *círculos vermelhos*, com os componentes críticos para o câncer e os mecanismos de controle discutidos no capítulo em *verde*. Interações inibidoras e estimuladoras entre proteínas são designadas como mostradas na legenda. (Adaptada de D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell* 100:57-70, 2000. Com permissão de Elsevier.)

Os componentes das vias de sinalização que normalmente funcionam para inibir a proliferação celular frequentemente aparecem como supressores de tumor. Um exemplo bem estudado é a via de sinalização TGFβ (discutida no Capítulo 15). Mutações do tipo perda de função nesta via de sinalização contribuem para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer humano. O receptor TGFβ-RII, por exemplo, está mutado em alguns cânceres de cólon, assim como Smad4 – uma proteína de sinalização chave na via – que frequentemente é inativada em cânceres de pâncreas e de outros órgãos. Esses achados refletem a função normal da via do TGFβ na restrição da proliferação celular (ver Figura 23-26).

Não foram surpresa os achados de que mutações que afetam diretamente o controle central do ciclo celular têm um papel importante em muitos cânceres. A proteína supressora de tumor Rb, discutida há pouco, controla um ponto-chave no qual as células decidem entrar no ciclo celular e replicar o seu DNA. A Rb serve como um freio que restringe a entrada da célula na fase S por ligar-se e inibir as proteínas reguladoras de genes da família E2F, que são necessárias para transcrever genes que codificam proteínas requeridas para a entrada na fase S. Normalmente, esta inibição por Rb é liberada no tempo apropriado pela fosforilação de Rb por várias *cinases dependentes de ciclina (Cdks, cyclin-dependent kinases)*, que fazem com que Rb libere seu domínio inibidor na proteína E2F (discutido no Capítulo 17).

Muitas células cancerosas proliferam inapropriadamente pela eliminação completa de Rb, como vimos anteriormente. Outras alcançam o mesmo efeito pela aquisição de mutações que alteram outros componentes da via reguladora de Rb (**Figura 20-38**). Em células normais, um complexo formado pela ciclina D e pela cinase dependente de ciclina Cdk4 (G_1-Cdk) é responsável pela fosforilação de Rb, e assim permite o progresso através do ciclo (ver Figura 17-62 e Tabela 17-1, p. 1063). A proteína *p16 (INK4)* – que é produzida quando as células são estressadas – inibe a progressão do ciclo celular, prevenindo a formação do complexo ciclina D-Cdk4 ativo, um importante componente da parada normal do ciclo celular em resposta ao estresse. Alguns glioblastomas e cânceres de mama têm amplificado os genes que codificam para Cdk4 ou ciclina D, favorecendo assim a proliferação celular. A deleção ou a inativação do gene *p16* é comum em muitas formas de cânceres humanos. Nos cânceres nos quais as mutações não inativam o *p16*, a metilação do DNA na região reguladora frequentemente silencia o gene, o que é um exemplo de uma alteração epigenética que contribui para o desenvolvimento do câncer. Mutações em qualquer componente de determinada via são suficientes para inativar a via e promover o câncer. Como esperado, então, um câncer

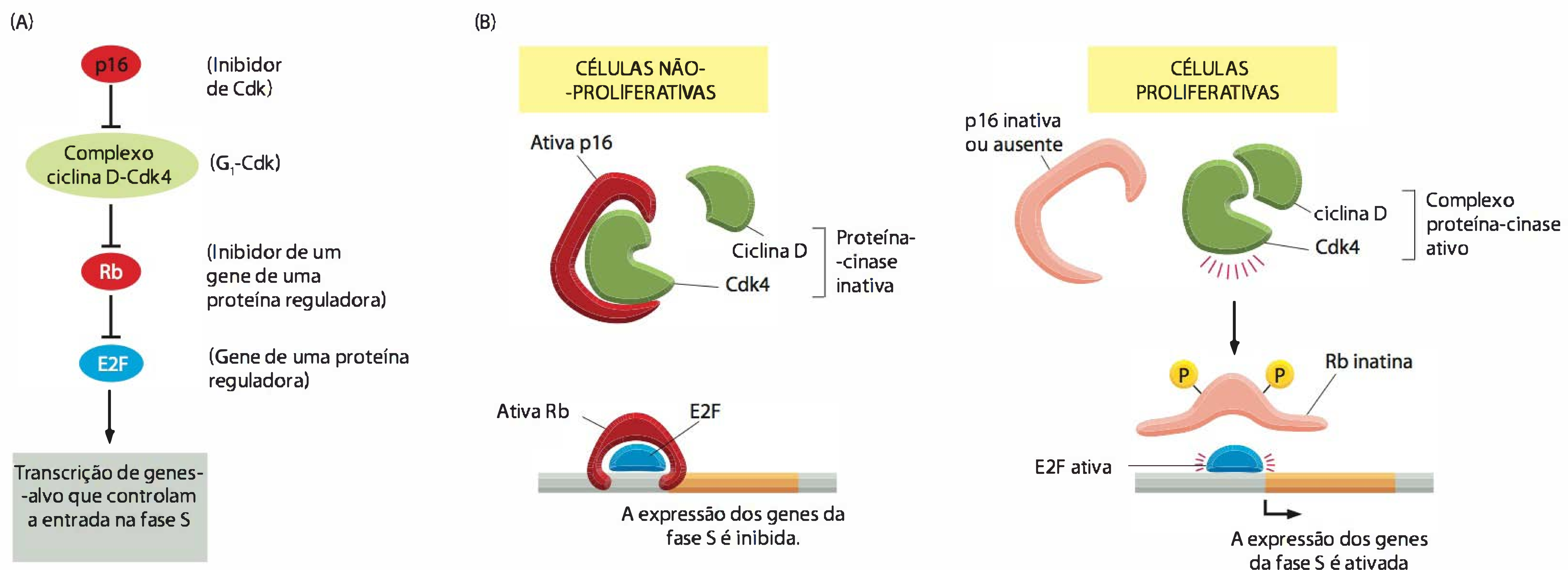


Figura 20-38 A via pela qual a Rb controla a entrada no ciclo celular contém tanto proto-oncogenes como genes supressores. Em cânceres humanos, todos os componentes desta via foram encontrados com alterações causadas por mutações (produtos de proto-oncogenes, em *verde*; produtos de genes supressores, em *vermelho;* E2F é mostrado em *azul* porque tem as ações inibidoras e estimuladoras dependendo da outra proteína que se liga a ele). Na maioria das vezes, apenas um dos componentes é alterado em um tumor individual. (A) Uma versão simplificada das relações de dependência da via; ver Figura 17-62 para outros detalhes. (B) A proteína Rb inibe a entrada no ciclo de divisão celular quando não está fosforilada. O complexo Cdk4 e ciclina D fosforila a Rb, encorajando assim a proliferação celular. Quando a célula está estressada, p16 inibe a formação do complexo ativo Cdk4-ciclina D, prevenindo a proliferação. A inativação de Rb ou de p16 por mutações estimula a divisão celular (e cada uma poderá ser considerada supressora de tumor), enquanto Cdk4 e ciclina D ativadas estimulam a divisão (podendo então ser consideradas proto-oncogenes).

raramente inativa mais de um componente em uma determinada via, o que não traria um benefício adicional a sua evolução.

Vias distintas podem mediar a desregulação da progressão do ciclo celular e a desregulação do crescimento celular em células cancerosas

Como descrito no Capítulo 17, um controle especial de sistema assegura que uma célula eucariótica faça uma cópia de cada um dos seus cromossomos e segregue exatamente uma cópia em cada uma das células-filhas criadas pela divisão celular. A iniciação do processo requer sinais de progressão do ciclo celular que são cuidadosamente regulados, como parâmetro-padrão para cada célula em um organismo multicelular permanecer em um estado G_0 quiescente (ver p.1103). Contudo a proliferação celular requer mais do que progressão através do ciclo celular; o processo requer crescimento celular, que envolve processos anabólicos complexos através dos quais as células sintetizam todas as macromoléculas necessárias a partir de precursores menores. Se uma célula se divide inapropriadamente sem primeiro crescer, ela se tornará menor a cada divisão e, por fim, ou para de crescer ou morre. O crescimento contínuo de um câncer, dessa maneira, requer alterações herdáveis que não desregulem a progressão do ciclo celular, assim como provoquem o crescimento (**Figura 20-39**).

A fosfoinositídeo 3-cinase (PI 3-cinase)/via de sinalização intracelular da Akt é crítica para o controle do crescimento celular. Como descrito no Capítulo 15, vários sinais extracelulares proteicos, incluindo insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina, normalmente estimulam essa via de sinalização. Em células cancerosas, no entanto, a via é ativada por mutações, fazendo com que a célula cresça na ausência de tais sinais. A ativação anormal da proteína-cinase Akt é central na desregulação do processo de crescimento, pois a ativação não somente estimula a síntese de proteínas (ver Figura 17-65), mas também aumenta bastante a incorporação de glicose (via ativação de mTOR) e a produção de acetil-CoA no citosol, requerida para a síntese de lipídeos (via ativação de ACL), como esquematizado na Figura 20-39. Assim, uma mutação comum no gene supressor de tumor, em muitos tipos de cânceres é a perda da fosfatase PTEN, cuja função normal é limitar a ativação de Akt por desfosforilação das moléculas que a PI 3-cinase fosforila.

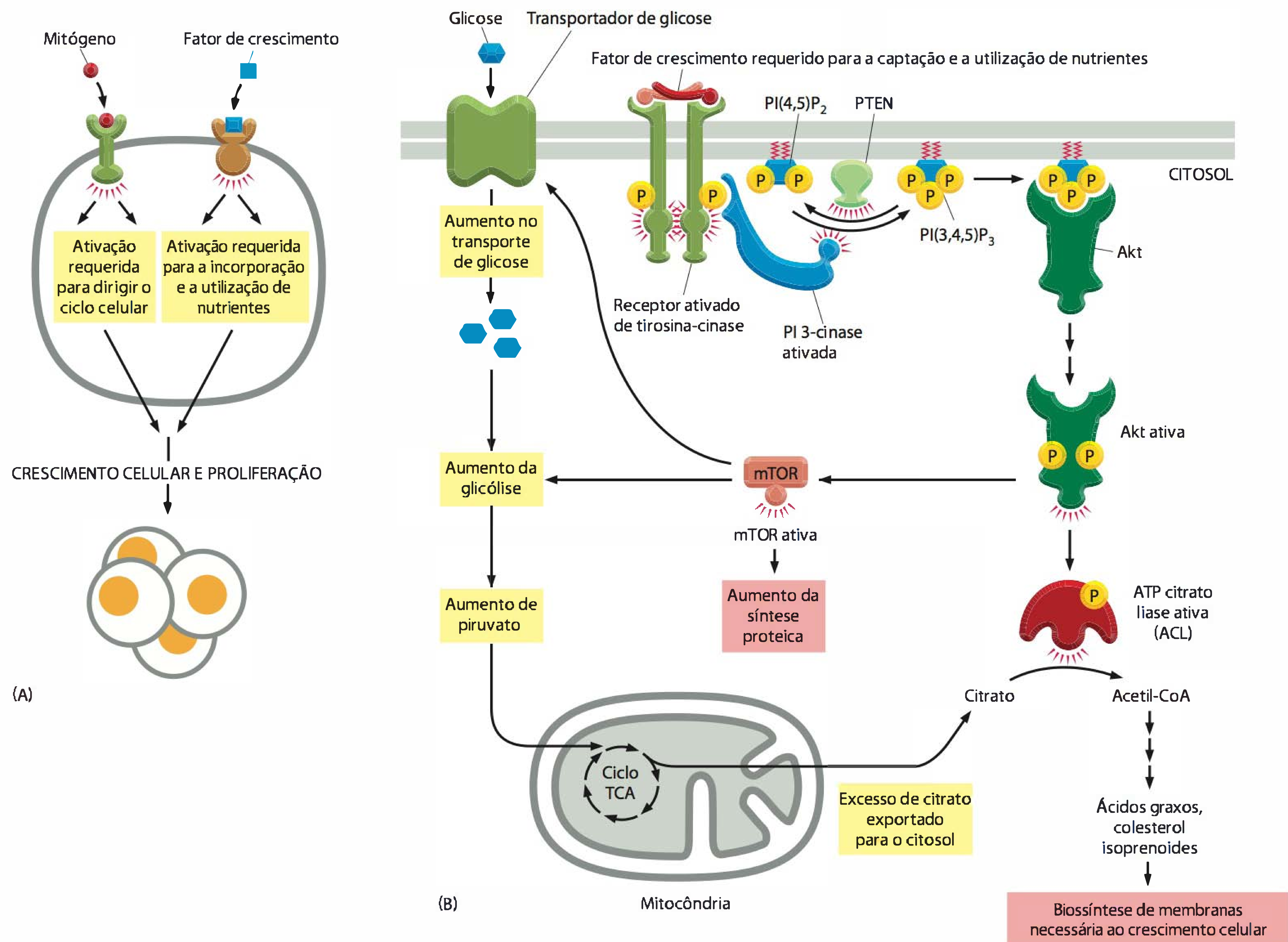


Figura 20-39 As células podem necessitar de dois tipos de sinais para proliferar. (A) Para se multiplicar com sucesso, suspeita-se que a maioria das células normais necessite dos sinais extracelulares que dirigem o ciclo de progressão da célula (aqui *vermelho* é o mitógeno) e dos sinais extracelulares que dirigem o crescimento celular (aqui *azul* é o fator de crescimento). (8) Diagrama do sistema de sinalização contendo Akt, que dirige o crescimento celular pelo estímulo aumentado de incorporação e utilização de glicose, incluindo a conversão do excesso de ácido cítrico produzido por intermediários do açúcar na mitocôndria em acetil-CoA, necessária no citosol para a síntese de lipídeos e a produção de novas membranas. Como indicado, a síntese de proteína também aumenta. Este sistema torna-se ativado precocemente na progressão do tumor.

A ativação anormal da rota PI 3-cinase/Akt, que normalmente ocorre precocemente no processo de progressão do tumor, explica a excessiva taxa de glicólise observada em células tumorais, conhecida como efeito Warburg. Acompanhada pela excreção do excesso de piruvato como lactato, a incorporação excessiva de glicose pelas células cancerosas é usada para localizar tumores pelas modernas técnicas de imagem do corpo inteiro (ver Figura 20-1).

Mutações nos genes que regulam a apoptose permitem às células cancerosas sobreviverem quando não deveriam

O controle do número de células depende da manutenção de um balanço entre a proliferação celular e a morte celular. No centro germinativo dos linfonodos, por exemplo, as células B proliferam rapidamente, mas a maioria da progênie é eliminada por apoptose. Assim, a correta regulação da apoptose é essencial na manutenção do balanço normal entre o nascimento e a morte celular em tecidos que substituem suas células com frequência, e também possui um papel vital na eliminação de células estressadas ou lesionadas. Como descrito no Capítulo 18, as células animais cometem suicídio por apoptose quando sentem que alguma coisa drasticamente errada aconteceu, como quando o seu DNA está severamente lesionado ou quando são privadas de sinais de sobrevivência extracelular, que dizem às células que elas estão no local apropriado. Como discutido anteriormente (ver Figura 20-14), células cancerosas são relativamente resistentes à apoptose, o que permite que elas aumentem em número e sobrevivam quando não deveriam.

Mutações nos genes que controlam a apoptose em geral são responsáveis por essa resistência. Uma proteína que normalmente inibe a apoptose, chamada de Bcl2, foi descoberta e designada porque sua expressão é ativada por uma translocação cromossômica no linfoma de célula B. A translocação coloca o gene *Bcl2* sob o controle de uma sequência reguladora

de DNA que dirige a superexpressão de Bcl2, o que permite a sobrevivência de linfócitos B que normalmente morreriam, aumentando bastante assim o número de células B e contribuindo para o desenvolvimento do câncer de células B.

Um dos genes envolvidos no controle da apoptose apresenta-se mutado em uma grande variedade de cânceres. Este gene supressor de tumor codifica uma proteína que é uma sentinela em uma intersecção crucial na rede de controle intracelular que governa a resposta celular a lesões do DNA e a vários outros estresses, incluindo oxigênio baixo (hipoxia) e privação de fator de crescimento. Essa proteína é a proteína tumoral p53, produzida pelo gene *Tp53*, mais comumente chamado de *p53*. Como explicamos a seguir, quando o *p53* é defeituoso, células geneticamente lesionadas e em divisão não morrem; o pior é que elas persistem na proliferação, acumulando mais defeitos genéticos, o que aumenta a malignidade.

Mutações no gene *p53* permitem que muitas células cancerosas sobrevivam e proliferem apesar das lesões no DNA

O gene ***p53*** – designado pela massa molecular do seu produto proteico – talvez seja o gene mais importante na prevenção do câncer humano. Em quase todos os cânceres humanos, esse gene supressor de tumor ou outros componentes da sua via estão mutados. Por que o *p53* é tão importante? A resposta reside em suas funções multifacetadas no controle do ciclo celular, na apoptose e na manutenção da estabilidade genética – todos os aspectos do papel fundamental da proteína p53 na proteção do organismo contra as consequências das lesões celulares e o risco de câncer.

Em contraste com a Rb, a maioria das células corporais em condições normais possui pouca proteína p53: apesar de sua síntese, ela é rapidamente degradada, o que indica que a p53 não é essencial ao desenvolvimento normal. Camundongos com ambas as cópias do gene removidas ou inativadas parecem normais em todos os aspectos, exceto um – eles universalmente desenvolvem câncer antes dos dez meses de idade. Tais observações sugerem que a p53 possui funções requeridas somente em circunstâncias especiais. Na verdade, quando células normais são privadas de oxigênio ou expostas a tratamentos que lesionam o DNA, como luz ultravioleta ou raios gama, elas aumentam a sua concentração de p53 bloqueando a degradação da molécula. O acúmulo da proteína p53 também é visto em células onde oncogenes como *Ras* e *Myc* são ativos de maneira incomum, gerando um estímulo anormal para a divisão celular.

Em todos estes casos, o alto nível da proteína p53 atua para limitar o dano feiro. Dependendo das circunstâncias e da severidade da lesão, a p53 poderá dirigir as células lesionadas ou com proliferação anormal a cometer suicídio por apoptose – um evento relativamente indolor para o organismo multicelular – ou poderá engatilhar um mecanismo que impede que as células se dividam até que a lesão seja reparada. Similarmente, quando os telômeros tornam-se muito curtos, a p53 é ativada e inibe divisões celulares posteriores, produzindo o fenômeno de senescência celular replicativa (**Figura 20-40**). A proteção oferecida por p53 é parte da razão de as mutações que ativam oncogenes como *Ras* e *Myc* não serem suficientes para criar um tumor.

A proteína p53 realiza seu trabalho na maior parte das vezes agindo como uma proteína reguladora de genes. Na verdade, as mutações mais comuns observadas em p53 em tumores humanos ocorrem no seu domínio ligador de DNA que lesiona sua habilidade de ligar-se às sequências do DNA-alvo. Como discutido no Capítulo 17, a proteína p53 exerce seus efeitos

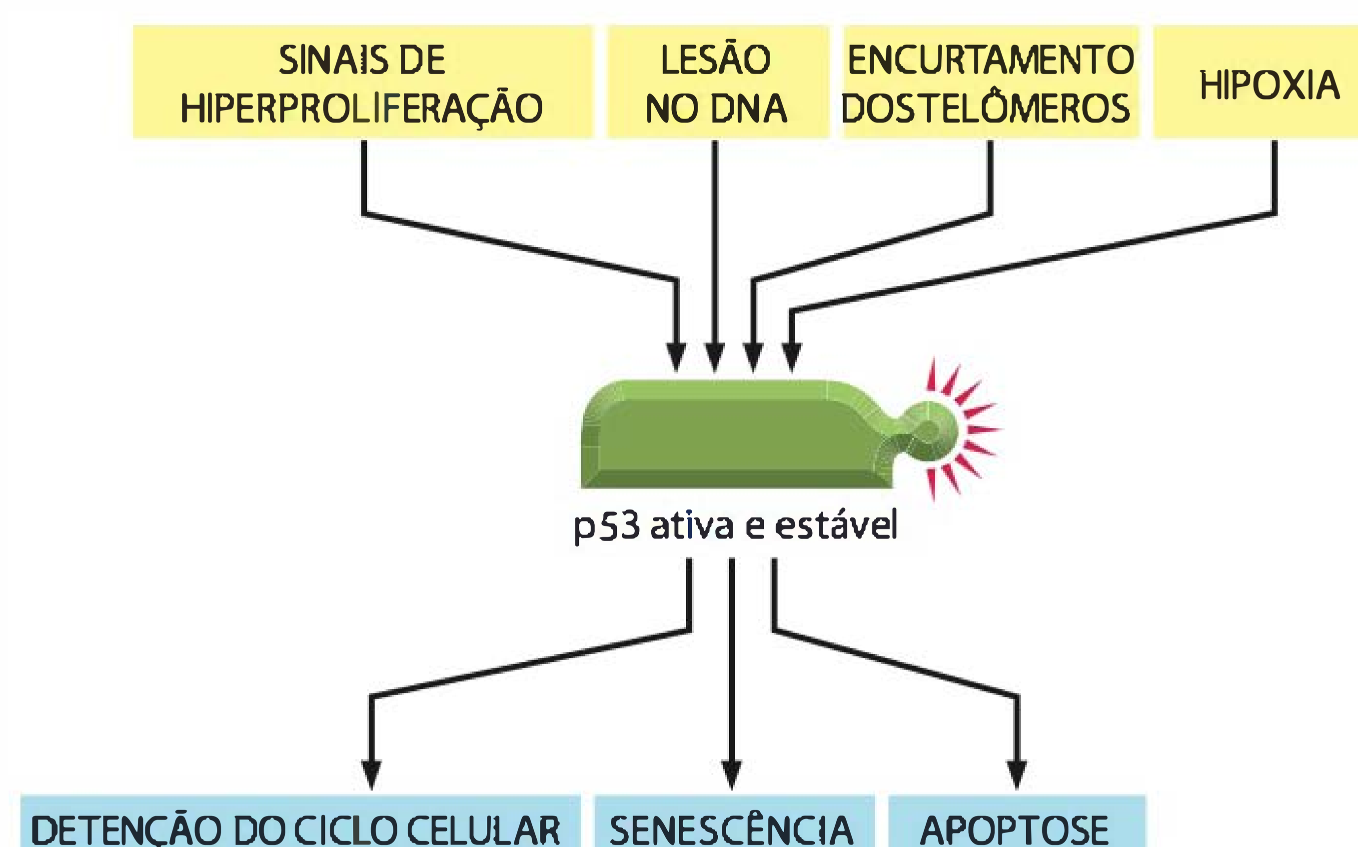


Figura 20-40 Mecanismos de ação da supressora de tumor p53. A proteína p53 é um sensor do estresse celular. Em resposta a sinais de hiperproliferação, lesão no DNA, hipoxia e/ou encurtamento dos telômeros, o nível de p53 aumenta, fazendo com que as células detenham o ciclo celular, entrem em apoptose ou usem a senescência replicativa. (Como discutido no Capítulo 17, uma célula senescente perde progressivamente a habilidade de se dividir.) Todos estes resultados são empecilhos para o crescimento tumoral.

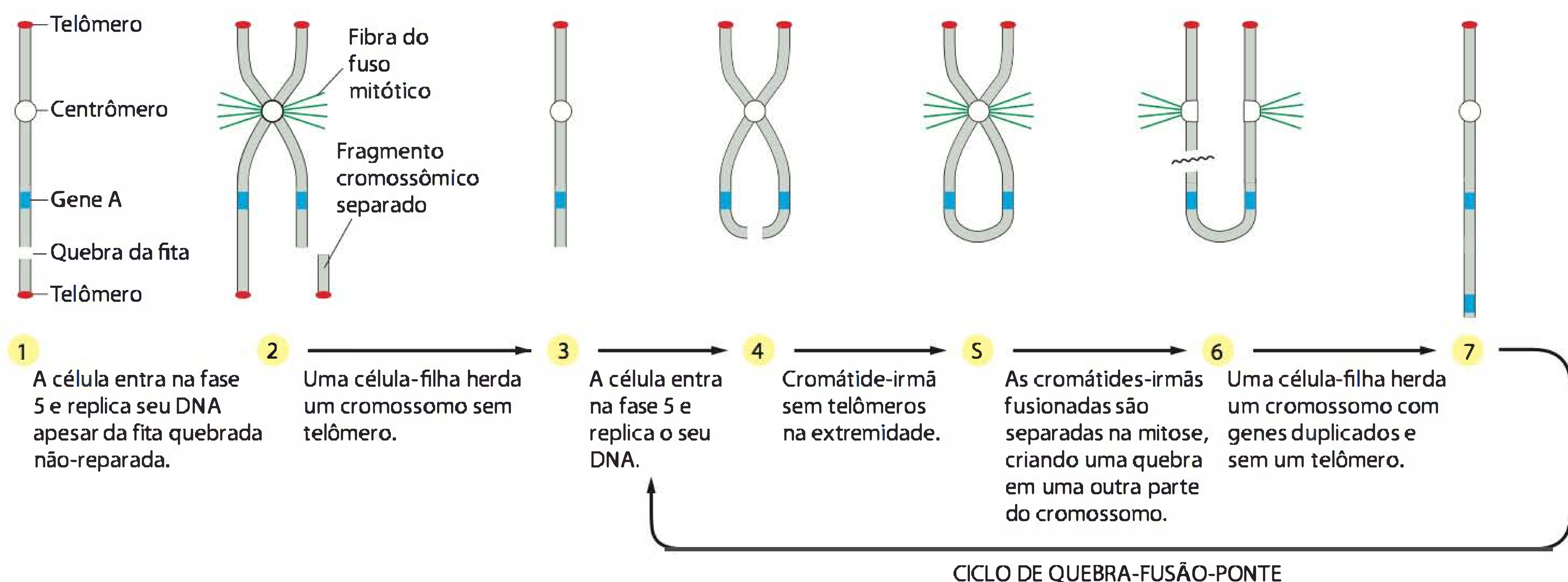


Figura 20-41 Como a replicação de DNA danificado pode levar a anormalidades cromossômicas, como amplificação e perda gênica. O diagrama mostra um dos muitos mecanismos possíveis. O processo começa com uma lesão acidental do DNA em uma célula que não possui uma proteína p53 funcional. Em vez de parar no ponto de verificação dependente de p53 no ciclo celular, onde uma célula normal com seu DNA lesionado pararia para corrigir a lesão, a célula defectiva em p53 entra na fase S, com as consequências mostradas no diagrama. Uma vez que o cromossomo transportando uma duplicação e não possuindo os telômeros foi gerado, repetidos ciclos de replicação, fusão de cromátides e quebra desigual (o ciclo de quebra-fusão-ponte) poderão aumentar o número de cópias da região duplicada ainda mais. Seleção a favor da célula com número aumentado de cópias de um gene na região afetada do cromossomo levará a mutantes nos quais os genes são amplificados com alto número de cópias. As cópias múltiplas poderão, por evento de recombinação ou por quebra da fita do DNA não reparado, ser excisadas do seu lócus original e aparecer como cromossomos duplos pequenos (ver Figura 20-34). A desordem cromossômica poderá levar à perda de genes, com seleção a favor da célula que perdeu o supressor de tumor.

inibidores no ciclo celular em parte, pelo menos, se ligando ao DNA para induzir a transcrição do gene *p21*, que codifica uma proteína que se liga e inibe o complexo Cdk requerido para a progressão no ciclo celular. Pelo bloqueio da atividade cinase do complexo Cdk, a proteína p21 previne a célula de entrar na fase S e replicar o seu DNA.

Os mecanismos pelos quais a proteína p53 induz a apoptose são mais complexos; ela pode estimular expressão de muitos genes pró-apoptóticos, mas também pode se ligar e inativar a proteína antiapoptótica Bcl2 na superfície da mitocôndria e, dessa forma, promover a apoptose (discutido no Capítulo 18).

Células com defeitos no gene *p53* não mostram as respostas de p53 dependentes de estresse. Elas tendem a escapar da apoptose e, se o seu DNA estiver lesionado, elas podem ir em frente, empurrando o DNA para replicação sem contudo parar para corrigir as lesões. Como resultado, elas podem morrer ou, muito pior, sobreviver e proliferar com um genoma corrompido (**Figura 20-41**). Tais mutilações genéticas podem levar à perda dos genes supressores de tumor e à ativação dos oncogenes. A perda de p53 também torna algumas células cancerosas muito menos sensíveis à radiação e a muitos fármacos anticâncer que poderiam parar a proliferação ou matá-las.

Em resumo, p53 ajuda um organismo multicelular a enfrentar com segurança lesões no DNA ou outros estresses celulares, agindo como uma guardiã da proliferação celular em circunstâncias que seriam perigosas. A perda da atividade do *p53* é muito perigosa, pois pode promover o desenvolvimento do câncer por quatro razões diferentes. Primeiro, por permitir que a célula com o DNA lesionado progrida no ciclo celular. Segundo, por permitir que ela escape da apoptose. Terceiro, por permitir a divisão das células com cromossomos lesionados, o que leva à instabilidade genética característica de células cancerosas, permitindo o acúmulo de mutações promotoras de câncer quando as células se dividem. Quarto, por tornar as células relativamente resistentes a fármacos anticâncer ou irradiação em alguns tipos de tumores. Muitas outras mutações podem contribuir com um ou outro tipo de comportamento inadequado, porém mutações em *p53* contribuem com todos.

Vírus de DNA tumorais bloqueiam a ação de proteínas-chave supressoras de tumor

Os vírus DNA tumorais causam câncer principalmente por interferirem com os controles do ciclo celular e da apoptose, incluindo aqueles que dependem de p53. Para entender esse tipo de carcinogênese viral, é importante entender a história da vida de um vírus. A maioria dos vírus de DNA usa a maquinaria de replicação do DNA celular para replicar seus genomas. Para produzir numerosas partículas infecciosas virais dentro de uma única célula, o vírus de DNA tem de comandar a maquinaria celular e dirigi-la de maneira rígida, quebrando as regras da replicação do DNA e em geral matando a célula no processo. A maioria dos vírus de DNA se reproduz somente dessa maneira. Alguns deles, no entanto, possuem uma segunda opção: eles podem propagar seus genomas de maneira calma, como um passageiro bem comportado na célula hospedeira, replicando em paralelo com o DNA celular no curso do ciclo celular comum. Estes vírus podem comutar entre dois modos de existência de acordo com as circunstâncias, permanecendo latentes sem causar dano algum por um longo

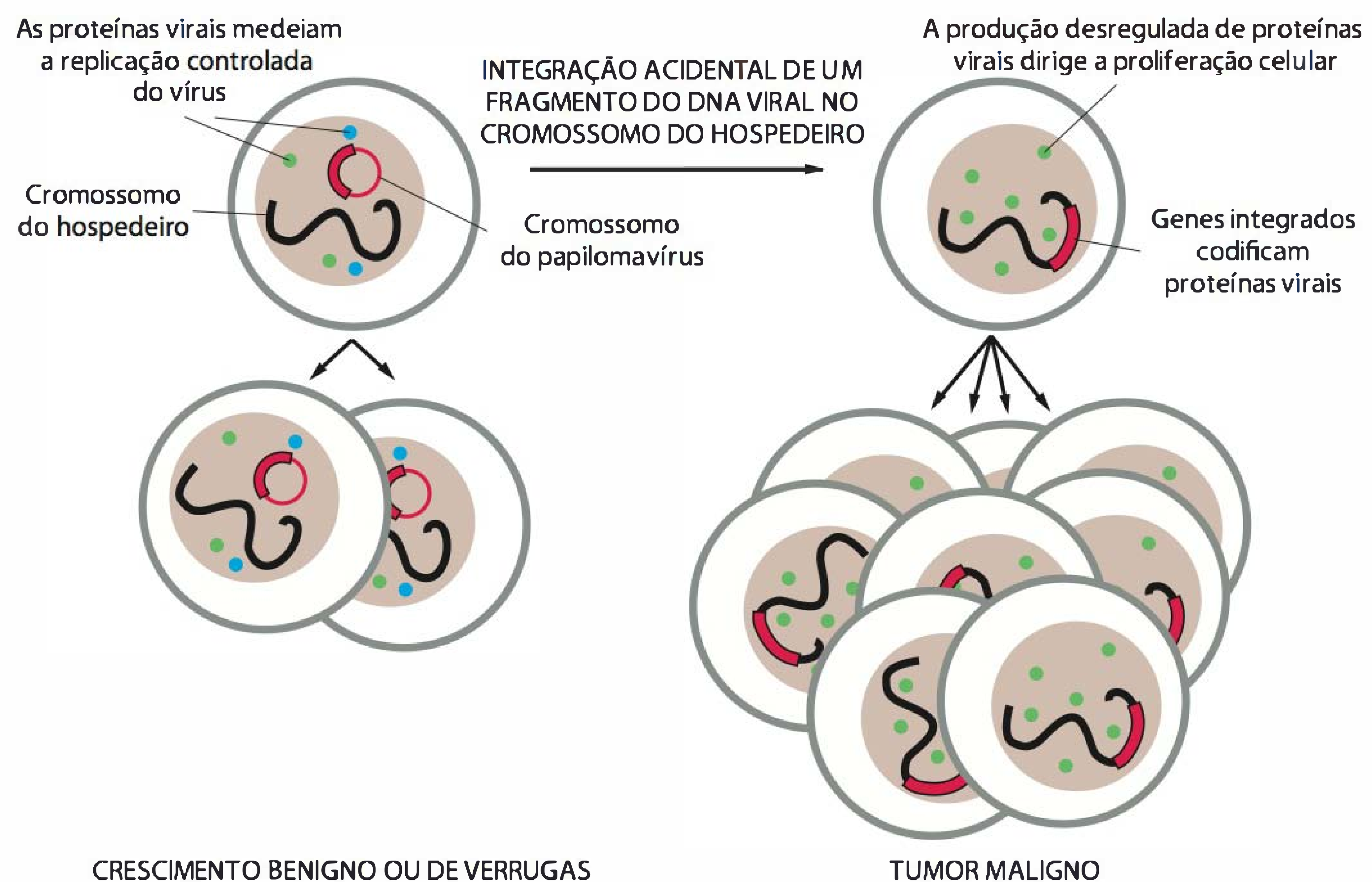


Figura 20-42 Como certos papilomavírus são considerados causadores de câncer de cérvice uterina. Os papilomavírus possuem cromossomos de DNA circular de fita dupla com cerca de 8.000 pares de nucleotídeos. Estes cromossomos normalmente são mantidos de maneira estável nas células basais do epitélio como plasmídeos, cuja replicação é regulada para que eles estejam em fase com os cromossomos da célula hospedeira (*esquerda*). Acidentes, que são raros, podem causar a integração de um fragmento do plasmídeo no cromossomo do hospedeiro, alterando o ambiente dos genes virais nas células basais. Isto (ou possivelmente outras causas) rompe o controle normal da expressão gênica viral. A expressão desregulada das proteínas virais interfere com o controle da divisão celular nas células basais, dessa forma ajudando a gênese do câncer (*direita*).

período de tempo, ou proliferando em algumas células em um processo que mata a célula hospedeira e gera um grande número de partículas infecciosas.

Estes vírus de DNA têm a habilidade de replicar seu DNA como passageiros em uma fase latente de replicação viral pela integração do genoma em um ou mais cromossomos do hospedeiro, ou formando plasmídeos extra, cromossômicos que se replicam concomitantemente com os cromossomos do hospedeiro durante a fase latente.

Não importa a forma de vida que o vírus de DNA esteja seguindo, não é do seu interesse matar o organismo hospedeiro. Porém, para vírus com uma fase de latência, acidentes podem ocorrer e ativar algumas das proteínas virais que o vírus normalmente usaria na sua fase replicativa para permitir que o DNA viral se replique independentemente do ciclo celular. Esses tipos de acidentes poderiam desencadear a proliferação persistente da célula hospedeira, levando-a ao câncer. O DNA viral suscetível a tais acidentes foi designado **vírus de DNA tumoral.**

Os **papilomavírus**, por exemplo, são a causa de verrugas humanas, sendo especialmente importantes como um fator-chave no carcinoma da cérvice uterina (6% de todos os cânceres humanos). Os papilomavírus infectam o epitélio cervical, onde se mantêm em uma fase latente na camada basal de células como plasmídeos extracromossômicos que se replicam concomitantemente com os cromossomos. Partículas virais infecciosas são geradas pela comutação para a fase replicativa nas camadas externas do epitélio no momento em que a progênie dessas células começa a se diferenciar antes de ser descamada da superfície. Aqui, a divisão celular normalmente deveria parar, porém o vírus interfere com a parada do ciclo celular para permitir a replicação do seu genoma. Via de regra, o efeito é restrito às camadas mais externas das células cervicais, sendo relativamente benigno, como nas verrugas. Ocasionalmente, no entanto, um acidente genético faz com que os genes virais que codificam as proteínas que previnem a parada do ciclo celular se integrem no cromossomo da célula hospedeira, tornando-se ativos na camada basal, onde as células-tronco epiteliais residem, o que leva ao câncer, com os genes virais agindo como oncogenes (**Figura 20-42**).

Nos papilomavírus, os genes virais que são os principais responsáveis são chamados de *E6* e *E7*. As proteínas desses oncogenes virais interagem com muitas proteínas celulares e particularmente se ligam a duas proteínas supressoras de tumor da célula hospedeira, pondo-as fora de ação e permitindo à célula replicar o seu DNA e se dividir de maneira descontrolada. Uma das proteínas é a Rb: por ligar-se à Rb, a proteína viral E7 impede que a Rb se ligue e iniba as proteínas E2F mencionadas anteriormente, o que permite que a célula, de maneira descontrolada, entre na fase S. A outra proteína é a p53; por ligar-se à p53, a proteína viral E6 engatilha a destruição de p53 (**Figura 20-43**), permitindo à célula anormal sobreviver, dividir-se e acumular mais anormalidades. Outros vírus de DNA tumorais usam mecanismos semelhantes para inibir a Rb e a p53, mostrando a importância da inativação de ambas as supressoras de tumor, o que permite o relaxamento dos freios normais da pro-

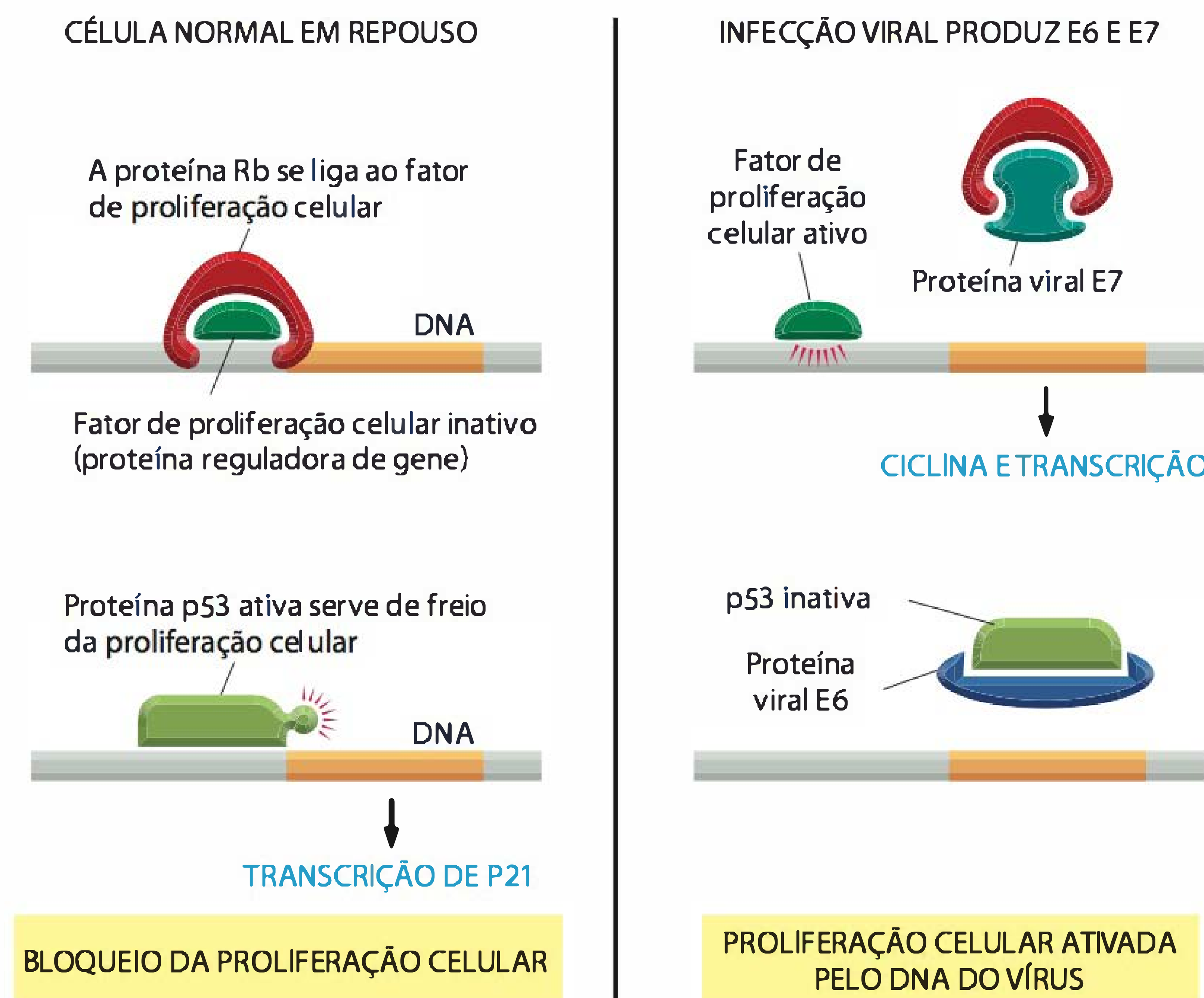


Figura 20-43 Ativação da proliferação celular por um vírus de DNA tumoral. Os papilomavírus produzem duas proteínas virais, E6 e E7, que sequestram as proteínas Rb e p53 das células hospedeiras. A ligação da proteína E6 leva à ubiquitinação da proteína p53, induzindo a sua proteólise (não-mostrada). O vírus SV40 (vírus relacionado que infecta macacos) usa uma única proteína com dupla função, chamada de antígeno T, para sequestrar as mesmas proteínas.

liferação celular. Assim, é surpreendente que praticamente todos os cânceres humanos possuiam ambas as vias inativadas, em geral afetando apenas um componente de cada.

As alterações nas células tumorais que levam à metástase ainda são um grande mistério

Talvez a lacuna mais significante no nosso entendimento sobre o câncer seja a que diz respeito à invasão e à metástase. Até o momento, ainda não foram claramente identificadas mutações que especificamente permitam que células cancerosas invadam os tecidos subjacentes, espalhem-se através do corpo e formem metástases. Na verdade, não está exatamente claro quais propriedades uma célula cancerosa deve adquirir para tornar-se metastática. Uma visão extrema é que a habilidade da célula cancerosa de tornar-se metastática não requer alterações genéticas posteriores além daquelas necessárias para enfraquecer os controles normais do crescimento, da divisão e da morte celulares. Alguns experimentos usando microarranjos de DNA para comparar os RNAs mensageiros expressos em uma metástase e no tumor primário apoiam esta visão. A visão alternativa mais amplamente aceita é a de que a metástase é uma tarefa complexa que requer mutações adicionais que podem ser bastante variadas, de acordo com as circunstâncias que são difíceis de ser descobertas individualmente.

Uma alteração molecular em células metastáticas de uma variedade de tumores – incluindo melanomas e carcinomas de mama, estômago e fígado – é a hiperexpressão da família da GTPase Rho *RhoC*, que ajuda a mediar a mobilidade celular com base em actina. Em alguns casos, a inibição da atividade de RhoC nestas células é suficiente para bloquear as suas habilidades metastáticas. No entanto, não está claro como RhoC contribui para a habilidade metastática.

A metástase apresenta diferentes problemas para diferentes tipos de células. Para uma célula sanguínea branca cancerosa circulando no corpo via corrente sanguínea, formar metástas e deve ser mais fácil do que para uma célula de carcinoma que terá de escapar de um epitélio. Como discutido anteriormente, é interessante distinguir duas fases de progressão do tumor requeridas para que um carcinoma forme metástase. Primeiro, as células devem escapar do confinamento normal do epitélio parental e começar a invadir os tecidos imediatamente abaixo. Segundo, elas devem viajar a locais distantes via corrente linfática ou sanguínea para estabelecer a *metástase*.

A primeira etapa, invasão local, requer uma perda dos mecanismos que normalmente mantêm as células epiteliais unidas. Como mencionado anteriormente, esta etapa é semelhante ao processo de desenvolvimento normal conhecido como *transição epitelial-mesenquimal* (*EMT, epithelial-to-mesenchymal transition*), no qual as células epiteliais sofrem uma mudança no caráter e tornam-se menos adesivas e mais migratórias (discutido no Capítulo 19). No âmago dessa transição estão as mudanças na expressão do gene da *caderina-E*. A função primária da proteína transmembrana caderina-E é na adesão célula-célula, sendo

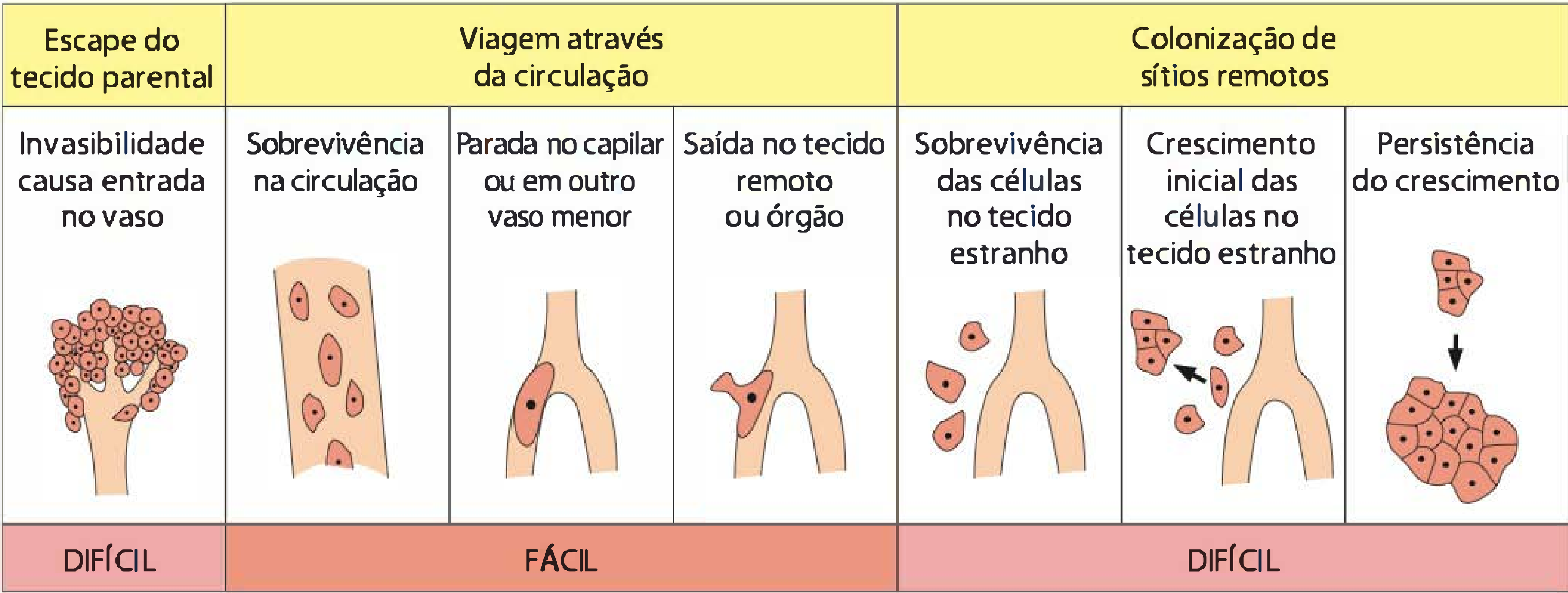


Figura 20-44 Barreiras para a metástase. Estudos com células tumorais marcadas deixando o sítio do tumor, entrando na circulação e mostrando quais passos do processo metastático, mostrado na Figura 20-17, são difíceis ou "ineficientes", no sentido de serem etapas nas quais muitas células falham e são perdidas. São nestas etapas difíceis que células altamente metastáticas são observadas pelo grande sucesso, se comparadas a células não-metastáticas. Parece que a habilidade de escapar do tecido parental e a habilidade de sobreviver e crescer no tecido estranho são propriedades que as células têm de adquirir para tornar-se metastáticas. (Adaptada de A. F. Chambers et al., *Breast Cancer Res.* 2:400-407, 2000. Com permissão de BioMed Central Ltd.)

especialmente importante na ligação de células epiteliais através de junções aderentes (ver Figura 19-15). Em alguns carcinomas do estômago e da mama, o gene *caderina-E* foi identificado como um gene supressor de tumor. O comportamento anormal de uma célula tumoral sem a proteína, poderá ser parcialmente bloqueado, pelo menos em células em cultivo: se um gene funcional da caderina-E é colocado de volta nas células cancerosas, elas perdem algumas das propriedades invasivas e começam a se tomar mais coesivas como células epiteliais normais. A perda do gene *caderina-E*, dessa maneira, poderá promover o desenvolvimento do câncer por facilitar a invasão local.

A entrada inicial de células tumorais na circulação é ajudada pela presença de um vasto suprimento de vasos sanguíneos e, alguma vezes, vasos linfáticos que os tumores atraem pela secreção de fatores angiogênicos como o VEGF, como discutido anteriormente; a fragilidade anormal somada ao vazamento de líquidos nestes vasos pode ajudar as células que tornaram-se invasivas a penetrar e então mover-se através da circulação com relativa facilidade. Os passos remanescentes na metástase que envolvem a saída do vaso sanguíneo ou linfático para a colonização efetiva de um local distante do tumor primário são mais difíceis de ser estudados. Para descobrir qual dos últimos estágios da metástase apresenta-se como o mais difícil para a célula cancerosa, células podem ser marcadas com um corante fluorescente ou com a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*), injetadas na corrente circulatória de um camundongo e então monitoradas. Neste experimento pode ser observado que muitas células sobrevivem na circulação, se alojam em pequenos vasos e penetram os tecidos subjacentes, não importando se são originárias de tumor metastático ou não. Algumas células morrem imediatamente após entrarem no tecido estranho; outras sobrevivem à entrada nos tecidos estranhos, porém falham ao tentar proliferar; outras ainda se dividem algumas vezes e param, formando micrometástases contendo dezenas ou mesmo milhares de células. Neste ponto, as células competentes para metástase superam suas contrapartes não-metastáticas pela formação de tumores em crescimento, levantando a possibilidade de que a habilidade de continuar a proliferação em tecidos estranhos (o processo chamado de *colonização*) é um processo-chave que as células cancerosas devem adquirir para tornarem-se metastáticas (**Figura 20-44**).

O desafio é usar ensaios como o descrito anteriormente para descobrir em nível molecular o que, se existir algo, distingue as células que colonizam daquelas que não colonizam. Uma possibilidade, como discutido anteriormente, é que as células capazes de colonizar são justamente aqueles raros membros da população parental do tumor que possuem o caráter especial de célula-tronco cancerosa. Ao que parece, este fato pode ser pelo menos uma parte da história, como explicamos há pouco. Apesar de conhecermos marcadores que ajudam a identificar células-tronco cancerosas, pelo menos para alguns cânceres, ainda não entendemos, no entanto, o que fundamentalmente dá a elas as propriedades especiais de células-tronco. Isto é parte do amplo problema de entender células-tronco em geral, discutido amplamente no Capítulo 23. De qualquer maneira, ainda é muito difícil apontar que alterações genéticas ou epigenéticas, se houver alguma, são necessárias para permitir que as células-tronco cancerosas colonizem tecidos estranhos.

Cânceres colorretais se desenvolvem lentamente, via uma sucessão de alterações visíveis

No começo do capítulo, vimos que a maioria dos cânceres se desenvolve gradualmente a partir de única célula aberrante, progredindo de tumores benignos para tumores malignos

pelo acúmulo de um número independente de acidentes genéticos e alterações epigenéticas. Discutimos o que alguns dos acidentes e alterações são em termos moleculares e como eles contribuem para o comportamento canceroso. Agora, vamos examinar um dos tipos mais comuns de câncer humano, mais detalhadamente, usando-o para ilustrar e também expandir alguns dos princípios gerais e mecanismos moleculares apresentados, na tentativa de tornar lógica a história natural da doença nestes termos. Vamos tomar o **câncer colorretal** como nosso exemplo, no qual as etapas da progressão do tumor foram seguidas *in vivo* com um colonoscópio (dispositivo de fibra óptica para visualizar o interior do cólon e do reto) e cuidadosamente estudadas em nível molecular. Este modelo, com base em estudos das formas esporádica e herdada da doença humana, serve de paradigma para ilustrar a natureza em etapas do desenvolvimento do tumor, o que nos permitirá associar estágios morfológicos específicos com alterações herdadas em função de um gene em particular.

O câncer colorretal se origina do epitélio que reveste o cólon (o maior segmento do intestino) e o reto (o segmento terminal do aparelho digestivo). A organização tecidual é muito similar à do intestino delgado, discutido em detalhes no Capítulo 23 (p. 1436-1442). Ambas as regiões do epitélio intestinal são renovadas em uma taxa extraordinariamente rápida, levando cerca de uma semana para substituir completamente a maior parte do revestimento intestinal. Em ambas as regiões, a renovação depende de células-tronco que se situam em bolsas profundas do epitélio, chamadas de criptas intestinais. Os sinais que mantêm as células-tronco e controlam a organização normal e a renovação do epitélio começam a ser perfeitamente entendidos, como explicado no Capítulo 23. Isto deve-se principalmente aos estudos que vieram da pesquisa em câncer. Mutações que rompem os sinais organizadores normais começam o processo da progressão tumoral para a maioria dos cânceres colorretais

O cânceres colorretais são comuns, correntemente causando cerca de 60.000 mortes por ano nos Estados Unidos, ou cerca de 10% do total de mortes por câncer. Como a maioria dos cânceres, eles em geral são diagnosticados tardiamente na vida (90% ocorrem depois da idade de 55). Exames de rotina, no entanto, de adultos normais, com o colonoscópio, frequentemente revelam pequenos tumores benignos ou adenomas do epitélio intestinal na forma de protusões teciduais chamadas de *pólipo* (**Figura 20-45**A; ver Figura 23-23). Acredita-se que estes pólipos adenomatosos sejam os precursores de uma ampla proporção de cânceres colorretais. Como a progressão da doença em geral é muito lenta, existe um período de 10 anos no qual o tumor de crescimento lento é detectável, porém ainda não se tornou maligno. Assim, pacientes são investigados por colonoscopia quando chegam aos cinquenta anos, e os pólipos são removidos pelo colonoscópio – procedimento cirúrgico fácil e rápido. A subsequente incidência de câncer colorretal é muito baixa, de acordo com alguns estudos, menos de um quarto do que seria.

O câncer do cólon nos traz um exemplo claro do fenômeno de progressão tumoral discutido previamente. Nas secções microscópicas dos pólipos com menos de 1 cm de diâmetro, as células e seus arranjos no epitélio em geral têm aparência quase normal. Quanto maior o pólipo, maior a probabilidade de conter células que parecem anormalmente indiferenciadas e formar estruturas organizadas anormalmente. Algumas vezes, duas ou mais áreas distintas podem ser distinguidas dentro de um único pólipo, com as células em uma área parecendo relativamente normais e aquelas na outra área com aparência claramente cancerosa, como se tivessem surgido como um subclone mutante dentro do clone original de células adenomatosas. Nos estágios terminais da doença, as células tumorais se tornam invasivas, primeiro invadindo a lâmina basal e a seguir se espalhando através da camada muscular que cerca o intestino (Figura 20-45B), e finalmente formando metástase para os linfonodos via vasos linfáticos e para o fígado, o pulmão e outros órgãos via vasos sanguíneos.

Poucas lesões genéticas chave são comuns a uma ampla fração de cânceres colorretais

Quais são as mutações que se acumulam com o tempo para produzir esta cadeia de eventos? Dos genes até aqui descobertos e envolvidos com o câncer colorretal, três são comuns e frequentemente mutados – o proto-oncogene *K-Ras* (membro da família gênica *Ras*) e os genes supressores de tumor *p53* e *Apc* (discutidos a seguir). Outros estão envolvidos em um número menor de cânceres de cólon (**Tabela 20-2**). Outros permanecem não identificados.

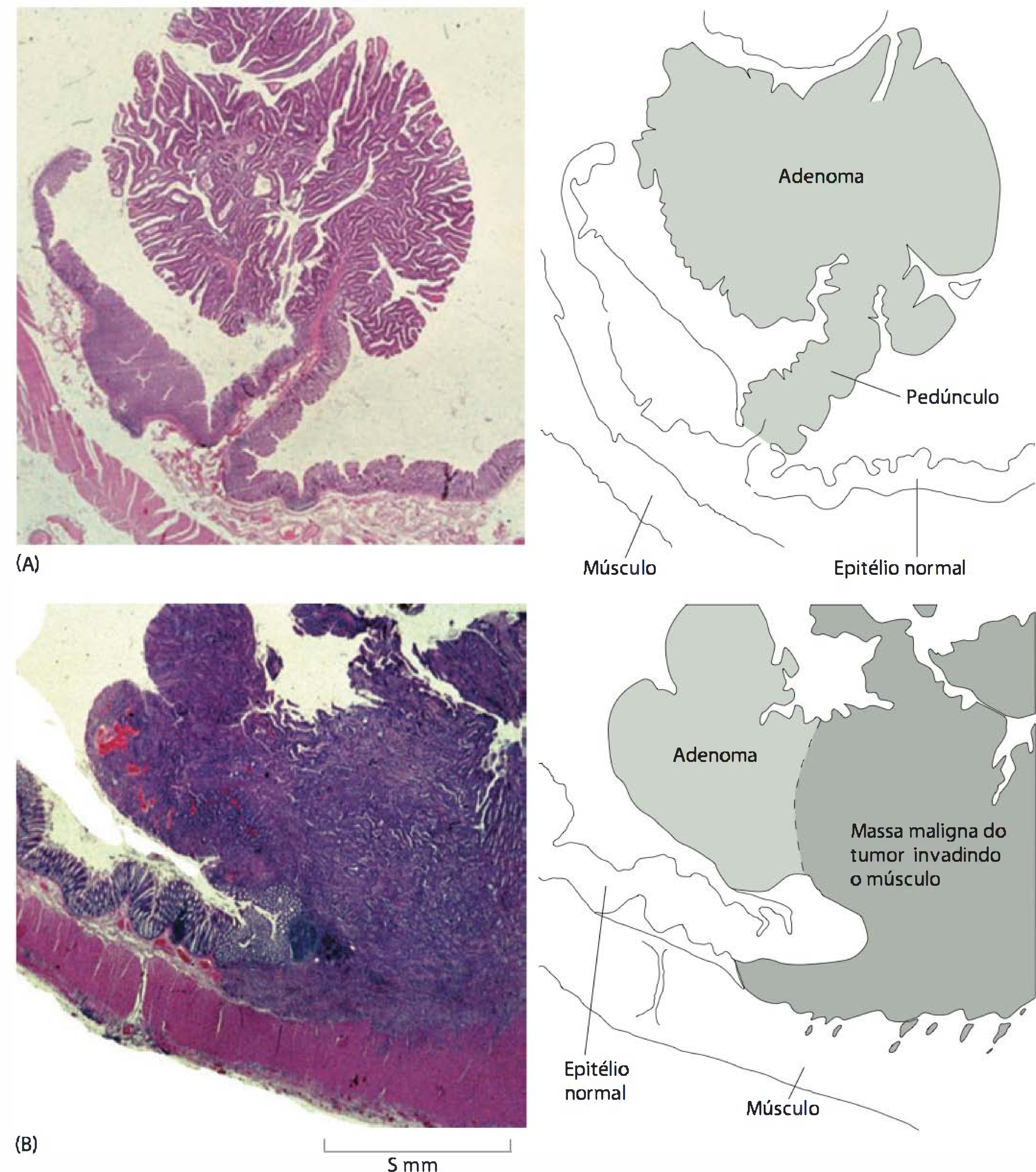


Figura 20-45 Secções transversais mostrando os estágios no desenvolvimento de um câncer de cólon típico. (A) Um pólipo adenomatoso do cólon. O pólipo emite protusões para o lúmen – espaço interno do cólon. O restante da parede do cólon está coberto com epitélio colônico normal; o epitélio do pólipo parece moderadamente anormal. (8) Um carcinoma que começa a invadir a camada muscular mais abaixo. (Cortesia de Paul Edwards.)

Uma abordagem para a descoberta das mutações responsáveis pelos cânceres colorretais é investigar as células para anormalidades em genes certamente envolvidos ou suspeitos de envolvimento com cânceres em outros órgãos. Tal tipo de investigação genética revelou que cerca de 40% dos cânceres colorretais possuem mutações pontuais no *K-Ras*, ativando-o para torná-lo um oncogene, e cerca de 60% possuem mutações inativantes ou deleções em *p53*.

Tabela 20-2 Algumas anormalidades genéticas detectadas em câncer colorretal

GENE	CLASSE	VIA AFETADA	CÂNCER DE CÓLON HUMANO (%)
K-Ras	Oncogene	Sinalizador tirosina-cinase receptora	40
β-catenina[1]	Oncogene	Sinalizador Wnt	5-10
Apc[1]	Supressor de tumor	Sinalizador Wnt	> 80
p53	Supressor de tumor	Resposta ao estresse e a danos ao DNA	60
receptor de TGFβII[2]	Supressor de tumor	Sinalizador TGFβ	10
Smad4[2]	Supressor de tumor	Sinalizador TGFβ	30
MLH1 e outros genes de reparo de pareamento incorreto de DNA	Supressor de tumor (estabilidade genética)	Reparo de pareamento incorreto de DNA	15 (Frequentemente silenciado por metilação)

Os genes com os mesmos números sobrescritos atuam na mesma via e dessa forma apenas um dos componentes está mutado em um câncer individual.

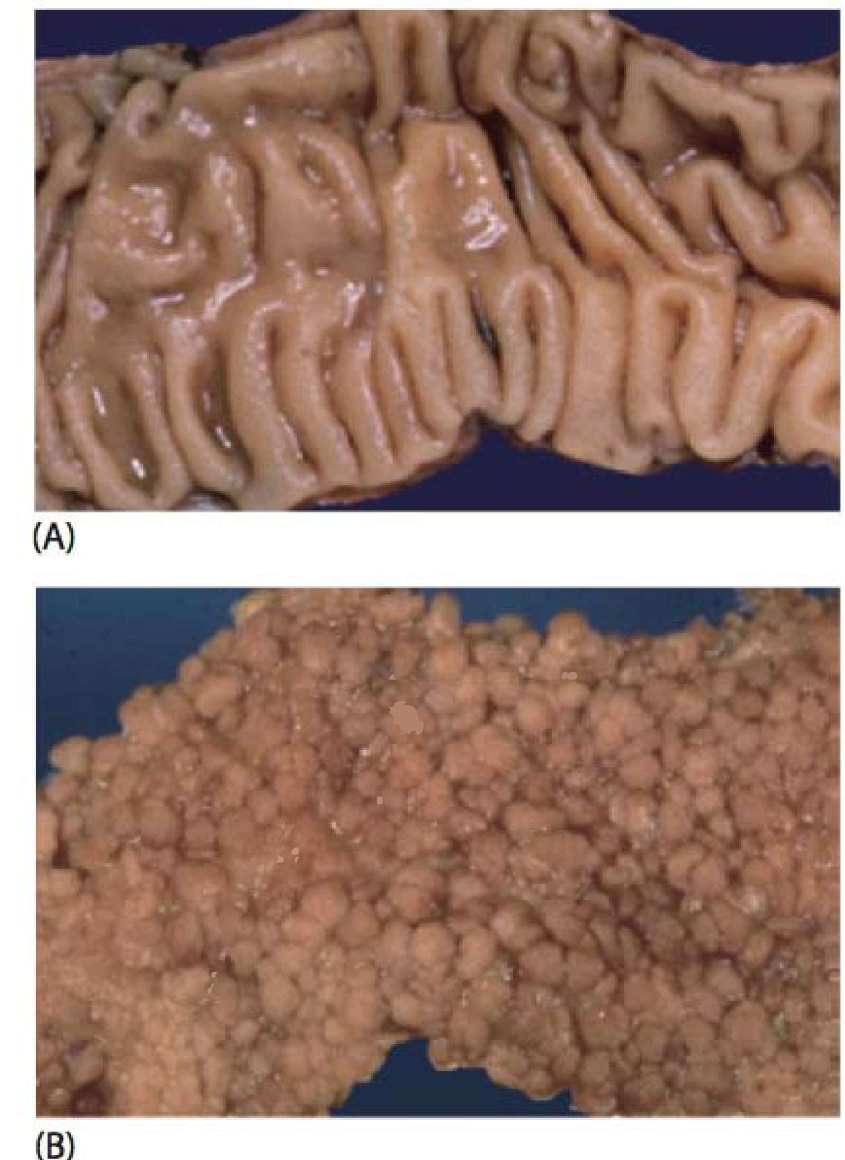


Figura 20-46 Cólon de um paciente com polipose adenomatosa familiar em comparação a um cólon normal. (A) A parede do cólon normal é ligeiramente endulada com uma superfície lisa. (8) A cólon com polipose está completamente coberto com centenas de pólipos que se projetam (mostrado em secções transversais na Figura 20-45), cada um parecendo uma couve-flor quando vistos a olho nu. (Cortesia de Andrew Wyllie e Mark Arends.)

Como discutido anteriormente, outra abordagem é investigar os defeitos genéticos nas poucas famílias que mostram predisposição hereditária para o câncer colorretal.

A primeira síndrome hereditária de câncer colorretal a ser analisada foi a *polipose adenomatosa familiar do cólon (FAP, familial adenomatous polyposis coli)*, na qual centenas ou milhares de pólipos se desenvolvem ao longo do comprimento do cólon (**Figura 20-46**). Os pólipos começam a aparecer na vida adulta jovem e, se não são removidos, um ou mais sempre progredirão para o estágio de malignidade; o tempo médio entre a primeira detecção de pólipos e o diagnóstico de câncer é de 12 anos. A doença poderá ocorrer devido a uma deleção ou inativação do gene supressor de tumor *Apc,* que tem as iniciais da síndrome. Indivíduos com a síndrome possuem mutações inativantes ou deleções em uma cópia do gene *Apc* em todas as células e mostra a perda de heterozigosidade em tumores, mesmo nos pólipos benignos. A maioria dos pacientes com câncer colorretal não possui a condição hereditária, porém mais de 80% dos cânceres (mas não as células normais) possuem ambas as cópias do gene *Apc* inativadas através de mutações adquiridas durante a vida. Assim, por uma via semelhante àquela discutida para o retinoblastoma, mutações no gene *Apc* foram identificadas como um dos ingredientes do câncer colorretal.

Como explicado anteriormente, mesmo que a síndrome não seja hereditária, os genes supressores de tumor poderão ser investigados pela busca de alterações genéticas adquiridas durante a evolução das células tumorais. O exame cuidadoso e sistemático de um grande número de cânceres colorretais revela que uma região seleta de certos cromossomos possui precisamente a mesma sequência de DNA de ambos os cromossomos herdados do pai e da mãe. A perda de heterozigosidade sugere que estas regiões abrigam genes supressores de tumor. Uma delas é a região que inclui o *Apc*. Outra inclui o gene *Smad4*, mutado em 30% dos cânceres de cólon; sua remoção bloqueia o efeito inibidor de crescimento da via TGFβ. Partes específicas de outros cromossomos também mostram frequentes perdas ou ganhos nos cânceres colorretais, sendo alvos importantes para se achar genes críticos adicionais para o câncer.

Com a expansão do nosso conhecimento sobre genes e suas funções, outra abordagem é localizar genes que codificam proteínas que interagem com proteínas codificadas por um gene crítico para o câncer conhecido, na expectativa de que tais genes possam ser alvo de mutações. A proteína Apc agora é conhecida por ser um componente inibidor da *via de sinalização Wnt* (discutida no Capítulo 15), que se liga à proteína *β-catenina*, outro componente da via Wnt, ajudando na sua degradação. Pela inibição da β-catenina dessa maneira, a Apc previne a migração de β-catenina para o núcleo, onde ela atua como um regulador da transcrição cuja função é manter o estado de célula-tronco, como discutido no Capítulo 23. A perda de Apc resulta em um excesso de β-catenina livre, e assim em uma expansão sem controle da população de células-tronco e um aumento massivo no número e tamanho das criptas intestinais (ver Figura 23-23).

Quando o gene de *β-catenina* foi sequenciado em uma coleção de tumores colorretais, entre os poucos tumores que não possuíam mutações no gene *Apc*, uma alta proporção possuía mutações ativadoras no gene de *β-catenina.* Assim, é a atividade excessiva da via de sinalização Wnt que é crítica para a iniciação do câncer, e não um oncogene ou um supressor de tumor que a via contém, o que está de acordo com o princípio geral de que um câncer individual raramente adquire mutações em mais de um componente de uma via que é crítica para a tumorigênese, pois não existem vantagens para que isso ocorra.

Sendo assim, por que o gene *Apc* em particular é o grande responsável pelo câncer colorretal? A proteína Apc é grande e interage não só com a β-catenina, mas também com vários outros componentes, incluindo os microtúbulos. A perda de Apc ao que parece aumenta a frequência de defeitos no fuso mitótico, levando a anormalidades cromossômicas quando a célula se divide. Este efeito promotor de câncer independente poderia explicar por que mutações em *Apc* são tão proeminentes como causa do câncer colorretal.

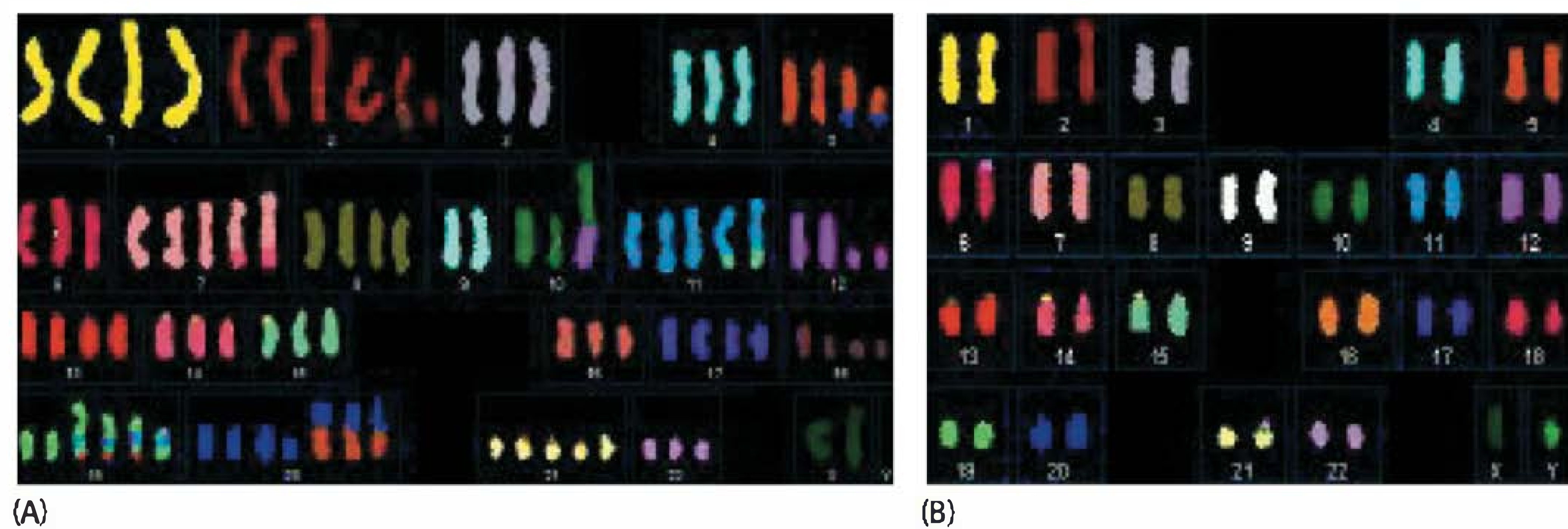


Figura 20-47 Complementos cromossômicos (cariótipos) do câncer de cólon mostrando diferentes tipos de instabilidade genética. (A) O cariótipo de câncer típico mostra muitas anormalidades grosseiras em número e estrutura de cromossomos. Variações consideráveis podem existir de célula para célula (não-mostrado). (B) O cariótipo de um tumor que possui complementos cromossômicos estáveis com poucas anomalias cromossômicas. Os defeitos em sua maioria são invisíveis e foram criados por defeitos na maquinaria de reparo de pareamento incorreto no DNA. Todos os cromossomos nesta figura foram corados como na Figura 20-13 o DNA de cada um dos cromossomos sendo corado com uma combinação de diferentes corantes fluorescentes. (Cortesia de Wael Abdel-Rahman e Paul Edwards.)

Alguns cânceres colorretais possuem defeitos na maquinaria de reparo de pareamento incorreto de bases

Em adição à doença hereditária (FAP) associada a mutações no gene *Apc*, existe um segundo tipo de predisposição hereditária mais comum para carcinoma do cólon no qual o curso dos eventos diferem do descrito para FAP. Na condição que é denominada *câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer)*, a probabilidade de câncer no cólon é aumentada sem qualquer aumento de pólipos colorretais (adenomas). Deste modo, as células cancerosas são diferentes e possuem um cariótipo normal (ou quase normal); a maioria dos tumores colorretais em pacientes não-HNPCC, em contraste, possui anormalidades grosseiras com múltiplas translocações, deleções e outras aberrações, assim como um número de cromossomos maior do que o normal (**Figura 20-47**).

As mutações que predispõem indivíduos HNPCC ao câncer colorretal ocorrem em um dos diversos genes que codificam para componentes centrais do *sistema de reparo incorreto do* DNA, que são homólogos em estrutura e função aos genes de bactéria e levedura *MutL* e *MutS* (ver Figura 2-20). Apenas uma das duas cópias existentes do gene envolvido está defeituosa, e o sistema de reparo ainda é capaz de remover os inevitáveis erros de replicação do DNA que ocorrem nas células dos pacientes. Entretanto, como discutido previamente, estes indivíduos estão em risco, pois a perda ou a inativação do outro gene imediatamente eleva a taxa espontânea de mutações em cem vezes ou mais (discutido no Capítulo 5). Estas células geneticamente instáveis podem agora presumivelmente aumentar a velocidade dos processos-padrão de mutações e seleção natural que permitem a clones celulares progredir para a malignidade.

Esse tipo particular de instabilidade genética produz alterações invisíveis no cromossomo – mais notavelmente em nucleotídeos individuais e expansões ou contrações curtas de repetições de mononucleotídeos e dinucleotídeos como AAAA... ou CACACA.... Quando o defeito foi reconhecido em pacientes HNPCC, mutações no sistema de reparo foram detectadas em 15% dos cânceres colorretais em pacientes sem predisposição para herança de mutações.

Assim, a instabilidade genética encontrada em muitos dos cânceres colorretais pode ser adquirida pelo menos de duas maneiras. A maioria dos cânceres mostra uma forma de instabilidade cromossômica que leva a alterações cromossômicas visíveis, enquanto outros ocorrem em escala muito menor e refletem defeito no sistema de reparo. Na verdade, muitos carcinomas mostram instabilidade cromossômica ou um sistema de reparo defeituoso – muito raramente, ambos. Tais achados claramente demonstram que a instabilidade genética não é um subproduto acidental do comportamento maligno, mas uma causa contribuinte – e células cancerosas podem adquirir tal instabilidade de diversas maneiras.

As etapas da progressão do tumor frequentemente podem ser correlacionadas a mutações específicas

Em qual ordem *K-Ras, p53, Apc* e outros genes críticos para o câncer colorretal mutam, e qual a contribuição de cada um deles para o comportamento antissocial da célula cancerosa? Não existe uma resposta simples, pois o câncer colorretal pode surgir por mais de uma via: assim, sabemos que, em alguns casos, a primeira mutação pode ocorrer no sistema de reparo de DNA por incorporação incorreta de nucleotídeos; em outros, pode ser um gene que regula a proliferação celular. Deste modo, como discutido previamente, uma característica geral como a instabilidade genética ou a tendência de proliferar anormalmente pode surgir de diversas maneiras, através de mutações em diferentes genes.

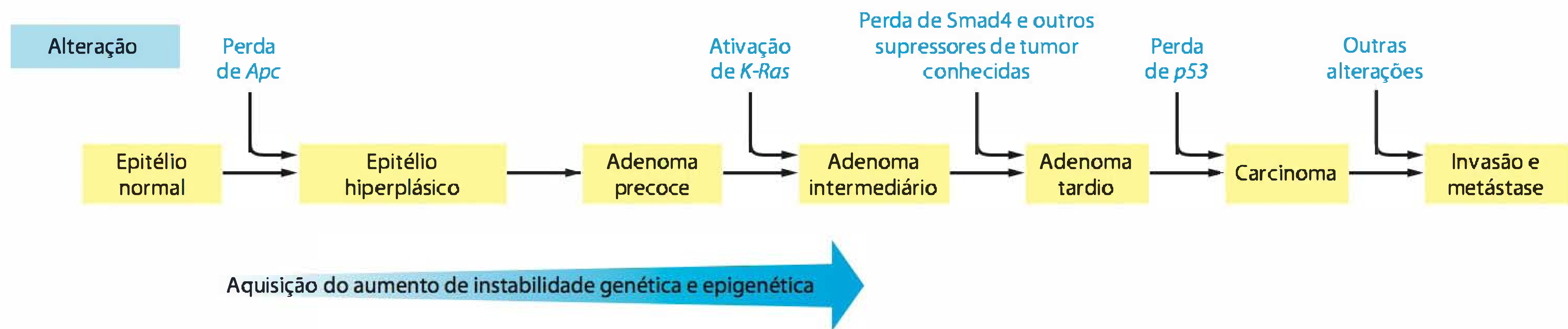


Figura 20-48 Sequencias típicas sugeridas de alterações genéticas fundamentais para o desenvolvimento de um carcinoma colorretal. Este diagrama muito simplificado traz uma ideia geral do modo como as mutações e o desenvolvimento tumoral se encaixam. Porém, certamente existem outros genes mutantes que ainda não são conhecidos, e diferentes cânceres de cólon podem progredir através de sequências diferentes de mutações.

Assim, certos conjuntos de mutações são particularmente comuns em cânceres colorretais, ocorrendo em uma ordem característica. Deste modo, na maioria dos casos, mutações que inativam o gene *Apc* parecem ser as primeiras, ou pelo menos parecem acontecer na etapa inicial, por serem detectadas com a mesma alta frequência em pequenos pólipos benignos ou em grandes tumores malignos. Alterações herdadas que levam à instabilidade genética ou epigenética parecem surgir nos primeiros passos da progressão do tumor, pois são requeridas para dirigir as etapas subsequentes.

Mutações ativadoras no gene *K-Ras* ocorrem tardiamente porque são raras em pequenos pólipos, mas muito comuns em pólipos grandes que mostram uma certa perturbação nos padrões de diferenciação celular e histológicos. Células de carcinoma colorretal em cultivo nesse estágio mostram as características típicas de células transformadas, como a habilidade de proliferar sem ancorar a um substrato. A perda do gene supressor de tumor *Smad4* e mutações inativantes de *p53* devem vir depois, porque são raras em pólipos e muito frequentes em carcinomas (**Figura 20-48**). Como discutido anteriormente, a perda da função de *p53* permite às células acumularem mutações adicionais e evitarem apoptose e a parada no ciclo celular.

Em resumo, apesar de o exato conjunto de mutações variar de um câncer colorretal para outro, a carcinogênese requer certas alterações genéticas que desabilitam um mecanismo de controle particular, e a ordem na qual estas alterações ocorrem não é ao acaso (**Figura 20-49**).

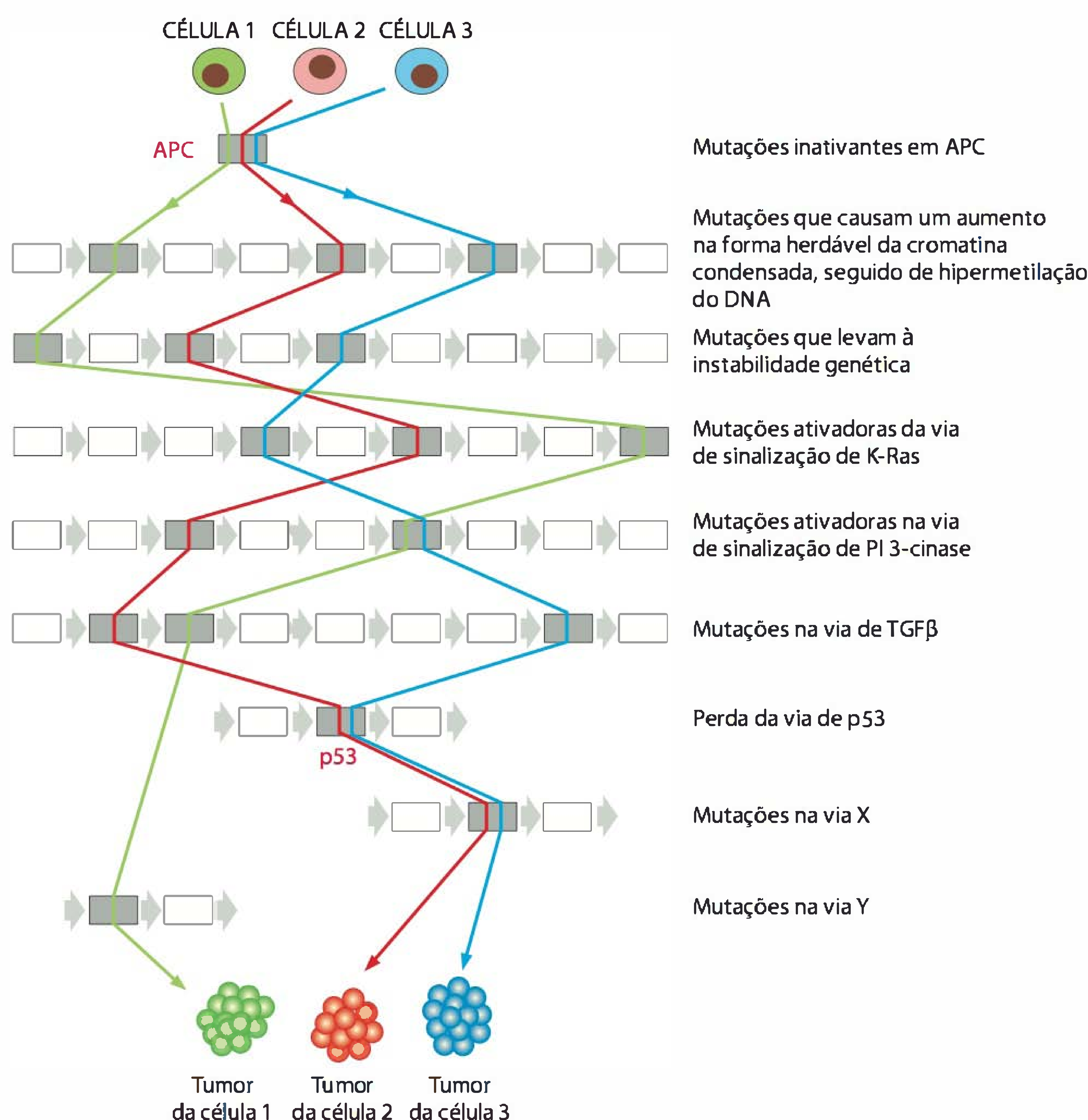


Figura 20-49 A natureza geral da progressão tumoral em nível molecular. Cada fileira no diagrama representa uma via bioquímica, de modo que a alteração de uma dada proteína (*caixa retangular*) pela alteração do seu gene é o bastante para ganhar o efeito completo. As três vias (*linhas coloridas verticais*) foram desenhadas para indicar as mutações que um clone de células tumorais em evolução acumula à medida que segue em direção ao câncer. O diagrama é modelado de acordo com eventos conhecidos no desenvolvimento do câncer de cólon, porém não pode ser tomado literalmente. Os pontos principais são que, enquanto muitos genes diferentes serão alterados em tumores de cólon individuais à medida que desenvolvem metástases, os tumores não são exatamente iguais, mas em alguns padrões. Em particular, tanto as vias de sinalização que estão alteradas quanto a ordem geral na qual estas alterações ocorrem frequentemente são similares para cânceres diferentes.

Cada caso de câncer é caracterizado por seu próprio arranjo de lesões genéticas

Como ilustrado pelo câncer colorretal, a classificação tradicional de cânceres é simplística. Mesmo um tipo único de câncer é uma coleção heterogênea de desordens; apesar de alguns aspectos comuns, cada desordem será caracterizada por seu próprio arranjo de lesões genéticas. Na forma de câncer de pulmão conhecido como *carcinoma de células pequenas*, por exemplo, são encontradas mutações em *p53*, *Rb*, *Myc* e em pelo menos cinco outros proto-oncogenes e genes supressores de tumor conhecidos. Pacientes diferentes possuem diferentes combinações de mutações, e estas diferenças genéticas correspondem a respostas diferentes ao tratamento.

A princípio, a biologia molecular fornece as ferramentas para buscar precisamente quais genes estão amplificados, mutados ou regulados incorretamente por mecanismos epigenéticos nas células tumorais de um dado paciente. Como discutiremos a seguir, tais informações logo provarão ser tão importantes para o diagnóstico e o tratamento do câncer como foi a identificação de micro-organismos para pacientes com doenças infecciosas.

Resumo

Estudos de embriões em desenvolvimento e camundongos geneticamente modificados por engenharia genética ajudaram a revelar as funções de um amplo número de genes críticos para o câncer. Muitos dos oncogenes e genes supressores de tumor mutados no câncer codificam para componentes da via do controle social que regulam os eventos de crescimento, divisão, diferenciação e morte. Outros genes, categorizados vagamente como "genes de manutenção do DNA", ajudam a manter a integridade do genoma. As alterações moleculares que permitem que o câncer forme metástase ainda são desconhecidas.

Os vírus tumorais de DNA, como os papilomavírus, podem promover o desenvolvimento de câncer por codificar proteínas que inibem o produto de alguns genes supressores de tumor. A proteína viral se liga e inibe a proteína Rb, que normalmente age como um freio na divisão celular, e também a proteína p53, que normalmente induz a parada do ciclo celular ou apoptose em resposta a lesões no DNA ou outros estresses celulares. Perda ou inativação da via de p53, que ocorre em quase todos os cânceres humanos espontâneos, é especialmente perigosa por permitir que células geneticamente mutiladas escapem da apoptose e continuem a proliferar. Inativação da via de Rb também ocorre na maioria dos cânceres humanos, ilustrando como cada uma das vias é fundamental na nossa proteção contra o câncer.

Podemos frequentemente correlacionar as etapas da progressão do tumor com mutações que ativam oncogenes específicos e inativam genes supressores de tumor específicos, com o câncer de cólon sendo o exemplo mais entendido. Contudo, combinações diferentes de mutações e alterações epigenéticas são encontradas em diferentes tipos de cânceres, e mesmo em diferentes pacientes com o mesmo tipo de câncer, refletindo a maneira ao acaso na qual tais alterações herdáveis ocorrem. Não obstante, muitos dos mesmos tipos de alterações são encontrados repetidamente, sugerindo que existe apenas um número limitado de maneiras nas quais nossa defesa contra o câncer pode ser rompida.

TRATAMENTO DO CÂNCER: PRESENTE E FUTURO

Podemos aplicar o nosso crescente entendimento da biologia do câncer para direcionar nosso ataque à doença em três níveis: prevenção, diagnóstico e tratamento. A prevenção é sempre melhor do que a cura e, como discutido anteriormente, muitos cânceres podem ser prevenidos especialmente evitando fumar tabaco. Dessa maneira, cânceres frequentemente podem ser detectados no estágio inicial pelo varredura de tumores primários pequenos, que poderão ser removidos antes de formarem metástase, como vimos para o câncer da cérvice uterina. Ensaios altamente sensíveis prometem criar novas oportunidades para uma melhor prevenção e tratamento por meio de diagnósticos mais precoces e mais precisos. Avanços nos métodos de varredura somados a mudanças no estilo de vida provavelmente oferecem o prospecto mais imediato para a redução das taxas de morte por câncer, porém eles nunca serão perfeitamente efetivos. Assim, pelos anos por vir, a doença em sua forma mais maligna continuará a ser comum e o tratamento continuará a ser necessário.

A busca para a cura dos cânceres é difícil, mas não impossível

A dificuldade de cura de um câncer é semelhante à dificuldade de nos livrarmos das ervas daninhas. As células cancerosas podem ser removidas cirurgicamente, ou destruídas por compostos químicos tóxicos, ou ainda por radiação, porém é difícil erradicar todas as células cancerosas. Cirurgia raramente pode eliminar todas as metástases e os tratamentos que matam as células cancerosas em geral são tóxicos para as células normais. Em adição, como descrito anteriormente, enquanto a maioria das células cancerosas frequentemente é morta por irradiação ou quimioterapia, a pequena população de células-tronco cancerosas que se dividem lentamente é difícil de ser eliminada dessa maneira; se mesmo umas poucas células-tronco cancerosas permanecem, elas podem regenerar o tumor. Dessa forma, diferentemente de células normais, células cancerosas mutam rapidamente e desenvolvem resistência a fármacos e à irradiação usadas contra elas.

Apesar dessas dificuldades, a cura efetiva usando fármacos anticâncer (sozinhas ou em combinação com outros tratamentos) já foi encontrada para alguns cânceres letais no passado, incluindo o linfoma de Hodgkin, o câncer de testículos, o coriocarcinoma, algumas leucemias e outros cânceres da infância. Mesmo para tipos de câncer onde a cura está longe de nossas expectativas, existem tratamentos que prolongam a vida ou pelo menos conferem uma boa qualidade de vida. Porém, que prospecto existe em melhorar o tratamento e achar a cura para as formas mais comuns de câncer, que ainda causam grandes sofrimentos e muitas mortes trágicas?

As terapias tradicionais exploram a instabilidade genética e a perda da resposta dos pontos de verificação do ciclo celular em células cancerosas

As terapias anticâncer necessitam tirar vantagens de algumas anormalidades moleculares de células cancerosas que as distinguem de células normais. Uma anormalidade é a instabilidade genética, causada por uma dessas anormalidades na manutenção dos cromossomos, nos pontos de verificação do ciclo celular e no reparo do DNA. Digno de nota é que a maioria das terapias correntes trabalha com a exploração de tais anormalidades, embora os cientistas que desenvolveram os tratamentos não soubessem disso. A maioria dos fármacos anticâncer e a radiação ionizante lesionam o DNA. Eles preferencialmente matam certos tipos de células cancerosas porque estas células mutantes têm uma habilidade diminuída de sobreviver aos danos. Células normais tratadas com radiação, por exemplo, param o ciclo celular até que reparem os danos do seu DNA. Tal parada no ciclo celular é um exemplo de *resposta de ponto de verificação do ciclo celular,* discutido no Capítulo 17. Células cancerosas geralmente possuem defeitos em muitos dos pontos de verificação e frequentemente continuam a se dividir após a irradiação; isso causa muitas mortes após alguns dias devido às severas lesões genéticas que elas experimentam.

Infelizmente, enquanto alguns dos defeitos moleculares presentes em células cancerosas aumentam a sua sensibilidade aos agentes citotóxicos, outros aumentam sua resistência. Algumas das mortes induzidas pelos danos ao DNA ocorrem por apoptose, e células cancerosas frequentemente adquirem defeitos no sistema de controle que ativa a apoptose em resposta a tais danos. Por exemplo, como discutimos anteriormente, danos no DNA induzidos por fármacos anticâncer ou irradiação normalmente ativam a p53, que engatilha a via apoptótica. Assim, a inativação da via de *p53* que ocorre em muitos cânceres torna certos tipos de células tumorais menos sensíveis a estes agentes. As células cancerosas variam amplamente nas suas respostas a vários tratamentos, provavelmente refletindo o tipo particular de defeito que possuem no reparo do DNA, nos pontos de verificação do ciclo celular e no controle da apoptose.

Novos fármacos poderão explorar a causa específica da instabilidade genética de um tumor

À medida que nos tornamos capazes de identificar as alterações específicas em uma célula cancerosa que a torna diferente de seus vizinhos normais, podemos usar este conhecimento para desenvolver terapias que eliminem as células cancerosas sem afetar as células normais. Uma das características das células cancerosas é sua instabilidade genética; como explica-

mos anteriormente, esta é uma das características que ajudam na evolução e na proliferação perigosa. Porém, é ao mesmo tempo um defeito – uma vulnerabilidade que podemos explorar para liquidá-las.

Como vimos, as células cancerosas são forçadas a caminhar por linhas tortuosas à medida que evoluem em direção à metástase: elas necessitam possuir um defeito no processo de manutenção do seu DNA que é severo o suficiente para permitir que acumulem novas mutações a taxas significativamente altas, porém nem tão severo para a autodestruição pela frequente perda de genes necessários para a sobrevivência celular. Como existem centenas de genes diferentes requeridos para manter as sequências do DNA e a estrutura dos cromossomos com alta fidelidade (discutido nos Capítulos 4 e 5), espera-se que existam pelo menos dezenas de caminhos diferentes para uma célula tumoral particular adquirir sua instabilidade genética. Desse modo, estes caminhos deverão ser mutuamente exclusivos: uma vez que uma célula se torna geneticamente instável de maneira moderada, é previsível que aumente seu risco de morrer devido à inativação de genes de manutenção adicionais. As células em que isso ocorre morrerão e serão excluídas da população tumoral.

Estudos detalhados dos mecanismos de manutenção do DNA discutidos no Capítulo 5 revelam uma quantidade surpreendente de redundâncias aparentes, com múltiplas vias para reparar cada tipo de dano ao DNA. Assim, nocauter uma determinada via para o reparo do DNA geralmente é menos desastroso do que se espera, pois uma via alternativa de reparo deve existir. Vimos, por exemplo, quão paralisadas forquilhas de replicação podem surgir quando a forquilha encontra uma quebra na fita-molde, e como a célula evita o desastre que resultaria então. Primeiro, elas possuem uma maquinaria para escapar do problema reparando diretamente a quebra em uma das fitas; então, caso isso falhe elas podem reparar a forquilha paralisada por recombinação homóloga (ver Figura 5-53). Suponhamos que uma célula cancerosa se torne geneticamente instável pela aquisição de uma mutação que reduza sua habilidade de reparar forquilhas paralisadas por recombinação homóloga. Seria possível erradicar o câncer tratando-o com um fármaco que iniba o reparo de quebra em uma das fitas, desse modo aumentando bastante o número de forquilhas paralisadas? As consequências esperadas seriam inofensivas para as células normais, que poderiam reparar forquilhas paralisadas, o que não aconteceria com as células cancerosas e, portanto, seria letal.

Enquanto tal possibilidade parece muito boa para ser verdadeira, precisamente esta estratégia parece funcionar para matar células em cânceres que possuem os genes supressores de tumor *Brca1* e *Brca2* inativados. Como descrito no Capítulo 5, Brca2 é uma proteína acessória que interage com a proteína Rad51 (o análogo RecA em humanos) na iniciação dos eventos de recombinação geral. A Brca1 é uma outra proteína requerida para o processo de reparo. Como *Rb*, *Brca1* e *Brca2* foram descobertos em mutações que predispõem o homem ao câncer – nesse caso, cânceres da mama e dos ovários (diferentemente de *Rb*, eles parecem estar envolvidos em apenas uma pequena proporção de tais cânceres). Indivíduos que herdam uma cópia mutada de *Brca1* ou *Brca2* desenvolvem tumores que inativaram a segunda cópia do mesmo gene, presumivelmente porque essa alteração torna as células geneticamente instáveis e aumenta a velocidade na progressão do tumor. Fármacos que inibem uma enzima chamada de PARP (poli ADP-ribose-polimerase) têm um efeito dramático nas células do tumor, matando-as com uma alta seletividade. Isso é atribuído ao fato de a PARP ser requerida para o reparo de quebras em uma das fitas do DNA. Talvez surpreendentemente, a inibição de PARP tem pouco efeito em células normais; de fato, camundongos projetados para perder PARP1 – o principal membro da família PARP envolvido no reparo do DNA – permanecem saudáveis sob condições de laboratório. Estes resultados sugerem que, enquanto a via de reparo que requer PARP supre a primeira linha de defesa contra quebras em uma fita de DNA, estas quebras podem ser facilmente reparadas por uma via de recombinação genética em células normais (**Figura 20-50**). Em contraste, células tumorais que adquiriram instabilidade genética pela perda de Brca1 ou Brca2 perdem sua segunda linha de defesa e tornam-se, assim, sensíveis aos inibidores de PARP (ou seja, elas não possuem a via de reparo 2 na Figura 20-50).

A inibição de PARP ainda está em triagem para tratamento de cânceres em humanos e está fadada a ser aplicada a apenas uma pequena proporção de casos de cânceres; porém, é um bom exemplo do tipo de abordagem racional e altamente seletiva para a terapia do câncer que começa a ser possível, e assim oferece esperanças para muitos outros tipos de câncer. Para entender a abordagem de forma ampla, precisamos de novas ferramentas para determinar a causa da instabilidade genética em tumores individuais, assim como o desenvolvimento de muitos fármacos contra a via alternativa de reparo do DNA.

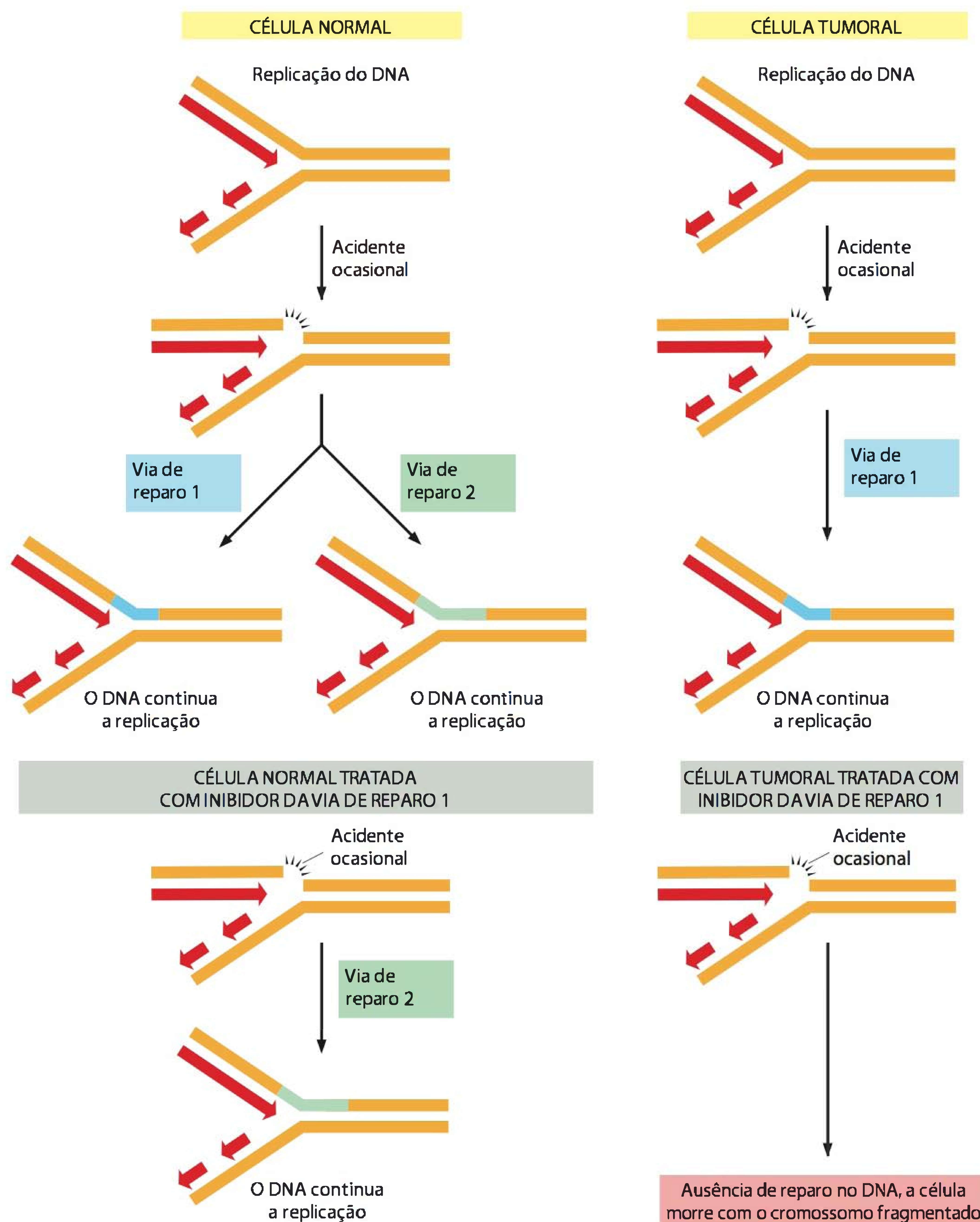


Figura 20-50 Como a instabilidade genética de um tumor pode ser explorada para a terapia do câncer. Como explicado no Capítulo 5, a manutenção das sequências de DNA é tão crítica para a vida que as células desenvolveram múltiplas vias para o reparo de lesões do DNA, evitando a replicação dos erros no DNA. Como ilustrado na figura, uma forquilha de replicação será paralisada toda vez que uma quebra na fita-molde for encontrada. No exemplo, células normais possuem duas diferentes vias de reparo que poderão corrigir o problema e assim prevenir mutações que surgiriam nas novas sequências sintetizadas do DNA. Dessa maneira, elas não seriam afetadas por um fármaco que bloqueia a via de reparo 1. Em contraste, a inativação da via de reparo 2 foi selecionada na evolução das células tumorais (porque as torna geneticamente instáveis). Consequentemente, apenas as células tumorais serão eliminadas pelo tratamento com um fármaco que bloqueia a via de reparo 1. Se uma célula tratada não morre por apoptose, suas filhas certamente morrerão, pois herdam conjuntos de cromossomos incompletos e fragmentados. No caso presente a que se subordina este exemplo mais esquemático, a função da via de reparo 1 (que requer a proteína PARP, discutida no texto) é remover quebras acidentais que ocorrem na fita simples de DNA *antes* do encontro com uma forquilha móvel de replicação, e a via de reparo 2 é o processo dependente de replicação para reparar forquilhas de replicação paralisadas ilustrado na Figura 5-53 (necessitando das proteínas Brca2 e Brca1; para detalhes, ver H. E. Bryant et al., *Nature* 434:913-916, 2005 e H. Farmer et al., *Nature* 434:917-921, 2005.)

A instabilidade genética ajuda a tornar os cânceres progressivamente mais resistentes a terapias

A instabilidade genética pode ser boa ou má para a terapia anticâncer. Apesar de parecer o calcanhar de Aquiles que a terapia pode explorar, ela também pode fazer com que a erradicação do câncer seja mais difícil. Uma alta taxa anormal de mutações tende a tornar a população de células cancerosas mais heterogêneas, o que pode trazer dificuldades para erradicar a população inteira com um tratamento único. Dessa maneira, ela permite que muitos cânceres desenvolvam resistência para fármacos terapêuticos em uma taxa alarmante.

Para piorar a situação, células que são expostas a um fármaco anticâncer frequentemente desenvolvem resistência não somente para aquele fármaco, como também para outros fármacos aos quais nunca foram expostas. O fenômeno de **resistência múltipla a fármaco** frequentemente é correlacionado com a amplificação de uma parte do genoma que contém um gene chamado de *Mdr1*. Este gene codifica uma ATPase de transporte embutida na membrana plasmática pertencente à superfamília de proteínas de transporte, denominada ABC (discutido no Capítulo 11), que bombeia substâncias lipofílicas para fora da célula. A superprodução desta proteína (ou outros membros da família) por uma célula cancerosa pode prevenir o acúmulo intracelular de muitos fármacos citotóxicos, tornando a célula insensível a eles. A amplificação de outros tipos de genes pode dar à célula uma van-

tagem seletiva. O gene que codifica a enzima diihidrofolato-redutase (DHFR, *dihydrofolate reductase*), por exemplo, pode tornar-se amplificado em células cancerosas tratadas com o fármaco anticâncer *metotrexato*. O metotrexato se liga e inibe a habilidade da DHFR de ligar ácido fólico, e a amplificação aumenta bastante a quantidade de enzima, reduzindo a sensibilidade da célula pelo fármaco.

Novas terapias estão emergindo do nosso conhecimento em biologia do câncer

O nosso entendimento crescente na biologia celular do câncer e na progressão do tumor está gradualmente levando a melhores métodos para o tratamento da doença, e não somente pelo uso de alvos de defeitos no ponto de verificação do ciclo celular e dos processos de reparo do DNA. Como exemplo, antagonistas do receptor de estrógeno (como o *tamoxifeno*) e fármacos que bloqueiam a síntese de estrógenos são amplamente usados para prevenir ou retardar a recorrência de cânceres de mama que foram investigados e tiveram a expressão de receptores de estrógenos detectada. Estes tratamentos antiestrógeno estão sendo testados para sua habilidade de prevenir o desenvolvimento de novos cânceres de mama. Tais fármacos não matam diretamente o tumor, mas previnem que o estrógeno promova a proliferação.

As grandes esperanças permanecem, contudo, em encontrar caminhos mais poderosos e seletivos de exterminar células cancerosas diretamente. Uma variedade de novos métodos ousados de atacar células cancerosas foi testada com sucesso em modelos animais – tipicamente reduzindo ou prevenindo o crescimento de tumores humanos transplantados em camundongos imunodeficientes. Muitas destas estratégias não terão uso médico, pois não funcionam em humanos, por terem efeitos colaterais ou serem simplesmente muito difíceis de implementar; algumas, no entanto, mostraram-se bem sucedidas na clínica. Uma estratégia depende da dependência de algumas células cancerosas em uma proteína particular que elas produzam, um fenômeno conhecido por *adição oncogênica*. O bloqueio da atividade da proteína pode ser um meio efetivo de tratar o câncer, caso não cause danos aos tecidos normais. Cerca de 25% dos cânceres de mama, por exemplo, expressam altos níveis da proteína Her 2, um receptor de tirosina-cinase relacionado ao receptor de EGF que tem um papel importante no desenvolvimento normal do epitélio mamário. Anticorpos monoclonais que inibem a função de Her2 reduzem a velocidade de crescimento de tumores de mama que expressam Her2, sendo agora uma terapia aprovada para estes cânceres.

Uma abordagem similar usa anticorpos para entregar moléculas tóxicas diretamente às células cancerosas. Anticorpos contra proteínas como Her2 que são abundantes na superfície da célula cancerosa podem ser armados com uma toxina ou carregar uma enzima que cliva um pró-fármaco, convertendo-a em uma molécula tóxica. No último exemplo, uma molécula de enzima pode então gerar um grande número de moléculas tóxicas na superfície da célula tumoral; estas moléculas pode se difundir para células tumorais vizinhas, aumentando a chance de elas serem atingidas mesmo se o anticorpo não se ligar diretamente a elas.

Anticorpos são de difícil produção em grandes quantidades, muito caros para serem produzidos e comprados, e devem ser administrados por injeção. O resultado final em terapia do câncer é desenvolver pequenas moléculas para matar células cancerosas especificamente. Os inibidores de PARP discutidos anteriormente são um exemplo; porém, para desafiar a maioria dos cânceres com um tratamento simples por fármaco, necessitamos de uma ampla coleção de moléculas pequenas distintas desenvolvidas para os diferentes tipos de câncer.

Pequenas moléculas podem ser desenvolvidas para inibir proteínas oncogênicas específicas

À medida que aumenta o nosso conhecimento sobre moléculas específicas envolvidas na gênese de um tipo particular de câncer, existe um esforço redobrado na busca de terapias direcionadas contra proteínas oncogênicas essenciais para uma célula cancerosa sobreviver e proliferar – desta forma, explorando o fenômeno de adição oncogênica mencionado previamente. Um grande sucesso deste tipo levantou altas esperanças para a utilização de tal terapia direcionada no futuro.

Como vimos anteriormente, a leucemia mieloide crônica (CML) é, via de regra, associada a uma translocação cromossômica visível sob a forma de cromossomo Filadélfia (ver Figura 20-5), sendo consequência da quebra e do rejunte de um cromossomo no sítio de dois genes, chamados de *Abl* e *Bcr*. A fusão dos dois genes cria um gene híbrido que codifica para uma proteína quimera denominada *Bcr-Abl*, consistindo em um fragmento N-terminal de Bcr fusionado à porção C-terminal de Abl (**Figura 20-51**). A Abl é uma tirosina-cinase envolvida na sinalização celular. A substituição do fragmento Bcr pela porção N-terminal de Abl torna-a superativa, o que estimula a proliferação inapropriada das células precursoras hematopoiéticas que contêm a proteína e previne que estas células morram por apoptose – o que muitas delas fariam em situação normal. Como resultado, um número excessivo de células sanguíneas se acumula na corrente circulatória, produzindo a CML.

A proteína quimérica Bcr-Abl é um alvo óbvio para um ataque terapêutico. A busca por fármacos sintéticos inibidores da atividade em tirosina-cinase descobriu um, denominado **Gleevec**, que bloqueia Bcr-Abl (**Figura 20-52**). Quando o fámaco foi aplicado em pacientes com CML, quase a totalidade mostrou uma melhora dramática, com um aparente desaparecimento das células portadoras do cromossomo Filadélfia em cerca de 80% dos pacientes. A resposta ao que parece é relativamente durável: depois de anos de tratamento contínuo, a maioria dos pacientes não progrediu para os estágios finais da doença – apesar de cânceres resistentes ao Gleevec emergirem com uma probabilidade de pelo menos 5% ao ano.

Os resultados não foram tão bons para pacientes com progressão para a fase aguda da leucemia mieloide, conhecida como crise explosiva, onde a instabilidade genética se instala e a marcha da doença se torna muito mais rápida. Tais pacientes mostram uma resposta no começo do tratamento e então têm uma recaída, pois as células cancerosas se tornam resistentes ao Gleevec. Essa resistência em geral é associada a mutações secundárias na porção do gene *Bcr-Abl* que codifica o domínio cinase da proteína, rompendo a habilidade do Gleevec de se ligar à cinase Bcr-Abl. Uma segunda geração de inibidores que funciona efetivamente contra os mutantes resistentes ao Gleevec recentemente foi desenvolvida. Basicamente, um coquetel de agentes múltiplos que cooperativamente bloqueiam a ação de Bcr-Abl talvez seja a chave para o sucesso do tratamento, pela prevenção da seleção de células resistentes em todos os estágios da doença.

Apesar das complicações com a resistência, o sucesso extraordinário do Gleevec para pacientes no estágio precoce da doença crônica é suficiente para provar o princípio: uma vez entendido precisamente quais lesões genéticas ocorreram em um câncer, podemos desenvolver métodos efetivos e racionais para o tratamento. Esta história de sucesso animou o empenho para identificar pequenas moléculas inibidoras de outras proteína-cinases oncogênicas que poderiam ser alvos efetivos para novos fármacos anticâncer. Um segundo exemplo de tal terapia é dado por uma pequena molécula que inibe o receptor de EGF, correntemente aprovada para o tratamento de alguns cânceres de pulmão.

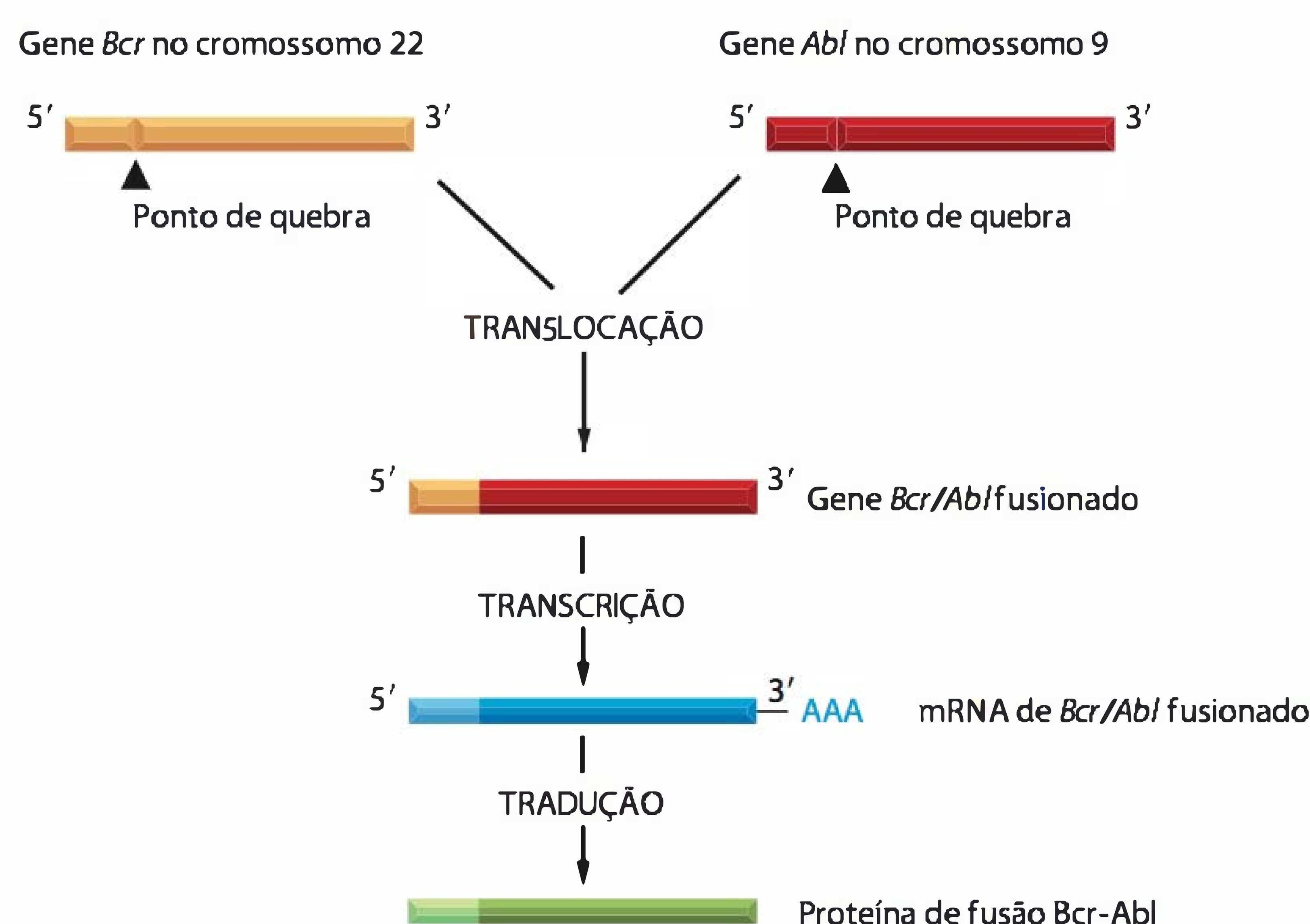


Figura 20-51 A conversão do proto-oncogene *Abl* em um oncogene em pacientes com leucemia mieloide crônica. A translocação cromossômica responsável junta o gene *Bcr* no cromossomo 22 ao gene *Abl* do cromossomo 9, gerando assim o cromossomo Filadélfia (ver Figura 20-5). A proteína fusionada resultante possui a porção N-terminal da proteína Bcr fusionada à porção C-terminal da proteína tirosina-cinase; em consequência, o domínio cinase de Abl torna-se inapropriadamente ativado, dirigindo a excessiva proliferação de um clone de células hematopoiéticas da medula óssea.

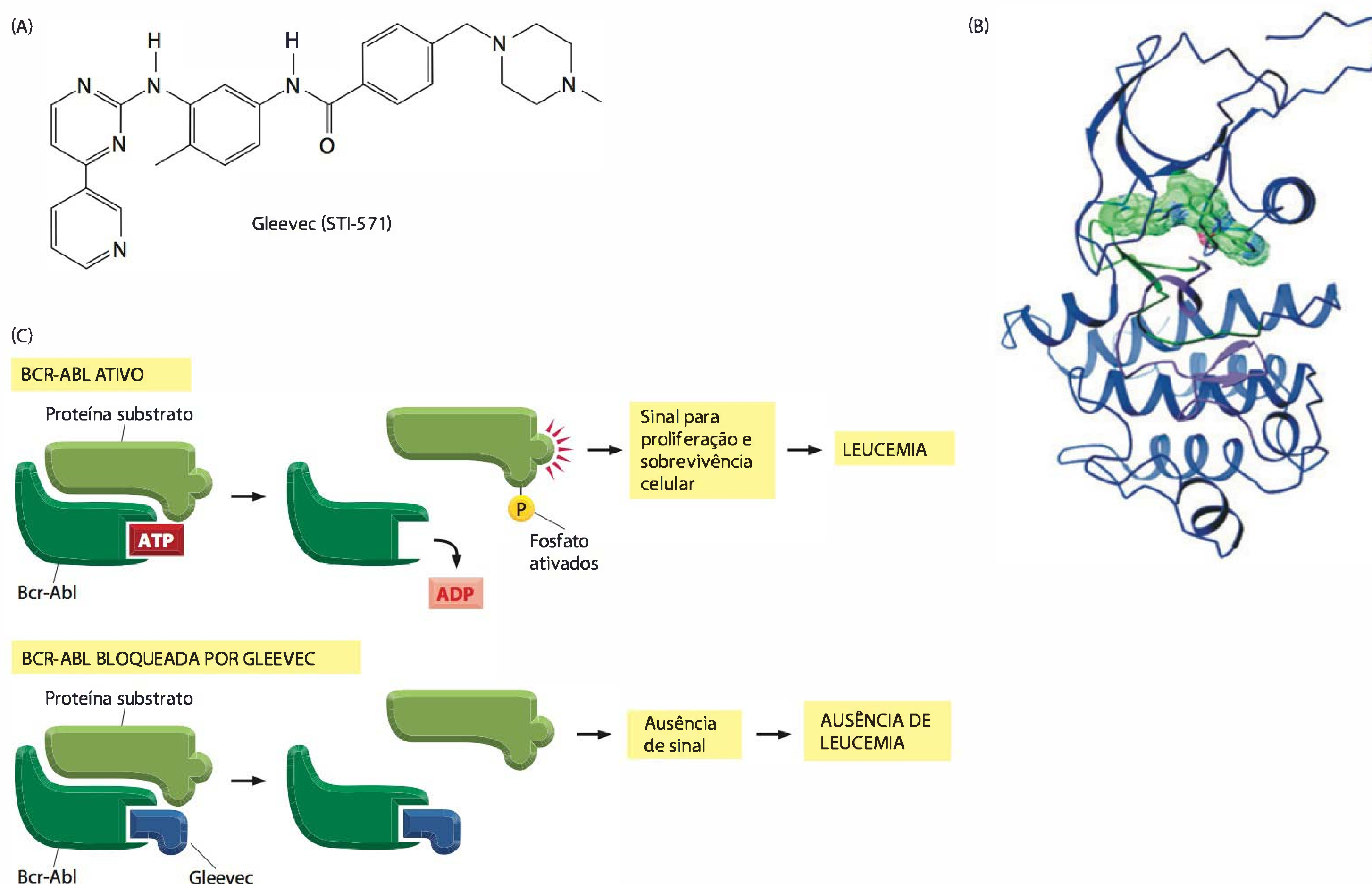


Figura 20-52 Como o Gleevec bloqueia a atividade da proteína Bcr-Abl e interrompe a leucemia mieloide crônica. (A) Estrutura química do Gleevec (imatinib). O fármaco pode ser administrado por via oral; ele possui efeitos colaterais que em geral são bem tolerados. (8) A estrutura do complexo do Gleevec (objeto sólido em *verde*) com o domínio tirosina-cinase da proteína Abl (diagrama em fitas), determinada por cristalografia por raios X. (C) O Gleevec se aloja no bolsão ligador de ATP do domínio tirosina-cinase da proteína Bcr-Abl, prevenindo que a Bcr-Abl transfira um grupo fosfato do ATP para a tirosina de uma proteína substrato, o que bloqueia a transmissão de sinal para a proliferação e a sobrevivência celular. (B, de T. Schindler et al., *Science* 289:1938-1942, 2000. Com permissão de AAAS.)

Vasos sanguíneos tumorais são um alvo lógico para terapia anticâncer

Outra abordagem para destruir tumores não tem como alvo direto a célula tumoral. Em vez disso, o alvo são os vasos sanguíneos dos quais um tumor depende. Como discutido anteriormente, o crescimento desses vasos requer sinais de angiogênese como o VEGF, os quais, pelo menos em modelos animais, podem ser bloqueados para prevenir o crescimento do tumor. Além disso, as células endoteliais no processo de formar novos vasos expressam marcadores distintos na sua superfície, o que daria uma oportunidade de atacar o desenvolvimento de vasos tumorais sem contudo lesionar os vasos sanguíneos existentes em tecidos normais. Pesquisas clínicas com vários inibidores de sinais angiogênicos estão em andamento, e diversos fármacos que inibem o receptor de VEGF foram recentemente aprovados para o tratamento de câncer renal. Similarmente, um anticorpo monoclonal contra VEGF foi aprovado para o tratamento de câncer de cólon em combinação com quimioterapia, apesar de ainda serem modestos os benefícios.

Muitos cânceres podem ser tratados pelo aumento da resposta imune contra um tumor específico

Nos últimos anos, aprendemos que a resposta imune normal do corpo ajuda na proteção contra o câncer. Camundongos que perdem partes importantes do sistema imune têm níveis

elevados de diversos tipos de câncer. De maneira similar, humanos que são imunocomprometidos possuem taxas 2 a 3 vezes maiores para certos tumores sólidos. Os antígenos próprios que são reconhecidos nesses casos podem atrair a atenção do sistema imune, pois são expressos em grandes quantidades, o que não é comum, por uma célula tumoral particular. Alternativamente, é possível que tais proteínas provoquem uma resposta autoimune, pois normalmente são expressas em embriões ou em outra área imunologicamente privilegiada, como o cérebro, onde o sistema imune nunca teve a oportunidade de desenvolver tolerância a elas.

Células tumorais variantes com uma exposição reduzida ao ataque imune podem derrotar a vigilância imunológica, e o processo da progressão tumoral ao que se pensa inclui mudanças herdáveis que reduzem a antigenicidade do tumor. No entanto, por nosso crescente entendimento dos complexos mecanismos da imunidade adaptativa e inata (ver Capítulos 24 e 25), oncologistas estão aprendendo agora a manipular a resposta imune para intensificar o ataque em tumores específicos. A esperança é que isto permitirá que as células cancerosas sejam eliminadas como se fossem tecido estranho.

O tratamento do paciente com vários fármacos simultaneamente tem vantagem potencial para a terapia anticâncer

Conforme descrito, alguns cânceres podem ser bastante reduzidos em tamanho pelo tratamento inicial com fármacos, com todas as células tumorais detectáveis parecendo desaparecer. Contudo, meses ou anos depois, o câncer reaparecerá em uma forma alterada que é resistente ao fármaco usado com sucesso primeiramente. Dada a natureza hipermutável das células tumorais, isso não é surpresa. O tratamento inicial com o fármaco presumivelmente falhou em atacar uma fração ínfima de células mutantes na população original de células tumorais (algumas das células-tronco tumorais, de acordo com esta visão dos tumores), e estas células eventualmente recriam o tumor pela continuação da proliferação.

Em alguns casos, esse problema poderá ser prevenido pela aplicação no paciente de dois ou três fármacos simultaneamente. A lógica é a mesma do tratamento HIV-AIDS com um coquetel de três inibidores de proteases: considerando que sempre existe possibilidade de algumas células na população inicial serem resistentes ao tratamento com um fármaco, não deverão existir células resistentes a dois fármacos que sejam diferentes. Em contraste, tratamentos sequenciais com fármacos podem permitir que poucas células resistentes ao primeiro fármaco se multipliquem em grande número, tornando possível o aparecimento de células com dupla resistência (**Figura 20-53**).

Como o nosso arsenal de possíveis fármacos contra células cancerosas aumenta a cada dia, é possível que um tratamento efetivo envolvendo o tratamento simultâneo com múltiplos fármacos possa ser desenvolvido para muitos cânceres.

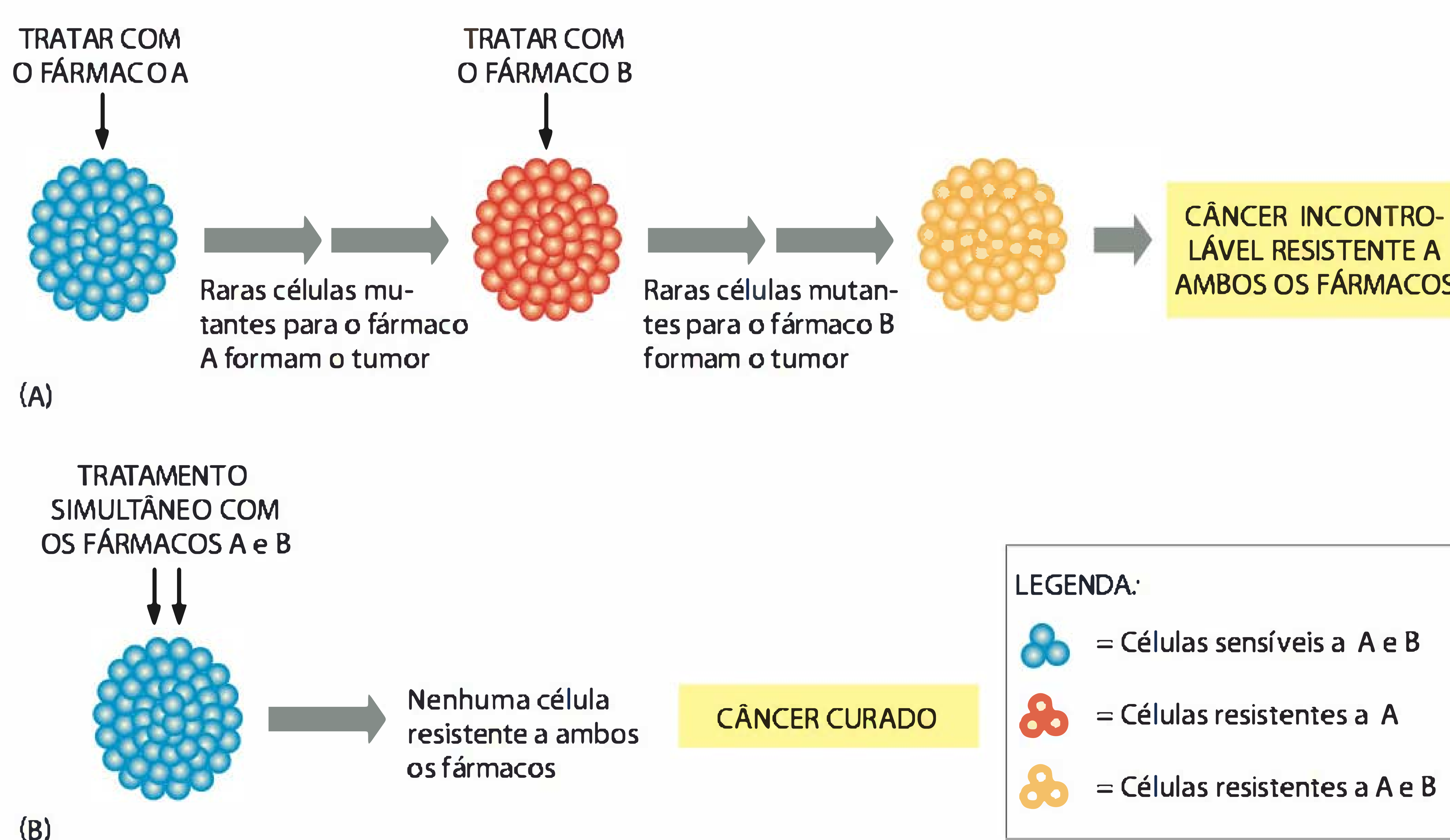


Figura 20-53 Por que o tratamento com múltiplos fármacos pode ser mais efetivo do que o tratamento sequenciai para terapia do câncer. Como as células tumorais são hipermutáveis, monoterapia administrada de maneira sequencial frequentemente permite a seleção de clones de células mutantes resistentes a ambos os fármacos.

O perfil da expressão gênica pode ajudar a classificar os cânceres em subgrupos clinicamente significativos

Agora é possível caracterizar cada câncer individual em nível molecular em detalhes sem precedentes. Por exemplo, a tecnologia de microarranjos de DNA (discutida no Capítulo 8) pode ser usada para determinar os padrões de expressão de milhares de genes simultaneamente em uma amostra de câncer e comparar com o padrão de expressão dos mesmos genes no tecido controle normal. Cada caso de um dado tipo de câncer, como câncer de mama, terá o seu próprio **perfil de expressão gênica.** No entanto, a comparação dos perfis de muitos pacientes mostra que eles podem ser grupados em um pequeno número de classes distintas, cujos membros dividem um perfil com traços comuns.

Por que tais perfis poderiam ser úteis? Todo o progresso médico depende de um diagnóstico acurado. Se não pudermos identificar uma doença corretamente, não poderemos descobrir as causas, predizer o prognóstico, selecionar o tratamento apropriado para um dado paciente, ou conduzir inquéritos efetivos em uma população de pacientes para julgar se um tratamento é efetivo. Cânceres, como vimos, são uma coleção heterogênea de doenças. O perfil da expressão gênica representa uma ferramenta para tornar um diagnóstico mais preciso por meio de uma melhor classificação do tumor. Esquemas de classificação padrão têm por base a análise histológica, e agora sabemos que podem amontoar em uma mesma classificação cânceres com diferentes comportamentos. Assim, o perfil da expressão gênica poderá não somente identificar um tumor em casos incertos, como também ajudar a classificar tumores mais precisamente com consequências importantes para o paciente. Uma análise de uma coleção de linfomas de células B difusos, por exemplo, demonstrou que existem duas classes separadas com base no perfil da expressão gênica, embora as classes não pudessem ser distinguidas histologicamente. Uma classe era associada a um prognóstico péssimo e a outra a um prognóstico melhor, estabelecendo a utilidade da classificação e fornecendo uma explicação para observações prévias de que alguns pacientes com a doença respondem efetivamente à terapia e sobrevivem, enquanto outros não. O perfil da expressão gênica ainda está em desenvolvimento para muitos cânceres, porém parece que no futuro será amplamente usado para guiar o tratamento.

Ainda há muito o que fazer

A análise molecular do câncer promete transformar o tratamento do câncer, pois permitirá o desenvolvimento de uma terapia muito mais acurada para o paciente. A descoberta de um grande número de genes críticos para o câncer trouxe um fim à era de tatear no escuro atrás de pistas para as bases moleculares do câncer. Foi encorajador descobrir que existem, afinal, alguns princípios gerais e que muitas formas da doença dividem entre si algumas anormalidades genéticas. Como sabemos a identidade de muitos genes críticos para o câncer e suas funções normais, começa a ser possível vislumbrar alvos precisos para um tratamento racional. Porém, estamos ainda longe de entender plenamente os cânceres humanos mais comuns e ainda necessitamos de um melhor entendimento sobre quase todos os processos descritos neste capítulo antes de vencermos esta doença letal da biologia celular. Dentre outras coisas, necessitamos de melhores maneiras para definir células-tronco cancerosas e isolá-las, podendo assim determinar suas características especiais e as bases moleculares de sua "razão de ser" tronco; mais crucialmente, necessitamos encontrar maneiras de matá-las – do contrário, nossas terapias falharão no final.

Sobreviventes de câncer e suas famílias têm sido importantes advogados de investimentos públicos em pesquisa biomédica básica. Estes grupos ocasionalmente expressam uma frustração compreensível com relação ao passo lento da tradução de nosso conhecimento sobre câncer, em terapias efetivas contra o câncer. Porém, o acúmulo de conhecimento traz uma aceleração no entendimento, e existe um senso comum hoje na comunidade de pesquisa em câncer de que o progresso no tratamento deste grupo de doenças é iminente. Tomando um exemplo, em anos recentes obtivemos um entendimento mais profundo e em detalhes dos processos moleculares que governam a decisão tudo-ou-nada que faz com que a célula cometa suicídio por apoptose. Quanto tempo levará para sermos capazes de analisar a rede de sinalização anormal em um tumor que permitirá o desenvolvimento de um coquetel de fármacos e fatores de crescimento que especificamente causam a morte em todas as células do câncer?

Olhando para traz na história da biologia celular e contemplando a velocidade dos progressos recentes, podemos ficar esperançosos. O desejo de entender, o qual dirige a pesquisa básica, com certeza revelará novos caminhos para usar nosso conhecimento da célula para tentos humanitários, não apenas em relação ao câncer, mas também em relação às doenças infecciosas, às doenças mentais, à agricultura e a outras áreas que mal podemos prever.

Resumo

Nosso crescente entendimento da biologia celular de cânceres já começou a conduzir a melhores maneiras de prevenir, diagnosticar e tratar estas doenças. Terapias anticâncer podem ser desenvolvidas para destruir células cancerosas, preferencialmente pela exploração das propriedades que as distinguem das células normais, incluindo as suas dependências por proteínas oncogênicas e os defeitos que elas abrigam nos seus mecanismos de reparo do DNA, nos mecanismos de pontos de verificação do ciclo celular e na via de controle da apoptose. Também é possível controlar o crescimento de tumores pelo ataque ao seu suprimento de sangue, privando-os da ajuda que eles requerem das células do estroma. Agora temos provas de que, pelo entendimento dos mecanismos de controle de células normais e de como exatamente elas são subvertidos em cânceres específicos, poderemos desenvolver fármacos que matam cânceres precisamente por atacar moléculas específicas requeridas para o crescimento e a sobrevivência das células cancerosas. E, como nos tornamos mais capazes na determinação de quais genes são alterados nas células de um dado tumor, começamos a fazer tratamentos sob medida mais acurados para cada paciente.

TESTE SEU CONHECIMENTO

Quais afirmações estão corretas? Justifique.

20-1 A instabilidade genética na forma de mutações pontuais, rearranjo cromossômico e alterações epigenéticas necessita ser maximizada para permitir o desenvolvimento do câncer.

20-2 Terapia anticâncer direcionada somente para matar as células que se dividem rapidamente e que são a parte principal do tumor provavelmente não eliminará o câncer de muitos pacientes.

20-3 As principais causas ambientais do câncer são os produtos do nosso modo de vida altamente industrializado, como a poluição e os aditivos alimentares.

20-4 O dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) deve ser um extraordinário mutagênico específico porque 90% dos tumores de pele que ele causa têm alteração A para T exatamente no mesmo sítio no gene *Ras* mutado.

20-5 Na via reguladora celular que controla o crescimento e a proliferação celular, os produtos dos oncogenes são componentes estimuladores e os produtos dos genes supressores de tumor são componentes inibidores.

Discuta as seguintes questões.

20-6 Em contraste com o câncer de cólon, cuja incidência aumenta consideravelmente com a idade, o osteossarcoma – um tumor que ocorre mais comumente nos ossos longos – é muito comum na adolescência. Osteossarcomas são relativamente raros em crianças jovens (até 9 anos) e em adultos (após 20 anos). Por que você supõe que a incidência de osteossarcoma não mostra o mesmo tipo de idade-dependência que o câncer de cólon?

20-7 Como mostrado na **Figura Q20-1**, a representação gráfica de morte devido a câncer de mama em mulheres difere dramaticamente da mesma representação gráfica para câncer de cólon. Perto dos 50 anos, a idade-dependência aumenta na taxa de morte para câncer de mama e decresce para câncer de cérvice, enquanto a taxa de morte devido a câncer de cólon (e a maioria dos outros cânceres) continua a aumentar. Por que você supõe que o aumento da idade-dependência em taxas de morte para câncer de mama e câncer de cérvice se reduz após os 50 anos?

20-8 Por analogia com automóveis, defeitos nos genes críticos para o câncer têm sido comparados a freios quebrados e aceleradores pifados, algumas vezes decorrentes de serviços malfeitos por maus mecânicos. Usando a analogia, decida como oncogenes, genes supressores de tumor e genes de manutenção de DNA podem ser relacionados a freios quebrados, aceleradores pifados e maus mecânicos. Explique a base de cada uma de suas escolhas.

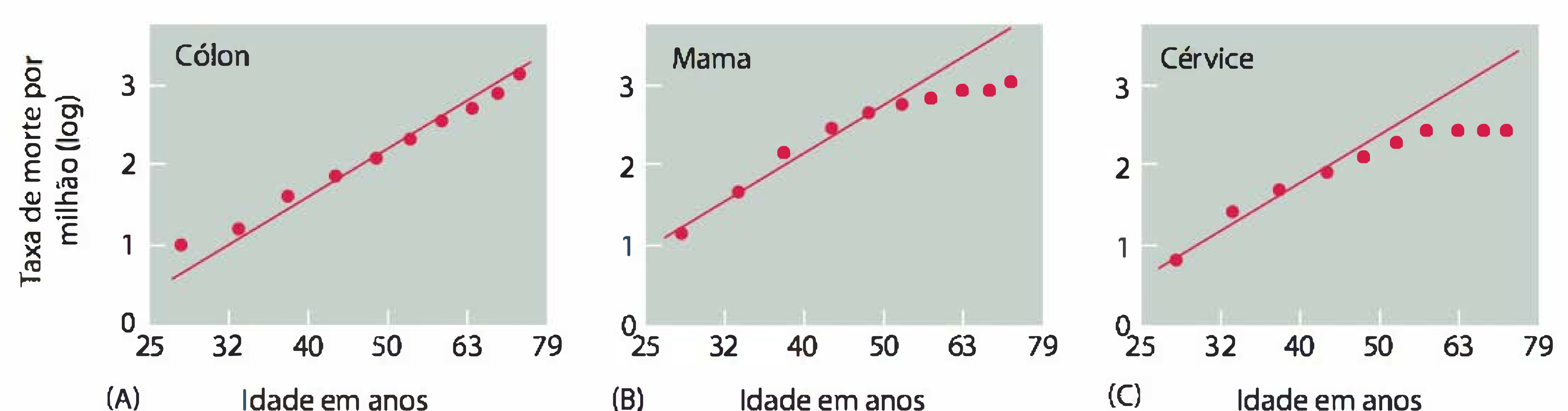


Figura Q20-1 Taxas de morte por câncer em função da idade (Questão 20-7). (A) Taxa de morte por câncer de cólon em mulheres. (B) Taxa de morte por câncer de mama em mulheres. (C)Taxa de morte por câncer de cérvice. Os dados em todos os casos são assinalados como log da taxa de morte *versus* a idade do paciente (em uma escala logarítmica) na morte. As linhas retas em B e C foram ajustadas para os dados dos grupos de idade mais jovens, enquanto a linha A foi ajustada para todos os pontos. (Dados de P. Armitage e R. Doll, *Br. J. Cancer* 91:1983-1989, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

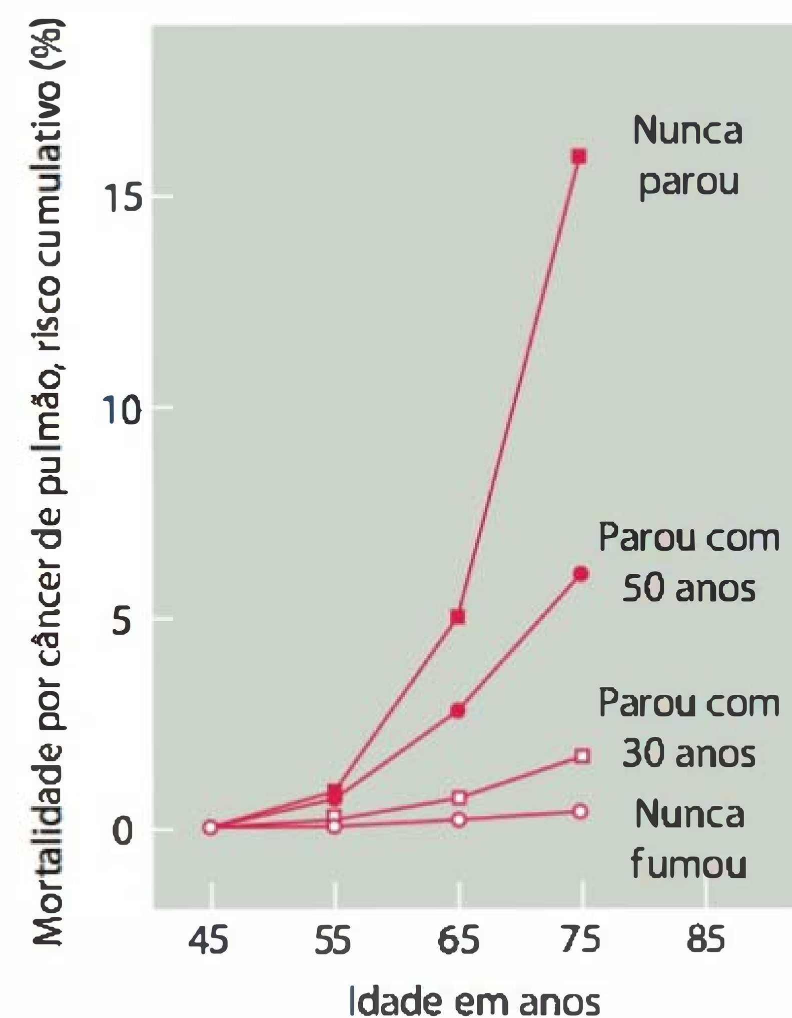


Figura Q20-2 Risco cumulativo da mortalidade por câncer de pulmão para não-fumantes, fumantes e ex-fumantes (Questão 20-9). O risco cumulativo é o total de mortes, como porcentagem, para cada grupo. Assim, para os que continuam fumando, 1% morre de câncer de pulmão entre as idades de 45 e 55 anos; um adicional de 4% morrem entre os 55 e os 65 (dando um risco cumulativo de 5%) e mais 11% morrem entre os 65 e os 75 (para um risco cumulativo de 16%).

20-9 Mortalidade devido a câncer de pulmão foi seguida em grupos de homens no Reino Unido por 50 anos. A **Figura Q20-2** mostra o risco cumulativo de morte por câncer de pulmão como uma função da idade e o hábito de fumar para quatro grupos de homens: os que nunca fumaram, os que pararam na idade de 30 anos, os que pararam com 50 anos e os que continuaram a fumar. Os dados mostram claramente que um indivíduo pode substancialmente reduzir seu risco cumulativo de morrer por câncer de pulmão ao parar de fumar. O que você supõe ser a base biológica para esta observação?

20-10 O diabo da Tasmânia, um marsupial carnívoro da Austrália, está ameaçado de extinção pela disseminação de uma doença fatal na qual um tumor maligno oral-facial interfere na habilidade do animal de se alimentar. Você foi chamado para analisar a fonte desse câncer incomum. Parece claro para você que o câncer de alguma maneira se espalha de animal para animal, por suas lutas frequentes, que são acompanhadas por dentadas na face e na boca. Para descobrir a fonte do câncer, você isolou tumores de 11 animais capturados em regiões bem separadas e os examinou. Como seria esperado, os cariótipos das células tumorais são altamente rearranjados em relação àquele do animal tipo selvagem (**Figura Q20-3**). Surpreendentemente, você observa que os cariótipos das onze amostras de tumores eram muito semelhantes. Um dos animais possui uma inversão no cromossomo 5 que não está presente no seu tumor facial. Como você supõe que este câncer foi transmitido de animal para animal? Não é mais provável que tenha surgido como consequência de uma infecção por um vírus ou por um micro-organismo? Explique seu raciocínio.

20-11 Agora que o sequenciamento de DNA é barato, confiável e rápido, seu orientador montou um consórcio de investigadores para perseguir uma ambiciosa meta de traçar todas as mutações em um conjunto de tumores humanos. Ele decidiu focar em câncer de mama e câncer colorretal porque eles causam 14% de todas as mortes por câncer. Para cada um dos 11 cânceres de mama e 11 cânceres colorretais você projetou oligonucleotídeos iniciadores para amplificar 120.839 éxons em 14.661 transcritos de 13.023 genes. Como controle, você amplificou as mesmas regiões de amostras de DNA de dois indivíduos sadios. Você sequenciou o produto de PCR e usou um software analítico para comparar 456 Mb de sequências tumorais com as sequências publicadas do genoma humano. Você ficou deslumbrado em encontrar 816.986 possíveis mutações. Isto representa mais de 37.000 mutações por tumor! Com certeza isso não está certo.

Você então pensa um pouco e deduz que o computador algumas vezes comete erros em chamar bases. Para testar a fonte de erro, você visualmente inspeciona cada leitura de sequência e acha que pode excluir 353.738 alterações, deixando ainda 463.248, ou cerca de 21.000 mutações por tumor. Ainda um bocado!

A. Você pode sugerir pelo menos três outras fontes de mutações aparentes que na realidade não contribuem para o tumor?

B. Após aplicar um número de critérios para filtrar alterações irrelevantes, você encontrou um total de1.307 mutações nos 22 cânceres de mama e colorretal, ou cerca de 59 mutações por tumor. Como você pode decidir quais das alterações das sequências podem ser mutações relacionadas ao câncer e quais provavelmente são mutações "passageiras" que ocorreram no gene, porém sem nada haver com o câncer (mas foram achadas nos tumores porque ocorreram nas mesmas células com mutações cancerígenas verdadeiras)?

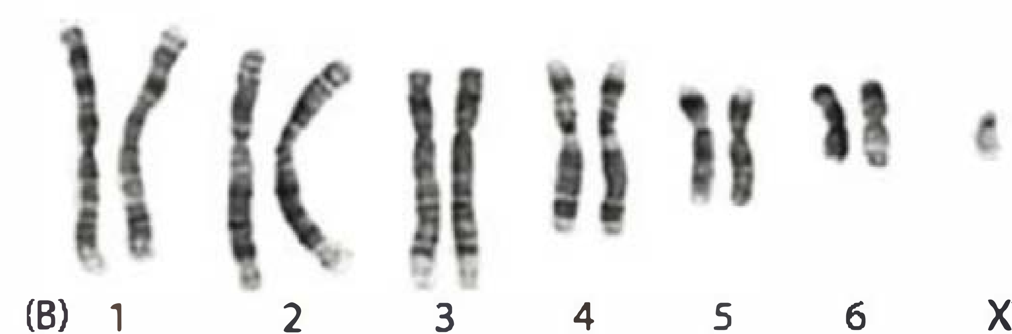
C. Será que sua estratégia compreensiva de sequenciamento detectou todas as alterações genéticas que afetam os gene-alvo nas células cancerosas?

20-12 Praticamente todos os tratamentos de câncer são desenvolvidos para matar as células cancerosas, em geral pela indução da apoptose. Entretanto, um câncer particular – leucemia pró-mielocítica aguda (APL, *acute promyelocytic leukemia*) – tem sido tratado com sucesso com *trans*-ácido retinoico, que faz com que os pró-mielócitos se diferenciem em neutrófilos. Como uma alteração nos estados de diferenciação das células cancerosas APL poderia ajudar o paciente?

20-13 Um dos maiores objetivos da terapia anticâncer moderna é identificar pequenas moléculas – fármacos anticâncer – que podem ser usadas para inibir os produtos de um gene específico e crítico para o câncer. Se você estivesse procurando por tais moléculas, poderia desenvolver inibidores para os produtos de oncogenes, genes supressores de tumor ou genes para manutenção do DNA? Explique por que você poderia (ou não) selecionar cada tipo de gene.



(A) Diabo da Tasmânia (*Sarcophilus harrisii*)



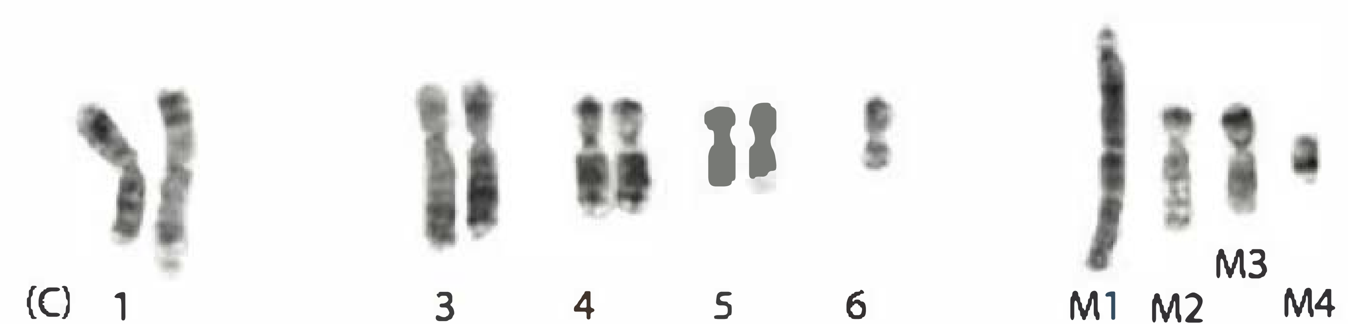


Figura Q20-3 Cariótipo de células do diabo da Tasmânia (Questão 20-10). (A) Um diabo da Tasmânia. (B) Cariótipo normal de um diabo da Tasmânia macho. O cariótipo tem 14 cromossomos, incluindo XY. (C) Cariótipo de células cancerosas encontrado em cada um dos 11 tumores faciais estudados. O cariótipo possui 13 cromossomos, com a ausência dos cromossomos sexuais, e ausência do par de cromossomos 2, um cromossomo 6, dois cromossomos 1 com os braços longos deletados, e quatro marcas cromossomais rearranjadas (M1-M4). (De A. M. Pearse e K. Swift, *Nature* 439:549, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

REFERÊNCIAS

Gerais

Bishop JM (2004) How to Win the Nobel Prize: An Unexpected Life in Science. Harvard University Press: Cambridge MA.
Stillman B & Stewart D (eds) (2005) Molecular Approaches to Controlling Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
Weinberg RA (2007) The Biology of Cancer. Garland Science: New York.

Câncer como um processo microevolutivo

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M et al (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14:43–47.
Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP et al (2006) Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18238–18242.
Cairns J (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 255:197–200.
Campesi J (2005) Senescent cells, tumor supression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–522.
Evan GI & Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342–348.
Fialkow PJ (1976) Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458:283–321.
Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 3:453–458.
Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3:415–428.
Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:776–781.
Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.
Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23–28.
Pardal R, Clarke MF & Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Rev Cancer* 3:895–902.
Sjoblom T, Jones S, Wood LD et al (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268–274.
Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2:442–454.
Tlsty TD & Coussens LM (2006) Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:119–150.
Ward RJ & Dirks PB (2007) Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2:175–189.

Causas evitáveis do câncer

Ames B, Durston WE, Yamasaki E & Lee FD (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2281–2285.
Berenblum I (1954) A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res* 14:471–477.
Cairns J (1985) The treatment of diseases and the war against cancer. *Sci Am* 253:51–59.
Doll R (1977) Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 265:589–597.
Doll R & Peto R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191–1308.
Hsu IC, Metcalf RA, Sun T et al (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427–428.
Newton R, Beral V & Weiss RA (eds) (1999) Infections and Human Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
Peto J (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411:390–395.

Descobrindo os genes críticos para o câncer

Davies H, Bignell GR, Cox C et al (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954.
Easton DF, Pooley KA, Dunning AM et al (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447:1087–1095.
Feinberg AP (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447:433–440.
Herman JG & Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042–2054.
Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.
Mitelman F, Johansson B & Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature RevCancer* 7:233-245.
Pinkel D & Albertson DG (2005). Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:331–354.
Rowley JD (2001) Chromosome translocations: dangerous liasisons revisited. *Nature RevCancer* 1:245–250.
The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–683.
Westbrook TF, Stegmeier F & Elledge SJ (2005) Dissecting cancer pathways and vulnerabilities with RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:435–444.

As bases moleculares do comportamento das células cancerosas

Artandi SE & DePinho RA (2000) Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Med* 6:852–855.
Brown JM & Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature RevCancer* 5:231–237.
Chambers AF, Naumov GN, Vantyghem S & Tuck AB (2000) Molecular biology of breast cancer metastasis: clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res* 2:400–407.
Edwards PAW (1999) The impact of developmental biology on cancer research: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 18:175–180.
Futreal PA, Coin L, Marshall M et al (2004) A census of human cancer genes. *Nature RevCancer* 4:177–183.
Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
Hoffman RM (2005) The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer *in vivo*. *Nature RevCancer* 5:796–806.
Kinzler KW & Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159–170.
Levine AJ, Hu W & Feng Z (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13:1027–1036.
Macleod KF & Jacks T (1999) Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 187:43–60.
Mani SA, Yang J, Brooks M et al (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10069–10074.
Mueller MM & Fusenig NE (2004) Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev Cancer* 4:839–849.
Plas DR & Thompson CB (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24:7435–7442.
Ridley A (2000) Molecular switches in metastasis. *Nature* 406:466–467.
Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441:424–430.
Sherr CJ (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature Rev Cancer* 6:663–673.
Vogelstein B & Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 10:789–799.
Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell-cycle control. *Cell* 81:323–330.

Tratamento do câncer: presente e futuro

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503–511.

Baselga J & Albanell J (2001) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annu Oncol* 12:S35–S41.

Druker BJ & Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105:3–7.

Folkman J (1996) Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 275:150–154.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537.

Huang P & Oliff A (2001) Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 11:343–348.

Garraway LA & Sellers WR (2006) Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature RevCancer* 6:593–602.

Jonkers J & 8erns A (2004) Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 6:535–538.

Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58–62.

Kim R, Emi M & Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1–14.

Madhusudan S & Middleton MR (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 31:603–617.

Roninson IB, Abelson HT, Housman DE et al (1984) Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. *Nature* 309:626–628.

Sarkadi B, Homolya L, Szakács G &Váradi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86:1179–236.

Sawyers C (2004)Targeted cancer therapy. *Nature* 432:294–297.

van 'tVeer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536.

Varmus H, Pao W, Politi K et al (2005) Oncogenes come of age. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:1–9.

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME et al (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 445:661–665.

Reprodução Sexuada: Meiose, Células Germinativas e Fecundação

21

Sexo não é totalmente necessário. Os organismos unicelulares podem reproduzir-se por divisão mitótica simples, e muitas plantas se propagam de forma vegetativa, pela formação de brotos multicelulares que mais tarde se separam da planta que os originou. Da mesma forma, no reino animal, uma *Hydra* multicelular pode produzir descendentes sozinha, por brotamento (**Figura 21-1**), e as anêmonas do mar e as minhocas marinhas podem dividir-se em duas metades, cada uma capaz de regenerar a metade que falta. Há ainda espécies de lagartos que consistem apenas em fêmeas e se reproduzem sem acasalamento. Embora tal **reprodução assexuada** seja simples e direta, ela dá origem a descendentes que são geneticamente idênticos ao organismo que os originou. Por outro lado, na **reprodução sexuada**, os genomas de dois indivíduos são misturados para produzir descendentes que diferem geneticamente uns dos outros e de seus pais. Aparentemente, esta forma de reprodução tem grandes vantagens, tanto que a grande maioria das plantas e animais a escolheu. Mesmo muitos procariotos e eucariotos que normalmente se reproduzem de forma assexuada, em períodos ocasionais, utilizam a troca genética, criando, dessa forma, descendentes com novas combinações de genes. Este capítulo descreve a maquinaria celular da reprodução sexuada. Porém, antes de discutirmos em detalhe como essa maquinaria funciona, faremos uma breve consideração sobre o que ela implica e que benefícios traz.

Neste capítulo

VISÃO GERAL DE REPRODUÇÃO SEXUADA 1269

MEIOSE 1272

CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS E DETERMINAÇÃO DO SEXO EM MAMÍFEROS 1282

OÓCITOS 1287

ESPERMATOZOIDES 1292

FECUNDAÇÃO 1297

VISÃO GERAL DE REPRODUÇÃO SEXUADA

Reprodução sexuada ocorre em organismos **diploides**, nos quais cada célula contém dois conjuntos de cromossomos, um cromossomo herdado de cada um dos pais. Entretanto, as células especializadas em levar adiante a reprodução sexuada são **haploides**; ou seja, cada uma delas contém apenas um conjunto de cromossomos. Na etapa final de reprodução sexuada, uma célula haploide de um indivíduo se funde com uma célula haploide de outro, misturando os dois genomas e restaurando o estado diploide. Portanto, a reprodução sexuada requer um tipo especializado de divisão celular chamado de *meiose*, no qual uma célula precursora diploide dá origem a uma progênie de células haploides, ao invés de células diploides, como ocorre na divisão celular mitótica normal.

Em organismos multicelulares que se reproduzem sexualmente, as células haploides produzidas por meiose se desenvolvem em **gametas** altamente especializados – *oócitos* (ou ovócitos), *espermatozoides*, pólen ou esporos. Nos animais, caracteristicamente, fêmeas produzem oócitos grandes e não-móveis, ao passo que machos produzem espermatozoides pequenos e móveis (**Figura 21-2**). Na *fecundação*, um espermatozoide haploide funde-se com um oócito haploide para formar uma célula diploide (um ovo fecundado, ou *zigoto*), que contém uma combinação nova de cromossomos. Então, o zigoto se desenvolve como um novo organismo multicelular por meio de sucessões repetidas de mitoses, seguidas por especialização celular, que inclui a produção de gametas (**Figura 21-3**A).

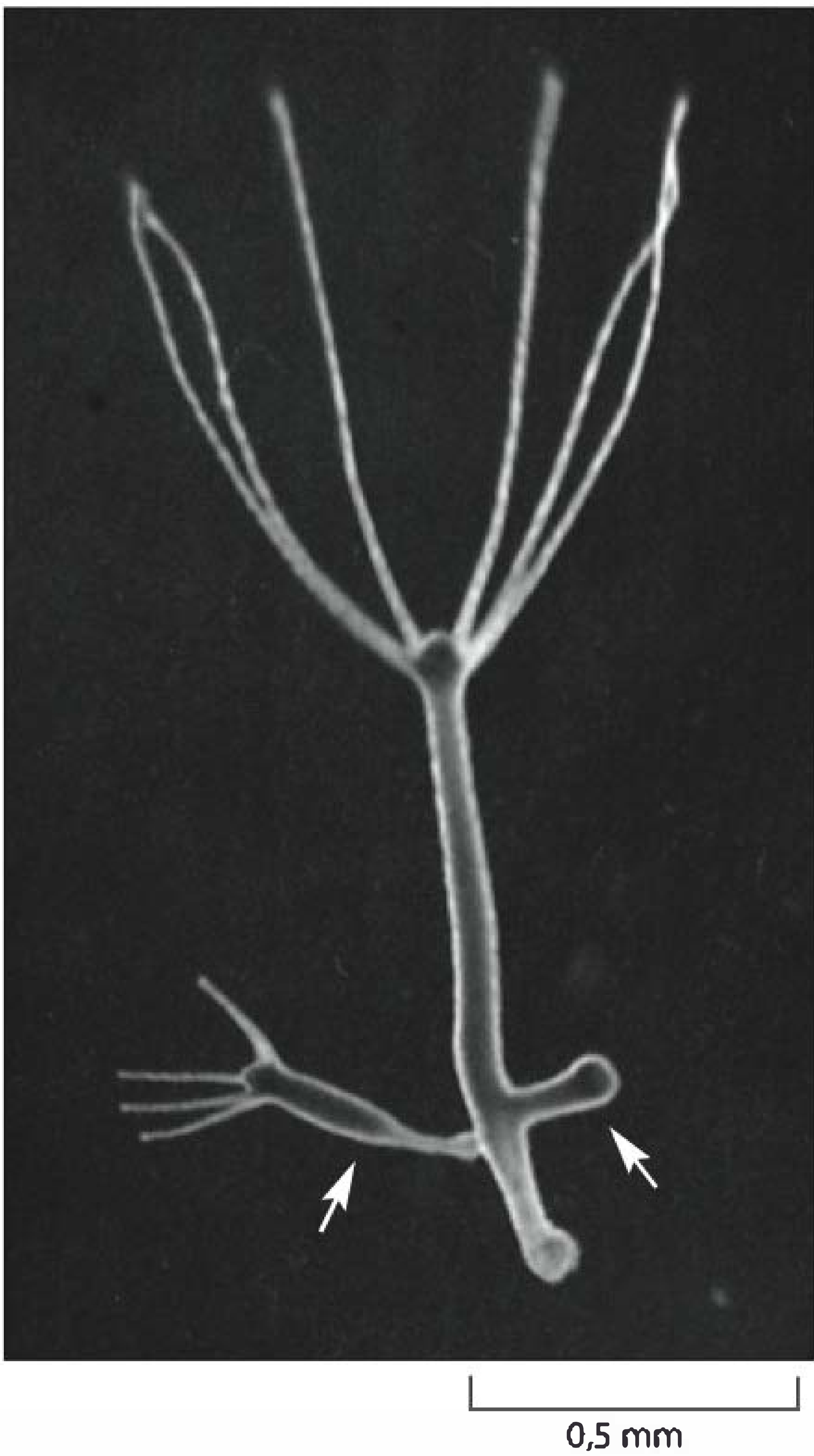


Figura 21-1 Fotografia de uma *Hydra*, da qual dois novos organismos estão brotando (*setas*). Os descendentes, que são geneticamente idênticos ao organismo que os originou, se desprenderão e viverão de forma independente. (Cortesia de Amata Hornbruch.)

Em eucariotos superiores, a fase haploide é curta

Na maioria dos organismos que se reproduzem sexualmente, as células diploides proliferam por divisão celular mitótica, e as células haploides que se formam por meiose não proliferam. Alguns organismos simples, como leveduras de fissão, são exceções nas quais as células haploides proliferam por mitose, e as células diploides formadas pela fusão de células ha-

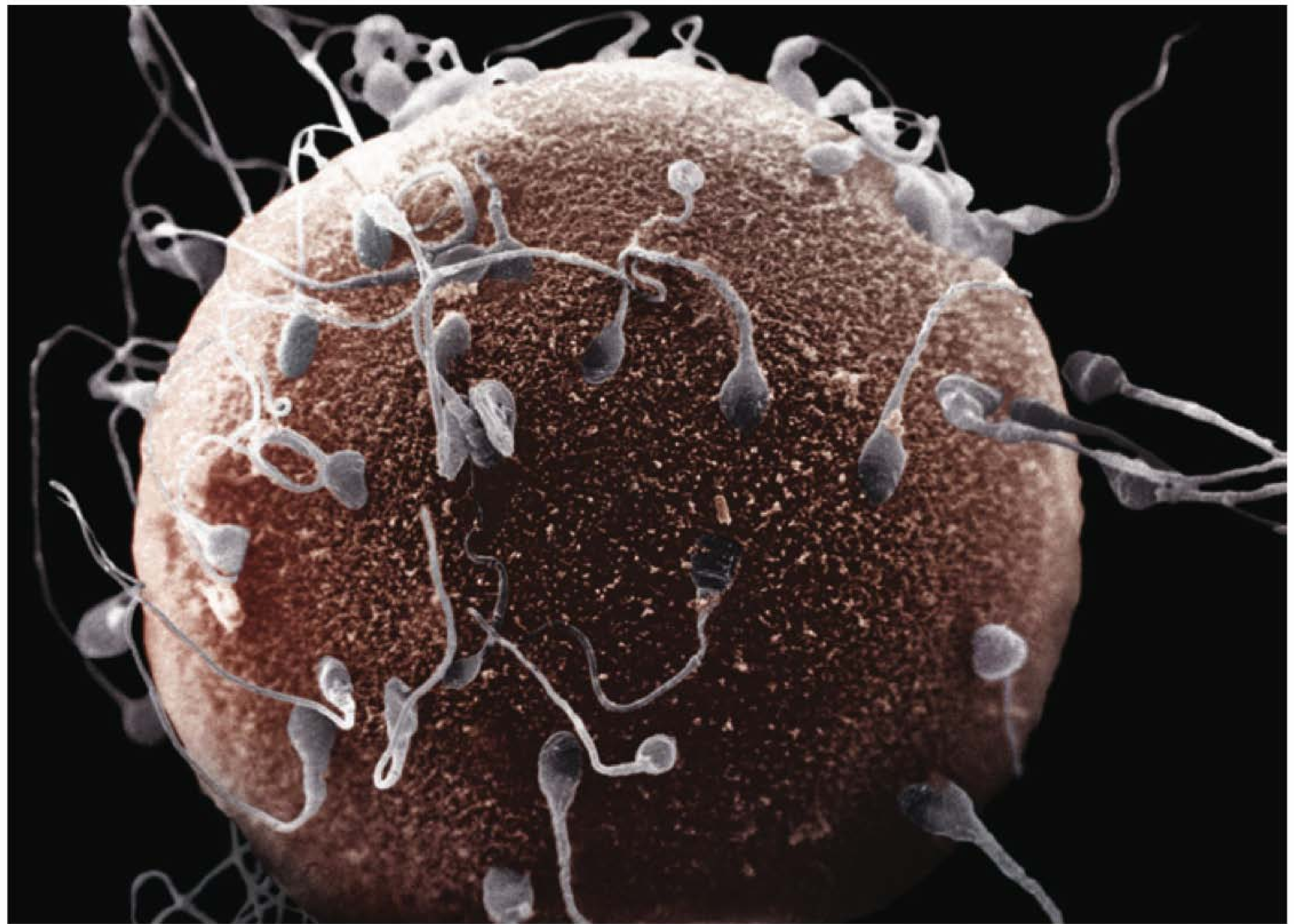


Figura 21-2 Eletromicrografia de varredura de um oócito com muitos espermatozoides humanos ligados a sua superfície. Apesar de oócito não ser móvel, os espermatozoides têm alta motilidade. Embora muitos espermatozoides estejam ligados ao oócito, somente um irá fecundá-lo, como será discutido mais adiante. (Cortesia de D. Phillips/Science Photo Library.)

ploides dividem-se diretamente por meiose para produzir novas células haploides (Figura 21-3B). Uma exceção menos extrema ocorre em plantas, nas quais tanto as células haploides como as diploides proliferam. Entretanto, em todas as plantas, menos nas mais primitivas, como musgos e samambaias, a fase haploide é muito curta e simples, enquanto a fase diploide se estende por um longo período de desenvolvimento e de proliferação celular.

Em quase todos os animais, incluindo todos os vertebrados, apenas as células diploides proliferam: os gametas haploides existem apenas brevemente, não se dividem e são altamente especializados para a fusão sexual. Nestes organismos, é vantajoso fazer a distinção

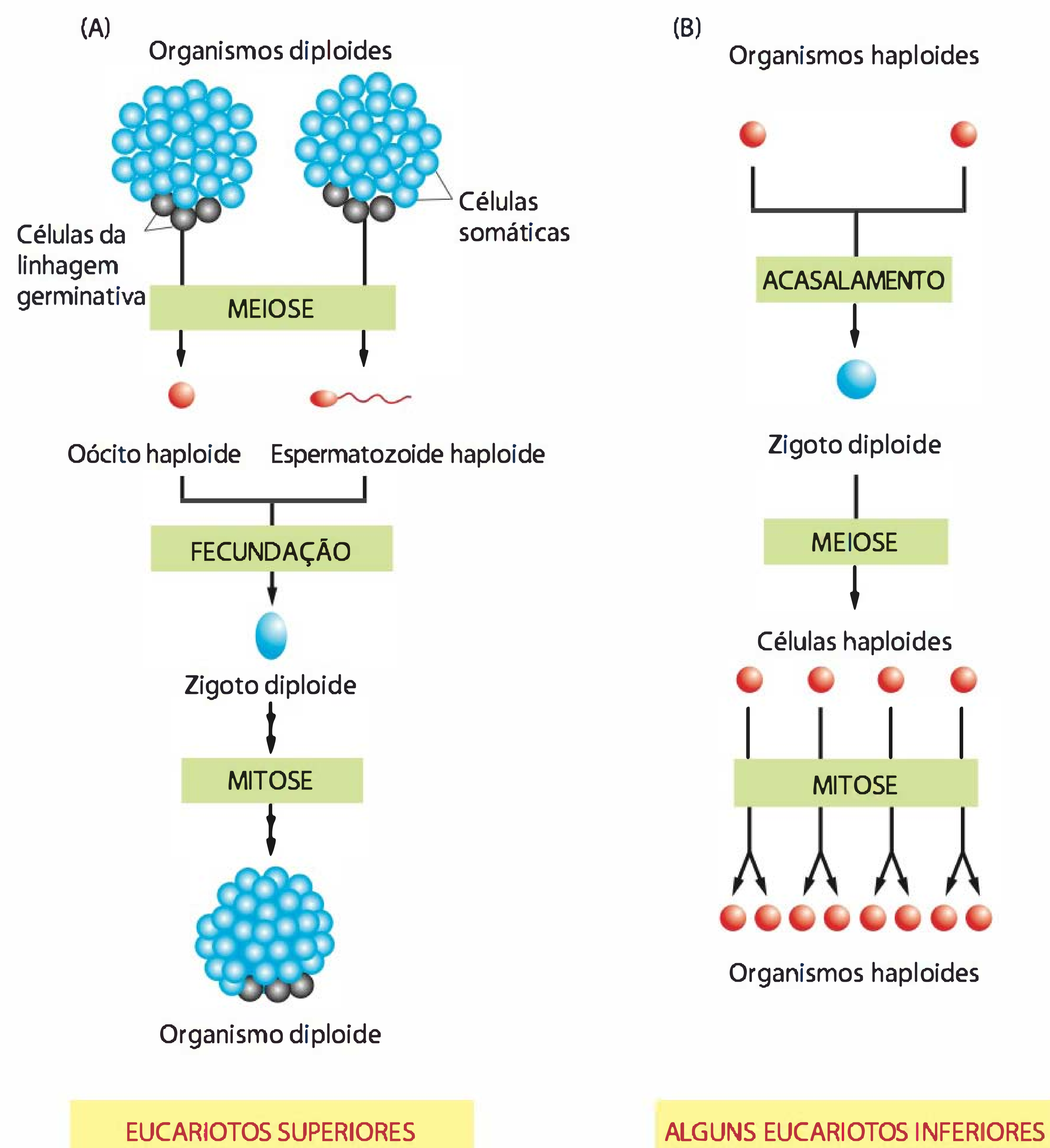


Figura 21-3 Células haploides e diploides no ciclo de vida de eucariotos superiores e alguns inferiores. As células haploides são mostradas em *vermelho* e as células diploides em *azul*. (A) As células na maioria dos animais e das plantas normalmente proliferam na fase diploide para formar um organismo multicelular; apenas os gametas (oócitos e espermatozoides em animais) são haploides, e eles se fundem no momento da fecundação para formar um zigoto diploide, que se desenvolve como um novo indivíduo. Os gametas se desenvolvem a partir de células diploides da linhagem germinativa (*cinza*) nas gônadas; todas as células restantes no organismo são células somáticas. (B) Em alguns eucariotos inferiores, como leveduras de fissão e a alga verde *Chlamydomonas*, ao contrário, as células haploides proliferam, e a única célula diploide é o zigoto, que existe temporariamente após acasalamento.

entre as células da **linhagem germinativa** (ou **células germinativas**), que incluem os gametas e suas células precursoras diploides específicas, e as **células somáticas**, que formam o restante do organismo e no final não deixam descendentes (ver Figura 21-3A). De certa forma, as células somáticas existem apenas para auxiliar as células germinativas a sobreviver, desenvolver-se e transmitir seu DNA para a próxima geração.

Meiose cria diversidade genética

Organismos que se reproduzem sexualmente herdam dois conjuntos completos de cromossomos, um de cada progenitor. Cada conjunto contém *cromossomos autossômicos*, comuns a todos os membros da espécie, e *cromossomos sexuais*, que estão distribuídos de forma diferente de acordo com o sexo do indivíduo. Portanto, cada núcleo diploide contém duas versões muito semelhantes de cada cromossomo autossômico, mais um conjunto de cromossomos sexuais adequados para o sexo do indivíduo. As duas cópias de cada cromossomo autossômico, uma herdada da mãe e uma do pai, são chamadas de **cromossomos homólogos**, e na maioria das células elas mantêm uma existência separada como cromossomos independentes. No entanto, durante a meiose cada cromossomo deve se comunicar fisicamente com seu par homólogo único através do pareamento, para sofrer recombinação genética. Essa comunicação é essencial para capacitar os homólogos a segregarem de forma correta em células-filhas diferentes durante a meiose.

Uma característica crucial da meiose é que ela gera células haploides que são geneticamente diferentes umas das outras e das duas células haploides que formaram o organismo no primeiro momento. As diferenças genéticas surgem por dois mecanismos. Primeiro, individualmente, um gameta contém ou a versão materna ou a paterna de cada cromossomo; como a escolha de materno ou paterno ocorre de forma independente e aleatória para cada par de homólogos, os cromossomos maternos e paternos originais são rearranjados em combinações novas nas células haploides. Segundo, mesmo que as versões materna e paterna de cada cromossomo tenham sequências de DNA semelhantes, elas não são idênticas, sofrendo recombinação genética durante a meiose – um processo chamado de *crossingover* (discutido no Capítulo 5) para produzir versões híbridas novas de cada cromossomo; dessa forma, cada cromossomo em um gameta contém uma mistura única de informação genética de ambos os pais. Discutiremos estes dois mecanismos em maiores detalhes mais tarde (ver Figura 21-13).

A reprodução sexuada proporciona uma vantagem competitiva aos organismos

A maquinaria da reprodução sexuada é elaborada, e os recursos gastos nela são grandes (**Figura 21-4**). Quais são seus benefícios e por que ela evoluiu? Reproduzindo-se sexualmente, os indivíduos produzem descendentes variados, cujos genótipos diversos provavelmente têm chances iguais de representar uma mudança para pior ou para melhor. Então, por que os indivíduos sexuados deveriam ter uma vantagem competitiva sobre os indivíduos que se reproduzem por um processo assexuado? Este problema continua deixando perplexos os biólogos evolucionistas.

Uma vantagem da reprodução sexual parece ser que o rearranjo de genes ajuda uma espécie a sobreviver em um ambiente variável imprevisível. Se um casal de pais produz muitos descendentes com uma variedade grande de combinações de genes, é maior a chance de que ao menos um de seus descendentes tenha a combinação de características necessária para sobreviver em um ambiente em modificação. Na verdade, uma população de leveduras que se reproduz por brotamento, modificada geneticamente para que não possa sofrer recombinação genética por meiose e, portanto, não possa se reproduzir sexualmente, adapta-se de forma muito menos satisfatória e mais demorada às condições ambientais rigorosas do que a população do tipo selvagem, que pode se reproduzir sexualmente.

Outra vantagem da reprodução sexuada parece ser sua capacidade de auxiliar na eliminação de genes prejudiciais de uma população: as fêmeas geralmente acasalam com os machos mais aptos, de modo que os machos menos aptos não deixam descendentes e servem apenas como uma espécie de lata de lixo genética. Esta seleção rigorosa entre os machos significa que genes "bons" são transmitidos e genes "ruins" são perdidos na população de forma mais eficiente que seriam de outro modo. Como resultado, espera-se que membros de uma população de reprodução sexuada tenham média de aptidão muito mais alta que membros de uma população equivalente que se reproduz assexuadamente.



Figura 21-4 Um pavão mostrando sua complexa cauda. Esta plumagem extravagante serve para atrair as fêmeas, com o objetivo de reprodução sexuada. Ela desenvolveu-se porque apenas os machos mais aptos e elegantes deixarão descendentes. (Cortesia de Cyril Laubscher.)

Quaisquer que sejam os benefícios que a reprodução sexuada possa ter, é surpreendente que praticamente todos os organismos complexos atuais tenham evoluído amplamente por gerações através da reprodução sexuada em vez da assexuada. Comparativamente, organismos assexuados, apesar de abundantes, na sua maioria parecem ter permanecido simples e primitivos.

Agora, passaremos para os mecanismos celulares do sexo, começando com os eventos da meiose. Então, focaremos nossa discussão principalmente em mamíferos. Primeiro, levaremos em consideração as células diploides da linhagem germinativa que originam os gametas e a maneira como o sexo de um mamífero é determinado. Finalmente, examinaremos o processo de fecundação, no qual um oócito e um espermatozoide se fundem para formar um novo organismo diploide.

Resumo

O ciclo reprodutivo sexuado envolve uma alternância de estados diploides e haploides: as células diploides dividem-se por meiose para formar células haploides, e as células haploides de dois indivíduos se fundem em pares para formar novos zigotos diploides. No processo, os genomas são misturados e recombinados para produzir indivíduos com novas combinações genéticas. Nos eucariotos superiores, as células diploides proliferam por mitose, e somente uma pequena proporção delas (aquelas da linhagem germinativa) sofre meiose para produzir células haploides; as células haploides se diferenciam como gametas, os quais são especializados para a reprodução sexuada, têm apenas uma existência breve e não se dividem. Acredita-se que a reprodução sexuada seja vantajosa tanto por produzir indivíduos com combinações genéticas novas, alguns dos quais podem sobreviver e procriar em um ambiente variável imprevisível, como por propiciar uma maneira eficiente de eliminar mutações prejudiciais de uma população.

MEIOSE

A compreensão de que os gametas são haploides veio de uma observação que também sugeria que os cromossomos carregam informação genética. Em 1883, em um estudo com vermes nematódeos, foi descoberto que o núcleo de um oócito e o de um espermatozoide contêm dois cromossomos cada um, enquanto o zigoto (ou ovo fecundado) contém quatro cromossomos. Isto levou à teoria cromossômica da hereditariedade, a qual explicou o paradoxo de longa data de que as contribuições materna e paterna para as características da progênie parecem ser iguais, apesar da enorme diferença de tamanho entre o oócito e o espermatozoide (ver Figura 21-2).

O achado também sugeriu que as células germinativas haploides resultam de um tipo especial de divisão celular no qual o número de cromossomos é dividido exatamente ao meio. Este tipo de divisão, chamado de **meiose** (do grego *meiosis*, que significa diminuição ou redução), nos animais inicia-se nas células da linhagem germinativa dos ovários ou testículos. Poderia parecer que a meiose acontece por uma modificação simples da mitose, na qual a síntese de DNA (fase S) é omitida e uma divisão celular simples produz diretamente duas células haploides. No entanto, a meiose é mais complexa que isto e envolve duas divisões celulares ao invés de uma, mas com apenas uma etapa de síntese de DNA. Os eventos essenciais da meiose foram estabelecidos somente no início da década de 1930, como resultado de cuidadosos estudos citológicos e genéticos. Estudos genéticos e moleculares mais recentes têm começado a identificar as várias proteínas específicas da meiose que fazem com que os cromossomos na meiose se comportem de uma maneira diferente dos cromossomos na mitose e ajudam a mediar os eventos decisivos de recombinação genética que ocorrem na meiose. Veremos que os eventos de recombinação são importantes não apenas para a variabilidade genética, mas também para a segregação cromossômica precisa durante a meiose.

Os gametas são produzidos por duas divisões celulares meióticas

A meiose utiliza quase a mesma maquinaria molecular e os sistemas de controle que agem na mitose comum. Contudo, neste capítulo daremos enfoque às características particulares da meiose que a distinguem da mitose. No início da meiose, assim como na mitose, os cromossomos têm o seu DNA replicado (na fase S meiótica) e as duas cópias estão intimamente ligadas por *complexos coesina* ao longo de todo seu comprimento (ver Figura 17-24), sendo chamadas de **cromátides-irmãs**. Entretanto, diferentemente da mitose, a meiose ocorre

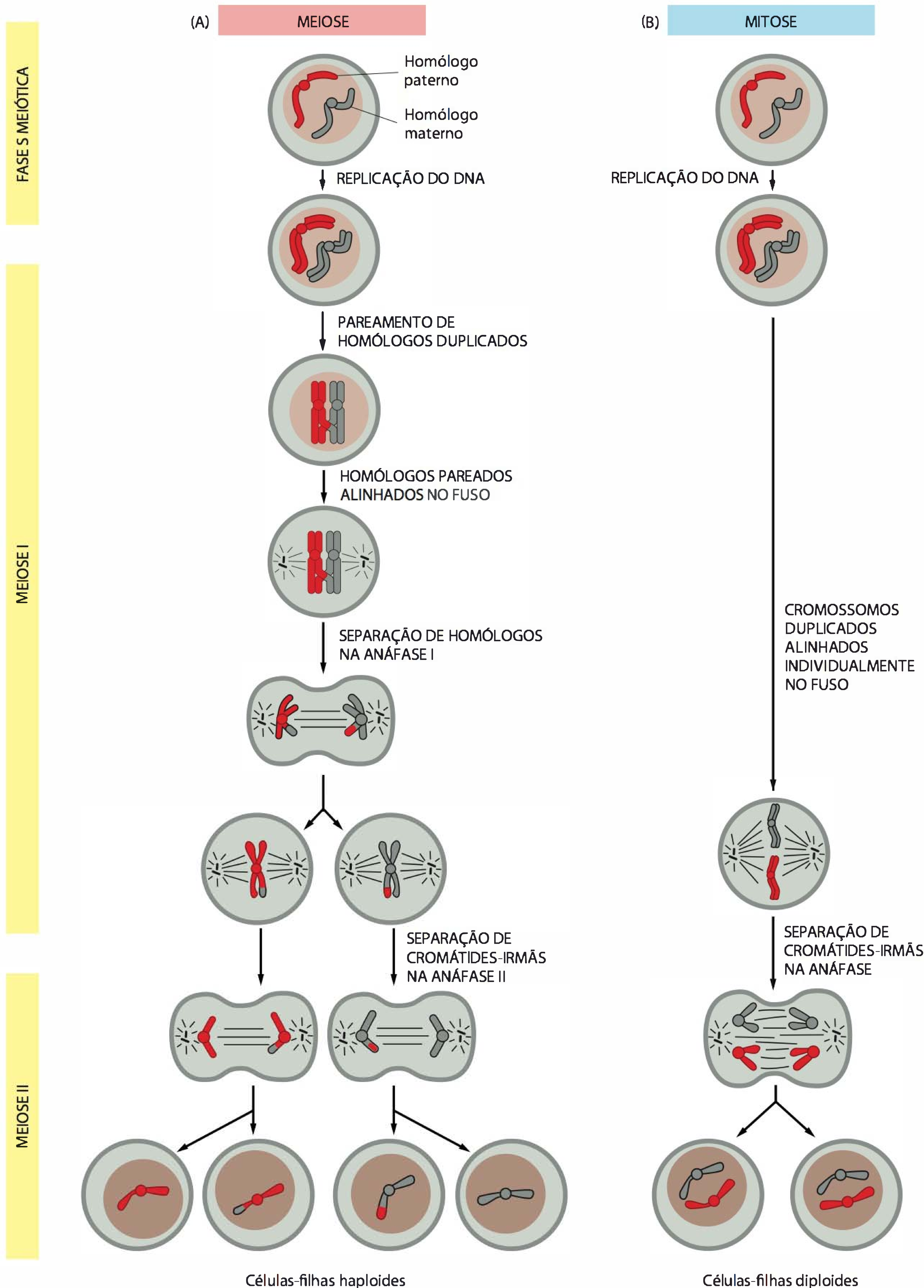


Figura 21-5 Comparação entre a meiose e a divisão celular mitótica. Para maior clareza, somente um par de cromossomos (homólogos) é mostrado. (A) Na meiose, após a replicação de DNA, duas divisões nucleares (e celulares) são necessárias para produzir os gametas haploides. Os homólogos duplicados, cada um composto por duas cromátides-irmãs unidas firmemente, pareiam e são segregados em células-filhas diferentes na meiose I; as cromátides-irmãs separam-se somente na meiose II. Como é indicado pela formação de cromossomos que são parcialmente *vermelhos* e parcialmente *cinzas*, o pareamento dos homólogos na meiose leva à recombinação genética (*crossing-over*) durante a meiose I, como será discutido mais tarde. Portanto, cada célula diploide que entra em meiose produz quatro células haploides geneticamente diferentes. (B) Na mitose, ao contrário, os homólogos não formam pares e as cromátides-irmãs separam-se durante a divisão única. Assim, cada célula diploide que se divide por mitose produz duas células-filhas diploides geneticamente idênticas.

para produzir gametas com a metade dos muitos cromossomos de suas células precursoras diploides. Isso é obtido pela modificação do programa mitótico de maneira que uma etapa única de replicação de DNA é seguida por duas etapas sucessivas de segregação de cromossomos (**Figura 21-5**A). Lembre-se de que, na mitose (discutida no Capítulo 17), os cromossomos duplicados alinham-se ao acaso no equador do fuso mitótico, e as cromátides-irmãs são tracionadas até separarem-se e serem segregadas em duas células-filhas, de modo que cada filha herda um conjunto diploide completo de cromossomos e é geneticamente idêntica à célula-mãe (Figura 21-5B). Na primeira divisão da meiose (**meiose I**), ao contrário, os homólogos paternos e maternos duplicados (incluindo os dois cromossomos sexuais replicados) pareiam um ao lado do outro e trocam informação genética por meio de um processo

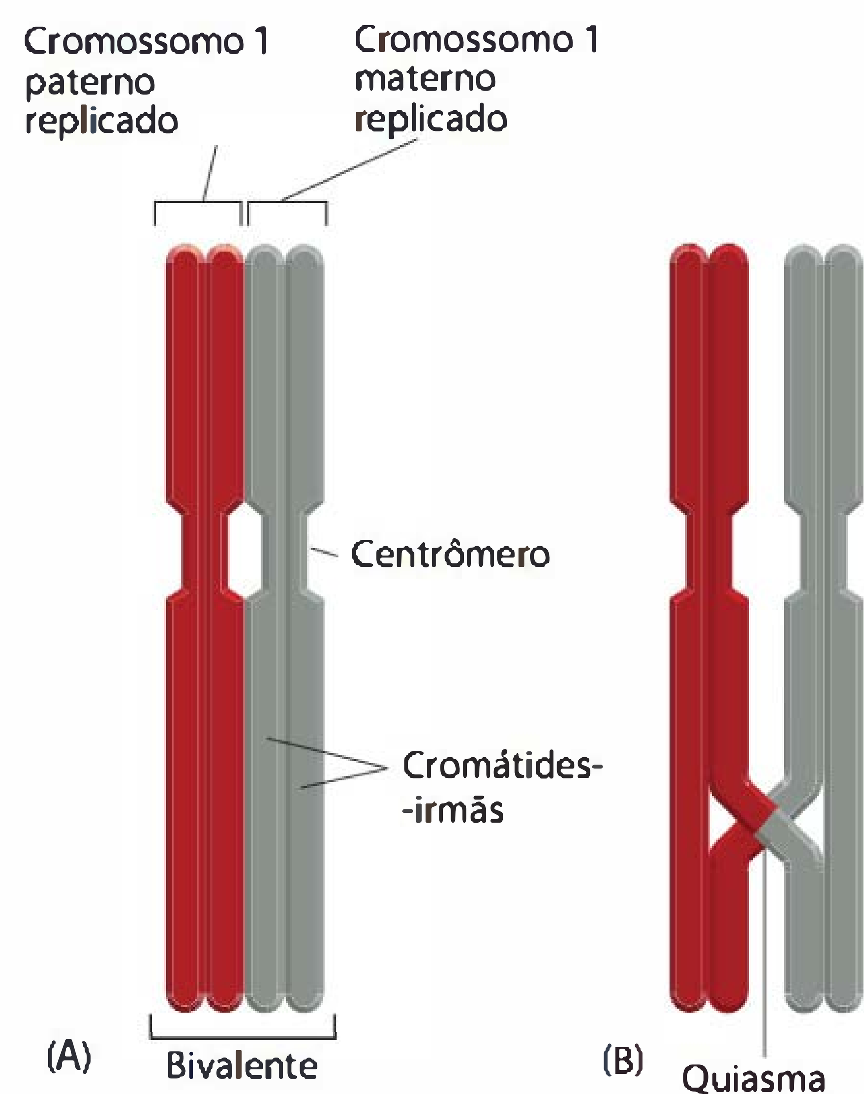


Figura 21-6 Alinhamento dos homólogos e *crossing-over*. (A) A estrutura formada por dois homólogos duplicados alinhados de forma muito próxima é chamada de *bivalente*. Como na mitose, as cromátides-irmãs estão conectadas firmemente ao longo de todo seu comprimento, bem como pelos seus centrômeros. Nesse estágio, os homólogos normalmente estão unidos por um complexo proteico chamado de *complexo sinaptotênico* (não-mostrado; ver Figura 21-9). (B) Um bivalente em estágio posterior no qual um único evento de *crossing-over* está ocorrendo entre cromátides não-irmãs. Somente quando o complexo sinaptotênico se desfaz e os homólogos pareados separam-se um pouco no final da prófase I, como é mostrado, é possível visualizar o *crossing-over* microscopicamente como uma tênue conexão, chamada de *quiasma*, entre os homólogos.

de recombinação genética. Então, eles alinham-se no equador do fuso meiótico, e depois, ao invés das cromátides-irmãs, os homólogos duplicados é que são tracionados até separarem-se, sendo segregados em duas células-filhas. Apenas na segunda divisão da meiose (**meiose II**), a qual ocorre sem uma replicação adicional de DNA, as cromátides-irmãs são separadas e segregadas para produzir células-filhas haploides. Dessa forma, cada célula diploide que entra em meiose produz quatro células haploides, sendo que cada uma herda ou a cópia materna ou a paterna de cada cromossomo, mas não ambas (ver Figura 21-5A).

Os cromossomos homólogos duplicados (e os cromossomos sexuais) formam pares durante o início da prófase I

Durante a mitose em muitos organismos, os cromossomos homólogos comportam-se independentemente uns dos outros. No entanto, durante a meiose I, é fundamental que homólogos se reconheçam uns aos outros e tornem-se ligados fisicamente a fim de que homólogos maternos e paternos passem por recombinação genética e segreguem para células-filhas diferentes na anáfase I. Mecanismos especiais medeiam estas interações íntimas entre homólogos.

A justaposição progressiva de homólogos ocorre durante uma prófase meiótica muito prolongada (prófase I), a qual pode levar horas em leveduras, dias em camundongos e semanas em vegetais superiores. Da mesma forma que na mitose, os cromossomos duplicados na prófase da meiose aparecem como estruturas delgadas longas, nas quais as cromátides-irmãs estão coladas firmemente e tão juntas que parecem apenas uma. É durante o início da prófase I que os homólogos começam a se unir ao longo de seu comprimento em um processo chamado de **pareamento**, que, pelo menos em alguns organismos, inicialmente ocorre por interações entre sequências de DNA complementar (chamadas de *sítios de pareamento*) nos dois homólogos; na maioria dos organismos, o pareamento estável requer recombinação genética entre os homólogos. Com o avanço da prófase I, os homólogos tornam-se mais intimamente justapostos, formando uma estrutura de quatro cromátides chamada de **bivalente** (**Figura 21-6**A). Como discutiremos mais adiante, a recombinação genética inicia durante o pareamento no início da prófase I, com a produção de quebras programadas na fita dupla de DNA da cromátide; alguns destes eventos de recombinação se resolverão mais tarde nos *entrecruzamentos* (*crossovers*), quando um fragmento de uma cromátide materna é trocado por um fragmento correspondente de uma cromátide do homólogo paterno (Figura 21-6B; ver também Figura 5-64).

O pareamento dos homólogos requer movimentos de cromossomos, mas não se sabe o que aciona estes movimentos. Os cromossomos replicados sofrem os principais rearranjos dentro do núcleo durante a prófase I. As extremidades dos cromossomos (os *telômeros*) estão firmemente ligadas à superfície do envelope nuclear. Inicialmente, eles estão distribuídos ali de forma difusa, mas então se agrupam transitoriamente em um ponto no envelope e, mais tarde ainda, dispersam-se novamente (**Figura 21-7**). Nem os mecanismos, nem as funções destes rearranjos são conhecidos, embora se imagine que eles tornem a prófase I mais rápida e eficiente. Uma possibilidade é que eles ajudem a impedir o embaralhamento dos cromossomos durante a prófase I. Em leveduras de fissão, o agrupamento dos telômeros é necessário para o pareamento e o *crossing-over* dos homólogos, porém em alguns organismos ele ocorre após o pareamento já estar bem encaminhado.

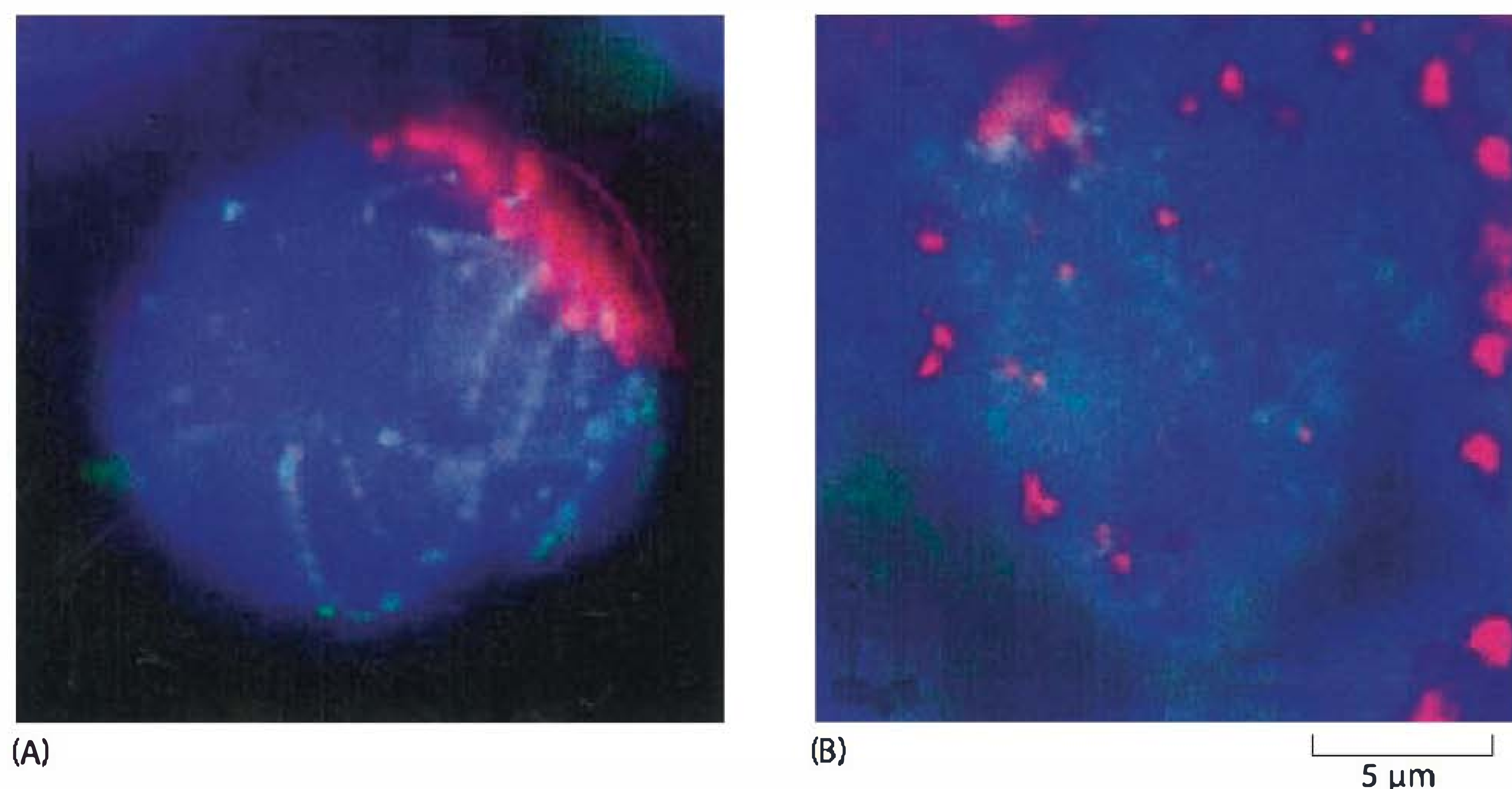


Figura 21-7 Rearranjo de telômeros durante a prófase em oócitos bovinos em desenvolvimento. O núcleo está corado de *azul*, e os telômeros, de *vermelho*. Durante a prófase I, os telômeros estão ligados à superfície interna do envelope nuclear. A princípio, eles estão dispersos em torno do envelope nuclear (não-mostrado). Então, eles tornam-se agrupados em uma região do envelope (A); por fim, perto do final da prófase I, eles se dispersam novamente (B). (De C. Pfeifer et al., *Dev. Biol.* 255:206-215, 2003. Com permissão de Elsevier.)

Descrevemos o pareamento de homólogos autossômicos durante a prófase I, mas o que acontece aos cromossomos sexuais? Isto varia entre organismos diferentes. Fêmeas mamíferas têm dois cromossomos X, que pareiam e segregam da mesma forma que os outros homólogos. Contudo, os machos têm um cromossomo X e um Y. Embora estes cromossomos não sejam homólogos, eles também devem parear e sofrer *crossing-over* durante a prófase para que sejam segregados normalmente na anáfase I. O pareamento, o *crossing-over* e a segregação são possíveis por causa de uma região pequena de homologia entre o X e o Y em uma ou ambas as extremidades destes cromossomos. Os dois cromossomos pareiam e se entrecruzam nessa região durante a prófase I, assegurando que cada espermatozoide receba ou um cromossomo X ou um Y, e não ambos ou nenhum. Assim, somente dois tipos de espermatozoides são produzidos normalmente: aqueles contendo um cromossomo Y, o qual dará origem a um embrião do sexo masculino, e aquele contendo um cromossomo X, que originará um embrião feminino.

O pareamento dos homólogos culmina na formação de um complexo sinaptotênico

Os homólogos pareados são trazidos a uma íntima justaposição, com seus eixos estruturais (*centro axial*) distantes cerca de 400 nm, por um mecanismo que depende, na maioria das espécies, das quebras programadas na fita dupla de DNA que ocorrem nas cromátides-irmãs. Por que atrair os eixos juntos? Uma possibilidade é que a grande máquina proteica, chamada de *complexo de recombinação*, que se organiza sobre uma quebra da fita dupla em uma cromátide, liga-se à sequência de DNA correspondente no homólogo próximo e ajuda a enovelar em seu par. Este assim chamado *alinhamento pré-sináptico* dos homólogos é seguido por *sinapse*, na qual o centro axial de um homólogo torna-se intimamente ligado ao centro axial de seu par por um arranjo hermeticamente agrupado de *filamentos transversos* para criar um **complexo sinaptotênico**, o qual atravessa o espaço, agora de 100 nm, entre os homólogos (**Figura 21-8**). Embora o *crossing-over* inicie antes da montagem do complexo sinaptotênico, as etapas finais ocorrem enquanto o DNA é mantido no complexo (discutido no Capítulo 5).

As modificações morfológicas que ocorrem durante o pareamento de cromossomos meióticos são a base para dividir a prófase I em cinco estágios sequenciais – leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Como é mostrado na **Figura 21-9**, a prófase I começa com o *leptóteno*, quando os homólogos condensam e pareiam, e inicia-se a recombinação genética. No *zigóteno*, o complexo sinaptotênico começa a formar-se em regiões próximas ao longo dos homólogos; a formação inicia em locais onde os homólogos estão associados intimamente e os eventos de recombinação estão ocorrendo. No *paquíteno*, o processo de formação está completo e os homólogos estão unidos por sinapses ao longo de todo seu comprimento. O estágio de paquíteno pode persistir por dias ou mais tempo, até a desinapse iniciar no *diplóteno* com a desorganização dos complexos sinaptotênicos e a concomitante condensação e o encurtamento dos cromossomos. É somente neste estágio, depois dos complexos terem se desfeito, que os eventos individuais de entrecruzamento entre cromátides não-irmãs podem

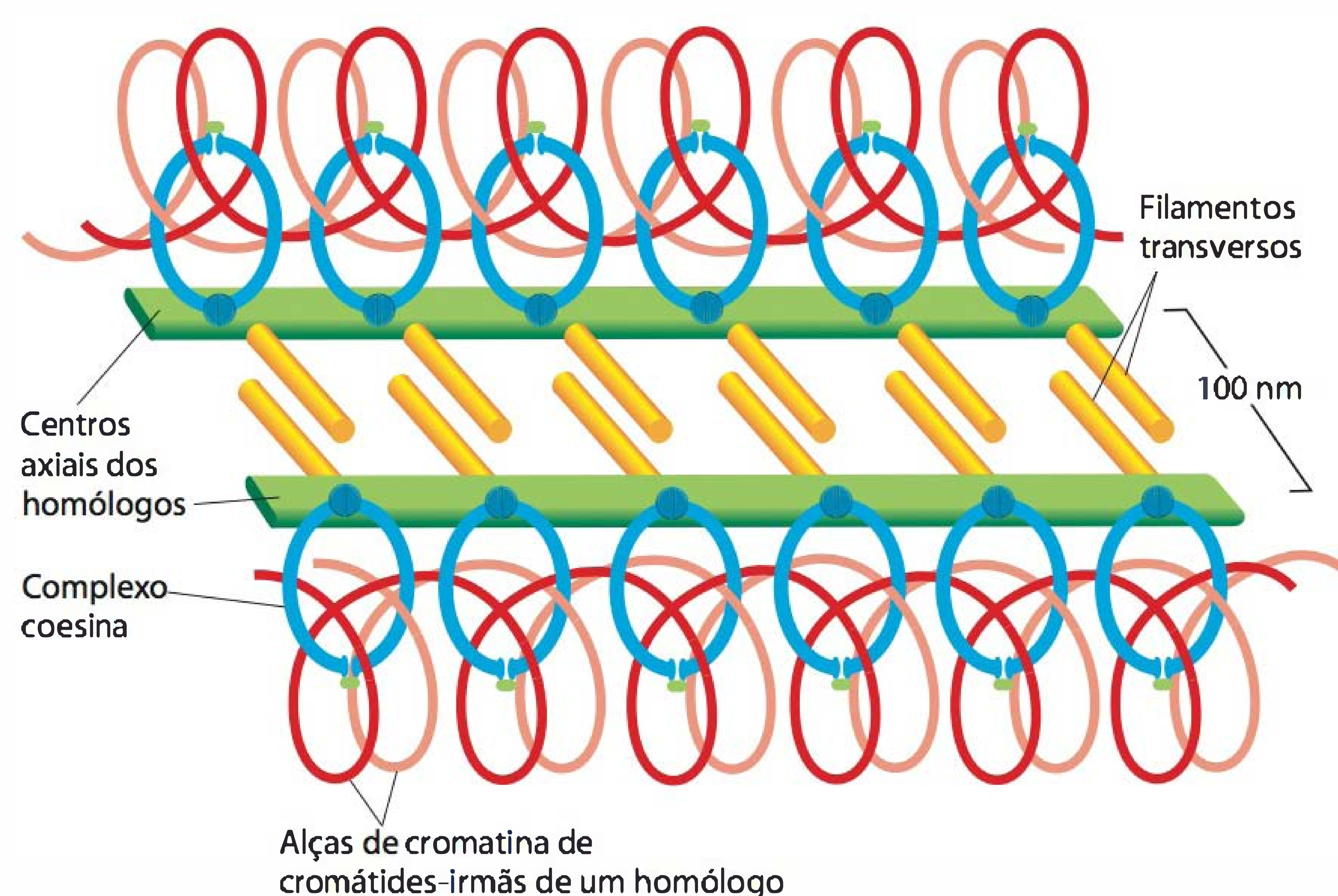


Figura 21-8 Desenho esquemático simplificado de um complexo sinaptotênico. Antes do complexo sinaptotênico se formar, complexos de recombinação se organizam sobre quebras da fita dupla de DNA em cromátides-irmãs e ajudam a catalisar o *crossing-over* entre alças de cromátides não-irmãs de lados opostos do complexo (não-mostrado). (Modificada de K. Nasmyth, *Annu. Rev. Genet*. 35:673-745, 2001. Com permissão de Annual Reviews.)

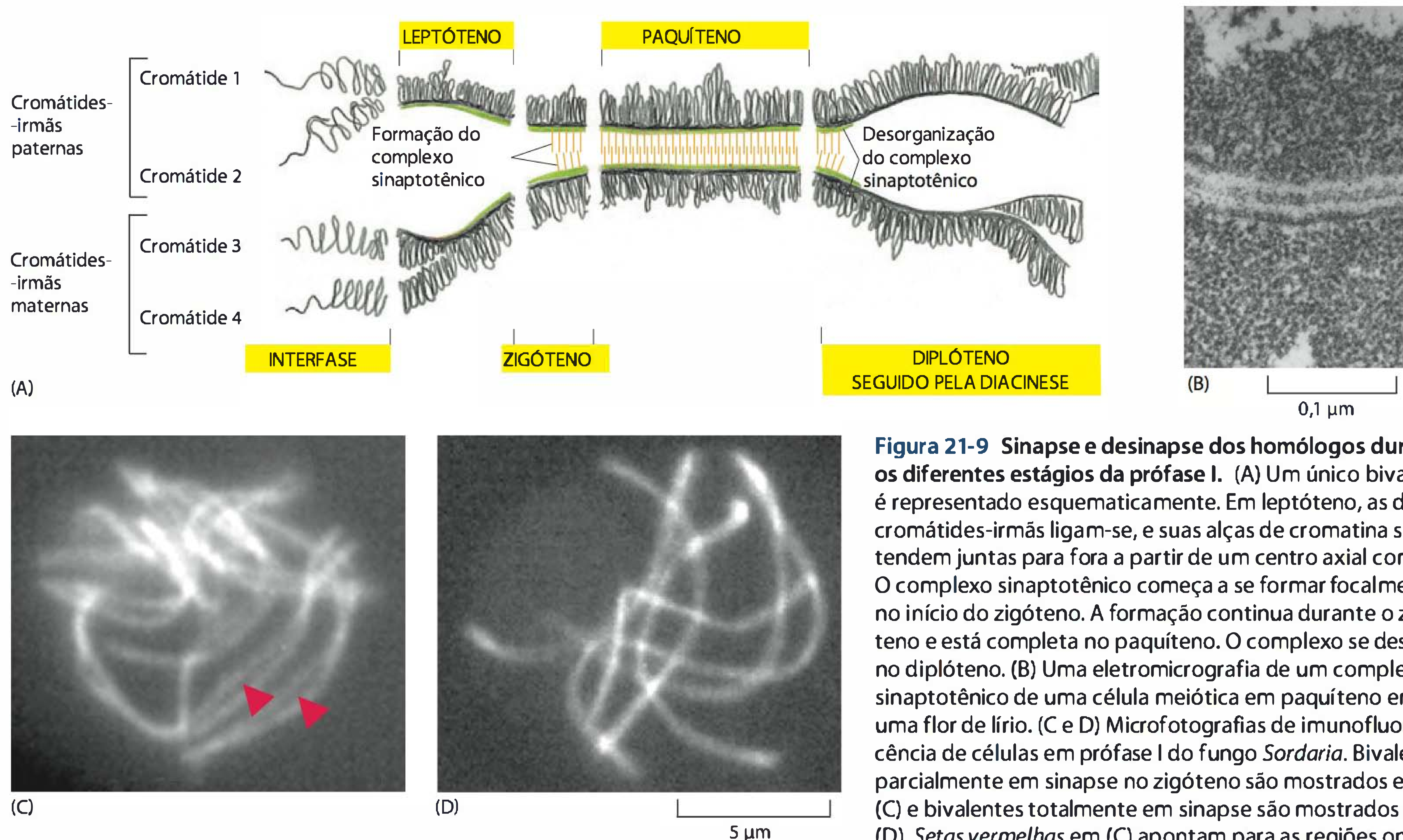


Figura 21-9 Sinapse e desinapse dos homólogos durante os diferentes estágios da prófase I. (A) Um único bivalente é representado esquematicamente. Em leptóteno, as duas cromátides-irmãs ligam-se, e suas alças de cromatina se estendem juntas para fora a partir de um centro axial comum. O complexo sinaptotênico começa a se formar focalmente no início do zigóteno. A formação continua durante o zigóteno e está completa no paquíteno. O complexo se desfaz no diplóteno. (B) Uma eletromicrografia de um complexo sinaptotênico de uma célula meiótica em paquíteno em uma flor de lírio. (C e D) Microfotografias de imunofluorescência de células em prófase I do fungo *Sordaria*. Bivalentes parcialmente em sinapse no zigóteno são mostrados em (C) e bivalentes totalmente em sinapse são mostrados em (D). *Setas vermelhas* em (C) apontam para as regiões onde a sinapse ainda está incompleta. (B, cortesia de Brian Wells; C e D, de A. Storlazzi et al., *Genes Dev.* 17:2675-2687, 2003. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

ser vistos como conexões inter-homólogos chamadas de **quiasmata** (o singular é **quiasma**), que agora desempenham um papel crucial na manutenção dos homólogos juntos de forma compacta (**Figura 21-10**). Os homólogos agora estão prontos para iniciar o processo de segregação. A prófase I termina com a *diacinese* – o estágio de transição para a metáfase I.

As proteínas que formam os filamentos transversos que fazem a ponte entre os centros axiais dos homólogos têm sido identificadas em várias espécies, incluindo leveduras, vermes, moscas e mamíferos. Elas formam homodímeros que interagem uns com os outros através do espaço de 100 nm existente entre os homólogos, como ilustrado na **Figura 21-11**. Na maioria dos eucariotos, estas proteínas são importantes para o *crossing-over*, uma vez que mutantes que carecem delas não conseguem estabelecer recombinações. Os complexos coesina que se organizam sobre o DNA durante a fase S e juntam as cromátides-irmãs durante a meiose são os componentes principais do centro axial de cada homólogo (ver Figura 21-8). Algumas das subunidades coesina que operam na meiose são as mesmas que funcionam na mitose, ao passo que outras são específicas para a meiose. Não só as recombinações como também os complexos coesina desempenham um papel fundamental na segregação dos homólogos durante a divisão meiótica I, como discutiremos agora.

A segregação dos homólogos depende de proteínas específicas da meiose associadas ao cinetocoro

Uma diferença fundamental entre meiose I e mitose (e meiose II) é que, na meiose I, ao invés das cromátides-irmãs, são os homólogos que se separam e são segregados em duas

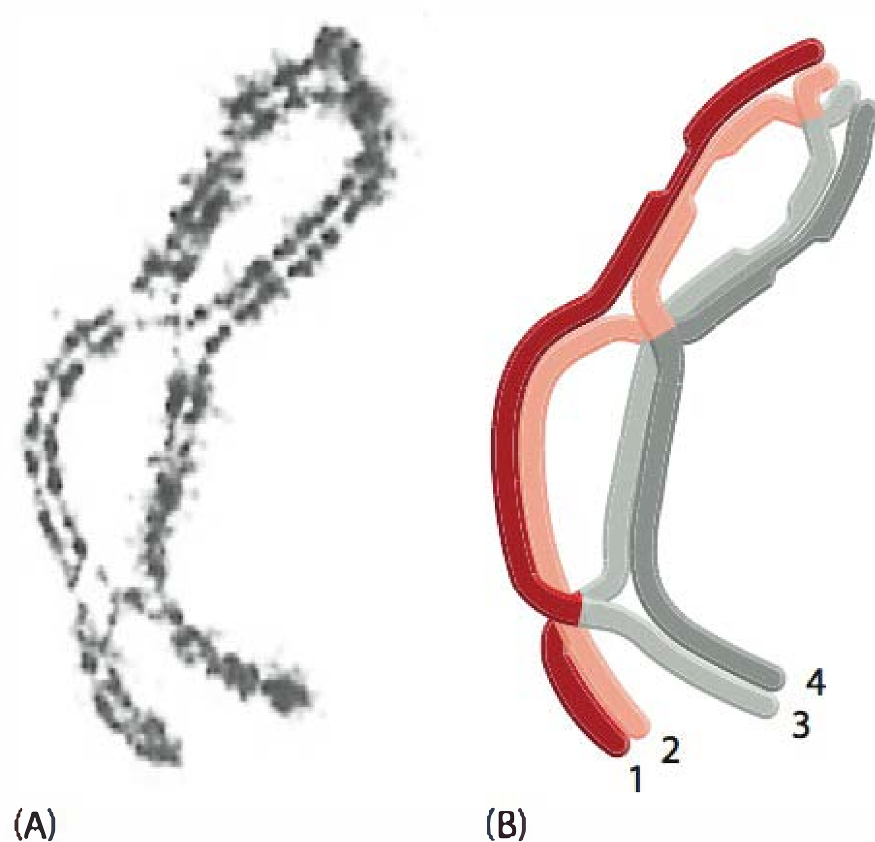


Figura 21-10 Um bivalente com três quiasmata resultantes de três eventos de *crossing-over* (entrecruzamento). (A) Fotomicrografia de luz de um bivalente de gafanhoto. (B) Desenho mostrando o arranjo dos entrecruzamentos em (A). Note que a cromátide 1 foi submetida a uma troca com a cromátide 3, e a cromátide 2 sofreu trocas com as cromátides 3 e 4. Observe também como a combinação de quiasmata e a adesão firme dos braços das cromátides-irmãs uma à outra (mediada por complexos coesina) mantêm os dois homólogos juntos após o complexo sinaptotênico ter se desorganizado; se os quiasmata ou a adesão entre as cromátides-irmãs deixam de se formar, os homólogos virão separados a este estágio e não serão segregados apropriadamente quando a célula se dividir no final da meiose I. (A, cortesia de Bernard John.)

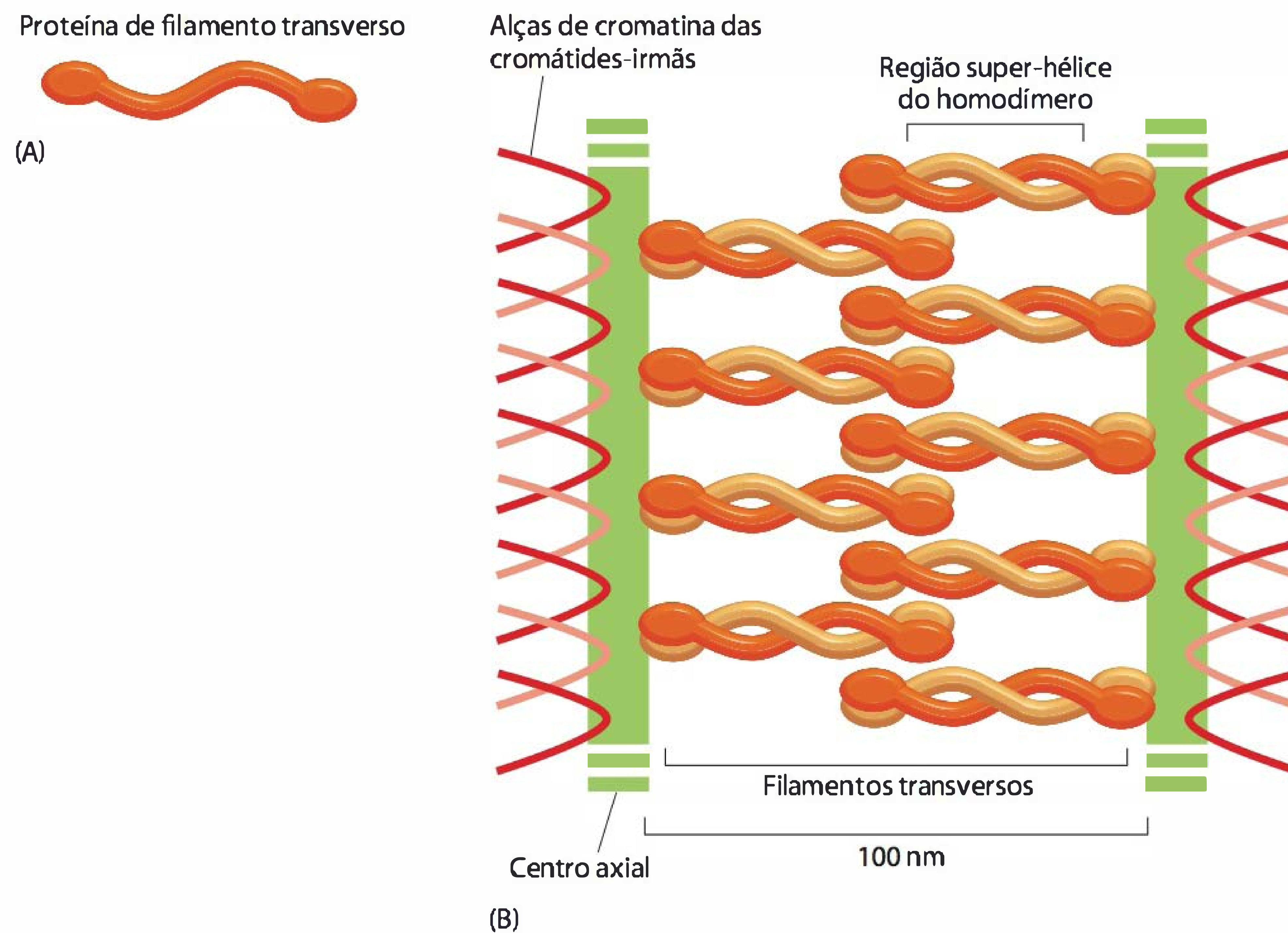


Figura 21-11 Modelo molecular de como filamentos transversos podem ser formados por um único tipo de proteína. (A) Um esquema da cadeia polipeptídica mostrando os domínios globulares N-terminal e C-terminal, conectados por uma região hélice-hélice (ou super-hélice). (B) Está proposto que a proteína forma homodímeros, os quais então interagem através do espaço de 100 nm que separa os centros axiais dos dois homólogos. (Adaptada de S. L. Page e R.S. Hawley, *Science* 301:785-789, 2003. Com permissão de AAAS.)

células-filhas (ver Figura 21-5). Esta diferença depende de três características da meiose I que a distinguem da mitose (**Figura 21-12**). Primeiro, os *cinetocoros* (complexos proteicos

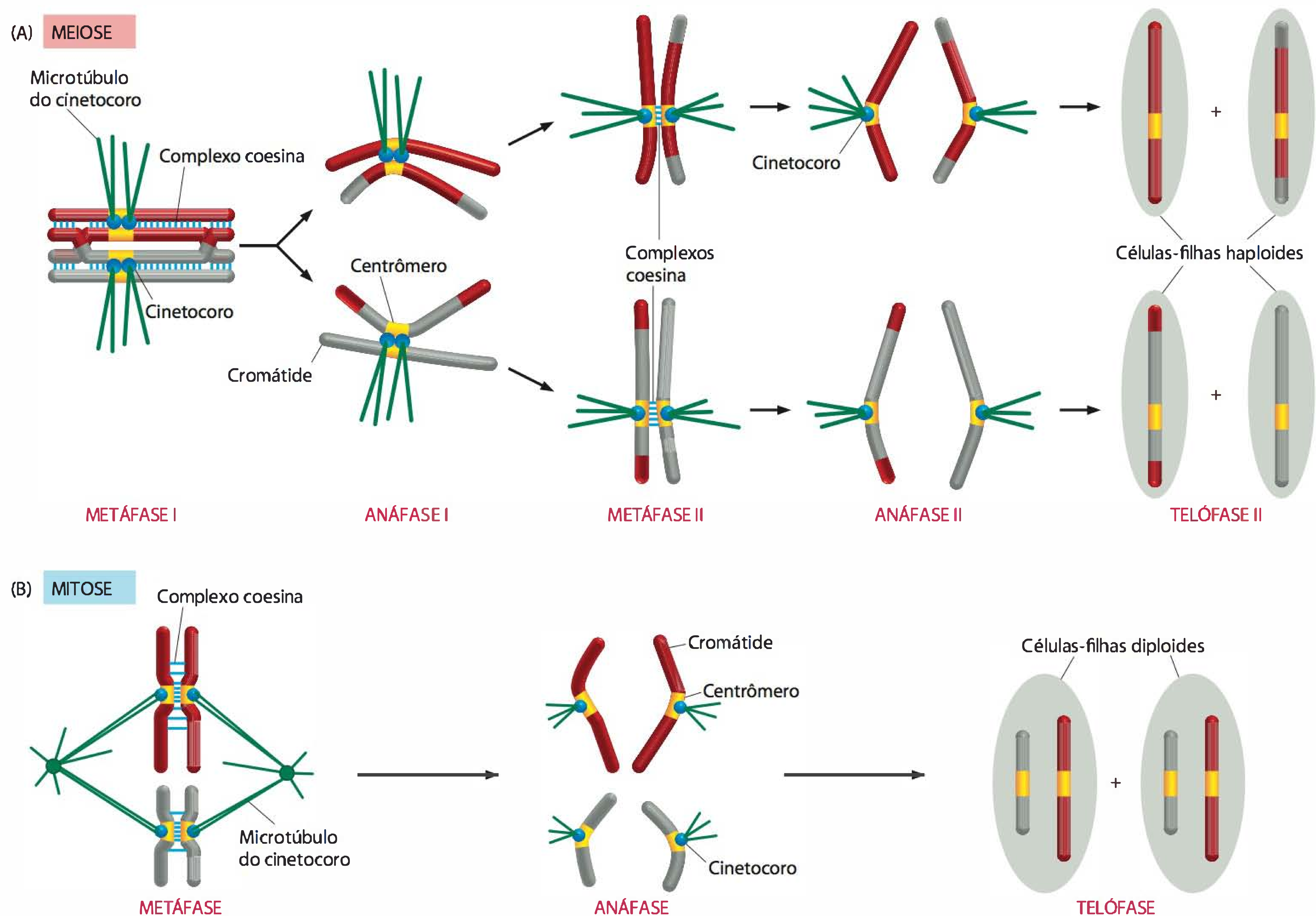


Figura 21-12 Comparação do comportamento do cromossomo em meiose I, meiose II e mitose. Cromossomos comportam-se de maneira semelhante em mitose e meiose II, mas comportam-se de forma muito diferente em meiose I. (A) Na meiose I, os dois cinetocoros-irmãos estão localizados lado-a-lado em cada homólogo nos centrômeros-irmãos e se prendem aos microtúbulos derivados do mesmo polo do fuso. A destruição proteolítica dos complexos coesina ao longo dos braços das cromátides-irmãs desfaz a aderência entre os braços e extingue gradualmente as recombinações, permitindo que os homólogos duplicados separem-se na anáfase I, enquanto os complexos coesina residuais nos centrômeros mantêm as irmãs juntas. A degradação proteolítica dos complexos coesina residuais nos centrômeros permite a separação das cromátides-irmãs na anáfase II. (B) Ao contrário, na mitose, os dois irmãos prendem-se aos microtúbulos derivados de diferentes polos do fuso, e as duas cromátides-irmãs migram separadas no início da anáfase e segregam em células-filhas separadas (discutido no Capítulo 17).

associados aos centrômeros, discutidos nos Capítulos 4 e 17) nas duas cromátides-irmãs de um homólogo se prendem aos microtúbulos derivados do mesmo polo do fuso da meiose I e, dessa forma, segregam juntos para a mesma célula-filha na anáfase I; isso contrasta com a mitose (e a meiose II), na qual os cinetocoros de duas cromátides-irmãs de um cromossomo se prendem a polos opostos do fuso e, por conseguinte, segregam para células-filhas diferentes na anáfase. Segundo, uma ligação física forte é mantida entre os homólogos e resiste às forças de tração do fuso da meiose I até os bivalentes estarem alinhados no equador do fuso e os homólogos separarem-se na anáfase I. Os quiasmata formados entre cromátides não-irmãs e a coesão entre os braços de cromátides-irmãs cooperam para manter os homólogos juntos (ver Figura 21-10). Terceiro, os braços das cromátides-irmãs separam-se na anáfase I, acabando com os quiasmata e permitindo que os homólogos separem-se, mas as irmãs permanecem aderidas juntas na região de seus centrômeros até a anáfase II e, portanto, não se separam na anáfase I.

Em experimentos de micromanipulação, cromossomos em meiose I transferidos para fusos de meiose II comportam-se como se estivessem em meiose I, indicando que o comportamento especializado de cromossomos, em meiose I é determinado pelos próprios cromossomos, ao invés do fuso ou outros fatores citoplasmáticos. Várias proteínas específicas da meiose associadas a cromossomos da meiose I explicam o comportamento especial, embora funcionem juntamente com proteínas não-específicas da meiose que ajudam a intermediar tanto a mitose como a meiose. Por exemplo, complexos de proteínas específicas da meiose associam-se com os dois cinetocoros em cada homólogo replicado e ajudam a assegurar que as duas cromátides-irmãs se prendam aos microtúbulos derivados de um único polo do fuso. Outras proteínas (chamadas de *shugoshinas*) associadas a cinetocoros ajudam a garantir que cinetocoros-irmãos não virão separados para a anáfase I, quando a enzima proteolítica *separase* (discutida no Capítulo 17) cliva os complexos coesina que unem os braços de cromátides-irmãs. Uma maneira das shugoshinas protegerem os complexos coesina em centrômeros é pelo recrutamento de uma proteína fosfatase específica para os centrômeros; a fosfatase reverte a fosforilação dos complexos coesina que é necessária para a separase clivá-los. Assim, os braços das cromátides vêm separados para a anáfase I, ao passo que os centrômeros não. As irmãs separam-se somente quando a separase cliva os complexos coesina remanescentes nos centrômeros na anáfase II (ver Figura 21-12A), quando as shugoshinas já funcionaram.

Ao contrário da meiose I, a meiose II ocorre rapidamente e lembra rigorosamente uma divisão celular mitótica, embora ocorra sem replicação de DNA. A prófase II é breve: o envelope nuclear se rompe, enquanto o novo fuso se forma, e então a metáfase II, a anáfase II e a telófase II seguem normalmente em uma sucessão rápida. Depois que os envelopes nucleares se formaram em torno dos quatro núcleos haploides produzidos na telófase, ocorre a citocinese e a meiose está completa.

A meiose frequentemente funciona mal

A distribuição dos cromossomos que ocorre durante a meiose é uma façanha extraordinária de contabilidade intracelular. Em humanos, cada meiose necessita que a célula inicial não perca de vista 92 cromátides (46 cromossomos, cada um duplicado), distribuindo um conjunto completo de cada tipo de cromossomo para cada uma das quatro células haploides descendentes. Não causa surpresa que podem ocorrer erros na distribuição dos cromossomos durante este processo complicado. Erros são especialmente comuns na meiose de fêmeas humanas, a qual é interrompida após o diplóteno durante anos: a meiose I só é completada no momento da *ovulação*, e a meiose II somente após o oócito ser fecundado. Na verdade, tais erros na segregação de cromossomos durante o desenvolvimento do oócito são as causas mais comuns tanto de aborto espontâneo quanto de retardo mental em humanos.

Quando os homólogos falham em se separar adequadamente – um fenômeno chamado de **não-disjunção** – o resultado é que alguns dos gametas haploides produzidos carecem de um cromossomo em particular, enquanto outros têm mais de uma cópia dele. (Células com um número anormal de cromossomos são chamadas de *aneuploides*, enquanto aquelas com o número correto são ditas *euploides*.) Na fecundação, gametas aneuploides formam embriões anormais, a maioria dos quais morre. No entanto, alguns sobrevivem. Por exemplo, em

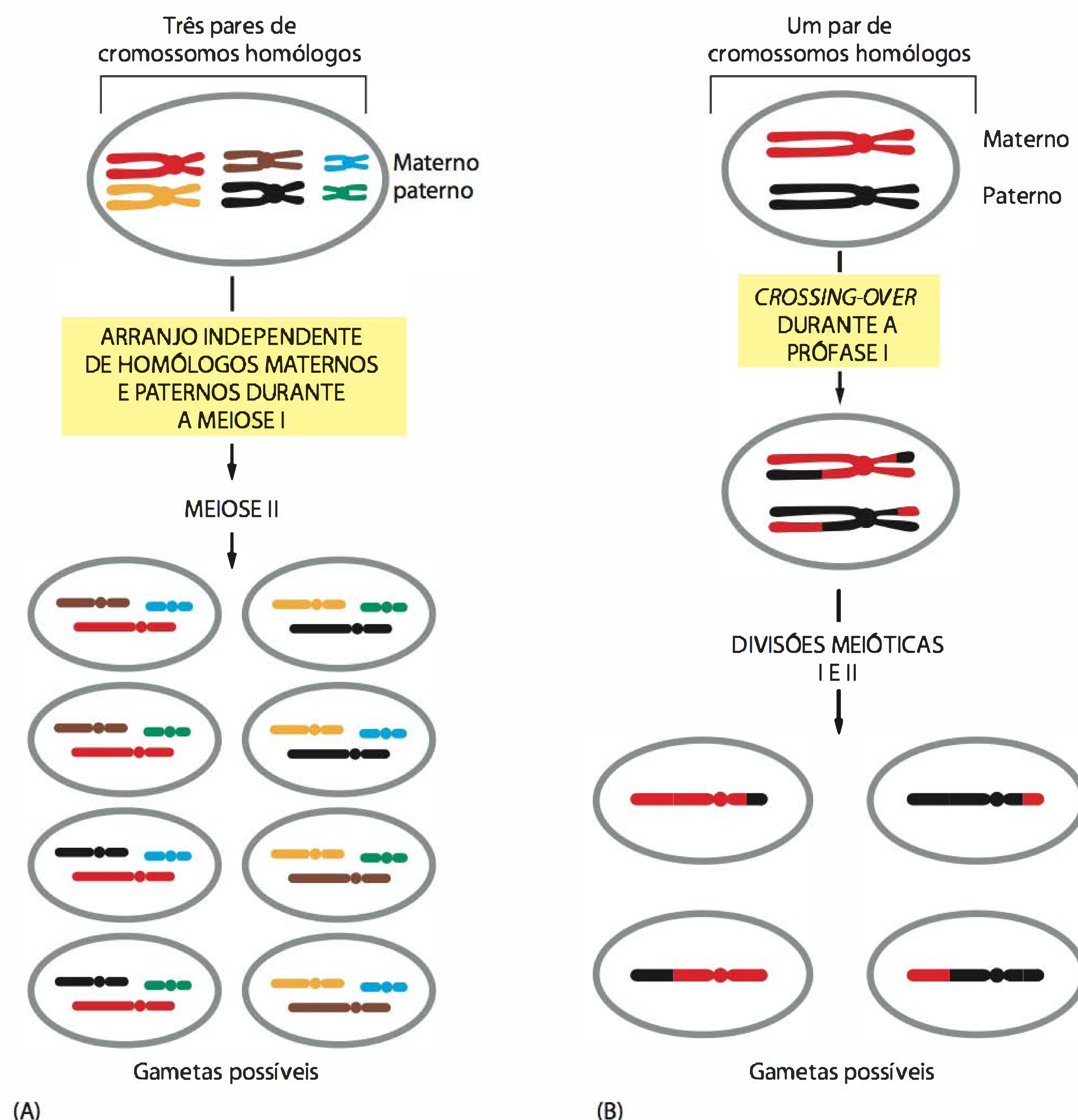


Figura 21-13 As duas principais contribuições para o rearranjo do material genético que ocorre na produção de gametas durante a meiose. (A) O arranjo independente dos homólogos materno e paterno durante a meiose produz 2^n gametas haploides diferentes para um organismo com n cromossomos. Aqui, $n = 3$, e há oito gametas diferentes possíveis. (B) O *crossing-over* durante a prófase I troca segmentos de DNA entre cromossomos homólogos e, dessa forma, rearranja genes em cromossomos particulares. Devido às muitas pequenas diferenças na sequência de DNA que sempre existem entre dois homólogos quaisquer, ambos os mecanismos aumentam a variabilidade genética dos organismos que se reproduzem sexualmente.

humanos, a *síndrome de Down*, que é a principal causa única de retardo mental, é causada por uma cópia extra do cromossomo 21, normalmente resultante da não-disjunção durante a meiose I no ovário da fêmea. Erros de segregação durante a meiose I aumentam muito à medida que a idade materna avança.

Apesar de sua falibilidade, quase todos os eucariotos usam a meiose, ao menos de forma intermitente, para embaralhar sua informação genética antes de passá-la para a próxima geração. O *crossing-over* faz a principal contribuição para este processo de mistura genética, como discutiremos agora.

O *crossing-over* reforça o rearranjo genético

A menos que sejam gêmeos idênticos, que se desenvolvem a partir de um único zigoto, dois filhos dos mesmos pais jamais são geneticamente iguais. Como discutimos anteriormente, isto ocorre porque, muito antes dos dois gametas fundirem-se durante a fecundação, dois tipos de rearranjo genético aleatório ocorreram na meiose I, durante a produção dos gametas: a distribuição ao acaso de homólogos maternos e paternos e o *crossing-over*. A distribuição aleatória dos homólogos maternos e paternos (**Figura 21-13**A), em princípio, poderia produzir 2^n gametas geneticamente diferentes, onde n é o número haploide de cromossomos. Por exemplo, em humanos, cada indivíduo pode produzir ao menos $2^{23} = 8{,}4 \times 10^6$ gametas geneticamente diferentes. Porém, o número real de variantes é muito maior que este por causa do ***crossing-over* cromossômico** (ou simplesmente ***crossing-over***), que é uma consequência da recombinação dos homólogos (discutida no Capítulo 5), na qual são trocados segmentos de DNA de cromossomos homólogos. Na meiose, quando a troca ocorre entre cromátides não-irmãs, ele mistura a constituição genética de cada um dos cromossomos (Figura 21-13B). Em média, entre dois e três *crossing-overs* (entrecruzamentos) ocorrem entre cada par de homólogos humanos (**Figura 21-14**).

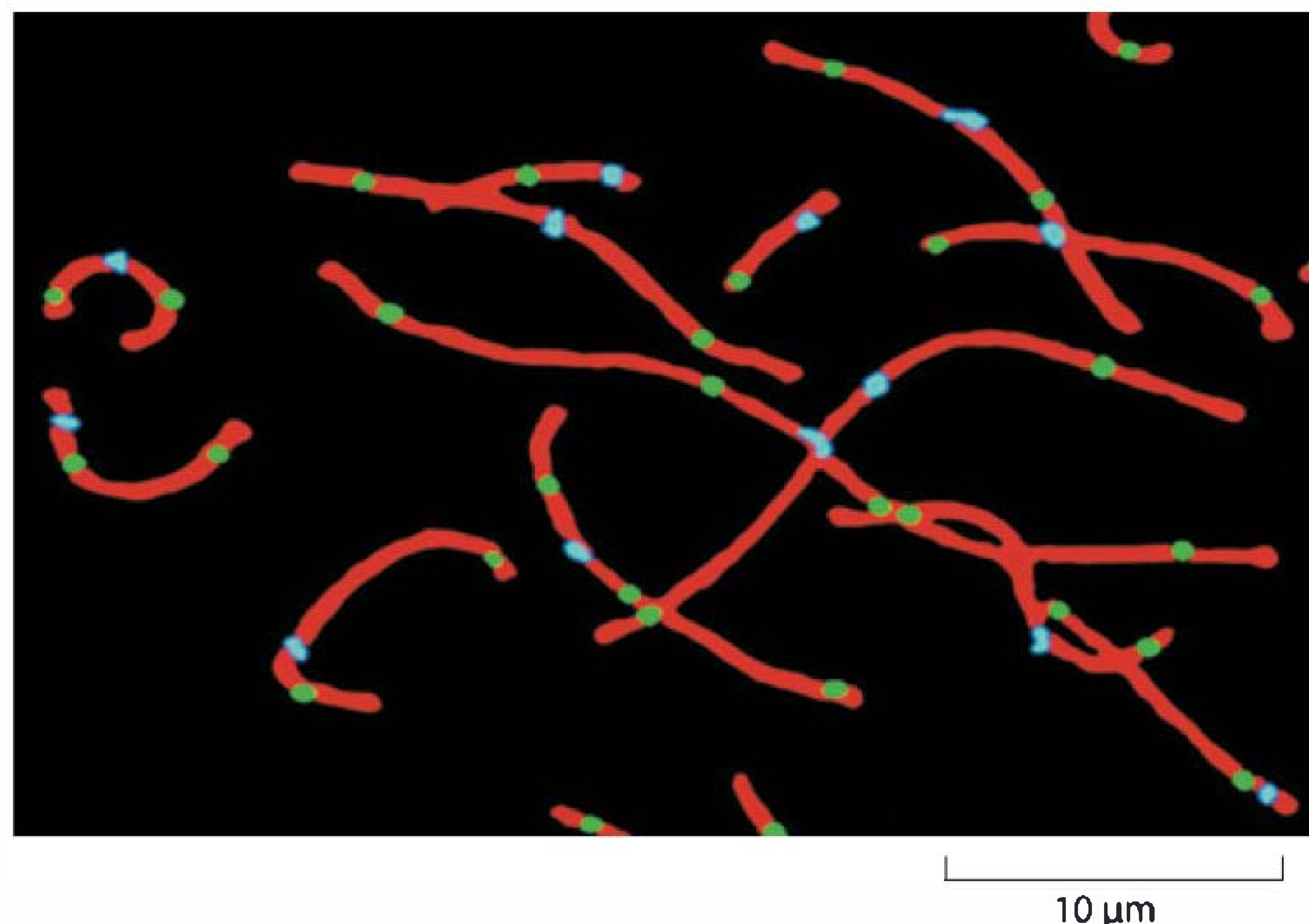


Figura 21-14 Entrecruzamentos entre homólogos no testículo humano. Nesta fotomicrografia de imunofluorescência, anticorpos foram usados para corar os complexos sinaptotênicos (*vermelho*), os centrômeros (*azul*) e os locais de *crossing-over* (*verde*). Observe que todos os bivalentes têm ao menos um entrecruzamento e nenhum tem mais que 3. (Modificada de A. Lynn et al., *Science* 296:2222-2225, 2002. Com permissão de AAAS.)

Os detalhes moleculares do *crossing-over* são discutidos no Capítulo 5 (ver Figura 5-64). Brevemente, uma proteína conservada específica da meiose chamada de *Spo 11* inicia o *crossing-over* por criar uma quebra na fita dupla do DNA tanto da cromátide materna quanto da paterna. Um *complexo de recombinação* multienzimático muito grande, contendo enzimas de reparo da fita dupla de DNA, reúne-se sobre a quebra e catalisa a recombinação homóloga. Na maioria dos casos, estes eventos não resultam em um entrecruzamento. Entretanto, em alguns casos, a recombinação homóloga leva a um *entrecruzamento*, onde segmentos de DNA são trocados entre cromátides não-irmãs de um modo recíproco. Como discutido anteriormente, após a desinapse, cada entrecruzamento pode ser visto ao microscópio como um quiasma (ver Figura 21-10A). Como ilustrado na Figura 21-10B, cada uma das duas cromátides-irmãs de um homólogo pode formar um ou mais entrecruzamentos com qualquer das duas cromátides-irmãs de seu par homólogo.

O *crossing-over* é altamente regulado

O *crossing-over* tem duas funções distintas na meiose: ele ajuda a manter os homólogos juntos até que sejam segregados adequadamente para as duas células-filhas produzidas pela meiose I e contribui para a diversidade genética dos gametas que finalmente são produzidos. No entanto, como poderia ser esperado, o *crossing-over* é altamente regulado: o número e a localização das quebras na fita dupla ao longo de cada cromossomo são controlados, assim como a probabilidade que uma quebra seja convertida em um entrecruzamento. Embora as quebras na fita dupla que ocorrem na meiose I possam estar situadas quase em qualquer lugar ao longo do cromossomo (ver Figura 21-14), elas não estão distribuídas de forma uniforme: elas se agrupam com frequência em locais onde a cromatina é mais acessível (em *hot spots*), e ocorrem apenas raramente em *cold spots*, locais como as regiões de heterocromatina em torno dos centrômeros e telômeros.

Pelo menos dois tipos de regulação influenciam a localização e o número de entrecruzamentos que se formam, nenhum deles sendo bem compreendido. Ambos funcionam antes do complexo sinaptotênico se organizar. Um assegura que pelo menos um entrecruzamento se forme entre os membros de cada par homólogo, como é necessário para a segregação normal dos homólogos em meiose I. No outro, chamado de *interferência de entrecruzamento*, a presença de um evento de entrecruzamento inibe a formação de outro próximo a ele, talvez pela depleção local das proteínas necessárias para converter uma quebra na fita dupla de DNA em um entrecruzamento estável.

Nos mamíferos, a meiose é regulada de forma diferente em machos e fêmeas

Os mecanismos básicos da meiose têm sido conservados durante a evolução em todos os eucariotos de reprodução sexuada. Por exemplo, em todos estes organismos a maior parte da meiose é gasta na prófase I, embora os detalhes da sincronização de estágios diferentes variem entre os organismos (**Figura 21-15**). No entanto, há algumas diferenças extraordinárias na regulação da meiose em espécies diferentes e em sexos diferentes na mesma espécie. A diferença entre os dois sexos é muito surpreendente em mamíferos.

Em fêmeas mamíferas, os *oócitos primários* iniciam a meiose no ovário fetal, mas a interrompem após o diplóteno, depois que o complexo sinaptotênico se desfaz na meiose I. Eles completam a meiose I somente após a fêmea tornar-se sexualmente madura, e o oócito é liberado do ovário durante a *ovulação*; além disso, o oócito liberado completa a meiose II somente se é fecundado. Dessa forma, há mecanismos especiais de parada e início durante a meiose em fêmeas mamíferas. Em humanos, alguns oócitos permanecem detidos em meiose I por 40 anos ou mais, o que, presumivelmente, é ao menos parte da razão do aumento dramático da não-disjunção em mulheres mais velhas. Ao contrário, em machos mamíferos, a meiose inicia nas células precursoras de espermatozoides (*espermatócitos primários*) no testículo somente na puberdade e, então, prossegue continuamente, sem os mecanismos de parada e início que funcionam durante a meiose na fêmea. Leva cerca de 24 dias para um espermatócito humano completar a meiose.

Também há uma grande diferença nas taxas de erro de meiose em fêmeas e machos mamíferos, e isto é especialmente impressionante em humanos. Em torno de 20% dos oócitos humanos são aneuploides, comparados a 3 a 4% de espermatozoides humanos, e, em grande parte como resultado disso, acima de 25% de todos os fetos humanos são aneuploides, e a maior parte deles por não-disjunção em oócitos na meiose I. A fecundação em mamíferos tipicamente envolve a ovulação de um número pequeno de oócitos em uma extremidade do trato reprodutor feminino e a entrada de milhões de espermatozoides na outra. Dada a escassez relativa de oócitos, se poderia esperar que o desenvolvimento do oócito estivesse submetido a um controle de qualidade mais rigoroso que o desenvolvimento do espermatozoide, mas o caso é o contrário. Se a meiose funciona mal em células do macho, um mecanismo de ponto de verificação do ciclo celular (discutido no Capítulo 17) é ativado, o que interrompe a meiose e leva à morte celular por apoptose. Tais mecanismos de ponto de verificação aparentemente não funcionam nas células meióticas femininas; se a segregação de homólogos deixa de ocorrer normalmente, as células continuam através da meiose e produzem oócitos aneuploides. A linhagem germinativa masculina, por outro lado, é considerada como sendo a principal fonte de outro tipo de erro genético. Como muito mais divisões celulares mitóticas ocorrem na via para a produção de um espermatozoide, e cada ciclo de replicação de DNA é propenso a erro, a contribuição dos pais para o número médio de novas mutações é maior que a contribuição das mães.

A produção de gametas envolve mais do que apenas a meiose, e os outros processos também diferem para oócitos e espermatozoides. Como veremos, ao final da meiose, um oócito mamífero está completamente maduro, enquanto um espermatozoide que tenha completado a meiose terá apenas começado sua diferenciação. No entanto, antes de discutirmos estes gametas, levaremos em consideração primeiro como certas células no embrião mamífero inicialmente tornam-se definidas para se desenvolverem em células germinativas e, então, como estas células tornam-se comprometidas para transformarem-se em espermatozoides ou oócitos, dependendo do sexo do indivíduo.

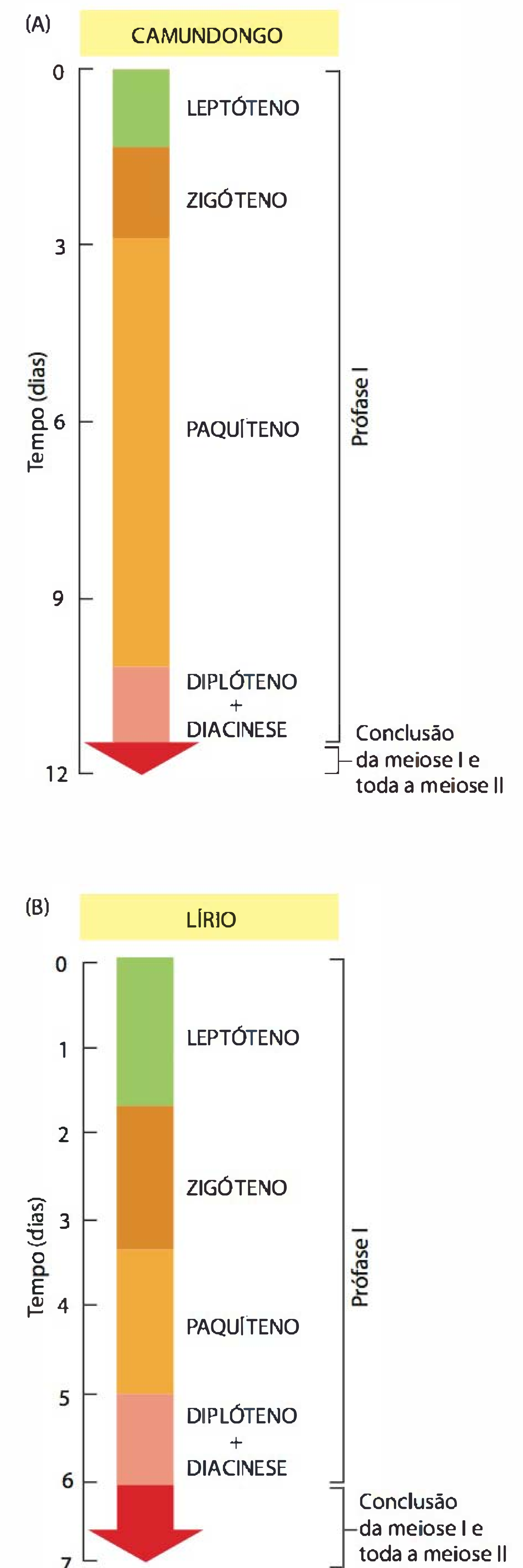


Figura 21-15 Comparação dos tempos necessários para cada um dos estágios da meiose. (A) Tempos aproximados para um macho mamífero (camundongo). (B) Tempos aproximados para o tecido masculino de uma planta (lírio). Os tempos diferem para gametas masculinos e femininos (espermatozoides e oócitos, respectivamente) da mesma espécie, assim como para os mesmos gametas de espécies diferentes. Por exemplo, a meiose em um macho humano continua por 24 dias, comparada com 12 dias no camundongo. Na fêmea humana, ela pode durar 40 anos ou mais, porque a meiose I é interrompida após o diplóteno. No entanto, em todas as espécies, a prófase I é sempre muito mais longa que todos os outros estágios meióticos juntos.

Resumo

Gametas haploides (oócitos, espermatozoides, pólen e esporos) são produzidos por meiose, na qual duas divisões celulares sucessivas seguem um ciclo de replicação de DNA para dar origem a quatro células haploides a partir de uma única célula diploide. A meiose é dominada por uma prófase I prolongada, que pode ocupar 90% ou mais do período meiótico total. No início da prófase I, os cromossomos estão replicados e consistem em duas cromátides-irmãs fortemente unidas. Então, os cromossomos homólogos (homólogos) pareiam lado-a-lado e tornam-se progressivamente mais intimamente justapostos à medida que a prófase I prossegue. Os homólogos fortemente alinhados (bivalentes) sofrem recombinação genética, formando entrecruzamentos que podem ser vistos, mais tarde, como quiasmata, os quais ajudam a manter cada par de homólogos unido durante a metáfase I. Tanto o crossing-over *quanto a segregação independente das cópias materna e paterna de cada cromossomo durante a meiose I têm papéis importantes na formação dos gametas geneticamente diferentes uns dos outros e de ambos os pais. Proteínas associadas ao cinetocoro específicas da meiose auxiliam a garantir que ambas as cromátides-irmãs em um homólogo prendam-se ao mesmo polo do fuso; outras proteínas associadas ao cinetocoro asseguram que os homólogos permaneçam conectados em seus centrômeros durante a anáfase I, de maneira que os homólogos, ao invés das cromátides-irmãs, sejam segregados na meiose I. Depois da longa meiose I, a meiose II segue rapidamente, sem replicação de DNA, em um processo que lembra a mitose, no qual cromátides-irmãs são separadas na anáfase.*

CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS E DETERMINAÇÃO DO SEXO EM MAMÍFEROS

As estratégias reprodutivas sexuais variam muito entre organismos diferentes. No restante deste capítulo, abordaremos principalmente as estratégias utilizadas pelos mamíferos.

Em todos os embriões de vertebrados, certas células são escolhidas no início do desenvolvimento como progenitoras dos gametas. Estas **células germinativas primordiais** (**PGCs**, *primordial germ cells*) diploides migram para as gônadas em desenvolvimento, as quais formarão os *ovários* nas fêmeas e os *testículos* nos machos. Após um período de proliferação mitótica nas gônadas em desenvolvimento, as PGCs sofrem meiose e se diferenciam em gametas maduros haploides – ou oócitos ou espermatozoides. Mais tarde, depois do acasalamento, a fusão do oócito com o espermatozoide inicia a embriogênese. A subsequente produção de novas PGCs nesse novo embrião começa o ciclo novamente (ver Figura 21-3A).

Nesta seção, levaremos em consideração como surgem as PGCs de mamíferos, como o sexo de um mamífero é determinado e como a determinação do sexo define se as PGCs se desenvolvem em espermatozoides ou em oócitos.

Sinais de células vizinhas especificam PGCs em embriões mamíferos

Em muitos animais, incluindo muitos vertebrados, o oócito não-fecundado contém moléculas específicas localizadas em uma região particular do citoplasma que determina quais células se tornarão células germinativas. Quando o oócito é fecundado e passa por divisões repetidas para produzir as células do embrião precoce, as células que herdam estas moléculas *determinantes de células germinativas* tornam-se PGCs (**Figura 21-16**). Embora a natureza molecular e as funções dos determinantes sejam amplamente desconhecidas, proteínas da família *Vasa* são um componente necessário em todos estes animais. Proteínas vasa são estruturalmente semelhantes a RNA-helicases dependentes de ATP, mas sua função precisa na determinação de células germinativas permanece um mistério.

Ao contrário, em outros animais, incluindo os mamíferos, o citoplasma do oócito não contém determinantes localizados para células germinativas. Em vez disso, sinais de células vizinhas ditam quais células tornam-se PGCs. Em mamíferos, todas as células produzidas pelas primeiras divisões do zigoto são *totipotentes* – isto é, elas têm o potencial para dar origem a qualquer dos tipos celulares do animal, incluindo as células germinativas e a células de tecidos extraembrionários como a placenta. Somente mais tarde um grupo pequeno de células é induzido a tomar-se PGCs por sinais produzidos por células vizinhas. No camundongo, por exemplo, em tomo de 6 dias após a fecundação, sinais (incluindo BMP4, proteína morfogênica dos ossos 4, de *bone morphogenic protein 4*) secretados por células no tecido que reveste a parte externa do próprio embrião induzem cerca de 10 células no tecido de revestimento embrionário adjacente a tornarem-se precursoras de PGC. Essas células dividem-se e maturam para tornar-se PGCs, impedindo a expressão de alguns genes de células somáticas e ativando a expressão de genes envolvidos na manutenção da característica especial de células germinativas.

Embora mecanismos diferentes especifiquem PGCs em animais diferentes, alguns dos mecanismos que controlam sua proliferação e desenvolvimento têm sido conservados na

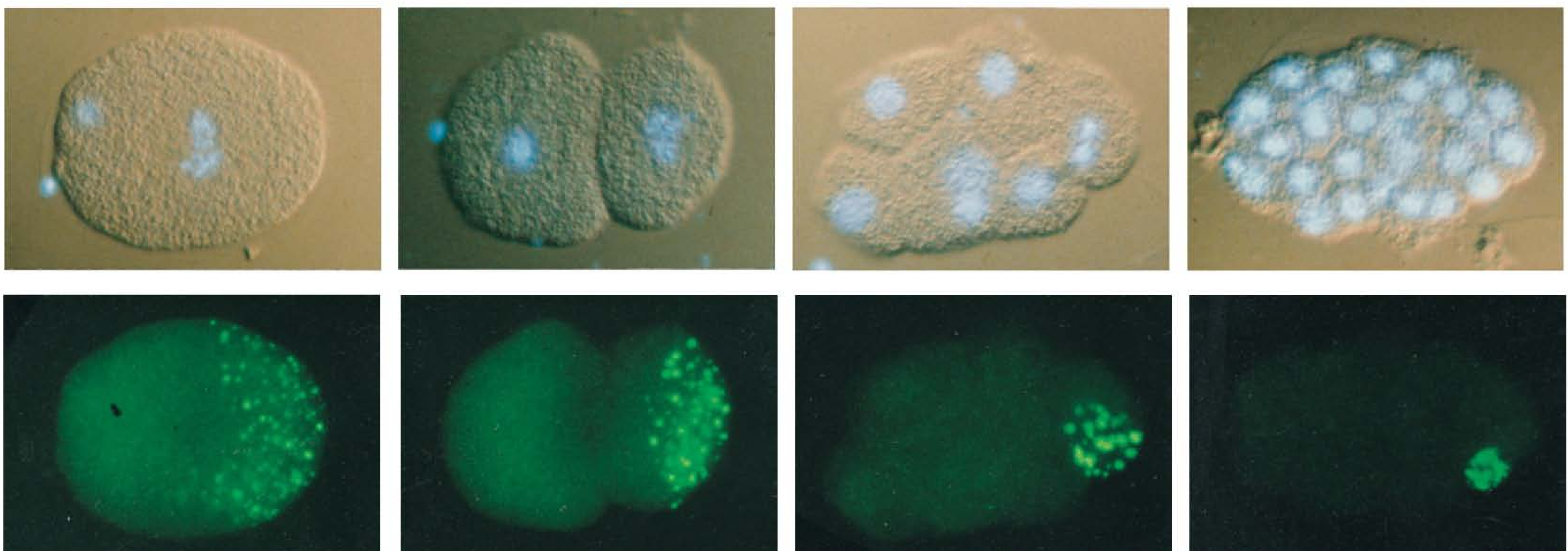


Figura 21-16 Segregação de determinantes de células germinativas no nematódeo *C. elegans*. As fotomicrografias na linha superior mostram o padrão de divisões celulares, com os núcleos celulares corados de *azul*; embaixo, as mesmas células estão coradas com um anticorpo que marca (em *verde*) grânulos pequenos (chamados de *grânulos P*) que funcionam como determinantes de células germinativas. Os grânulos P são compostos por moléculas de RNA e proteína, estando distribuídos aleatoriamente por todo o citoplasma do oócito não-fecundado (não-mostrado aqui). Como mostrado nos painéis mais à esquerda, após a fecundação, os grânulos se acumulam em um dos polos do zigoto. Então, os grânulos são segregados em uma das duas células-filhas a cada divisão celular. A única célula contendo os grânulos P no embrião mostrado nos painéis mais à direita é a precursora da linhagem germinativa. (Cortesia de Susan Strome).

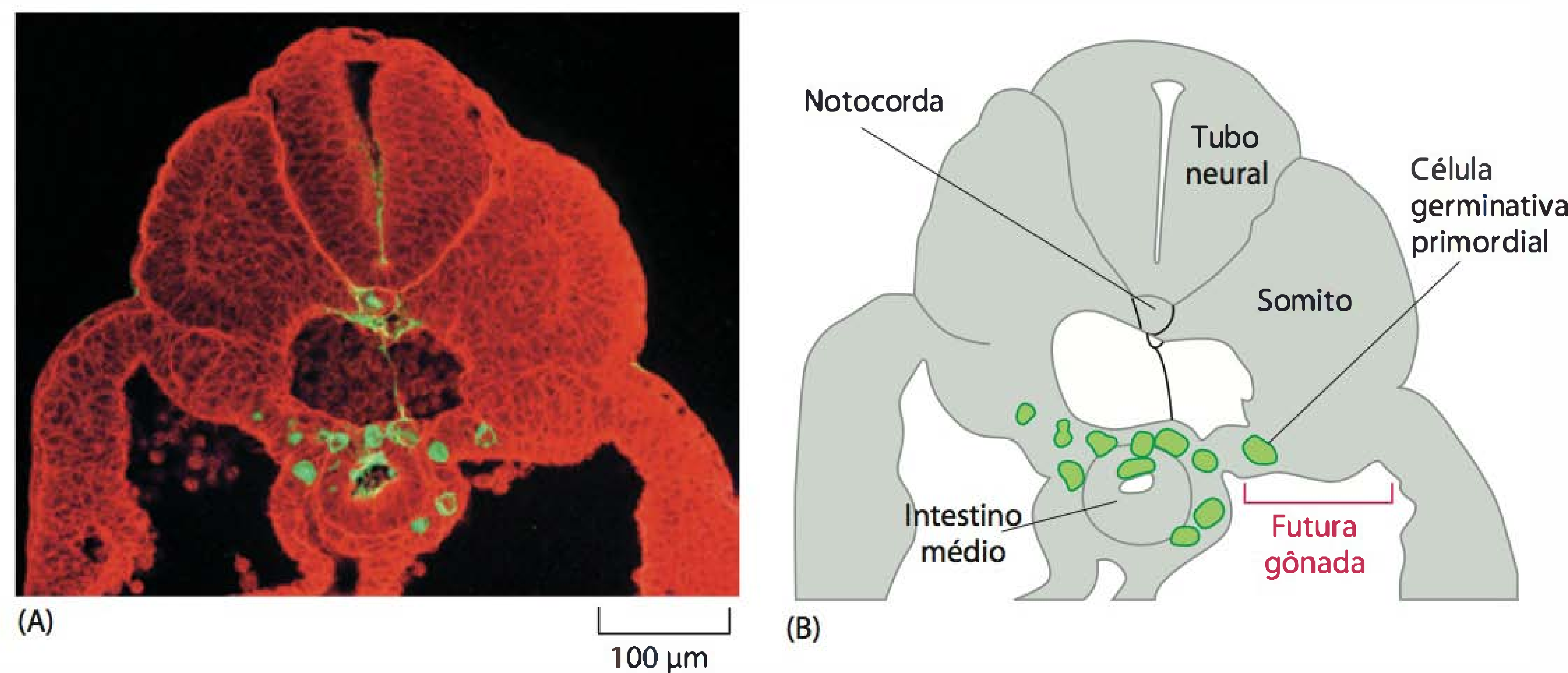


Figura 21-17 Migração de PGCs de mamíferos. (A) Fotomicrografia de fluorescência mostrando PGCs migrando em um corte transversal de um embrião precoce de camundongo. As PGCs estão coradas com um anticorpo monoclonal (em *verde*) que marca especificamente estas células neste estágio da embriogênese. As células restantes no embrião estão coradas com uma lecitina (em *vermelho*) que se liga ao ácido siálico, que é encontrado na superfície de todas as células. (B) Esquema que corresponde à fotomicrografia mostrada em (A). (A, cortesia de Robert Anderson e Chris Wylie.)

evolução desde vermes até humanos. Por exemplo, o desenvolvimento de PGCs em todos animais que têm sido estudados conta com a supressão dos destinos de células somáticas por repressão de genes, bem como a inibição de tradução de mRNAs específicos por proteínas de ligação ao RNA *Nanos*.

As PGCs migram para a gônada em desenvolvimento

Depois que as PGCs mamíferas se desenvolvem, elas proliferam e migram para seu destino final nas gônadas em desenvolvimento (**Figura 21-17**). Enquanto elas migram através do embrião, várias proteínas-sinal extracelulares produzidas por células somáticas adjacentes atuam na sinalização para elas sobreviverem, proliferarem e migrarem. Entre as proteínas--sinal secretadas que ajudam a atrair as PGCs para a gônada em desenvolvimento estão as *quimiocinas*, as quais se ligam a receptores associados à proteína G (GPCRs, *G-protein-coupled receptors*) e orientam a migração de vários tipos celulares, incluindo as PGCs e as células brancas do sangue, os leucócitos (discutido no Capítulo 23).

Após as PGCs entrarem na gônada em desenvolvimento, que neste estágio é chamada de *crista genital* (ou *saliência genital*), elas passam por mais várias divisões celulares mitóticas, na direção de tornarem-se especializadas a seguir uma via que as levará a desenvolverem-se como oócitos ou espermatozoides.

Entretanto, logo que as PGCs migram para o interior da gônada embrionária, elas não estão irreversivelmente comprometidas a tornarem-se gametas. Quando removidas do embrião e cultivadas na presença de proteínas-sinal extracelulares adequadas, elas se convertem em células que podem ser mantidas indefinidamente em cultivo como uma linhagem celular que pode produzir qualquer dos tipos celulares do organismo do animal, embora não as células extra-embrionárias que formarão estruturas como a placenta; por essa razão, elas são ditas *pluripotentes*, ao invés de totipotentes. A respeito disso, estas assim chamadas *células germinativas embrionárias* (*EG*, *embrionyc germ cells*) lembram as *células-tronco embrionárias* (*ES*, *embrionyc stem cells*) (discutido no Capítulo 23). Células EG e ES são fontes promissoras de vários tipos celulares humanos – tanto para testes de fármacos quanto para o tratamento de doenças, como ataques cardíacos, derrames e várias doenças neurodegenerativas, nas quais tipos celulares específicos morrem.

O que determina se as PGCs que migram para dentro da gônada mamífera se desenvolverão em oócitos ou espermatozoides? Surpreendentemente, o que determina não é a constituição de seu próprio cromossomo sexual, mas sim se a crista genital começou a se desenvolver em um ovário ou em um testículo, respectivamente. Os cromossomos sexuais nas células somáticas da crista genital determinam que tipo de gônada a crista se tornará. Apesar de muitos genes influenciarem no resultado, um único gene no cromossomo Y tem um papel especialmente importante.

O gene *Sry* direciona a gônada mamífera em desenvolvimento a tornar-se um testículo

Aristóteles acreditava que a temperatura do macho durante o ato sexual determinava o sexo dos descendentes: quanto mais alta a temperatura, maior a chance de produzir um macho. Estivesse ele referindo-se a lagartos ou crocodilos ao invés de humanos, ele estaria muito próximo da verdade, visto que em muitos répteis ovíparos a temperatura de incubação dos

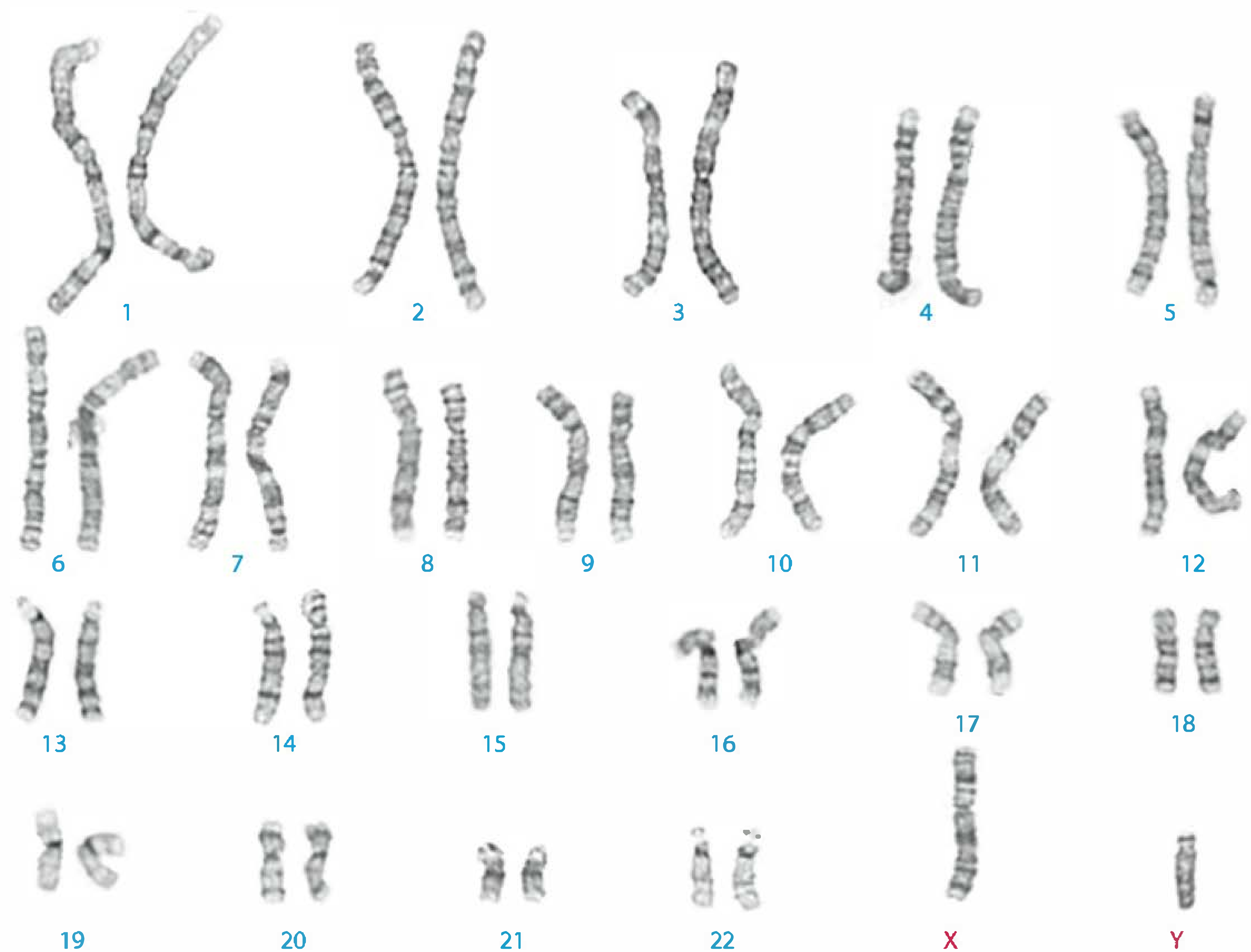


Figura 21-18 Cromossomos de um macho humano normal. Os cromossomos foram marcados com o corante de Giemsa. Ver também Figuras 4-10 e 4-11. Observe a diferença de tamanho dos dois cromossomos sexuais. Enquanto o cromossomo X tem mais de 1.000 genes, o cromossomo Y contém apenas cerca de 80. (Cortesia de Julie Robertson do Wisconsin State Laboratory of Hygiene.)

ovos determina o sexo dos descendentes; em lagartos e crocodilos, os machos desenvolvem-se em temperaturas quentes e as fêmeas em temperaturas frias. No entanto, sabemos agora que os cromossomos sexuais, ao invés da temperatura dos pais ou do embrião, determinam o sexo de um mamífero.

As fêmeas dos mamíferos têm dois cromossomos X em todas as suas células somáticas, enquanto que os machos têm um X e um Y. A presença ou a ausência do cromossomo Y, que é o menor cromossomo humano (**Figura 21-18**), determina o sexo do indivíduo. Os indivíduos com um cromossomo Y se desenvolvem como machos, não importando quantos cromossomos X eles tenham, enquanto indivíduos sem um cromossomo Y se desenvolvem como fêmeas, mesmo que tenham apenas um cromossomo X. O espermatozoide que fecunda o oócito determina o sexo do zigoto resultante: o oócito têm um único cromossomo X, enquanto o espermatozoide pode ter um X ou um Y.

O cromossomo Y influencia o sexo do indivíduo por guiar as células somáticas da crista genital a se desenvolverem como um testículo em vez de um ovário. Embriões mamíferos estão programados para desenvolverem-se como fêmeas a não ser que sejam impedidos de fazê-lo pelo testículo, que conduz o embrião a se desenvolver como um macho. Se as cristas genitais são removidas antes de terem começado a se desenvolver em um testículo ou um ovário, um mamífero desenvolve-se como uma fêmea, independentemente do cromossomo sexual que ele transporte. Isso não significa que sinais não sejam necessários para o desenvolvimento de órgãos específicos da fêmea em mamíferos: por exemplo, a secreção da proteína-sinal Wnt4 é necessária ao desenvolvimento normal do ovário mamífero.

O gene decisivo no cromossomo Y que conduz a crista genital a desenvolver-se em testículo ao invés de ovário é chamado de ***Sry***, por ser a "região do Y que determina o sexo" (*sex-determining region of Y*). Surpreendentemente, quando este gene é introduzido no genoma de um zigoto de camundongo XX, o embrião transgênico produzido desenvolve-se como um macho, mesmo que lhe faltem todos os outros genes do cromossomo Y. Entretanto, tais camundongos *de sexo-revertido* não podem produzir espermatozoides, por lhes faltar os outros genes no cromossomo Y que são necessários para o desenvolvimento destes gametas. De forma semelhante, humanos XY com uma mutação que inativa o *Sry* se desenvolvem como fêmeas, mesmo que sejam geneticamente machos.

O *Sry* é expresso em uma subpopulação de células somáticas da gônada em desenvolvimento, e isto faz com que estas células se diferenciem em **células de Sertoli**, o principal tipo de células de sustentação no testículo (ver Figura 21-29). As células de Sertoli dirigem o desenvolvimento sexual ao longo de uma via de diferenciação masculina por influenciar outras células na crista genital e em outras partes do embrião, pelo menos de quatro maneiras:

1. Elas estimulam as PGCs recém-chegadas a se desenvolverem ao longo de uma via que produz espermatozoides. Elas fazem isso impedindo que as células entrem em meiose e se desenvolvam ao longo da via que produz oócitos, como discutiremos mais tarde.
2. Elas secretam o *hormônio antimulleriano*, que entra na circulação do sangue e suprime o desenvolvimento do trato reprodutor feminino por causar a regressão do ducto de Muller (caso contrário, estes ductos dariam origem ao oviduto, ao útero e à parte superior da vagina).
3. Elas estimulam células endoteliais e musculares lisas no tecido mesenquimal adjacente a migrar para o interior da gônada em desenvolvimento. Estas células formam elementos fundamentais dentro do testículo que são necessários para a produção normal de espermatozoides, a qual inicia quando o organismo atinge a maturidade sexual.
4. Elas ajudam a induzir outras células somáticas na gônada em desenvolvimento a se tornarem *células de Leydig*, que secretam o hormônio sexual masculino *testosterona* na corrente sanguínea. A secreção de testosterona é responsável por induzir todas as características sexuais secundárias masculinas, incluindo as estruturas do trato reprodutor masculino, como a próstata e as vesículas seminais, que se desenvolvem a partir de outro ducto, chamado de sistema de ductos de Wolff. Este sistema de ductos degenera-se na fêmea em desenvolvimento, pois necessita de testosterona para sobreviver e se desenvolver. A secreção de testosterona também ajuda a masculinizar o cérebro precoce em desenvolvimento, influenciando a identidade e a orientação sexual masculina e, por isso, o comportamento sexual: por exemplo, ratas que são tratadas com testosterona logo após o nascimento mostram mais tarde um comportamento sexual semelhante ao dos machos.

O gene *Sry* codifica uma proteína reguladora de gene (Sry) que liga-se ao DNA e influencia a transcrição de outros genes envolvidos no desenvolvimento da célula de Sertoli. Um gene fundamental nesta cascata codifica outra proteína reguladora de gene relacionada à Sry, que é chamada de Sox9. O gene *Sox9* não está no cromossomo Y, mas é expresso em machos em todos os vertebrados, ao contrário do *Sry*, que é encontrado apenas em mamíferos. Se o *Sox9* é expresso de forma ectópica nas gônadas em desenvolvimento de um embrião de camundongo XX, o embrião desenvolve-se como um macho, mesmo que lhe falte o gene *Sry*, sugerindo que a proteína Sry normalmente atue pela indução da expressão do gene *Sox9*. A proteína Sox9 ativa diretamente a transcrição de pelo menos alguns genes específicos de células de Sertoli, incluindo o gene que codifica o hormônio antimulleriano.

Na ausência ou de *Sry* ou de *Sox9*, a crista genital de um embrião XY se desenvolve como um ovário ao invés de um testículo. As células de sustentação tornam-se *células foliculares* em vez de células de Sertoli. Outras células somáticas tornam-se *células da teca folicular* (em vez de células de Leydig), o que, iniciando a puberdade, contribui para a produção do hormônio sexual feminino *estrogênio*. As PGCs se desenvolvem ao longo da via que produz oócitos, ao invés de espermatozoides (**Figura 21-19**), e o animal se desenvolve como uma fêmea.

Como as células de Sertoli induzem as PGCs que migram para o interior da gônada em desenvolvimento em machos a seguirem a via que leva à produção de espermatozoide ao invés da que leva à produção de oócito? O mecanismo depende da pequena molécula– sinal *ácido retinoico* (ver Figura 15-13), que, em ambos os sexos, é produzida por células em uma estrutura tubular transitória chamada de mesonefros, que se encontra adjacente à gônada em desenvolvimento. No ovário embrionário, o ácido retinoico induz as células da linhagem germinativa em proliferação a entrarem em meiose e darem início à via que leva à produção de oócitos; as células ficam detidas após diplóteno da prófase I, fase em que elas permanecem até a ovulação, que inicia quando a fêmea atinge a maturidade sexual. No testículo embrionário, ao contrário, células de Sertoli produzem uma enzima que degrada o ácido retinoico, impedindo que o ácido retinoico do mesonefros induza as células da linhagem germinativa a entrar em meiose e iniciar o desenvolvimento de oócitos. Apenas muito mais tarde, quando o macho torna-se sexualmente maduro, as células da linhagem germinativa no testículo começam a produzir espermatozoides.

Muitos aspectos da reprodução sexuada variam bastante entre espécies animais

Embora a meiose seja altamente conservada em todos os eucariotos que se reproduzem sexualmente, outros aspectos da reprodução sexuada são extremamente variáveis. Temos

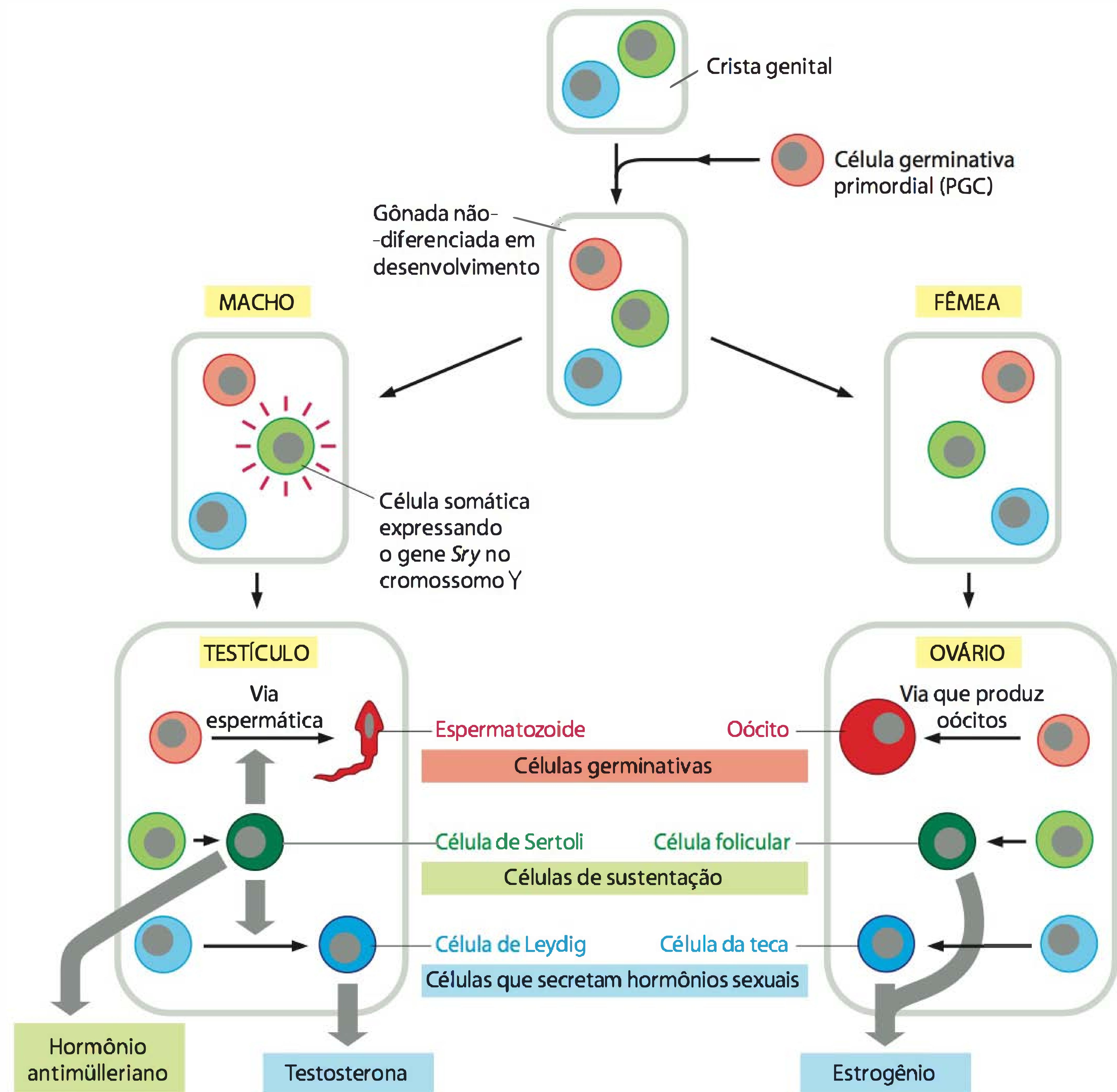


Figura 21-19 Influência do *Sry* sobre a gônada em desenvolvimento. As células da linhagem germinativa estão sombreadas em *vermelho*, e as células somáticas estão sombreadas em *verde* ou *azul*. A mudança da cor clara para a escura indica que a célula tornou-se diferenciada. O gene *Sry* atua em uma subpopulação de células somáticas na gônada em desenvolvimento para direcioná-las a se diferenciar em células de Sertoli, ao invés de células foliculares. As células de Sertoli, então, impedem que as células da linhagem germinativa se desenvolvam ao longo da via ocitária e ajudam a guiá-las para a via de desenvolvimento de espermatozoides. Elas também secretam o hormônio antimulleriano, que causa a regressão dos ductos de Muller, e ajudam a induzir outras células somáticas a se diferenciarem em células de Leydig, as quais secretam testosterona (ver Figura 21-29). Na ausência de *Sry*, as células da linhagem germinativa se comprometem com o desenvolvimento de oócitos, e as células somáticas se desenvolvem ou como células foliculares da granulosa, as quais sustentam o desenvolvimento do oócito, ou como células da teca folicular, que produzem progesterona; a progesterona é convertida em estrogênio pelas células foliculares da granulosa. Embora o testículo inicie a secreção de testosterona no feto, o ovário não começa a secretar estrogênio até a puberdade.

visto que o sexo de um animal pode depender ou de seus cromossomos ou do ambiente no qual ele se desenvolve. Contudo, mesmo os mecanismos genéticos da determinação do sexo variam muito. Por exemplo, em *C. elegans* e *Drosophila*, o sexo é determinado pela proporção de cromossomos X em relação aos autossômicos, em vez da presença ou ausência de um cromossomo Y, como nos mamíferos. Em *C. elegans*, a determinação do sexo depende principalmente dos controles da transcrição e da tradução sobre a expressão gênica, enquanto em *Drosophila* ela depende de uma cascata de eventos de regulação do processamento (*splicing*) de RNA, como foi discutido no Capítulo 7. Além disso, em *Drosophila,* o caráter de especificidade do sexo de cada célula no organismo é programado individualmente por seus próprios cromossomos, em vez de ser controlado principalmente por hormônios. Permanece um mistério o porquê de alguns aspectos da reprodução sexuada terem sido conservados durante a evolução, enquanto outros se tornaram fundamentalmente tão diferentes.

Resumo

Um número pequeno de células no embrião mamífero precoce recebe sinais de suas vizinhas para tornarem-se células da linhagem germinativa. As células germinativas primordiais (PGCs) resultantes proliferam e migram para o interior das gônadas em desenvolvimento. Aqui, as células da linhagem germinativa comprometem-se a se desenvolver em oócitos, se a gônada está se tornando um ovário, ou espermatozoides, se a gônada está se tornando um testículo. Uma gônada em desenvolvimento se diferenciará em um ovário a menos que suas células somáticas contenham um cromossomo Y, caso no qual ela se diferencia em um testículo. O gene Sry *no cromossomo Y mamífero é fundamental para o desenvolvimento do testículo: ele é expresso em uma subpopulação de células somáticas na gônada em desenvolvimento e as conduz para diferenciarem-se em células de Sertoli, as quais então produzem moléculas-sinal que promovem o desenvolvimento de características masculinas e reprimem o desenvolvimento de características femininas. Embriões mamíferos são programados para seguir uma via feminina de desenvolvimento a menos que sejam desviados pelas células de Sertoli para seguir a via masculina.*

OÓCITOS

Pelo menos em um aspecto, os oócitos são as células animais mais extraordinárias: uma vez ativados, eles podem dar origem a um novo indivíduo completo dentro de dias ou semanas. Nenhuma outra célula em um animal superior tem esta capacidade. A ativação geralmente é a consequência da *fecundação* – fusão de um espermatozoide com o oócito – mas oócitos também podem ser artificialmente ativados por vários tratamentos químicos ou físicos não-específicos. Na verdade, alguns organismos, incluindo uns poucos vertebrados, como alguns lagartos, normalmente reproduzem-se por meio de oócitos que se tornam ativados na ausência de espermatozoide – isto é, por **partenogênese**. Os mamíferos são os únicos animais que não podem ser produzidos partenogeneticamente; por causa do *imprinting genômico* (discutido no Capítulo 7), eles necessitam tanto de contribuições genéticas maternas quanto paternas.

Apesar de um oócito ser capaz de originar todos os tipos celulares no organismo adulto, ele próprio é uma célula altamente especializada, excepcionalmente equipada para a função única de gerar um novo indivíduo. O citoplasma de um oócito pode até mesmo reprogramar um núcleo de uma célula somática para que o núcleo possa dirigir o desenvolvimento de um novo indivíduo, ainda que os componentes responsáveis no oócito sejam na maioria desconhecidos. Dessa maneira é que a famosa ovelha Dolly foi produzida. O núcleo de um oócito de ovelha não-fecundado foi removido com uma pipeta de vidro e substituído pelo núcleo de uma célula somática adulta. Um impulso elétrico foi usado para ativar o oócito, e o embrião resultante foi implantado no útero de uma fêmea receptora. A ovelha adulta resultante tinha o genoma do núcleo da célula somática doadora e, portanto, era um *clone* da ovelha doadora.

A mesma abordagem, chamada de *clonagem reprodutiva*, tem sido usada para produzir clones de vários mamíferos, incluindo camundongos, ratos, gatos, cães, cabras, porcos, vacas e cavalos (ver Figura 21-38). Em todos os casos, a eficiência é baixa: a maior parte dos clones morre antes de nascer, e menos de 5% deles se desenvolvem até a fase adulta, provavelmente porque o núcleo somático transplantado não é reprogramado completamente e, portanto, expressa muitos genes de forma inadequada.

Nesta seção, consideraremos brevemente algumas das características especializadas de um oócito, antes de discutir como ele sofre seus preparativos finais para a fecundação.



Figura 21-20 O tamanho real de três oócitos. O oócito humano possui 0,1 mm de diâmetro.

Um oócito é altamente especializado para desenvolvimento independente

Os oócitos da maioria dos animais são células únicas gigantes. Eles contêm reservas de todos os materiais necessários ao desenvolvimento inicial do embrião até o estágio no qual o novo indivíduo possa começar a se alimentar. Antes desse estágio, essa célula gigante sofre clivagens em muitas células menores, mas sem ocorrer crescimento efetivo. O embrião mamífero é uma exceção. Ele pode começar a crescer precocemente pela captação de nutrientes da mãe por meio da placenta. Dessa forma, um oócito de mamífero, apesar de ainda ser uma célula grande, não é tão grande quanto um oócito de uma rã ou de uma ave, por exemplo. Caracteristicamente, os oócitos são esféricos ou ovoides, com um diâmetro de cerca de 0,1 mm em humanos e em ouriços-do-mar (cuja larvas são muito pequenas), de 1 a 2 mm em rãs e em peixes e de muitos centímetros em aves e em répteis (**Figura 21-20**). Em contraste, uma célula somática típica tem um diâmetro de apenas cerca de 10 a 30 μm (**Figura 21-21**).

Normalmente, o citoplasma do oócito contém reservas de nutrientes na forma de **gema**, a qual é rica em lipídeos, proteínas e polissacarídeos e que geralmente está contida dentro de estruturas delicadas, chamadas de *grânulos da gema*. Em algumas espécies, uma membrana envolve cada grânulo da gema. Nos oócitos que se desenvolvem como grandes animais fora do corpo da mãe, a gema pode ocupar mais de 95% do volume da célula. Nos mamíferos, cujos embriões são em grande parte nutridos por suas mães através da placenta, há pouca ou nenhuma gema.

O **revestimento do oócito** é outra peculiaridade dessas células. É uma forma especializada de matriz extracelular que consiste, em grande parte, em glicoproteínas – algumas secretadas pelo oócito e algumas pelas células que o circundam. Em muitas espécies, o revestimento principal é uma camada imediatamente em torno da membrana plasmática do oócito; em oócitos de animais não-mamíferos, como aqueles de ouriços-do-mar ou galinhas, ela é chamada de *camada vitelina*, enquanto que em oócitos de mamíferos é chamada de *zona pelúcida* (**Figura 21-22**). Essa camada protege o oócito de lesões mecânicas e, em muitos oócitos,

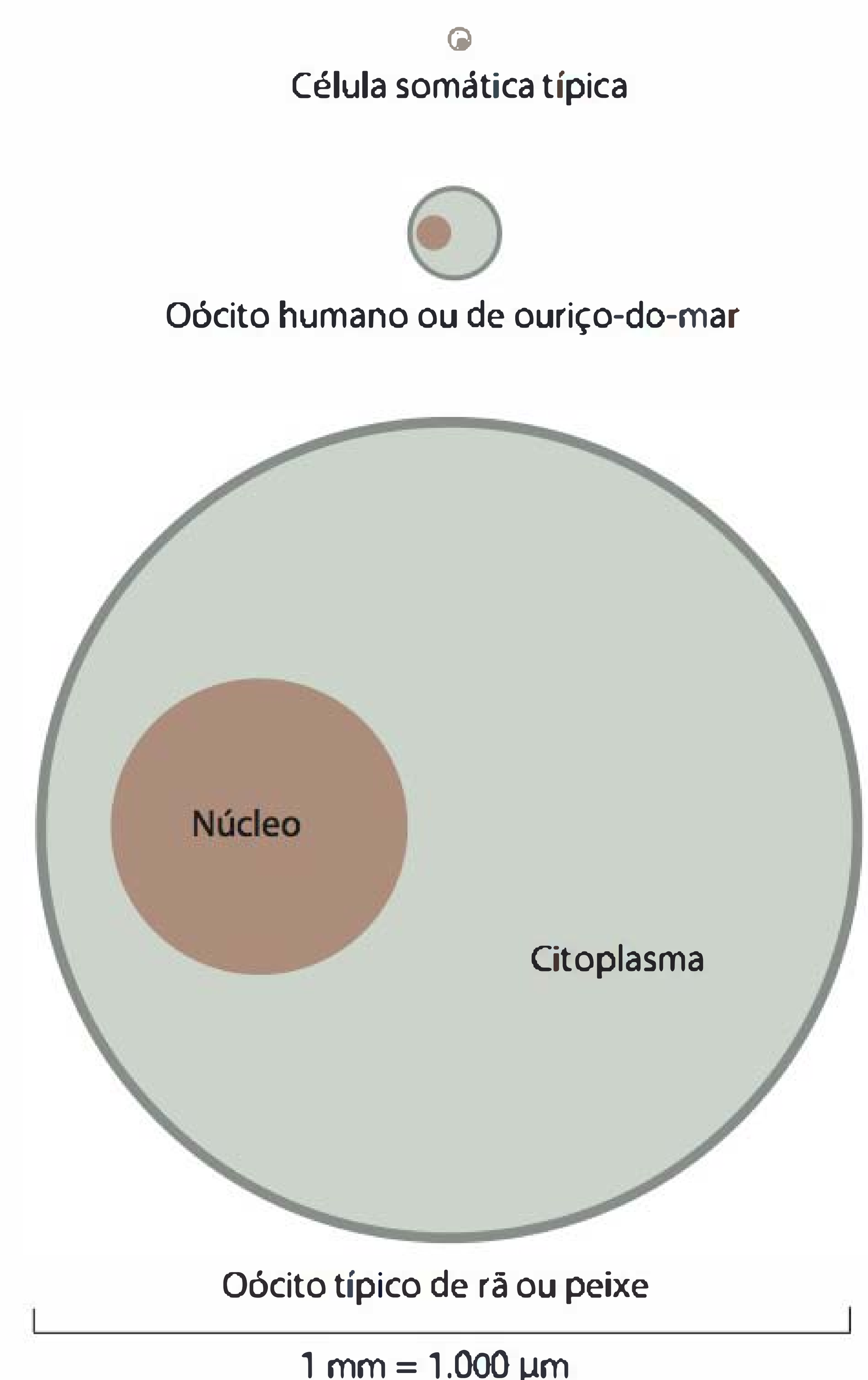


Figura 21-21 Tamanhos relativos de vários oócitos, comparados com o tamanho de uma célula somática típica.

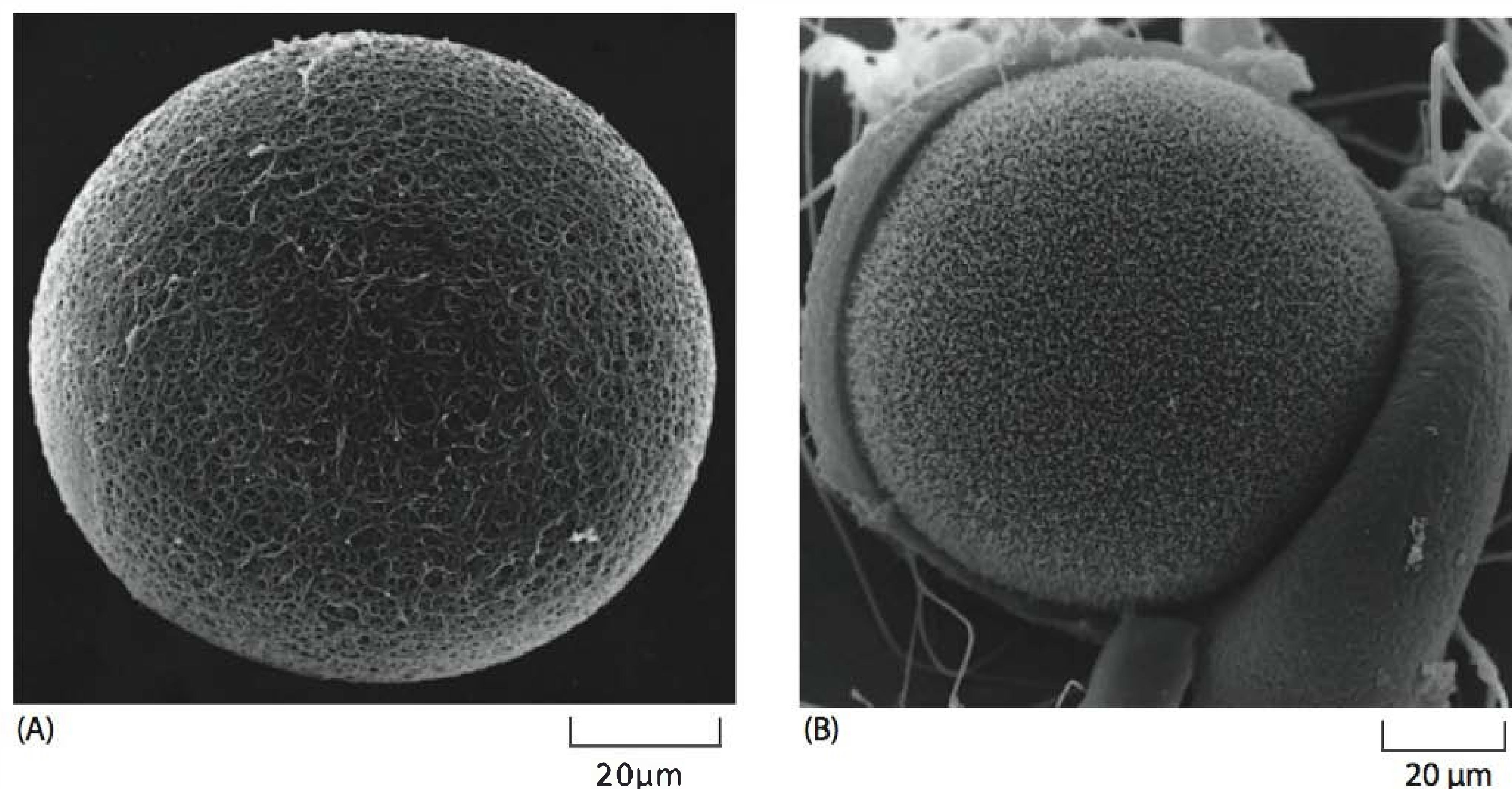


Figura 21-22 A zona pelúcida. (A) Eletromicrografia de varredura de um oócito de hamster mostrando a zona pelúcida. (B) Uma eletromicrografia de varredura de um oócito semelhante, no qual a zona (à qual vários espermatozoides estão aderidos) foi parcialmente removida para revelar a membrana plasmática subjacente, que contém numerosas microvilosidades. A zona é inteiramente produzida pelo oócito em desenvolvimento. (De D. M. Phillips, *J. Ultrastruct. Res.* 72:1-12, 1980. Com permissão de Elsevier.)

ela também atua como uma barreira espécie-específica para o espermatozoide, admitindo apenas a entrada daqueles da mesma espécie ou de espécies intimamente relacionadas.

Muitos oócitos (incluindo os de mamíferos) contêm vesículas secretoras especializadas, logo abaixo da membrana plasmática, na região externa, ou *córtex*, do citoplasma oocitário. Quando um espermatozoide ativa o oócito, estes **grânulos corticais** liberam seu conteúdo por exocitose; o conteúdo dos grânulos altera o revestimento do oócito de forma a ajudar a evitar que mais de um espermatozoide fusione-se ao oócito.

De modo geral, os grânulos corticais estão distribuídos uniformemente por todo o córtex. Entretanto, em muitos organismos, alguns componentes citoplasmáticos do oócito têm uma distribuição espantosamente assimétrica. Alguns destes componentes localizados mais tarde servem como determinantes de células germinativas (ver Figura 21-16) ou ajudam a estabelecer a polaridade do embrião, como discutido no Capítulo 22.

Os oócitos desenvolvem-se em etapas

Um gameta feminino em desenvolvimento, ou **oócito**, diferencia-se em oócito maduro por uma série de modificações progressivas. A regulagem destas modificações é coordenada com as fases da meiose, nas quais as células germinativas passam por suas duas divisões finais altamente especializadas. Como discutido anteriormente, os oócitos permanecem detidos na meiose I por um período prolongado, enquanto crescem em tamanho e diferenciam-se progressivamente; em muitos casos, após completarem a meiose I, eles permanecem suspensos novamente em metáfase II, enquanto aguardam a fecundação (embora possam aguardar a fecundação em vários outros pontos, dependendo da espécie).

Enquanto os detalhes do desenvolvimento do oócito (**oogênese**) variam de espécie a espécie, as etapas gerais são semelhantes, como mostrado na **Figura 21-23**. As células germinativas primordiais migram para a gônada em desenvolvimento para tornarem-se *oogônias*, as quais proliferam por mitose por um período antes de iniciarem a meiose I, ponto no qual elas são chamadas de *oócitos primários*; normalmente isso ocorre antes do nascimento em mamíferos. Como discutido anteriormente, antes do início da meiose I, o DNA é replicado, de modo que cada cromossomo consiste em duas cromátides-irmãs; no início da prófase I, os cromossomos homólogos duplicados pareiam ao longo de seu eixo longitudinal, e o *crossing-over* ocorre entre as cromátides não-irmãs desses homólogos pareados (ver Figura 21-10). Após esses eventos, a célula permanece retida depois do diplóteno da prófase I por um período que varia de poucos dias até vários anos, dependendo da espécie. Durante este longo período de suspensão (ou, em alguns casos, no início da maturidade sexual), os oócitos primários sintetizam um revestimento e grânulos corticais. Os oócitos grandes de espécies não-mamíferas, também acumulam ribossomos, gema, glicogênio, lipídeo e os RNAs mensageiros (mRNAs) que, mais tarde, irão dirigir a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e o desenvolvimento embrionário inicial. Em muitos destes oócitos, podemos observar as atividades biossintéticas intensivas na estrutura dos cromossomos, os quais descondensam e formam alças laterais, adquirindo a aparência característica de "cromossomos plumosos", significando que os genes nas alças estão sendo intensamente transcritos (ver Figuras 4-54 e 4-55).

A próxima fase do desenvolvimento do oócito, a *maturação do oócito*, normalmente não ocorre até a maturidade sexual, quando hormônios estimulam o oócito. Sob essas influências hormonais, a célula retoma sua progressão ao longo da meiose I. Os cromossomos

condensam novamente, o envelope nuclear se rompe, o fuso meiótico se organiza e os cromossomos homólogos replicados segregam em dois grupos na anáfase I, cada um contendo a metade do número original de cromossomos. Para finalizar a meiose I, o citoplasma divide-se assimetricamente, produzindo duas células que diferem muito em tamanho: uma é um pequeno *corpúsculo polar*, e a outra é um grande **oócito secundário**, o precursor do ovo, ou zigoto. Nesse estágio, cada cromossomo é ainda composto de duas cromátides-irmãs mantidas juntas em seus centrômeros. As cromátides-irmãs não se separam até a anáfase II, após a qual o citoplasma do grande oócito secundário divide-se novamente assimetricamente para produzir o **ovo** (ou **zigoto**) e um segundo corpúsculo polar pequeno, cada um contendo um grupo haploide de cromossomos individuais (ver Figura 21-23). Em função

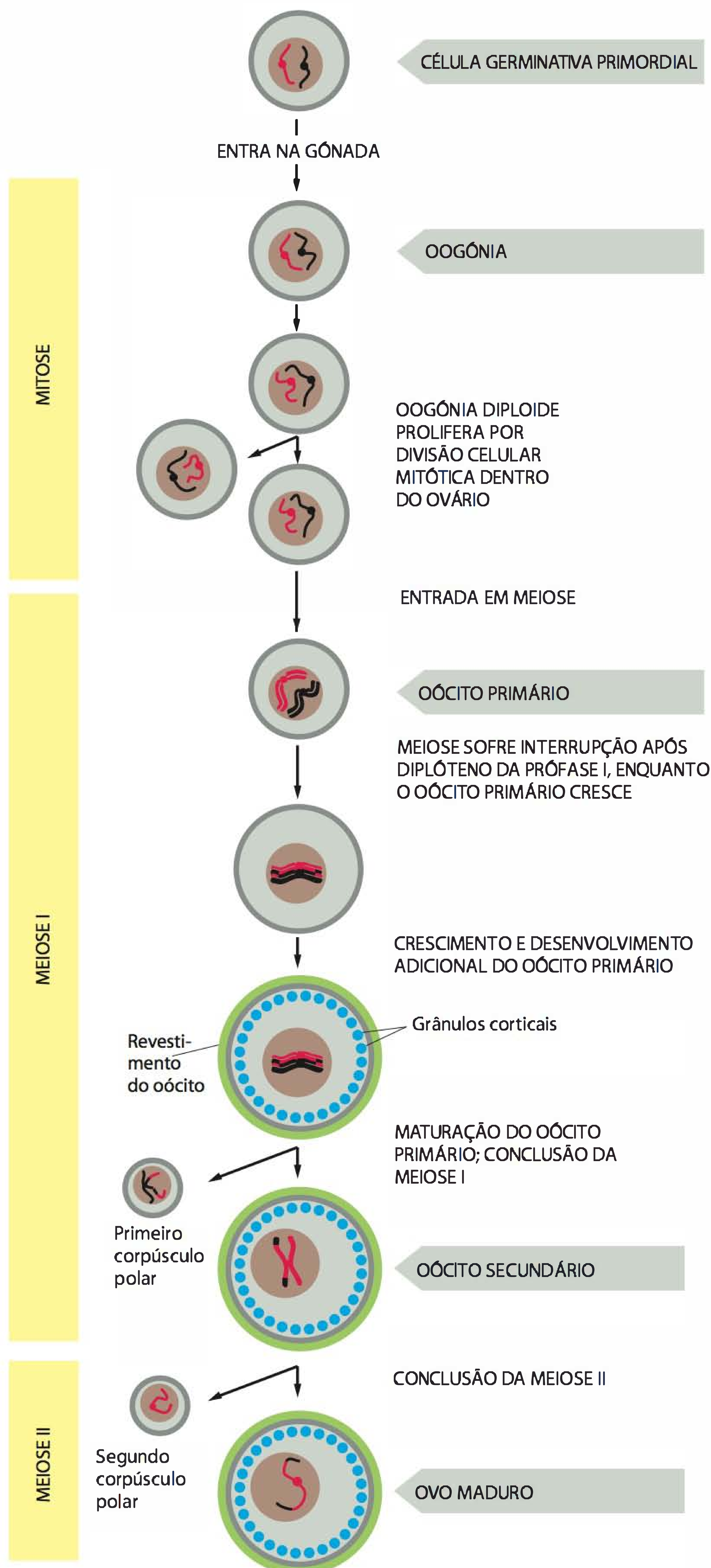


Figura 21-23 As etapas da oogênese. As oogônias desenvolvem-se a partir de células germinativas primordiais (PGCs) que migram para as gônadas em desenvolvimento nos estágios iniciais da embriogênese. Para maior clareza, apenas um par de cromossomos homólogos é mostrado. Após várias divisões mitóticas, as oogônias iniciam a meiose e agora são chamadas de oócitos primários. Em mamíferos, os oócitos primários são formados muito cedo (entre 3 e 8 meses de gestação nos embriões humanos) e permanecem retidos após o diplóteno da prófase I até a fêmea tornar-se sexualmente madura. Neste ponto, um pequeno número de oócitos primários matura periodicamente sob a influência de hormônios, completando a meiose I e tornando-se oócitos secundários, os quais finalmente sofrerão meiose II, para produzir ovos maduros. O estágio no qual o ovo ou o oócito é liberado do ovário e fecundado varia de espécie para espécie. Na maior parte dos vertebrados, a maturação do oócito é retida em metáfase II, e o oócito secundário completa a meiose II apenas após a fecundação. Todos os corpúsculos polares finalmente degeneram. Na maioria dos animais, o oócito em desenvolvimento é circundado por células acessórias especializadas que ajudaram a mantê-lo isolado e nutrido (não-representado).

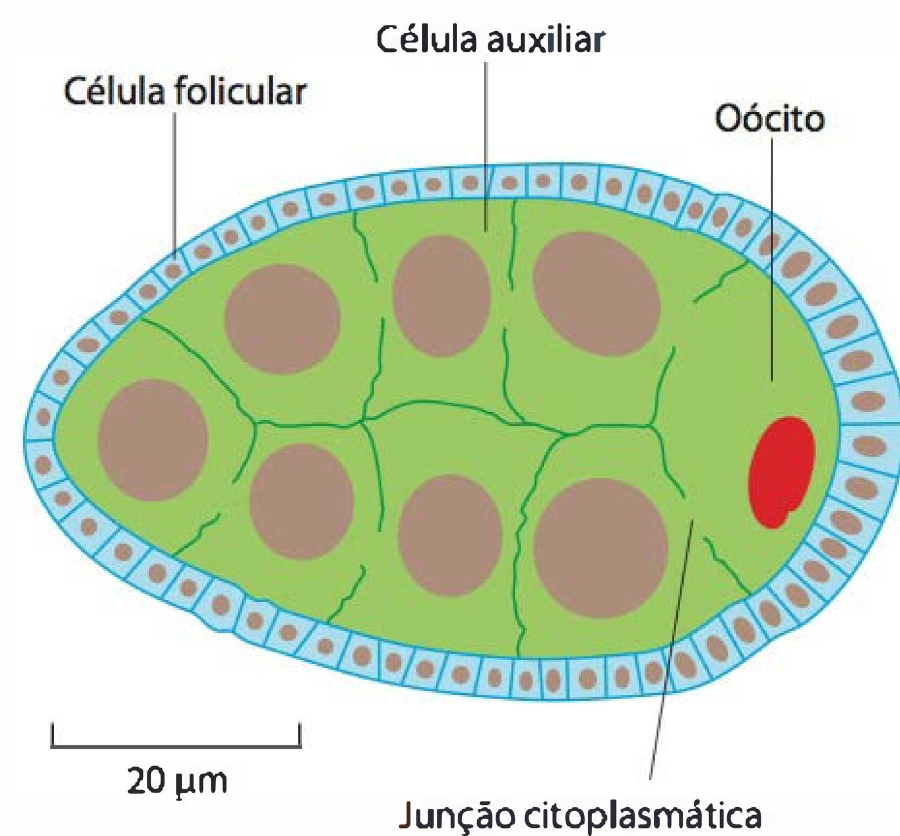


Figura 21-24 Células auxiliares e células foliculares associadas a um oócito de *Drosophila*. As células auxiliares e o oócito originam-se de uma oogônia comum, a qual dá origem a um oócito e a 15 células auxiliares (apenas sete delas são vistas neste plano de corte). Estas células permanecem unidas por junções citoplasmáticas, que resultam de divisões celulares incompletas. Por fim, as células auxiliares depositam seu conteúdo citoplasmático dentro do oócito em desenvolvimento e morrem. As células foliculares se desenvolvem de forma independente a partir de células do mesoderma.

dessas divisões assimétricas de seu citoplasma, os oócitos mantêm seu tamanho grande, apesar de sofrerem as duas divisões meióticas. Ambos os corpúsculos polares são pequenos e, por fim, degeneram.

Na maioria dos vertebrados, a maturação do oócito avança até a metáfase da meiose II, ponto no qual tornam-se retidos. No momento da **ovulação**, o oócito secundário retido é liberado do ovário, pronto para ser fecundado. Se a fecundação ocorrer, o bloqueio é retirado e a célula completa a meiose, tornando-se um ovo maduro. Por ele estar fecundado, também é chamado de zigoto.

Os oócitos utilizam mecanismos especiais para atingir seu tamanho grande

Uma célula somática com diâmetro de 10 a 20 µm normalmente leva cerca de 24 horas para dobrar sua massa, na preparação para a divisão celular. A essa taxa de biossíntese, tal célula levaria um tempo muito longo para alcançar a massa milhares de vezes maior de um oócito de mamífero, com o diâmetro de 100 µm. Ela levaria ainda mais tempo para alcançar a massa milhões de vezes maior de um oócito de inseto com diâmetro de 1.000 µm. Ainda, alguns insetos vivem apenas poucos dias e conseguem produzir oócitos com diâmetros até maiores do que 1.000 µm. Os oócitos devem ter mecanismos especiais para alcançar seu tamanho tão grande.

Uma estratégia simples para o crescimento rápido é possuir cópias extras de genes na célula. A maior parte do crescimento de um oócito ocorre após a replicação do DNA, durante a prolongada interrupção após o diplóteno na prófase I, quando o grupo de cromossomos diploides está duplicado (ver Figura 21-23). Dessa forma, ele tem duas vezes mais DNA disponível para a síntese de RNA do que tem em média uma célula somática na fase G_1 do ciclo celular. Os oócitos de algumas espécies ficam mesmo grandes períodos acumulando DNA extra: eles produzem muitas cópias extras de certos genes. Como discutimos no Capítulo 6, as células somáticas da maioria dos organismos contêm 100 a 500 cópias dos genes de RNA ribossomal para produzir ribossomos suficientes para a síntese de proteína. Os oócitos necessitam de um número de ribossomos ainda maior para sustentar a taxa elevada de síntese proteica exigida durante os estágios iniciais da embriogênese e, nos oócitos de vários animais, os genes de RNA ribossomal são amplificados especificamente; alguns oócitos de anfíbios, por exemplo, contêm 1 ou 2 milhões de cópias desses genes.

Os oócitos também podem depender, em parte, das atividades sintéticas de outras células para seu crescimento. Por exemplo, a gema normalmente é sintetizada fora do ovário e importada para dentro do oócito. Em aves, anfíbios e insetos, as proteínas da gema são produzidas por células do fígado (ou suas equivalentes), as quais secretam essas proteínas no sangue. Dentro dos ovários, os oócitos utilizam a endocitose mediada por receptor para captar as proteínas da gema do fluido extracelular (ver Figura 13-46). O auxílio nutricional pode vir também de células acessórias adjacentes no ovário. Elas podem ser de dois tipos. Em alguns invertebrados, parte da progênie da oogônia torna-se **células auxiliares** (*nurse cells*), em vez de tornar-se oócitos. Junções citoplasmáticas conectam essas células ao oócito, permitindo que macromoléculas passem diretamente das células auxiliares para dentro do citoplasma do oócito (**Figura 21-24**). Para o oócito de inseto, as células auxiliares sintetizam muitos dos produtos – ribossomos, mRNA, proteínas e outros – que os oócitos dos vertebrados têm que produzir sozinhos.

As outras células acessórias do ovário que ajudam a nutrir os oócitos em desenvolvimento são células somáticas comuns, chamadas de **células foliculares**, que circundam cada oócito em desenvolvimento tanto em invertebrados como em vertebrados. Elas estão dispostas como uma camada epitelial ao redor do oócito (**Figura 21-25**; ver também Figura 21-24) e estão conectadas umas às outras e ao oócito por meio de *junções ocludentes*, que permitem a troca de moléculas pequenas, mas não de macromoléculas (discutido no Capítulo 19). Embora as células foliculares sejam incapazes de fornecer macromoléculas pré-formadas ao oócito através destas junções, elas podem fornecer as moléculas precursoras pequenas, a partir das quais as macromoléculas são produzidas. A importância fundamental da comunicação por junções comunicantes tem sido demonstrada distintamente no ovário de camundongo, onde as proteínas de junção comunicante (*conexinas*) envolvidas em conectar células foliculares umas às outras são diferentes daquelas que conectam as células foliculares ao oócito. Se os genes que codificam qualquer uma destas proteínas são destruídos em camundongos, tanto células foliculares como oócitos deixam de se desenvolver normalmente, e as fêmeas são estéreis. Em muitas espécies, as células foliculares secretam macro-

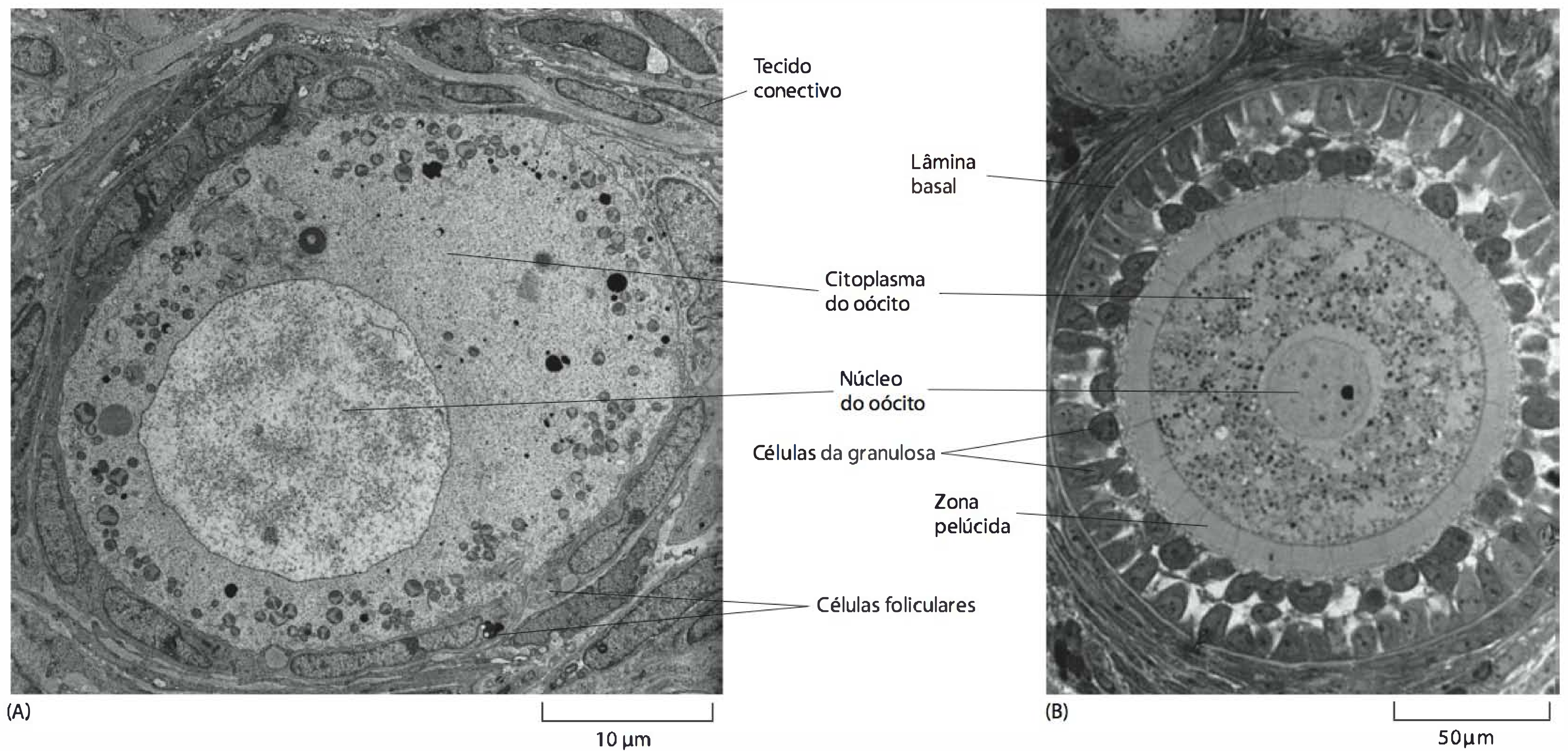


Figura 21-25 Eletromicrografia de oócitos primários em desenvolvimento no ovário de coelho. (A) Um estágio inicial do desenvolvimento do oócito primário. Nem a zona pelúcida nem os grânulos corticais foram desenvolvidos, e uma única camada de células foliculares achatadas circunda o oócito. (B) Um oócito primário mais desenvolvido, que é mostrado em uma magnitude seis vezes menor, porque é muito maior que o oócito em (A). Esse oócito adquiriu uma zona pelúcida espessa e está circundado por várias camadas de células foliculares (agora chamadas de células da granulosa) e uma lâmina basal que isola o oócito das outras células no ovário. As células da granulosa estão conectadas umas às outras e ao oócito por junções comunicantes. (De The Cellular Basis of Mammalian Reproduction [J. Van Blerkom e P. Motta eds.]. Baltimore-Munich: Urban & Schwarzenberg, 1979.)

moléculas que, ou contribuem para o revestimento do oócito, são captadas para dentro do oócito em desenvolvimento através de endocitose mediada por receptor, ou atuam sobre os receptores de superfície celular do oócito para controlar o padrão de assimetria espacial e axial do oócito (discutido no Capítulo 22).

A comunicação entre o oócito e suas células foliculares ocorre em ambas as direções. A sincronização dos processos de desenvolvimento nos dois grupos de células tem que ser coordenada, e parece que isso depende de sinais do oócito para as células foliculares. Experimentos nos quais oócitos jovens são combinados com células foliculares velhas, ou vice-versa, mostram que um programa de desenvolvimento intrínseco no oócito geralmente controla a taxa de desenvolvimento da célula folicular.

A maioria dos oócitos humanos morre sem maturar

A **Figura 21-26** resume as etapas no desenvolvimento do oócito humano no ovário. Uma camada única de células foliculares circunda a maior parte dos oócitos primários em meninas recém-nascidas. Tal oócito, junto com suas células foliculares circundantes, é chamado de *folículo primordial* (ver Figura 21-25A). Periodicamente, iniciando algum tempo antes

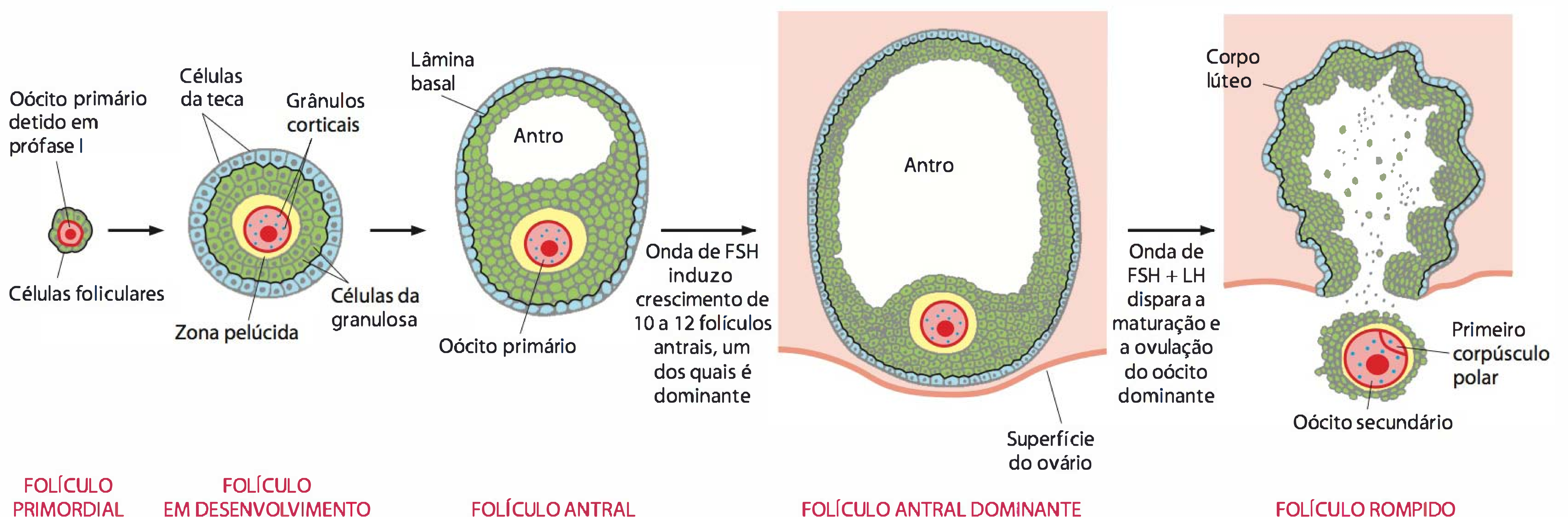


Figura 21-26 As etapas no desenvolvimento do oócito humano. Observe que, durante a maior parte de seu desenvolvimento, o oócito é circundado por células da granulosa (*verde*), as quais estão separadas de uma camada externa de *células da teca folicular* (*azul*) por uma lâmina basal (*preto*) interposta. Depois da ovulação, o folículo esvaziado se transforma em uma estrutura endócrina, o *corpo lúteo*, que secreta progesterona para auxiliar a preparar o útero para a gestação. Se a fecundação não ocorre, o corpo lúteo regride, e o revestimento do útero é perdido por descamação durante a menstruação.

do nascimento, uma pequena proporção de folículos primordiais começa a crescer e eles se tornam *folículos em desenvolvimento*, nos quais camadas múltiplas de células foliculares (agora chamadas de *células da granulosa*) circundam o oócito em crescimento (ver Figura 21-25B). Não se sabe o que faz com que certos folículos primordiais iniciem o crescimento. Alguns destes folículos em desenvolvimento progridem até adquirir em uma cavidade cheia de líquido, ou *antro folicular*, para tornarem-se *folículos antrais*.

Após a puberdade, aproximadamente uma vez por mês, a hipófise secreta uma onda de *hormônio folículo-estimulante* (*FSH*, *follicle stimulating hormone*), que acelera o crescimento de cerca de 10 a 12 folículos antrais. Um destes folículos torna-se dominante, e, perto da metade do ciclo menstrual, uma onda de FSH e de *hormônio luteinizante* (*LH*, *luteinizing hormone*) dispara a *ovulação*: o oócito primário dominante completa a meiose I e o oócito secundário resultante é retido em metáfase II; o folículo aumenta rapidamente e se rompe na superfície do ovário, liberando o oócito secundário, ainda circundado por uma capa de células da granulosa embebida em uma matriz semelhante a gelatina rica em hialuronana (ácido hialurônico). O oócito liberado é levado a completar a meiose II somente se um espermatozoide fecundá-lo dentro de um dia, ou um pouco mais ou menos.

Permanece um mistério por que apenas uma proporção pequena dos muitos folículos antrais presentes nos ovários no momento da onda de FSH a cada mês é estimulada a acelerar seu crescimento, e por que apenas um destes folículos matura e libera seu oócito, enquanto o restante degenera. Uma vez que o folículo selecionado tenha maturado além de certo ponto, algum mecanismo de *feedback* (retroalimentação) deve funcionar para garantir que nenhum outro folículo complete a maturação e seja ovulado durante este ciclo. Qualquer que seja o mecanismo, o resultado é que, durante os 40 anos ou um pouco mais ou menos da vida reprodutiva de uma mulher, somente 400 ou 500 oócitos serão liberados. Todos os outros milhões, ou um pouco mais ou menos, de oócitos primários presentes ao nascimento morrem sem maturar. Ainda é um enigma por que tantos oócitos são formados apenas para morrer nos ovários.

Resumo

Os oócitos desenvolvem-se em etapas, a partir de células germinativas primordiais (PGCs) que migram para a gônada em desenvolvimento, onde tornam-se oogônias. Após um período de proliferação mitótica, as oogônias iniciam a meiose I e são agora chamadas de oócitos primários. Os oócitos primários permanecem retidos após o diplóteno da prófase I de dias a anos, dependendo da espécie. Durante esse período de permanência na prófase I, eles crescem, sintetizam um revestimento e acumulam ribossomos, mRNA e proteínas, frequentemente requisitando a ajuda de outras células, incluindo as células foliculares circundantes. A sinalização bidirecional entre os oócitos e suas células foliculares é necessária para o crescimento e o desenvolvimento normal do oócito. No processo de indução hormonal da maturação oocitária, os oócitos primários completam a meiose I para formar um corpúsculo polar pequeno e um grande oócito secundário, que prossegue para a metáfase da meiose II. Na maioria dos vertebrados, o oócito secundário é detido em metáfase II até ser estimulado pela fecundação a completar a meiose e iniciar o desenvolvimento embrionário.

ESPERMATOZOIDES

Na maioria das espécies, existem dois tipos fundamentalmente diferentes de gametas. O oócito está entre as maiores células em um organismo, enquanto o **espermatozoide** normalmente é a menor. O oócito e o espermatozoide são otimizados em vias opostas para a propagação dos genes que carregam. O oócito não é móvel e contribui para a sobrevivência dos genes maternos por promover grande armazenamento de matéria-prima para o crescimento e o desenvolvimento do embrião, juntamente com um eficiente envoltório protetor. O espermatozoide, ao contrário, é otimizado para difundir os genes paternos explorando este investimento materno: de modo geral, ele é altamente móvel e tem uma forma aerodinâmica que lhe proporciona rapidez e eficiência para realizar a fecundação. A competição entre os espermatozoides é feroz, e a grande maioria falha na sua missão: dos bilhões de espermatozoides liberados durante a vida reprodutiva de um homem, apenas uns poucos conseguem fecundar um oócito.

Os espermatozoides estão altamente adaptados para transferir seu DNA para um oócito

Os espermatozoides típicos são células "despidas", equipadas com um flagelo forte que os impulsiona através de um meio aquoso, mas desprovidas de organelas citoplasmáticas,

como ribossomos, retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi, que são desnecessárias para a tarefa de transferir seu DNA para o oócito. No entanto, os espermatozoides contêm muitas mitocôndrias localizadas estrategicamente onde elas possam dar força ao flagelo de forma mais eficiente. Os espermatozoides geralmente consistem em duas regiões morfológica e funcionalmente diferentes, contidas por uma única membrana plasmática: a *cauda*, que impulsiona o espermatozoide em direção ao oócito e auxilia na sua passagem através do revestimento do gameta feminino, e a *cabeça*, que contém um núcleo haploide altamente condensado (**Figura 21-27**). O DNA no núcleo está condensado de maneira extremamente compacta, para minimizar seu volume para o transporte, e a transcrição está desativada. Os cromossomos de muitos espermatozoides carecem das histonas das células somáticas e, ao invés delas, estão condensados com proteínas simples, com carga altamente positiva, chamadas de *protaminas*, bem como com histonas específicas de espermatozoides.

Na cabeça da maioria dos espermatozoides de animais, posicionada muito próximo à extremidade anterior do envelope nuclear, está uma vesícula secretora especializada chamada de **vesícula acrossômica** (ou **acrossomo**). Essa vesícula contém enzimas hidrolíticas que acredita-se que auxiliem o espermatozoide a penetrar através do revestimento externo do oócito. Quando um espermatozoide entra em contato com o revestimento do oócito, o conteúdo do acrossomo é liberado por exocitose na chamada *reação de acrossomo* (ou *reação acrossômica*). Essa reação é necessária para o espermatozoide ligar-se ao revestimento, passar através dele e fundir-se com o oócito.

A cauda móvel do espermatozoide é um flagelo longo, cujo *axonema* central deriva-se de um corpo basal situado exatamente atrás do núcleo. Como descrito no Capítulo 16, o axonema consiste em dois microtúbulos centrais simples circundados por nove pares de microtúbulos dispostos simetricamente. O flagelo de alguns espermatozoides (incluindo os de mamíferos) difere de outros flagelos porque o padrão de 9 + 2 microtúbulos está circundado por nove *fibras densas* externas (**Figura 21-28**). As fibras densas são rígidas e não-contráteis, e acredita-se que restrinjam a flexibilidade do flagelo e protejam-no de forças de torção; defeitos nessas fibras levam à morfologia espermática anormal e à infertilidade. O dobramento ativo do flagelo é causado pelo deslizamento dos pares de microtúbulos adjacentes entre si, controlado por proteínas motoras chamadas de dineínas, as quais usam a energia da hidrólise do ATP para o deslizamento dos microtúbulos. O ATP é produzido por um grande número de mitocôndrias altamente especializadas que estão concentradas na parte anterior da cauda do espermatozoide (chamada de *peça intermediária*), onde o ATP é necessário.

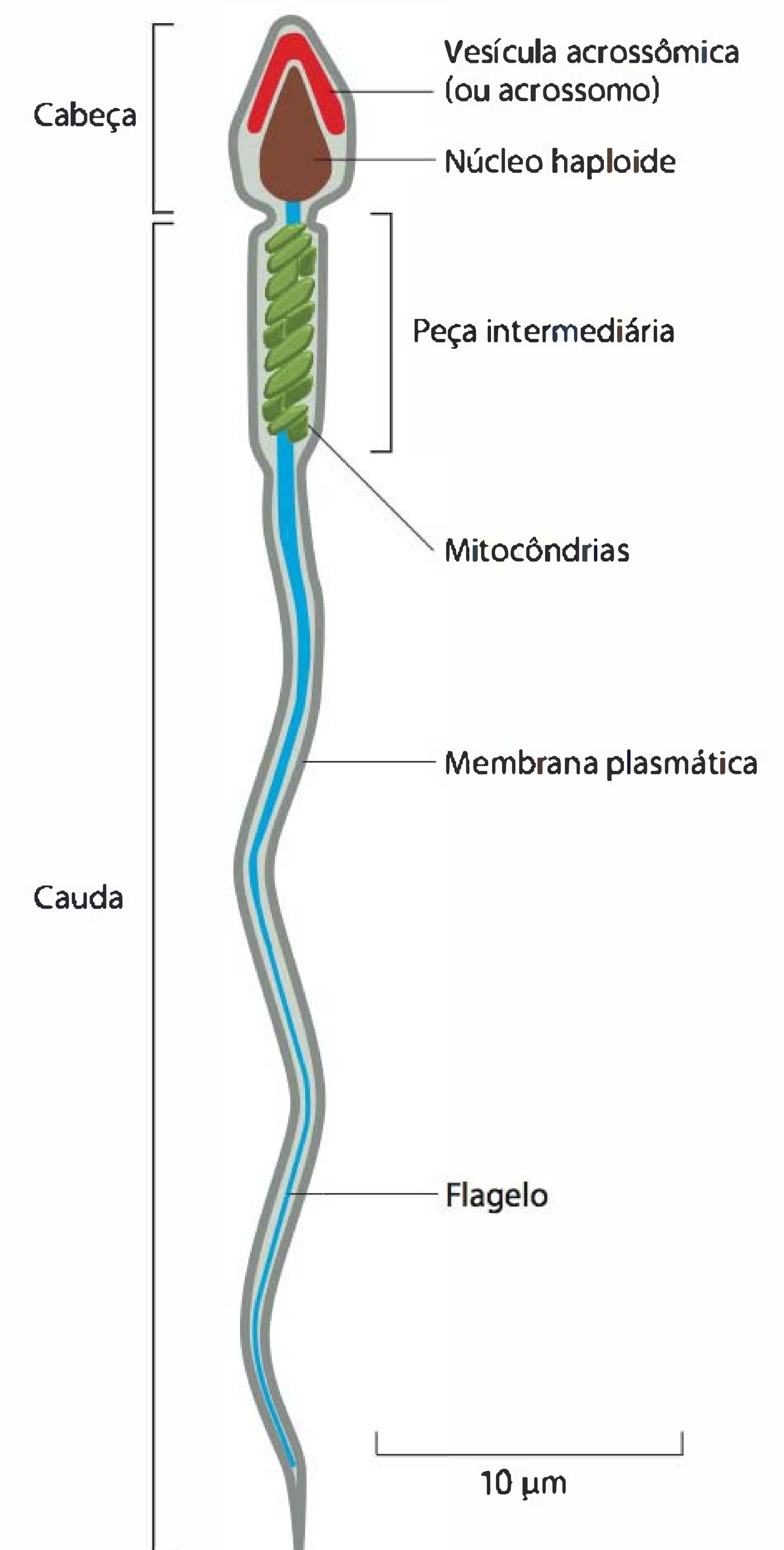


Figura 21-27 Um espermatozoide humano. Ele é mostrado em corte longitudinal.

Os espermatozoides são produzidos continuamente no testículo mamífero

Ao contrário dos oócitos, que iniciam a meiose antes do nascimento e permanecem retidos após o diplóteno da prófase I até que a fêmea humana atinja a puberdade, a meiose e a produção de espermatozoides (**espermatogênese**) não iniciam nos testículos dos machos humanos até a puberdade. Então, eles seguem continuamente no revestimento epitelial de tubos muito longos e altamente contorcidos, chamados de *túbulos seminíferos*. Células germinativas imaturas, chamadas de *espermatogônias*, estão localizadas ao redor do limite mais externo desses túbulos, próximas à lâmina basal (**Figura 21-29**A). A maioria dessas células divide-se um número limitado de vezes por mitose antes que a proliferação pare e inicie-se a meiose I, ponto no qual elas agora são chamadas de *espermatócitos primários*; os espermatócitos primários originam os *espermatócitos secundários*, os quais se dividem para originar *espermátides*, que, finalmente, diferenciam-se em espermatozoides (Figura 21-29B). Uma proporção pequena das espermatogônias serve como células-tronco, que lentamente dividem-se por mitose durante a vida, produzindo células-filhas, as quais ou permanecem como células-tronco ou comprometem-se com a maturação.

As etapas da espermatogênese e suas relações com a meiose são ilustradas na **Figura 21-30**. Durante a prófase I, os cromossomos homólogos pareados participam do *crossing-over*. Então, os espermatócitos primários completam a meiose I para produzir dois esper-

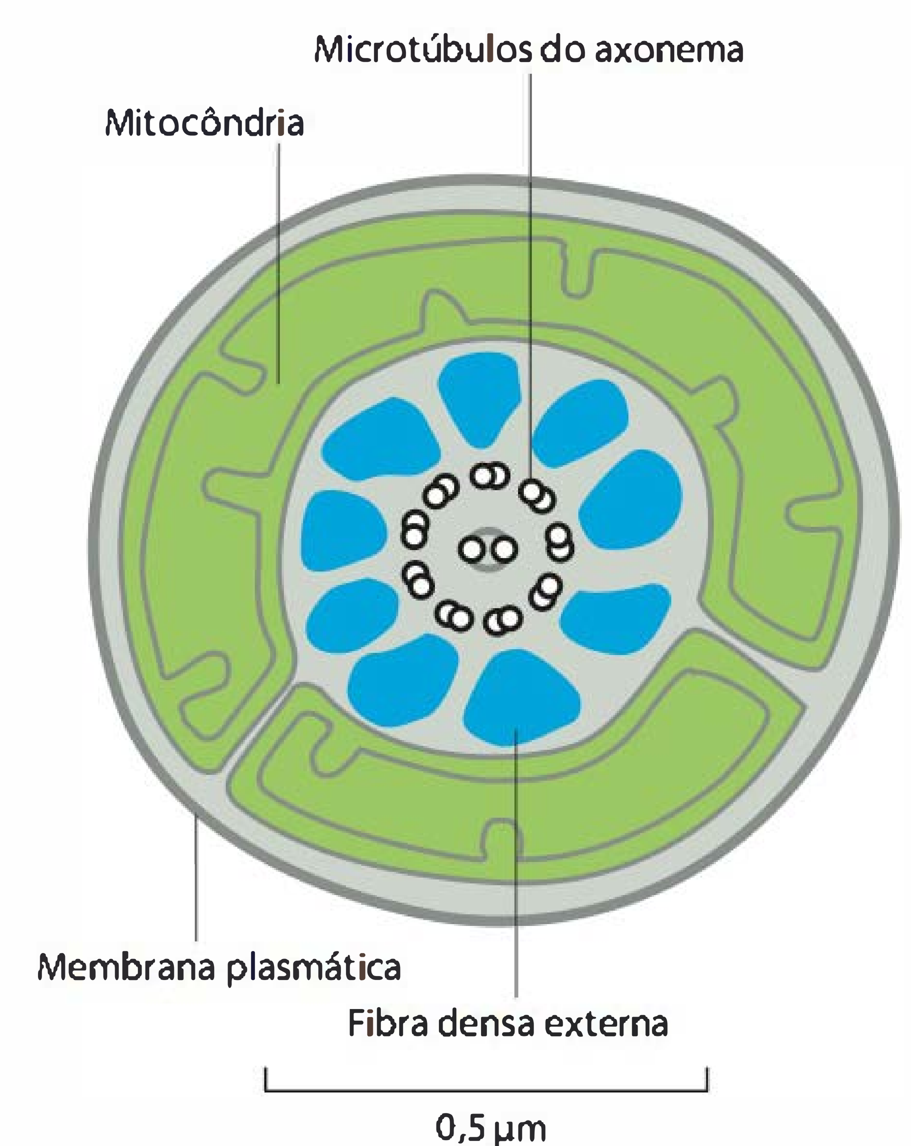


Figura 21-28 Esquema da peça intermediária de um espermatozoide mamífero, visto em corte transversal em um microscópio eletrônico. O centro do flagelo é composto de um axonema circundado por nove fibras densas. O axonema consiste em dois microtúbulos simples, cercados por nove pares de microtúbulos. As mitocôndrias (mostradas em *verde*) estão bem localizadas para fornecer o ATP necessário ao movimento do flagelo; elas estão distribuídas em um arranjo espiral incomum ao redor do axonema (ver Figura 21-27).

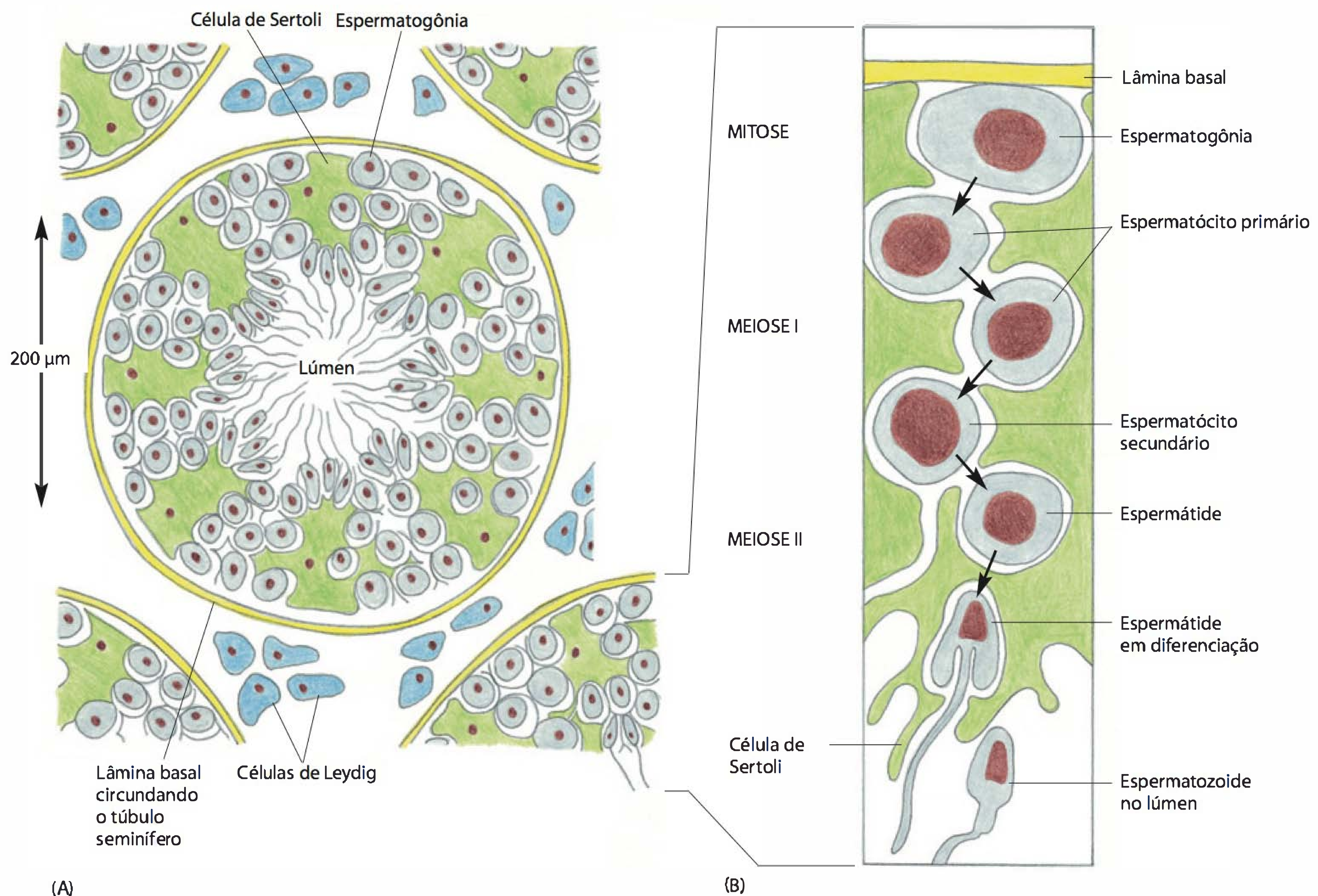


Figura 21-29 Diagramas altamente simplificados de um corte transversal de um túbulo seminífero em um testículo mamífero. (A) Todos os estágios da espermatogênese mostrados ocorrem enquanto as células da linhagem germinativa em desenvolvimento estão em íntima associação com as células de Sertoli. Essas células dirigem a diferenciação sexual ao longo de uma via masculina. Elas são células grandes que se estendem da lâmina basal até o lúmem do túbulo seminífero; são necessárias à sobrevivência das espermatogônias e são análogas às células foliculares no ovário (ver Figura 21-19). A espermatogênese também depende da testosterona secretada pelas células de Leydig, localizadas entre os túbulos seminíferos. (B) As espermatogônias dividem-se por mitose na periferia do túbulo seminífero. Algumas dessas células entram em meiose I para tornarem-se espermatócitos primários; eles, então, completam a meiose I para tornarem-se espermatócitos secundários. Os espermatócitos secundários, por sua vez, completam a meiose II e tornam-se espermátides, as quais se diferenciam em espermatozoides e são liberadas do túbulo (ver Figura 21-30). Em homens, uma espermatogônia leva cerca de 24 dias desde o início da meiose até a emergência como uma espermátide, e outras cinco semanas para a espermátide se diferenciar em um espermatozoide.

matócitos secundários, cada um contendo 22 cromossomos autossômicos duplicados, assim como ou um cromossomo X duplicado ou um cromossomo Y duplicado. Os dois espermatócitos secundários derivados de cada espermatócito primário prosseguem na meiose II para produzir quatro espermátides, cada uma com um número haploide de cromossomos simples. As espermátides haploides sofrem, então, modificações morfológicas dramáticas até se diferenciarem em espermatozoides, os quais migram para a luz dos túbulos seminíferos. Posteriormente, os espermatozoides passam para o *epidídimo*, um tubo contorcido que está ligado ao testículo, onde sofrem maturação e são armazenados. Entretanto, os espermatozoides armazenados ainda não estão aptos a fecundar um oócito; como discutiremos mais tarde, eles sofrem maturação adicional no trato genital feminino – um processo chamado de *capacitação*.

Os espermatozoides se desenvolvem como um sincício

Uma característica intrigante da espermatogênese é que, uma vez que uma espermatogônia começa a maturar, sua progênie não completa a divisão citoplasmática (citocinese) durante a mitose e a meiose subsequentes. Consequentemente, grandes clones de células-filhas em diferenciação, que descendem de uma mesma espermatogônia em maturação, permanecem unidos por junções citoplasmáticas, formando um sincício (**Figura 21-31**). As junções citoplasmáticas persistem até a fase final da diferenciação espermática, quando os espermatozoides são liberados individualmente no lúmem do túbulo seminífero. Como resultado, espermatozoides diferenciados são produzidos em grupos síncronos em uma determinada área do túbulo seminífero. Qual é a função do arranjo sincicial?

Vimos anteriormente que os oócitos crescem e se diferenciam enquanto contêm o grupo diploide de cromossomos em duplicata. Os espermatozoides, ao contrário, não crescem e sofrem a maior parte de sua diferenciação após seus núcleos terem completado a meiose para tornarem-se haploides. No entanto, a presença das junções citoplasmáticas entre eles significa que cada espermatozoide haploide em desenvolvimento compartilha um citoplasma comum com seus vizinhos. Dessa forma, ele pode ser suprido com todos os produtos

dos genes de um genoma diploide completo. Por exemplo, um espermatozoide em desenvolvimento que carrega um cromossomo Y pode ser suprido com proteínas essenciais codificadas pelos genes do cromossomo X. Assim, o genoma diploide controla a diferenciação espermática, da mesma forma que controla a diferenciação do oócito.

Alguns dos genes que regulam a espermatogênese foram conservados durante a evolução desde moscas até humanos. Por exemplo, os genes *Daz* codificam proteínas de ligação ao RNA e estão localizados em um local no cromossomo Y humano. Descobriu-se que este local sofreu deleção em uma proporção considerável de homens inférteis, muitos dos quais não podem produzir espermatozoides. Um gene de *Drosophila* homólogo aos genes *Daz* hu-

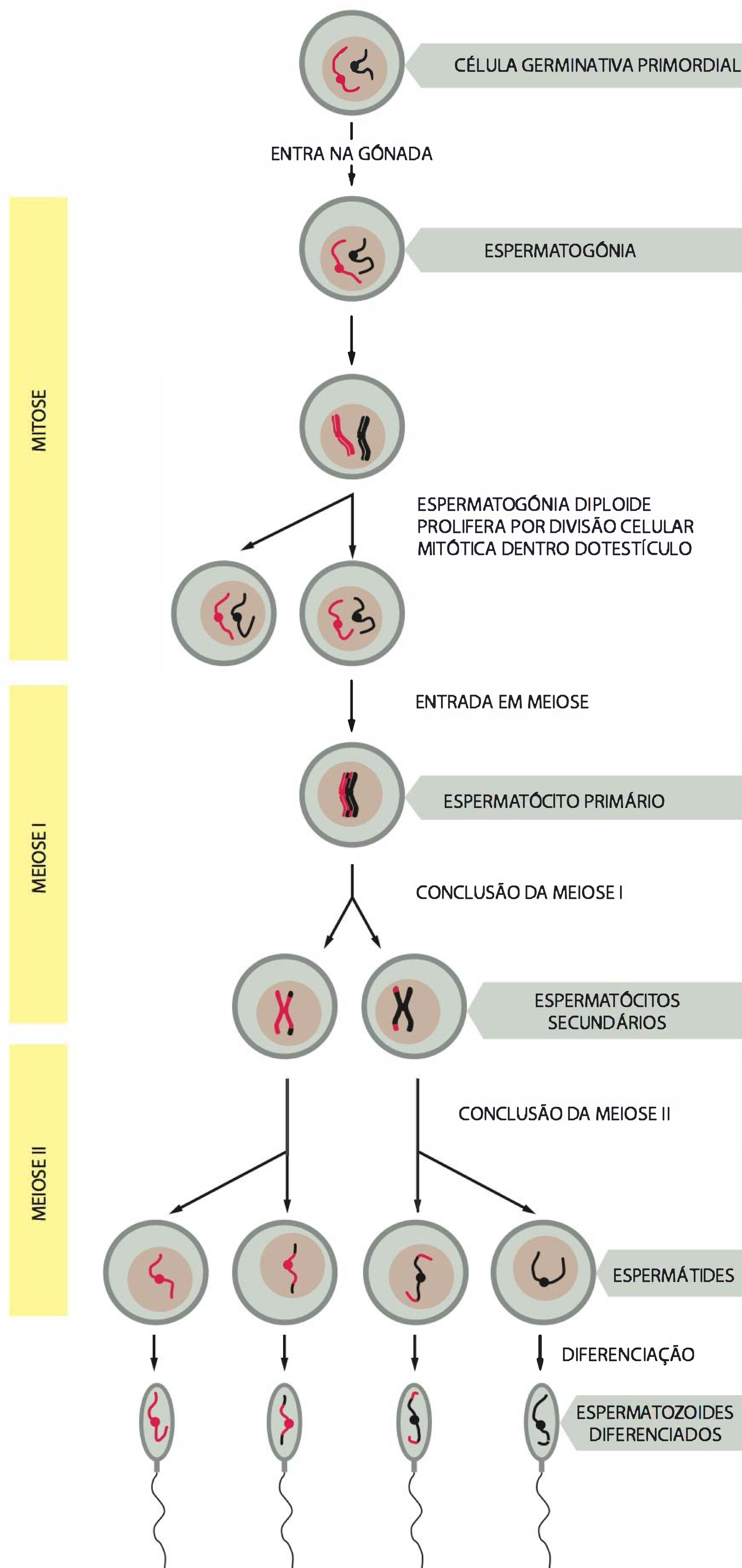


Figura 21-30 As etapas da espermatogênese. As espermatogônias desenvolvem-se a partir de células germinativas primordiais (PGCs) que migram para o interior da gônada em desenvolvimento nos estágios iniciais da embriogênese. Quando o animal torna-se sexualmente maduro, as espermatogônias começam a proliferar com rapidez por mitose. Algumas mantêm a capacidade de se dividir indefinidamente (como células-tronco espermatogônias). Outras (espermatogônias em maturação) sofrem um número limitado de ciclos de divisão mitótica antes de iniciar a meiose para tornarem-se espermatócitos, que, finalmente, tornam-se espermátides haploides e, então, espermatozoides. A espermatogênese difere da oogênese (ver Figura 21-23) de várias maneiras. (1) Novas células entram em meiose continuamente a partir da puberdade. (2) Cada célula que inicia a meiose dá origem a quatro gametas diferenciados ao invés de um. (3) O espermatozoide maduro forma-se por um processo elaborado de diferenciação celular que inicia após a conclusão da meiose. (4) Ocorrem cerca de duas vezes mais divisões celulares na produção de um espermatozoide do que na produção de um oócito; por exemplo, em um camundongo estima-se que em média ocorram cerca de 56 divisões desde o zigoto até a formação de um espermatozoide, e em torno de 27 divisões desde o zigoto até um oócito maduro.

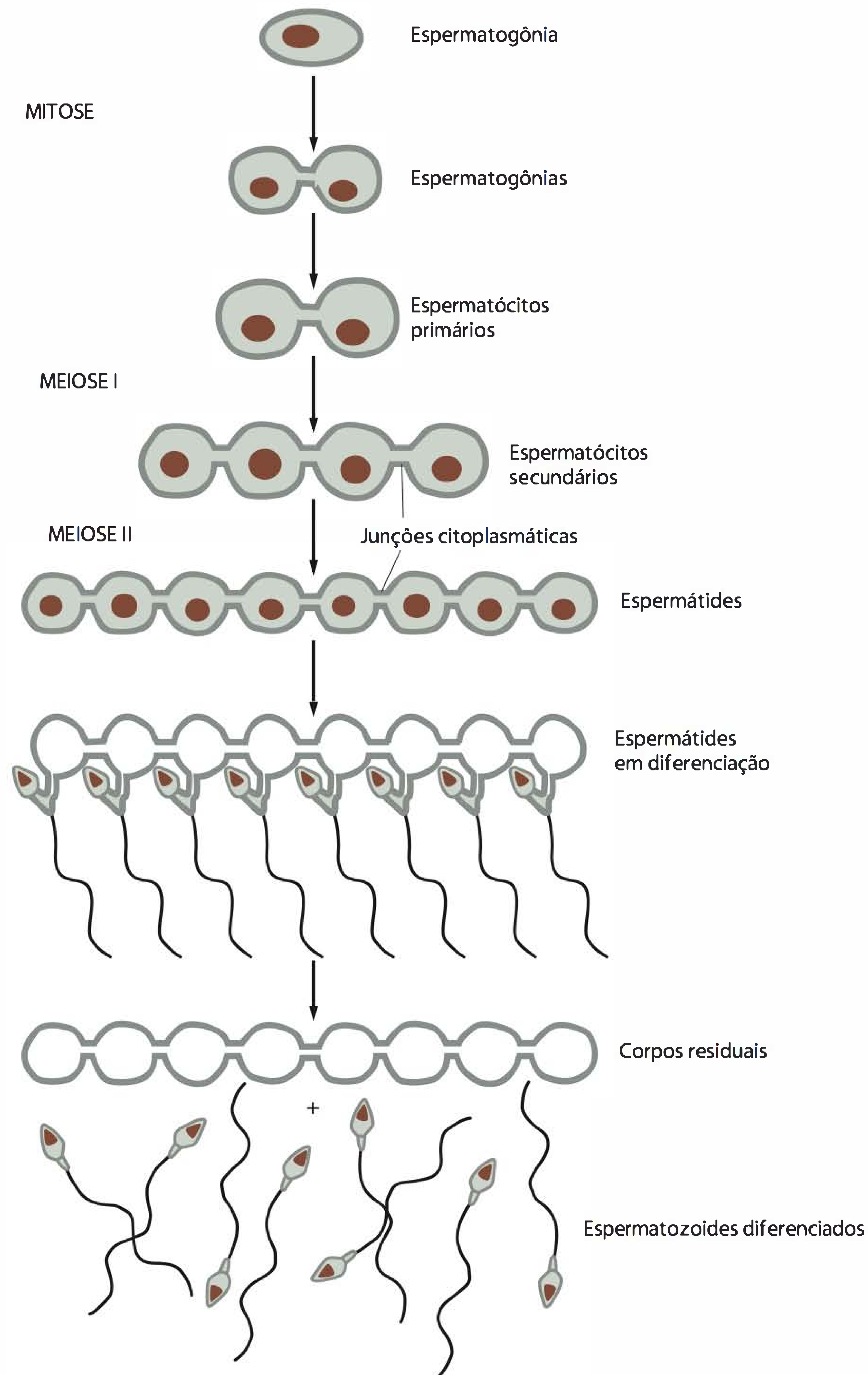


Figura 21-31 Junções citoplasmáticas em células espermáticas em desenvolvimento e seus precursores. A progênie de uma única espermatogônia em maturação permanece unida através de junções citoplasmáticas durante a diferenciação em espermatozoide. Para simplificação, apenas duas espermatogônias conectadas em maturação são mostradas iniciando a meiose, para finalmente produzir oito espermátides haploides unidas. Na verdade, o número de células conectadas que entram nas duas divisões meióticas e sofrem diferenciação de forma síncrona é muito maior do que o representado aqui. Note que, no processo de diferenciação, a maior parte do citoplasma da espermátide é descartada na forma de *corpos residuais*, os quais são fagocitados por células de Sertoli.

manos é, de forma semelhante, fundamental para a espermatogênese nessa mosca: machos da mosca deficientes em Daz são inférteis porque não produzem espermatozoides, porém, extraordinariamente, podem ser curados por um transgene *Daz* humano. As proteínas de ligação ao RNA são importantes especialmente na espermatogênese, porque muitos dos genes expressos na linhagem espermática são regulados no nível da tradução do RNA.

Resumo

Um espermatozoide geralmente é uma célula pequena, compactada, altamente especializada para a tarefa de fecundar um oócito. Enquanto em mulheres um grupo grande de oócitos é produzido antes do nascimento, nos homens a espermatogônia começa a entrar em meiose para produzir espermatócitos (e espermatozoides) apenas após a maturidade sexual, e continua a fazê-lo daí por diante. Cada espermatócito primário diploide dá origem a quatro espermatozoides haploides diferenciados. O processo de diferenciação espermática ocorre após a meiose estar completa, o que leva cinco semanas, em humanos. No entanto, como as espermatogônias e os espermatócitos em diferenciação falham em completar a citocinese, a progênie de uma única espermatogônia desenvolve-se como um grande sincício. Assim, os produtos proteicos codificados por ambos os cromossomos dos pais dirigem a diferenciação dos espermatozoides, mesmo que cada núcleo espermático seja haploide.

FECUNDAÇÃO

Uma vez liberados, o oócito e o espermatozoide estão igualmente destinados a morrer dentro de minutos ou horas, a menos que encontrem um ao outro e se fundam no processo de **fecundação**. Por meio da fecundação, o oócito e o espermatozoide são salvos: o oócito é ativado para iniciar seu programa de desenvolvimento, e os núcleos haploides dos dois gametas se unem para formar o genoma diploide de um novo organismo. Originalmente, a fecundação foi estudada de forma mais intensiva em invertebrados marinhos como ouriços-do-mar e estrelas-do-mar, onde a fecundação ocorre na água do mar, após a liberação de quantidades enormes tanto de oócitos quanto de espermatozoides. Esta fecundação externa é bem mais acessível de ser estudada do que a fecundação interna de mamíferos, que normalmente acontece no trato reprodutor feminino após o acasalamento. No entanto, no final dos anos de 1950, tornou-se possível fecundar oócitos de mamíferos *in vitro*, abrindo caminho para uma análise dos eventos celulares e moleculares da fecundação nestes animais.

Nesta seção, concentraremo-nos na fecundação em mamíferos. Começaremos considerando a capacitação dos espermatozoides que ocorre durante sua passagem através do trato genital feminino. Então, discutiremos a ligação do espermatozoide ao revestimento do oócito (a zona pelúcida), que induz a *reação de acrossomo*, necessária para o espermatozoide passar através da zona e fundir-se com o oócito. A seguir examinaremos a ligação do espermatozoide com a membrana plasmática do oócito e sua subsequente fusão com esta membrana. Após, discutindo como a fusão de um espermatozoide ativa o oócito e como os núcleos haploides dos dois gametas reúnem-se no zigoto para completar a fecundação, consideraremos brevemente o campo em crescente expansão da tecnologia de reprodução assistida, que tem revolucionado o tratamento da infertilidade humana e aberto caminho para novas maneiras de manipulação do processo reprodutivo.

Espermatozoides ejaculados se tornam capacitados no trato genital feminino

Dos 300 milhões ou mais de espermatozoides humanos ejaculados durante o ato sexual, apenas cerca de 200 alcançam o local de fecundação no *oviduto*. Uma vez que encontre um oócito, um espermatozoide deve primeiramente migrar através das camadas de células da granulosa que circundam o oócito e, depois, ligar-se e atravessar a zona pelúcida. Finalmente, ele deve ligar-se e fundir-se à membrana plasmática do oócito.

Espermatozoides ejaculados de mamíferos, inicialmente, não são competentes para realizar nenhuma dessas tarefas. Eles devem primeiro ser modificados por condições no trato reprodutor feminino. Como é necessário para o espermatozoide adquirir a capacidade de fecundar um oócito, o processo é chamado de **capacitação**. A capacitação leva cerca de 5 a 6 horas em humanos, sendo completada apenas quando o espermatozoide chega no oviduto. O espermatozoide sofre grandes alterações bioquímicas e funcionais, incluindo alterações em glicoproteínas, lipídeos e canais de íons na membrana plasmática, e uma grande alteração no potencial de repouso de sua membrana (o potencial de membrana se desloca para um valor mais negativo, de modo que a membrana se torna hiperpolarizada). A capacitação também está associada a um aumento no pH citosólico, a fosforilação de tirosina de várias proteínas espermáticas e a exposição dos receptores de superfície celular que ajudam o espermatozoide a ligar-se à zona pelúcida. A capacitação altera dois aspectos decisivos do comportamento espermático: ela aumenta bastante a motilidade do flagelo e torna o espermatozoide capaz de sofrer a reação de acrossomo.

A capacitação pode ocorrer *in vitro* no meio de cultivo apropriado e, normalmente, é uma parte necessária desse tipo de fecundação. Três componentes críticos são necessários no meio, todos normalmente estando em concentrações altas no trato genital feminino – albumina, Ca^{2+} e HOC_3^-. A proteína albumina ajuda a extrair o colesterol da membrana plasmática, aumentando a capacidade desta membrana de fundir-se à membrana do acrossomo durante a reação acrossômica. O Ca^{2+} e o HOC_3^- entram no espermatozoide e ativam diretamente uma enzima adenilil-ciclase solúvel no citosol para produzir AMP cíclico (discutido no Capítulo 15), que ajuda a iniciar muitas das alterações associadas à capacitação.

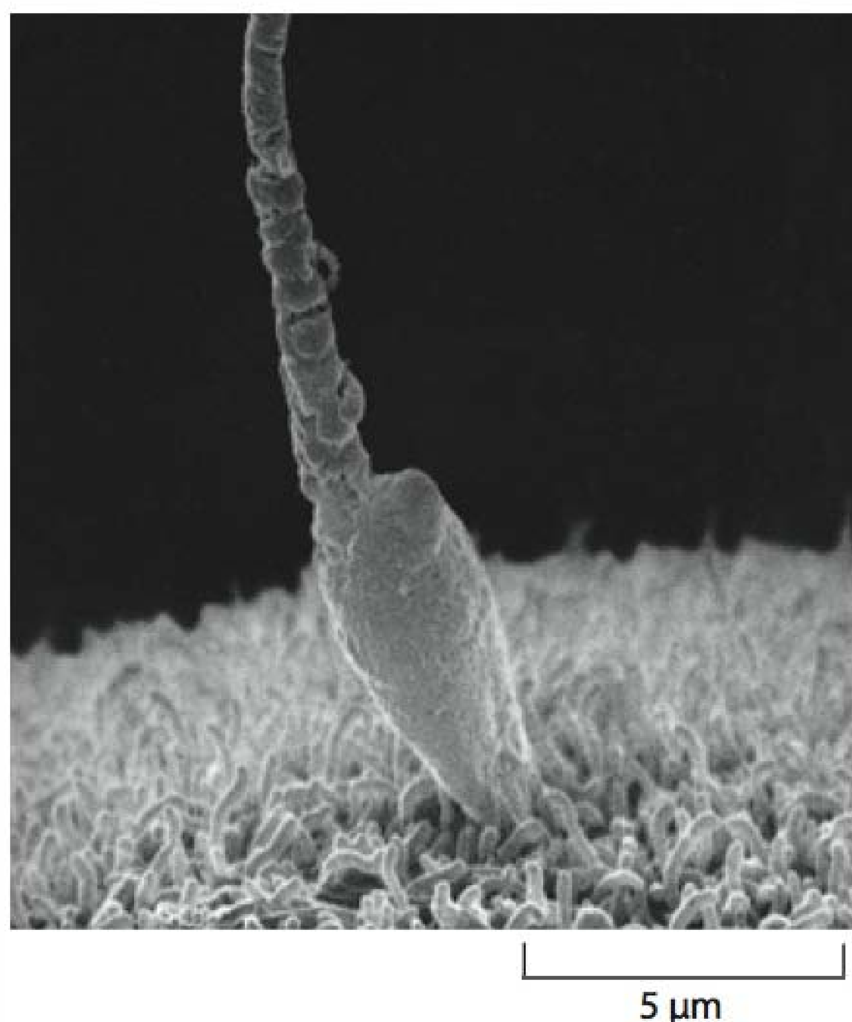


Figura 21-32 Eletromicrografia de varredura de um espermatozoide humano fazendo contato com um oócito de hamster. A zona pelúcida do oócito foi removida, expondo a membrana plasmática que contém numerosas microvilosidades. A habilidade do espermatozoide de um indivíduo penetrar os oócitos de hamster é usada como um teste de fertilidade masculina; a penetração de mais de 10 a 25% dos oócitos é considerada normal. (Cortesia de David M. Phillips.)

Espermatozoides capacitados ligam-se à zona pelúcida e sofrem uma reação acrossômica

Durante a ovulação, oócitos mamíferos são liberados do ovário para dentro da cavidade peritoneal próximo à entrada do oviduto, para dentro do qual eles são levados rapidamente. Eles estão cobertos com várias camadas de células da granulosa embebidas em uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico (discutido no Capítulo 19). As células da granulosa podem ajudar o oócito a ser recolhido para dentro do oviduto, e elas também podem secretar sinais químicos não-identificados que atraem os espermatozoides para o oócito.

Encontrando um oócito, um espermatozoide capacitado precisa penetrar as camadas de células da granulosa, utilizando uma enzima hialuronidase presente na superfície do espermatozoide. Então, ele pode se ligar à **zona pelúcida** (ver Figura 21-22). Normalmente, a zona pelúcida funciona como uma barreira à fecundação entre espécies, e a remoção dela frequentemente elimina essa barreira. Espermatozoides humanos, por exemplo, fecundarão oócitos de hamster que tiveram sua zona removida com enzimas específicas; obviamente, tais zigotos híbridos não se desenvolvem. Algumas vezes, oócitos de hamster sem zona são utilizados em clínicas de infertilidade para avaliar a capacidade fecundante de espermatozoides humanos *in vitro* (**Figura 21-32**).

A zona pelúcida da maioria dos oócitos de mamíferos é composta principalmente por três glicoproteínas, as quais são todas produzidas exclusivamente pelo oócito em crescimento. Duas delas, ZP2 e ZP3, agrupam-se em filamentos longos, enquanto a outra, ZP1, faz ligações entrecruzadas dos filamentos em uma rede tridimensional. A proteína ZP3 é fundamental: fêmeas de camundongos com um gene *Zp3* inativado produzem oócitos sem uma zona pelúcida e são inférteis. Os oligossacarídeos específicos O-ligados na ZP3 parecem ser responsáveis, ao menos em parte, pela ligação espécie-específica do espermatozoide à zona. Entretanto, a ligação do espermatozoide à zona é complexa e envolve tanto mecanismos dependentes quanto independentes de ZP3, assim como uma variedade de proteínas na superfície do espermatozoide.

A zona induz o espermatozoide a sofrer a **reação de acrossomo** (ou **reação acrossômica**), na qual o conteúdo do acrossomo é liberado por exocitose (**Figura 21-33**). A reação de acrossomo é necessária à fecundação normal, pois expõe várias enzimas hidrolíticas que talvez ajudem o espermatozoide a abrir o túnel através da zona pelúcida, e altera a superfície do espermatozoide de maneira que ele possa se ligar e se fundir à membrana plasmática do oócito, como discutiremos a seguir. A ZP3 purificada *in vitro* pode disparar a reação de acrossomo, possivelmente por ativação de um receptor semelhante à lecitina na superfície do espermatozoide, que parece ser uma forma transmembrana da enzima galactosil-transferase. A ativação do receptor leva a um aumento no Ca^{2+} no citosol do espermatozoide, o qual inicia a exocitose.

O mecanismo de fusão espermatozoide-oócito ainda é desconhecido

Depois de um espermatozoide sofrer a reação acrossômica e penetrar a zona pelúcida, ele liga-se à membrana plasmática do oócito, inclinando-se sobre as extremidades das microvilosidades na superfície do gameta feminino (ver Figura 21-32). O espermatozoide liga-se inicialmente por sua extremidade anterior e, depois, por sua porção lateral (ver Figura 21-33). Rapidamente as microvilosidades vizinhas sobre a superfície do oócito se alongam e se agrupam em torno do espermatozoide para assegurar que este seja aderido de forma firme até que possa fundir-se ao oócito. Depois da fusão, todos os componentes do espermatozoide são atraídos para dentro do oócito, à medida que as microvilosidades são reabsorvidas.

Os mecanismos moleculares responsáveis pela ligação e fusão espermatozoide-oócito são em grande parte desconhecidos, embora, após um número de ativações artificiais, duas proteínas de membrana têm sido apontadas como necessárias à fusão. Uma é a proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas, específica do espermatozoide, chamada de *Izumo* (em função de um santuário japonês dedicado ao casamento). Ela torna-se exposta na superfície do espermatozoide de camundongo e humano durante a reação de acrossomo. Anticorpos anti-Izumo impedem a fusão, e espermatozoides de camundongo deficientes de Izumo não podem se fundir a oócitos normais, porém ainda é desconhecida a forma como a Izumo promove a fusão espermatozoide-oócito. A única proteína na superfície do oócito que se demonstrou necessária à fusão com o espermatozoide é a proteína *CD9*, que é um membro da família *tetraspanina*, assim chamada porque essas proteínas têm quatro segmentos que transpõem a membrana. Espermatozoides normais não se fundem a oócitos de fêmeas de camundongo deficientes de CD9, indicando que a fusão espermatozoide-oócito depende de CD9, mas não se sabe como. A CD9 não atua sozinha na superfície do oócito para promover a

fusão: espermatozoides normais também não se fundem a oócitos tratados com uma enzima que remove proteínas fixadas à membrana plasmática por uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*) (discutido no Capítulo 10), indicando que uma ou mais proteínas ligadas ao GPI também são necessárias à fusão, embora a proteína ou as proteínas apropriadas já tenham sido identificadas.

A fusão do espermatozoide ativa o oócito por aumentar o Ca^{2+} no citosol

A fusão com o espermatozoide ativa o oócito, fazendo os grânulos corticais liberarem seu conteúdo por exocitose, em um processo chamado de *reação cortical*. A meiose, que estava retida em metáfase II, é concluída, produzindo um segundo corpúsculo polar e um zigoto, o qual começa a se desenvolver.

Um aumento de Ca^{2+} no citosol do oócito fecundado dispara todos estes eventos. Se a concentração de Ca^{2+} no citosol de um oócito não-fecundado é elevada artificialmente – diretamente por uma injeção de Ca^{2+} ou indiretamente pelo uso de um ionóforo contendo Ca^{2+} (discutido no Capítulo 11) – os oócitos de todos os animais até agora testados, incluindo os mamíferos, são ativados. Ao contrário, o impedimento do aumento no Ca^{2+} pela injeção de EGTA, um agente quelante de Ca^{2+}, inibe a ativação do oócito em resposta à fecundação.

Quando o espermatozoide funde-se à membrana plasmática do oócito de uma maneira normal, isso causa um aumento local no Ca^{2+} citosólico, que se difunde como uma onda através da célula (ver Figura 15-40). A onda se propaga por *feedback* positivo: a elevação no Ca^{2+} citosólico causa abertura dos canais de Ca^{2+}, permitindo que ainda mais Ca^{2+} entre no citosol. A onda inicial de liberação de Ca^{2+} normalmente é seguida, dentro de poucos minutos, por oscilações de Ca^{2+} (discutido no Capítulo 15), que persistem por várias horas.

O espermatozoide que realizou a fusão dispara a onda e as oscilações de Ca^{2+} por introduzir um fator dentro do citosol do oócito. A injeção de um espermatozoide intacto, de uma cabeça de espermatozoide ou de um extrato de espermatozoide dentro de um oócito faz o mesmo. Todos esses tratamentos aumentam a concentração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), o qual libera Ca^{2+} do retículo endoplasmático e inicia a onda e as oscilações de Ca^{2+} (discutido no Capítulo 15). Um candidato forte para ser o fator crítico que o espermatozoide mamífero introduz no oócito é uma forma de fosfolipase C específica de espermatozoides (PLCζ), que cliva diretamente o fosfoinositol 4,5-bifosfato ($PI[4,5]P_2$) para produzir IP_3 (e diacilglicerol) (ver Figura 15-39).

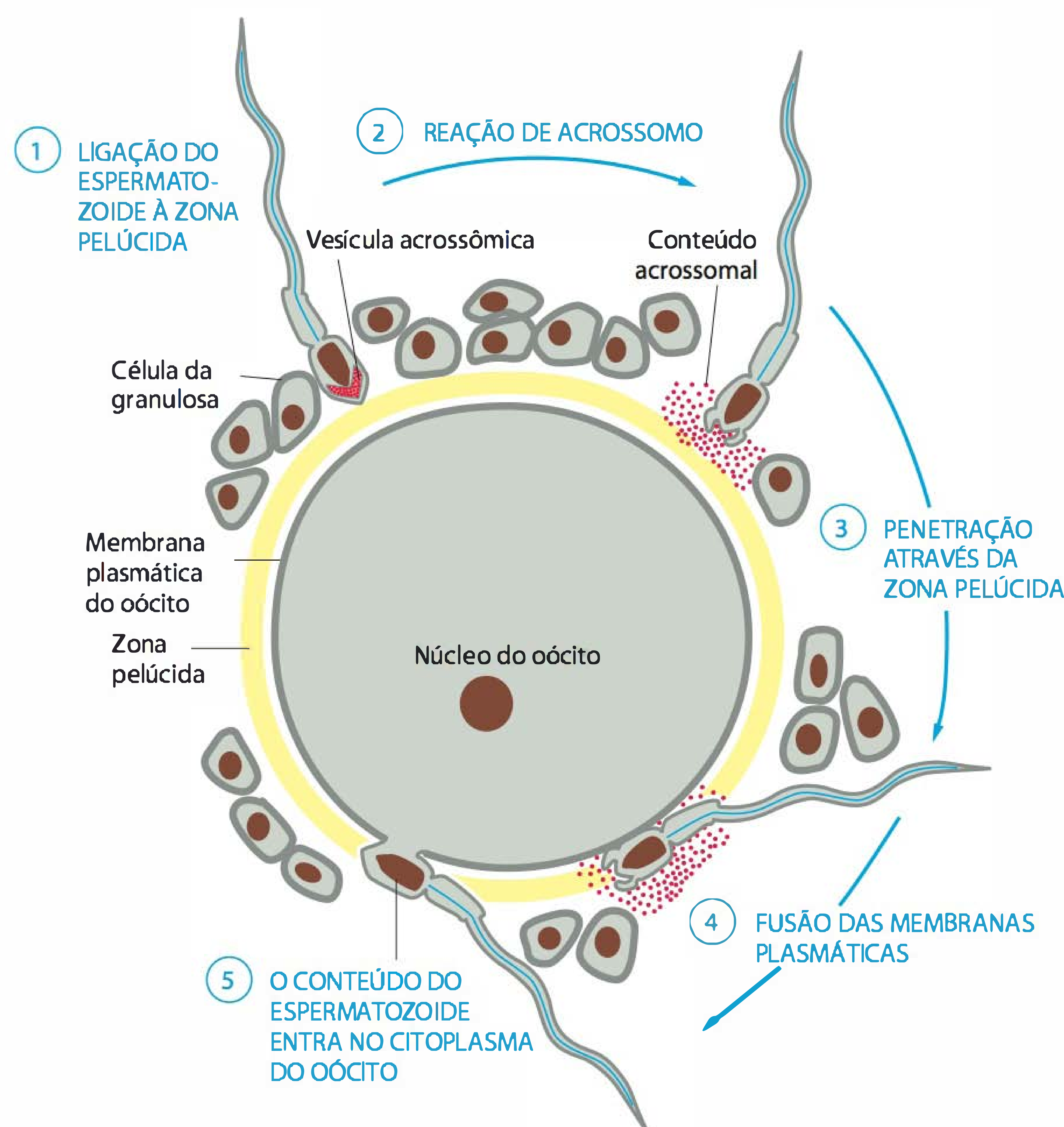


Figura 21-33 A reação de acrossomo que ocorre quando um espermatozoide de mamífero fecunda um oócito. Em camundongos, a zona pelúcida tem cerca de 6 μm de espessura, e o espermatozoide a atravessa a uma velocidade de cerca de 1 μm/min.

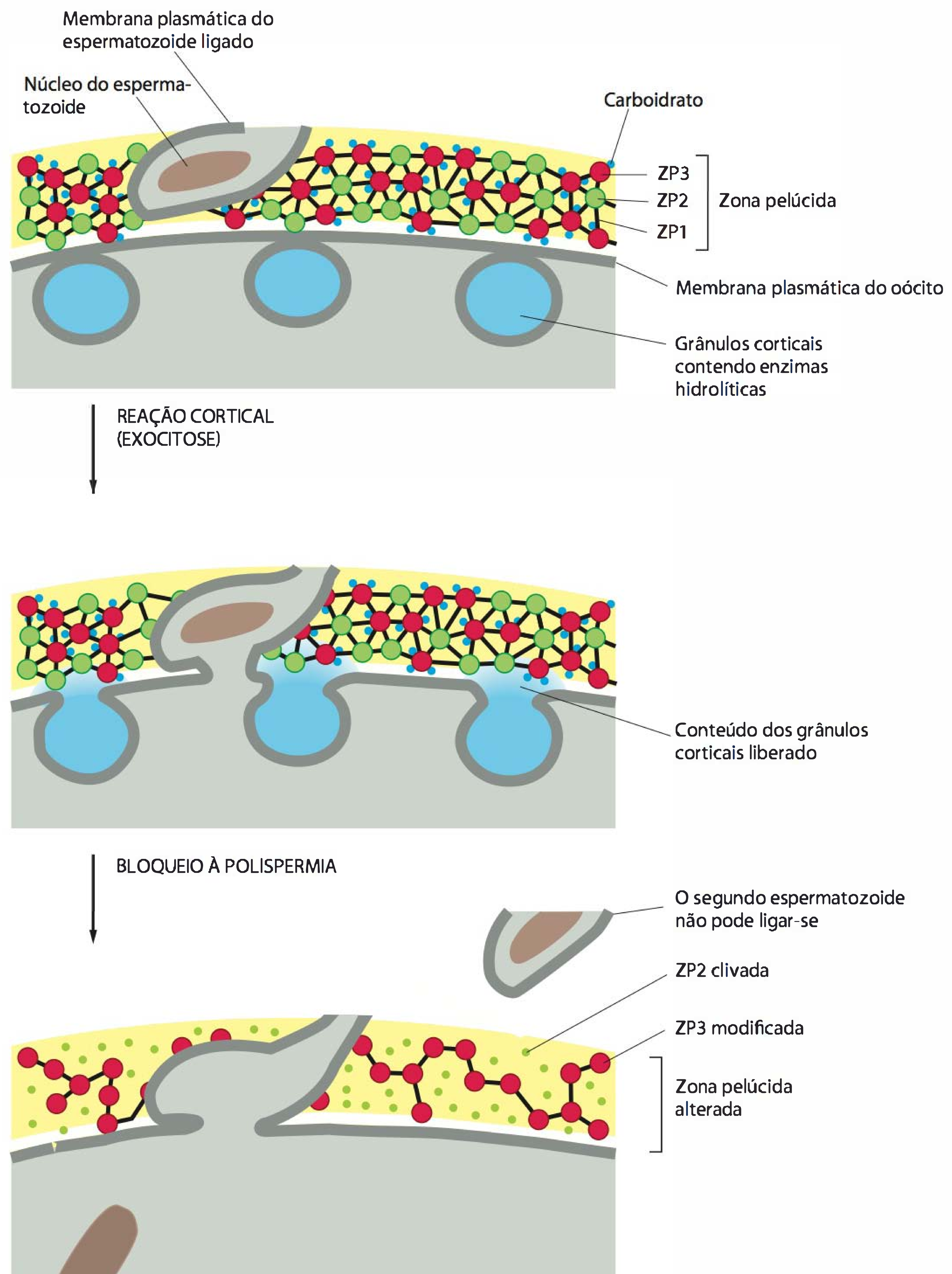


Figura 21-34 Esquema de como se acredita que a reação cortical em um oócito de camundongo evita que espermatozoides adicionais entrem no oócito. O conteúdo liberado dos grânulos corticais inativa a ZP3, de modo que ela não pode mais se ligar à membrana plasmática do espermatozoide. Ele também cliva parcialmente a ZP2, endurecendo a zona pelúcida de maneira que os espermatozoides não podem penetrá-la. Juntas, estas alterações promovem um bloqueio à poliespermia.

A reação cortical ajuda a garantir que apenas um espermatozoide fecunde o oócito

Embora muitos espermatozoides possam ligar-se a um oócito, normalmente apenas um funde-se à membrana plasmática do oócito e injeta seu citosol, núcleo e outras organelas no citoplasma do gameta feminino. Se mais de um espermatozoide fundir-se – uma situação chamada de *poliespermia* – são formados fusos mitóticos extra ou multipolares, resultando na segregação defeituosa dos cromossomos durante as primeiras divisões celulares mitóticas; células aneuploides são produzidas, e o desenvolvimento geralmente para.

Dois mecanismos funcionam para assegurar que apenas um espermatozoide fecunde o oócito. Primeiro, uma alteração na membrana plasmática do oócito, causada pela fusão do primeiro espermatozoide, evita que outros espermatozoides se fundam. Em oócitos de ouriço-do-mar, a alteração é uma despolarização rápida da membrana do oócito; em oócitos mamíferos, o mecanismo não é conhecido. O segundo bloqueio à polispermia é proporcionado pela **reação cortical** do oócito, a qual libera várias enzimas que alteram a estrutura da zona pelúcida, de modo que os espermatozoides não podem ligar-se ou penetrar nela. Entre as alterações que ocorrem na zona de mamíferos está a inativação de ZP3, de maneira que ela não possa mais se ligar a espermatozoides ou induzir uma reação de acrossomo; além disso, a ZP2 é clivada, o que ajuda de certa forma a tornar a zona impenetrável (**Figura 21-34**).

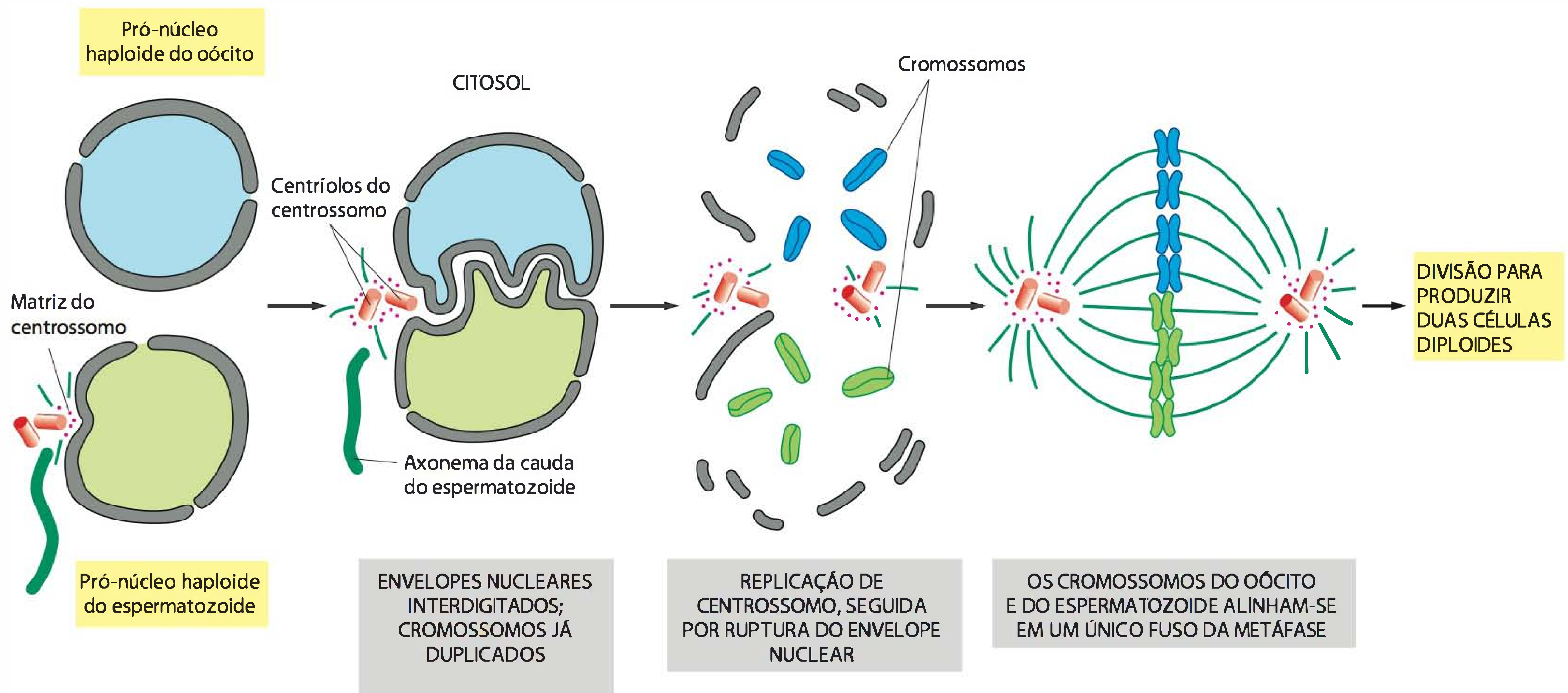


Figura 21-35 A aproximação dos pró-núcleos do espermatozoide e do oócito após a fecundação em mamíferos. Os pró-núcleos migram em direção ao centro do zigoto. Quando estão muito próximos, seus envelopes nucleares formam interdigitações. O centrossomo se duplica, os envelopes nucleares se rompem e, finalmente, os cromossomos de ambos os gametas são integrados em um fuso mitótico único, que organiza a primeira divisão (clivagem) do zigoto. (Adaptada de esquemas e de eletromicrografias fornecidas por Daniel Szöllösi.)

O espermatozoide fornece centríolos assim como seu genoma para o zigoto

Uma vez fecundado, o oócito é chamado de **zigoto**. No entanto, a fecundação não está completa até que os dois núcleos haploides (chamados de *pró-núcleos*) – um do oócito e o outro do espermatozoide – tenham se aproximado e combinado seus cromossomos em um único núcleo diploide. Em oócitos fecundados de mamíferos, os dois pró-núcleos não se fundem diretamente como ocorre em muitas outras espécies. Eles se aproximam um do outro, mas permanecem separados até depois que a membrana de cada pró-núcleo seja rompida em preparação à primeira divisão mitótica do zigoto (**Figura 21-35**).

Na maioria dos animais, incluindo os humanos, o espermatozoide contribui com mais do que seu genoma para o zigoto. Ele também fornece seus centríolos – estruturas que estão ausentes em oócitos humanos não-fecundados. Os centríolos do espermatozoide entram no oócito junto com o seu núcleo e a sua cauda, e um centrossomo se forma em torno deles. Nos humanos, o centrossomo se duplica e, então, os dois centrossomos resultantes auxiliam na organização do primeiro fuso mitótico no zigoto (**Figura 21-36**, e ver também Figura 21-35). Isso explica por que a poliespermia, na qual vários espermatozoides fornecem seus centríolos para o oócito, causa a formação de fusos mitóticos extra ou multipolares.

A fecundação *in vitro* e a injeção intracitoplasmática do espermatozoide estão revolucionando o tratamento da infertilidade humana

Cerca de 10% dos casais humanos têm a fertilidade diminuída, de forma que a mulher não se torna grávida após 12 a 18 meses mantendo relações sexuais sem utilizar métodos anticoncepcionais. Em aproximadamente metade destes casos, o homem é o problema, e na outra metade, é a mulher. Embora haja numerosas razões para a fertilidade diminuída tanto em homens quanto em mulheres, na grande maioria dos casos alguma forma de tecnologia de reprodução assistida pode resolver o problema.

O primeiro grande avanço no tratamento da infertilidade ocorreu em 1978, com o nascimento de Louise Brown, a primeira criança produzida por **fecundação *in vitro*** (**IVF**, *in vitro fertilization*). Antes deste sucesso, houveram debates acalorados sobre a ética e a segurança da IVF – excepcionalmente semelhantes aos debates éticos atuais sobre a produção e o uso de células-tronco embrionárias (ES) humanas. Agora, a IVF é um procedimento de rotina e tem mais de um milhão de crianças produzidas. Para iniciar o processo, geralmente a mulher é pré-tratada com hormônios para estimular a maturação simultânea de múltiplos

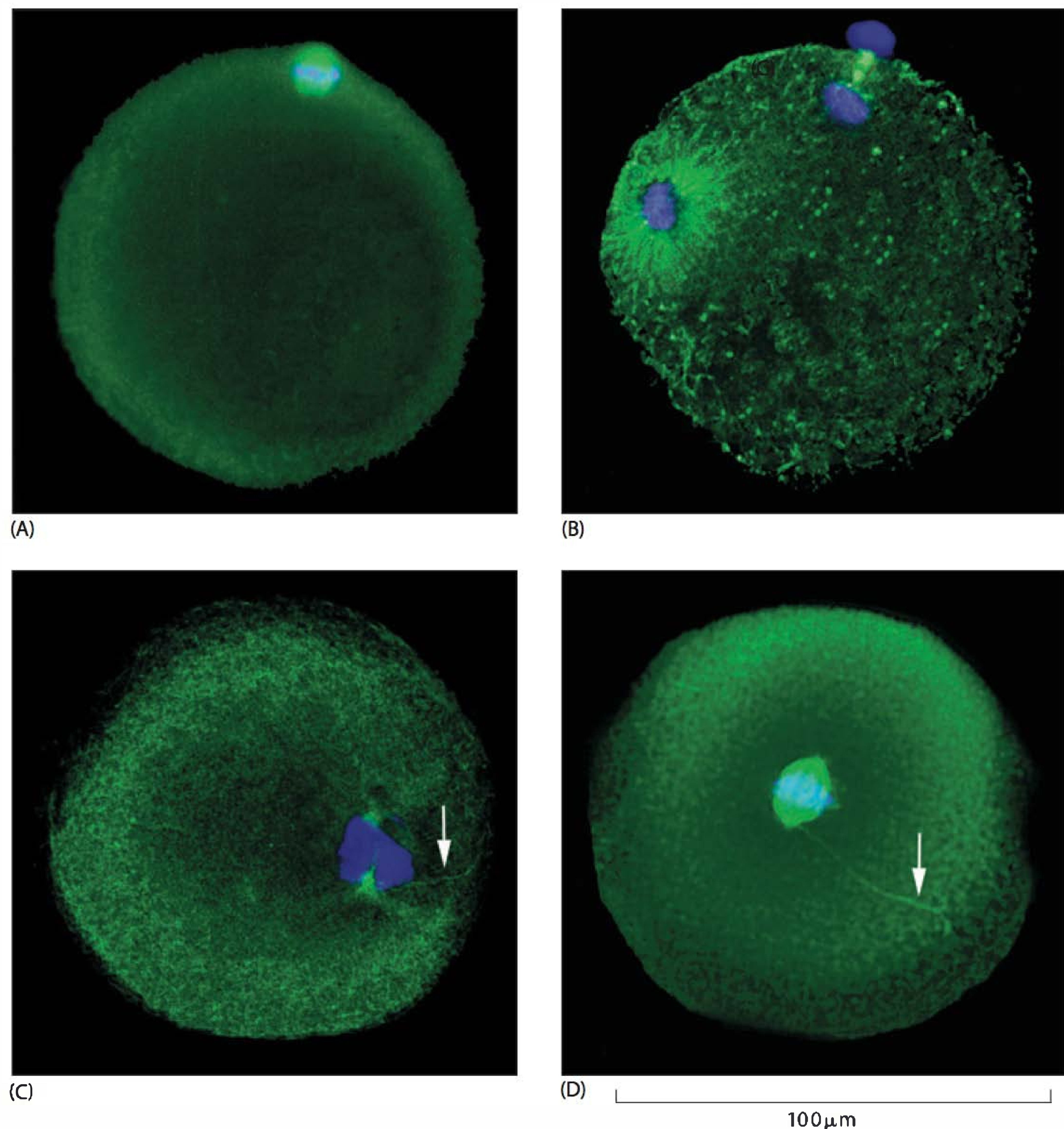


Figura 21-36 Fotomicrografias de imunofluorescência de pró-núcleos de espermatozoide e de oócito humanos aproximando-se após a fecundação *in vitro*. Os microtúbulos do fuso estão corados em *verde* com anticorpos anti-tubulina, e o DNA está marcado em *azul* com uma coloração específica. (A) Um fuso meiótico em um oócito secundário maduro não-fecundado. (B) Um oócito fecundado, que está realizando a extrusão de seu segundo corpúsculo polar, cerca de cinco horas após a fusão com um espermatozoide. A cabeça do espermatozoide (*à esquerda*) está cercada por uma série de microtúbulos. Os pró-núcleos do oócito e do espermatozoide ainda estão muito distantes. (C) Os dois pró-núcleos estão se aproximando. (D) Cerca de 16 horas após a fusão dos gametas, o centrossomo que entrou no oócito com o espermatozoide está duplicado, e os centrossomos-filhos organizaram um fuso mitótico bipolar. Os cromossomos de ambos os pró-núcleos estão alinhados na placa metafásica do fuso. Como é indicado pelas setas em (C) e (D), a cauda do espermatozoide ainda está associada a um dos centrossomos. (De C. Simerly et al., *Nat. Med.*1: 47-53, 1995. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

oócitos. Logo antes de serem liberados pela ovulação, os oócitos são recolhidos do ovário (utilizando-se uma agulha longa introduzida através da vagina) e são fecundados em placas de cultivo com os espermatozoides do homem. Após poucos dias em cultivo, 2 ou 3 dos embriões precoces de melhor aparência morfológica são transferidos com um cateter para dentro do útero da mulher; os embriões restantes normalmente são mantidos congelados em nitrogênio líquido, para implantações posteriores, se necessário. A principal complicação da IVF é a gestação múltipla, que ocorre em mais de 30% dos casos, se comparada com cerca de 2% em gestações naturais.

O procedimento de IVF descrito há pouco tem permitido a muitas mulheres, inférteis anteriormente, produzir crianças normais. Entretanto, a IVF não resolve o problema para homens inférteis que geralmente produzem espermatozoides anormais ou em quantidade muito pequena. O segundo avanço, que ocorreu em 1992, forneceu a solução para a maior parte destes homens. Nesta modificação da IVF, chamada de **injeção intracitoplasmática do espermatozoide** (**ICSI**, *intracytoplasmic sperm injection*), um oócito é fecundado pela injeção de um único espermatozoide dentro dele (**Figura 21-37**). Esta estratégia elimina a necessidade de um número grande de espermatozoides móveis e evita os muitos obstáculos que normalmente um espermatozoide tem de passar para fecundar um oócito, incluindo capacitação, migração até o oócito, reação de acrossomo, passagem através da zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito. A ICSI tem uma taxa de sucesso de mais de 50% e tem mais de 100.000 crianças produzidas.

Além de revolucionar o tratamento da infertilidade, a IVF abriu caminho para muitas possibilidades novas na manipulação do processo reprodutivo. Por exemplo, ela tem tornado possível aos pais portadores de genes defeituosos prevenir a passagem do gene para seus filhos, por meio da triagem dos embriões IVF portadores do gene antes da implantação deles no útero.



Figura 21-37 Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Fotomicrografia de luz de um oócito secundário humano sendo sustentado por uma pipeta de sucção (à esquerda) e injetado com um único espermatozoide humano por intermédio de uma agulha de vidro. A zona pelúcida reveste o oócito e o corpúsculo polar. (Cortesia de Reproductive Biology Associates, Atlanta, Geórgia.)

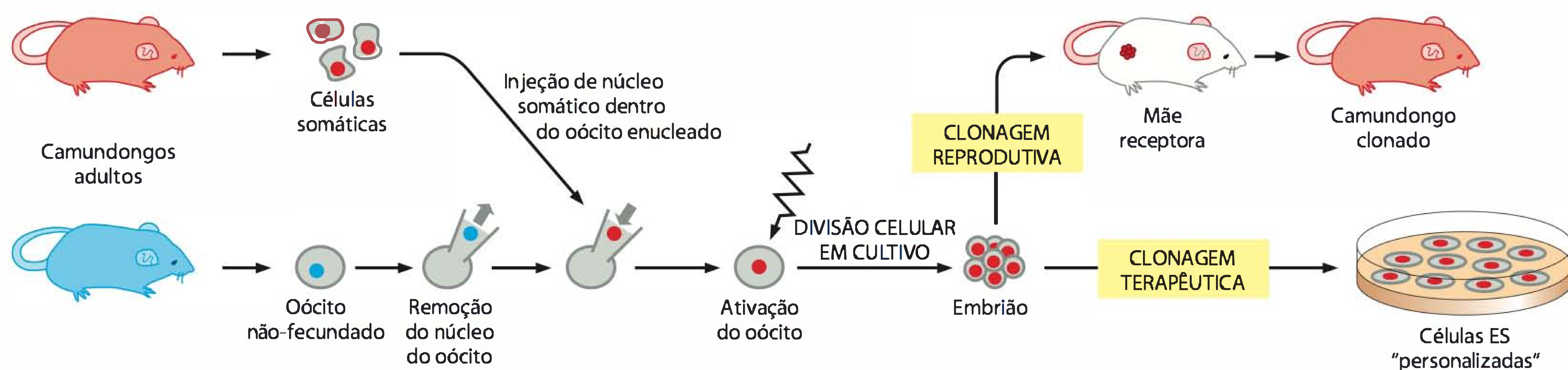


Figura 21-38 Diferença entre clonagem reprodutiva e a preparação de células tronco embrionárias "personalizadas". Em ambos os casos, se produz um embrião reconstruído pela remoção (ou destruição) do núcleo de um oócito não-fecundado e pela substituição deste pelo núcleo de uma célula somática do animal a ser clonado. O oócito reconstruído é ativado por um choque elétrico para se desenvolver. Na *clonagem reprodutiva*, o embrião que se desenvolve em cultivo é transplantado para o útero de uma mãe receptora e dá origem a um animal cionado. Ao contrário, na preparação de células tronco embrionárias (ES) personalizadas – algumas vezes chamada de *clonagem terapêutica* – o embrião é usado para produzir células ES em cultivo e estas, então, podem ser utilizadas para produzir vários tipos celulares especializados para o tratamento do indivíduo que forneceu o núcleo somático; como as células especializadas produzidas por estas células ES são geneticamente idênticas à doadora do núcleo somático, elas não serão rejeitadas pelo sistema imunológico.

Como discutido antes, técnicas *in vitro* para manipulação de oócitos de mamíferos têm tornado possível produzir clones de muitos tipos de mamíferos, pela transferência do núcleo de uma célula somática do animal a ser clonado para dentro de um oócito não-fecundado que tenha tido seu próprio núcleo removido ou destruído. Este não é um procedimento fácil; a taxa de sucesso é baixa, e ainda é incerto se um humano poderia ser clonado de maneira semelhante. Além disso, há argumentos éticos sérios em relação a se alguém deveria, em algum momento, tentar clonar um humano. No entanto, há o entendimento geral de que não deveria ser tentado com a tecnologia existente, pois a probabilidade de produzir uma criança anormal é alta; na verdade, muitos países e estados americanos têm feito a tentativa ilegal.

Entretanto, tal *clonagem reprodutiva* não deveria ser confundida com *clonagem terapêutica*, na qual o embrião precoce produzido *in vitro* a partir de tal zigoto reconstituído não é implantado em um útero para produzir um novo indivíduo, mas, em vez disso, é usado para fazer células ES que são geneticamente idênticas à doadora do núcleo somático (**Figura 21-38**). Vários tipos de células especializadas produzidas a partir de tais células ES "personalizadas" poderiam, então, ser usados para tratar o doador, evitando o problema da rejeição imunológica associada à utilização de células derivadas de células ES geneticamente diferentes. Evidentemente, as sociedades teriam que tomar algumas decisões difíceis sobre até onde elas estão dispostas a ir na exploração destas tecnologias novas para manipular o processo reprodutivo para o possível benefício dos indivíduos. Alternativamente, poderia ser possível, no futuro, produzir células semelhantes a ES personalizadas por caminhos que evitem estes dilemas éticos: por exemplo, em experimentos recentes, a engenharia genética foi usada para expressar em fibroblastos de camundongo em cultivo várias proteínas reguladoras de genes normalmente expressas em células ES; quando quatro destes transgenes foram expressos simultaneamente, os fibroblastos comportaram-se de forma muito semelhante a células ES.

A fecundação marca o início de um dos mais admiráveis fenômenos em toda a biologia – o processo de embriogênese, no qual o zigoto se desenvolve em um novo indivíduo. Este é o assunto do próximo capítulo.

Resumo

A fecundação em mamíferos inicia normalmente quando um espermatozoide, que tenha sofrido capacitação no trato reprodutor feminino, liga-se à zona pelúcida que envolve um oócito no oviduto. Esta ligação induz o espermatozoide a sofrer uma reação de acrossomo, liberando o conteúdo da vesícula acrossômica, que se imagina ser capaz de ajudar o espermatozoide a abrir (por digestão enzimática) seu caminho através da zona. A reação de acrossomo também é necessária para o espermatozoide ligar-se e fundir-se à membrana plasmática do oócito. A fusão do espermatozoide com o oócito induz uma onda e oscilações de Ca^{2+} *no citosol do oócito, que ativam o gameta feminino. A ativação inclui a reação cortical do oócito, na qual os grânulos corticais liberam seu conteúdo, o qual altera a zona pelúcida de modo que outros espermatozoides não podem ligar-se ou penetrar nela. A sinalização de* Ca^{2+} *também dispara o desenvolvimento do zigoto, que começa depois que os dois pró-núcleos haploides se aproximam e alinham seus cromossomos em um fuso mitótico único, que intermedeia a primeira divisão mitótica do zigoto. Muitos casais previamente inférteis agora podem se reproduzir graças à IVF e à ICSI.*

REFERÊNCIAS

Gerais

Austin CR and Short RV eds (1984) Reproduction in Mammals Vol I Germ Cells and Fertilization 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Gilbert SF (2006) Developmental Biology 8th ed pp 175–210, 529–554, 593–626. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Visão geral de reprodução sexuada

Cavalier-Smith T (2002) Origins of the machinery of recombination and sex. *Heredity* 88:125–41.

Charlesworth B (2006) The evolutionary biology of sex. *Curr Biol* 16:R693–R695.

Hoekstra RF (2005) Evolutionary biology: why sex is good. *Nature* 434:571–573.

Maynard Smith J (1978) Evolution of Sex. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Meiose

Blat Y, Protacio RU, Hunter N and Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* 111:791–802.

Börner GV, Kleckner N and Hunter N (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117:29–45.

De Massy B (2003) Distribution of meiotic recombination sites. *Trends Genet* 19:514–522.

Gerton JL, and Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Rev Genet* 6:477–487.

Hall H, Hunt P and Hassold T (2006) Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16:323–329.

Hauf S and Watanabe Y (2004) Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 119:317–327.

Hunt PA and Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181–2183.

Jordan P (2006) Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. *Biochem Soc Trans* 34:545–549.

Nasmyth K (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 35:673–745.

Page SL and Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:525–558.

Petronczki M, Siomos MF and Nasmyth K (2003) Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112:423–440.

Células germinativas primordiais e determinação do sexo em mamíferos

Bowles J, Knight D, Smith C et al (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312:596–600.

Extavour CG and Akam M (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 130:5869–5884.

Goodfellow PN and Lovell-Badge R (1993) SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27:71–92.

Knower KC, Kelly S and Harley VR (2003) Turning on the male—SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res* 101:185–198.

McLaren A (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262:1–15.

Morrish BC and Sinclair AH (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124:447–457.

Surani MA, Ancelin K, Hajkova P et al (2004) Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69:1–9.

Tilmann C and Capel B (2002) Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 57:1–18.

Oócitos

Gosden RG (2002) Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186149–186153.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM and Eppig JJ (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178–2180.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H et al (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414–424.

Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES (2004) Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res* 105:228–234.

Espermatozoides

Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198–236.

Moreno RD and Alvarado CP (2006) The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev* 73:1430–1434.

Ogawa T, Ohmura M and Ohbo K (2005) The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 82:381–388.

Toshimori K (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 61:1–6.

Fecundação

De Jonge C (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11:205–214.

Hafez ES, Goff L and Hafez B (2004) Mammalian fertilization, IVF, ICSI:physiological/molecular parameters, clinical application. *Arch Androl* 50:69–88.

Jaenisch R (2004) Human Cloning—The Science and Ethics of Nuclear Transplantation. *N Eng J Med* 351:2787–2791.

Shur BD, Rodeheffer C and Ensslin MA (2004) Mammalian fertilization. *Curr Biol* 14:R691–692.

Stein KK, Primakoff P and Myles D (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 117:6269–6274.

Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.

Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N and Shalgi R (2006) When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *MolCell Endocrinol* 252:107–114.

Wassarman PM (2005) Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* 204:388–391.

Whitaker M (2006) Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 86:25–88.

Desenvolvimento de Organismos Multicelulares

22

Neste capítulo

MECANISMOS UNIVERSAIS DE DESENVOLVIMENTO ANIMAL 1305

CAENORHABDITIS ELEGANS: O DESENVOLVIMENTO A PARTIR DA PERSPECTIVA DE UMA CÉLULA INDIVIDUAL *1321*

DROSOPHILA E A GENÉTICA MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE PADRÕES: A GÊNESE DO PLANO CORPORAL 1328

GENES SELETORES HOMEÓTICOS E A FORMAÇÃO DE PADRÕES DO EIXO ÂNTERO-POSTERIOR 1341

ORGANOGÊNESE E A FORMAÇÃO DOS PADRÕES DOS ÓRGÃOS ACESSÓRIOS 1347

MOVIMENTOS CELULARES E A DETERMINAÇÃO DA FORMA DO CORPO DOS VERTEBRADOS 1363

O CAMUNDONGO 1378

DESENVOLVIMENTO NEURAL 1383

DESENVOLVIMENTO VEGETAL 1398

Um animal ou planta inicia a sua vida como uma célula única – um óvulo fertilizado. Durante o desenvolvimento, esta célula divide-se repetidamente para produzir muitas células diferentes em um padrão final de complexidade e precisão espetaculares. Em última análise, o genoma determina o padrão, e o quebra-cabeça da biologia do desenvolvimento é entender como ele o faz.

O genoma normalmente é idêntico em todas as células; as células diferem não porque contenham informações genéticas diferentes, mas porque expressam conjuntos diferentes de genes. Esta expressão genética seletiva controla os quatro processos essenciais de construção do embrião: (1) *proliferação celular*, produção de muitas células a partir de uma, (2) *especialização celular*, criação de células com diferentes características em diferentes posições, (3) *interações celulares*, coordenação do comportamento de uma célula com o de suas vizinhas, e (4) *movimentos celulares*, rearranjo das células para formar tecidos e órgãos estruturados (**Figura 22-1**).

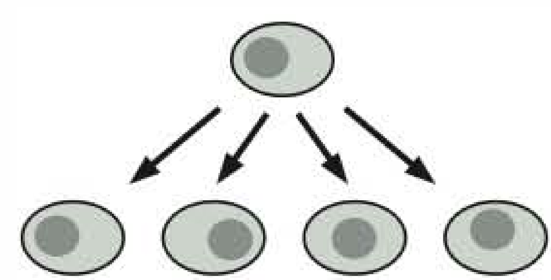
Em um embrião em desenvolvimento, todos os processos estão acontecendo ao mesmo tempo, em uma variedade caleidoscópica de maneiras diferentes, em partes distintas do organismo. Para entender as estratégias básicas do desenvolvimento, teremos que limitar o nosso foco. Em particular, precisamos entender o curso de eventos a partir do ponto de vista de uma célula individual e como o genoma atua nessa célula. Não há um oficial em comando mantendo-se fora do combate para direcionar as tropas; cada uma das milhões de células no embrião precisa tomar as suas próprias decisões, de acordo com a sua própria cópia de instruções genéticas e suas circunstâncias particulares.

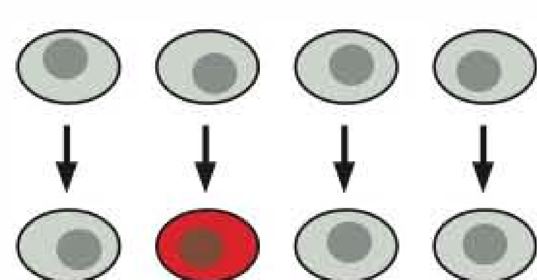
A complexidade dos animais e das plantas depende de uma característica extraordinária do sistema de controle genético. As células possuem uma memória: os genes que uma célula expressa e a maneira como ela se comporta dependem do seu passado e do seu ambiente presente. As células do corpo – as células musculares, os neurônios, as células da pele, as células do intestino, e assim por diante – mantêm as suas características especializadas não porque elas recebem continuamente as mesmas instruções do seu meio, mas porque elas retêm um registro dos sinais que as suas ancestrais receberam em um desenvolvimento embrionário inicial. Os mecanismos moleculares de memória celular foram introduzidos no Capítulo 7. Neste capítulo abordaremos as suas consequências.

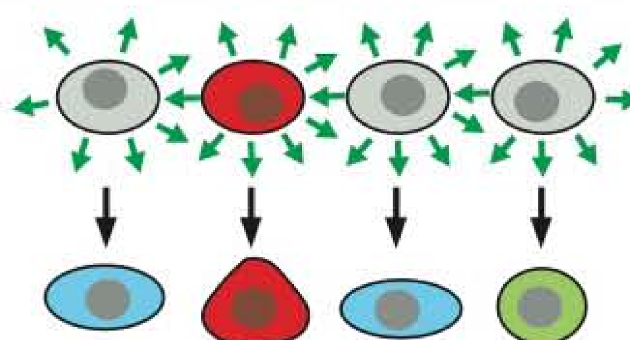
MECANISMOS UNIVERSAIS DE DESENVOLVIMENTO ANIMAL

Existem em torno de 10 milhões de espécies de animais, e eles são fantasticamente variados. Ninguém espera que o verme, a mosca, a águia e a lula gigante tenham sido gerados pelos mesmos mecanismos de desenvolvimento, assim como não se espera que os mesmos métodos tenham sido usados para fazer um sapato e um avião. Alguns princípios similares abstratos devem estar envolvidos, talvez, mas com certeza não as mesmas moléculas específicas.

Uma das revelações mais impressionantes dos últimos 10 ou 20 anos foi que as nossas suspeitas iniciais estavam erradas. De fato, muito da maquinaria básica de desenvolvimento é essencialmente a mesma, não somente em todos os vertebrados, mas também em todos os maiores filos de invertebrados. As moléculas reconhecidamente semelhantes e evolutivamente relacionadas definem nossos tipos celulares especializados, marcam as diferenças entre as regiões do corpo e auxiliam a criar o padrão corporal. As proteínas homólogas são, com frequência, funcionalmente intercambiáveis entre espécies muito diferentes. Uma proteína de camundongos produzida de maneira artificial em uma mosca pode, frequentemente, realizar a mesma função da própria versão da proteína da mosca, e vice-versa, con-







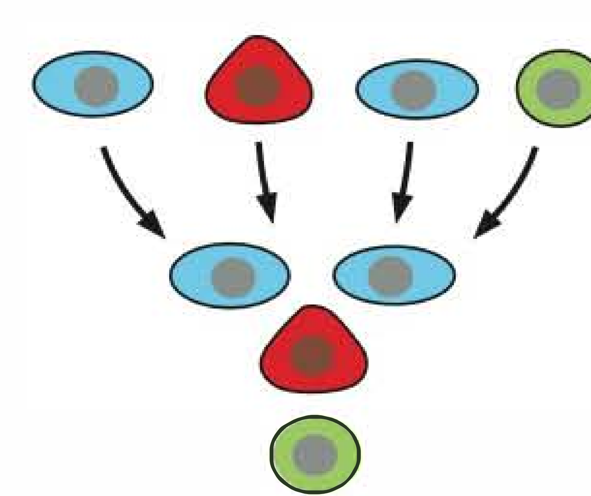


Figura 22-1 Os quatro processos essenciais pelos quais um organismo multicelular é feito: proliferação celular, especialização celular, interação celular e movimento celular.

trolando de forma eficaz o desenvolvimento de um olho, por exemplo, ou a arquitetura do cérebro (**Figura 22-2**). Graças a esta unidade fundamental do mecanismo, como veremos, os biólogos do desenvolvimento estão agora caminhando em direção a um entendimento coerente do desenvolvimento animal.

As plantas pertencem a um reino separado: elas desenvolveram seus organismos multicelulares independentemente dos animais. Também pode ser dada uma explicação unificada para o seu desenvolvimento, porém diferente da dos animais. Os animais serão o nosso principal interesse neste capítulo, mas retornaremos para as plantas, de maneira breve, no final.

Começaremos pela revisão de alguns princípios gerais básicos do desenvolvimento animal e pela introdução das sete espécies animais que os biólogos do desenvolvimento adotaram como os seus organismos-modelo principais.

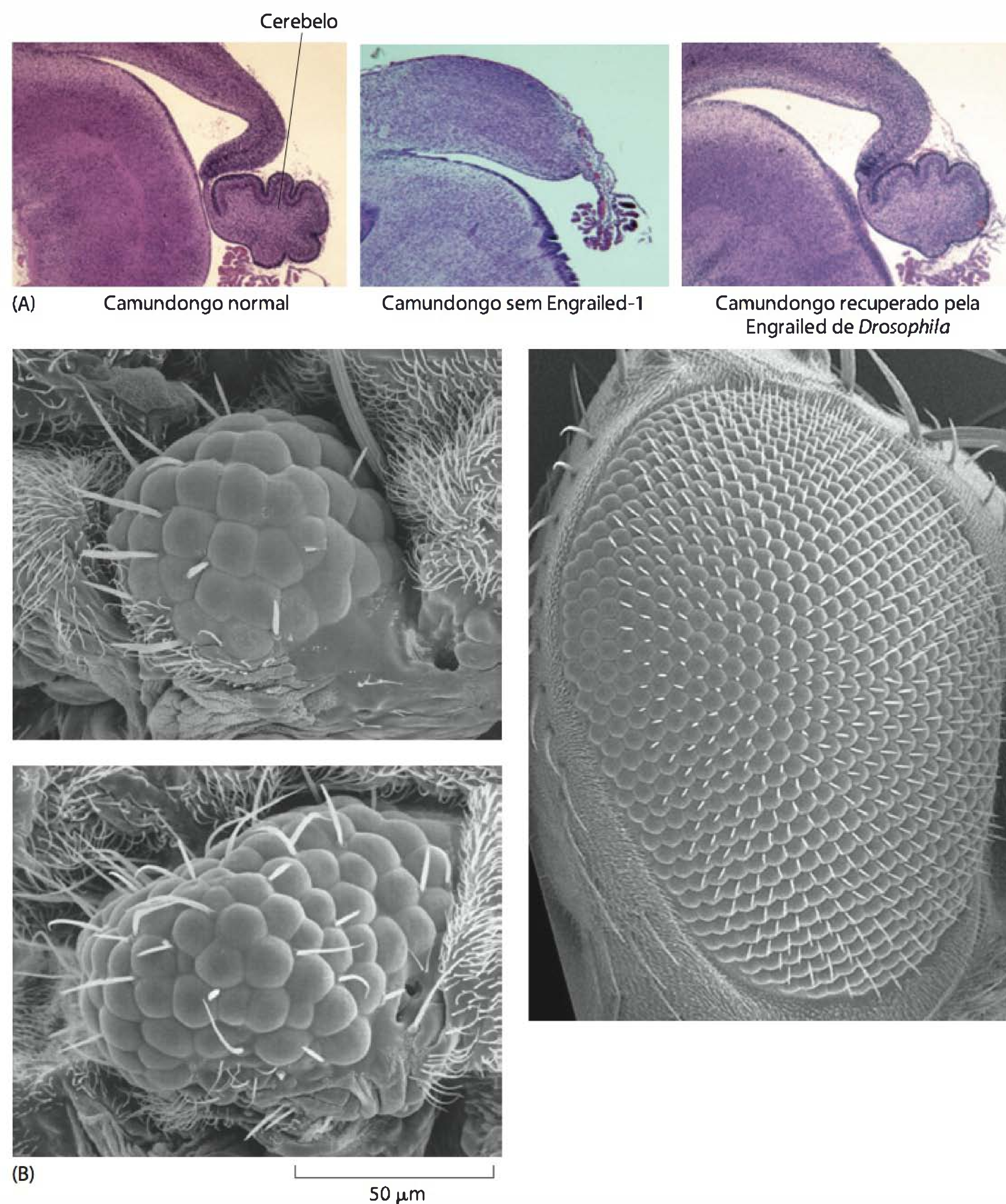


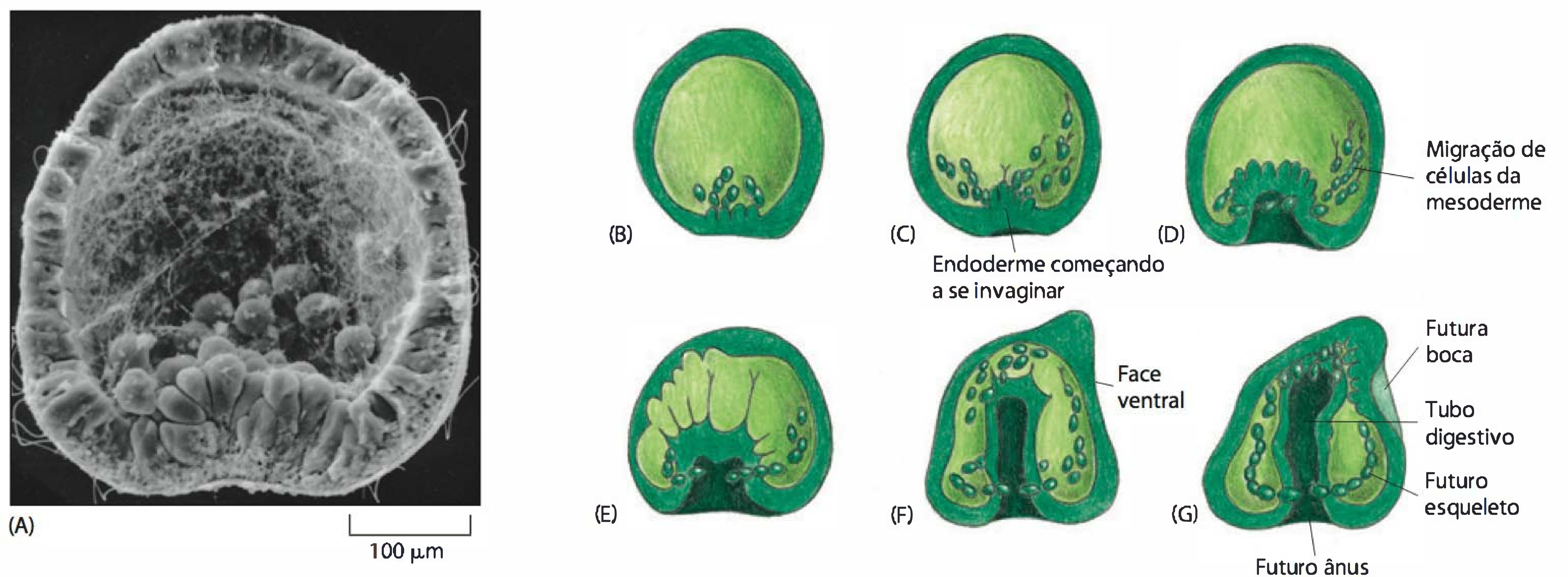
Figura 22-2 Proteínas homólogas funcionando de maneira intercambiável no desenvolvimento de camundongos e de moscas. (A) Uma proteína de mosca utilizada em um camundongo. A sequência de *Drosophila* de DNA codificante para a proteína Engrailed (uma proteína de regulação gênica) pode ser substituída pela sequência codificante correspondente da proteína Engrailed-1 de camundongo. A perda de Engrailed-1 nos camundongos causa um defeito em seus cérebros (o cerebelo não se desenvolve); a proteína de *Drosophila* atua como um substituto eficiente, recuperando o camundongo transgênico da sua deformidade. (B) Uma proteína de molusco utilizada em uma mosca. A proteína Eyeless controla o desenvolvimento ocular de *Drosophila* e, quando sua expressão é alterada, pode induzir o desenvolvimento de um olho em um local anormal, como uma perna. A proteína homóloga, Pax6, de camundongo, de lula e praticamente de qualquer animal dotado de olhos, quando apresenta uma expressão alterada de forma semelhante em uma mosca transgênica, produz o mesmo efeito. As micrografias eletrônicas de varredura mostram uma região de tecido ocular na perna de uma mosca, resultante da expressão alterada do gene *Eyeless* de *Drosophila* (acima) e do *Pax6* de lula (abaixo). O painel à direita mostra, em uma amplificação menor, todo o olho de uma *Drosophila* normal, para comparação. (A, de M. C. Hanks et al., *Development* 125:4521-4530, 1998. Com permissão da The Company of Biologists; B, de S. I. Tomarev et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:2421-2426, 1997. Com permissão da National Academy of Sciences e cortesia de Kevin Moses.)

Os animais compartilham algumas características anatômicas básicas

As semelhanças entre as espécies animais em relação aos genes que controlam o desenvolvimento refletem a evolução dos animais a partir de um ancestral comum no qual esses genes já estavam presentes. Embora não saibamos como ele se parecia, o ancestral comum dos vermes, dos moluscos, dos insetos, dos vertebrados e de outros animais complexos tinha, necessariamente, muitos tipos celulares diferenciados que seriam reconhecidos por nós: células epidérmicas, por exemplo, formando uma camada externa protetora; células do intestino para absorver nutrientes da comida ingerida; células musculares para mover-se; neurônios e células sensoriais para controlar os movimentos. O corpo deve ter sido organizado com uma camada de pele cobrindo o exterior, uma boca para a alimentação e um tubo intestinal para reter e processar a comida – com músculos, nervos e outros tecidos arranjados no espaço entre a camada externa de pele e o tubo intestinal interno.

Essas características são comuns a quase todos os animais, e elas correspondem a um esquema anatômico básico de desenvolvimento. A célula-ovo – um depósito gigante de materiais – se divide, ou se **cliva**, para formar muitas células menores. Estas se aderem para criar uma camada epitelial voltada para o meio externo. Uma grande parte dessa camada permanece externa, constituindo a **ectoderme** – o precursor da epiderme e do sistema nervoso. Uma parte da camada dobra-se em direção ao interior para formar a **endoderme** – o precursor do intestino e de seus órgãos acessórios, como os pulmões e o fígado. Outro grupo de células move-se para o espaço entre a ectoderme e a endoderme e forma a **mesoderme** – o precursor dos músculos, dos tecidos conectivos e de vários outros componentes. Essa transformação de uma simples bola, ou esfera oca de células, em uma estrutura com tubo digestivo é chamada de **gastrulação** (da palavra grega para "barriga") e, de uma forma ou outra, é uma característica quase universal do desenvolvimento animal. A **Figura 22-3** ilustra o processo como é visto no ouriço-do-mar.

A evolução tem se diversificado, com base nos fundamentos moleculares e anatômicos que descrevemos neste capítulo, para produzir a maravilhosa variedade de espécies dos dias de hoje. Contudo, a conservação geral dos genes e dos mecanismos significa que, ao estudar o desenvolvimento de um animal, muito frequentemente são encontrados indícios gerais do



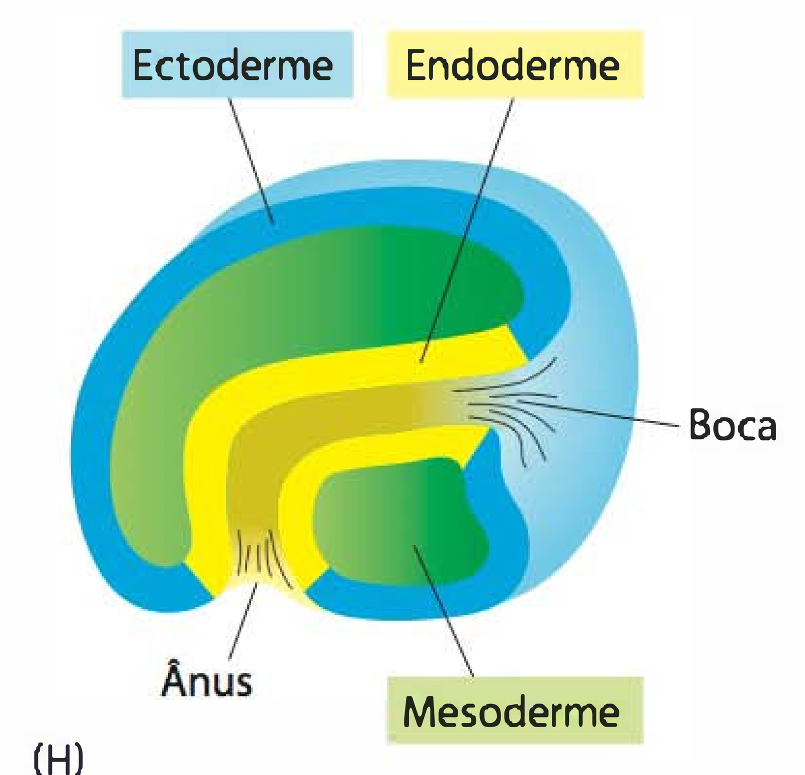


Figura 22-3 Gastrulação no ouriço-do-mar. Um ovo fertilizado divide-se para produzir uma blástula – uma esfera oca de células epiteliais circundando uma cavidade. Então, no processo de gastrulação, algumas células dobram-se para o interior para formar o intestino e outros tecidos internos. (A) Micrografia eletrônica de varredura mostrando o início da migração do epitélio. (B) Representação mostrando como um grupo de células se separa do epitélio para constituir a mesoderme. (C) Estas células migram para a face interna da parede da blástula. (D) Enquanto isso, o epitélio continua a dobrar-se para a região interna para formar a endoderme. (E e F) A endoderme invaginada estende-se em um longo tubo digestivo. (G) O final do tubo digestivo faz contato com a parede da blástula no local da futura abertura da boca. Aqui a ectoderme e a endoderme irão fusionar-se, e será formada uma abertura. (H) O plano corporal básico animal, com uma camada de ectoderme na parte exterior, um tubo de endoderme na parte de dentro e a mesoderme encaixada entre eles. (A, de R. D. Burke et al., *Dev. Biol.* 146:542-557, 1991. Com permissão da Academic Press; B-G, conforme L. Wolpert e T. Gustafson, *Endeavour* 26:85-90, 1967. Com permissão de Elsevier.)

desenvolvimento de vários outros tipos de animais. Como resultado, os biólogos do desenvolvimento da atualidade, assim como os biólogos celulares, podem se dar ao luxo de estudar questões fundamentais na espécie que ofereça o caminho mais fácil para uma resposta.

Os animais multicelulares são ricos em proteínas que fazem a mediação das interações celulares e da regulação gênica

O sequenciamento de genomas revela a extensão das semelhanças moleculares entre as espécies. O verme nematoide *Caenorhabditis elegans*, a mosca *Drosophila melanogaster* e o vertebrado *Homo sapiens* são os primeiros três animais para os quais foi obtida a sequência completa do genoma. Na árvore familiar da evolução animal, eles estão muito distantes uns dos outros: a linhagem que leva aos vertebrados divergiu daquela que leva aos nematoides, aos insetos e aos moluscos mais de 600 milhões de anos atrás. Apesar disso, quando os 20 mil genes do *C. elegans*, os 14 mil genes da *Drosophila* e os 25 mil genes dos humanos são sistematicamente comparados uns com os outros, é observado que em torno de 50% dos genes de cada uma das espécies possuem homólogos claramente reconhecíveis em uma ou nas outras duas espécies. Em outras palavras, as versões reconhecíveis de pelo menos 50% de todos os genes humanos já estavam presentes no ancestral comum dos vermes, das moscas e dos humanos.

Obviamente, nem tudo é conservado: existem alguns genes com funções-chave no desenvolvimento de vertebrados que não possuem homólogos no genoma de *C. elegans* ou de *Drosophila*, e vice-versa. Entretanto, o fato de existir uma grande proporção dos 50% dos genes que não possui homólogos identificáveis em outros filos não significa, simplesmente, que as suas funções são de menor importância. Embora esses genes não-conservados sejam transcritos e bem-representados em bibliotecas de DNA complementar (cDNA), os estudos de variabilidade de sequências de DNA e de aminoácidos dentro e entre as populações naturais indicam que esses genes podem, excepcionalmente, sofrer mutações sem comprometer seriamente a adaptabilidade; quando são inativados artificialmente, as consequências não são tão severas quanto seriam no caso dos genes que possuem homólogos em espécies que apresentam relações distantes. Uma vez que estes genes são livres para evoluir rapidamente, algumas dezenas de milhões de anos podem ser suficientes para destruir qualquer semelhança familiar, ou para permitir a sua perda do genoma.

Os genomas de diferentes classes de animais diferem também porque, como discutido no Capítulo 1, existem variações substanciais na extensão das duplicações gênicas: a quantidade de duplicações gênicas na evolução dos vertebrados tem sido particularmente grande; como resultado, um mamífero ou um peixe frequentemente possuem vários homólogos que correspondem a um único gene em um verme ou em uma mosca.

Apesar de tais diferenças, em uma primeira análise, podemos dizer que todos esses animais possuem um conjunto semelhante de proteínas a sua disposição para as suas funções-chave. Em outras palavras, eles constroem seus corpos usando, de maneira geral, o mesmo conjunto de partes moleculares.

Quais genes, então, são necessários para produzir um animal multicelular, além daqueles necessários para produzir uma única célula? A comparação dos genomas de animais com o de leveduras que se reproduzem por brotamento – um eucarioto unicelular – sugere que duas classes de proteínas são especialmente importantes para a organização multicelular. A primeira classe é a das moléculas transmembrana usadas para a adesão e a sinalização celular. Em torno de 2.000 genes de *C. elegans* codificam receptores de superfície celular, proteínas de adesão celular e canais iônicos que estão ausentes na levedura, ou presentes em número muito menor. A segunda classe é a das proteínas de regulação gênica: estas proteínas de ligação ao DNA são muito mais numerosas no genoma de *C. elegans* do que no de levedura. Por exemplo, a família básica hélice-alça-hélice possui 41 membros em *C. elegans*, 84 na *Drosophila*, 131 nos humanos e somente 7 nas leveduras, e outras famílias de reguladores da expressão gênica também são dramaticamente superexpressas nos animais, quando comparadas a leveduras. Não é surpresa, portanto, que essas duas classes de proteínas sejam centrais para a biologia do desenvolvimento: como veremos, o desenvolvimento de animais multicelulares é dominado por interações célula-célula e pela expressão gênica diferencial.

Como discutido no Capítulo 7, microRNAs (miRNAs) também têm um papel significativo no controle da expressão gênica durante o desenvolvimento, mas parecem ser de importância secundária quando comparados às proteínas. Dessa forma, um embrião mutante de peixe-zebra que não expresse a proteína Dicer, que é necessária à produção de miRNAs

funcionais, ainda iniciará o seu desenvolvimento quase normalmente, originando tipos celulares especializados e uma organização do plano corporal mais ou menos correta, antes que as anomalias se tornem severas.

O DNA regulador define o programa de desenvolvimento

Um verme, uma mosca, um molusco e um mamífero compartilham muitos dos mesmos tipos celulares essenciais, e todos são dotados de uma boca, um intestino, um sistema nervoso e uma pele; contudo, além de umas poucas características básicas, eles parecem radicalmente diferentes em sua estrutura corporal. Se o genoma determina a estrutura do corpo e todos esses animais possuem esta coleção similar de genes, como podem ser tão diferentes?

As proteínas codificadas no genoma podem ser vistas como os componentes de um conjunto de ferramentas de construção. Muitas coisas podem ser construídas com este conjunto, assim como um conjunto de ferramentas de construção de crianças pode ser usado para fazer caminhões, casas, pontes, guindastes, e assim por diante, pela associação dos componentes em diferentes combinações. Alguns elementos, necessariamente, vão juntos – porcas com parafusos, rodas com pneus e eixos – mas a organização em grande escala do objeto final não é definida por essas estruturas. Ao contrário, ela é definida pelas instruções que acompanham os componentes e descrevem como eles devem ser montados.

Em grande parte, as instruções necessárias para produzir um animal multicelular estão contidas no DNA regulador não-codificante associado a cada gene. Como discutido no Capítulo 4, cada gene em um organismo multicelular está associado a milhares ou dezenas de milhares de nucleotídeos de DNA não-codificante. Este DNA pode conter, dispersas nele, dúzias de elementos reguladores separados ou *estimuladores* – pequenos segmentos de DNA que servem como sítios de ligação para complexos específicos de proteínas de regulação gênica. Em termos gerais, como explicado no Capítulo 7, a presença de um dado módulo regulador desse tipo leva à expressão do gene sempre que o complexo de proteínas que reconhecem aquele segmento de DNA esteja apropriadamente montado na célula (em alguns casos, uma inibição ou um efeito mais complicado na expressão gênica é produzido em seu lugar). Se pudéssemos decifrar o conjunto completo de módulos reguladores associados a um gene, entenderíamos todas as condições moleculares diferentes sob as quais os produtos daquele gene devem ser produzidos. Este DNA regulador pode, assim, ser considerado como o definidor do programa sequencial de desenvolvimento: as regras passam de um estado para o próximo, enquanto as células proliferam e leem suas posições no embrião pela relação com as suas adjacências, ativando novos conjuntos de genes de acordo com as atividades das proteínas que elas correntemente contêm (**Figura 22-4**). Variações nas próprias proteínas, obviamente, também contribuem para as diferenças entre as espécies. No entanto, mesmo que o conjunto de proteínas codificado pelo genoma se mantenha completamente inalterado, a variação no DNA regulador seria suficiente para originar tecidos e estruturas corporais radicalmente distintos.

Quando comparamos espécies animais com planos corporais semelhantes – diferentes vertebrados, como um peixe, um pássaro e um mamífero, por exemplo – observamos que os genes correspondentes normalmente possuem conjuntos semelhantes de módulos reguladores: as sequências de DNA de muitos módulos individuais têm sido bem conservadas e são reconhecidas como homólogas nos diferentes animais. O mesmo é verdade se comparamos diferentes espécies de vermes nematoides ou diferentes espécies de insetos. Contudo, quando comparamos regiões reguladoras de vertebrados com aquelas de vermes ou de

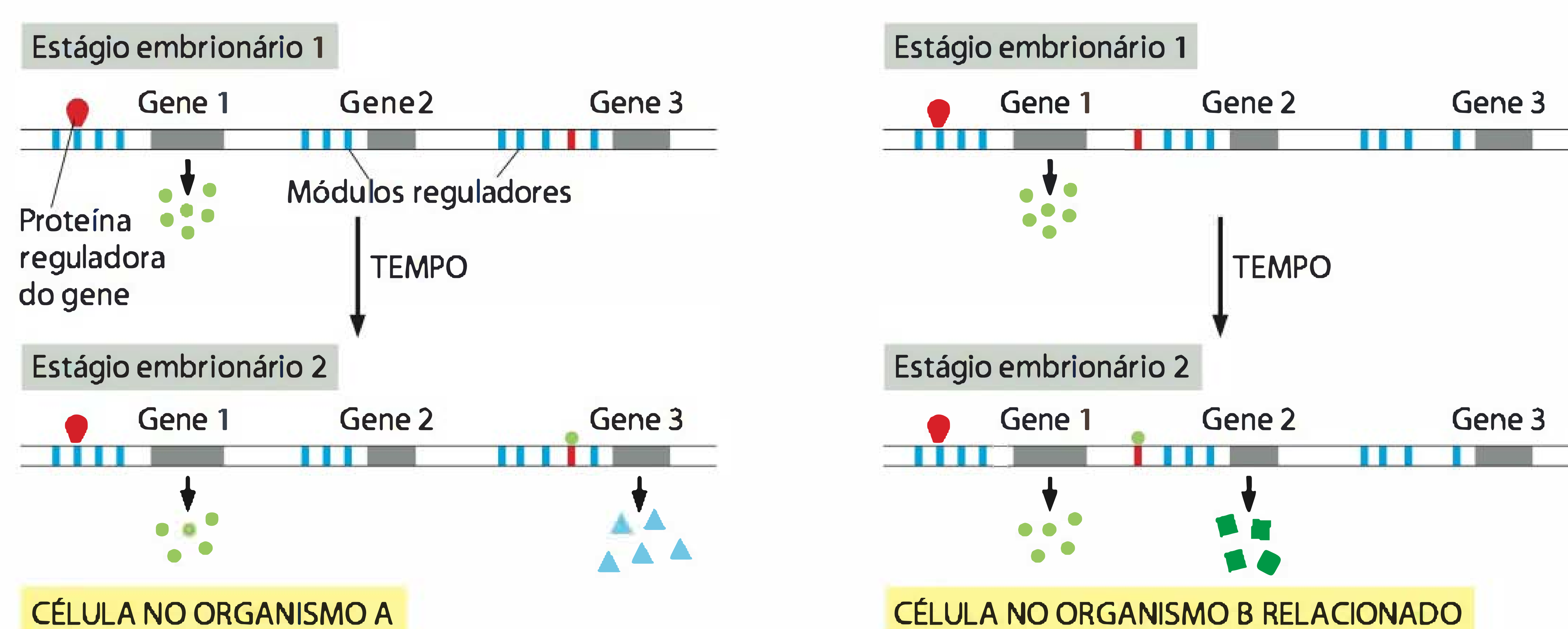


Figura 22-4 Como o DNA regulador define a sucessão de padrões de expressão gênica no desenvolvimento. Os genomas dos organismos A e B codificam o mesmo conjunto de proteínas, porém possuem DNAs reguladores diferentes. As duas células na figura começam no mesmo estado, expressando as mesmas proteínas no estágio 1, mas passam para estados bem diferentes no estágio 2, devido ao arranjo distinto de módulos reguladores.

moscas, é difícil ver qualquer tipo de semelhança. As sequências codificantes de proteínas são indubitavelmente semelhantes, mas as sequências correspondentes de DNA regulador mostram-se muito diferentes. Este é o resultado esperado se diferentes planos de corpo são produzidos principalmente pela alteração do programa incorporado no DNA regulador, embora retendo a maior parte do mesmo conjunto de proteínas.

A manipulação do embrião revela as interações entre as suas células

Confrontado com um animal adulto, em toda a sua complexidade, como alguém começa a analisar o processo que o trouxe à vida? A primeira etapa essencial é descrever as alterações anatômicas – os padrões de divisão celular, de crescimento e de movimento que convertem o ovo em um organismo maduro. Este é o trabalho da *embriologia descritiva*, sendo mais difícil do que se poderia pensar. Para explicar o desenvolvimento em termos de comportamento celular, precisamos ser capazes de rastrear as células individuais acompanhando suas divisões celulares, transformações e migrações no embrião. As bases da embriologia descritiva foram apresentadas no século XIX, mas a tarefa mais refinada de *rastreamento das linhagens celulares* continua a por à prova a ingenuidade dos biólogos do desenvolvimento (**Figura 22-5**).

Dada uma descrição, como se pode ir além e descobrir os mecanismos causais? Tradicionalmente, os *embriologistas experimentais* têm tentado entender o desenvolvimento em termos das maneiras pelas quais as células e os tecidos interagem para gerar a estrutura multicelular. Os *geneticistas do desenvolvimento*, enquanto isso, têm tentado analisar o desenvolvimento em termos das ações dos genes. Essas duas estratégias são complementares e convergiram para produzir o nosso conhecimento atual.

Na embriologia experimental, as células e os tecidos de animais em desenvolvimento são removidos, rearranjados, transplantados ou crescidos em isolamento, de modo a descobrir como eles influenciam um ao outro. Os resultados são, com frequência, surpreendentes: um embrião inicial cortado pela metade, por exemplo, pode produzir dois animais completos e perfeitamente formados, ou um pequeno pedaço de um tecido transplantado para um novo local pode reorganizar toda a estrutura do corpo em desenvolvimento (**Figura 22-6**). Observações desse tipo podem ser aprofundadas e aperfeiçoadas para decifrar as interações

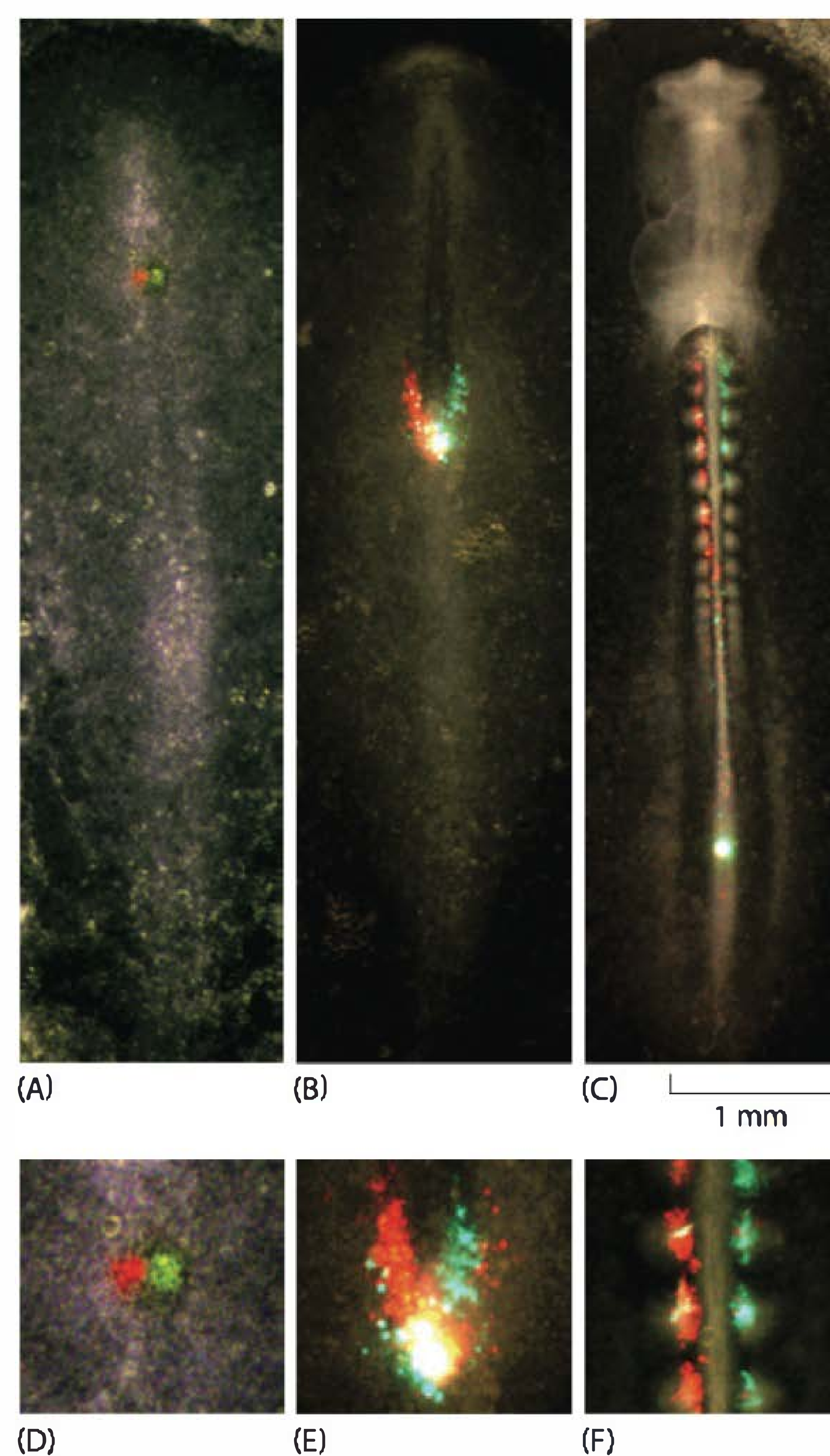


Figura 22-5 Rastreamento de linhagens celulares em embrião jovem de galinha. As figuras na fileira de cima são de baixa amplificação e mostram os embriões inteiros; as figuras abaixo são mais detalhadas, mostrando a distribuição das células marcadas. O experimento de rastreamento releva os rearranjos celulares complexos e dramáticos. (A, D) Dois pequenos pontos de marcadores fluorescentes, um *vermelho* e outro *verde*, foram utilizados para marcar pequenos grupos de células em um embrião em 20 horas de incubação. Apesar de o embrião ainda parecer uma lâmina de tecido quase sem características distintas, já existe algum grau de especialização. Os pontos foram colocados em cada um dos lados de uma estrutura chamada de nó primitivo, ou linha primitiva. (B, E) Seis horas mais tarde, algumas das células marcadas permanecem no nó primitivo (que se moveu para trás), causando um ponto de fluorescência no local, enquanto outras começaram a se mover para a frente, em relação ao nó primitivo. (C, F) Após mais oito horas, o plano corporal é claramente visível, com a cabeça na extremidade anterior (no topo), um eixo central e fileiras de segmentos corporais embrionários, denominados somitos, nos dois lados do corpo. O nó primitivo regrediu ainda mais em direção à cauda; algumas das células marcadas originalmente permanecem no nó primitivo, formando um ponto brilhante de fluorescência, enquanto outras migraram para posições mais anteriores e se tornaram parte dos somitos. (Cortesia de Raquel Mendes e Leonor Saúde.)

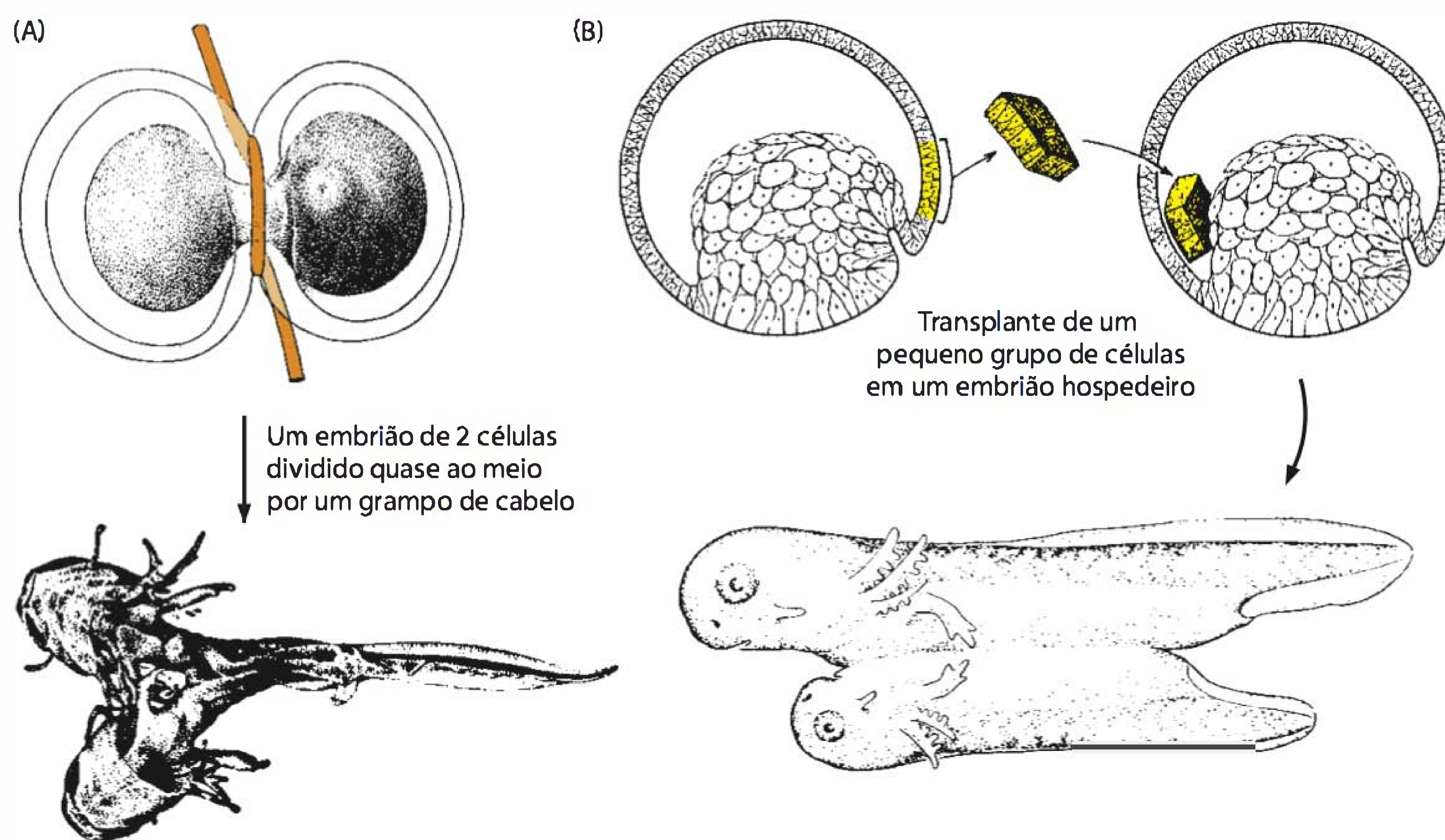


Figura 22-6 Alguns resultados surpreendentes obtidos pela embriologia experimental. Em (A), um embrião anfíbio inicial é dividido praticamente em duas partes com um grampo de cabelo. Em (B), um embrião de anfíbio em um estágio um pouco mais tardio recebe um enxerto de um pequeno conjunto de células de outro embrião naquele estágio. As duas operações, bem-diferentes, induzem um único embrião a desenvolver-se em um par de gêmeos ligados (siameses). É também possível no experimento (A) dividir o embrião inicial em duas metades completamente separadas; dois girinos bem-formados inteiramente separados são então produzidos. (A, segundo H. Spemann, Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press, 1938; B, Segundo J. Holtfreter e V. Hamburger, in Analysis of Development [B.H. Willier, P. A. Weiss e V. Hamburger, eds.], p. 230-296. Philadelphia: Saunders, 1955.)

básicas célula-célula e as regras do comportamento celular. Os experimentos são mais fáceis de serem realizados em grandes embriões que sejam prontamente acessíveis para microcirurgias. Assim, as espécies mais usadas têm sido as aves – especialmente a galinha – e os anfíbios – particularmente a rã africana *Xenopus laevis*.

Os estudos de animais mutantes identificam os genes que controlam os processos do desenvolvimento

A genética do desenvolvimento inicia-se com o isolamento de animais mutantes cujo desenvolvimento é anormal. Isso geralmente envolve uma *sondagem genética*, como descrito no Capítulo 8. Os animais parentais são tratados com um mutagênico químico ou com uma radiação ionizante para induzir mutações nas suas células germinativas, e grandes números da sua progênie são examinados. Os raros mutantes que mostram alguma anormalidade interessante no desenvolvimento – desenvolvimento alterado do olho, por exemplo – são selecionados para um estudo mais aprofundado. Dessa maneira, é possível descobrir os genes que são especificamente necessários ao desenvolvimento normal de qualquer característica escolhida. Pela clonagem e pelo sequenciamento de um gene encontrado dessa maneira, é possível identificar o seu produto proteico, investigar como ele funciona e começar uma análise do DNA regulador que controla a sua expressão.

A estratégia genética é mais fácil em pequenos animais com tempos de geração curtos que podem crescer em laboratório. O primeiro animal a ser estudado desse modo foi a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, a qual será estudada extensivamente a seguir. Contudo, a mesma estratégia tem sido bem sucedida no verme nematoide, *Caenorhabditis elegans*, no peixe-zebra, *Danio rerio*, e no camundongo, *Mus musculus*. Embora os humanos não sejam intencionalmente mutagenizados, eles são sondados para anormalidades em números enormes pelo sistema médico de saúde. Muitas mutações em humanos causam anormalidades compatíveis com a vida, e as análises dos indivíduos afetados e das suas células fornecem indícios importantes sobre os processos do desenvolvimento.

Uma célula toma as decisões sobre o seu desenvolvimento muito antes de mostrar uma mudança visível

Por um simples olhar atento, ou com o auxílio de marcadores fluorescentes e outras técnicas de marcação celular, pode-se descobrir qual será o destino de determinada célula em um embrião, caso seja permitido a ele desenvolver-se normalmente. A célula pode ter como destino morrer, por exemplo, ou tornar-se um neurônio, ser parte de um órgão, como o pé, ou dar origem a uma progênie de células distribuídas por todo o corpo. Conhecer o **destino celular**, nesse sentido, entretanto, é saber quase nada a respeito da característica intrínseca da célula. Em um extremo, a célula que é destinada a tornar-se, digamos, um neurônio pode já estar especializada de uma maneira que garanta que ela se tornará um neurônio, não impor-

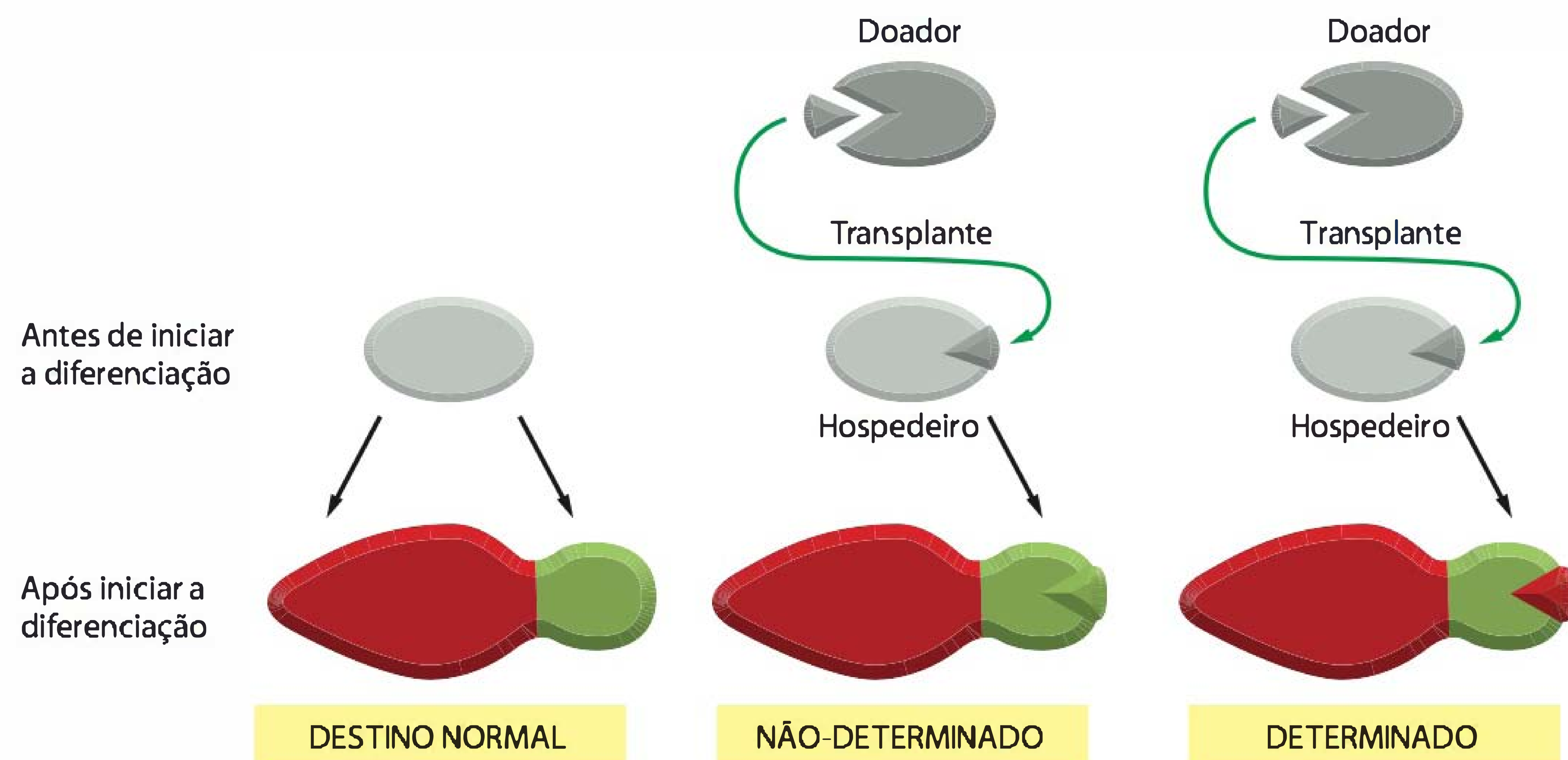


Figura 22-7 O teste-padrão para a determinação celular.

tando o quanto o seu ambiente seja alterado; tal célula é considerada como **determinada** para o seu destino. No extremo oposto, a célula pode ser bioquimicamente idêntica a outras células fadadas a outros destinos, sendo a sua posição acidental a única diferença entre elas, o que expõe as células a influências futuras distintas.

O estado de determinação de uma célula pode ser testado transplantando-a para ambientes alterados (**Figura 22-7**). Uma das conclusões-chave da embriologia experimental tem sido que, graças à memória celular, uma célula pode tornar-se determinada muito antes de mostrar algum sinal externo óbvio de diferenciação.

Entre os extremos de total determinação e completa indeterminação celular, há um amplo espectro de possibilidades. Uma célula pode, por exemplo, já estar levemente especializada para o seu destino normal, com uma forte tendência para desenvolver-se naquela direção, mas ainda capaz de alterar-se e ter um destino diferente, se colocada em um ambiente suficientemente coercivo. (Alguns biólogos do desenvolvimento descreveriam esta célula como *especificada* ou *comprometida*, mas ainda não determinada.) Ou a célula pode estar determinada, digamos, como uma célula cerebral, mas ainda não determinada quanto a ser um componente neuronal ou glial do cérebro. E, frequentemente, parece que células adjacentes do mesmo tipo interagem e dependem de suporte mútuo para manter suas características especializadas, de maneira que elas irão comportar-se como determinadas se mantidas juntas em um agrupamento, mas não determinadas se colocadas sozinhas e isoladas de suas companhias usuais.

As células relembram valores posicionais que refletem a sua localização no corpo

Em muitos sistemas, muito antes de as células comprometerem-se com a diferenciação em um tipo celular específico, tornam-se *regionalmente determinadas*: ou seja, ativam e mantêm a expressão de genes que podem ser considerados como marcadores de posição ou de região do corpo. Esta característica posição-específica de uma célula é chamada de **valor posicional** e mostra seus efeitos na maneira como a célula se comporta em etapas subsequentes da formação dos padrões.

O desenvolvimento da perna e da asa de galinha fornece um exemplo impressionante. Ambas, a perna e a asa do adulto, consistem em músculos, ossos, pele e assim por diante – quase exatamente a mesma gama de tecidos diferenciados. A diferença entre os dois membros não reside nos tipos de tecidos, mas na maneira como estes tecidos estão arranjados no espaço. Como, então, essa diferença ocorre?

No embrião da galinha, a perna e a asa originam-se quase ao mesmo tempo, na forma de pequenos brotos no formato de língua que se projetam do flanco. As células nos dois pares de brotos dos membros parecem semelhantes e uniformemente indiferenciadas em um primeiro momento. Contudo, um simples experimento mostra que essa aparente semelhança é enganosa. Um pequeno bloco de tecido indiferenciado na base do broto da perna, da região que normalmente daria origem à coxa, pode ser cortado e enxertado na ponta do broto da asa. Surpreendentemente, o enxerto não dá origem à parte apropriada de ponta de asa, nem a um pedaço de tecido de coxa no local errado, mas a um dedo do pé (**Figura 22-8**). Esse experimento mostra que as células do broto da perna já estão previamente deter-

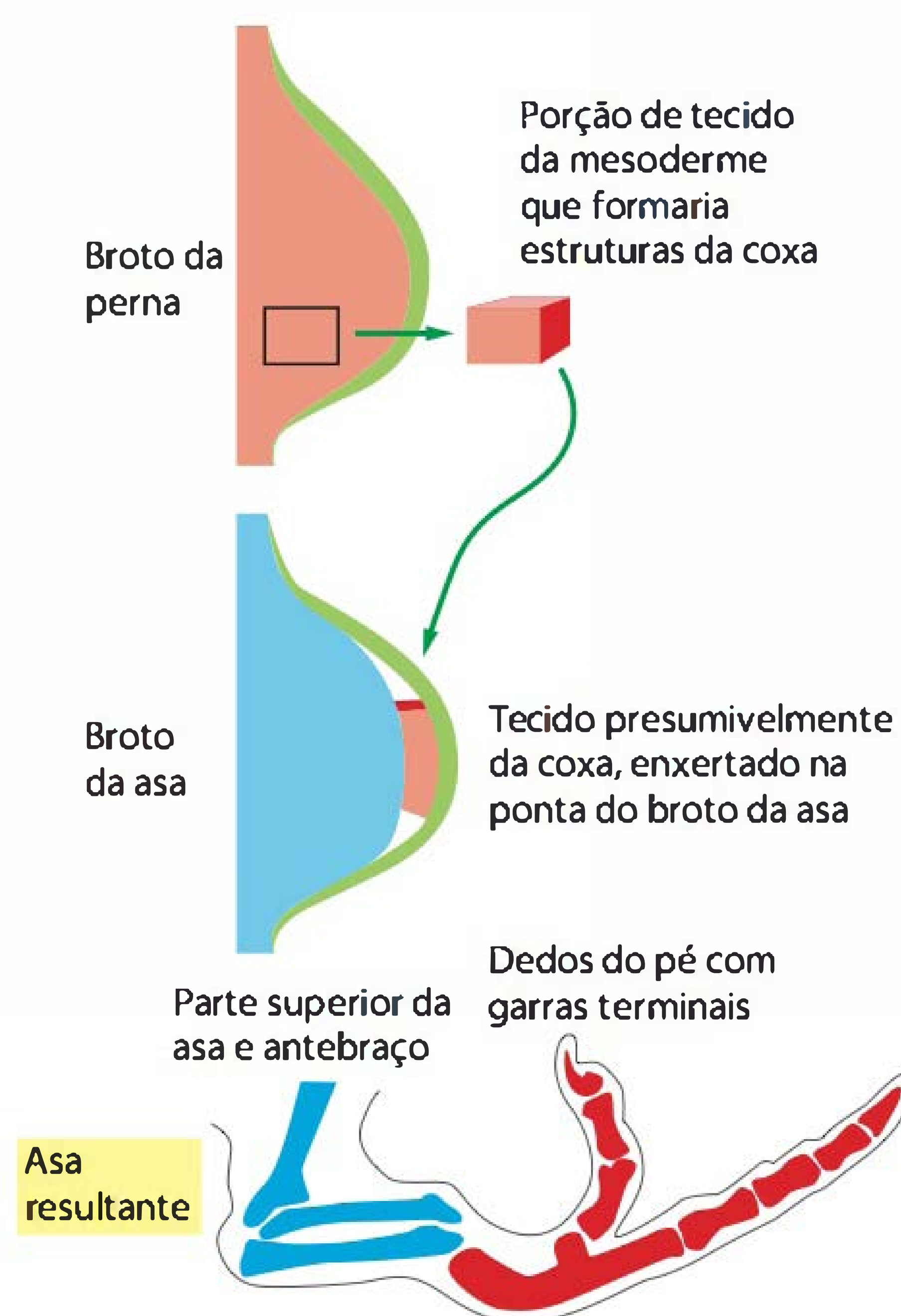


Figura 22-8 Provável tecido de coxa enxertado na ponta de um broto de asa de galinha, formando dedos do pé. (Segundo J.W. Saunders et al., *Dev. Biol.* 1:281-301, 1959. Com permissão da Academic Press.)



Figura 22-9 Embriões de galinha aos seis dias de incubação, mostrando os brotos dos membros marcados por hibridização *in situ* com sondas para detecção da expressão dos genes *Tbx4*, *Tbx5* e *Pitx1*, todos codificando proteínas de regulação gênica relacionadas. As células que expressam *Tbx5* irão formar uma asa; as células que expressam *Tbx4* e *Pitx1* formarão uma perna. *Pitx1*, quando expresso de forma errônea no broto da asa, faz com que o membro desenvolva características de uma perna. (Cortesia de Malcolm Logan.)

minadas como perna, mas ainda não irrevogavelmente comprometidas para vir a ser uma parte particular da perna: elas ainda podem responder a sinais no broto da asa, de maneira que formam estruturas apropriadas para a ponta do membro, em vez da base. O sistema de sinalização que controla as diferenças entre as partes do membro é, aparentemente, o mesmo para a perna ou para a asa. A diferença entre os dois membros resulta da diferença nos estados internos das suas células no início do desenvolvimento dos membros.

A diferença do valor posicional entre as células dos membros anteriores e as células dos membros posteriores dos vertebrados parece ser um reflexo da expressão diferencial de um conjunto de genes, que codificam proteínas de regulação gênica que são responsáveis por fazer com que as células nos dois brotos de membros se comportem de maneiras distintas (**Figura 22-9**). Mais tarde, neste capítulo, explicaremos como o próximo nível, mais detalhado, de formação de padrões é determinado em um broto individual de um membro.

Sinais indutivos podem criar diferenças ordenadas entre células inicialmente idênticas

Em cada estágio do seu desenvolvimento, a célula de um embrião é exposta a um conjunto limitado de opções de acordo com o seu estado: a célula percorre uma via de desenvolvimento que se ramifica repetidamente. A cada ramificação nesta via, ela deve fazer uma escolha, e esta sequência de escolhas determina seu destino final. Dessa forma, um complexo grupo de tipos celulares distintos é produzido.

Para compreender o desenvolvimento, precisamos saber como cada escolha entre as possíveis opções é controlada, e como estas opções dependem das escolhas feitas previamente. Para reduzir esta questão a sua forma mais simples: como duas células com o mesmo genoma, mas separadas no espaço, tornam-se diferentes?

A maneira mais eficaz de tornar células diferentes é expô-las a diferentes condições ambientais, e os sinalizadores ambientais mais importantes que atuam sobre as células de um embrião são aqueles advindos das células adjacentes. Dessa forma, no modo de formação de padrões provavelmente mais comum, um grupo de células inicialmente apresenta o mesmo potencial de desenvolvimento, e um sinal originado fora deste grupo de células faz com que um ou mais membros deste grupo tome uma via de desenvolvimento distinta, causando uma alteração nas suas características. Este processo é chamado de **interação indutiva**. Geralmente, o sinal é limitado no tempo e no espaço, de forma que apenas um subconjunto de células competentes – aquelas mais próximas da fonte do sinal adquira o caráter induzido (**Figura 22-10**).

Alguns sinais indutores são de curto alcance – em especial aqueles transmitidos por contatos célula-célula; outros são de longo alcance, mediados por moléculas que podem se difundir pelo meio extracelular. O grupo de células inicialmente semelhantes competentes para responder ao sinal é às vezes chamado de *grupo de equivalência* ou *campo morfogenético*. Ele pode consistir em apenas duas, ou em milhares de células, e qualquer fração deste total pode ser induzida, dependendo da intensidade e da distribuição do sinal.

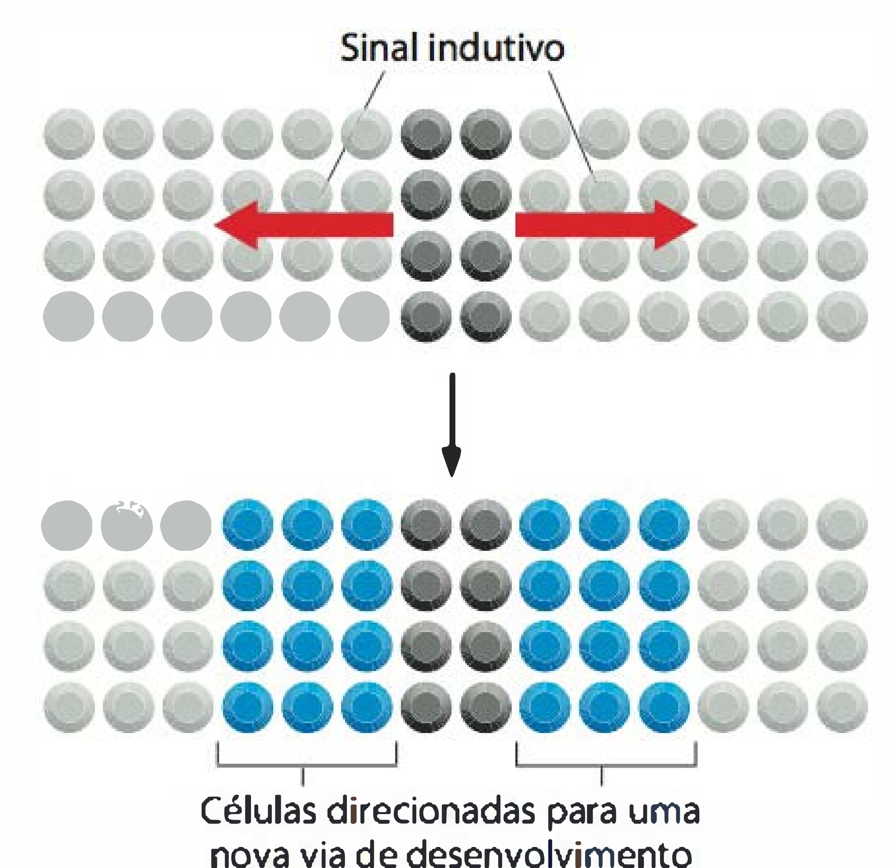


Figura 22-10 Sinalização indutiva.

Células-irmãs podem nascer diferentes por uma divisão celular assimétrica

A diversificação celular nem sempre precisa depender de sinais extracelulares: em alguns casos, células-irmãs nascem diferentes como resultado de uma **divisão celular assimétrica**, em que conjuntos significativos de moléculas são divididos de maneira desigual entre as

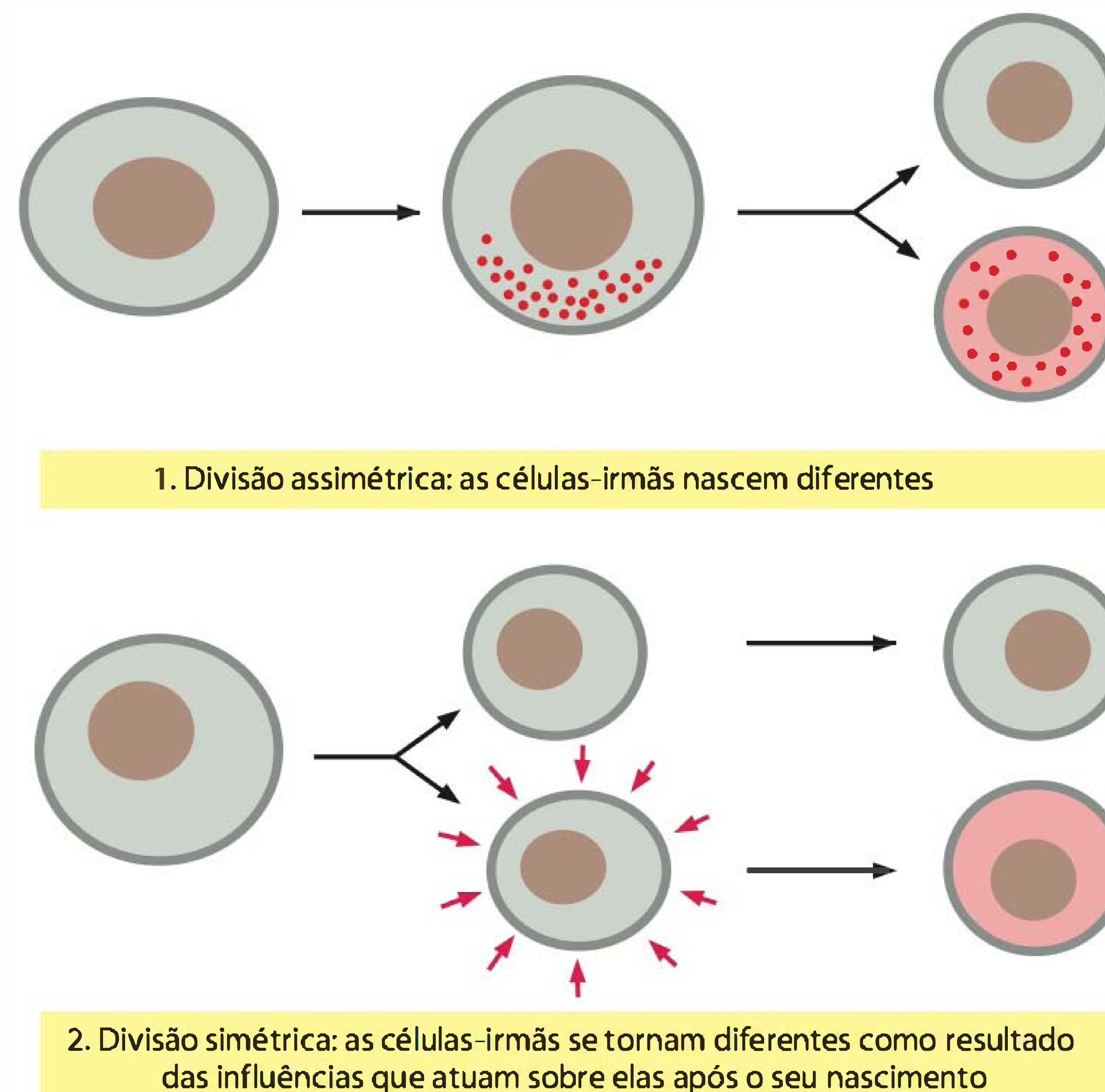


Figura 22-11 **Os dois modos de tornar células-irmãs diferentes.**

duas células no momento da divisão. Esta segregação assimétrica de moléculas (ou conjuntos de moléculas) atua como *determinante* para um dos destinos celulares pela alteração direta ou indireta do padrão de expressão gênica na célula-filha que a contém (**Figura 22-11**).

As divisões assimétricas são particularmente comuns no início do desenvolvimento, quando o ovo fertilizado divide-se para originar células-filhas com destinos diferentes, mas elas também ocorrem em estágios mais tardios – na gênese das células nervosas, por exemplo.

A retroalimentação positiva pode originar assimetria onde não havia antes

A sinalização indutiva e a divisão celular assimétrica representam duas estratégias distintas para a criação de diferenças entre as células. Ambas, no entanto, pressupõem uma assimetria preexistente no sistema: a fonte do sinal indutivo deve estar localizada de forma que algumas células recebem o sinal forte e outras não; ou a célula-mãe já deve apresentar uma assimetria interna antes de se dividir. Muito frequentemente, o histórico do sistema assegura que alguma assimetria estará presente. Contudo, o que acontece se não estiver, ou se a assimetria inicial for apenas sutil?

A resposta reside na **retroalimentação positiva**: pela retroalimentação positiva, um sistema que inicialmente era homogêneo e simétrico pode criar padrões espontaneamente, mesmo quando não houver um sinal externo organizado. E nos casos onde, como geralmente ocorre, o ambiente ou as condições iniciais imponham uma assimetria inicial fraca mas definitiva, a retroalimentação positiva provê os meios necessários para amplificar a assimetria e criar um padrão de desenvolvimento.

Para ilustrar a ideia, considere um par de células adjacentes que iniciam em um estado similar e podem trocar sinais para influenciar o comportamento uma da outra (**Figura 22-12**). Quanto mais qualquer uma das células produzir o mesmo produto X, mais ela vai sinalizar para a célula vizinha que iniba sua produção de X. Este tipo de interação célula-célula é chamado de *inibição lateral* e origina um ciclo de retroalimentação positiva que tende a amplificar qualquer diferença inicial entre as duas células. Esta diferença pode ser originada por condições impostas por algum fator externo anterior, ou simplesmente por flutuações aleatórias espontâneas, ou "ruído" – uma característica inevitável do circuito do controle genético nas células, conforme discutido no Capítulo 7. Em qualquer um dos casos, a inibição lateral significa que, se a célula #1 sintetizar um pouco mais de X, ela fará com que a célula #2 sintetize menos; e como a célula #2 faz menos X, ela causa uma menor inibição na célula #1, o que permite que a quantidade de X na célula #1 aumente ainda mais; e assim sucessivamente, até que um estado de equilíbrio seja atingido, onde a célula #1 contém grandes quantidades de X e a célula #2 contém muito pouco.

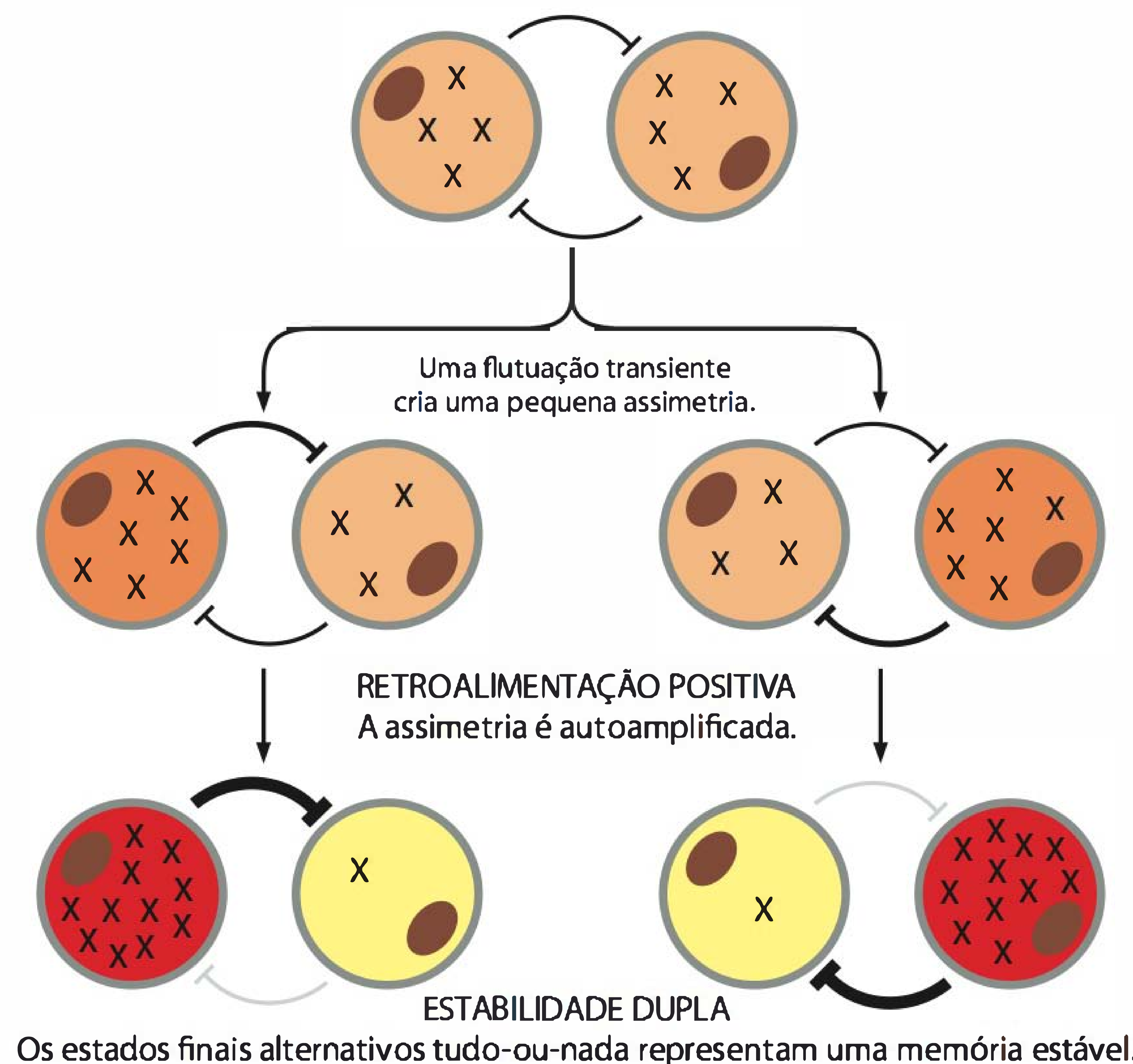


Figura 22-12 Origem da assimetria pela retroalimentação positiva. Neste exemplo, duas células interagem, cada uma produzindo uma substância X que atua na outra célula, inibindo a produção de X, um efeito conhecido como inibição lateral. Um aumento na produção de X em uma das células leva a uma retroalimentação positiva que tende a aumentar a produção de X nesta mesma célula, enquanto diminui a quantidade de X na célula vizinha. Isto pode originar uma instabilidade crescente, tornando as duas células radicalmente distintas. Por fim, o sistema se estabiliza em um dos dois estados opostos. A escolha final do estado representa uma forma de memória: uma pequena influência que inicialmente direcionou uma escolha não é mais necessária para manter o estado final estável.

Análises matemáticas mostram que este fenômeno depende da força do efeito da inibição lateral: se ela for muito fraca, as flutuações irão desaparecer e não haverá efeito durador; mas se ela for forte e duradoura o suficiente, o efeito será autoamplificado de forma constante, rompendo a simetria inicial entre as duas células. A inibição lateral, frequentemente mediada pela troca de sinais nos pontos de contato célula-célula através da via de sinalização de Notch (como discutido no Capítulo 15), é um mecanismo comum de diversificação celular em tecidos animais, fazendo com que células adjacentes se especializem de formas diferentes.

A retroalimentação positiva gera padrões, cria resultados tudo-ou-nada e provê memória

Processos similares de retroalimentação positiva podem operar sobre conjuntos maiores de células para originar diversos tipos de padrões espaciais. Por exemplo, uma substância A (um ativador de curto alcance) pode estimular sua própria produção nas células que a contenham e nas células adjacentes, enquanto pode também estimulá-las a produzir um sinal H (um inibidor de longo alcance) que se difunde amplamente e inibe a produção de A nas células localizadas a grandes distâncias. Se todas as células partirem de um estado inicial igual, mas um grupo de células ganhar certa vantagem pela produção um tanto maior de A do que o restante das células, a assimetria pode ser autoamplificada. A ativação de curto alcance, combinada desta forma à inibição de longo alcance, pode colaborar para a formação de grupos de células que se tornem especializadas como *centros sinalizadores* localizados, em um tecido inicialmente homogêneo.

No polo oposto do espectro de magnitude, a retroalimentação positiva também pode ser o meio pelo qual as células individuais se tornam espontaneamente polarizadas e internamente assimétricas, por meio de sistemas de sinalização intracelular que tornam um sinal assimétrico inicial capaz de autoamplificação.

Por meio destas e de muitas outras variações sobre o tema da retroalimentação positiva, alguns princípios gerais se aplicam. Em cada um dos exemplos anteriores, a retroalimentação positiva leva ao *rompimento da simetria* e a um fenômeno *tudo-ou-nada*. Se a retroalimentação estiver abaixo de um certo limiar de força, as células se mantêm essencialmente no mesmo estado; se a retroalimentação estiver acima do limiar, elas se tornam muito diferentes. Acima deste limiar, o sistema tem *estabilidade dupla* ou é *multiestável* – ele se desloca na direção de um ou outro resultado final, dentre os dois ou mais resultados possíveis altamente distintos, de acordo com qual das células (ou qual dos polos de uma única célula) ganhou a vantagem inicial.

A escolha entre resultados finais alternativos pode ser determinada por sinais externos que conferem a uma das células uma pequena vantagem inicial. Contudo, uma vez que a

retroalimentação positiva tenha feito o seu trabalho, este sinal externo se torna irrelevante. O rompimento da simetria, uma vez estabelecido, é muito difícil de ser revertido: a retroalimentação positiva faz com que o estado assimétrico escolhido seja autossustentado, mesmo quando o sinal inicial tenha desaparecido. Dessa forma, a retroalimentação positiva provê ao sistema uma *memória* dos sinais passados.

Todos estes efeitos da retroalimentação positiva – rompimento da simetria, resultados tudo-ou-nada, estabilidade dupla e memória – andam lado a lado e são encontrados repetidas vezes no desenvolvimento dos organismos. Estes efeitos são fundamentais para a origem de padrões estáveis e fortemente delineados nas células em diferentes estados.

Um pequeno conjunto de vias de sinalização, utilizado repetidamente, controla o padrão de desenvolvimento

Quais, então, são as moléculas que atuam como sinais para coordenar a formação espacial de padrões em um embrião, seja para dar origem à assimetria *de novo*, ou para agir como indutores dos centros de sinalização estabelecidos para controlar a diversificação das células adjacentes? Em princípio, qualquer tipo de molécula extracelular poderia servir. Na prática, a maioria dos eventos indutivos conhecidos no desenvolvimento animal é governada por apenas uma família de proteínas de sinalização altamente conservadas, que são utilizadas repetidamente em contextos diferentes. A descoberta deste vocabulário limitado que as células utilizam para comunicação durante o processo de desenvolvimento ocorreu nos últimos 10 a 20 anos como uma das grandes descobertas simplificadoras da biologia do desenvolvimento. Na **Tabela 22-1**, revisamos brevemente as seis principais famílias de proteínas de sinalização que atuam repetidamente como indutoras do desenvolvimento animal. Detalhes dos mecanismos intracelulares através dos quais estas moléculas atuam são encontrados no Capítulo 15.

O resultado final da maioria dos eventos de indução é uma alteração na transcrição do DNA na célula que responde ao sinal: alguns genes são ativados e outros são inibidos. Diferentes moléculas sinalizadoras ativam diferentes tipos de proteínas reguladoras de genes. Além disso, o efeito de ativação de uma proteína reguladora de genes irá depender de quais outras proteínas reguladoras de genes também estiverem presentes em uma célula, uma vez que elas atuam em conjunto. Como resultado, diferentes tipos celulares em geral responderão de maneiras diferentes a um mesmo sinal, e células iguais frequentemente irão responder de maneiras diferentes a um mesmo sinal que seja iniciado em tempos distintos. A resposta dependerá de quais outras proteínas reguladoras de genes estiverem presentes antes da chegada do sinal – refletindo a memória celular dos sinais recebidos previamente, e de quais outros sinais a célula está recebendo no momento corrente.

Morfógenos são indutores de longo alcance que exercem efeitos graduados

Moléculas-sinal frequentemente parecem coordenar uma escolha simples tipo sim ou não: um efeito quando sua concentração é alta e outro quando sua concentração é baixa. A retro-

Tabela 22-1 Algumas proteínas-sinal são utilizadas repetidamente como indutoras do desenvolvimento animal

VIA DE SINALIZAÇÃO	FAMÍLIA DE LIGANTES	FAMÍLIA DE RECEPTORES	INIBIDORES/MODULADORES EXTRACELULARES
Receptor tirosina- cinase (RTK)	EGF FGF (Branchless) Efrinas	Receptores EGF Receptores FGF (Breathless) Receptores Eph	Argos
Superfamília TGFβ	TGFβ BMP (Dpp) Nodal	Receptores TGFβ Receptores BMP	chordin (Sog), noggin
Wnt	Wnt (Wingless)	Frizzled	Dickkopf, Cerberus
Hedgehog	Hedgehog	Patched, Smoothened	
Notch	Delta	Notch	Fringe

Apenas alguns exemplos representativos de cada classe de proteínas são listados – principalmente aqueles que são mencionados neste Capítulo. Nomes particulares para *Drosophila* são mostrados entre parênteses. Muitos dos componentes listados apresentam diversos homólogos distinguidos por números (FGF1, FGF2, etc.) ou por nomes compostos (Sonic hedgehog, Lunatic fringe). Outras vias de sinalização, incluindo as vias JAK/STAT, receptores nucleares de hormônios e receptores associados à proteína G, também desempenham um papel importante em alguns processos de desenvolvimento.

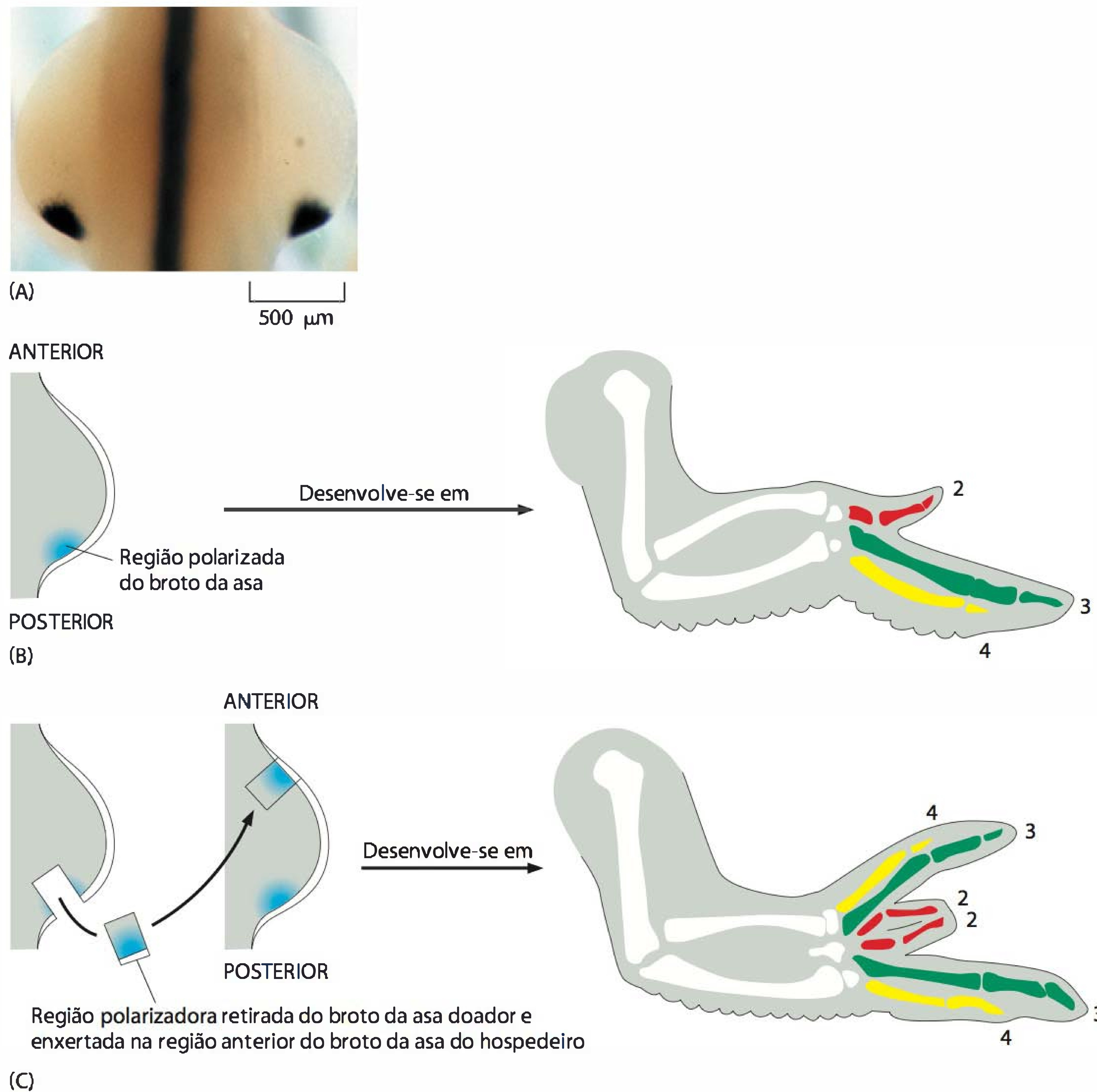


Figura 22-13 Sonic hedgehog como um morfógeno no desenvolvimento dos membros de galinhas. (A) A expressão do gene *Sonic hedgehog* em um embrião de galinha de quatro dias, mostrada por hibridização *in situ* (vista dorsal do tronco no nível dos brotos das asas). O gene é expresso na linha média do corpo e na borda posterior (a região polarizada) de cada um dos brotos das asas. A proteína Sonic hedgehog espalha-se a partir destas fontes. (B) Desenvolvimento normal da asa. (C) Um enxerto de tecido da região polarizada causa uma duplicação especular do padrão da asa do hospedeiro. Acredita-se que o tipo de dígito que se desenvolve seja coordenado pela concentração local da proteína Sonic hedgehog; tipos diferentes de dígitos (marcados 2, 3 e 4) formam-se de acordo com sua distância de uma fonte de Sonic hedgehog. (A, cortesia de Randall S. Johnson e Robert D. Riddle.)

alimentação positiva faz com que as células respondam de forma tudo-ou-nada, de maneira que um resultado é obtido quando o sinal está abaixo de um dado valor crítico, e outro resultado quando está acima deste valor. Em muitos casos, no entanto, as respostas têm um ajuste mais fino: uma alta concentração pode, por exemplo, direcionar as células-alvo para uma via de desenvolvimento, uma concentração intermediária para uma outra via, e baixas concentrações podem induzir estas células a uma outra via possível. Um caso importante é aquele em que a molécula-sinal difunde-se a partir de um centro de sinalização localizado, criando um gradiente de concentração de sinal. As células a diferentes distâncias da fonte são direcionadas a comportarem-se em uma grande variedade de maneiras diferentes, de acordo com a concentração do sinal que elas recebem.

Assim, uma molécula-sinal que impõe um padrão em um amplo campo de células é chamada de **morfógeno**. Os membros dos vertebrados fornecem um exemplo notável: um grupo de células em um lado do broto do membro embrionário pode se tornar especializado como um centro sinalizador e secretar a proteína Sonic hedgehog – um membro da família Hedgehog de moléculas–sinal. Esta proteína espalha-se a partir de sua fonte, formando um *gradiente de morfógenos* que controla as características das células ao longo do eixo polegar-para-dedo mínimo do broto do membro. Se um grupo adicional de células sinalizadoras é enxertado no lado oposto do broto, uma duplicação especular do padrão de dígitos é produzida (**Figura 22-13**).

Os inibidores extracelulares de moléculas-sinal moldam a resposta ao indutor

Especialmente para as moléculas que podem atuar à distância, é importante limitar a ação do sinal, assim como produzi-lo. A maioria das proteínas–sinal do desenvolvimento possui antagonistas extracelulares que podem inibir a sua função. Estes antagonistas geralmente são proteínas que se ligam ao sinal ou seu receptor, impedindo que ocorra uma interação produtiva.

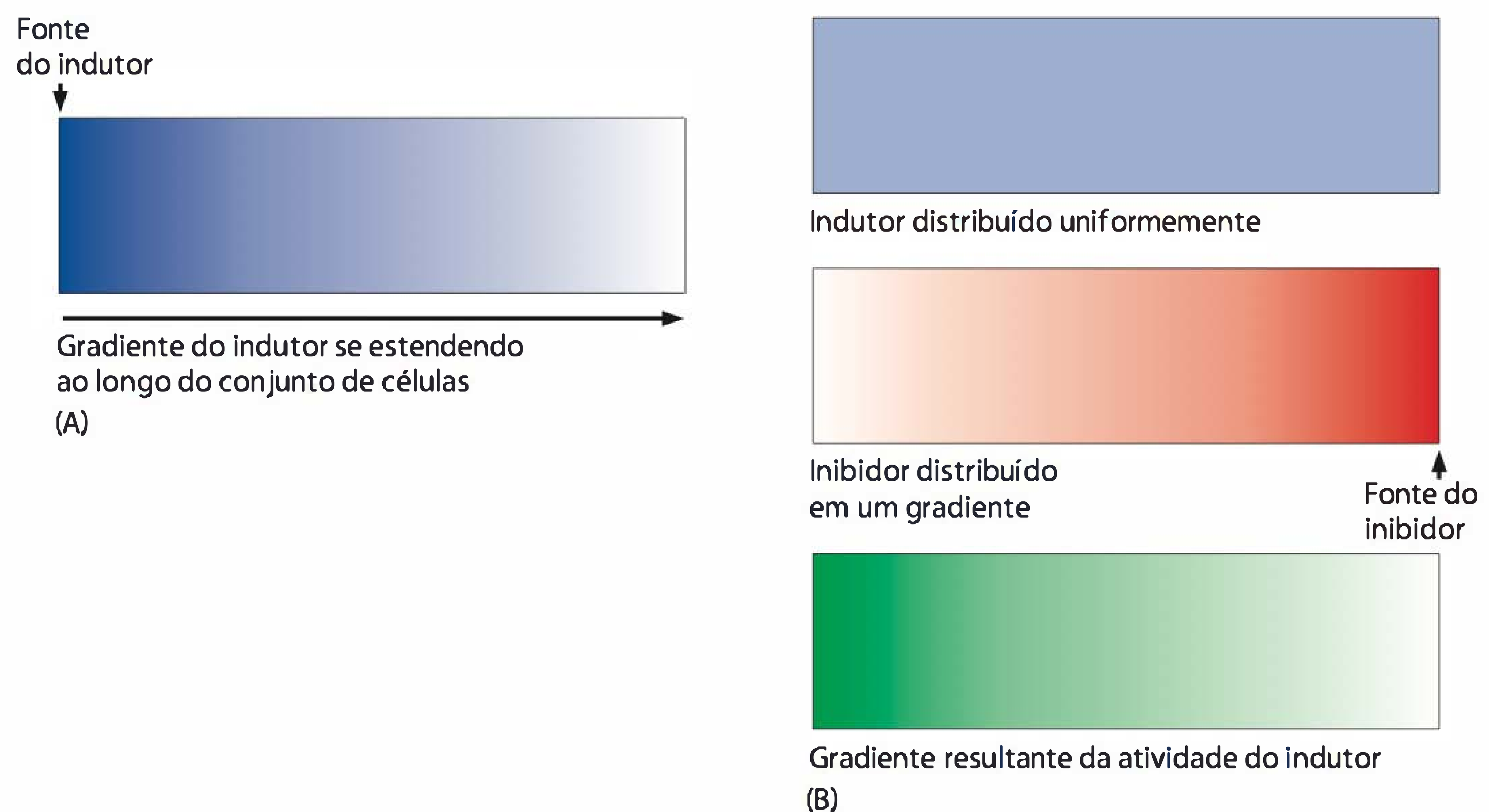


Figura 22-14 Duas maneiras de criar um gradiente de morfógenos. (A) Pela produção localizada de um indutor – um morfógeno – que se difunde a partir da sua origem. (B) Pela produção localizada de um inibidor que se difunde a partir da sua origem e bloqueia a ação de um indutor uniformemente distribuído.

Um número surpreendentemente grande de decisões no desenvolvimento é, na verdade, regulado por inibidores e não pela molécula-sinal primária. O sistema nervoso em um embrião de rã origina-se de um conjunto de células que é competente para formar tanto tecido neuronal quanto epiderme. Um tecido indutor libera a proteína chordin, a qual favorece a formação do tecido neuronal. A chordin não possui receptor próprio. Em vez disso, ela é um inibidor de proteínas–sinal da família BMP/TGFβ, que induzem o desenvolvimento da epiderme e estão presentes por toda a região neuroepitelial onde os neurônios e a epiderme se formam. A indução do tecido neuronal é devida a um gradiente inibidor de um sinal antagonista (**Figura 22-14**).

Os sinais de desenvolvimento podem se espalhar através de um tecido de diferentes maneiras

Acredita-se que muitos sinais de desenvolvimento se espalhem pelos tecidos por difusão simples através dos espaços entre as células. Se um grupo especializado de células produz uma molécula-sinal em taxas constantes, e este morfógeno é então degradado conforme se afasta desta fonte, um gradiente discreto será formado, com o ponto máximo na fonte. A velocidade de difusão e a meia-vida do morfógeno determinarão juntas a extensão do gradiente (**Figura 22-15**).

Este mecanismo simples pode ser modificado de diversas maneiras para ajustar a forma e a extensão do gradiente. Receptores na superfície das células ao longo do caminho podem

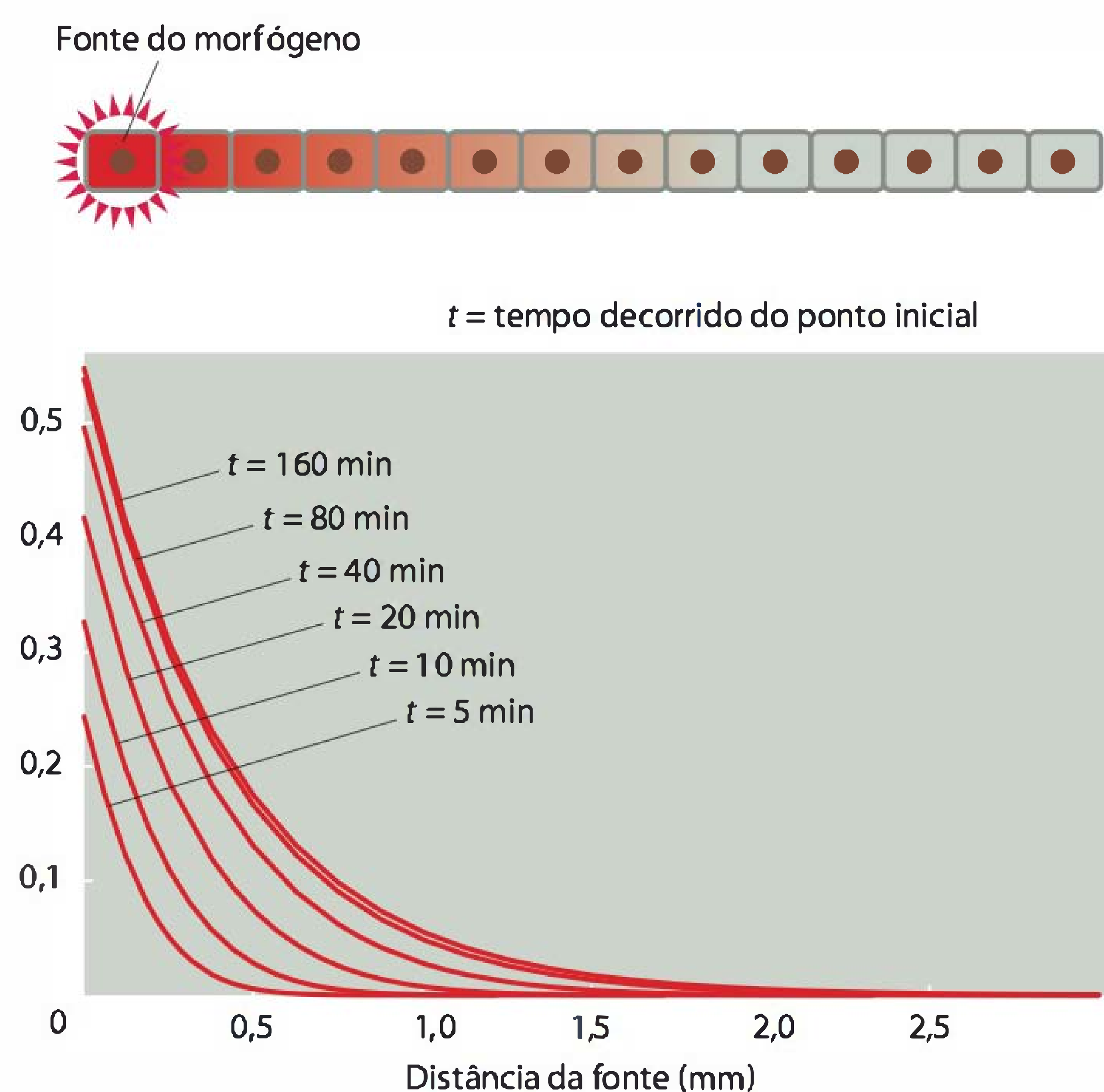


Figura 22-15 Estabelecimento de um gradiente de sinal por difusão. O gráfico mostra estágios sucessivos do estabelecimento da concentração de uma molécula-sinal produzida a taxas constantes na origem, com a produção começando no tempo 0. A molécula sofre degradação conforme se difunde da fonte, criando um gradiente de concentração com o pico na fonte. Os gráficos foram calculados com a premissa de que a difusão ocorre ao longo de um eixo no espaço, de que a molécula tem uma meia-vida ($t_{1/2}$) de 20 minutos, e de que ela se difunde com a constante de difusão $D = 0,4\ Mm^2hr^{-1}$, parâmetros típicos para uma proteína pequena (30 kDa) em água. Note que o gradiente já está próximo do estado de equilíbrio com o tempo de uma hora e que a concentração no estado de equilíbrio (nos tempos maiores) diminui exponencialmente com a distância.

capturar o morfógeno e promover a sua endocitose e degradação, diminuindo sua meia-vida efetiva. Ou ele pode se ligar a moléculas da matriz extracelular, reduzindo a sua taxa de difusão efetiva. Em alguns casos, é como se o morfógeno fosse captado pelas células por endocitose e depois liberado novamente, apenas para ser captado e liberado por outras células, de forma que o sinal se espalha através de uma longa via intracelular.

Há ainda um outro mecanismo para a distribuição de sinal que depende de longos e finos filipódeos, ou *citonemas*, que se estendem por distâncias equivalentes a muitas vezes o diâmetro celular em alguns tecidos do epitélio. Uma célula pode enviar citonemas para fazer contato com outra célula distante, tanto para entregar quanto para receber um sinal desta célula. Dessa forma, por exemplo, uma célula pode realizar inibição lateral através da via Notch em um grande conjunto de células adjacentes.

Os programas que são intrínsecos a uma célula frequentemente definem o curso de tempo do seu desenvolvimento

Sinais como os que acabamos de discutir desempenham um grande papel no controle do tempo dos eventos de desenvolvimento, mas seria errado imaginar que toda a mudança no desenvolvimento necessita de um sinal indutor para desencadeá-la. Muitos dos mecanismos que alteram características celulares são intrínsecos das células e não necessitam de sinais do ambiente celular: a célula progredirá no seu programa de desenvolvimento mesmo quando mantida em um ambiente constante. Existem muitos casos em que alguém poderia suspeitar de que algo deste tipo está ocorrendo no controle da duração do processo de desenvolvimento. Por exemplo, em um camundongo, as células progenitoras neuronais no córtex cerebral continuam a dividir-se e a gerar neurônios por somente 11 ciclos celulares, e no macaco, por aproximadamente 28 ciclos, após os quais elas param. Diferentes tipos de neurônios são gerados em estágios distintos desse programa, sugerindo que, à medida que a célula progenitora envelhece, ela altera as especificações que fornece para as células da progênie em diferenciação.

No contexto de um embrião intacto, é difícil provar que tal curso de eventos é estritamente o resultado de um processo celular autônomo marcador de tempo, uma vez que o ambiente celular está se alterando. Os experimentos com células em cultura, entretanto, fornecem evidências claras. Por exemplo, as células progenitoras da glia isoladas do nervo óptico de um rato, sete dias após o nascimento, e cultivadas sob condições constantes em um meio apropriado irão manter a proliferação por um tempo estritamente limitado (correspondente a um máximo de aproximadamente oito divisões celulares) e então irão diferenciar-se em oligodendrócitos (as células da glia que formam as bainhas de mielina ao redor dos axônios no cérebro), obedecendo a um padrão de tempo semelhante ao que elas teriam seguido se tivessem sido deixadas no seu lugar no embrião.

Os mecanismos moleculares responsáveis por estas alterações lentas nas condições internas da célula, realizadas no curso de dias, semanas, meses e mesmo anos, ainda não são conhecidos. Uma possibilidade é que eles reflitam mudanças progressivas no estado da cromatina (discutido no Capítulo 4).

Os mecanismos que controlam a escala de tempo de processos mais rápidos, apesar de ainda pouco conhecidos, não são um mistério. Mais adiante, discutiremos um exemplo – o oscilador de expressão gênica, conhecido como *relógio de segmentação*, que coordena a formação de somitos em embriões de vertebrados – os rudimentos das séries de vértebras, costelas e músculos associados.

Enquanto o embrião cresce, os padrões iniciais são estabelecidos em pequenos grupos de células e refinados por indução sequencial

Os sinais que organizam o padrão espacial de um embrião em geral atuam sobre distâncias curtas e governam escolhas relativamente simples. Um morfógeno, por exemplo, normalmente atua sobre uma distância de menos de 1 mm – uma distância efetiva para difusão (ver Figura 22-15) – e direciona escolhas entre não mais do que uma porção de opções de desenvolvimento para as células nas quais ele atua. Contudo, os órgãos que eventualmente se desenvolvem são muito maiores e mais complexos do que isso.

A proliferação celular que se segue à especificação inicial é responsável pelo aumento em tamanho, enquanto que o refinamento do padrão inicial é explicado por uma série de induções locais que acrescentam níveis sucessivos de detalhes em um esboço inicialmen-

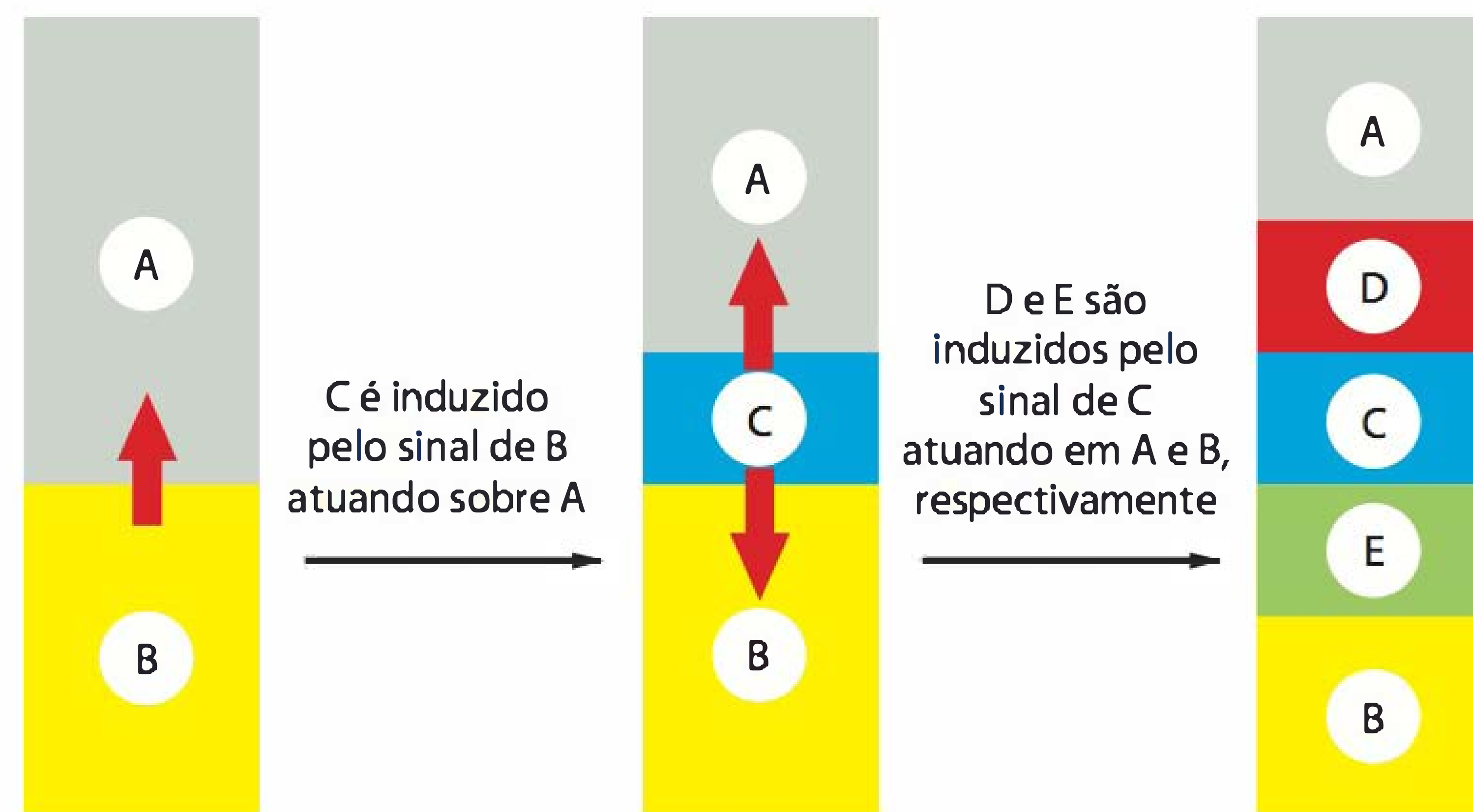


Figura 22-16 Formação de padrões por indução sequencial. Uma série de interações indutoras pode gerar muitos tipos celulares, iniciando a partir de somente alguns.

te simples. Assim que dois tipos de células estão presentes, uma delas pode produzir um fator que induza um subconjunto de células vizinhas a se especializarem em uma terceira via. O terceiro tipo celular pode, por sua vez, sinalizar em resposta aos outros dois tipos celulares próximos, gerando um quarto e um quinto tipo celular, e assim por diante (**Figura 22-16**).

Esta estratégia para a geração de um padrão progressivamente mais complicado é chamada de **indução sequencial**. É principalmente por meio de induções sequenciais que a estrutura do corpo de um animal em desenvolvimento, após ser primeiramente esboçada em miniatura, torna-se elaborada em detalhes progressivamente mais finos, enquanto o desenvolvimento prossegue.

Nas seções que se seguem, focalizaremos em uma pequena seleção de organismos-modelo para ver como os princípios que citamos nesta primeira seção operam na prática. Começaremos com o verme nematoide, *Caenorhabditis elegans*.

Resumo

As alterações óbvias no comportamento celular que observamos enquanto um organismo multicelular desenvolve-se são os sinais exteriores de uma complexa computação molecular, dependente da memória celular que está ocorrendo dentro das células enquanto elas recebem e processam os sinais de suas vizinhas e emitem sinais em resposta. O padrão final dos tipos celulares diferenciados é, dessa forma, o resultado de um programa mais oculto de especialização celular – um programa extensivamente utilizado na alteração dos padrões de expressão por proteínas de regulação gênica, dando a uma célula potencialidades diferentes das outras muito antes de a diferenciação terminal começar. Os biólogos do desenvolvimento procuram decifrar o programa oculto e relacioná-lo, por meio de experimentos genéticos e microcirúrgicos, aos sinais que as células trocam enquanto elas proliferam, interagem e movem-se.

Animais tão diferentes como vermes, moscas e humanos usam conjuntos semelhantes de proteínas para controlar o seu desenvolvimento, de maneira que o que descobrimos em um organismo frequentemente fornece informações sobre os outros. Um grupo de vias de sinalização célula-célula evolutivamente conservadas é usado repetitivamente, em diferentes organismos e em tempos distintos, para regular a criação de um padrão multicelular organizado. As diferenças no plano corporal parecem surgir em grande parte de diferenças no DNA regulador associado a cada gene. Este DNA desempenha uma função central na definição do programa sequencial de desenvolvimento, colocando genes em ação em tempos e em locais específicos, de acordo com o padrão de expressão gênica que estava presente em cada célula no estágio de desenvolvimento anterior.

As diferenças entre as células de um embrião surgem de várias maneiras. A retroalimentação positiva pode levar ao rompimento da simetria, criando uma diferença marcante e constante entre células inicialmente quase idênticas. Células-irmãs podem nascer diferentes como resultado de uma divisão celular assimétrica. Ou um grupo de células inicialmente semelhantes pode ser exposto a diferentes sinais indutivos de células localizadas fora do grupo; indutores de longo alcance com efeitos gradativos, chamados de morfógenos, podem organizar padrões complexos. Por meio da memória celular, tais sinais temporários podem ter um efeito duradouro sobre o estado interno da célula, induzindo-a, por exemplo, a tornar-se determinada para um destino específico. Assim, as sequências de sinais simples atuando em tempos e em locais diferentes nas células em crescimento dão origem aos intricados e variados organismos multicelulares que povoam o mundo ao nosso redor.

CAENORHABDITIS ELEGANS: O DESENVOLVIMENTO A PARTIR DA PERSPECTIVA DE UMA CÉLULA INDIVIDUAL

O verme nematoide *Caenorhabditis elegans* é um organismo pequeno, relativamente simples e precisamente estruturado. A anatomia de seu desenvolvimento tem sido descrita em extraordinário detalhe, e pode-se mapear a linhagem exata de cada célula no corpo. A sequência genômica completa também é conhecida, e um grande número de fenótipos mutantes tem sido analisado para determinar funções gênicas. Se há algum animal multicelular cujo desenvolvimento deveríamos ser capazes de entender em termos de controle genético, é este.

Comparações de sequências de DNA indicam que, enquanto as linhagens que levam aos nematoides, aos insetos e aos vertebrados divergiram uma da outra ao redor da mesma época, a taxa de mudanças evolutivas na linhagem dos nematoides tem sido substancialmente maior: os seus genes, a sua estrutura corporal e suas estratégias de desenvolvimento são mais divergentes dos nossos próprios do que dos da *Drosophila*. No entanto, no nível molecular, muitos dos seus mecanismos de desenvolvimento são similares em insetos e vertebrados, sendo coordenados por sistemas de genes homólogos. Se quisermos saber como um olho, um membro ou um coração se desenvolve, é preciso procurar estas respostas em outros locais: o *C. elegans* não possui estes órgãos. Contudo, em um nível mais fundamental, ele é bastante instrutivo: apresenta as questões gerais básicas do desenvolvimento animal de uma forma relativamente simples e nos possibilita respondê-las em termos de função gênica e do comportamento das células individuais identificadas.

O *Caenorhabditis elegans* é anatomicamente simples

Como adulto, o *C. elegans* consiste em somente cerca de mil células somáticas e de 1.000 a 2.000 células germinativas (exatamente 959 núcleos celulares somáticos e aproximadamente 2.000 células germinativas são encontrados em um sexo; exatamente 1.031 núcleos celulares somáticos e cerca de 1.000 células germinativas no outro) (**Figura 22-17**). A sua anatomia foi reconstruída, célula por célula, por microscopia eletrônica de seções seriadas. A estrutura do plano corporal do verme é simples: ele tem simetria aproximadamente bilateral, um corpo alongado composto dos mesmos tecidos básicos de outros animais (nervos, músculos, intestino, pele), organizado com boca e cérebro na extremidade anterior e ânus na posterior. A parede externa do corpo é composta de duas camadas: a epiderme protetora, ou "pele", e a camada muscular imediatamente abaixo. Um tubo de células endodermais forma o intestino. Um segundo tubo, localizado entre o intestino e a parede do corpo, constitui a gônada; a sua parede é composta de células somáticas, com as células germinativas dentro dela.

O verme *C. elegans* tem dois sexos – um hermafrodita e um macho. O hermafrodita pode ser visto simplesmente como uma fêmea que produz um número limitado de esperma: ela pode reproduzir-se tanto por autofecundação, usando o seu próprio esperma, como por fecundação cruzada após a transferência do esperma do macho pelo acasalamento. A autofecundação permite a um verme heterozigoto único produzir uma progênie homozigota. Esta é uma característica importante que auxilia a fazer do *C. elegans* um organismo excepcionalmente conveniente para estudos genéticos.

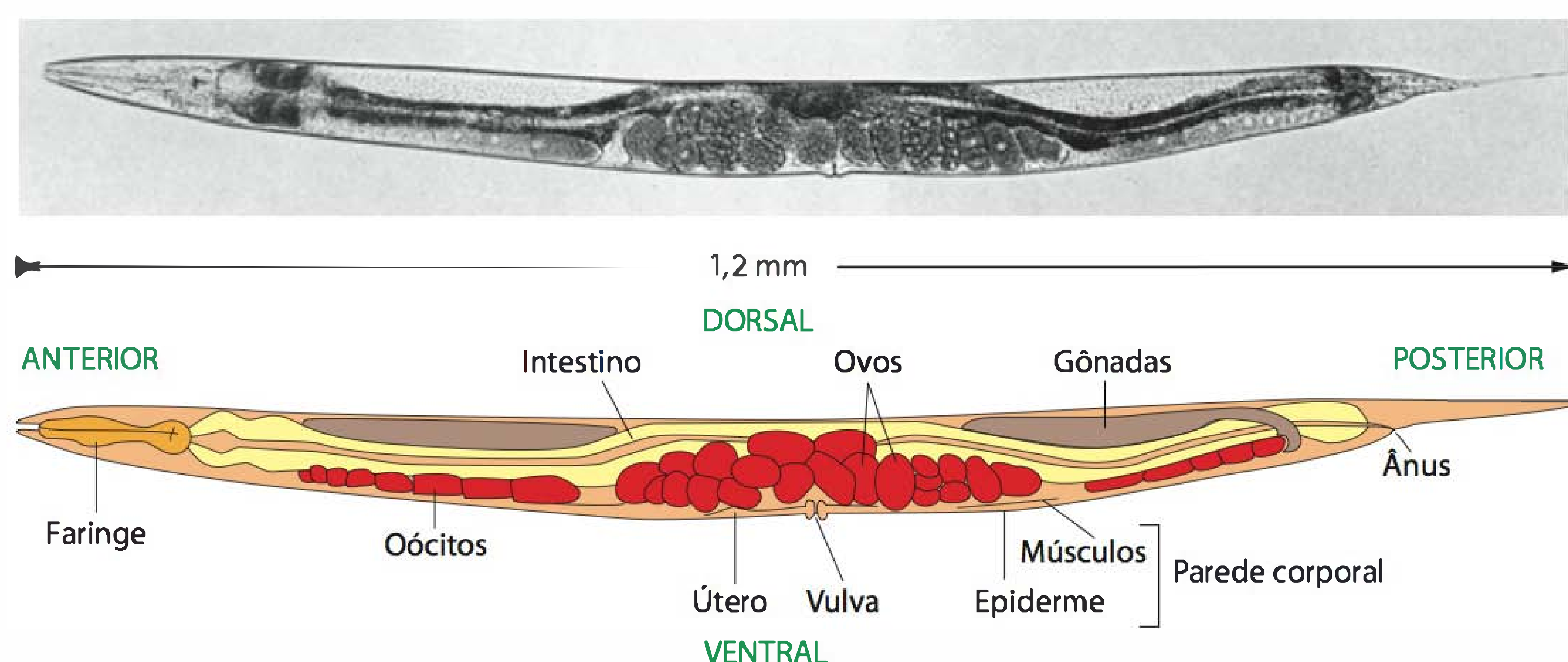


Figura 22-17 ***Caenorhabditis elegans*.** É mostrada uma visão lateral de um adulto hermafrodita. (De J. E. Sulston e H. R. Horvitz, *Dev. Biol.* 56:110-156, 1977. Com permissão da Academic Press.)

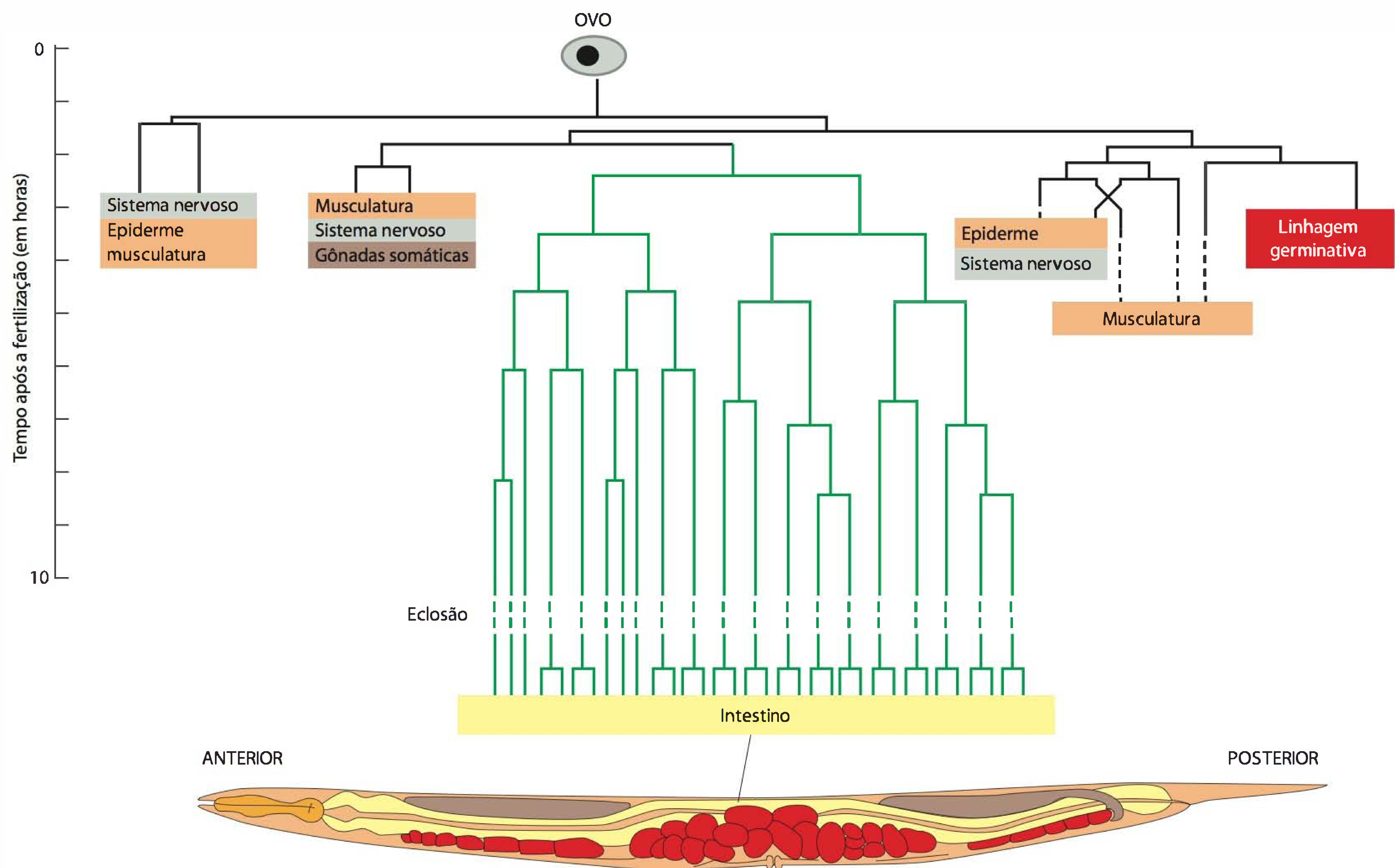


Figura 22-18 **A árvore de linhagens para as células que formam o tubo digestivo (o intestino) de *C. elegans*.** Note que, embora as células intestinais formem um único clone (assim como o fazem as células da linhagem germinativa), as células da maioria dos outros tecidos não o fazem. As células nervosas (não mostradas na figura do adulto na parte inferior) são agrupadas principalmente em um gânglio próximo às extremidades anterior e posterior do animal e no nervo ventral que percorre o comprimento do corpo.

Os destinos celulares no nematoide em desenvolvimento são quase perfeitamente previsíveis

O *C. elegans* inicia a sua vida como uma única célula, o ovo fertilizado, o qual origina, por meio de repetidas divisões celulares, as 558 células que formam um pequeno verme dentro da casca do ovo. Após a eclosão, as divisões adicionais resultam no crescimento e na maturação sexual do verme, enquanto ele passa por quatro estágios larvais sucessivos, separados por mudas. Após a muda final para o estágio adulto, o verme hermafrodita inicia a produção de seus próprios ovos. A sequência inteira de desenvolvimento, de ovo a ovo, leva somente cerca de três dias.

A linhagem de todas as células a partir do ovo unicelular até o adulto multicelular foi mapeada pela observação direta do animal em desenvolvimento. No nematoide, um dado precursor celular inicia o mesmo padrão de divisões celulares em cada indivíduo e, com poucas exceções, o destino de cada célula descendente pode ser previsto a partir da sua posição na árvore de linhagens (**Figura 22-18**).

Esse grau de precisão estereotipada não é visto no desenvolvimento de animais maiores. À primeira vista, isso poderia sugerir que cada linhagem celular no embrião nematoide é rígida e independentemente programada para seguir um conjunto de padrões de divisão celular e de especialização celular, tornando o verme um péssimo e não-representativo organismo-modelo para o desenvolvimento. Veremos que isso está longe de ser verdade: como em outros animais, o desenvolvimento depende de interações célula-célula e de processos internos das células individuais. O resultado no nematoide é quase perfeitamente previsível, porque o padrão de interações célula-célula é altamente reproduzível, estando precisamente correlacionado à sequência das divisões celulares.

No verme em desenvolvimento, como em outros animais, a maioria das células não se restringe a gerar uma progênie de células de um único tipo diferenciado até um momento mais tardio do desenvolvimento, e células de um determinado tipo, como as musculares, em geral são derivadas de diversos precursores dispersos espacialmente e que também dão origem a outros tipos de células. As exceções, nos vermes, são o intestino e a gônada, cada um formado por uma única *célula fundadora*, originada no estágio de desenvolvimento de 8 células para a linhagem celular do intestino, e no estágio de 16 células para a

linhagem de célula-ovo, ou *linhagem germinativa*. Contudo, em qualquer caso, a diversificação celular começa cedo, tão cedo quanto o ovo começa a se clivar: muito antes da diferenciação terminal, a célula começa a se encaminhar através de uma série de estágios intermediários de especialização, seguindo diferentes programas de acordo com sua localização e suas interações com as células adjacentes. Como surgem estas diferenças iniciais entre as células?

Os produtos de genes de efeito materno organizam a divisão assimétrica do ovo

O verme é semelhante à maioria dos animais na especificação inicial das células que irão eventualmente dar origem às células germinativas (ovos ou esperma). A linhagem germinativa dos vermes é produzida por uma série estrita de divisões celulares assimétricas do ovo fertilizado. A assimetria origina-se com um sinal do ambiente do ovo: o ponto de entrada do esperma define o futuro polo posterior do ovo alongado. As proteínas no ovo interagem umas com as outras e organizam-se em relação a este ponto de maneira a criar uma assimetria mais elaborada no interior da célula. As proteínas envolvidas são traduzidas principalmente a partir de produtos de mRNA acumulados dos genes da mãe. Como este RNA é produzido antes de o ovo ser posto, é somente o genótipo da mãe que determina o que acontece nos primeiros passos do desenvolvimento. Os genes que atuam desta maneira são chamados de **genes de efeito materno**.

Um subconjunto de genes de efeito materno é especificamente necessário para organizar o padrão assimétrico do ovo nematoide. Estes são chamados de genes *Par* (defectivos em partição), e pelo menos seis foram identificados por rastreamento genético de mutantes em que o padrão tenha sido rompido. Os genes *Par* possuem homólogos em insetos e em vertebrados, onde desempenham papel fundamental na organização da polaridade da célula, como discutido no Capítulo 19. De fato, uma das chaves para o entendimento atual dos mecanismos gerais envolvidos com a polaridade de células foi a descoberta destes genes por estudos em embriões de desenvolvimento inicial de *C. elegans*.

No ovo nematoide, assim como em outras células no nematoide e em outros animais, as proteínas Par (os produtos dos genes *Par*) têm elas mesmas uma distribuição assimétrica, algumas estando localizadas em um dos extremos da célula e outras no extremo oposto. Elas servem para trazer um conjunto de partículas de ribonucleoproteínas chamadas de *grânulos P* para o polo posterior do ovo, de maneira que a célula-filha posterior herda os grânulos P, e a célula-filha anterior não. Por todas as poucas divisões celulares seguintes, as proteínas Par operam de uma maneira semelhante, orientando o fuso mitótico e segregando os grânulos P para uma célula-filha em cada mitose, até que, no estágio de 16 células, há somente uma célula que contém os grânulos P (**Figura 22-19**). Esta célula origina a linhagem germinativa.

A especificação dos precursores das células germinativas como independentes dos precursores das células somáticas é um evento-chave no desenvolvimento de praticamente todos os tipos de animais, e o processo tem características comuns mesmo em filos com

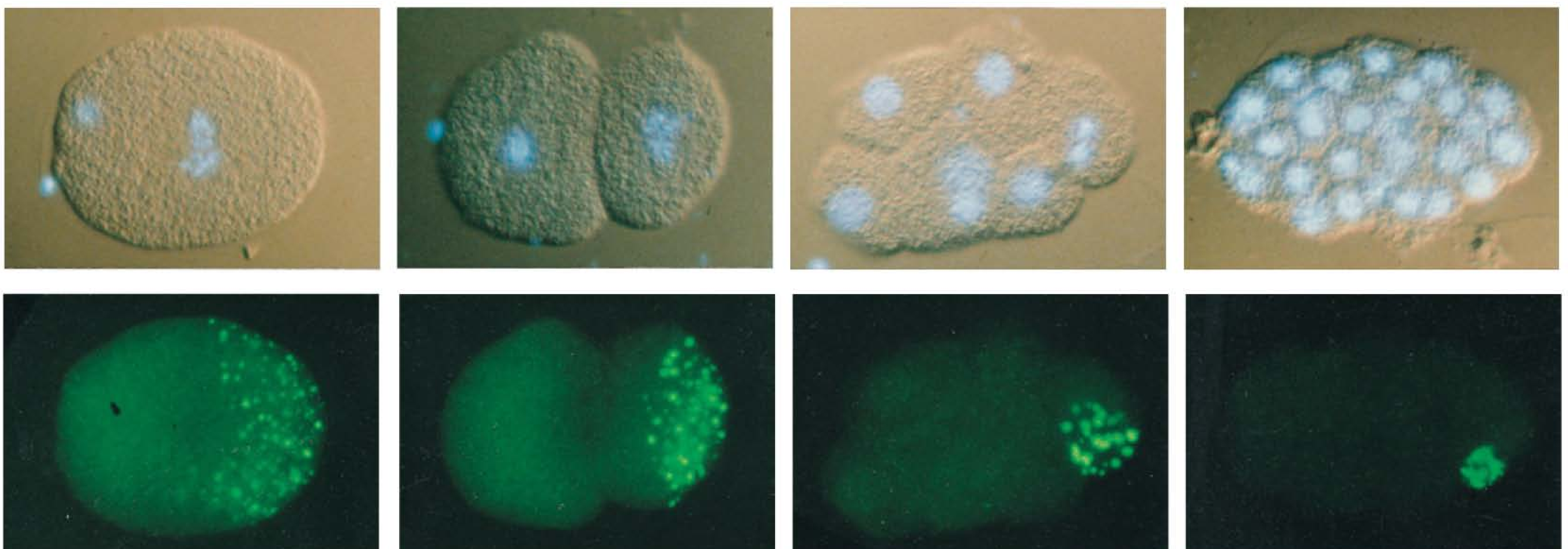


Figura 22-19 Divisões assimétricas segregando grânulos P na célula fundadora da linhagem germinativa de *C. elegans*. As micrografias na linha de cima mostram o padrão de divisões celulares, com os núcleos celulares corados em *azul* com um marcador fluorescente específico para DNA; abaixo estão as mesmas células coradas com um anticorpo contra os grânulos P. Estes pequenos grânulos (0,5 a 1 μm de diâmetro) estão distribuídos aleatoriamente por todo o citoplasma em um ovo não-fertilizado (não-mostrado). Após a fertilização, em cada divisão celular até o estágio de 16 células, tanto eles como a maquinaria intracelular que os localiza assimetricamente estão segregados em uma única célula-filha. (Cortesia de Susan Strome.)

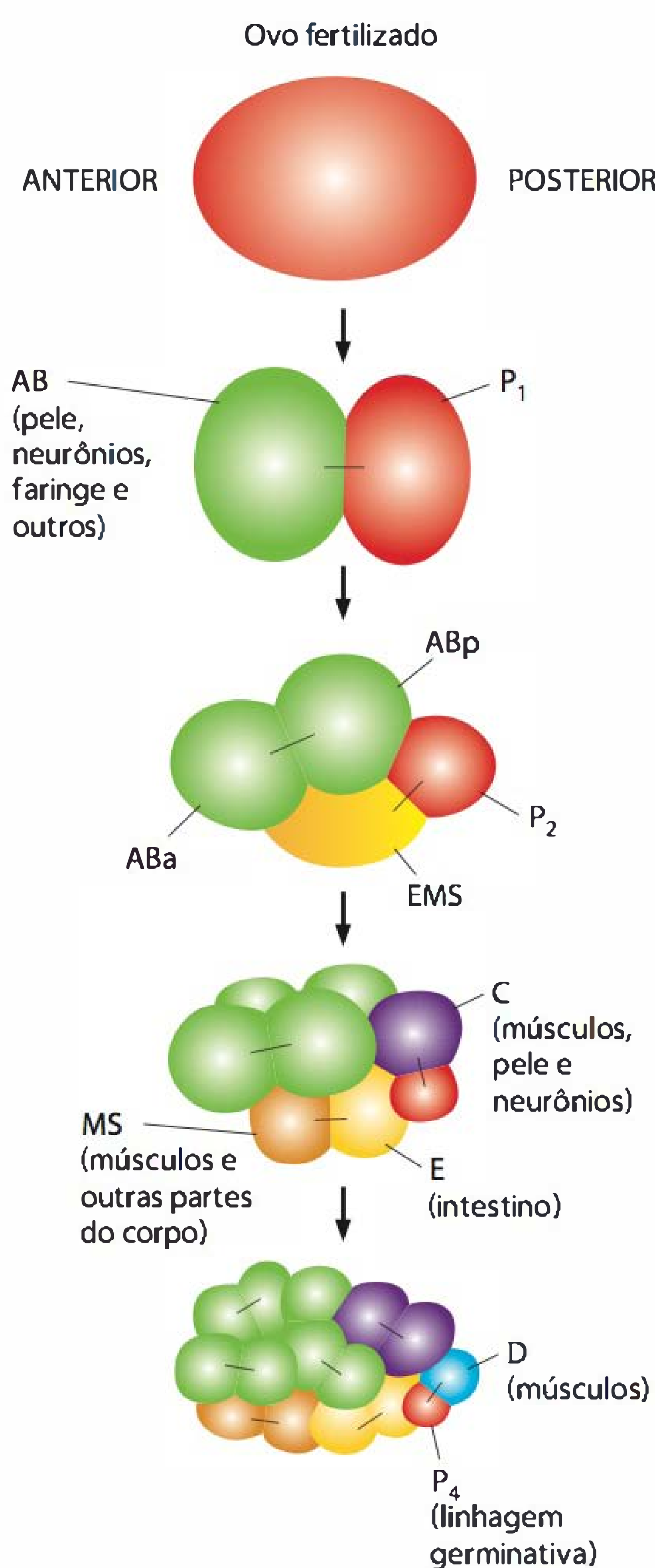


Figura 22-20 O padrão de divisões celulares em um embrião jovem de *C. elegans*, indicando os nomes e os destinos das células individuais. As células que são irmãs são mostradas ligadas por uma *linha preta curta*. (Segundo K. Kemphues, *Cell* 101:345-348, 2000. Com permissão de Elsevier.)

estruturas corporais muito diferentes. Dessa forma, na *Drosophila*, as partículas semelhantes aos grânulos P também são segregadas em uma extremidade do ovo e tornam-se incorporadas nas células precursoras da linhagem germinativa para a determinação do seu destino. Um fenômeno similar ocorre nos peixes e nas rãs. Nessas espécies, pode-se reconhecer pelo menos algumas das mesmas proteínas no material que determina as células germinativas, incluindo os homólogos de uma proteína de ligação ao RNA chamada de Vasa. Ainda é desconhecido o modo como a Vasa e as suas proteínas associadas e moléculas de RNA atuam na definição da linhagem germinativa.

Os padrões progressivamente mais complexos são criados por interações célula-célula

O ovo do *C. elegans*, assim como de outros animais, é uma célula extraordinariamente grande, com espaço para a formação de padrões internos complexos. Além dos grânulos P, outros fatores são distribuídos em uma maneira ordenada ao longo do seu eixo ântero-posterior sob o controle das proteínas Par, que, assim, são alocadas para células diferentes enquanto o ovo passa por alguns dos primeiros ciclos de divisão celular. Essas divisões ocorrem sem crescimento (uma vez que a alimentação não pode começar antes que a boca e o intestino tenham sido formados) e subdividem o ovo em células progressivamente menores. Muitos dos fatores que são localizados são proteínas de regulação gênica, as quais atuam diretamente na célula que as herda para direcionar ou bloquear a expressão de genes específicos, adicionando diferenças entre a célula e as suas vizinhas e comprometendo-a com um destino especializado.

Enquanto as primeiras poucas diferenças ao longo do eixo ântero-posterior do *C. elegans* são o resultado de divisões assimétricas, a formação de novos padrões, incluindo o padrão dos tipos celulares ao longo de outros eixos, depende de interações entre uma célula e outra. As linhagens celulares no embrião são tão reproduzíveis que as células individuais podem ser designadas com nomes e identificadas em cada animal (**Figura 22-20**); as células do estágio de quatro células, por exemplo, são chamadas de ABa e ABp (as duas células-irmãs anteriores), e EMS e P_2 (as duas células-irmãs posteriores). Como resultado das divisões assimétricas que acabamos de descrever, a célula P_2 expressa uma proteína-sinal na sua superfície – Delta, uma proteína de nematoides homóloga ao ligante de Notch – enquanto as células ABa e ABp expressam o receptor transmembrana correspondente – um homólogo de Notch. A forma alongada da casca do ovo força essas células para um arranjo tal que a célula mais anterior, ABa, e a célula mais posterior, P_2, não estão mais em contato uma com a outra. Assim, somente a célula ABp pode receber sinais da célula P_2, tornando ABp diferente de ABa e definindo o futuro eixo dorso-ventral do verme (**Figura 22-21**).

Ao mesmo tempo, a P_2 também expressa outra molécula-sinal, a proteína Wnt, a qual atua no receptor Wnt (uma proteína Frizzled) na membrana da célula EMS. Este sinal polariza a célula EMS em relação ao seu local de contato com P_2, controlando a orientação do fuso mitótico. A célula EMS então se divide para originar duas células-filhas que se tornam comprometidas para destinos diferentes como resultado do sinal Wnt de P_2. Uma filha, a célula MS, originará músculos e várias outras partes do corpo; a outra filha, a célula E, é a célula fundadora do intestino, comprometida em originar todas as células do intestino e de nenhum outro tecido (ver Figura 22-21).

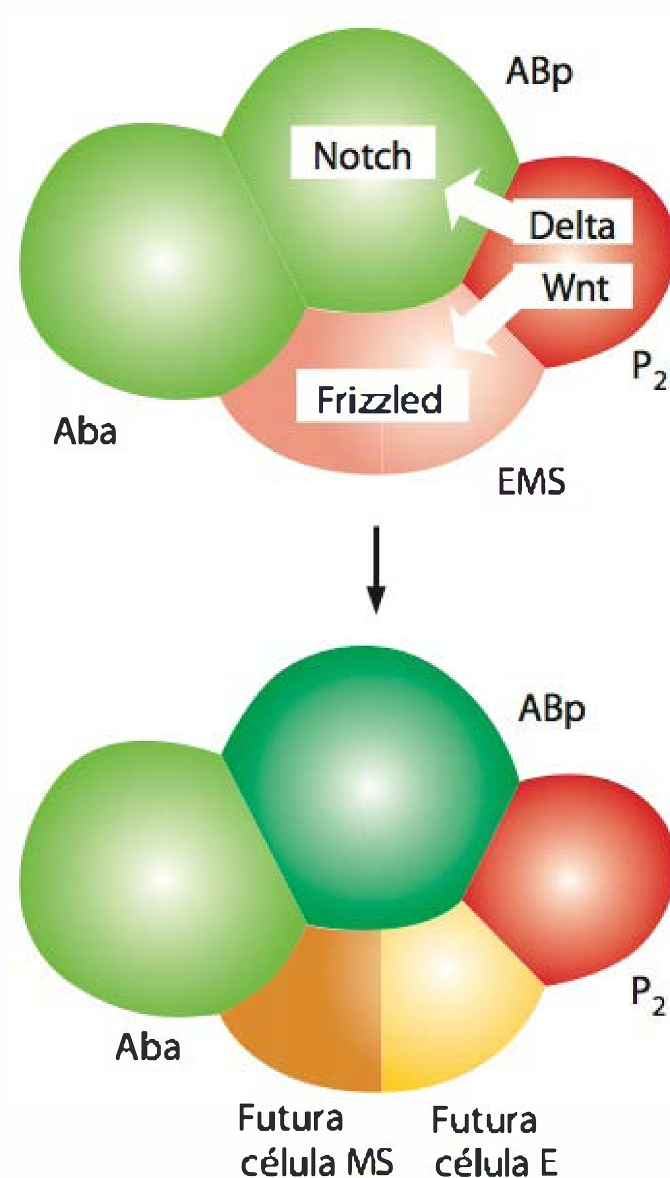


Figura 22-21 Vias de sinalização celular controlando a designação de diferentes características para as células em um embrião nematoide de quatro células. A célula P_2 utiliza a via de sinalização de Notch para enviar um sinal indutor para a célula ABp, induzindo-a a adotar uma característica especializada. A célula ABa possui todo o aparato molecular para responder da mesma maneira ao mesmo sinal, mas ela não o faz, porque não está em contato com P_2. Enquanto isso, um sinal Wnt da célula P_2 induz a célula EMS a orientar o seu fuso mitótico e a gerar duas filhas que se tornam comprometidas com destinos diferentes, como resultado de suas exposições distintas à proteína Wnt – a célula MS e a célula E (a célula fundadora do intestino).

Tendo sido descrita a cadeia de causa e efeito no desenvolvimento inicial dos nematoides, examinaremos agora alguns dos métodos que têm sido usados para decifrá-la.

A microcirurgia e a genética revelam a lógica do controle do desenvolvimento; a clonagem de genes e o seu sequenciamento revelam seus mecanismos moleculares

Para descobrir os mecanismos causais, precisamos conhecer o potencial de desenvolvimento das células individuais no embrião. Em que momentos de suas vidas elas sofrem alterações internas decisivas que as determinam para um destino particular, e em que momentos dependem dos sinais de outras células? No nematoide, a microcirurgia de microemissão *laser* pode ser usada para matar uma ou mais células vizinhas, e então observar diretamente como a célula comporta-se em circunstâncias alteradas. Alternativamente, as células de um embrião inicial podem ser empurradas e rearranjadas dentro da casca do ovo pelo uso de uma fina agulha. Por exemplo, as posições relativas de ABa e de ABp podem ser trocadas no estágio de desenvolvimento de quatro células. A célula ABa passa pelo que normalmente seria o programado para a célula ABp, e vice-versa, mostrando que as duas células inicialmente possuem o mesmo potencial de desenvolvimento e dependem dos sinais das suas vizinhas para torná-las diferentes. Uma terceira tática é remover a casca do ovo de um embrião inicial de *C. elegans* pela sua digestão com enzimas e, então, manipular as células em cultura. A existência de um sinal polarizante de P_2 para EMS foi demonstrada dessa maneira.

Foram usadas sondagens genéticas para identificar genes envolvidos na interação das células P_2-EMS. Procurou-se por linhagens mutantes de vermes nos quais nenhuma célula de intestino fosse induzida (chamados de mutantes *Mom*, porque possuem mais mesoderma, do inglês *more mesoderm* – o mesoderma sendo o destino de ambas as células-filhas de EMS, quando a indução falha). A clonagem e o sequenciamento dos genes *Mom* revelaram que um codifica a proteína-sinal Wnt que é expressa na célula P_2, e o outro codifica uma proteína Frizzled (um receptor Wnt) que é expressa na célula EMS. Uma segunda sondagem genética foi conduzida em busca de linhagens mutantes dos vermes com o fenótipo oposto, nos quais células extras de intestino são induzidas (chamados de mutantes *Pop*, porque apresentam uma faringe posterior, do inglês *posterior pharynx*). Um dos genes *Pop* (*Pop1*) codifica uma proteína de regulação gênica (um homólogo de LEF1/TCF) cuja atividade é diminuída pela sinalização de Wnt em *C. elegans*. Quando a atividade de *Pop1* está ausente, ambas as filhas das células EMS comportam-se como se tivessem recebido o sinal Wnt de P_2. Foram usados métodos genéticos semelhantes para identificar os genes cujos produtos medeiam a sinalização dependente de Notch de P_2 para ABa.

Continuando neste caminho, é possível construir uma representação detalhada dos eventos decisivos no desenvolvimento do nematoide e da maquinaria geneticamente específica que os controlam.

As células alteram suas capacidades de resposta aos sinais do desenvolvimento ao longo do tempo

A complexidade do corpo do nematoide adulto é alcançada por meio do uso repetido de uma série de mecanismos formadores de padrões, incluindo aqueles que acabamos de ver em ação no embrião inicial. Por exemplo, as divisões celulares com assimetria molecular são dependentes das proteínas de regulação gênica Pop1, presentes durante todo o desenvolvimento de *C. elegans*, criando células-irmãs anteriores e posteriores com diferentes características.

Como enfatizado anteriormente, enquanto os mesmos poucos tipos de sinais atuam repetidamente em tempos e locais distintos, os efeitos que eles provocam são diferentes porque as células são programadas para responder diferentemente de acordo com a sua idade e o seu histórico. Vimos, por exemplo, que no estágio do desenvolvimento de quatro células, uma célula, ABp, altera seu potencial de desenvolvimento devido a um sinal recebido através da via de sinalização de Notch. No estágio de desenvolvimento de 12 células, as netas da célula ABp e as netas da célula ABa encontram outro sinal de Notch, desta vez oriundo de uma célula-neta EMS. A neta de ABa altera o seu estado interno em resposta a este sinal e inicia a formação da faringe. A neta de ABp não o faz – a exposição inicial ao sinal de Notch tornou-a não-responsiva. Portanto, em diferentes momentos na sua história, ambas as li-

nhagens celulares ABa e ABp respondem a Notch, porém os resultados são diferentes. De alguma maneira, um sinal de Notch no estágio de 12 células induz a faringe, mas um sinal de Notch no estágio de quatro células possui outros efeitos – os quais incluem a prevenção da indução da faringe por este mesmo sinal em um estágio mais tardio. Este fenômeno, onde um mesmo mecanismo de sinalização tem efeitos distintos em estágios diferentes e em contextos diferentes, é visto no desenvolvimento de todos os animais, e em todos eles a via de sinalização de Notch é utilizada desta forma, repetidamente.

Os genes heterocrônicos controlam o tempo no desenvolvimento

Uma célula não precisa receber um sinal externo para alterar-se: um conjunto de moléculas reguladoras dentro da célula pode provocar a produção de outro, e a célula pode então passar por uma série de diferentes estados de maneira autônoma. Esses estados diferem não somente em sua capacidade de resposta a sinais externos, mas também em outros aspectos da sua química interna, incluindo as proteínas que interrompem ou iniciam o ciclo de divisão celular. Dessa forma, os mecanismos internos da célula, juntamente com os sinais recebidos no passado e no presente, ditam a sequência das alterações bioquímicas na célula e o momento das suas divisões celulares.

Os detalhes moleculares específicos dos mecanismos que governam o programa temporal do desenvolvimento ainda são desconhecidos. Extraordinariamente, pouco se sabe, mesmo no embrião nematoide com o seu padrão rigidamente previsível de divisões celulares, a respeito de como a sequência das divisões celulares é controlada. Entretanto, nos últimos estágios, quando a larva alimenta-se, cresce e sofre a muda para tornar-se um adulto, é possível identificar alguns dos genes que controlam os momentos dos eventos celulares. As mutações nesses genes causam fenótipos *heterocrônicos*: as células em uma larva de um estágio comportam-se como se pertencessem a uma larva de um estágio diferente, ou as células no adulto continuam dividindo-se como se pertencessem a uma larva (**Figura 22-22**).

Por meio de análises genéticas, pode-se determinar que os produtos dos genes heterocrônicos agem em série, formando cascatas reguladoras. Curiosamente, dois genes no início das suas respectivas cascatas, chamados de *Lin4* e *Let7*, não codificam proteínas, mas moléculas de microRNAs – pequenas moléculas de RNA regulador não-traduzidas, com 21 ou 22 nucleotídeos. Estas atuam pela ligação a sequências complementares nas regiões não-codificantes das moléculas de mRNA transcritas de outros genes heterocrônicos, inibindo, assim, sua tradução e promovendo a sua degradação, como discutido no Capítulo 7. O aumento dos níveis do RNA de *Lin4* controla a progressão do comportamento celular do estágio 1 de larva para o comportamento celular do estágio 3 de larva; o aumento dos níveis do RNA de *Let7* controla a progressão da larva tardia para o adulto. Na realidade, *Lin4* e *Let7* foram os

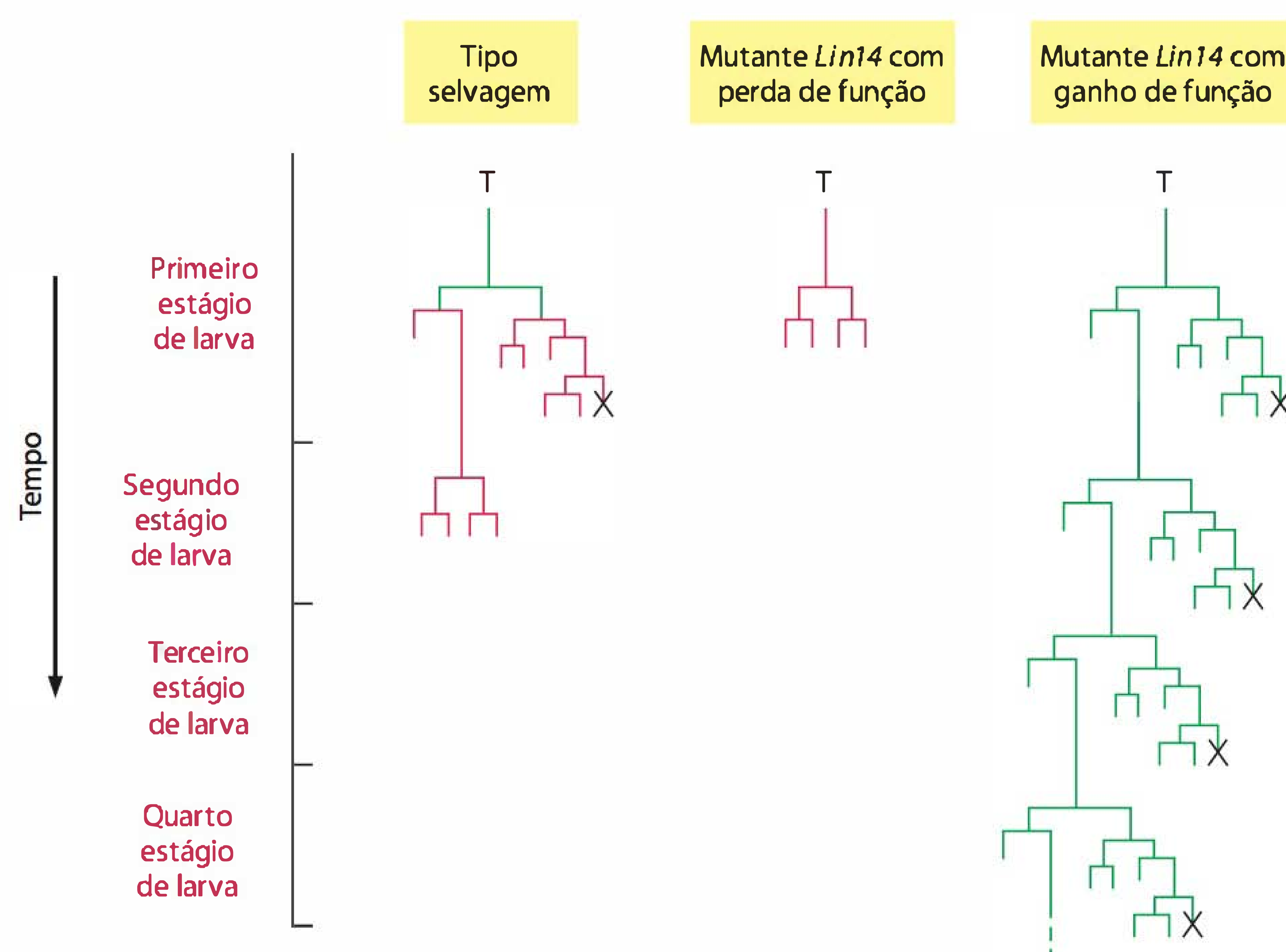


Figura 22-22 Mutações heterocrônicas no gene *Lin-14* de *C. elegans*. São mostrados os efeitos em somente uma das muitas linhagens afetadas. A mutação com perda de função (recessiva) em *Lin14* causa uma ocorrência prematura do padrão de divisão celular e as características de diferenciação da larva tardia, de maneira que o animal alcança o seu estágio final de modo prematuro e com um número anormalmente pequeno de células. A mutação com ganho de função (dominante) provoca o efeito oposto, induzindo as células a reiterarem os seus padrões de divisão celular característicos do primeiro estágio larval, continuando por cinco ou seis ciclos de mudas e persistindo na produção de um tipo imaturo de cutícula. A cruz denota uma morte celular programada. As *linhas verdes* representam as células que contêm a proteína Lin14 (que se liga ao DNA); as *linhas vermelhas* representam as células que não contêm essa proteína. No desenvolvimento normal, o desaparecimento de Lin14 é desencadeado pelo início da alimentação larval. (Segundo A. Ambros e H. R. Horvitz, *Science* 226:409-416, 1984, com permissão de AAAS; e P. Arasu, B. Wightman e G. Ruvkun, *Growth Dev. Aging* 5:1825-1833, 1991, com permissão da Growth Publishing Co., Inc.)

primeiros microRNAs a serem descritos nos animais: por meio de estudos da genética do desenvolvimento em *C. elegans* foi descoberta a importância de toda essa classe de moléculas para a regulação gênica.

As moléculas de RNA que são idênticas ou quase idênticas ao RNA *Let7* são encontradas em muitas outras espécies, incluindo-se a *Drosophila*, o peixe-zebra e os humanos. Além disso, esses RNAs parecem atuar de maneira semelhante para regular o nível das suas moléculas de mRNA-alvo, e os próprios alvos são homólogos aos alvos do RNA *Let7* do nematoide. Em *Drosophila*, este sistema de moléculas parece estar envolvido na metamorfose da forma larval para mosca, mantendo conservado o seu papel de controlar o curso das transições envolvidas no desenvolvimento.

As células não contam as divisões celulares para cronometrar seus programas internos

Uma vez que os passos da especialização celular têm de ser coordenados com as divisões celulares, frequentemente é sugerido que o ciclo de divisão celular deveria servir como um relógio no controle do ritmo dos outros eventos no desenvolvimento. Sob este ponto de vista, as alterações nos estados internos estariam condicionadas a sua passagem pelos ciclos de divisão: a célula passaria para o próximo estado se sofresse mitose, por exemplo. Apesar de haver alguns casos onde as alterações no estado celular estão condicionadas aos eventos do ciclo celular, isto está longe de ser uma regra geral. As células dos embriões em desenvolvimento, sejam eles vermes, moscas ou vertebrados, normalmente mantêm seu cronograma-padrão de determinação e de diferenciação, mesmo quando o progresso pelo ciclo de divisão celular é bloqueado de maneira artificial. Existem necessariamente algumas anormalidades, pelo menos porque uma célula única que não se dividiu não pode diferenciar-se de duas maneiras de uma só vez. Contudo, na maioria dos casos que têm sido estudados, parece claro que a célula altera o seu estado com o tempo, de forma mais ou menos independente da divisão celular, e que esta alteração de estado controla a decisão de dividir-se, assim como a decisão de quando e como se especializar.

Células selecionadas morrem por apoptose como parte do programa de desenvolvimento

O controle dos números celulares no desenvolvimento depende tanto da morte celular quanto da divisão celular. Um hermafrodita de *C. elegans* gera 1.030 núcleos somáticos celulares no curso do seu desenvolvimento, mas 131 das células morrem. Estas mortes celulares programadas ocorrem em um padrão absolutamente previsível. Em *C. elegans*, elas podem ser descritas em detalhes, pois é possível rastrear o destino de cada célula individual e ver quem morre, observando como cada vítima suicida sofre apoptose e é rapidamente engolfada e digerida pelas células vizinhas (**Figura 22-23**). Em outros organismos, em que uma observação detalhada é mais difícil, tais mortes facilmente passam despercebidas; mas a morte celular por apoptose provavelmente seja o destino de uma fração substancial das células produzidas pela maioria dos animais, desempenhando uma parte essencial na geração de um indivíduo com os tipos celulares certos, em números e locais certos, como discutido no Capítulo 18.

As sondagens genéticas em *C. elegans* têm sido cruciais na identificação dos genes que desencadeiam a apoptose e em salientar a sua importância no desenvolvimento. Descobriu-se que três genes, chamados de *Ced3*, *Ced4* e *Egl1* (*CED*, morte celular anormal, de *cell death abnormal*), são necessários para ocorrerem as 131 mortes celulares normais. Se esses genes são inativados por mutação, as células que normalmente são destinadas a morrer sobrevivem, diferenciando-se como tipos celulares reconhecidos, como neurônios. Por outro lado, a superexpressão ou a expressão em local errôneo dos mesmos genes causa a morte de



Figura 22-23 Morte celular apoptótica em *C. elegans*. A morte depende da expressão dos genes *Ced3* e *Ced4* na ausência da expressão de *Ced9* – todos na própria célula que está morrendo. O subsequente engolfamento e a remoção dos restos dependem da expressão de outros genes nas células vizinhas.

muitas células que normalmente sobreviveriam. O mesmo efeito resulta de mutações que inativam outro gene, *Ced9*, o qual normalmente reprime o programa de morte celular.

Todos esses genes codificam para componentes conservados da maquinaria de morte celular. Como descrito no Capítulo 18, o *Ced3* codifica para um homólogo de caspases, enquanto o *Ced4*, o *Ced9* e o *Egl1* são respectivamente homólogos de *Apaf1*, *Bcl2* e *Bad*. Sem a compreensão obtida pela análise detalhada do desenvolvimento desse verme nematoide transparente e geneticamente maleável, teria sido muito mais difícil descobrir esses genes e entender o processo de morte celular nos vertebrados.

Resumo

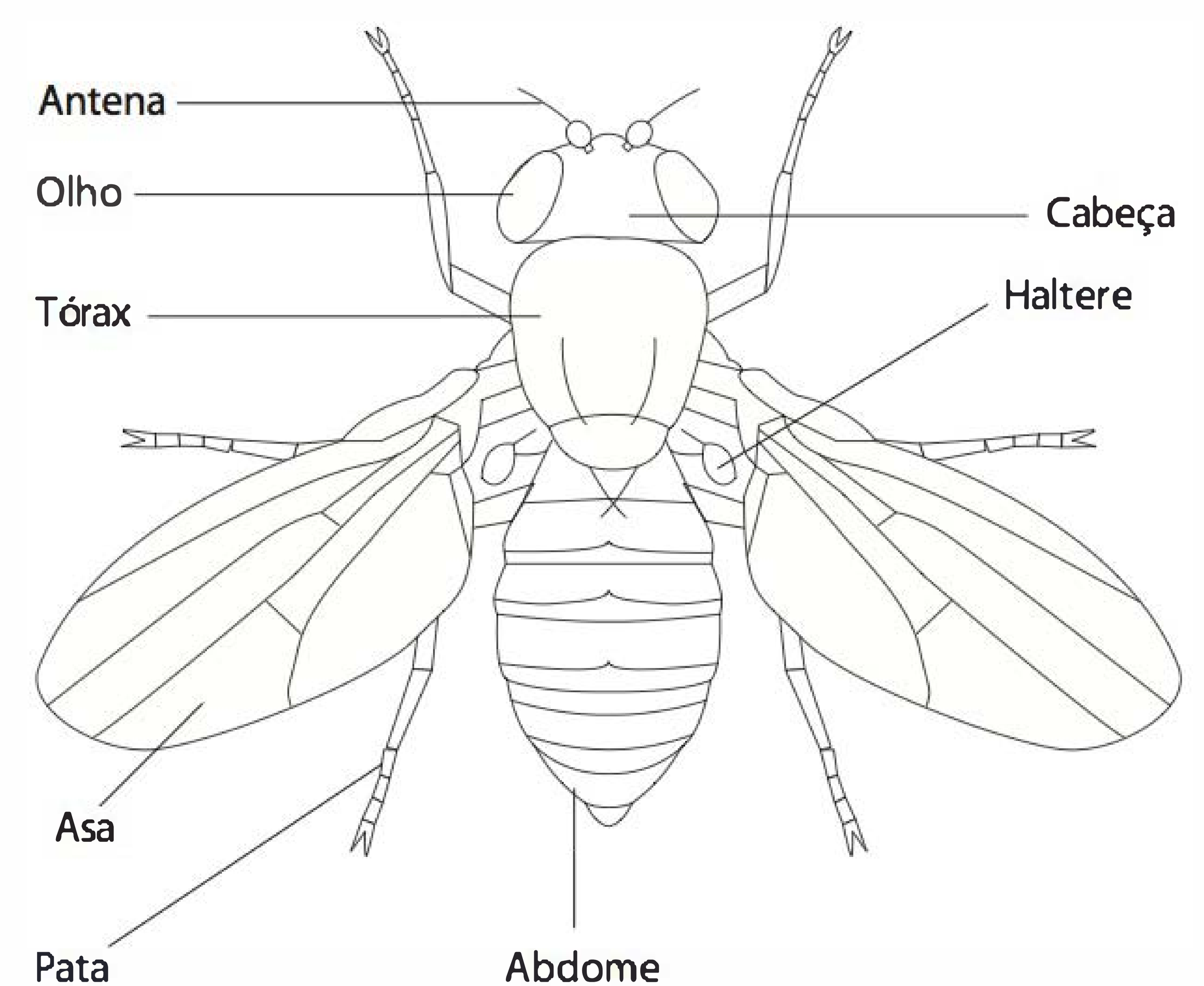
O desenvolvimento do pequeno verme nematoide transparente e relativamente simples Caenorhabditis elegans é extraordinariamente reproduzível e tem sido descrito em detalhes, pois uma célula em qualquer posição no corpo tem a mesma linhagem em todos os indivíduos, e essa linhagem é totalmente conhecida. Além disso, o seu genoma foi completamente sequenciado. Assim, estratégias genéticas e técnicas microcirúrgicas podem ser combinadas para decifrar os mecanismos do desenvolvimento. Como em outros organismos, o desenvolvimento depende da ação recíproca de interações célula-célula e de processos celulares autônomos. O desenvolvimento inicia com uma divisão assimétrica do ovo fertilizado, dividindo-o em duas células menores contendo diferentes determinantes de destino celulares. As filhas dessas células interagem através das vias de sinalização celulares de Notch e Wnt para criar uma série mais diversa de estados celulares. Enquanto isso, por divisões assimétricas adicionais, uma célula herda materiais do ovo que a determinam, em um estágio precoce, como progenitora da linhagem germinativa.

As sondagens genéticas identificam os conjuntos de genes responsáveis por estas e por etapas mais tardias do desenvolvimento, incluindo, por exemplo, os genes de morte celular que controlam a apoptose de um subconjunto específico de células como parte do programa normal de desenvolvimento. Os genes heterocrônicos que governam a duração dos eventos no desenvolvimento também foram identificados, embora, em geral, ainda tenhamos pouco entendimento sobre o controle temporal do desenvolvimento. Existem boas evidências, entretanto, de que o ritmo do desenvolvimento não é ajustado pela contagem das divisões celulares.

DROSOPHILA E A GENÉTICA MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE PADRÕES: A GÊNESE DO PLANO CORPORAL

A mosca *Drosophila melanogaster* (**Figura 22-24**), mais do que qualquer outro organismo, transformou o nosso conhecimento de como os genes governam a formação de padrões do corpo. A anatomia da *Drosophila* é mais complexa do que a de *C. elegans*, superando em


(A)



(B)

Figura 22-24 ***Drosophila melanogaster.*** Vista dorsal de uma mosca normal adulta. (A) Fotografia. (B) Desenho ilustrativo. (Fotografia cortesia de E. B. Lewis.)

cem vezes o seu número de células, e mostra paralelos mais óbvios com a nossa própria estrutura corporal. Surpreendentemente, a mosca tem menos genes que o verme – cerca de 14 mil e 20 mil, respectivamente. Por outro lado, ela tem o dobro de DNA por gene (cerca de 10 mil nucleotídeos em média, se comparado com cerca de 5 mil do verme), a maior parte sendo de DNA não-codificante. O conjunto de construção molecular tem um número menor de partes, mas as instruções de montagem – como especificado pelas sequências reguladoras no DNA não-codificante – parecem ser mais volumosas.

Décadas de estudo genético, culminando nas massivas sondagens genéticas, produziram um catálogo dos genes de controle do desenvolvimento que definem o padrão espacial dos tipos celulares e das estruturas do corpo da mosca; e a biologia molecular tem nos fornecido ferramentas para observar esses genes em ação. Pela hibridização *in situ*, usando sondas de DNA ou de RNA em embriões inteiros, ou pela coloração com anticorpos marcados para revelar a distribuição de proteínas específicas, pode-se observar diretamente como os estados internos das células são definidos pelos conjuntos de genes reguladores que elas expressam em diferentes momentos do desenvolvimento. Além disso, pela análise de animais que são uma quimera de células mutantes e não-mutantes, pode-se descobrir como cada gene opera como parte de um sistema que especifica a organização do corpo.

A maioria dos genes que controlam o padrão do corpo da *Drosophila* tem contrapartes próximas em animais superiores, incluindo nós mesmos. De fato, muitos dos mecanismos básicos para a definição da estrutura do corpo e a formação dos padrões de órgãos e de tecidos individuais são incrivelmente similares. Assim, surpreendentemente, a mosca forneceu a chave para o entendimento da genética molecular do nosso próprio desenvolvimento.

As moscas, assim como os vermes nematoides, são ideais para estudos genéticos: de baixo custo para criar, fáceis de mutar e rápidas em seu ciclo reprodutivo. Contudo, existe uma razão mais fundamental para elas serem tão importantes para os geneticistas do desenvolvimento. Como enfatizado anteriormente, como resultado das duplicações gênicas, os genomas dos vertebrados frequentemente contêm dois ou três genes homólogos que correspondem a um único gene na mosca. Uma mutação que destrua um desses genes muitas vezes não consegue revelar a função central do gene, pois os outros homólogos compartilham a função e mantêm-se ativos. Na mosca, com o seu conjunto gênico mais econômico, este fenômeno de redundância genética é menos prevalente. Assim, o fenômeno de uma única mutação na mosca, mais comumente, revela a função do gene mutante.

O corpo do inseto é construído como uma série de unidades segmentares

O cronograma de desenvolvimento da *Drosophila*, do ovo ao adulto, está resumido na **Figura 22-25**. O período de *desenvolvimento embrionário* começa na fertilização e leva em torno de um dia, ao final do qual o embrião eclode da casca do ovo para tornar-se uma *larva*. A larva passa então por três estágios, ou *ínstares*, separados por mudas nas quais ela perde a sua camada antiga de cutícula e produz uma maior. No final do terceiro ínstar ela forma uma pupa. No interior da *pupa* ocorre um remodelamento radical do corpo – um processo chamado de *metamorfose*. Eventualmente, cerca de nove dias após a fertilização, uma mosca adulta, ou *imago*, emerge.

A mosca consiste em uma cabeça, com boca, olhos e antenas, seguidas por três segmentos torácicos (numerados T1 a T3) e oito ou nove segmentos abdominais (numerados A1 a A9). Cada segmento, embora diferente dos outros, é produzido de acordo com um plano semelhante. O segmento T1, por exemplo, carrega um par de patas; T2 carrega um par de patas mais um par de asas, e T3 carrega um par de patas mais um par de halteres – pequenos balanceadores em forma de saliências arredondadas importantes para o voo, evoluídos a partir do segundo par de asas que os insetos mais primitivos possuem. A segmentação, quase repetitiva, desenvolve-se no embrião inicial durante as primeiras horas após a fertilização (**Figura 22-26**), mas é mais óbvia na larva (**Figura 22-27**), na qual os segmentos parecem mais similares do que no adulto. No embrião, pode ser visto que os rudimentos da cabeça, ou pelo menos as futuras estruturas da boca do adulto, também são segmentares. Nas duas extremidades do animal, entretanto, existem estruturas terminais altamente especializadas que não são derivadas de segmentação.

Os limites entre os segmentos são tradicionalmente definidos por marcadores anatômicos visíveis; contudo, na discussão dos padrões de expressão gênica, é conveniente desenhar um conjunto diferente de limites segmentares, definindo uma série de unidades



Figura 22-25 **Resumo do desenvolvimento da *Drosophila*, do ovo até a mosca adulta.**

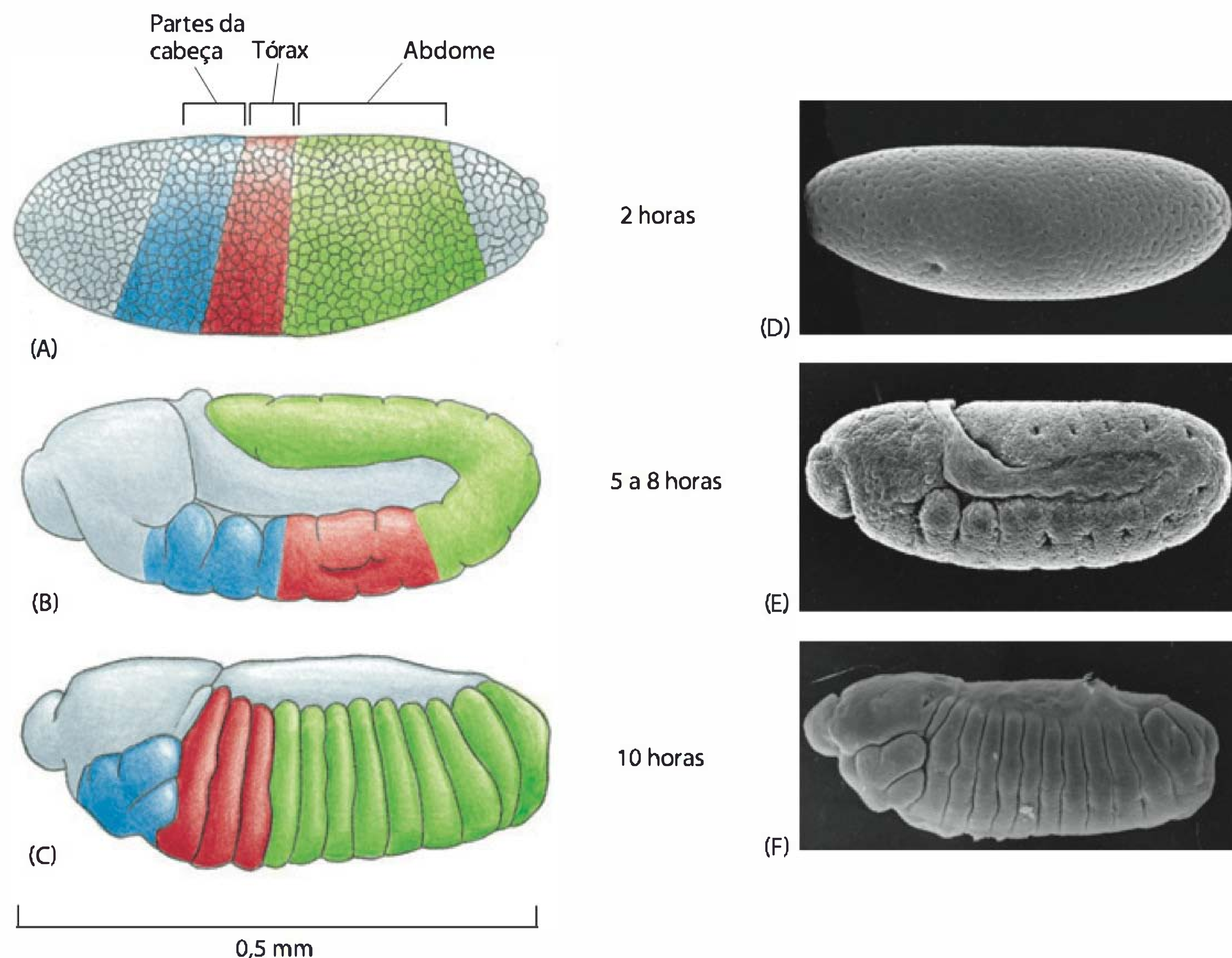


Figura 22-26 A origem dos segmentos corporais de *Drosophila* durante o desenvolvimento embrionário. Os embriões são mostrados em vista lateral nas ilustrações (A-C) e nas micrografias eletrônicas por varredura correspondentes (D-F). (A e D) Em duas horas, o embrião está no estágio de blastoderme sincicial (ver Figura 22-28) e nenhum segmento é visível, apesar de um mapa de destinação celular poder ser desenhado, mostrando as futuras regiões segmentares (coloridas em A). (B e E) Em cinco a oito horas, o embrião está no estágio de banda germinativa estendida: a gastrulação ocorreu, a segmentação começou a tornar-se visível, e o eixo segmentado do corpo aumentou em comprimento, curvando-se para trás na extremidade caudal, de maneira a encaixar-se na casca do ovo. (C e F) Em 10 horas, o eixo do corpo contraiu-se e tornou-se linear novamente, e todos os segmentos estão claramente definidos. As estruturas da cabeça, visíveis externamente neste estágio, irão se dobrar no interior da larva, para emergir novamente somente quando a larva entrar na fase de formação da pupa e tornar-se um adulto. (D e E, cortesia de F. R. Turner e A. P. Mahowald, *Dev. Biol*. 50:95-108, 1976; F, de J. P. Petschek, N. Perrimon, e A. P. Mahowald, *Dev. Biol*. 119:175-189, 1987. Ambas com permissão da Academic Press.)

segmentares chamadas de *parassegmentos*, metade de um segmento não relacionado aos segmentos definidos tradicionalmente (ver Figura 22-27).

A *Drosophila* inicia o seu desenvolvimento como um sincício

O ovo de *Drosophila* mede em torno de 0,5 mm de comprimento e 0,15 mm de diâmetro, com uma polaridade claramente definida. Assim como os ovos de outros insetos, mas ao contrário dos vertebrados, ele começa o seu desenvolvimento de uma maneira incomum: uma série de divisões nucleares, sem divisão celular, cria um sincício. As divisões nucleares iniciais são sincrônicas e extremamente rápidas, ocorrendo a cada oito minutos. As primeiras nove divisões geram uma nuvem de núcleos, a maioria dos quais migra do meio do ovo em direção à superfície, onde eles formam uma monocamada chamada de *blastoderma sincicial*. Após outras quatro rodadas de divisões nucleares, as membranas plasmáticas crescem em direção ao interior a partir da superfície do ovo para incluir cada núcleo, convertendo assim o blastoderma sincicial em um *blastoderma celular*, consistindo em aproximadamente

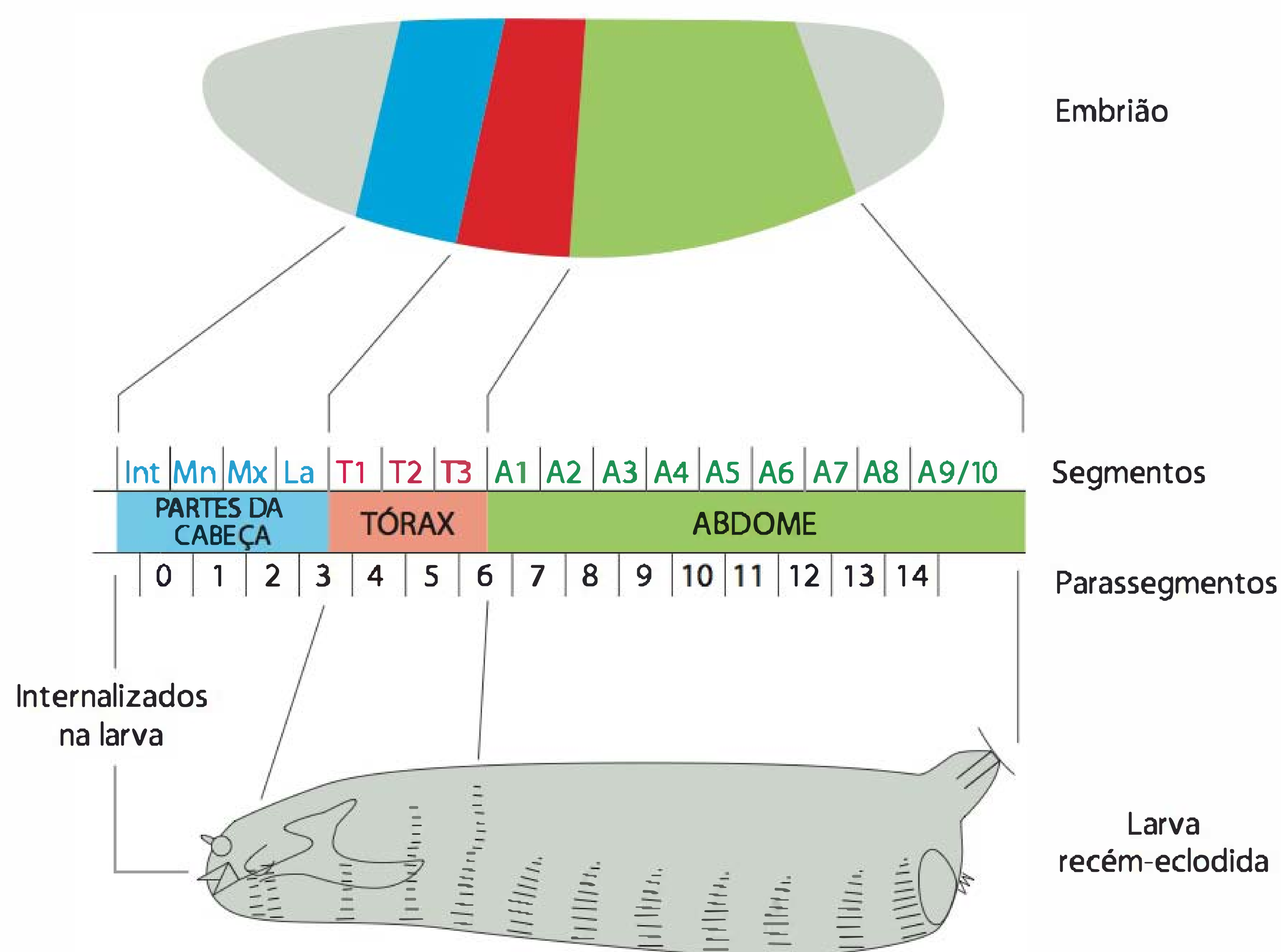
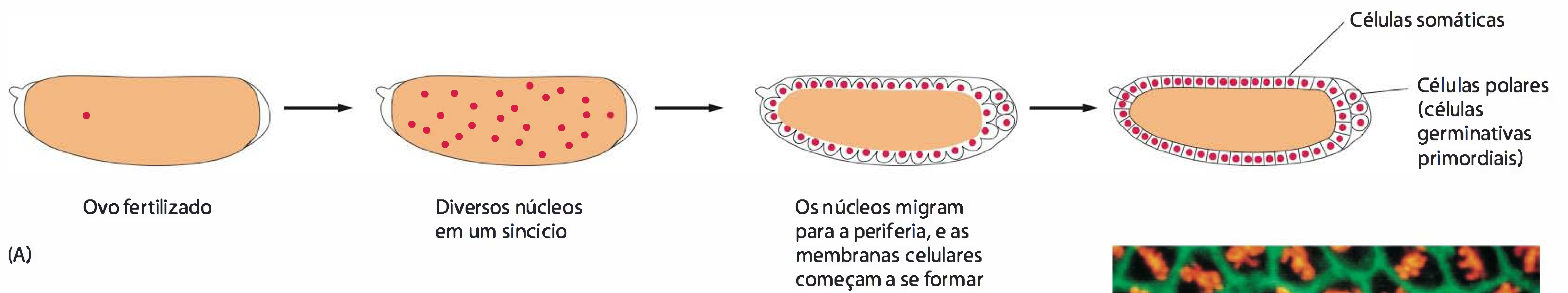


Figura 22-27 Os segmentos da larva de *Drosophila* e suas correspondências com regiões do blastoderma. As partes do embrião que se organizam em segmentos estão mostradas em *cores*. As duas extremidades do embrião, sombreadas em *cinza*, não são segmentadas e se dobram para o interior do corpo para formar as estruturas internas da cabeça e do intestino. (As futuras estruturas externas segmentadas da cabeça do adulto também são temporariamente internalizadas na larva.) A segmentação na *Drosophila* pode ser descrita tanto em termos de segmentos como de parassegmentos: a relação é mostrada na parte central da figura. Os parassegmentos frequentemente correspondem de maneira mais simples aos padrões de expressão gênica. O número exato de segmentos abdominais é passível de debate: oito estão claramente definidos, e um está presente de maneira vestigial na larva, mas ausente no adulto.



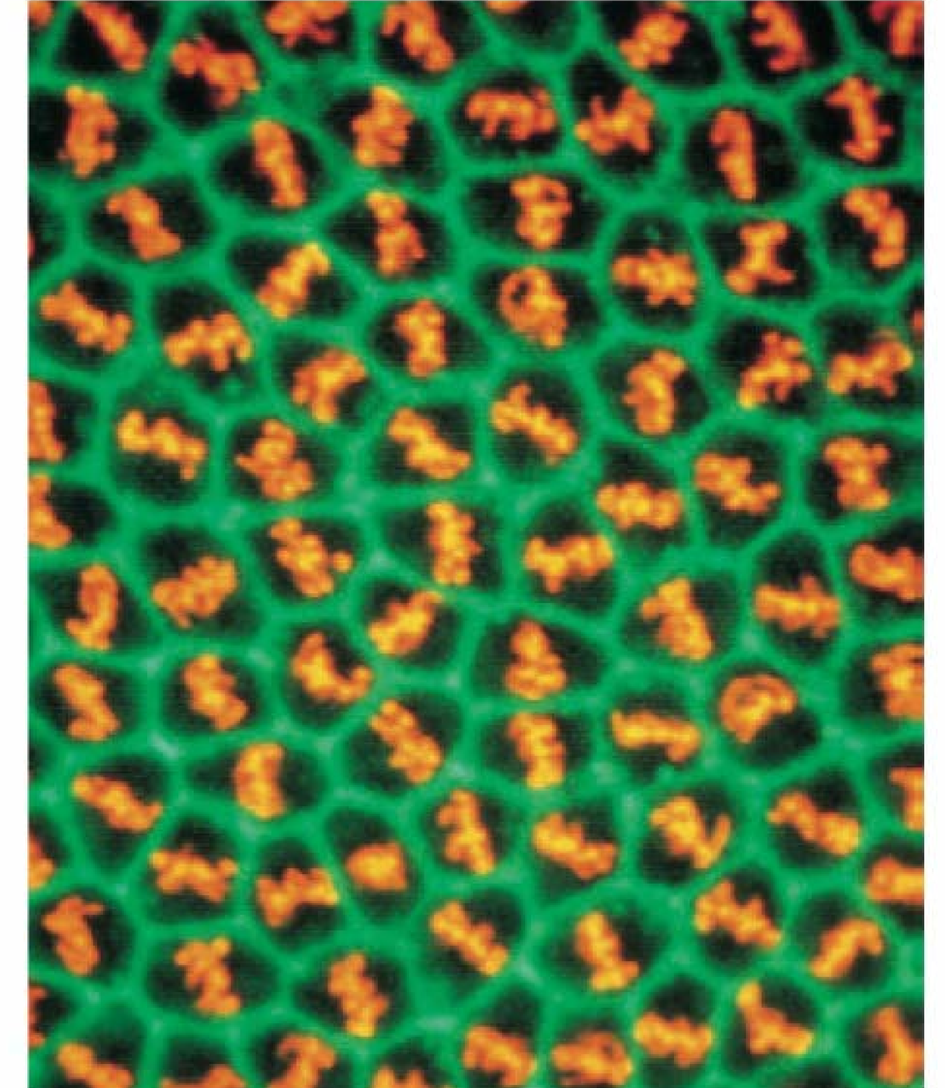


Figura 22-28 Desenvolvimento do ovo de *Drosophila*, da fertilização ao estágio de blastoderma celular. (A) Desenhos esquemáticos. (B) Visão de superfície – uma fotografia de secção ótica de núcleos do blastoderma sofrendo mitose na transição do estágio de blastoderma sincicial para blastoderma celular. A actina está corada em *verde*, os cromossomos, em *laranja*. (A, segundo H. A. Schneiderman, in Insect Development [P. A. Lawrence, ed.], p. 3-34. Oxford, UK: Blackwell, 1976; B, cortesia de William Sullivan.)

6 mil células separadas (**Figura 22-28**). Cerca de 15 dos núcleos que formam a extremidade posterior final do ovo são segregados em células alguns ciclos antes; estas **células polares** são os precursores da linhagem germinativa (células germinativas primordiais) que darão origem aos ovos ou ao esperma.

Até o estágio de blastoderma celular, o desenvolvimento depende muito – embora não exclusivamente – dos estoques de mRNA e de proteína maternos que foram acumulados no ovo, antes da fertilização. A frenética taxa de replicação do DNA e de divisões nucleares, evidentemente, oferece poucas oportunidades para a transcrição. Após a formação das células, as divisões celulares continuam em uma maneira mais convencional, sem sincronia e em uma taxa mais lenta, e a taxa de transcrição aumenta bastante. A gastrulação começa um pouco antes de a formação das células estar completa, quando partes da camada de células que forma o exterior do embrião começam a dobrar-se para o interior a fim de formar o intestino, a musculatura e os tecidos internos associados. Um pouco mais tarde e em outra região do embrião, um conjunto separado de células move-se da superfície do epitélio para o interior a fim de formar o sistema nervoso central. Por marcação e rastreamento das células durante esses vários movimentos, pode-se desenhar um mapa de destinações para a monocamada de células da superfície do blastoderma (**Figura 22-29**).

Assim que a gastrulação esteja quase completa, uma série de endentações e de protuberâncias aparece na superfície do embrião, marcando a subdivisão do corpo em segmentos ao longo do seu eixo ântero-posterior (ver Figura 22-26). Em seguida, emerge uma larva totalmente segmentada, pronta para começar a comer e a crescer. Dentro do corpo da larva, pequenos grupos de células permanecem aparentemente indiferenciados, formando estruturas chamadas de *discos imaginais*. Estes grupos irão crescer tanto quanto a larva e, no final, darão origem à maioria das estruturas do corpo adulto, como veremos mais tarde.

Uma extremidade para a cabeça e uma extremidade para a cauda, um lado ventral (barriga) e um lado dorsal (costas), um intestino, um sistema nervoso, uma série de segmentos corporais – estas são as características da estrutura corporal básica que a *Drosophila* compartilha com

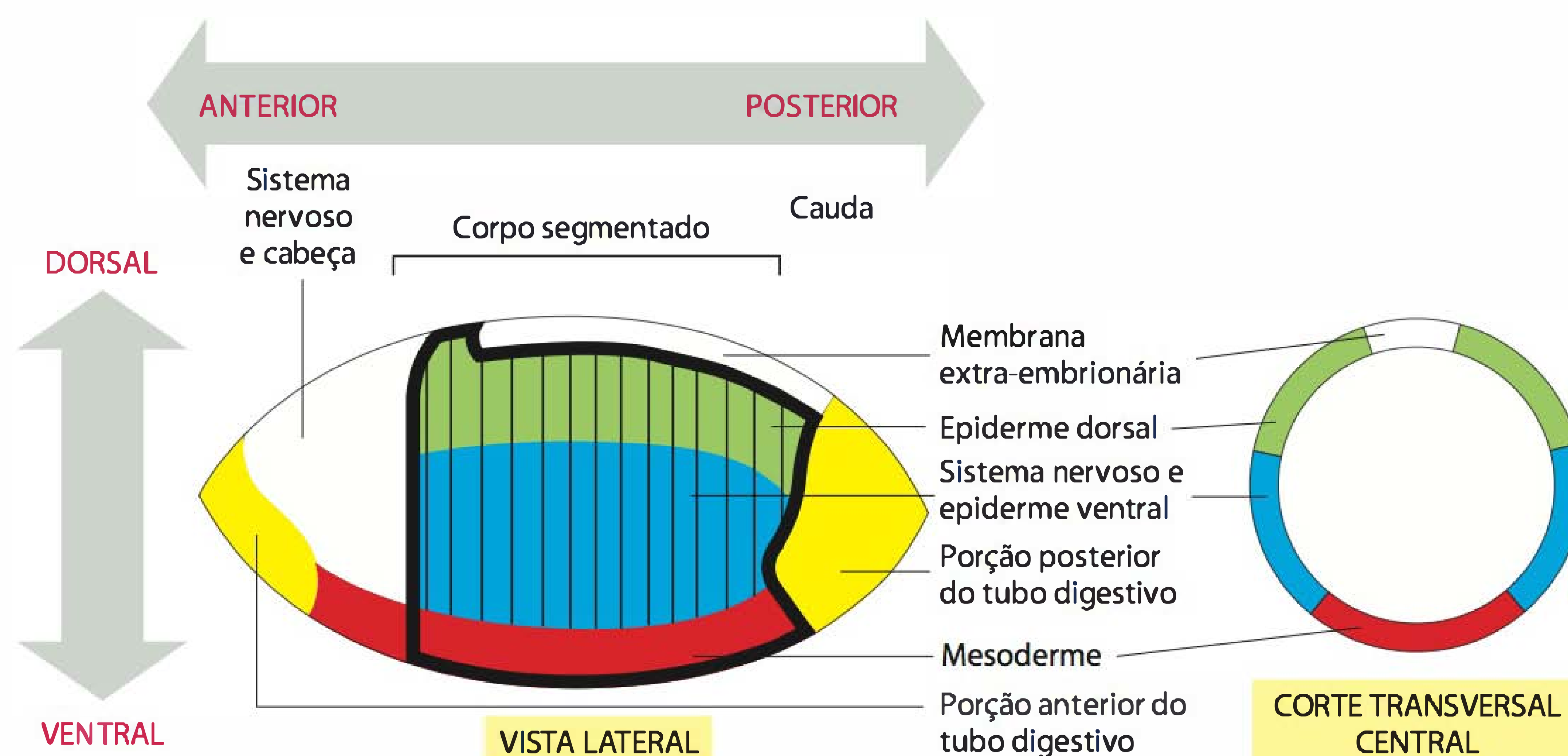


Figura 22-29 Mapa de destinação de um embrião de *Drosophila* no estágio de blastoderma celular. O embrião é apresentado em uma visão lateral e em uma secção transversal, mostrando a relação entre a subdivisão dorso-ventral nos principais tipos de tecidos futuros e o padrão ântero-posterior dos futuros segmentos. Uma linha grossa circunda a região que formará as estruturas segmentares. Durante a gastrulação, as células ao longo da linha média ventral se invaginam para formar a mesoderme, enquanto as células destinadas a formar o intestino se invaginam próximas a cada uma das extremidades do embrião. (Conforme V. Hartenstein, G. M. Technau, e J. A. Campos-Ortega, *Wilhelm Roux' Arch. Dev. Biol.* 194:213-216, 1985. Com permissão de Elsevier.)

muitos outros animais, incluindo os humanos. Começaremos nosso relato dos mecanismos de desenvolvimento da *Drosophila* considerando como esta estrutura corporal é produzida.

As sondagens genéticas definem os grupos de genes necessários aos aspectos específicos da formação dos padrões iniciais

Pela realização de uma série de sondagens genéticas com base na mutagênese por saturação (discutido no Capítulo 8), tem sido possível acumular uma coleção de mutantes de *Drosophila* que parecem incluir alterações em uma grande proporção dos genes que afetam o desenvolvimento. Mutações independentes no mesmo gene podem ser distinguidas de mutações em genes separados por um teste de complementação (ver Painel 8-1, p. 555), levando a um catálogo de genes classificados de acordo com os seus fenótipos mutantes. Nesse catálogo, um grupo de genes com fenótipos mutantes muito semelhantes frequentemente codificará um conjunto de proteínas que trabalham juntas para realizar uma função.

Algumas vezes as funções no desenvolvimento reveladas pelos fenótipos mutantes são aquelas que poderíamos esperar; outras vezes são uma surpresa. Uma sondagem genética em larga escala focando o desenvolvimento inicial da *Drosophila* revelou que os genes-chave formam um conjunto relativamente pequeno de classes funcionais definidas por seus fenótipos mutantes. Alguns – os *genes de polaridade do ovo* (**Figura 22-30**) – são necessários para

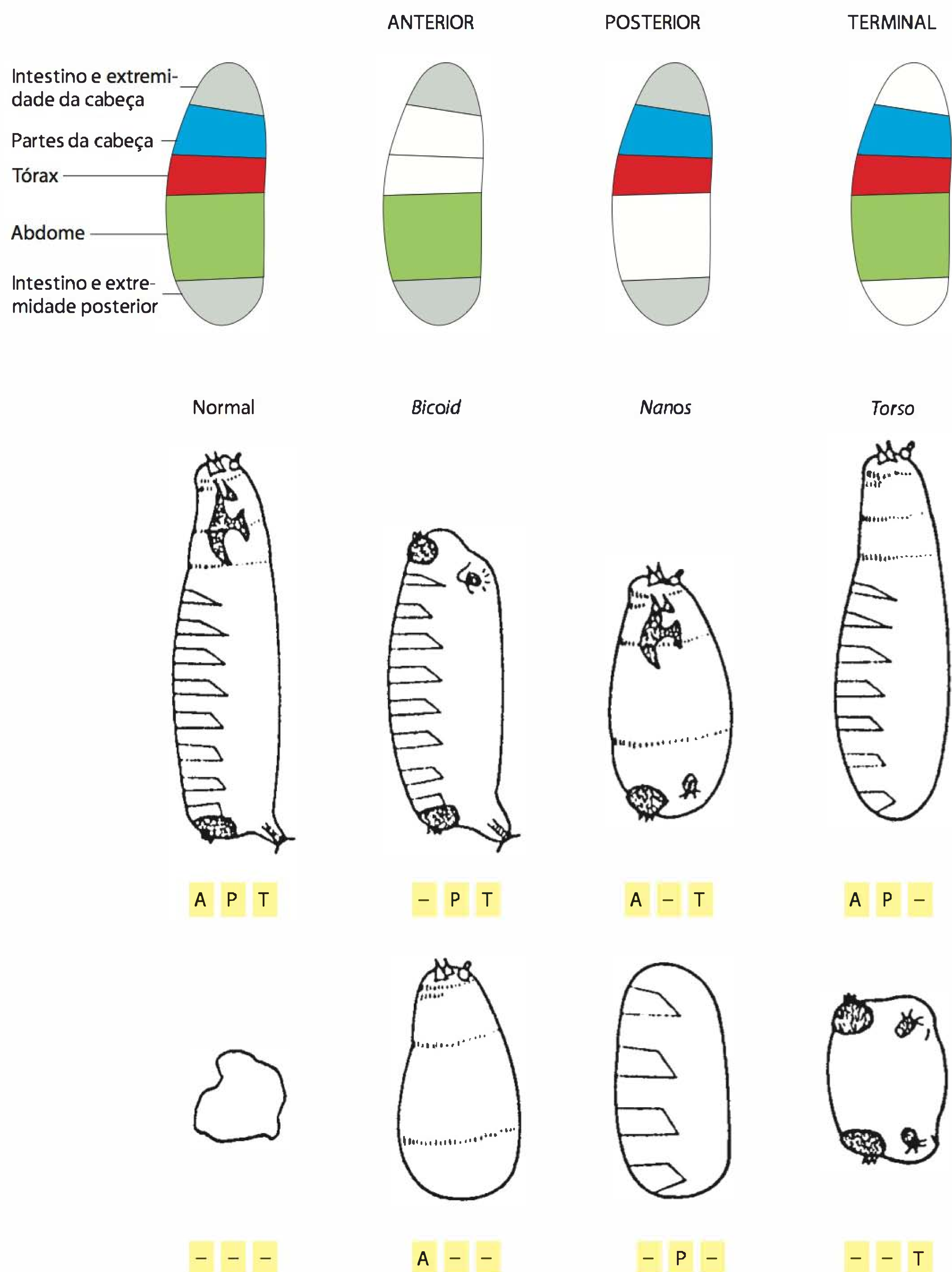


Figura 22-30 Domínios dos sistemas anterior, posterior e terminal dos genes de polaridade do ovo. O diagrama superior mostra os destinos das diferentes regiões do ovo/embrião inicial e indicam (em *branco*) as partes que falham em desenvolver-se se os sistemas anterior, posterior ou terminal estão defectivos. A fileira do meio mostra esquematicamente o aparecimento de uma larva normal e de larvas mutantes que são defectivas em um gene do sistema anterior (p. ex., *Bicoid*), do sistema posterior (p. ex., *Nanos*) ou do sistema terminal (p. ex., *Torso*). A fileira de baixo dos desenhos mostra a aparência das larvas nas quais nenhum ou somente um dos três sistemas gênicos está funcional. As legendas abaixo de cada larva especificam quais sistemas estão intactos (A P T para a larva normal, – P T para a larva onde o sistema anterior é defectivo, mas os sistemas posterior e terminal estão intactos, e assim por diante). A inativação de um sistema gênico particular causa a perda do conjunto correspondente de estruturas do corpo; as partes do corpo que se formam correspondem aos sistemas gênicos que permanecem funcionais. Note que as larvas com um defeito no sistema anterior ainda podem formar estruturas terminais na sua extremidade anterior, mas estas são de um tipo normalmente encontrado na extremidade posterior do corpo e não na cabeça. (Ligeiramente modificada de D. St. Johnston e C. Nusslein-Volhard, *Cell* 68:201-219, 1992. Com permissão de Elsevier.)

definir os eixos ântero-posterior e dorso-ventral do embrião e marcar as duas extremidades para destinos especiais por meio de mecanismos envolvendo interações entre o oócito e as células vizinhas no ovário. Outros, os *genes gap*, são necessários em regiões amplas e específicas ao longo do eixo ântero-posterior de um embrião inicial para permitir o seu desenvolvimento apropriado. Uma terceira categoria, os *genes pair-rule*, são necessários, mais surpreendentemente, para o desenvolvimento de segmentos alternados do corpo. Uma quarta categoria, os *genes de polaridade dos segmentos*, é responsável pela organização do padrão ântero-posterior de cada segmento individual.

A descoberta desses quatro sistemas de genes, e a subsequente análise de suas funções (um trabalho ainda em andamento), foi uma famosa epopeia da genética do desenvolvimento. Ela teve um impacto revolucionário em toda a biologia do desenvolvimento ao apontar o caminho em direção a uma explicação sistemática e abrangente do controle genético do desenvolvimento embrionário. Nesta seção, resumiremos as conclusões relacionadas às fases iniciais do desenvolvimento da *Drosophila*, pois elas são específicas de insetos; abordaremos em maior extensão as partes do processo que ilustram princípios gerais.

As interações do oócito com seu ambiente definem os eixos do embrião: a função dosgenes de polaridade do ovo

Surpreendentemente, as etapas mais iniciais do desenvolvimento animal estão entre as mais variáveis, mesmo dentro de um mesmo filo. Uma rã, uma galinha e um mamífero, por exemplo, mesmo que desenvolvam-se de maneiras semelhantes mais tarde, produzem óvulos que diferem radicalmente em tamanho e em estrutura e começam o seu desenvolvimento com sequências diferentes de divisões celulares e eventos de especialização celular.

O estilo de desenvolvimento inicial que descrevemos para *C. elegans* é típico de muitas classes de animais. Por outro lado, o desenvolvimento inicial de *Drosophila* representa uma variação extrema. Os eixos principais do futuro corpo do inseto são definidos antes da fertilização por uma complexa troca de sinais entre o ovo não-fertilizado, ou oócito, e as células foliculares que o circundam no ovário (**Figura 22-31**). Então, na fase sincicial após a fertilização, uma quantidade excepcional de formação de padrões ocorre no conjunto de núcleos que se dividem rapidamente, antes da primeira divisão do ovo em células separadas. Aqui, não há necessidade das formas comuns de comunicação célula-célula envolvendo comunicação transmembrana; as regiões vizinhas do embrião inicial de *Drosophila* podem comunicar-se por meio de proteínas de regulação e de moléculas de mRNA que se difundem ou que são ativamente transportadas através do citoplasma da célula gigante multinucleada.

Nos estágios anteriores à fertilização, o eixo ântero-posterior do futuro embrião se torna definido por três sistemas de moléculas que criam pontos de referência no oócito (**Figura 22-32**). Seguindo-se a fertilização, cada ponto de referência serve como um farol, fornecendo um sinal na forma de um gradiente de morfógenos, que organiza o processo de desenvolvimento na sua vizinhança. Dois desses sinais são gerados a partir de depósitos localizados de moléculas de mRNA específicas. A futura extremidade anterior do embrião contém uma grande concentração de mRNA para a proteína de regulação gênica chamada de Bicoid; este mRNA é traduzido para produzir a proteína Bicoid, a qual se difunde

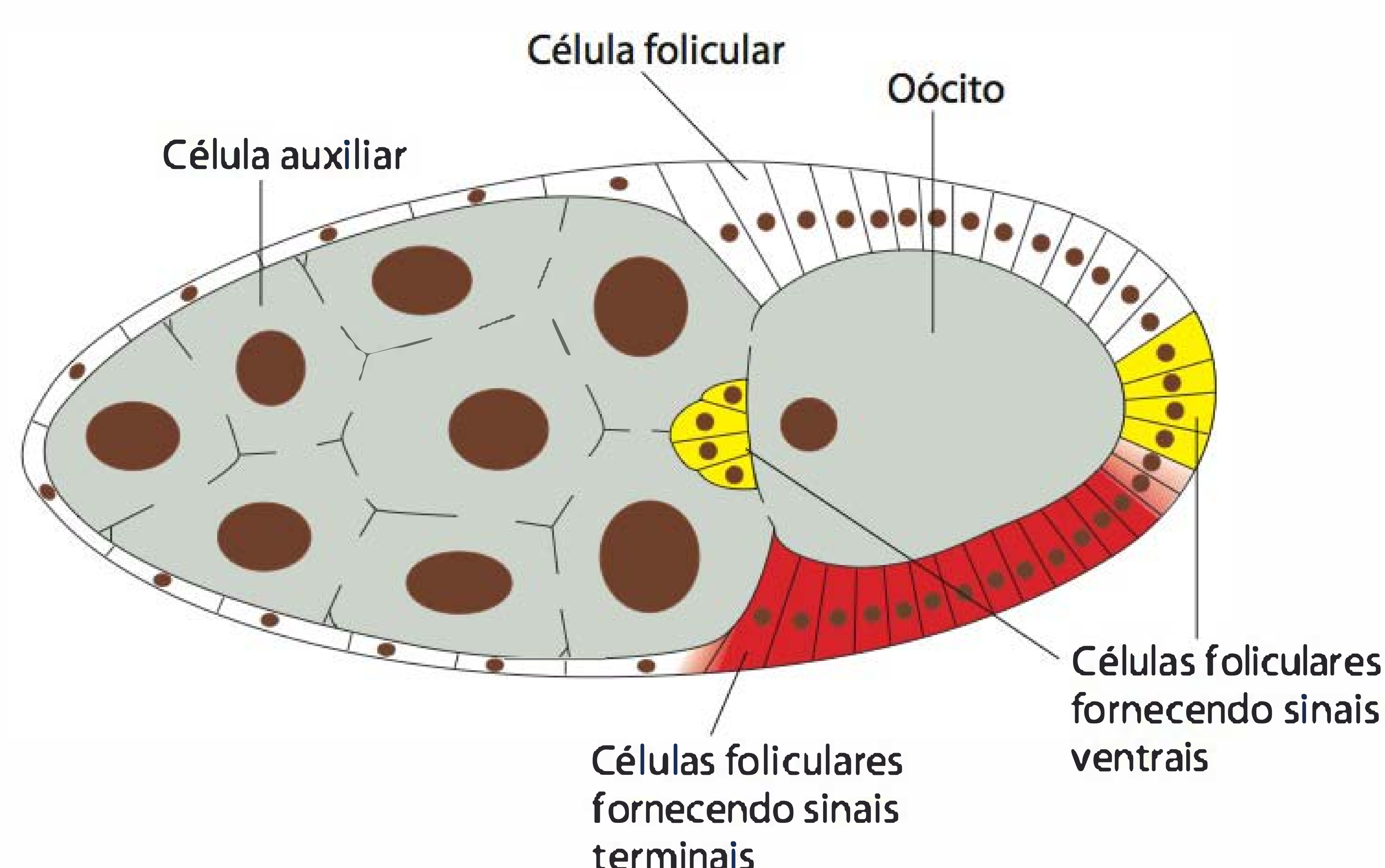


Figura 22-31 Um oócito de Drosophila no seu folículo. O oócito é derivado de uma célula germinativa que se divide quatro vezes para originar uma família de 16 células que permanecem em comunicação umas com as outras através de pontes citoplasmáticas (*cinza*). Um membro do grupo da família torna-se o oócito, enquanto as outras células se tornam células auxiliares, que produzem muitos dos componentes necessários pelo oócito e os transportam para dentro dele através das pontes citoplasmáticas. As células foliculares que circundam parcialmente o oócito possuem uma ancestralidade separada. Como indicado, elas são as fontes dos sinais terminal e ventral de polarização do ovo.

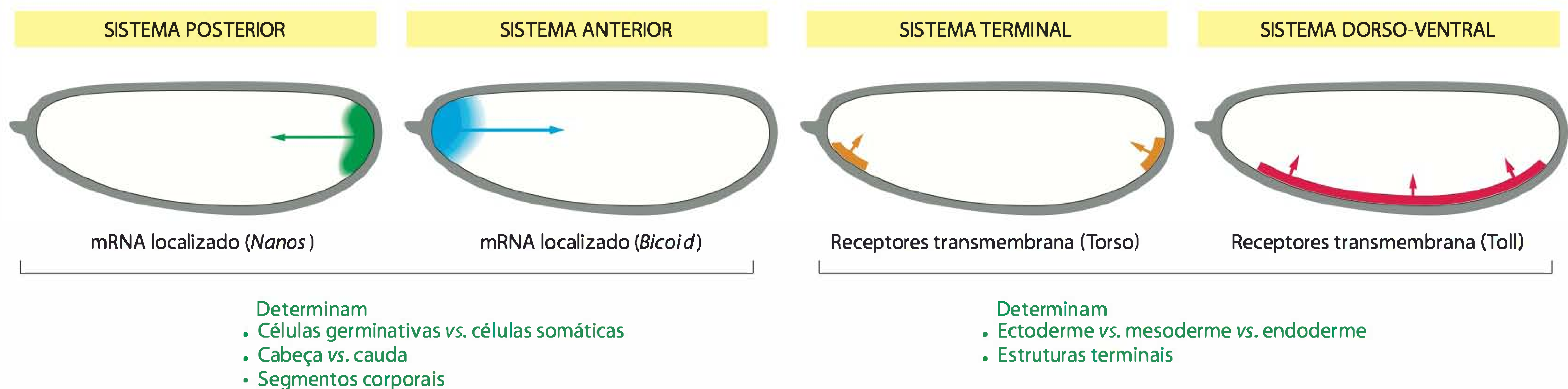


Figura 22-32 A organização dos quatro sistemas de gradiente de polaridade do ovo. Os receptores Toll e Torso são distribuídos portoda a membrana; o colorido nos diagramas à direita indica o local em que eles se tornam ativados pelos ligantes extracelulares.

a partir de sua fonte para formar um gradiente de concentração com o seu máximo na extremidade anterior do ovo. A futura extremidade posterior do embrião contém uma alta concentração de mRNA para um regulador da tradução chamado de Nanos, o qual forma um gradiente posterior da mesma maneira. O terceiro sinal é gerado simetricamente em ambas as extremidades do ovo, pela ativação local de um receptor tirosina-cinase transmembrana chamado de Torso. O receptor ativado exerce os seus efeitos em uma amplitude pequena, marcando os locais das estruturas terminais especializadas que irão formar as extremidades da cabeça e da cauda da futura larva e, também, definindo os rudimentos do futuro intestino. Os três conjuntos de genes responsáveis por esses determinantes localizados são referidos como os conjuntos **anterior**, **posterior** e **terminal** dos genes de **polaridade do ovo**.

Um quarto ponto de referência define o eixo dorso-ventral (ver Figura 22-32): uma proteína que é produzida pelas células foliculares abaixo da futura região ventral do embrião leva à ativação localizada de outro receptor transmembrana, chamado de Toll, na membrana do oócito. Os genes necessários a essa função são chamados de genes **dorso-ventrais** de polaridade do ovo.

Todos os genes de polaridade do ovo, nessas quatro classes, são genes de efeito materno: é o genoma da mãe, não o genoma do zigoto, que é crítico. Assim, uma mosca cujos cromossomos são mutantes em ambas as cópias do gene *Bicoid*, mas que nasceu de uma mãe que possui uma cópia normal de *Bicoid*, desenvolve-se de maneira perfeitamente normal, sem nenhum defeito no padrão da cabeça. Entretanto, se aquela mosca-filha é uma fêmea, nenhum mRNA funcional de *Bicoid* pode ser depositado na porção anterior dos seus próprios ovos, e todos irão desenvolver-se em embriões sem cabeça, independentemente do genótipo do pai.

Cada um dos quatro sinais de polaridade do ovo – fornecidos por Bicoid, Nanos, Torso e Toll – exerce seus efeitos pela regulação (direta ou indireta) da expressão de genes nos núcleos do blastoderma. O uso destas moléculas particulares para organizar o ovo não é uma característica geral do desenvolvimento inicial dos animais – na verdade, somente a *Drosophila* e os insetos intimamente relacionados possuem um gene *Bicoid*. Toll foi aqui cooptado para a formação do padrão dorso-ventral; a sua função mais antiga e universal é a resposta imune inata, como discutido no Capítulo 24.

Apesar disso, o sistema de polaridade do ovo apresenta algumas características altamente conservadas. Por exemplo, a localização do mRNA de *Nanos* em uma extremidade do ovo está ligada e é dependente da localização dos determinantes da célula germinativa naquele local, assim como em *C. elegans*. Mais adiante durante o desenvolvimento, enquanto o genoma do zigoto começa a atuar sob a influência do sistema de polaridade do ovo, mais semelhanças com outras espécies animais tornam-se aparentes. Utilizaremos o sistema dorso-ventral para ilustrar este ponto.

Os genes de sinalização dorso-ventrais criam um gradiente de uma proteína nuclear de regulação gênica

A ativação localizada do receptor Toll no lado ventral do ovo controla a distribuição da Dorsal, uma proteína de regulação gênica que se encontra dentro do ovo. A proteína Dorsal pertence à mesma família da proteína de regulação gênica NFκB de vertebrados (discutida no Capítulo 15). A sua atividade regulada por Toll, assim como a de NFκB, depende

da sua translocação a partir do citoplasma, onde ela é mantida em uma forma inativa, para o núcleo, onde regula a expressão gênica. No ovo recém-posto, ambos, o mRNA de *Dorsal* (detectado por hibridização *in situ*) e a proteína que ele codifica (detectada com anticorpos), são distribuídos uniformemente no citoplasma. Após os núcleos terem migrado para a superfície do embrião a fim de formar o blastoderma, entretanto, ocorre uma redistribuição extraordinária da proteína Dorsal: dorsalmente, a proteína permanece no citoplasma, mas ventralmente ela se concentra no núcleo, com um gradiente suave de localização nuclear entre estes dois extremos (**Figura 22-33**). O sinal transmitido pela proteína Toll controla a redistribuição de Dorsal por uma via de sinalização que é essencialmente a mesma via dependente de Toll envolvida na imunidade inata.

Uma vez no interior do núcleo, a proteína Dorsal ativa ou inibe a expressão de diferentes conjuntos de genes, dependendo da sua concentração. A expressão de cada gene responsivo depende do seu DNA regulador – especificamente, do número e da afinidade dos sítios de ligação que este DNA contém para Dorsal e para outras proteínas reguladoras. Dessa maneira, o DNA regulador é capaz de *interpretar* o sinal posicional fornecido pelo gradiente da proteína Dorsal, de maneira a definir uma série de territórios dorso-ventrais – faixas distintas de células posicionadas no comprimento do embrião (**Figura 22-34**A). Mais ventralmente – onde está a maior concentração da proteína Dorsal – ela ativa, por exemplo, a expressão do gene chamado de *Twist*, que é específico para o mesoderma (**Figura 22-35**). Mais dorsalmente, onde a concentração da proteína Dorsal é menor, as células ativam o gene *Decapentaplegic* (*Dpp*). E, em uma região intermediária, onde a concentração da proteína Dorsal é alta o suficiente para reprimir *Dpp*, mas muito baixa para ativar *Twist*; as células ativam outro conjunto de genes, incluindo um denominado *Short gastrulation* (*Sog*).

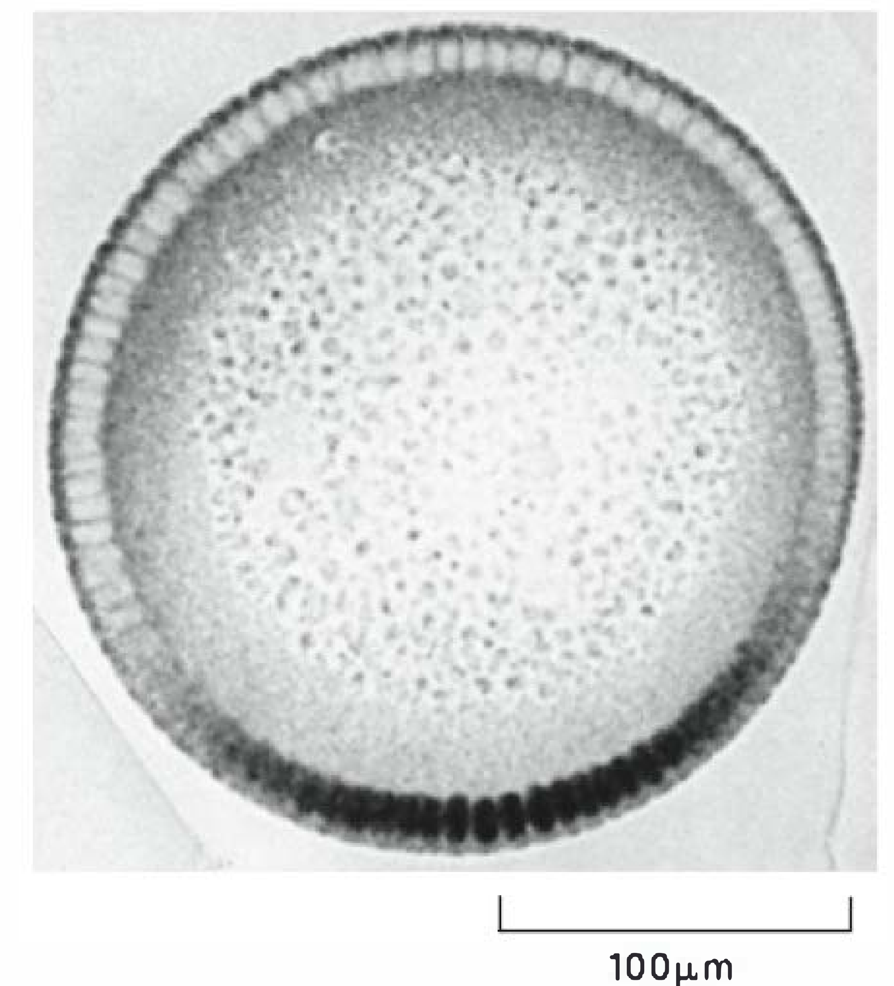


Figura 22-33 O gradiente de concentração da proteína Dorsal nos núcleos do blastoderma, revelado por anticorpos. Dorsalmente, a proteína está presente no citoplasma e ausente nos núcleos; ventralmente, ela está ausente no citoplasma e concentrada nos núcleos. (De S. Roth, D. Stein e C. Nusslein-Volhard, *Cell* 59:1189-1202, 1989. Com permissão de Elsevier.)

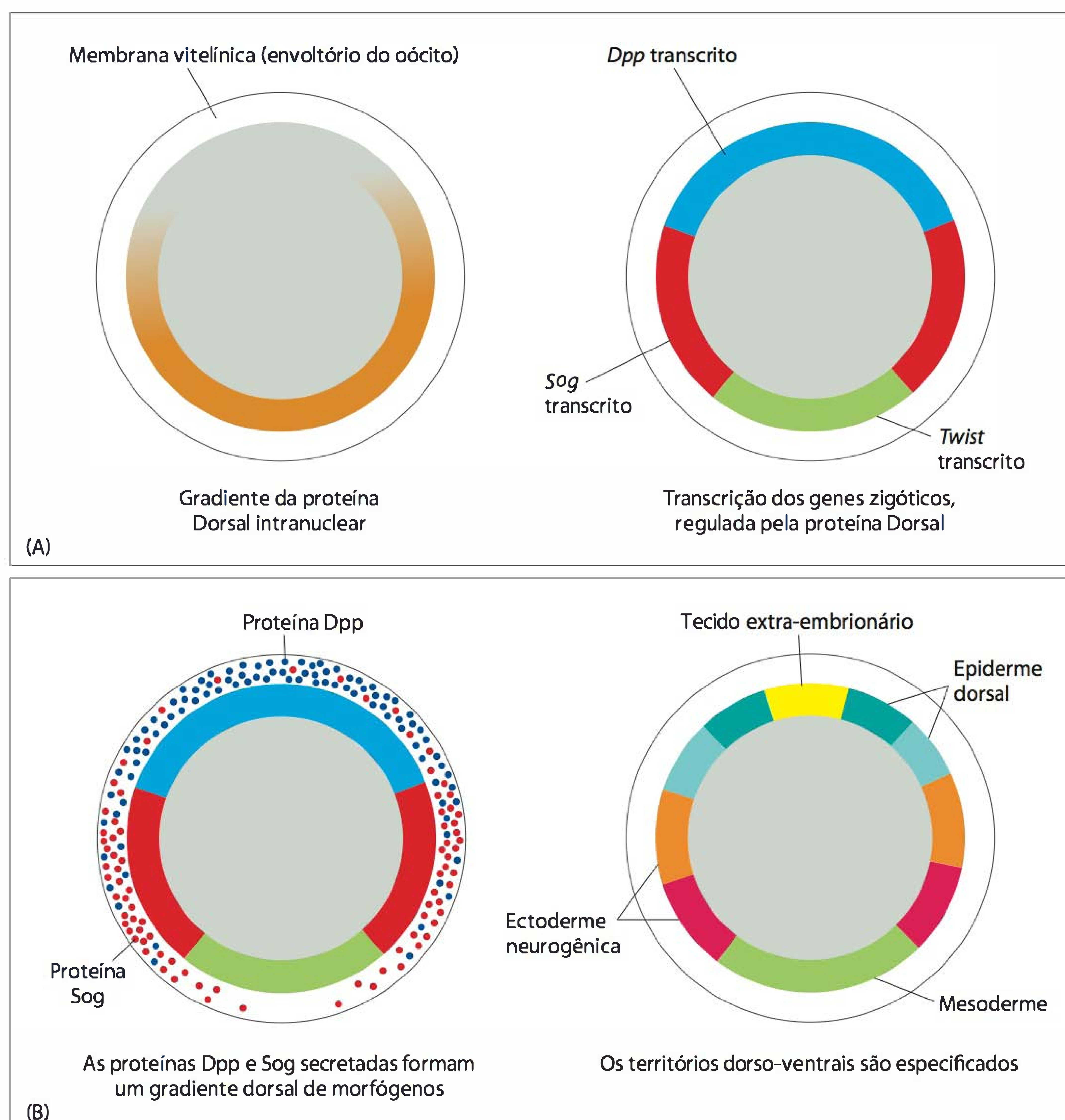


Figura 22-34 Gradientes de morfógenos determinando os padrões do eixo dorso-ventral do embrião. (A) O gradiente da proteína Dorsal define três amplos territórios de expressão gênica, marcados aqui pela expressão de três genes representativos – *Dpp*, *Sog* e *Twist*. (B) Um pouco mais tarde, as células expressando *Dpp* e *Sog* secretam, respectivamente, as proteínas de sinalização Dpp (um membro da família TGFβ) e Sog (um antagonista de Dpp). Estas duas proteínas difundem-se e interagem uma com a outra (e com certos outros fatores) para determinar um gradiente de atividade de Dpp que guia um processo mais detalhado de formação de padrões.



Figura 22-35 A origem da mesoderme a partir de células que expressam Twist. Os embriões foram fixados em estágios sucessivos, cortados transversalmente e corados com um anticorpo contra a proteína Twist, uma proteína de regulação gênica da família bHLH. As células que expressam Twist movem-se para o interior do embrião para formar a mesoderme. (De M. Leptin, J. Casal, B. Grunewald e R. Reuter, *Development Suppl*. 23-31, 1992. Com permissão de The Company of Biologists.)

Dpp e Sog produzem um gradiente de morfógenos secundário para refinar o padrão da parte dorsal do embrião

Os produtos dos genes regulados diretamente pela proteína Dorsal geram sinais locais que definem subdivisões mais finas do eixo dorso-ventral. Estes sinais atuam após a celularização e assumem a forma de moléculas de sinalização extracelular convencionais. Em particular, *Dpp* codifica para a proteína secretada Dpp, a qual forma um gradiente de morfógenos na parte dorsal do embrião. O gene *Sog*, enquanto isso, codifica para outra proteína secretada que é produzida na ectoderme neurogênica e atua como um antagonista de Dpp. Os gradientes de difusão oposta dessas duas proteínas criam um gradiente acentuado de atividade de Dpp. Os níveis mais altos de atividade de Dpp, em combinação com certos outros fatores, induzem o desenvolvimento do tecido mais dorsal de todos – a membrana extra-embrionária; os níveis intermediários induzem o desenvolvimento da ectoderme dorsal, e os níveis muito baixos permitem o desenvolvimento da ectoderme neurogênica (Figura 22-34B).

O eixo dorso-ventral dos insetos corresponde ao eixo ventro-dorsal dos vertebrados

A Dpp é um membro da superfamília TGFβ das moléculas de sinalização que também é importante nos vertebrados; a Sog é um homólogo da proteína chordin dos vertebrados. É surpreendente que um homólogo da Dpp, BMP4, e a chordin atuem juntos nos vertebrados da mesma maneira que Dpp e Sog em *Drosophila*. Essas duas proteínas controlam o padrão dorso-ventral da ectoderme, com altos níveis de chordin definindo a região que é neurogênica, e altos níveis de atividade de BMP4 definindo a região que não é. Isto, combinado a outros paralelos moleculares, sugere que esta parte da estrutura corporal foi conservada entre os insetos e os vertebrados. Entretanto, o eixo está invertido, de maneira que a parte dorsal na mosca corresponde à parte ventral no vertebrado (**Figura 22-36**). Em algum ponto da história evolutiva, parece que o ancestral de uma dessas classes de animais optou por viver a vida de cabeça para baixo.

Três classes de genes de segmentação refinam o padrão materno ântero-posterior e subdividem o embrião

Após os gradientes iniciais de Bicoid e de Nanos serem criados para definir o eixo ântero-posterior, os **genes de segmentação** refinam o padrão. As mutações em qualquer um dos genes de segmentação alteram o número de segmentos ou sua organização interna básica, sem afetar a polaridade global do embrião. Os genes de segmentação são expressos por subconjuntos de células no embrião, de maneira que seus produtos são os primeiros componentes do genoma próprio do embrião, que não os do genoma materno, a contribuir para o desen-

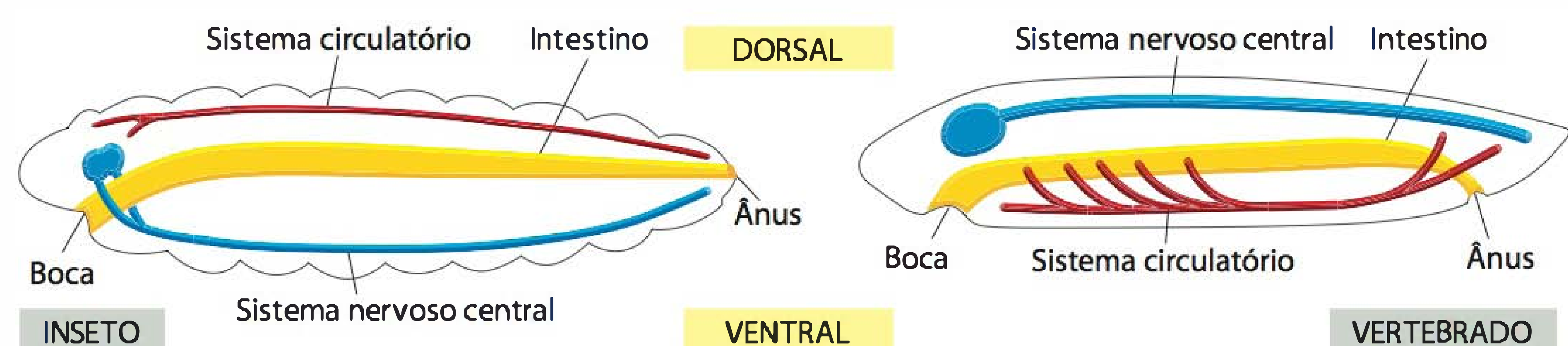


Figura 22-36 O plano corporal de vertebrados como uma inversão dorso-ventral do plano corporal de insetos. O mecanismo de determinação dos padrões dorso-ventrais em um embrião vertebrado é discutido em mais detalhes posteriormente neste capítulo. Note a correspondência com relação ao sistema circulatório, ao intestino e ao sistema nervoso. Em insetos, o sistema circulatório é representado por um coração tubular e um vaso sanguíneo dorsal principal, que bombeia sangue para os espaços dos tecidos por meio de um conjunto de aberturas e recebe o sangue de volta dos tecidos por meio de outro conjunto. Em contraste com os vertebrados, não há um sistema de vasos capilares para conter o sangue enquanto ele é percolado através dos tecidos. Entretanto, o desenvolvimento do coração depende de genes homólogos nos vertebrados e nos insetos, reforçando a relação entre os dois planos corporais. (Segundo E. L. Ferguson, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:424-431, 1996. Com permissão de Elsevier.)

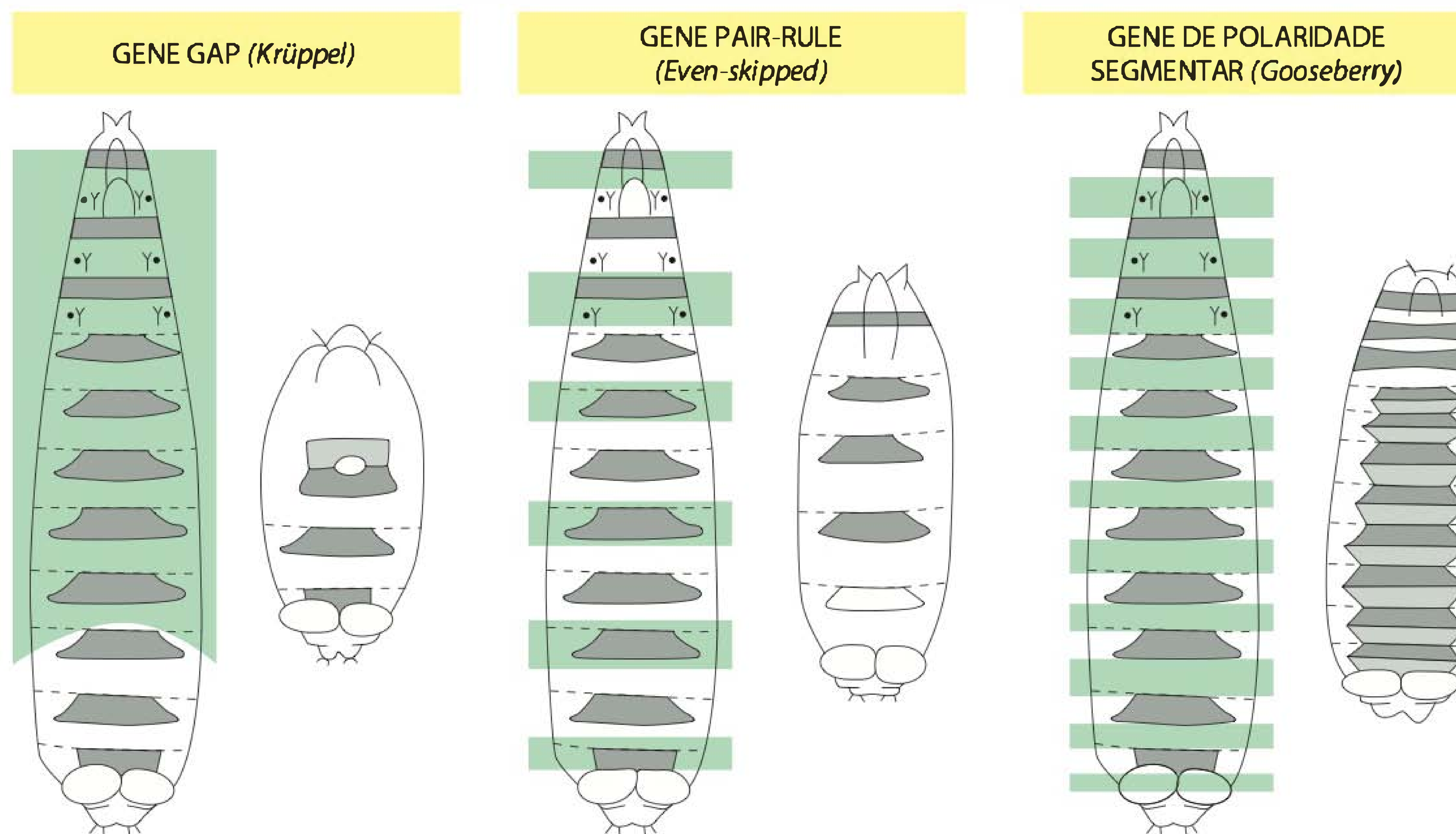


Figura 22-37 Exemplos de fenótipos de mutações afetando os três tipos de genes de segmentação. Em cada caso, as áreas sombreadas em *verde* na larva normal (*esquerda*) estão ausentes no mutante ou foram substituídas por duplicações especulares das regiões não afetadas. (Modificada de C. Nusslein-Volhard e E. Wieschaus, *Nature* 287:795-801, 1980. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

volvimento embrionário. Eles são chamados de *genes de efeito zigótico*, para distingui-los dos genes iniciais de efeito materno.

Os genes de segmentação distribuem-se em três grupos, de acordo com seus fenótipos mutantes (**Figura 22-37**). É conveniente considerar estes três grupos como se suas ações ocorressem em sequência, apesar de, na realidade, suas funções se sobreporem. Primeiro, atuam em um conjunto de pelo menos seis **genes *gap***, cujos produtos definem subdivisões não refinadas do embrião. As mutações em um gene *gap* eliminam um ou mais grupos de segmentos adjacentes, e as mutações em genes *gap* distintos causam defeitos diferentes, porém parcialmente sobrepostos. Em um mutante *Kruppel*, por exemplo, a larva não apresenta oito segmentos, de T1 a A5.

Os próximos genes de segmentação a atuarem são um conjunto de oito **genes *pair-rule***. As mutações nestes genes causam uma série de deleções afetando segmentos alternados, deixando o embrião com somente a metade dos segmentos normais. Enquanto todos os mutantes *pair-rule* apresentam esta periodicidade de dois segmentos, eles diferem na posição precisa das deleções relativas aos limites segmentais ou parassegmentais. O mutante *pair-rule Even-skipped* (*Eve*), por exemplo, discutido no Capítulo 7, não apresenta todos os parassegmentos de números ímpares; o mutante *pair-rule Fushi-tarazu* (*Ftz*) não possui todos os parassegmentos de números pares, e o mutante *pair-rule Hairy* não apresenta uma série de regiões que são semelhantes em largura, mas que não têm relação com as unidades parassegmentais.

Finalmente, existem pelo menos 10 **genes de polaridade segmentar**. As mutações nesses genes produzem larvas com um número normal de segmentos, mas com uma parte de cada segmento deletada e substituída por uma duplicação especular de todo ou de parte do segmento restante. Em mutantes *Gooseberry*, por exemplo, a metade posterior de cada segmento (ou seja, a metade anterior de cada parassegmento) é substituída por uma imagem aproximadamente especular de metade do segmento adjacente anterior (ver Figura 22-37).

Veremos mais tarde que, em paralelo com o processo de segmentação, um conjunto adicional de genes, os *genes seletores homeóticos*, serve para definir e preservar as diferenças entre um segmento e o próximo.

Os fenótipos dos vários mutantes de segmentação sugerem que os genes de segmentação formam um sistema coordenado que subdivide o embrião progressivamente em domínios cada vez menores ao longo do eixo ântero-posterior, distinguido por padrões diferentes de expressão gênica. A genética molecular tem ajudado a revelar como este sistema funciona.

A expressão localizada dos genes de segmentação é regulada por uma hierarquia de sinais posicionais

Cerca de três quartos dos genes de segmentação, incluindo todos os genes *gap* e os genes *pair-rule*, codificam para proteínas de regulação gênica. As suas ações sobre outros genes

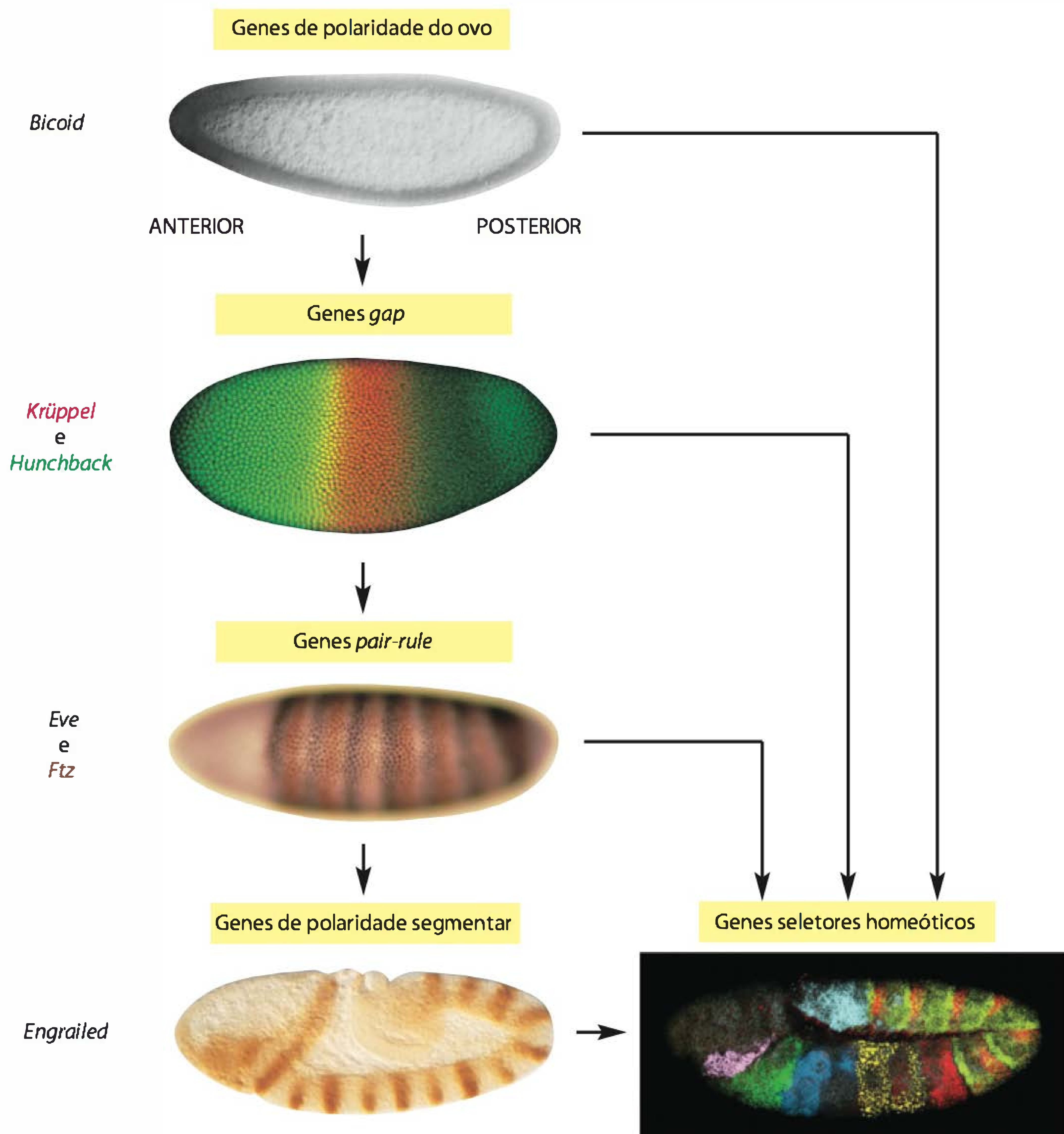


Figura 22-38 A hierarquia reguladora dos genes de polaridade do ovo, *gap*, segmentar e seletores homeóticos. As fotografias mostram o padrão de expressão de exemplos representativos de genes em cada categoria, revelados pela coloração com anticorpos contra produtos proteicos. Os genes seletores homeóticos, discutidos abaixo, definem as últimas diferenças entre um segmento e o próximo. (Fotografias a partir do topo (i) de W. Driever e C. Nusslein-Volhard, *Cell* 54:83-104, 1988. Com permissão de Elsevier; (ii) cortesia de Jim Langeland, Steve Paddock, Sean Carroll e Howard Hughes Medical Institute; (iii) de P. A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992; (iv) de C. Hama, Z. ali e T.B. Kornberg, *Genes Dev.* 4:1079-1093, 1990. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press; (v) cortesia de William McGinnis, adaptada de D. Kosman et al., *Science* 305:846, 2004. Com permissão de AAAS.)

podem ser observadas pela comparação da expressão gênica nos embriões normais e nos mutantes. Pelo uso de sondas apropriadas para a detecção dos transcritos gênicos ou de seus produtos proteicos, é possível, efetivamente, obter representações instantâneas de genes sendo ativados e inativados nos padrões em alteração. Repetindo o processo em mutantes que não possuam um gene de segmentação particular, pode-se começar a dissecar a lógica de todo o sistema de controle gênico.

Os produtos dos genes de polaridade do ovo fornecem sinais globais de posição no embrião inicial. Eles induzem a expressão de genes *gap* particulares em regiões particulares. Os produtos dos genes *gap* fornecem um segundo conjunto de sinais posicionais que atuam mais localmente para regular detalhes mais precisos da formação de padrões, pela expressão de outros genes, incluindo os genes *pair-rule* (**Figura 22-38**). Os genes *pair-rule*, por sua vez, colaboram uns com os outros e com os genes *gap* para construir um padrão periódico de expressão dos genes de polaridade segmentar, e os genes de polaridade segmentar colaboram uns com os outros para definir o padrão interno de cada segmento individual. A estratégia, dessa forma, é uma indução sequencial (ver Figura 22-16). No final do processo, os gradientes globais produzidos pelos genes de polaridade do ovo desencadearam a criação de um padrão mais refinado por meio de uma hierarquia de controles posicionais sequenciais, progressivamente mais locais. Como os sinais posicionais globais que iniciaram o processo não necessitam especificar diretamente os detalhes finos, os núcleos celulares individuais não precisam ser controlados com precisão extrema por pequenas diferenças na concentração destes sinais. Ao contrário, em cada etapa na sequência, novos sinais começam a atuar, produzindo diferenças substanciais e localizadas de concentração para definir novos detalhes. A indução sequencial é uma estratégia sólida. Ela trabalha de maneira segura para produzir embriões de moscas que apresentem todos o mesmo padrão, apesar da imprecisão essencial dos sistemas de controle biológicos e da variação de condições, como a temperatura, em que a mosca se desenvolve.

A natureza modular do DNA regulador permite que os genes possuam múltiplas funções controladas independentemente

O elaborado processo de formação de padrões recém-descrito depende de longos trechos de sequências de DNA não-codificante que controlam a expressão de cada um dos genes envolvidos. Essas regiões reguladoras ligam múltiplas cópias das proteínas de regulação gênica produzidas pelos genes formadores de padrões expressos anteriormente. Assim como um mecanismo lógico de entrada e de saída, um gene individual é ativado e inativado de acordo com uma combinação particular de proteínas ligadas a suas regiões reguladoras em cada estágio do desenvolvimento. No Capítulo 7, descrevemos um gene de segmentação em particular – o gene *pair-rule Even-skipped* (*Eve*) – e discutimos como a decisão de transcrever o gene é feita de acordo com todas essas informações (ver Figura 7-55). Este exemplo pode ser mais elaborado para ilustrar alguns princípios importantes da formação dos padrões do desenvolvimento.

As faixas individuais da expressão de *Eve* dependem de módulos reguladores separados no DNA regulador de *Eve*. Assim, um módulo regulador é responsável pela expressão de *Eve* nas faixas 1 + 5, outro na faixa 2, outro nas faixas 3 + 7 e ainda outro nas faixas 4 + 6 (**Figura 22-39**). Cada módulo regulador define um conjunto diferente de requisitos para a expressão gênica de acordo com a concentração dos produtos dos genes de polaridade do ovo e dos genes *gap*. Dessa forma, o DNA regulador de *Eve* serve para traduzir o padrão complexo e não-repetitivo das proteínas de polaridade do ovo e gap em um padrão periódico de expressão de um gene *pair-rule*.

A organização modular do DNA regulador de *Eve* recém-descrito é típica da regulação gênica de animais multicelulares e de plantas, e tem profundas implicações. Por meio da junção das sequências dos módulos que respondem a diferentes combinações de proteínas reguladoras, é possível gerar quase qualquer padrão de expressão gênica com base em quase qualquer outro. A presença dos módulos, além disso, permite ao DNA regulador definir padrões de expressão gênica que não são simplesmente complexos, mas cujas partes são independentemente ajustáveis. Uma alteração em um destes módulos reguladores pode alterar uma parte do padrão de expressão, sem afetar o resto e sem necessitar de alterações nas proteínas reguladoras que levariam a repercussões na expressão de outros genes no genoma. Como descrito no Capítulo 7, é este DNA regulador que contém a chave para a organização complexa de plantas e de animais multicelulares, e suas propriedades tornam possível a adaptabilidade independente de cada parte da estrutura do corpo de um organismo no curso da evolução.

A maioria dos genes de segmentação também desempenha funções importantes em outros momentos e locais no desenvolvimento da *Drosophila*. O gene *Eve*, por exemplo, é expresso em subconjuntos de neurônios, em células precursoras musculares e em vários

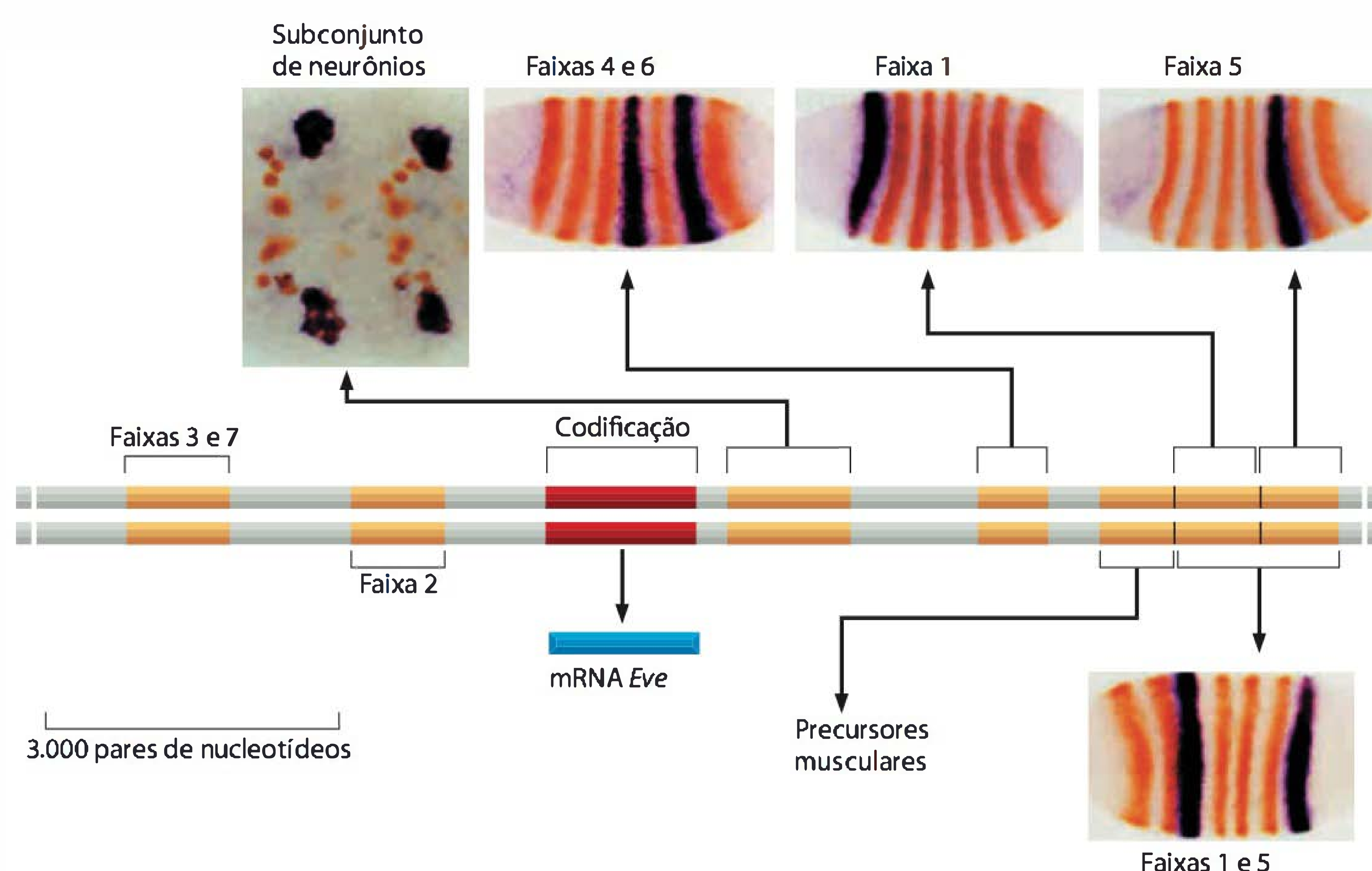


Figura 22-39 Organização modular do DNA regulador do gene *Eve*. No experimento mostrado, fragmentos clonados do DNA regulador foram ligados ao repórter *LacZ* (um gene bacteriano). Os embriões transgênicos contendo estas construções foram então coradas por hibridização *in situ* para revelar o padrão de expressão de *LacZ* (*azul/preto*) e contracorado com um anticorpo anti-*Eve* (*laranja*) para mostrar as posições das faixas de expressão normais de *Eve*. Diferentes segmentos do DNA regulador de *Eve* (*ocre*) controlam a expressão gênica em regiões que correspondem a diferentes partes do padrão de expressão normal de *Eve*. Dois segmentos em *tandem* controlam a expressão em um padrão que é a soma dos padrões gerados por cada um deles individualmente. Os módulos reguladores separados são responsáveis por diferentes momentos da expressão gênica, assim como diferentes localizações: o painel mais à esquerda mostra a ação de um módulo que começa a agir mais tarde do que os outros ilustrados e controla a expressão em um subconjunto de neurônios. (De M. Fujioka et al., *Development* 126:2527-538, 1999. Com permissão de The Company of Biologists.)

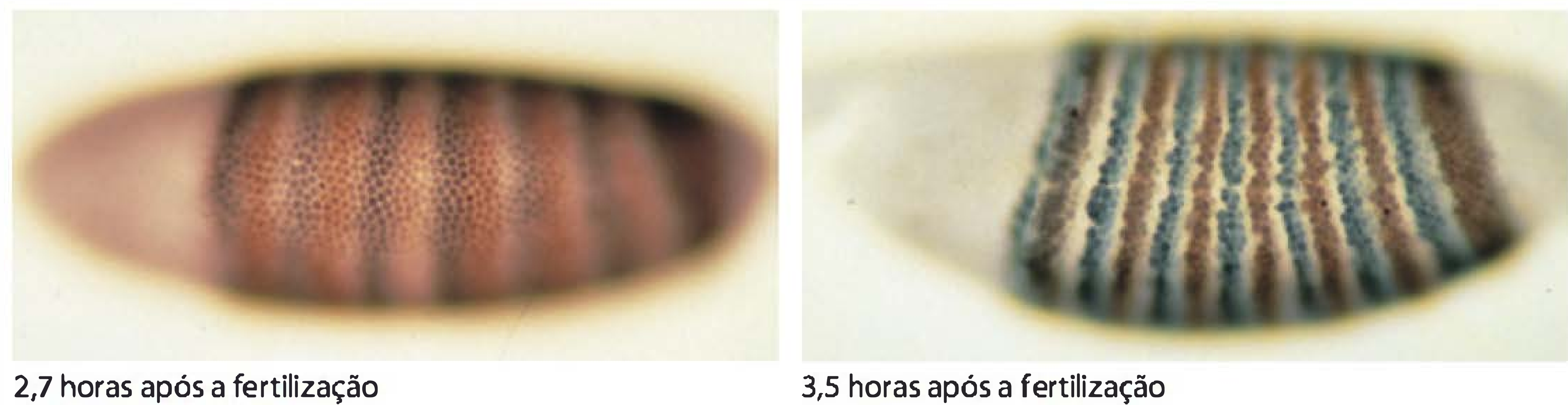


Figura 22-40 A formação das faixas de *Ftz* e de *Eve* no blastoderma de *Drosophila*. *Ftz* e *Eve* são ambos genes *pair-rule*. Os seus padrões de expressão (mostrados em *marrom* para *Ftz* e em *cinza* para *Eve*) são inicialmente pouco definidos, mas rapidamente transformam-se em faixas nitidamente delineadas. (De P. A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992.)

outros locais sob o controle de estimuladores adicionais (ver Figura 22-39). Pela adição de novos módulos a este DNA regulador, qualquer gene pode ser cooptado durante a evolução para novos propósitos em novos locais do corpo, sem detrimento de suas outras funções.

Os genes de polaridade do ovo, os genes *gap* e os genes *pair-rule* criam um padrão transiente que é relembrado por outros genes

Dentro das primeiras horas após a fertilização, os genes *gap* e os genes *pair-rule* são ativados. Seus produtos de mRNA aparecem primeiramente em padrões que somente se aproximam da situação final; então, em um curto período – por meio de uma série de ajustes interativos – a indefinida distribuição inicial dos produtos gênicos transforma-se em um sistema regular e nitidamente definido de faixas (**Figura 22-40**). Contudo, esse sistema por si só é instável e transiente. Enquanto o embrião avança pela gastrulação e além, o padrão regular segmentar dos produtos gênicos gap e pair-rule desintegram-se. As suas ações, entretanto, produziram um conjunto permanente de marcações – valores posicionais – nas células do blastoderma. Estas marcas posicionais estão gravadas na ativação persistente de certos genes de polaridade segmentar e dos genes seletores homeóticos, os quais servem para manter a organização segmentar da larva e do adulto. O gene *Engrailed* de polaridade segmentar fornece um bom exemplo. Os seus transcritos de mRNA são vistos no blastoderma celular em uma série de 14 faixas, cada uma com aproximadamente uma célula de largura, correspondendo às porções mais anteriores dos futuros parassegmentos (**Figura 22-41**).

Os genes de polaridade segmentar são expressos em padrões que se repetem de um parassegmento para o próximo, e as suas faixas de expressão aparecem em uma relação fixa com as faixas de expressão dos genes *pair-rule* que os auxiliam na sua ativação. Entretanto, a produção deste padrão em cada parassegmento depende de interações entre os próprios genes de polaridade segmentar. Essas interações ocorrem em etapas quando o blastoderma já se tornou totalmente dividido em células separadas, de maneira que a sinalização célula-célula normal tem que entrar em ação. Um grande subconjunto de genes de polaridade segmentar codifica para componentes de duas vias de transdução de sinais, a via Wnt e a via Hedgehog, incluindo as proteínas sinalizadoras secretadas Wingless

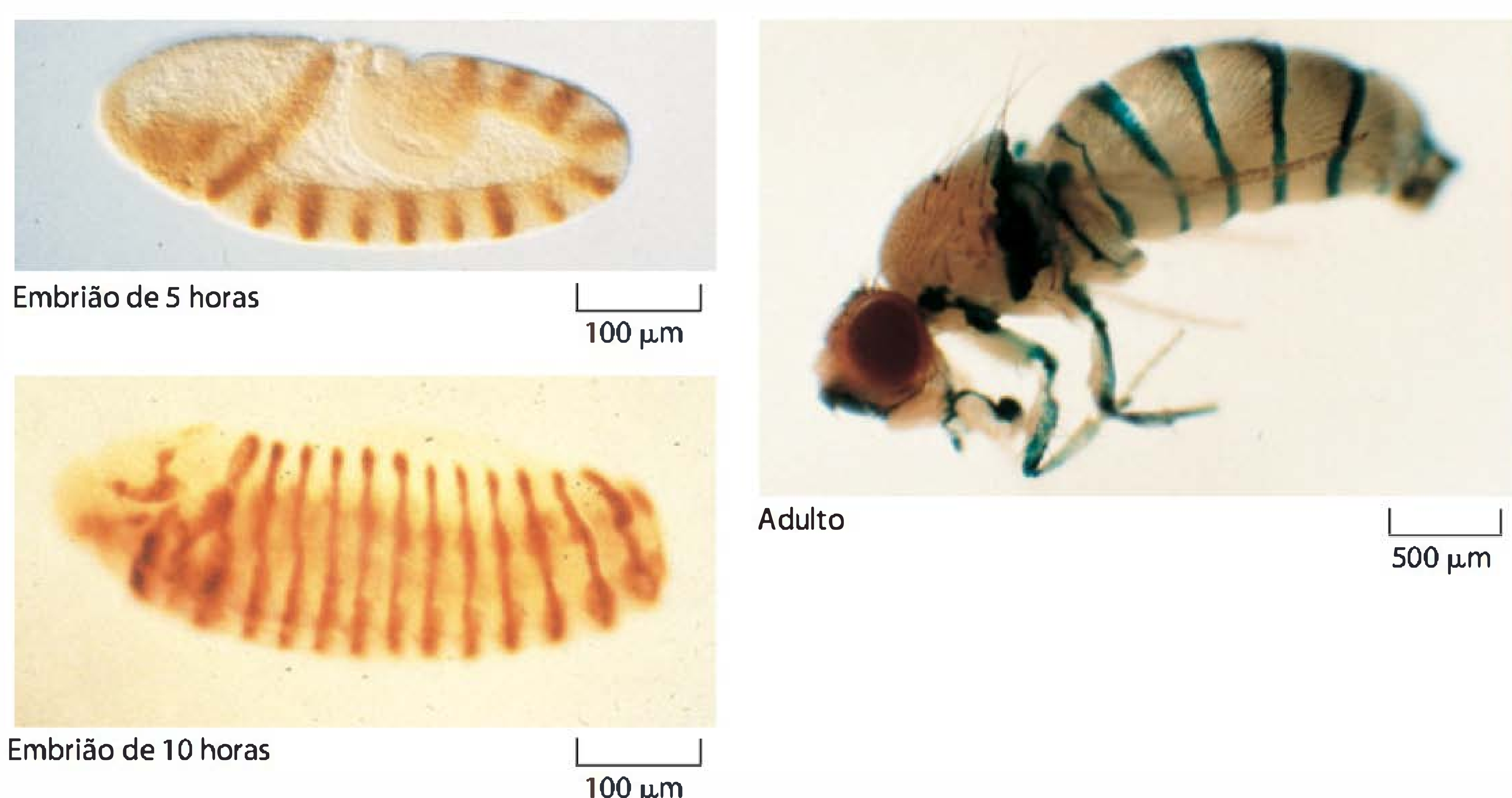


Figura 22-41 O padrão de expressão de *Engrailed*, um gene de polaridade segmentar. O padrão de *Engrailed* é mostrado em um embrião de cinco horas (no estágio de banda germinativa estendida), em um embrião de 10 horas e no adulto (cujas asas foram removidas nesta preparação). O padrão é revelado por um anticorpo (*marrom*) contra a proteína Engrailed (para os embriões de 5 e 10 horas) ou (para o adulto) pela construção de uma linhagem de *Drosophila* contendo as sequências controladoras do gene *Engrailed* acopladas à sequência codificante do repórter *LacZ*, cujo produto é detectado histoquimicamente por meio de um produto azul da reação que ele catalisa. Note que o padrão de *Engrailed*, uma vez estabelecido, é preservado por toda a vida do animal. (De C. Hama, Z. Ali e T. B. Kornberg, *Genes Dev*. 4:1079-1093. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

(um membro da família Wnt) e Hedgehog. Estas são expressas em diferentes bandas de células que servem como centros de sinalização em cada parassegmento e atuam na manutenção e no refino da expressão de outros genes de polaridade segmentar. Além disso, embora a sua expressão inicial seja determinada pelos genes *pair-rule*, as duas proteínas sinalizadoras regulam uma a expressão da outra em uma via mutuamente sustentada e continuam a auxiliar o desencadeamento da expressão de genes, como o *Engrailed*, precisamente em seus locais corretos.

O padrão de expressão de *Engrailed* persistirá por toda a vida, muito depois de os sinais que organizaram a sua produção terem desaparecido (ver Figura 22-41). Este exemplo ilustra não somente a subdivisão progressiva do embrião por meio de sinais cada vez mais precisamente localizados, mas também a transição entre os eventos de sinalização temporários do desenvolvimento inicial e a posterior manutenção estável das informações do desenvolvimento.

Além de regular os genes de polaridade segmentar, os produtos dos genes *pair-rule* colaboram com os produtos dos genes *gap* para induzir a ativação precisamente localizada de um conjunto adicional de marcações espaciais – os genes seletores homeóticos. São os genes seletores homeóticos que distinguem permanentemente um parassegmento de outro. Na próxima seção, examinaremos esses genes seletores em detalhe e discutiremos as suas funções na memória celular.

Resumo

A mosca Drosophila tem sido o principal organismo, modelo para o estudo da genética do desenvolvimento animal. Assim como outros insetos, ela começa o seu desenvolvimento com uma série de divisões nucleares, gerando um sincício, e grande parte da formação dos padrões iniciais ocorre nesta célula única gigante e multinucleada. O padrão se origina das assimetrias no ovo, organizadas tanto por depósitos localizados de mRNA dentro do ovo como por sinais das células foliculares ao redor dele. As informações posicionais no embrião multinucleado são fornecidas por quatro gradientes intracelulares produzidos pelos produtos de quatro grupos de genes de efeito materno chamados de genes de polaridade do ovo. Eles controlam quatro distinções fundamentais para a estrutura corporal dos animais: dorsal versus *ventral, endoderme* versus *mesoderme e ectoderme, células germinativas* versus *células somáticas e cabeça* versus *parte posterior.*

Os genes de polaridade do ovo operam pela produção de distribuições graduadas de proteínas de regulação gênica no ovo e no embrião inicial. Os gradientes ao longo do eixo ântero-posterior iniciam a expressão ordenada dos genes gap, dos genes pair-rule, dos genes de polaridade segmentar e dos genes seletores homeóticos. Estes, por meio de uma hierarquia de interações, tornam-se expressos em algumas regiões do embrião e não em outras, subdividindo progressivamente o blastoderma em uma série regular de unidades modulares repetidas chamadas de segmentos. Os padrões complexos de expressão gênica refletem a organização modular do DNA regulador, com estimuladores separados para cada gene individual responsável por partes separadas do seu padrão de expressão.

Os genes de polaridade segmentar começam a agir próximo ao final do processo de segmentação, logo após o sincício ter se dividido em células separadas, e controlam a formação de padrões internos de cada segmento por sinalizações célula-célula por meio das vias de Wnt (Wingless) e Hedgehog. Isto leva a uma ativação localizada e persistente de genes como Engrailed, dando às células um registro da sua localização ântero-posterior dentro do segmento. Enquanto isso, um novo gradiente de sinalização célula-célula também é gerado ao longo do eixo dorso-ventral, com o membro da família TGFβ Decapentaplegic (Dpp) e seu antagonista, Short gastrulation, atuando como morfógenos. Este gradiente auxilia a refinar a escolha das várias características das células em diferentes níveis dorso-ventrais. Sabe-se também que as proteínas homólogas controlam a formação de padrões do eixo ventro-dorsal nos vertebrados.

GENES SELETORES HOMEÓTICOS E A FORMAÇÃO DE PADRÕES DO EIXO ÂNTERO-POSTERIOR

À medida que o desenvolvimento progride, o corpo torna-se cada vez mais complexo. Em toda esta complexidade crescente existe, entretanto, uma característica simplificadora que coloca o entendimento de todo o processo de desenvolvimento a nosso alcance.



Figura 22-42 Mutação homeótica. A mosca mostrada aqui é um mutante *Antennapedia*. As suas antenas estão convertidas em estruturas de pernas por uma mutação na região reguladora do gene *Antennapedia* que o induz a ser expresso na cabeça. Compare com a mosca normal mostrada na Figura 21-24. (Cortesia de Matthew Scott.)

Repetidamente, em cada espécie e em cada nível de organização, as estruturas complexas são feitas pela repetição de alguns temas básicos, com variações. Assim, um número limitado de tipos celulares básicos diferenciados, como as células musculares ou os fibroblastos, ressurge com variações individuais sutis em diferentes locais. Esses tipos celulares estão organizados em uma variedade limitada de tipos de tecidos, como os músculos ou os tendões, os quais novamente estão repetidos com variações sutis em diferentes regiões do corpo. A partir de vários tecidos, órgãos como os dentes ou os dedos são produzidos – molares e incisivos, indicadores e polegares e dedos dos pés – alguns tipos básicos de estrutura, repetidos com variações.

Em qualquer lugar em que encontremos este fenômeno de *repetição modulada*, podemos dividir o problema dos biólogos do desenvolvimento em duas questões: qual é o mecanismo básico de construção comum a todos os objetos de uma dada classe, e como este mecanismo é modificado para originar as variações observadas? O embrião usa uma estratégia combinatória para gerar a sua complexidade, e podemos usar a estratégia combinatória para entendê-la.

Os segmentos do corpo do inseto fornecem um exemplo muito claro. Já havíamos esboçado a maneira pela qual os rudimentos de um único segmento típico são construídos. Precisamos agora considerar como um segmento é induzido a ser diferente de outro.

O código Hox especifica diferenças ântero-posteriores

O primeiro vestígio de uma resposta genética para a questão de como cada segmento adquire a sua identidade individual surgiu há mais de 80 anos, com a descoberta da primeira de várias mutações na *Drosophila* que causavam perturbações bizarras na organização da mosca adulta. No mutante *Antennapedia*, por exemplo, as pernas originam-se a partir da cabeça, no lugar das antenas (**Figura 22-42**), enquanto no mutante *Bithorax*, porções de um par de asas extras aparecem onde normalmente deveriam estar estruturas muito menores chamadas de halteres. Essas mutações transformam partes do corpo em estruturas apropriadas para outras posições e são chamadas de *homeóticas*. Um conjunto inteiro de **genes seletores homeóticos** determina o caráter ântero-posterior dos segmentos da mosca.

Os genes deste conjunto – oito deles na mosca – são relacionados uns com os outros como membros de uma família multigênica e pertencem a um ou a outro de dois agrupamentos gênicos conhecidos como **complexo Bithorax** e **complexo Antennapedia**. Os genes no complexo Bithorax controlam as diferenças entre os segmentos abdominais e torácicos do corpo, e aqueles do complexo Antennapedia controlam as diferenças entre os segmentos torácicos e os da cabeça. As comparações com outras espécies mostram que os mesmos genes estão presentes em essencialmente todos os animais, incluindo os humanos. Estas comparações também revelam que os complexos Antennapedia e Bithorax são as duas metades de uma única entidade, chamada de **complexo Hox**, que se tornou dividida no curso da evolução da mosca e cujos membros operam de uma maneira coordenada para exercer o seu controle sobre o padrão cabeça-cauda do corpo.

Os genes seletores homeóticos codificam proteínas de ligação ao DNA que interagem com outras proteínas de regulação gênica

À primeira vista, cada gene seletor homeótico normalmente é expresso somente naquelas regiões que se desenvolvem de modo anormal quando o gene está mutado ou ausente. Os produtos desses genes podem, então, ser vistos como marcas de endereço molecular pertencentes às células de cada parassegmento: eles são a encarnação física do valor posicional da célula. Se as marcas de endereçamento estiverem alteradas, o parassegmento comporta-se como se estivesse localizado em outro lugar, e a deleção de todo o complexo resulta em uma larva cujos segmentos do corpo são todos semelhantes (**Figura 22-43**).

Um primeiro problema, portanto, é entender como os produtos dos genes seletores homeóticos atuam na maquinaria básica de formação de padrões segmentares para dar a cada segmento sua individualidade. Os produtos dos genes seletores homeóticos são proteínas de regulação gênica, todas relacionadas umas às outras por possuírem um *homeodomínio* de ligação ao DNA altamente conservado (de 60 aminoácidos), discutido no Capítulo 7. O segmento correspondente na sequência de DNA é chamado de *homeobox*, do qual, pela abreviatura, o complexo Hox ganhou seu nome.

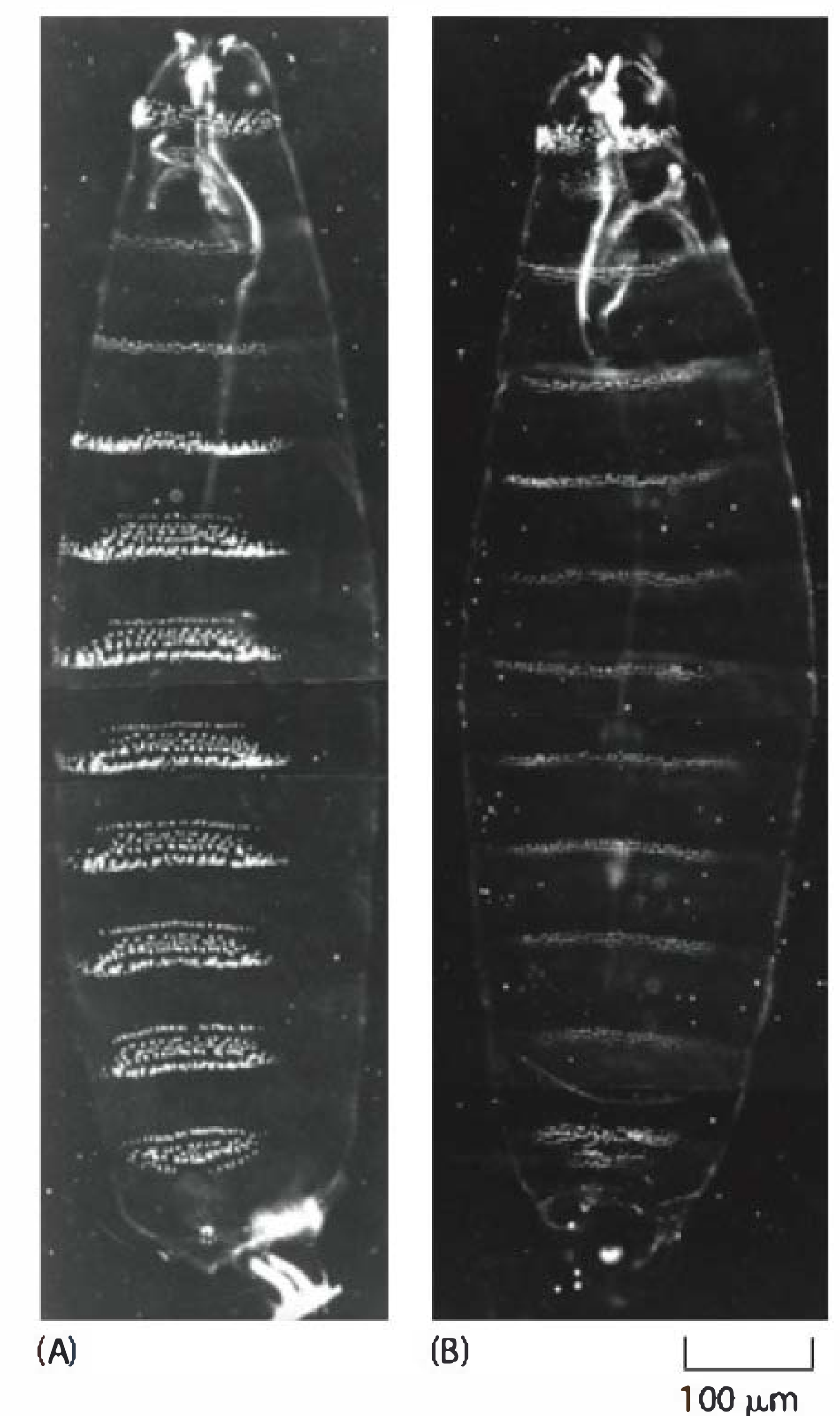


Figura 22-43 O efeito da deleção da maioria dos genes do complexo Bithorax. (A) Uma larva normal de *Drosophila* mostrada sob iluminação em campo escuro; (B) a larva mutante com grande parte do complexo Bithorax deletada. No mutante, todos os parassegmentos posteriores a P5 têm a aparência de P5. (De G. Struhl, *Nature* 293:36-41, 1981. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Se os produtos dos genes seletores homeóticos são semelhantes nas suas regiões de ligação ao DNA, como eles exercem efeitos diferentes de modo a fazer um parassegmento distinto do seguinte? A resposta parece estar, em grande parte, nas partes das proteínas que não se ligam diretamente ao DNA, mas interagem com outras proteínas nos complexos de ligação ao DNA. Os diferentes parceiros nestes complexos atuam junto com as proteínas seletoras homeóticas para determinar quais os sítios de ligação ao DNA serão reconhecidos e se o efeito na transcrição naqueles sítios será de ativação ou repressão. Dessa maneira, os produtos dos genes seletores homeóticos combinam-se a outras proteínas de regulação gênica e modulam suas ações de maneira a dar a cada parassegmento os seus aspectos característicos.

Os genes seletores homeóticos são expressos sequencialmente de acordo com a sua ordem no complexo Hox

Para entender como o complexo Hox fornece valores posicionais às células, também precisamos considerar como a expressão dos próprios genes *Hox* é regulada. As sequências codificantes dos oito genes seletores homeóticos nos complexos Antennapedia e Bithorax estão distribuídas em meio a uma quantidade muito maior – um total de aproximadamente 650 mil pares de nucleotídeos – de DNA regulador. Este DNA inclui sítios de ligação aos produtos dos genes de polaridade do ovo e dos genes de segmentação. O DNA regulador no complexo Hox atua como um intérprete dos múltiplos itens de informações posicionais fornecidos por todas estas proteínas de regulação gênica. Em resposta, é transcrito um conjunto particular de genes seletores homeóticos, apropriado para aquela localização.

No padrão de controle existe uma notável regularidade. A sequência na qual os genes estão ordenados ao longo do cromossomo, em ambos os complexos Antennapedia e Bithorax, corresponde quase exatamente à ordem na qual eles são expressos ao longo do eixo do corpo (**Figura 22-44**). Isso sugere que os genes são ativados em série por algum processo graduado – em duração ou em intensidade – ao longo do eixo do corpo e cuja ação se espalha gradualmente ao longo do cromossomo. De modo geral, o mais "posterior" dos genes expressos em uma célula é o que domina, direcionando para uma diminuição da expressão dos genes "anteriores" previamente ativados e ditando a característica do segmento. Os mecanismos de regulação gênica subjacentes a esses fenômenos ainda não são compreendidos, mas as suas consequências são profundas. Veremos que a organização serial da expressão gênica no complexo Hox é uma característica fundamental que tem sido altamente conservada no curso da evolução.

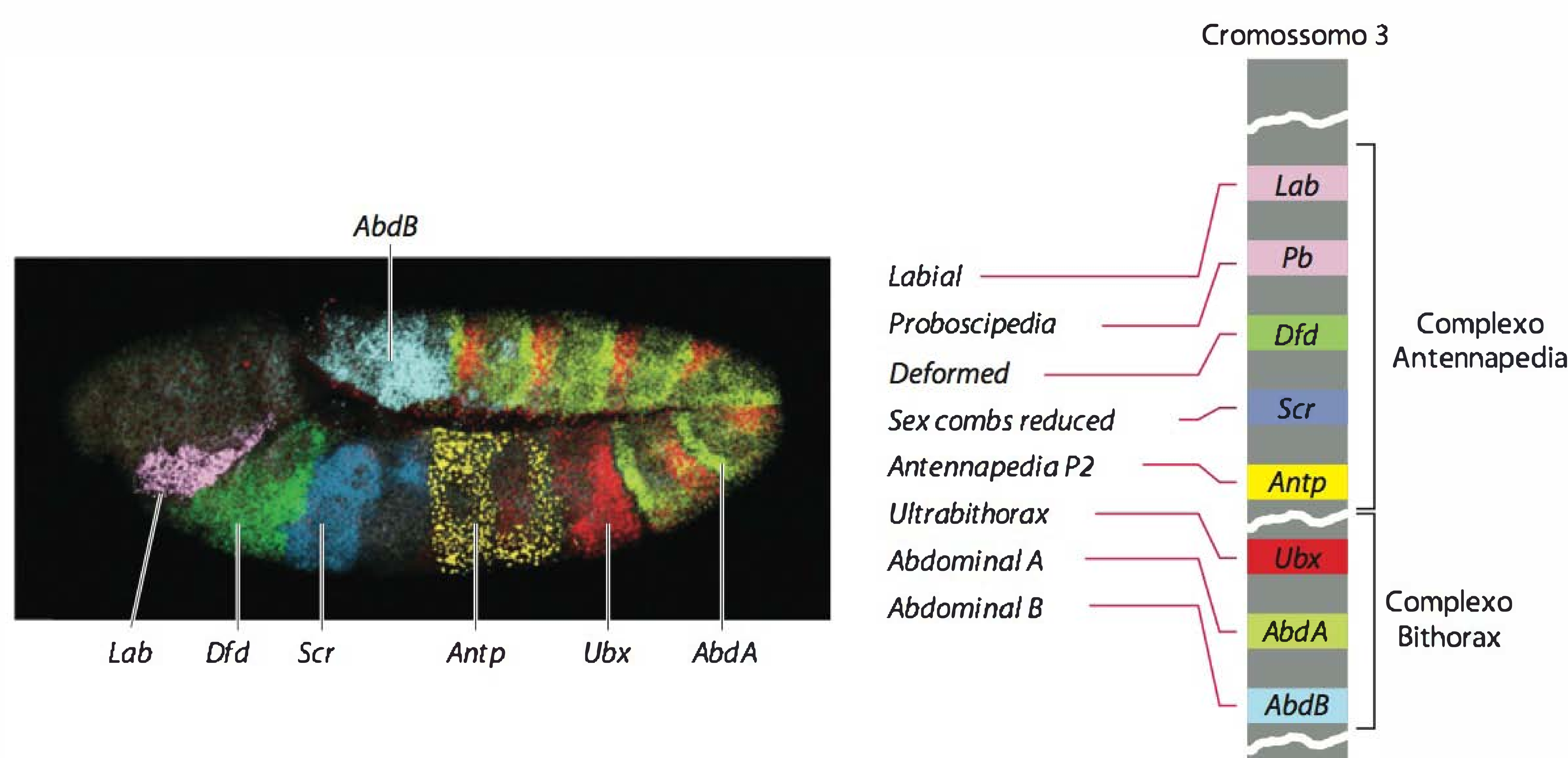


Figura 22-44 Os padrões de expressão comparados às localizações cromossômicas dos genes do complexo Hox. O diagrama mostra a sequência dos genes em cada uma das duas subdivisões dos complexos cromossômicos. Esta sequência corresponde, com poucas exceções, à sequência espacial na qual os genes são expressos, conforme mostrado na fotografia de um embrião no estágio de banda germinativa estendida, cerca de cinco horas após a fertilização. O embrião foi corado por hibridização *in situ* com diferentes sondas marcadas com cores distintas para detectar os produtos de mRNAs de diferentes genes *Hox*. (Fotografia cortesia de William McGinnis, adaptada de D. Kosman et al., *Science* 305:846, 2004. Com permissão de AAAS.)

Existem centenas de outros genes contendo homeobox no genoma da mosca – e de outras espécies animais – mas a maioria está dispersa e não agrupada em complexos como o complexo Hox. Eles desempenham muitas funções diferentes na regulação gênica, mas uma proporção substancial apresenta funções afins às dos genes *Hox*: eles controlam as variações de um tema básico do desenvolvimento. As diferentes classes de neurônios, por exemplo, diferenciam-se frequentemente umas das outras pela expressão de genes específicos dessa grande superfamília.

O complexo Hox carrega um registro permanente das informações posicionais

O padrão espacial de expressão dos genes no complexo Hox é formado por sinais que atuam no início do desenvolvimento, mas as consequências são duradouras. Embora o padrão de expressão sofra ajustes complexos enquanto o desenvolvimento progride, o complexo Hox se comporta, em cada célula, como um registro permanente da posição ântero-posterior que a célula ocupou no embrião inicial. Assim, as células de cada segmento estão equipadas com uma memória de longa duração da sua localização ao longo do eixo ântero-posterior do corpo – em outras palavras, com um valor posicional ântero-posterior. Como veremos na próxima seção, esta memória impressa no complexo Hox controla a identidade específica dos segmentos não somente nos segmentos larvais, mas também nas estruturas da mosca adulta, que são geradas em um estágio muito mais tardio em relação aos discos imaginais larvais e a outros abrigos de células imaginais precursoras na larva.

O mecanismo molecular da memória celular para esta informação posicional conta com dois tipos de informações reguladoras. Uma é originada dos próprios genes seletores homeóticos: muitas das proteínas Hox autoativam a transcrição de seus próprios genes. Outra informação crucial é originada em dois grandes conjuntos complementares de proteínas que controlam a estrutura da cromatina, chamados de *grupo Polycomb* e *grupo Trithorax*. Se estes reguladores estão defeituosos, o padrão de expressão dos genes seletores homeóticos é, no primeiro momento, formado de maneira correta, mas não é corretamente mantido conforme o embrião se desenvolve.

Os dois conjuntos de reguladores atuam de maneiras opostas. As proteínas do grupo Trithorax são necessárias para manter a transcrição dos genes *Hox* nas células em que a transcrição já foi ativada. Em contraste, as proteínas do grupo Polycomb formam complexos estáveis que se ligam à cromatina do complexo Hox e mantêm o estado reprimido nas células em que os genes *Hox* não foram ativados no seu momento crítico (**Figura 22-45**). A memória do desenvolvimento envolve modificações covalentes específicas nas histonas dos nucleossomos nas adjacências dos genes *Hox*, induzindo a uma mudança de estado da cromatina que pode ser perpetuada de uma geração de células para a próxima, conforme discutido nos Capítulos 4 e 7.

O eixo ântero-posterior é controlado pelos genes seletores *Hox* também nos vertebrados

Os homólogos dos genes seletores homeóticos de *Drosophila* são encontrados em quase todas as espécies animais estudadas, dos cnidários (hidras) e nematoides até os moluscos e mamíferos. Notavelmente, esses genes frequentemente são agrupados em complexos semelhantes ao complexo Hox de insetos. No camundongo, existem quatro desses complexos – chamados de complexos *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* e *HoxD* – cada um em um cromossomo diferente. Os genes individuais em cada complexo podem ser reconhecidos pelas suas sequências correspondentes de membros específicos do conjunto de genes de *Drosophila*. Na realidade, os genes *Hox* de mamíferos podem funcionar na *Drosophila* como substitutos parciais dos genes *Hox* correspondentes de *Drosophila*. Parece que cada um dos quatro complexos Hox de mamíferos é, grosseiramente falando, o equivalente a um complexo completo de insetos (ou seja, o complexo Antennapedia mais o complexo Bithorax) (**Figura 22-46**).

A ordenação dos genes dentro de cada complexo Hox dos vertebrados é essencialmente a mesma do complexo Hox de insetos, sugerindo que todos os quatro complexos dos vertebrados se originaram por duplicações de um único complexo primordial e que preservaram

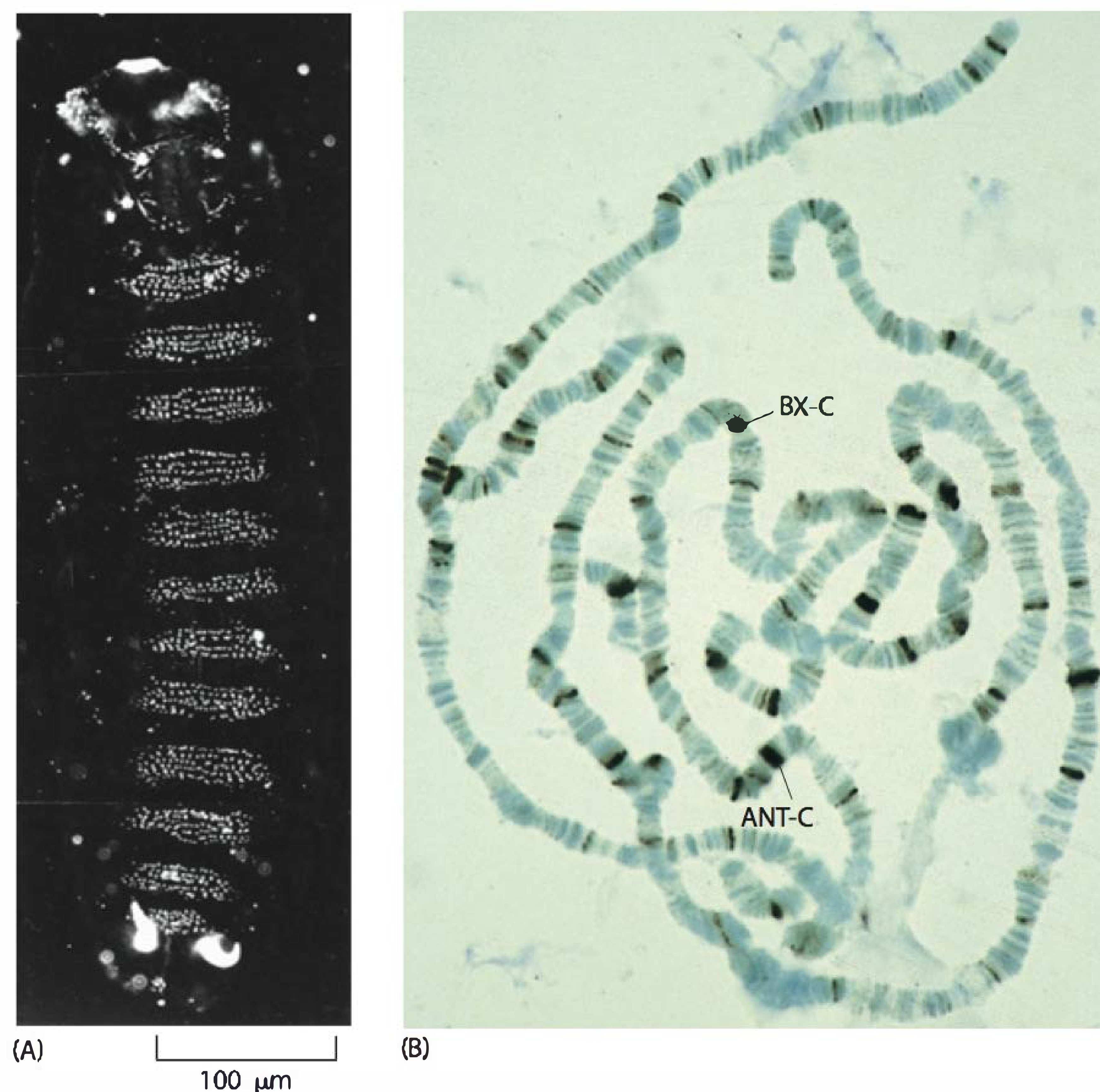


Figura 22-45 A ação dos genes do grupo Polycomb. (A) Fotografia de um embrião mutante defeituoso para o gene *Extra sex combs* (*Esc*) e derivado de uma mãe que também não apresentava este gene. O gene pertence ao grupo Polycomb. Essencialmente todos os segmentos foram transformados assemelhando-se ao segmento abdominal mais posterior (compare com a Figura 22-43). No mutante, o padrão de expressão dos genes seletores homeóticos, que inicialmente é bastante normal, torna-se tão instável que logo todos os genes estão ativados ao longo do eixo do corpo. (B) O padrão normal de ligação da proteína Polycomb aos cromossomos gigantes da *Drosophila*, visualizado com um anticorpo contra Polycomb. A proteína está ligada ao complexo Antennapedia (ANT-C), ao complexo Bithorax (BX-C) e a cerca de 60 outros locais. (A, de G. Struhl, *Nature* 293:36-41, 1981. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.; B, cortesia de B. Zink e R. Paro, *Trends Genet*. 6:416-421, 1990. Com permissão de Elsevier.)

sua organização básica. Mais surpreendentemente, quando os padrões de expressão dos genes *Hox* são examinados no embrião de vertebrados por hibridização *in situ*, percebe-se que os membros de cada complexo são expressos em uma série cabeça-cauda ao longo do eixo do corpo, assim como em *Drosophila* (**Figura 22-47**). O padrão é mais claramente observado no tubo neural, mas também é visível em outros tecidos, especialmente na mesoderme. Com exceções menores, essa ordenação anatômica corresponde à ordenação cromossômica dos genes em cada complexo, e os genes correspondentes nos quatro diferentes complexos Hox possuem domínios ântero-posteriores de expressão quase idênticos.

Os domínios de expressão gênica definem um sistema detalhado de correspondências entre as regiões do corpo dos insetos e as regiões do corpo dos vertebrados (ver Figura 22-46). Os parassegmentos da mosca correspondem a uma série de segmentos semelhantemente marcados na porção anterior do embrião de vertebrado. Estes segmentos estão mais claramente demarcados no cérebro posterior (ver Figuras 22-46 e 22-47), onde são chamados de *rombômeros*. Nos tecidos laterais ao cérebro posterior, a segmentação é vista em uma série de *arcos branquiais*, proeminentes em todos os embriões de vertebrados – os precursores dos sistemas de brânquias em peixes e dos maxilares e das estruturas do pescoço em mamíferos; cada par de rombômeros no cérebro posterior corresponde a um arco branquial. No cérebro posterior, como na *Drosophila*, os limites dos domínios de expressão de muitos dos genes *Hox* estão alinhados com os limites dos segmentos anatômicos.

Os produtos dos genes *Hox* de mamíferos parecem especificar valores posicionais que controlam o padrão ântero-posterior de partes do cérebro posterior, do pescoço e do tronco (assim como outras partes do corpo). Assim como em *Drosophila*, quando um gene *Hox* posterior é artificialmente expresso em uma região anterior, ele faz com que o tecido anterior apresente características do tecido posterior. No entanto, a perda de um gene *Hox* posterior permite que o tecido posterior, onde ele normalmente seria expresso, adote uma característica anterior (**Figura 22-48**). As transformações observadas nos mutantes *Hox* de camundongos frequentemente são incompletas, talvez devido à redundância entre os genes nos quatro agrupamentos de genes *Hox*. Contudo, parece claro que a mosca e o camundongo usam essencialmente a mesma maquinaria molecular para originar características individuais para as regiões sucessivas ao longo de pelo menos uma parte do seu eixo ântero-posterior.

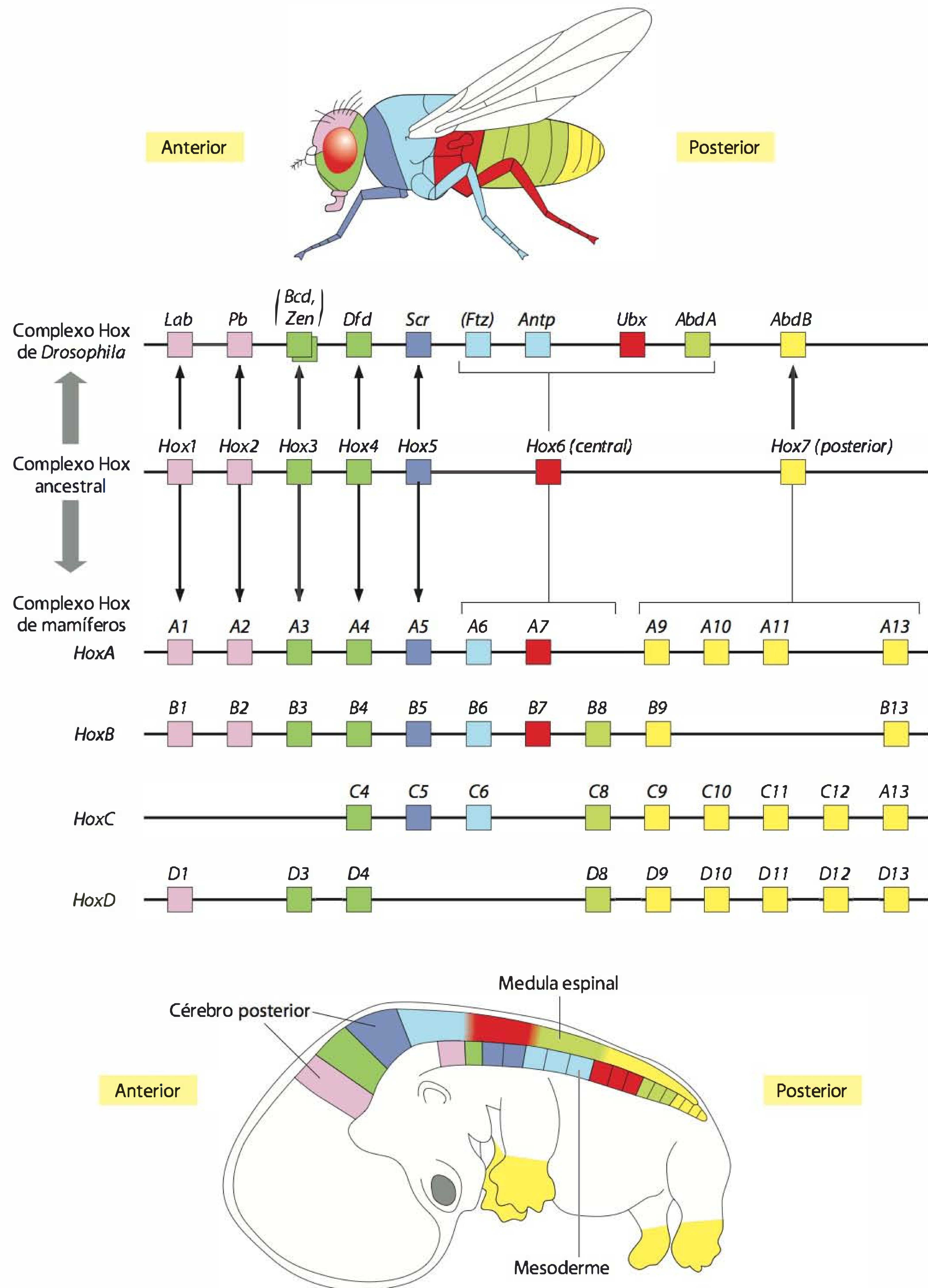
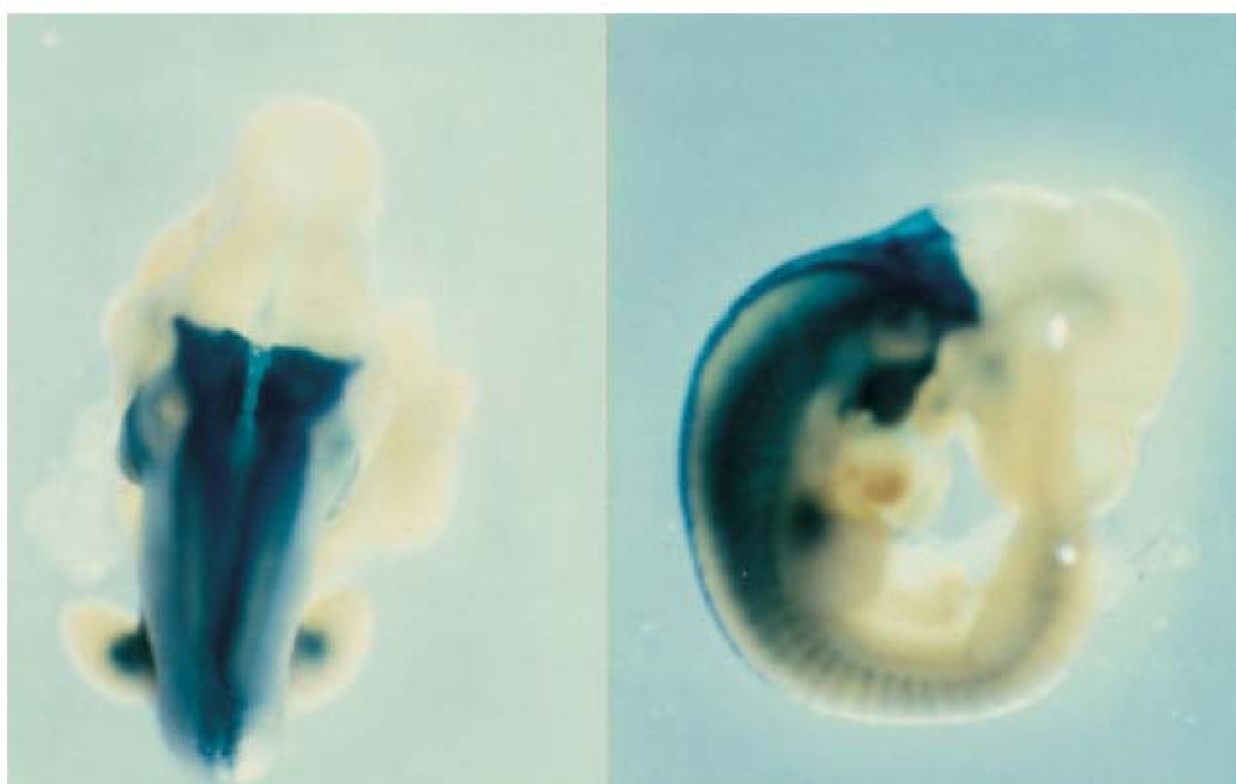


Figura 22-46 O complexo Hox de um inseto e os complexos Hox de um mamífero comparados e relacionados às regiões do corpo. Os genes dos complexos Antennapedia e Bithorax de *Drosophila* são mostrados em sua ordem cromossômica na linha de cima; os genes correspondentes dos quatro complexos Hox de mamíferos estão mostrados abaixo, também na sua ordem cromossômica. Os domínios de expressão gênica na mosca e no mamífero estão indicados em uma forma simplificada pelas *cores* nos desenhos dos animais acima e abaixo. Entretanto, os detalhes dos padrões dependem do estágio do desenvolvimento e variam um pouco de um complexo Hox de mamífero para outro. Também, em muitos casos, os genes mostrados aqui como expressos em um domínio anterior também são expressos mais posteriormente, sobrepondo-se aos domínios dos genes *Hox* mais posteriores (ver, por exemplo, Figura 22-47). Acredita-se que os complexos tenham evoluído como segue: primeiro, em algum ancestral comum de vermes, moscas e vertebrados, um único gene seletor homeótico primordial sofreu duplicações repetidas para formar uma série destes genes em *tandem* – o complexo Hox ancestral. Na sublinhagem da *Drosophila*, este complexo único dividiu-se nos complexos separados Antennapedia e Bithorax. Enquanto isso, na linhagem que originou os mamíferos, todo o complexo foi duplicado repetidamente para originar os quatro complexos Hox. O paralelismo não é perfeito porque, aparentemente, alguns genes individuais foram duplicados, outros perdidos, e, ainda, outros cooptados para diferentes propósitos (genes em parênteses na linha de cima) desde que os complexos divergiram. (Com base no diagrama cortesia de William McGinnis.)

HoxB2



HoxB4

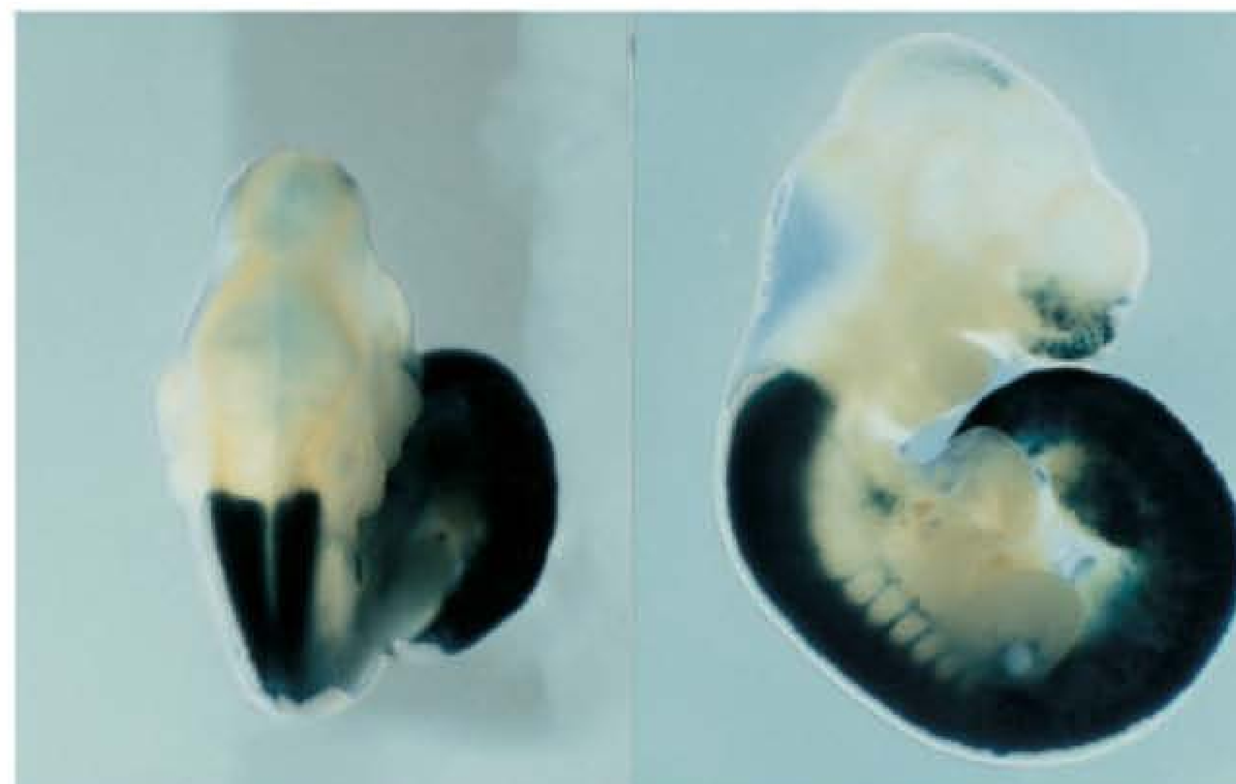


Figura 22-47 Domínios de expressão dos genes *Hox* em um camundongo. As fotografias mostram embriões inteiros exibindo os domínios de expressão de dois genes do complexo HoxB (*coloração azul*). Estes domínios podem ser revelados por hibridização *in situ* ou, como nestes exemplos, pela construção de camundongos transgênicos contendo a sequência controladora de um gene *Hox* acoplado a um gene repórter *LacZ*, cujo produto é detectado histoquimicamente. Cada gene é expresso em uma longa extensão de tecido com um limite anterior nitidamente definido. Quanto mais inicial for a posição do gene no seu complexo cromossômico, mais anterior será o limite anatômico de sua expressão. Assim, com poucas exceções, os domínios anatômicos dos sucessivos genes formam um conjunto agrupado, ordenado de acordo com a ordem dos genes no complexo cromossômico (Cortesia de Robb Krumlauf.)

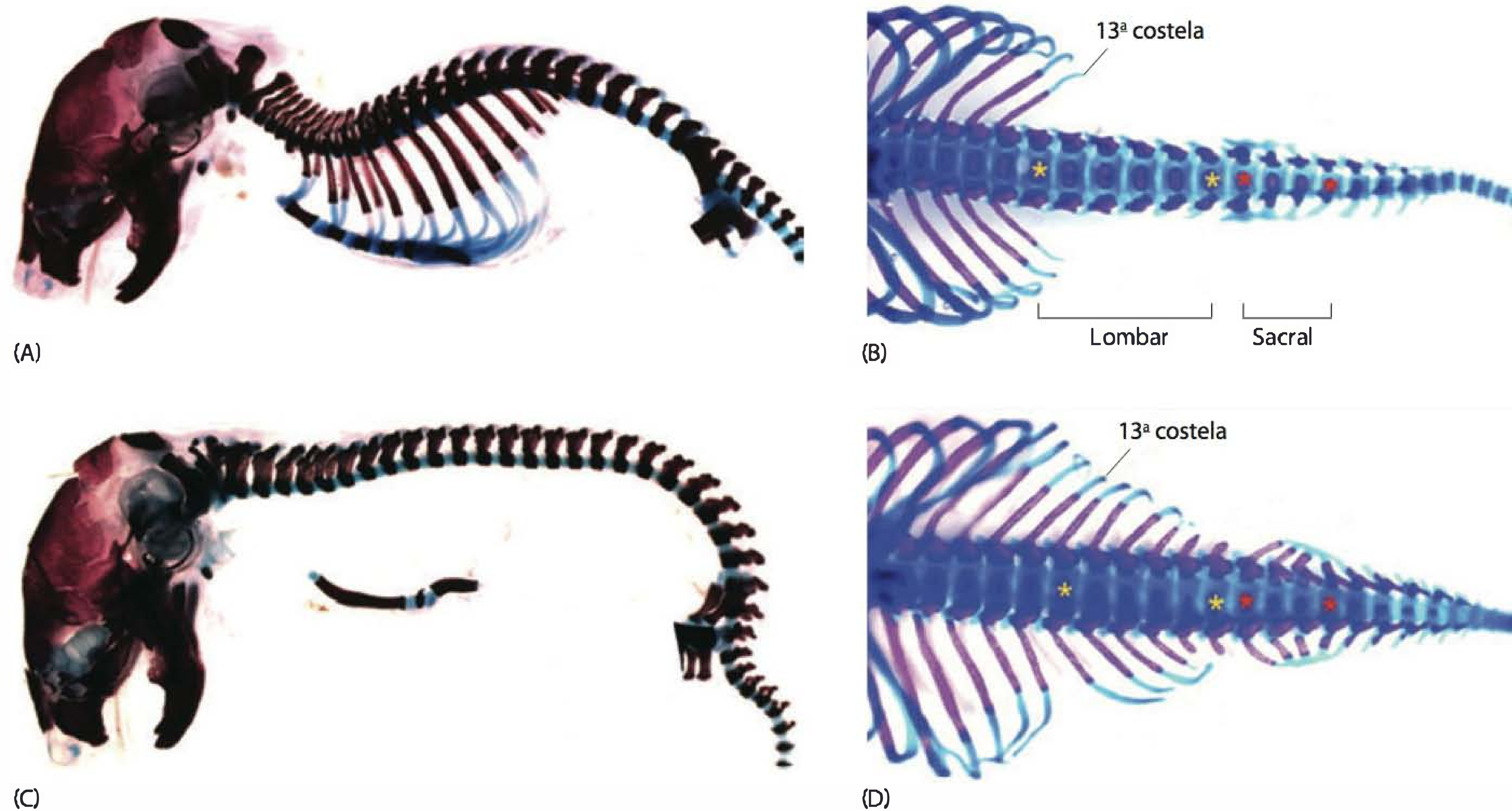


Figura 22-48 Controle da formação do padrão ântero-posterior pelos genes *Hox* no camundongo. (A, B) Um camundongo normal possui cerca de 65 vértebras, diferindo em suas estruturas de acordo com a sua posição ao longo do eixo do corpo: 7 cervicais (pescoço), 13 torácicas (com costelas), 6 lombares (marcadas pelos asteriscos *amarelos* em [B]), 4 sacrais (marcadas pelos asteriscos *vermelhos* em [B]), e cerca de 35 caudais (cauda). (A) mostra a visão lateral; (B) mostra a visão dorsal; para maior clareza, as costelas foram removidas em cada figura. (C) O gene *HoxA10* normalmente é expresso na região lombar (junto com seus parálogos *HoxC10* e *HoxD10*); aqui ele foi expresso artificialmente no tecido vertebral em desenvolvimento ao longo do eixo do corpo. Como resultado, as vértebras cervicais e torácicas foram todas convertidas a um caráter lombar. (D) Ao contrário, quando *HoxA10* é suprimido, assim como *HoxC10* e *HoxD10*, as vértebras que normalmente teriam caráter lombar e sacral apresentam caráter torácico. (A e C, de M. Carapuço et al., *Genes Dev.* 19:2116-2121, 2005. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press; B e D, de D. M. Wellik e M. R. Capecchi, *Science* 301:363-367, 2003. Com permissão de AAAS.)

Resumo

A complexidade do corpo do adulto é formada pela repetição modulada de alguns tipos básicos de estrutura. Assim, sobreposto ao padrão de expressão gênica que se repete em cada segmento, existe um padrão serial de expressão de genes seletores homeóticos que confere a cada segmento uma identidade diferente. Os genes seletores homeóticos codificam proteínas de ligação ao DNA da família dos homeodomínios. Eles estão organizados no genoma da Drosophila em dois agrupamentos, chamados de complexos Antennapedia e Bithorax, considerados como as duas partes de um único complexo Hox primordial que se dividiu durante a evolução da mosca. Em cada complexo, os genes estão arranjados em uma sequência que corresponde a sua sequência de expressão ao longo do eixo do corpo. A expressão gênica de Hox é iniciada no embrião. Ela é mantida, subsequentemente, pela ação de proteínas de ligação ao DNA dos grupos Polycomb e Trithorax, os quais marcam a cromatina do complexo Hox com um registro hereditário do seu estado embrionário de ativação. Os complexos Hox homólogos aos da Drosophila são encontrados em praticamente todos os tipos de animais que têm sido examinados, dos cnidários aos humanos, e parecem desempenhar uma função evolutivamente conservada na formação dos padrões do eixo ântero-posterior do corpo. Os mamíferos possuem quatro complexos Hox, cada um apresentando uma relação semelhante entre o arranjo serial dos genes no cromossomo e seus padrões seriais de expressão ao longo do eixo do corpo.

ORGANOGÊNESE E A FORMAÇÃO DOS PADRÕES DOS ÓRGÃOS ACESSÓRIOS

Vimos que os segmentos de uma larva de inseto são variações de um mesmo tema básico, com os genes de segmentação definindo o módulo repetitivo básico, e os genes seletores homeóticos dando a cada segmento a sua característica individual. O mesmo aplica-se aos principais órgãos acessórios do corpo do inseto adulto – pernas, asas, antenas, estruturas da boca e genitália externa: eles também são variações de um tema básico comum. Em um nível mais refinado de detalhes, encontraremos a mesma maravilhosa simplificação: os órgãos acessórios – e muitas outras partes do corpo – consistem em subestruturas que são elas próprias variações de um pequeno número de temas básicos evolutivamente conservados.

Nesta seção, seguimos o curso do desenvolvimento da *Drosophila* até o seu final, estreitando o foco em cada etapa para examinar um exemplo das muitas estruturas relacionadas que estão se desenvolvendo paralelamente. Enquanto avançamos, indicaremos paralelos com estruturas de vertebrados que se desenvolvem de maneira semelhante, usando

não somente as mesmas estratégias gerais, mas muitos dos mesmos mecanismos moleculares específicos. Para evitar a interrupção da narrativa mais tarde, precisamos primeiro explicar brevemente alguns métodos experimentais fundamentais, necessários para enfrentar um problema especial que surge quando tentamos descobrir como os genes controlam os estágios mais tardios do desenvolvimento.

As mutações somáticas condicionais e induzidas tornam possível analisar funções gênicas tardias no desenvolvimento

Como anteriormente enfatizado, o mesmo gene pode ser usado repetidamente em muitas situações distintas – em diferentes regiões do corpo e em diferentes momentos. Com frequência, as mutações de perda de função alteram o desenvolvimento tão seriamente que o embrião ou a larva morre, privando-nos da oportunidade de observar como a mutação afetaria os processos seguintes.

Uma maneira de contornar esse problema é estudar as mutações condicionais. Se tivermos, por exemplo, uma mutação sensível à temperatura no gene de interesse, podemos manter o animal durante o desenvolvimento inicial em uma temperatura baixa, em que o produto gênico funciona normalmente, e, então, desabilitar o produto gênico quando desejado, pela elevação da temperatura, a fim de descobrir as funções mais tardias.

Outros métodos envolvem a modificação do DNA em subconjuntos de células em estágios mais tardios de desenvolvimento – um tipo de cirurgia genética de células individuais que permite que os grupos mutantes de células de um genótipo específico sejam gerados em um determinado momento do desenvolvimento. Este notável feito pode ser obtido por *recombinação somática induzida*, e o organismo resultante é chamado de **mosaico genético**. Por meio dos mosaicos genéticos, podemos não apenas contornar o problema da letalidade quando a função de um gene é perturbada no organismo como um todo, mas também podemos explorar as funções do gene na comunicação célula-célula, pela justaposição de células mutantes e não-mutantes. Podemos testar, por exemplo, se a célula utiliza seu próprio produto gênico para a sinalização a células vizinhas, ou se ela recebe sinais destas outras células, ou nenhuma dessas alternativas. E, pela indução de alterações genéticas em momentos diferentes, podemos determinar precisamente quando um gene atua para produzir um efeito particular.

Uma versão corrente desta técnica para indução de recombinação somática utiliza moscas transgênicas que tenham sido desenvolvidas para conter dois tipos de elementos genéticos derivados de leveduras: o gene FLP recombinase sítio-específico e a sequência-alvo FLP recombinase (FRT, *FLP recombinase target*). Tipicamente, o animal é homozigoto para uma inserção da sequência FRT próxima ao centrômero em um braço do cromossomo escolhido, enquanto uma construção consistindo no gene *Flp* sob o controle de um promotor de choque térmico é inserida em algum outro lugar do genoma. Se este embrião, ou larva transgênica, é submetido a um choque térmico (ou seja, exposto à alta temperatura por alguns minutos), a expressão de *Flp* é induzida, e esta enzima catalisa permutações e recombinações entre os cromossomos maternos e paternos no sítio FRT. Se o choque térmico é ajustado para ser suficientemente suave, este evento ocorrerá em somente uma ou poucas células, distribuídas ao acaso. Como explicado na **Figura 22-49**, se o animal também é heterozigoto para o gene de interesse em uma região cromossômica permutada, o processo pode resultar em um par de células-filhas que são homozigotas; uma recebendo duas cópias do alelo materno do gene, a outra recebendo duas cópias do alelo paterno. Cada uma dessas células-filhas irá normalmente crescer e dividir-se para dar origem a pequenas regiões clonais de progênie homozigota.

A ocorrência de permutação pode ser detectada se o animal é escolhido para ser também heterozigoto para uma mutação em um gene marcador que esteja no mesmo braço do cromossomo do gene de interesse e, dessa forma, sofre permutação juntamente a ele. Assim, os clones de células mutantes homozigotas claramente identificados podem ser criados conforme a necessidade. Tanto FLP como FRT, ou os pares de elementos de recombinação análogos Cre e Lox, podem ser usados também em outras configurações para ativar ou inativar a expressão de um gene (ver Figura 5-79). Com estas técnicas, pode-se descobrir o que acontece, por exemplo, quando as células são induzidas a produzir uma molécula-sinal particular em um local anormal, ou quando são privadas de um receptor particular.

Em vez de usar um promotor de choque térmico para direcionar a expressão da FLP recombinase, pode-se usar uma cópia da sequência reguladora de um gene no genoma

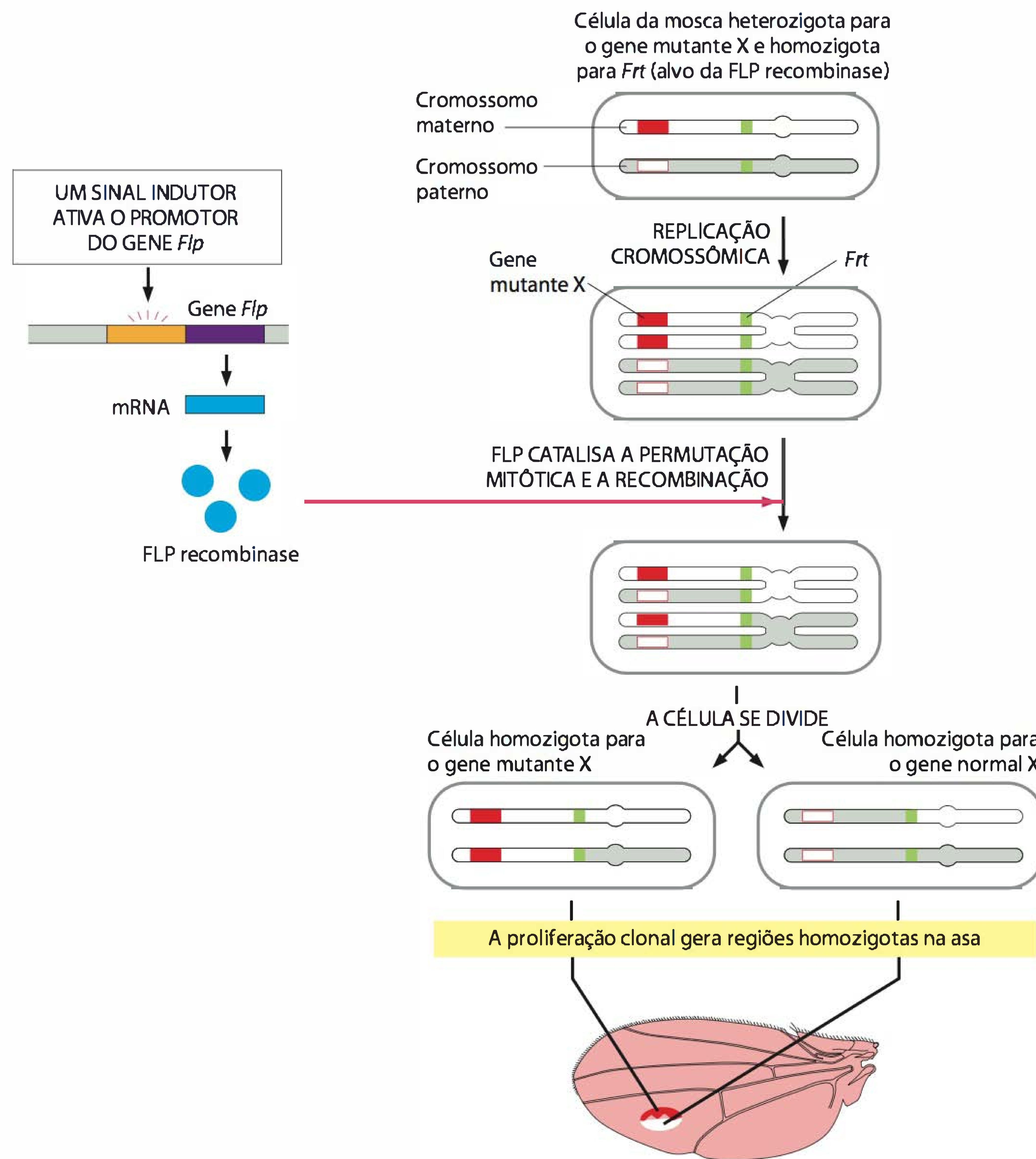


Figura 22-49 Criação de células mutantes pela recombinação somática induzida. Os diagramas seguem a destinação de um único par de cromossomos homólogos, um do pai (*sombreado*), o outro da mãe (*não-sombreado*). Estes cromossomos possuem um elemento *Frt* (*verde*) inserido próximo aos seus centrômeros e contêm um lócus para o gene de interesse – gene X – mais adiante ao longo do mesmo braço do cromossomo. O cromossomo paterno (neste exemplo) carrega o alelo selvagem do gene X (*retângulo delimitado em vermelho*), enquanto o cromossomo materno carrega um alelo mutante recessivo (*retângulo vermelho*). A recombinação pela troca de DNA entre os cromossomos materno e paterno, catalisada pela FLP recombinase, pode dar origem a um par de células-filhas, uma contendo duas cópias do tipo selvagem do gene X, a outra contendo duas cópias mutantes. Para auxiliar a identificação das células onde a recombinação ocorreu, os cromossomos materno e paterno podem ser escolhidos para portar diferentes marcadores genéticos (não-mostrado), capazes de gerar um produto visível, e posicionados no cromossomo de maneira que a recombinação envolvendo o lócus marcador – resultando em uma alteração visível na aparência das células – possa ser considerada como um sinal seguro de que o gene X também sofreu recombinação.

normal da mosca que seja expresso em algum momento e local interessantes. O evento de recombinação será então desencadeado, e as células mutantes serão criadas somente nos locais onde aquele gene normalmente é expresso. Uma variante dessa técnica usa emprestada a maquinaria de regulação transcricional da levedura, em vez da maquinaria de recombinação genética, para ativar ou inativar de maneira reversível um gene determinado da mosca, de acordo com o padrão normal de expressão de algum outro gene escolhido da mosca (**Figura 22-50**).

Assim, pela ativação ou inativação de funções gênicas em momentos e em locais específicos, os biólogos do desenvolvimento podem começar a decifrar o sistema de sinais especificados geneticamente e as respostas que controlam a formação dos padrões de qualquer órgão do corpo.

As partes do corpo da mosca adulta desenvolvem-se a partir dos discos imaginais

As estruturas externas da mosca adulta são formadas em grande parte de rudimentos chamados de **discos imaginais** – grupos de células que são deixadas de lado, aparentemente indiferenciadas, em cada segmento da larva. Os discos são bolsas de epitélio, de forma semelhante a balões enrugados e achatados, e contíguas à epiderme (a camada superficial) da larva. Existem 19 discos, arranjados como nove pares em cada lado da larva mais um disco na linha média (**Figura 22-51**). Eles crescem e desenvolvem seu padrão interno enquanto a larva cresce, até que, finalmente, na metamorfose, viram pelo avesso (colocam a porção interna no lado exterior), estendem-se e diferenciam-se abertamente para formar a camada epidérmica do adulto. Os olhos e as antenas desenvolvem-se a partir de um par de discos, as asas e parte do tórax a partir de outro, o primeiro par de patas de outro, e assim por diante.

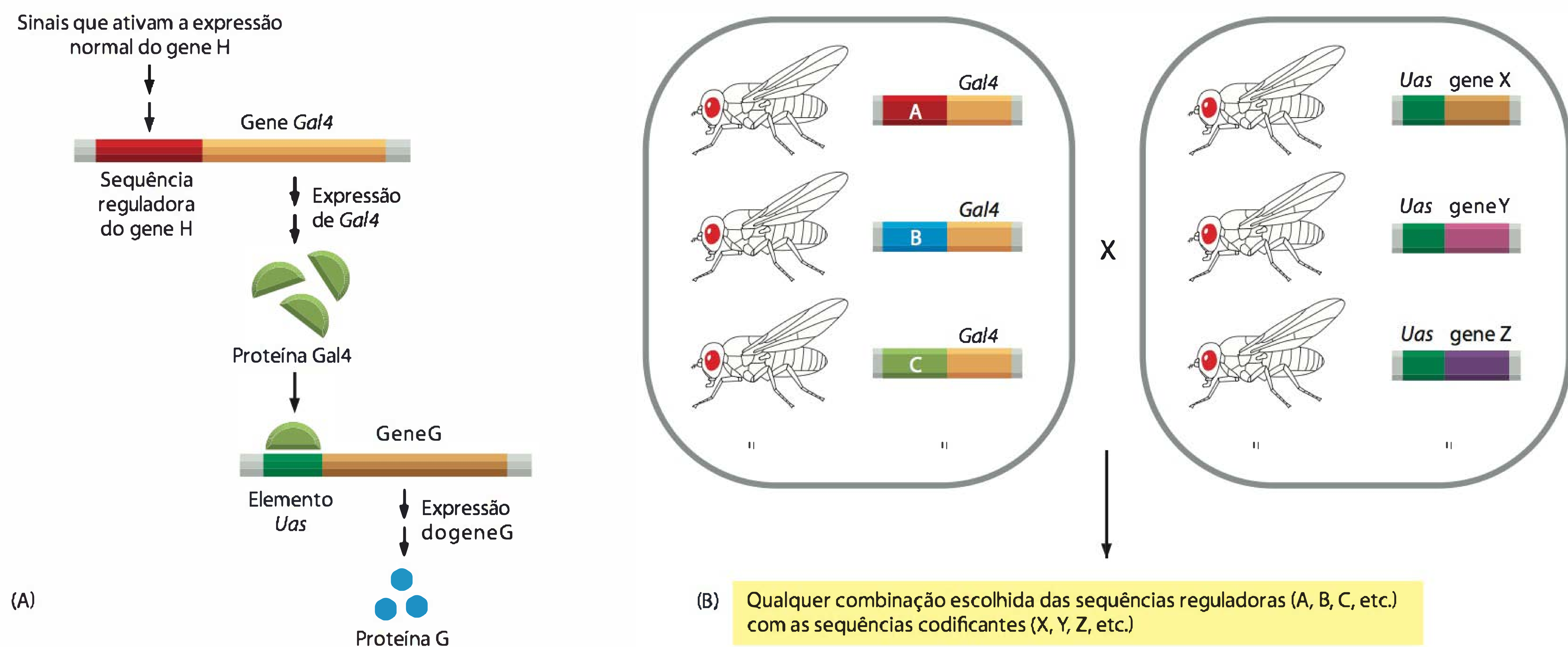


Figura 22-50 A técnica *Gal4/Uas* para o controle da expressão gênica alterada em *Drosophila*. O método permite que se possa direcionar a expressão de um gene G escolhido nos locais e nos momentos onde um outro gene H de **Drosophila** normalmente é expresso. (A) Um animal transgênico é criado com duas construções separadas inseridas no seu genoma. Um inserto consiste em uma sequência reguladora específica de leveduras, chamada de elemento *Uas* (de *upstream activating sequence*), acoplada a uma cópia da sequência codificante do gene G. O outro inserto contém a sequência codificante do gene de levedura *Gal4*, cujo produto é uma proteína de regulação gênica específica de levedura que se liga ao elemento *Uas*; este inserto *Gal4* é colocado próximo à região reguladora do gene H e é controlado por ela. Onde quer que o gene H seja expresso normalmente, a proteína Gal4 também é produzida e induz a transcrição do gene G. (B) Embora se possa alcançar o mesmo resultado pela ligação de uma cópia da sequência reguladora H diretamente na sequência codificante G, a metodologia de *Gal4/Uas* possibilita uma estratégia que é mais eficiente em um plano maior. Duas "bibliotecas" separadas de moscas transgênicas são construídas; uma contendo insertos *Gal4* controlados por uma variedade de sequências reguladoras de diferentes genes A, B, C, etc., a outra contendo insertos *Uas* controlando uma variedade de sequências codificantes X, Y, Z, etc. Pelo cruzamento das moscas de uma biblioteca com moscas da outra, qualquer sequência codificante desejada pode ser funcionalmente acoplada a qualquer sequência reguladora desejada. Para gerar a biblioteca de moscas com inserções *Gal4* em locais úteis, as moscas são primeiramente produzidas com inserções *Gal4* em localizações aleatórias do seu genoma. Estas moscas são então cruzadas com moscas contendo um elemento *Uas* ligado a um gene repórter com um produto facilmente detectável. A expressão do gene repórter revela se *Gal4* foi inserido em um local que torna a sua expressão controlada por um estimulador interessante; as moscas mostrando padrões repórter interessantes são mantidas e estudadas. Esta técnica é chamada de técnica de armadilha de estimuladores, pois fornece uma maneira de caçar e caracterizar sequências reguladoras interessantes no genoma.

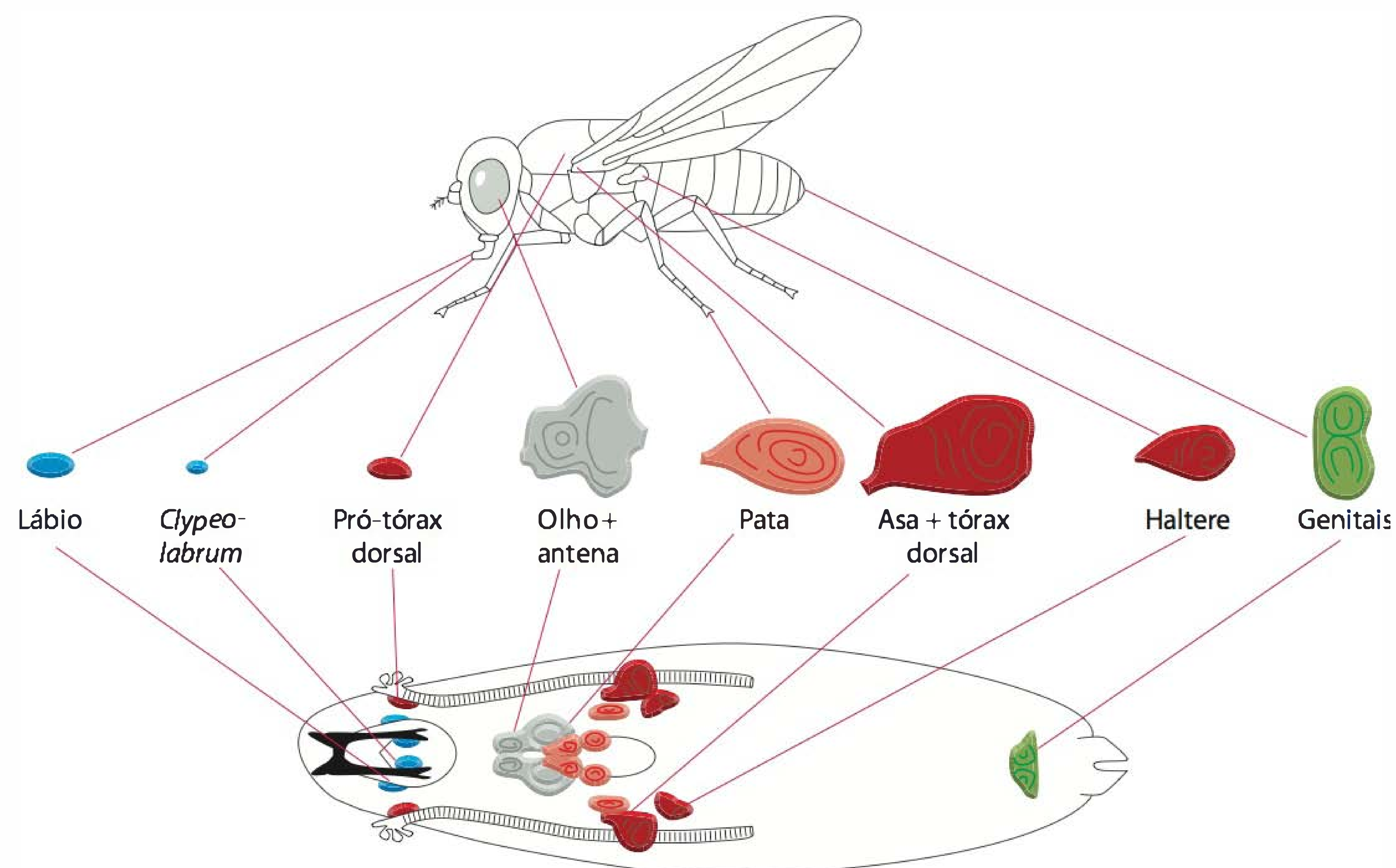


Figura 22-51 Os discos imaginais na larva de *Drosophila* e as estruturas do adulto que eles originam. (Segundo J. W. Fristrom et al., in Problems in Biology: RNA in Development [E. W. Hanley, ed.], p. 382. Salt Lake City: University of Utah Press, 1969.)

Os genes seletores homeóticos são essenciais para a memória da informação posicional nas células dos discos imaginais

As células de um disco imaginal se parecem com qualquer outra, mas os experimentos de transplantes mostram que elas são de fato já determinadas regionalmente e não são equivalentes. Se um disco imaginal é transplantado na posição de outro na larva, e a larva desenvolve-se até a metamorfose, o disco enxertado diferencia-se autonomamente em uma estrutura apropriada para a sua posição original: um disco de asa origina estruturas da asa, um disco de halteres, estruturas de halteres, independentemente do seu novo local. Isso mostra que as células dos discos imaginais são controladas pela memória da sua posição original. Por um procedimento de transplante serial mais complexo, que deixa as células do disco imaginal proliferarem por um período mais extenso antes da diferenciação, pode-se mostrar que esta memória celular é estavelmente herdada (com raros lapsos) por um número indefinidamente grande de gerações celulares.

Os genes seletores homeóticos são componentes essenciais do mecanismo de memória. Se, em qualquer estágio do longo período que leva à diferenciação na metamorfose, ambas as cópias de um gene seletor homeótico forem eliminadas pela recombinação somática induzida, a partir de um clone de células do disco imaginal que normalmente iriam expressar aquele gene, aquelas células irão diferenciar-se em estruturas incorretas, como se pertencessem a um segmento diferente do corpo. Essas e outras observações indicam que a memória de informação posicional de cada célula depende de uma atividade continuada dos genes seletores homeóticos. Essa memória, além disso, é expressa em uma forma celular autônoma – cada célula parecendo manter o seu estado individualmente, dependendo da sua própria história e de seu próprio genoma.

Genes reguladores específicos definem as células que formarão um órgão acessório

Precisamos agora examinar como um órgão acessório desenvolve o seu padrão interno. Tomaremos a asa do inseto como exemplo.

O processo começa com os mecanismos iniciais de formação de padrões que já discutimos. Os sistemas ântero-posterior e dorso-ventral de sinalizações no embrião inicial, em essência, delimitam uma grade ortogonal, no blastoderma, na forma de limites de expressão gênica segmentares dorso-ventrais e ântero-posteriores, periodicamente espaçados. Em certos pontos da interseção desses limites, a combinação de genes expressos é tal que induz um agrupamento de células à via de formação dos discos imaginais.

Em termos moleculares, isso corresponde à ativação da expressão dos genes reguladores definidores dos discos imaginais. Na maioria dos discos, o gene *Distal-less* é ativado. Ele codifica para uma proteína de regulação gênica que é essencial ao crescimento sustentado necessário para criar um órgão acessório alongado, como uma pata ou uma antena, com um eixo próximo-distal. Na ausência desse gene, tais órgãos acessórios não se formam, e quando ele é expresso artificialmente em locais anormais, podem ser produzidos órgãos acessórios em locais incorretos. O *Distal-less* é expresso em uma forma semelhante nos membros em desenvolvimento e em outros órgãos acessórios da maioria das espécies de invertebrados e de vertebrados que já foram examinadas (**Figura 22-52**). Para o disco do olho, outro gene, o



Figura 22-52 Expressão de *Distal-less* em patas em desenvolvimento e em órgãos acessórios relacionados de várias espécies. (A) Uma larva de ouriço-do-mar. (B) Uma larva de mariposa. (A, de G. Panganiban et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:5162– 5166, 1997. Com permissão da National Academy of Sciences; B, de G. Panganiban, L. Nagy e S.B. Carrol, *Curr. Biol*. 4:671-675, 1994. Com permissão de Elsevier.)

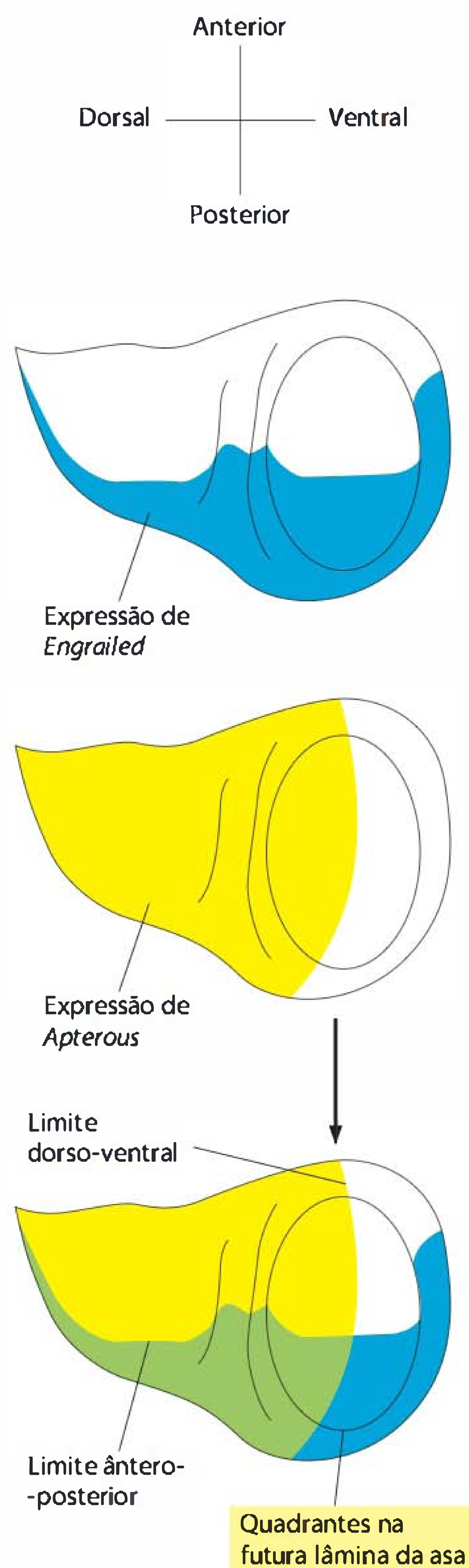


Figura 22-53 Domínios de expressão gênica no disco imaginal da asa, definindo os quadrantes da futura asa. A lâmina da asa deriva-se do domínio oval voltado para a direita e é dividida em quatro quadrantes pela expressão de *Apterous* e de *Engrailed*, como mostrado.

Eyeless (juntamente com dois genes correlatos), desempenha uma função correspondente; ele também possui homólogos com funções homólogas – os genes *Pax6* que direcionam o desenvolvimento do olho em outras espécies, como discutido no Capítulo 7.

O disco da asa de insetos é dividido em compartimentos

Desde o princípio, o agrupamento de células formando o disco imaginal apresenta os rudimentos de um padrão interno, herdado no início do processo de formação de padrões. Por exemplo, as células na metade posterior do rudimento do disco da asa (e da maioria dos outros rudimentos dos discos imaginais) expressam o gene *Engrailed* de polaridade segmentar, enquanto aquelas na metade anterior não. As assimetrias iniciais são a base para uma subsequente formação de padrões mais detalhada, assim como no ovo e no embrião inicial.

Os setores do disco da asa definidos pelas diferenças iniciais de expressão gênica correspondem a partes específicas da futura asa. A região posterior expressando *Engrailed* formará a metade posterior da asa, e a região que não expressa *Engrailed* formará a metade anterior. Enquanto isso, a parte dorsal do disco da asa expressa um gene chamado de *Apterous*, enquanto a metade ventral não. Na metamorfose, o disco dobra-se ao longo da linha que separa esses domínios para originar uma asa cuja camada dorsal de células é derivada da região que expressa *Apterous* e cuja camada ventral é derivada da região que não expressa *Apterous*. A margem da asa, onde estas duas camadas epiteliais estão unidas, corresponde aos limites do domínio de expressão de *Apterous* no disco (**Figura 22-53**).

As células do disco, tendo ativado a expressão dos genes que as marcam como anteriores ou posteriores, dorsais ou ventrais, retêm esta especificação enquanto o disco cresce e se desenvolve. Como as células são sensíveis a essas diferenças e seletivas na sua escolha dos vizinhos, são formados limites nitidamente definidos entre os quatro conjuntos resultantes de células, sem mistura nas interfaces. Os quatro quadrantes correspondentes do disco são chamados de **compartimentos**, pois não existe troca de células entre eles (**Figura 22-54**).

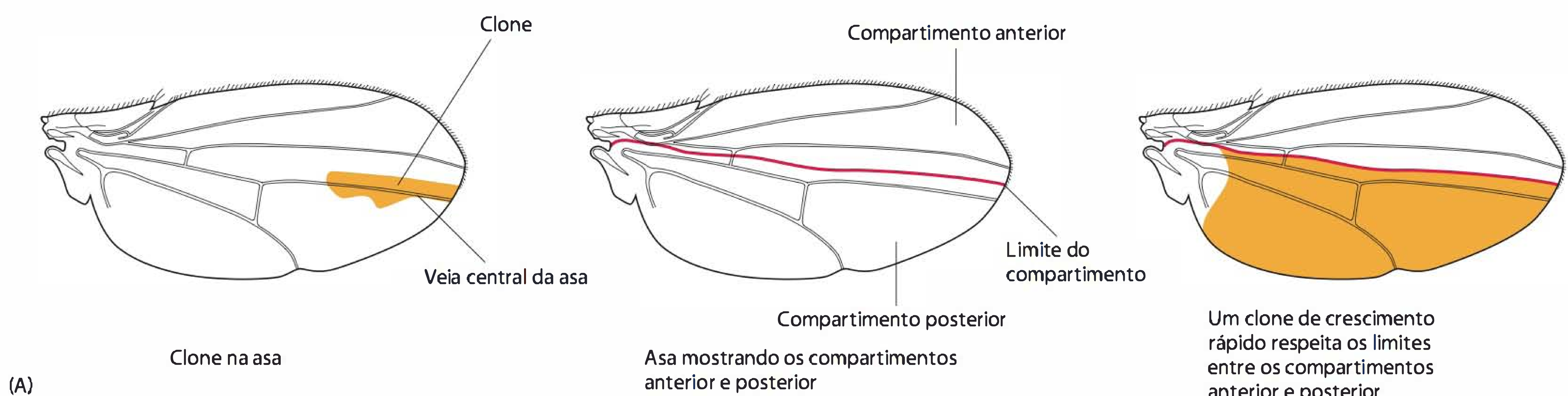




Figura 22-54 Compartimentos na asa do adulto. (A) As formas dos clones marcados na asa de *Drosophila* revelam a existência de limites entre os compartimentos. A borda de cada clone marcado é reta em suas porções limítrofes. Quando um clone marcado foi geneticamente alterado de modo que crescesse mais rapidamente do que o resto da asa, sendo portanto muito grande, ele respeita o limite entre os compartimentos da mesma maneira (desenho à direita). Note que o limite do compartimento não coincide com a veia central da asa. (B) O padrão de expressão do gene *Engrailed* na asa, revelado pela mesma técnica usada na mosca adulta mostrada na Figura 22-41. O limite do compartimento coincide com o limite da expressão do gene *Engrailed*. (A, segundo F. H. C. Crick e P. A. Lawrence, *Science* 189:340-347, 1975. Com permissão de AAAS; B, cortesia de Chihiro Hama e Tom Kornberg.)

Quatro vias de sinalização da mesma família combinam-se para formar o padrão dos discos da asa: Wingless, Hedgehog, Dpp e Notch

Ao longo dos limites dos compartimentos – o limite ântero-posterior definido por *Engrailed* e o limite dorso-ventral definido por *Apterous* – células em diferentes estados confrontam-se umas com as outras e interagem para criar bandas estreitas de células especializadas. Estas células limítrofes produzem novos sinais para organizar o subsequente crescimento e a formação de padrões mais detalhados do órgão acessório.

As células no compartimento posterior da asa expressam a proteína de sinalização Hedgehog, mas não respondem a ela. As células no compartimento anterior podem responder a Hedgehog. Uma vez que Hedgehog atua somente a uma curta distância, a via de recepção de sinais é ativada somente na estreita banda de células imediatamente anterior ao limite do compartimento, onde as células anteriores e posteriores estão justapostas. Estas células limítrofes respondem com a ativação da expressão de outra molécula sinalizadora, Dpp – a mesma proteína que encontramos previamente, na formação de padrões dorso-ventrais no embrião inicial (**Figura 22-55**). A Dpp atua no seu novo contexto em grande parte da mesma maneira que antes: ela difunde os seus efeitos para o exterior a partir das células limítrofes (por difusão, via citonemas, ou por meio de transferência célula-célula por exocitose e endoxitose), produzindo um gradiente de morfógenos para controlar o subsequente padrão detalhado de crescimento e de expressão gênica.

Ocorrem eventos análogos no limite do compartimento dorso-ventral (ver Figura 22-55). Aqui, na futura margem da asa, uma comunicação de curta distância mediada pela via de Notch cria uma banda de células limítrofes que produzem outro morfógeno, a proteína Wingless – o mesmo fator de sinalização, pertencendo à família Wnt, que atuou inicialmente na formação do padrão ântero-posterior de cada segmento embrionário. Os gradientes de Dpp e de Wingless, juntamente com os outros sinais e assimetrias de expressão gênica que discutimos, combinam-se para conduzir a expressão de outros genes em localizações precisamente definidas dentro de cada compartimento.

O tamanho de cada compartimento é regulado por interações entre as suas células

Um dos mais misteriosos e pouco conhecidos aspectos do desenvolvimento animal é o controle do seu crescimento: por que cada parte do corpo cresce em um tamanho precisamen-

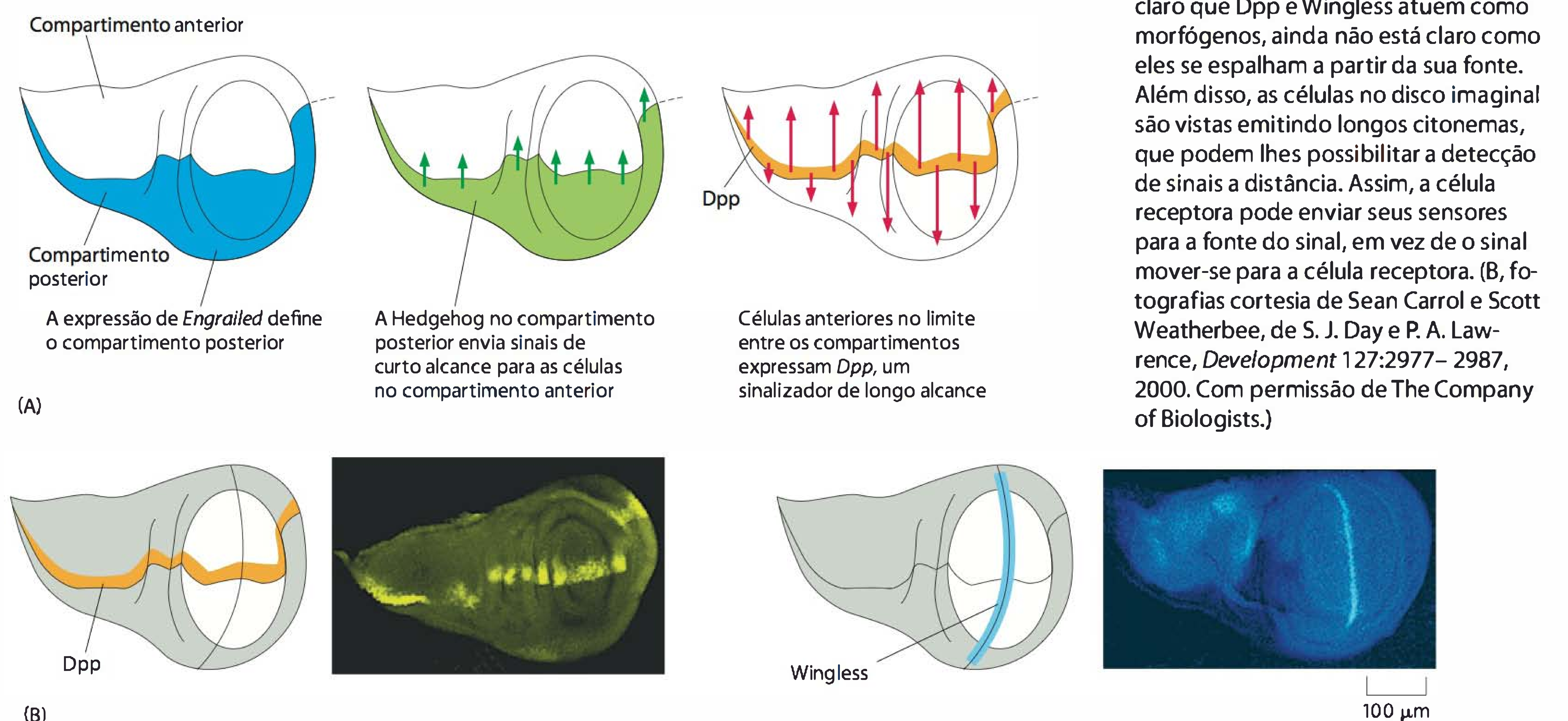


Figura 22-55 Sinais morfogenéticos criados nos limites dos compartimentos no disco imaginal da asa. (A) Criação da região de sinalização Dpp no limite do compartimento ântero-posterior por meio de uma interação mediada por Hedgehog entre as células anteriores e posteriores. De maneira análoga, uma interação mediada por Notch entre as células dorsais e ventrais cria uma região de sinalização Wingless (Wnt) ao longo do limite dorso-ventral. (B) Os padrões de expressão observados de Dpp e de Wingless. Embora pareça claro que Dpp e Wingless atuem como morfógenos, ainda não está claro como eles se espalham a partir da sua fonte. Além disso, as células no disco imaginal são vistas emitindo longos citonemas, que podem lhes possibilitar a detecção de sinais a distância. Assim, a célula receptora pode enviar seus sensores para a fonte do sinal, em vez de o sinal mover-se para a célula receptora. (B, fotografias cortesia de Sean Carrol e Scott Weatherbee, de S. J. Day e P. A. Lawrence, *Development* 127:2977– 2987, 2000. Com permissão de The Company of Biologists.)

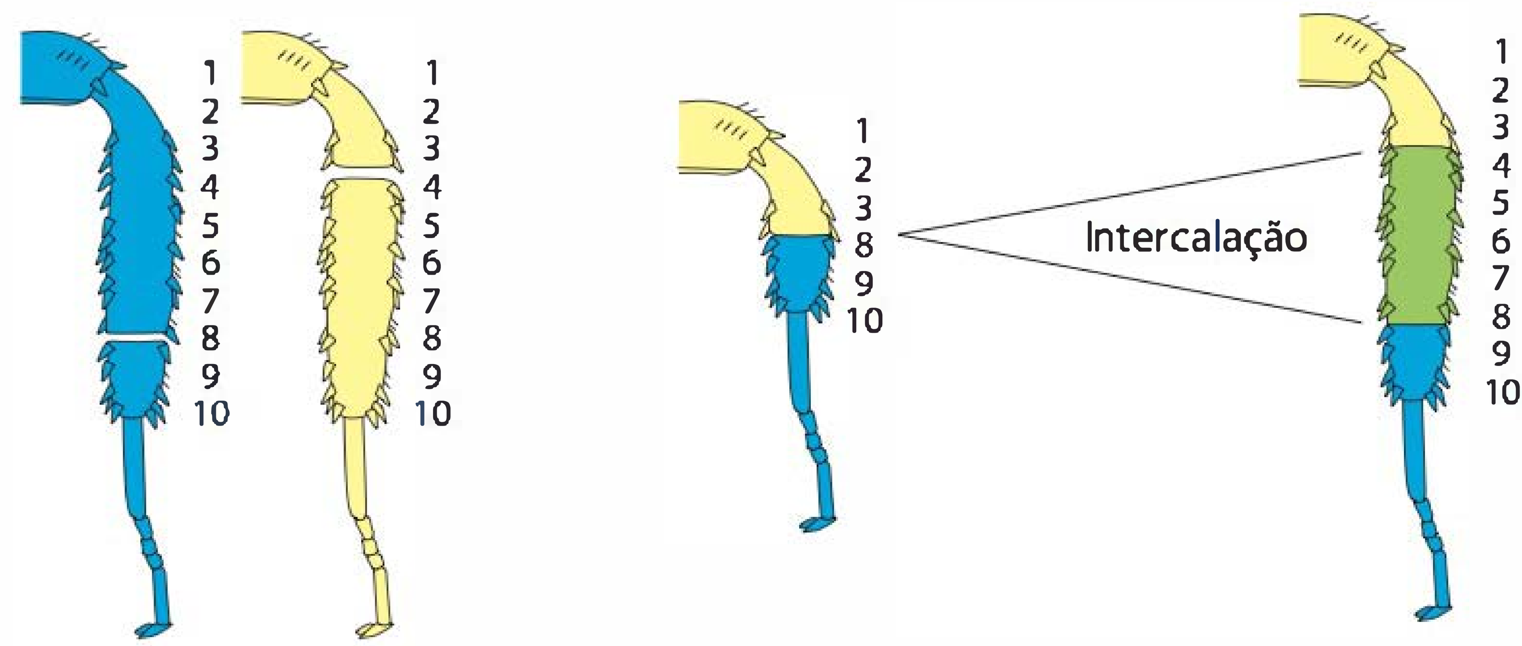


Figura 22-56 Regeneração intercalar. Quando porções não-correspondentes de uma pata em crescimento de barata são enxertadas juntas, um novo tecido (*verde*) é intercalado (por proliferação celular) para preencher a lacuna entre os padrões das estruturas da pata, restaurando o segmento da pata a seu tamanho e padrão normais.

te definido? Esse problema é exemplificado de maneira marcante pelos discos imaginais de *Drosophila*. Por recombinação somática induzida, pode-se, por exemplo, criar um pequeno conjunto clonal de células que proliferam mais rapidamente do que as demais células no órgão em desenvolvimento. O clone pode crescer e ocupar quase a totalidade do compartimento no qual ele está e, ainda assim, não ultrapassa o limite do compartimento. Espantosamente, o seu crescimento rápido não apresenta quase nenhum efeito no tamanho final do compartimento, em sua forma ou mesmo nos detalhes do seu padrão interno (ver Figura 22-54). De alguma maneira, as células dentro do compartimento interagem umas com as outras determinando quando o seu crescimento deve parar, e cada compartimento comporta-se como uma unidade reguladora neste aspecto.

Uma primeira questão é se o tamanho do compartimento é regulado de maneira a conter um número determinado de células. Mutações nos componentes da maquinaria de controle do ciclo celular podem ser usadas para acelerar ou retardar a taxa de divisão celular, sem alterar a taxa de crescimento celular ou tecidual. Isso resulta em números anormais de pequenas células, ou o contrário, mas o tamanho – ou seja, a área – do compartimento praticamente não é alterado. Assim, o mecanismo regulador parece depender de sinais que indicam a distância física entre uma parte do compartimento e a outra, e das respostas celulares que, de alguma forma, leem esses sinais de maneira a interromper o crescimento somente quando o espaçamento entre estas partes atingiu seu valor apropriado.

Este tipo de regulação do crescimento é demonstrado de forma notável na **regeneração intercalar** que ocorre quando partes separadas de um disco imaginal de *Drosophila* ou de uma pata em crescimento de barata são cirurgicamente enxertadas juntas. Após o enxerto, as células na vizinhança da junção proliferam e completam as partes do padrão que deveriam normalmente ficar entre elas, continuando o seu crescimento até que seja restaurado o espaçamento normal entre os pontos de referência (**Figura 22-56**). Os mecanismos que realizam isso permanecem um mistério, mas parece provável que sejam semelhantes aos mecanismos que regulam o crescimento durante o desenvolvimento normal.

Qual mecanismo garante que cada pequeno pedaço do padrão dentro de um compartimento cresça até o seu tamanho apropriado, apesar dos distúrbios locais na taxa de crescimento ou das condições iniciais? Os gradientes de morfógenos (de Dpp e Wingless, p. ex.) criam um padrão pela imposição de características diferentes nas células em diferentes posições. Seria possível que as células em cada região possam, de alguma maneira, perceber o quão próximo está o espaçamento do padrão – o quão acentuado é o gradiente de alterações nas características da célula – e continuem o seu crescimento até que o tecido esteja espalhado até seu grau correto?

Essa ideia foi testada com a criação de clones de células do disco imaginal da asa em que os componentes subsequentes da via de sinalização Dpp estão expressos de maneira alterada, de forma a induzir um nível de ativação maior ou menor que o observado nas células adjacentes. Do ponto de vista das células, as condições nos limites do clone mutante são equivalentes àquelas produzidas por um gradiente bastante acentuado de Dpp. O resultado é que as células nestas adjacências são estimuladas a se dividir em taxas aumentadas. Ao contrário, se o nível de sinalização de Dpp for tornado uniforme em uma região mediana do disco da asa em desenvolvimento, onde ele normalmente seria bastante acentuado, as divisões celulares são inibidas. Isso parece indicar que o gradiente do morfógeno realmente controla a taxa de proliferação. Contudo, se isso for verdadeiro, como as células percebem este gradiente?

A resposta não é conhecida, mas existem fortes evidências de que este mecanismo depende de sinais gerados nas junções célula-célula, onde células com diferentes graus de ativação da via do morfógeno fazem contato. Como discutido no Capítulo 19, mutações nos componentes juncionais, como as proteínas estruturais Discs-large (Dlg), ou no membro da

superfamília das caderinas, Fat, podem levar a falhas dramáticas no controle do crescimento, permitindo que o disco da asa cresça muito além do seu tamanho normal apropriado. No caso da proteína Fat, um conjunto de outras moléculas, incluindo proteínas-cinase chamadas de Hippo e Warts, foi identificado como componente da via de sinalização que liga Fat na membrana celular, até o controle da expressão gênica, no núcleo. Os produtos dos genes-alvo incluem a ciclina E, reguladora do ciclo celular, e um inibidor da apoptose, assim como o microRNA *Bantam*, que parece ser parte essencial do mecanismo de controle do crescimento. Apesar destes fatos animadores, os mecanismos que controlam o tamanho de um órgão ainda são um mistério. Se pudermos descobrir como eles funcionam em *Drosophila*, poderemos ter alguma ideia de como ocorre o controle do tamanho dos órgãos em vertebrados, em nossa perplexidade acerca desta questão fundamental é ainda mais profunda. Para outros aspectos do desenvolvimento de órgãos, como discutiremos agora, as moscas e os vertebrados são inesperadamente similares em nível molecular, sugerindo que os seus mecanismos de controle do crescimento também possam ser similares.

Os padrões dos membros dos vertebrados são formados por mecanismos similares

Os membros dos vertebrados parecem muito diferentes dos membros dos insetos. A asa do inseto, por exemplo, consiste principalmente em duas camadas de epitélio de um padrão elaborado, com pouco tecido entre elas. Em contraste, um membro de um vertebrado consiste em um sistema elaboradamente padronizado de músculos, ossos e tecidos conectivos dentro de uma cobertura de epiderme fina e estrutura de forma muito mais simples. Além disso, a evidência evolutiva sugere que o último ancestral comum entre os insetos e os vertebrados talvez não apresentasse pernas, nem braços, nem asas e nem nadadeiras, e que estes vários órgãos acessórios evoluíram independentemente no homem. E, ainda, quando examinamos os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento dos membros dos vertebrados, encontramos um número surpreendente de similaridades com os membros dos insetos. Já mencionamos algumas dessas semelhanças, mas existem muitas outras: quase todas as moléculas que mencionamos na asa da mosca têm contrapartes nos membros dos vertebrados, embora estes sejam expressos em diferentes relações espaciais.

Os paralelismos têm sido mais cuidadosamente estudados no embrião de galinha. Como vimos anteriormente, cada perna ou asa de uma galinha origina-se de um broto de membro em forma de língua, consistindo em uma massa de células de tecido conectivo embrionário, chamadas de células mesenquimais, encapsuladas em um envoltório de epitélio. Nessa estrutura, encontra-se a expressão de homólogos de quase todos os genes que mencionamos em nossa explicação sobre a formação dos padrões de asa da *Drosophila*, incluindo *Distal-less*, *Wingless*, *Notch*, *Engrailed*, *Dpp* e *Hedgehog*, desempenhando principalmente funções que parecem mais ou menos com as suas funções no disco imaginal da asa da *Drosophila* (**Figura 22-57**).

Os genes *Hox*, igualmente, fazem um aparecimento nos membros de insetos e de vertebrados. No órgão acessório dos insetos, os compartimentos anterior e posterior são distinguidos pela expressão de diferentes genes do complexo Hox – um resultado do padrão de

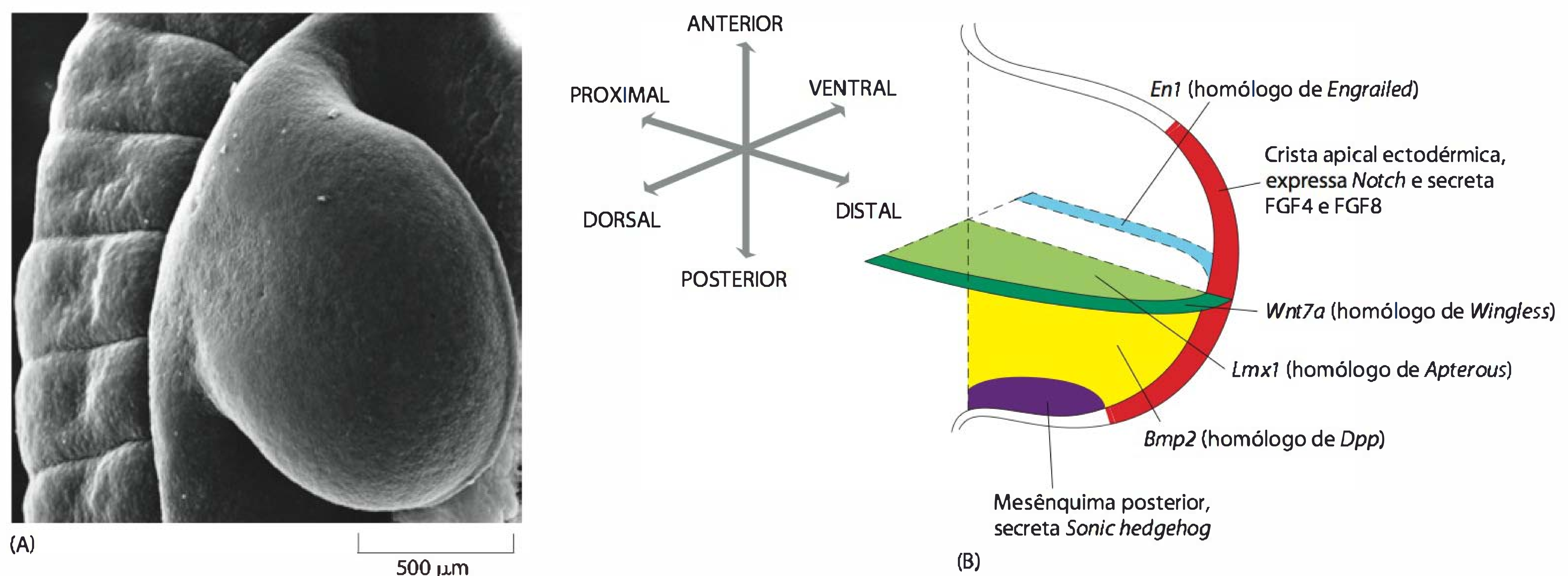


Figura 22-57 Moléculas que controlam a formação de padrões em um broto de membro de um vertebrado. (A) Um broto de asa de um embrião de galinha após quatro dias de incubação. A micrografia eletrônica de varredura mostra uma visão dorsal, com somitos (os segmentos do tronco do embrião) visíveis à esquerda. Na margem distal do broto do membro, uma crista engrossada pode ser vista – a crista apical ectodérmica. (B) Padrões de expressão de proteínas-chave de sinalização e fatores de regulação gênica no broto de membro de galinha. Os padrões estão representados esquematicamente em dois planos imaginários de secção do broto do membro, um (horizontal) para mostrar o sistema dorso-ventral e o outro (vertical) para mostrar os sistemas ântero-posterior e próximo-distal. *Sonic hedgehog*, *Bmp2* e *Lmx1* são expressos no núcleo mesodérmico do broto do membro; as outras moléculas no diagrama são expressas na sua cobertura epitelial. Quase todas as moléculas mostradas possuem homólogos que estão envolvidos na formação dos padrões do disco da asa de *Drosophila*. (A, cortesia de Paul Martin.)

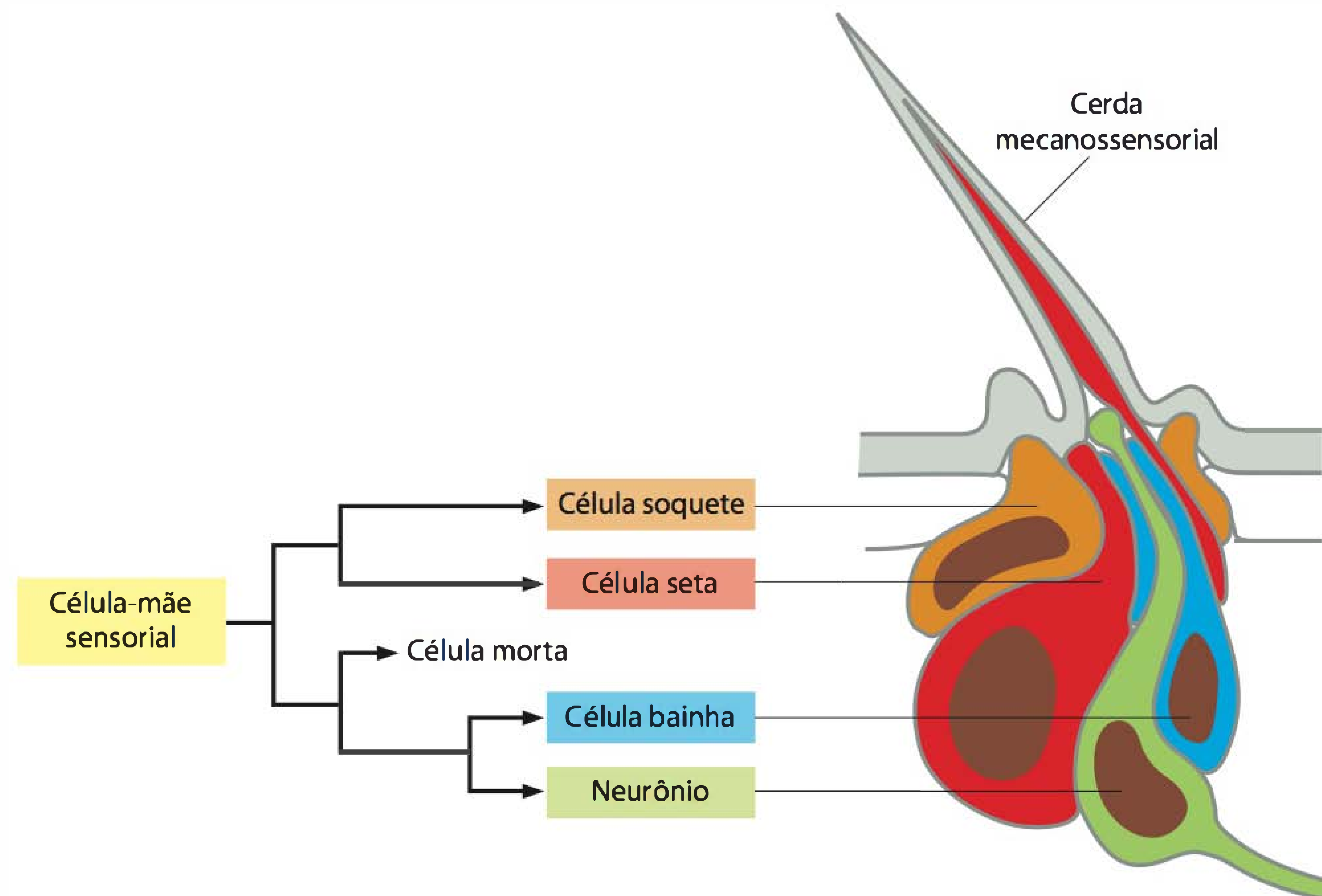


Figura 22-58 A estrutura básica da cerda mecanossensorial. A linhagem das quatro células da cerda – todas descendentes de uma única célula-mãe sensorial – é mostrada à esquerda.

expressão serial desses genes ao longo do eixo ântero-posterior do corpo como um todo. No membro do vertebrado, genes de dois dos complexos Hox de vertebrados (*HoxA* e *HoxD*) são expressos em um padrão regular, segundo as regras comuns de expressão serial dos genes nesses complexos. Eles auxiliam, em conjunto com outros fatores, tais como as proteínas Tbx mencionadas anteriormente (ver Figura 22-9), na regulação das diferenças de comportamento celular ao longo do eixo próximo-distal do membro.

De acordo com uma hipótese, essas semelhanças moleculares entre os membros em desenvolvimento em diferentes filos refletem a descendência de um ancestral comum que, apesar de não ser dotado de membros, possuía órgãos acessórios de algum tipo, produzidos a partir de princípios semelhantes – antenas, talvez, ou partes protuberantes da boca para apanhar a comida. Os órgãos acessórios semelhantes a membros modernos, das asas e das patas de uma mosca, até os braços e as pernas de um humano, teriam evoluído pela ativação de genes para a formação de órgãos acessórios em novos locais do corpo, como um resultado de mudanças na regulação gênica.



Figura 22-59 Células-mãe sensoriais no disco imaginai da asa. As células--mãe sensoriais (aqui em *azul*) são facilmente reveladas nesta linhagem especial de *Drosophila*, a qual contém um gene repórter *LacZ* artificial que, por acaso, foi inserido no genoma próximo a uma região controladora que o induz a ser expresso seletivamente nas células-mãe sensoriais. A coloração *púrpura* mostra o padrão de expressão do gene *Scute*; isto prenuncia a produção das células-mãe sensoriais e é enfraquecido ao longo do desenvolvimento sucessivo dessas células. (De P. Cubas et al., *Genes Dev*. 5:996-1008, 1991. Com permissão de Cold Spring Harbor laboratory Press.)

A expressão localizada de classes específicas de proteínas de regulação gênica prenuncia a diferenciação celular

Voltamos agora à linha do desenvolvimento do disco imaginal da *Drosophila*, e a seguiremos até a sua etapa final, na qual as células se tornam definitivamente diferenciadas. Estreitando o foco ainda mais, tomamos como exemplo a diferenciação de somente um tipo de estrutura pequena que surge no disco imaginal do epitélio: a **cerda sensorial**.

As cerdas que cobrem a superfície do corpo de um inseto são órgãos sensoriais em miniaturas. Algumas respondem a estímulos químicos, outras a estímulos mecânicos, mas todas são construídas de maneira similar. A estrutura é vista em sua maior simplicidade nas cerdas mecanossensoriais. Cada uma dessas cerdas consiste em quatro células: uma célula seta, uma célula soquete, uma célula bainha neuronal e um neurônio (**Figura 22-58**). O movimento da seta da cerda excita o neurônio, o qual envia um sinal para o sistema nervoso central.

As células da cerda da mosca adulta derivam do disco imaginal do epitélio, e todas as quatro células são netas ou bisnetas (ver Figura 22-58) de uma única *célula-mãe sensorial* que se torna distinta das células epidérmicas prospectivas vizinhas durante o último instar larval (**Figura 22-59**). (Um quinto descendente morre ou, em alguns tecidos, torna-se uma célula da glia.) Para explicarmos o padrão de diferenciação da cerda, devemos explicar primeiro como a gênese das células-mãe sensoriais é controlada e como os cinco descendentes de cada uma dessas células tornam-se diferentes uns dos outros.

Dois genes, chamados de *Achaete* e *Scute*, são cruciais na iniciação da formação das cerdas no disco imaginal do epitélio. Esses genes desempenham funções similares e complementares e codificam para proteínas de regulação gênica intimamente relacionadas da classe básica hélice-alça-hélice (discutido no Capítulo 7). Como resultado dos mecanismos

de formação dos padrões do disco dos tipos que já discutimos, o *Achaete* e o *Scute* são expressos no disco imaginal dentro das regiões em que as cerdas vão se formar. As mutações que eliminam a expressão desses genes em alguns dos locais comuns bloqueiam o desenvolvimento das cerdas somente naqueles locais, e as mutações que causam a expressão em locais adicionais anormais induzem as cerdas a desenvolverem-se lá. Contudo, a expressão de *Achaete* e de *Scute* é transitória, e somente algumas das células que inicialmente expressam os genes chegam a se tornar células-mãe sensoriais; as outras se tornam epiderme comum. O estado que é especificado pela expressão de *Achaete* e de *Scute* é chamado de *pró-neural*, e *Achaete* e *Scute* são chamados de **genes pró-neurais**. As células pró-neurais são induzidas a seguir a via neurossensorial da diferenciação, mas, como veremos, quais delas irão realmente fazê-lo depende de interações competitivas entre elas.

A inibição lateral produz a distinção das células-mãe sensoriais nos agrupamentos pró-neurais

As células que expressam genes pró-neurais ocorrem em grupos no disco imaginal epitelial – um pequeno e isolado agrupamento de menos de 30 células para uma grande cerda isolada, e um amplo e contínuo conjunto de centenas ou de milhares de células para um campo de pequenas cerdas. No primeiro caso, somente um membro do agrupamento torna-se uma célula-mãe sensorial; no segundo caso, muitas células distribuídas por toda a região pró-neural o fazem. Em ambos os casos, cada célula-mãe sensorial é circundada por células que inativam a expressão dos genes pró-neurais e são condenadas a diferenciarem-se como epiderme. Os experimentos com mosaicos genéticos mostram que isso se deve ao fato de que uma célula que se torna comprometida com a via de diferenciação da célula-mãe sensorial envia um sinal para as suas vizinhas não fazerem a mesma coisa: ela exerce uma *inibição lateral*. Se uma célula que normalmente se tornaria uma célula-mãe sensorial for geneticamente incapacitada de fazê-lo, uma célula pró-neural adjacente, libertada da inibição lateral, irá se tornar uma célula-mãe sensorial em seu lugar.

A inibição lateral é mediada pela via de sinalização de Notch. Todas as células no agrupamento inicialmente expressam o receptor transmembrana Notch e o seu ligante transmembrana Delta. Em qualquer lugar que Delta ativar Notch, um sinal inibidor é enviado para a célula que expressa Notch; consequentemente, todas as células no agrupamento inicialmente inibem umas às outras. Entretanto, acredita-se que o recebimento do sinal em uma dada célula diminua não somente a tendência daquela célula de se especializar como uma célula-mãe sensorial, mas também a sua habilidade de resposta por meio da liberação do sinal Delta. Isso cria uma situação competitiva, da qual uma única célula em cada pequena região – a futura célula-mãe sensorial – emerge como vencedora, remetendo um forte sinal inibidor para os seus vizinhos imediatos, mas não recebendo nenhum sinal deste tipo em troca (**Figura 22-60**). As consequências de uma falha desse mecanismo regulador estão mostradas na **Figura 22-61**.

A inibição lateral direciona a progênie da célula-mãe sensorial a diferentes destinações finais

O mesmo mecanismo de inibição lateral dependente de Notch opera repetidamente na formação das cerdas – não somente para forçar as vizinhas das células-mãe sensoriais a seguirem uma via diferente e se tornarem epidérmicas, mas também, mais tardiamente, para produzir filhas, netas e finalmente bisnetas da célula-mãe sensorial que expressem diferentes genes, de maneira a formar os distintos componentes da cerda. Em cada estágio, a inibição lateral medeia uma interação competitiva que força células adjacentes a se comportarem de maneiras contrastantes. Usando uma mutação Notch sensível à temperatura, é possível desativar a sinalização Notch após a célula-mãe sensorial ter se diferenciado, mas antes de ela ter se dividido. A progênie então se distingue de maneira similar, originando um agrupamento de neurônios no lugar dos quatro tipos distintos de células de uma cerda.

Como muitas outras competições, aquelas mediadas pela inibição lateral frequentemente são fraudulentas: uma célula já inicia com uma vantagem que garante que ela será a vencedora. No desenvolvimento dos diferentes tipos celulares das cerdas sensoriais, uma tendência forte inicial é fornecida por uma assimetria em cada uma das divisões celulares da célula-mãe sensorial e de sua progênie. Uma proteína chamada de Numb (juntamente com

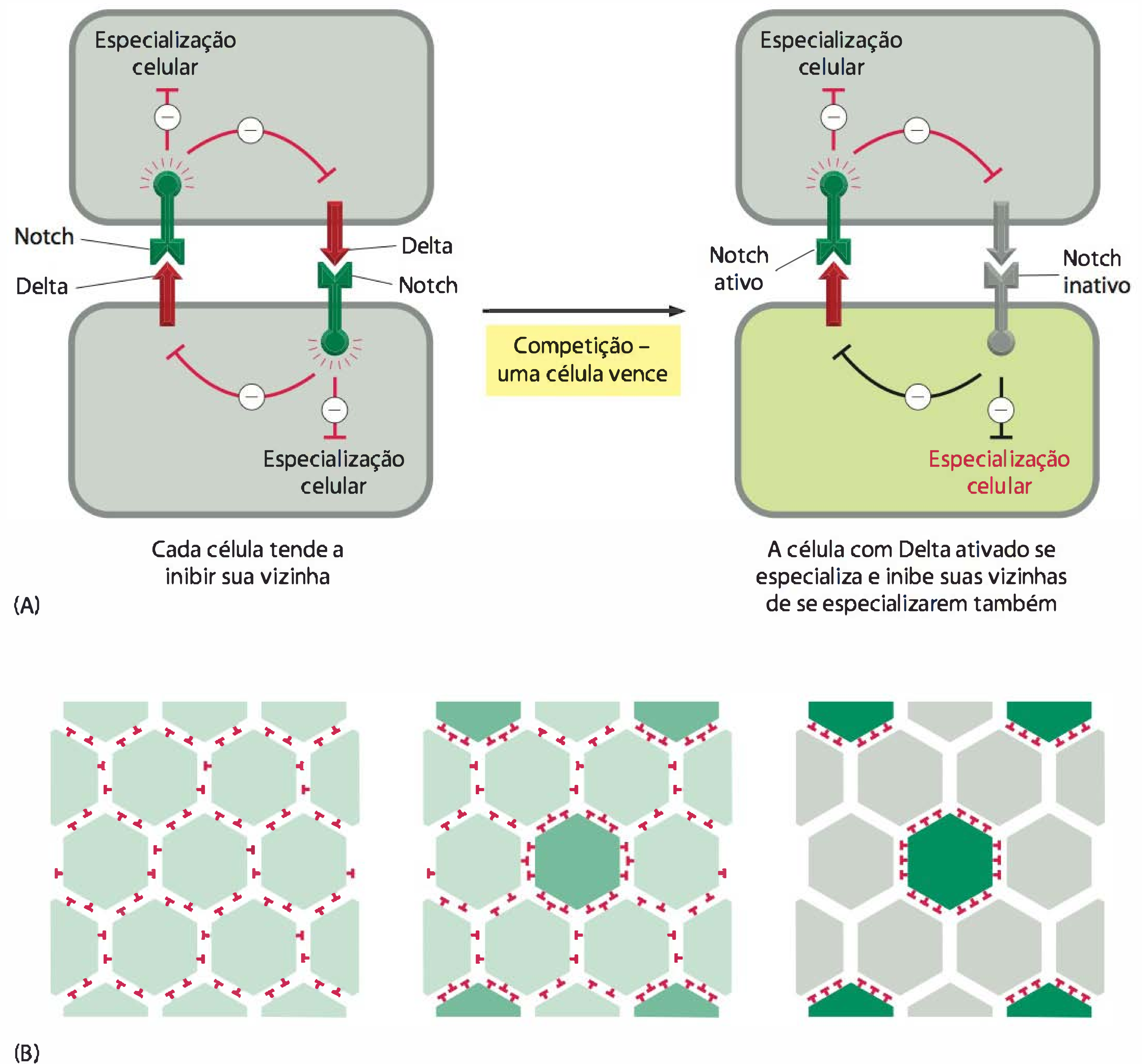


Figura 22-60 Inibição lateral. (A) O mecanismo básico da inibição lateral competitiva mediada por Notch, ilustrada com somente duas células interagindo. Neste diagrama, a ausência de cor nas proteínas ou nas linhas efetoras indica inatividade. (B) O resultado do mesmo processo operando em um conjunto maior de células. Inicialmente, todas as células no conjunto são equivalentes, expressando tanto o receptor transmembrana Notch como o seu ligante transmembrana Delta. Cada célula tem a tendência a se especializar (como uma célula-mãe sensorial), e cada uma emite um sinal inibidor para os seus vizinhos para desencorajá-los a também se especializarem nessa via. Isso cria uma situação competitiva. Assim que uma célula individual ganha alguma vantagem na competição, esta vantagem se torna aumentada. A célula vencedora, conforme se torna mais comprometida a se diferenciar como uma célula-mãe sensorial, também inibe as suas vizinhas de maneira mais forte. Por outro lado, uma vez que essas vizinhas perdem a sua capacidade de se diferenciarem como células-mãe sensoriais, elas também perdem a capacidade de inibir outras células de fazer o mesmo. A inibição lateral, assim, induz as células adjacentes a seguirem destinos diferentes. Embora se acredite que a interação normalmente seja dependente de contatos célula-célula, a futura célula-mãe sensorial pode ser capaz de emitir um sinal inibidor para as células que estão a uma distância maior que o diâmetro de uma célula – por exemplo, por meio da emissão de longas protrusões para alcançá-las.

outras proteínas) torna-se localizada em uma extremidade da célula em divisão, de maneira que uma filha herda a proteína Numb e a outra não (**Figura 22-62**). Numb bloqueia a atividade de Notch. Assim, a célula contendo Numb é imune aos sinais inibidores das suas vizinhas, enquanto a sua irmã permanece sensível. Uma vez que ambas as células inicialmente expressam Delta, o ligante de Notch, a célula que herdou Numb progride para tornar-se neural e direciona a sua irmã a um destino não-neural.

A polaridade planar das divisões assimétricas é controlada pela sinalização via receptor Frizzled

Para o mecanismo de Numb operar, deve haver uma maquinaria na célula em divisão para segregar o determinante para um lado da célula antes da divisão. Além disso, assim que a célula entra em mitose, o fuso mitótico deve estar alinhado com essa assimetria de modo que o determinante seja alocado para somente uma célula-filha, e não compartilhado com ambas as filhas no momento da divisão celular. No caso anterior, a célula-mãe sensorial, na sua primeira divisão, divide-se regularmente para originar uma célula anterior que herda Numb e uma célula posterior que não herda. Conforme discutido no Capítulo 19, este tipo



Figura 22-61 O resultado da inativação da inibição lateral durante a diferenciação das células-mãe sensoriais. A fotografia mostra uma parte do tórax de uma mosca contendo uma região mutante na qual o gene neurogênico Delta foi parcialmente inativado. A redução da inibição lateral induziu quase a totalidade das células na porção mutante (no centro da figura) a se desenvolverem como células-mãe sensoriais, produzindo um grande excesso de cerdas sensoriais nesta região. As regiões de células mutantes portando mutações mais extremas na via Notch, causando perda total da inibição lateral, não formam cerdas visíveis, pois toda a progênie das células-mãe sensoriais se desenvolvem como neurônios ou células da glia, em vez de se diversificarem para formar tanto neurônios como as partes externas da estrutura da cerda. (Cortesia de P. Heitzler e P. Simpson, *Cell* 64:1083-1093, 1991. Com permissão de Elsevier.)

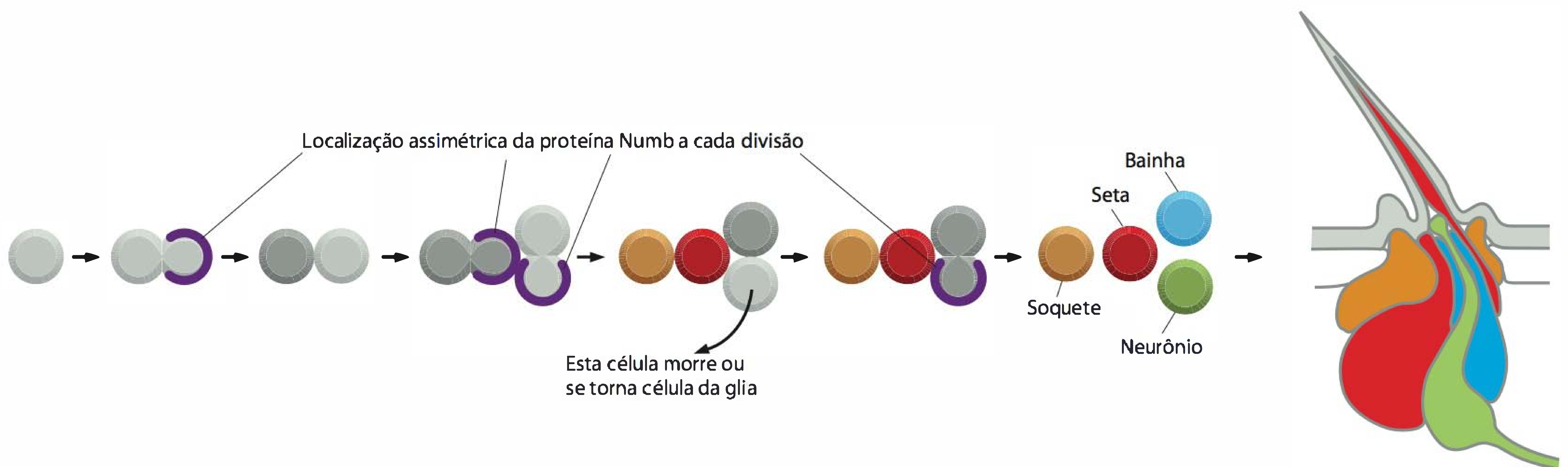


Figura 22-62 Numb afeta a inibição lateral durante o desenvolvimento da cerda. Em cada divisão da progênie da célula-mãe sensorial, a proteína Numb é distribuída assimetricamente, originando células-filhas distintas. Note que algumas divisões celulares são orientadas de acordo com o fuso mitótico, no plano do epitélio, e outras são perpendiculares a ele; a localização de Numb é controlada por diferentes maneiras nestes tipos distintos de divisão, mas desempenha um papel crítico em cada um deles, decidindo o destino celular. (Com base em dados de M. Gho, Y. Bellaiche e F. Schweisguth, *Development* 126:3573-3584, 1999. Com permissão de The Company of Biologists.)

de polaridade no plano do epitélio é chamado de *polaridade planar* (distinta, em contraste, da polaridade ápico-basal, em que a assimetria celular é perpendicular ao plano do epitélio). Esta polaridade se manifesta na orientação das cerdas que uniformemente apontam para trás, dando à mosca a aparência de quem está sempre contra o vento (**Figura 22-63**).

A polaridade planar na divisão inicial da célula-mãe sensorial é controlada por uma via de sinalização similar àquela que controla as divisões assimétricas no nematoide (ver Figura 22-21), dependente do receptor Frizzled. As proteínas Frizzled foram discutidas no Capítulo 15 como receptores para as proteínas Wnt, mas no controle da polaridade planar – nas moscas e provavelmente nos vertebrados também – esta via funciona de uma maneira especial: o mecanismo intracelular de substituição exerce seus efeitos principais no citoesqueleto de actina, e não na expressão gênica. A proteína intracelular Dishevelled, abaixo de Frizzled, é comum nos ramos de regulação gênica e na regulação da actina nas vias de sinalização. Os domínios separados da molécula Dishevelled são responsáveis pelas duas funções (**Figura 22-64**). Ambas, Frizzled e Dishevelled, obtiveram seus nomes da aparência "despenteada" das moscas em que a polaridade das cerdas é desorganizada (ver Figura 19-32).

As divisões assimétricas de células-tronco geram neurônios adicionais no sistema nervoso central

Os mecanismos que descrevemos para o controle da gênese dos neurônios das cerdas sensoriais operam também, com variações, na gênese de praticamente todos os outros neurônios – não somente em insetos, mas também em outros filos. Assim, no sistema nervoso embrionário, tanto nas moscas como nos vertebrados, os neurônios são gerados em regiões de expressão de genes pró-neurais semelhantes a *Achaete* e a *Scute*. Os neurônios nascentes expressam Delta e inibem seus vizinhos imediatos, os quais expressam Notch, de se tornarem comprometidos com a diferenciação neuronal, ao mesmo tempo. Quando a sinalização por Notch é bloqueada, a inibição falha, e nas regiões pró-neurais os neurônios são gerados em grande excesso, ao custo das células não-neuronais (**Figura 22-65**).

No sistema nervoso central, no entanto, um mecanismo adicional auxilia na geração do grande número de neurônios e células da glia necessário: uma classe especial de células se torna comprometida como precursores neurais, mas ao invés de se diferenciarem diretamente como neurônios ou células da glia, estas células sofrem uma longa série de divisões assimétricas pela qual uma sucessão de neurônios e células da glia é adicionada à população. Este mecanismo é melhor compreendido em *Drosophila*, apesar de haver diversos indicativos de que algo similar ocorra na neurogênese dos vertebrados.

No sistema nervoso central embrionário de *Drosophila*, os precursores de células nervosas, ou **neuroblastos**, diferenciam-se inicialmente a partir da ectoderme neurogênica por um mecanismo típico de inibição lateral que depende de Notch. Cada neuroblasto então se divide repetidamente de maneira assimétrica (**Figura 22-66**A). Em cada divisão, uma célula-

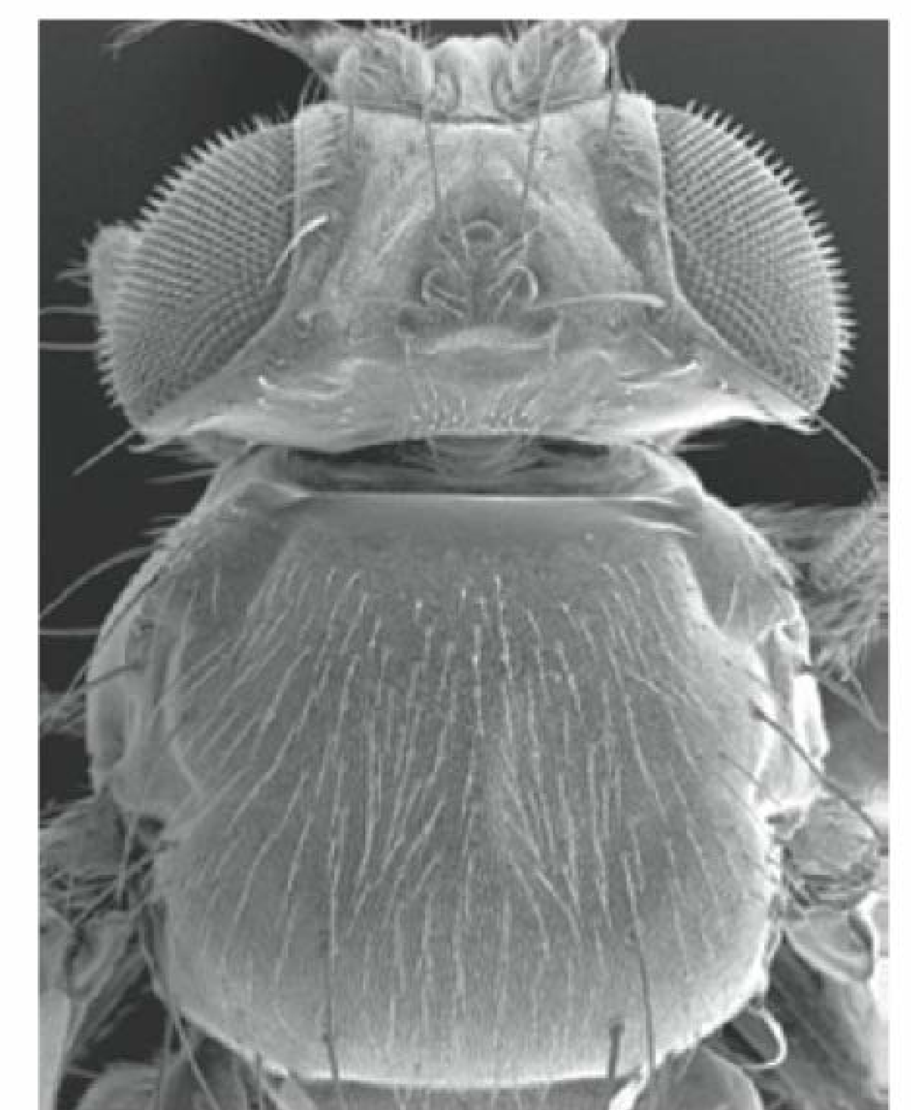
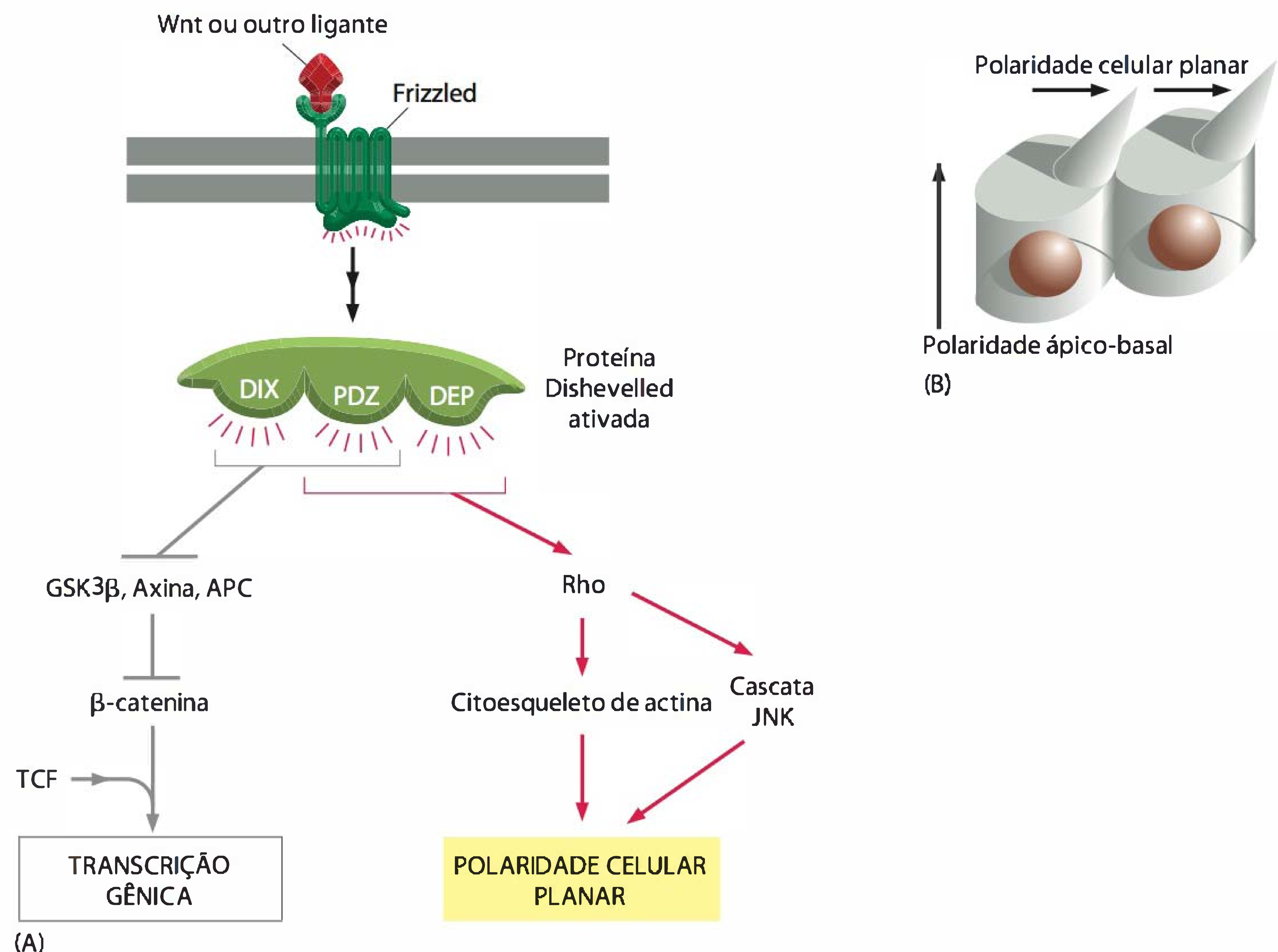


Figura 22-63 A polaridade celular planar manifestada na polaridade das cerdas nas costas de uma mosca: todas as cerdas apontam para trás. (Micrografia eletrônica de varredura cortesia de S. Oldham e E. Hafen, de E. Spana e N. Perrimon, *Trends Genet.* 15:301-302, 1999. Com permissão de Elsevier.)

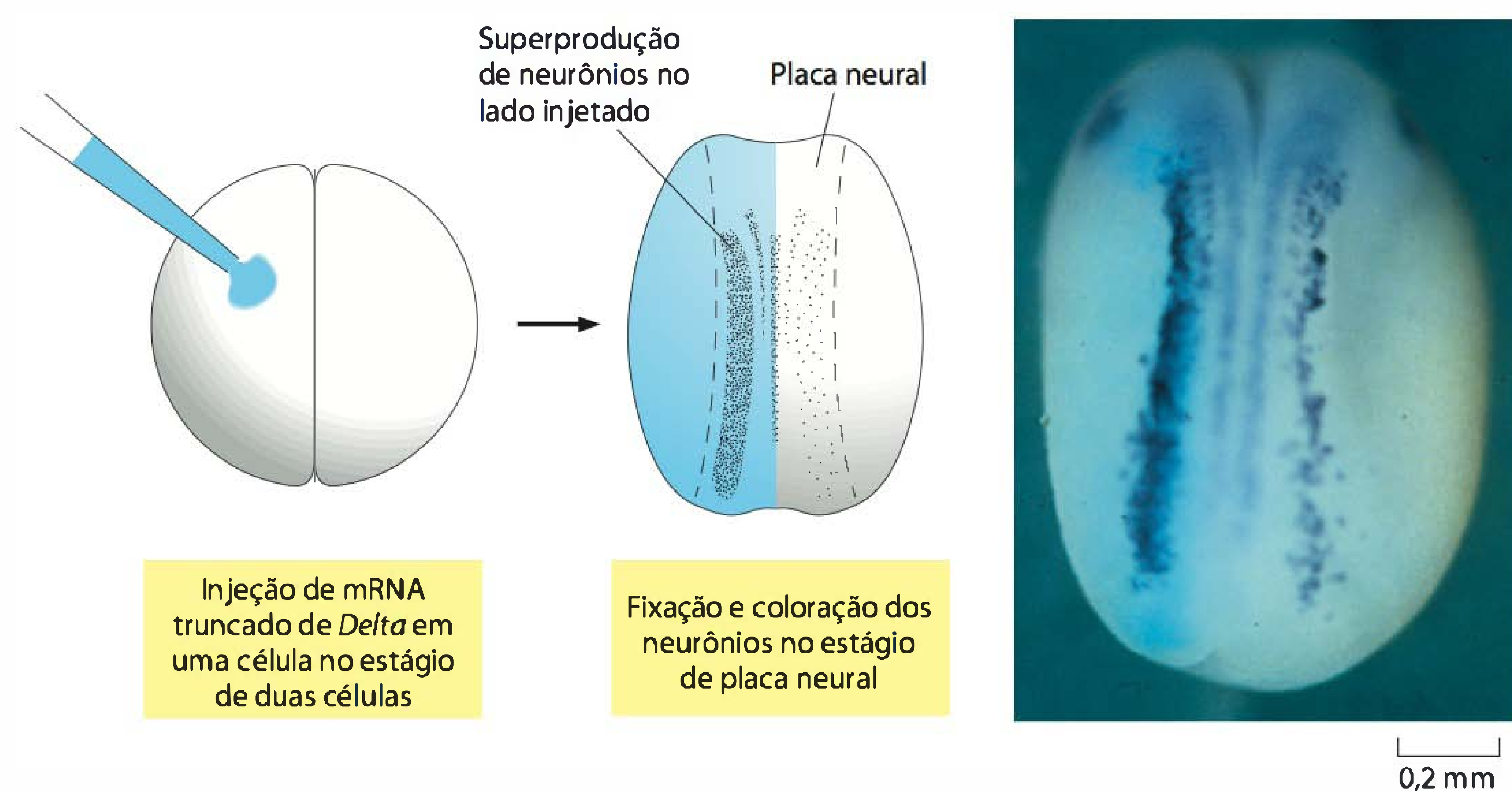
Figura 22-64 O controle da polaridade celular planar. (A) Os dois ramos da via de sinalização Wnt/Frizzled. O ramo principal, discutido no Capítulo 15, controla a expressão gênica através de β-catenina; o ramo de polaridade planar controla o citoesqueleto de actina através de GTPases Rho. Diferentes domínios da proteína Dishevelled são responsáveis pelos dois efeitos. Ainda não está claro qual membro da família da proteína sinalizadora Wnt é responsável pela ativação da função de polaridade planar de Frizzled na *Drosophila*. (B) Desenho das células mostrando a polaridade planar. Em pelo menos alguns sistemas, a polaridade celular planar está associada à localização assimétrica do próprio receptor Frizzled em um lado de cada célula. (Ver também Capítulo 19, Figura 19-32.)



filha se mantém como um neuroblasto, enquanto a outra, que é muito menor, torna-se especializada em uma *célula-mãe de gânglio* (*GMC, ganglion mother cell*). A célula-mãe de gânglio irá se dividir apenas uma vez, originando um par de neurônios, ou um neurônio e uma célula da glia, ou um par de células da glia. O neuroblasto se torna menor a cada divisão, conforme ele divide seu conteúdo entre as células-mãe de gânglio sucessivamente. Eventualmente, em geral após 12 ciclos celulares, o processo para, talvez porque o neuroblasto se torne muito pequeno para passar pelo ponto de controle do tamanho celular no ciclo de divisão celular. Mais tarde, na larva, as divisões dos neuroblastos recomeçam, e agora são acompanhadas pelo crescimento celular, permitindo que o processo se mantenha indefinidamente, gerando um número muito maior de neurônios e células da glia que o necessário em uma mosca adulta.

Os neuroblastos da larva são, portanto, **células-tronco**: enquanto eles mesmos não estão terminalmente diferenciados, comportam-se como uma fonte autorrenovável e potencialmente inesgotável de células terminalmente diferenciadas. No Capítulo 23, onde discutimos as células-tronco em detalhes, veremos que as células-tronco não necessariamente precisam se dividir assimetricamente, mas que a divisão assimétrica é uma estratégia possível, e que os neuroblastos das moscas proveem um bonito exemplo.

Figura 22-65 Efeitos do bloqueio da sinalização de Notch em um embrião de *Xenopus*. No experimento mostrado, um mRNA codificando para uma forma truncada de Delta, o ligante de Notch, é injetado juntamente com o mRNA de *LacZ*, utilizado como marcador, em uma célula de um embrião no estágio de duas células. A proteína truncada Delta produzida a partir do mRNA bloqueia a sinalização por Notch nas células que descendem da célula que recebeu a injeção. Estas células situam-se no lado esquerdo do embrião e são identificáveis porque contêm a proteína LacZ (coloração *azul*) e a proteína truncada Delta. O lado direito do embrião não é afetado e serve como controle. O embrião é fixado e corado em um estágio em que o sistema nervoso ainda não tenha se enrolado para formar o tubo neuronal, mas ainda é mais ou menos como uma lâmina achatada de células – a placa neural – exposta na superfície do embrião. Os primeiros neurônios (corados em *roxo* na fotografia) já iniciaram a diferenciação em bandas alongadas (regiões pró-neurais) em cada lado da linha média. No lado controle (direito), elas são um subconjunto espalhado de população celular pró-neural. No lado com Notch bloqueado (esquerdo), praticamente todas as células nas regiões pró-neurais se diferenciaram em neurônios, criando uma banda densamente corada de neurônios sem células intermediárias. As injeções de mRNA codificando para Delta normal e funcional provocam um efeito oposto, reduzindo o número de células que se diferenciam como neurônios. (Fotografia de A. Chitnis et al., *Nature* 375:761-766, 1995. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



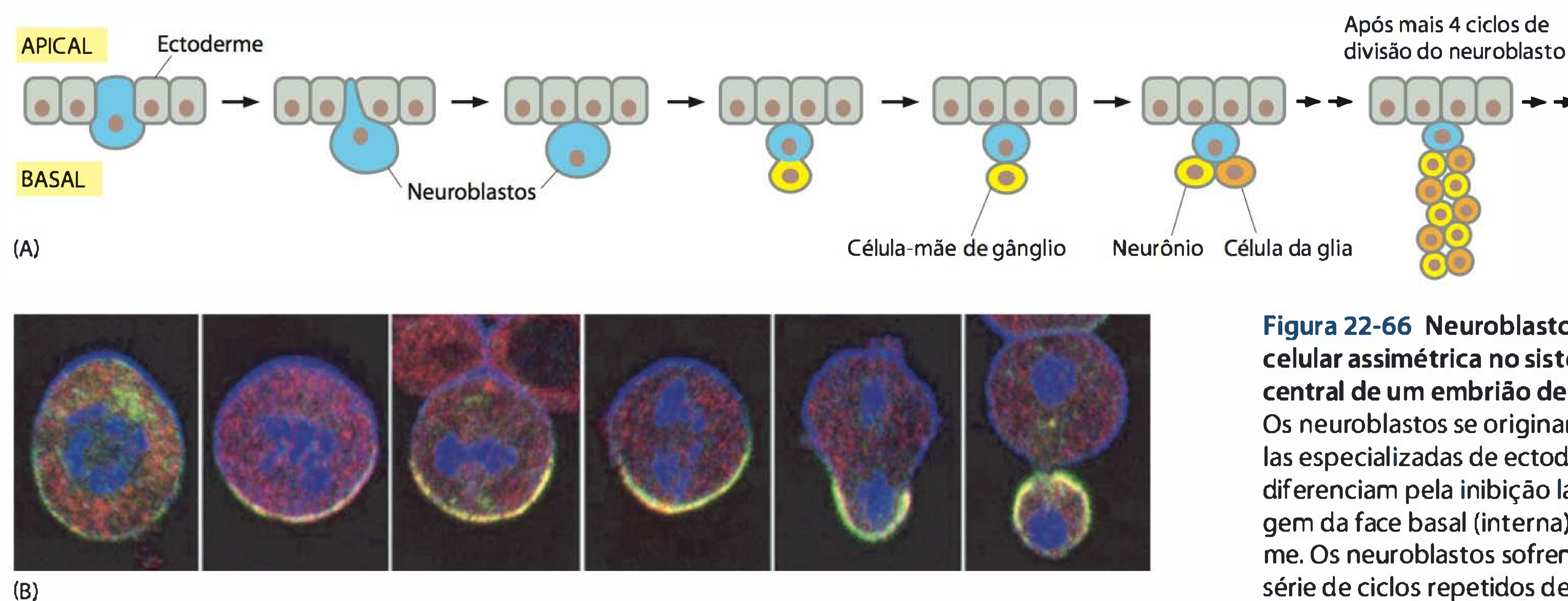


Figura 22-66 Neuroblastos e a divisão celular assimétrica no sistema nervoso central de um embrião de mosca. (A) Os neuroblastos se originam como células especializadas de ectoderme. Eles se diferenciam pela inibição lateral e emergem da face basal (interna) da ectoderme. Os neuroblastos sofrem então uma série de ciclos repetidos de divisões celulares, dividindo-se assimetricamente, originando séries de células-mãe de gânglios. Cada célula-mãe de gânglio se divide apenas uma vez para dar origem a um par de células-filhas diferenciadas (tipicamente um neurônio e uma célula da glia). (B) A distribuição assimétrica dos determinantes do destino celular em um neuroblasto isolado, conforme ele sofre mitose. Os cromossomos mitóticos estão corados em *azul*. O complexo Par3/Par6/aPKC, mostrado em *azul* pela marcação com anticorpos para aPKC, concentra-se no córtex apical, fazendo com que Miranda (*verde*), Brat (*vermelho*, sendo *amarelo* onde Miranda e Brat se sobrepõem) e Prospero (não-marcado) se localizam no córtex basal. Conforme as células se dividem, estas três últimas moléculas se tornam segregadas na célula-mãe de gânglio, forçando-a a se diferenciar e deixando o neuroblasto livre para regenerar sua assimetria e se dividir novamente da mesma maneira. (B, de C.Y. Lee et al. *Dev. Cell* 10:441-449, 2006. Com permissão de Elsevier.)

As divisões assimétricas do neuroblasto segregam um inibidor da divisão celular em apenas uma das células-filhas

As divisões dos neuroblastos são assimétricas em três aspectos: (1) fisicamente, onde uma célula-filha é menor do que a outra; (2) bioquimicamente, em fatores que controlam a diferenciação; e (3) bioquimicamente, em fatores que controlam a proliferação. Todas estas assimetrias devem ser coordenadas umas com as outras e com a orientação do fuso mitótico, para que o plano de clivagem divida a célula em partes corretas. Como isto é realizado?

O neuroblasto tem uma assimetria ápico-basal que reflete a sua origem a partir da ectoderme, que, como outros epitélios, tem polaridade ápico-basal bem-definida. Conforme vimos no Capítulo 19, a polaridade ápico-basal é controlada por um complexo de três proteínas – Par3 (também chamada de Bazooca em *Drosophila*), Par6 e aPKC (proteína-cinase C atípica, de *atypical protein kinase C*) – que se tornam localizadas no córtex na região apical da célula. Acredita-se que a localização do complexo Par3/Par6/aPKC seja a primeira fonte de assimetria no neuroblasto. Pelo recrutamento de outros componentes, alguns dos quais exercem o mecanismo de retroalimentação para manter a localização do complexo, o complexo coordena todo o processo de divisão desigual.

O complexo Par3/Par6/aPKC define a orientação do fuso mitótico e a partição desigual da célula na citocinese por interações com proteínas adaptadoras denominadas Inscuteable e Partner of Inscuteable (Pins). Estas proteínas, por sua vez, recrutam a subunidade α de uma proteína G trimérica (discutido no Capítulo 15), que atua neste contexto como um mensageiro intracelular que guia a organização do citoesqueleto.

Ao mesmo tempo, o complexo Par3/Par6/aPKC fosforila localmente um regulador da arquitetura intracelular, chamado de Lgl (de *Lethal giant larvae*), e dessa forma, faz com que outra proteína adaptadora, chamada de Miranda, torne-se mais concentrada no córtex no polo oposto da célula (basal) (Figura 22-66B). Miranda se liga a proteínas que controlam a diferenciação e a proliferação celular, localizando-as no mesmo polo. Quando o neuroblasto se divide, Miranda e seus ligantes são segregados na célula-mãe de gânglio. Uma das moléculas direcionadas para a célula-mãe de gânglio é a proteína de regulação gênica chamada de Prospero, que direciona a diferenciação. Outra proteína é um repressor pós-transcricional chamado de Brat (de *Brain Tumor*). Brat atua como um inibidor da proliferação, aparentemente pela prevenção da produção da proteína promotora do crescimento Myc, famosa pelo seu papel no câncer (discutido no Capítulo 20). Em mutantes em que Brat é defectiva, ou onde ela não está localizada corretamente, a célula-filha menor resultante de divisão assimétrica do neuroblasto frequentemente não é bem sucedida na sua diferenciação em célula-mãe de gânglio, crescendo e se dividindo como um neuroblasto. O resultado é um tumor cerebral – uma massa de neuroblastos que cresce exponencialmente e sem limites, até que a mosca morra.

Se os tecidos dos vertebrados possuem células-tronco que se comportam de maneira similar aos neuroblastos das moscas é uma questão de grande interesse, especialmente em relação ao câncer.

A sinalização por Notch regula o padrão mais refinado dos tipos celulares diferenciados em diversos tipos de tecidos

Cada célula-filha e uma célula-mãe de gânglio normal podem se tornar tanto um neurônio quanto uma célula da glia. A escolha final, assim como a escolha do destino celular para a progênie de uma célula-mãe sensorial no sistema nervoso periférico, é controlada pela via de sinalização Notch e por inibição lateral. O processo de inibição lateral mediado por Notch mostrou-se crucial para a diversificação celular e para a formação de padrões mais refinados em uma enorme variedade de tecidos diferentes. Na mosca, ele controla a produção não somente dos neurônios, mas também de muitos outros tipos celulares diferenciados – por exemplo, no músculo, no revestimento do intestino, no sistema excretor, na traqueia, no olho e em outros órgãos sensoriais. Nos vertebrados, os homólogos de Notch e seus ligantes são expressos em tecidos correspondentes e desempenham funções semelhantes: as mutações na via de Notch alteram o equilíbrio dos neurônios e das células não-neuronais no sistema nervoso central e dos diferentes tipos celulares especializados no revestimento do intestino, das células endócrinas e exócrinas no pâncreas e das células sensoriais e auxiliares em órgãos sensoriais como o ouvido, para citar apenas alguns exemplos.

Em todos esses tecidos, é necessária uma mistura balanceada de diferentes tipos celulares. A sinalização por Notch fornece os meios para gerar a mistura, possibilitando que células individuais expressem um conjunto de genes, direcionando seus vizinhos imediatos a expressarem outro conjunto.

Alguns genes reguladores chave definem um tipo celular; outros podem ativar o programa para a criação de um órgão inteiro

Conforme mencionamos no início deste capítulo, existem alguns genes cujos produtos agem como disparadores para o desenvolvimento de um órgão específico, iniciando e coordenando todo o complexo programa de expressão gênica necessário para isso. Assim, por exemplo, quando o gene *Eyeless* é expresso artificialmente em um grupo de células no disco imaginal da pata, uma porção de células bem-organizadas de tecido ocular, com todos os seus tipos celulares corretamente arranjados, se desenvolverá na pata (ver Figura 22-2). De maneira similar, mas muito mais tarde, quando a célula faz a escolha final de um modo particular de diferenciação, como consequência das interações mediadas por Notch, ela deve seguir um complexo programa envolvendo a expressão de um conjunto inteiro de genes, e este programa de diferenciação é iniciado e coordenado por um conjunto muito menor de reguladores de nível superior. Estes reguladores são algumas vezes chamados de "proteínas reguladoras mestras" (mesmo que elas somente possam exercer seus efeitos específicos em combinação com os parceiros corretos, em uma célula que está adequadamente preparada).

Um exemplo é a família MyoD/miogenina de proteínas de regulação gênica. Estas proteínas direcionam as células para diferenciarem-se como músculos, expressando actinas e miosinas musculares específicas e todas as outras proteínas do citoesqueleto, metabólicas e de membrana necessárias à célula muscular (ver Figura 7-75). As proteínas de regulação gênica que definem tipos particulares de células frequentemente pertencem (assim como MyoD e seus correlatos) à família básica hélice-alça-hélice, codificada por genes homólogos e, em alguns casos, aparentemente idênticos aos genes pró-neurais que já mencionamos. A sua expressão frequentemente é controlada pela via Notch por meio de complicados circuitos de retroalimentação.

A diferenciação celular terminal trouxe-nos ao final do nosso esboço de como os genes controlam a produção de uma mosca. Nossa narrativa foi necessariamente simplificada. Um número muito maior de genes do que aquele aqui mencionado está envolvido em cada um dos processos do desenvolvimento que descrevemos. Os circuitos de retroalimentação, os mecanismos alternativos operando em paralelo, as redundâncias genéticas e outros fenômenos complicam o quadro como um todo. Apesar disso, a mensagem principal da genética do desenvolvimento é de uma simplicidade inesperada. Um número limitado de genes e de mecanismos, utilizados repetidamente em diferentes circunstâncias e combinações, é responsável pelo controle das principais características do desenvolvimento de todos os animais multicelulares.

A seguir, abordaremos um aspecto essencial do desenvolvimento animal que até agora temos negligenciado: os movimentos celulares.

Resumo

As partes externas de uma mosca adulta desenvolvem-se a partir de estruturas epiteliais chamadas de discos imaginais. Cada disco imaginal está dividido em um pequeno número de domínios que expressam diferentes proteínas de regulação gênica como resultado de processos de formação de padrões embrionários iniciais. Estes domínios são chamados de compartimentos, pois suas células não se misturam. Nos limites dos compartimentos, as células que expressam genes diferentes confrontam-se umas com as outras e interagem, induzindo a produção localizada de morfógenos que governam o crescimento adicional e a formação dos padrões internos de cada compartimento. Assim, no disco da asa, as células dorsais e ventrais interagem pelo mecanismo de sinalização Notch para criar uma fonte da proteína Wingless (Wnt) ao longo dos limites do compartimento dorso-ventral, enquanto as células anteriores e posteriores interagem por meio da sinalização de curto alcance Hedgehog para criar uma fonte da proteína Dpp (um membro da família TGFβ) ao longo dos limites do compartimento ântero-posterior. Todas estas moléculas de sinalização possuem homólogos que desempenham papéis semelhantes na formação de padrões dos membros em vertebrados.

Cada compartimento de um disco imaginal, e cada subestrutura dentro dele, cresce até um tamanho precisamente previsível, mesmo em face de distúrbios aparentemente drásticos, como as mutações que alteram a taxa de divisão celular. Embora os gradientes de morfógenos no disco claramente estejam envolvidos, os mecanismos reguladores críticos que controlam o tamanho dos órgãos não são entendidos.

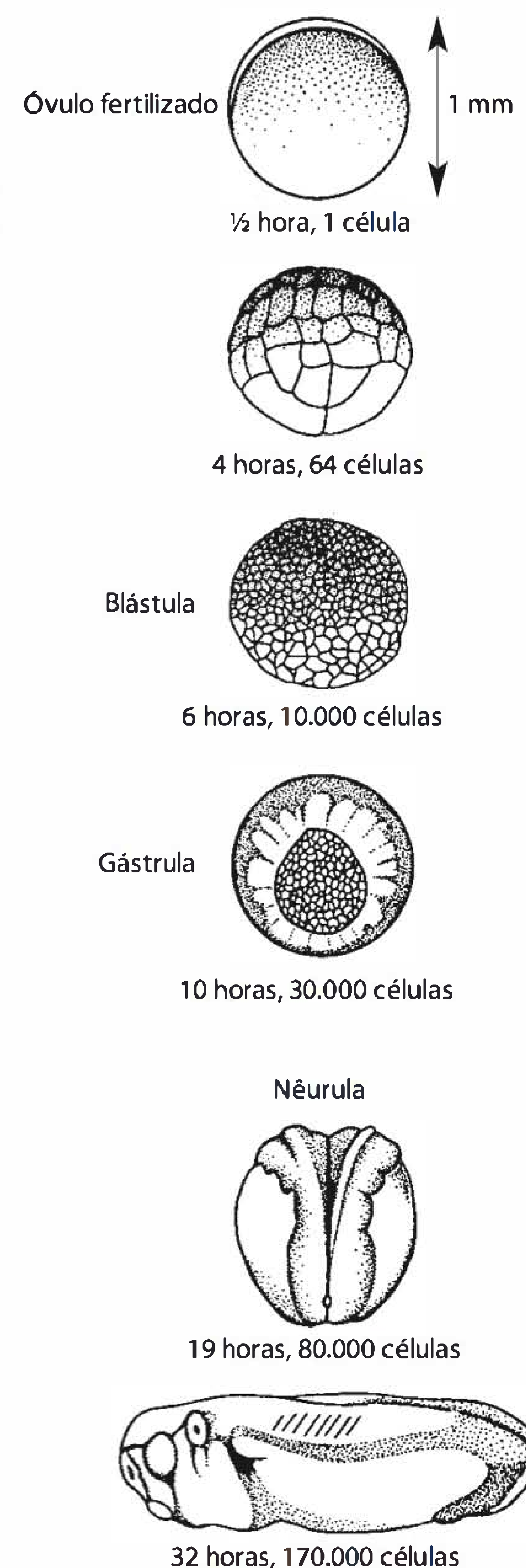
Dentro de cada compartimento, os gradientes de morfógenos controlam os locais de expressão de conjuntos adicionais de genes, definindo conjuntos de células que interagem umas com as outras ainda mais uma vez para criarem os detalhes mais refinados dos padrões finais de diferenciação celular. Assim, a expressão gênica pró-neural define os locais onde as cerdas sensoriais irão se formar, e as interações mediadas por Notch entre as células do agrupamento pró-neural, juntamente com as divisões celulares assimétricas, forçam as células individuais das cerdas a seguirem caminhos distintos para a diferenciação terminal. No sistema nervoso central, neuroblastos se diferenciam da ectoderme por inibição lateral de uma maneira similar, sofrendo uma longa série de divisões assimétricas como células-tronco para originar neurônios e células da glia. Falhas na distribuição assimétrica de moléculas que controlam a diferenciação e a proliferação celular podem converter células-tronco de neuroblastos em células de tumorais.

Acredita-se que muitos destes mecanismos também atuem em tecidos de vertebrados.

MOVIMENTOS CELULARES E A DETERMINAÇÃO DA FORMA DO CORPO DOS VERTEBRADOS

A maioria das células do corpo de um animal é móvel, e no embrião em desenvolvimento seus movimentos muitas vezes são extensos, dramáticos e surpreendentes. Mudanças controladas na expressão gênica criam arranjos ordenados de células em diferentes estados; movimentos celulares rearranjam esses blocos de construção celulares, colocando-os em seus devidos lugares. Os genes que as células expressam determinam como eles se movem; nesse sentido, o controle da expressão gênica é o fenômeno primordial. Contudo, os movimentos celulares também são cruciais, e maiores explicações não são necessárias se quisermos entender como é formada a arquitetura do corpo. Nesta seção, examinaremos esse tópico no contexto do desenvolvimento de vertebrados. Tomaremos como nosso exemplo principal a rã *Xenopus laevis* (**Figura 22-67**), na qual os movimentos celulares têm sido bem estudados; embora também serão analisadas evidências da galinha, do peixe-zebra e do camundongo.





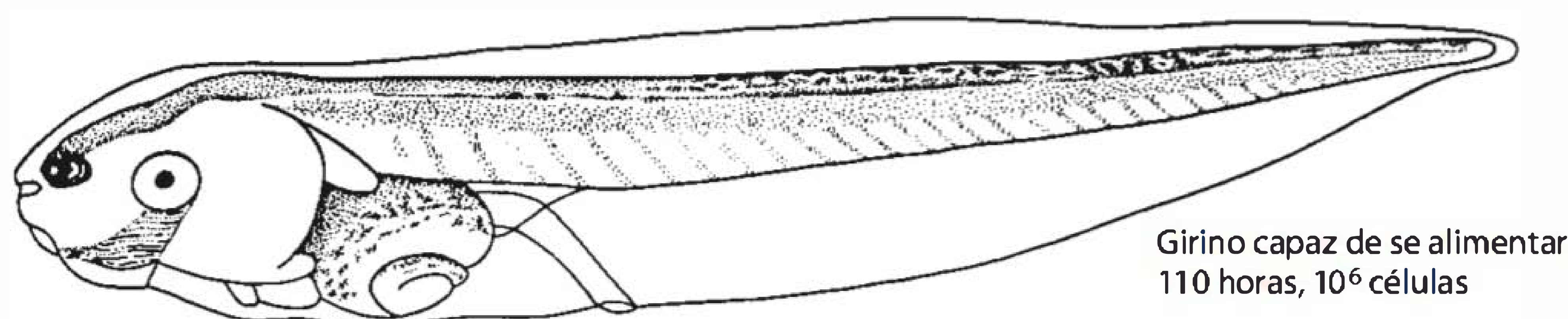
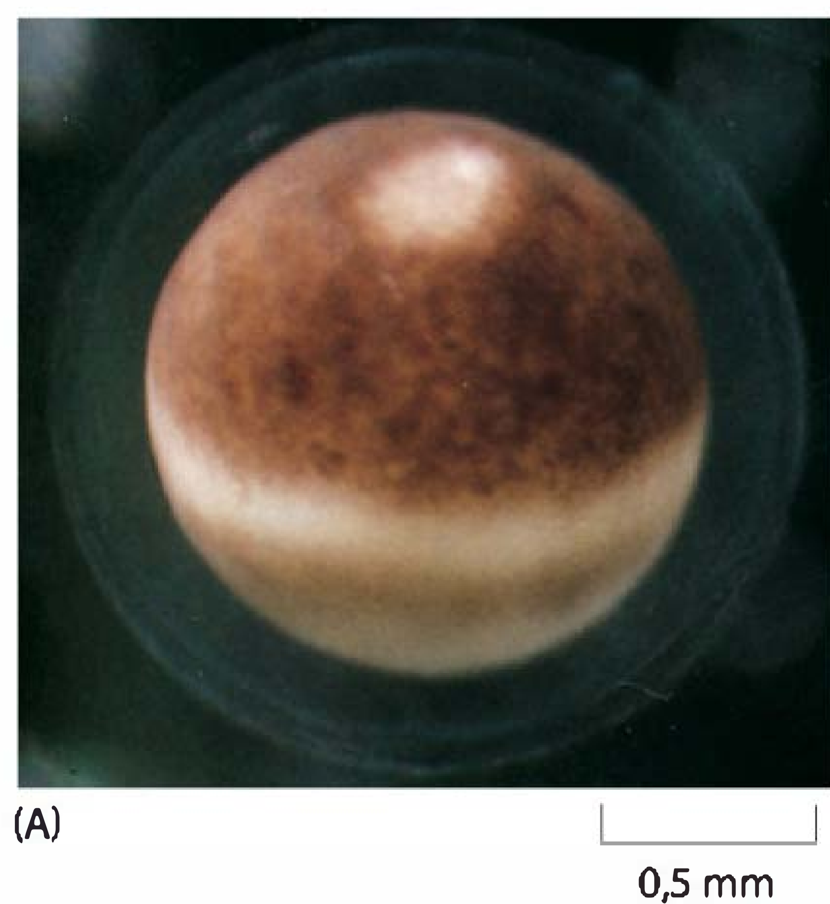


Figura 22-67 Sinopse do desenvolvimento de *Xenopus laevis* a partir do óvulo recém-fertilizado até o girino capaz de se alimentar. A rã adulta é mostrada na fotografia superior. Os estágios de desenvolvimento são vistos lateralmente, com exceção dos embriões de 10 horas e 19 horas, os quais são vistos de baixo e de cima, respectivamente. Todos os estágios, exceto o de adulto, são mostrados na mesma escala. (Fotografia cortesia de Jonathan Slack; desenhos segundo P. D. Nieuwkoop e J. Faber, Normal Table of *Xenopus laevis* [Daudin]. Amsterdam: North-Holland, 1956.)



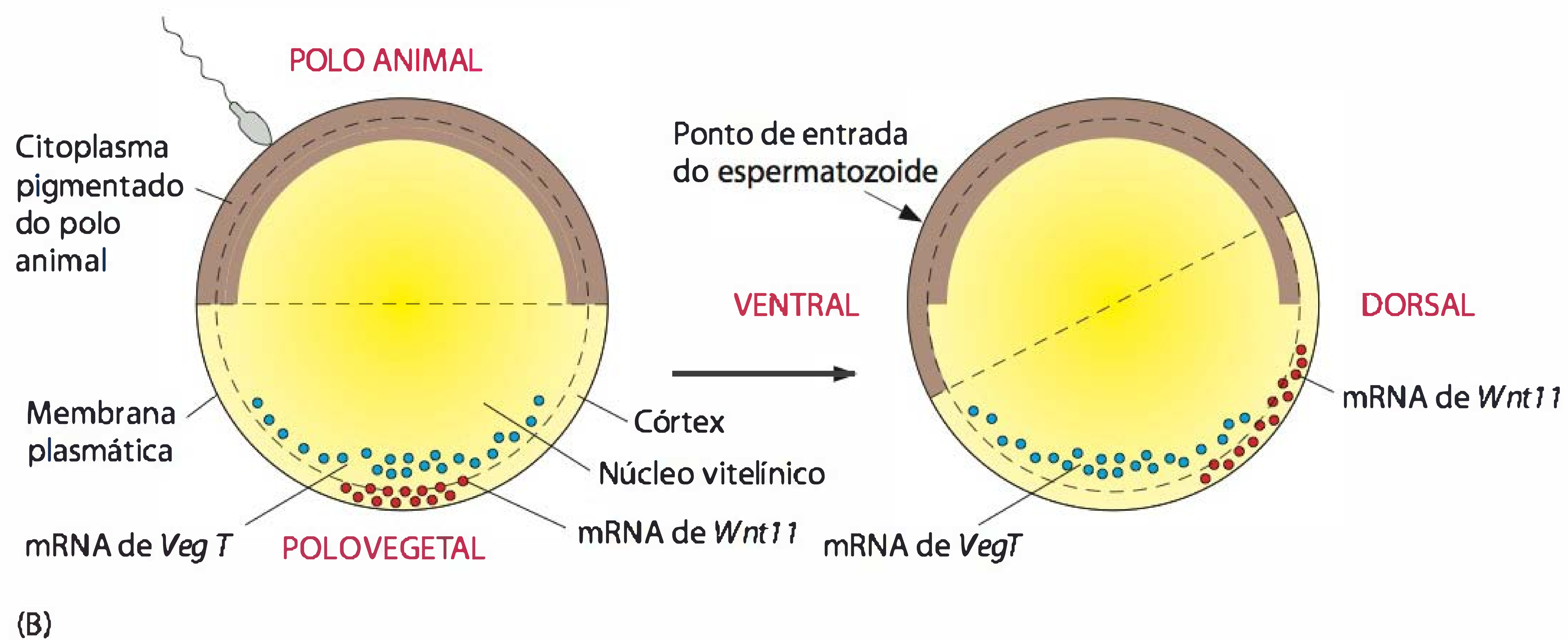


Figura 22-68 O óvulo de *Xenopus* e suas assimetrias. (A) Visão lateral de um óvulo fotografado pouco antes da fertilização. (B) A distribuição assimétrica de moléculas dentro do óvulo, e como isso se altera após a fertilização para definir uma assimetria dorso-ventral, assim como uma assimetria animal-vegetal. A fertilização, por meio de uma reorganização do citoesqueleto de microtúbulos, provoca uma rotação no córtex do ovo (uma camada com alguns μm de profundidade) de mais ou menos 30° em relação ao centro do ovo em uma direção determinada pelo sítio de entrada do espermatozoide. Alguns componentes são carregados ainda mais adiante, para o futuro sítio dorsal por transporte ativo ao longo dos microtúbulos. A resultante concentração dorsal de mRNA de *Wnt11* leva à produção dorsal da proteína sinalizadora Wnt11 e define a polaridade dorso-ventral do futuro embrião. (A, cortesia de Tony Mills.)

A polaridade do embrião de anfíbios depende da polaridade do óvulo

O óvulo de *Xenopus* é uma célula grande, um pouco maior que um milímetro de diâmetro (**Figura 22-68**A). A extremidade inferior de coloração clara do óvulo é chamada de polo vegetal; a extremidade superior de coloração escura é chamada de polo animal. Os hemisférios vegetal e animal contêm diferentes seleções de moléculas de mRNA e outros componentes celulares, os quais são distribuídos a células separadas quando a célula-ovo começa a se dividir após a fertilização. Próximo ao polo vegetal, por exemplo, há um acúmulo de mRNAs que codificam a proteína de regulação gênica VegT (uma proteína de ligação ao DNA da família T-box) e proteínas sinalizadoras da superfamília TGFβ, assim como alguns componentes proteicos já feitos da via de sinalização Wnt (Figura 22-68B). O resultado é que as células que herdam o citoplasma vegetal irão produzir sinais para a organização do comportamento de células adjacentes. Elas estão comprometidas a formar o intestino – o tecido mais interno do corpo; as células que herdam o citoplasma animal irão formar os tecidos externos. Assim, grosseiramente falando, o eixo animal-vegetal do óvulo corresponde à dimensão externa para a interna (ou da pele para o intestino) do futuro organismo.

A fertilização inicia uma série de divisões e movimentos celulares que irão, no final, forçar as células vegetais e as células da região equatorial (mediana) do eixo animal-vegetal para o interior. No decorrer desses movimentos complexos, os três principais eixos do corpo são estabelecidos: o *ântero-posterior*, da cabeça à cauda; o *dorso-ventral*, das costas à barriga; e o *médio-lateral*, da linha média para fora, em direção à esquerda ou à direita. A orientação desses eixos é determinada pelas assimetrias do embrião jovem. O óvulo não-fertilizado tem somente um eixo de assimetria – o animal-vegetal – mas a fertilização desencadeia um movimento intracelular que dá ao ovo uma assimetria adicional, definindo um segundo eixo em ângulos retos a este. Após a entrada do espermatozoide, o córtex externo e rico em actina do citoplasma do ovo sofre uma rotação em relação ao núcleo central do ovo, de forma que o polo animal do córtex é ligeiramente deslocado para um lado. Tratamentos que bloqueiam a rotação permitem que a clivagem ocorra normalmente, mas produzem um embrião com um intestino central e sem estruturas dorsais ou assimetria dorso-ventral. Assim, a rotação cortical é necessária para definir o eixo dorso-ventral do futuro corpo, e o eixo de assimetria criado no ovo pela rotação é chamado de eixo dorso-ventral do ovo. Note, contudo, que os movimentos celulares subsequentes implicam que a relação entre os eixos do ovo e os eixos do futuro corpo é mais complicada que o sugerido por esta terminologia. A direção da rotação cortical é influenciada pelo ponto de entrada do espermatozoide, talvez através do centrossomo que o espermatozoide carrega para dentro do ovo, e o movimento é associado a uma reorganização dos microtúbulos no citoplasma do ovo. Isso leva ao transporte com base em microtúbulos de vários componentes, incluindo o mRNA que codifica a Wnt11, um membro da família Wnt de moléculas-sinal, em direção ao futuro lado dorsal (ver Figura 22-68B). Este mRNA é logo traduzido, produzindo a proteína Wnt11 na região vegetal dorsal. A Wnt11, secretada de células que se formam naquela região, é crucial ao acionamento da cascata de eventos subsequentes que organizarão o eixo dorso-ventral do corpo.

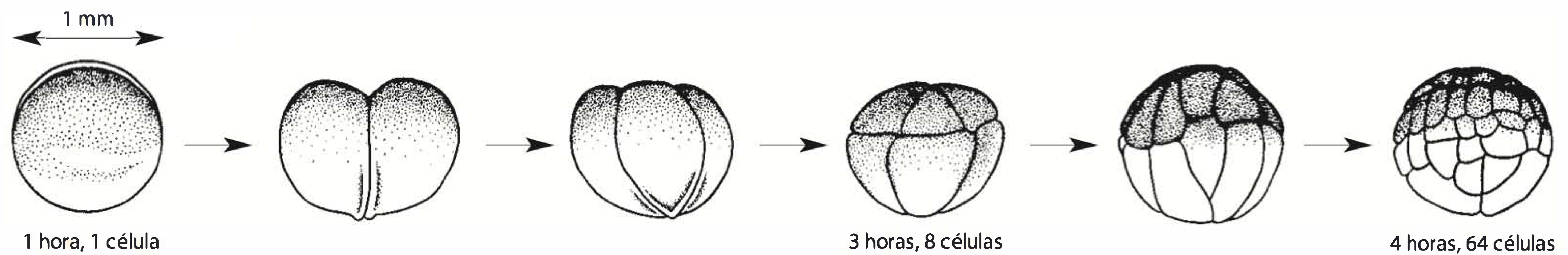


Figura 22-69 Os estágios da clivagem em *Xenopus*. As divisões por clivagem rapidamente subdividem o ovo em muitas células menores. Todas as células se dividem sincronicamente até as primeiras 12 clivagens, mas as divisões são assimétricas, de forma que as células vegetais inferiores, carregadas de vitelo, são menos numerosas e maiores.

A clivagem produz muitas células a partir de uma

A rotação cortical é completada cerca de uma hora após a fertilização, sendo seguida por clivagem, na qual a grande célula-ovo única rapidamente se subdivide, por mitoses repetidas, em muitas células menores, ou *blastômeros*, sem nenhuma alteração na massa total (**Figura 22-69**). Dessa maneira, os determinantes assimetricamente distribuídos no ovo ficam distribuídos em células separadas, com destinos diferentes (**Figura 22-70**).

Essas primeiras divisões celulares em *Xenopus* têm um tempo de ciclo de cerca de 30 minutos, com uma alternância direta de fases M e S, como discutido no Capítulo 17. As taxas bastante altas de replicação do DNA e da mitose parecem impedir quase toda a transcrição gênica (embora ocorra a síntese de proteínas), e o embrião em processo de clivagem é quase inteiramente dependente de reservas de RNA, proteína, membrana e outros materiais que se acumularam no ovo enquanto se desenvolvia como oócito na mãe. Após cerca de 12 ciclos de clivagem (7 horas), a taxa de divisão celular diminui, os ciclos celulares começam a seguir o padrão normal com fases G_1 e G_2 intervenientes entre as fases S e M, e começa a transcrição extensiva do genoma do embrião. Este evento é chamado de *transição da blástula média*, e ocorre com velocidade aproximadamente similar na maioria das espécies animais (sendo os mamíferos uma exceção). Estudos no peixe-zebra mostram que os transcritos recém-sintetizados incluem microRNAs que reconhecem muitos dos transcritos depositados no ovo pela mãe e que controlam a degradação rápida destes. Assim, a transição da blástula média marca o ponto em que o genoma do próprio embrião assume a maior parte do controle do desenvolvimento.

A gastrulação transforma uma bola côncava de células em uma estrutura de três camadas com um intestino primitivo

Durante o período de clivagem, o embrião de rã se transforma de uma esfera sólida de células em algo semelhante a uma bola côncava, com uma cavidade interna cheia de fluido e cercada por células que se aderem, formando um folheto epitelial. O embrião agora é denominado **blástula** (**Figura 22-71**).

Logo após, começam os movimentos coordenados da gastrulação. Esse processo dramático transforma a simples bola côncava de células em uma estrutura de camadas múltiplas com um tubo intestinal central e simetria bilateral: por meio de uma versão mais elaborada do processo anteriormente descrito para o ouriço-do-mar (ver Figura 22-3), muitas das células no exterior do embrião são movidas para dentro dele. O desenvolvimento subsequente depende das interações entre as camadas interna, externa e mediana de células assim formadas: a *endoderme* na parte interna, consistindo nas células que se moveram para o interior a fim de formar o intestino primitivo; a *ectoderme* na parte externa, consistindo em

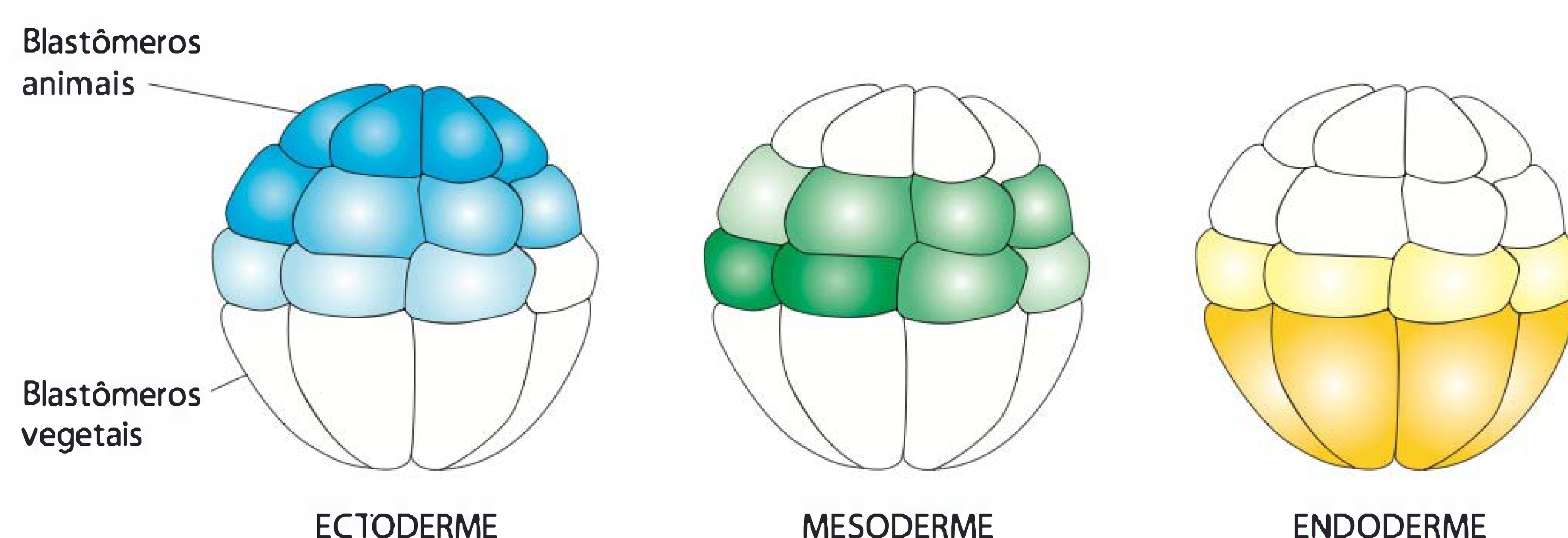


Figura 22-70 As origens das três camadas germinativas remontam a blastômeros distintos do embrião em seus estágios iniciais de clivagem. A endoderme deriva da maioria dos blastômeros vegetais, a ectoderme, da maioria dos animais, e a mesoderme, de um conjunto intermediário que também contribui à endoderme e à ectoderme. A coloração em cada ilustração indica que, quanto maior a intensidade, maior a proporção de progênie celular que irá contribuir a uma dada camada germinativa. (Segundo L. Dale, *Curr. Biol.* 9:R812-R815, 1999. Com permissão de Elsevier.)

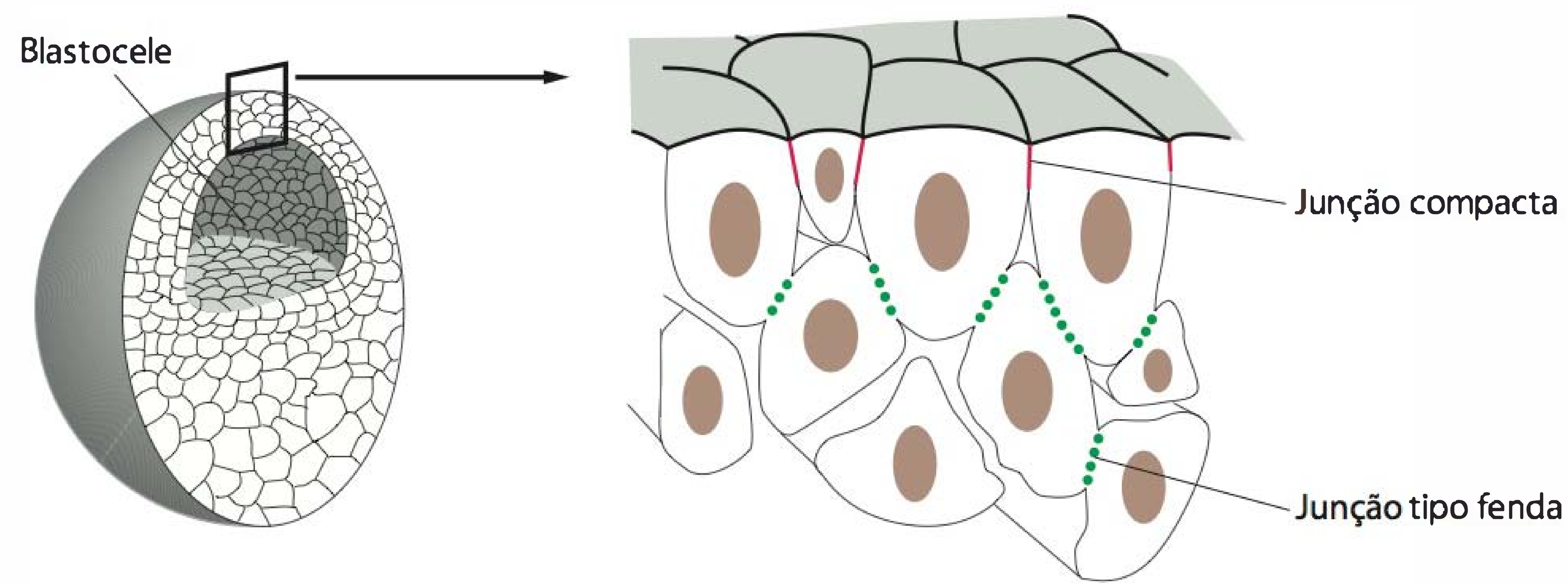


Figura 22-71 A blástula. Nas regiões mais externas do embrião, as junções compactas entre os blastômeros começam a criar um folheto epitelial que isola o interior do embrião do meio externo. O Na^+ é bombeado através desta camada para dentro dos espaços no interior do embrião, e a água segue dentro desses espaços devido ao gradiente de pressão osmótica resultante. Como consequência, as fendas intercelulares dentro do embrião se alargam para formar uma única cavidade, a blastocele. Em *Xenopus*, a parede da blastocele apresenta uma espessura correspondente a várias células, e somente as células mais externas estão compactamente ligadas umas às outras, como em um epitélio.

células que permaneceram externas; e a *mesoderme* entre elas, consistindo em células que se destacaram do epitélio para formar um tecido conectivo embrionário organizado mais frouxamente (**Figura 22-72**). A partir dessas três *camadas germinativas*, os tecidos do corpo do vertebrado adulto serão gerados, preservando o plano corporal básico estabelecido durante a gastrulação.

Os movimentos da gastrulação são precisamente previsíveis

O padrão de movimentos da gastrulação que cria as camadas germinativas e estabelece o eixo do corpo é descrito para *Xenopus* na **Figura 22-73**. Os detalhes são complexos, mas os princípios são simples.

As células da futura endoderme são dobradas para o interior, ou *involuídas*, em sucessão. O processo começa com um movimento descendente de células a partir do hemisfério animal para cobrir e cercar o hemisfério vegetal vitelínico, que representa a fonte de alimento do embrião. As células que estão na vanguarda deste movimento, na margem vegetal do folheto celular que avança, são as primeiras a involuir, voltando-se para dentro e, em seguida, movendo-se para cima em direção ao polo animal, a fim de formar a parte mais anterior do intestino. À medida que se aproximam do polo animal, essas primeiras células endodérmicas irão sinalizar à ectoderme sobreposta a definição da extremidade anterior da cabeça. A boca irá eventualmente se desenvolver como um orifício formado em um sítio anterior, onde a endoderme, e a ectoderme entram em contato direto. Enquanto isso, as futuras células da mesoderme, destinadas a se destacar do folheto epitelial para formar o "recheio de sanduíche" entre endoderme e mesoderme, dobram-se para o interior junto com as células da endoderme, e também se movem para cima em direção ao polo animal. As primeiras células a involuir vão formar partes da cabeça, e as últimas formam partes da cauda. Dessa maneira, o eixo ântero-posterior do embrião final é traçado em sequência.

Os movimentos ântero-posteriores atuam em conjunto com os movimentos que organizam o eixo dorso-ventral do corpo. A gastrulação começa no lado da blástula que foi marcado como dorsal pela rotação cortical. Neste momento, a involução de células para o interior começa com uma curta endentação que rapidamente se estende para formar o *blastóporo* – uma linha de invaginação que se curva para envolver o polo vegetal. O sítio onde a invaginação começa define o *lábio dorsal do blastóporo*. Como veremos, este tecido desempenha um papel importante em eventos subsequentes e dá origem às estruturas dorsais centrais do eixo principal do corpo.

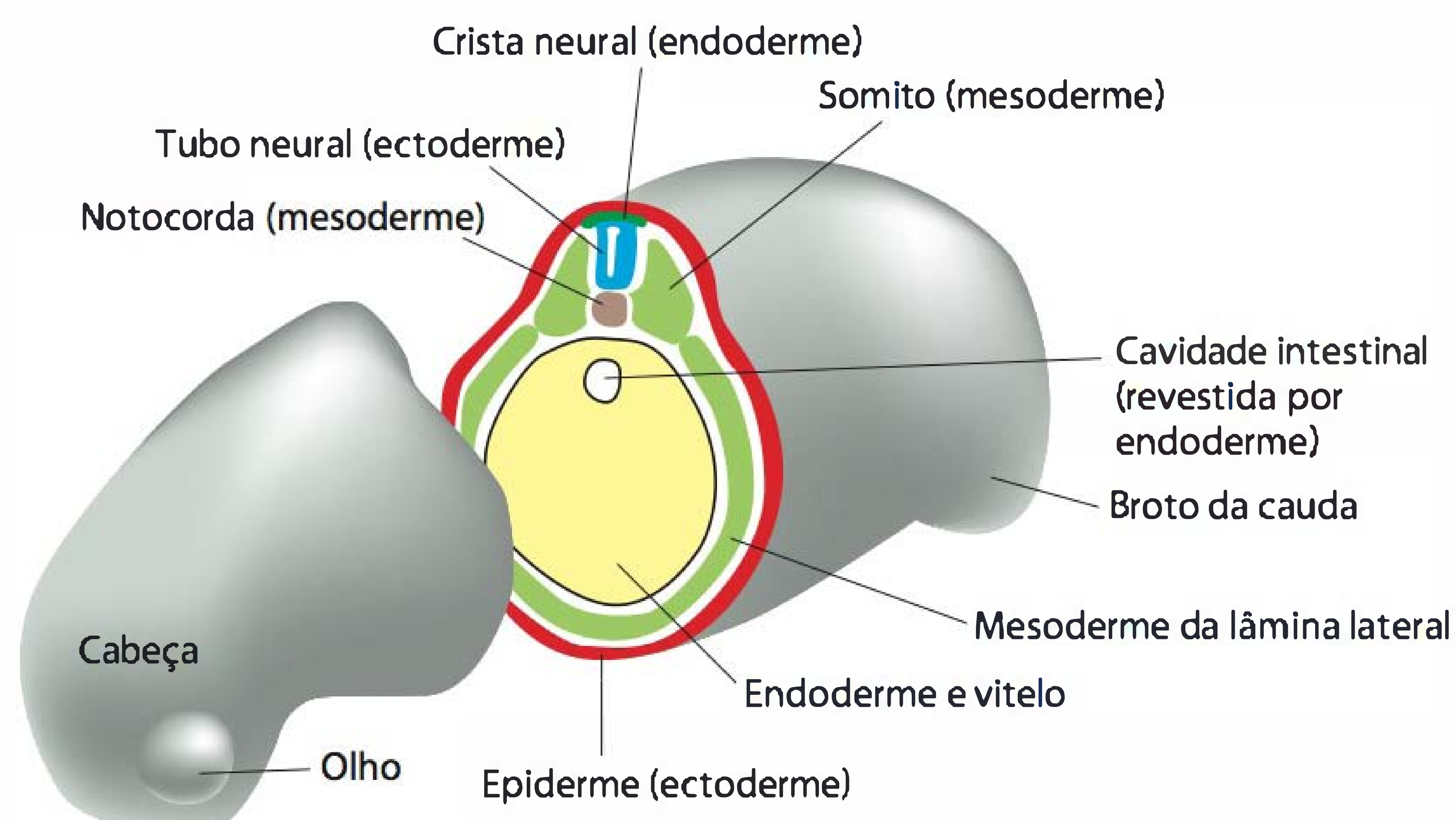


Figura 22-72 Secção transversal ao longo do tronco de um embrião de anfíbio após o final da gastrulação, mostrando o arranjo dos tecidos endodérmicos, mesodérmicos e ectodérmicos. A endoderme formará o revestimento epitelial do intestino, da boca ao ânus. Ela origina não somente a faringe, o esôfago, o estômago e o intestino, mas também muitas glândulas associadas. As glândulas salivares, o fígado, o pâncreas, a traqueia e os pulmões, por exemplo, desenvolvem-se de extensões da parede do trato digestivo originalmente simples, multiplicando-se e tornando-se sistemas de tubos ramificados que se conectam ao intestino ou à faringe. A endoderme forma somente os componentes epiteliais dessas estruturas – o revestimento do intestino e as células secretoras do pâncreas, por exemplo. A musculatura de suporte e os elementos fibrosos se originam da mesoderme. A mesoderme dá origem aos tecidos conectivos – primeiramente à frouxa malha tridimensional de células que preenche o espaço do embrião, conhecida como mesênquima e, por último, à cartilagem, aos ossos e ao tecido fibroso, incluindo a derme (a camada mais interna da pele). A mesoderme também forma os músculos, o sistema vascular inteiro – incluindo o coração, os vasos sanguíneos e as células do sangue – e os túbulos, os ductos e os tecidos de suporte dos rins e das gônadas. A ectoderme formará a epiderme (a camada epitelial mais externa da pele) e as estruturas acessórias da epiderme, como cabelos, glândulas sudoríparas e glândulas mamárias. Ela também originará todo o sistema nervoso, central e periférico, incluindo não somente os neurônios e a glia, mas também as células sensoriais do nariz, dos ouvidos, dos olhos e de outros órgãos sensoriais. (Segundo T. Mohun et al., *Cell* 22:9-15, 1980. Com permissão de Elsevier.)

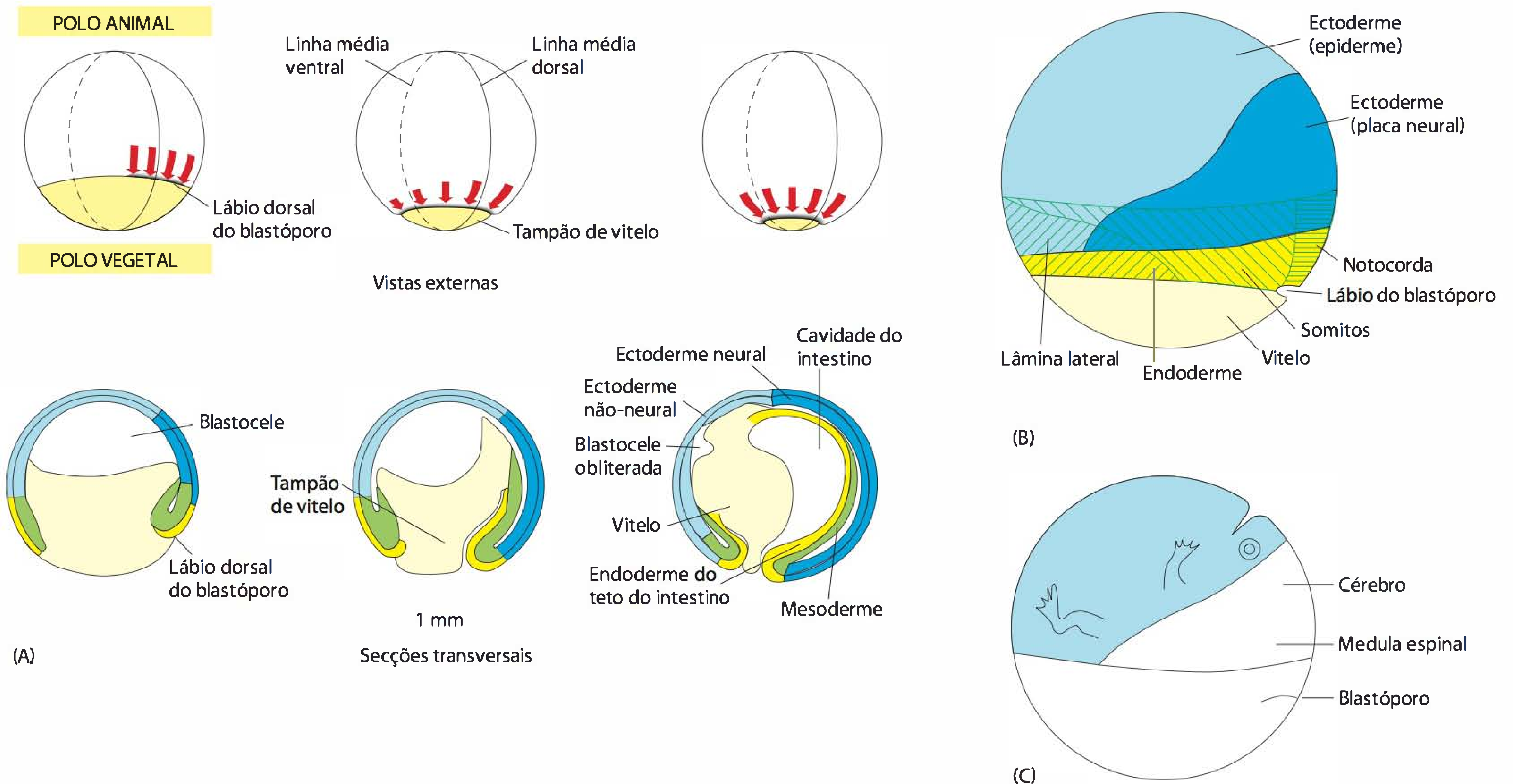


Figura 22-73 Gastrulação em *Xenopus*. (A) As vistas externas (*acima*) mostram o embrião como um objeto semitransparente visto de lado; com as direções do movimento celular indicadas pelas *setas vermelhas*, as secções transversais (*abaixo*) estão cortadas no plano mediano (o plano das linhas médias dorsal e ventral). A gastrulação começa quando uma pequena endentação, o início do blastóporo, torna-se visível no exterior da blástula. Esta endentação se estende gradativamente, curvando-se para formar um círculo completo que envolve um tampão de células muito ricas em vitelo (destinadas a serem contidas no intestino e digeridas). Enquanto isso, as camadas de células se dobram ao redor do lábio do blastóporo e se movem para o fundo, no interior do embrião. Ao mesmo tempo, o epitélio externo na região do polo animal se espalha ativamente e toma o lugar das camadas de células que se dobraram para a região interna. Por fim, o epitélio do hemisfério animal se espalha desta maneira e cobre toda a superfície externa do embrião, e, assim que a gastrulação é concluída, o círculo do blastóporo encolhe até quase corresponder a um ponto. (B) Um mapa de destinações para o embrião inicial de *Xenopus* (visto lateralmente) assim que ele começa a gastrulação, mostrando as origens das células que formarão as três camadas germinativas como resultado dos movimentos de gastrulação. As várias partes da mesoderme (lâmina lateral, somitos e notocorda) derivam de células de regiões profundas que se separam do epitélio na região tracejada. As outras células, incluindo as células mais superficiais na região tracejada, darão origem à ectoderme (*azul*, *acima*) ou à endoderme (*amarelo*, *abaixo*). Falando grosseiramente, as primeiras células a se voltarem para o interior, ou involuir, irão se mover para a frente na parte interna do embrião, a fim de formar as estruturas endodérmicas e mesodérmicas mais anteriores, enquanto as que involuírem por último formarão as estruturas mais posteriores. (C) Desenho (não deve ser tomado literalmente) mostrando aproximadamente como as diferentes regiões do mapa ectodérmico se situam dentro da superfície do corpo do animal adulto. (Segundo R. E. Keller, *J. Exp. Zool.* 216:81-101, 1981, com permissão de John Wiley & Sons, Inc., e *Dev. Biol.* 42:222-241, 1975, com permissão de Academic Press.)

Sinais químicos desencadeiam os processos mecânicos

As moléculas de mRNA de *VegT*, *Wnt11* e também outras localizadas no citoplasma vegetal do ovo ocasionam a distribuição localizada de seus produtos proteicos. Estes agem dentro e sobre as células da porção inferior e mediana do embrião para dar-lhes características especializadas e colocá-las em movimento, tanto por efeitos diretos como pela estimulação da produção de outras moléculas-sinal secretadas, particularmente proteínas da superfamília TGFβ. Se esses sinais são bloqueados, nenhum tipo de célula mesodérmica é gerado e a gastrulação é interrompida. A ativação local da via de sinalização Wnt no lado dorsal do embrião (resultante da rotação cortical inicial; ver Figura 22-68) modifica a ação dos outros sinais, de modo a induzir o desenvolvimento das células especiais que formam o lábio dorsal do blastóporo (**Figura 22-74**).

O lábio dorsal do blastóporo desempenha um papel central na gastrulação não somente em um sentido geométrico, mas também como uma nova fonte de controle eficaz. Se o lábio dorsal do blastóporo é extirpado de um embrião no início da gastrulação e enxertado em outro embrião, porém em uma posição diferente, o embrião hospedeiro inicia a gastrulação tanto no sítio de seu próprio lábio dorsal como no sítio do enxerto. Os movimentos da gastrulação no segundo sítio acarretam a formação de um segundo

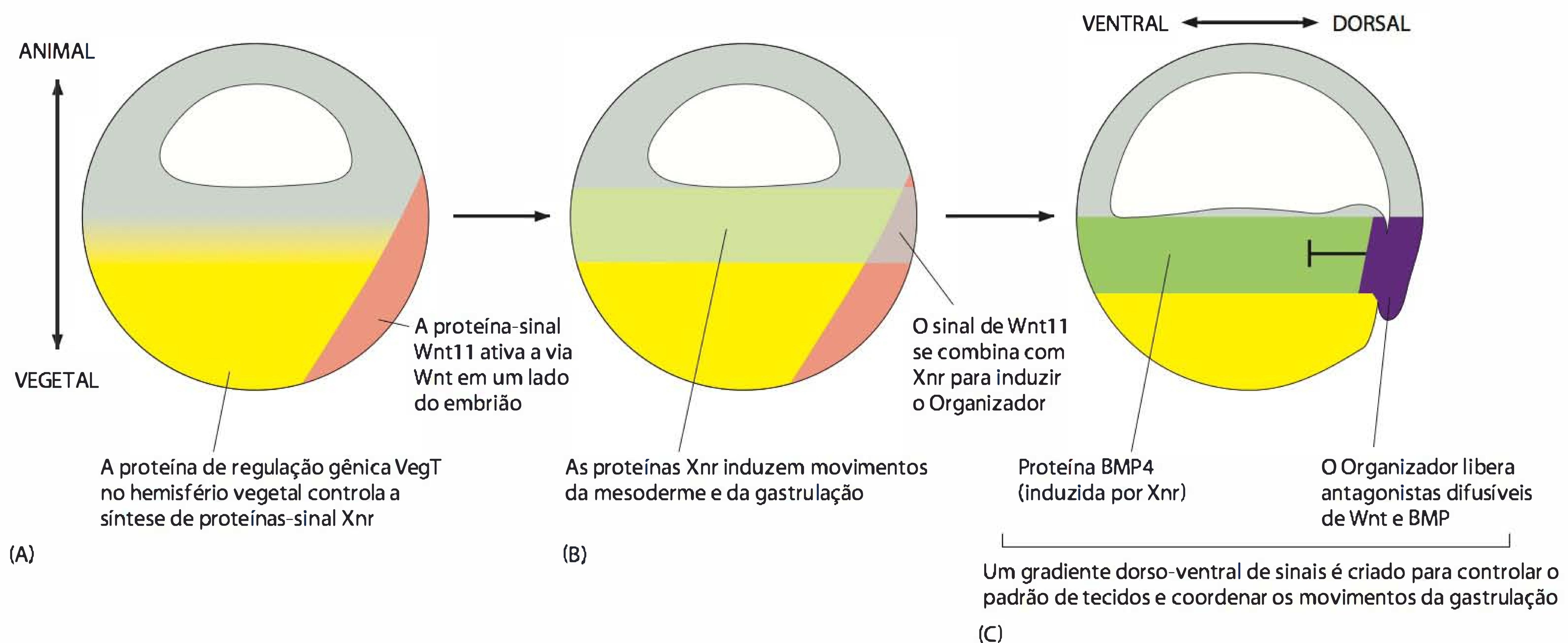


Figura 22-74 Visão atual dos principais sinais indutores que organizam os eventos da gastrulação. (A) A distribuição de moléculas determinantes do eixo na blástula resulta da herança de diferentes partes do citoplasma do óvulo fertilizado de rã. A proteína de regulação gênica VegT nos blastômeros vegetais é traduzida a partir do mRNA de *VegT* que estava localizado no polo vegetal antes da fertilização. A proteína Wnt11 no futuro lado dorsal é traduzida a partir do mRNA localizado lá e resultante da rotação cortical que se segue à fertilização. (B) A VegT dirige a expressão de proteínas Xnr (relacionadas a nodal em *Xenopus*) e de outros membros da superfamília TGFβ, que induzem a formação de uma banda de mesoderme na parte mediana do embrião, enquanto a Wnt11 modifica o efeito no lado dorsal, colaborando com Xnr para induzir a formação do Organizador. (C) Um gradiente de morfógenos que organiza o eixo dorso-ventral é construído por uma combinação de sinais, incluindo a BMP4 (outro membro da superfamília TGFβ), secretada pela mesoderme, e antagonistas das vias Wnt e BMP, secretados pelas células do Organizador no lábio dorsal do blastóporo.

conjunto completo de estruturas corporais e resultam em um embrião duplo (gêmeos siameses) (ver Figura 22-6B).

Evidentemente, o lábio dorsal do blastóporo é a fonte de um sinal (ou sinais) que coordena tanto os movimentos de gastrulação como o padrão de especialização dos tecidos em sua vizinhança. Devido a esse papel crucial na organização da formação do eixo principal do corpo, o lábio dorsal do blastóporo é conhecido como **Organizador** (ou Organizador de Spemann, com referência a seu codescobridor). É o exemplo mais antigo e famoso de um *centro de sinalização embrionária*.

Mudanças ativas no empacotamento celular propiciam uma força motriz à gastrulação

O Organizador controla o padrão dorso-ventral de diferenciação celular em sua vizinhança pela secreção de pelo menos seis diferentes proteínas-sinal. Estas agem como antagonistas difusíveis dos dois principais tipos de sinais que já mencionamos, provenientes das células mais vegetais – isto é, de sinais de Wnt e de sinais semelhantes a TGFβ (especificamente as proteínas BMP). Esses inibidores liberados do Organizador podem ajudar a limitar o tamanho do Organizador ao impedir que células vizinhas também adotem uma característica de Organizador. Ao mesmo tempo, eles criam um gradiente de atividade de sinalização – um gradiente de morfógenos, cujo valor local reflete a distância do Organizador (Figura 22-74C). À medida que as células se movem durante a gastrulação, elas experimentam diferentes doses de sinais de BMP (e outros), lançadas em diferentes tempos, evocando diferentes comportamentos celulares e acarretando diferentes destinos finais. Contudo, como o padrão de movimentos celulares é organizado em termos mecânicos e quais são as forças que o desencadeiam?

A gastrulação começa com mudanças na forma das células no sítio do blastóporo. Nos anfíbios, estas são chamadas de células-garrafa: elas possuem corpos largos e gargalos estreitos que as ancoram à superfície do epitélio (**Figura 22-75**) e podem ajudar a forçar a curvatura do epitélio, de modo que ele se dobre para dentro e produza a endentação inicial vista do lado exterior. Uma vez formada esta primeira dobra, as células podem continuar a passar para o interior, como uma camada, para formar o intestino e a mesoderme. O movimento parece ser dirigido principalmente por um reempacotamento ativo das células, especialmente aquelas nas regiões em involução ao redor do Organizador (ver Figura 22-75). Aqui ocorrem as **extensões convergentes**. Pequenos fragmentos quadrados de tecido dessas regiões, isolados em cultura, irão espontaneamente se estreitar e se alongar por meio de um rearranjo das células, da mesma forma que o fariam no embrião no processo de convergência em direção à linha média dorsal, dobrando-se para o interior ao redor do lábio do blastóporo e em seguida se alongando para formar o eixo principal do corpo.

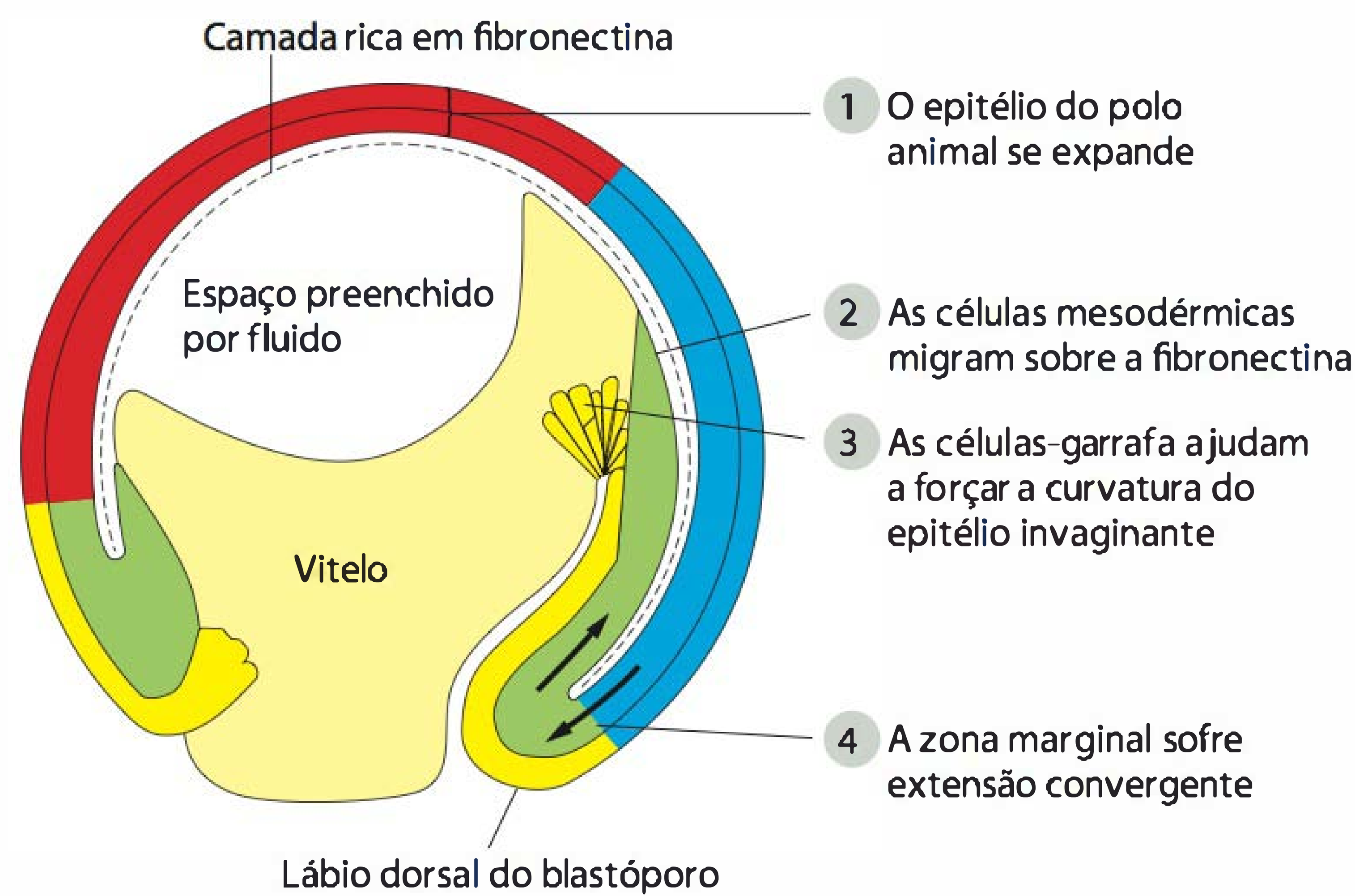


Figura 22-75 Movimentos celulares na gastrulação. Secção transversal de um embrião de *Xenopus* em gastrulação, feita no mesmo plano da Figura 22-73, indicando os quatro principais tipos de movimentos envolvidos na gastrulação. O epitélio do polo animal se expande por rearranjo celular, tornando-se mais fino à medida que se espalha. A migração de células mesodérmicas sobre uma matriz rica em fibronectina que reveste a parte superior da blastocele pode ajudar a empurrar os tecidos invaginados para a frente. Contudo, a principal força motriz à gastrulação em *Xenopus* é a extensão convergente na zona marginal. (Segundo R. E. Keller, *J. Exp. Zool.* 216:81-101, 1981. Com permissão de Wiley-Liss.)

Para que esta transformação extraordinária seja efetuada, as células individuais têm de se arrastar umas sobre as outras de forma coordenada (**Figura 22-76**). O alinhamento de seus movimentos parece depender da mesma maquinaria que, no verme e na mosca, encontramos controlando a polaridade planar celular: a via de sinalização de polaridade Frizzled/Dishevelled. Quando esta via é bloqueada – por uma forma dominante negativa de Dishevelled, por exemplo – a extensão convergente não ocorre.

Padrões variáveis de moléculas de adesão celular forçam a formação de novos arranjos de células

Os padrões de expressão gênica governam os movimentos celulares embrionários de muitos modos diferentes. Eles regulam a mobilidade celular, a forma celular e a produção de sinais para seu direcionamento. Também têm a importante função de determinar os conjuntos de moléculas de adesão que as células apresentam em suas superfícies. Por meio de alterações em suas moléculas de superfície, uma célula pode romper ligações antigas e produzir novas. As células em uma região podem desenvolver propriedades de superfície que fazem-nas se aderirem umas às outras e se segregarem de um grupo de células vizinhas cuja superfície química é diferente.

Experimentos feitos há meio século em embriões jovens de anfíbios mostraram que os efeitos de adesão seletiva célula-célula podem ser tão eficazes a ponto de resultar em uma

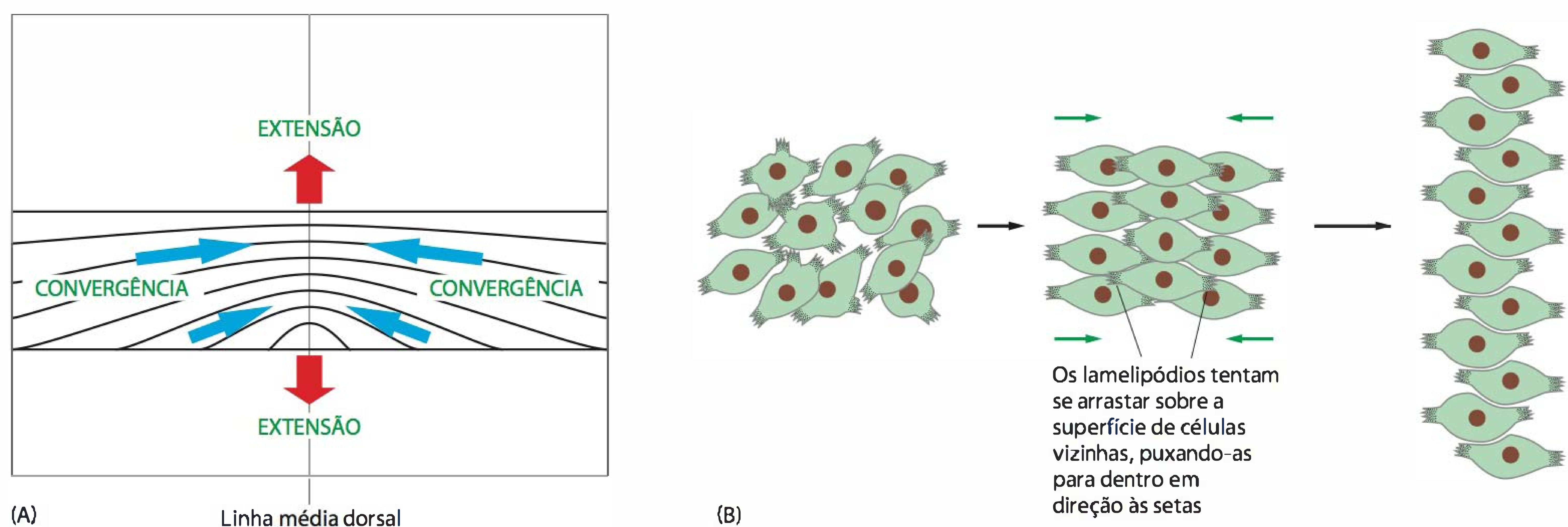


Figura 22-76 Extensão convergente e suas bases celulares. (A) Padrão de extensão convergente na zona marginal de uma gástrula visto a partir do lado dorsal. As *setas azuis* representam a convergência em direção à linha média dorsal, as *setas vermelhas* representam a extensão do eixo ântero-posterior. O diagrama simplificado não pretende mostrar o movimento acompanhado de involução, pelo qual as células estão se dobrando para o interior do embrião. (B) Diagrama esquemático do comportamento celular que forma a base da extensão convergente. As células formam lamelipódios, com os quais tentam se arrastar umas sobre as outras. O alinhamento dos movimentos dos lamelipódios ao longo de um eixo comum leva à extensão convergente. O processo depende da via de sinalização de polaridade Frizzled/Dishevelled e é presumivelmente cooperativo, porque as células que já estão alinhadas exercem forças que tendem a alinhar suas vizinhas da mesma maneira. (B, segundo J. Shih e R. Keller, *Development* 116:901-914, 1992. Com permissão de The Company of Biologists.)

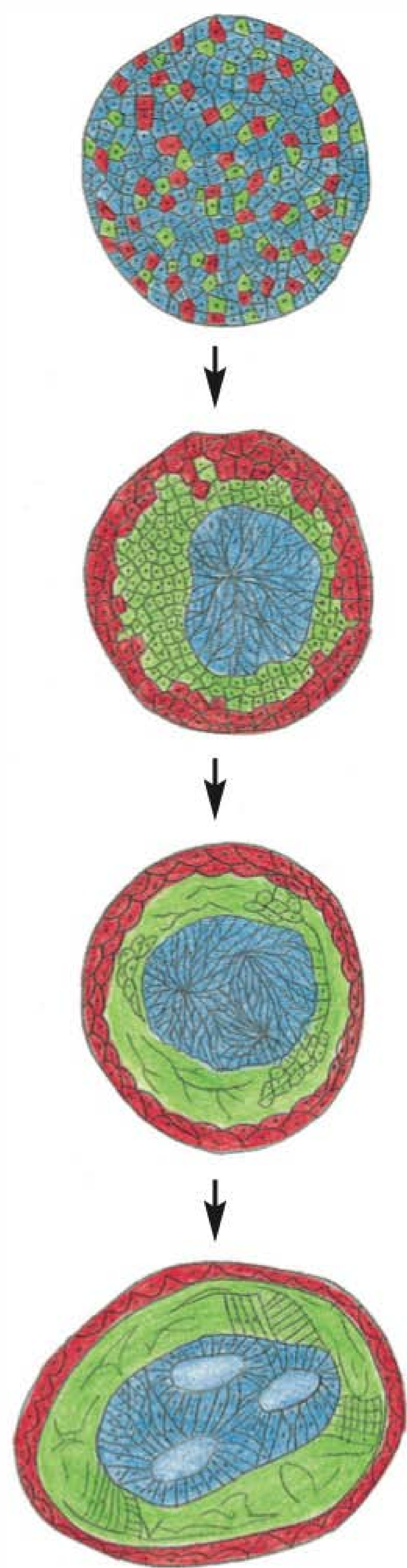


Figura 22-77 Separação por tipos celulares. As células de diferentes partes de um embrião jovem de anfíbio irão se separar por tipos, de acordo com suas origens. No experimento clássico aqui mostrado, as células da mesoderme (*verde*), as células da placa neural (*azul*) e as células epidérmicas (*vermelho*) foram desagregadas e em seguida reagregadas em uma mistura aleatória. Elas se separam por tipos em um arranjo reminiscente ao de um embrião normal, com um "tubo neural" interno, uma epiderme externa e uma mesoderme no meio. (Modificada de P. L. Townes e J. Holtfreter, *J. Exp. Zool.* 128:53-120, 1955. Com permissão de Wiley-Liss.)

reconstrução aproximada da estrutura normal de um embrião jovem pós-gastrulação, mesmo após as células terem sido artificialmente dissociadas. Quando essas células são reagregadas em uma mistura aleatória, elas se separam espontaneamente, de acordo com suas características originais (**Figura 22-77**). Como discutido no Capítulo 19, um papel central em tais fenômenos é desempenhado pelas *caderinas* – uma grande e variada família de proteínas de adesão célula-célula dependentes de Ca^{2+} evolutivamente relacionadas. Estas e outras moléculas de adesão célula-célula são diferencialmente expressas nos vários tecidos do embrião jovem, sendo que anticorpos contra elas interferem na adesão seletiva normal entre células de um tipo similar.

As mudanças nos padrões de expressão das várias caderinas se correlacionam intimamente com as alterações dos padrões de associação entre as células durante a gastrulação, a neurulação e a formação dos somitos (ver Figura 19-25). Esses rearranjos são provavelmente regulados e direcionados, em parte, pelo padrão de caderinas. Em particular, as caderinas parecem desempenhar uma função importante no controle da formação e da dissolução de folhetos epiteliais e de agrupamentos de células. Elas não somente colam uma célula à outra, mas também propiciam ancoramento para os filamentos intracelulares de actina nos sítios de adesão célula-célula. Desta maneira, o padrão de tensões e movimentos no tecido em desenvolvimento é regulado de acordo com o padrão de adesões.

A notocorda se alonga, enquanto a placa neural se enrola para formar o tubo neural

A gastrulação é somente a primeira – embora talvez a mais dramática – de uma estonteante variedade de movimentos celulares que moldam as partes do corpo. Temos espaço para discutir somente alguns deles aqui.

No embrião que se segue à gastrulação, a camada de mesoderme é dividida em placas separadas nos lados esquerdo e direito do corpo. Definindo o eixo central do corpo e efetuando esta separação, está a especialização mais inicial da mesoderme, conhecida como **notocorda**. Este delgado bastão de células, com ectoderme acima dele, endoderme abaixo e mesoderme de cada lado (ver Figura 22-72), deriva das células do próprio Organizador. As células da notocorda são caracterizadas pela expressão de uma proteína de regulação gênica denominada Brachyury (palavra grega para "cauda curta", tomada a partir de um fenótipo mutante) que pertence à mesma família T-box da proteína VegT dos blastômeros vegetais.

Assim que as células da notocorda passam ao redor do lábio dorsal do blastóporo e se movem para o interior do embrião, elas formam uma coluna de tecido que se alonga dramaticamente por meio de extensão convergente. As células da notocorda também ficam inchadas com vacúolos, de modo que o bastão se alonga ainda mais e distende o embrião. A notocorda é a peculiaridade definidora dos cordados – o filo ao qual pertencem os vertebrados. É uma das principais características dos vertebrados, não tendo nenhum equivalente aparente em *Drosophila*. Nos cordados mais primitivos, os quais não possuem vértebras, a notocorda persiste como um substituto primitivo para a coluna vertebral. Nos vertebrados, ela funciona como um núcleo ao redor do qual outras células mesodérmicas irão finalmente se reunir para formar as vértebras.

Enquanto isso, outros movimentos estão ocorrendo na camada sobreposta de ectoderme, a fim de formar os rudimentos do sistema nervoso. Em um processo conhecido como *neurulação*, uma ampla região central de ectoderme, denominada *placa neural*, torna-se espessa, se enrola em um tubo e se desprende do resto da camada de células. O tubo assim criado a partir da ectoderme é chamado de **tubo neural**; ele irá formar o cérebro e a medula espinal (**Figura 22-78**).

Os mecanismos de neurulação dependem de alterações no empacotamento das células e na forma das células que fazem com que o epitélio se enrole em um tubo (**Figura**

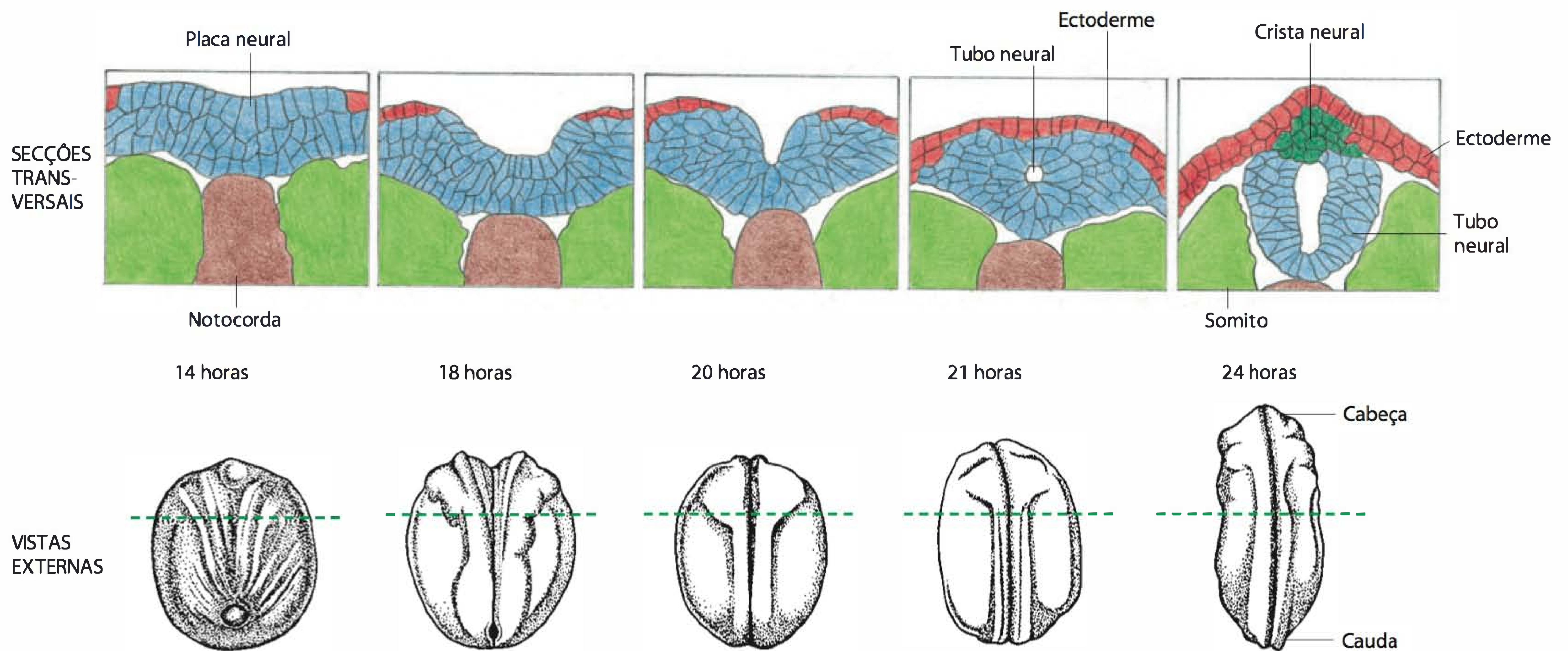


Figura 22-78 Formação do tubo neural em *Xenopus*. As vistas externas são a partir do lado dorsal. As secções transversais estão cortadas em um plano indicado pelas linhas tracejadas. (Segundo T. E. Schroeder, *J. Embryol. Exp. Morphol*. 23:427-462, 1970. Com permissão de The Company of Biologists.)

22-79). Os sinais, inicialmente do Organizador e posteriormente da notocorda e da mesoderme subjacentes, definem a extensão da placa neural, induzem os movimentos que fazem-na se enrolar e ajudam a organizar o padrão interno do tubo neural. A notocorda secreta particularmente a proteína Sonic hedgehog – um homólogo da proteína de sinalização Hedgehog de *Drosophila* – que atua como um morfógeno que controla a expressão gênica nos tecidos vizinhos (**Figura 22-80**).

Um oscilador da expressão gênica controla a segmentação da mesoderme para somitos

As mudanças geneticamente reguladas na adesão celular formam a base de um dos processos mais notáveis e característicos do desenvolvimento dos vertebrados – a formação dos segmentos do eixo do corpo.

Em cada lado do tubo neural recém-formado se encontra uma placa de mesoderme (ver Figura 22-72). Para formar as séries repetitivas de vértebras, costelas e músculos segmentares, esta placa se fragmenta em blocos separados, ou **somitos** – grupos coesivos de células, separados por fendas. A **Figura 22-81**A mostra o processo como ocorre no embrião de galinha. Os somitos se formam um após o outro, iniciando na cabeça e terminando na cauda. Dependendo da espécie, o número final de somitos varia de menos de 50 (em uma rã ou um pássaro) a mais de 300 (em uma cobra). A parte posterior e mais imatura da placa mesodérmica, denominada *mesoderme pré-somítica*, fornece o tecido necessário: à medida que ela recua em direção à cauda, estendendo o embrião, deposita uma trilha de somitos. O caráter especial da mesoderme pré-somítica é mantido por meio de sinalização FGF: o mRNA de *Fgf8* é sintetizado na extremidade da cauda do embrião e lentamente degradado à medida que as células se afastam desta região. A tradução da mensagem resulta em um gradiente de proteína FGF8 secretada, tendo seu ponto alto na extremidade da cauda.

A formação da fenda entre um somito e o próximo é prenunciada por um padrão espacial de alternância da expressão gênica na mesoderme pré-somítica: as células prestes a formar a parte posterior de um novo somito ativam a expressão de um conjunto de genes, enquanto aquelas destinadas a formar a parte anterior do próximo somito ativam a expressão de outro conjunto. A coesão seletiva resultante da expressão gênica diferencial parece ser a causa subjacente da segmentação física observada.

O problema, então, é entender como o padrão de alternância repetitiva da expressão gênica é montado. Estudos originalmente feitos em embriões de galinha deram o ponto de partida para uma resposta. Na parte posterior da mesoderme pré-somítica, a expressão de certos genes oscila ao longo do tempo. O primeiro gene oscilador de somito a ser descoberto foi o *Hes1*, um homólogo do gene *pair-rule Hairy* de *Drosophila* e dos genes *E(spl)* que medeiam respostas à sinalização Notch. A duração de um ciclo completo de oscila-

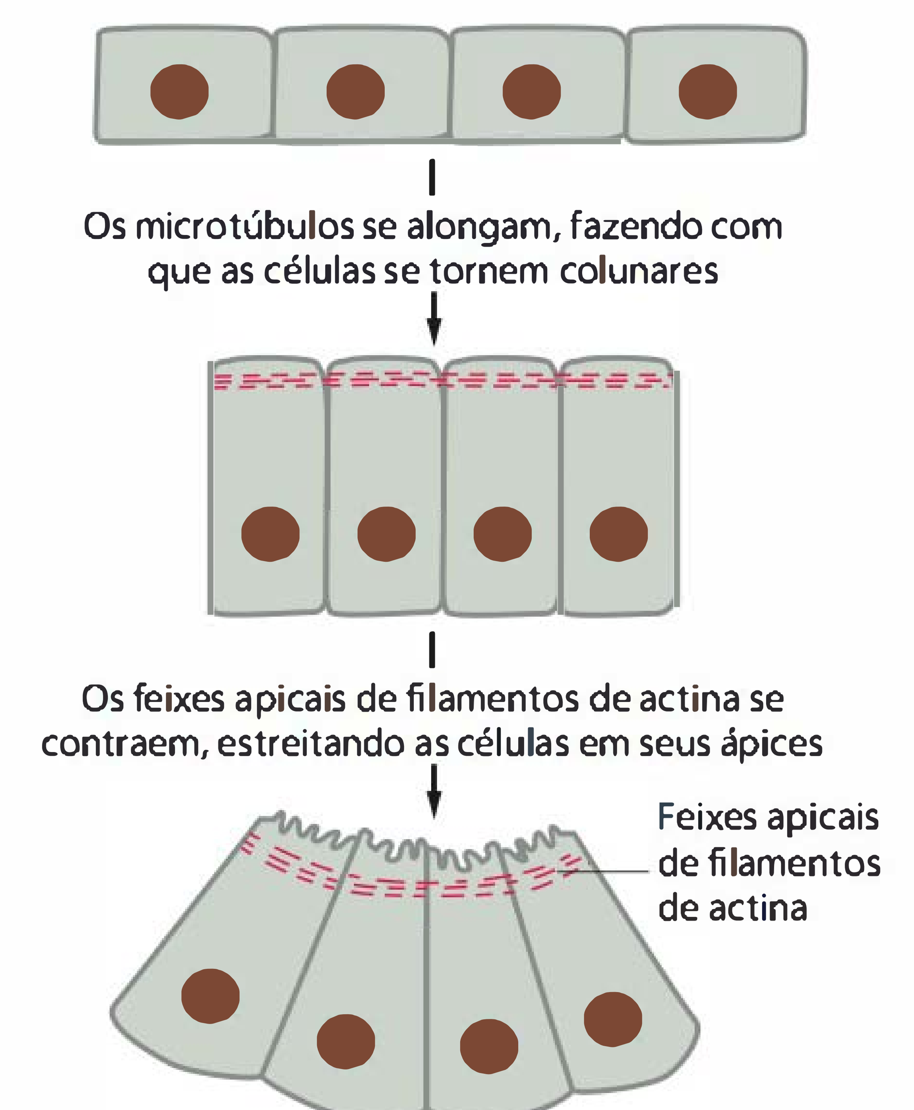


Figura 22-79 O dobramento de um epitélio por meio de alterações na morfologia celular mediadas por microtúbulos e filamentos de actina. O diagrama tem como base observações do processo de neurulação em tritões e salamandras, nos quais o epitélio apresenta somente uma camada celular de espessura. Quando as extremidades apicais das células ficam mais estreitas, a superfície superior de suas membranas se torna pregueada.

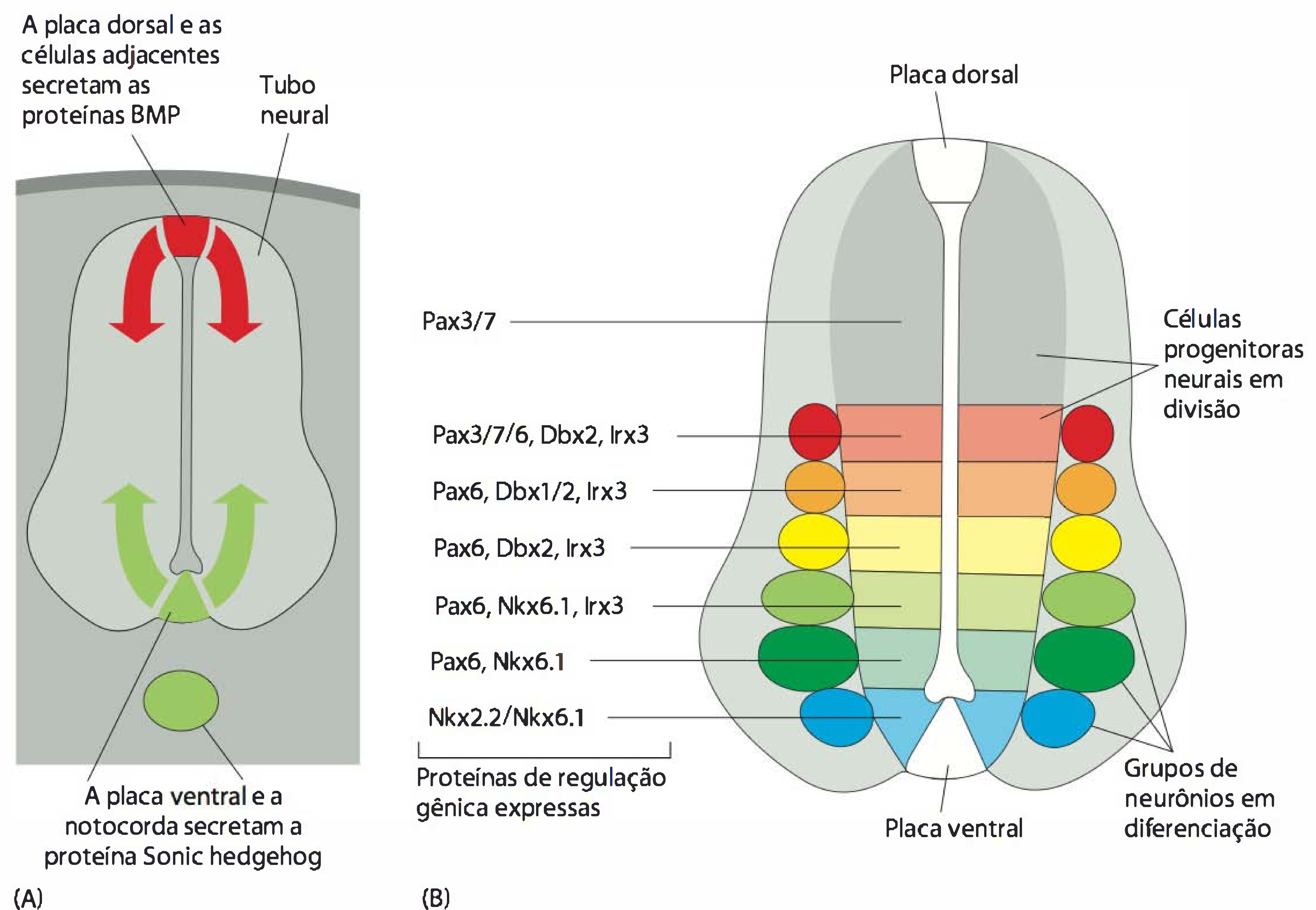


Figura 22-80 Secção transversal esquemática da medula espinal de um embrião de galinha, mostrando como células em diferentes níveis ao longo do eixo dorso-ventral expressam diferentes proteínas de regulação gênica. (A) Sinais que direcionam o padrão dorso-ventral: a proteína Sonic hedgehog da notocorda e da lâmina pavimentar (a linha média ventral do tubo neural) e as proteínas BMP da lâmina superior (a linha média dorsal) agem como morfógenos, controlando a expressão gênica. (B) Os padrões resultantes de expressão gênica na parte ventral da medula espinal em desenvolvimento. Diferentes grupos de células progenitoras neurais em proliferação (na zona ventricular, próxima ao lúmen do tubo neural) e de neurônios em diferenciação (na zona do manto, mais externamente) expressam diferentes combinações de proteínas de regulação gênica. Aquelas indicadas neste diagrama são, em sua maioria, membros da superfamília de homeodomínios; vários outros genes da mesma superfamília (incluindo as proteínas Islet/Lim) são expressos nos neurônios em diferenciação. Os neurônios que expressam diferentes proteínas de regulação gênica formarão conexões com diferentes parceiros e podem criar diferentes combinações de neurotransmissores e receptores.

ção deste **relógio de segmentação** (90 minutos na galinha) equivale ao tempo necessário para produzir um somito adicional. À medida que as células emergem da mesoderme pré-somítica para formar os somitos – em outras palavras, à medida que elas deixam de ser expostas ao sinal de FGF8 – sua oscilação diminui e por fim cessa. Algumas vêm a ser interrompidas em um estado, algumas em outro, de acordo com a fase de seu ciclo de oscilação no momento de saída da mesoderme pré-somítica. O *Hes1* e vários outros genes de oscilação codificam proteínas de regulação gênica; assim, as células que caem abaixo do nível crítico de FGF8, quando estão no pico de seu ciclo de oscilação, ativam um conjunto de genes reguladores, enquanto aquelas que ultrapassam o limiar na depressão do ciclo ativam outro (Figura 22-81B). Dessa maneira, acredita-se que a oscilação temporal da ex-

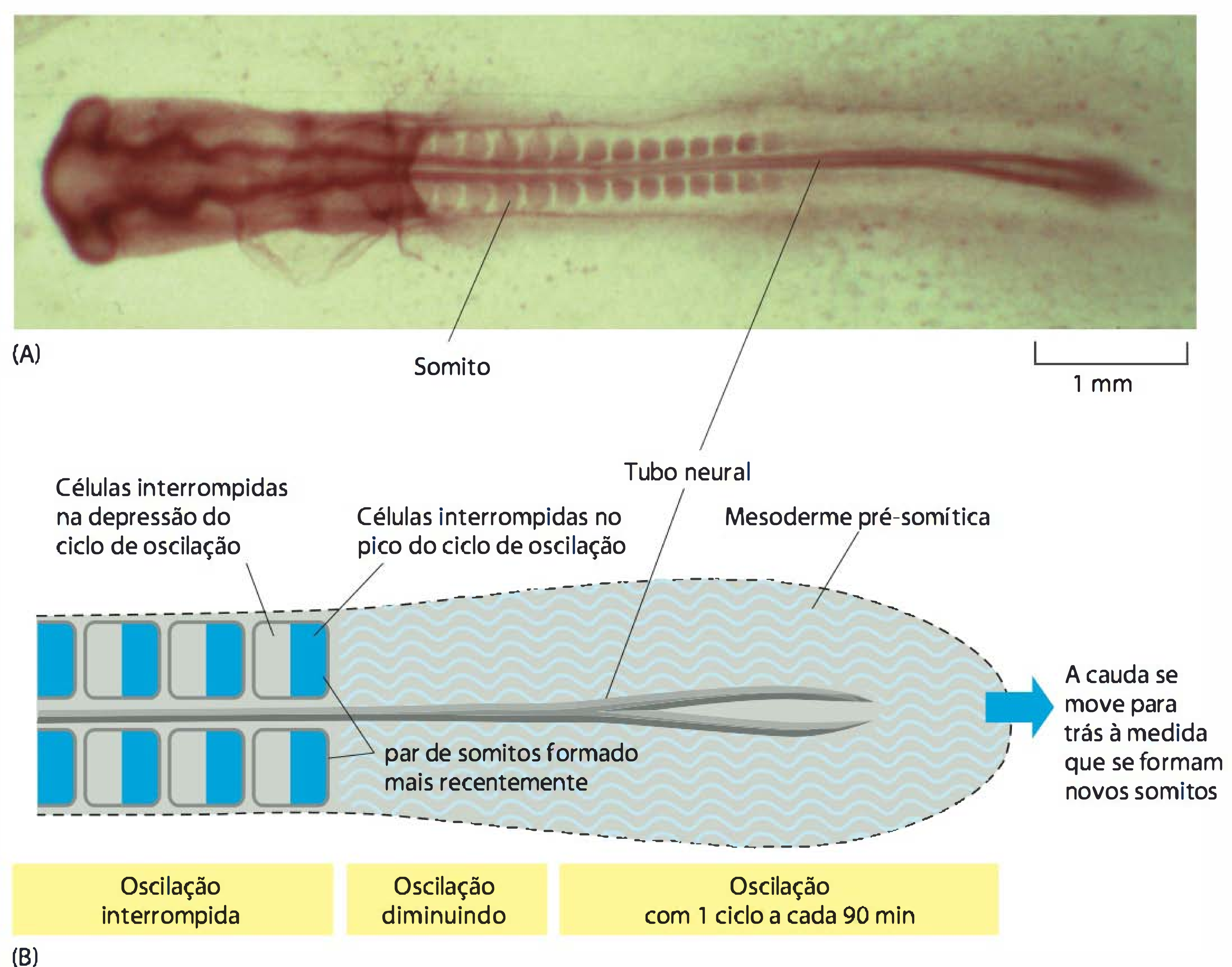


Figura 22-81 Formação de somitos no embrião de galinha. (A) Um embrião de galinha com 40 horas de incubação. (B) Modo como a oscilação temporal da expressão gênica na mesoderme pré-somítica se converte em um padrão de alternância espacial da expressão gênica nos somitos formados. Na parte posterior da mesoderme pré-somítica, cada célula oscila com um tempo de ciclo de 90 minutos. À medida que as células amadurecem e emergem da região pré-somítica, sua oscilação é gradativamente diminuída e finalmente levada a parar, deixando-as em um estado que depende da fase do ciclo em que elas estejam no momento crítico. Desta maneira, uma oscilação temporal da expressão gênica determina um padrão de alternância espacial. (A, de Y. J. Jiang, L. Smithers e J. Lewis, *Curr. Biol.* 8:R868-R871, 1998. Com permissão de Elsevier.)

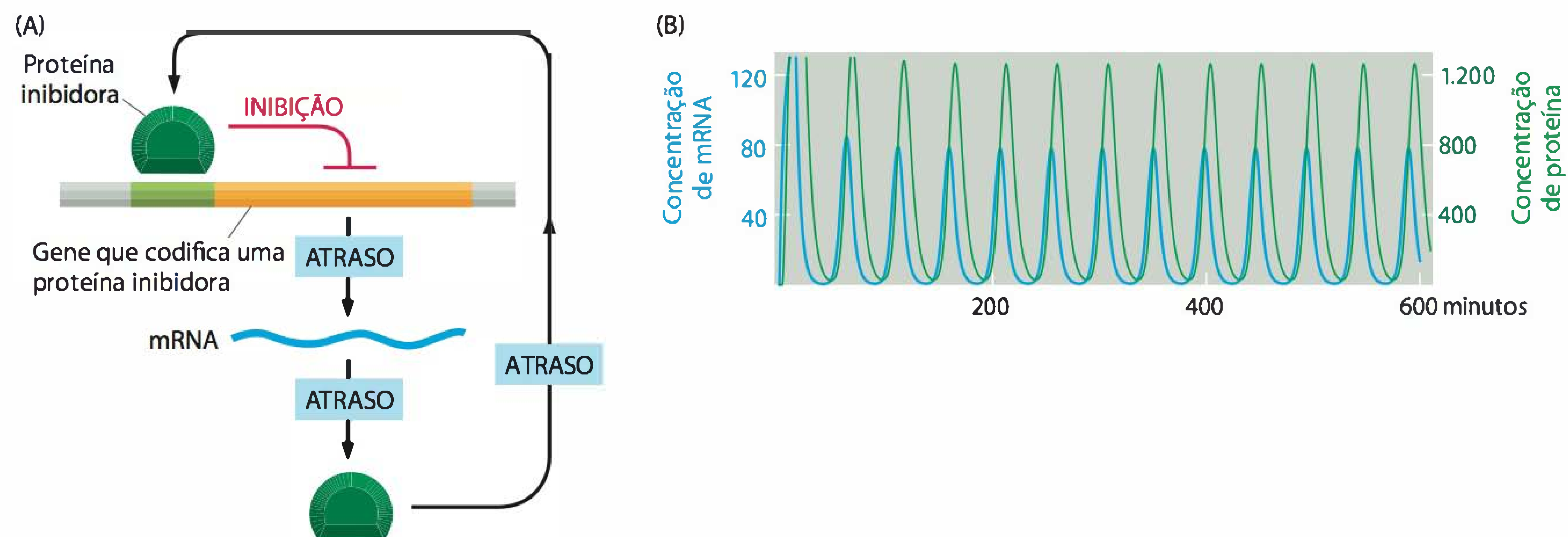


Figura 22-82 A retroalimentação negativa atrasada dá origem à expressão gênica oscilante. (A) Um único gene, codificando uma proteína de regulação gênica que inibe sua própria expressão, pode se comportar como um oscilador. Para que a oscilação ocorra, deve haver um atraso (ou vários atrasos) no circuito de retroalimentação, e os tempos de vida das moléculas de mRNA e proteína devem ser breves em comparação ao atraso total. O atraso determina o período de oscilação. De acordo com uma teoria, um circuito de retroalimentação como este, com base em um gene chamado de *Her7* no peixe-zebra, ou *Hes7* no camundongo (um parente do gene *Hes1*), é o marca-passo do relógio de segmentação que governa a formação dos somitos. (B) A oscilação prevista do mRNA de *Her7* e da proteína correspondente, computada usando-se estimativas aproximadas dos parâmetros do circuito de retroalimentação apropriados para este gene no peixe-zebra. As concentrações são medidas em número de moléculas por célula. O período previsto é próximo ao período observado, que é de 30 minutos por somito no peixe-zebra.

pressão gênica na mesoderme pré-somítica deixe seu rastro em um padrão espacialmente periódico de expressão gênica na mesoderme em maturação, e isso, por sua vez, dita como o tecido irá se fragmentar em blocos fisicamente separados.

A retroalimentação negativa retardada pode gerar as oscilações do relógio de segmentação

Qual é, então, o mecanismo que gera a oscilação temporal? Como funciona o relógio? No camundongo, descobriu-se que pelo menos três classes de genes apresentam um padrão de expressão oscilante na mesoderme pré-somítica, codificando componentes da via Notch, da via Wnt e da via Fgf, respectivamente; porém, sabe-se que a maioria das mutações que interrompem o relógio e desorganizam a segmentação dos somitos está localizada em componentes da via Notch. Aí estão incluídos genes (como o *Hes1* e, mais significativamente, seu parente *Hes7*) que são regulados por Notch e codificam proteínas de regulação gênica inibidoras. Algumas dessas proteínas agem diretamente no DNA regulador de seu próprio gene, de modo a inibir sua própria expressão. De acordo com uma teoria, este circuito de retroalimentação negativa simples poderia ser o gerador básico das oscilações (**Figura 22-82**): quando o gene é transcrito, a quantidade de seu produto proteico cessa; a proteína, então, decai, permitindo que a transcrição comece de novo, e assim por diante. Há um intervalo entre o início de um novo evento de transcrição e o primeiro aparecimento, no núcleo, das moléculas de proteínas reguladoras resultantes, porque leva um certo tempo para que a RNA-polimerase percorra o gene, para que o transcrito de RNA resultante amadureça, deixe o núcleo e direcione a síntese de uma molécula proteica, e para que a proteína entre no núcleo a fim de controlar a transcrição. Propõe-se que este atraso no circuito de retroalimentação seja o principal determinante do período de oscilação do relógio e, assim, do tamanho de cada somito.

A maioria das células de cada somito recém-formado irá rapidamente se diferenciar para formar um bloco de músculo, correspondente a um segmento de músculo do eixo principal do corpo. O embrião pode agora (e o faz) começar a se torcer. Os subconjuntos separados das células dos somitos irão formar as vértebras e outros tecidos conectivos, como a derme. Um subconjunto adicional se desprende do somito e migra para a mesoderme lateral não-segmentada, arrastando-se pelos espaços entre outras células: esses emigrantes irão dar origem a praticamente todas as outras células musculares esqueléticas do corpo, incluindo as dos membros.

Os tecidos embrionários são invadidos de modo estritamente controlado por células migratórias

Os precursores das células musculares, ou *mioblastos*, que emigram dos somitos estão determinados, mas não completamente diferenciados. Nos tecidos que colonizam, eles irão se misturar com outras classes de células das quais parecem praticamente indistintos; contudo, irão manter a expressão de proteínas de regulação gênica específicas de mioblastos (como a Pax3 e os membros da família MyoD) e, quando chegar o momento da diferenciação, eles, e somente eles, irão se transformar em células musculares (**Figura 22-83**).

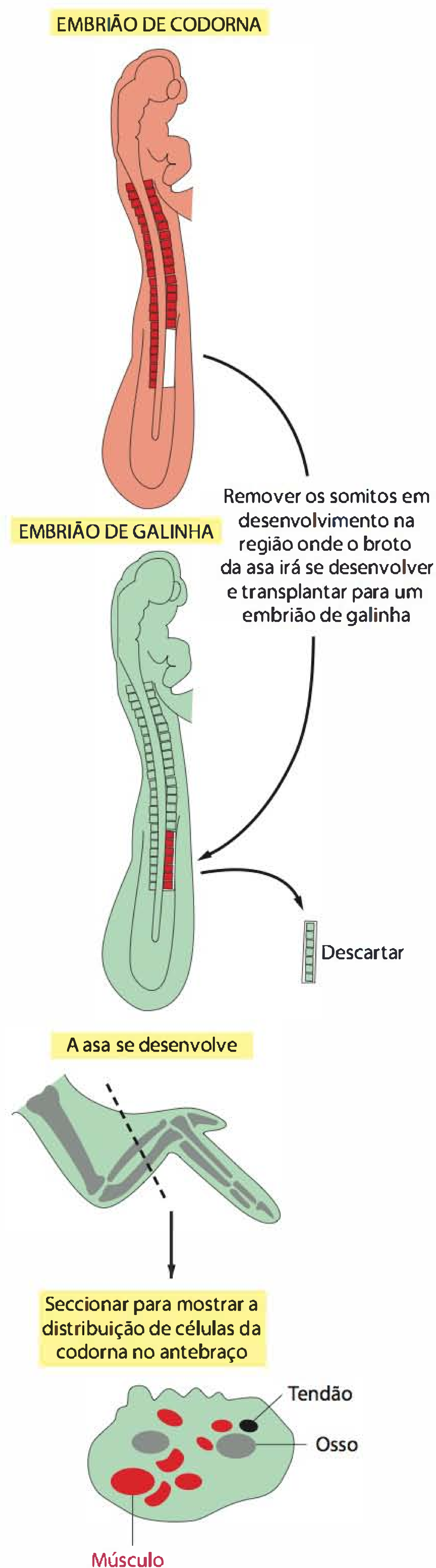


Figura 22-83 A origem migratória das células musculares dos membros. As migrações podem ser localizadas pelo transplante de células de um embrião de codorna em um embrião de galinha; as duas espécies são muito semelhantes em seu desenvolvimento, mas as células de codorna são reconhecidas pela aparência distinta de seus nucléolos. Se as células dos somitos de codorna forem substituídas pelas células dos somitos de um embrião de galinha de dois dias de incubação e a asa da galinha for seccionada uma semana mais tarde, será observado que as células musculares na asa da galinha derivam dos somitos transplantados da codorna.

O padrão final dos músculos – nos membros, por exemplo – é determinado pelas vias que as células migrantes seguem e pela seleção dos sítios que elas colonizam. Os tecidos conectivos embrionários formam uma estrutura que é percorrida pelos mioblastos e que propicia sinais que orientam sua distribuição. Não importa de qual somito eles provêm, os mioblastos que migram para um broto de um membro anterior formarão o padrão de músculos apropriados para um membro anterior, e aqueles que migram para um broto de um membro posterior formarão o padrão apropriado para um membro posterior.

Enquanto isso, outras classes de células migratórias selecionam diferentes vias para a execução de seus percursos. Ao longo da linha onde o tubo neural se desprende da futura epiderme, diversas células ectodérmicas se separam do epitélio e também migram como indivíduos através da mesoderme (**Figura 22-84**). Estas são as células da **crista neural**; elas irão dar origem a praticamente todos os neurônios e todas as células gliais do sistema nervoso periférico, assim como às células pigmentares da pele e a muitos tecidos conectivos na cabeça, incluindo os ossos do crânio e dos maxilares. Outros migrantes importantes são os precursores das células sanguíneas, das células germinativas e de muitos grupos de neurônios dentro do sistema nervoso central, assim como as *células endoteliais* que formam os vasos sanguíneos. Cada uma dessas classes de viajantes colonizará um conjunto diferente de sítios. Como resultado de tais invasões, a maioria dos tecidos no corpo de um vertebrado é uma mistura de células com diferentes características derivadas de partes amplamente separadas do embrião.

Quando uma célula migrante percorre os tecidos embrionários, ela repetidamente estende projeções que sondam suas adjacências imediatas, testando a presença de sinais sutis aos quais ela é particularmente sensível, em virtude de sua variedade específica de proteínas receptoras de superfície celular. Dentro da célula, essas proteínas receptoras estão conectadas ao citoesqueleto, o qual movimenta a célula. Alguns materiais da matriz extracelu-

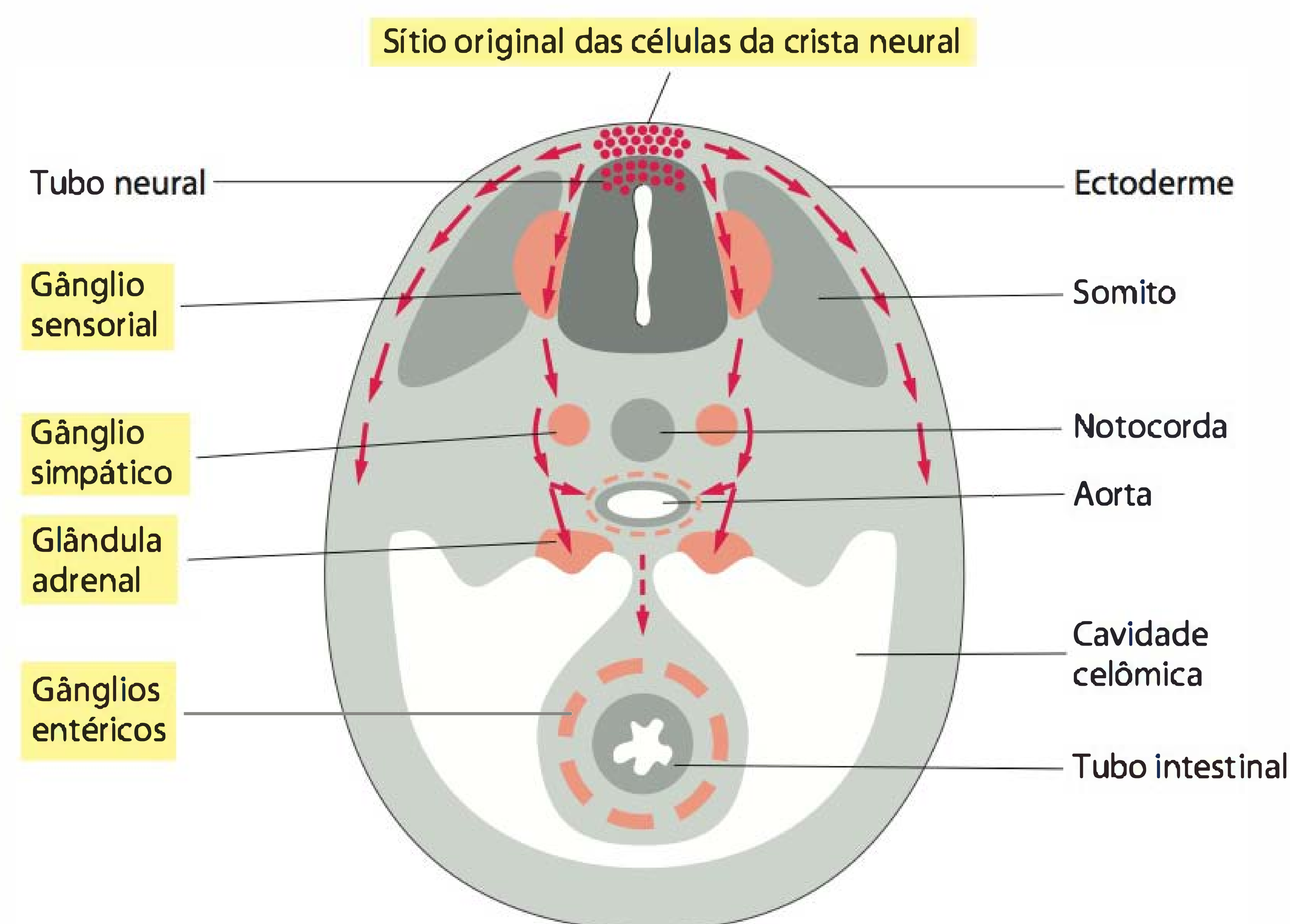


Figura 22-84 As principais vias de migração celular da crista neural. Um embrião de galinha é mostrado em uma secção transversal esquemática através da parte mediana do tronco. Derivados da crista neural que se situam no fundo estão indicados por caixas de texto *amarelas*. As células que tomam o caminho logo abaixo da ectoderme formarão as células pigmentares da pele; aquelas que tomam o caminho mais interno, via somitos, formarão os neurônios, as células gliais dos gânglios sensoriais e simpáticos e partes da glândula adrenal. Os neurônios e as células gliais dos gânglios entéricos, na parede do intestino, são formados a partir de células da crista neural que migram ao longo da extensão do corpo, originadas ou da região do pescoço ou da região sacral. Em *Drosophila*, os neurônios na parede do intestino se originam de maneira similar, pela migração a partir da extremidade da cabeça do embrião. (Ver também Figura 19-23.)

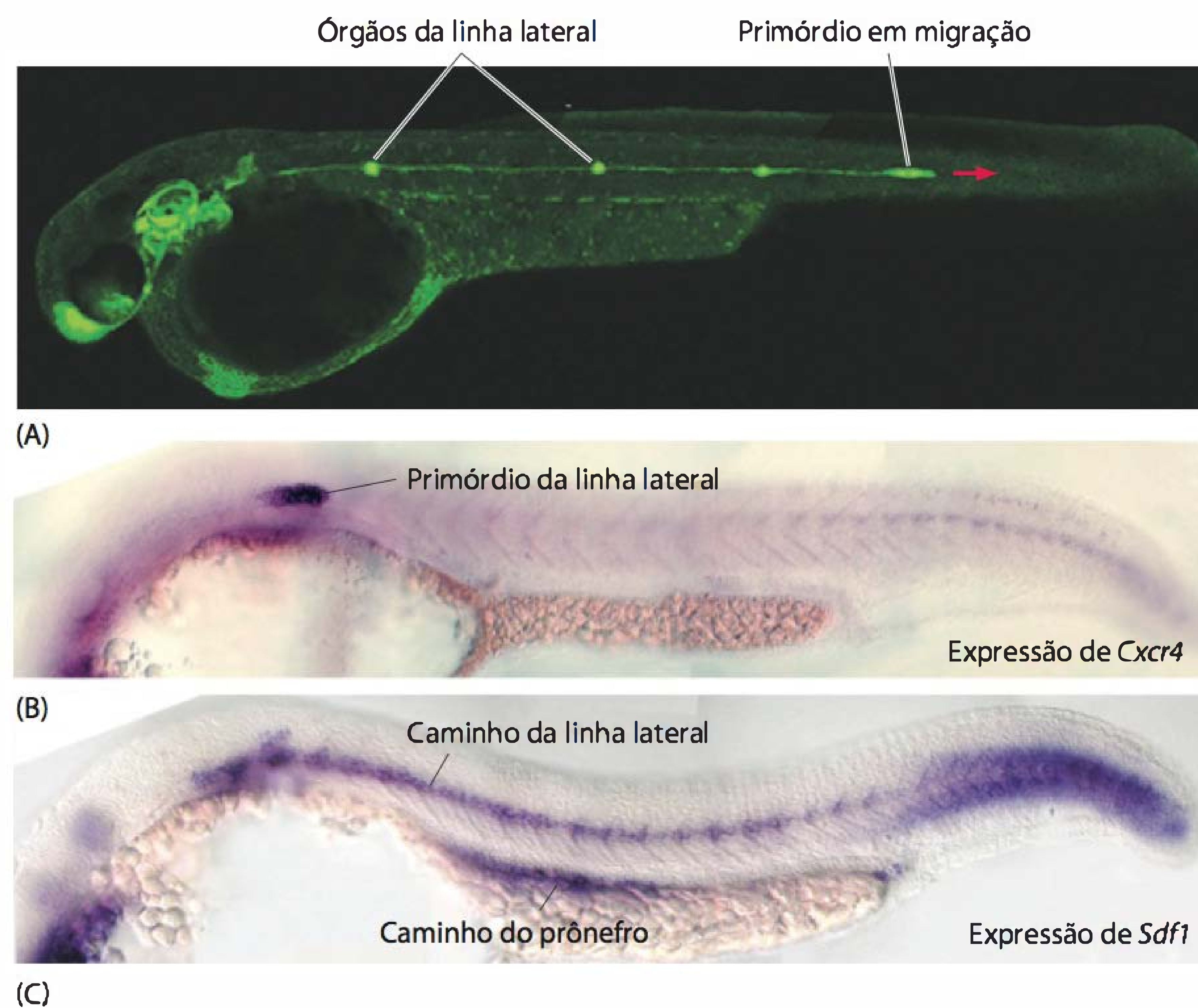


Figura 22-85 Migração do primórdio da linha lateral em uma larva de peixe-zebra, guiada por SDF1 e CXCR4. A linha lateral é uma série de órgãos mecano-sensoriais, intimamente semelhantes às manchas sensoriais do ouvido interno, as quais detectam o movimento da água acima da superfície em um peixe ou anfíbio. (A) Eles se originam como agrupamentos de células depositados por um primórdio que migra ao longo do flanco da larva, a partir de um sítio na cabeça até a cauda, como mostrado nesta larva de dois dias na qual as células da linha lateral estão marcadas pela expressão da Proteína Verde Fluorescente. (B) As células no primórdio expressam o receptor de quimiotaxia CXCR4, aqui mostrado por hibridização *in situ* em uma larva de 1 dia. (C) A trilha que elas seguirão é marcada pela expressão do ligante SDF1, mostrado por hibridização *in situ* em outro espécime de 1 dia. Se o ligante estiver ausente ao longo da via normal (como resultado de uma mutação), o primórdio se desvia de sua via apropriada e segue uma trilha alternativa mais ventral, marcada por outra faixa de SDF1, que define o caminho normal de outra estrutura migratória, o pronefro. (A, cortesia de David Gilmour; B e C, de N. B. David et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:16297-16302, 2002. Com permissão de National Academy of Sciences.)

lar, como a proteína fibronectina, propiciam sítios adesivos que ajudam a célula a avançar; outros, como o proteoglicano de sulfato de condroitina, inibem a locomoção e repelem a imigração. As células não-migrantes ao longo da via podem, da mesma forma, possuir superfícies convidativas ou repelentes, ou podem até mesmo estender filopódios que tocam a célula migrante e afetam seu comportamento.

Entre essa grande quantidade de diferentes influências controladoras, algumas se sobressaem como especialmente importantes. Em particular, muitos tipos diferentes de células são guiados por quimiotaxia, que depende de um receptor chamado de CXCR4. Esta proteína de superfície celular pertence à família de receptores acoplados à proteína G e é ativada por um ligante extracelular denominado SDF1. As células que expressam a CXCR4 podem detectar seu caminho ao longo de trilhas marcadas pela produção de SDF (**Figura 22-85**). A quimiotaxia em direção a fontes de SDF1 desempenha um papel importante na orientação das migrações de linfócitos e de várias outras células brancas do sangue; de neurônios no cérebro em desenvolvimento; de células progenitoras musculares que entram nos brotos dos membros; de células germinativas primordiais que se movem em direção às gônadas; e de células cancerosas que se espalham por metástase.

A distribuição das células migrantes depende de fatores de sobrevivência, assim como de sinais de direcionamento

A distribuição final das células migrantes depende não somente das vias que elas tomam, mas também do fato de sobreviverem ou não à jornada e de prosperarem ou não no ambiente que encontrarão no final da jornada. Sítios específicos fornecem os fatores de sobrevivência necessários a cada tipo específico de célula migrante. Por exemplo, as células da crista neural que dão origem às células de pigmentação da pele e às células nervosas do intestino dependem de um fator peptídico chamado de *endotelina-3*, que é secretado por tecidos nas vias de migração; camundongos mutantes e humanos com deficiência no gene para este fator ou para seu receptor apresentam regiões não-pigmentadas (albinas) e mal-formações potencialmente letais no intestino resultantes da ausência de inervação intestinal (uma condição chamada de megacolo, devido à grande distensão do cólon).

As células germinativas, os precursores das células sanguíneas e as células de pigmentação derivadas da crista neural parecem todos compartilhar pelo menos um requisito comum para sua sobrevivência, envolvendo um receptor transmembrana, denominado *proteína Kit*, na membrana das células migrantes, e um ligante, denominado *fator Steel*, produzido pelas células do tecido através do qual as células migram e/ou no qual vêm a se estabelecer. Indivíduos com mutações nos genes para qualquer uma dessas proteínas são deficientes quanto à pigmentação, ao suprimento de células sanguíneas e à produção de células germinativas (**Figura 22-86**).



Figura 22-86 Efeito de mutações no gene *Kit*. Tanto o bebê como o camundongo são heterozigotos para uma mutação de perda de função que os deixa com somente a metade da quantidade normal do produto do gene *Kit*. Em ambos os casos, a pigmentação é defectiva, porque as células pigmentares dependem do produto de Kit como receptor para um fator de sobrevivência. (Cortesia de R. A. Fleischman, de *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:10885-10889, 1991. Com permissão de National Academy of Sciences.)

A assimetria esquerda-direita do corpo dos vertebrados deriva da assimetria molecular no embrião jovem

Vistos de fora, os vertebrados podem parecer bilateralmente simétricos, mas muitos de seus órgãos internos – o coração, o estômago, o fígado, e assim por diante – são muito assimétricos. Essa assimetria é bastante reproduzível: 99,98% das pessoas têm o coração no lado esquerdo. Vimos como o embrião de um vertebrado desenvolve suas camadas de tecido internas e externas e seus eixos ântero-posterior e dorso-ventral. Contudo, como surge a assimetria esquerda-direita?

Estudos genéticos em mamíferos mostram que esse problema pode ser dividido em duas questões distintas – uma relacionada à criação da assimetria e outra relacionada a sua orientação. Em humanos e camundongos, conhecem-se várias mutações que ocasionam uma randomização do eixo esquerda-direita: 50% dos indivíduos mutantes têm seus órgãos internos arranjados da forma normal, enquanto os outros 50% apresentam uma anatomia invertida, com o coração no lado direito. Nestes indivíduos, ao que parece, o mecanismo que torna os lados esquerdo e direito diferentes funcionou corretamente, mas o mecanismo que decide entre as duas orientações possíveis do eixo esquerda-direita está defectivo.

A chave para a base desses fenômenos vem da descoberta de assimetrias moleculares que precedem as primeiras assimetrias anatômicas maiores. Os sinais mais precoces são vistos em padrões de expressão gênica na vizinhança do *nodo* – o homólogo, no camundongo e na galinha, ao Organizador das rãs. Em particular, o gene *Nodal*, que codifica um membro da superfamília TGFβ, é expresso assimetricamente nesta região (não somente no camundongo, mas também na galinha, na rã e no peixe-zebra) (**Figura 22-87**). A assimetria da expressão de *Nodal* na vizinhança imediata do nodo é transmitida para fora a fim de

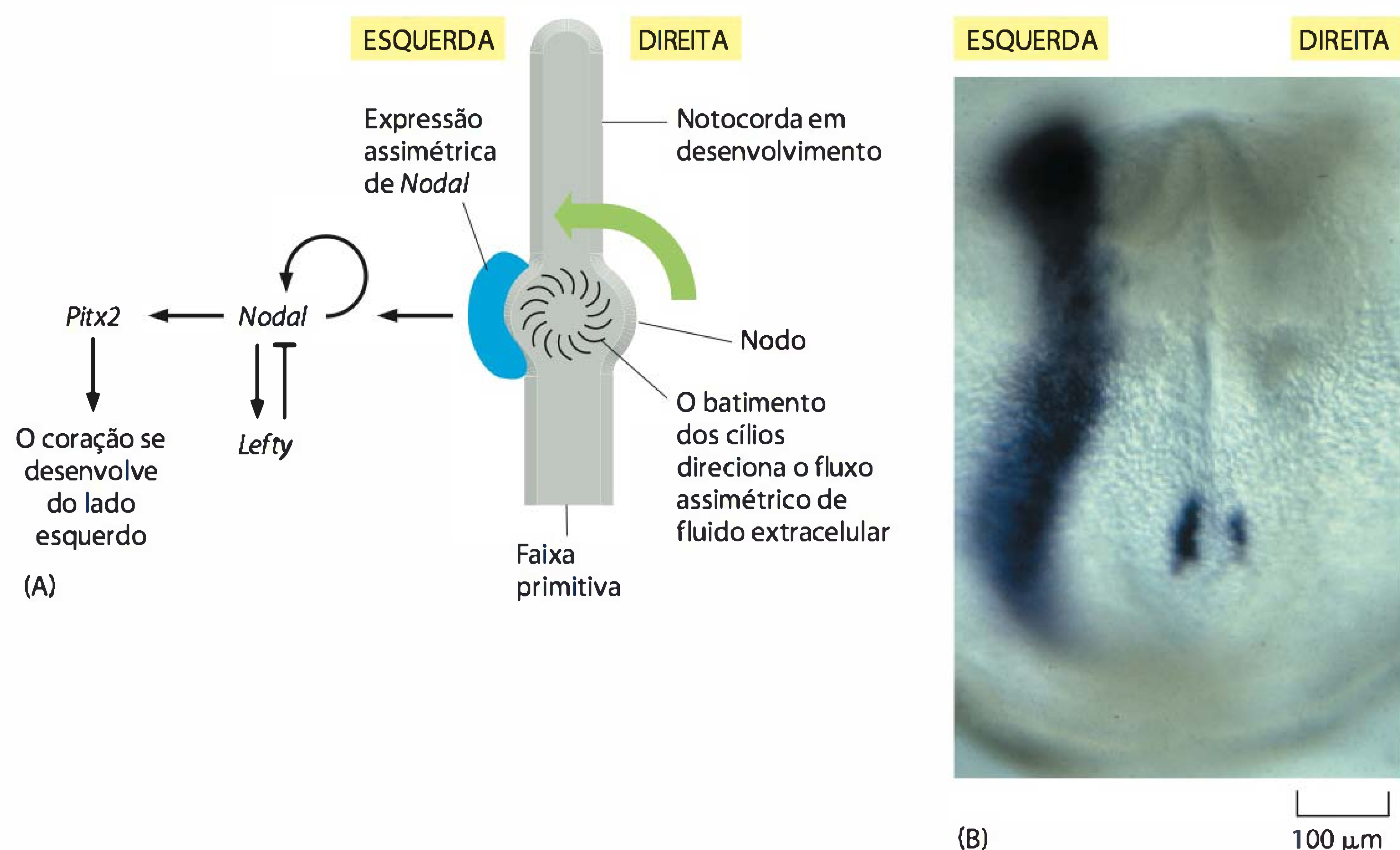


Figura 22-87 Batimento helicoidal dos cílios no nodo e as origens da assimetria esquerda-direita. (A) O batimento dos cílios direciona uma corrente de fluido em direção a um lado do nodo, e isso leva à expressão gênica assimétrica na vizinhança do nodo. Segundo uma teoria, o fluxo exerce este efeito pelo transporte de proteínas-sinal extracelulares a um lado. Outra teoria observa que os cílios também podem funcionar como mecanossensores, e propõe que um subgrupo de cílios no nodo responde à deflexão devida à corrente de fluido pela abertura de canais de Ca^{2+}, de modo a criar um aumento da concentração de Ca^{2+} nas células em um lado. (B) O padrão de expressão assimétrico resultante de *Nodal*, que codifica uma proteína-sinal pertencente à superfamília TGFβ, na vizinhança do nodo (*os dois pontos azuis inferiores*) em um embrião de camundongo de 8 dias de gestação, como mostrado por hibridização *in situ*. Neste estágio, a assimetria já foi retransmitida em direção à parte externa até a mesoderme da lâmina lateral, onde *Nodal* é expresso no lado esquerdo (*porção azul grande e alongada*), mas não no direito. (B, cortesia de Elizabeth Robertson.)

criar uma ampla faixa de expressão de *Nodal* na mesoderme ao longo do lado esquerdo – e somente do lado esquerdo – do corpo do embrião. O mecanismo que transmite a assimetria a partir do nodo e localiza a expressão de *Nodal* não é entendido e pode variar entre as diferentes classes de vertebrados. Em todas as espécies, contudo, ele parece depender de circuitos de retroalimentação que envolvem, além de *Nodal*, um segundo conjunto de genes, os genes *Lefty*. Estes, como o próprio *Nodal*, são diretamente regulados pela via de sinalização Nodal, e seus produtos, as proteínas Lefty, são relacionados a Nodal. Porém, as proteínas Lefty se difundem mais amplamente e agem contrariamente, como antagonistas de Nodal. Camundongos com uma mutação nocaute no gene *Lefty1* frequentemente apresentam o lado direito convertido em uma imagem especular do esquerdo, de forma que a simetria esquerda-direita se perde.

Outro gene diretamente regulado pela via Nodal, *Pitx2*, que codifica uma proteína de regulação gênica, vincula o resultado das interações entre Nodal/Lefty ao desenvolvimento anatômico subsequente. A Nodal controla a expressão de *Pitx2* no lado esquerdo do corpo e, com isso, confere assimetria ao coração e a outros órgãos internos.

Isso nos deixa com o quebra-cabeça de como a assimetria inicial da expressão de *Nodal* se origina. Seja qual for o mecanismo, o resultado dos eventos no nodo em um animal normal deve ser influenciado de tal forma que os genes específicos do lado esquerdo sejam regularmente expressos no lado esquerdo: deve haver uma ligação entre o mecanismo que cria a assimetria e o mecanismo que a orienta. Um indício para o mecanismo de orientação foi primeiramente observado em uma clínica de infertilidade da Suécia. Descobriu-se que um pequeno subconjunto de homens inférteis possuía espermatozoides sem mobilidade devido a um defeito nas moléculas de dineína necessárias ao batimento dos cílios e flagelos. Esses homens também sofriam de bronquite crônica e sinusite, porque os cílios em seus tratos respiratórios eram defeituosos. E, surpreendentemente, 50% deles tinham os órgãos internos esquerda-direita invertidos, com o coração à direita. As descobertas originalmente pareceram completamente misteriosas; porém, efeitos similares são vistos em mamíferos com outras mutações que resultam em cílios defeituosos. Isso sugere que o batimento ciliar, de algum modo, controla como o eixo esquerda-direita é orientado.

A videomicroscopia em tempo real em um embrião vivo de camundongo revela que as células do nodo, em sua face interna, são dotadas de cílios que batem de modo helicoidal: como uma rosca de parafuso, essas células têm um sentido definido e, no nodo, elas estão arranjadas em uma pequena concavidade que é moldada de forma que seus batimentos direcionam uma corrente de fluido ao lado esquerdo (ver Figura 22-87A). Segundo uma teoria, acredita-se que as proteínas-sinal carregadas nesta corrente produzam a tendência que orienta o eixo esquerda-direita do corpo do camundongo. Outra teoria propõe que os cílios, neste sistema, como em outros contextos, agem não somente como direcionadores do fluxo de fluido, mas também como sensores mecânicos, respondendo à deflexão pela geração de uma corrente assimétrica de íons Ca^{2+} que atravessa o nodo e influencia o tecido adjacente.

O sentido do batimento ciliar reflete o sentido – a assimetria esquerda-direita – das moléculas orgânicas das quais todos os seres vivos são feitos. Parece que isso, portanto, é a diretriz final da assimetria esquerda-direita de nossa anatomia.

Resumo

O desenvolvimento animal envolve movimentos celulares dramáticos. Assim, na gastrulação, as células do exterior do embrião jovem se dobram para o interior para formar a cavidade intestinal e criar as três camadas germinativas – endoderme, mesoderme e ectoderme – a partir das quais são construídos os animais superiores. Nos vertebrados, os movimentos da gastrulação são organizados por sinais do Organizador (o lábio dorsal do blastóporo de anfíbios, correspondente ao nodo em um embrião de galinha ou camundongo). Esses sinais especificam o eixo dorso-ventral do corpo e governam a extensão convergente, na qual o folheto de células que se move para o interior do corpo se estende ao longo do eixo cabeça-cauda enquanto se estreita em ângulos retos a este eixo. Os movimentos ativos de re-empacotamento de células individuais que dirigem a extensão convergente são coordenados pela via de sinalização de polaridade planar Frizzled/Dishevelled – um ramo da via de sinalização Wnt que regula o citoesqueleto de actina.

O desenvolvimento subsequente envolve muitos movimentos celulares adicionais. Parte da ectoderme se torna espessa, enrolando-se e se desprendendo para formar o tubo neural e a crista neural. Na linha média, um bastão de células especializadas denominado notocorda se

alonga para formar o eixo central do embrião. As longas placas de mesoderme em cada lado da notocorda vêm a ser segmentadas em somitos. Células migrantes, como as da crista neural, desprendem-se de seus vizinhos originais e percorrem o embrião para colonizar novos sítios. Células germinativas primordiais e muitas outras migrantes são guiadas por quimiotaxia dependente do receptor CXCR4 e de seu ligante SDF1. Moléculas específicas de adesão celular, como as caderinas e integrinas, auxiliam no direcionamento das migrações e controlam a coesão seletiva das células em novos arranjos.

Finalmente, o padrão de movimentos celulares é direcionado pelo padrão de expressão gênica, o qual determina as propriedades da superfície celular e a mobilidade. Assim, a formação dos somitos depende de um padrão periódico de expressão gênica, que é estabelecido por um oscilador bioquímico – o relógio de segmentação – na mesoderme e que dita a maneira pela qual a massa de células irá se dividir em blocos separados. Similarmente, a assimetria anatômica esquerda-direita do corpo dos vertebrados é prenunciada pela assimetria esquerda-direita no padrão de expressão gênica no embrião jovem. Acredita-se que essa assimetria, pelo menos em mamíferos, seja em última análise direcionada pelo sentido do batimento ciliar na vizinhança do nodo.

O CAMUNDONGO

O embrião de camundongo – minúsculo e inacessível no útero de sua mãe – representa um desafio difícil para os biólogos do desenvolvimento. Contudo, ele tem dois atrativos imediatos. Primeiro, o camundongo é um mamífero, e os mamíferos são os animais que mais interessam a nós, humanos. Segundo, entre os mamíferos, ele é um dos mais convenientes para estudos genéticos, porque é pequeno e se reproduz rapidamente. Esses dois fatores têm estimulado um enorme esforço de pesquisa, resultando no desenvolvimento de algumas ferramentas extraordinariamente potentes. Desta maneira, o camundongo tornou-se o principal organismo-modelo para a experimentação em genética de mamíferos e o mais intensivamente estudado substituto para humanos. Ele está evolutivamente separado dos humanos por apenas cerca de cem milhões de anos. Seu genoma tem o mesmo tamanho que o nosso e existe uma correspondência muito próxima de um para um entre os genes de camundongos e os de humanos. Nossas proteínas são, tipicamente, de 80 a 90% idênticas quanto à sequência de aminoácidos, e grandes blocos de estreita similaridade quanto à sequência de nucleotídeos também são evidentes, quando as sequências reguladoras de DNA são comparadas.

Por meio de engenhosidade e perseverança, os biólogos do desenvolvimento encontraram meios para ter acesso ao embrião jovem de camundongo sem matá-lo e para gerar camundongos com mutações em qualquer gene selecionado. Quase todas as modificações genéticas que podem ser feitas em um verme, uma mosca ou um peixe-zebra agora também podem ser feitas no camundongo e, em alguns casos, até de forma melhor. Os custos com pesquisa em camundongos são muito maiores, mas também são maiores os incentivos. Como resultado, o camundongo se tornou uma fonte rica de informação sobre todos os aspectos da genética molecular do desenvolvimento – um sistema modelo-chave não somente para mamíferos, mas também para outros animais. Ele proporcionou, por exemplo, muito do que sabemos sobre os genes *Hox*, a simetria esquerda-direita, os controles da morte celular, o papel da sinalização Notch e uma série de outros tópicos.

Já fizemos repetidamente uso de dados do camundongo. Iremos utilizá-los ainda mais no próximo capítulo, em que discutiremos os tecidos adultos e os processos de desenvolvimento que ocorrem neles. Nesta seção, examinaremos as características especiais do desenvolvimento do camundongo que têm sido exploradas para possibilitar a manipulação genética. Por meio de exemplos, delinearemos também como o camundongo tem sido usado para esclarecer um importante processo adicional do desenvolvimento – a criação de órgãos, como pulmões e glândulas, por interações entre tecido conectivo embrionário e epitélio.

O desenvolvimento de mamíferos começa com um preâmbulo especializado

O embrião dos mamíferos começa seu desenvolvimento de uma maneira excepcional. Protegido dentro do útero, ele não tem a mesma necessidade que os embriões da maioria das outras espécies têm de completar as etapas iniciais do desenvolvimento rapidamente. Além disso, o desenvolvimento de uma placenta prontamente fornece nutrição a partir da mãe, de

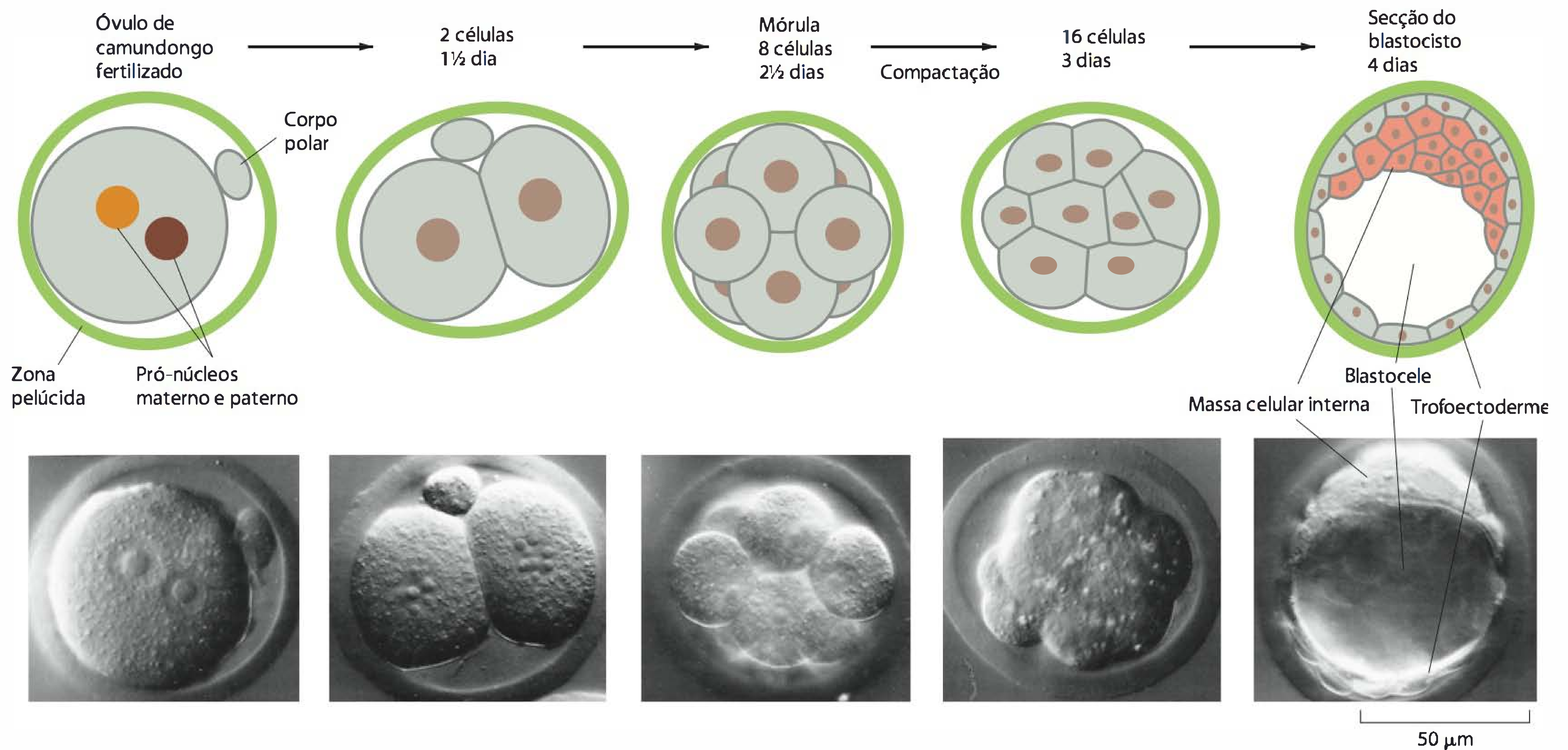
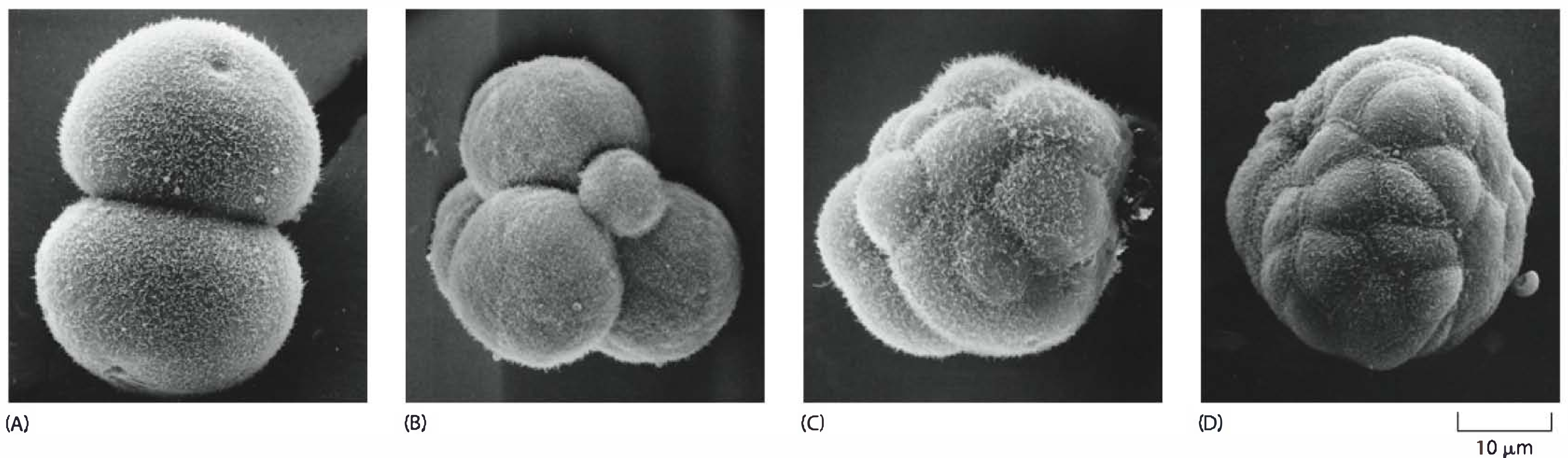


Figura 22-88 Os estágios iniciais do desenvolvimento do camundongo. A zona pelúcida é uma cápsula gelatinosa da qual o embrião se livra após alguns dias, o que lhe permite se implantar na parede do útero. (Fotografias cortesia de Patricia Calarco.)

forma que o ovo não precisa conter grandes reservas de matérias-primas, como o vitelo, por exemplo. O ovo de um camundongo tem um diâmetro de apenas cerca de 80 μm e, portanto, um volume cerca de 2.000 vezes menor que um ovo típico de anfíbio. Suas divisões por clivagem não ocorrem mais rapidamente que as divisões de muitas células somáticas comuns, e a transcrição gênica já se inicia no estágio de duas células. O mais importante é que, enquanto os estágios posteriores do desenvolvimento de mamíferos são similares àqueles de outros vertebrados, como *Xenopus*, os mamíferos começam tomando um grande desvio no desenvolvimento para gerar um conjunto complicado de estruturas – notavelmente o saco amniótico e a placenta – que envolvem e protegem adequadamente o embrião e propiciam a troca de metabólitos com a mãe. Essas estruturas, assim como o resto do corpo, derivam do óvulo fertilizado, mas são chamadas de *extraembrionárias* porque são descartadas ao nascimento e não fazem parte do adulto. Estruturas acessórias similares também se formam no desenvolvimento de aves e répteis.

Os estágios iniciais do desenvolvimento do camundongo estão resumidos na **Figura 22-88**. O óvulo fertilizado se divide e gera 16 células até três dias após a fertilização. Inicialmente, as células ficam presas umas às outras apenas frouxamente, mas ao começar o estágio de 8 células elas se tornam mais coesivas e sofrem *compactação*, formando uma bola sólida de células denominada *mórula* (palavra em latim para "pequena amora") (**Figura 22-89**). Formam-se junções compactas apicais entre as células, lacrando o interior da mórula do meio externo. Logo após isso, uma cavidade interna se desenvolve, convertendo a mórula em um *blastocisto* – uma esfera oca. A camada externa de células, que forma a parede da esfera, é chamada de *trofoectoderme*. Ela dará origem aos tecidos extra-embrionários. Um

Figura 22-89 Micrografias eletrônicas de varredura do embrião jovem de camundongo. A zona pelúcida foi removida. (A) Estágio de duas células. (B) Estágio de quatro células (um corpo polar é visível, além dos quatro blastômeros – ver Figura 21-23). (C) Mórula com 8 a 16 células – a compactação está ocorrendo. (D) Blastocisto. (A-C, cortesia de Patricia Calarco; D, de P. Calarco e C. J. Epstein, *Dev. Biol.* 32:208-213, 1973. Com permissão de Academic Press.)



agrupamento interno de células, chamado de *massa celular interna*, está localizado em um lado da cavidade. Ele dará origem à totalidade do embrião propriamente dito.

Após o embrião ter se livrado de sua cápsula gelatinosa (em cerca de quatro dias), as células da trofoectoderme estabelecem um estreito contato com a parede do útero, iniciando o processo de implantação que levará à formação da placenta. Enquanto isso, a massa celular interna cresce e começa a se diferenciar. Parte dela dá origem a algumas estruturas extraembrionárias adicionais, como o saco vitelínico, enquanto o resto segue em frente para formar o embrião propriamente dito pelos processos de gastrulação, neurulação, e assim por diante, que são fundamentalmente similares àqueles vistos em outros vertebrados, embora distorções da geometria muitas vezes tornem a homologia difícil de ser discernida à primeira vista.

O embrião jovem de mamíferos é altamente regulador

Os determinantes intracelulares localizados têm apenas um pequeno papel no desenvolvimento inicial dos mamíferos, e os blastômeros produzidos pelas primeiras poucas divisões celulares são extraordinariamente adaptáveis. Se o embrião jovem for dividido em dois, um par de gêmeos idênticos pode ser produzido – dois indivíduos normais completos a partir de uma única célula. Similarmente, se uma das células em um embrião de camundongo com duas células for destruída perfurando-a com uma agulha e o "meio embrião" resultante for colocado no útero de uma mãe adotiva para se desenvolver, em muitos casos um camundongo perfeitamente normal irá se formar.

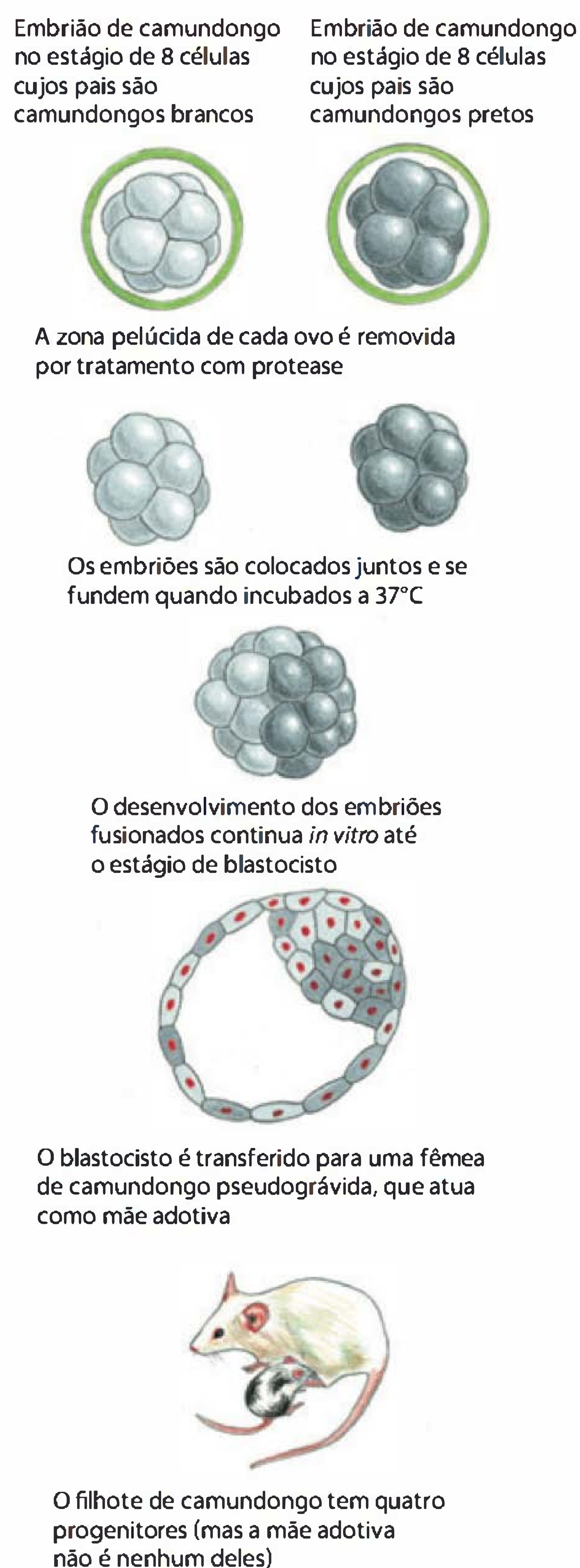


Figura 22-90 Procedimento para criar um camundongo quimérico. Duas mórulas de diferentes genótipos são combinadas.

Inversamente, dois embriões de camundongo com 8 células podem ser combinados para formar uma única mórula gigante que, então, se desenvolve em um camundongo de estrutura e tamanho normais (**Figura 22-90**). Tais criaturas, formadas a partir de agregados de grupos de células geneticamente diferentes, são chamadas de *quimeras*. As quimeras também podem ser obtidas por meio da injeção de células de um embrião jovem de um genótipo em um blastocisto de outro genótipo. As células injetadas vêm a ser incorporadas na massa celular interna do blastocisto hospedeiro, e um animal quimérico se desenvolve. Desta maneira, uma única célula coletada de um embrião de 8 células ou da massa celular interna de outro blastocisto jovem pode dar origem a qualquer combinação de tipos celulares na quimera. Onde quer que a célula adicionada venha a ser encontrada, ela responde corretamente a estímulos de seus vizinhos e segue o caminho apropriado de desenvolvimento.

Essas descobertas têm duas implicações. Primeiro, durante os estágios iniciais, o sistema de desenvolvimento está se autoajustando, de forma que uma estrutura normal se desenvolve mesmo se as condições iniciais forem perturbadas. Embriões ou partes de embriões que têm esta propriedade são denominados **reguladores**. Segundo, as células individuais da massa celular interna são inicialmente *totipotentes*, ou quase totalmente: embora elas não possam formar o trofoblasto, podem dar origem a qualquer parte do corpo adulto, incluindo as células germinativas.

As células-tronco embrionárias totipotentes podem ser obtidas a partir de um embrião de mamífero

Se um embrião jovem de camundongo normal é enxertado no rim ou testículo de um adulto, seu desenvolvimento é perturbado além de qualquer possibilidade de regulação adequada, mas não é interrompido. O resultado é um crescimento tumoroso bizarro conhecido como *teratoma*, que consiste em uma massa desorganizada de células contendo muitos tipos de tecidos diferenciados – pele, osso, epitélio glandular, e assim por diante – misturados com células-tronco não-diferenciadas que continuam a se dividir e gerar ainda mais esses tecidos diferenciados.

A investigação das células-tronco em teratomas e tipos relacionados de tumores levou à descoberta de que seu comportamento reflete uma propriedade notável das células normais da massa celular interna: em um ambiente adequado, elas podem ser induzidas a se proliferar indefinidamente enquanto retiverem seu caráter totipotente. Células cultivadas que possuem esta propriedade são chamadas de **células-tronco embrionárias** ou **células ES** (de *embryonic stem cells*). Elas podem ser derivadas colocando-se uma massa celular interna normal em cultura e dispersando as células tão logo proliferem. Separar as células de suas vizinhas normais e colocá-las no meio de cultura apropriado evidentemente interrompe o programa normal de mudança de características celulares e, assim, permite que as células continuem a se

dividir indefinidamente sem diferenciação. Muitos tecidos do corpo adulto também contêm células-tronco que podem se dividir indefinidamente sem diferenciação terminal, como veremos no próximo capítulo; porém, estas *células-tronco adultas*, quando se diferenciam, normalmente dão origem somente a uma série bastante restrita de tipos celulares diferenciados.

O estado no qual as células ES são interrompidas parece ser equivalente àquele de células normais da massa celular interna. Pode-se mostrar isso coletando células ES da placa de cultura e injetando-as em um blastocisto normal (**Figura 22-91**). As células injetadas se incorporam à massa celular interna do blastocisto e podem contribuir para a formação de um camundongo quimérico aparentemente normal. As descendentes das células-tronco injetadas podem ser encontradas em praticamente qualquer tecido deste camundongo, onde elas se diferenciam de uma maneira bem-comportada e apropriada para o local, podendo até mesmo formar células germinativas viáveis. O comportamento extraordinariamente adaptável das células ES mostra que sinais dos vizinhos de uma célula não somente orientam escolhas entre diferentes vias de diferenciação, mas também podem parar ou iniciar o relógio do desenvolvimento – os processos que impelem uma célula a progredir do estado embrionário para o adulto.

Em nível prático, as células ES têm uma dupla importância. Primeiro, do ponto de vista médico, elas oferecem a perspectiva de uma fonte versátil de células para o reparo de tecidos danificados e defectivos no corpo adulto, como discutiremos no final do próximo capítulo. Segundo, as células ES tornam possíveis as formas mais precisamente controladas de modificação genética, permitindo que animais sejam criados com praticamente qualquer alteração desejada introduzida em seu genoma. Como discutido no Capítulo 8, a técnica usa a recombinação genética para substituir uma sequência de DNA normal por um segmento de DNA construído artificialmente em um local selecionado do genoma de uma célula ES. Embora apenas uma rara célula incorpore a construção de DNA corretamente, foram elaborados procedimentos de seleção para encontrar esta célula entre as milhares de outras nas quais a construção de DNA foi transfectada. Uma vez selecionadas, as células ES geneticamente modificadas podem ser injetadas em um blastocisto para formar um camundongo quimérico. Este camundongo irá, com sorte, ter algumas células germinativas derivadas de ES, capazes de atuar como fundadoras de uma nova geração de camundongos que consistem inteiramente em células carregando a mutação cuidadosamente projetada. Desta maneira, um camundongo mutante completo pode ser ressuscitado a partir da placa de cultura (ver Figura 8-65).

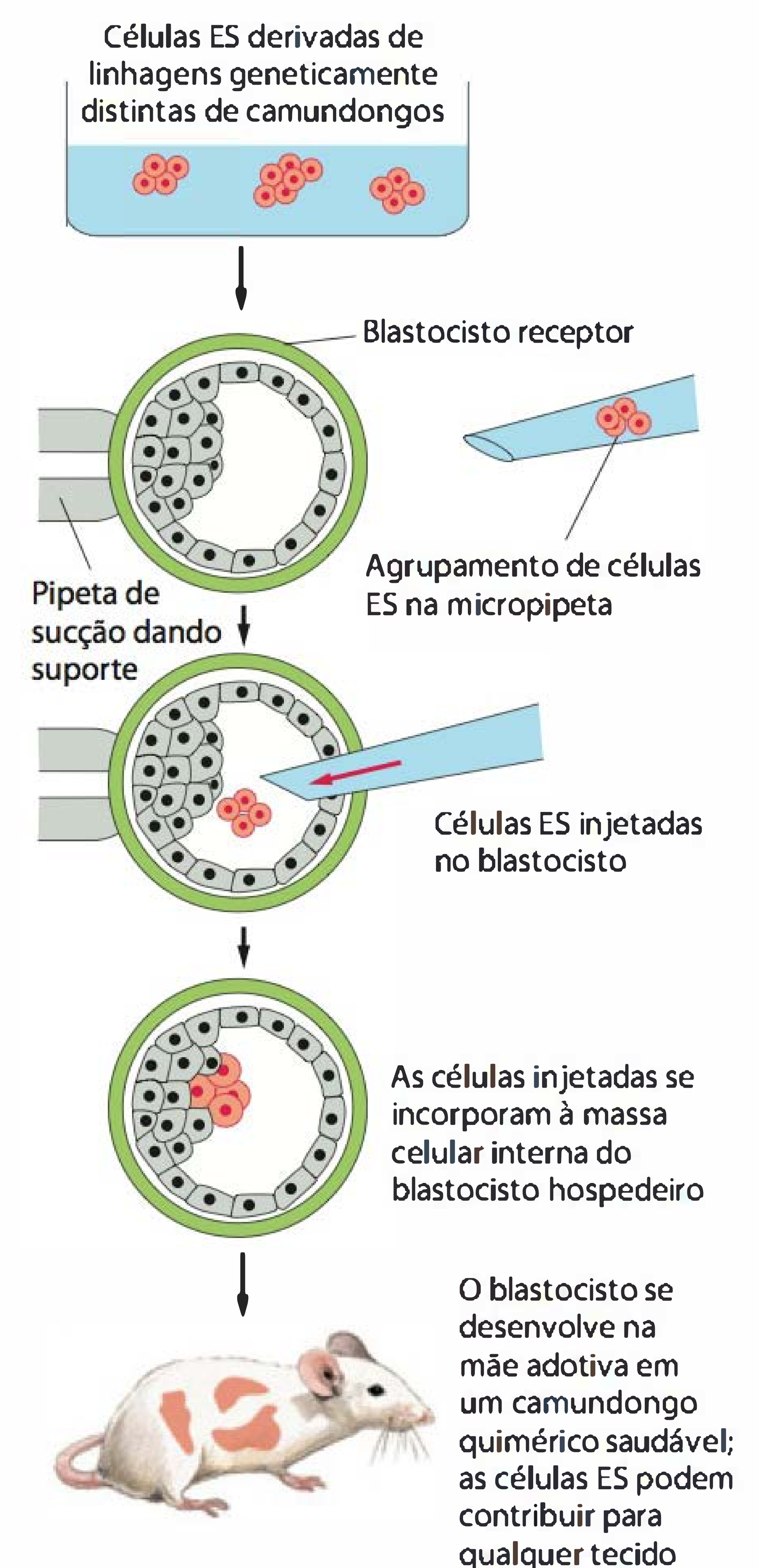


Figura 22-91 Fazendo um camundongo quimérico com células ES. As células ES em cultura podem se combinar com as células de um blastocisto normal para formar um camundongo quimérico saudável e podem contribuir para qualquer um de seus tecidos, incluindo a linhagem germinativa. Portanto, as células ES são totipotentes.

Interações entre o epitélio e o mesênquima geram estruturas tubulares ramificadas

Os vertebrados são animais comparativamente grandes, devendo muito de seu tamanho aos tecidos conectivos. Contudo, para a excreção, a absorção de nutrientes e as trocas gasosas, eles também requerem grandes quantidades de vários tipos especializados de superfícies epiteliais. Muitos desses tipos tomam a forma de estruturas tubulares criadas por meio de *morfogênese por ramificação*, na qual um epitélio invade o tecido conectivo embrionário (mesênquima) para formar um órgão composto. O pulmão é um exemplo típico. Ele se origina da endoderme que reveste a parte basal da porção anterior do intestino. Este epitélio brota e se expande para dentro do mesênquima vizinho para formar a *árvore brônquica*, um sistema de tubos que se ramificam repetidamente à medida que se estendem (**Figura 22-92**). O mesmo mesênquima também é invadido por células endoteliais – as células que revestem os vasos sanguíneos – para criar o sistema de vias aéreas e vasos sanguíneos intimamente justapostos necessário às trocas gasosas nos pulmões (discutido no Capítulo 23).

Todo o processo depende de trocas de sinais em ambas as direções entre os brotos em crescimento do epitélio e o mesênquima que estão invadindo. Esses sinais podem ser analisados por meio de manipulações genéticas no camundongo. Um papel central é desempenhado por proteínas-sinal da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) e por receptores de tirosina-cinases sobre os quais eles atuam. Essas vias de sinalização têm vários papéis no desenvolvimento, mas parecem ser especialmente importantes nas muitas interações que ocorrem entre o epitélio e o mesênquima.

Os mamíferos têm cerca de 20 diferentes genes *Fgf*, em comparação com três em *Drosophila* e dois em *C. elegans*. O *Fgf* mais importante nos pulmões é o *Fgf10*. Este é expresso em agrupamentos de células mesenquimais próximas às extremidades dos tubos epiteliais em crescimento, enquanto seu receptor é expresso nas próprias células epiteliais. O FGF10 ou

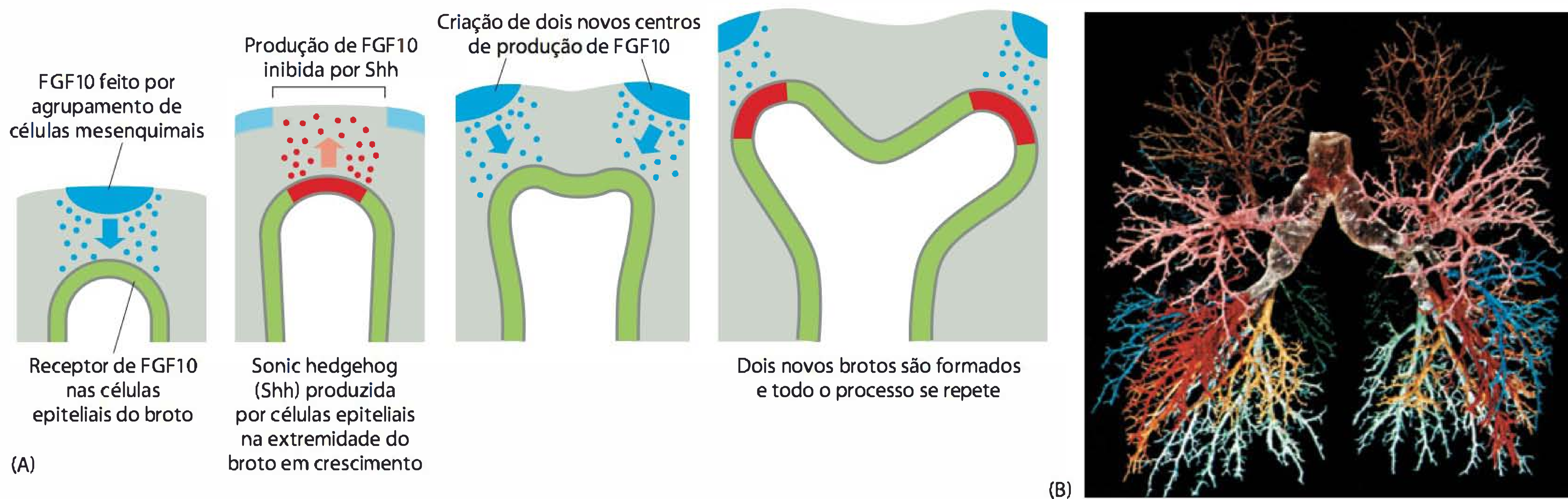


Figura 22-92 Morfogênese por ramificação nos pulmões. (A) Como se acredita que FGF10 e Sonic hedgehog induzam o crescimento e a ramificação dos brotos da árvore brônquica. Muitas outras moléculas-sinal, como BMP4, também são expressas neste sistema, e o mecanismo de ramificação sugerido é apenas uma das várias possibilidades. (B) Molde da árvore brônquica de um humano adulto, preparada pela injeção de resina nas vias aéreas; resinas de diferentes cores foram injetadas nas diferentes ramificações da árvore. (B, de R. Warwick e P. L. Williams, Gray's Anatomy, 35th ed. Edinburgh: Longman, 1973.)

seu receptor podem ser nocauteados (pelas técnicas-padrão com base na recombinação de células ES). No camundongo mutante nocauteado resultante, todo o processo de morfogênese por ramificação então falha – um broto primário de epitélio pulmonar é formado, mas não se expande para dentro do mesênquima para criar uma árvore brônquica. Inversamente, uma esfera microscópica embebida em FGF10 e colocada próxima a um epitélio pulmonar embrionário em cultura induzirá a formação de um broto, que se expandirá em direção a ela. Evidentemente, o epitélio invade o mesênquima apenas por convite, em resposta a FGF10.

Contudo, o que faz com que os tubos epiteliais em crescimento se ramifiquem repetidamente, à medida que efetuam a invasão? Isso parece depender de um sinal Sonic hedgehog que é enviado na direção oposta, a partir das células epiteliais nas extremidades dos brotos, de volta para o mesênquima. Em camundongos sem Sonic hedgehog, o epitélio dos pulmões cresce e se diferencia, mas forma um saco em vez de uma árvore ramificada de túbulos. Enquanto isso, o FGF10, em vez de estar restrito a pequenos agrupamentos de células mesenquimais, com cada agrupamento atuando como um sinal para direcionar o crescimento de um broto epitelial separado, é expresso em amplas bandas de células imediatamente adjacentes ao epitélio. Essa descoberta sugere que o sinal Sonic hedgehog pode servir para cortar a expressão de FGF10 nas células mesenquimais mais próximas à extremidade crescente de um broto, dividindo o agrupamento secretor de FGF10 em dois agrupamentos separados, os quais, por sua vez, fazem com que o broto se ramifique em dois (ver Figura 22-92A).

O crescimento por ramificação tanto do epitélio como do mesênquima tem de ser coordenado com o desenvolvimento dos vasos sanguíneos associados, e todo o processo envolve um grande número de sinais adicionais. Muitos aspectos do sistema ainda não são entendidos. Sabe-se, contudo, que *Drosophila* utiliza mecanismos intimamente relacionados para governar a morfogênese por ramificação de seu sistema traqueal – os túbulos que formam as vias aéreas de um inseto. Novamente, o processo depende da proteína FGF de *Drosophila*, codificada pelo gene *Branchless*, e do receptor FGF de *Drosophila*, codificado pelo gene *Breathless*, ambos operando de forma muito semelhante à observada no camundongo. Na verdade, estudos genéticos do desenvolvimento traqueal em *Drosophila* também identificaram outros componentes da maquinaria de controle, e os genes de *Drosophila* nos levaram a seus homólogos em vertebrados. As manipulações genéticas no camundongo nos deram os meios para testar se esses genes também possuem funções similares nos mamíferos; e, em um grau extraordinário, eles o fazem.

Resumo

O camundongo tem um papel central como organismo-modelo para o estudo da genética molecular do desenvolvimento de mamíferos. O desenvolvimento do camundongo é essencialmente similar ao de outros vertebrados, mas começa com um preâmbulo especializado para formar estruturas extraembrionárias, como o âmnio e a placenta. Técnicas potentes foram elaboradas para a criação de nocautes gênicos e outras alterações genéticas marcadas pela exploração de propriedades altamente reguladoras das células da massa celular interna do embrião de camundongo. Essas células podem ser colocadas em cultura e mantidas como células-tronco embrionárias (células ES). Sob condições corretas de cultura, as células ES podem se proliferar indefinidamente sem diferenciação,

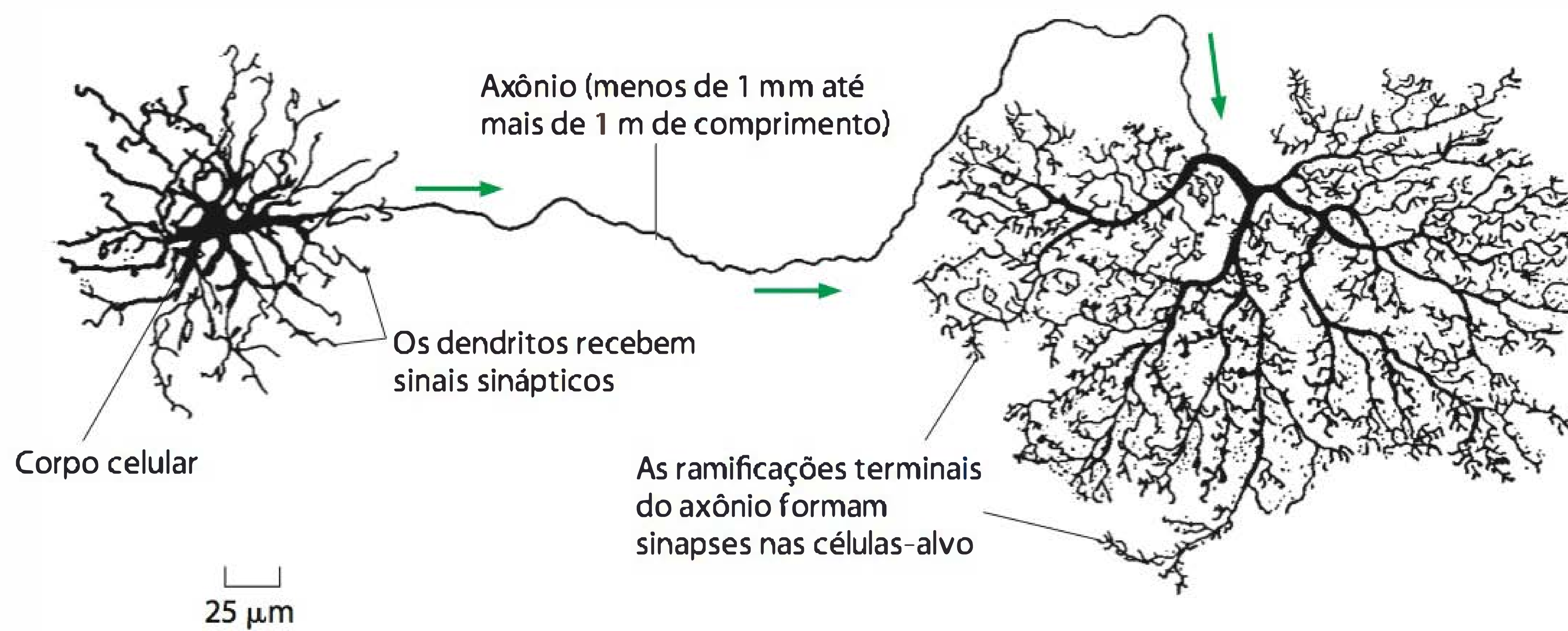


Figura 22-93 Um neurônio típico de um vertebrado. As setas indicam a direção em que os sinais são transmitidos. O neurônio mostrado é da retina de um macaco. Os maiores e mais longos neurônios humanos se estendem por cerca de 1 milhão de μm e têm um axônio com 15 μm de diâmetro. (Desenho de neurônio de B. B. Boycott, em Essays on the Nervous System [R. Bellairs e E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

enquanto retêm a capacidade de dar origem a qualquer parte do corpo quando injetadas de volta em um embrião jovem de camundongo.

Muitos processos gerais do desenvolvimento, incluindo a maioria daqueles discutidos neste capítulo, foram esclarecidos por estudos em camundongos. Apenas como um exemplo, o camundongo tem sido utilizado para investigar o controle da morfogênese por ramificação. Este processo dá origem a estruturas como, por exemplo, pulmões e glândulas, e é governado por trocas de sinais entre as células mesenquimais e o epitélio invasor. As funções desses sinais podem ser analisadas por experimentos de nocaute gênico.

DESENVOLVIMENTO NEURAL

As **células nervosas**, ou **neurônios**, estão entre os mais antigos de todos os tipos celulares especializados de animais. Sua estrutura não é comparável com a de nenhuma outra classe de células, e o desenvolvimento do sistema nervoso apresenta problemas que não têm paralelo real em outros tecidos. Um neurônio é sobretudo extraordinário por sua forma bastante estendida, com um *axônio* longo e *dendritos* ramificados que o conectam por meio de sinapses a outras células (**Figura 22-93**). O desafio central do desenvolvimento neural é explicar como os axônios e dendritos crescem, encontram seus parceiros corretos e estabelecem sinapses com os mesmos de forma seletiva, criando uma rede funcional (**Figura 22-94**). O problema é formidável: o cérebro humano contém mais de 10^{11} neurônios, cada um dos quais, em média, deve fazer conexões com milhares de outros, de acordo com um plano de ligação previsível e regular. A precisão necessária não é tão grande como a existente em um computador artificial, pois o cérebro realiza suas computações de maneira diferente e é mais tolerante aos caprichos dos componentes individuais; no entanto, o cérebro supera todas as outras estruturas biológicas em sua complexidade organizada.

Os componentes de um sistema nervoso típico – as várias classes de neurônios, células gliais, células sensoriais e músculos – originam-se em diversos locais extensamente separados no embrião e, inicialmente, não estão conectados. Assim, na primeira fase do desenvolvimento neural (**Figura 22-95**), as diferentes partes se desenvolvem de acordo com seus próprios programas locais: os neurônios nascem e características específicas lhes são atribuídas de acordo com o local e o momento de seu nascimento, sob o controle de sinais indutivos e mecanismos de regulação gênica similares àqueles que já discutimos para outros tecidos do corpo. A próxima fase envolve um tipo de morfogênese única ao sistema nervoso: os axônios e dendritos crescem ao longo de vias específicas, estabelecendo uma rede provisória, mas organizada, de conexões entre as partes separadas do sistema. Na terceira fase e final, que continua pela vida adulta, as conexões são ajustadas e aperfeiçoadas por meio de interações entre os componentes amplamente distribuídos de uma maneira que depende dos sinais elétricos que passam entre eles.

São designadas diferentes características aos neurônios de acordo com o momento e o local onde nasceram

Os neurônios são quase sempre produzidos em associação com as **células gliais**, que propiciam uma estrutura de suporte e criam um ambiente fechado e protegido no qual os neurônios podem realizar suas funções. Ambos os tipos de células, em todos os animais, desen-

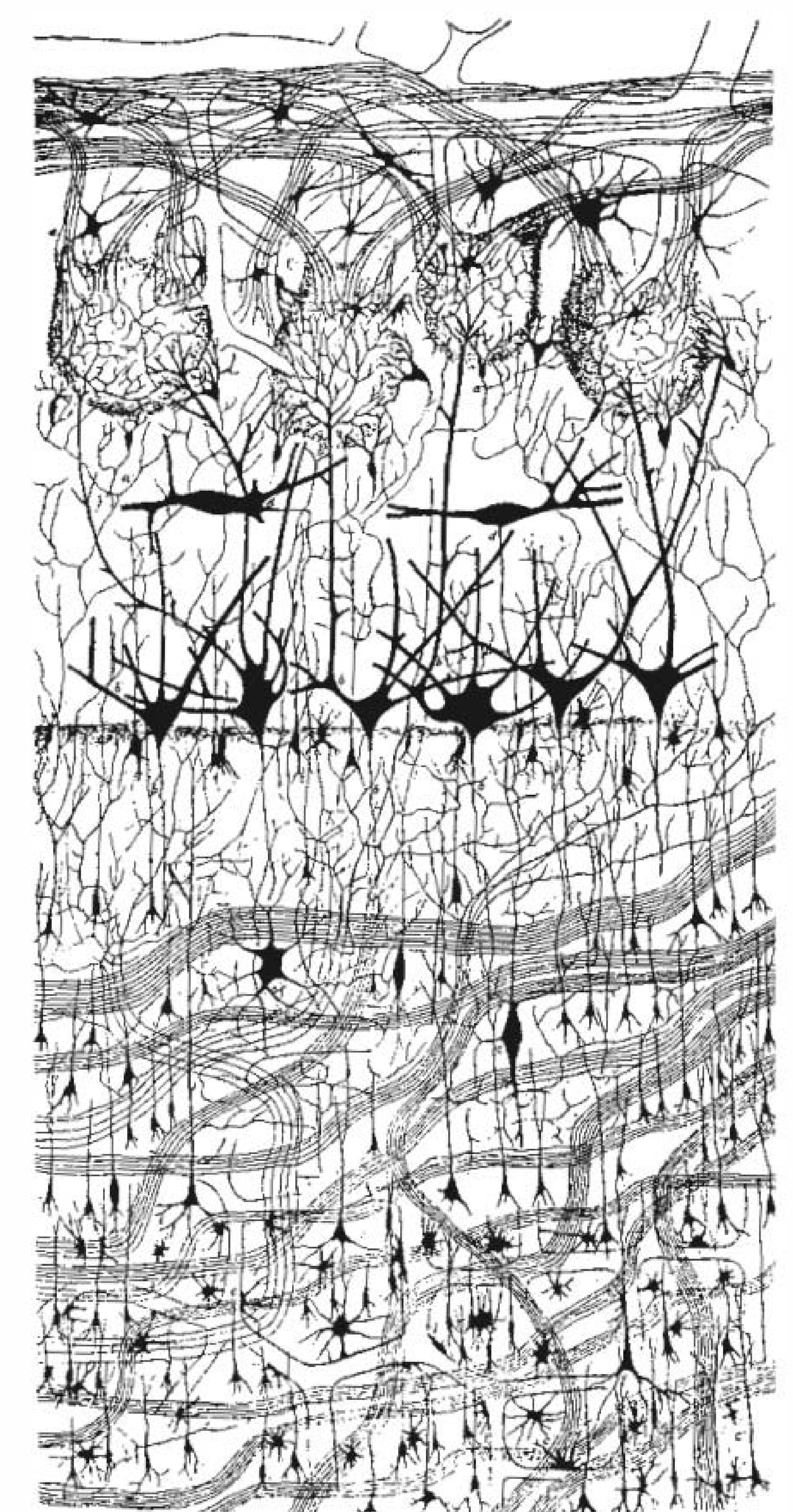


Figura 22-94 A complexa organização das conexões das células nervosas. Este desenho representa uma secção transversal de uma pequena parte do cérebro de um mamífero – o bulbo olfatório de um cão, corado pela técnica de Golgi. Os objetos pretos são neurônios; as linhas finas são axônios e dendritos, por meio dos quais os vários grupos de neurônios são interconectados de acordo com regras precisas. (De C. Golgi, *Riv. sper. freniat. Reggio-Emilia* 1:405-425, 1875; reproduzida em M. Jacobson, Developmental Neurobiology, 3rd ed. New York: Plenum, 1992.)

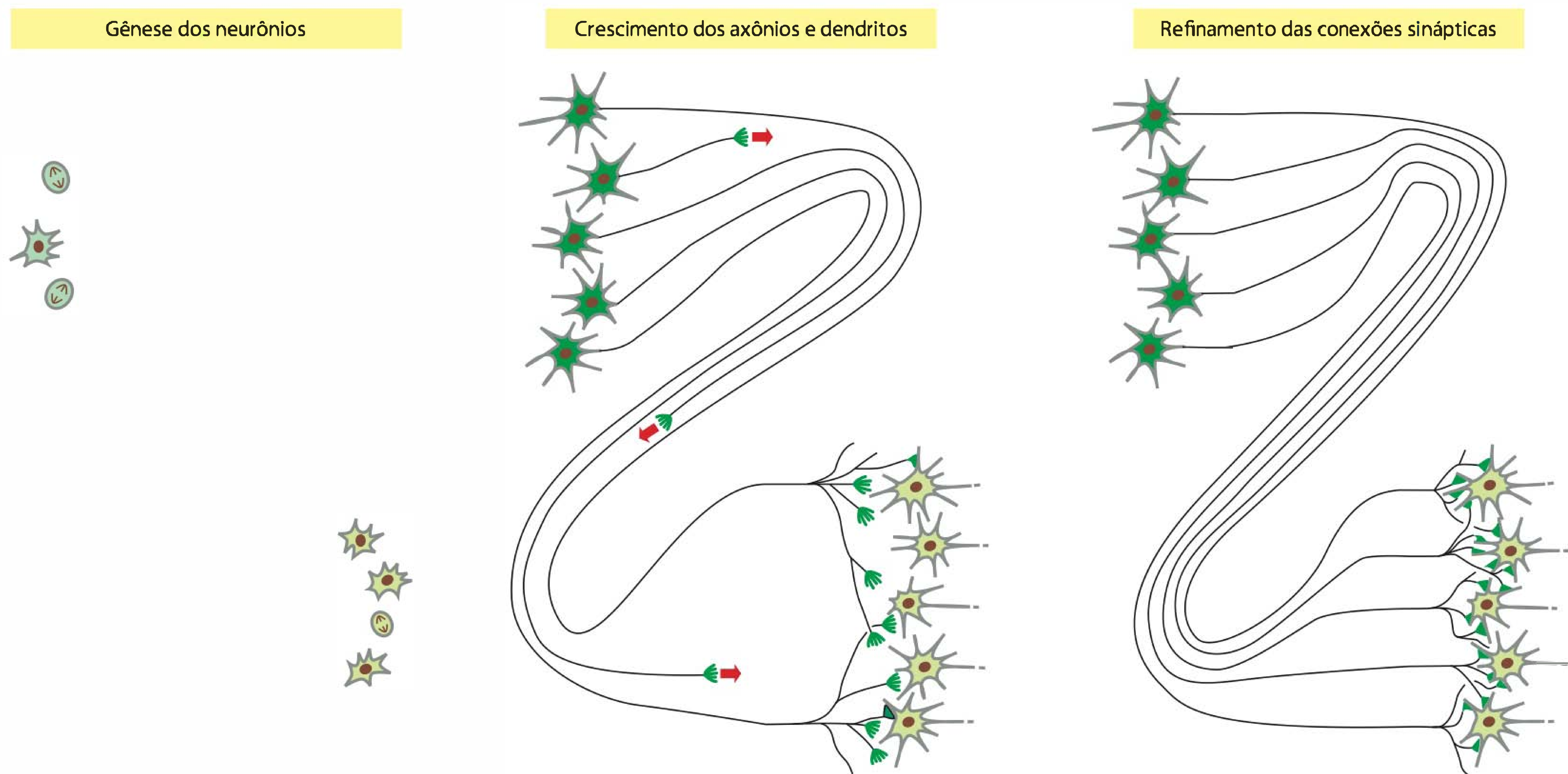


Figura 22-95 As três fases do desenvolvimento neural.

volvem-se a partir da ectoderme, normalmente como células-irmãs ou primas derivadas de um precursor comum. Assim, nos vertebrados, os neurônios e as células gliais do *sistema nervoso central* (incluindo a medula espinal, o cérebro e a retina do olho) derivam da parte da ectoderme que se enrola para formar o tubo neural, enquanto aqueles do *sistema nervoso periférico* derivam principalmente da crista neural (**Figura 22-96**).

O **tubo neural**, com o qual estaremos principalmente envolvidos, consiste inicialmente em um epitélio de uma única camada (**Figura 22-97**). As células epiteliais são as progenitoras dos neurônios e da glia. Quando esses tipos celulares são gerados, o epitélio se torna espesso e se transforma em uma estrutura mais complexa. Como anteriormente discutido, a sinalização Delta-Notch controla a diferenciação das células progenitoras em neurônios: os neurônios nascentes expressam Delta e, com isso, inibem suas células vizinhas, que não se diferenciam em neurônios ao mesmo tempo. Isso assegura que nem todas as progenitoras se diferenciem simultaneamente, permanecendo como uma população de células em divisão a partir da qual podem ser gerados neurônios adicionais. As células progenitoras e, posteriormente, as células gliais também mantêm a coesão do epitélio e formam uma estrutura de sustentação que abarca sua espessura. Ao longo e entre essas células altas, como animais entre as árvores de uma floresta, os neurônios recém-nascidos migram, encontram seus locais de repouso, amadurecem e projetam seus axônios e dendritos (**Figura 22-98**).

As proteínas-sinal secretadas a partir dos lados ventral e dorsal do tubo neural agem como morfógenos contrários, levando os neurônios a nascer em diferentes níveis dorso-ventrais para expressar diferentes proteínas de regulação gênica (ver Figura 22-80). Também existem diferenças ao longo do eixo cabeça-caudal, refletindo o padrão ântero-posterior de expressão dos genes *Hox* e as ações de outros morfógenos. Além disso, assim como em *Drosophila*, os neurônios continuam a ser gerados em cada região do sistema nervoso central durante muitos dias, semanas ou até meses, dando origem a uma diversidade ainda maior, pois as células adotam diferentes características de acordo com sua "data de nascimento" – o

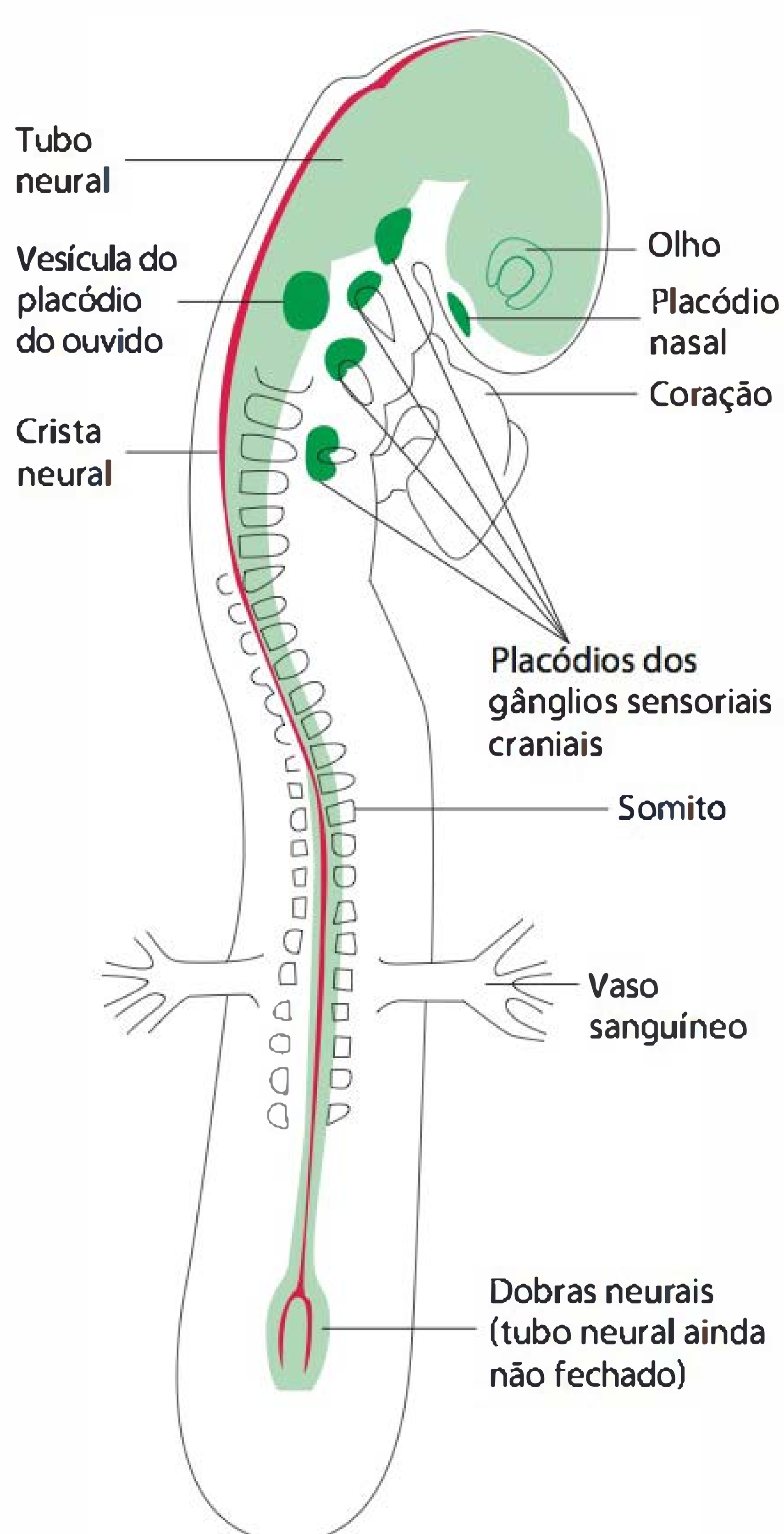


Figura 22-96 Diagrama de um embrião de galinha de dois dias, mostrando as origens do sistema nervoso. O tubo neural (*verde-claro*) já está fechado, exceto na extremidade caudal, e se localiza internamente, abaixo da ectoderme, da qual fazia parte originalmente (ver Figura 22-78). A crista neural (*vermelho*) se localiza dorsalmente logo abaixo da ectoderme, dentro ou acima do teto do tubo neural. Além disso, espessamentos, ou placódios (*verde-escuro*), na ectoderme da cabeça dão origem a algumas das células transdutoras sensoriais e a neurônios daquela região, incluindo aqueles do ouvido e do nariz. As células da retina do olho, por outro lado, originam-se como parte do tubo neural.

momento da mitose terminal que marca o início da diferenciação neuronal (**Figura 22-99**). Quando células progenitoras são retiradas do cérebro de um embrião de camundongo e mantidas em cultura por vários dias, individualmente isoladas de seu ambiente normal, elas passam por praticamente o mesmo programa que o tecido intacto. Ou seja, elas se dividem repetidamente, produzindo pares de filhas que frequentemente adotam destinos diferentes, de modo que uma permanece como a progenitora em divisão e as outras se comprometem com o processo de diferenciação.

As sucessivas divisões dão início a uma sequência de diferentes tipos celulares neuronais e gliais, segundo um cronograma mais ou menos regular. Isso implica que as próprias progenitoras devem alterar, de forma autônoma, sua característica intrínseca de uma geração celular para a próxima. O mecanismo molecular desta alteração progressiva é desconhecido, assim como também o é em outros tipos celulares em que ocorrem lentas mudanças similares.

A característica atribuída a um neurônio em seu nascimento estabelece as conexões que ele irá formar

As diferenças na expressão gênica modulam as características dos neurônios e ajudam a induzi-los a fazer conexões com diferentes parceiros. Na medula espinal, por exemplo, agrupamentos de células localizados ventralmente expressam genes da família homeobox *Islet/Lim* (que codificam proteínas de regulação gênica) e se desenvolvem como neurônios motores, projetando axônios que se conectam com subconjuntos específicos de músculos – músculos diferentes de acordo com os membros específicos da família *Islet/Lim* expressos. Se o padrão de expressão gênica for artificialmente alterado, os neurônios se projetam para músculos-alvo diferentes.

Os diferentes destinos refletem escolhas de diferentes caminhos que os axônios fazem quando crescem a partir do corpo celular nervoso, assim como seu reconhecimento seletivo de diferentes células-alvo no final da jornada. Na parte dorsal da medula espinal estão localizados neurônios que recebem e transmitem informações sensoriais vindas de neurônios

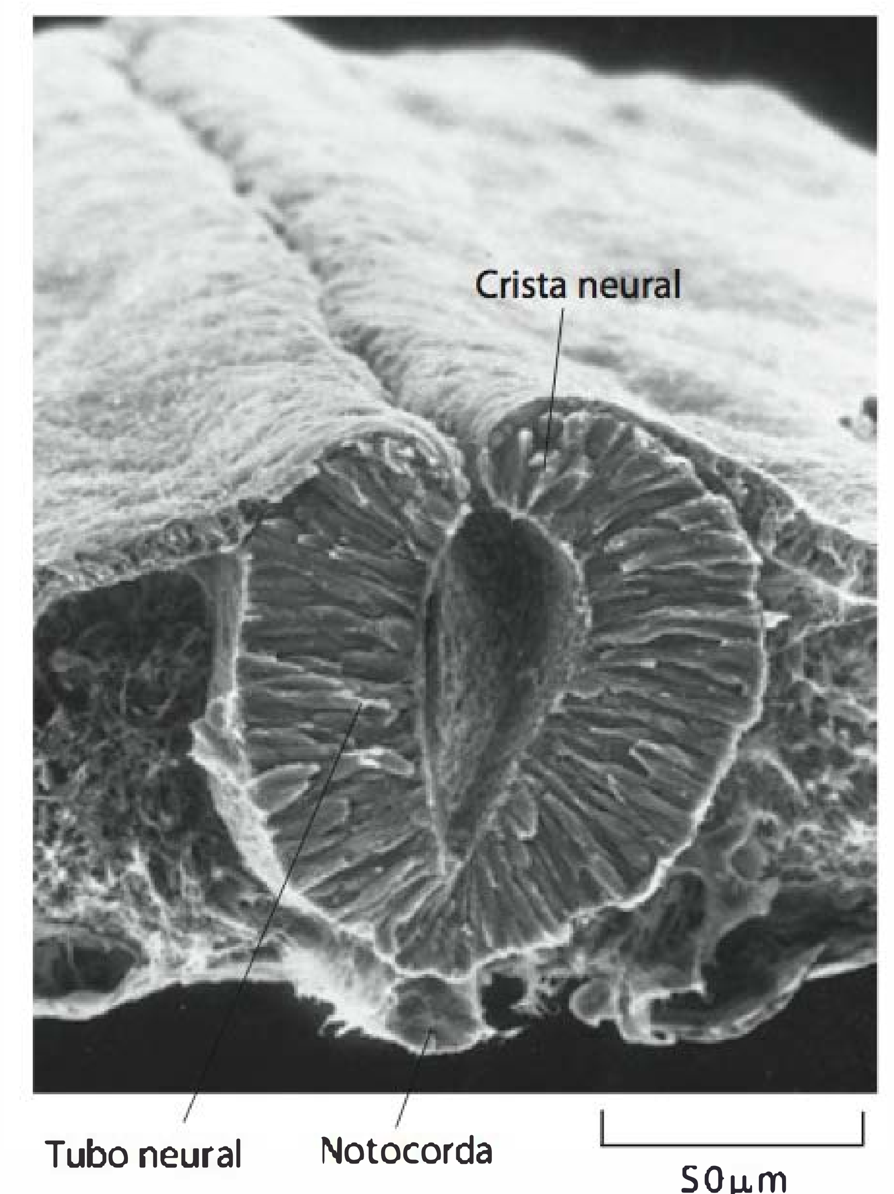


Figura 22-97 Formação do tubo neural. A micrografia eletrônica de varredura mostra uma secção transversal do tronco de um embrião de galinha de dois dias. O tubo neural está prestes a se fechar e se separar da ectoderme; neste estágio, ele consiste (na galinha) em um epitélio que tem a espessura de apenas uma célula. (Cortesia de J. P. Revel e S. Brown.)

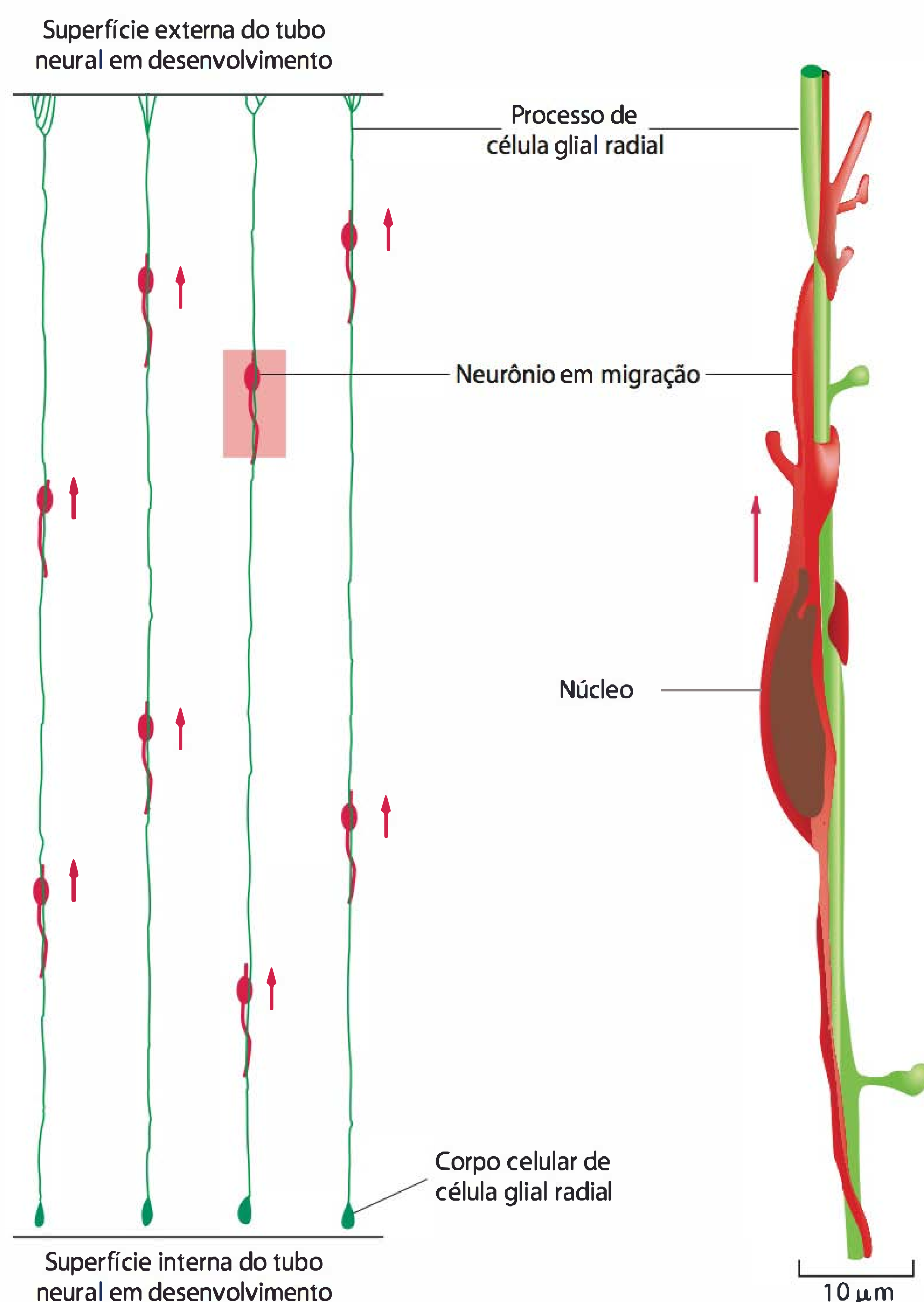


Figura 22-98 A migração de neurônios imaturos. Antes de projetar seus axônios e dendritos, os neurônios recém-nascidos frequentemente migram de seu local de nascimento e se estabelecem em outro local. Os diagramas têm como base reconstruções de seções do córtex cerebral de um macaco (parte do tubo neural). Os neurônios passam por sua divisão celular final próximo à face luminal interna do tubo neural e então migram para fora, movendo-se lentamente ao longo de células gliais radiais. Cada uma dessas células se estende a partir da superfície interna do tubo para a externa, uma distância que pode ser de até 2 cm no córtex cerebral do cérebro em desenvolvimento de um primata. As células gliais radiais podem ser consideradas como células persistentes do epitélio colunar original do tubo neural que vêm a ser extraordinariamente distendidas à medida que a parede do tubo se espessa. (Segundo P. Rakic, *J. Comp. Neurol.* 145:61-84, 1972. Com permissão de John Wiley & Sons, Inc.)

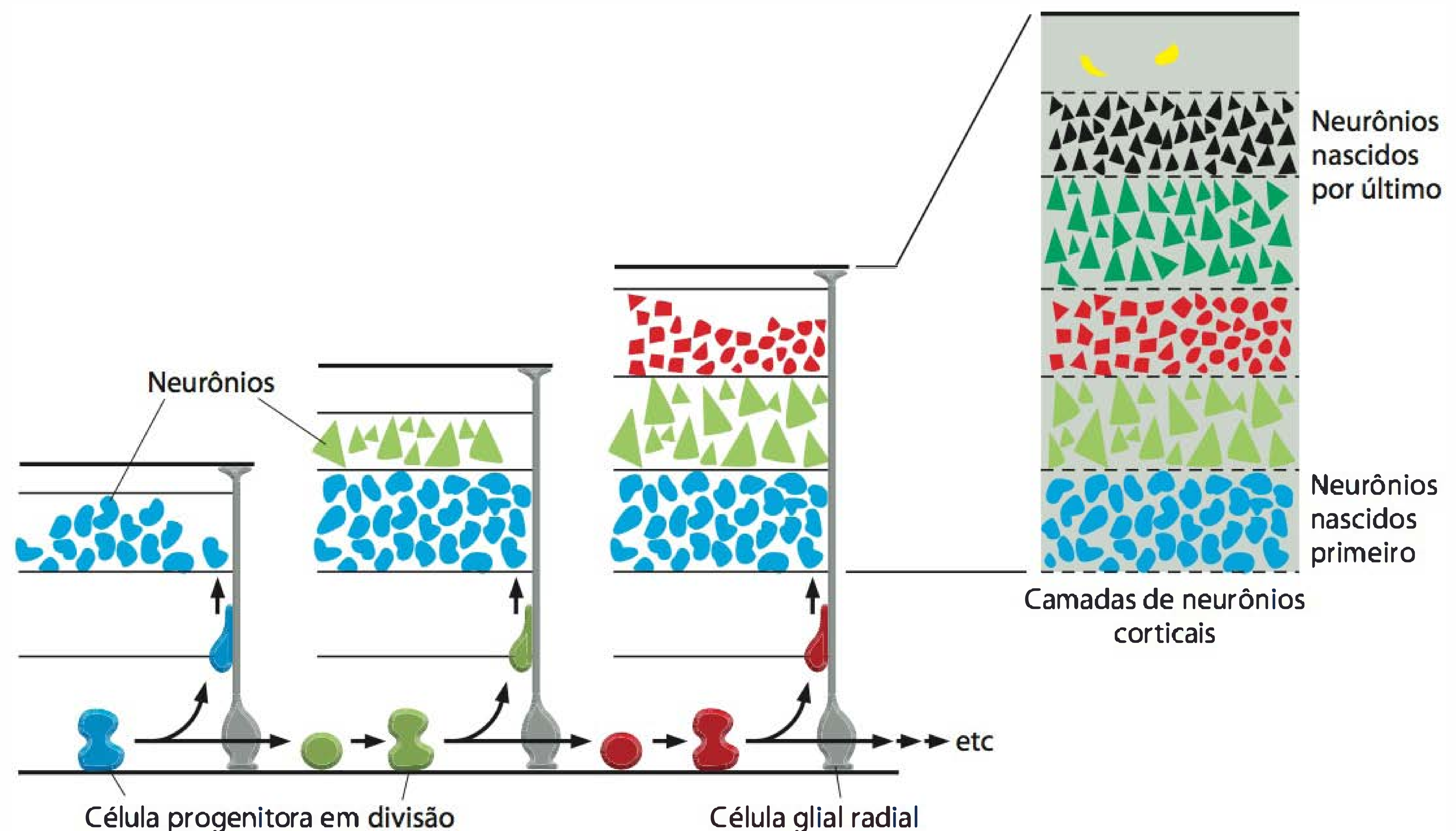


Figura 22-99 Produção programada de diferentes tipos de neurônios em diferentes momentos a partir de progenitoras em divisão no córtex cerebral do cérebro de um mamífero. Próximas a uma face do neuroepitélio cortical, as células progenitoras se dividem repetidamente, de modo semelhante às células-tronco, para produzir neurônios. Os neurônios migram para fora em direção à face oposta do epitélio, movendo-se lentamente ao longo das superfícies de células gliais radiais, como mostrado na Figura 22-98. Os primeiros neurônios nascidos se estabelecem mais perto de seu local de nascimento, enquanto os neurônios nascidos mais tarde se movem adiante e os ultrapassam, estabelecendo-se mais distantemente. Assim, gerações sucessivas de neurônios ocupam diferentes camadas no córtex e têm características intrínsecas diferentes, de acordo com suas datas de nascimento.

sensoriais da periferia do corpo. Em posições intermediárias, existem várias outras classes de interneurônios, conectando conjuntos específicos de células nervosas uns aos outros. Alguns enviam seus axônios dorsalmente, outros ventralmente; alguns para cima em direção à cabeça, outros para baixo em direção à cauda, e ainda outros através da base do tubo neural para o outro lado do corpo (**Figura 22-100**). Em um filme em tempo real, no qual os neurônios em desenvolvimento são corados com um corante fluorescente, pode-se observar os movimentos das extremidades crescentes dos axônios à medida que eles se estendem: faz lembrar as luzes do tráfego na hora do *rush* à noite, quando os carros parecem formar linhas luminosas ao longo de uma rede de rodovias, tomando este ou aquele caminho em cruzamentos movimentados, cada um fazendo sua própria escolha de rota.

Como esses movimentos complexos são guiados? Antes de arriscar uma resposta, devemos examinar mais minuciosamente a estrutura do neurônio em crescimento.

Cada axônio ou dendrito se estende por meio de um cone de crescimento em sua ponta

Um neurônio típico emite um longo axônio, projetando-o em direção a um alvo distante ao qual sinais devem ser transferidos, e vários dendritos mais curtos, nos quais ele principalmente recebe sinais novos a partir de terminais de axônios de outros neurônios. Cada processo se estende por meio do crescimento de sua extremidade, onde um alargamento

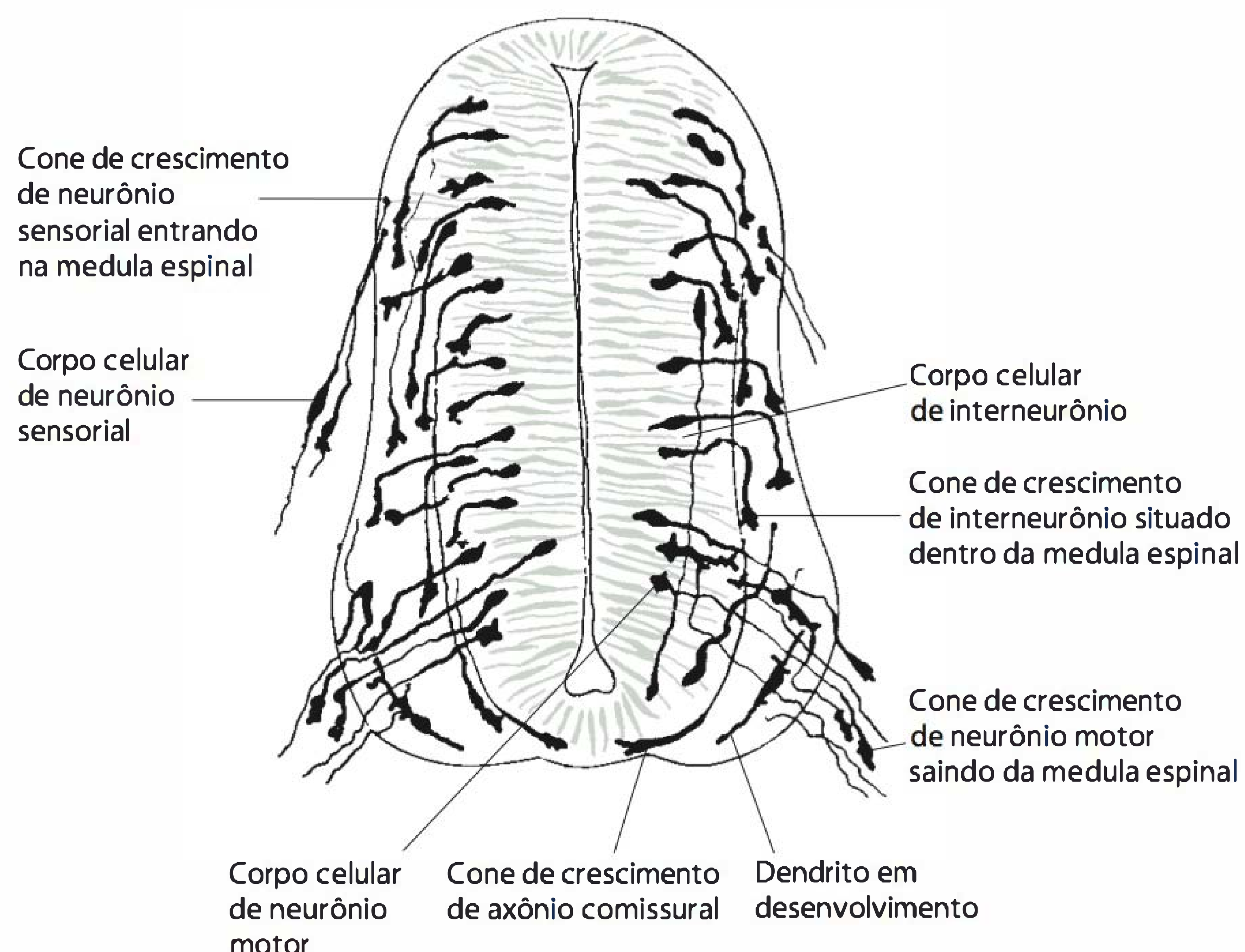


Figura 22-100 Axônios em crescimento na medula espinal em desenvolvimento de um embrião de galinha de três dias. O desenho mostra uma secção transversal corada pela técnica de Golgi. Aparentemente, a maioria dos neurônios já tem apenas um processo alongado – o futuro axônio. Uma expansão irregularmente modelada – um cone de crescimento – é vista na extremidade crescente de cada axônio. Os cones de crescimento dos neurônios motores se formam a partir da medula espinal (para progredir em direção aos músculos), aqueles dos neurônios sensoriais crescem para dentro da medula a partir do lado de fora (onde se localizam seus corpos celulares) e aqueles dos interneurônios permanecem dentro da medula espinal. Muitos dos interneurônios emitem seus axônios para baixo em direção à placa basal para atravessar para o outro lado da medula espinal; estes axônios são denominados comissurais. Neste estágio inicial, muitas das células embrionárias da medula espinal (nas regiões sombreadas em *cinza*) ainda estão se proliferando e não começaram a se diferenciar em neurônios ou células gliais. (De S. Ramón y Cajal, Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, 1909-1911. Paris: Maloine; reimpresso, Madrid: C.S.I.C., 1972.)

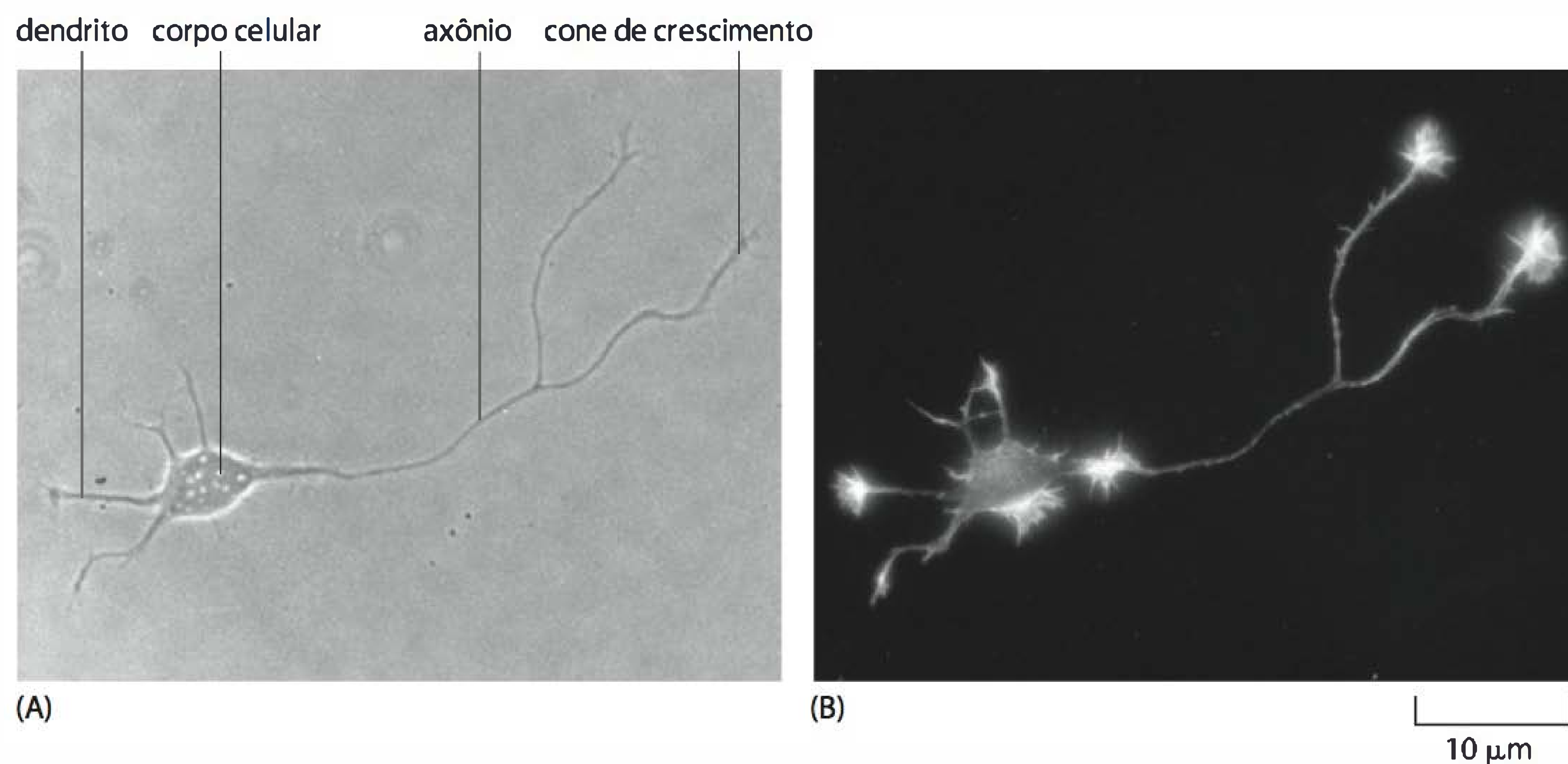


Figura 22-101 Formação de axônios e dendritos em cultura. Um neurônio jovem foi isolado do cérebro de um mamífero e colocado para se desenvolver em cultura, onde ele emite seus prolongamentos. Um destes prolongamentos, o futuro axônio, começou a crescer mais rápido que o resto (os futuros dendritos) e se bifurcou. (A) Uma fotografia de contraste de fase; (B) o padrão de coloração com faloidina fluorescente, que se liga a filamentos de actina. A actina está concentrada nos cones de crescimento nas extremidades dos prolongamentos que estão se estendendo ativamente e em alguns outros locais de atividade lamelipodial. (Cortesia de Kimberly Goslin.)

irregular e pontiagudo é observado. Esta estrutura, denominada **cone de crescimento**, movimenta-se lentamente através do tecido adjacente, arrastando um axônio ou dendrito fino atrás de si (ver Figura 22-100). O cone de crescimento compreende tanto o mecanismo que produz o movimento como o aparato de direção que conduz a extremidade de cada processo ao longo do caminho adequado (ver Figura 16-105).

Muito do que sabemos a respeito das propriedades dos cones de crescimento veio de estudos em cultura de células ou tecidos. Pode-se observar quando um neurônio começa a estender seus prolongamentos, todos semelhantes no começo, até que um dos cones de crescimento realiza uma alteração súbita em sua velocidade, identificando seu prolongamento como axônio, com seu próprio conjunto axônio-específico de proteínas (**Figura 22-101**). O contraste entre axônio e dendrito estabelecido neste estágio envolve o transporte intracelular polarizado de diferentes materiais para dentro de dois tipos de prolongamento. O resultado é que eles irão se expandir por distâncias diferentes, seguir caminhos diferentes e desempenhar diferentes papéis na formação de sinapses.

O cone de crescimento na extremidade de um típico prolongamento em crescimento de uma célula nervosa – ou axônio ou dendrito – move-se para a frente a uma velocidade de cerca de 1 mm por dia, continuamente explorando as regiões que estão adiante e de cada lado por meio da extensão de seus filopódios e lamelipódios. Quando tal protrusão faz contato com uma superfície desfavorável, ela se retrai; quando faz contato com uma superfície mais favorável, ela persiste por mais tempo, guiando o cone de crescimento como um todo a se mover naquela direção. Desta maneira, o cone de crescimento pode ser guiado por variações sutis nas propriedades de superfície dos substratos sobre os quais se move. Ao mesmo tempo, ele é sensível a fatores quimiotáticos que se difundem no meio circundante, os quais também podem estimular ou impedir seu avanço. Esses comportamentos dependem da maquinaria citoesquelética dentro do cone de crescimento, como discutido no Capítulo 16. Uma grande quantidade de receptores na membrana do cone de crescimento detectam os sinais externos e, pela ação de reguladores intracelulares, como as GTPases monoméricas Rho e Rac, controlam o agrupamento e o desagrupamento dos filamentos de actina e de outros componentes da maquinaria de movimento celular.

O cone de crescimento guia o neurito em desenvolvimento ao longo de um caminho precisamente definido *in vivo*

Em animais vivos, os cones de crescimento geralmente se deslocam em direção a seus alvos ao longo de vias previsíveis e estereotipadas, explorando uma grande quantidade de diferentes sinais para encontrar seu caminho, mas sempre requerendo um substrato de matriz extracelular ou de superfície celular sobre o qual possa deslizar. Frequentemente, os cones de crescimento tomam vias que foram inauguradas por outros neuritos, os quais eles seguem por meio de orientação por contato. Como resultado, as fibras nervosas em um animal maduro se encontram normalmente agrupadas em feixes paralelos compactos (denominados fascículos ou sistemas de fibras). Acredita-se que esse rastejamento dos cones de crescimento ao longo dos axônios seja mediado por moléculas homofílicas de adesão célula-célula – glicoproteínas de membrana que auxiliam uma célula que as exibe a se ligar a qualquer outra célula que também as apresenta. Como discutido no Capítulo 19, duas das classes

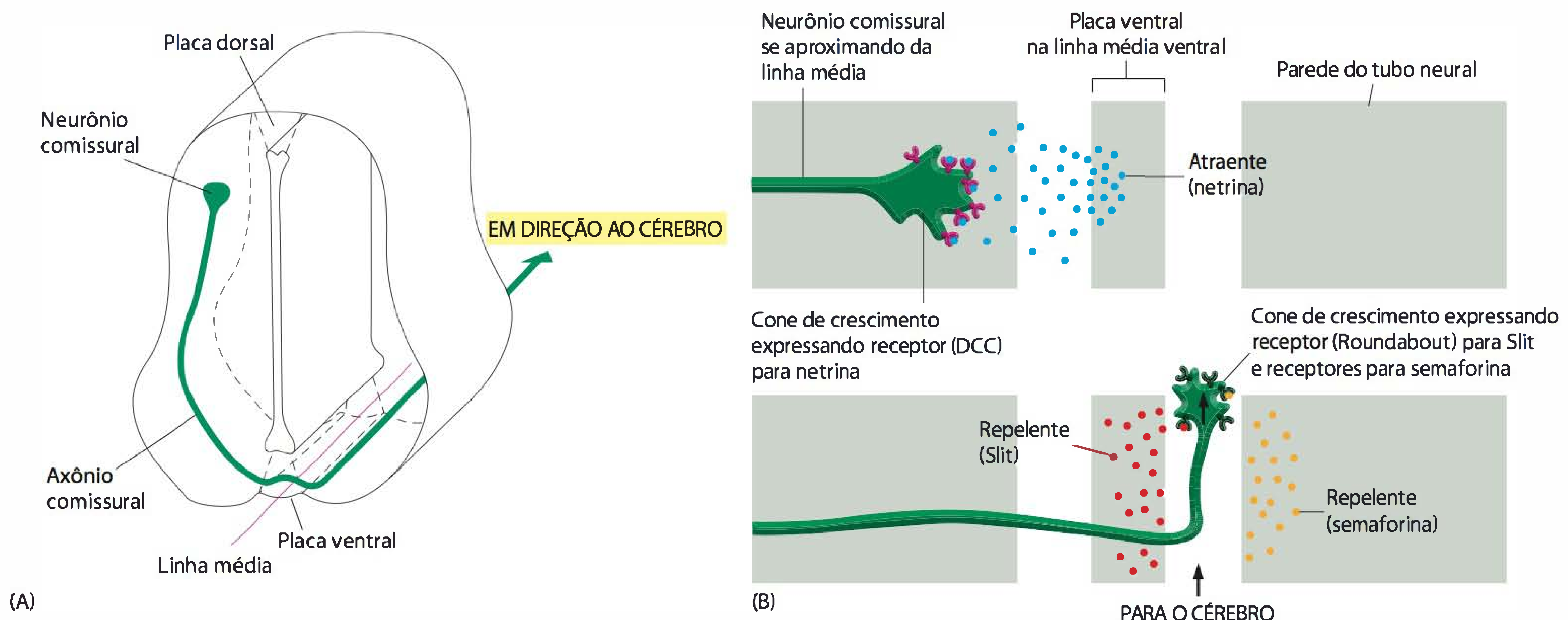


Figura 22-102 A orientação de axônios comissurais. (A) O caminho tomado pelos axônios comissurais na medula espinal embrionária de um vertebrado. (B) Os sinais que os orientam. Os cones de crescimento são primeiramente atraídos para a lâmina pavimentar pela netrina, que é secretada pelas células da lâmina pavimentar e age sobre o receptor DCC na membrana axônica. Quando atravessam a lâmina basal, os cones de crescimento aumentam a expressão de Roundabout, o receptor para uma proteína repelente, Slit, que também é secretada pela lâmina basal. A proteína Slit, ligando-se ao receptor Roundabout, não somente age como repelente para impedir que as células entrem novamente na lâmina basal, mas também bloqueia a receptividade ao atraente netrina. Ao mesmo tempo, os cones de crescimento ativam a expressão de receptores para outra proteína repelente, a semaforina, que é secretada pelas células nas paredes laterais do tubo neural. Capturados entre dois territórios repelentes, os cones de crescimento, tendo atravessado a linha média, deslocam-se em um fascículo compacto para cima em direção ao cérebro.

mais importantes dessas moléculas são aquelas que pertencem à superfamília das imunoglobulinas, como as N-CAM, e aquelas da família de caderinas dependentes de Ca^{2+}, como a N-caderina. Os membros de ambas as famílias geralmente estão presentes nas superfícies dos cones de crescimento, dos axônios e de vários outros tipos celulares sobre os quais os cones de crescimento se arrastam, incluindo as células gliais do sistema nervoso central e as células musculares da periferia do corpo. O genoma humano contém mais de 100 genes de caderinas, por exemplo, e a maior parte deles é expressa no cérebro (ver Figura 19-6). Diferentes conjuntos de moléculas de adesão célula-célula, atuando em combinações variadas, propiciam um mecanismo para a orientação e o reconhecimento neuronal seletivo. Os cones de crescimento também migram sobre componentes da matriz extracelular. Algumas dessas moléculas de matriz, como a *laminina*, favorecem o crescimento dos axônios, enquanto outras, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina, o inibem.

Os cones de crescimento são guiados por uma sucessão de diferentes sinais em diferentes estágios de sua jornada, e não é somente a adesividade do substrato que importa. Outro papel importante é desempenhado por fatores quimiotáticos, secretados a partir de células que agem como guias em pontos estratégicos ao longo do caminho – alguns atraindo e outros repelindo. A trajetória dos axônios *comissurais* – aqueles que atravessam de um lado do corpo para o outro – constitui um belo exemplo de como uma combinação de sinais de orientação pode especificar um caminho complexo. Os axônios comissurais são uma característica geral de animais bilateralmente simétricos, pois os dois lados do corpo têm de ser coordenados por meio de neurônios. Os vermes, as moscas e os vertebrados utilizam mecanismos intimamente relacionados para guiar seu crescimento.

Na medula espinal em desenvolvimento de um vertebrado, por exemplo, um grande número de neurônios envia seus cones de crescimento axônicos ventralmente em direção à lâmina pavimentar – uma faixa especializada de células que forma a linha média ventral do tubo neural (ver Figura 22-100). Os cones de crescimento cruzam a lâmina pavimentar e então mudam de direção abruptamente, em ângulo reto, para seguir um caminho longitudinal para cima, em direção ao cérebro, paralelamente à lâmina pavimentar, mas nunca cruzando-a novamente (**Figura 22-102**A). O primeiro estágio da jornada depende de um gradiente de concentração da proteína *netrina*, secretada pelas células da lâmina pavimentar: os cones de crescimento comissurais farejam o caminho em direção a sua fonte. A netrina foi purificada de embriões de galinha testando-se extratos de tecido neural quanto a uma atividade que atrairia os cones de crescimento comissurais em uma placa de cultura. Sua sequência revelou que a netrina dos vertebrados era homóloga a uma proteína já identificada em *C. elegans* por meio de triagens genéticas de vermes mutantes com axônios com orientação alterada – denominados mutantes *Unc* (de *uncoordinated*), pois se movem de forma desordenada. Um dos genes *Unc*, *Unc6*, codifica o homólogo da netrina. Outro, *Unc40*, codifica seu receptor transmembrana; este também tem um homólogo vertebrado, denominado DCC, que é expresso nos neurônios comissurais e serve como mediador em sua resposta ao gradiente de netrina.

A ativação localizada de DCC pela netrina leva à abertura de uma classe especializada de canais iônicos na membrana plasmática. Esses canais, denominados canais TRPC (po-

tencial transiente de receptor C, de *transient receptor potential C*), pertencem a uma grande família (a família TRP), que é responsável por muitos outros processos de transdução sensorial, desde sensações mecânicas até a percepção de calor e frio. Quando abertos, os canais TRPC permitem que o Ca^{2+} (e outros cátions) entre na célula. O aumento localizado de Ca^{2+} ativa, então, a maquinaria para a extensão de filopódios e o movimento do cone de crescimento em direção à fonte de netrina.

Os receptores em cada cone de crescimento determinam a via que ele irá tomar: os neurônios não-comissurais no tubo neural, sem DCC, não são atraídos para a lâmina pavimentar, e os neurônios que expressam um receptor diferente de netrina – denominado Unc5H nos vertebrados (com o equivalente Unc5 no verme) – são ativamente repelidos pela lâmina pavimentar e enviam seus axônios em direção à lâmina superior.

Os cones de crescimento podem alterar sua sensibilidade à medida que se deslocam

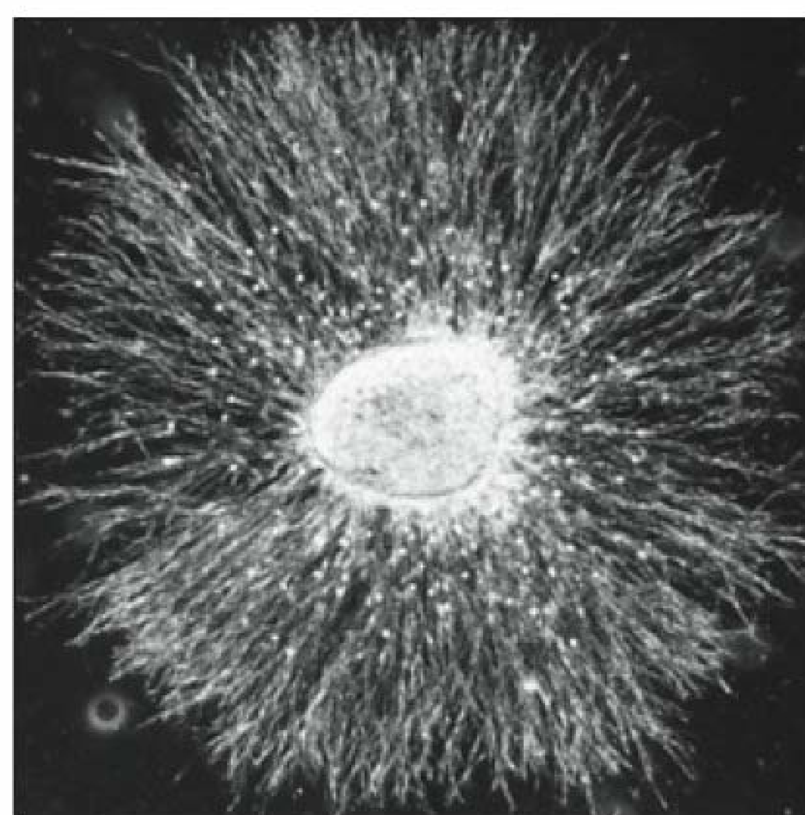
Se os cones de crescimento comissurais são atraídos para a lâmina pavimentar, por que eles a atravessam e emergem no outro lado, em vez de permanecer no território atrativo? E, depois de a terem cruzado, por que eles nunca voltam? A provável resposta se encontra em outro conjunto de moléculas, várias das quais também são conservadas entre vertebrados e invertebrados. Estudos em mutantes de *Drosophila* com axônios comissurais com orientação alterada identificaram, primeiramente, três das proteínas-chave: Slit, Roundabout e Commissureless.

A Slit, assim como a netrina, é produzida por células da linha média da mosca em desenvolvimento, enquanto seu receptor, Roundabout, é expresso nos neurônios comissurais. A Slit, que age sobre Roundabout, tem um efeito exatamente oposto ao da netrina: ela repele os cones de crescimento, bloqueando a entrada no território da linha média. Entretanto, a Commissureless interfere na entrega de Roundabout à superfície celular e, com isso, faz com que os cones de crescimento fiquem inicialmente cegos para este sinal de "mantenha-se afastado". Os cones de crescimento comissurais neste estado avançam para a linha média; quando eles a atravessam, parecem perder, por um mecanismo que ainda não compreendemos, sua venda da proteína Commissureless e começam a ser repelidos. Emergindo do outro lado, eles agora têm o receptor Roundabout funcional em suas superfícies e são, desse modo, proibidos de entrar novamente.

Nos vertebrados, opera um mecanismo similar, envolvendo homólogos de Slit e Roundabout. Os cones de crescimento comissurais são primeiramente atraídos para a linha média e, então, de alguma maneira alteram suas proteínas receptoras de superfície quando a atravessam; desse modo, eles mudam suas sensibilidades, ganhando sensibilidade para a repulsão por Slit – que é expressa na lâmina pavimentar – e perdendo sensibilidade para a atração por netrina. A sensibilidade a Slit na aproximação inicial à linha média não é bloqueada por nenhum homólogo de Commissureless, mas por um membro divergente da família do receptor Roundabout denominado Rig1, que se situa na membrana plasmática e interfere na recepção de sinais por seus primos. Uma vez que os cones de crescimento tenham atravessado a linha média, o bloqueio de Rig1 é interrompido por um mecanismo desconhecido. A repulsão a partir da linha média evita que eles se percam e voltem pelo mesmo caminho. Ao mesmo tempo, os cones de crescimento aparentemente se tornam sensíveis a outro grupo de sinais repulsivos, na forma de proteínas denominadas semaforinas, que os impedem de voltar para as regiões dorsais da medula espinal. Estando presos entre os dois conjuntos de sinais repulsivos, os cones de crescimento não têm outra escolha a não ser seguir em frente por um caminho estreito, correndo em paralelo à lâmina pavimentar, mas nunca entrando novamente nela (Figura 22-102B).

Os tecidos-alvo liberam fatores neurotróficos que controlam o crescimento e a sobrevivência das células nervosas

Finalmente, os cones de crescimento dos axônios alcançam a região-alvo em que devem parar e fazer sinapses. Os neurônios que emitiram os axônios podem agora começar a se comunicar com suas células-alvo. Embora as sinapses geralmente transmitam sinais em uma direção, do axônio para ou o dendrito ou o músculo, as comunicações que ocorrem durante o desenvolvimento são uma via de mão dupla. Os sinais oriundos do tecido-alvo não só regulam quais cones de crescimento devem fazer sinapse (como discutiremos a seguir), mas também quantos dos neurônios em inervação devem sobreviver.



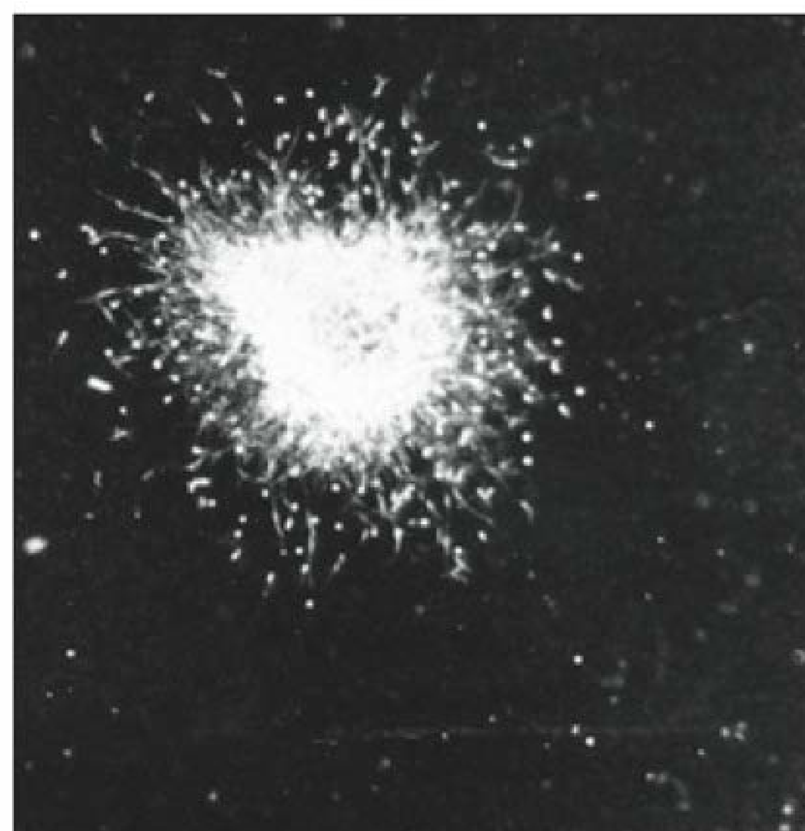


Figura 22-103 Efeitos do NGF no desenvolvimento de neuritos. Fotomicrografias de campo escuro de um gânglio simpático cultivado por 48 horas com (*acima*) e sem (*abaixo*) o NGF. Os neuritos se desenvolvem a partir dos neurônios simpáticos apenas quando o NGF está presente no meio. Cada cultura também contém células de Schwann (gliais) que migraram para fora do gânglio; elas não são afetadas por NGF. A sobrevivência neuronal e a manutenção dos cones de crescimento para a extensão dos neuritos representam dois efeitos distintos do NGF. O efeito nos cones de crescimento é local, direto, rápido e independente de comunicações com o corpo celular; quando o NGF é removido, os cones de crescimento prejudicados interrompem seus movimentos dentro de um ou dois minutos. O efeito do NGF sobre a sobrevivência celular é menos imediato e está associado à absorção de NGF por endocitose e a seu transporte intracelular de volta para o corpo celular. (Cortesia de Naomi Kleitman.)

A maior parte dos tipos de neurônios do sistema nervoso central e periférico dos vertebrados é produzida em excesso; até 50% ou mais deles morrem logo após ter alcançado seu alvo, mesmo que pareçam perfeitamente normais e saudáveis até o momento de sua morte. Cerca de metade de todos os neurônios motores que enviam axônios para os músculos esqueléticos, por exemplo, morre dentro de alguns dias após ter feito contato com suas células musculares-alvo. Uma proporção similar dos neurônios sensoriais que fazem a inervação da pele morre depois que seus cones de crescimento chegaram lá.

Acredita-se que essa morte em grande escala de neurônios reflita o resultado de uma competição. Cada tipo de célula-alvo libera uma quantidade limitada de um fator neurotrófico específico que os neurônios que inervam aquele alvo precisam para sobreviver. Aparentemente, os neurônios competem pelo fator e aqueles que não conseguem o suficiente morrem por morte celular programada. Se a quantidade de tecido-alvo é aumentada – enxertando um broto de um membro extra em um lado do embrião, por exemplo – mais neurônios inervando o membro sobrevivem; inversamente, se o broto do membro é cortado, todos os neurônios inervando o membro morrem. Desta maneira, embora os indivíduos possam variar quanto às suas proporções corporais, eles sempre manterão o número correto de neurônios motores para inervar todos os seus músculos e o número correto de neurônios sensoriais para inervar toda a sua superfície corporal. A estratégia aparentemente dispendiosa de superprodução seguida pela morte de células excedentes funciona em quase todas as regiões do sistema nervoso. Ela funciona como um meio simples e efetivo de ajustar cada população de neurônios que fazem a inervação, de acordo com a quantidade de tecido que necessita de inervação.

O primeiro fator neurotrófico a ser identificado, que ainda continua sendo o melhor caracterizado, é simplesmente conhecido como fator de crescimento neuronal (NGF, *nerve growth factor*) – o membro fundador da família das *neurotrofinas* das proteínas de sinalização. Ele promove a sobrevivência de classes específicas de neurônios sensoriais derivados da crista neural e de neurônios simpáticos (uma subclasse de neurônios periféricos que controlam as contrações dos músculos lisos e a secreção das glândulas exócrinas). O NGF é produzido pelos tecidos que estes neurônios inervam. Quando o NGF extra é fornecido, os neurônios sensoriais e simpáticos adicionais sobrevivem, como se o tecido-alvo extra estivesse presente. Inversamente, em um camundongo com uma mutação que inativa o gene NGF ou o gene de seu receptor (uma tirosina-cinase transmembrana denominada TrkA), quase todos os neurônios simpáticos e os neurônios sensoriais dependentes de NGF são perdidos. Existem muitos fatores neurotróficos, mas apenas alguns pertencem à família das neurotrofinas, atuando em diferentes combinações para promover a sobrevivência de diferentes classes de neurônios.

O NGF e seus assemelhados têm um papel adicional: além de agirem na célula nervosa como um todo, controlando sua sobrevivência, eles regulam o crescimento de axônios e dendritos (**Figura 22-103**). Podem até mesmo agir localmente em somente uma parte da árvore de prolongamentos das células nervosas, promovendo ou podando o crescimento de ramificações individuais: um cone de crescimento exposto ao NGF mostra um aumento imediato de mobilidade. Inversamente, uma ramificação de um axônio que é privado de NGF morre, enquanto o resto do neurônio continua a ser banhado pelo fator.

A ação periférica do NGF continua a ser importante depois da fase de morte neuronal. Na pele, por exemplo, o NGF controla a ramificação das fibras nervosas sensoriais, assegurando não só que toda a superfície do corpo fique inervada durante o desenvolvimento, mas também que ela recupere sua inervação após alguma lesão.

A especificidade neuronal orienta a formação de mapas neurais organizados

Em muitos casos, os axônios originados de neurônios de um tipo similar, mas localizados em posições diferentes, unem-se para a jornada e chegam ao alvo em um feixe compacto. Lá eles se dispersam novamente, terminando em locais diferentes no território-alvo.

A projeção a partir do olho para o cérebro constitui um exemplo importante. Os neurônios na retina que transmitem a informação visual para o cérebro são chamados de *células ganglionares da retina*. Existem mais de um milhão delas, cada uma informando a respeito de uma parte diferente do campo visual. Seus axônios convergem na cabeça do nervo óptico atrás do olho e se deslocam juntos ao longo do cone óptico para dentro do cérebro. O principal sítio de terminação, na maioria dos vertebrados que não são mamíferos, é o *tectum óptico* – uma ampla expansão de células no cérebro médio. Em conexão com os neurônios do tectum, os axônios da retina se distribuem em um padrão previsível de acordo com o arranjo de seus corpos celulares na retina: as células ganglionares que são vizinhas na retina se conectam com células-alvo que são vizinhas no tectum. A projeção organizada cria um **mapa** do espaço visual no tectum (**Figura 22-104**).

Mapas organizados desse tipo são encontrados em muitas regiões do cérebro. No sistema auditivo, por exemplo, os neurônios se projetam a partir do ouvido para o cérebro em uma ordem tonotópica, criando um mapa no qual as células cerebrais que recebem informações sobre sons de diferentes alturas estão ordenadas ao longo de uma linha, como as teclas de um piano. E, no sistema somatossensorial, os neurônios que transmitem informações a respeito do tato mapeiam no córtex cerebral de modo a impressionar um "homúnculo" – uma pequena imagem bidimensional distorcida da superfície do corpo (**Figura 22-105**).

O mapa retinotópico do espaço visual no tectum óptico é o melhor de todos os mapas caracterizados. Como ele se origina? Em princípio, os cones de crescimento poderiam ser fisicamente canalizados para diferentes destinos como consequência de suas diferentes posições de partida, como motoristas em uma rodovia com várias pistas onde é proibido trocar de faixa. Essa possibilidade foi testada no sistema visual em um experimento famoso da década de 1940. Se o nervo óptico de uma rã for cortado, ele irá se regenerar. Os axônios retinais crescem de volta ao tectum óptico, restaurando a visão normal. Se, além disso, o olho for girado em sua órbita no momento de cortar o nervo, de modo que as células retinais originalmente ventrais sejam colocadas na posição das células retinais dorsais, a visão ainda é restaurada, mas com um defeito incômodo: o animal se comporta como se estivesse vendo o mundo de cabeça para baixo e com os lados esquerdo e direito invertidos. Isso ocorre porque as células retinais mal colocadas fazem as conexões apropriadas às suas posições originais,

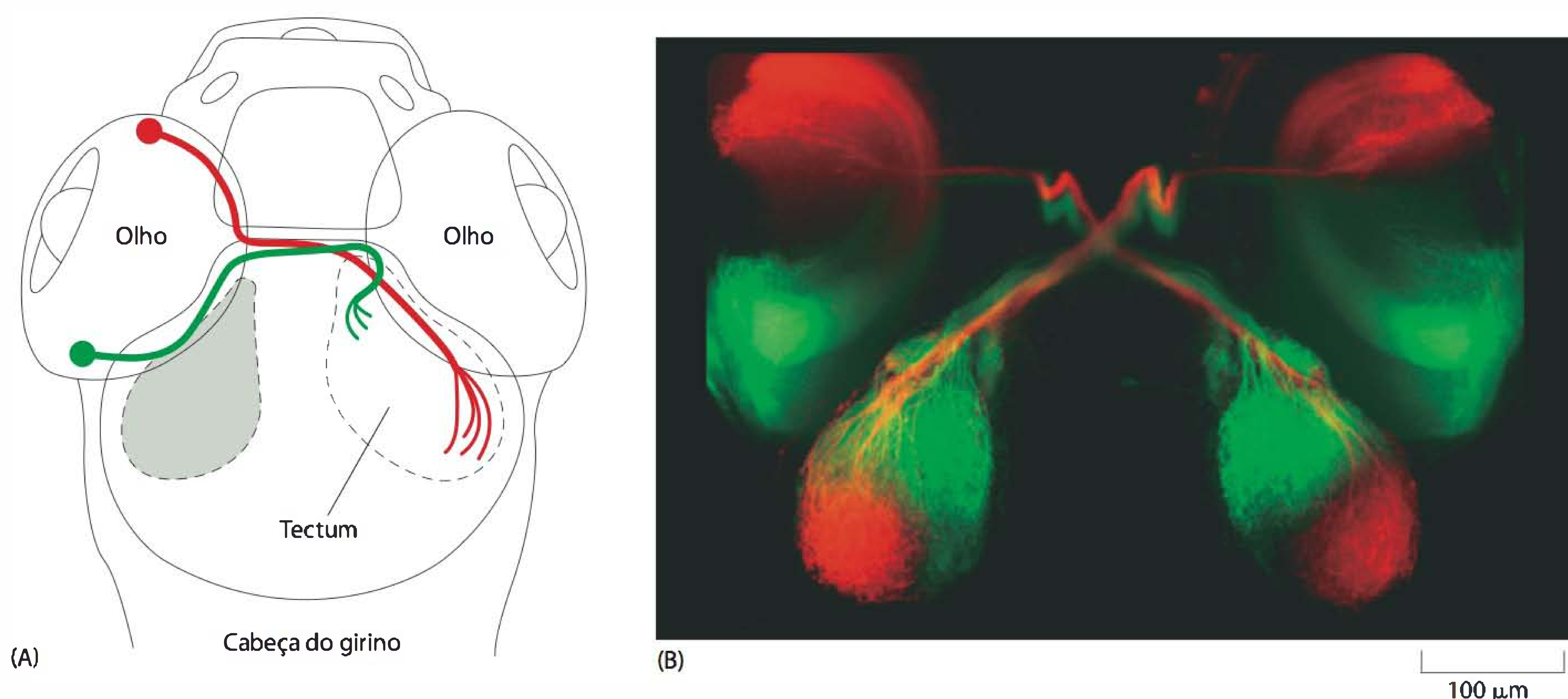


Figura 22-104 O mapa neural a partir do olho para o cérebro de um peixe-zebra jovem. (A) Vista diagramática, olhando para baixo a partir do topo da cabeça. (B) Micrografia de fluorescência. Corantes fluorescentes sinalizadores foram injetados dentro de cada olho – *vermelho* na parte anterior, *verde* na parte posterior. As moléculas sinalizadoras foram absorvidas pelos neurônios na retina e transportadas ao longo de seus axônios, revelando os caminhos que eles tomam para o tectum óptico no cérebro e o mapa que eles formam lá. (Cortesia de Chi-Bin Chien, de D. H. Sanes, T. A. Reh e W. A. Harris, Development of the Nervous System. San Diego, CA: Academic Press, 2000.)

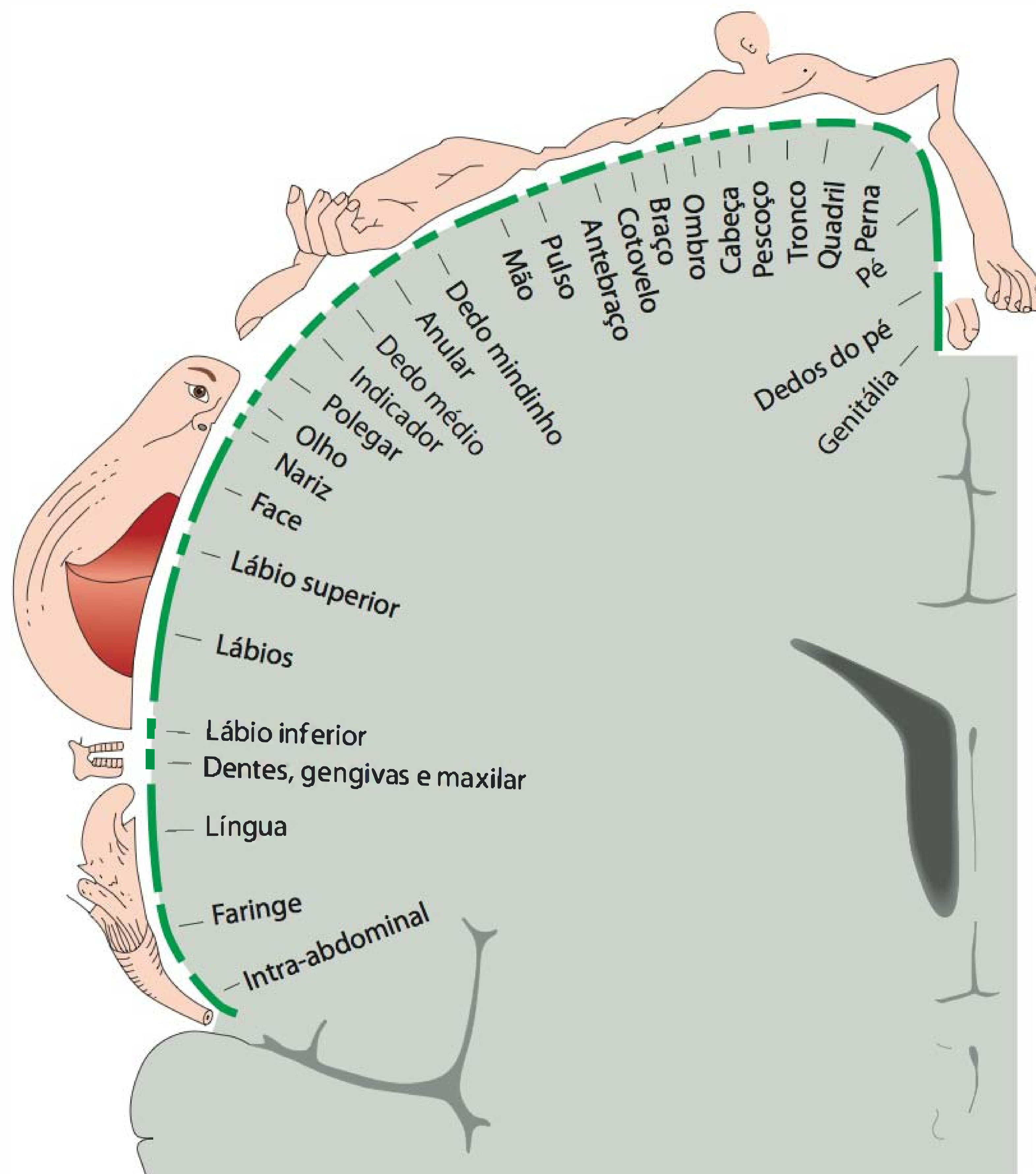


Figura 22-105 Mapa da superfície do corpo no cérebro humano. A superfície do corpo está mapeada na região somatossensorial do córtex cerebral por um sistema organizado de conexões de células nervosas, de modo que a informação sensorial vinda de sítios corporais vizinhos é entregue a sítios vizinhos no cérebro. Isso significa que o mapa no cérebro é em grande parte fiel à topologia da superfície do corpo, mesmo que diferentes regiões do corpo estejam representadas em diferentes proporções, de acordo com sua densidade de inervação. O homúnculo (o "pequeno homem" no cérebro) tem lábios grandes, por exemplo, porque os lábios são uma fonte particularmente grande e importante de informações sensoriais. O mapa foi determinado estimulando-se diferentes pontos no córtex de pacientes conscientes durante cirurgias de cérebro e gravando o que eles diziam estar sentindo. (Segundo W. Penfield e T. Rasmussen, The Cerebral Cortex of Man. New York: Macmillan, 1950.)

e não às suas posições reais. Parece que as células têm valores posicionais – propriedades bioquímicas específicas para posição que representam registros de sua localização original. Como resultado, as células em lados opostos da retina são intrinsecamente diferentes, assim como os neurônios motores da medula espinal que se projetam para diferentes músculos são intrinsecamente diferentes.

Tal não-equivalência entre neurônios é referida como *especificidade neuronal*. É esta característica intrínseca que orienta os axônios retinais a seus sítios-alvo adequados no tectum. Os próprios sítios-alvo são distinguíveis pelos axônios retinais, pois as células do tectum também carregam marcas posicionais. Assim, o mapa neuronal depende de uma correspondência entre dois sistemas de marcadores posicionais, um na retina e outro no tectum.

Os axônios de diferentes regiões da retina respondem diferentemente a um gradiente de moléculas repulsivas no tectum

Os axônios da retina nasal (o lado mais próximo do nariz) se projetam para o tectum posterior, e os axônios da retina temporal (o lado mais distante do nariz) se projetam para o tectum anterior, com regiões intermediárias de retina projetando-se para regiões intermediárias do tectum. Quando se permite que axônios nasais e temporais cresçam sobre um tapete de membranas do tectum anterior e posterior em uma placa de cultura, eles também mostram seletividade (**Figura 22-106**). Os axônios temporais preferem substancialmente as membranas do tectum anterior, como *in vivo*, ao passo que os axônios nasais ou preferem as membranas do tectum posterior ou não têm preferência (dependendo da espécie animal). A diferença-chave entre o tectum anterior e o posterior parece ser um fator repulsivo no tectum posterior, ao qual os axônios retinais temporais são sensíveis, mas os axônios retinais nasais não o são: se um cone de crescimento retinal temporal tocar a membrana do tectum posterior, ele desfaz seus filopódios e se retrai.

Experimentos com base nesses fenômenos *in vitro* identificaram algumas das moléculas responsáveis. O fator repulsivo na membrana do tectum posterior parece ser parcial ou inteiramente constituído de proteínas *efrina A*, um subconjunto da família de proteínas ligadas a GPI que atuam como ligantes para a família *EphA* de receptores de tirosina-cinases. No camundongo, duas efrinas diferentes são expressas para formar um gradiente ântero-posterior nas células do tectum. As células anteriores têm pouca ou nenhuma quantidade

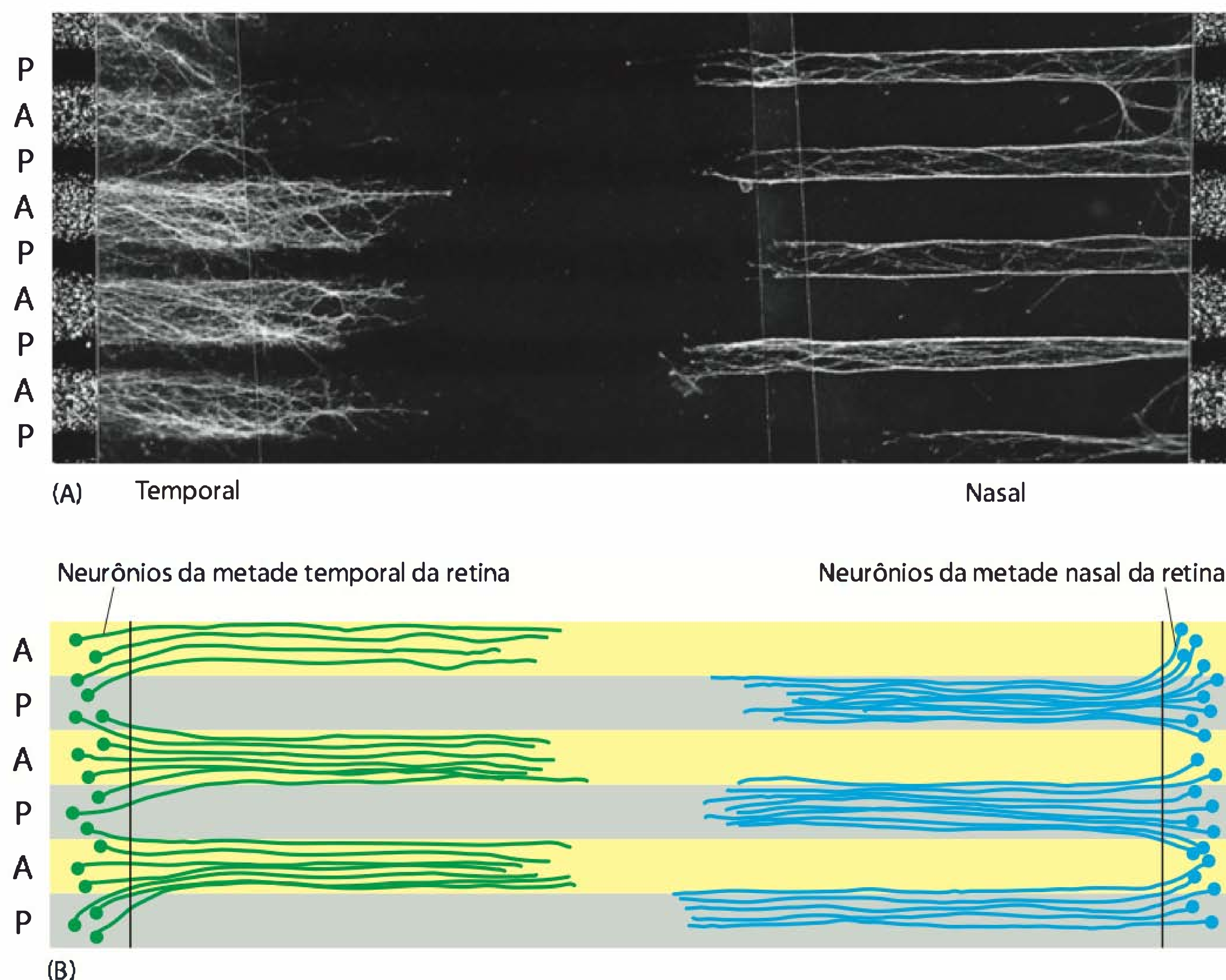


Figura 22-106 Seletividade dos axônios retinais crescendo sobre as membranas do tectum. (A) Uma fotografia da observação experimental. (B) Um diagrama do que está acontecendo. O substrato da cultura foi coberto com faixas alternadas de membrana preparadas tanto a partir do tectum posterior (P) como do tectum anterior (A). Na fotografia, as faixas do tectum anterior são visualizadas corando-as com um marcador fluorescente nas faixas verticais nos lados da figura. Os axônios de neurônios da metade temporal da retina (crescendo a partir da esquerda) seguem as faixas da membrana do tectum anterior, mas evitam a membrana do tectum posterior, enquanto os axônios de neurônios da metade nasal da retina (crescendo a partir da direita) fazem o contrário. Assim, o tectum anterior difere do tectum posterior e a retina nasal da retina temporal, e as diferenças guiam o desenvolvimento axônico seletivo. Esses experimentos foram realizados com células do embrião de galinha. (De Y. von Boxberg, S. Deiss e U. Schwarz, *Neuron* 10:345-357, 1993. Com permissão de Elsevier.)

de efrina, as células no centro do tectum expressam a efrina A2 e as células na margem posterior do tectum expressam a efrina A2 e a efrina A5. Assim, existe um gradiente de expressão de efrinas através do tectum. Enquanto isso, os axônios que entram expressam receptores Eph, também em um gradiente: os axônios temporais expressam altos níveis de Eph, tornando-os sensíveis à repulsão pela efrina A, ao passo que os axônios nasais expressam baixos níveis de Eph. Similarmente, distribuindo-se ao longo do outro eixo principal do tectum, da porção mediana à lateral, há a expressão graduada da proteína efrina B e também de outro tipo de molécula de sinalização, Wnt3, com a expressão equivalentemente graduada de receptores EphB e receptores Wnt3 ao longo do eixo dorso-ventral da retina.

Esse sistema de sinais e receptores é suficiente para produzir um mapa bidimensional organizado, se fizermos uma suposição adicional – uma suposição corroborada por experimentos *in vivo*: que os axônios retinais de alguma maneira interagem uns com os outros e competem pelo território do tectum. Assim, os axônios temporais estão restritos ao tectum anterior e afastam os axônios nasais dele; os axônios nasais, consequentemente, estão restritos ao tectum posterior. Entre os extremos, estabelece-se um equilíbrio, criando-se um mapa uniforme do eixo temporonasal da retina sobre o eixo ântero-posterior do tectum.

Os padrões difusos das conexões sinápticas se tornam nítidos pelo remodelamento dependente de atividade

Em um animal normal, o mapa da retina e do tectum é inicialmente confuso e impreciso: o sistema de marcadores complementares que acabamos de descrever é suficiente para definir o esboço geral do mapa, mas não a ponto de especificar seus detalhes sutis. Estudos em rãs e peixes mostram que cada axônio retinal primeiro se ramifica extensamente no tectum e estabelece uma profusão de sinapses, distribuídas sobre uma grande área do tectum que se sobrepõe aos territórios inervados por outros axônios. Esses territórios são subsequentemente modificados pela eliminação seletiva de sinapses e pela retração de ramificações dos axônios. Isso é acompanhado pela formação de novos brotos, por meio dos quais cada axônio desenvolve uma distribuição mais densa de sinapses no território que ele retém.

Um papel central nesse remodelamento e refinamento do mapa é desempenhado por duas regras de competição que, conjuntamente, ajudam a criar uma ordem espacial: (1) axônios de regiões separadas da retina, que tendem a ser excitados em diferentes momentos, competem para dominar o território disponível do tectum, mas (2) axônios de sítios vizinhos na retina, que tendem a ser excitados ao mesmo tempo, inervam territórios vizinhos no

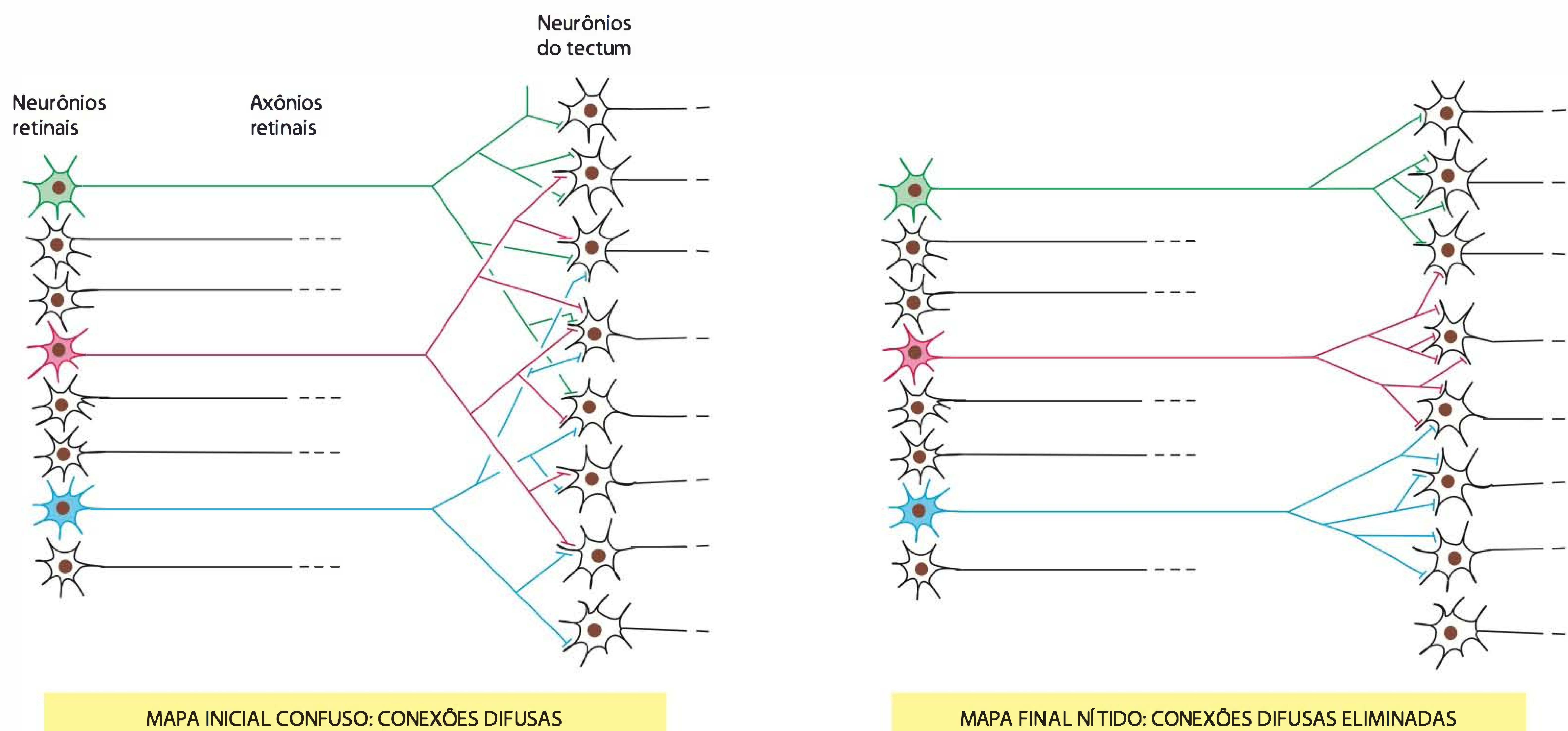


Figura 22-107 Refinamento do mapa tectum-retinal pela eliminação de sinapses. A princípio o mapa é confuso, porque cada axônio retinal se ramifica extensamente para inervar uma região ampla do tectum que se sobrepõe às regiões inervadas por outros axônios retinais. O mapa é então refinado pela eliminação de sinapses. Onde axônios de partes separadas da retina fazem sinapses com a mesma célula do tectum, ocorre a competição, eliminando as conexões feitas por um dos axônios. Porém, axônios de células que são vizinhas próximas na retina cooperam, mantendo suas sinapses em células compartilhadas do tectum. Assim, cada axônio retinal acaba inervando um pequeno território do tectum, adjacente e parcialmente sobreposto ao território inervado por axônios de sítios vizinhos na retina.

tectum, pois colaboram para reter e fortalecer suas sinapses em células compartilhadas do tectum (**Figura 22-107**). O mecanismo subjacente a ambas as regras depende da atividade elétrica e da sinalização nas sinapses que são formadas. Se todos os potenciais de ação forem bloqueados por uma toxina que se liga a canais de Na^+ controlados por voltagem, o remodelamento de sinapses é inibido e o mapa permanece confuso.

O fenômeno de eliminação de sinapses dependente de atividade é encontrado em quase todas as partes do sistema nervoso em desenvolvimento dos vertebrados. As sinapses são primeiramente formadas em abundância e distribuídas sobre uma ampla área-alvo; em seguida, o sistema de conexões é cortado e remodelado por processos competitivos que dependem da atividade elétrica e da sinalização sináptica. Desta maneira, a eliminação de sinapses é distinta da eliminação de neurônios excedentes por morte celular, ocorrendo após o período de morte neuronal normal ter acabado.

Muito do que sabemos sobre os mecanismos celulares de formação e eliminação de sinapses vem de experimentos sobre a inervação do músculo esquelético em embriões de vertebrados. A troca bidirecional de sinais entre os terminais axônicos dos nervos e as células musculares controla a formação inicial das sinapses. Em locais de contato, os receptores de acetilcolina estão agrupados na membrana da célula muscular, e o aparato para a secreção deste neurotransmissor se organiza nos terminais dos axônios (discutido no Capítulo 11). Cada célula muscular primeiramente recebe sinapses de vários neurônios; contudo, no final, por um processo que tipicamente leva duas semanas, ela fica inervada por apenas um. A retração de sinapses novamente depende da comunicação sináptica: se a transmissão sináptica for bloqueada por uma toxina que se liga aos receptores de acetilcolina na membrana da célula muscular, a célula muscular retém sua inervação múltipla além do tempo normal para a eliminação.

Experimentos com o sistema musculoesquelético, assim como o sistema tectum-retinal, sugerem que não só a quantidade de atividade elétrica em uma sinapse é importante a sua manutenção, mas também sua coordenação temporal. O fortalecimento ou o enfraquecimento de uma sinapse parece depender criticamente do fato de a atividade na célula pré-sináptica ser ou não sincronizada com a atividade das outras células pré-sinápticas que estão fazendo sinapses no mesmo alvo (e assim, também, sincronizadas com a atividade das próprias células-alvo).

Essas e muitas outras descobertas sugeriram uma interpretação simples das regras de competição para a eliminação de sinapses no sistema tectum-retinal (**Figura 22-108**). Os axônios de diferentes partes da retina disparam em momentos diferentes e, assim, competem. A cada vez que um deles dispara, a sinapse (ou as sinapses) feita pelo outro em uma célula-alvo do tectum é enfraquecida, até que um dos axônios é deixado sozinho no comando daquela célula. Os axônios de células retinais vizinhas, por outro lado, tendem a disparar

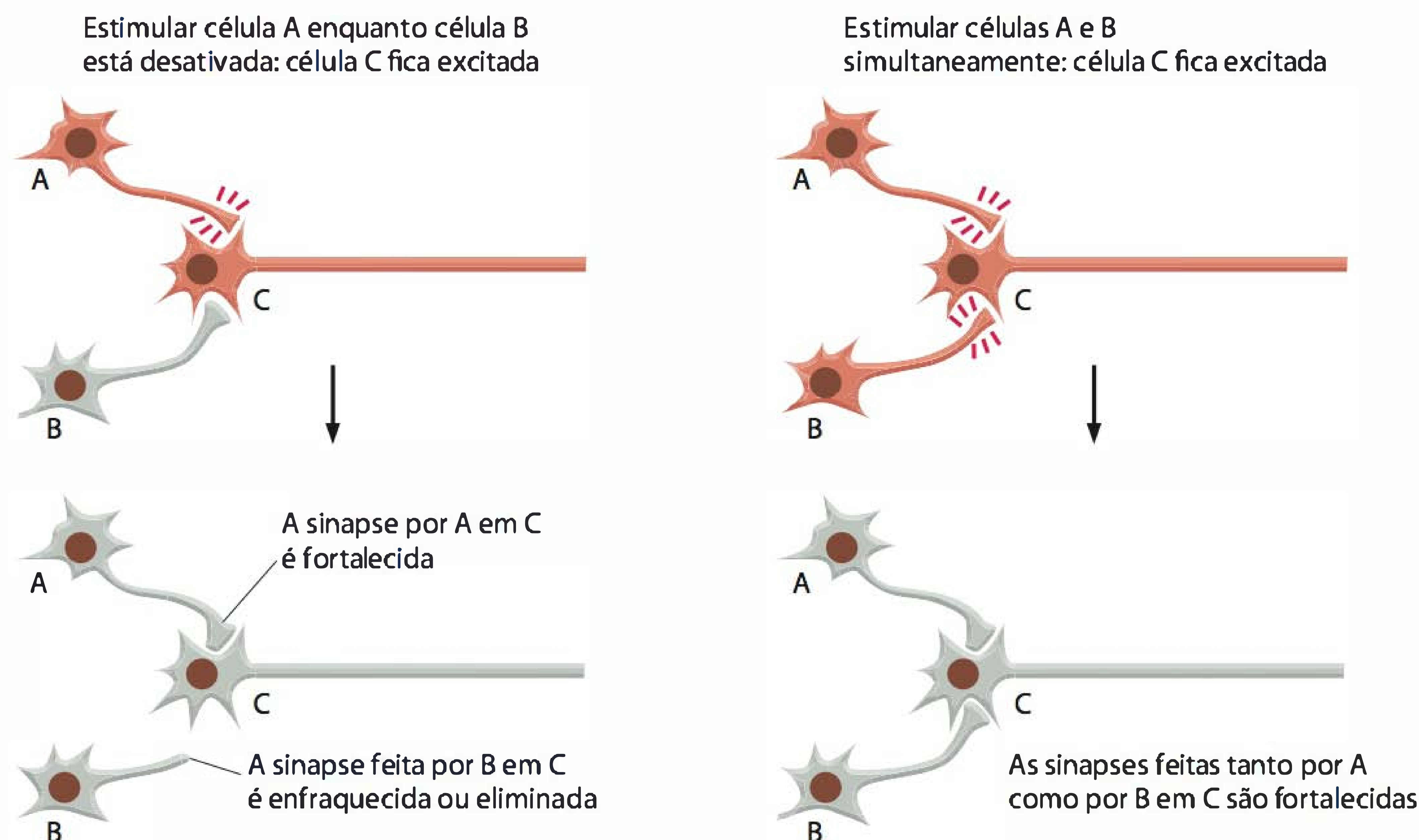


Figura 22-108 Modificação de sinapses e sua dependência da atividade elétrica. Experimentos em vários sistemas indicam que as sinapses são fortalecidas ou enfraquecidas pela atividade elétrica, de acordo com as regras mostradas no diagrama. O princípio subjacente parece ser que cada excitação de uma célula-alvo tende a enfraquecer qualquer sinapse em que o terminal do axônio pré-sináptico tenha estado desativado, mas a fortalecer qualquer sinapse em que o terminal do axônio pré-sináptico tenha sido recém-ativado. Como resultado, "neurônios que disparam juntos, se instalam juntos". Uma sinapse repetidamente enfraquecida e raramente fortalecida pode ser completamente eliminada.

em sincronia uns com os outros: portanto, eles não competem, mantendo as sinapses em células compartilhadas do tectum e criando um mapa precisamente ordenado, no qual células vizinhas da retina se projetam para sítios vizinhos no tectum.

A experiência molda o padrão de conexões sinápticas no cérebro

O fenômeno que acabamos de descrever é resumido na frase "neurônios que disparam juntos, se instalam juntos". A mesma regra de disparo que relaciona a manutenção de sinapses à atividade neural ajuda a organizar nossos cérebros em desenvolvimento à luz da experiência.

No cérebro de um mamífero, os axônios que transmitem *inputs* vindos dos dois olhos são unidos em uma camada celular específica na região visual do córtex cerebral. Aqui eles formam dois mapas sobrepostos do campo visual externo, um percebido através do olho direito, e o outro percebido através do olho esquerdo. Embora haja evidências de uma certa tendência para que *inputs* dos olhos direito e esquerdo sejam segregados mesmo antes do início da comunicação sináptica, uma grande proporção dos axônios que carregam informações a partir dos dois olhos em estágios iniciais faz sinapses conjuntamente em células-alvo corticais compartilhadas. Contudo, um período de atividade de sinalização inicial ocorrendo espontânea e independentemente em cada retina, mesmo antes de começar a visão, leva a uma clara segregação de *inputs*, criando faixas de células no córtex que são orientadas por *inputs* vindos do olho direito, alternando com faixas que são orientadas por *inputs* vindos do olho esquerdo (**Figura 22-109**). A regra de disparo sugere uma interpretação simples: um par de axônios trazendo informações de sítios vizinhos no olho esquerdo irá frequentemente disparar ao mesmo tempo e, portanto, instalar-se ao mesmo tempo; o mesmo fará um par de axônios de sítios vizinhos no olho direito. Porém, um axônio do olho direito e um axônio do olho esquerdo raramente irão disparar juntos e, em vez

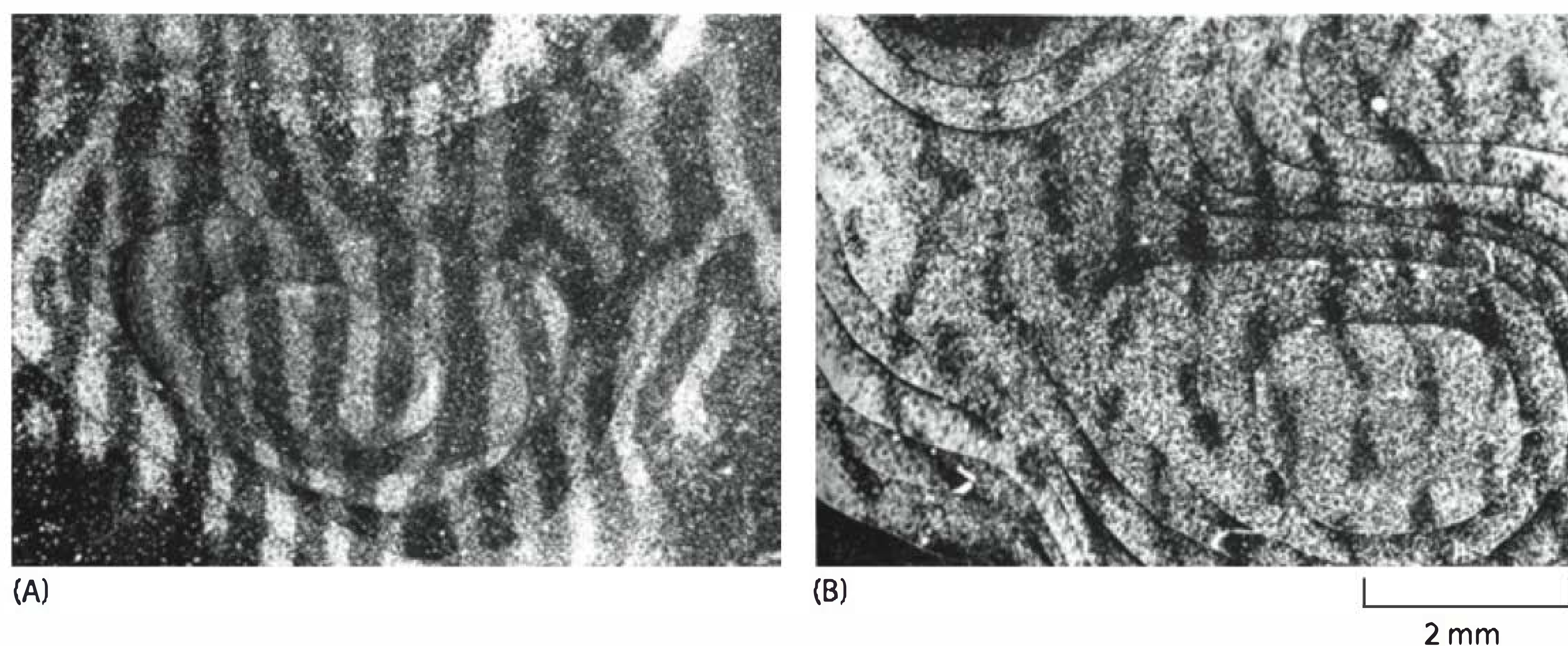


Figura 22-109 Colunas de dominância ocular no córtex visual do cérebro de um macaco e sua sensibilidade à experiência visual. (A) Normalmente, as faixas de células corticais dirigidas pelo olho direito se alternam com as faixas, de igual largura, dirigidas pelo olho esquerdo. As faixas são reveladas, aqui, injetando-se uma molécula detectora radiativa dentro de um olho, dando tempo para que este detector seja transportado para o córtex visual e detectando a radiatividade por autorradiografia, em secções cortadas paralelamente à superfície cortical. (B) Se um olho é mantido coberto durante o período crítico de desenvolvimento e, assim, privado de experiências visuais, suas faixas se contraem, e aquelas do olho ativo se expandem. Desta maneira, o olho privado pode perder o poder de visão quase inteiramente. (De D. H. Hubel, T. N. Wiesel e S. Le Vay, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 278:377-409, 1977. Com permissão de The Royal Society.)

disso, competirão. Na verdade, se a atividade dos dois olhos for silenciada utilizando-se fármacos que bloqueiam potenciais de ação ou a transmissão sináptica, os *inputs* não se segregam corretamente.

A manutenção do padrão de conexões é extraordinariamente sensível às experiências que ocorrem cedo na vida. Se, durante um certo *período crítico* (que termina aproximadamente aos cinco anos de idade em humanos), um olho é mantido coberto por um tempo, de forma a ficar privado de estimulação visual, enquanto o outro olho é estimulado normalmente, o olho privado perde suas conexões sinápticas para o córtex e fica quase inteira e irreversivelmente cego. De acordo com o que preveria a regra de disparo, ocorreu uma competição na qual as sinapses no córtex visual feitas por axônios inativos foram eliminadas, enquanto as sinapses feitas por axônios ativos foram consolidadas. Desta maneira, o território cortical é alocado para axônios que carregam informações e não é desperdiçado com aqueles que são silenciosos.

No estabelecimento das conexões nervosas que nos permitem ver, não só a quantidade de estimulação visual é importante, mas também sua coordenação temporal. Por exemplo, a capacidade de ver a profundidade – a visão estérea – depende de células em outras camadas do córtex visual que recebem *inputs* transmitidos a partir de ambos os olhos de uma só vez, transportando informações sobre a mesma parte do campo visual como visto de dois ângulos levemente diferentes. Essas células dirigidas de maneira binocular nos permitem comparar o que é visto pelo olho direito com o que é visto pelo olho esquerdo, de forma a deduzir informações sobre as distâncias relativas dos objetos em relação a nós. Contudo, se os dois olhos forem impedidos durante o período crítico de ver a mesma cena ao mesmo tempo – por exemplo, cobrindo primeiro um olho e depois o outro em dias alternados, ou simplesmente como consequência de um estrabismo infantil – quase nenhuma das células dirigidas de maneira binocular é retida no córtex, e a capacidade de percepção estérea é inevitavelmente perdida. Evidentemente, de acordo com a regra de disparo, os *inputs* a partir de cada olho para um neurônio dirigido de maneira binocular são mantidos somente se os dois *inputs* são frequentemente acionados para disparar em sincronia, como ocorre quando os dois olhos olham juntos para a mesma cena.

A memória adulta e a remodelação das sinapses durante o desenvolvimento podem depender de mecanismos similares

Vimos no Capítulo 11 que as alterações sinápticas subjacentes à memória, pelo menos em algumas partes do cérebro adulto, notavelmente o hipocampo, dependem do comportamento de um tipo particular de receptor para o neurotransmissor glutamato – o receptor NMDA. A inundação de Ca^{2+} na célula pós-sináptica através de canais abertos por este receptor aciona mudanças duradouras na intensidade das sinapses naquela célula, afetando tanto as estruturas pré-sinápticas como as pós-sinápticas. As alterações que são induzidas pelo mecanismo dependente de NMDA no cérebro adulto obedecem a regras semelhantes à regra de disparo no desenvolvimento: os eventos no mundo exterior que levam dois neurônios a serem ativos ao mesmo tempo, ou em rápida sucessão, favorecem a formação ou o fortalecimento de sinapses entre eles. Tem-se sugerido que esta condição, denominada *regra de Hebb*, seja o princípio fundamental subjacente ao aprendizado associativo.

É possível, então, que tanto o aprendizado adulto como as formas mais extremas de plasticidade sináptica vistas durante o desenvolvimento dependam da mesma maquinaria básica de ajuste sináptico? Existem muitos indícios que apontam para tal. Observou-se, por exemplo, que inibidores que bloqueiam especificamente a ativação do receptor NMDA interferem no refinamento e na remodelação de conexões sinápticas no sistema visual em desenvolvimento. Tanto no animal em desenvolvimento como no adulto, as alterações na força das conexões sinápticas correspondem a mudanças na estrutura física. A escala dessas mudanças físicas é, contudo, muito diferente. No organismo em desenvolvimento, a atividade elétrica frequentemente regula a extensão e a regressão de grandes ramificações das árvores axônicas e dendríticas. Porém, no cérebro adulto, os ajustes estruturais que ocorrem em resposta à atividade parecem ser tipicamente muito mais localizados de forma precisa, afetando os tamanhos de espinhos dendríticos individuais – as minúsculas protrusões em forma de maçaneta, com alguns poucos micrômetros de comprimento, nas quais os dendritos recebem sinapses individuais (**Figura 22-110**). Parece que o Ca^{2+} que entra em um espinho por meio dos canais de NMDA, em resposta à excitação da sinapse naquele espinho

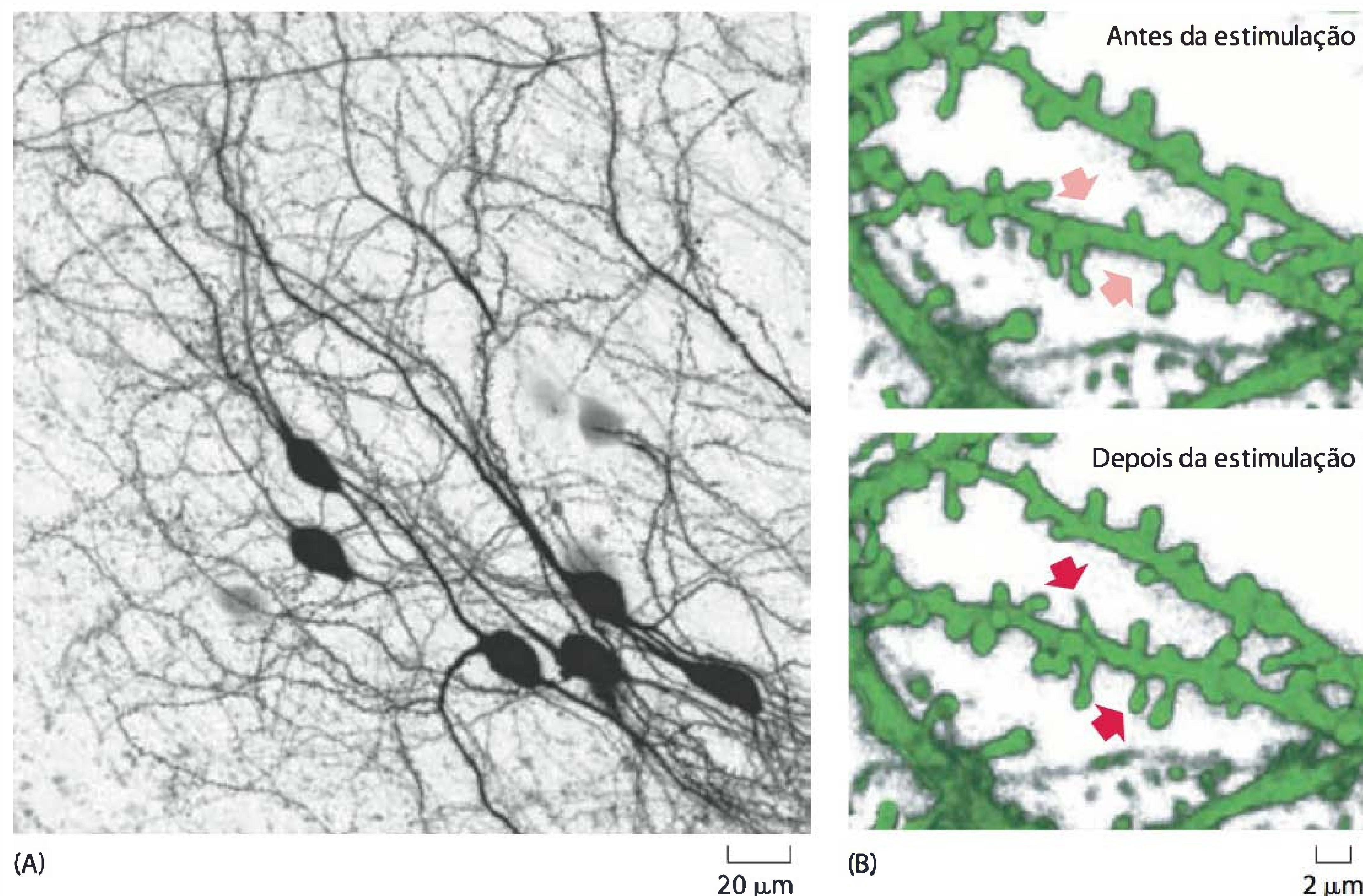


Figura 22-110 Crescimento de espinhos dendríticos em resposta à estimulação sináptica. (A) Neurônios em uma porção de tecido vivo do hipocampo de um camundongo jovem. As células são marcadas pela expressão da proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) e observadas com um microscópio de varredura de *laser* de dois fótons, que permite a visualização de dendritos individuais em alta resolução. O inserto mostra uma imagem processada de uma pequena parte de alguns dos dendritos. Estes estão cobertos por minúsculos espinhos dendríticos, que são os locais das sinapses. (B) Intensos ciclos repetidos de estimulação sináptica, acionados por um microeletrodo próximo, ocasionam a formação de novos espinhos dentro de 30 minutos. A estimulação em baixa frequência tem o efeito contrário, ocasionando a regressão de um subgrupo de espinhos. (De U. V. Nägerl, N. Eberhorn, S. B. Cambridge e T. Bonhoeffer, *Neuron* 44:759-767, 2004. Com permissão de Elsevier.)

particular, pode fazer com que o espinho remodele seu citoesqueleto de actina. Contudo, ainda temos muito a aprender sobre o mecanismo que ocasiona tais mudanças e sua relação com o aprendizado e a memória. A base molecular dos processos de remodelação das sinapses pela qual a experiência molda nossos cérebros continua a ser um dos principais desafios que o sistema nervoso apresenta à biologia celular.

Resumo

O desenvolvimento do sistema nervoso acontece em três fases: primeiro, as células nervosas são geradas por meio de divisões celulares; em seguida, tendo cessado a divisão, as células emitem axônios e dendritos para formar sinapses profusas com outras células remotas, de modo que a comunicação possa iniciar; por último, o sistema de conexões sinápticas é refinado e remodelado de acordo com o padrão de atividade elétrica na rede neural.

Os neurônios, e as células gliais que sempre os acompanham, são gerados a partir de precursores ectodérmicos, e aqueles nascidos em diferentes momentos e lugares expressam diferentes grupos de genes, que os ajudam a determinar as conexões que serão formadas. Os axônios e os dendritos se projetam dos neurônios por meio de cones de crescimento, que seguem rotas específicas delineadas por sinais ao longo da via. Estruturas como a lâmina pavimentar da medula espinal embrionária secretam tanto substâncias químicas atrativas como repelentes, às quais os cones de crescimento de diferentes classes de neurônios respondem de maneira distinta. Quando alcançam sua área-alvo, os axônios terminam seletivamente em um subgrupo de células acessíveis, e em muitas partes do sistema nervoso são montados mapas neurais – projeções organizadas de um arranjo de neurônios sobre outro. No sistema tectum-retinal, o mapa tem como base a combinação de sistemas complementares de marcadores de superfície celular posição-específicos – efrinas e receptores Eph – presentes nos dois grupos de células.

Após os cones de crescimento terem alcançado seus alvos e as conexões iniciais terem se formado, ocorrem dois tipos principais de ajustes. Primeiro, muitos dos neurônios em inervação morrem como resultado de uma competição por fatores de sobrevivência, como o NGF (fator de crescimento neuronal) secretado pelo tecido-alvo. Essa morte celular ajusta a quantidade de inervação de acordo com o tamanho do alvo. Segundo, as sinapses individuais são suprimidas em alguns lugares e reforçadas em outros, a fim de criar um padrão de conexões ordenado de forma mais precisa. Este último processo depende da atividade elétrica: sinapses que são ativadas com frequência são reforçadas, e diferentes neurônios que contatam a mesma célula-alvo tendem a manter suas sinapses no alvo compartilhado somente se ambos forem seguidamente ativados ao mesmo tempo. Desta maneira, a estrutura do cérebro pode ser ajustada para refletir as conexões entre eventos que ocorrem no mundo exterior. O mecanismo molecular subjacente a essa plasticidade sináptica pode ser similar àquele responsável pela formação das memórias na vida adulta.

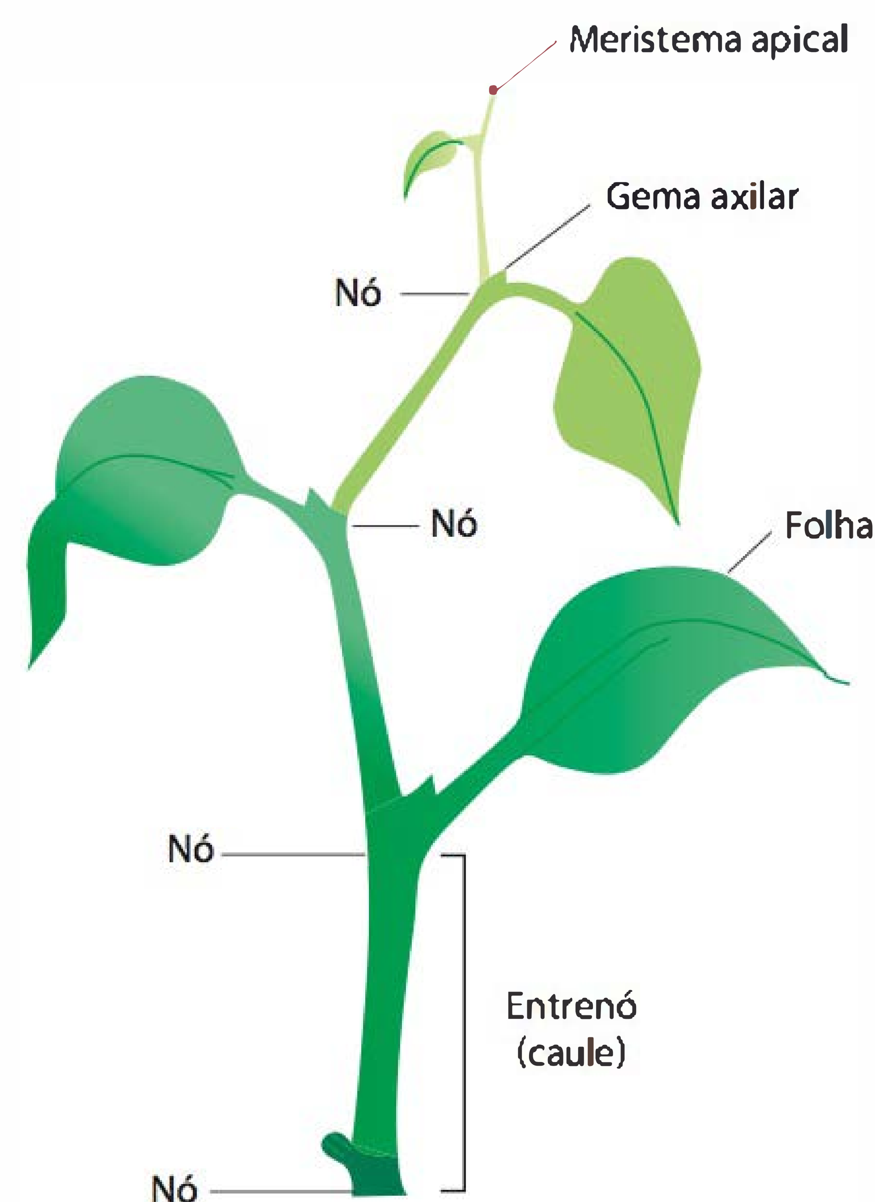


Figura 22-111 Um exemplo simples da construção modular nas plantas. Cada módulo (mostrado em diferentes tons de *verde*) consiste em um caule, uma folha e uma gema contendo um centro de crescimento potencial ou meristema. A gema se forma nos pontos de ramificação ou nós (ou, ainda, nodos), onde a folha se separa do caule. Os módulos se originam sequencialmente a partir da atividade contínua do meristema apical.

DESENVOLVIMENTO VEGETAL

As plantas e os animais estão separados por cerca de 1,5 bilhão de anos de história evolutiva. Sua organização multicelular evoluiu independentemente, mas utilizando o mesmo jogo inicial de ferramentas – o conjunto de genes herdado de seu ancestral eucariótico unicelular comum. A maioria das diferenças entre suas estratégias de desenvolvimento provém de duas peculiaridades básicas das plantas. Primeiro, elas obtêm sua energia da luz solar, e não pela ingestão de outros organismos. Isso impõe um plano corporal diferente daquele dos animais. Segundo, suas células são envolvidas por paredes celulares semirrígidas e cimentadas umas às outras, impedindo-as de se mover como as células animais. Isso impõe um conjunto diferente de mecanismos para a modelagem do corpo e diferentes processos de desenvolvimento para enfrentar um ambiente variável.

O desenvolvimento animal é em grande parte protegido contra mudanças ambientais, e o embrião gera a mesma estrutura corporal, geneticamente determinada, sem ser afetado por condições externas. O desenvolvimento da maioria dos vegetais, por outro lado, é dramaticamente influenciado pelo ambiente. Como não podem se equiparar a seu ambiente, movendo-se de um lugar para o outro, os vegetais se adaptam, em vez de alterar o curso de seu desenvolvimento. Sua estratégia é oportunista. Um dado tipo de órgão – uma folha, uma flor ou uma raiz, por exemplo – pode ser produzido, a partir de um óvulo fertilizado, por meio de muitos caminhos diferentes, de acordo com sinais do ambiente. De uma folha de begônia fixada ao solo pode crescer uma raiz; a raiz pode formar um broto; o broto, sob luz solar, pode desenvolver folhas e flores.

A planta madura consiste, tipicamente, em muitas cópias de um pequeno conjunto de módulos padronizados, como descrito na **Figura 22-111**. As posições e os momentos em que cada módulo é gerado são bastante influenciados pelo ambiente, determinando uma ampla variação na estrutura global da planta. As escolhas entre módulos alternativos e sua organização em uma planta inteira dependem de estímulos externos e sinais hormonais de longo alcance que desempenham um papel muito menor no controle do desenvolvimento animal.

Contudo, embora a estrutura global de uma planta – seu padrão de raízes ou ramos, seu número de folhas ou flores – possa ser muito variável, sua organização detalhada em pequena escala não o é. Uma folha, uma flor ou até mesmo um embrião jovem de planta são especificados de forma tão precisa como qualquer órgão de um animal, possuindo uma estrutura *determinada*, em contraste com o padrão *indeterminado* de ramificação e brotamento da planta como um todo. A organização interna de um módulo vegetal gera essencialmente os mesmos problemas relacionados ao controle genético de formação de padrões observados no desenvolvimento animal, e eles são resolvidos de maneiras análogas. Nesta seção, daremos enfoque aos mecanismos celulares do desenvolvimento de angiospermas (plantas que florescem). Examinaremos tanto as diferenças como as similaridades com os animais.

A *Arabidopsis* serve de organismo-modelo para a genética molecular de plantas

As angiospermas, apesar de sua imensa variedade, têm uma origem relativamente recente. Os mais antigos exemplares fósseis conhecidos têm 130 milhões de anos de idade, em comparação aos 350 milhões ou mais de animais vertebrados. Portanto, subjacente à diversidade de formas, existe um alto grau de similaridade quanto aos mecanismos moleculares. Como veremos, uma pequena mudança genética pode transformar a estrutura de uma planta em grande escala; e, assim como a fisiologia das plantas permite sua sobrevivência em muitos ambientes diferentes, ela também permite a sobrevivência de muitas formas diferencialmente estruturadas. Uma mutação que origina um animal com duas cabeças geralmente é letal; a mutação que dobra o número de flores ou ramos em uma planta geralmente não é.

Para identificar os genes que controlam o desenvolvimento vegetal e descobrir seu funcionamento, os biólogos vegetais selecionaram uma pequena erva daninha, o agrião (ou árabis) de parede comum *Arabidopsis thaliana* (**Figura 22-112**) como seu organismo-modelo



Figura 22-112 *Arabidopsis thaliana*. Esta pequena planta é um membro da família da mostarda (ou das crucíferas, ver também Figura 1-46). É uma erva daninha sem utilidade econômica, mas de grande valor para estudos genéticos do desenvolvimento vegetal. (De M. A. Estelle e C. R. Somerville, *Trends Genet*. 12:89-93, 1986. Com permissão de Elsevier.)

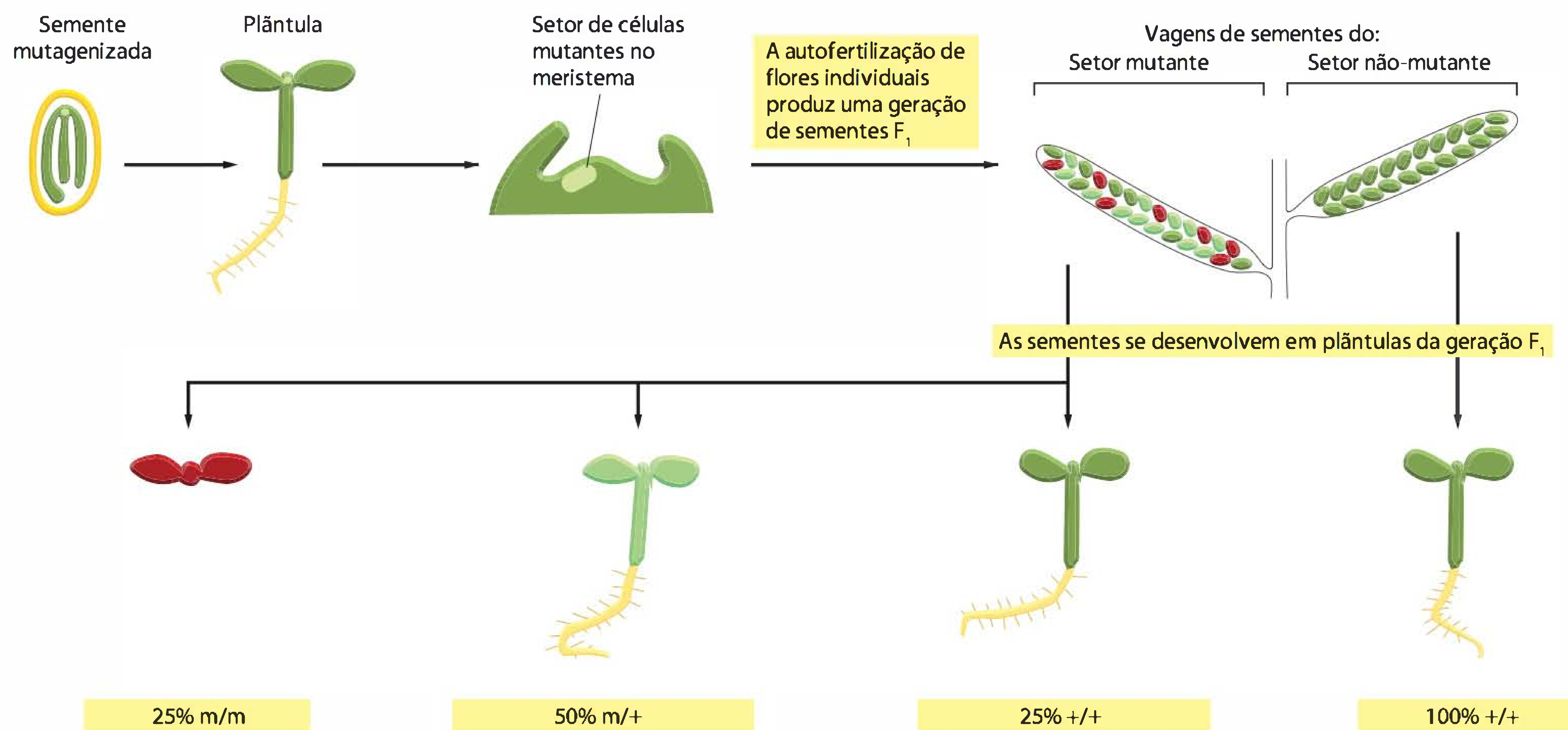


Figura 22-113 Produção de mutantes em *Arabidopsis*. Uma semente, contendo um embrião multicelular, é tratada com uma substância química mutagênica e cultivada até o estágio de planta adulta. Em geral, esta planta será um mosaico de clones de células carregando diferentes mutações induzidas. Uma flor individual produzida por esta planta normalmente será composta por células pertencentes ao mesmo clone, todas carregando a mesma mutação, m, na forma heterozigota (m/+). A autofertilização de flores individuais por seu próprio pólen resulta em vagens de sementes, cada qual contendo uma família de embriões em que metade dos membros será, em média, heterozigota (m/+), um quarto será mutante homozigoto (m/m) e um quarto será o tipo selvagem homozigoto (+/+). Frequentemente, a mutação terá um efeito letal recessivo, como indicado aqui pela ausência de uma raiz na plântula m/m. O estoque mutante é então mantido pelo cruzamento dos heterozigotos, que irão produzir vagens de sementes (geração F_2) que contêm uma mistura de sementes +/+, m/+ e m/m.

principal. Assim como a *Drosophila* ou o *Caenorhabditis elegans*, ela é pequena, de rápida reprodução e conveniente para a genética. Pode ser crescida dentro de ambientes fechados (como placas de Petri ou minúsculos potes de planta) em grande quantidade, produzindo centenas de sementes por planta após 8 a 10 semanas. Ela tem, em comum com o *C. elegans*, uma vantagem significativa sobre a *Drosophila* ou os animais vertebrados para estudos genéticos: como muitas angiospermas, ela pode se reproduzir como hermafrodita, pois uma única flor produz tanto óvulos como gametas masculinos que podem fertilizá-la. Portanto, quando uma flor heterozigota para uma mutação letal recessiva é autofertilizada, um quarto de suas sementes irá apresentar o fenótipo embrionário homozigoto. Isso facilita a realização de triagens genéticas (**Figura 22-113**) e também a obtenção de um catálogo dos genes necessários a processos específicos do desenvolvimento.

O genoma de *Arabidopsis* é rico em genes controladores do desenvolvimento

A *Arabidopsis* tem um dos menores genomas de plantas – 125 milhões de pares de nucleotídeos, estando no mesmo nível de *C. elegans* e *Drosophila* – e a sequência completa de DNA é agora conhecida. Ela contém aproximadamente 26.000 genes. Contudo, este total inclui muitas duplicatas recentemente geradas, de modo que o número de tipos funcionalmente distintos de proteínas representadas pode ser consideravelmente menor. Foram estabelecidos métodos de cultura de células e de transformação genética, assim como imensas bibliotecas de sementes carregando mutações produzidas por inserções aleatórias de elementos genéticos móveis, de forma que plantas com mutações em qualquer gene selecionado podem ser obtidas sob medida. Assim, existem ferramentas potentes para analisar as funções de muitos genes. Embora apenas uma pequena fração do conjunto total de genes tenha sido experimentalmente caracterizada até agora, poder-se tentar atribuir funções a vários genes – cerca de 18.000 – com base nas similaridades de sequência com genes bem caracterizados em *Arabidopsis* e outros organismos.

O genoma da *Arabidopsis* é ainda mais rico em genes que codificam proteínas de regulação gênica que os genomas de muitos animais multicelulares (**Tabela 22-2**). Algumas importantes famílias de proteínas de regulação gênica de animais (como a família Myb de proteínas que se ligam ao DNA) são bastante difundidas, enquanto outras (como os receptores de hormônios nucleares) parecem estar completamente ausentes, e existem grandes famílias de proteínas de regulação gênica nos vegetais que não têm homólogos nos animais.

Embora proteínas de regulação gênica homólogas (como as proteínas homeodomínio) possam ser reconhecidas tanto nos vegetais quanto nos animais, elas têm pouco em comum no que se refere aos genes que regulam ou aos tipos de decisões relacionadas ao desenvolvimento que controlam, e há pouca conservação das sequências de proteína fora dos domínios de ligação ao DNA.

Tabela 22-2 Algumas das principais famílias de proteínas de regulação gênica em *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

	NÚMERO DE MEMBROS DA FAMÍLIA PREVISTOS A PARTIR DA ANÁLISE DE GENOMAS			
FAMÍLIA	*Arabidopsis*	*Drosophila*	*C. elegans*	LEVEDURA
Myb	190	6	3	10
AP2/EREBP (proteína de ligação ao elemento responsivo a etileno/Apetala2)	144	0	0	0
bHLH (hélice-alça-hélice básica)	139	46	25	8
NAC	109	0	0	0
C2H2 (dedo de Zn)	105	291	139	53
Homeobox	89	103	84	9
MADS box	82	2	2	4
bZIP	81	21	25	21
WRKY (dedo de Zn)	72	0	0	0
GARP	56	0	0	0
C2C2 (dedo de Zn)/GATA	104	6	9	10
Receptor de hormônio nuclear	0	21	25	0
C6 (dedo de Zn)	0	0	0	52
Total estimado (incluindo muitos não listados acima)	1533	635	669	209
% de genes no genoma	5,9	4,5	3,5	3,5

A Tabela lista somente aquelas famílias que têm no mínimo 50 membros em pelo menos um organismo. (Dados de J. L. Riechmann et al., *Science* 290:2105--2110, 2000. Com permissão de AAAS.)

A *Arabidopsis* é semelhante aos animais multicelulares quanto ao fato de possuir muitos genes para comunicação celular e transdução de sinais (1.900 genes dos 18.000 classificados), mas os detalhes específicos desses conjuntos de genes são muito diferentes, como discutido no Capítulo 15. Os mecanismos de sinalização Wnt, Hedgehog, Notch e TGFβ estão ausentes em *Arabidopsis*. Em compensação, outras vias de sinalização peculiares aos vegetais são altamente desenvolvidas. Os receptores de superfície celular da classe das tirosina-cinases parecem estar completamente ausentes, embora muitos dos componentes de sinalização que atuam a jusante desses receptores em animais estejam presentes. Inversamente, existem vários receptores da classe das serina/treonina-cinases, mas eles não atuam pelo mesmo sistema de mensageiros intracelulares que os receptores de serina/treonina-cinases em animais. Muitos conjuntos de genes são dedicados aos processos de desenvolvimento que são especialmente importantes às plantas: mais de 1.000 para a síntese e o remodelamento da parede celular vegetal, por exemplo, e mais de 100 para detectar e responder à luz.

Examinaremos agora como esses genes das plantas são utilizados para controlar o desenvolvimento vegetal.

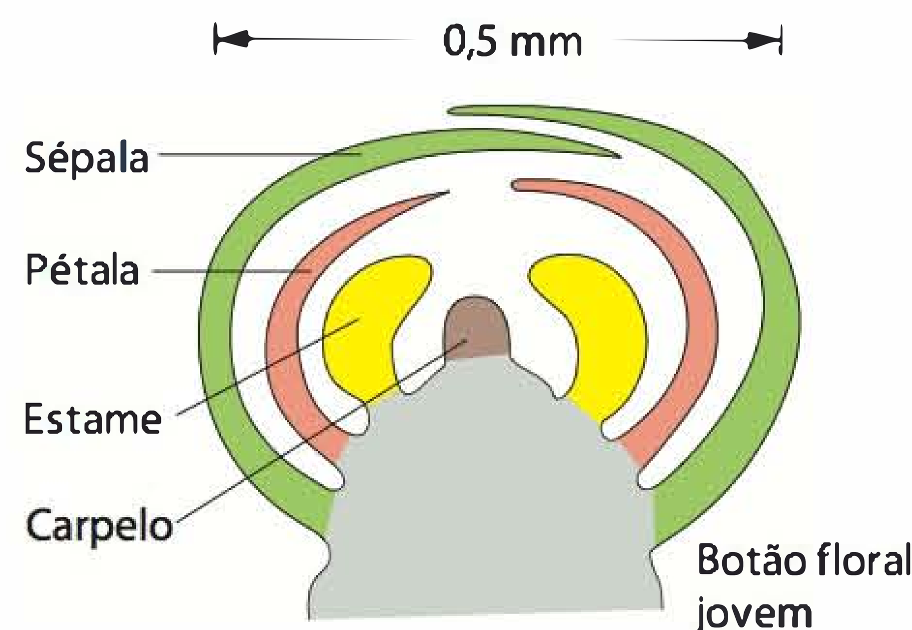
O desenvolvimento embrionário inicia com o estabelecimento de um eixo raiz-caule e é, então, interrompido dentro da semente

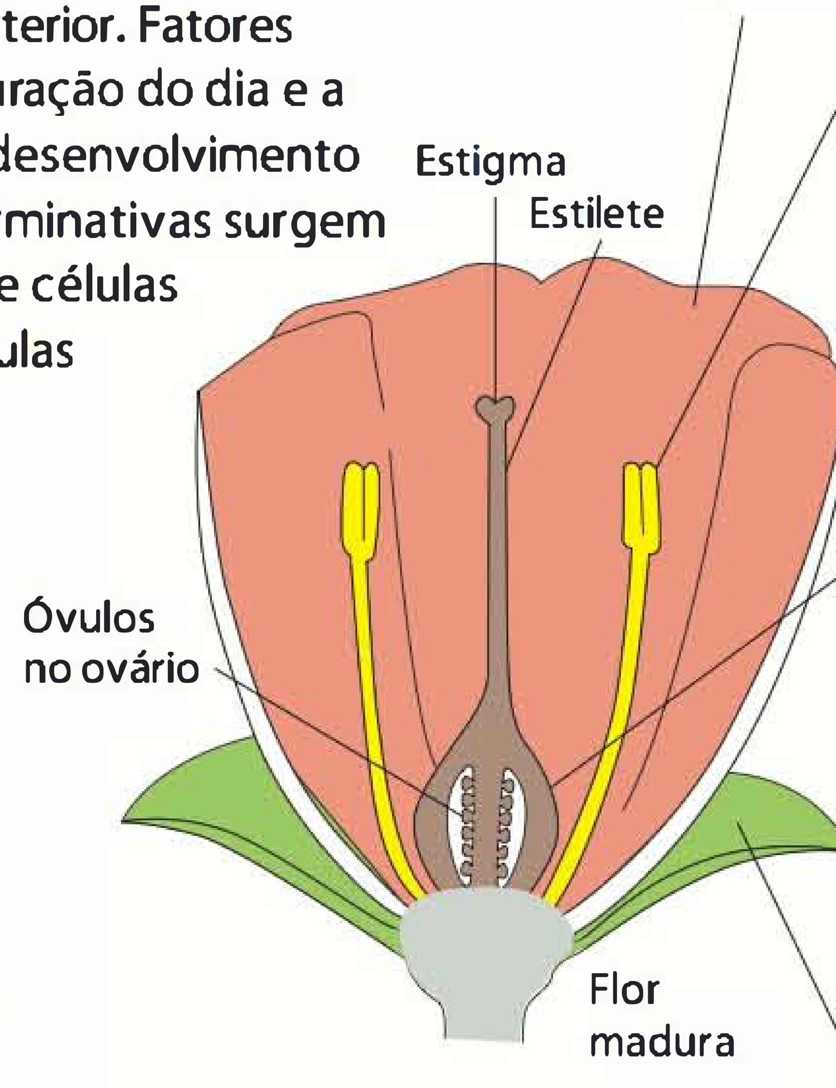
A estratégia básica da reprodução sexual em angiospermas está brevemente resumida no **Painel 22-1**. O óvulo fertilizado, ou zigoto, de um vegetal superior começa a se dividir assimetricamente para estabelecer a polaridade do futuro embrião. Um dos produtos dessa divisão é uma pequena célula com citoplasma denso, que se tornará o embrião propriamente dito. O outro é uma grande célula vacuolada que continuará a se dividir e formar uma estrutura denominada *suspensor*, o qual é, de certa forma, comparável ao cordão umbilical dos mamíferos. O suspensor liga o embrião ao tecido nutritivo adjacente e estabelece um caminho para o transporte de nutrientes.

Durante a próxima etapa do desenvolvimento, a célula embrionária diploide se prolifera e forma uma bola de células que, rapidamente, adquirem uma estrutura polarizada. Isso envolve dois grupos principais de células em proliferação – um na extremidade do suspensor embrionário, que irá colaborar com a célula suspensora mais elevada para gerar a raiz, e um na extremidade oposta, que gerará o caule (**Figura 22-114**). O eixo principal raiz-caule assim estabelecido é análogo ao eixo cabeça-cauda de um animal. Simultaneamente, torna-se possível distinguir as futuras *células epidérmicas*, formando a camada mais externa do embrião, as futuras *células do tecido basal*, ocupando a maior parte da porção interna, e as fu-

FLOR

As flores, que contêm as células reprodutivas das plantas superiores, surgem a partir dos meristemas apicais dos caules vegetativos, onde elas terminam o crescimento vegetativo posterior. Fatores ambientais, frequentemente os ritmos de duração do dia e a temperatura, desencadeiam a mudança do desenvolvimento vegetativo para o floral. Assim, as células germinativas surgem tarde no desenvolvimento vegetal a partir de células somáticas, ao invés de uma linhagem de células germinativas, como nos animais.

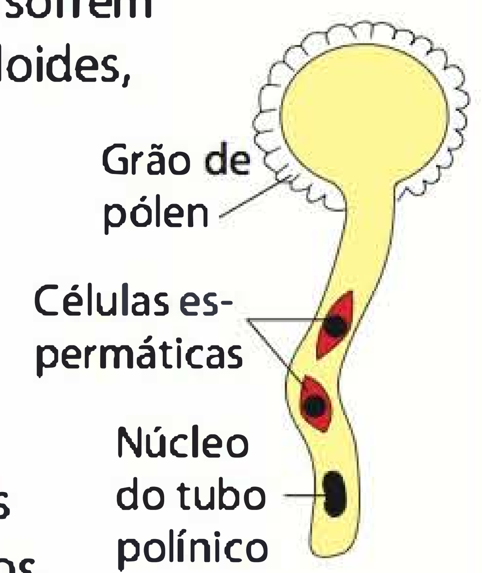




A estrutura floral é tanto variada como espécie-específica, mas geralmente compreende quatro conjuntos de estruturas arranjadas concentricamente que podem, cada uma, ser consideradas folhas modificadas.

Pétala: estruturas diferenciadas semelhantes a folhas, normalmente intensamente coloridas, facilitam a polinização pela atração de insetos, por exemplo.

Estame: um órgão contendo células que sofrem meiose e formam os grãos de pólen haploides, cada um dos quais contém duas células espermáticas masculinas. O pólen transferido ao estigma germina, e o tubo polínico leva os dois espermatozoides não-móveis até o ovário.

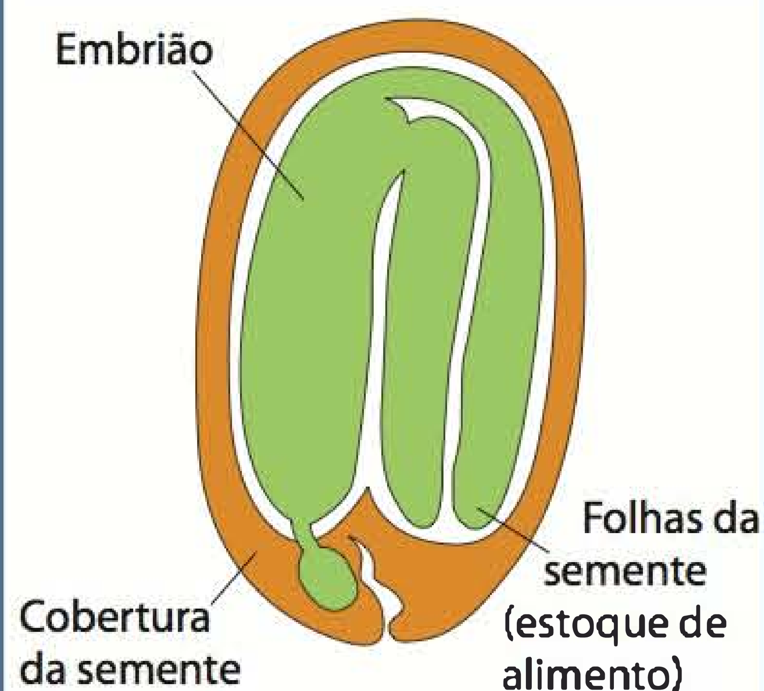


Carpelo: um órgão contendo um ou mais ovários, cada um dos quais contém óvulos. Cada óvulo abriga células que sofrem meiose e formam um saco embrionário contendo a célula-ovo feminina. Na fertilização, uma célula espermática se funde com a célula-ovo e formará o futuro embrião diploide, enquanto a outra se funde com duas células no saco embrionário para formar o tecido do endosperma triploide.

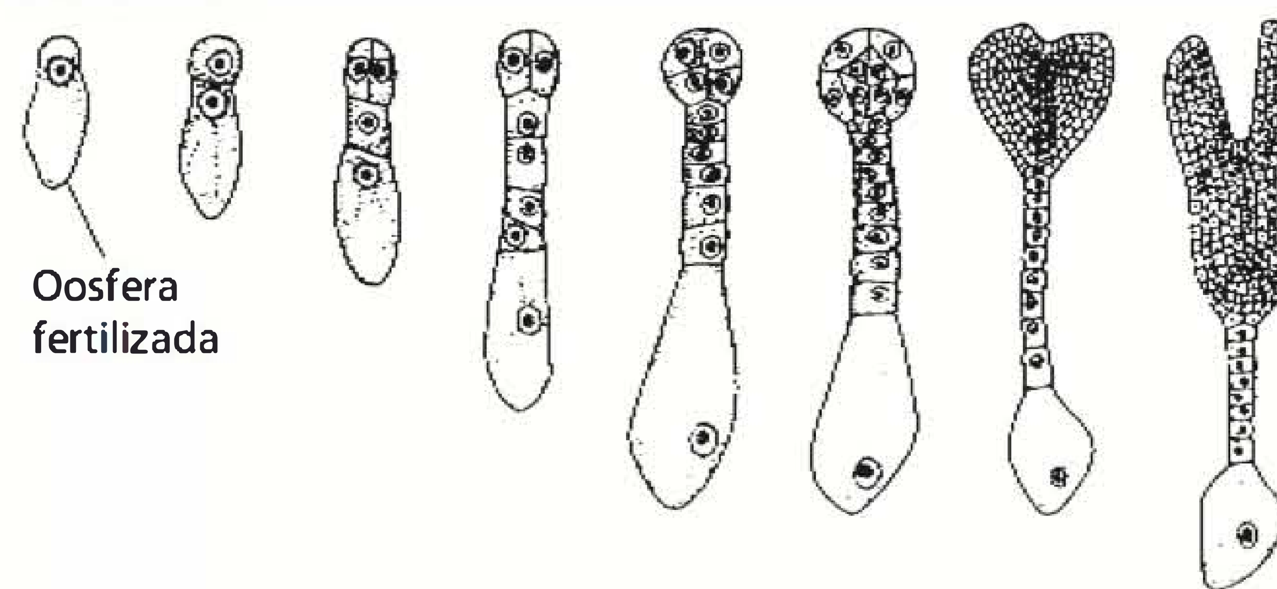
Sépalas: estruturas semelhantes a folhas que formam uma cobertura protetora durante o desenvolvimento floral inicial.

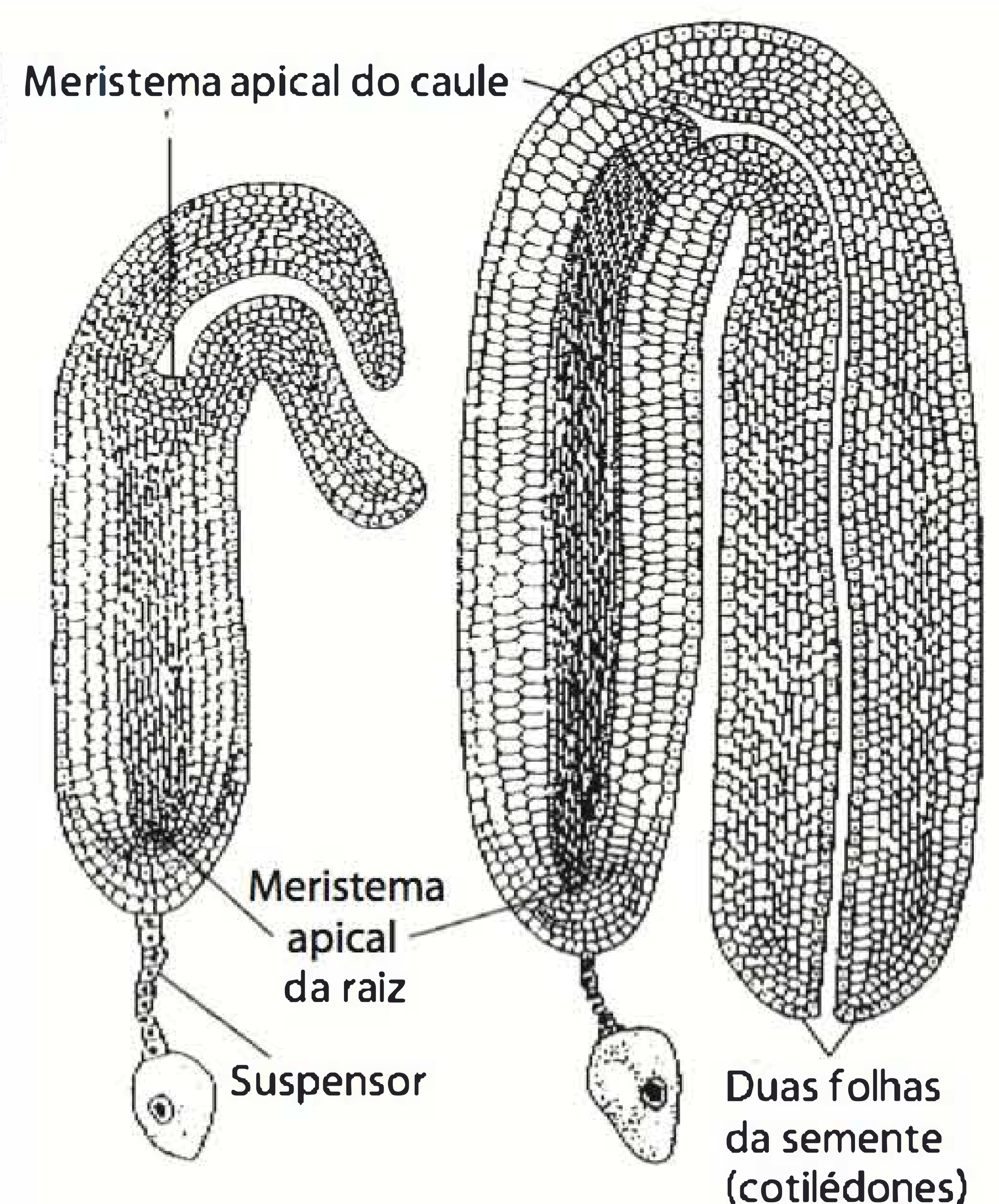
SEMENTE

A semente contém o embrião dormente, um estoque de alimento e uma cobertura. No final de seu desenvolvimento, o conteúdo de água de uma semente pode diminuir de 90 para 5%. A semente normalmente está protegida em um *fruto*, cujos tecidos são de origem materna.



EMBRIÃO





A oosfera fertilizada dentro do óvulo irá crescer para formar um embrião usando nutrientes transportados do endosperma pelo suspensor. Uma série complexa de divisões celulares, ilustradas aqui para a erva daninha comum denominada "bolsa-de-pastor", produz um embrião com um meristema apical de raiz, um meristema apical de caule e uma (monocotiledôneas) ou duas (dicotiledôneas) folhas embrionárias ou da semente, chamadas de cotilédones.

O desenvolvimento é interrompido neste estágio, e o óvulo, contendo o embrião, agora se torna uma semente, adaptada para dispersão e sobrevivência.

GERMINAÇÃO

Para que o embrião retome seu crescimento, a semente deve germinar, um processo dependente tanto de fatores internos (dormência) como de fatores ambientais, incluindo água, temperatura e oxigênio. As reservas de alimento para a fase inicial da germinação podem ser tanto o endosperma (milho) como os cotilédones (ervilha e feijão).

A raiz primária normalmente emerge primeiro da semente para assegurar um suprimento inicial de água para a plântula. Os cotilédones podem aparecer acima do solo, como mostrado aqui para o feijão de jardim, ou podem permanecer sob o solo, como nas ervilhas. Em ambos os casos, os cotilédones, no final, murcham.

O meristema apical pode agora mostrar sua capacidade de crescimento contínuo, produzindo um padrão típico de nós, entrenós e gemas (ver Figura 22-106).

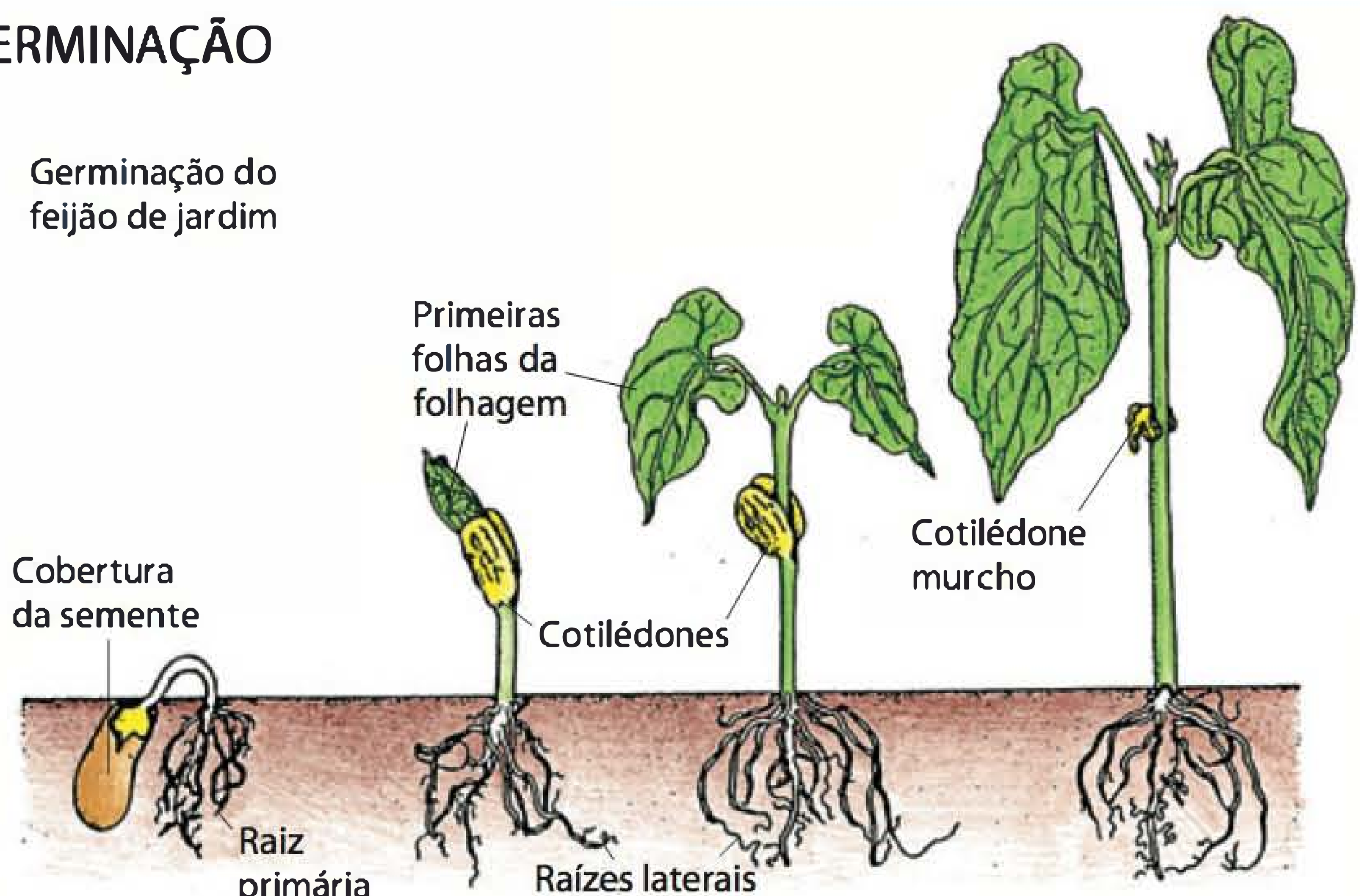
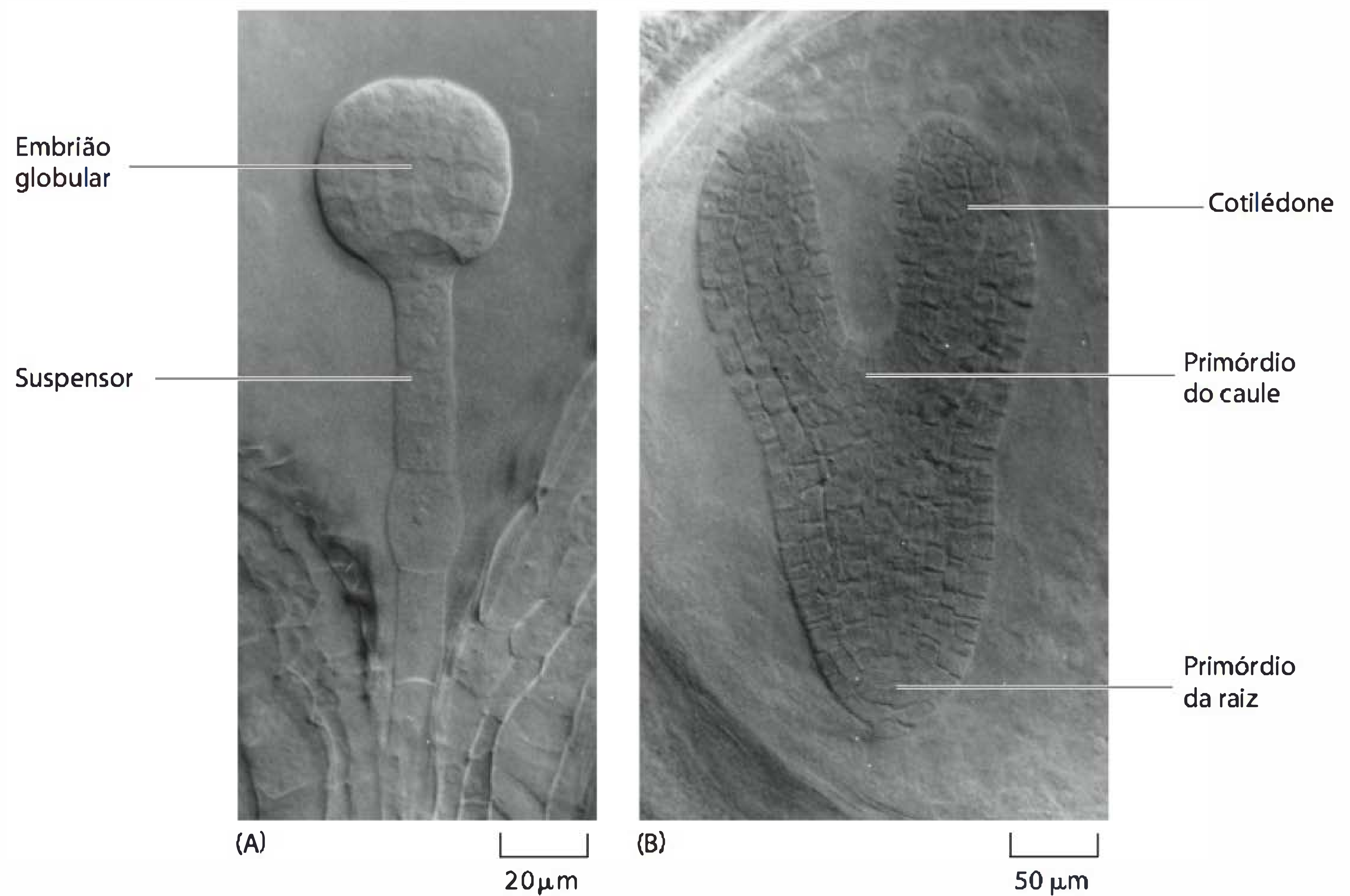


Figura 22-114 Dois estágios da embriogênese em *Arabidopsis thaliana*. (De G. Jurgens et al., *Development [Suppl.]* 1:27-38, 1991. Com permissão de The Company of Biologists.)



turas *células do tecido vascular*, formando a zona central (**Painel 22-2**). Esses três conjuntos de células podem ser comparados às três camadas germinativas de um embrião animal. Um pouco mais tarde durante o desenvolvimento, o rudimento do caule começa a produzir as folhas embrionárias da semente, ou *cotilédones* – uma, no caso de monocotiledôneas, e duas, no caso de dicotiledôneas. Logo após esse estágio, o desenvolvimento normalmente cessa e o embrião fica empacotado em uma **semente** (uma cápsula formada por tecidos da planta-mãe), especializada para a dispersão e a sobrevivência em condições adversas. O embrião em uma semente é estabilizado pela desidratação e pode permanecer dormente por um período muito longo – até mesmo centenas de anos. Quando reidratadas, as sementes germinam e o desenvolvimento embrionário é concluído.

Podem-se utilizar triagens genéticas em *Arabidopsis*, assim como em *Drosophila* ou *C. elegans*, para identificar os genes que governam a organização do embrião, agrupando-os em categorias, de acordo com seus fenótipos mutantes homozigotos. Alguns são necessários à formação da raiz da plântula, outros para o caule da plântula e outros para o ápice da plântula com seus cotilédones. Outra classe é necessária para a formação dos três principais tipos de tecido – epiderme, tecido basal e tecido vascular – e outra classe também é requerida para as mudanças organizadas do formato celular que conferem a forma alongada ao embrião e à plântula (**Figura 22-115**).

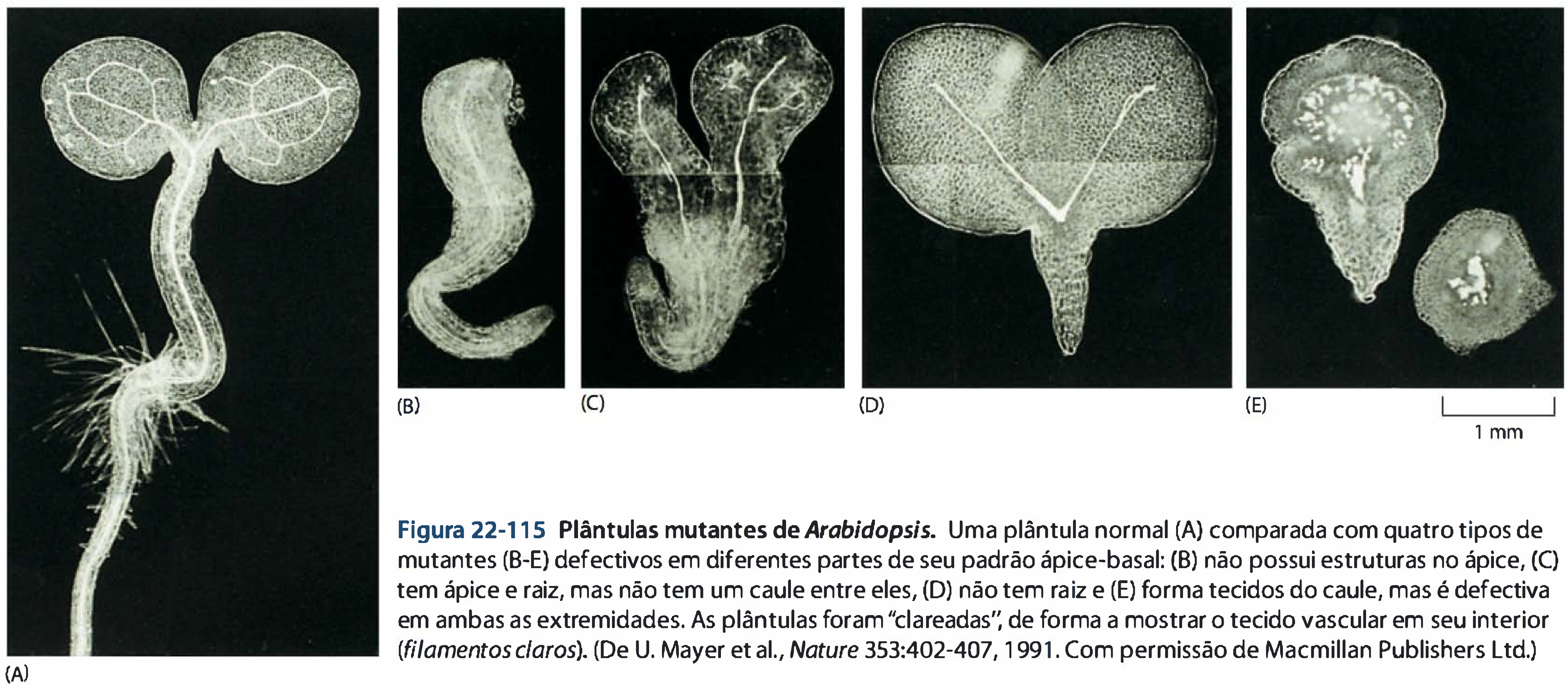


Figura 22-115 Plântulas mutantes de *Arabidopsis*. Uma plântula normal (A) comparada com quatro tipos de mutantes (B-E) defectivos em diferentes partes de seu padrão ápice-basal: (B) não possui estruturas no ápice, (C) tem ápice e raiz, mas não tem um caule entre eles, (D) não tem raiz e (E) forma tecidos do caule, mas é defectiva em ambas as extremidades. As plântulas foram "clareadas", de forma a mostrar o tecido vascular em seu interior (*filamentos claros*). (De U. Mayer et al., *Nature* 353:402-407, 1991. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

As partes de uma planta são sequencialmente geradas por meristemas

O embrião de um inseto ou um animal vertebrado é um modelo rudimentar, em escala miniatura, do organismo adulto, e os detalhes da estrutura corporal são progressivamente preenchidos, à medida que ele cresce. O embrião de uma planta se torna adulto de uma maneira completamente diferente: as partes da planta adulta são criadas de forma sequencial por grupos de células que se proliferam e constroem estruturas adicionais na periferia da planta. Esses importantíssimos grupos de células são denominados **meristemas apicais** (ver Figura 22-111). Cada meristema consiste em uma população autorrenovável de células do caule. À medida que elas se dividem, deixam para trás uma série de progênies que se deslocam da região do meristema, crescem e, finalmente, diferenciam-se. Embora os meristemas apicais do caule e da raiz gerem todas as variedades básicas de células que são necessárias para construir folhas, raízes e caules, muitas células externas aos meristemas apicais também mantêm a capacidade de proliferação futura e retêm o potencial de meristema. Desta maneira, as árvores e outras plantas perenes, por exemplo, são capazes de aumentar a circunferência dos caules e das raízes à medida que os anos passam e podem produzir novos brotos a partir de regiões dormentes, se a planta é danificada.

Os rudimentos dos meristemas apicais das raízes e dos caules já estão determinados no embrião. Tão logo se rompe a cobertura da semente durante a germinação, ocorre um dramático aumento de tamanho das células não-meristemáticas, direcionando primeiro a emergência de uma raiz para estabelecer uma base de apoio imediata no solo e, então, de um caule (**Figura 22-116**). Isso é acompanhado por divisões celulares rápidas e contínuas nos meristemas apicais: no meristema apical de uma raiz de milho, por exemplo, as células se dividem a cada 12 horas, produzindo 5×10^5 células por dia. A raiz e o caule em rápido crescimento sondam o ambiente – a raiz aumentando a capacidade da planta de captar água e minerais do solo, e o caule aumentando a capacidade de fotossíntese (ver Painel 22-1).



Figura 22-116 Uma plântula de *Arabidopsis*. Os dois objetos *marrons* à direita da plântula jovem são as duas metades da cobertura descartada da semente. (Cortesia de Catherine Duckett.)

O desenvolvimento da plântula depende de sinais ambientais

Da germinação em diante, o curso do desenvolvimento dos vegetais é fortemente influenciado por sinais do ambiente. O caule tem de se desenvolver rapidamente no solo, e deve abrir seu cotilédone e começar a fotossíntese somente após ter atingido a luz. A duração desta transição entre o rápido desenvolvimento subterrâneo e o crescimento com o uso da luz não pode ser geneticamente programada, pois a profundidade em que a semente é enterrada é imprevisível. A ativação do desenvolvimento é controlada pela luz que, entre outros efeitos, atua na plântula inibindo a produção de uma classe de reguladores do crescimento vegetal denominados *brassinosteroides*, discutidos no Capítulo 15. As mutações nos genes necessários à produção ou à recepção de sinais de brassinosteroides tornam o caule da plântula verde, retardam seu alongamento e abrem os cotilédones prematuramente, enquanto as plântulas continuam no escuro.

Sinais hormonais de longo alcance coordenam eventos do desenvolvimento em partes separadas da planta

As partes separadas de uma planta experimentam ambientes diferentes, reagindo individualmente a eles por meio de mudanças em seu modo de desenvolvimento. A planta, contudo, deve continuar a funcionar como um todo. Isso demanda que escolhas de desenvolvimento e os eventos daí decorrentes em uma parte da planta afetem escolhas de desenvolvimento em outros locais. Devem existir sinais de longo alcance para efetuar tal coordenação.

Os jardineiros sabem, por exemplo, que quando se arranca a ponta de um ramo pode-se estimular seu crescimento lateral: a remoção do meristema apical alivia os meristemas axilares quiescentes de uma inibição e permite que eles formem novos ramos. Nesse caso, o sinal de longo alcance do meristema apical, ou pelo menos um componente-chave, foi identificado. Trata-se de uma auxina, membro de uma de várias classes de **reguladores do crescimento vegetal** (às vezes denominados *hormônios vegetais*), os quais influenciam fortemente o desenvolvimento vegetal. Outras classes conhecidas incluem as *giberelinas*, as *citocininas*, o *ácido abscísico*, o gás *etileno* e os *brassinosteroides*. Como mostrado na **Figura 22-117**, todos são moléculas pequenas que prontamente penetram as paredes celulares. Todos são sintetizados pela maioria das células vegetais e podem ou agir localmente ou ser

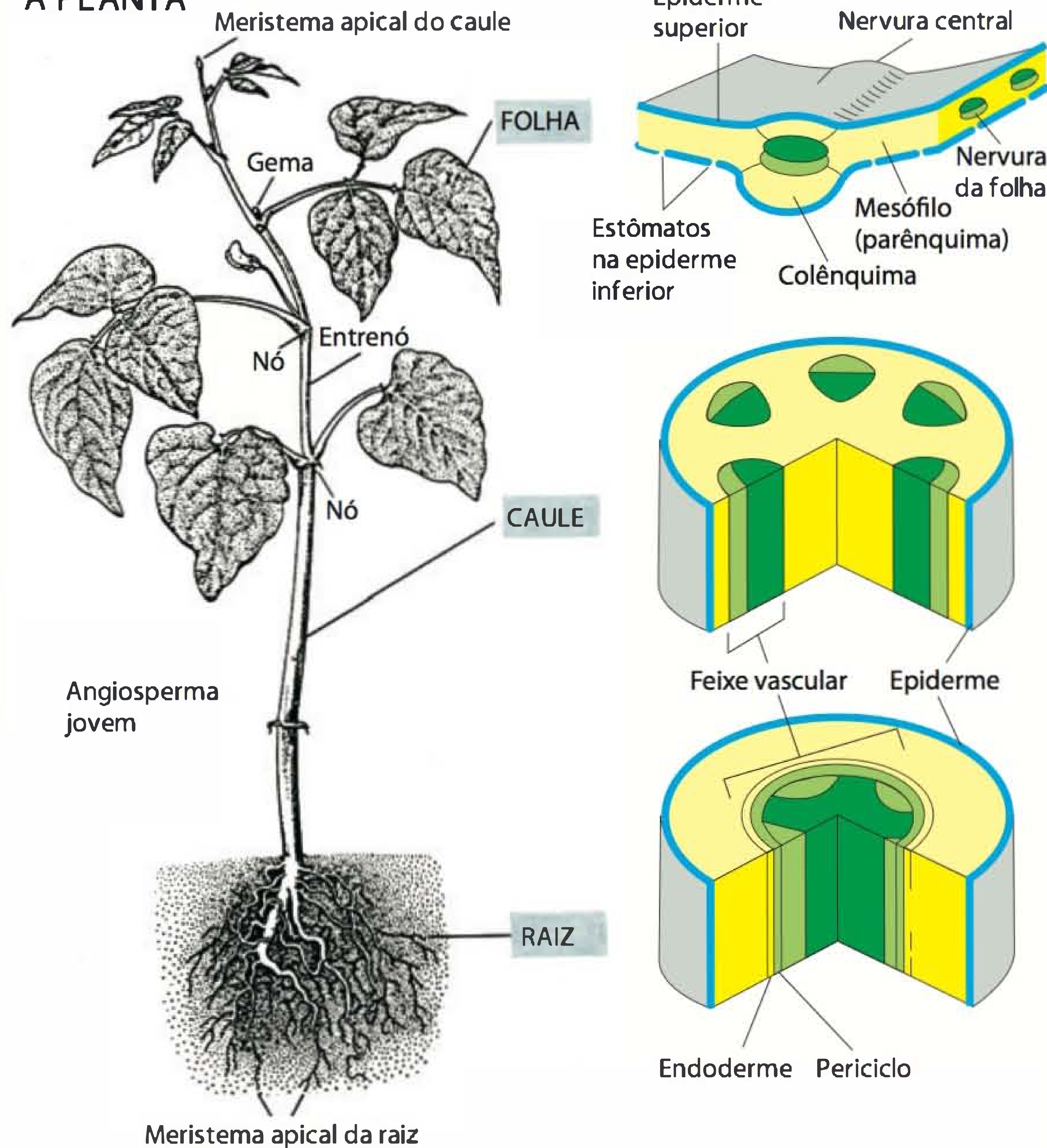
OS TRÊS SISTEMAS TISSULARES

A divisão celular, o crescimento e a diferenciação dão origem a sistemas tissulares com funções especializadas.

TECIDO DA DERME (▬): Esta é a cobertura externa protetora da planta que está em contato com o ambiente. Ela facilita a captação de água e íons pelas raízes e regula as trocas gasosas nas folhas e nos caules.

TECIDO VASCULAR: Em conjunto, o floema (▬) e o xilema (▬) formam um sistema vascular contínuo em toda a planta. Este tecido conduz água e solutos entre os órgãos e também proporciona suporte mecânico.

TECIDO BASAL (▬): Este tecido de empacotamento e suporte é responsável pela maior parte do volume da planta jovem. Ele também funciona na produção e no armazenamento de alimento.



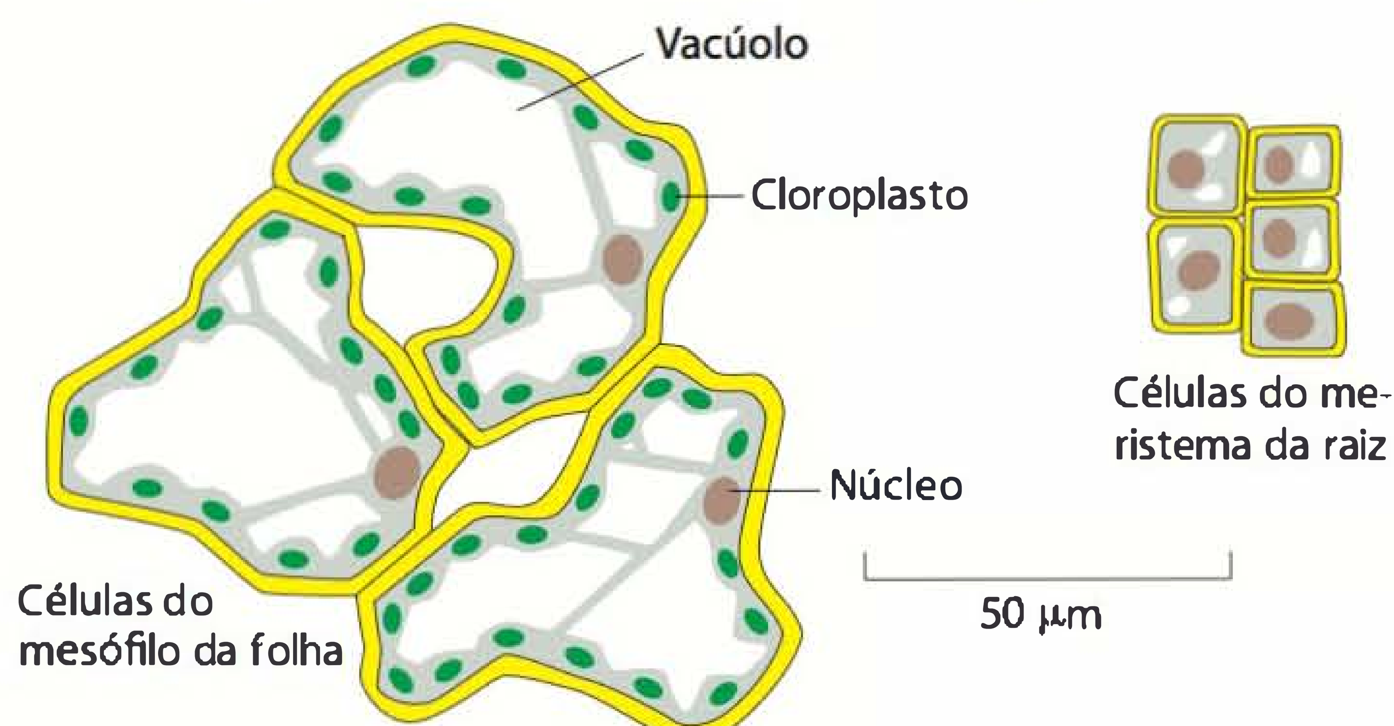
A angiosperma jovem mostrada à direita é construída a partir de três tipos principais de órgãos: folhas, caules e raízes. Cada órgão vegetal, por sua vez, é constituído de três sistemas tissulares: basal (▬), dérmico (▬) e vascular (▬▬).

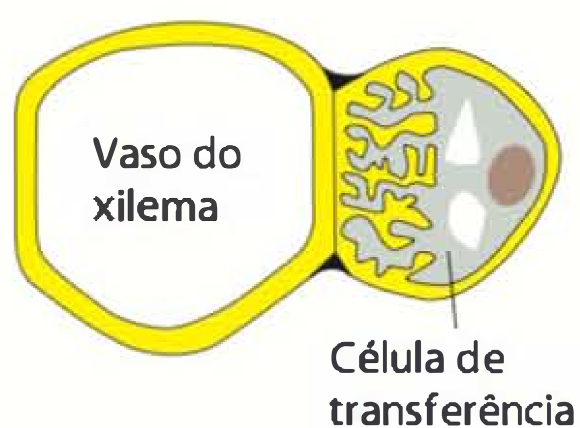
Os três sistemas tissulares são basicamente derivados da atividade proliferativa das células dos meristemas apicais da raiz ou do caule, e cada um contém um número relativamente pequeno de tipos celulares especializados. Estes três sistemas tissulares comuns, e as células que os formam, são descritos neste painel.

TECIDO BASAL

O sistema de tecido basal contém três tipos celulares principais denominados parênquima, colênquima e esclerênquima.

As células do parênquima são encontradas em todos os sistemas tissulares. São células vivas, geralmente capazes de divisões adicionais, e têm uma fina parede celular primária. Estas células têm várias funções. As células meristemáticas apicais e laterais das gemas e raízes fornecem as novas células necessárias ao crescimento. A produção e o armazenamento de alimento ocorrem nas células fotossintéticas da folha e do caule (denominadas células mesofílicas); as células do parênquima de reserva formam a maior parte do volume da maioria das frutas e verduras. Devido a sua capacidade proliferativa, as células do parênquima também servem de células-tronco para a cicatrização e regeneração.

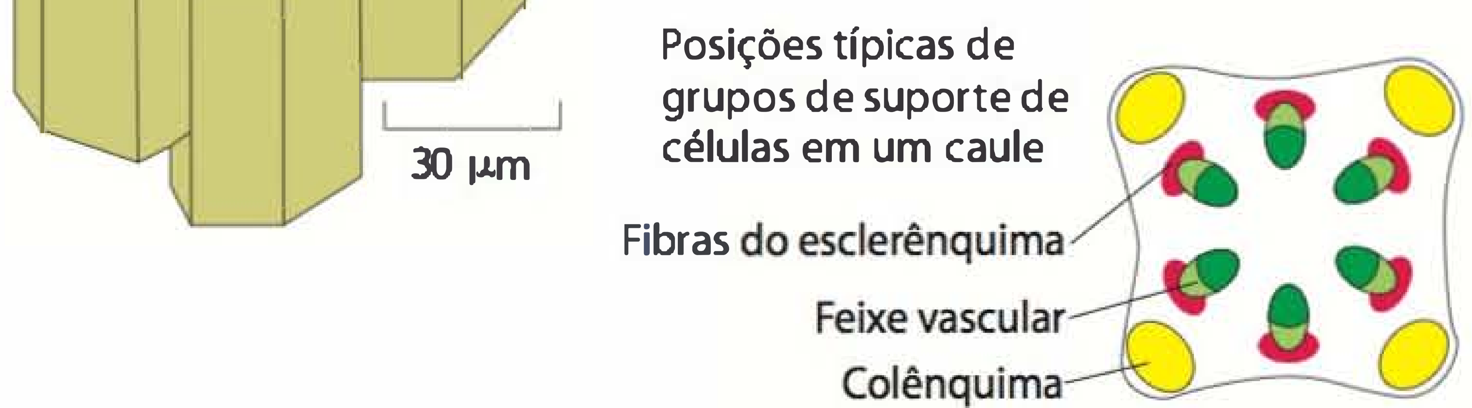




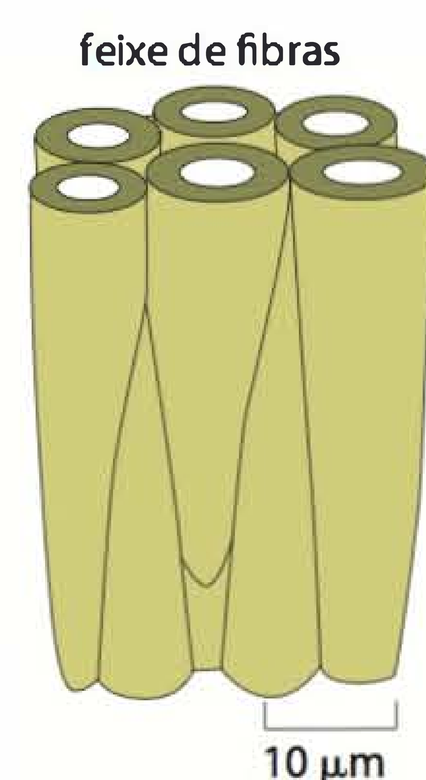
A célula de transferência, uma forma especializada de célula do parênquima, é prontamente identificável por um crescimento elaborado da parede celular primária. O aumento da área da membrana plasmática abaixo dessas paredes facilita o transporte rápido de solutos para e a partir de células do sistema vascular.

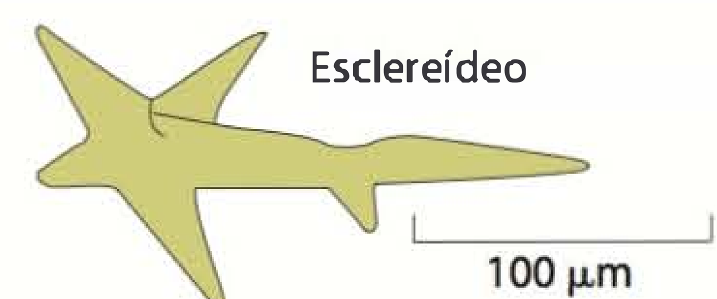
O colênquima são células vivas similares às células do parênquima, com exceção das paredes celulares, que são muito mais espessas, normalmente alongadas e empacotadas em longas fibras em forma de corda. Elas são capazes de se estender e proporcionam suporte mecânico ao sistema tissular basal das regiões em alongamento da planta. As células do colênquima são especialmente comuns nas regiões subepidérmicas dos caules.

30 µm



O esclerênquima, assim como o colênquima, tem funções de reforço e suporte. Contudo, trata-se normalmente de células mortas com espessas paredes celulares secundárias lignificadas, que as impedem de se alongar à medida que a planta cresce. Os dois tipos comuns são fibras, que frequentemente formam longos feixes, e esclereídeos, que são células ramificadas mais curtas encontradas nas cascas de sementes e frutas.

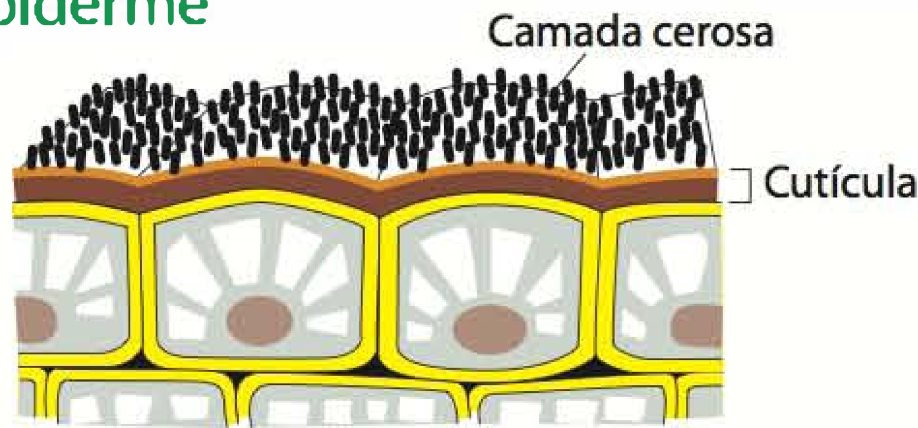




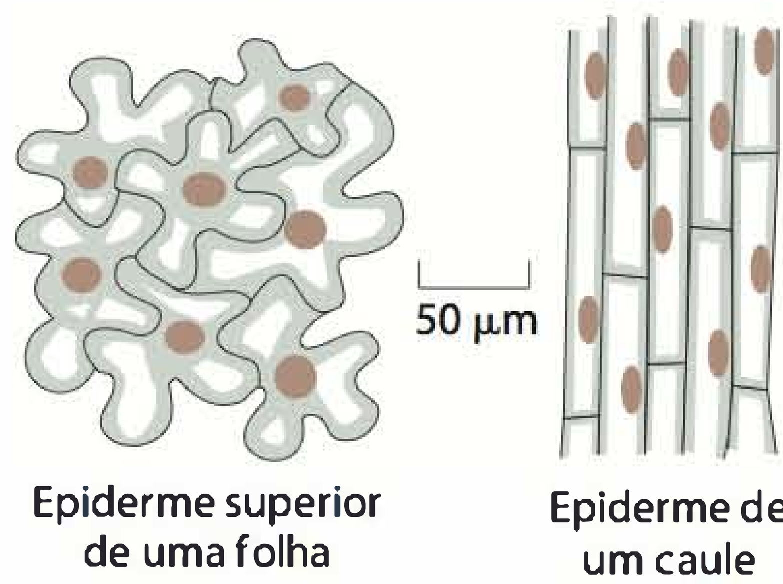
TECIDO DA DERME

A epiderme é a cobertura protetora externa primária do corpo da planta. As células da epiderme também são modificadas para formar os estômatos e pelos de vários tipos.

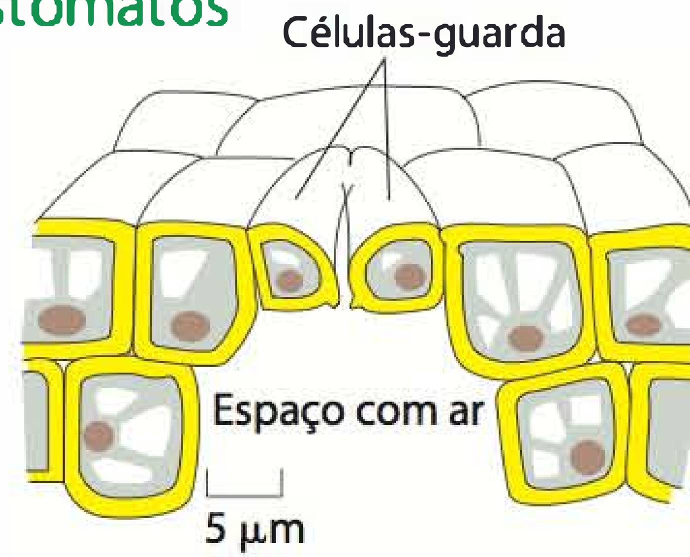
Epiderme



A epiderme (geralmente formada por uma camada de células de espessura) cobre todo o caule, a folha e a raiz da planta jovem. As células são vivas, têm uma parede celular primária espessa e são cobertas, na superfície externa, por uma cutícula especial com uma camada cerosa externa. As células são firmemente entrelaçadas em diferentes padrões.

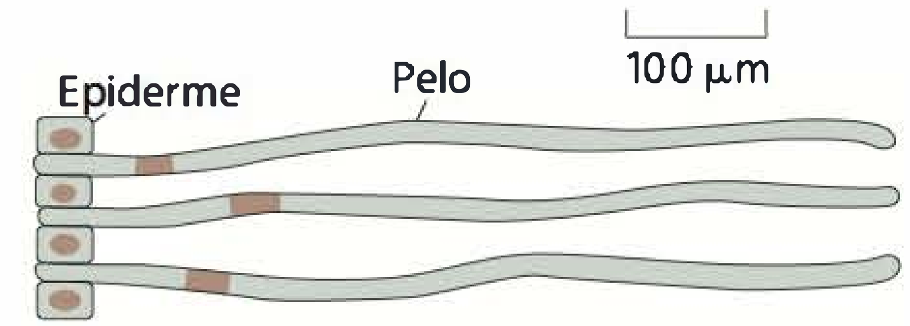


Estômatos

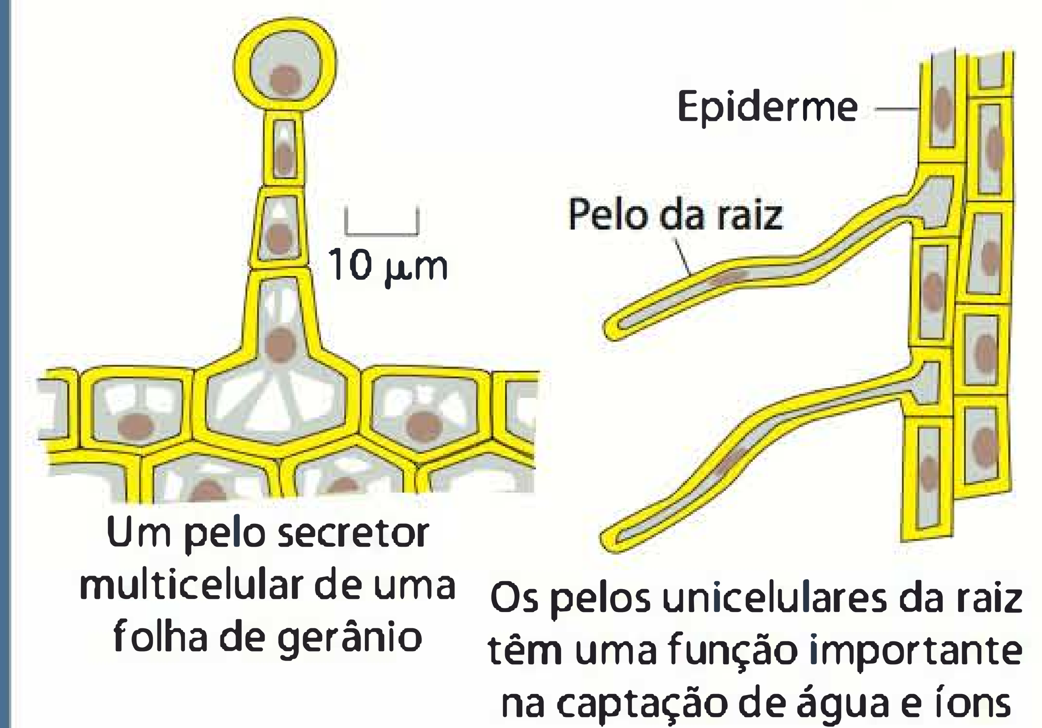


Os estômatos são aberturas na epiderme, principalmente na superfície inferior da folha, que regulam as trocas gasosas na planta. Eles são formados por duas células epidérmicas especializadas denominadas *células-guarda*, que regulam o diâmetro do poro. Os estômatos estão distribuídos em um padrão espécie-específico distinto dentro de cada epiderme.

Os pelos (ou tricomas) são apêndices derivados das células epidérmicas. Eles existem em uma grande variedade de formas e normalmente são encontrados em todas as partes da planta. Os pelos funcionam na



proteção, na absorção e na secreção. Por exemplo, quando os pelos unicelulares jovens na epiderme da semente de algodão crescem, as paredes serão secundariamente espessadas com celulose para formar as fibras do algodão.

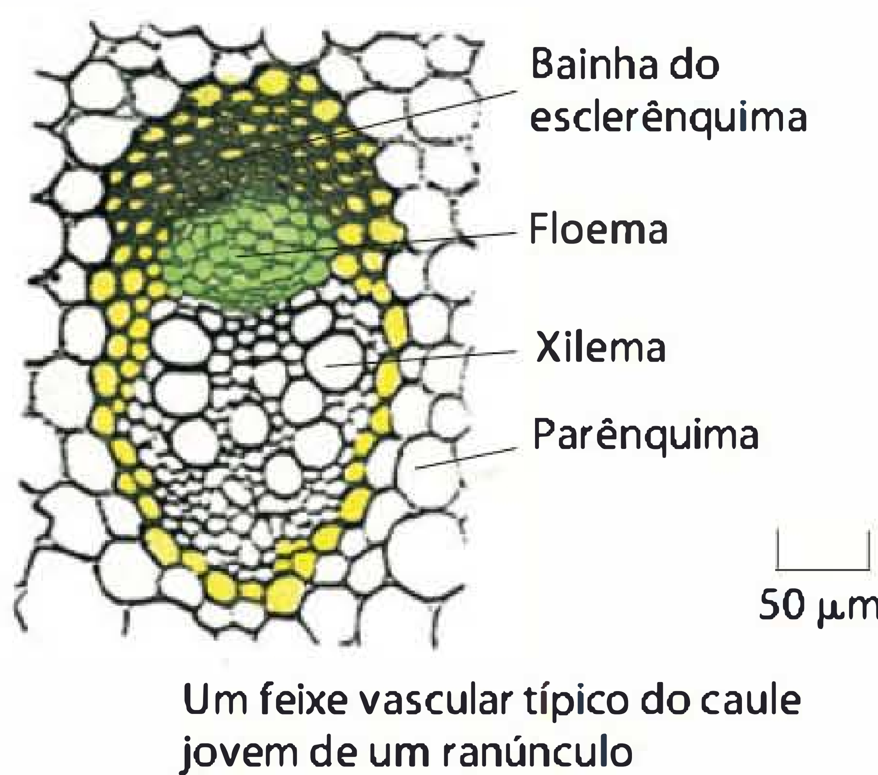


Um pelo secretor multicelular de uma folha de gerânio

Os pelos unicelulares da raiz têm uma função importante na captação de água e íons

Feixes vasculares

As raízes normalmente têm um único feixe vascular, mas os caules têm vários feixes. Estes estão arranjados em simetria estritamente radial nas dicotiledôneas, mas estão dispersos mais irregularmente nas monocotiledôneas.

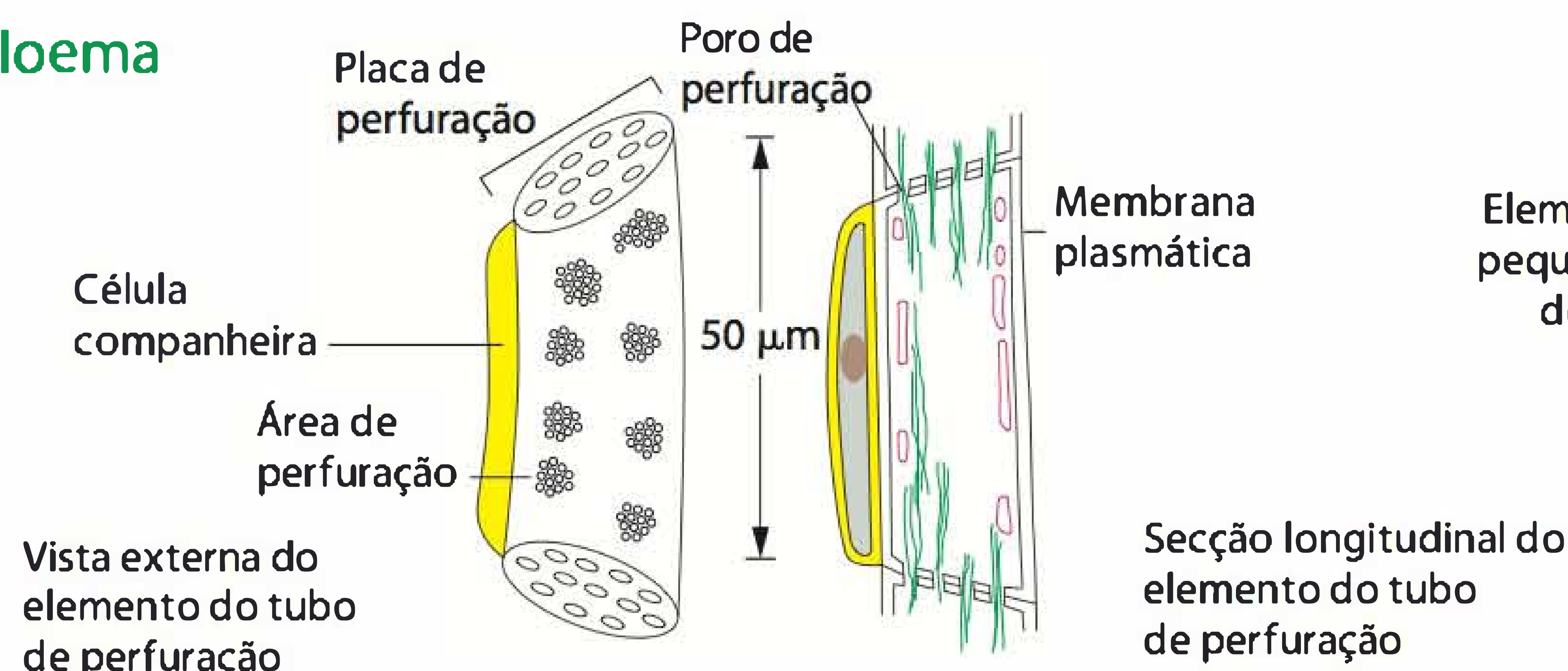


Um feixe vascular típico do caule jovem de um ranúnculo

TECIDO VASCULAR

Juntos, o floema e o xilema formam um sistema vascular contínuo por toda a planta. Nas plantas jovens, eles normalmente estão associados a vários outros tipos celulares nos *feixes vasculares*. Tanto o floema como o xilema são tecidos complexos. Seus elementos condutores estão associados a células do parênquima, que mantêm os elementos e trocam materiais com eles. Além disso, os grupos de células do colênquima e do esclerênquima proporcionam suporte mecânico.

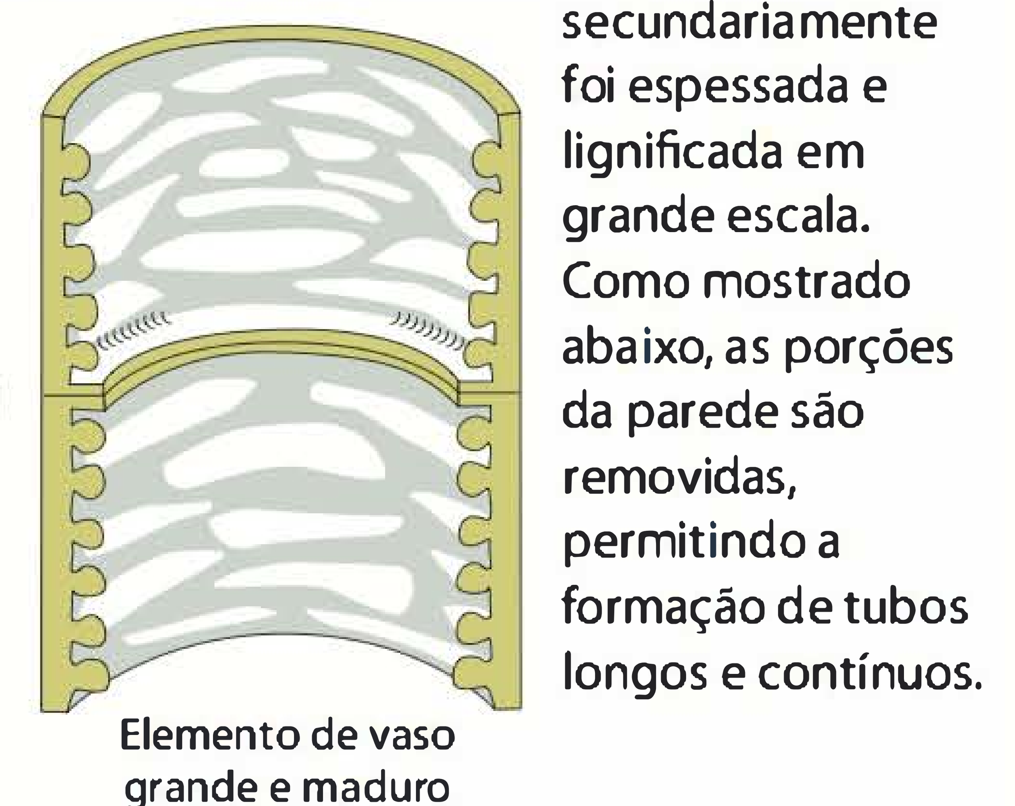
Floema



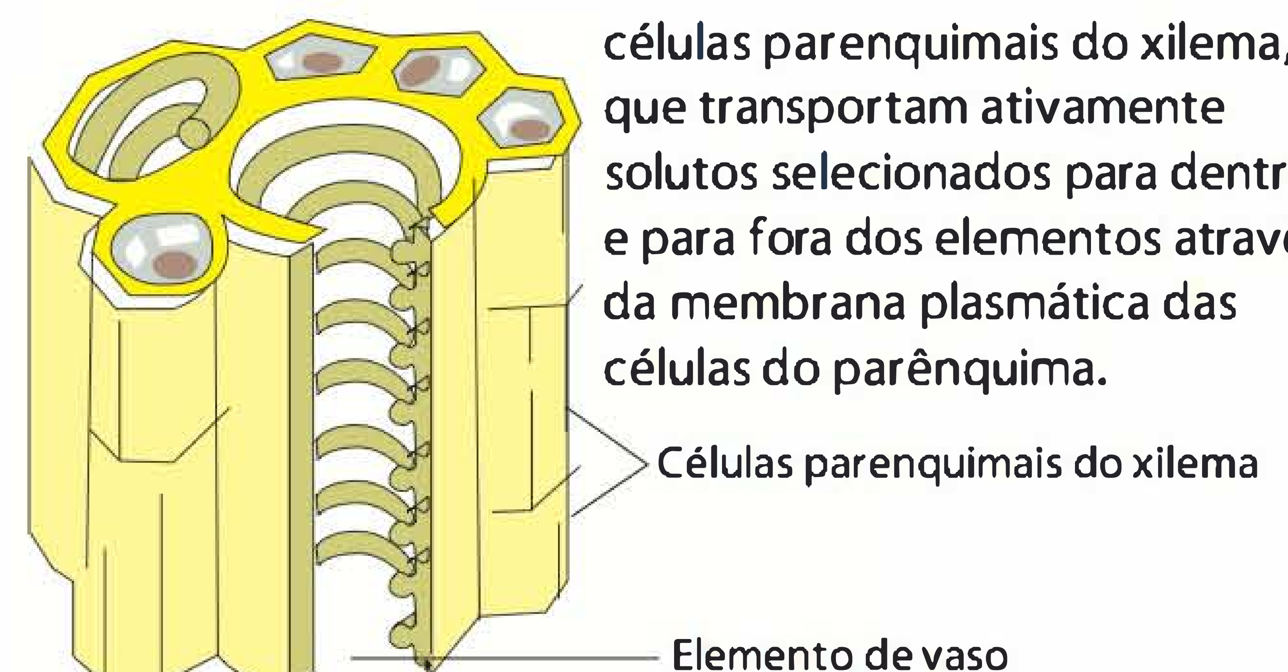
O floema está envolvido no transporte de solutos orgânicos nas plantas. As principais células condutoras (elementos) estão alinhadas para formar os tubos denominados tubos de filtração. Os elementos dos *tubos de filtração*, na maturidade, são células vivas interconectadas por perfurações formadas, em suas paredes externas, por plasmodesmata aumentados e modificados (placas de perfuração). Essas células mantêm sua membrana plasmática, mas perderam o núcleo e a maior parte do citoplasma; elas dependem, portanto, de células companheiras associadas para sua manutenção. As *células companheiras* têm a função adicional de transportar ativamente moléculas de alimento solúvel para dentro e para fora dos elementos do tubo de filtração através de áreas de perfuração porosas na parede.

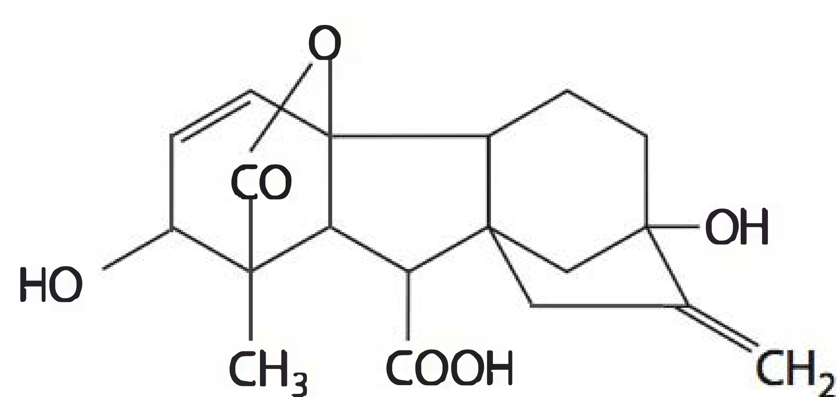
Xilema

O xilema transporta água e íons dissolvidos nos vegetais. As principais células condutoras são os elementos de vasos aqui mostrados, os quais, na maturidade, são células mortas que não possuem membrana plasmática. A parede celular secundariamente foi espessada e lignificada em grande escala. Como mostrado abaixo, as porções da parede são removidas, permitindo a formação de tubos longos e contínuos.

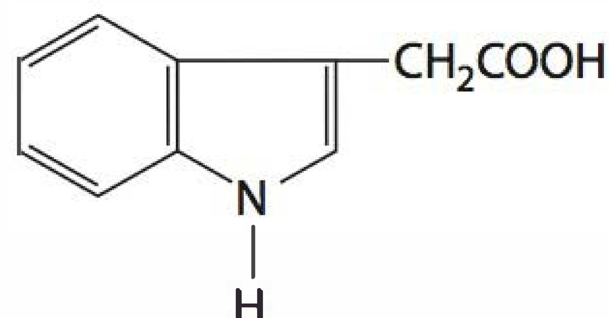


Os elementos de vaso estão intimamente associados às células parenquimais do xilema, que transportam ativamente solutos selecionados para dentro e para fora dos elementos através da membrana plasmática das células do parênquima.

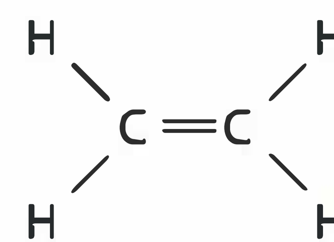




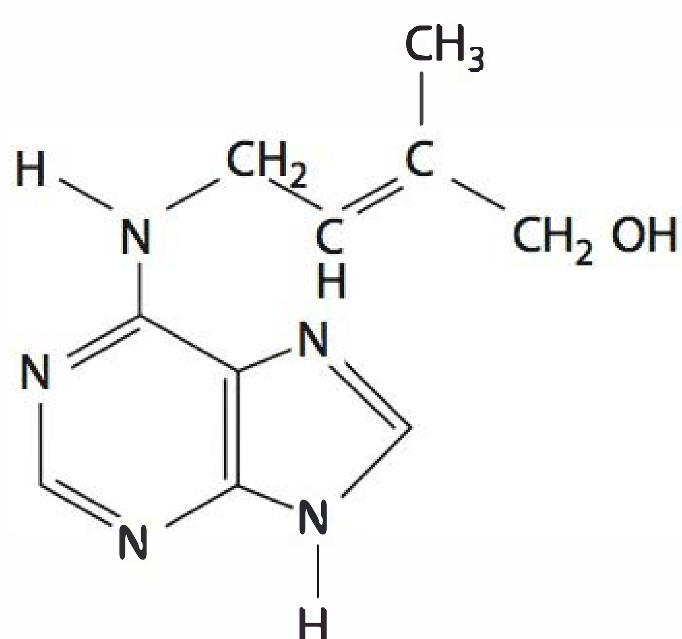
Ácido giberélico (GA3) [uma giberelina]



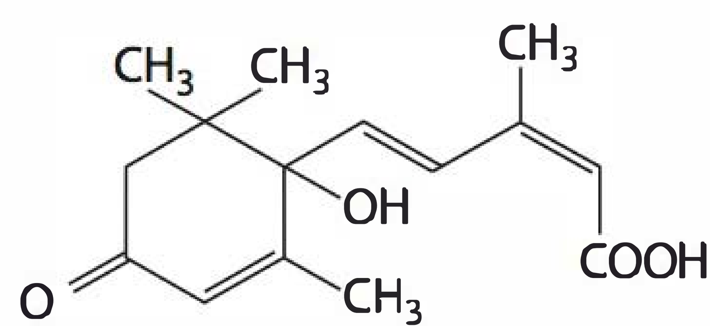
Ácido indol-3-acético (IAA) [uma auxina]



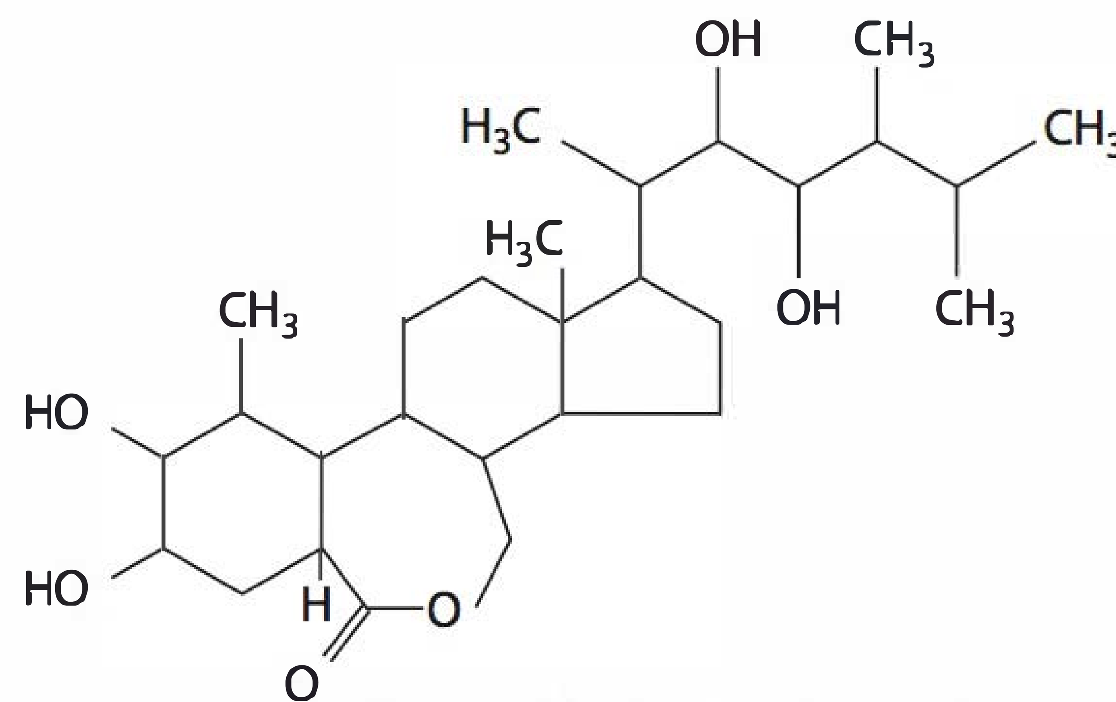
Etileno



Zeatina [uma citocinina]



Ácido abscísico (ABA)



Brassinolídeo [um brassinosteroide]

Figura 22-117 Reguladores do crescimento vegetal. É mostrada a fórmula de uma molécula representativa, que ocorre naturalmente, de cada um dos seis grupos conhecidos de moléculas reguladoras do crescimento vegetal.

transportados para influenciar células-alvo à distância. A auxina, por exemplo, é transportada de célula a célula a uma taxa de cerca de 1 cm por hora a partir da ponta de um caule em direção à sua base. Cada regulador do crescimento tem múltiplos efeitos, e esses são modulados por outros reguladores do crescimento, assim como por sinais ambientais e pelo estado nutricional. Assim, a auxina pode isoladamente promover a formação de raízes, mas em conjunto com uma giberelina pode promover o alongamento do caule, com uma citocinina pode suprimir o crescimento de gemas laterais e, com o etileno, pode estimular o crescimento de raízes laterais. Notavelmente, como veremos a seguir, a auxina também controla os padrões detalhados de especialização celular, em escala microscópica, no meristema apical. Os receptores que reconhecem alguns desses reguladores do crescimento são discutidos no Capítulo 15.

A forma de cada nova estrutura depende da divisão e da expansão celular orientada

As células vegetais, aprisionadas dentro de suas paredes celulares, não podem se mover e se espalhar à medida que a planta cresce; porém, podem se dividir e inchar, esticar e se curvar. A morfogênese de uma planta em desenvolvimento, portanto, depende de divisões celulares organizadas seguidas de expansões celulares estritamente orientadas. A maioria das células produzidas no meristema apical da raiz, por exemplo, passa por três fases distintas de desenvolvimento – divisão, crescimento (alongamento) e diferenciação. Estas três etapas, que se sobrepõem tanto no espaço como no tempo, originam a arquitetura característica da extremidade de uma raiz. Embora o processo de diferenciação celular frequentemente comece enquanto uma célula ainda está se alongando, é fácil distinguir, por comparação, em uma extremidade de raiz, uma zona de divisão celular, uma zona de alongamento celular orientado (que responde pelo crescimento no comprimento da raiz) e uma zona de diferenciação celular (**Figura 22-118**).

Na fase de expansão controlada, que geralmente sucede a divisão celular, as células-filha frequentemente podem aumentar 50 vezes ou mais em volume. Esta expansão é orientada por uma pressão osmótica de turgor que pressiona a parede celular da planta para fora, e sua direção é determinada pela orientação das fibrilas de celulose na parede celular, as quais forçam a expansão ao longo de um eixo (ver Figura 19-73). A orientação da celulose, por sua vez, é aparentemente controlada pela orientação dos arranjos de microtúbulos justapostos à membrana plasmática, os quais, acredita-se, guiam a deposição de celulose (discutido no Capítulo 19). Esta orientação pode ser rapidamente alterada por reguladores do crescimento vegetal, como o etileno e o ácido giberélico (**Figura 22-119**), mas os mecanismos moleculares subjacentes a esses rearranjos dramáticos no citoesqueleto ainda não são conhecidos.

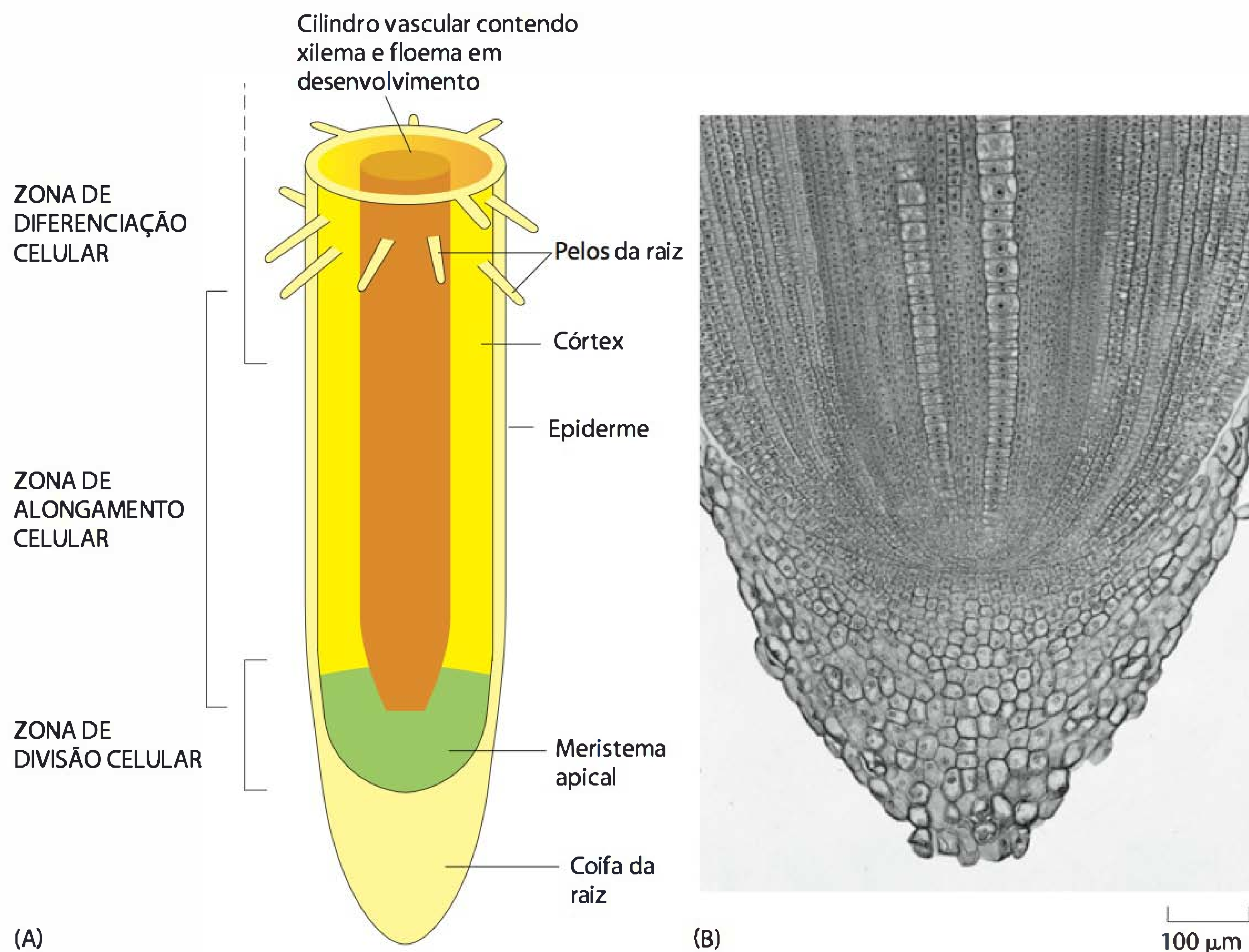


Figura 22-118 A extremidade de uma raiz em crescimento. (A) A organização dos 2 mm finais da extremidade de uma raiz em crescimento. As zonas aproximadas nas quais as células se encontram em divisão, em alongamento e em diferenciação estão indicadas. (B) O meristema apical e a coifa da extremidade de uma raiz de milho, mostrando as fileiras organizadas de células produzidas. (B, de R. F. Evert, Biology of Plants, 4th ed. New York: Worth, 1986.)

Cada módulo vegetal cresce a partir de um conjunto microscópico de primórdios em um meristema

Os meristemas apicais se autoperpetuam: em uma planta perene, eles continuam com suas funções indefinidamente, enquanto a planta sobreviver, e são responsáveis pelo seu crescimento e desenvolvimento contínuo. Contudo, os meristemas apicais também dão origem a um segundo tipo de crescimento, cujo desenvolvimento é estritamente limitado e culmina com a formação de uma estrutura como uma folha ou flor, com tamanho e forma determinados e um curto tempo de vida. Assim, à medida que um caule vegetativo (que não floresce) se alonga, seu meristema apical deixa para trás uma sequência organizada de *nós*, a partir da qual as folhas se formam, e *entrenós* (segmentos de caule). Desta maneira, a atividade contínua do meristema produz um número sempre crescente de módulos similares, cada um consistindo em um caule, uma folha e uma gema (ver Figura 22-111). Os módulos são conectados uns aos outros por tecidos de suporte e transporte, e os módulos sucessivos são precisamente posicionados em relação aos demais, dando origem a uma estrutura de padrões repetitivos. Este modo interativo de desenvolvimento é característico dos vegetais e é visto em muitas outras estruturas, além do sistema caule-folha (**Figura 22-120**).

Embora o módulo final possa ser grande, sua organização é inicialmente mapeada em uma escala microscópica, como aquela de um embrião animal. No ápice do caule, dentro de um espaço de um milímetro ou menos, encontra-se uma pequena cúpula central cercada por uma série de protuberâncias distintas em vários estágios de alongamento (**Figura 22-121**). A protuberância central é o próprio meristema apical; cada uma das protuberâncias em volta é o primórdio de uma folha. Esta pequena região, portanto, contém os rudimentos já distin-

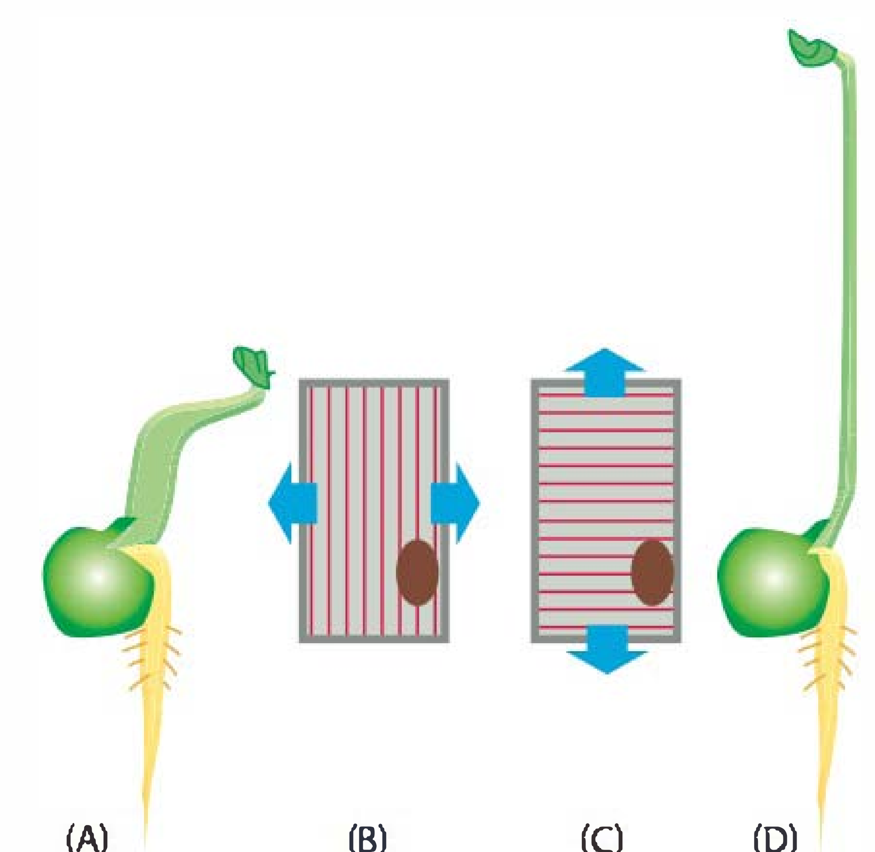


Figura 22-119 Os diferentes efeitos dos reguladores do crescimento vegetal etileno e ácido giberélico. Esses reguladores exercem efeitos rápidos e opostos na orientação do arranjo de microtúbulos corticais nas células dos caules jovens de ervilha. Uma célula típica de uma planta tratada com etileno (B) mostra uma orientação longitudinal dos microtúbulos, enquanto uma célula típica de uma planta tratada com ácido giberélico (C) mostra uma orientação transversal. Novas microfibrilas de celulose são depositadas em paralelo aos microtúbulos. Uma vez que isso influencia a direção da expansão celular, o ácido giberélico e o etileno promovem o crescimento em direções opostas: as plântulas tratadas com etileno irão desenvolver caules curtos e grossos (A), enquanto as plântulas tratadas com ácido giberélico desenvolverão caules longos e finos (D).

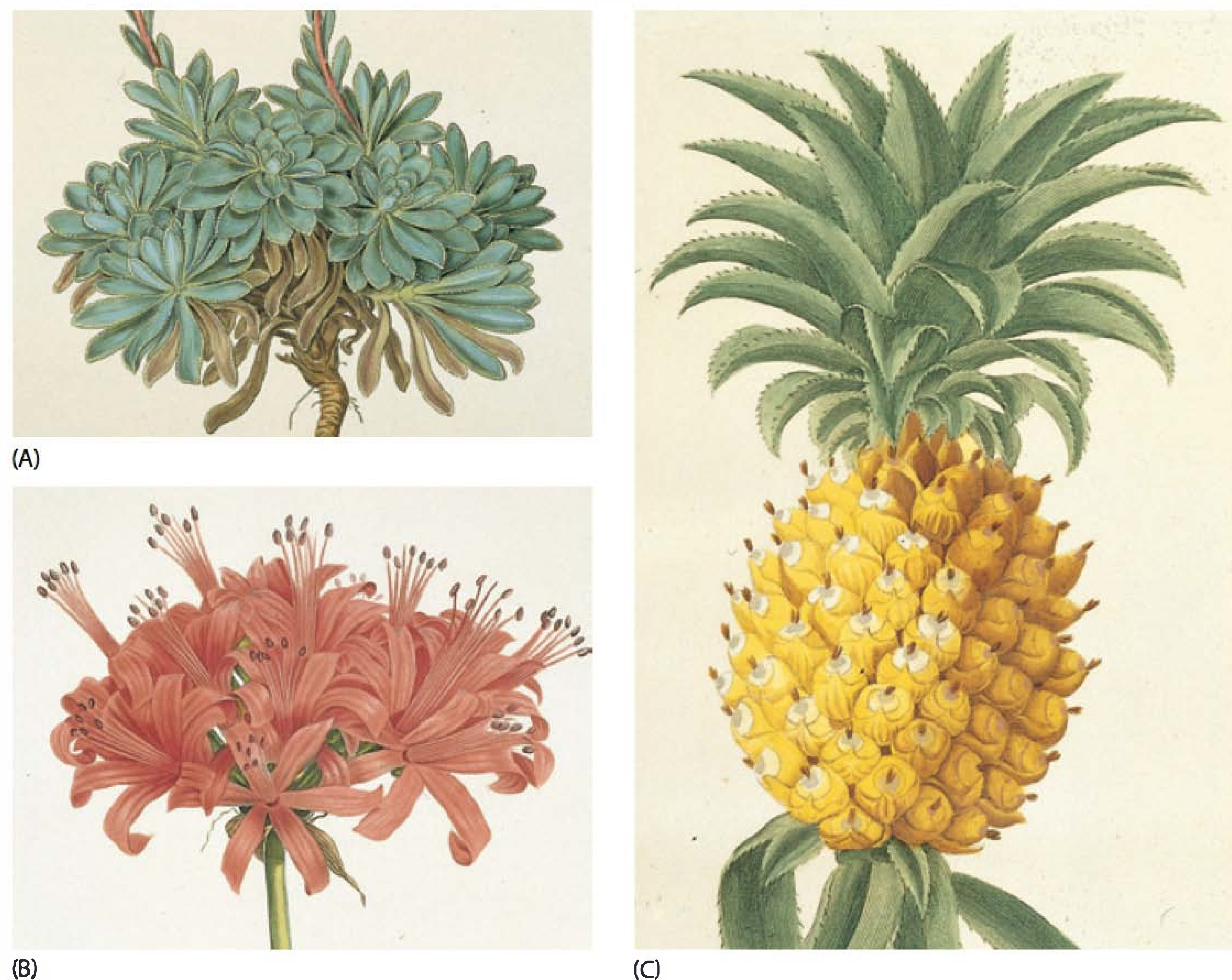


Figura 22-120 Padrões repetitivos nas plantas. A localização precisa dos sucessivos módulos a partir de um único meristema apical produz esses padrões elaborados, porém regulares, em folhas (A), flores (B) e frutos (C). (A, de John Sibthorp, Flora Graeca. London: R. Taylor, 1806-1840; B, de Pierre Joseph Redouté, Les Liliacées. Paris: chez l'Auteur, 1807; C, de Christopher Jacob Trew, Uitgezochte planten. Amsterdam: Jan Christiaan Sepp, 1771 – todas cortesias de John Innes Foundation.)

tos de vários módulos completos. Por meio de um programa bem-definido de proliferação e alongamento celular, cada primórdio foliar e suas células adjacentes irão crescer para formar uma folha, um nó e um entrenó. Enquanto isso, o próprio meristema apical dará origem a novos primórdios foliares, de modo a gerar mais e mais módulos, em uma sucessão potencialmente infinita. A organização serial dos módulos dos vegetais é, assim, controlada por eventos no ápice do caule.

O transporte polarizado de auxina controla o padrão de primórdios no meristema

Quais são os sinais que operam na minúscula região apical e determinam o arranjo de primórdios, e como esses sinais são gerados no padrão adequado? Um indício provém de uma mutação em um gene denominado *Pin1*, cuja perda impede a formação de primórdios fo-

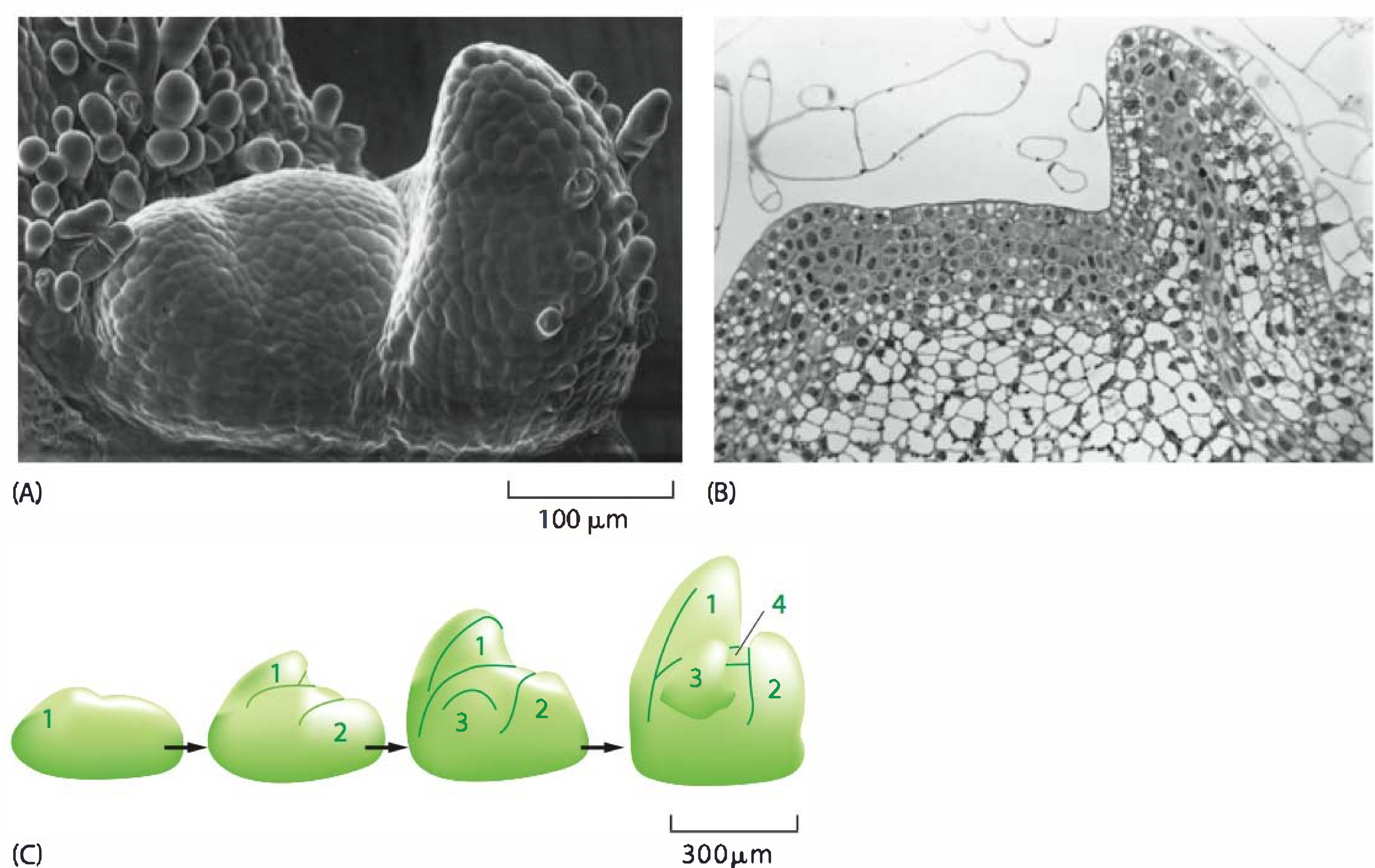


Figura 22-121 O ápice de um broto de uma planta jovem de tabaco. (A) Uma micrografia eletrônica de varredura mostra o ápice do caule com dois primórdios foliares emergindo sequencialmente, vistos aqui como intumescimentos laterais em cada lado da cúpula do meristema apical. (B) Uma secção fina de um ápice similar mostra que o primórdio foliar mais jovem se origina de um pequeno grupo de células (cerca de 100) nas quatro ou cinco camadas externas de células. (C) Um desenho esquemático mostrando que o aparecimento sequencial de primórdios foliares ocorre em um pequeno espaço e muito cedo no desenvolvimento do caule. O crescimento do ápice formará, no devido tempo, entrenós que separarão as folhas, de maneira ordenada, ao longo do caule (ver Figura 22-111). (A e B, de R. S. Poethig e I. M. Sussex, *Planta* 165:158-169, 1985. Com permissão de Springer-Verlag.)

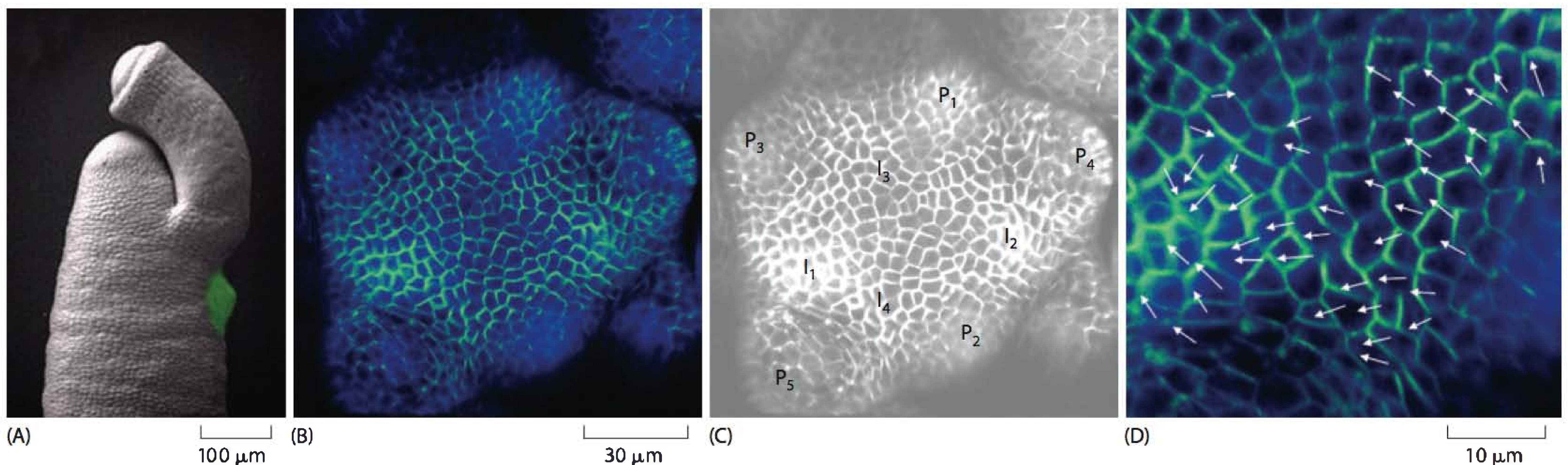


Figura 22-122 Controle de padrões em um meristema por auxina e Pin1. (A) Uma microgotícula contendo auxina (*ponto verde*) foi aplicada a uma lateral de um meristema mutante, fenotipicamente similar a um mutante *Pin1*, porque ele não possui a proteína necessária para o controle do transporte de auxina. A auxina induziu a formação de um primórdio floral lateral. (B) Distribuição do transportador de auxina Pin1 em um meristema. (B) Um meristema apical de *Arabidopsis* visto de cima, por microscopia de fluorescência, revelando a distribuição da proteína Pin1 (marcada com GFP) na camada superficial celular. (C) A mesma imagem legendada, mostrando os locais dos primórdios estabelecidos (sendo P_1 o mais recentemente formado e P_4 o mais maduro) e os primórdios incipientes previstos (sendo I_1 o próximo a se formar e I_4 o que está mais distante no futuro). (D) Porção ampliada de (B), mostrando a distribuição assimétrica de Pin1 nas membranas das células individuais, conduzindo a auxina em direção ao local de um primórdio incipiente. As *setas* indicam a direção do transporte. À medida que os primórdios se estabelecem, a quantidade de Pin1 em sua camada superficial diminui, em parte porque mudanças adicionais na distribuição das proteínas de transporte fazem com que a auxina seja bombeada a jusante, para dentro do tecido vascular que se desenvolve abaixo. Padrões complexos de transporte de auxinas também controlam a estrutura detalhada de muitos outros tecidos vegetais em desenvolvimento. (A, de D. Reinhardt et al., *Nature* 426:255-260, 2003. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd; B-D, de M. G. Heisler et al., *Curr. Biol.* 15:1899-1911, 2005. Com permissão de Elsevier.)

liares, mas permite que o caule principal continue crescendo, produzindo uma longa e fina estrutura desfolhada, semelhante a um alfinete, com o meristema apical em sua cabeça. A proteína Pin1 é um transportador de auxina, direcionando o efluxo através da membrana plasmática para dentro do espaço extracelular. Isso sugere que o primórdio foliar esteja ausente no mutante, porque a distribuição de auxina está incorreta. Na verdade, a aplicação de uma microgotícula de auxina a uma lateral de um meristema apical mutante *Pin1*, ou de um tipo similar, ao lado da cabeça do "alfinete", induzirá a formação de um primórdio foliar ou floral no local de aplicação da auxina (**Figura 22-122**A).

Pode-se observar a distribuição da proteína transportadora Pin1 em tecido vivo pela criação de uma planta transgênica (mas sob outros aspectos normal) que expressa uma forma de Pin1 marcada com a proteína fluorescente verde (Figura 22-122B-D). Na camada mais externa de células do meristema, a quantidade de Pin1 varia de região para região em um padrão que se correlaciona com o padrão dos primórdios em desenvolvimento, porque o gene *Pin1* está ativado pela auxina. Além disso, a proteína Pin1 está assimetricamente distribuída nas membranas das células individuais, de modo que elas produzem auxina em maior quantidade de um lado que do outro, criando concentrações locais máximas que especificam onde os primórdios começarão a se formar. As bombas parecem estar concentradas na lateral voltada a células vizinhas cuja própria concentração de auxina é máxima, sugerindo a existência de um mecanismo de retroalimentação positiva no acúmulo de auxina. Modelos computacionais mostram que este tipo de retroalimentação positiva pode amplificar a assimetria e gerar um padrão de altos e baixos na concentração de auxina, da mesma categoria que o observado. O transporte localizado de auxina na direção perpendicular, entre o folheto externo de células meristemáticas e os filamentos de tecido vascular se desenvolvendo abaixo, contribui para a assimetria. À medida que as células se proliferam e o tecido cresce, as distribuições da proteína Pin1 e de auxina se ajustam, produzindo novos picos e novos primórdios laterais, em sucessão regular.

Variações desse tema repetitivo básico podem dar origem a arquiteturas mais complexas, incluindo estruturas como gavinhas, folhas, ramos e flores. Assim, ativando diferentes conjuntos de genes no ápice do caule, a planta pode produzir diferentes tipos de primórdios, em diferentes padrões espaciais.

A sinalização celular mantém o meristema

Uma questão central a todos esses fenômenos é a de como o meristema apical se mantém. As células do meristema devem continuar a se proliferar durante semanas, anos e até mesmo séculos à medida que a planta cresce, substituindo a si próprias enquanto geram, continuamente, uma progênie de células que se diferenciam. Ao longo de todo o processo, o tamanho do grupo de células que constituem o meristema permanece praticamente constante (cerca de 100 células em *Arabidopsis*, p. ex.). Podem surgir novos meristemas quando a planta se ramifica, mas eles também preservam o mesmo tamanho.

Triagens genéticas identificaram os genes necessários à manutenção de meristemas. Por exemplo, as mutações que interrompem o gene *Wuschel*, que codifica uma proteína homeodomínio, convertem o meristema apical em um tecido não-meristemático, de modo que a plântula não brota. Inversamente, mutações no grupo de genes *Clavata*, que codificam componentes de uma via de sinalização célula-célula (ver Figura 15-83), tornam o me-

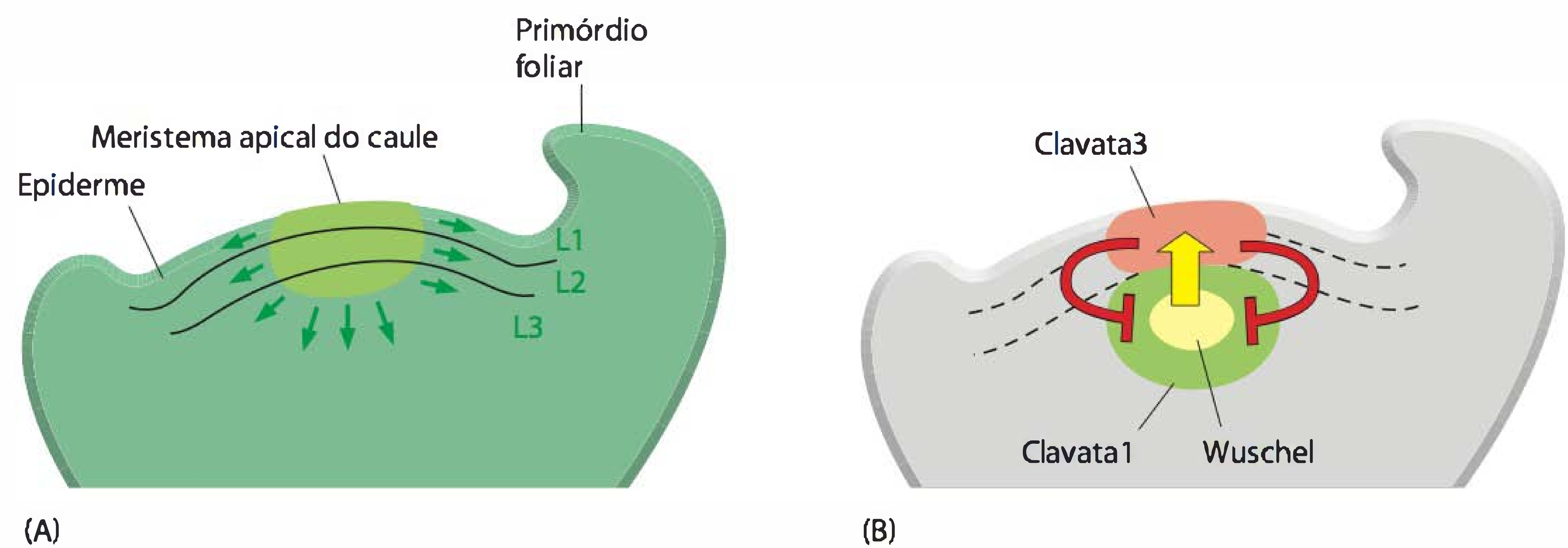


Figura 22-123 Acredita-se que os circuitos de retroalimentação mantêm o meristema apical do caule. (A) Arranjo das camadas de células que constituem o meristema apical do caule. (B) Padrão de comunicação célula-célula que mantém o meristema. A superexpressão artificial de *Wuschel* na região L3 leva a um aumento do número de células nas camadas L1 e L2, que se comportam como células meristemáticas e expressam *Clavata3*; a superexpressão artificial de *Clavata3* nas camadas L1 e L2 leva a uma redução da expressão de *Wuschel* na região L3 abaixo e a uma diminuição do número de células meristemáticas. *Clavata3* codifica uma pequena proteína-sinal, enquanto *Clavata1* codifica seu receptor, uma proteína-cinase transmembrana. *Wuschel*, que é expressa na parte central da região que expressa o receptor Clavata1, codifica uma proteína de regulação gênica da classe homeodomínio. Acredita-se que o tamanho do meristema seja controlado por um equilíbrio autorregulador entre um sinal estimulador de curto alcance produzido por células que expressam Wuschel (*seta amarela*) e um sinal inibidor de alcance mais longo liberado por Clavata3 (*barras vermelhas*).

ristema anormalmente grande. Esses genes são expressos em diferentes camadas de células na região do meristema (**Figura 22-123**A). As duas camadas mais superficiais de células, chamadas de camadas L1 e L2, juntamente com a parte mais superior da camada L3, contêm as células do próprio meristema, isto é, as células-tronco, capazes de se dividir indefinidamente para dar origem a futuras partes da planta. As células meristemáticas das camadas L1 e L2 expressam Clavata3, uma pequena proteína sinalizadora secretada. Logo abaixo, na camada L3, encontra-se um grupo de células que expressam Clavata1 (o receptor de Clavata3). No centro desta porção de Clavata1 estão células que expressam a proteína de regulação gênica Wuschel.

O padrão de divisões celulares implica que as células que expressam Wuschel não são parte do meristema propriamente dito; novas células que expressam Wuschel são, aparentemente, continuamente recrutadas a partir da parte meristemática (relativa a células-tronco) da população L3, logo acima do domínio Wuschel. No entanto, as células que expressam Wuschel estão no centro do mecanismo que mantém o meristema. Um sinal que elas produzem mantém o comportamento meristemático nas células acima, estimula a expressão dos genes *Clavata* e, presumivelmente, faz com que novas células recrutadas para o domínio Wuschel ativem Wuschel. A retroalimentação negativa das células meristemáticas superiores, distribuída pela via de sinalização Clavata, influencia as regiões abaixo para limitar o tamanho do domínio Wuschel, impedindo, com isso, que o meristema se torne muito grande (Figura 22-123B).

Essa descrição do meristema vegetal, embora incerta em alguns detalhes e certamente bastante simplificada, proporciona um dos exemplos mais claros de uma importante estratégia geral de desenvolvimento: ela mostra como um circuito de retroalimentação envolvendo um sinal de ativação de curto alcance (como aquele produzido pelas células que expressam Wuschel) e um sinal de inibição de longo alcance (como Clavata3) podem manter, de forma estável, um centro de sinalização de um tamanho bem-definido mesmo quando existe proliferação e circulação contínua das células que formam aquele centro. Como chamamos a atenção no início deste capítulo, acredita-se que sistemas análogos de sinais operem no desenvolvimento animal para manter centros de sinalização localizados – como o Organizador da gástrula de anfíbios ou a zona de atividade polarizadora em um broto de membro. E, assim como essa estratégia serve para manter os meristemas de uma planta madura, ela também pode servir nos tecidos de um animal adulto, como, por exemplo, o revestimento do intestino (discutido no Capítulo 23), para manter os importantíssimos grupos de células-tronco adultas.

Mutações reguladoras podem transformar a topologia vegetal pela alteração do comportamento celular no meristema

Para que o caule de uma planta possa se ramificar, novos meristemas apicais do caule devem ser criados, e isso também depende de eventos próximos ao ápice do caule. A cada nó em desenvolvimento, no ângulo agudo (axila) entre o primórdio foliar e o caule, é formada uma gema (**Figura 22-124**). Esta gema contém um ninho de células, derivadas do meristema apical, que mantém um caráter meristemático. Elas têm a capacidade de se tornar o meristema apical de um novo ramo ou o primórdio de uma estrutura como a flor; porém, também têm a opção alternativa de permanecer quiescentes como *gemas axilares*. O padrão de ramificação dos vegetais é regulado por esta escolha de destinação, e mutações que o afetam podem transformar a estrutura da planta. O milho constitui um belo exemplo.

O milho representa um dos feitos mais extraordinários de engenharia genética produzidos pela humanidade. Os indígenas americanos o criaram por meio de cruzamento seletivo, durante um período de vários séculos, ou talvez milênios, entre 5.000 e 10.000 anos atrás.

Eles partiram de uma gramínea selvagem conhecida como teosinte, com caules folhosos muito ramificados e minúsculas espigas carregando sementes duras e incomestíveis. A análise genética detalhada identificou alguns loci genéticos – cerca de cinco – como os sítios das mutações responsáveis pela maior parte das diferenças entre este ancestral não-promissor e o milho moderno. Um desses loci, com um efeito particularmente dramático, corresponde a um gene denominado *Teosinte branched-1* (*Tb1*). No milho com mutações de perda de função em *Tb1*, o caule simples não-ramificado comum, com algumas folhas grandes em intervalos ao longo do caule, é transformado em uma massa de folhas densa e ramificada remanescente do teosinte (**Figura 22-125**A). O padrão de ramificação no mutante implica que as gemas auxiliares, que se originam em posições normais, escaparam de um mecanismo de inibição que as impede, no milho normal, de se desenvolverem em ramos.

No milho normal, o caule único é coroado com um pendão (ou coruto) – uma flor masculina – enquanto algumas das gemas axilares ao longo do caule se desenvolvem em flores femininas e, após a fertilização, formam as espigas de milho que comemos. No milho mutante, defectivo no gene *Tb1*, essas gemas axilares frutíferas são transformadas em ramificações carregando pendões. A planta de teosinte selvagem é como o milho defectivo em *Tb1* quanto a sua aparência folhosa e altamente ramificada, mas diferentemente desse mutante ela produz espigas em muitos de seus ramos laterais, como se o gene *Tb1* estivesse ativo. A análise de DNA revela a explicação. Tanto o teosinte como o milho normal possuem o gene *Tb1* funcional, com uma sequência codificante quase idêntica, mas no milho a região reguladora sofreu uma mutação que elevou o nível da expressão gênica. Assim, no milho normal o gene é expresso em um nível alto em cada gema axilar, inibindo a formação de ramificações, enquanto no teosinte a expressão em muitas gemas axilares é baixa, de modo que ocorre a formação de ramos (Figura 22-125B).

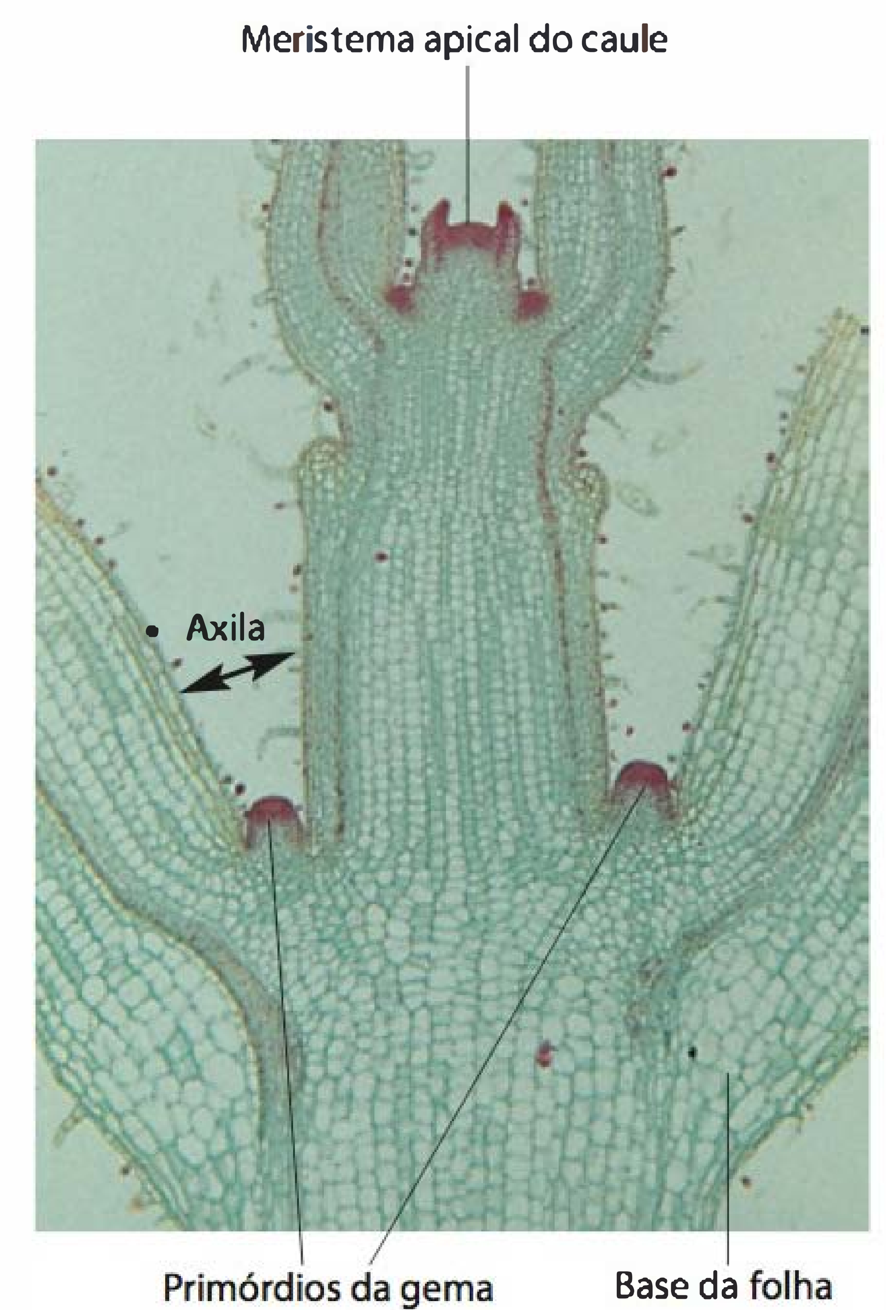


Figura 22-124 Gemas axilares na vizinhança do ápice de um caule. A fotografia mostra uma secção longitudinal de *Coleus blumei*, uma folhagem comum. (De P. H. Raven, R. F. Evert e S. E. Eichhorn, Biology of Plants, 6th ed. New York: Freeman/Worth, 1999, utilizada com permissão.)

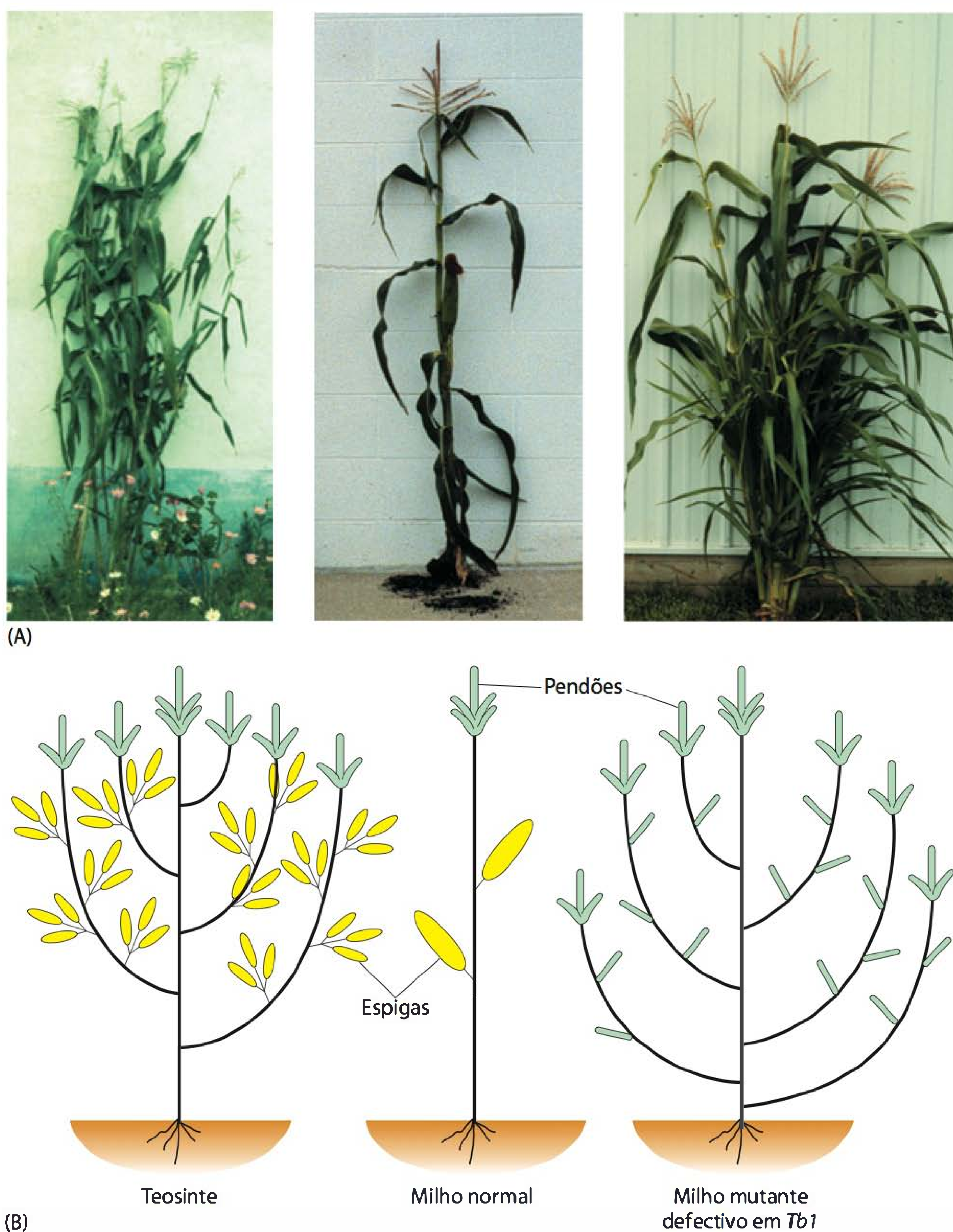


Figura 22-125 Transformação da arquitetura vegetal por mutação: uma comparação entre o teosinte, o milho normal e o milho defectivo em *Tb1*. (A) Fotografias de três tipos de plantas. (B) Comparação esquemática entre a arquitetura do teosinte, do milho normal e do milho defectivo em *Tb1*. O produto do gene *Tb1* é necessário ao desenvolvimento de espigas. Ele está ausente no mutante *Tb1* e está presente tanto no teosinte como no milho normal, mas essas duas plantas diferem, porque o gene é diferentemente regulado. (A, imagem da esquerda, de J. Doebley e R. L. Wang, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 62:361-367, 1997. Com permissão de Cold Spring Harbor Laboratory Press, A, imagem do meio e da direita, de J. Doebley, A. Stec e L. Hubbard, *Nature* 386:485-488, 1997. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Esse exemplo mostra como mutações simples, ativando o comportamento de células meristemáticas, podem transformar a estrutura vegetal – um princípio de enorme importância no cruzamento de plantas para a alimentação. De forma mais ampla, o caso de *Tb1* ilustra como novos planos corporais, sejam vegetais ou animais, podem evoluir por meio de mudanças no DNA regulador sem alterações nas características das proteínas sintetizadas.

A ativação para a floração depende de sinais ambientais passados e presentes

Os meristemas enfrentam outras escolhas de desenvolvimento além daquela existente entre quiescência e crescimento, como já vimos em nossa discussão sobre o milho, e essas também frequentemente são reguladas pelo ambiente. A mais importante é a decisão de formar uma flor (**Figura 22-126**).

A mudança do crescimento meristemático para a formação de flores é desencadeada por uma combinação de sinais. A planta não leva apenas em conta a temperatura, a intensidade luminosa e as condições nutricionais atuais; ela também baseia sua decisão de florescer em condições passadas. Um sinal importante, para muitas plantas, é a duração do dia. Para detectá-lo, a planta utiliza seu relógio circadiano – um ritmo endógeno de 24 horas da expressão gênica – para gerar um sinal positivo para o florescimento somente quando há luz na parte apropriada do dia. O próprio relógio é influenciado pela luz e, na realidade, a planta utiliza o relógio para comparar as condições luminosas passadas e presentes. Partes importantes da maquinaria genética subjacente a esses fenômenos foram identificadas, dos fitocromos e criptocromos que agem como receptores luminosos (discutido no Capítulo 15) ao gene *Constans*, cuja expressão nas folhas da planta representa um sinal para a floração. Acredita-se que o sinal seja retransmitido das folhas ao meristema, via vasculatura, pelo produto de outro gene, *Flowering locus T* (*Ft*), que é regulado por Constans.

Contudo, este mesmo sinal alcançará o meristema e desencadear a floração somente se a planta estiver em uma condição receptiva, que tipicamente depende de sua história ao longo de um período mais longo. Muitas plantas florescerão somente se tiverem previamente passado por um longo período no frio: elas devem atravessar o inverno antes de se comportarem como se fosse primavera – um processo denominado *vernalização*. O frio prolongado ocasiona mudanças na estrutura da cromatina, dependentes de outro grande conjunto de genes, incluindo homólogos de membros do grupo *Polycomb* que mencionamos anteriormente devido a seu papel na perpetuação de padrões de expressão gênica em *Drosophila*. Essas mudanças epigenéticas (discutido nos Capítulos 4 e 7) resultam no silenciamento gradual do gene *Flowering locus C* (*Flc*). O efeito é duradouro, persistindo por muitos ciclos de divisão celular, mesmo quando o clima fica mais quente. O gene *Flc* codifica um inibidor da floração, antagonizando a expressão e a ação do gene *Ft*. Assim, a vernalização, ao bloquear a produção do inibidor, permite que o meristema receba o sinal Ft e responda a ele por mudanças na expressão de um conjunto de genes de *identidade de meristema floral* no meristema apical.

Mutações que afetam a regulação da expressão de *Flc* alteram o momento de floração e, assim, a capacidade de uma planta de florescer em um dado clima. Assim, o sistema de con-

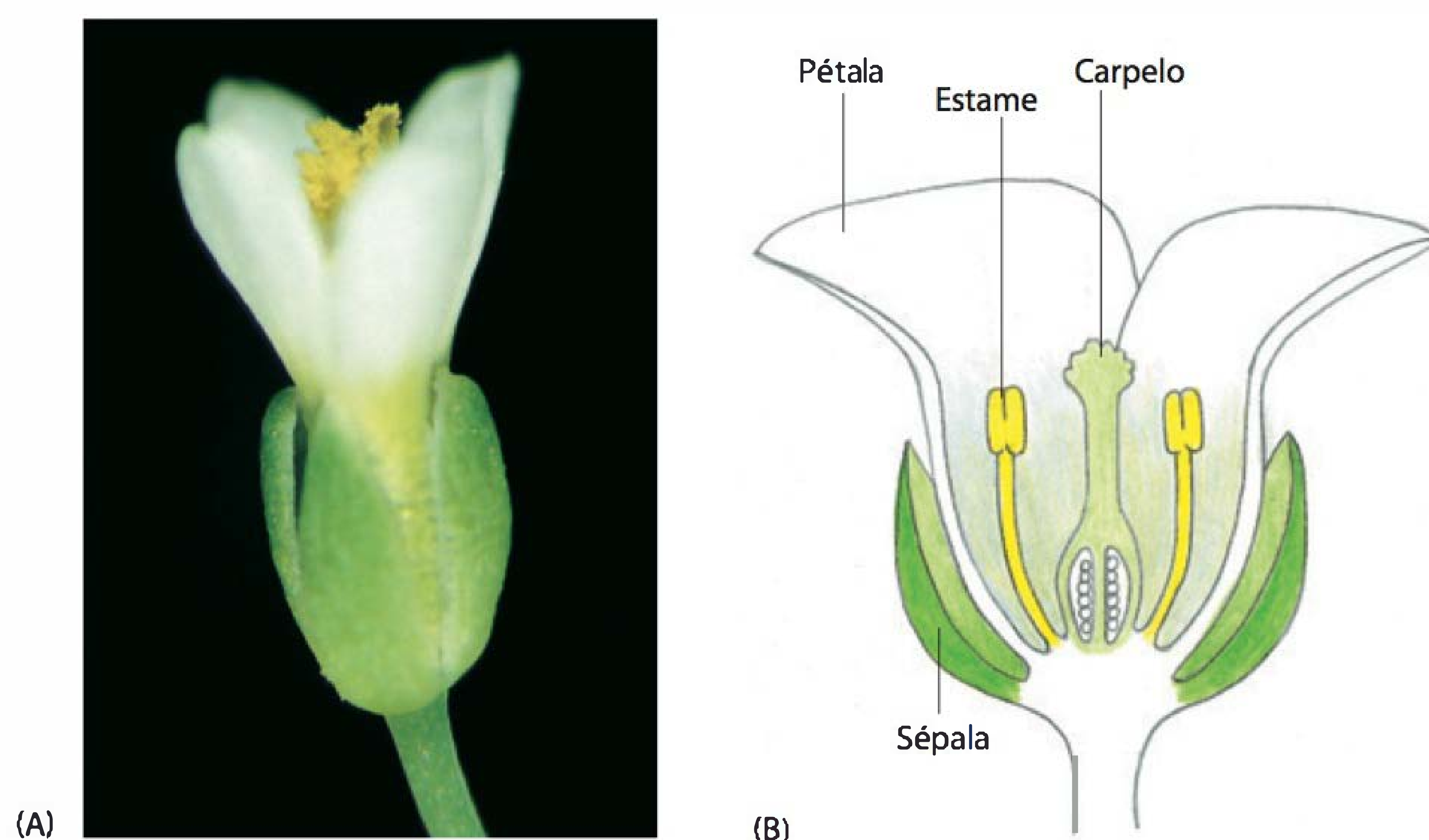


Figura 22-126 A estrutura de uma flor de *Arabidopsis*. (A) Fotografia. (B) Vista esquemática de uma secção longitudinal. O plano básico, como mostrado em (B), é comum à maioria das angiospermas dicotiledôneas. (A, cortesia de Leslie Sieburth.)


(A)


(B)


(C)


(D)

Figura 22-127 Flores de *Arabidopsis* mostrando uma seleção de mutações homeóticas. (A) Em *Apetala2*, as sépalas estão convertidas em carpelos e as pétalas em estames. (B) Em *Apetala3*, as pétalas estão convertidas em sépalas e os estames em carpelos. (C) Em *Agamous*, os estames estão convertidos em pétalas e os carpelos em meristema floral. (D) Em um mutante triplo, onde estas três funções são defectivas, todos os órgãos da flor estão convertidos em folhas. (A-C, cortesia de Leslie Sieburth; D, cortesia de Mark Running.)

trole global que governa a ativação para a floração é de vital importância para a agricultura, especialmente em uma época de rápidas mudanças climáticas.

Os genes seletores homeóticos especificam as partes de uma flor

Ao ativar os genes de identidade de meristema floral, o meristema apical abandona suas chances de continuar o crescimento vegetativo e arrisca seu futuro na produção de gametas. Suas células se envolvem em um programa rigorosamente finito de crescimento e diferenciação: por uma modificação dos mecanismos comuns para a geração de folhas, uma série de verticilos de órgãos acessórios especializados é formada de maneira precisa – tipicamente as sépalas primeiro, em seguida as pétalas, depois os estames carregando as anteras que contêm o pólen e, por último, os carpelos que contêm os óvulos (ver Painel 22-1). No final desse processo, o meristema desapareceu, mas junto com sua progênie ele criou as células germinativas.

A série de folhas modificadas que formam uma flor pode ser comparada à série de segmentos do corpo que formam uma mosca. Nos vegetais, assim como nas moscas, podem-se encontrar mutações homeóticas que convertem uma parte do padrão em características do outro. Os fenótipos mutantes podem ser agrupados em no mínimo quatro classes, nas quais grupos diferentes, mas sobrepostos, de órgãos estão alterados (**Figura 22-127**). A primeira, ou classe "A", exemplificada pelo mutante *Apetala2* de *Arabidopsis*, tem seus dois verticilos mais externos transformados: as sépalas estão convertidas em carpelos e as pétalas em estames. A segunda, ou classe "B", exemplificada por *Apetala3*, tem seus dois verticilos do meio transformados: as pétalas estão convertidas em sépalas e os estames em carpelos. A terceira, ou classe "C", exemplificada por *Agamous*, tem seus dois verticilos mais internos transformados, com uma consequência mais drástica: os estames estão convertidos em pétalas, os carpelos estão ausentes e, em seu lugar, as células centrais da flor se comportam como um meristema floral, que começa todo o processo de desenvolvimento novamente, gerando outro conjunto anormal de sépalas e pétalas aninhado dentro do primeiro e, potencialmente,

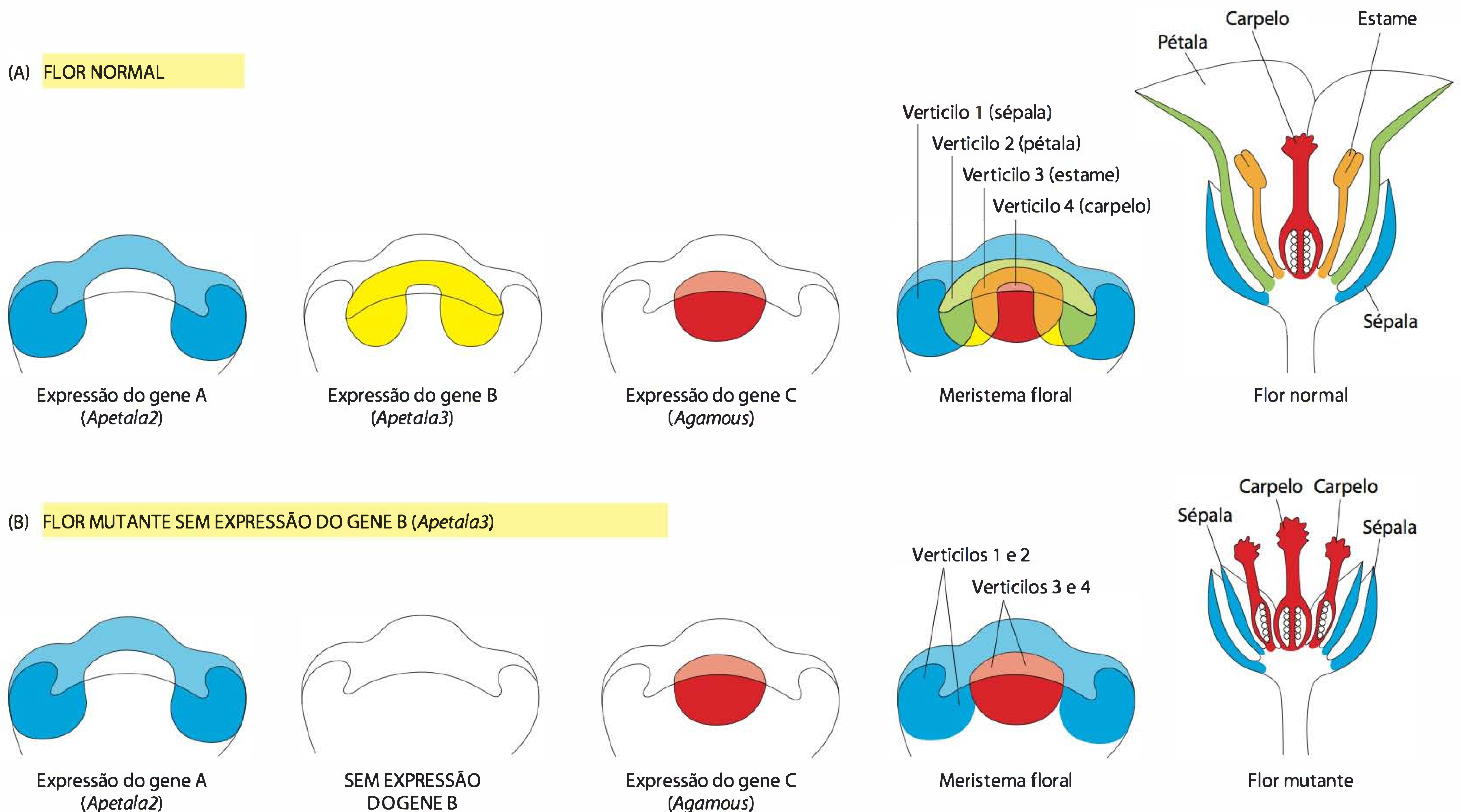


Figura 22-128 Expressão de genes seletores homeóticos em uma flor de *Arabidopsis*. (A) Diagrama dos padrões normais de expressão dos três genes cujos fenótipos mutantes estão ilustrados na Figura 22-127A-C. Os três genes codificam proteínas de regulação gênica. Os sombreamentos coloridos na flor indicam que órgão se desenvolve a partir de cada verticilo do meristema, não implicando, porém, que os genes seletores homeóticos ainda estejam sendo expressos neste estágio. (B) Os padrões em um mutante onde o gene *Apetala3* é defectivo. Como a natureza dos órgãos em cada verticilo é definida pelo conjunto de genes seletores homeóticos que eles expressam, os estames e as pétalas estão convertidos em sépalas e carpelos. A consequência de uma deficiência de um gene da classe A, como *Apetala2*, é um pouco mais complexa: a ausência deste produto do gene da classe A permite que o gene da classe C seja expresso nos dois verticilos externos, assim como nos dois internos, fazendo com que estes verticilos externos se desenvolvam como carpelos e estames, respectivamente. A deficiência de um gene da classe C impede que a região central sofra diferenciação terminal como carpelo e determina que esta porção continue o crescimento como meristema, gerando mais e mais sépalas e pétalas.

outro aninhado dentro deste, e assim por diante, indefinidamente. Uma quarta classe, os mutantes *Sepallata*, têm seus três verticilos internos transformados em sépalas.

Esses fenótipos identificam quatro classes de genes seletores homeóticos, que, como os genes seletores homeóticos de *Drosophila*, codificam, todos, proteínas de regulação gênica. Eles são expressos em diferentes domínios e definem as diferenças do estado celular que atribuem às diferentes partes de uma flor normal suas diferentes características, como mostrado na **Figura 22-128**. Os produtos dos genes colaboram para formar complexos proteicos que direcionam a expressão dos genes apropriados a jusante. Em um mutante triplo, onde as funções genéticas A, B e C estão ausentes, obtém-se no lugar da flor uma sucessão indefinida de folhas intimamente aninhadas (ver Figura 22-127D). Inversamente, em uma planta transgênica, em que os genes das classes A, B e *Sepallata* são expressos em conjunto, fora de seus domínios normais, as folhas são transformadas em pétalas. Portanto, as folhas representam um "estado basal" no qual nenhum desses genes seletores homeóticos é expresso, enquanto os outros tipos de órgãos resultam da expressão de genes em diferentes combinações.

Estudos similares têm sido realizados em outras espécies de plantas, e grupos similares de fenótipos e genes foram identificados: as plantas, assim como os animais, conservaram seus sistemas de genes seletores homeóticos. A duplicação gênica desempenhou um grande papel na evolução desses genes: vários deles, necessários em diferentes órgãos da flor, têm sequências claramente homólogas. Eles não são da classe homeobox, mas são membros de uma outra família de proteínas de regulação gênica (a assim chamada família MADS), também encontrada nas leveduras e nos vertebrados.

Claramente, as plantas e os animais encontraram, independentemente, soluções bastante similares para muitos dos problemas fundamentais do desenvolvimento multicelular.

Resumo

O desenvolvimento de uma angiosperma, como o de um animal, começa com a divisão de um óvulo fertilizado para formar um embrião com uma organização polarizada: a parte apical do embrião formará a gema, a parte basal, a raiz, e a parte intermediária, o caule. Inicialmente, a divisão celular ocorre ao longo de todo o corpo do embrião. Entretanto, à medida que o embrião cresce, a adição de novas células se torna restrita a pequenas regiões conhecidas como meristemas. Os meristemas apicais, nas pontas das gemas e nas pontas das raízes, persistirão por toda a vida da planta, permitindo que ela cresça pela adição sequencial de novas partes corporais em sua periferia. Tipicamente, a gema gera uma série repetitiva de módulos, cada qual consistindo em um segmento de caule, uma folha e uma gema axilar. O transporte polarizado de auxina controla o posicionamento dos primórdios dessas estruturas, à medida que elas surgem nas cercanias do meristema. Uma gema axilar é potencialmente um novo meristema, capaz de dar origem a um ramo lateral; o ambiente e os sinais hormonais de longo alcance dentro da planta podem controlar seu desenvolvimento pela regulação da ativação de gemas. Mutações que alteram as regras para a ativação de gemas axilares podem ter um efeito drástico sobre a forma e a estrutura da planta; uma única dessas mutações – uma de cerca de cinco alterações genéticas-chave – é responsável por uma grande parte da diferença dramática entre o milho moderno e seu ancestral selvagem, o teosinte.

A pequena erva daninha Arabidopsis thaliana é amplamente utilizada como organismo-modelo para estudos genéticos, sendo a primeira planta a ter tido seu genoma completamente sequenciado. Como nos animais, os genes que governam o desenvolvimento vegetal podem ser identificados por meio de triagens genéticas, e suas funções podem ser testadas por manipulações genéticas. Tais estudos começaram a revelar os mecanismos moleculares pelos quais a organização interna de cada módulo da planta é projetada em uma escala microscópica por interações célula-célula nas proximidades do meristema apical. O próprio meristema parece ser mantido por um circuito de retroalimentação local, no qual células que expressam a proteína de regulação gênica Wuschel produzem um estímulo positivo, e por uma retroalimentação negativa, dependente da via de sinalização célula-célula Clavata, que impede que o meristema se torne muito grande.

Sinais ambientais – especialmente a luz apropriadamente ajustada – podem induzir a expressão de genes que alteram o meristema apical que formaria uma folha para um que formará uma flor. As partes de uma flor – suas sépalas, pétalas, estames e carpelos – são formadas por uma modificação do mecanismo de desenvolvimento das folhas, e as diferenças entre essas partes são controladas por genes seletores homeóticos que são intimamente análogos (mas não homólogos) àqueles dos animais.

REFERÊNCIAS

Geral

Carroll SB, Grenier JK & Weatherbee SD (2004) From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design, 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science.

Gilbert SF (2006) Developmental Biology, 8th ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Nusslein-Volhard C (2006) Coming to Life: How Genes Drive Development. London: Yale University Press

Wolpert L, Jessell TM, Lawrence P et al (2006) Principles of Development, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.

Mecanismos universais de desenvolvimento animal

Gilbert SF & Raunio AM (eds) (1997) Embryology: Constructing The Organism. Sunderland, MA: Sinauer.

Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME et al (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308:833–838.

Lander AD (2007) Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. *Cell* 128:245–256.

Meinhardt H & Gierer A (2000) Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *BioEssays* 22:753–760.

Spemann H (1938) Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press. Reprinted 1988, New York: Garland Publishing.

Tyson JJ, Chen KC & Novak B (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* 15:221–231.

Caenorhabditis elegans: o desenvolvimento a partir da perspectiva de uma célula individual

Girard LR, Fiedler TJ, Harris TW et al (2007) WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Res* 35:D472–475.

Harris WA & Hartenstein V (1991) Neuronal determination without cell division in *Xenopus* embryos. *Neuron* 6:499–515.

Kamath RS, Fraser AG, Dong Y et al (2003) Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi. *Nature* 421:231–237.

Lyczak R, Gomes JE & Bowerman B (2002) Heads or tails: cell polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell* 3:157–166.

Metzstein MM, Stanfield GM & Horvitz HR (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14:410–416.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F et al (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89.

Strome S & Lehmann R (2007) Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. *Science* 316:392–393.

Drosophila e a genética molecular da formação de padrões: a gênese do plano corporal

Bate M & Martinez Arias A (eds) (1993) The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gregor T, Bialek W, de Ruyter van Steveninck RR, Tank DW & Wieschaus EF (2005) Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102:18403–18407.

Huynh JR & St Johnston D (2004) The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* 14:R438–449.
Lawrence PA (1992) The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design. Oxford: Blackwell Scientific.
Nusslein-Volhard C & Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.
Peel AD, Chipman AD & Akam M (2005) Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature Rev Genet* 6:905–916.
Stathopoulos A & Levine M (2004) Whole-genome analysis of *Drosophila* gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 14:477–484.

Genes seletores homeóticos e a formação de padrões do eixo ântero-posterior

Lemons D & McGinnis W (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313:1918–1922.
Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565–570.
McGinnis W, Garber RL, Wirz J et al (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403–408.
Ringrose L & Paro R (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134:223–232.
Wellik DM & Capecchi MR (2003) Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301:363–367.

Organogênese e a formação dos padrões dos órgãos acessórios

Bellaiche Y & Schweisguth F (2001) Lineage diversity in the *Drosophila* nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 11:418–423.
Betschinger J & Knoblich JA (2004) Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila, C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* 14:R674–685.
Betschinger J, Mechtler K & Knoblich JA (2006) Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124:1241–1253.
Irvine KD & Rauskolb C (2001) Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:189–214.
Harvey K & Tapon N (2007) The Salvador-Warts-Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network. *Nature Rev Cancer* 7:182–191.
O'Farrell P (2004). How metazoans reach their full size : the natural history of bigness, In Cell Growth:The Control of Cell Size, MN Hall et al, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1–22.
Panganiban G, Irvine SM, Lowe C et al (1997) The origin and evolution of animal appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5162–5166.
Rogulja D & Irvine KD (2005) Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* 123:449–461.
Tickle C (2003) Patterning systems—from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 4:449–458.

Movimentos celulares e a determinação da forma do corpo dos vertebrados

David NB, Sapede D, Saint-Etienne L et al (2002) Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16297–16302.
Heasman J (2006) Maternal determinants of embryonic cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 17:93–98.
Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y & Takeda S (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125:33–45.
Kalcheim C & Le Douarin NM (1999) The Neural Crest, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
Lewis J (2003) Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr Biol* 13:1398–1408.
Pourquie O (2003) The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* 301:328–330.
Raz E (2004) Guidance of primordial germ cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16:169–173.
Schier AF (2007) The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316:406–407.
Tabin CJ (2006) The key to left-right asymmetry. *Cell* 127:27–32.
Takeichi M, Nakagawa S, Aono S et al (2000) Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:885–890.

O camundongo

Ghabrial A, Luschnig S, Metzstein MM & Krasnow MA (2003) Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:623–647.
Hogan BL & Kolodziej PA (2002) Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Rev Genet* 3:513–523.
Larsen WJ (2001) Human Embryology, 3rd ed: Churchill Livingstone.
Lu CC, Brennan J & Robertson EJ (2001) From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *CurrOpin Genet Dev* 11:384–392.
Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435–462.
Weaver M, Dunn NR & Hogan BL (2000) Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* 127:2695–2704.
Zernicka-Goetz M (2006) The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *CurrOpin Genet Dev* 16:406–412.

Desenvolvimento neural

Bi G & Poo M (2001) Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu Rev Neurosci* 24:139–166.
Flanagan JG (2006) Neural map specification by gradients. *CurrOpin Neurobiol* 16:59–66.
Hubel DH & Wiesel TN (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28:1041–1059.
Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM (2000) Principles of Neural Science, 4th ed. New York: McGraw-Hill.
Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB & Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759–767.
Pearson BJ & Doe CQ (2004) Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:619–647.
Sanes DH, Reh TA & Harris WA (2000) Development of the Nervous System. San Diego: Academic Press.
Tessier-Lavigne M (2002) Wiring the brain: the logic and molecular mechanisms of axon guidance and regeneration. *Harvey Lect* 98:103–143.
Waites CL, Craig AM & Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251–274.
Wang GX & Poo MM (2005) Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434:898–904.
Zou Y, Stoeckli E, Chen H & Tessier-Lavigne M (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* 102:363–375.

Desenvolvimento vegetal

Bäurle I & Dean C (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125:655–664.
Doebley J, Stec A & Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485–488.
Heisler MG, Ohno C, Das P et al (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *CurrBiol* 15:1899–1911.
Howell SH (1998) Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press.
Jack T (2001) Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends Plant Sci.* 6:310–316.
Schoof H, Lenhard M, Haecker A et al (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100:635–644.

Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos

23

As células originalmente evoluíram como indivíduos de vida livre, mas as células que têm importância principal para nós, como seres humanos, são membros especializados de uma comunidade multicelular. Elas perderam características necessárias à sobrevivência independente e adquiriram peculiaridades que servem às necessidades do organismo como um todo. Embora partilhem o mesmo genoma, elas são formidavelmente diferentes: há mais de 200 tipos celulares diferentes reconhecidos no corpo humano. Elas colaboram umas com as outras para formar muitos tecidos diferentes, arranjados em órgãos executando funções extremamente variadas. Para entendê-las, não basta analisá-las em uma placa de cultivo: também precisamos conhecer como elas vivem, funcionam e morrem em seu habitat natural, o corpo intacto.

Nos Capítulos 7 e 21, vimos como os vários tipos de células tornam-se diferentes no embrião e como a memória celular e os sinais celulares de suas vizinhas lhes permitem permanecer diferenciadas daí em diante. No Capítulo 19, discutimos a tecnologia de construção de tecidos multicelulares – os dispositivos que mantêm as células unidas e os materiais extracelulares que dão suporte a elas. Neste capítulo, consideramos as funções e o ciclo de vida de células especializadas no organismo adulto de um vertebrado. Descrevemos como as células trabalham juntas para realizar suas funções, como novas células especializadas são originadas, como vivem e morrem e como a arquitetura dos tecidos é preservada, apesar da constante substituição de células velhas por novas. Examinamos em particular o papel desempenhado em muitos tecidos pelas *células-tronco* – células que são especializadas para fornecer um suprimento indefinido de células diferenciadas frescas quando estas são perdidas, descartadas ou necessárias em grande número.

Discutiremos esses tópicos por meio de uma série de exemplos – alguns escolhidos porque ilustram princípios gerais importantes, outros porque salientam objetos de estudo preferidos e outros ainda porque colocam problemas intrigantes que a biologia celular ainda tem que solucionar. Por fim, confrontaremos a questão prática que sustenta a turbulência atual de interesses em células-tronco: como podemos utilizar nosso conhecimento dos processos de diferenciação celular e renovação de tecidos para que funcionem acima do normal e melhorar aquelas lesões e falhas do organismo humano que até agora parecem sem recuperação?

Neste capítulo

A EPIDERME E SUA RENOVAÇÃO POR MEIO DE CÉLULAS-TRONCO 1417

EPITÉLIO SENSORIAL 1429

AS VIAS AÉREAS E O INTESTINO 1434

VASOS SANGUÍNEOS, LINFÁTICOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS 1450

RENOVAÇÃO POR CÉLULAS-TRONCO MULTIPOTENTES: FORMAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE 1450

ORIGEM, MODULAÇÃO E REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO 1463

FIBROBLASTOS E SUAS TRANSFORMAÇÕES: A FAMÍLIA DE CÉLULAS DO TECIDO CONECTIVO 1467

MODIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO 1476

A EPIDERME E SUA RENOVAÇÃO POR MEIO DE CÉLULAS-TRONCO

Começaremos com um tecido muito familiar: a pele. Como quase todos os tecidos, a pele é um complexo de vários tipos celulares diferentes. Para desempenhar sua função básica como uma barreira, a camada que cobre a parte mais externa da pele depende de uma variedade de células e estruturas de sustentação, muitas das quais também são necessárias na maior parte dos outros tecidos. Ela necessita de suporte mecânico, em grande parte proporcionado pela estrutura de matriz extracelular, secretada principalmente por *fibroblastos*. Necessita de um suprimento de sangue para trazer nutrientes e oxigênio e remover produtos de excreção e dióxido de carbono, e isso requer uma rede de vasos sanguíneos revestidos com *células endoteliais*. Estes vasos também fornecem vias de acesso para as células do sistema imune se defenderem contra infecções: os *macrófagos* e as *células dendríticas* fagocitam os patógenos invasores e ajudam a ativar os *linfócitos*, e os próprios linfócitos servem como intermediários para respostas mais sofisticadas do sistema imune adaptativo (discutido no Capítulo 24). As *fibras nervosas* também são necessárias para transmitir a informação sen-

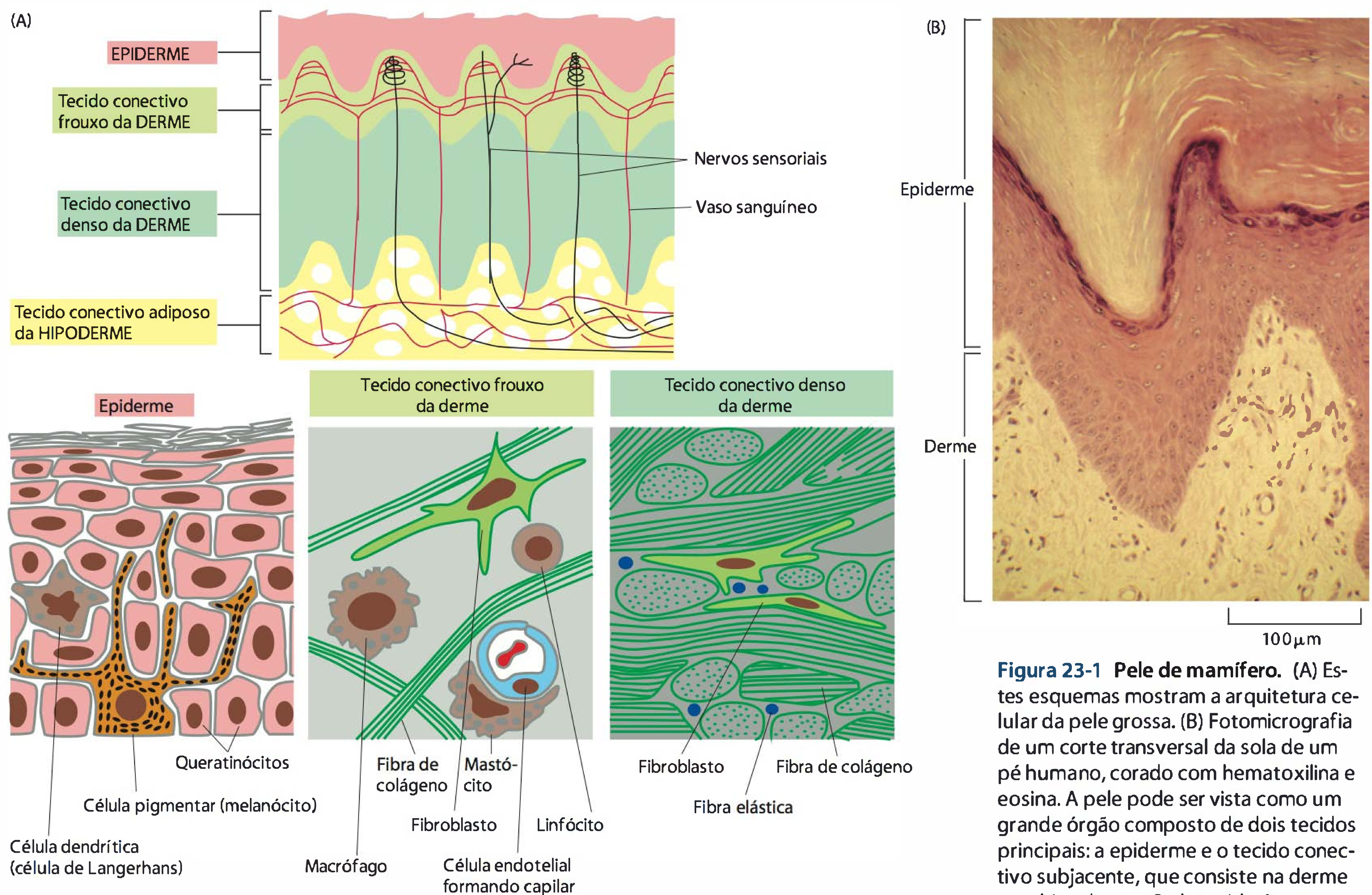


Figura 23-1 Pele de mamífero. (A) Estes esquemas mostram a arquitetura celular da pele grossa. (B) Fotomicrografia de um corte transversal da sola de um pé humano, corado com hematoxilina e eosina. A pele pode ser vista como um grande órgão composto de dois tecidos principais: a epiderme e o tecido conectivo subjacente, que consiste na derme e na hipoderme. Cada tecido é composto de vários tipos celulares diferentes. A derme e a hipoderme são ricamente supridas com vasos sanguíneos e nervos. Algumas fibras nervosas se estendem para a epiderme.

sorial desde o tecido até o sistema nervoso central e para liberar sinais na direção oposta para a secreção glandular e a contração do músculo liso.

A **Figura 23-1** ilustra a arquitetura da pele e mostra como ela satisfaz todas estas necessidades. Um epitélio, a **epiderme**, forma a cobertura mais externa, criando uma barreira impermeável que é autorreparada e renovada continuamente. Abaixo desta, encontra-se uma camada relativamente grossa de tecido conectivo, a qual inclui a **derme** resistente e rica em colágeno (da qual é feito o couro) e a camada adiposa subjacente do *tecido conectivo subcutâneo*, ou *hipoderme*. Na pele, como em qualquer outro órgão, o tecido conectivo, com os vasos e os nervos que passam através dele, supre a maioria das funções gerais de sustentação listadas anteriormente. Entretanto, a epiderme é o componente fundamental, essencial da pele – o tecido que é característico para este órgão, mesmo ainda que não seja a maior parte de seu volume. Anexos como pelos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas desenvolvem-se como especializações da epiderme (**Figura 23-2**). Mecanismos complexos regulam a distribuição destas estruturas e seus padrões distintos de crescimento e renovação. As regiões de epitélio menos especializado, mais ou menos liso, que cobre a superfície do corpo entre os folículos pilosos e outros anexos, são chamadas de *epiderme interfolicular*. Esta tem uma organização simples e proporciona uma boa introdução para a maneira pela qual os tecidos de um organismo adulto são renovados continuamente.

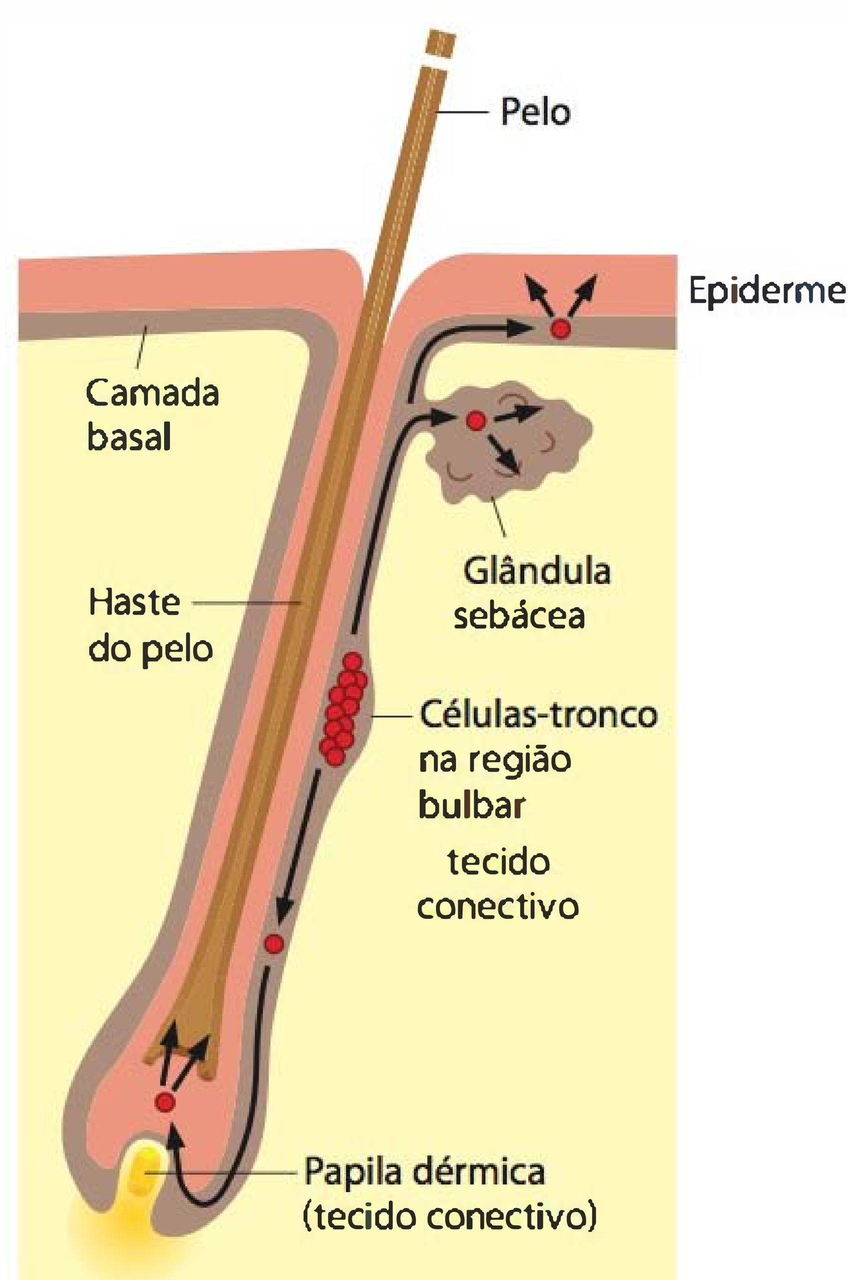


Figura 23-2 Um **folículo piloso e sua glândula sebácea associada.** Estas estruturas formam-se como especializações da epiderme. O pelo cresce para cima a partir da papila na sua base. A glândula sebácea contém células carregadas de lipídeo, que é secretado para manter o pelo adequadamente lubrificado. A estrutura inteira sofre ciclos de crescimento, regressão (quando o pelo cai) e restabelecimento. Como o restante da epiderme, ele depende de células-tronco para seu crescimento e restabelecimento em cada ciclo. Um grupo importante de células-tronco (vermelho), capaz de dar origem tanto ao folículo piloso quanto à epiderme interfolicular, ocorre em uma região chamada de dilatação bulbosa (ou bulbar), logo abaixo da glândula sebácea.

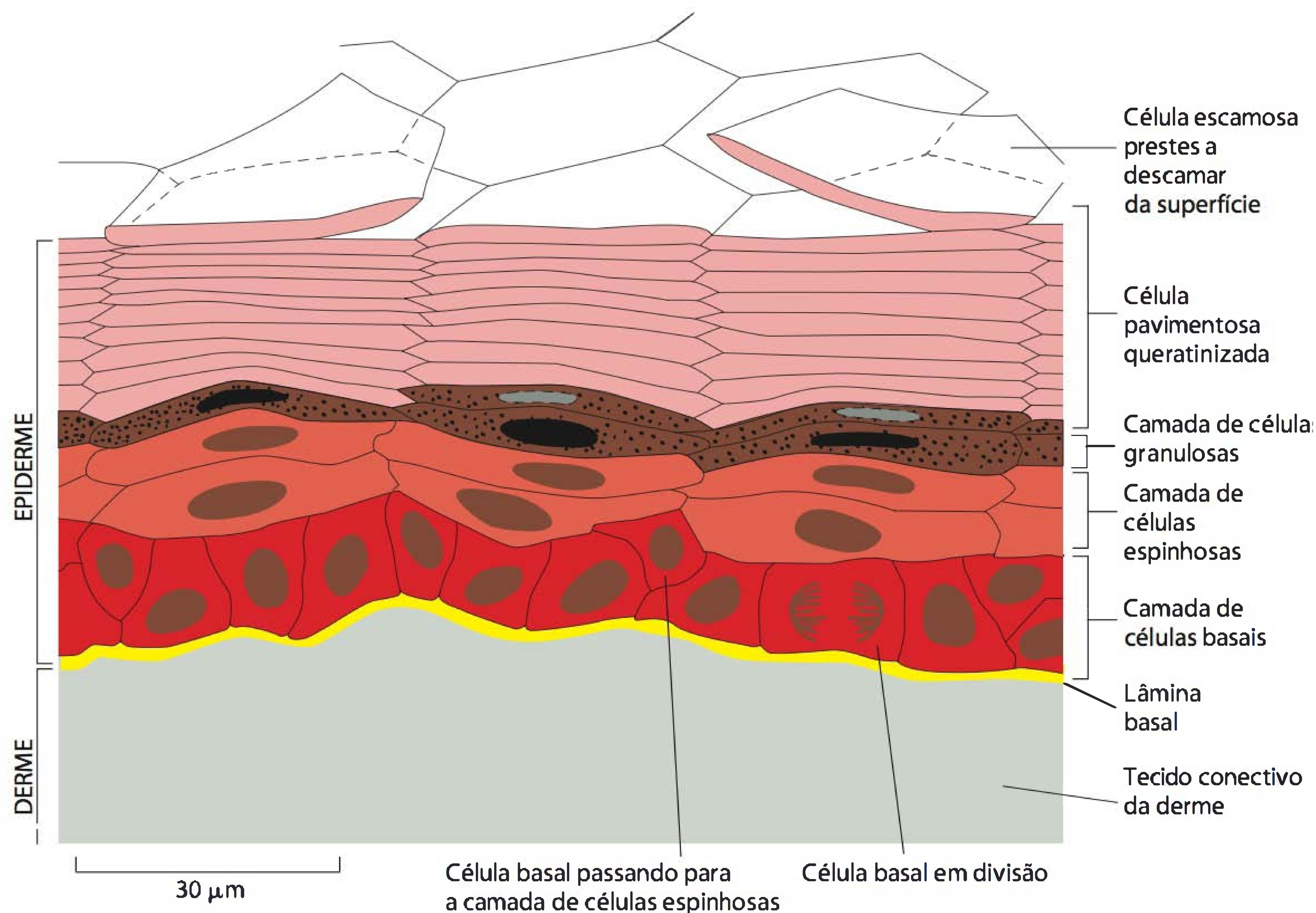


Figura 23-3 A estrutura estratificada da epiderme vista em um camundongo. Os contornos das células escamosas queratinizadas são revelados embebendo-as em uma solução contendo hidróxido de sódio. O arranjo hexagonal altamente ordenado de colunas de células se entrelaçando mostrado aqui ocorre somente em alguns locais nos quais a epiderme é fina. Na pele humana, as fileiras de células escamosas normalmente são muitas vezes mais altas e menos regulares, e onde a pele é muito grossa as células em mitose são vistas não somente na camada basal, mas também nas primeiras poucas camadas de células acima dele. Além das células destinadas à queratinização, as camadas profundas da epiderme incluem um pequeno número de tipos de células diferentes, como indicado na Figura 23-1, incluindo células dendríticas chamadas de células de Langerhans, derivadas da medula óssea; melanócitos (células pigmentares) derivados da crista neural; e células de Merkel, que estão associadas a terminações nervosas na epiderme.

As células da epiderme formam uma barreira impermeável estratificada

A epiderme interfolicular é um epitélio de múltiplas camadas (*estratificado*) composto em grande parte de *queratinócitos* (assim chamados porque sua atividade diferenciada característica é a síntese de proteínas de filamentos intermediários chamadas de queratinas, que dão à epiderme a sua resistência) (**Figura 23-3**). Estas células modificam seu aspecto de uma camada para a outra. Aquelas na camada mais interna, presas à uma lâmina basal subjacente, são denominadas *células basais* e, normalmente, são somente elas que se dividem. Acima das células da camada basal, estão várias camadas de *células espinhosas* grandes (**Figura 23-4**), cujos numerosos desmossomos – cada um deles sendo um local de ancoragem para grossos feixes de filamentos de queratina – são visíveis ao microscópio de luz exatamente como minúsculos espinhos ao redor da superfície da célula (por isso o nome célula espinhosa). Acima das células espinhosas encontra-se o estrato granuloso, fino e com células de coloração escura intensa (ver Figura 23-3). É neste nível que as células estão unidas firmemente para formar uma barreira impermeável. Os camundongos que deixam de formar esta barreira em virtude de um defeito genético morrem por perda rápida de fluido logo após o nascimento, mesmo apesar de sua pele parecer normal em outros aspectos.

O estrato granuloso, com sua barreira ao movimento de água e de solutos, marca o limite entre a camada mais interna, metabolicamente ativa, e a camada mais externa da epiderme, que consiste em células mortas cujas organelas intracelulares desapareceram. Essas células mais externas estão reduzidas a escamas achatadas, ou *células escamosas*, densamente envoltas por queratina. As membranas plasmáticas tanto das células escamosas como das células mais externas do estrato granuloso estão reforçadas na sua superfície citoplasmática por uma camada fina (12 nm) e resistente de proteínas ligadas por intercruzamento, que incluem uma proteína citoplasmática chamada de involucrina. As próprias células escamosas normalmente estão tão comprimidas e finas que é difícil distinguir seus limites ao microscópio de luz, mas, se mergulhadas em solução de hidróxido de sódio (ou um banho morno de imersão), aumentam um pouco de volume e, assim, seus contornos podem ser vistos (ver Figura 23-3).



Figura 23-4 Uma célula espinhosa. Este desenho, feito a partir de uma eletromicrografia de um corte da epiderme, mostra os feixes de filamentos de queratina que atravessam o citoplasma e estão inseridos nas junções do tipo desmossomo que unem a célula espinhosa (vermelho) às suas vizinhas. Os nutrientes e a água difundem-se livremente através dos espaços intercelulares nas camadas metabolicamente ativas da epiderme ocupadas pelas células espinhosas. Mais para fora, ao nível das células do estrato granuloso, há uma barreira impermeável que se considera ser criada por um material selante secretado pelas células do estrato granuloso. (De R. V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: an Atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1979.)

As células epidérmicas em diferenciação expressam uma sequência de genes diferentes à medida que amadurecem

Tendo descrito a imagem estática, vamos agora colocá-la em movimento e ver como a epiderme é continuamente renovada. Enquanto algumas células basais estão se dividindo, somando-se à população na camada basal, outras (suas irmãs ou primas) estão movendo-se para fora do estrato basal em direção ao estrato espinhoso, realizando a primeira etapa de sua jornada para o exterior. Quando atingem o estrato granuloso, as células começam a perder seu núcleo e suas organelas citoplasmáticas, por meio de um mecanismo de degradação que envolve ativação parcial da maquinaria de apoptose; desse modo, as células são transformadas em células escamosas queratinizadas no estrato córneo. Por fim, elas descamam da superfície da pele (e tornam-se um dos principais constituintes da poeira doméstica). O tempo decorrido desde a produção de uma célula no estrato basal da pele humana até o momento de sua perda por descamação na superfície é de cerca de um mês, dependendo da região do corpo.

Como o novo queratinócito no estrato basal é transformado na célula escamosa nas camadas mais externas (ver Figura 23-4), ele passa através de uma sucessão de estados diferentes de expressão gênica, sintetizando uma sucessão de membros diferentes das proteínas da família queratina. Entretanto, outras proteínas características, como a involucrina, também começam a ser sintetizadas como parte de um programa coordenado de **diferenciação celular definitiva** – o processo no qual uma célula precursora adquire suas características especializadas finais e, em geral, para permanentemente de se dividir. O programa inteiro é iniciado na camada basal. É aqui que os destinos das células são decididos.

Células-tronco na camada basal asseguram a renovação da epiderme

Os humanos renovam as camadas mais externas da sua epiderme milhares de vezes durante toda a vida. Na camada basal deve haver células que podem permanecer indiferenciadas e continuar dividindo-se durante toda vida, lançando continuamente descendentes que se comprometem com a diferenciação, deixam a camada basal e, por fim, são descamadas. O processo só pode ser mantido se a população de células basais está se autorrenovando. Portanto, ele deve conter algumas células que produzam uma progênie mista, incluindo células-filhas que permanecem indiferenciadas como suas mães, e células-filhas que se diferenciam. As células com esta propriedade são chamadas de **células-tronco**. Elas têm um papel tão importante em uma grande variedade de tecidos que é útil fazer uma definição formal.

As propriedades que definem uma célula-tronco são as seguintes:

1. Ela própria não está diferenciada definitivamente (isto é, ela não está no final de uma via de diferenciação).
2. Ela pode se dividir sem limite (ou ao menos durante o tempo de vida de um animal).
3. Quando se divide, cada célula-filha tem uma alternativa: pode permanecer como uma célula-tronco, ou pode começar um caminho que a compromete com a diferenciação definitiva (**Figura 23-5**).

Células-tronco são necessárias onde quer que haja uma necessidade frequente de repor células diferenciadas que não possam se dividir por si próprias. Parte da definição diz que a própria célula-tronco deve ser capaz de se dividir. Porém deve-se observar que não necessariamente ela deva ser capaz de se dividir rapidamente; de fato, as células-tronco se dividem normalmente em uma taxa relativamente lenta.

A necessidade por células-tronco surge em muitos tecidos diferentes. Dessa maneira, as células-tronco são de muitos tipos, especializadas para gerar diferentes classes de células diferenciadas definitivamente – células-tronco epidérmicas para a epiderme, células-tronco intestinais para o epitélio do intestino, células-tronco hemopoiéticas para o sangue, e assim por diante. Contudo, cada sistema de célula-tronco levanta questões fundamentais semelhantes. Quais são as características que distinguem a célula-tronco em níveis moleculares?

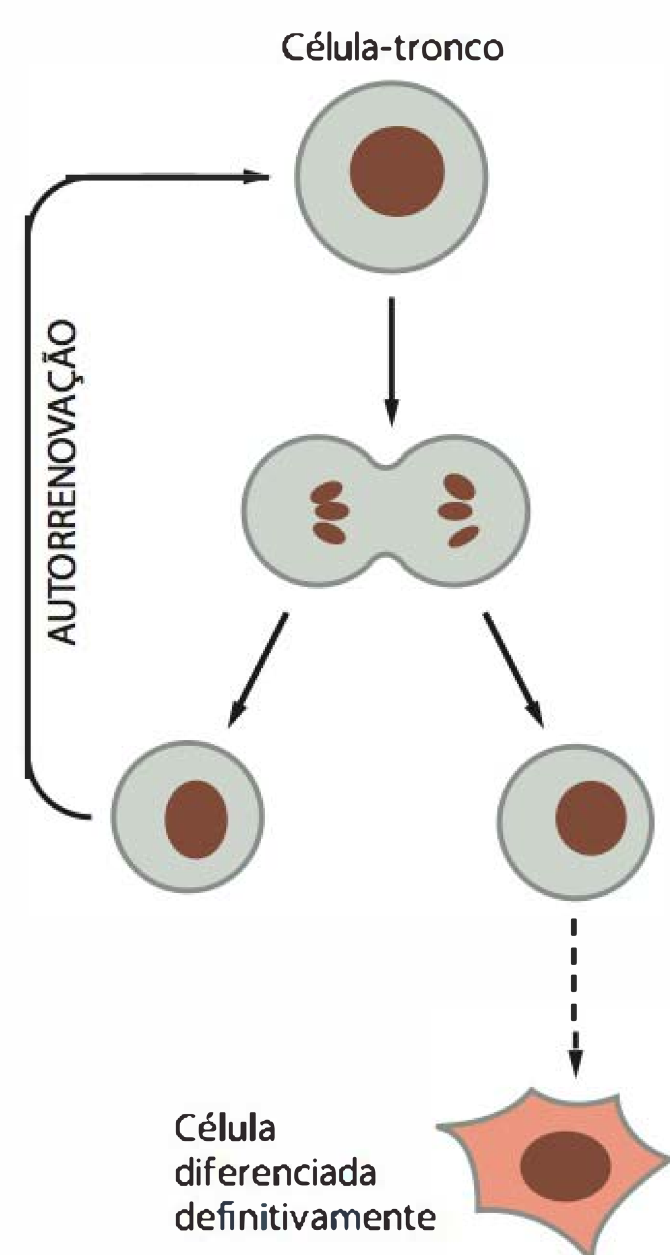


Figura 23-5 A definição de uma célula-tronco. Cada célula-filha produzida quando uma célula-tronco se divide pode permanecer como uma célula-tronco, ou pode vir a tornar-se diferenciada definitivamente. Em muitos casos, a célula-filha que opta pela diferenciação definitiva é submetida a divisões celulares adicionais antes de a diferenciação definitiva estar completada.

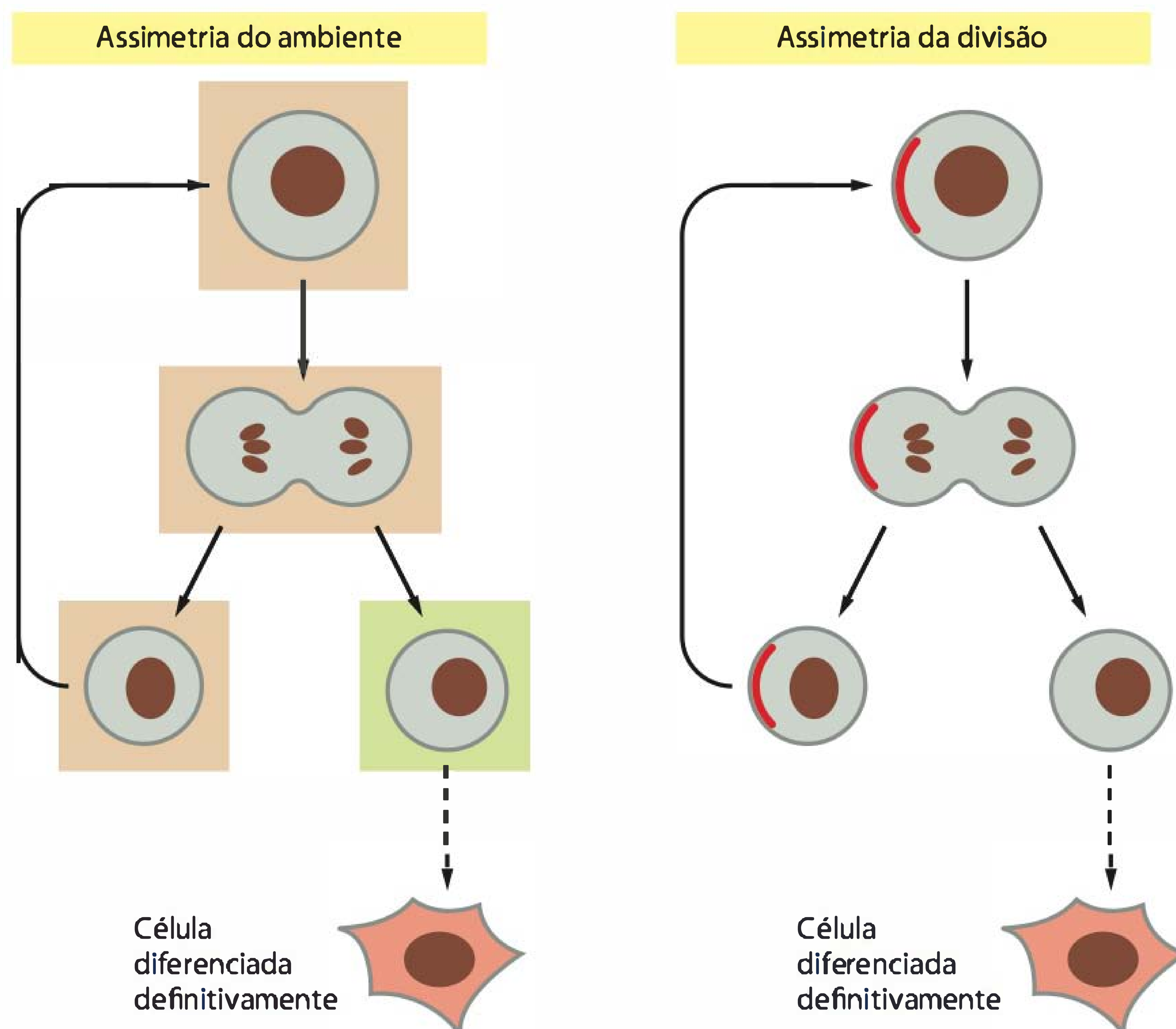


Figura 23-6 Duas maneiras para uma célula-tronco produzir células-filhas com destinos diferentes. Na estratégia com base em assimetria do ambiente, as células-filhas da célula-tronco são inicialmente semelhantes e são direcionadas em vias diferentes, de acordo com as influências do ambiente que atuam sobre elas, após terem sido geradas. O ambiente é mostrado como sombreamento colorido em torno da célula. Com esta estratégia, o número de células-tronco pode ser aumentado ou reduzido para ajustar-se ao nicho disponível para elas. Na estratégia com base na assimetria da divisão, a célula-tronco tem uma assimetria interna e se divide de tal maneira que suas duas filhas já estão dotadas de determinantes diferentes no momento em que são produzidas. Em alguns casos, a escolha entre destinos alternativos pode ser feita ao acaso para cada célula-filha, mas com uma probabilidade definida, como um "cara ou coroa", refletindo a aleatoriedade intrínseca ou "ruído" em todos os sistemas de controle genético (discutido no Capítulo 7).

Que fatores determinam se ela se divide ou permanece latente? O que define se uma determinada célula-filha se compromete com a diferenciação ou permanece como uma célula-tronco? E quando a célula-tronco pode dar origem a mais de um tipo de célula diferenciada – como muitas vezes é o caso – o que determina qual a via de diferenciação que é seguida?

As duas células-filhas de uma célula-tronco não têm sempre que se tornar diferentes

Em uma condição estável, para manter uma população estável de células-tronco, precisamente 50% das células-filhas de células-tronco em cada geração celular devem permanecer como células-tronco. Em princípio, isto pode ser realizado de duas maneiras – por meio de *assimetria do ambiente* ou por meio de *assimetria da divisão* (**Figura 23-6**). Na primeira estratégia, a divisão de uma célula-tronco poderia produzir duas células-filhas inicialmente semelhantes, cujos destinos seriam dirigidos, subsequentemente, por seu ambiente ou por algum processo aleatório com uma probabilidade adequadamente controlada pelo ambiente; 50% da *população* de células-filhas permaneceria como células-tronco, mas as duas filhas de uma determinada célula-tronco na população poderiam frequentemente ter o mesmo destino. No extremo oposto, a divisão da célula-tronco poderia ser sempre rigorosamente assimétrica, produzindo uma célula-filha que herda a qualidade de célula-tronco e outra que herda os fatores que a forçam a entrar em diferenciação. Os neuroblastos do sistema nervoso central da *Drosophila*, discutidos no Capítulo 22, são um exemplo de células que apresentam este tipo de assimetria da divisão. No entanto, esta estratégia na sua forma estrita tem uma desvantagem: significa que as células-tronco existentes podem jamais aumentar seu número, e qualquer perda de células-tronco é irreparável, a menos por recrutamento de algum outro tipo de célula para tornar-se uma célula-tronco. A estratégia de controle por assimetria do ambiente é mais flexível.

Na verdade, se um pedaço de epiderme é destruído, a lesão é reparada pelas células epidérmicas vizinhas que migram e proliferam para cobrir a área descoberta. Neste processo, um novo pedaço de epiderme que se autorrenova é formado, implicando que células-tronco adicionais têm que ser produzidas para suprir as que foram perdidas. Estas devem ter sido produzidas por divisões simétricas nas quais uma célula-tronco dá origem a duas. Dessa maneira, a população de células-tronco regula seu número para ajustar-se ao nicho disponível.

Observações como essas sugerem que a manutenção do caráter de célula-tronco na epiderme pode ser controlado por contato com a lâmina basal, com uma perda de contato desencadeando o início da diferenciação definitiva, e a manutenção do contato servindo para preservar o potencial de célula-tronco. Esta ideia contém uma certa verdade, mas não é inteiramente verdadeira. Como explicaremos a seguir, nem todas as células na camada basal têm a capacidade para servir como células-tronco.

A camada basal contém tanto células-tronco como células amplificadoras transitórias

Os queratinócitos basais podem ser dissociados da epiderme intacta e proliferar em placas de cultivo, dando origem a novas células basais e a células diferenciadas definitivas. Mesmo dentro de uma população de queratinócitos basais em cultivo na qual todos parecem indiferenciados, há grande variação na habilidade de proliferar. Quando queratinócitos humanos são tomados um a um e testados quanto a sua habilidade em formar novas colônias, alguns parecem ser totalmente incapazes de se dividir, outros passam somente por alguns poucos ciclos de divisão celular e depois param, e outros ainda se dividem por um número de vezes suficiente para formar grandes colônias. Este potencial proliferativo correlaciona-se diretamente com a expressão da subunidade β1 da integrina, a qual ajuda a mediar a adesão à lâmina basal. Grupos de células com altos níveis dessa molécula são encontrados também na camada basal da epiderme humana intacta e considera-se que sejam formados por células-tronco (**Figura 23-7**). Ainda não temos marcadores definitivos para as próprias células-tronco, e falaremos mais sobre eles nas próximas seções do capítulo.

Paradoxalmente, muitas senão todas as células da epiderme que dão origem a grandes colônias em cultivo parecem ser células que, elas próprias, em geral raramente dividem-se. Uma linha de evidências surgiu de experimentos em que um pulso de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, é dado a animais jovens, nos quais a epiderme está crescendo rapidamente, ou a animais maduros após uma lesão que provoca reparo rápido. Então, espera-se por muitos dias ou semanas antes da fixação do tecido e a coloração com um anticorpo que reconheça o DNA no qual a BrdU tenha sido incorporada. A BrdU é captada por qualquer célula que esteja em fase S do ciclo de divisão no momento inicial do pulso. Como é esperado que a BrdU seja diluída à metade a cada divisão celular subsequente, quaisquer células que permaneçam marcadas fortemente no momento da fixação são consideradas como tendo sofrido poucas ou nenhuma divisões desde a replicação de seu DNA no momento do pulso. Tais *células que conservam marcação* podem ser vistas entre células não-marcadas ou levemente marcadas na cama da basal da epiderme mesmo após um período de vários meses, e são vistas em grande número em folículos pilosos, em uma região chamada de dilatação bulbosa ou bulbar (ver Figura 23-2). Procedimentos de marcação engenhosos indicam que as células que conservam marcação, ao menos no folículo piloso, são na verdade células-tronco: quando um novo ciclo de crescimento do pelo inicia após um pelo velho ter sido perdido, as células que conservam marcação na dilatação bulbar finalmente se dividem e contribuem com as células que vão formar o folículo piloso regenerado.

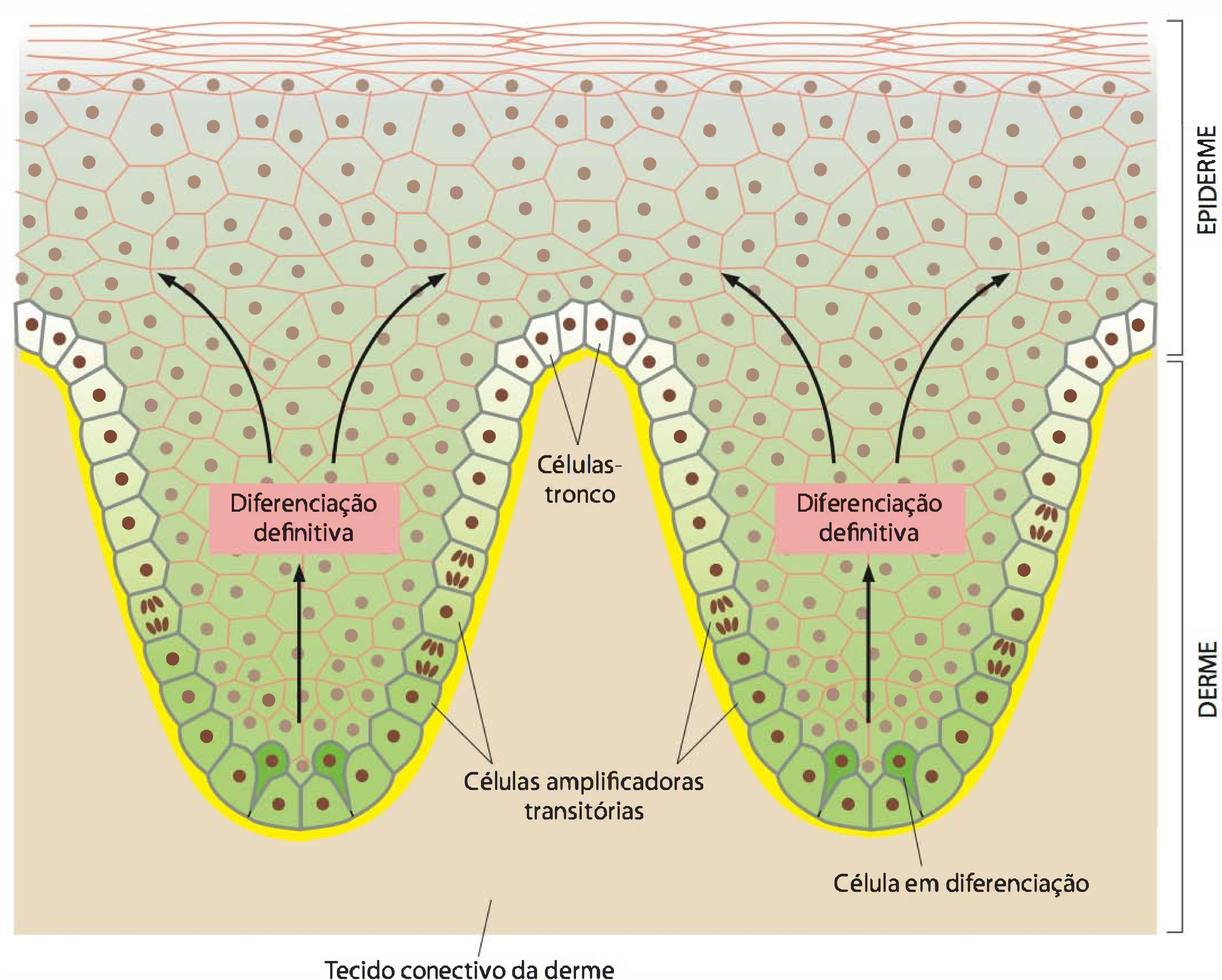


Figura 23-7 A distribuição de células-tronco na epiderme humana e o padrão de produção de células epidérmicas. O esquema tem como base amostras nas quais a localização das células-tronco foi identificada por coloração para β1 integrina, e a das células diferenciadas, por coloração para queratina-10, um marcador de diferenciação de queratinócitos; as células em divisão foram identificadas por marcação com BrdU, um análogo da timidina que é incorporado em células na fase S do ciclo de divisão celular. As células-tronco parecem estar agrupadas perto das pontas das papilas dérmicas. Elas raramente dividem-se, dando origem (por um movimento lateral) a células amplificadoras transitórias, que ocupam as regiões entre elas. As células amplificadoras transitórias dividem-se frequentemente, mas por um número limitado de ciclos de divisão, ao fim do qual elas começam a se diferenciar e deixam a camada basal. A distribuição precisa das células-tronco e das células amplificadoras transitórias varia de uma região da epiderme para outra. (Adaptada de S. Lowell et al., Curr. Biol. 10:491-500, 2000. Com permissão de Elsevier.)

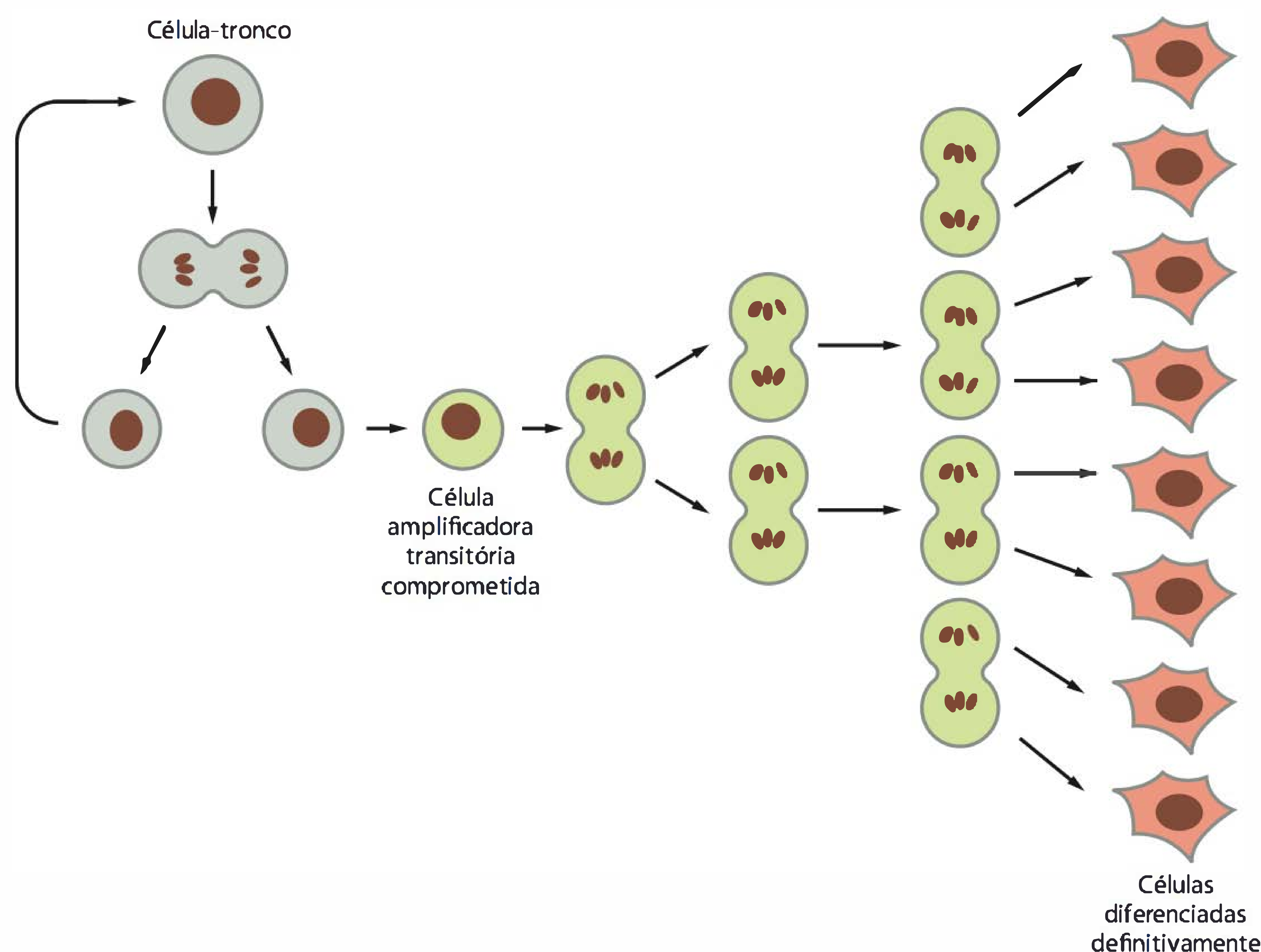


Figura 23-8 Células amplificadoras transitórias. As células-tronco em muitos tecidos se dividem apenas raramente, mas dão origem a células amplificadoras transitórias – células-filhas comprometidas com a diferenciação, que passam por uma série limitada de divisões mais rápidas antes que completem o processo. No exemplo mostrado aqui, cada divisão de célula-tronco dá origem à progênie de oito células diferenciadas definitivamente.

Embora não esteja certo que todas as células do folículo piloso tenham este caráter de conservar marcação, algumas claramente o têm, e o mesmo parece ser verdade para as células-tronco na epiderme interfolicular. Além disso, as células basais que expressam integrina β1 em níveis altos – as células que podem dar origem a grandes colônias em cultivo – raramente são vistas se dividindo.

Misturadas a estas células há outras que se dividem mais frequentemente – mas apenas por um número limitado de ciclos de divisão, depois dos quais elas deixam a camada basal e se diferenciam. Estas últimas células são chamadas de **células amplificadoras transitórias** – "transitórias" porque estão em trânsito entre o caráter célula-tronco e o caráter diferenciado; "amplificadoras" porque os ciclos de divisão pelos quais elas passam têm o efeito de amplificar o número da progênie diferenciada que resulta de uma única divisão de célula-tronco (**Figura 23-8**). Desta forma, uma população pequena de células-tronco que se divide apenas raramente pode produzir um suprimento abundante de células diferenciadas novas.

Divisões amplificadoras transitórias são parte da estratégia de controle do crescimento

Células amplificadoras transitórias são uma característica comum nos sistemas de células-tronco. Isso significa que na maioria destes sistemas há poucas células-tronco verdadeiras e elas estão misturadas com um número muito maior de células da progênie que têm apenas uma capacidade limitada para se dividir. Como discutido no Capítulo 20, o mesmo parece ser verdadeiro não apenas para a autorrenovação normal de tecidos, mas também para muitos cânceres, onde apenas poucas células na população celular do tumor são capazes de servir como células-tronco tumorais. Por que aconteceria isto? Há várias respostas possíveis, mas uma parte da explicação provavelmente encontra-se na estratégia pela qual animais multicelulares grandes (como os mamíferos) controlam os tamanhos de suas populações celulares.

As proporções das partes do corpo geralmente são determinadas precocemente, durante o desenvolvimento, por meio de sinais que agem sobre distâncias do diâmetro de no máximo poucas centenas de células: para cada órgão ou tecido, um rudimento pequeno ou uma população de células colonizadoras é delimitado desta maneira. As populações de células colonizadoras então devem crescer, mas – ao menos em mamíferos – apenas até certo limite definido, no ponto em que elas devem parar.

Uma maneira de deter o crescimento em um certo tamanho é por sinais de *feedback* (retroalimentação) que agem sobre distâncias muito longas no organismo maduro; veremos que tais sinais, na verdade, desempenham um papel importante no controle do crescimento de pelo menos alguns tecidos. Outra estratégia, no entanto, é dotar cada célula colonizadora

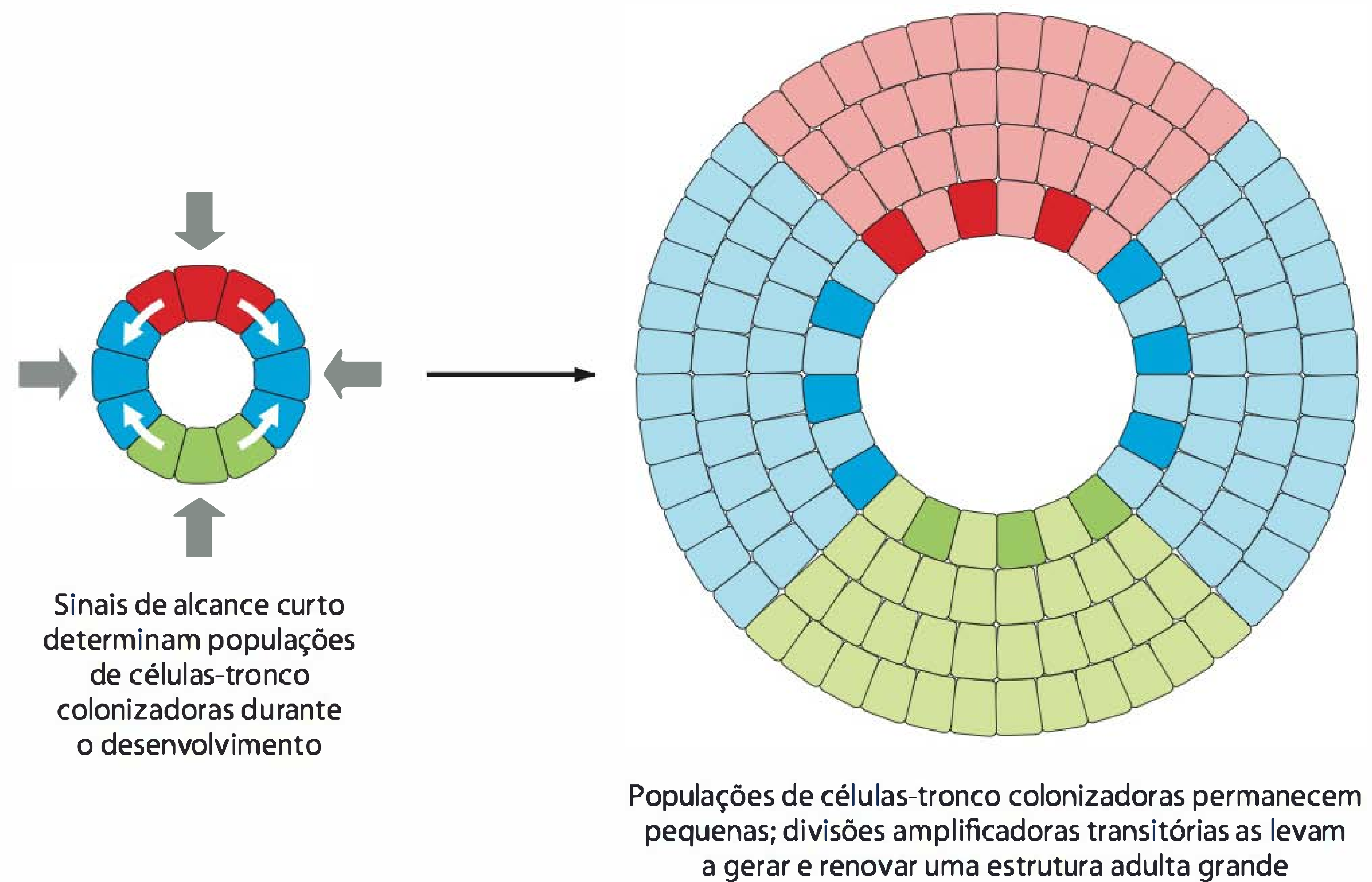


Figura 23-9 Uma maneira para definir o tamanho de um órgão grande. No embrião, sinais de alcance curto determinam grupos pequenos de células como colonizadoras de populações celulares diferentes. Cada colonizadora pode, então, ser programada para dividir-se um certo número de vezes, dando origem a um grande conjunto de células no adulto. Se o órgão adulto está sendo renovado enquanto mantém seu tamanho adequado, as colonizadoras podem ser programadas para dividirem-se como células-tronco, dando origem em cada divisão, em média, a uma célula-filha que permanece como uma célula-tronco e outra que é programada para passar por um número fixo de divisões amplificadoras transitórias.

com um programa interno que ordena que ela deva dividir-se um número limitado de vezes e, então, parar. Desta maneira, sinais de alcance curto durante o desenvolvimento podem definir o tamanho de estruturas que ao final são grandes (**Figura 23-9**). Contudo, se esta é a estratégia, como o tecido adulto pode ser renovado continuamente? Uma solução é especificar as células colonizadoras como células-tronco, capazes de continuar dividindo-se indefinidamente, mas produzindo a cada divisão uma célula-filha que permanece como uma célula-tronco e uma que é programada para passar por um número limitado de divisões amplificadoras transitórias e, então, parar.

Este certamente é um relato muito simples e incompleto do controle do crescimento e da renovação de tecido, mas ajuda a explicar por que células que estão programadas para sofrer sequências longas de divisões celulares e, então, parar são uma característica tão comum de desenvolvimento animal e por que a renovação de tecido por meio de células-tronco envolve tão frequentemente divisões amplificadoras transitórias.

As células-tronco de alguns tecidos conservam seletivamente as fitas originais do DNA

As células-tronco em muitos tecidos parecem ser células que conservam marcação. Como explicado anteriormente, isto em geral tem sido pressuposto porque, tendo incorporado um marcador como a BrdU em seu DNA durante um período de exposição a ela, as células-tronco raramente se dividem, de maneira que a marcação é diluída lentamente apenas por nova síntese de DNA. Entretanto, há outra interpretação possível: independentemente de elas dividirem-se rápida ou lentamente, as células-tronco podem segregar suas fitas de DNA assimetricamente, de tal maneira que em cada divisão, e para cada cromossomo, a fita de DNA específica que foi marcada originalmente é conservada na célula-filha que permanece como uma célula-tronco. Essa fita original provavelmente deveria ter adquirido algum tipo de marca especial, designando-a como uma fita célula-tronco e assegurando que ela segregasse assimetricamente, na célula-filha que permanece uma célula-tronco (ver Figura 23-6), juntamente com todas as fitas de DNA marcadas de forma semelhante dos outros cromossomos; dessa forma, as fitas mais velhas marcadas seriam conservadas nas células-tronco de geração celular para geração celular. A marca poderia, por exemplo, ganhar a forma de alguma proteína especial do cinetocoro que permanece associada à fita de DNA mais velha no centrômero de cada cromossomo durante a replicação do DNA e, então, compromete-se com alguma assimetria no fuso mitótico a fim de que a célula-tronco filha receba todos os cromossomos-filhos que carregam a marca. Em cada geração de células-tronco, as mesmas fitas de DNA marcadas originais serviriam, então, como modelos para a produção dos conjuntos novos de fitas de DNA a serem despachados para as células amplificadoras transitórias na geração seguinte (**Figura 23-10**).

Esta hipótese da "fita imortal" pode parecer difícil de se acreditar, dado que nenhum mecanismo foi identificado ainda para tal marcação e segregação de fitas de DNA individuais. Contudo, há evidências crescentes sugerindo que a hipótese da fita imortal está correta. O músculo (descrito mais adiante neste capítulo) proporciona um exemplo. Quando a BrdU é

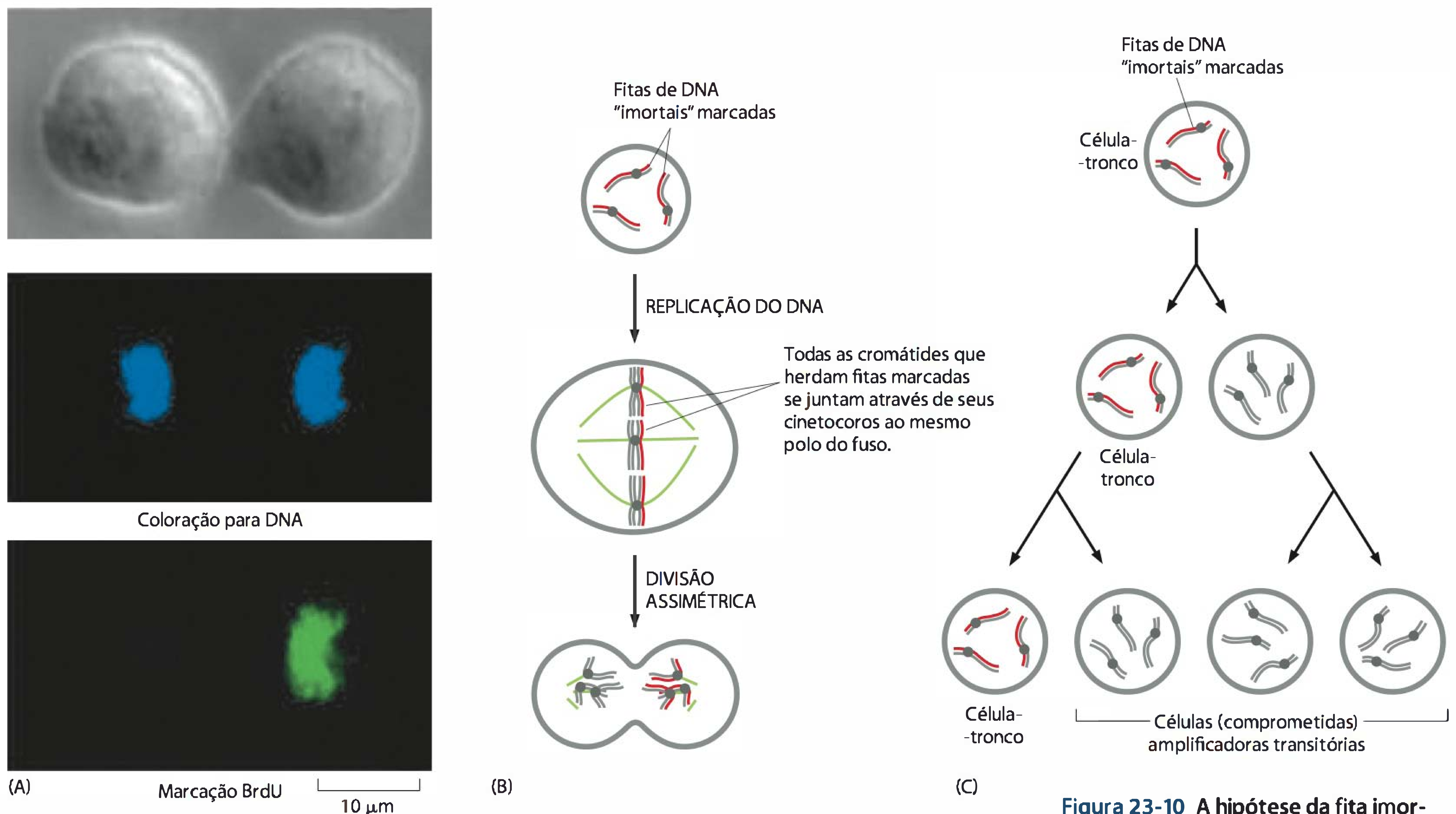


Figura 23-10 A hipótese da fita imortal. (A) Evidência experimental. Aqui, células-tronco de músculo esquelético (membros da população de célula satélite de músculo, discutido mais adiante neste capítulo) foram colocadas em cultivo e mantidas durante quatro dias para que se dividissem, em presença de BrdU para marcar as novas fitas de DNA sintetizadas. Então, as células foram mantidas em cultivo por um dia para se dividirem na ausência de BrdU. As fotografias mostram um par de células-filhas no final deste processo: uma herdou BrdU, a outra não. Isto implica em que os cromossomos-filhos carregando fitas de DNA sintetizadas durante as divisões celulares que ocorreram na presença de BrdU foram todos herdados por uma célula, enquanto aqueles carregando apenas fitas de DNA preexistentes ou sintetizadas subsequentemente foram herdados pela outra. Este fenômeno, no qual fitas de DNA velhas e novas são distribuídas assimetricamente para células-filhas diferentes, é visto apenas em populações celulares que incluem células-tronco. (B) O padrão de herança de fitas de DNA em células-tronco de acordo com a hipótese da fita imortal. Uma fita em cada cromossomo na célula-tronco é marcada de alguma forma como a fita imortal, sendo conservada pela célula-tronco filha. (C) Esta fita de DNA original permanece disponível durante todas as gerações de células-tronco subsequentes como um modelo para a produção de cromossomos de células amplificadoras transitórias. (A, de V. Shinin, B. Gayraud-Morel, D. Gomès e S. Tajbakhsh, Nat. Cell Biol. 8:677-687, 2006. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

fornecida durante um período de produção de células-tronco musculares e o destino subsequente das células é seguido à medida que elas dividem-se e proliferam, é possível detectar pequenos clones de células, ou pares de células-filhas, dentro dos quais toda a marcação com BrdU está concentrada em uma única célula, embora todas as células compartilhem a mesma origem comum de uma célula ancestral única que absorveu inicialmente a marcação. Observações semelhantes têm sido apresentadas em estudos de outros tipos de células-tronco e, significativamente, este comportamento não tem sido observado em populações celulares que não contêm células-tronco. A hipótese da fita imortal não explicaria apenas por que as células-tronco conservam indefinidamente o DNA marcado, mas implicaria também que a divisão assimétrica é uma propriedade fundamental de célula-tronco, com a consequência de que qualquer aumento no número de células-tronco deve necessitar de condições especiais para conferir a marca de imortalidade às fitas de DNA adicionais sintetizadas novamente. A hipótese da fita imortal foi proposta originalmente nos anos de 1970 como um mecanismo para as células-tronco evitarem o acúmulo de mutações promotoras de câncer durante a replicação do DNA. A redução do risco de câncer poderia ser um de seus benefícios.

A taxa de divisão de células-tronco pode aumentar dramaticamente quando células novas são necessárias com urgência

Qualquer que possa ser o mecanismo de manutenção das células-tronco, a utilização de divisões amplificadoras transitórias traz vários benefícios. Primeiro, significa que o número de células-tronco pode ser pequeno e sua taxa de divisão pode ser baixa, mesmo quando células diferenciadas definitivas têm de ser produzidas rapidamente em grande número. Isso reduz a carga cumulativa de dano genético, uma vez que a maioria das mutações ocorre no decorrer da replicação de DNA e da mitose, e mutações que ocorrem em células que não são células-tronco são eliminadas no processo de renovação do tecido. Assim, a probabilidade de câncer é reduzida. Se a hipótese da fita imortal estiver correta, de maneira que células-tronco sempre conservam as fitas de DNA modelo "imortais" originais, o risco é ainda mais reduzido, uma vez que a maioria dos erros de sequências introduzidos durante a replicação do DNA ocorrerá nas fitas novas sintetizadas, as quais as células-tronco finalmente descartam.

Segundo, e talvez mais importante, uma taxa de divisão baixa de células-tronco em circunstâncias normais permite um aumento dramático quando há uma necessidade urgente – por exemplo, a reparação de uma ferida. Então, as células-tronco podem ser

estimuladas a dividir rapidamente, e os ciclos de divisão adicionais podem tanto ampliar o estoque de células-tronco quanto aumentar abruptamente a produção de células comprometidas com a diferenciação definitiva. Dessa forma, por exemplo, quando um pedaço de pele com pelos é cortado, as células-tronco que se dividem lentamente na região bulbosa dos folículos pilosos que sobreviveram próximo à ferida são submetidas a uma proliferação rápida, e algumas células de sua progênie saem como células-tronco novas para formar uma epiderme inter-folicular sadia para cobrir o pedaço ferido da superfície do corpo.

A interação de muitos sinais dirige a renovação da epiderme

A renovação celular na epiderme parece um caso simples à primeira vista, mas a simplicidade é ilusória. Há muitos pontos no processo que têm que ser controlados de acordo com as circunstâncias: a taxa de divisão das células-tronco; a probabilidade de que uma célula-tronco filha permanecerá como célula-tronco; o número de divisões celulares das células amplificadoras transitórias; o momento de saída da camada basal e o tempo que a célula leva para completar seu programa de diferenciação e ser descamada da superfície. A regulação dessas etapas deve possibilitar que a epiderme responda à abrasão, tornando-se grossa e calosa, e que repare a si própria, quando ferida. Em regiões especializadas da epiderme, como aquelas que formam os folículos pilosos, com seus próprios subtipos especializados de células-tronco, mais controles ainda são necessários para organizar o padrão local.

Cada um dos pontos de controle tem sua própria importância, e uma grande quantidade de sinais moleculares é necessária para regular a todos, de modo a manter a superfície do corpo sempre adequadamente coberta. Como sugerimos anteriormente, uma influência importante é o contato com a lâmina basal, sinalizado através de integrinas na membrana plasmática das células. Se os queratinócitos basais cultivados são mantidos em suspensão, em vez de permitir-se que se apoiem e se prendam ao fundo da placa de cultivo, todos param de se dividir e se diferenciam. Para permanecer como uma célula-tronco epidérmica, aparentemente é necessário (embora não seja o suficiente) que ela esteja ligada à lâmina basal ou à outra matriz extracelular. Esta necessidade ajuda a assegurar que o tamanho da população de células-tronco não aumente sem limites. Caso se aglomerem fora de seu nicho normal sobre a lâmina basal, as células perdem sua qualidade de célula-tronco. Quando esta regra é quebrada, como em alguns cânceres, o resultado pode ser um tumor de crescimento constante.

A maioria dos outros mecanismos de comunicação celular descritos no Capítulo 15 também está envolvida no controle da renovação da epiderme, na sinalização entre as células dentro da epiderme ou na sinalização entre a epiderme e a derme. As vias de sinalização EGF, FGF, Wnt, Hedgehog, Notch, BMP/TGFβ e integrina estão envolvidas (e veremos que o mesmo é verdade em muitos outros tecidos). A superativação da via Hedgehog, por exemplo, pode fazer com que as células da epiderme entrem em divisão após terem deixado a camada basal, e mutações em componentes desta via são responsáveis por muitos cânceres de epiderme. Ao mesmo tempo, a sinalização Hedgehog ajuda a orientar a escolha do caminho de diferenciação: uma falta de sinalização Hedgehog leva à perda de glândulas sebáceas, enquanto um excesso pode fazer com que glândulas sebáceas se desenvolvam em regiões onde elas nunca se formariam normalmente. De maneira semelhante, a perda da sinalização Wnt leva à falha no desenvolvimento do folículo piloso, enquanto a ativação excessiva desta via faz com que folículos pilosos extras se formem e cresçam excessivamente até que deem origem a tumores.

A sinalização Notch, ao contrário, parece limitar o tamanho da população de células-tronco, inibindo células-tronco próximas a permanecerem como células-tronco e fazendo com que elas se tornem células amplificadoras transitórias. A TGFβ tem uma função-chave em sinalização para a derme durante o reparo de ferimentos na pele, promovendo a formação de tecido cicatricial rico em colágeno. As funções individuais precisas de todos os vários mecanismos de sinalização na epiderme estão apenas começando a ser desvendadas.

A glândula mamária sofre ciclos de desenvolvimento e de regressão

Em regiões especializadas da superfície do corpo, vários outros tipos de células desenvolvem-se a partir da epiderme embrionária. Particularmente, secreções como suor, lágrimas,

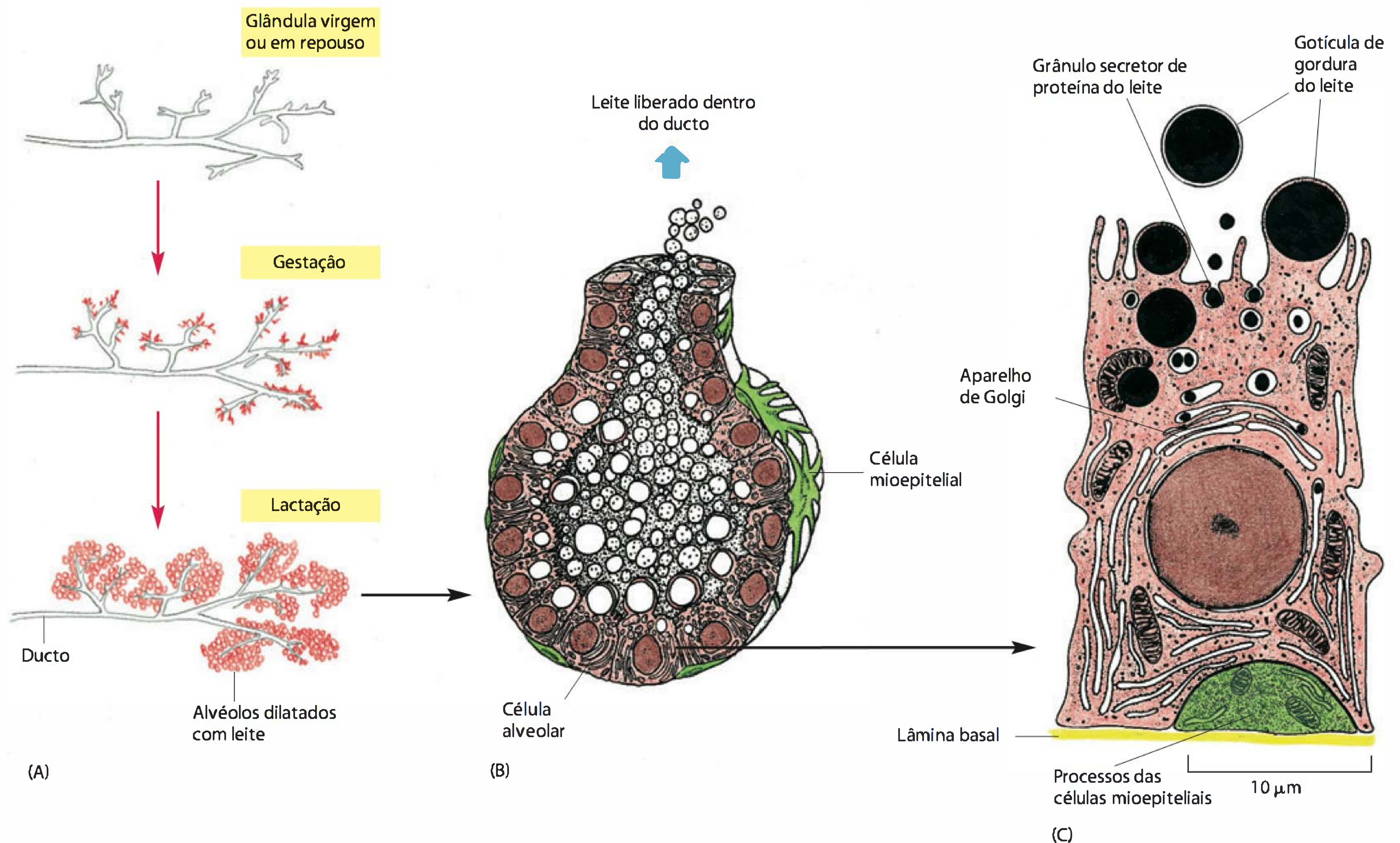


Figura 23-11 A glândula mamária. (A) O crescimento dos alvéolos a partir dos ductos da glândula mamária durante a gestação e a lactação. Somente uma parte pequena da glândula é mostrada. A glândula "em repouso" contém uma quantidade pequena de tecido glandular inativo imerso em uma grande quantidade de tecido conectivo adiposo. Durante a gestação ocorre uma enorme proliferação do tecido glandular às custas do tecido conectivo adiposo, com as porções secretoras da glândula se desenvolvendo preferencialmente para criar alvéolos. (B) Um dos alvéolos secretores de leite com a rede de células mioepiteliais contráteis (verde) envolvendo-o (ver também Figura 23-47E). (C) Um único tipo de célula alveolar secretora produz tanto as proteínas como a gordura do leite. As proteínas são secretadas da maneira normal por exocitose, enquanto a gordura é liberada como gotículas envolvidas por membrana plasmática que se destacam da célula. (B, após R. Krstić, Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. Berlin: Springer-Verlag, 1978; C, de D.W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12th ed. New York: Chapman and Hall, 1994.)

saliva e leite são produzidas por células segregadas em glândulas situadas mais profundamente que se originam como invaginações da epiderme. Essas estruturas epiteliais têm funções e padrões de regeneração bastante diferentes daqueles das regiões queratinizadas.

As glândulas mamárias são os maiores e mais notáveis desses órgãos secretores. Elas são a característica que define os mamíferos e são um assunto importante por muitos motivos: não servem apenas para o sustento de bebês e atração do sexo oposto, mas também como a base para uma grande indústria – a indústria leiteira – e como o local de algumas das formas mais comuns de câncer. O tecido mamário ilustra de forma dramática que os processos de desenvolvimento continuam no organismo adulto, mostrando também como a morte celular por apoptose permite ciclos de crescimento e regressão.

A produção de leite deve ser ativada quando um bebê nasce e desligada quando o bebê é desmamado. Durante a gestação, as células produtoras da fábrica de leite são produzidas; no desmame, elas são destruídas. Uma glândula mamária adulta "em repouso" consiste em sistemas de ductos ramificados imersos em tecido conectivo adiposo; esta é a futura rede de tubos que conduzirá o leite até o mamilo. Os ductos são revestidos com um epitélio que inclui células-tronco mamárias. Estas células-tronco podem ser identificadas por um teste funcional, no qual as células do tecido mamário são dissociadas, selecionadas de acordo com os marcadores de superfície celular que elas expressam e transplantadas de volta para um tecido hospedeiro adequado (um bloco de gordura mamária). Este ensaio revela que um subgrupo pequeno do total de células epiteliais tem o potencial de célula-tronco. Uma única destas células, estimada em cerca de uma em 5.000 da população epitelial mamária total, mas mais concentrada dentro de uma população que expressa certos marcadores, pode proliferar indefinidamente e dar origem a uma glândula mamária completa com todos os seus tipos celulares epiteliais. Esta glândula reconstituída é capaz de prosseguir pelo programa de diferenciação completo necessário à produção de leite. Na primeira etapa que leva à produção do leite, os hormônios esteroides que circulam durante a gestação (estrógeno e progesterona) promovem a proliferação das células do ducto, aumentando seu número em várias centenas de vezes. Em um processo que depende da ativação local da via Wnt, as regiões terminais dos ductos crescem e se ramificam, formando pequenas bolsas dilatadas, ou

alvéolos, contendo células secretoras (**Figura 23-11**). A secreção do leite começa somente quando estas células são estimuladas pela combinação de diferentes hormônios circulantes no sangue da mãe após o nascimento do bebê, especialmente a prolactina da glândula hipófise (ou pituitária). A prolactina liga-se a receptores sobre a superfície das células epiteliais mamárias e, por isso, ativa uma via que ativa a expressão de genes de proteínas do leite. Como na epiderme, sinais da matriz extracelular, mediados por integrinas, também são essenciais: as células produtoras de leite só podem responder à prolactina se elas também estiverem em contato com a lâmina basal. Um outro nível de controle hormonal comanda a real ejeção do leite da mama: o estímulo de sucção faz com que as células do hipotálamo (no cérebro) liberem o hormônio *ocitocina*, que percorre a corrente sanguínea para agir sobre *células mioepiteliais*. Estas células musculares se originam da mesma população precursora epitelial das células secretoras da mama e têm uma teia de processos longos que envolvem os alvéolos. Em resposta à ocitocina, elas contraem, esguichando o leite dos alvéolos para dentro dos ductos.

Por fim, quando o bebê é desmamado e a amamentação cessa, as células secretoras morrem por apoptose, e a maior parte dos alvéolos desaparece. Rapidamente, os macrófagos fagocitam as células mortas, metaloproteinases da matriz degradam a matriz extracelular excedente e a glândula reverte ao seu estado de repouso. Esta finalização da lactação parece ser induzida pelo acúmulo de leite, ao invés de por um mecanismo hormonal. Se um grupo de ductos mamários é obstruído de modo que nenhum leite possa ser expelido, as células secretoras que o abastecem cometem suicídio em massa por apoptose, enquanto outras regiões da glândula sobrevivem e continuam a funcionar. A apoptose é desencadeada por uma combinação complexa de fatores que se acumulam onde a secreção de leite está bloqueada.

A divisão celular na glândula mamária em crescimento é regulada não somente por hormônios, mas também por sinais locais que passam entre as células dentro do epitélio e entre as células epiteliais e o tecido conectivo, ou *estroma*, no qual as células epiteliais estão infiltradas. Todos os sinais listados anteriormente como importantes no controle da renovação celular na epiderme também estão implicados em eventos que os controlam na glândula mamária. Novamente, os sinais liberados via integrinas desempenham um papel crucial: privadas das adesões de lâmina basal que ativam a sinalização por integrinas, as células epiteliais deixam de responder normalmente aos sinais hormonais. As falhas nesses sistemas de controle interativos são a base de algumas das formas mais comuns de câncer, e precisamos entendê-las melhor.

Resumo

A pele consiste em um tecido conectivo resistente, a derme, revestido por um epitélio estratificado impermeável, a epiderme. A epiderme é continuamente renovada a partir de células-tronco, com um tempo de renovação, em humanos, de cerca de um mês. Por definição, as células-tronco não estão diferenciadas definitivamente e têm a capacidade de se dividir ao longo do tempo de vida do organismo, produzindo algumas células-filhas que se diferenciam e outras que permanecem como células-tronco. As células-tronco da epiderme encontram-se na camada basal, presas à lâmina basal; sob condições normais, sua taxa de divisão é baixa. A progênie que se torna comprometida com a diferenciação passa por várias divisões amplificadoras transitórias rápidas na camada basal e, então, para de se dividir e desloca-se em direção à superfície da pele. Essas células diferenciam-se progressivamente, trocando da expressão de um grupo de queratinas para a expressão de outras até que, finalmente, seus núcleos degeneram, produzindo uma camada externa de células queratinizadas mortas que são continuamente descamadas da superfície.

O destino das filhas de uma célula-tronco é controlado por interações com a lâmina basal, mediadas por integrinas e por sinais das células vizinhas. Alguns tipos de células-tronco também podem ser programados internamente para se dividir assimetricamente de maneira a criar uma filha com característica de célula-tronco e uma filha comprometida com a diferenciação final; isso pode envolver segregação seletiva de fitas de DNA modelo "imortais" originais dentro da célula-tronco filha. Entretanto, os controles ambientais permitem que duas células-tronco sejam produzidas a partir de uma durante processos de reparo de ferimentos e podem desencadear etapas de aumentos na taxa de divisão de células-tronco. Fatores como as proteínas-sinal Wnt e Hedgehog regulam não somente a taxa de proliferação celular de acordo com o necessário, mas também podem dirigir a especializa-

ção de células epidérmicas para formar estruturas como folículos pilosos e glândulas sebáceas. Estes e outros órgãos ligados à epiderme, como as glândulas mamárias, têm suas próprias células-tronco e seu próprio padrão distinto de renovação celular. Nas mamas, por exemplo, os hormônios circulantes estimulam as células a proliferar, diferenciar-se e produzir leite; o término da amamentação desencadeia a morte por apoptose das células secretoras de leite, em resposta a uma combinação de fatores que se formam quando o leite deixa de ser drenado.

EPITÉLIO SENSORIAL

Nós sentimos os odores, os sons e as imagens do mundo externo por meio de uma outra classe de especializações do epitélio que cobre a superfície de nosso corpo. Os tecidos sensoriais do nariz, dos ouvidos e dos olhos – e, na realidade, se observarmos a origem dos tecidos no embrião, os do sistema nervoso central inteiro – todos surgem do mesmo folheto de células, o *ectoderma*, que dá origem à epiderme. Essas estruturas têm várias características em comum, e seu desenvolvimento é comandado por sistemas de genes afins (discutido no Capítulo 22). Todas conservam uma organização epitelial, mas que é muito diferente daquela da epiderme ou das glândulas derivadas dela.

O nariz, o ouvido e o olho são órgãos complexos, com dispositivos elaborados para coletar sinais do meio externo e distribuí-los, filtrados e concentrados, para o epitélio sensorial, onde podem atuar sobre o sistema nervoso. O epitélio sensorial em cada órgão é o componente-chave, embora seja pequeno em relação a todo o aparelho auxiliar. Ele é a parte que tem sido mais altamente conservada durante a evolução, não apenas de um vertebrado para outro, mas também entre vertebrados e invertebrados.

Dentro de cada epitélio sensorial encontram-se células sensoriais que atuam como *transdutores*, convertendo sinais do meio externo em um potencial elétrico que o sistema nervoso pode interpretar. No nariz, os transdutores sensoriais são *neurônios sensoriais olfatórios*; no ouvido, *células pilosas auditivas*; e no olho, *fotorreceptores*. Todos esses tipos celulares são neurônios ou células semelhantes a neurônios (células neuroepiteliais). Cada um possui em sua extremidade apical uma estrutura especializada que detecta o estímulo externo e o converte em uma modificação no potencial de membrana. Em sua extremidade basal, cada um faz sinapses com neurônios que retransmitem a informação sensorial para locais específicos no cérebro.

Os neurônios sensoriais olfatórios são continuamente substituídos

No epitélio olfatório do nariz (**Figura 23-12**A), um subgrupo de células epiteliais se diferencia como **neurônios sensoriais olfatórios**. Essas células têm cílios imóveis, modificados na sua superfície livre (ver Figura 15-46), contendo proteínas receptoras de odor, e um único axônio que se estende de sua extremidade basal em direção ao cérebro (Figura 23-12B). *Células de sustentação* que se estendem pelo epitélio engrossado e têm propriedades semelhantes àquelas das células da glia no sistema nervoso central mantêm os neurônios no lugar

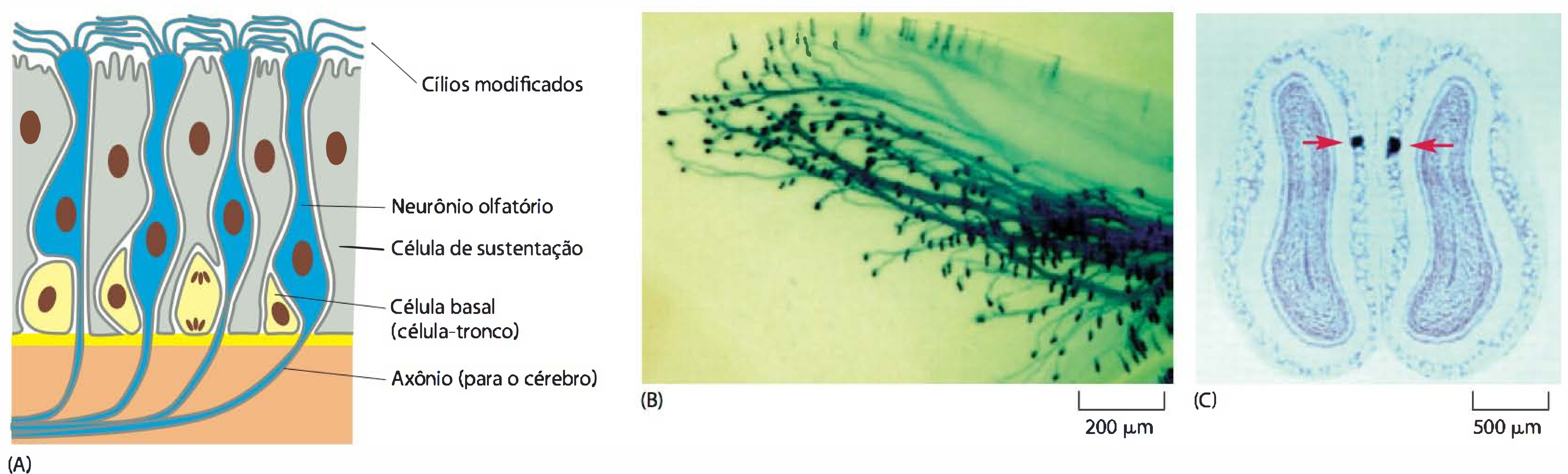


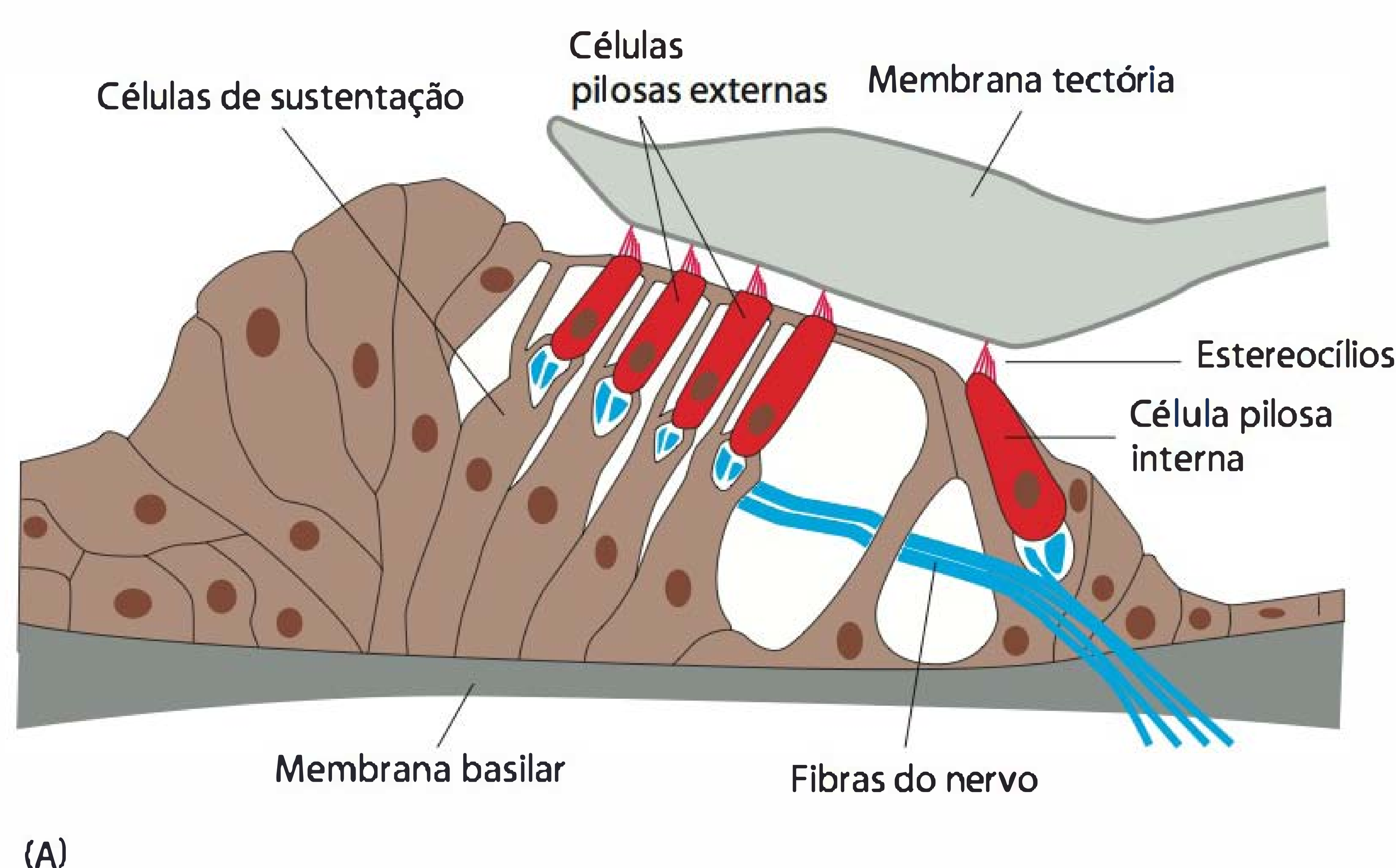
Figura 23-12 Epitélio olfatório e neurônios olfatórios. (A) O epitélio olfatório consiste em células de sustentação, em células basais e em neurônios sensoriais olfatórios. As células basais são as células-tronco para a produção de neurônios olfatórios. Seis a oito cílios modificados se projetam do ápice do neurônio olfatório e contêm os receptores de odor. (B) Esta fotomicrografia mostra neurônios olfatórios no nariz de um camundongo geneticamente modificado no qual o gene LacZ foi inserido no lócus de um receptor de odor; assim, todas as células que normalmente expressariam este receptor específico agora também produzem a enzima β-galactosidase. A β-galactosidase é detectada pelo produto azul da reação enzimática que ela catalisa. Os corpos celulares (azul-escuro) dos neurônios olfatórios marcados, que se encontram dispersos no epitélio olfatório, enviam seus axônios (azul-claro) em direção ao cérebro (fora do desenho à direita). (C) Um corte transversal dos bulbos olfatórios esquerdo e direito, corados para β-galactosidase. Os axônios de todos os neurônios olfatórios que expressam o mesmo receptor de odor convergem para os mesmos glomérulos (setas vermelhas) localizados simetricamente dentro dos bulbos nos lados direito e esquerdo do cérebro. Outros glomérulos (não-corados) recebem seus impulsos de neurônios olfatórios que expressam outros receptores de odor. (B e C, de P. Mombaerts et al., Cell 87:675-686, 1996. Com permissão de Elsevier.)

e separados uns dos outros. As superfícies sensoriais são mantidas úmidas e protegidas por uma camada de fluido secretado por células sequestradas em glândulas que se comunicam com a superfície exposta. Entretanto, mesmo com esta proteção, cada neurônio olfatório sobrevive apenas por um mês ou dois e, assim, uma terceira classe de células – as *células basais* – está presente no epitélio para produzir substitutos para os neurônios olfatórios que são perdidos. A população de células basais, situadas em contato com a lâmina basal, inclui células-tronco para a produção dos neurônios.

Como foi discutido no Capítulo 15, o genoma contém um número extraordinariamente grande de genes de receptores de odor – cerca de 1.000 em um camundongo ou um cão, e cerca de 350 (mais muitos outros que estão degenerados e não-funcionais) em um humano. Cada neurônio olfatório expressa, muito provavelmente, apenas um desses genes, habilitando a célula a responder a uma classe específica de odores (geralmente moléculas orgânicas pequenas) que compartilham alguma característica estrutural que a proteína receptora de odor reconheça. Contudo, não importa qual seja o odor, cada neurônio olfatório responde da mesma forma – ele envia uma série de potenciais de ação ao longo do seu axônio para o cérebro. Essa sensibilidade discriminadora de um neurônio olfatório individual, portanto, só é útil se o seu axônio envia sua mensagem ao centro específico de retransmissão no cérebro que é dedicado à gama específica de odores que o neurônio sente. Esses centros de retransmissão são chamados de *glomérulos*. Estão localizados em estruturas chamadas de bulbos olfatórios (um de cada lado do cérebro), com cerca de 1.800 glomérulos em cada bulbo (no camundongo). Os neurônios olfatórios que expressam o mesmo receptor de odor estão dispersos por todo o epitélio olfatório, mas todos os seus axônios convergem para o mesmo glomérulo (Figura 23-12C). À medida que novos neurônios olfatórios são produzidos, substituindo aqueles que morrem, eles devem por sua vez enviar seus axônios para o glomérulo certo. Assim, as proteínas receptoras de odor têm uma segunda função: direcionam as extremidades em crescimento dos novos axônios ao longo do caminho específico para os glomérulos-alvo apropriados nos bulbos olfatórios. Se não fosse pelo funcionamento contínuo deste sistema de orientação, em um mês uma rosa poderia cheirar como um limão e, no próximo, como um peixe podre.

As células pilosas auditivas têm de durar a vida toda

O epitélio sensorial responsável pela audição está organizado da forma mais precisa e minuciosa entre todos os tecidos no corpo (**Figura 23-13**). Suas células sensoriais, as **células pilosas auditivas**, estão retidas em uma estrutura rígida de células de sustentação e cobertas por uma massa de matriz extracelular (a membrana tectória), em uma estrutura chamada de *órgão de Corti*. As células pilosas convertem estímulos mecânicos em sinais elétricos. Cada uma tem um arranjo característico em forma de órgão de tubos de microvilosidades gigantes (chamadas de *estereocílios*) que se sobressaem de sua superfície como bastões rígidos, preenchidos com uma trama de filamentos de actina, e dispostos em fileiras por ordem de altura. As dimensões de cada uma destas fileiras são especificadas com uma exatidão extraordinária, de acordo com a localização da célula pilosa no ouvido e a frequência de som à qual ela tem que responder. As vibrações sonoras balançam o órgão de Corti, fazendo o feixe de estereocílios inclinar (**Figura 23-14**) e, mecanicamente, abrir ou fechar canais de íons na



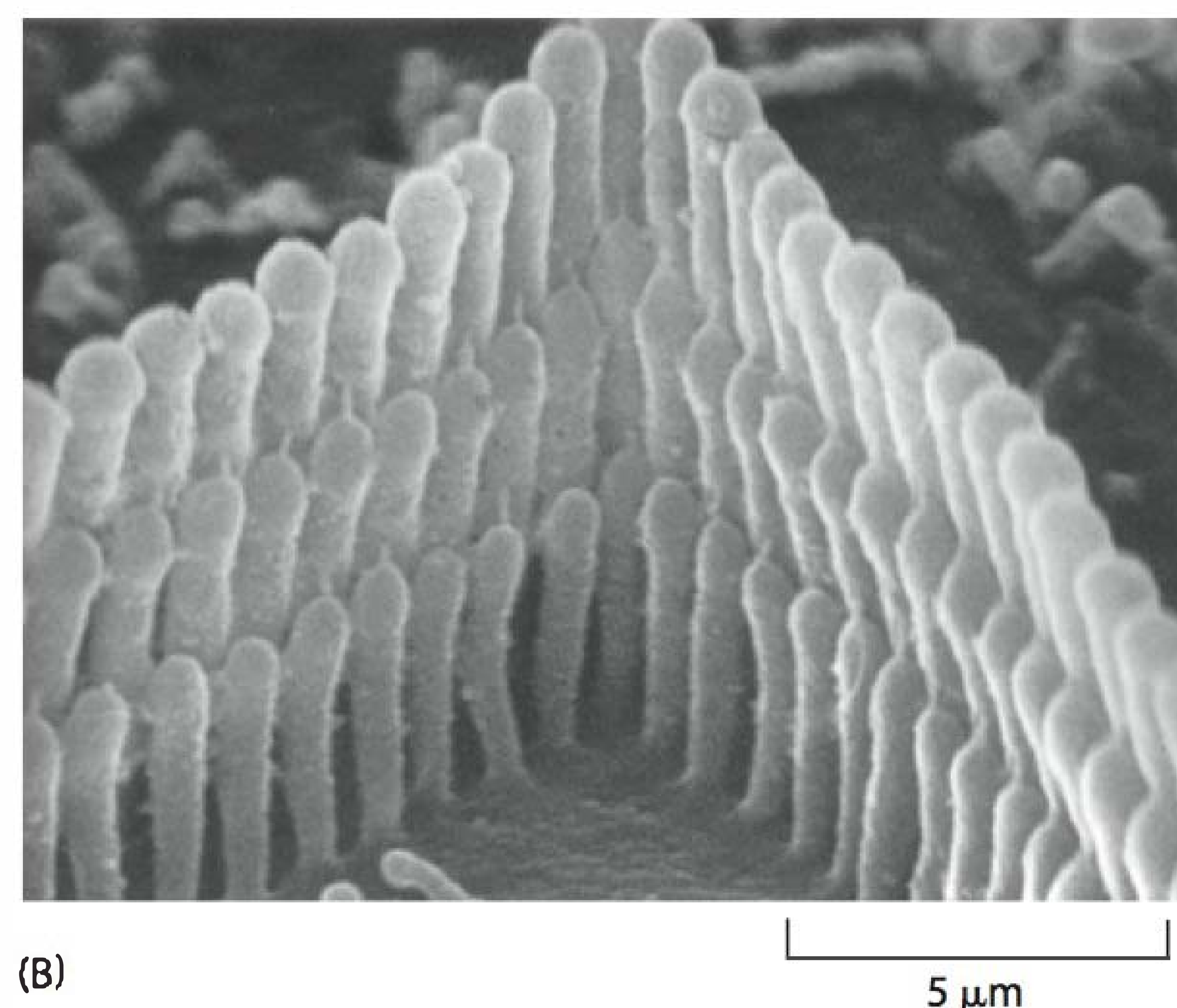


Figura 23-13 Células pilosas auditivas. (A) Um corte transversal esquemático do aparelho auditivo (o órgão de Corti) no ouvido interno de um mamífero mostra as células pilosas auditivas sustentadas em uma elaborada estrutura epitelial de células de sustentação e cobertas por uma massa de matriz extracelular (a membrana tectória). O epitélio que contém as células pilosas assenta-se sobre a membrana basilar – um folheto de tecido fino e elástico que forma um tabique longo e estreito de separação entre dois canais preenchidos de fluido. O som provoca ondas de pressão nestes canais e faz a membrana basilar vibrar para cima e para baixo. (B) Esta eletromicrografia de varredura mostra a superfície apical de uma célula pilosa auditiva externa, com o arranjo característico em forma de órgão de tubos de microvilosidades gigantes (estereocílios). As células pilosas internas, das quais há somente 3.500 em cada ouvido humano, são os principais receptores auditivos. Acredita-se que as células pilosas externas, aproximadamente quatro vezes mais numerosas, formem parte de um mecanismo de retroalimentação que regula o estímulo mecânico liberado para as células pilosas internas. (B, de J. D. Pickles, Prog. Neurobiol. 24:1-42, 1985. Com permissão de Elsevier.)

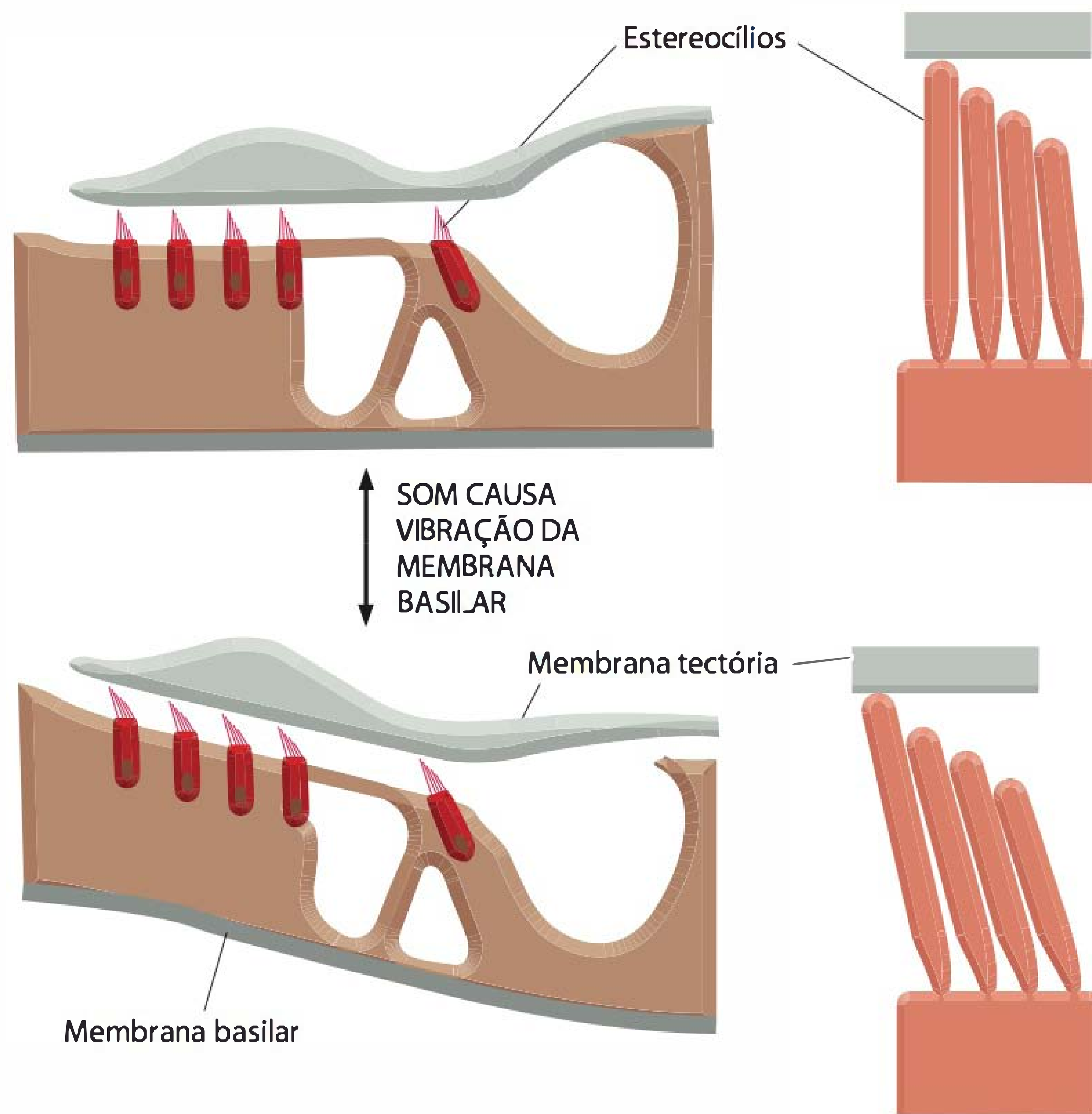


Figura 23-14 Como um movimento relativo da matriz extracelular que recobre os estereocílios (a membrana tectória) inclina os estereocílios das células pilosas auditivas no órgão de Corti, no ouvido interno de um mamífero. Os estereocílios comportam-se como bastões rígidos, dobráveis na base e formando um feixe nas pontas.

membrana dos estereocílios (**Figura 23-15**). O fluxo de cargas elétricas transportado para dentro da célula pelos íons altera o potencial de membrana e, desse modo, controla a liberação de neurotransmissores na porção basal da célula, onde a célula faz sinapse com uma terminação nervosa.

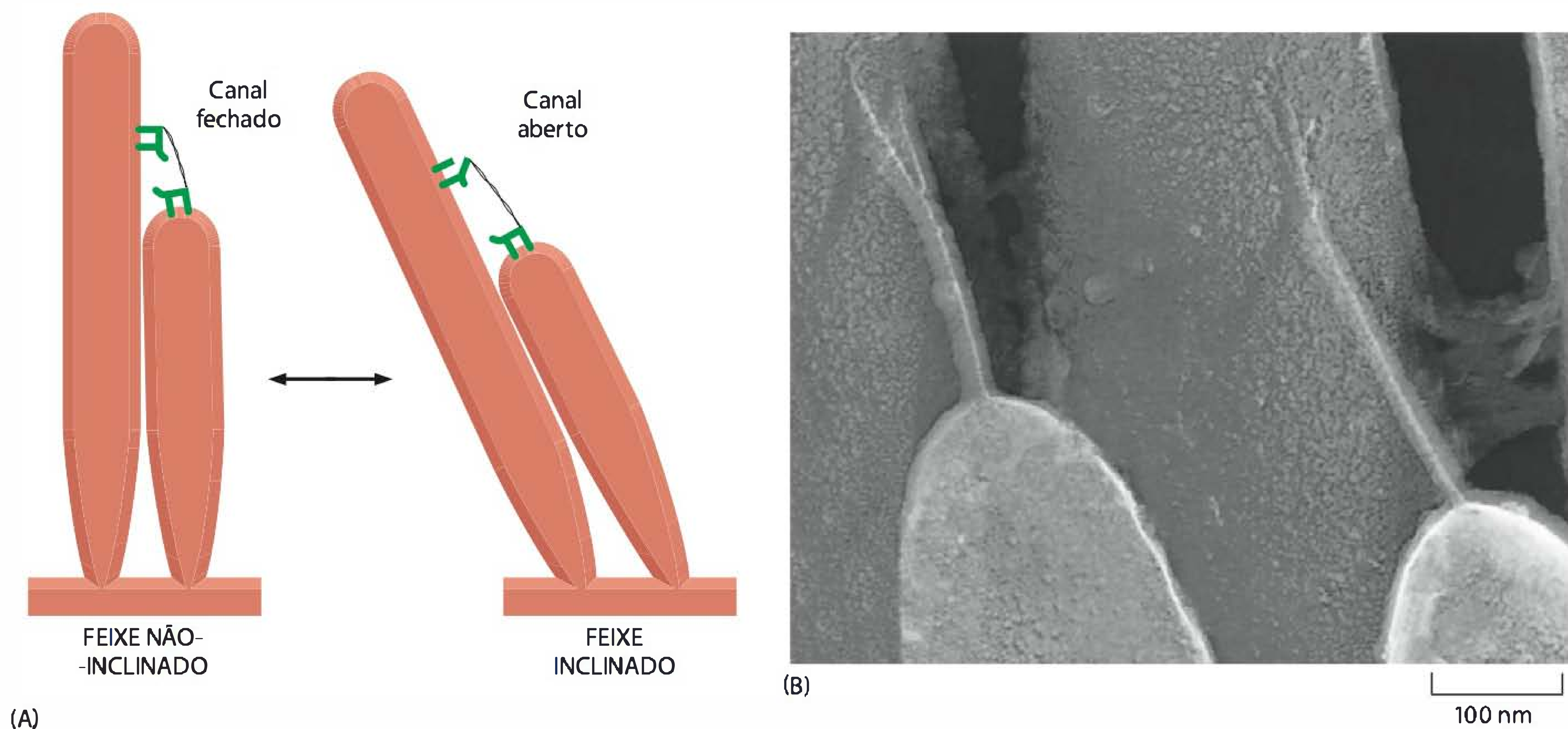


Figura 23-15 Como funciona uma célula pilosa sensorial. (A) A célula funciona como um transdutor, gerando um sinal elétrico em resposta às vibrações sonoras que balançam o órgão de Corti e, assim, fazem os estereocílios inclinarem-se. Um filamento fino passa mais ou menos verticalmente por cima da ponta de cada estereocílio menor para ligá-lo a um ponto mais elevado em seu vizinho adjacente mais alto. A inclinação do feixe faz tensão sobre os filamentos, que distendem mecanicamente o "portão" dos canais de íons na membrana dos estereocílios. A abertura desses canais permite um influxo de carga positiva, despolarizando a célula pilosa. (B) Uma eletromicrografia dos filamentos que se estendem do alto de dois estereocílios. Cada filamento consiste, ao menos em parte, em membros de moléculas de adesão célula-célula da superfamília das caderinas. Indivíduos mutantes que carecem destas caderinas específicas não têm os filamentos e são surdos.

Por medidas automáticas extraordinariamente delicadas, correlacionadas a registros elétricos de uma única célula pilosa quando o feixe de estereocílios é desviado pelo toque com uma sonda de vidro flexível, é possível detectar um "ceder" extra do feixe, produzido mecanicamente pela força aplicada, e os canais puxados são abertos. Dessa maneira, pode ser mostrado que a força necessária para abrir um único desses canais hipotéticos é de cerca de 2×10^{-13} newtons e que seu "portão" se move a uma distância de cerca de 4 nm quando ele se abre. O mecanismo é espantosamente sensível: calcula-se que os sons mais fracos que podemos ouvir estendem os filamentos por uma média de 0,04 nm, o que está quase abaixo da metade do diâmetro de um átomo de hidrogênio. (B, de B. Kachar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:13336-13341, 2000. Com permissão da National Academy of Sciences.)

Nos humanos e em outros mamíferos, as células pilosas auditivas, ao contrário dos neurônios olfatórios, têm que durar a vida toda. Caso sejam destruídas por doenças, toxinas ou ruído excessivamente alto, elas não são regeneradas, e a perda de audição resultante é permanente. Porém, em outros vertebrados, quando células pilosas auditivas são destruídas, as células de sustentação são acionadas para que se dividam e comportem-se como células-tronco, gerando uma progênie de células que podem se diferenciar como substitutas das células pilosas que foram perdidas. Com melhor compreensão de como este processo de regeneração é regulado, um dia poderemos ser capazes de induzir o epitélio auditivo a se recuperar por si próprio também em humanos.

Até aqui, é conhecido um tratamento que pode produzir a regeneração parcial das células pilosas auditivas em um mamífero adulto. A técnica utiliza um vírus (um adenovírus) construído para conter uma cópia do gene *Atoh1*, que codifica para uma proteína reguladora de gene conhecida por guiar a diferenciação de células pilosas durante o desenvolvimento. Porquinhos da Índia que foram ensurdecidos por exposição a uma toxina que destrói células pilosas podem ser tratados por injeções com esta construção viral dentro do ouvido lesionado. Então, muitas das células de sustentação sobreviventes tornam-se infectadas com a construção viral e expressam *Atoh1*. Isto as converte em células pilosas funcionais, e o animal recupera parcialmente sua audição no ouvido tratado.

A maioria das células permanentes renova suas partes: as células fotorreceptoras da retina

A retina neural é o mais complexo dos epitélios sensoriais. Ela consiste em várias camadas de células organizadas de uma maneira que parece insensata. Os neurônios que transmitem sinais do olho para o cérebro (chamados de *células ganglionares da retina*) encontram-se mais próximos do mundo externo, de modo que a luz, focada pela lente, deve passar através deles para atingir as células fotorreceptoras. Os **fotorreceptores**, que são classificados como *cones* ou *bastonetes*, de acordo com sua forma, ficam com suas extremidades fotorreceptoras, ou segmentos externos, parcialmente embutidas no *epitélio pigmentar* (**Figura 23-16**). Os bastonetes e os cones contêm diferentes *pigmentos visuais* – complexos fotossensíveis da proteína *opsina* com molécula *retinal*, uma molécula pequena que absorve luz. Os bastonetes, nos

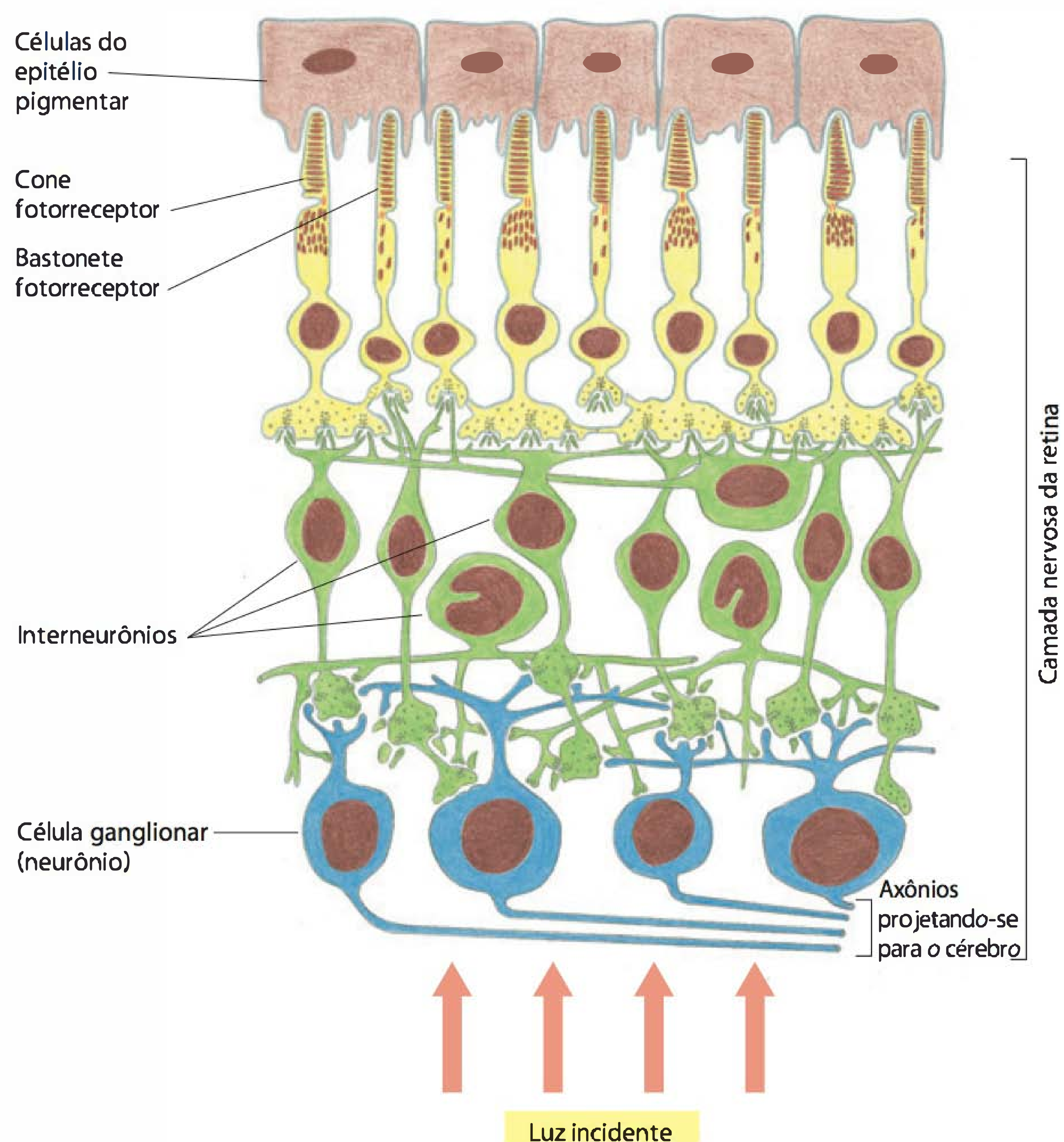


Figura 23-16 A estrutura da retina. Quando a luz estimula os fotorreceptores, o sinal elétrico resultante é retransmitido via interneurônios para as células ganglionares, que, então, transportam o sinal para o cérebro. Uma população de células de sustentação especializadas (não-mostradas aqui) ocupa os espaços entre os neurônios e os fotorreceptores na retina nervosa. (Modificada de J. E. Dowling e B. B. Boycott, Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 166:80-111, 1966. Com permissão da Royal Society.)

quais o pigmento visual é chamado de *rodopsina*, são especialmente sensíveis a níveis baixos de luz, enquanto os cones (dos quais há três tipos em humanos, cada um com uma opsina diferente, originando uma resposta de espectro diferente) detectam cores e detalhes precisos.

O segmento externo de um fotorreceptor parece ser um cílio modificado com um arranjo de microtúbulos característico de cílio na região conectando o segmento externo ao resto da célula (**Figura 23-17**). O restante do segmento externo está quase inteiramente preenchido com uma pilha densa de membranas (discos membranosos) na qual os complexos fotossensíveis estão embebidos; a luz absorvida aqui produz uma resposta elétrica, como discutido no Capítulo 15. Em suas extremidades opostas, os fotorreceptores formam sinapses em interneurônios, os quais retransmitem o sinal para as células ganglionares da retina (ver Figura 23-16).

Nos humanos, os fotorreceptores, como as células pilosas auditivas humanas, são células permanentes que não se dividem e não são substituídas se destruídas por doenças ou por raio *laser* mal-direcionado. Entretanto, as moléculas fotossensíveis de pigmento visual não são permanentes, mas são continuamente degradadas e substituídas. Nos bastonetes (embora, curiosamente, não nos cones), esta renovação está organizada em uma linha de produção ordenada, que pode ser analisada seguindo a passagem de moléculas de proteína marcadas radiativamente através da célula, após um pulso breve de aminoácido radiativo (**Figura 23-18**). As proteínas marcadas radiativamente podem ser seguidas desde o aparelho de Golgi, no segmento interno da célula, até a base da pilha de discos membranosos no segmento externo. Daí elas são gradualmente deslocadas em direção à extremidade apical, na forma de material novo que é incorporado na base da pilha de discos. Por fim (após cerca de dez dias, no rato), quando alcançam a extremidade apical do segmento externo, as proteínas marcadas e as camadas de membrana nas quais elas estão embebidas são fagocitadas (captadas e digeridas) pelas células do epitélio pigmentar.

Este exemplo ilustra um ponto geral: mesmo que células individuais de certos tipos celulares persistam, pouco do organismo adulto consiste nas mesmas moléculas que foram estabelecidas no embrião.

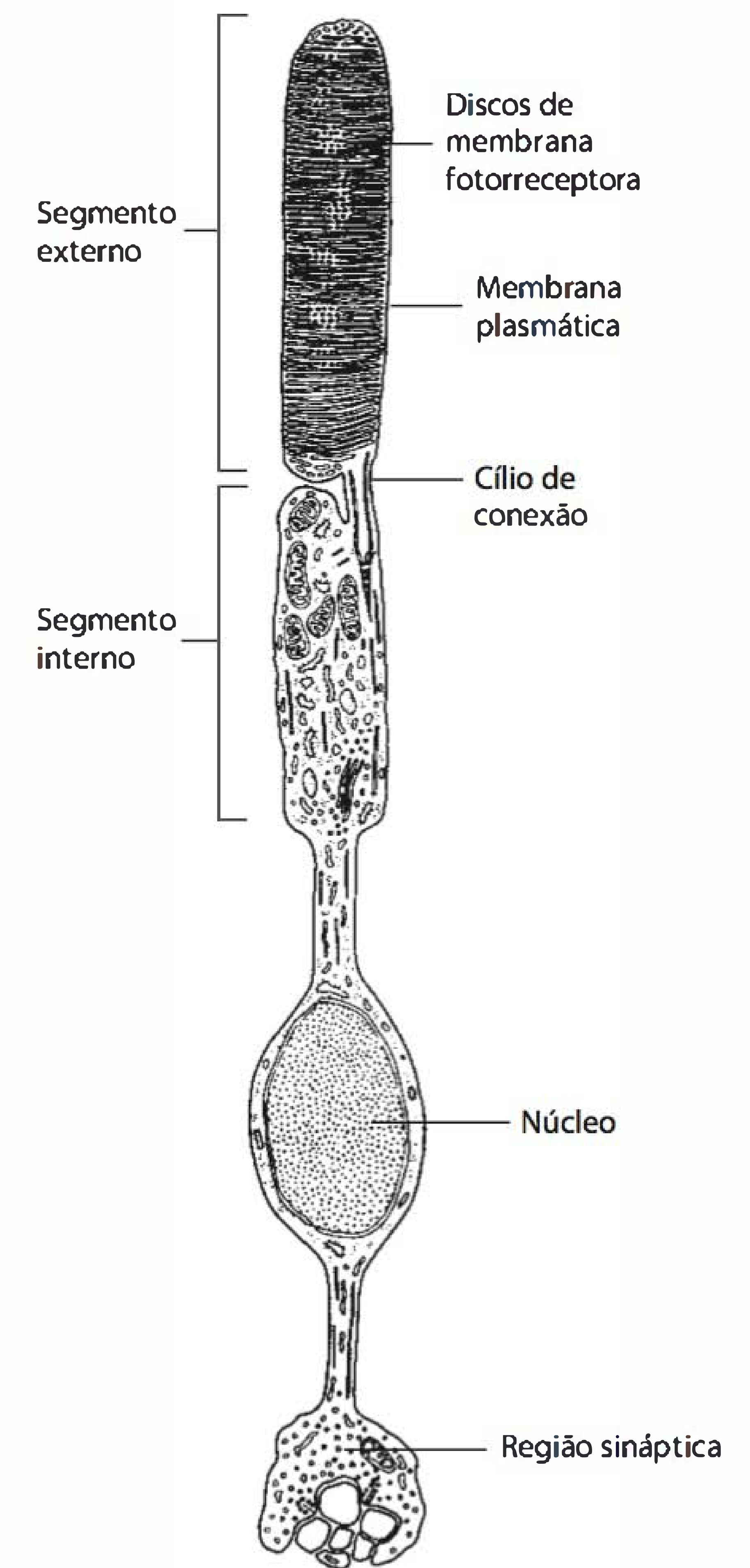


Figura 23-17 Um bastonetefotorreceptor.

Resumo

A maioria das células receptoras sensoriais, como as células da epiderme e as células nervosas, deriva do epitélio que forma a superfície externa do embrião. Elas convertem estímulos externos em sinais elétricos, que elas retransmitem para neurônios por meio de sinapses químicas. As células receptoras olfatórias no nariz são neurônios treinados, que enviam seus axônios para o cérebro. Elas têm um tempo de vida de apenas um ou dois meses, e são continuamente substituídas por

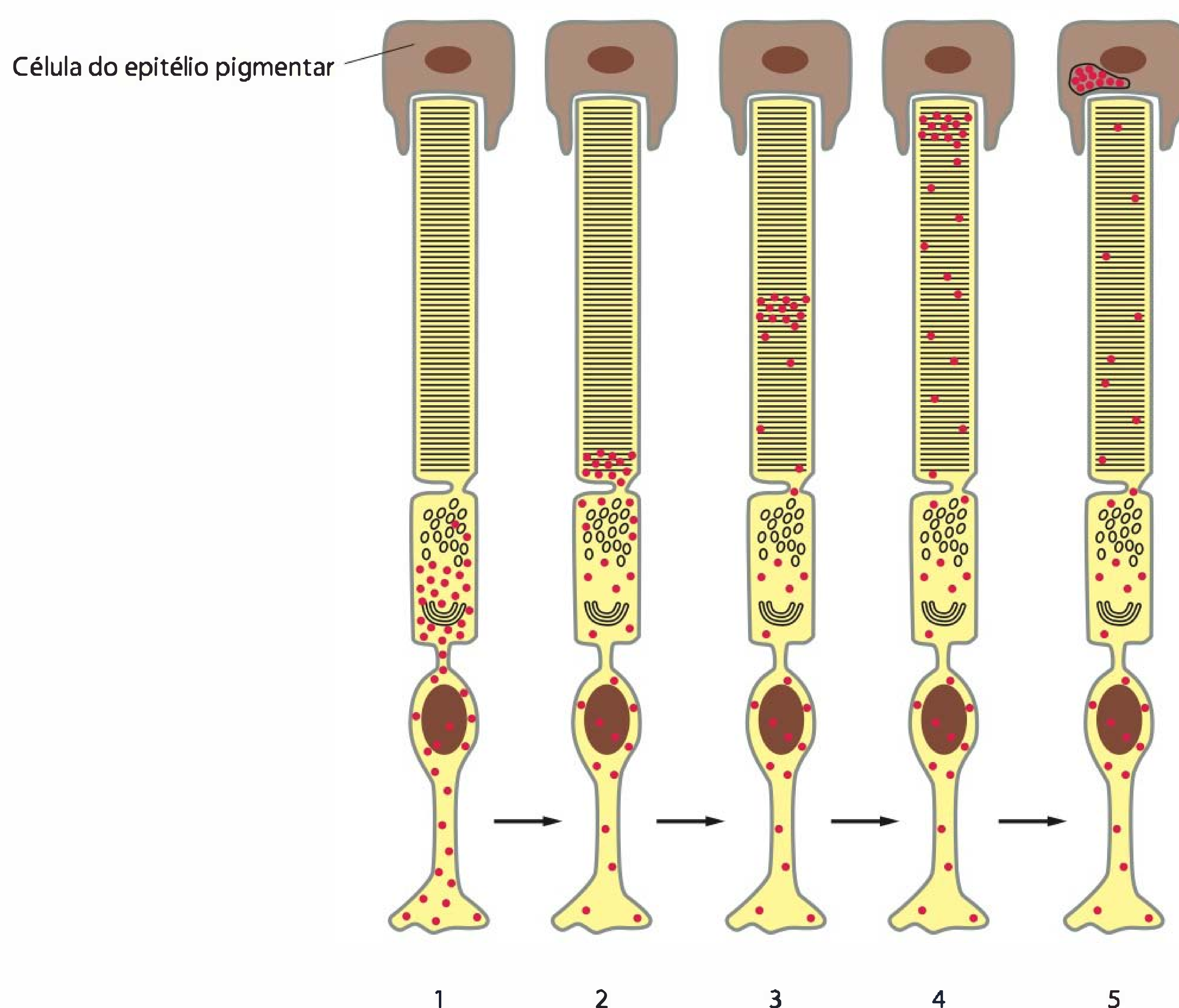


Figura 23-18 Renovação de proteína de membrana em um bastonete. Após um pulso de H3-leucina, a passagem de proteínas marcadas radiativamente através da célula é acompanhada por autorradiografia. Os pontos vermelhos indicam locais de radiatividade. O método revela somente a H3-leucina que tenha sido incorporada em proteínas; o restante é retirado por lavagem durante a preparação do tecido. (1) A leucina incorporada é vista primeiro, concentrada nas vizinhanças do aparelho de Golgi. (2) Daí ela passa para a base do segmento externo em um disco de membrana fotorreceptora recém-sintetizado. (3-5) Novos discos são formados em uma taxa de três ou quatro por hora (em um mamífero), deslocando os discos mais velhos em direção ao epitélio pigmentar.

novas células derivadas de células-tronco no epitélio olfatório. Cada neurônio olfatório expressa apenas uma das centenas de diferentes proteínas olfatórias receptoras para as quais existem genes no genoma, e os axônios de todos os neurônios olfatórios que expressam a mesma proteína receptora navegam para os mesmos glomérulos nos bulbos olfatórios do cérebro.

As células pilosas auditivas – as células receptoras do som – ao contrário das células receptoras olfatórias, têm que durar por toda a vida, pelo menos em mamíferos, embora a expressão artificial de um gene de diferenciação de células pilosas, Atoh1, possa converter células de sustentação funcionais em células pilosas no local onde estas células tenham sido destruídas. As células pilosas não têm axônios, mas fazem contato sináptico com terminações de nervos no epitélio auditivo. Elas têm esse nome em função do feixe de estereocílios (microvilosidades gigantes) semelhantes a pelos sobre a sua superfície externa. As vibrações sonoras inclinam o feixe, distendendo mecanicamente os "portões" de canais de íon sobre os estereocílios em uma configuração aberta para excitar eletricamente a célula.

As células fotorreceptoras na retina do olho absorvem fótons em moléculas de pigmento visual (proteína opsina mais retinal) mantidas em pilhas de discos membranosos nos segmentos externos dos fotorreceptores, disparando uma excitação elétrica pela via mais indireta de sinalização intracelular. Embora as células fotorreceptoras sejam elas próprias permanentes e insubstituíveis, os discos membranosos ricos em opsina que elas contêm sofrem renovação contínua.

AS VIAS AÉREAS E O INTESTINO

Os exemplos que discutimos até agora representam uma pequena seleção de tipos de tecidos e de células que derivam do folheto externo do embrião – o ectoderma. Entretanto, eles são suficientes para ilustrar o quão diferentes estas células podem ser com relação à forma, à função, ao modo de vida e ao padrão de substituição. O folheto mais interno do embrião – o *endoderma*, que forma o tubo digestivo primitivo – dá origem a outra população inteira de tipos celulares que revestem o sistema digestivo e seus órgãos acessórios. Começamos com os pulmões.

Os tipos celulares adjacentes colaboram nos alvéolos dos pulmões

As vias aéreas dos pulmões são formadas por ramificações repetidas de um sistema de tubos que se originam no embrião de uma evaginação em forma de bolsa (divertículo) do revestimento do intestino, como discutido no Capítulo 22 (ver Figura 22-92). As repetidas fileiras de ramificações terminam em várias centenas de milhares de sacos cheios de ar – os **alvéolos**. Os alvéolos têm paredes finas, intimamente justapostas às paredes dos capilares sanguíneos, de modo a permitir a troca de O_2 e de CO_2 com a corrente sanguínea (**Figura 23-19**).

Para sobreviver, as células que revestem os alvéolos devem permanecer úmidas. Ao mesmo tempo, elas devem servir como um balão de gás que pode expandir e contrair a cada inspirar e expirar. Isso cria um problema. Quando duas superfícies molhadas se tocam, elas tornam-se aderidas uma à outra pela tensão na superfície da camada de água entre elas – um efeito que exerce influência mais forte quanto menor a proporção da estrutura. Portanto, há um risco de que os alvéolos possam colapsar e ser impossível reexpandirem. Para solucionar o problema, dois tipos de células estão presentes no revestimento dos alvéolos. As *células alveolares tipo I* (ou *pneumócitos tipo I*) recobrem a maior parte da parede: elas são delgadas e planas (pavimentosas) para permitir a troca gasosa. As *células alveolares tipo II* (*ou pneumócitos tipo II*) estão distribuídas entre elas; estas são cúbicas e secretam *surfactante*, um material rico em fosfolipídeo, que forma um filme de interface sobre as superfícies de água livre e reduz a tensão superficial, tornando fácil a reexpansão dos alvéolos, mesmo que eles colapsem. A produção de quantidades adequadas de surfactante no feto, que inicia em torno dos cinco meses de gestação nos humanos, marca o início da possibilidade de vida independente. Os bebês prematuros que nascem antes desse estágio são incapazes de encher seus pulmões de ar e respirar; aqueles que nascem depois disso podem fazê-lo e, com cuidados intensivos, podem sobreviver.

Células caliciformes, células ciliadas e macrófagos colaboram para manter as vias aéreas limpas

Nas vias aéreas superiores encontramos diferentes combinações de tipos celulares, que servem a diferentes propósitos. O ar que respiramos está cheio de poeira, sujeira e micro-orga-

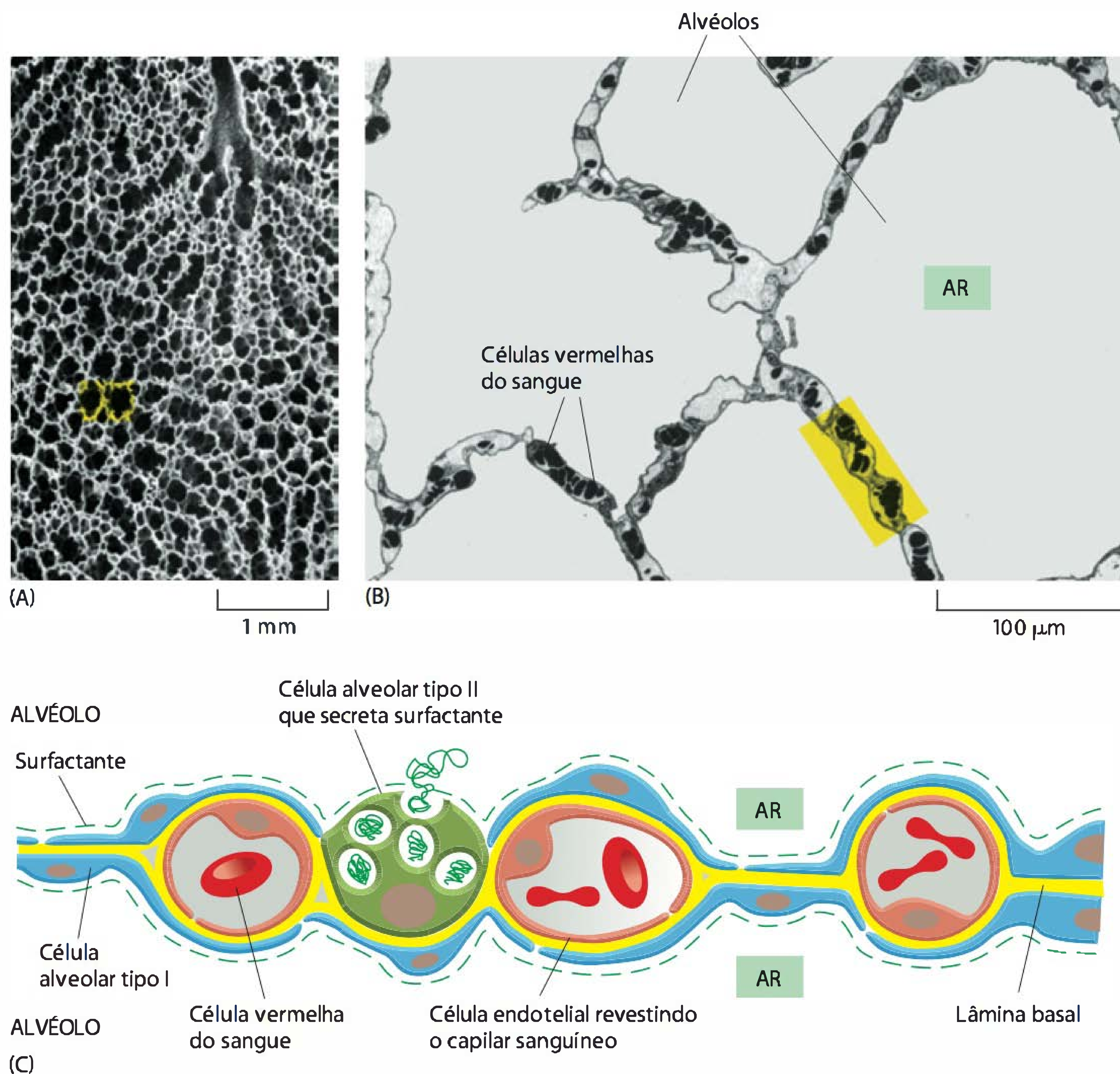


Figura 22-19 Alvéolos no pulmão. (A) Eletromicrografia de varredura em baixa magnitude, mostrando a textura esponjosa criada pelos inúmeros alvéolos cheios de ar. Um bronquíolo (via aérea tubular pequena) é visto na parte superior, comunicando-se com os alvéolos. (B) Eletromicrografia de transmissão de um corte transversal da região que corresponde ao quadro amarelo em (A), mostrando as paredes alveolares, onde ocorre a troca gasosa. (C) Esquema da arquitetura celular de uma parte da parede alveolar, que corresponde ao quadro amarelo em (B). (A, de P. Gehr et al., Respir. Physiol. 44:61-86, 1981. Com permissão de Elsevier; B, cortesia de Peter Gehr, de D. W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12th ed. New York: Chapman and Hall, 1994.)

nismos em suspensão. Para manter os pulmões limpos e saudáveis, esses materiais devem ser removidos constantemente. Para desempenhar essa tarefa, um *epitélio respiratório* relativamente espesso reveste as vias aéreas mais amplas (**Figura 23-20**). Este epitélio consiste em três tipos celulares diferenciados: *células caliciformes* (assim chamadas por causa de sua forma), que secretam muco; *células ciliadas*, com cílios móveis; e um pequeno número de *células endócrinas*, que secretam serotonina e peptídeos que atuam como mediadores locais. Estas moléculas-sinal afetam terminações nervosas e outras células vizinhas no trato respiratório, de modo a ajudar na regulação da taxa de secreção de muco e batimento ciliar, na contração das células musculares circundantes que podem fazer a constrição das vias aéreas, e em outras funções. As células basais também estão presentes e servem como células-tronco para a renovação do epitélio.

O muco secretado pelas células caliciformes forma uma cobertura visco-elástica de cerca de 5 μm de espessura sobre a porção superior dos cílios. Os cílios, todos batendo na mesma direção, a uma taxa de cerca de 12 batimentos por segundo, removem o muco dos pulmões, levando consigo os detritos que tenham ficado aderidos a ele. Esta esteira rolante para a remoção de lixo dos pulmões é chamada de *escada rolante mucociliar*. Com certeza, algumas partículas inaladas podem atingir os alvéolos, onde não há esta escada rolante. Aqui, o material indesejado é removido por uma outra classe de células especializadas, os *macrófagos*, que percorrem os pulmões, fagocitando materiais estranhos e matando e digerindo bactérias. Muitos milhões de macrófagos, carregados com detritos, são removidos dos pulmões a cada hora na escada rolante mucociliar.

Na extremidade superior do sistema respiratório, o epitélio respiratório úmido coberto de muco passa abruptamente a epitélio pavimentoso estratificado. Este folheto celular está estruturado para resistência mecânica e proteção e, como a epiderme, ele consiste em muitas camadas de células achatadas, densamente envoltas por queratina. Difere da epiderme porque é mantido úmido, e suas células retêm os núcleos, mesmo nas camadas mais externas. Limites abruptos de especializações celulares epiteliais, como aqueles entre a mucosa e o epitélio pavimentoso estratificado do trato respiratório, também são encontrados em outras partes do corpo, mas pouco se sabe sobre como eles são criados e mantidos.

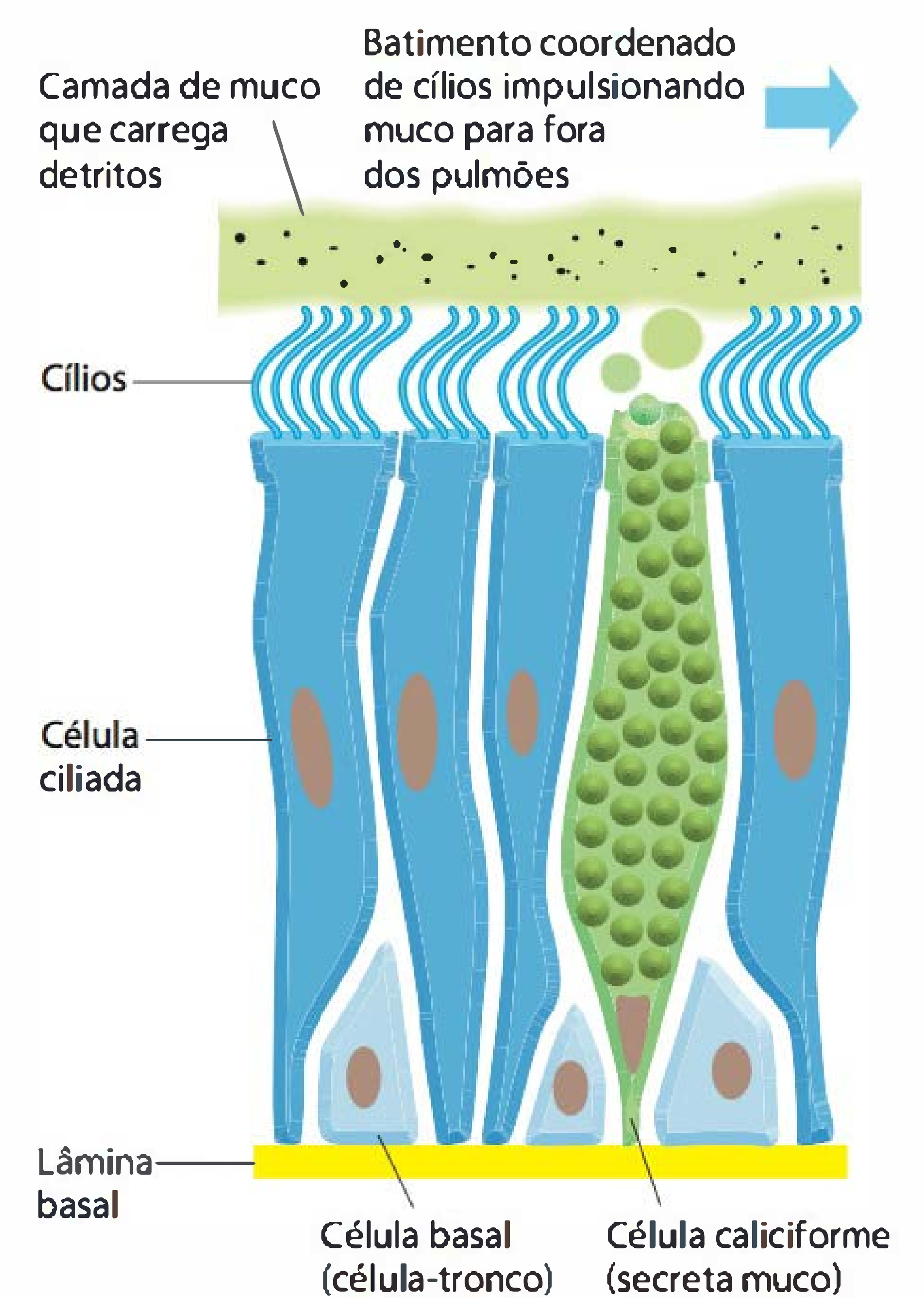


Figura 23-20 Epitélio respiratório. As células caliciformes secretam o muco, que forma uma cobertura sobre as extremidades das células ciliadas. O batimento regular e coordenado dos cílios impulsiona o muco para cima e para fora das vias aéreas, levando qualquer detrito que esteja aderido a ele. O mecanismo que coordena o batimento ciliar é um mistério, mas ele parece refletir uma polaridade intrínseca no epitélio. Se um segmento da traqueia de coelho é invertido cirurgicamente, ele continua removendo muco, mas na direção errada, recuando em direção ao pulmão, em oposição às porções adjacentes não-invertidas da traqueia.

O revestimento do intestino delgado renova a si mesmo mais rápido que qualquer outro tecido

Somente os vertebrados que respiram o ar têm pulmões, mas todos os vertebrados, e quase todos os animais invertebrados, têm um intestino – isto é, um tubo digestivo revestido com células especializadas para a digestão do alimento e a absorção das moléculas nutrientes liberadas pela digestão. Essas duas atividades são difíceis de gerenciar ao mesmo tempo, pois os processos que digerem alimento no lúmen do intestino são suscetíveis de digerir também o revestimento do próprio intestino, incluindo as células que absorvem os nutrientes. O intestino utiliza várias estratégias para resolver o problema.

Os processos digestivos mais intensos, que envolvem hidrólise ácida, assim como ação enzimática, são realizados em um compartimento de reação separado, o estômago. Os produtos então são passados para o intestino delgado, onde os nutrientes são absorvidos e a digestão enzimática continua, mas em um pH neutro. As regiões diferentes do revestimento do intestino consistem em diferentes misturas de tipos celulares. O epitélio do estômago inclui células que secretam ácido e outras células que secretam enzimas digestivas que funcionam em pH ácido. Inversamente, as glândulas (em particular o pâncreas) que desembocam dentro do segmento inicial do intestino delgado contêm células que secretam bicarbonato, para neutralizar a acidez, e outras células que secretam enzimas digestivas que atuam em pH neutro. O revestimento do intestino, abaixo do estômago, contém tanto células absortivas como células especializadas na secreção de muco, que recobre o epitélio com uma camada protetora. Também no estômago, as superfícies mais expostas são revestidas com células mucosas. E, no caso dessas medidas não serem suficientes, o revestimento inteiro do estômago e do intestino é renovado e substituído continuamente por células recentemente produzidas, com uma taxa de renovação de uma semana ou menos.

O processo de renovação tem sido melhor estudado no intestino delgado (**Figura 23-21**). O revestimento do intestino delgado (e da maioria das outras regiões do intestino) é um epitélio de uma única camada. Este epitélio recobre as superfícies das *vilosidades* que se projetam em direção ao lúmen e reveste as *criptas* que descem em direção ao tecido conectivo subjacente. As células-tronco em divisão localizam-se em uma posição protegida

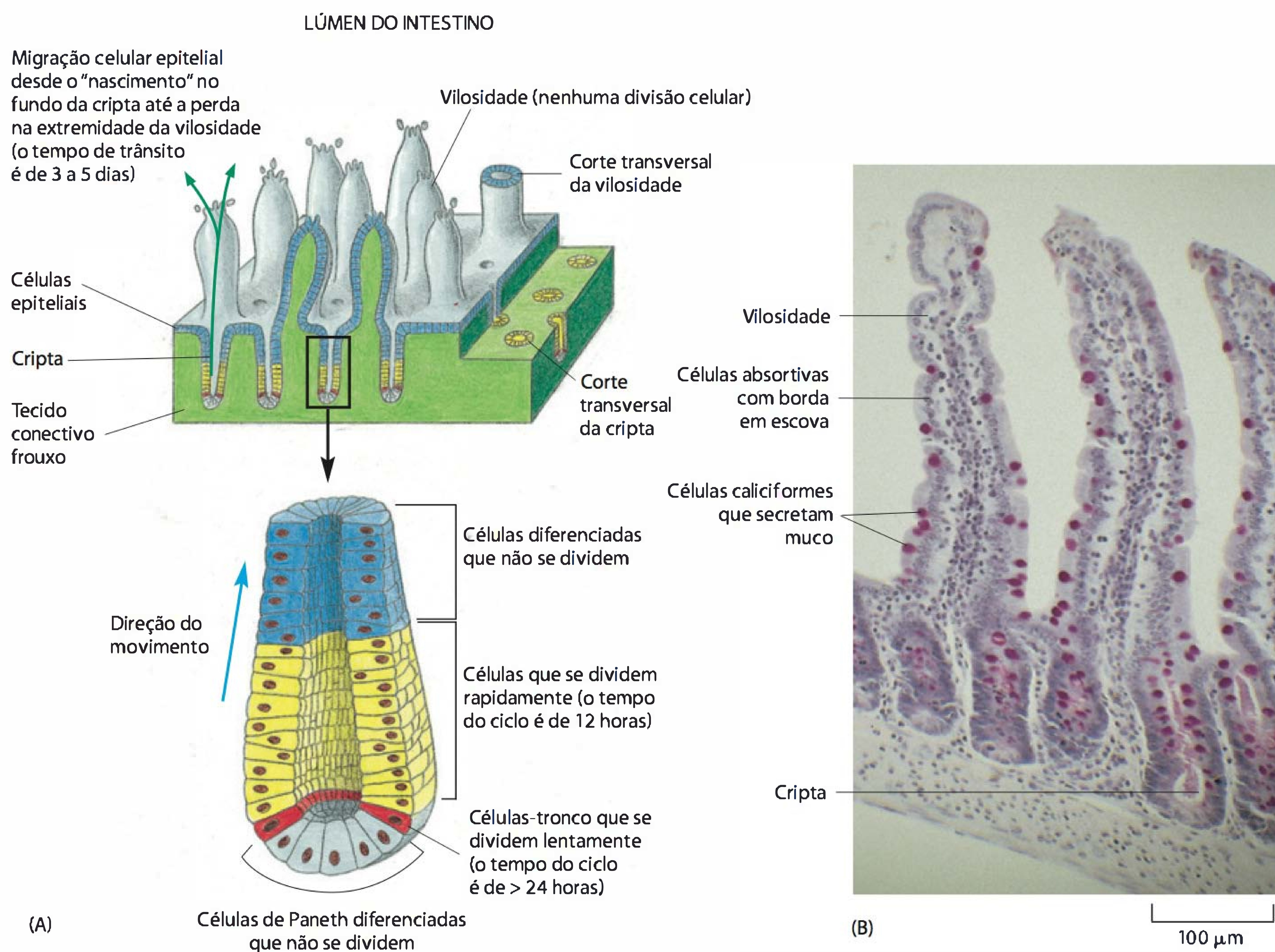


Figura 23-21 Renovação do revestimento do intestino. (A) O padrão de renovação celular e de proliferação de células-tronco no epitélio que forma o revestimento do intestino delgado. A seta colorida mostra a direção ascendente geral do movimento celular na vilosidade, mas algumas células, incluindo uma proporção de células caliciformes e enteroendócrinas, ficam para trás e diferenciam-se ainda enquanto estão nas criptas. As células diferenciadas que não se dividem (células de Paneth) nas profundezas das criptas também têm um tempo de vida finito e são substituídas continuamente pela progênie das células-tronco. (B) Fotografia de um corte de parte do revestimento do intestino delgado, mostrando as vilosidades e as criptas. Notar como as células caliciformes secretoras de muco (coradas de vermelho) estão intercaladas entre outros tipos celulares. As células enteroendócrinas são menos numerosas e menos fáceis de identificar sem colorações especiais. Ver Figura 23-22 para a estrutura destas células.

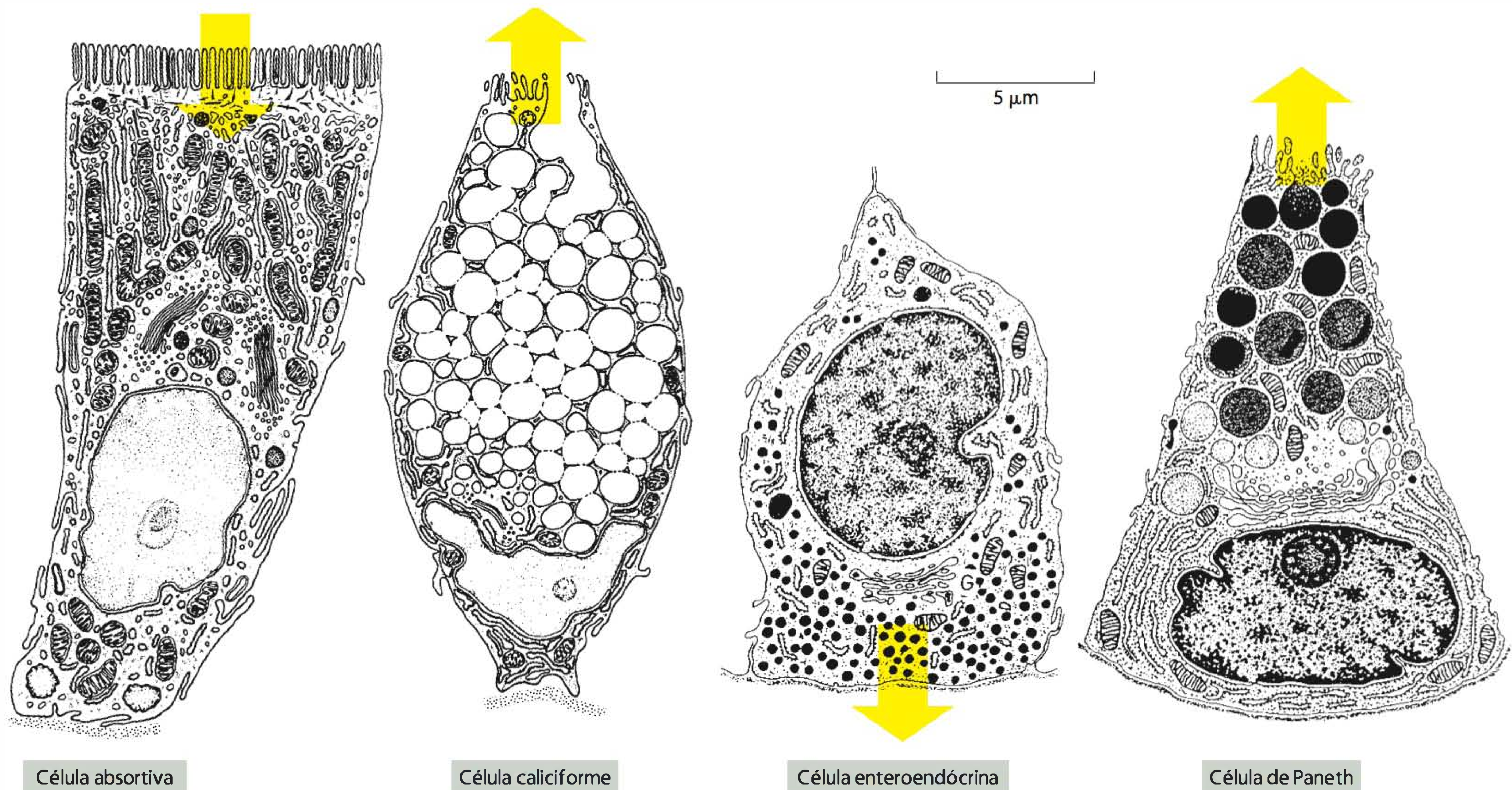


Figura 23-22 Os quatro principais tipos de células diferenciadas encontrados no revestimento epitelial do intestino delgado. Todos são gerados a partir de células-tronco indiferenciadas pluripotentes que vivem próximas ao fundo das criptas (ver Figura 23-21). As microvilosidades sobre a superfície apical (borda em escova) das células absortivas proporcionam um aumento de área de superfície de 30 vezes, não somente para a absorção de nutrientes, mas também para a fixação das enzimas que realizam os estágios finais da digestão extracelular, degradando peptídeos pequenos e dissacarídeos em monômeros que podem ser transportados através da membrana celular. As setas amarelas grossas indicam a direção da secreção ou da captação de materiais por cada tipo de célula. (Com base em T. L. Lentz, Cell Fine Structure. Philadelphia: Saunders, 1971; R. Krstić, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. Berlin: Springer-Verlag, 1984.)

nas profundezas das criptas. Estas produzem quatro tipos de células-filhas diferenciadas (**Figura 23-22**):

1. *Células absortivas* (também chamadas de *células com borda em escova* ou *enterócitos*) têm microvilosidades densamente colocadas sobre sua superfície exposta para aumentar sua área de superfície ativa para a captação de nutrientes. Elas tanto absorvem nutrientes quanto secretam (ou carregam em suas superfícies externas) enzimas hidrolíticas que realizam algumas das etapas finais da digestão extracelular, quebrando moléculas de alimento na preparação para o transporte através da membrana plasmática.
2. *Células caliciformes* (como no epitélio respiratório) secretam muco.
3. *Células de Paneth* fazem parte do sistema imune de defesa inato (discutido no Capítulo 24) e secretam (juntamente com alguns fatores de crescimento) *criptidinas* – proteínas da família das defensinas que matam bactérias (ver Figura 24-46).
4. *Células enteroendócrinas*, de mais de 15 subtipos diferentes, secretam serotonina e hormônios peptídeos, como colecistoquinina (CCK), que atuam sobre neurônios e outros tipos de células na parede do intestino e regulam o crescimento, a proliferação e as atividades digestivas de células do intestino e de outros tecidos. Por exemplo, a colecistoquinina é liberada pelas células enteroendócrinas em resposta à presença de nutrientes no intestino e liga-se a receptores nas terminações de nervos sensoriais próximos, que transmitem um sinal ao cérebro para parar a sua sensação de fome após você ter comido o suficiente.

As células absortivas, caliciformes e enteroendócrinas migram principalmente para cima, a partir da região de células-tronco, através de um movimento de deslizamento no plano da camada epitelial, para cobrir as superfícies das vilosidades. Em analogia com a epiderme, acredita-se que as células precursoras que proliferam mais rapidamente na cripta estão em um estágio de amplificação transitório, já comprometidas com a diferenciação, mas passam por várias divisões durante seu percurso para fora da cripta, antes de pararem de se dividir e diferenciarem-se de forma definitiva. Dentro de dois a cinco dias (no camundongo) após emergirem das criptas, as células atingem as extremidades das vilosidades, onde elas

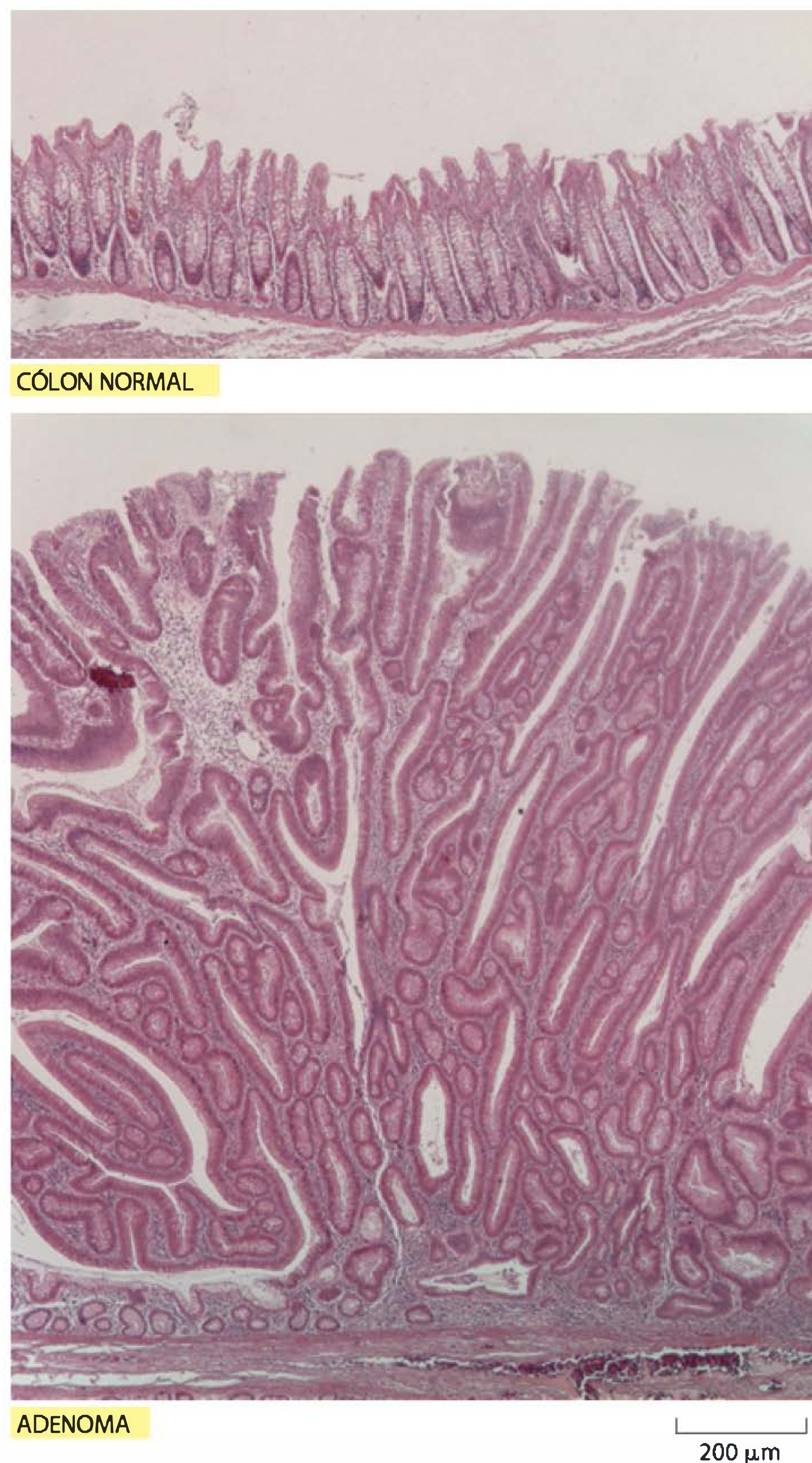


Figura 23-23 Um adenoma no cólon humano, comparado com o tecido normal de uma região adjacente do cólon da mesma pessoa. A amostra é de um paciente com uma mutação hereditária em uma de suas duas cópias do gene Apc. Uma mutação na outra cópia do gene Apc, que ocorreu em uma célula epitelial do cólon durante a vida adulta, deu origem a um clone de células que comportam-se como se a via de sinalização Wnt estivesse ativada permanentemente. Como resultado, as células deste clone formam um adenoma – uma massa de estruturas gigantes semelhantes a criptas, enorme, firme e que se expande.

sofrem os estágios iniciais de apoptose e, finalmente, são descartadas no lúmen intestinal. As células de Paneth são produzidas em número muito menor e têm um padrão de migração diferente. Elas permanecem no fundo das criptas, onde também são continuamente substituídas, embora não tão rapidamente, persistindo por cerca de 20 dias (no camundongo) antes de sofrerem apoptose e serem fagocitadas por suas vizinhas. As células-tronco também permanecem no fundo ou próximo ao fundo das criptas. O que as mantém neste local e o que restringe a divisão celular às criptas? Como as migrações são controladas para que algumas células movam-se para cima enquanto outras permanecem embaixo? Quais são os sinais moleculares que organizam o sistema inteiro de células-tronco e como eles funcionam?

A sinalização Wnt mantém o compartimento de células-tronco do intestino

O início de uma resposta para estas questões surgiu de estudos de câncer de cólon e reto (a porção final do intestino). Como discutido no Capítulo 20, algumas pessoas têm uma predisposição hereditária para esta doença e, com o avançar do câncer, desenvolvem um número grande de tumores pré-cancerosos pequenos (adenomas) no revestimento de seu intestino grosso (**Figura 23-23**). A aparência destes tumores sugere que eles tenham surgido de células da cripta intestinal que tenham falhado em parar sua proliferação pela maneira normal e, dessa forma, tenham dado lugar a estruturas semelhantes a criptas excessivamente grandes. A causa pode estar relacionada a mutações do gene *Apc* (polipose adenomatosa do cólon, de *adenomatous polyposis coli*): os tumores surgem de células que tenham perdido ambas as cópias do gene. O *Apc* codifica para uma proteína que previne a ativação inapropriada da via de sinalização Wnt, de modo que se suspeita que a perda da APC imita o efeito da exposição continua a um sinal Wnt. Portanto, a sugestão é que a sinalização Wnt normalmente mantém as células da cripta

estado proliferativo, e a interrupção da exposição à sinalização Wnt normalmente as faz parar de se dividir enquanto elas deixam a cripta. Na verdade, camundongos que são homozigotos para uma mutação *knockout* no gene *Tcf4*, que codifica para uma proteína reguladora de gene que é necessária como realizadora da sinalização Wnt no intestino, não produzem criptas, apresentam falhas na renovação de seu epitélio intestinal e morrem logo após o nascimento.

Experimentos com camundongos transgênicos confirmam a importância da sinalização Wnt e revelam outros reguladores que atuam junto com Wnt para organizar a linha de produção de células intestinais e mantê-la seguindo corretamente. Por exemplo, utilizando a técnica Cre/lox com um promotor induzido por Cre (como descrito no Capítulo 8, p. 567), é possível por fora de ação (nocautear) bruscamente o gene *Apc* nas células epiteliais do intestino, em qualquer momento escolhido na vida do camundongo. Dentro de poucos dias, a estrutura do intestino está transformada: as regiões de células proliferativas semelhantes a criptas estão bastante aumentadas, as vilosidades são reduzidas e o número de células diferenciadas definitivas está drasticamente reduzido. Ao contrário, pode-se produzir um camundongo transgênico no qual todas as células epiteliais do intestino secretem um inibidor da sinalização Wnt capaz de difundir-se. Estes animais, nos quais a sinalização Wnt está bloqueada, formam apenas algumas criptas e têm apenas algumas células em proliferação em seu epitélio intestinal. Por outro lado, quase todas as células do revestimento do intestino estão completamente diferenciadas como células absortivas que não se dividem; porém, células caliciformes, células enteroendócrinas e células de Paneth estão ausentes. Dessa forma, a sinalização Wnt não apenas mantém as células em um estado proliferativo, mas também é necessária para torná-las competentes para dar origem à série completa de tipos celulares diferenciados definitivamente.

A sinalização Notch controla a diversificação celular do intestino

Então, o que faz as células diversificarem à medida que elas diferenciam? A sinalização Notch tem esta função em muitos outros sistemas, onde ela medeia a inibição lateral – uma competição interativa que guia células vizinhas em direção a destinos diferentes (ver Capítulos 15 e 22, Figuras 15-75 e 22-60). Todos os componentes essenciais da via Notch são expressos nas criptas; parece que a sinalização Wnt ativa sua expressão. Quando a sinalização Notch é bloqueada bruscamente por *knockout* de um destes componentes essenciais, dentro de poucos dias todas as células nas criptas se diferenciam como células caliciformes e cessam a divisão; ao contrário, quando a sinalização Notch é ativada artificialmente em todas as células, não são produzidas células caliciformes e as regiões de proliferação celular semelhantes a criptas são ampliadas.

Dos efeitos de todas estas manipulações da sinalização Wnt e Notch, chegamos a um quadro simples de como as duas vias se combinam para dirigir a produção de células diferenciadas a partir de células-tronco (**Figura 23-24**). Contudo, a sinalização Wnt promove

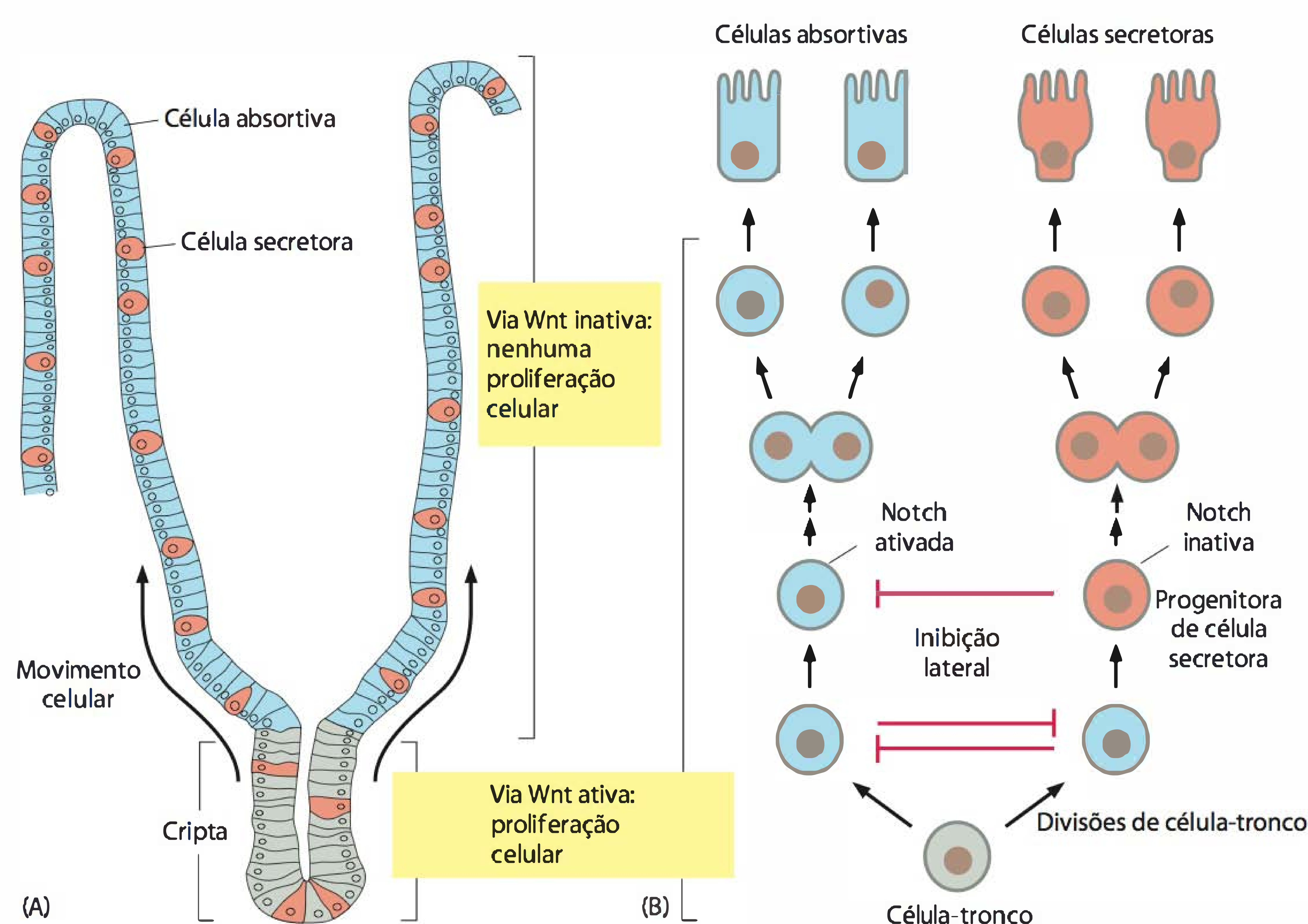


Figura 23-24 Como as vias de sinalização Wnt e Notch combinam-se para controlar a produção de células diferenciadas a partir de células-tronco no intestino. (A) A sinalização Wnt mantém a proliferação na cripta, onde as células-tronco se localizam e sua progênie torna-se comprometida com destinos diferentes. (B) A sinalização Wnt na cripta guia a expressão de componentes da via de sinalização Notch nesta região; assim, a sinalização Notch é ativa na cripta e, por inibição lateral, força as células deste local a se diversificarem. Ambas as vias devem estar ativadas na mesma célula para mantê-la como célula-tronco. As células da progênie da célula-tronco continuam dividindo-se sob influência de Wnt mesmo após elas tornarem-se comprometidas com um destino diferenciado específico, mas a escolha do momento destas divisões de amplificação transitória em relação ao comprometimento não é compreendida em detalhes.

proliferação celular e confere competência para a série completa de formas de diferenciação, embora evite que a diferenciação ocorra imediatamente; dessa maneira, ela define a cripta e mantém as células-tronco. Contudo, a sinalização Wnt ao mesmo tempo também ativa a expressão dos componentes da via Notch, e a sinalização Notch dentro da população da cripta medeia a inibição lateral, que força as células a diversificar, de tal maneira que algumas tornam-se escolhidas para distribuir a inibição lateral, enquanto outras a recebem. Células do grupo precedente expressam ligantes Notch e ativam Notch em suas vizinhas, mas escapam da ativação de Notch nelas próprias; como resultado, elas tornam-se comprometidas a diferenciar em células secretoras. Células do segundo grupo – a maioria – são mantidas em um estado oposto, com Notch ativado e a expressão de ligante inibida; como resultado, elas conservam a competência para se diferenciar em qualquer uma, por uma variedade de maneiras, e entram em competição de inibição lateral com suas vizinhas. Ambos os grupos de células (com exceção de alguns subtipos secretores) continuam dividindo-se enquanto elas estão na cripta, sob a influência de Wnt. Contudo, quando as células deixam a cripta e perdem a exposição à sinalização Wnt, a competição para, as divisões cessam e as células se diferenciam de acordo com seu estado individual de ativação Notch neste momento – como células absortivas se Notch ainda está ativado, como células secretoras se Notch não está.

Certamente, esta não é toda a história de eventos na cripta. Ela não explica, por exemplo, como os vários subgrupos de células secretoras (caliciformes, enteroendócrinas e de Paneth) tornam-se diferentes uns dos outros. Nem ela diz coisa alguma sobre a distinção que muitos especialistas acreditam existir entre as células-tronco verdadeiras e as células amplificadoras transitórias que se dividem mais rapidamente dentro da cripta. Diversos membros diferentes de cada uma das famílias de componentes das vias Wnt e Notch são expressos no epitélio da cripta e no tecido conectivo em torno da base da cripta e, provavelmente, têm efeitos diferentes. Além disso, outras vias de sinalização também têm funções cruciais na organização do sistema.

A sinalização efrina-Eph controla a migração de células epiteliais do intestino

Uma das características mais notáveis do sistema de células-tronco do intestino é a migração estável, ordenada e seletiva de células da cripta para a vilosidade. Células absortivas, caliciformes e enteroendócrinas em diferenciação deixam as criptas e sobem a vilosidade (**Figura 23-25**); células-tronco permanecem nas profundezas das criptas; e células de Paneth migram bem para baixo em direção ao fundo da cripta. Este padrão de movimentos, que segrega os diferentes grupos de células, depende ainda de outra via de sinalização célula-célula. A sinalização Wnt estimula a expressão de receptores de superfície celular da família EphB (discutido no Capítulo 15) nas células da cripta; entretanto, conforme as células se diferenciam, elas interrompem a expressão destes receptores e, ao invés disso, ativam a expressão dos ligantes, proteínas de superfície celular da família efrinaB (**Figura 23-26**A). Há uma exceção: as células de Paneth conservam a expressão das proteínas EphB (receptores).

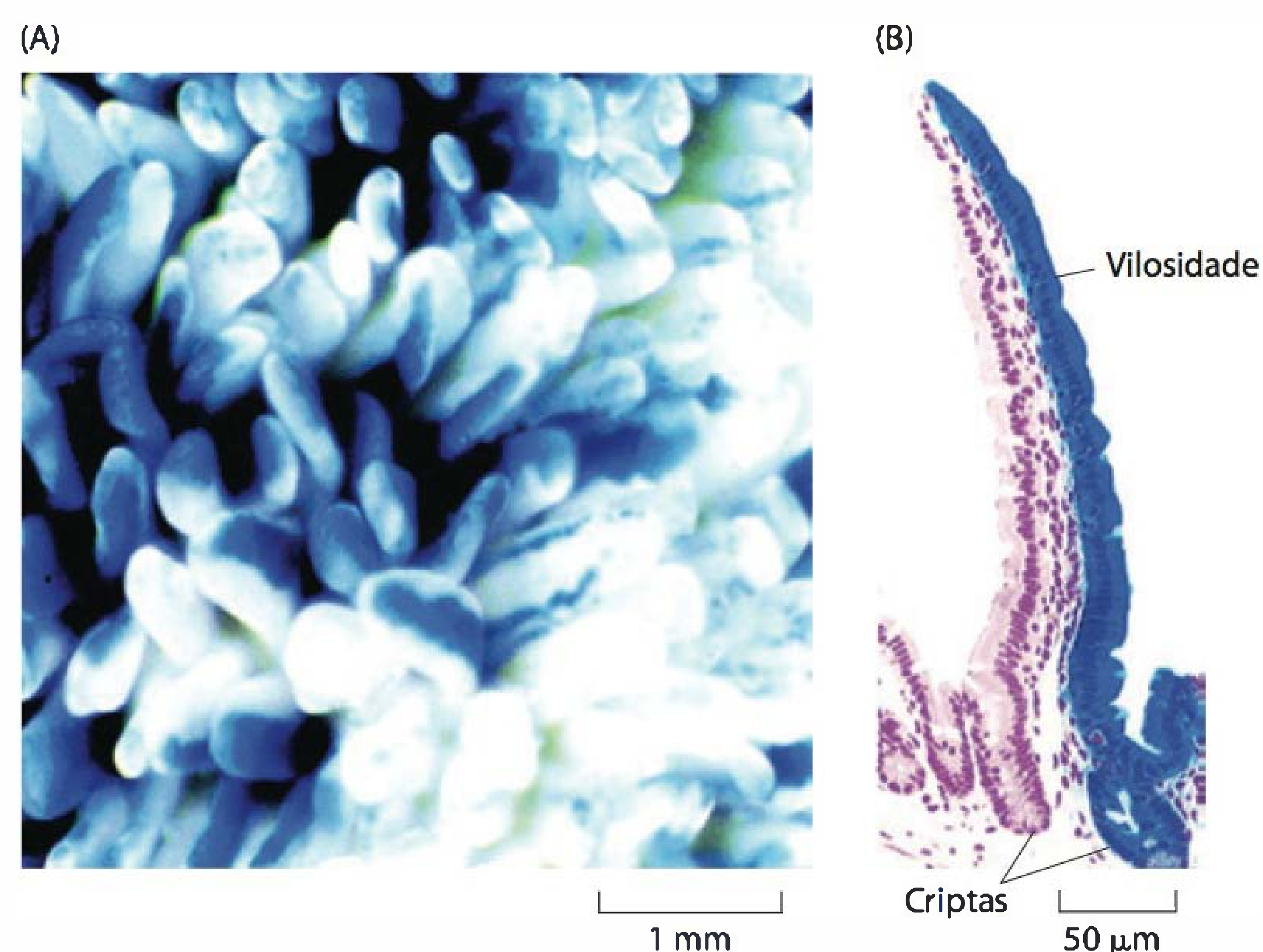
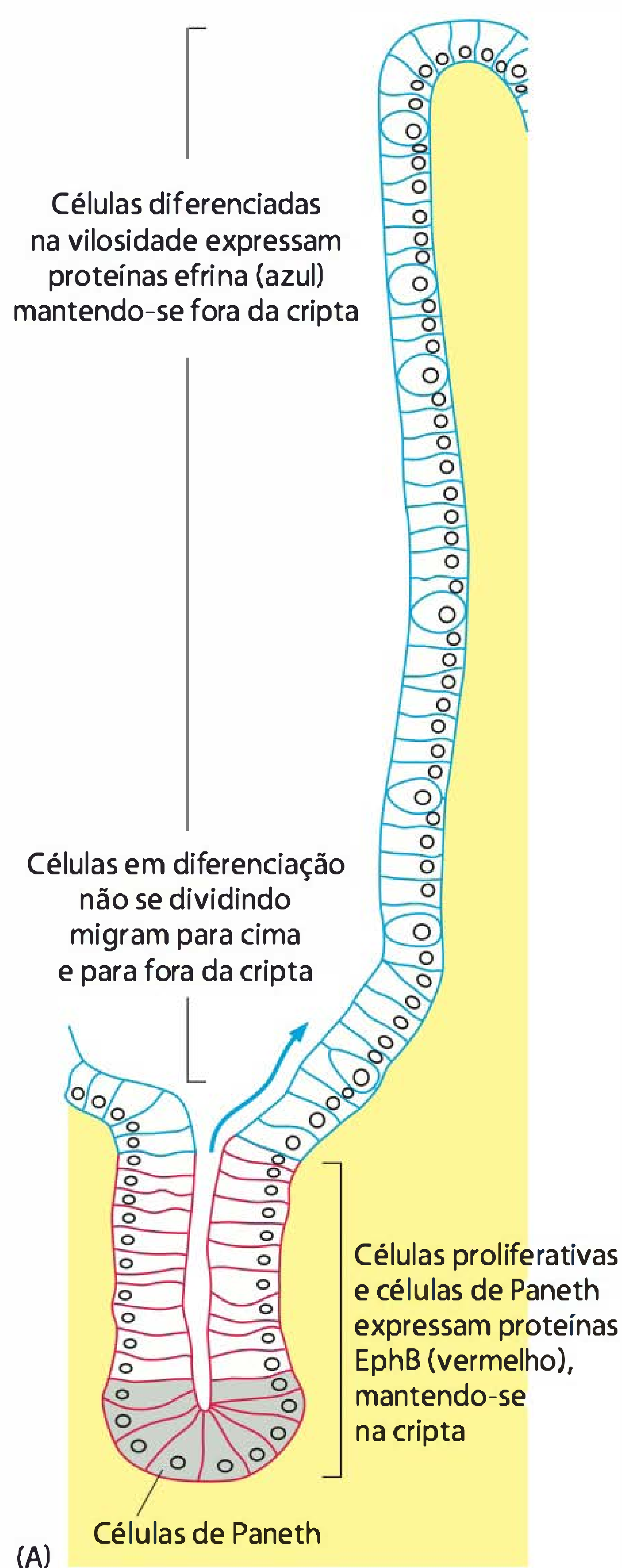
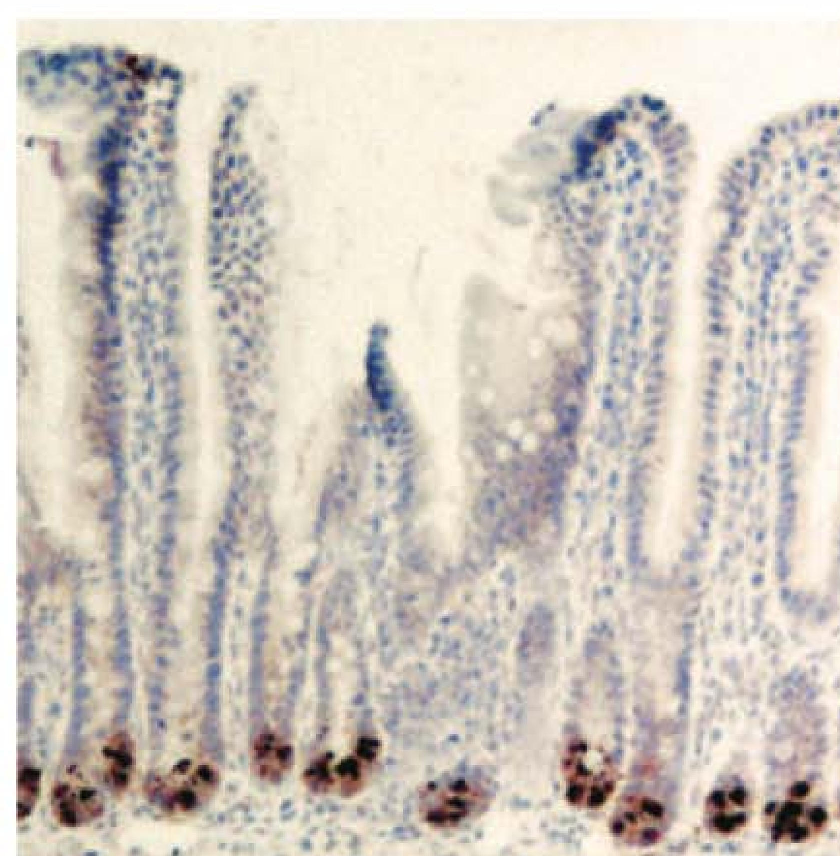


Figura 23-25 Migração de células da cripta em direção à vilosidade. Neste intestino de camundongo, um subgrupo de células epiteliais ao acaso foi induzido a sofrer uma mutação durante a vida fetal tardia, fazendo as células mutantes expressarem um transgene LacZ, que codifica uma enzima que pode ser detectada pelo produto azul da reação que ela catalisa. Durante seis semanas após o nascimento, cada cripta tornou-se povoada pela progênie de uma única célula-tronco e, dessa forma, aparece ou totalmente azul ou totalmente branca, conforme a célula-tronco tenha sido ou não marcada geneticamente desta forma. Várias criptas contribuem para uma única vilosidade, cada uma enviando um fluxo de células diferenciadas para fora em sua direção. (A) Vista, em pequeno aumento, da superfície de parte do revestimento do intestino, mostrando muitas vilosidades, cada uma recebendo fluxos de células de diversas criptas. (B) Detalhe de uma única vilosidade e criptas adjacentes em corte transversal. No exemplo mostrado, o fluxo de células de diferentes criptas permaneceu separado sem se misturar, de forma que a vilosidade aparece azul de um lado e branca do outro; o mais comum é haver alguma mistura, sendo observado um resultado menos ordenado. (De M. H. Wong, J. R. Saam, T. S. Stappenbeck, C. H. Rexer e J. L. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12601-12606, 2000. Com permissão da National Academy of Sciences.)





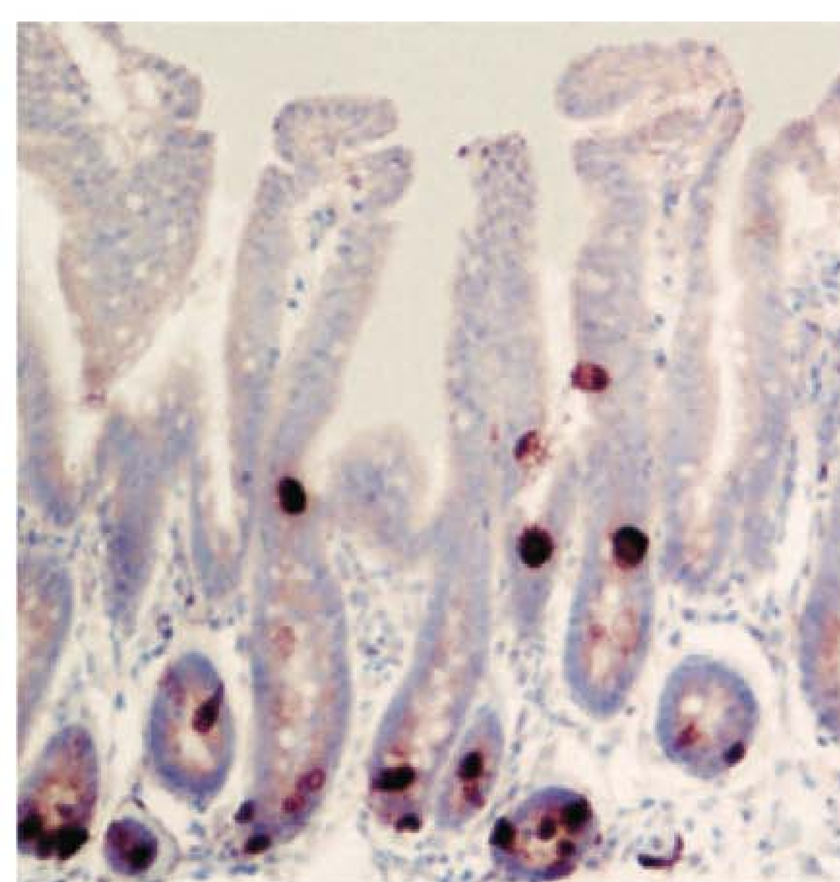
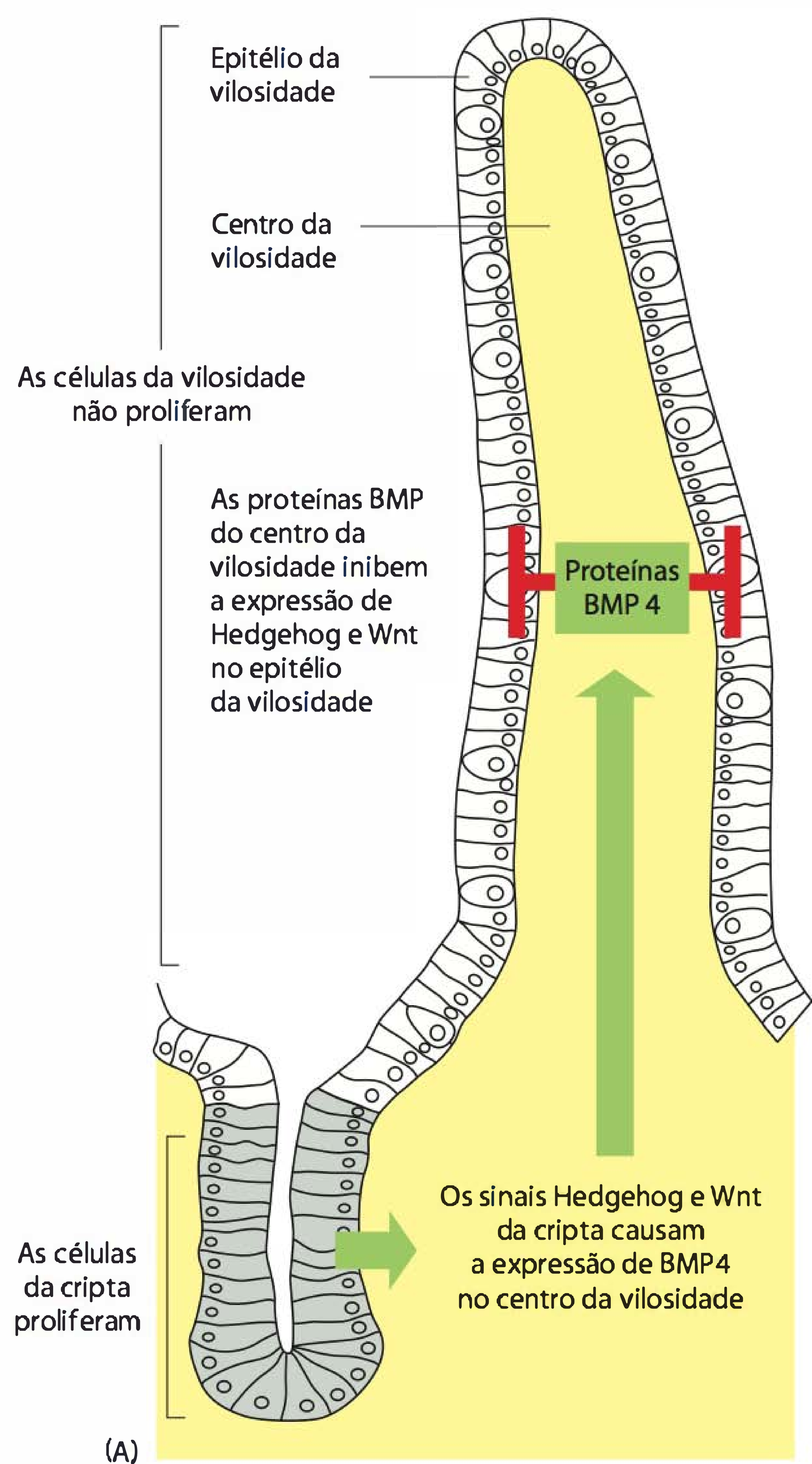


Figura 23-26 A sinalização efrina-Eph controla a segregação celular entre criptas e vilosidades. (A) As células proliferativas (incluindo as células-tronco) e as células de Paneth expressam proteínas EphB, enquanto as células diferenciadas, células que já não se dividem e que revestem a vilosidade, expressam proteínas efrinaB. A interação repulsiva célula-célula mediada pelo encontro entre estes dois tipos de moléculas de superfície celular mantém as duas classes de células segregadas. (B) Em um intestino normal, o resultado é que as células de Paneth (coloração castanha) e as células em divisão permanecem confinadas à base das criptas. (C) Em um mutante onde proteínas EphB são defeituosas, células que deveriam permanecer nas criptas desviam para fora em direção à vilosidade. (Adaptada de E. Batlle et al., Cell 111:251-263, 2002. Com permissão de Elsevier.)

Portanto, a expressão de EphB é característica de células que permanecem nas criptas, enquanto a expressão de efrinaB é característica de células que se movem para fora em direção à vilosidade. Em vários outros tecidos, células que expressam proteínas EphB são repelidas por contato com células que expressam efrinas (ver Capítulo 22, Figura 22-106). Parece que o mesmo é verdade no revestimento do intestino, e que este mecanismo serve para manter as células nos seus locais adequados. Em mutantes por *knockout* de EphB, a população celular torna-se misturada de tal maneira que, por exemplo, células de Paneth desviam para fora em direção à vilosidade (Figura 23-26C). A perda de genes EphB em cânceres intestinais está correlacionada ao início do comportamento invasivo pelas células tumorais.

As vias de sinalização Wnt, Hedgehog, PDGF e BMP combinam-se para delimitar o nicho de células-tronco

Claramente, as células-tronco do intestino não podem existir sem o ambiente especial que a cripta proporciona a elas. Este **nicho de células-tronco** é tão essencial quanto as próprias células-tronco. Como ele é criado e mantido? O mecanismo parece depender de uma interação complexa de sinais entre o epitélio e o tecido conectivo subjacente. A troca de sinais Wnt, Hedgehog e PDGF entre os dois tecidos, e entre regiões diferentes do eixo cripta-vilosidade, levam a uma restrição da sinalização Wnt às vizinhanças das criptas. As células epiteliais nas criptas produzem tanto proteínas Wnt quanto os receptores que respondem a elas, criando uma alça de retroalimentação positiva que, provavelmente, ajuda a fazer a ativação da via Wnt nesta região de autossustentação. Ao mesmo tempo, a troca de sinais com o tecido conectivo leva à expressão de proteínas BMP nas células do tecido conectivo que forma o centro das vilosidades (**Figura 23-27**). Estas células sinalizam para o epitélio da vilosidade adjacente para inibir o desenvolvimento de criptas em local errado: o bloqueio da sinalização BMP interrompe toda a organização e produz criptas no lugar errado, formando invaginações de proliferação do epitélio ao longo da parte lateral das vilosidades.



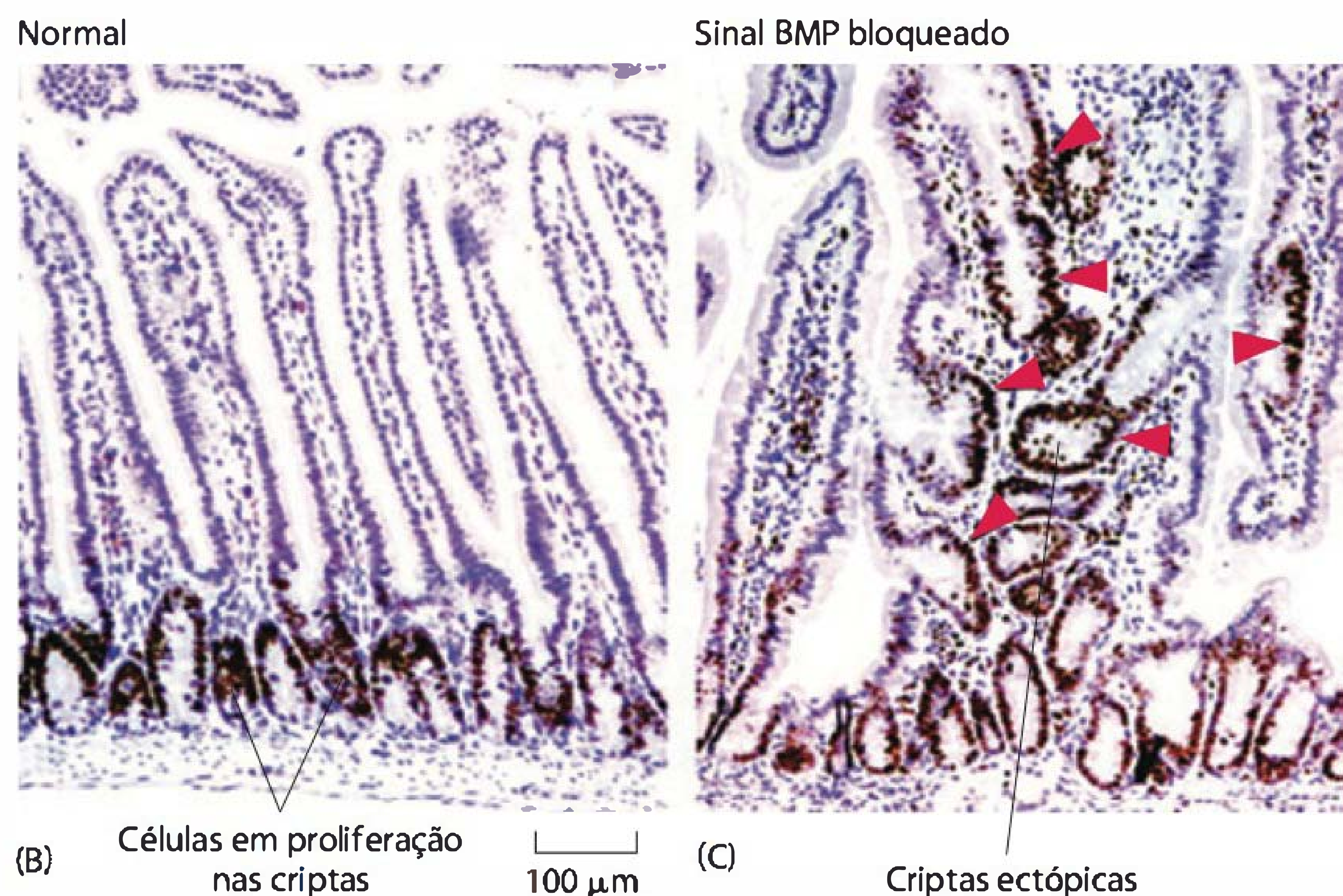


Figura 23-27 Sinais definem o nicho intestinal de células-tronco. (A) Esquema do sistema de sinalização. Proteínas-sinal das famílias Hedgehog e Wnt são expressas pelas células epiteliais na base de cada cripta, as quais também expressam receptores Wnt e se deparam com níveis altos de ativação da via Wnt. As células do tecido conectivo subjacente ao epitélio expressam tanto receptores Hedgehog quanto receptores Wnt. O efeito combinado dos sinais da base da cripta, talvez em conjunto com outros sinais, vai induzir as células do tecido conectivo situado no centro de cada vilosidade a expressar proteínas BMP. As proteínas BMP atuam sobre o epitélio da vilosidade, impedindo suas células de formar criptas. (B) Corte transversal de uma região de epitélio intestinal normal. A coloração castanha marca células proliferativas, as quais estão confinadas à cripta. (C) Corte de intestino de um camundongo transgênico que expressa um inibidor de sinalização BMP, corado de maneira semelhante. As criptas contendo células em divisão se desenvolveram de forma ectópica, ao longo das partes laterais da vilosidade mal-formada. (B e C, cortesia de A. Haramis et al., Science 303:1684-1686, 2004. Com permissão de AAAS.)

As funções do fígado como uma interface entre o tubo digestivo e o sangue

Como acabamos de ver, as funções do intestino estão divididas entre uma variedade de tipos celulares. Algumas células são especializadas para a secreção de ácido hidroclorídrico, outras para a secreção de enzimas, outras para a absorção de nutrientes, e assim por diante. Alguns desses tipos celulares estão intimamente associados na parede do intestino, enquanto outros são segregados em grandes glândulas que se comunicam com o intestino e se originam no embrião como proliferações externas do epitélio intestinal.

O fígado é a maior dessas glândulas. Ele se desenvolve em um local onde corre a principal veia, próximo à parede do tubo digestivo primitivo, e o órgão adulto conserva uma relação especial com o sangue. As células no fígado que derivam do epitélio do intestino primitivo – os **hepatócitos** – estão organizadas em placas e em cordões celulares interligados, com espaços preenchidos de sangue chamados de sinusoides correndo entre eles (**Figura 23-28**). O sangue está separado da superfície dos hepatócitos por uma camada única de células endoteliais achatadas que recobrem as faces expostas das células hepáticas. Essa estrutura facilita as principais funções do fígado, que dependem da troca de metabólitos entre os hepatócitos e o sangue.

O fígado é o principal local no qual os nutrientes que estão sendo absorvidos no intestino e transferidos para o sangue são processados para a utilização por outras células do corpo. Ele recebe a maior parte de seu suprimento sanguíneo diretamente a partir do tubo intestinal (por meio da veia porta). Os hepatócitos sintetizam, degradam e armazenam um imenso número de substâncias. Eles desempenham um papel central no metabolismo de carboidratos e de lipídeos do corpo como um todo e secretam a maioria das proteínas encontradas no plasma sanguíneo. Ao mesmo tempo, os hepatócitos permanecem relacionados ao lúmen do intestino através de um sistema de canais diminutos (ou canalículos) e de grandes ductos (ver Figura 23-28B,C) e secretam no intestino, por essa via, tanto os resíduos dos produtos de seu metabolismo como um agente emulsificante, a *bile*, que auxilia

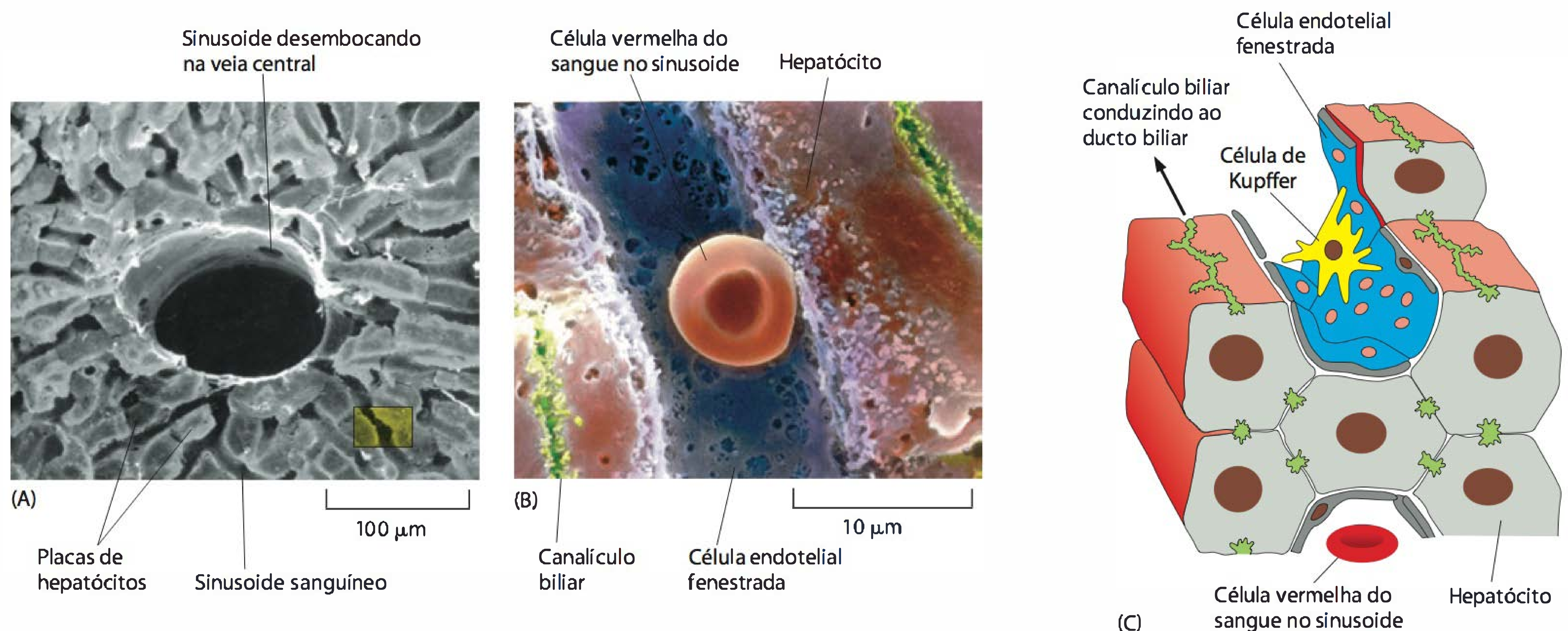


Figura 23-28 A estrutura do fígado. (A) Uma eletromicrografia de varredura de uma porção do fígado, mostrando as placas e os cordões irregulares de hepatócitos e de muitos canais pequenos, ou sinusoides, para o fluxo de sangue. Os canais grandes são vasos que distribuem e coletam o sangue que corre pelos sinusoides. (B) Detalhe de um sinusoide (ampliação de uma região semelhante àquela marcada pelo retângulo amarelo embaixo, à direita, em [A]). (C) Desenho esquemático da fina estrutura do fígado. Uma única e delgada camada de células endoteliais intercaladas com macrófagos chamados de células de Kupffer separa os hepatócitos da corrente sanguínea. Pequenos buracos na camada endotelial, chamados de fenestras ("janelas", em latim), permitem a troca de moléculas e de partículas pequenas entre os hepatócitos e a corrente sanguínea. Além da troca de materiais com o sangue, os hepatócitos formam um sistema de minúsculos canalículos biliares dentro dos quais eles secretam bile, que é descarregada finalmente no intestino por meio de ductos biliares. A estrutura real é menos uniforme do que este esquema sugere. (A e B, cortesia de Pietro M. Motta, University of Rome "La Sapienza".)

na absorção de gorduras. Os hepatócitos são células grandes e cerca de 50% deles (em um humano adulto) são poliploides, com duas, quatro, oito ou mesmo mais vezes a quantidade diploide normal de DNA por célula.

Em contraste com o resto do sistema digestivo, parece haver uma divisão de trabalho notavelmente pequena dentro da população de hepatócitos. Cada hepatócito parece ser capaz de realizar a mesma gama ampla de tarefas metabólicas e secretoras. Essas células completamente diferenciadas também podem se dividir repetidamente, quando há necessidade, como explicaremos a seguir.

A perda celular do fígado estimula a sua proliferação celular

O fígado ilustra de maneira impressionante um dos grandes problemas não-solucionados da biologia do desenvolvimento e tecidual: o que determina o tamanho de um órgão do corpo ou a quantidade de um tipo de tecido em relação a outro? Para órgãos diferentes, quase com certeza as respostas são diferentes, mas há apenas alguns casos nos quais o mecanismo é bem-conhecido.

Os hepatócitos vivem, normalmente, por um ano ou mais e são renovados em uma taxa lenta. Entretanto, mesmo em um tecido que se renova lentamente, um pequeno, porém persistente, desequilíbrio entre a taxa de produção celular e a taxa de morte celular poderia levar ao desastre. Se 2% dos hepatócitos em um humano se dividissem a cada semana, mas somente 1% morresse, o fígado cresceria a ponto de exceder o peso do resto do corpo dentro de oito anos. Os mecanismos homeostáticos devem funcionar para ajustar a taxa de proliferação celular ou a taxa de morte celular, ou ambas, de modo a manter o órgão em seu tamanho normal. Além disso, este tamanho precisa ser condizente com o tamanho do resto do corpo. De fato, quando o fígado de um cão pequeno é transplantado em um cão grande, ele cresce rapidamente para o tamanho quase apropriado para o hospedeiro; inversamente, quando o fígado é transplantado de um cão grande para um pequeno, ele encolhe.

Uma evidência direta do controle homeostático da proliferação celular do fígado veio de experimentos nos quais hepatócitos em grande número foram removidos cirurgicamente, ou foram intencionalmente mortos por envenenamento com tetracloreto de carbono. Dentro de um dia, ou logo após uma das formas de lesão, uma onda de divisão celular ocorre entre os hepatócitos que sobreviveram, e o tecido perdido é substituído rapidamente. (Se os próprios hepatócitos são totalmente eliminados, uma outra classe de células, localizadas nos ductos biliares, pode servir como células-tronco para a origem de novos hepatócitos, mas em geral não há necessidade disso.) Por exemplo, se dois terços do fígado de um rato são removidos, um fígado de tamanho aproximadamente normal pode ser regenerado a partir do que restou por meio de proliferação de hepatócitos, em cerca de duas semanas. Embora muitas moléculas tenham sido relacionadas ao desencadeamento dessa reação, uma das mais importantes é uma proteína chamada de *fator de crescimento de hepatócito*. Ela estimula os hepatócitos a se dividirem em cultivo, e sua produção aumenta abruptamente (por um mecanismo pouco conhecido) em resposta à lesão do fígado.

O equilíbrio entre a geração e a morte das células no fígado adulto (e em outros órgãos também) não depende exclusivamente da regulação da proliferação celular: os controles de sobrevivência celular também desempenham uma função. Por exemplo, se um rato adulto é tratado com fenobarbital, os hepatócitos são estimulados a se dividir, fazendo o fígado aumentar. Quando o tratamento com fenobarbital é interrompido, a morte celular de hepatócitos aumenta muito, até o fígado retornar ao seu tamanho original, normalmente dentro de mais ou menos uma semana. O mecanismo desse tipo de controle de sobrevivência celular é desconhecido, mas tem sido sugerido que os hepatócitos, como a maioria das células de vertebrados, dependem de sinais de outras células para sua sobrevivência e que o nível normal desses sinais pode sustentar apenas um certo número-padrão de hepatócitos. Se o número de hepatócitos eleva-se acima disso (p. ex., como resultado de tratamento com fenobarbital), a morte de hepatócitos aumentará automaticamente, para baixar o seu número. Não se sabe como os níveis apropriados de fatores de sobrevivência são mantidos.

A renovação de tecido não depende obrigatoriamente de células-tronco: as células secretoras de insulina no pâncreas

A maior parte dos órgãos do sistema respiratório e digestivo, incluindo os pulmões, o estômago e o pâncreas, contém uma subpopulação de células endócrinas semelhantes às células enteroendócrinas no intestino e, como elas, produzidas no epitélio sob o controle da via de sinalização Notch. As *células secretoras de insulina* (*células β*) do pâncreas pertencem a esta categoria. Seu modo de renovação tem uma importância especial, porque a perda destas células (através de lesão autoimune) é responsável pelo diabete tipo I (forma juvenil da doença) e também um fator significativo no diabete tipo II (forma adulta da doença). Em um pâncreas normal, elas estão sequestradas em grupos celulares, chamados de *ilhotas de Langerhans* (**Figura 23-29**), onde estão reunidas com células enteroendócrinas afins, que secretam outros hormônios. As ilhotas não contêm subgrupos evidentes de células especializadas para atuar como células-tronco, ainda que células β novas sejam continuamente produzidas dentro delas. De onde vêm estas novas células?

A questão tem sido respondida pelo estudo de camundongos transgênicos no qual uma variante engenhosa da técnica de Cre-Lox (descrita no Capítulo 8) foi usada para produzir um marcador de mutação justamente naquelas células que estivessem expressando o gene insulina no momento em que uma substância foi administrada para ativar Cre. Dessa forma, as únicas células que tornaram-se marcadas e transmitiram a marca para sua progênie foram aquelas que já haviam se diferenciado em células β no momento do tratamento. Quando os camundongos foram analisados cerca de um ano mais tarde, todas as células β novas carregavam a marca, implicando em que elas eram descendentes de células β já diferenciadas, e não de alguma célula-tronco indiferenciada. Como no fígado, parece que a população de células diferenciadas aqui é renovada e ampliada por duplicação simples de células diferenciadas existentes, e não por meio de células-tronco.

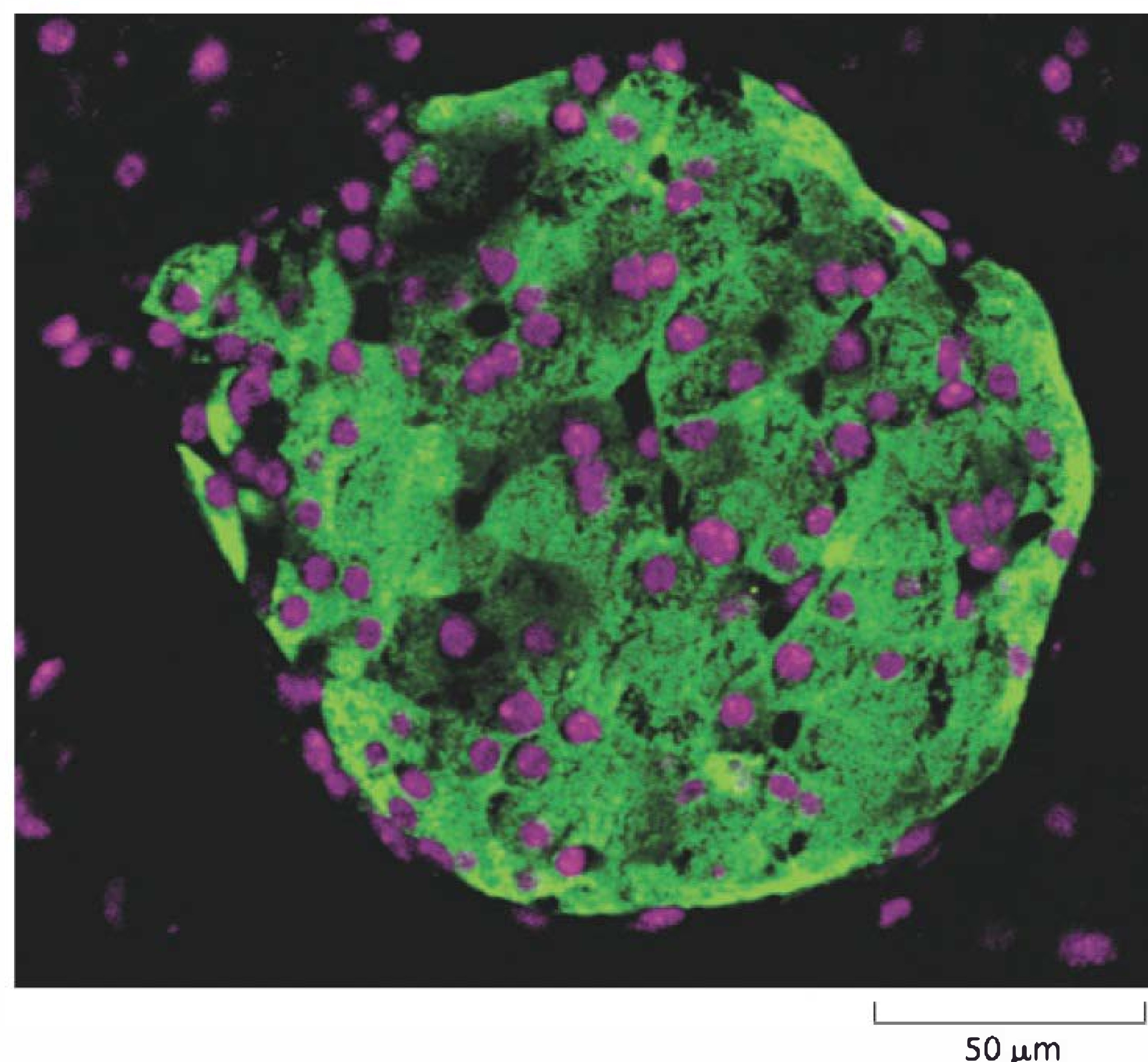


Figura 23-29 Uma ilhota de Langerhans no pâncreas. As células secretoras de insulina (células β) são coradas de verde por imunofluorescência. Os núcleos celulares são corados de púrpura com um corante de DNA. As células pancreáticas exócrinas circundantes (que secretam enzimas digestivas e bicarbonato no intestino através de ductos) não são coradas, exceto seus núcleos. Dentro da ilhota, próximo a sua superfície, também há um pequeno número de células (não-coradas) que secretam hormônios como o glucagon. As células secretoras de insulina substituem a elas mesmas através de duplicação simples, sem a necessidade de células-tronco especializadas. (Adaptada de uma fotografia, cortesia de Yuval Dor. © 2004 Yuval Dor, The Hebrew University, Jerusalém.)

Resumo

O pulmão desempenha uma função simples – troca gasosa –, mas seus sistemas de controle são complexos. As células secretoras de surfactante ajudam a impedir o colapso dos alvéolos. Os macrófagos limpam constantemente os alvéolos de resíduos e de micro-organismos. Uma escada rolante mucociliar formada por células caliciformes secretoras de muco e de células com cílios móveis varre os resíduos para fora das vias aéreas.

No intestino, onde ocorrem os processos químicos potencialmente mais prejudiciais, a renovação celular constante e rápida mantém o epitélio absortivo em bom estado. No intestino delgado, as células-tronco nas criptas originam novas células absortivas, caliciformes, enteroendócrinas e de Paneth, substituindo a maior parte do revestimento epitelial do intestino a cada semana. A sinalização Wnt nas criptas mantém a população de células-tronco, enquanto a sinalização Notch induz a diversificação da progênie de células-tronco e limita o número que vai destinar à função secretora. Interações célula-célula dentro do epitélio, mediadas por sinalização Efrina-Eph, controlam a migração seletiva de células das criptas para cima, em direção às vilosidades. Interações entre o epitélio e o estroma, envolvendo as vias Wnt, Hedgehog, PDGF e BMP, organizam o padrão de criptas e vilosidades, criando, desta forma, os nichos onde habitam as células-tronco.

O fígado é um órgão mais protegido, mas também pode ajustar rapidamente seu tamanho para mais ou para menos pela proliferação celular ou pela morte celular, quando surge a necessidade. Os hepatócitos diferenciados permanecem capazes de se dividir por toda vida, mostrando que uma classe especializada de células-tronco não é sempre necessária para a renovação do tecido. De forma semelhante, a população de células produtoras de insulina no pâncreas é ampliada e renovada por duplicação simples de células produtoras de insulina já existentes.

VASOS SANGUÍNEOS, LINFÁTICOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS

Dos tecidos que derivam do ectoderma e do endoderma embrionário, agora começaremos a trabalhar aqueles derivados do *mesoderma*. Este folheto intermediário de células, encaixado entre o ectoderma e o endoderma, cresce e se diversifica para proporcionar uma extensa variedade de funções de suporte. Ele dá origem aos tecidos conectivos do corpo, às células do sangue e aos vasos sanguíneos e linfáticos, assim como músculo, rim e muitas outras estruturas e tipos celulares. Começaremos com os vasos sanguíneos.

Quase todos os tecidos dependem de um suprimento de sangue, e o suprimento de sangue depende de **células endoteliais**, que formam o revestimento dos vasos sanguíneos. As células endoteliais têm uma capacidade notável para adaptar seu número e seu arranjo para servir às necessidades locais. Elas criam um sistema adaptável de suporte da vida, estendendo-se por migração celular para quase toda região do corpo. Se não fossem as células endoteliais que estendem e remodelam a rede de vasos sanguíneos, o crescimento e o reparo dos tecidos seriam impossíveis. O tecido canceroso é tão dependente de um suprimento de sangue quanto o tecido normal, e isto tem levado a uma onda de interesse na biologia celular endotelial. Pelo bloqueio da formação de novos vasos sanguíneos com o uso de fármacos que atuam sobre células endoteliais, pode ser possível bloquear o crescimento de tumores (discutido no Capítulo 20).

As células endoteliais revestem todos os vasos sanguíneos e linfáticos

Os vasos sanguíneos maiores são artérias e veias, que têm uma parede espessa resistente de tecido conectivo e muitas camadas de células musculares lisas (**Figura 23-30**). A parede é revestida por uma única camada extremamente fina de células endoteliais, o *endotélio*, separada das camadas externas vizinhas por uma lâmina basal. As quantidades de tecido conectivo e músculo liso na parede do vaso variam de acordo com o diâmetro e a função do vaso, porém o revestimento endotelial está sempre presente. Nos ramos mais finos da árvore vascular – os capilares e os sinusoides – as paredes consistem apenas em células endoteliais e em uma lâmina basal (**Figura 23-31**), juntamente com uns poucos e dispersos – porém funcionalmente importantes – *pericitos*. Estes são células da família do tecido conectivo, relacionadas às células vasculares musculares lisas, que se envolvem ao redor dos pequenos vasos (**Figura 23-32**).

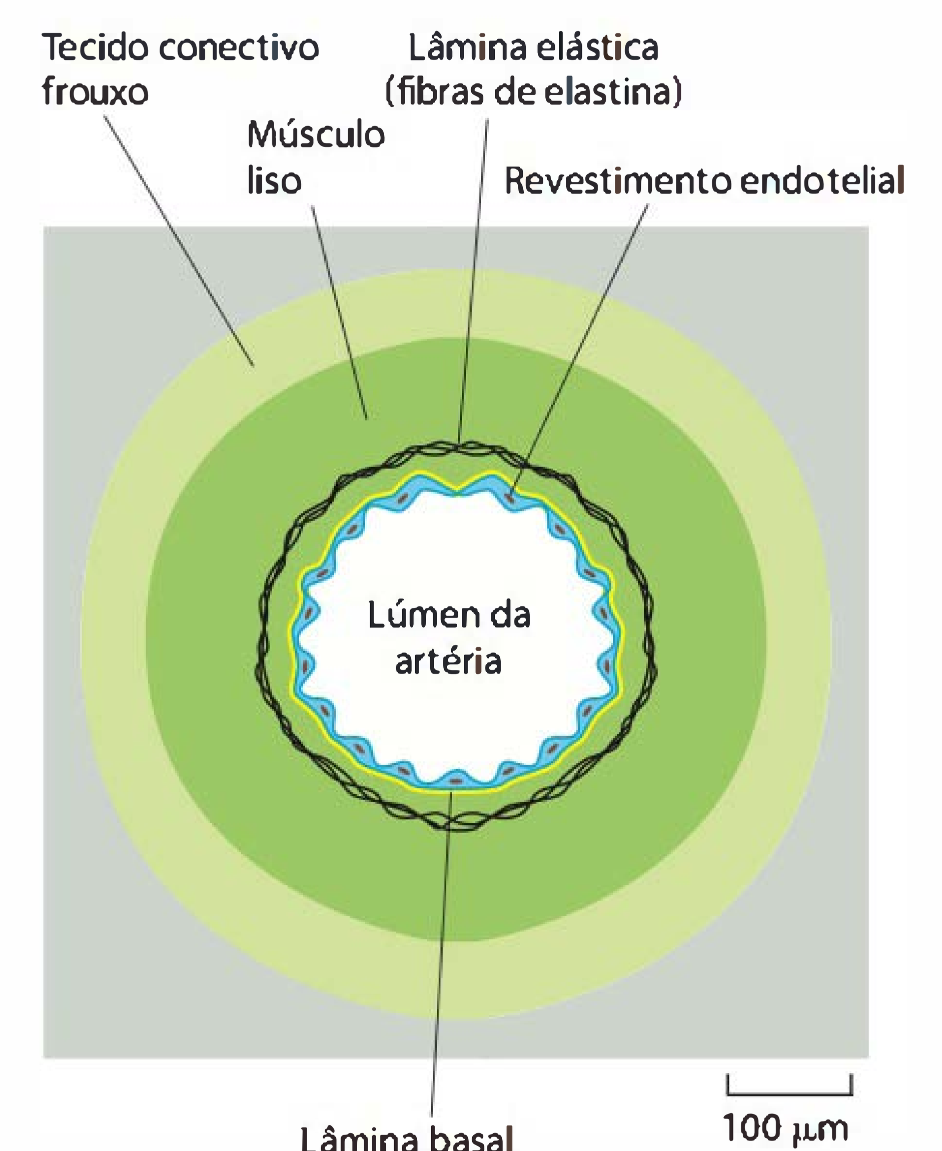


Figura 23-30 Esquema de uma artéria pequena em corte transversal. As células endoteliais, embora imperceptíveis, são o componente fundamental. Comparar com o capilar na Figura 23-31.

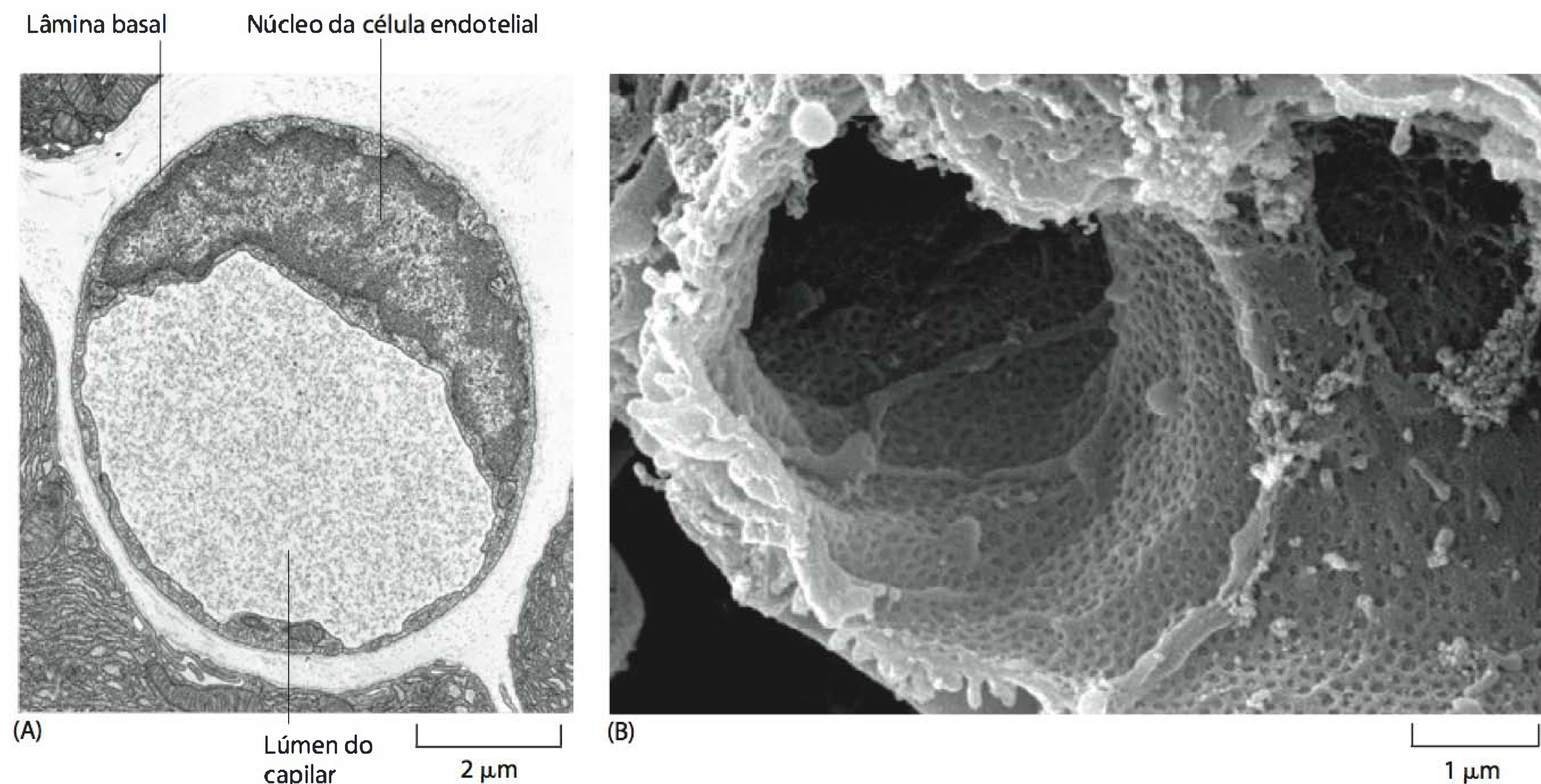


Figura 23-31 Capilares. (A) Eletromicrografia de um corte transversal de um capilar pequeno no pâncreas. A parede é formada por uma única célula endotelial circundada por uma lâmina basal. (B) Eletromicrografia de varredura do interior de um capilar em um glomérulo do rim, onde ocorre filtração do sangue para produzir urina. Aqui, como no fígado (ver Figura 23-28), as células endoteliais são especializadas para formar uma estrutura em forma de peneira, com fenestras, organizadas de forma bastante parecida com os poros no envelope nuclear das células eucarióticas, permitindo que a água e a maioria das moléculas passem livremente para fora da corrente sanguínea. (A, de R. P. Bolender, J. Cell Biol. 61:269-287, 1974. Com permissão de The Rockefeller University Press; B, cortesia de Steve Gschmeissner e David Shima.)

Menos evidentes que os vasos sanguíneos são os vasos linfáticos. Estes não transportam sangue e têm paredes muito mais delgadas e mais permeáveis que os vasos sanguíneos. Eles proporcionam um sistema de drenagem para o fluido (linfa) que filtra para fora dos vasos sanguíneos, bem como uma via de saída para células brancas do sangue que tenham migrado dos vasos sanguíneos para dentro dos tecidos. Infelizmente, muitas vezes eles também fornecem a via pela qual células de câncer escapam de um tumor primário para invadir outros tecidos. Os linfáticos formam um sistema ramificado de afluentes, todos drenando, finalmente, para dentro de um único grande vaso linfático, o ducto torácico, que se abre em uma grande veia, próxima ao coração. Da mesma forma que os vasos sanguíneos, os linfáticos são revestidos com células endoteliais.

Dessa forma, as células endoteliais revestem o sistema vascular sanguíneo e linfático inteiro, desde o coração até os menores capilares, e controlam a passagem de materiais – e o trânsito de células brancas do sangue – para dentro e para fora da corrente sanguínea. Artérias, veias e linfáticos desenvolvem-se todos a partir de vasos pequenos constituídos unicamente de células endoteliais e de lâmina basal: o tecido conectivo e o músculo liso são adicionados mais tarde, quando necessário, sob influência de sinais provenientes das células endoteliais.

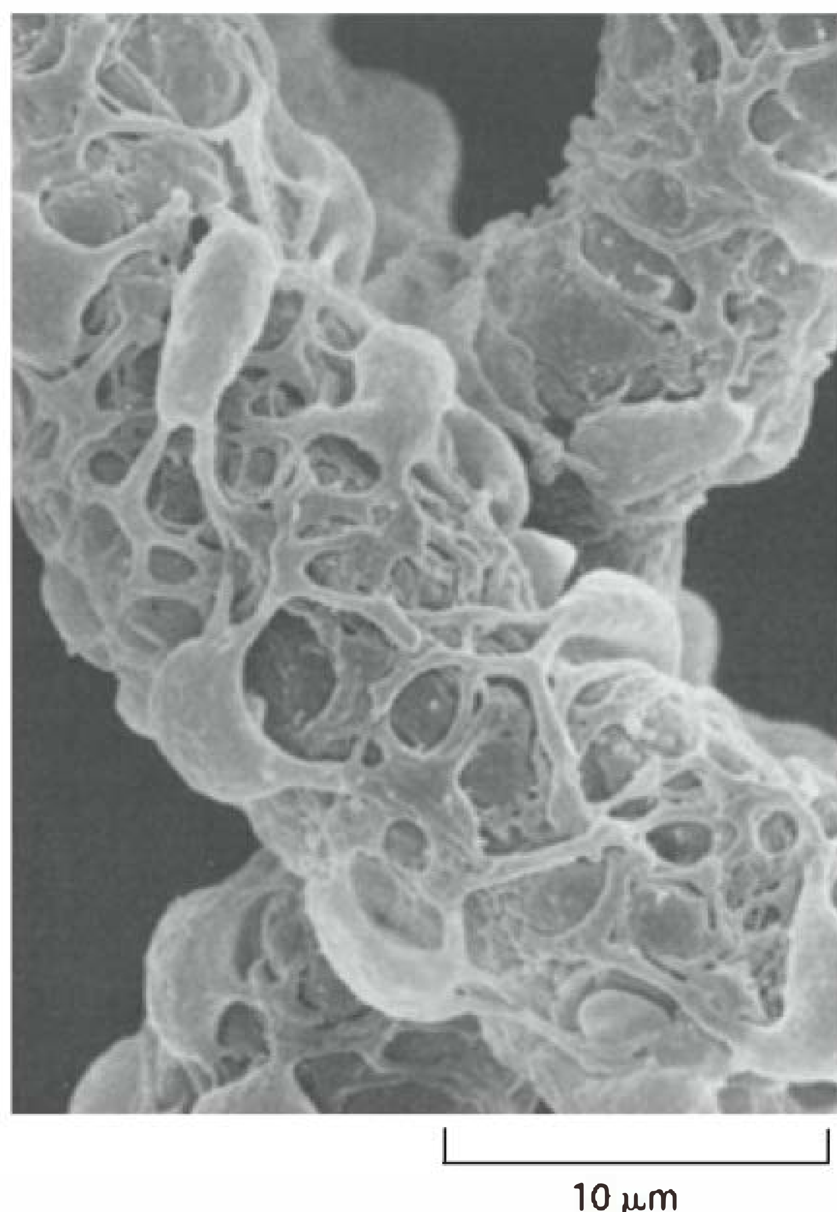


Figura 23-32 Pericitos. A eletromicrografia de varredura mostra pericitos envolvendo seus processos em torno de um vaso sanguíneo pequeno (uma vênula pós-capilar) na glândula mamária de uma gata. Pericitos estão presentes também em torno de capilares, porém distribuídos de forma muito mais esparsa. (De T. Fujiwara e Y. Uehara, Am. J. Anat. 170:39-54, 1984. Com permissão de Wiley-Liss.)

Extremidades de células endoteliais abrem caminho para a angiogênese

Para compreender como o sistema vascular se forma dentro do indivíduo e como ele se adapta às alterações de necessidades de tecidos, temos que entender as células endoteliais. Como elas tornam-se tão amplamente distribuídas, e como elas formam canais que se associam exatamente na forma adequada para o sangue circular através dos tecidos e para a linfa drenar de volta para a corrente sanguínea?

Células endoteliais são originadas em locais específicos no embrião precoce a partir de precursoras que também dão origem a células do sangue. A partir destes locais, as células endoteliais embrionárias precoces migram, proliferam e se diferenciam para formar os primeiros rudimentos de vasos sanguíneos – um processo chamado de *vasculogênese*. O crescimento e a ramificação subsequentes dos vasos por todo o corpo ocorrem, principalmente, por proliferação e movimento das células endoteliais destes primeiros vasos, em um processo chamado de **angiogênese**.

A angiogênese ocorre de uma maneira muito semelhante no organismo jovem enquanto ele cresce e no adulto durante o reparo e a remodelação de tecido. Podemos observar o comportamento das células em estruturas naturalmente transparentes, como a córnea do

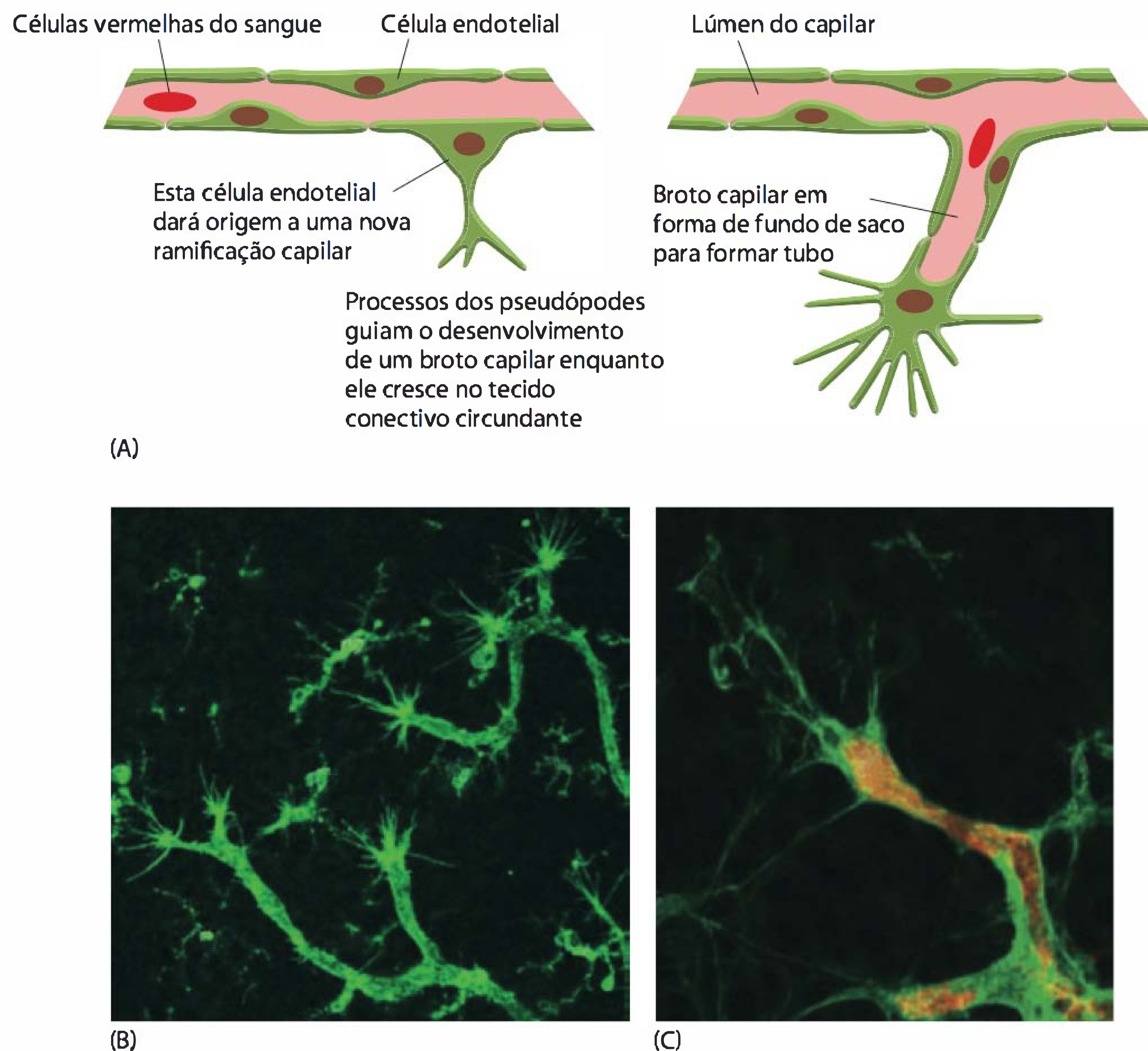


Figura 23-33 Angiogênese. (A) Um novo capilar sanguíneo se forma pelo brotamento de uma célula endotelial a partir da parede de um pequeno vaso existente. Uma célula endotelial da extremidade, com muitos filopódios, guia o avanço de cada broto capilar. As células endoteliais da haste seguem atrás da célula da extremidade e tornam-se ocas para formar um tubo com lúmen interno. (B) Capilares sanguíneos brotando na retina de um camundongo embrionário. (C) Uma amostra semelhante, mas com um corante vermelho injetado na corrente sanguínea para revelar o lúmen do capilar se abrindo atrás da célula da extremidade. (B e C, de H. Gerhardt et al., J. Cell Biol. 161:1163-1177, 2003. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

olho ou a barbatana de um girino, ou em tecido em cultivo, ou no embrião. A retina embrionária, a qual os vasos sanguíneos invadem de acordo com um horário previsto, é um exemplo conveniente para estudo experimental. Cada vaso novo origina-se como um broto capilar do lado de um capilar existente ou pequena vênula (**Figura 23-33**A). Na extremidade do broto, abrindo caminho, está uma célula endotelial com um caráter distinto. Esta *célula da extremidade* tem um padrão de expressão gênica um tanto diferente daquele das células endoteliais da haste que seguem atrás dela, e enquanto elas se dividem, ela não o faz; mas a característica mais surpreendente da célula da extremidade é que ela estende muitos processos longos chamados de filopódios, que parecem com aqueles de um cone de crescimento neuronal (Figura 23-33B). As células da haste, entretanto, tornam-se encavadas e ocas para formar um lúmen (ver Figura 23-33A). Pode-se observar este processo no embrião transparente de peixe-zebra: as células individuais desenvolvem vacúolos internos que associam-se àqueles de suas vizinhas para criar um tubo multicelular contínuo.

As células endoteliais da extremidade que abrem caminho para o crescimento de capilares normais não apenas parecem com cones de crescimento neuronal, mas também respondem de forma semelhante aos sinais no ambiente. De fato, muitas das mesmas moléculas de controle estão envolvidas, incluindo semaforinas, netrinas, slits e efrinas, juntamente com os receptores correspondentes, que são expressos nas células da extremidade e guiam o broto vascular ao longo de vias específicas no embrião, frequentemente em paralelo com nervos. Porém, talvez a molécula de controle mais importante para as células endoteliais seja uma que está dedicada especificamente ao controle do desenvolvimento vascular: o *fator de crescimento endotelial vascular* (*VEGF*, *vascular endothelial growth factor*). Teremos mais a falar sobre isso a seguir.

Tipos diferentes de células endoteliais formam tipos diferentes de vasos

Para criar um circuito novo para fluxo de sangue, um broto vascular deve continuar a crescer até encontrar outro broto ou vaso com o qual ele possa conectar-se. Provavelmente, as regras de conexão têm de ser seletivas, para evitar a formação de circuitos curtos indesejáveis e para manter os sistemas sanguíneo e linfático adequadamente separados. Na verdade, células endoteliais de vasos arteriais, venosos e linfáticos em desenvolvimento expressam genes diferentes e têm propriedades de superfície diferentes. Evidentemente, essas diferenças ajudam a orientar os vários tipos de vasos ao longo de diferentes vias, controlam a

formação seletiva de conexões e dirigem o desenvolvimento de diferentes tipos de paredes à medida que o vaso aumenta. Por exemplo, as células endoteliais arteriais, ao menos no embrião, expressam a proteína transmembrana efrinaB2, enquanto as células endoteliais venosas expressam a proteína receptora correspondente, EphB4 (discutido no Capítulo 15). Estas moléculas medeiam a sinalização em locais de contato célula-célula e são essenciais ao desenvolvimento de uma rede de vasos corretamente organizada.

A expressão da proteína reguladora de gene Prox1 distingue as células endoteliais de vasos linfáticos das células endoteliais arteriais e venosas. Este gene ativa um subgrupo de células endoteliais na parede de uma grande veia no embrião (a veia cardinal), convertendo-as em progenitoras linfáticas. A partir destas, toda a vascularização linfática deriva-se por brotamento, como descrito anteriormente. A Prox1 faz as células endoteliais linfáticas expressarem receptores para um membro diferente da família VEGF de moléculas de controle, bem como proteínas que evitam que as células linfáticas formem conexões com vasos sanguíneos.

Tecidos que necessitam de um suprimento de sangue liberam VEGF; a sinalização Notch entre células endoteliais regula a resposta

Quase todas as células, em quase todos os tecidos de um vertebrado, estão localizadas a 50 a 100 μm de um capilar sanguíneo. Que mecanismo assegura que o sistema de vasos sanguíneos ramifique para todas as direções? Como está ajustado de forma tão perfeita às necessidades locais dos tecidos, não apenas durante o desenvolvimento normal, mas também em todos os tipos de circunstâncias patológicas? Um ferimento, por exemplo, induz um grande e repentino crescimento de capilares nas vizinhanças da lesão para satisfazer as altas exigências metabólicas do processo de reparo (**Figura 23-34**). Os irritantes e as infecções locais também causam uma proliferação de novos capilares, a maioria dos quais regride e desaparece quando a inflamação diminui. De forma menos benigna, uma amostra pequena do tecido de um tumor implantado na córnea, que normalmente não apresenta vasos sanguíneos, faz com que os vasos sanguíneos cresçam rapidamente na direção do implante a partir da margem vascular da córnea; a taxa de crescimento do tumor aumenta bruscamente, assim que os vasos chegam a ele.

Em todos esses casos, as células endoteliais invasoras respondem a sinais produzidos pelo tecido que elas invadem. Os sinais são complexos, mas um papel-chave é desempenhado pelo **fator de crescimento endotelial vascular** (**VEGF**), um parente distante do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF, *platelet-derived growth factor*). A regulação de crescimento do vaso sanguíneo, para corresponder às necessidades do tecido, depende do controle de produção de VEGF, por meio de mudanças na estabilidade de seu mRNA e em sua taxa de transcrição. O último controle é relativamente bem-compreendido. Uma falta de oxigênio, em praticamente qualquer tipo de célula, causa um aumento na concentração intracelular de uma proteína reguladora de gene chamada de **fator 1α induzido por hipoxia** (**HIF1α**, *hypoxia-inducible factor 1α*). O HIF1α estimula a transcrição do gene *Vegf* (e de outros genes cujos produtos são necessários quando o suprimento de oxigênio está baixo). A proteína VEGF é secretada, difunde-se através do tecido (com isoformas diferentes de VEGF difundindo-se a extensões diferentes) e atua sobre as células endoteliais próximas, estimulando-as a proliferar, a produzirem proteases para ajudá-las a digerir seu caminho através da lâmina basal do capilar, ou da vênula de origem, e a formar brotos. As células da extremidade dos brotos detectam

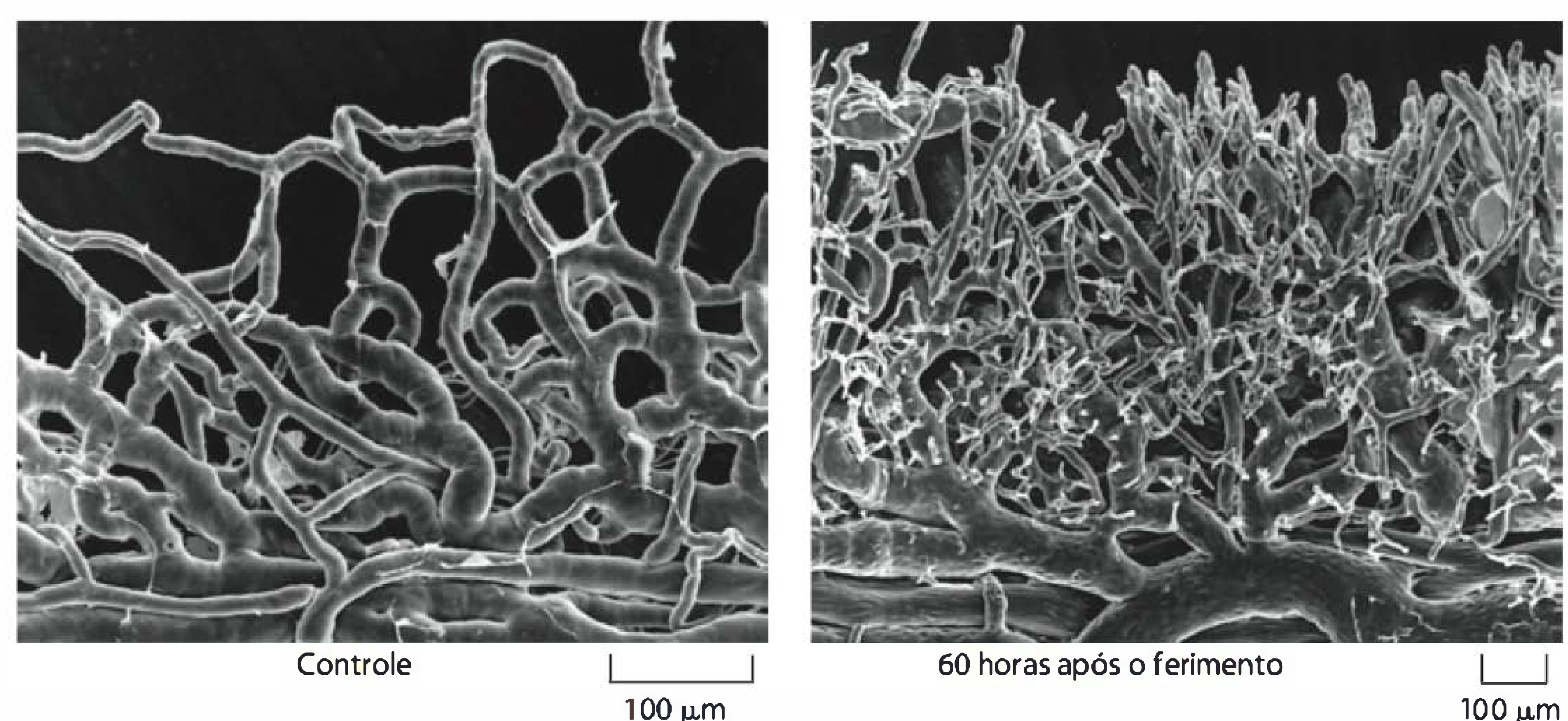


Figura 23-34 **Formação de novo capilar em resposta a ferimento.** A eletromicrografia de varredura dos moldes do sistema de vasos sanguíneos que circundam a margem da córnea mostra a reação ao ferimento. Os moldes são feitos injetando uma resina dentro dos vasos e deixando-a solidificar; isto revela a forma do lúmen como oposta à forma das células. Sessenta horas após o ferimento, muitos capilares novos tinham começado a brotar em direção ao lado da lesão, que está exatamente acima da parte superior da imagem. Seu supercrescimento orientado reflete uma resposta quimiotática das células endoteliais a um fator angiogênico liberado na ferida. (Cortesia de Peter C. Burger.)

o gradiente de VEGF e movem-se na direção da fonte deste. (Outros fatores de crescimento, incluindo alguns membros da família do fator de crescimento de fibroblasto, também podem estimular a angiogênese, mediando reações para outras condições, como a inflamação.)

Quando os novos vasos se formam, trazendo sangue para o tecido, a concentração de oxigênio se eleva, a atividade de HIF1α diminui, a produção de VEGF é encerrada, e a angiogênese chega ao fim (**Figura 23-35**). Como em todos os sistemas de sinalização, é tão importante ligar o sinal corretamente, como desligá-lo. No tecido normal bem-oxigenado, a degradação contínua da proteína HIF1α mantém a concentração de HIF1α baixa: na presença de oxigênio, uma enzima que necessita de oxigênio modifica HIF1α de modo que ela seja alvo para degradação. A degradação, por sua vez, requer o produto de outro gene, que codifica para uma subunidade ligase ubiquitina E3, que está defeituoso em uma disfunção rara, chamada de *síndrome de von Hippel-Lindau* (*VHL*). As pessoas com esta doença nascem com apenas uma cópia funcional do gene *Vhl*; as mutações que ocorrem ao acaso depois no organismo dão origem a células com as duas cópias defeituosas do gene. Estas células contêm grandes quantidades de HIF1, apesar da disponibilidade de oxigênio, desencadeando a superprodução contínua de VEGF. O resultado é o desenvolvimento de *hemangioblastomas*, tumores que contêm massas densas de vasos sanguíneos. As próprias células mutantes que produzem o VEGF são, aparentemente, encorajadas a proliferar pela nutrição demasiadamente rica proporcionada pelo excesso de vasos sanguíneos, criando um ciclo vicioso que promove o crescimento do tumor. A perda do produto do gene *Vhl* (a proteína VHL) também dá origem a outros tumores, assim como hemangioblastomas, por mecanismos que podem ser independentes dos efeitos sobre a angiogênese.

Contudo, esta não é toda a história de como a angiogênese é controlada. O VEGF e outros fatores relacionados do tecido-alvo são essenciais para estimular e dirigir a angiogênese, mas interações entre uma célula endotelial e outra, mediadas pela via de sinalização Notch, também têm uma função crítica. Estas interações controlam quais células serão escolhidas para comportarem-se como células da extremidade, estendendo filopódios e arrastando-se à frente para criar novos brotos vasculares, e elas são necessárias para conduzir este comportamento móvel a uma parada no momento em que ele deve cessar. Dessa forma, quando brotos endoteliais se encontram e se juntam para formar um circuito vascular, eles normalmente se inibem para reduzir suas atividades de brotamento. O efeito depende de um ligante de Notch específico, chamado de Delta4, que é expresso na célula da extremidade e ativa Notch em suas vizinhas; a ativação de Notch leva à expressão reduzida de receptores VEGF, fazendo com que as células vizinhas da célula da extremidade não respondam ao VEGF. Em mutantes nos quais a sinalização Notch é defeituosa, o comportamento de brotamento continua de forma inapropriada e deixa de ser restrito às células da extremidade. O resultado é uma rede excessivamente densa de vasos mal-organizados, não-funcionais, que transportam pouco ou nenhum sangue.

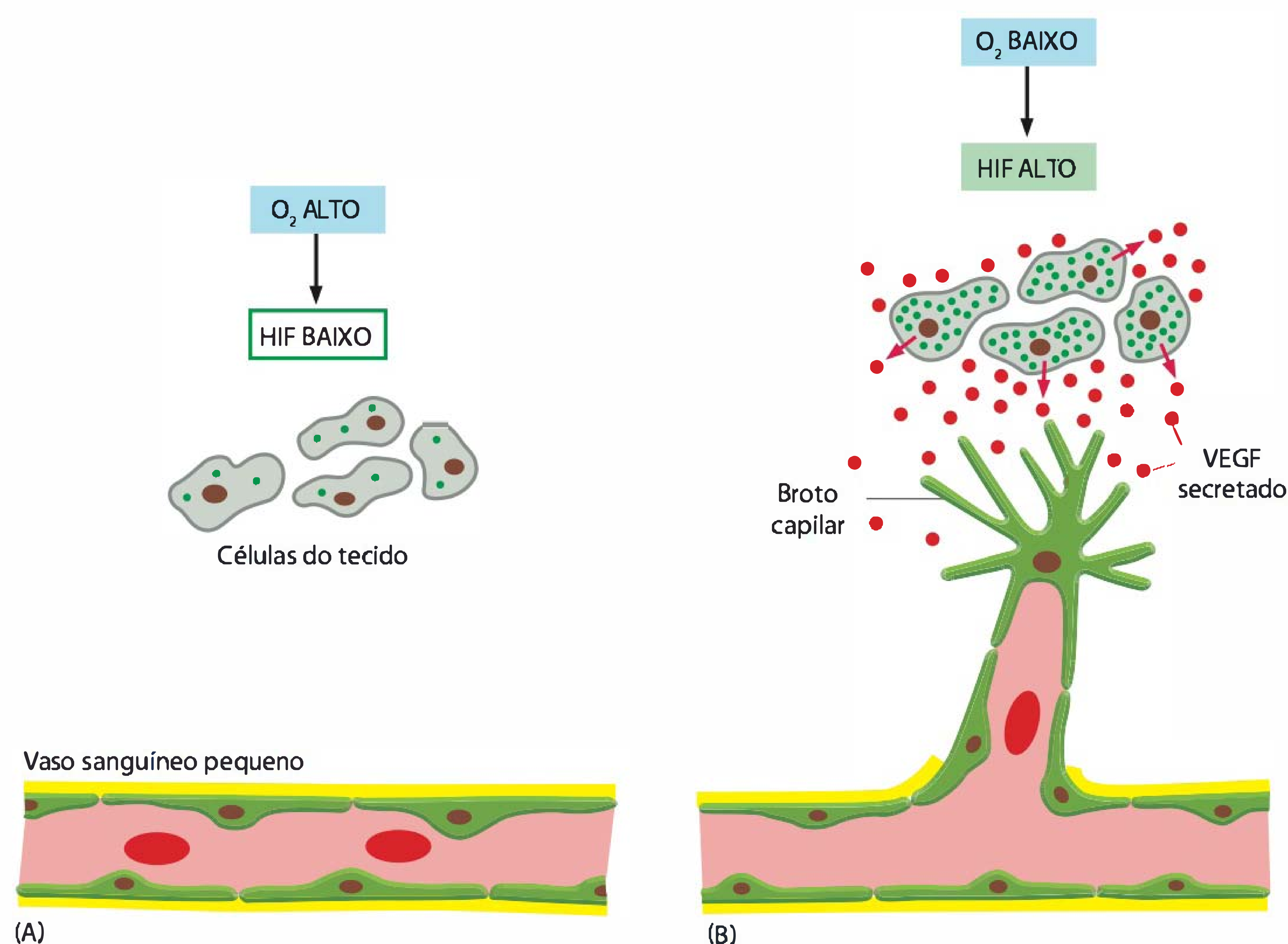


Figura 23-35 O mecanismo regulador que controla o crescimento do vaso sanguíneo conforme a necessidade do tecido por oxigênio. A falta de oxigênio desencadeia a secreção de VEGF, que estimula a angiogênese.

Sinais das células endoteliais controlam o recrutamento de pericitos e células musculares lisas para formar a parede do vaso

A rede vascular é remodelada continuamente enquanto ela cresce e se adapta. Um vaso recém-formado pode engrossar; ou pode brotar ramos laterais; ou pode regredir. As próprias células musculares lisas ou de outros tecidos conectivos que formam uma camada em torno do endotélio (ver Figura 23-32) ajudam a estabilizar os vasos enquanto eles aumentam. Este processo de formação da parede do vaso inicia com o recrutamento de pericitos. Um número pequeno destas células migra em companhia das células da haste, pela parte externa de cada broto endotelial. O recrutamento e a proliferação de pericitos e células musculares lisas para formar uma parede de vaso depende da PDGF-B secretada pelas células endoteliais e dos receptores de PDGF nos pericitos e nas células musculares lisas. Em mutantes nos quais falta essa proteína-sinal ou seu receptor, estas células da parede do vaso estão ausentes em muitas regiões. Como resultado, os vasos sanguíneos embrionários desenvolvem microaneurismas – dilatações patológicas microscópicas – que eventualmente se rompem, assim como outras anormalidades, que refletem a importância da troca de sinais em ambas as direções entre as células externas da parede do vaso e as células endoteliais.

Uma vez que um vaso tenha amadurecido, os sinais das células endoteliais para o tecido conectivo e o músculo liso circundante continuam a regular a função e a estrutura do vaso. Por exemplo, as células endoteliais têm mecanorreceptores que lhes permitem perceber a tensão próxima devido ao fluxo de sangue sobre sua superfície. As células reagem pela produção e liberação do gás óxido nítrico (NO, *nitric oxide*), sinalizando, dessa forma, para as células vizinhas e induzindo alterações no diâmetro do vaso e na espessura da parede para acomodar o fluxo de sangue. As células endoteliais também medeiam respostas rápidas aos sinais nervosos para a dilatação dos vasos sanguíneos, por liberação de NO para fazer o músculo liso relaxar na parede do vaso, como discutido no Capítulo 15.

Resumo

As células endoteliais são os elementos fundamentais do sistema vascular. Elas formam uma camada celular única que reveste todos os vasos sanguíneos e linfáticos e regula as trocas entre a corrente sanguínea e os tecidos vizinhos. Os vasos novos se originam como brotos endoteliais a partir das paredes de pequenos vasos existentes. Uma célula endotelial móvel e especializada da extremidade direciona a margem de cada broto, estendendo filopódios que respondem a gradientes de moléculas de controle no ambiente, levando ao crescimento do broto de forma semelhante ao crescimento do cone de um neurônio. As células endoteliais da haste, seguindo atrás, tornam-se encavadas e ocas para formar um tubo capilar. As células endoteliais de artérias, veias e linfáticos em desenvolvimento expressam proteínas de superfície celular diferentes, que podem controlar a maneira pela qual elas se juntam para criar uma rede vascular. Os sinais das células endoteliais organizam o crescimento e o desenvolvimento das células do tecido conectivo que formam as camadas circundantes da parede do vaso.

Um mecanismo homeostático assegura que os vasos sanguíneos penetrem cada região do corpo. As células que são pobres em oxigênio aumentam sua concentração do fator 1α induzido por hipoxia (HIF1α), que estimula a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF atua sobre as células endoteliais, fazendo-as proliferar e invadir o tecido pouco oxigenado para supri-lo com vasos sanguíneos novos. As células endoteliais também interagem umas com as outras pela via Notch. Esta troca de sinais Notch é necessária para limitar o número de células que se comporta como célula da extremidade e parar o comportamento angiogênico quando células da extremidade se encontram.

RENOVAÇÃO POR CÉLULAS-TRONCO MULTIPOTENTES: FORMAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE

O sangue contém muitos tipos de células com funções que variam desde o transporte de oxigênio à produção de anticorpos. Algumas dessas células permanecem dentro do sistema vascular, enquanto outras usam o sistema vascular apenas como um meio de transporte e desempenham sua função em outro local. Entretanto, todas as células sanguíneas têm certas semelhanças em sua história de vida. Todas elas têm um tempo de vida limitado e são produzidas por toda a vida do animal. Notavelmente, todas são produzidas, em última análise, a

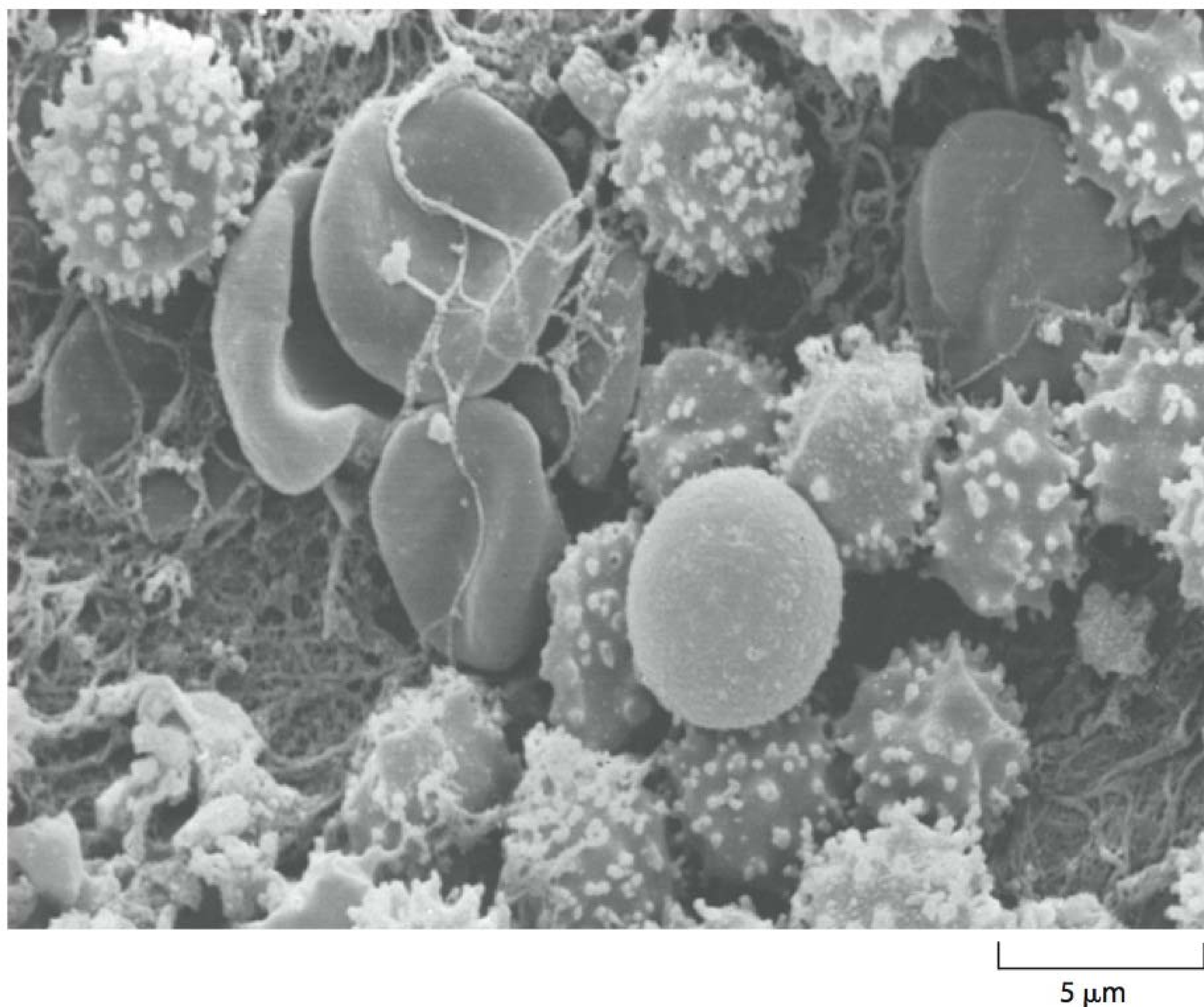


Figura 23-36 Eletromicrografia de varredura de células do sangue de mamífero presas em um coágulo sanguíneo. As células maiores, mais esféricas, com uma superfície áspera, são células sanguíneas brancas; as células mais lisas e achatadas são células vermelhas do sangue. (Cortesia de Ray Moss.)

partir de uma célula-tronco comum, na medula óssea. Assim, esta *célula-tronco hemopoiética* (que forma sangue, também chamada de *hematopoiética*) é multipotente, dando origem a todos os tipos de células sanguíneas diferenciadas definitivas, assim como a alguns outros tipos de células, como os osteoclastos no osso, que discutiremos mais tarde.

As células sanguíneas podem ser classificadas como vermelhas ou brancas (**Figura 23-36**). As **células vermelhas do sangue**, ou **eritrócitos** (hemácias), permanecem dentro dos vasos sanguíneos e transportam O_2 e CO_2 ligados à hemoglobina. As **células brancas do sangue**, ou **leucócitos**, combatem infecções e, em alguns casos, realizam a fagocitose e a digestão de detritos. Os leucócitos, ao contrário dos eritrócitos, devem abrir seu caminho atravessando as paredes de pequenos vasos sanguíneos e migrar para os tecidos para desempenhar suas tarefas. Além disso, o sangue contém grande número de **plaquetas**, que não são células inteiras, mas pequenos fragmentos celulares soltos, ou "minicélulas", derivados do citoplasma de células grandes chamadas de *megacariócitos*. As plaquetas se aderem especificamente ao revestimento celular endotelial de vasos sanguíneos lesados, onde ajudam no reparo de rupturas e auxiliam no processo de coagulação sanguínea.

As três principais categorias de células brancas do sangue são granulócitos, monócitos e linfócitos

Todas as células vermelhas do sangue permanecem em uma única classe, seguindo a mesma trajetória de desenvolvimento enquanto amadurecem, e o mesmo é verdade para as plaquetas; contudo há muitos tipos distintos de células brancas do sangue. As células brancas do sangue tradicionalmente estão agrupadas em três categorias principais – granulócitos, monócitos e linfócitos – com base na sua aparência à microscopia óptica.

Os **granulócitos** contêm numerosos lisossomos e vesículas secretoras (ou grânulos) e estão subdivididos em três classes, de acordo com a morfologia e as propriedades de coloração dessas organelas (**Figura 23-37**). As diferenças na coloração refletem as principais diferenças químicas e de função. Os *neutrófilos* (também chamados de *leucócitos polimorfonucleares* por causa de seus núcleos multilobulados) são o tipo mais comum de granulócitos; eles fagocitam e destroem os micro-organismos, especialmente as bactérias, e dessa forma têm um papel-chave na imunidade inata à infecção bacteriana, como discutido no Capítulo 25. Os *basófilos* secretam histamina (e, em algumas espécies, serotonina), que auxilia a mediar a reação inflamatória; eles estão intimamente relacionados aos mastócitos, que se localizam no tecido conectivo, mas também são gerados pelas células-tronco hemopoiéticas. Os *eosinófilos* auxiliam a destruir os parasitas e modulam as respostas inflamatórias alérgicas.

Uma vez que eles tenham deixado a corrente sanguínea, os **monócitos** (ver Figura 23-37D) amadurecem, tornando-se **macrófagos**, que, juntamente com os neutrófilos, são as principais "células fagocitárias profissionais" no organismo. Como discutido no Capítulo 13,

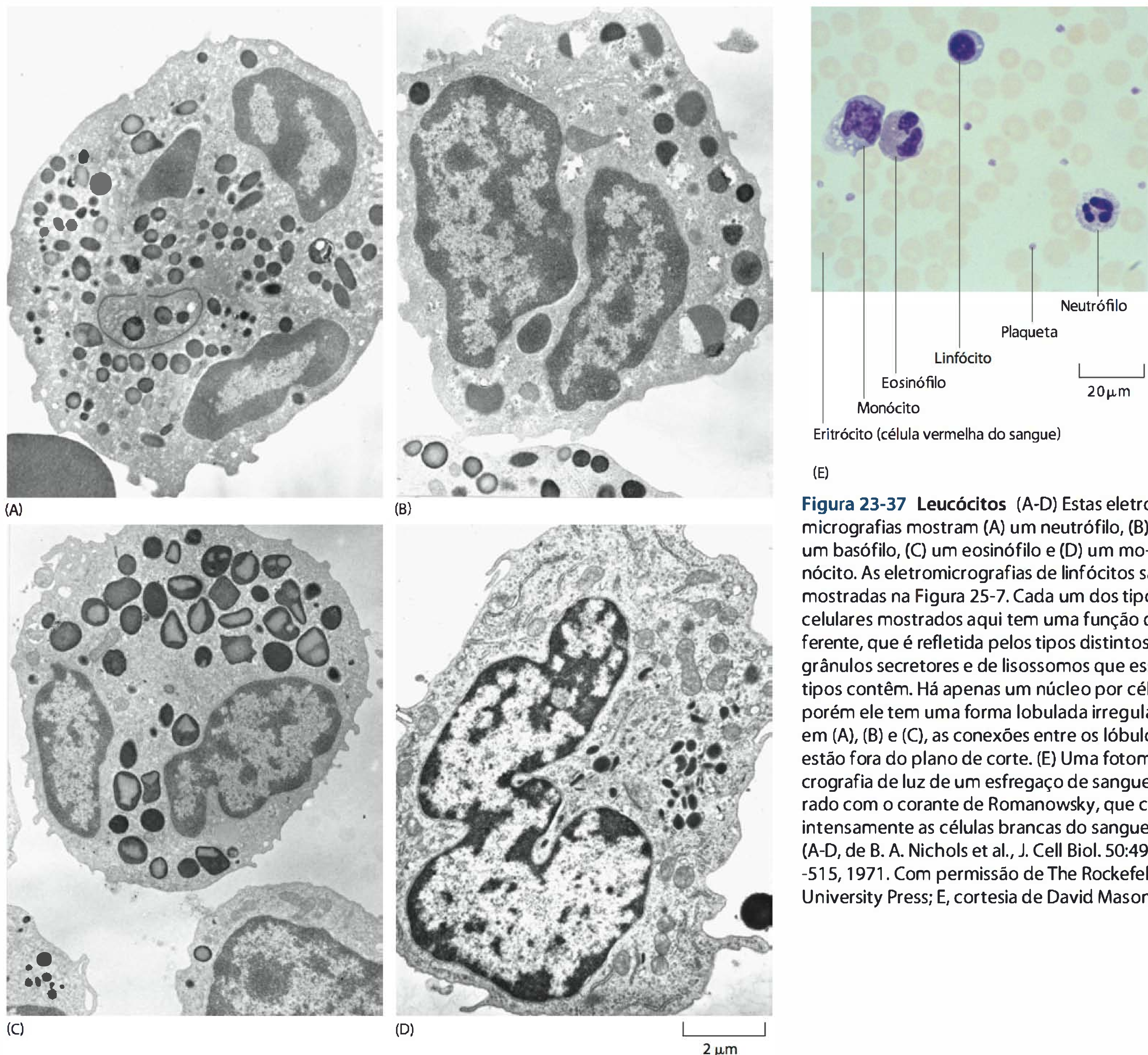


Figura 23-37 Leucócitos (A-D) Estas eletromicrografias mostram (A) um neutrófilo, (B) um basófilo, (C) um eosinófilo e (D) um monócito. As eletromicrografias de linfócitos são mostradas na Figura 25-7. Cada um dos tipos celulares mostrados aqui tem uma função diferente, que é refletida pelos tipos distintos de grânulos secretores e de lisossomos que esses tipos contêm. Há apenas um núcleo por célula, porém ele tem uma forma lobulada irregular e, em (A), (B) e (C), as conexões entre os lóbulos estão fora do plano de corte. (E) Uma fotomicrografia de luz de um esfregaço de sangue corado com o corante de Romanowsky, que cora intensamente as células brancas do sangue. (A-D, de B. A. Nichols et al., J. Cell Biol. 50:498--515, 1971. Com permissão de The Rockefeller University Press; E, cortesia de David Mason.)

ambos os tipos de células fagocitárias contêm lisossomos especializados que se fundem a vesículas fagocitárias recém-formadas (fagossomos), expondo os micro-organismos fagocitados a uma enxurrada, produzida enzimaticamente, de moléculas altamente reativas de superóxido (O_2^-) e de hipoclorito (HOCl, o ingrediente ativo da água sanitária), assim como ao ataque de uma mistura concentrada de hidrolases lisossomais que se tornam ativas no fagossomo. Entretanto, os macrófagos são muito grandes e vivem mais tempo que os neutrófilos. Eles reconhecem e removem células velhas, mortas e lesadas em muitos tecidos, sendo os únicos aptos a ingerir micro-organismos grandes, tais como protozoários.

Os monócitos também dão origem a *células dendríticas*, como as *células de Langerhans* espalhadas na epiderme. Como os macrófagos, as células dendríticas são células migratórias que podem ingerir substâncias e organismos estranhos; porém, quando ativas elas não têm um apetite por fagocitose e, em vez disso, são especializadas como apresentadoras de antígenos estranhos aos linfócitos, para desencadear uma resposta imune. As células de Langerhans, por exemplo, ingerem antígenos estranhos na epiderme e os transportam de volta para apresentá-los aos linfócitos, nos linfonodos.

Há duas classes principais de **linfócitos**, ambas envolvidas em respostas imunes: os *linfócitos B* produzem anticorpos, enquanto os *linfócitos T* matam as células infectadas por

vírus e regulam as atividades de outras células brancas do sangue. Além disso, há células semelhantes a linfócitos, chamadas de *células matadoras naturais* (*NK, natural killer*), que matam alguns tipos de células tumorais e células infectadas por vírus. A produção de linfócitos é um tópico especializado discutido em detalhes no Capítulo 25. Aqui nos concentraremos principalmente no desenvolvimento de outras células sanguíneas, com frequência classificadas coletivamente como **células mieloides**.

Os vários tipos de células do sangue e suas funções estão resumidos na **Tabela 23-1**.

A produção de cada tipo de célula do sangue na medula óssea é controlada individualmente

A maioria das células sanguíneas brancas funciona em tecidos que não o sangue; o sangue simplesmente as transporta para onde elas são necessárias. Uma infecção ou uma lesão local em qualquer tecido atrai rapidamente as células brancas do sangue para a região afetada como parte da resposta inflamatória, que ajuda a combater a infecção ou a cicatrizar a ferida.

A resposta inflamatória é complexa e é controlada por muitas moléculas-sinal diferentes produzidas no local por mastócitos, terminações nervosas, plaquetas e células brancas do sangue, assim como pela ativação do complemento (discutido nos Capítulos 24 e 25). Algumas dessas moléculas-sinal atuam sobre os capilares vizinhos, fazendo com que as células endoteliais fiquem aderidas de forma menos firme umas às outras, preparando suas superfícies adesivas para a passagem das células brancas do sangue. Assim, as células brancas do sangue prendem-se como insetos sobre um papel mata-moscas podendo então escapar do vaso comprimindo-se entre as células endoteliais e utilizando enzimas de digestão para deslizar através da membrana basal. Como discutido no Capítulo 19, receptores locais chamados de *selectinas* medeiam a ligação inicial às células endoteliais, enquanto a ligação mais forte necessária para que as células brancas do sangue deslizem para fora do vaso sanguíneo

Tabela 23-1 Células do sangue

TIPO DE CÉLULA	FUNÇÕES PRINCIPAIS	CONCENTRAÇÃO TÍPICA NO SANGUE HUMANO (CÉLULAS/LITRO)
Células vermelhas do sangue (eritrócitos)	Transportam O_2 e CO_2	5×10^{12}
Células brancas do sangue (leucócitos)		
Granulócitos		
Neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares)	Fagocitam e destroem bactérias invasoras	5×10^9
Eosinófilos	Destroem parasitas grandes e modulam respostas inflamatórias alérgicas	2×10^8
Basófilos	Liberam histamina (e, em algumas espécies, serotonina) em certas reações imunes	4×10^7
Monócitos	Nos tecidos, tornam-se macrófagos, que fagocitam e digerem micro-organismos e corpos estranhos invasores, assim como células velhas danificadas	4×10^8
Linfócitos		
Células B	Produzem anticorpos	2×10^9
Células T	Matam células infectadas por vírus e regulam atividades de outros leucócitos	1×10^9
Células matadoras naturais (células NK)	Matam células infectadas por vírus e algumas células tumorais	1×10^8
Plaquetas (fragmentos celulares que resultam de *megacariócitos* na medula óssea)	Iniciam a coagulação sanguínea	3×10^{11}

Seres humanos contêm cerca de 5 litros de sangue, que são responsáveis por 7% do peso corporal. Células vermelhas do sangue (eritrócitos) constituem cerca de 45% deste volume e células brancas cerca de 1%, sendo o restante o plasma sanguíneo líquido.

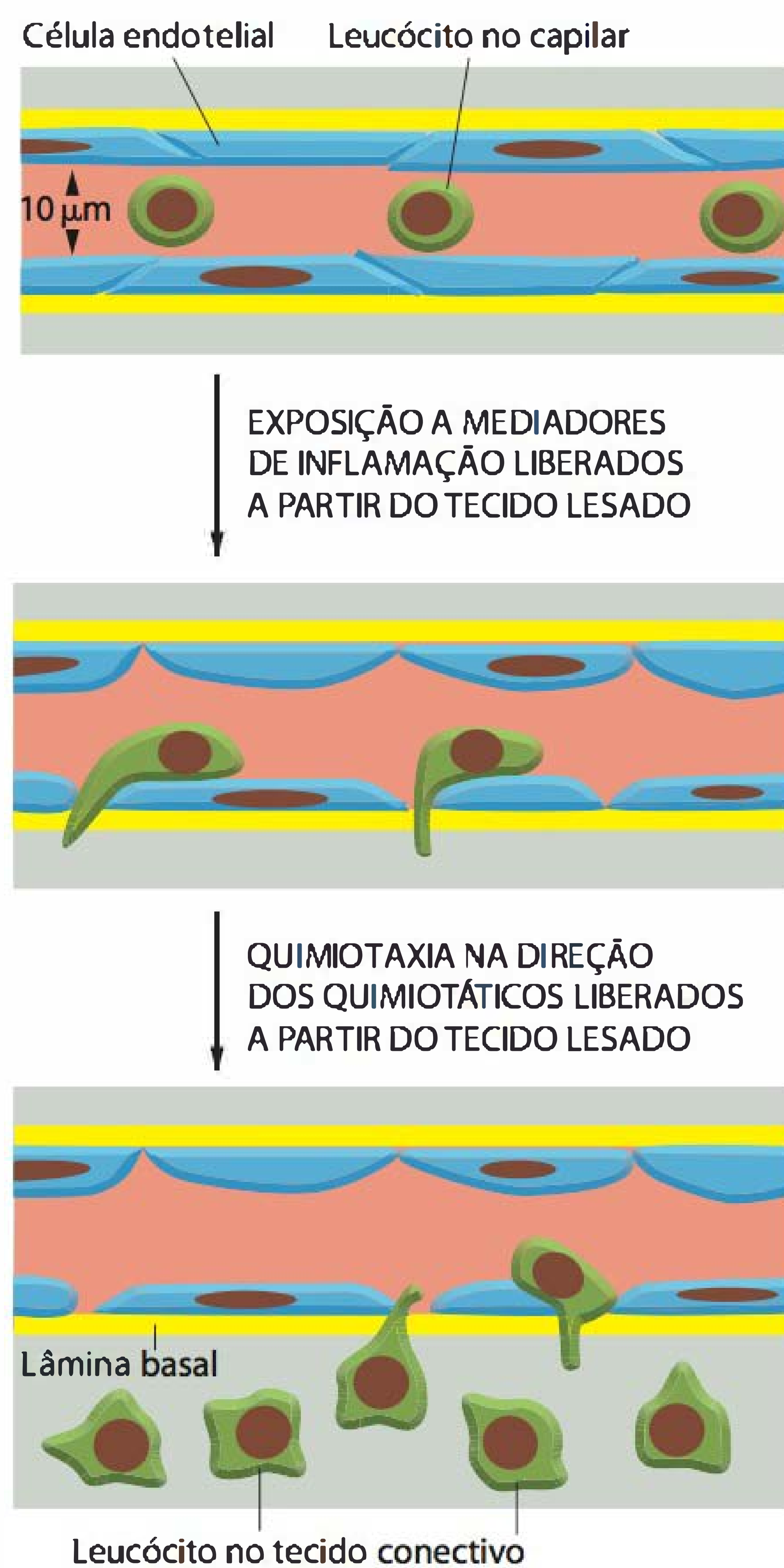


Figura 23-38 A migração de leucócitos para fora da corrente sanguínea, durante uma resposta inflamatória. A resposta é iniciada por moléculas-sinal produzidas por células do local (principalmente no tecido conectivo) ou por ativação do complemento. Alguns destes mediadores atuam sobre as células endoteliais do capilar, fazendo-as afrouxar suas ligações com as células vizinhas, até que os capilares tornem-se mais permeáveis. As células endoteliais também são estimuladas a expressar selectinas, moléculas de superfície celular que reconhecem carboidratos específicos que estão presentes na superfície de leucócitos no sangue e os fazem aderir ao endotélio. Os tecidos inflamados e as células endoteliais locais secretam outros mediadores, chamados de quimiocinas, que atuam como agentes quimiotáticos, fazendo os leucócitos ligados deslizarem entre as células endoteliais para dentro do tecido.

é mediada por *integrinas* (ver Figura 19-19). Tecidos inflamados ou lesados e células endoteliais locais secretam outras moléculas chamadas de *quimiocinas*, que atuam como agentes quimiotáticos para tipos específicos de células brancas do sangue, fazendo-as tornarem-se polarizadas e deslizarem em direção à fonte do agente quimiotático. Como resultado, grande número de células brancas do sangue penetra o tecido afetado (**Figura 23-38**).

Outras moléculas-sinal produzidas durante uma resposta inflamatória migram pelo sangue e estimulam a medula óssea a produzir mais leucócitos e a liberá-los na corrente sanguínea. A medula óssea é o alvo-chave para tal regulação porque, com exceção dos linfócitos e de alguns macrófagos, a maioria dos tipos de células sanguíneas dos mamíferos adultos é produzida apenas na medula óssea. A regulação tende a ser específica para cada tipo celular: por exemplo, algumas infecções bacterianas causam um aumento seletivo dos neutrófilos, enquanto as infecções com alguns protozoários e com outros parasitas causam um aumento seletivo dos eosinófilos. (Por este motivo, os médicos rotineiramente utilizam a contagem diferencial de células brancas do sangue para auxiliar no diagnóstico de infecções e de outras doenças inflamatórias.)

Em outras circunstâncias, a produção de eritrócitos é aumentada seletivamente – por exemplo, nos processos de aclimatação, quando alguém vai viver em altas altitudes, onde o oxigênio é escasso. Dessa forma, a formação de células sanguíneas, ou *hemopoiese* (também chamada de *hematopoiese*), envolve necessariamente controles complexos, os quais regulam a produção de cada tipo de célula sanguínea individualmente para satisfazer as mudanças necessárias. Entender como funcionam esses controles é um problema de grande importância médica.

No organismo animal, é mais difícil de analisar a hemopoiese do que a renovação celular em um tecido, como a epiderme ou o revestimento do intestino, onde uma organização espacial simples e regular torna fácil seguir o processo de renovação e localizar as células-tronco. Os tecidos hemopoiéticos não aparecem de forma tão ordenada. Contudo, as células hemopoiéticas têm uma característica de vida nômade que as torna mais acessíveis ao estudo experimental de outras maneiras. É fácil obter células hemopoiéticas dispersas e transferi-las, sem danos, de um animal para outro. Além disso, a proliferação e a diferenciação de células individuais e sua progênie podem ser observadas e analisadas em cultivo, e numerosos marcadores moleculares distinguem os vários estágios de diferenciação. Por isso, sabe-se mais sobre as moléculas que controlam a produção de células sanguíneas do que sobre aquelas que controlam a produção celular em outros tecidos de mamíferos. Estudos de hemopoiese têm influenciado fortemente os conceitos atuais sobre sistemas de células-tronco em geral.

A medula óssea contém células-tronco hemopoiéticas

Métodos rotineiros de coloração nos permitem reconhecer os diferentes tipos de células sanguíneas e suas precursoras imediatas na medula óssea (**Figura 23-39**). Aqui, estas células estão misturadas umas com as outras, assim como com células adiposas e outras células do estroma (células do tecido conectivo), que produzem uma malha de sustentação delicada de fibras de colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Além disso, o tecido inteiro é ricamente abastecido com vasos sanguíneos de paredes finas, chamados de *seios sanguíneos*, dentro dos quais as novas células sanguíneas são descarregadas. Os **megacariócitos** também estão presentes; estes, ao contrário das outras células sanguíneas, permanecem na medula óssea quando maduros e são uma de suas características mais impressionantes, sendo extraordinariamente grandes (diâmetro acima de 60 μm), com um núcleo altamente po-

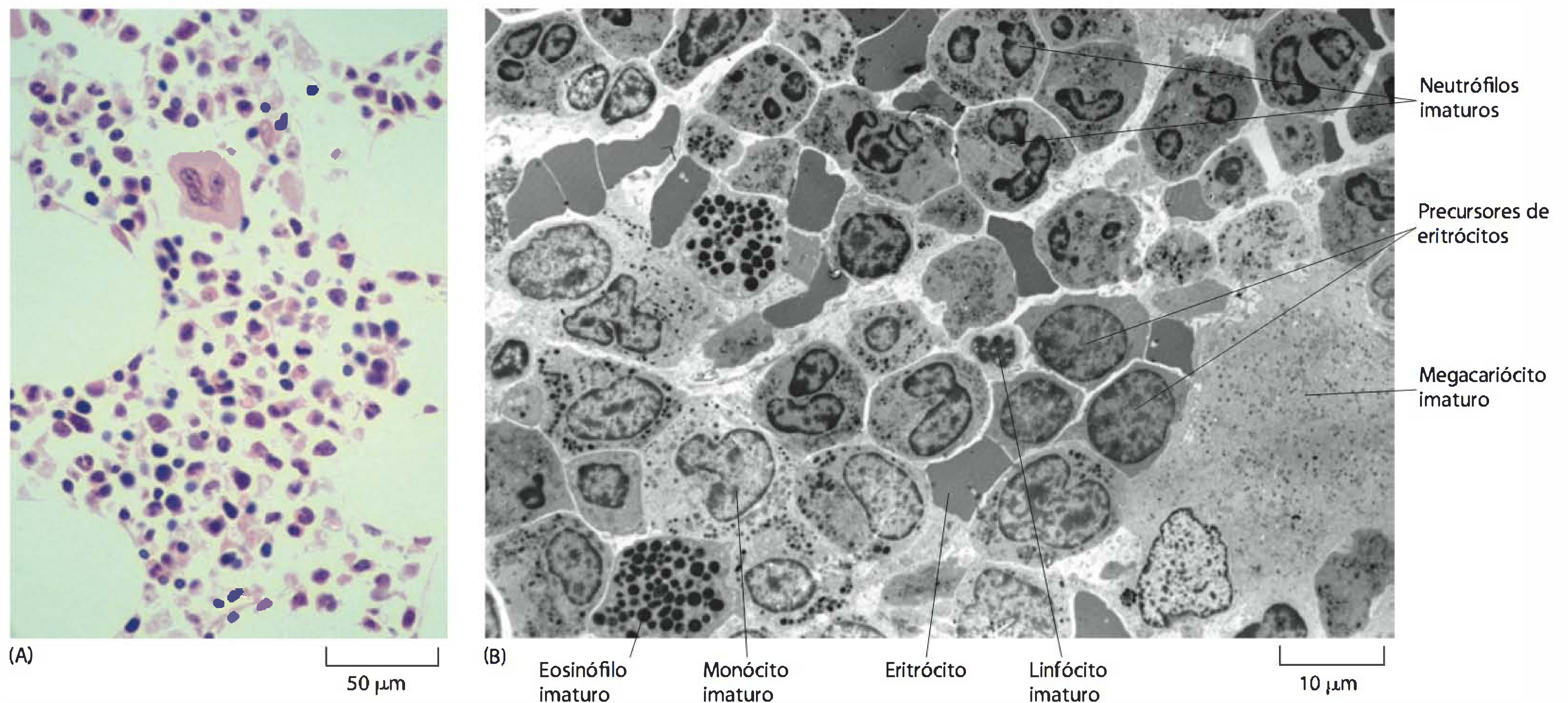


Figura 23-39 Medula óssea. (A) Fotomicrografia óptica de um corte corado. Os grandes espaços vazios correspondem a células adiposas, das quais o conteúdo adiposo dissolveu-se durante a preparação da amostra. A célula gigante com um núcleo lobulado é um megacariócito. (B) Eletromicrografia de baixa magnitude. A medula óssea é a principal fonte de novas células sanguíneas (exceto dos linfócitos T, que são produzidos no timo). Notar que as células sanguíneas imaturas de um tipo particular tendem a agrupar-se em "grupos familiares". (A, cortesia de David Mason; B, de J. A. G. Rhodin, Histology: A Text and Atlas. New York: Oxford University Press, 1974.)

liploide. Normalmente, eles se encontram junto aos seios sanguíneos e estendem processos celulares através de aberturas no revestimento endotelial desses vasos; as plaquetas brotam desses processos e são levadas pelo sangue (**Figura 23-40**).

Em função do arranjo complexo das células na medula óssea, em cortes de tecido normal é difícil identificar quase todas as células, exceto as precursoras imediatas das células sanguíneas maduras. As células que correspondem aos estágios de desenvolvimento ainda precoces, antes que qualquer diferenciação clara tenha iniciado, são muito semelhantes em sua aparência e, embora a distribuição espacial de tipos celulares tenha alguma característica ordenada, não há características óbvias visíveis pelas quais se possa reconhecer as células-tronco principais. Para identificar e caracterizar as células-tronco, é necessário um ensaio funcional, que envolve o rastreamento da progênie de células individuais. Como veremos, isso pode ser feito *in vitro* simplesmente examinando-se as colônias produzidas por células isoladas em cultivo. Contudo, o sistema hemopoiético também pode ser manipulado de forma que tais clones de células possam ser reconhecidos *in vivo* no organismo animal.

Quando um animal é exposto a uma dose grande de raios X, a maior parte das células hemopoiéticas é destruída, e o animal morre dentro de poucos dias como resultado de sua incapacidade de produzir novas células sanguíneas. Entretanto, o animal pode ser salvo por uma transfusão de células coletadas da medula óssea de um doador saudável, imunologi-

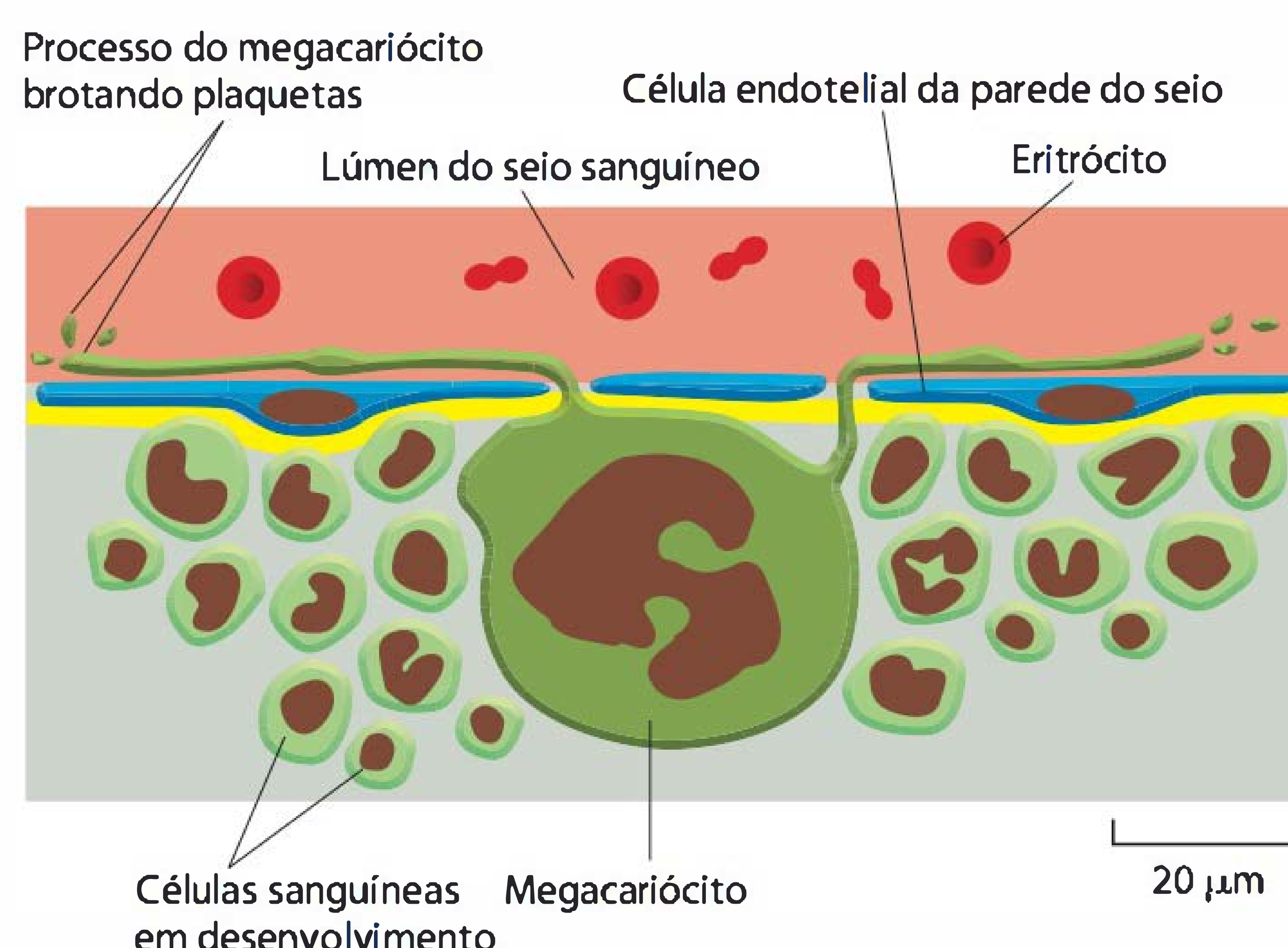


Figura 23-40 Um megacariócito entre outras células na medula óssea. Seu tamanho enorme resulta do fato de ele possuir um núcleo altamente poliploide. Um megacariócito produz cerca de 10 mil plaquetas, que partem dos longos processos celulares que se estendem pelas aberturas nas paredes de um seio sanguíneo adjacente.



Figura 23-41 Salvamento de um camundongo submetido à irradiação por transfusão de células da medula óssea. Um procedimento essencialmente semelhante é utilizado no tratamento de leucemia em pacientes humanos por transplante de medula óssea.

camente compatível. Dentre estas células há algumas que podem colonizar o hospedeiro submetido à irradiação e reabastecê-lo permanentemente com tecido hemopoiético (**Figura 23-41**). Experimentos deste tipo demonstram que a medula óssea contém células-tronco hemopoiéticas. Eles também mostram como podemos analisar a presença de células-tronco hemopoiéticas e, a partir daí, descobrir as características moleculares que as distinguem de outras células.

Para esse propósito, as células coletadas da medula óssea são separadas em grupos (utilizando-se um equipamento que separa células ativadas por fluorescência) de acordo com os antígenos de superfície que elas apresentam, e as frações diferentes são transfundidas para os camundongos submetidos à irradiação. Se uma fração salva um camundongo hospedeiro submetido à irradiação, ela deve conter células-tronco hemopoiéticas. Dessa maneira, tem sido possível mostrar que as células-tronco hemopoiéticas são caracterizadas por uma combinação específica de proteínas de superfície celular e, com a separação apropriada, podemos obter preparações praticamente puras de células-tronco. As células-tronco retiradas são uma minúscula fração da população da medula óssea – cerca de 1 célula em 10.000; mas isto é o suficiente. Uma quantidade tão pequena quanto cinco destas células injetadas em um camundongo hospedeiro com hemopoiese defeituosa é suficiente para reconstituir seu sistema hemopoiético inteiro, originando um conjunto completo de tipos de células sanguíneas, assim como novas células-tronco.

Uma célula-tronco multipotente origina todas as categorias de células sanguíneas

Para acompanhar que variedade de tipos celulares uma única **célula-tronco hemopoiética** pode originar, é necessária uma forma de marcar o destino de sua progênie. Isto pode ser feito por meio da marcação genética individual das células-tronco, de modo que sua progênie pode ser identificada mesmo após as células terem sido liberadas na corrente sanguínea. Embora vários métodos tenham sido utilizados para isso, um retrovírus especialmente modificado (um vetor retrovírus carregando um gene marcado) serve particularmente bem a esse propósito. O vírus marcador, como outros retrovírus, pode inserir seu próprio genoma nos cromossomos das células que ele infecta, mas os genes que permitiriam a ele originar novas partículas de vírus infecciosas foram removidos. Portanto, o marcador está confinado à progênie das células que foram infectadas originalmente, e a progênie de cada uma dessas células pode ser distinguida da progênie de outra, porque os locais de inserção do vírus nos cromossomos são diferentes. Para analisar linhagens de células hemopoiéticas, as células da medula óssea são primeiramente infectadas com o vetor retrovírus *in vitro* e, então, são transferidas para um receptor mortalmente submetido à irradiação; as sondas de DNA podem então ser usadas para encontrar e marcar a progênie de células individuais infectadas nos vários tecidos hemopoiéticos e linfoides do hospedeiro. Estes experimentos mostram que a célula-tronco hemopoiética individual é *multipotente* e pode originar a variedade completa de tipos celulares sanguíneos, tanto mieloides como linfoides, assim como as próprias células-tronco novas (**Figura 23-42**).

Mais adiante neste capítulo, explicaremos como os mesmos métodos que foram desenvolvidos para experimentação em camundongos podem ser agora utilizados para o tratamento de doenças em humanos.

O comprometimento é um processo de etapas sucessivas

As células-tronco hemopoiéticas não saltam diretamente de um estado multipotente para um comprometimento com só uma via de diferenciação; em vez disso, elas passam por uma série de restrições progressivas. A primeira etapa, normalmente, é o comprometimento com um destino mieloide ou um linfoide. Acredita-se que isto dá origem a dois grupos de células progenitoras, uma capaz de gerar um grande número de todos os tipos diferentes de células mieloides, ou talvez de células mieloides mais linfocitos B, e outro capaz de gerar um grande número de todos os tipos diferentes de células linfoides, ou pelo menos os linfocitos T. As etapas seguintes dão origem a progenitoras comprometidas com a produção de apenas um tipo celular. As etapas de comprometimento estão correlacionadas com mudanças na expressão de genes de proteínas reguladoras específicas, necessárias à produção de subgrupos diferentes de células sanguíneas. Estas proteínas parecem atuar de uma maneira combinada complicada: por exemplo, a *proteína GATA1* é necessária para a maturação de células vermelhas do sangue, mas também está ativa em etapas muito precoces da via hemopoiética.

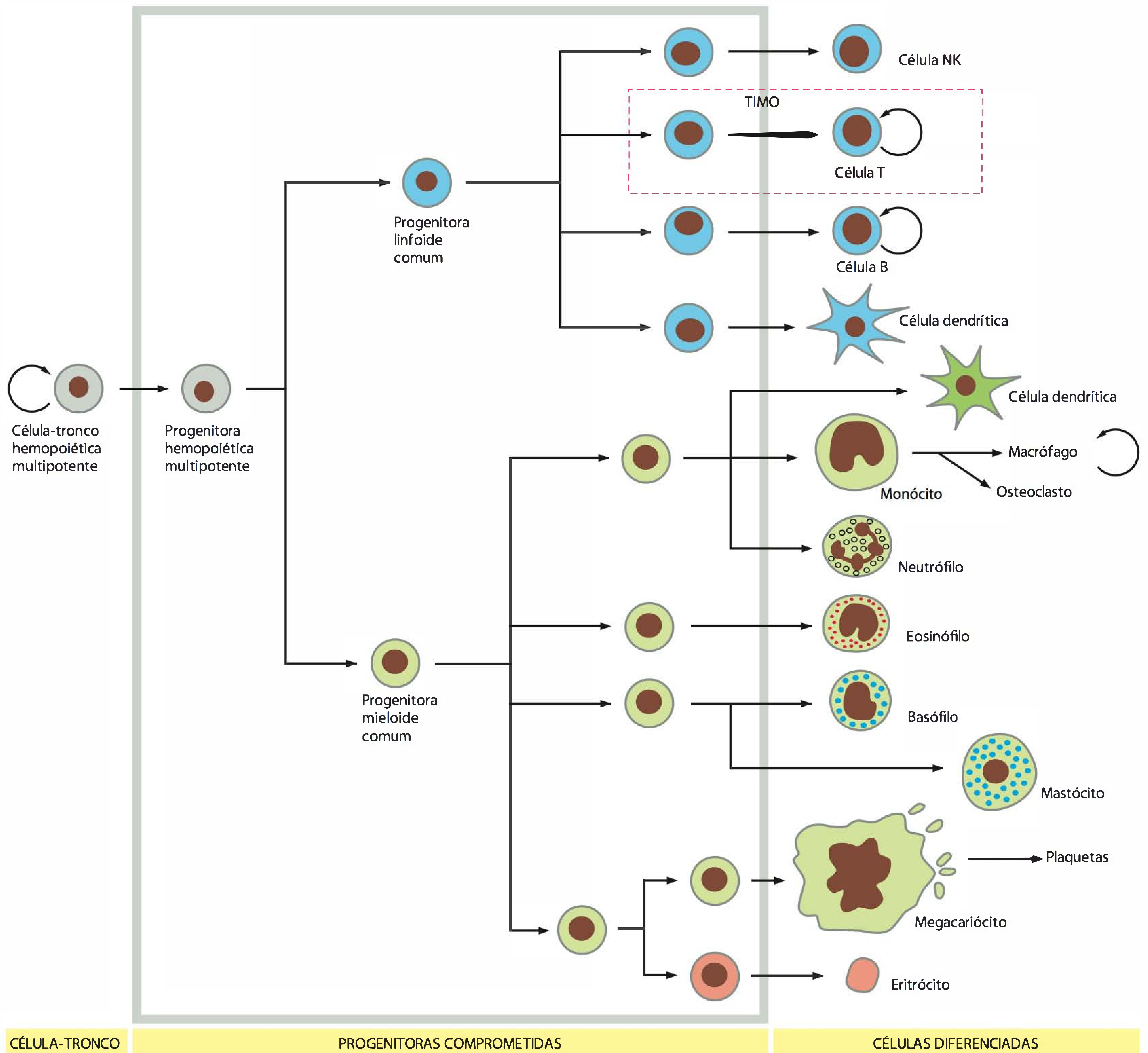


Figura 23-42 Tentativa de um esquema de hemopoiese. A célula-tronco multipotente normalmente se divide com pouca frequência para gerar mais células-tronco multipotentes, que estão se autorrenovando, ou células progenitoras comprometidas, que são limitadas no número de vezes que podem se dividir, antes da diferenciação, para formar células sanguíneas maduras. Enquanto passam por suas divisões, as progenitoras tornam-se progressivamente mais especializadas na variedade de tipos celulares a que podem dar origem, como indicado pela ramificação do diagrama de linhagem celular na região restrita ao quadro cinza. No entanto, muitos dos detalhes desta parte do diagrama de linhagem ainda são controversos. Nos mamíferos adultos, todas as células mostradas desenvolvem-se principalmente na medula óssea – exceto os linfócitos T, que se desenvolvem no timo, e os macrófagos e os osteoclastos, que se desenvolvem a partir de monócitos do sangue. Algumas células dendríticas também podem derivar-se de monócitos.

A divisão de células progenitoras comprometidas amplifica o número de células sanguíneas especializadas

As células progenitoras hemopoiéticas geralmente tornam-se comprometidas com uma via especial de diferenciação longa antes de cessarem a proliferação e tornarem-se definitivamente diferenciadas. As progenitoras comprometidas passam por muitas rodadas de divisão celular para amplificar o número definitivo de células de determinado tipo especializado. Dessa maneira, uma única divisão de célula-tronco pode levar à produção de milhares de células-filhas diferenciadas, o que explica por que o número de células-tronco é apenas uma

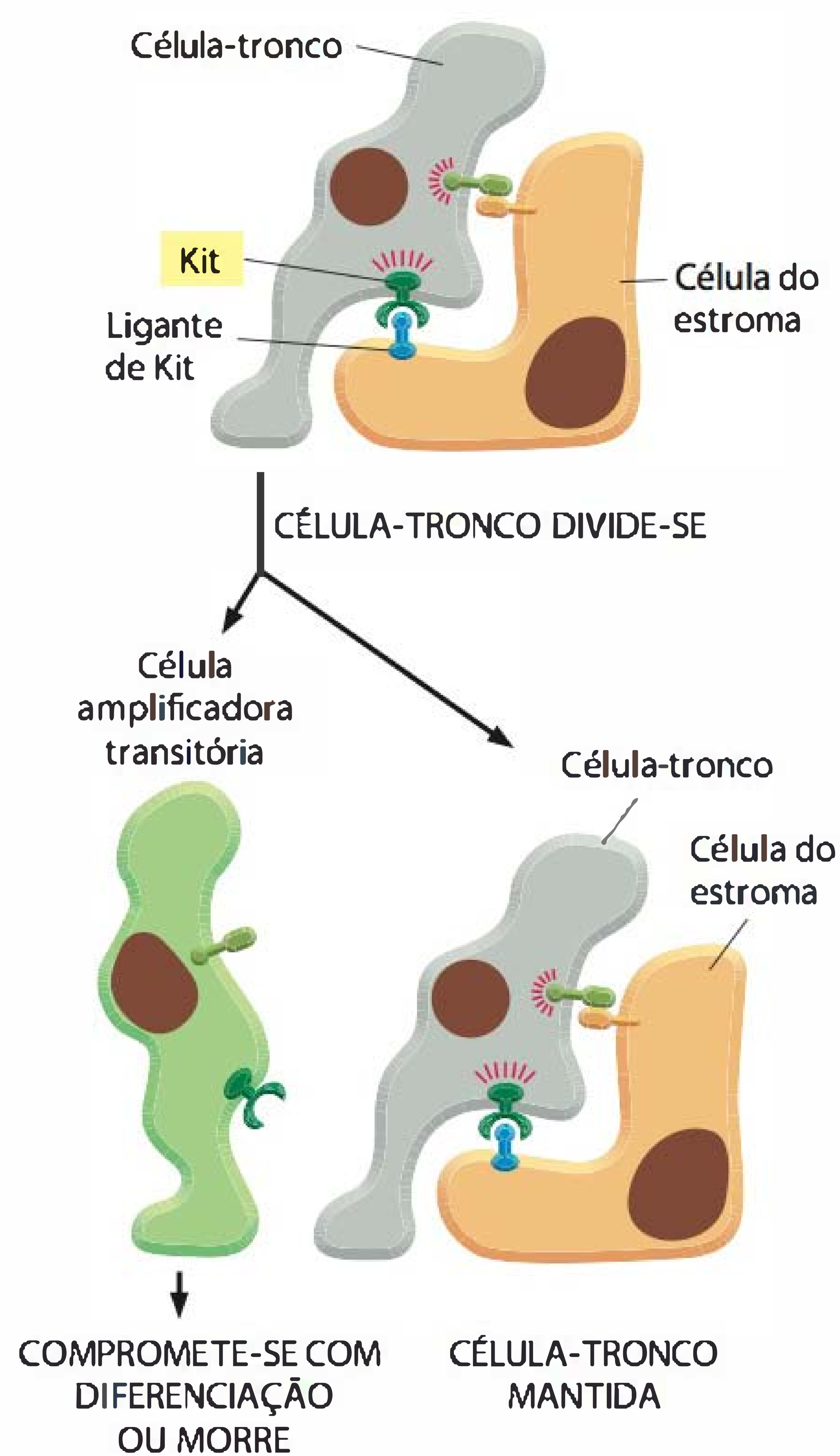


Figura 23-43 Dependência de células-tronco hemopoiéticas em contato com células do estroma. A interação dependente de contato entre Kit e seu ligante é um dos vários mecanismos de sinalização que acredita-se estarem envolvidos na manutenção de células-tronco hemopoiéticas. O sistema real certamente é mais complexo; a dependência das células hemopoiéticas em contato com as células do estroma pode não ser absoluta, visto que um pequeno número de células-tronco funcionais pode ser encontrado livre na circulação.

pequena fração da população total de células hemopoiéticas. Pela mesma razão, uma taxa alta de produção de células sanguíneas pode ser mantida, mesmo que a taxa de divisão de células-tronco seja baixa. Como observado anteriormente, a divisão pouco frequente ou inativa é uma característica comum de células-tronco em vários tecidos. Pela redução do número de ciclos de divisão que as próprias células-tronco têm que sofrer ao longo de sua vida, diminui-se o risco de ocorrência de mutações em células-tronco, que originariam clones de células mutantes persistentes no corpo. Isto também tem outro efeito: reduz a taxa de senescência replicativa (discutido no Capítulo 17). Na verdade, células-tronco hemopoiéticas que são forçadas a manter-se dividindo rapidamente (por *knockout* de um gene chamado de *Gfi1* que restringe sua taxa de proliferação, ou por outra maneira) não conseguem manter a hemopoiese por todo o ciclo normal de vida.

A natureza da etapa de comprometimento indica que o sistema hemopoiético pode ser considerado como uma árvore genealógica hierárquica de células. As células-tronco multipotentes dão origem a *células progenitoras comprometidas*, que são especificadas para dar origem a apenas um ou a alguns poucos tipos de células sanguíneas. As progenitoras comprometidas dividem-se com rapidez, mas apenas um número limitado de vezes antes de diferenciarem-se definitivamente em células que não se dividem mais e morrem após vários dias ou semanas. De modo geral, muitas células morrem também nas etapas iniciais da via. Os estudos em cultivo proporcionam uma maneira de descobrir como são reguladas a proliferação, a diferenciação e a morte das células hemopoiéticas.

As células-tronco dependem dos sinais de contato de células do estroma

As células hemopoiéticas podem sobreviver, proliferar e diferenciar em cultivo se, e somente se, elas estiverem providas com proteínas-sinal específicas ou acompanhadas por células que produzem estas proteínas. Se privadas de tais proteínas, as células morrem. Para a manutenção a longo prazo, também parece ser necessário o contato com as células de suporte apropriadas: a hemopoiese pode continuar funcionando *in vitro* por meses ou mesmo por anos por cultivo de células hemopoiéticas de medula óssea distribuídas sobre a superfície de uma camada de células do estroma da medula óssea, que imitam o ambiente da medula óssea intacta. Tais cultivos podem originar todos os tipos de células mieloides, e sua continuação por longo prazo implica que as células-tronco, assim como sua progênie diferenciada, estejam sendo produzidas continuamente.

Na medula óssea, onde elas normalmente vivem, as células-tronco hemopoiéticas estão localizadas principalmente em contato íntimo com os *osteoblastos* que revestem as superfícies ósseas da cavidade medular – as células que produzem a matriz óssea. Tratamentos e mutações que aumentam ou diminuem o número de osteoblastos causam alterações correspondentes no número de células-tronco hemopoiéticas. Isto sugere que os osteoblastos fornecem os sinais que as células-tronco hemopoiéticas necessitam para mantê-las em seu estado de célula-tronco não-comprometida com a diferenciação, exatamente como a cripta intestinal fornece os sinais necessários para manter as células-tronco do epitélio do intestino. Em ambos os sistemas, normalmente as células-tronco estão confinadas a um nicho especial, e quando deixam este nicho, elas tendem a perder seu potencial de célula-tronco (**Figura 23-43**). As células-tronco hemopoiéticas na medula óssea e em qualquer outro local também estão frequentemente associadas a uma classe especial de células endoteliais, que podem fornecer-lhes um nicho alternativo.

Uma característica-chave do nicho de célula-tronco na medula óssea, como no intestino, é que ele fornece estímulo da via de sinalização Wnt. A ativação artificial desta via em células-tronco hemopoiéticas cultivadas as ajuda a sobreviver, proliferar e manter sua característica de célula-tronco, enquanto o bloqueio da sinalização Wnt faz o oposto. Outra interação importante para a manutenção da hemopoiese surgiu da análise de camundongos mutantes com uma combinação curiosa de defeitos: uma escassez de células vermelhas do sangue (anemia), de células germinativas (esterilidade) e de células pigmentares (manchas brancas da pele; ver Figura 22-86). Como discutido no Capítulo 22, esta síndrome resulta de mutações em um dos dois seguintes genes: um, chamado de *Kit*, codifica um receptor tirosina-cinase; o outro codifica o seu ligante. Os tipos celulares afetados pelas mutações derivam todos de precursores migratórios, e parece que, em cada caso, esses precursores devem expressar o receptor e serem supridos com o ligante pelo seu ambiente, para que sobrevivam e produzam progênie em número normal. Os estudos em camundongos mu-

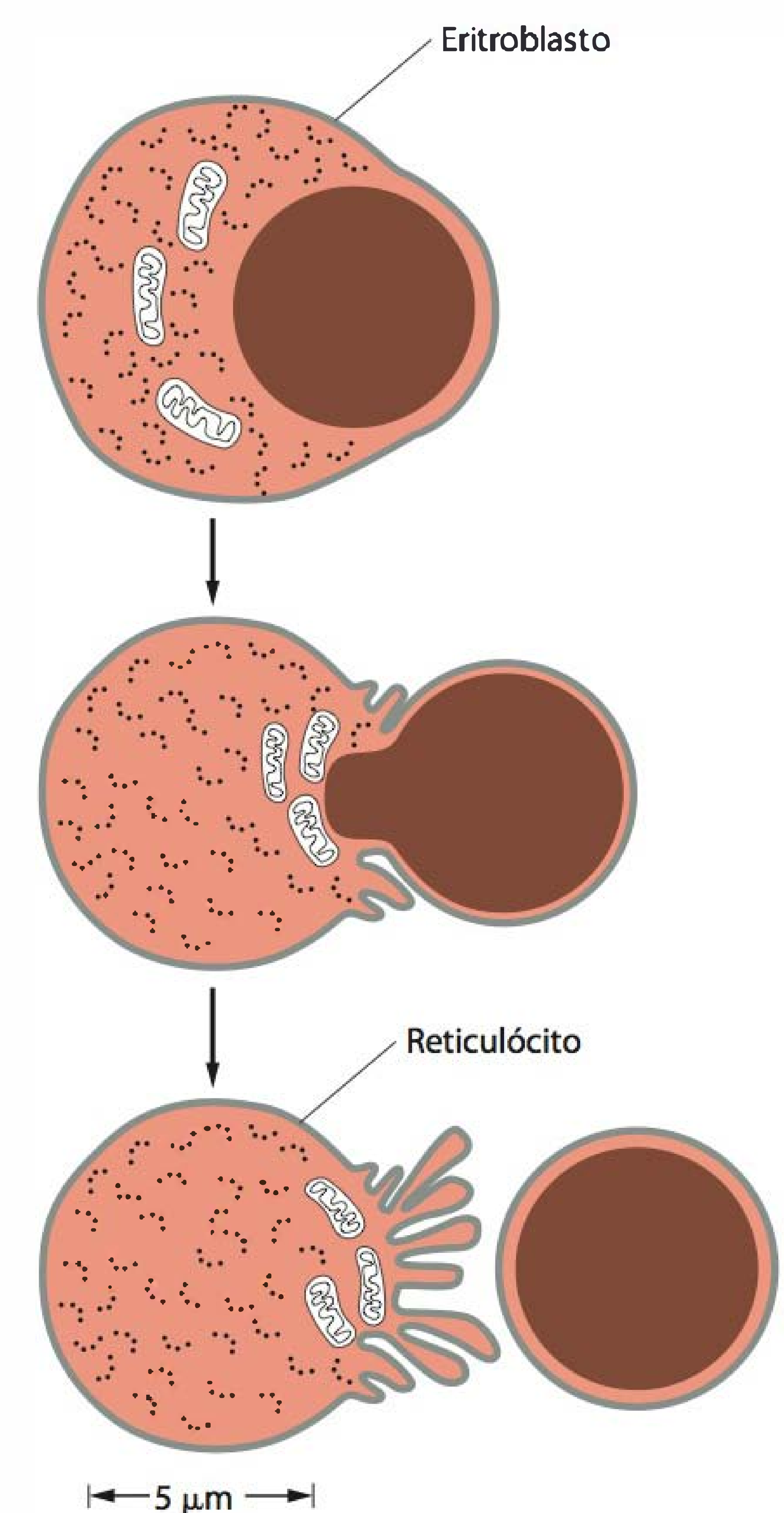


Figura 23-44 Célula vermelha do sangue em desenvolvimento (eritroblasto). A célula é mostrada expelindo seu núcleo para tornar-se um eritrócito imaturo (um reticulócito), que, então, deixa a medula óssea e passa para a corrente sanguínea. O reticulócito perderá suas mitocôndrias e ribossomos dentro de um ou dois dias, tornando-se um eritrócito maduro. Os clones de eritrócitos se desenvolvem na medula óssea sobre a superfície de um macrófago, que fagocita e digere os núcleos descartados pelos eritroblastos.

tantes sugerem que o ligante de Kit deve estar ligado à membrana para ser completamente eficiente, indicando que a hemopoiese normal requer contato direto célula-célula entre as células hemopoiéticas que expressam a proteína receptora Kit e as células do estroma (entre elas osteoblastos) que expressam o ligante de Kit.

Os fatores que regulam a hemopoiese podem ser analisados em cultivo

Enquanto as células-tronco dependem do contato com as células do estroma para manutenção a longo prazo, sua progênie comprometida não apresenta essa dependência, ou ao menos não no mesmo grau. Assim, as células hemopoiéticas destacadas da medula óssea podem ser cultivadas em uma matriz semissólida de ágar ou metilcelulose diluída, e fatores retirados de outras células podem ser adicionados artificialmente ao meio. Como as células não podem migrar na matriz semissólida, a progênie de cada célula precursora isolada permanece junta, como uma colônia facilmente distinguível. Um único progenitor de neutrófilo comprometido, por exemplo, pode dar origem a um clone de milhares de neutrófilos. Tais sistemas de cultivo têm permitido a análise dos fatores que sustentam a hemopoiese e, por conseguinte, sua purificação e a exploração de suas ações. Estas substâncias são glicoproteínas e normalmente são chamadas de **fatores estimuladores de colônia** (**CSFs**, *colony-stimulating factors*). Do número crescente de CSFs que têm sido descritos e purificados, alguns circulam no sangue e atuam como hormônios, enquanto outros atuam na medula óssea como mediadores locais secretados ou, da mesma forma que o ligante de Kit, como sinais ligados à membrana que funcionam por contato célula-célula. O mais bem-compreendido dos CSFs que atuam como hormônios é a glicoproteína eritropoietina, que é produzida nos rins e regula a *eritropoiese*, a formação das células vermelhas do sangue.

A eritropoiese depende do hormônio eritropoietina

O eritrócito é de longe o tipo mais comum de célula no sangue (ver Tabela 23-1). Quando maduro, ele está repleto de hemoglobina e não contém praticamente nenhuma das organelas celulares habituais. Em um eritrócito de um mamífero adulto, mesmo o núcleo, o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e os ribossomos estão ausentes, tendo sido expelidos da célula durante seu desenvolvimento (**Figura 23-44**). Portanto, o eritrócito não pode crescer ou dividir-se; a única maneira possível de produzir mais eritrócitos é por meio de células-tronco. Além disso, os eritrócitos têm um período de vida limitado – cerca de 120 dias em humanos ou 55 dias em camundongos. Os eritrócitos esgotados são fagocitados e digeridos por macrófagos no fígado e no baço, que removem mais de 10^{11} eritrócitos senis em cada um de nós, a cada dia. Os eritrócitos jovens protegem a si próprios deste destino ativamente: eles têm uma proteína em sua superfície que se liga a um receptor inibidor em macrófagos e, assim, evita sua fagocitose.

Uma falta de oxigênio ou escassez de eritrócitos estimula células especializadas no rim a sintetizarem e a secretarem quantidades aumentadas de **eritropoietina** na corrente sanguínea. A eritropoietina, por sua vez, estimula a produção de mais eritrócitos. Visto que é observada uma mudança na taxa de liberação de novos eritrócitos na corrente sanguínea em 1 a 2 dias após o aumento dos níveis de eritropoietina no sangue, o hormônio deve atuar em células que estão muito próximas dos precursores de eritrócitos maduros.

As células que respondem à eritropoietina podem ser identificadas pelo cultivo de células de medula óssea em matriz semissólida na presença de eritropoietina. Em poucos dias, aparecem colônias de cerca de 60 eritrócitos, cada uma estabelecida por a uma única célula progenitora eritroide comprometida. Esta progenitora depende de eritropoietina para sua sobrevivência, assim como para sua proliferação. Ela ainda não contém hemoglobina, e é derivada de um tipo precoce de progenitora eritroide comprometida que não depende de eritropoietina.

Tabela 23-2 Alguns fatores estimuladores de colônia (CSFs) que influenciam a formação de célula sanguínea

FATOR	CÉLULAS-ALVO	CÉLULAS QUE OS PRODUZEM	RECEPTORES
Eritropoietina	CFC-E	Células do rim	Família citocina
Interleucina 3 (IL3)	Célula-tronco multipotente, a maioria das células progenitoras, muitas células diferenciadas definitivamente	Linfócitos T, células da epiderme	Família citocina
CSF de granulócito/macrófago (GMCSF)	Células progenitoras GM	Linfócitos T, células endoteliais, fibroblastos	Família citocina
CSF de granulócito (GCSF)	Células progenitoras GM e neutrófilos	Macrófagos, fibroblastos	Família citocina
CSF de macrófago (MCSF)	Células progenitoras GM e macrófagos	Fibroblastos, macrófagos, células endoteliais	Família receptor tirosina-cinase
Ligante Kit	Células-tronco hemopoiéticas	Células do estroma na medula óssea e muitas outras células	Família receptor tirosina-cinase

Um segundo CSF, chamado de **interleucina-3** (**IL3**), promove a sobrevivência e a proliferação das células progenitoras eritroides precoces. Em sua presença, desenvolvem-se colônias eritroides muito grandes, contendo acima de 5 mil eritrócitos cada uma, desenvolvidas a partir de células de medula óssea cultivadas em um processo que requer uma semana ou 10 dias. Evidentemente, as descendentes das células-tronco hemopoiéticas, após tornarem-se comprometidas com o destino eritroide, têm que seguir seu caminho através de mais um programa longo de divisões celulares, alterando sua característica e sua dependência de sinais do ambiente enquanto avançam na direção do estado final de diferenciação.

Múltiplos CSFs influenciam a produção de neutrófilos e macrófagos

As duas classes de células especializadas em fagocitose, os neutrófilos e os macrófagos, desenvolvem-se a partir de uma célula progenitora comum chamada de **célula progenitora de granulócito/macrófago** (**célula progenitora GM**). Como os outros granulócitos (eosinófilos e basófilos), os neutrófilos circulam no sangue apenas por poucas horas antes de migrarem para fora dos capilares dentro dos tecidos conectivos ou de outros locais específicos, onde sobrevivem somente por alguns dias. Então, eles morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos. Em contraste, os macrófagos podem permanecer durante meses ou talvez mesmo anos fora da corrente sanguínea, onde podem ser ativados por sinais locais para recomeçar a proliferação.

Pelo menos sete CSFs diferentes que estimulam a formação de colônias de neutrófilo e macrófago em cultivo foram definidos, e acredita-se que alguns ou todos esses atuem em combinações diferentes para regular a produção seletiva destas células *in vivo*. Esses CSFs são sintetizados por vários tipos celulares – incluindo as células endoteliais, os fibroblastos, os macrófagos e os linfócitos – e, de forma típica, sua concentração no sangue aumenta rapidamente em resposta à infecção bacteriana em um tecido, aumentando, assim, o número de células fagocitárias liberadas da medula óssea para a corrente sanguínea. A IL3 é um dos fatores menos específicos, atuando sobre células-tronco multipotentes bem como sobre a maioria dos tipos de células progenitoras comprometidas, incluindo as células progenitoras GM. Vários outros fatores agem de forma mais seletiva sobre as células progenitoras GM comprometidas e a sua progênie diferenciada (**Tabela 23-2**), embora em muitos casos eles também atuem sobre certos outros ramos da árvore genealógica hemopoiética.

Todos esses CSFs, como a eritropoietina, são glicoproteínas que atuam em baixas concentrações (cerca de 10^{-12} M) por ligação a receptores de superfície celular específicos, como discutido no Capítulo 15. Poucos desses receptores são tirosina-cinases transmembrana, mas a maioria pertence à grande família de receptores citocina, cujos membros normalmente são compostos de duas ou mais subunidades, uma das quais frequentemente é compartilhada entre vários tipos de receptores (**Figura 23-45**). Os CSFs não funcionam apenas sobre as células precursoras para promover a produção de progênie diferenciada, eles também ativam as funções especializadas (como a fagocitose e as células-alvo de morte) das células definitivamente diferenciadas. As proteínas produzidas artificialmente a partir de genes clonados para estes fatores são potentes estimuladores de hemopoiese em animais de laboratório. Atualmente são utilizadas amplamente em pacientes humanos para estimular a regeneração do tecido hemopoiético e desenvolver resistência a infecções – uma demonstra-

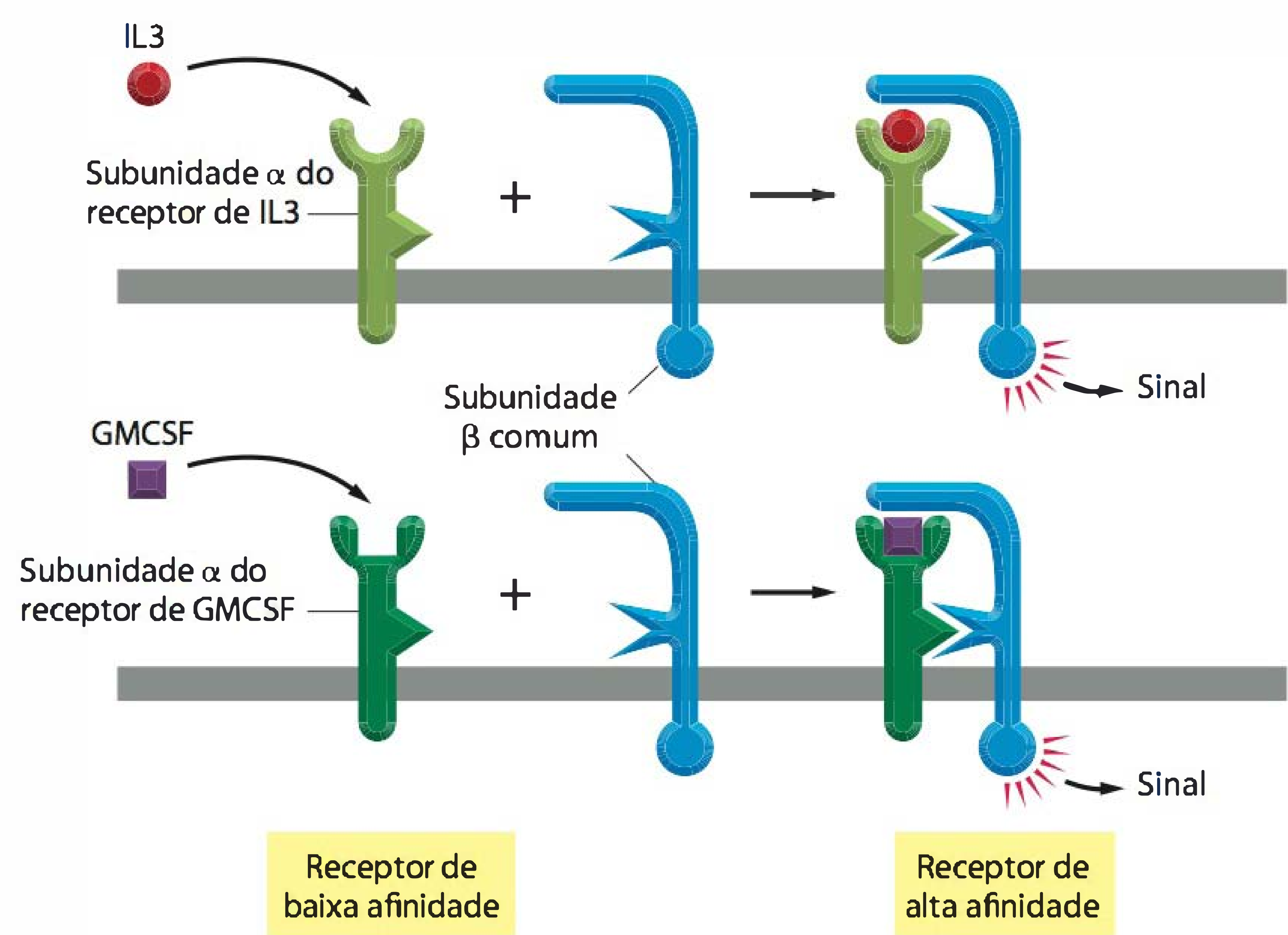


Figura 23-45 Compartilhamento de subunidades entre receptores de CSF. Os receptores de IL3 e os receptores de GMCSF humano têm subunidades a diferentes e uma subunidade b comum. Acredita-se que seus ligantes se unam com baixa afinidade à subunidade a livre, desencadeando a junção do heterodímero que se une com alta afinidade ao ligante.

ção impressionante de como a pesquisa básica em biologia celular e os experimentos com animais podem levar a um melhor tratamento médico.

O comportamento de uma célula hemopoiética depende em parte do acaso

Os CSFs são definidos como fatores que promovem a produção de colônias de células sanguíneas diferenciadas. Contudo, que efeito, precisamente, um CSF tem sobre uma célula hemopoiética individual? O fator pode controlar a taxa de divisão celular ou o número de ciclos de divisão que a célula progenitora sofre antes de se diferenciar; pode atuar mais tarde na linhagem hemopoiética para facilitar a diferenciação; pode agir de forma precoce para influenciar o comprometimento; ou pode simplesmente aumentar a probabilidade de sobrevivência celular (**Figura 23-46**). Pelo monitoramento do destino de células hemopoiéticas individuais isoladas em cultivo, é possível demonstrar que um único CSF, como o GMCSF, pode exercer todos esses efeitos, embora ainda não esteja claro qual é o mais importante *in vivo*.

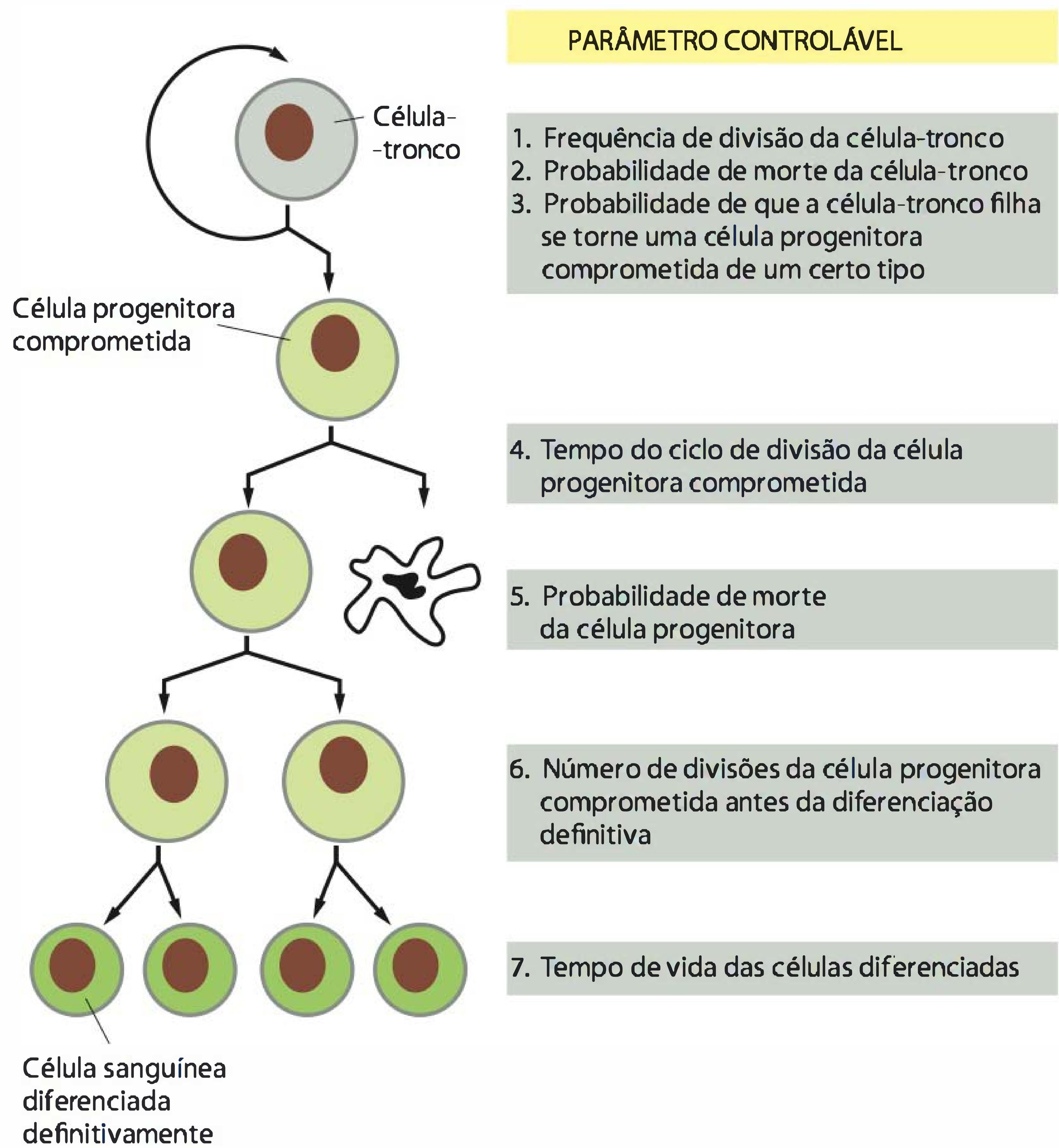


Figura 23-46 Alguns dos parâmetros por meio dos quais a produção de células sanguíneas de um tipo específico poderia ser regulada. Estudos em cultivo sugerem que os fatores estimuladores de colônia (CSFs) podem afetar todos estes aspectos da hemopoiese.

Além disso, os estudos *in vitro* indicam que a maneira como uma célula hemopoiética se comporta se deve, em grande parte, ao acaso – provavelmente, uma reflexão do "barulho" no sistema de controle genético, discutido no Capítulo 7. Ao menos alguns dos CSFs parecem atuar regulando probabilidades, e não ditando diretamente o que a célula fará. Em cultivos de células hemopoiéticas, mesmo que as células sejam selecionadas para ser uma população o mais homogênea possível, há uma variação considerável nos tamanhos e, frequentemente, nas características das colônias que se desenvolvem. E, se duas células-irmãs são retiradas imediatamente após a divisão celular e cultivadas separadamente sob condições idênticas, elas com frequência dão origem a colônias que contêm tipos diferentes de células sanguíneas, ou aos mesmos tipos de células sanguíneas em número diferente. Assim, tanto a programação da divisão celular quanto o processo de comprometimento a uma via particular de diferenciação parecem envolver acontecimentos ao acaso no nível de uma célula individual, mesmo que o comportamento de um sistema multicelular como um todo seja regulado de uma maneira segura. A sequência de restrições ao destino celular apresentada na Figura 23-42 exprime a impressão de um programa executado com a mesma lógica e precisão do computador. Células individuais podem ser mais peculiares e inconstantes, e algumas vezes podem avançar por outra via de decisão a partir da célula-tronco em direção à diferenciação definitiva.

A regulação da sobrevivência celular é tão importante quanto a regulação da proliferação celular

O comportamento-padrão das células hemopoiéticas na ausência de CSFs é a morte por apoptose (discutido no Capítulo 18). Assim, em princípio, os CSFs poderiam regular o número de vários tipos de células sanguíneas inteiramente pelo controle seletivo da sobrevivência celular dessa via. Há evidências de que o controle da sobrevivência celular, na verdade, representa uma parte central na regulação do número de células sanguíneas, assim como ocorre para hepatócitos e muitos outros tipos de células, como vimos anteriormente. A intensidade de apoptose no sistema hemopoiético dos vertebrados é enorme: por exemplo, bilhões de neutrófilos morrem dessa maneira a cada dia em um humano adulto. Na verdade, a maioria de neutrófilos produzidos na medula óssea morre ali, sem jamais exercer sua função. Este ciclo inútil de produção e de destruição serve, provavelmente, para manter um suprimento-reserva de células que pode ser imediatamente mobilizado para combater uma infecção sempre que ela surgir, ou para ser fagocitado e digerido para reciclagem, quando tudo está em ordem. Comparada à vida do organismo, a vida das células tem pouca importância.

Pouca morte celular pode ser tão perigosa para a saúde de um organismo multicelular quanto a proliferação demasiada. No sistema hemopoiético, as mutações que inibem a morte celular por causarem a produção excessiva do inibidor intracelular de apoptose Bcl2 promovem o desenvolvimento de câncer em linfócitos B. Na verdade, a capacidade para autorrenovação ilimitada é uma característica perigosa para qualquer célula, e muitos casos de leucemia surgem por mutações que conferem esta capacidade a células precursoras hemopoiéticas comprometidas que normalmente estariam destinadas a se diferenciar e morrer, após um número limitado de ciclos de divisão.

Resumo

Os muitos tipos de células sanguíneas, incluindo os eritrócitos, os linfócitos, os granulócitos e os macrófagos, derivam todos de uma célula-tronco multipotente comum. No adulto, as células-tronco hemopoiéticas são encontradas principalmente na medula óssea e dependem de sinais de células do estroma da medula (tecido conectivo), especialmente osteoblastos, para manter sua característica de célula-tronco. Como em alguns outros sistemas de célula-tronco, a via de sinalização Wnt parece ser crítica para a manutenção de célula-tronco, embora não seja a única envolvida. Normalmente, as células-tronco se dividem de forma pouco frequente para produzir mais células-tronco (autorrenovação) e várias células progenitoras comprometidas (células amplificadoras transitórias), cada uma capaz de dar origem a apenas um ou uns poucos tipos de células sanguíneas. As células progenitoras comprometidas se dividem sob a influência de várias moléculas de proteínas sinalizadoras (fatores estimuladores de colônia, ou CSFs) e, então, se diferenciam definitivamente em células sanguíneas maduras, que geralmente morrem após vários dias ou semanas.

Os estudos de hemopoiese têm sido bastante auxiliados por análises in vitro *nas quais as células-tronco ou as células progenitoras comprometidas formam colônias clonais, quando cultivadas em uma matriz semissólida. A progênie de células-tronco parece fazer suas escolhas entre vias alter-*

nativas de desenvolvimento de uma maneira parcialmente ao acaso. A morte celular por apoptose, controlada pela disponibilidade de CSFs, também desempenha um papel central na regulação do número de células sanguíneas diferenciadas maduras.

ORIGEM, MODULAÇÃO E REGENERAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O termo "músculo" inclui muitos tipos celulares, todos especializados em contração, mas diferentes em outros aspectos. Como observado no Capítulo 16, todas as células de eucariotos possuem um sistema contrátil envolvendo actina e miosina, mas as células musculares desenvolveram este mecanismo em um nível elevado. Os mamíferos possuem quatro tipos principais de células especializadas para contração: as células do músculo esquelético, as células do músculo cardíaco (coração), as células do músculo liso e as células mioepiteliais (**Figura 23-47**). Elas diferem em função, em estrutura e desenvolvimento. Embora todas produzam forças contráteis pelo uso de sistemas de filamentos organizados com base em actina e em miosina, as moléculas de actina e de miosina utilizadas são um pouco diferentes na sequência de aminoácidos, estão arranjadas de forma diferente nas células e estão associadas a grupos diferentes de proteínas para controlar a contração.

As **células do músculo esquelético** são responsáveis por praticamente todos os movimentos que estão sob controle voluntário. Essas células podem ser muito grandes (2 a 3

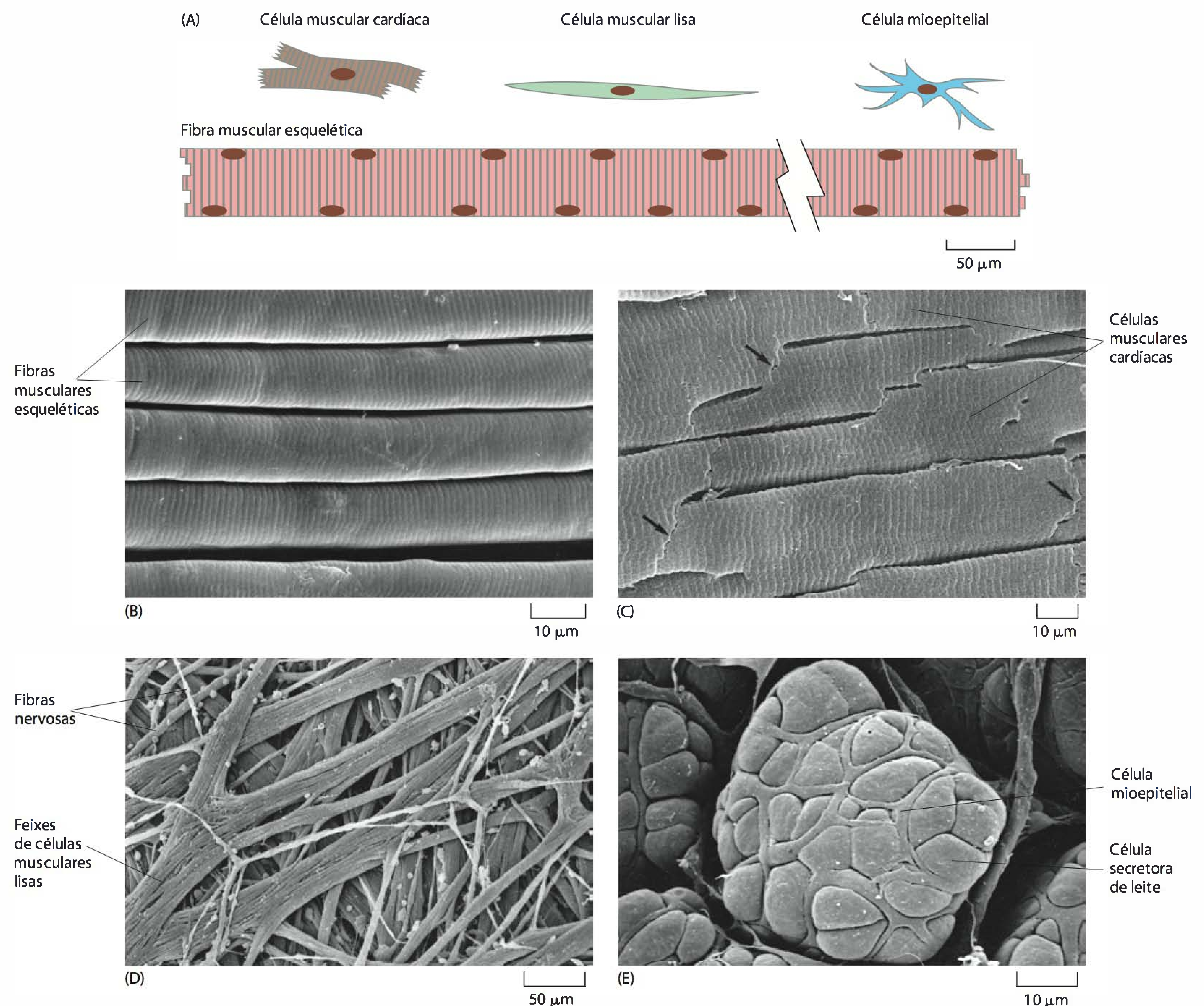


Figura 23-47 Os quatro tipos de células musculares de um mamífero. (A) Desenhos esquemáticos (em escala). (B-E) Eletromicrografias de varredura mostrando (B) músculo esquelético do pescoço de um hamster, (C) músculo cardíaco de um rato, (D) músculo liso da bexiga de uma cobaia e (E) células mioepiteliais em um alvéolo secretor de uma glândula mamária de rata em lactação. As setas em (C) apontam para os discos intercalares – junções entre as extremidades de duas células musculares cardíacas; as células musculares esqueléticas dos músculos longos são unidas nas extremidades de forma semelhante. Observar que o músculo liso é mostrado em aumento menor que os outros. (B, cortesia de Junzo Desaki; C, de T. Fujiwara, in Cardiac Muscle in Handbook of Microscopic Anatomy [E. D. Canal, ed.]. Berlin: Springer-Verlag, 1986; D, cortesia de Satoshi Nakasiro; E, de T. Nagato et al., Cell Tiss. Res. 209:1-10, 1980. Com permissão de Springer-Verlag.)

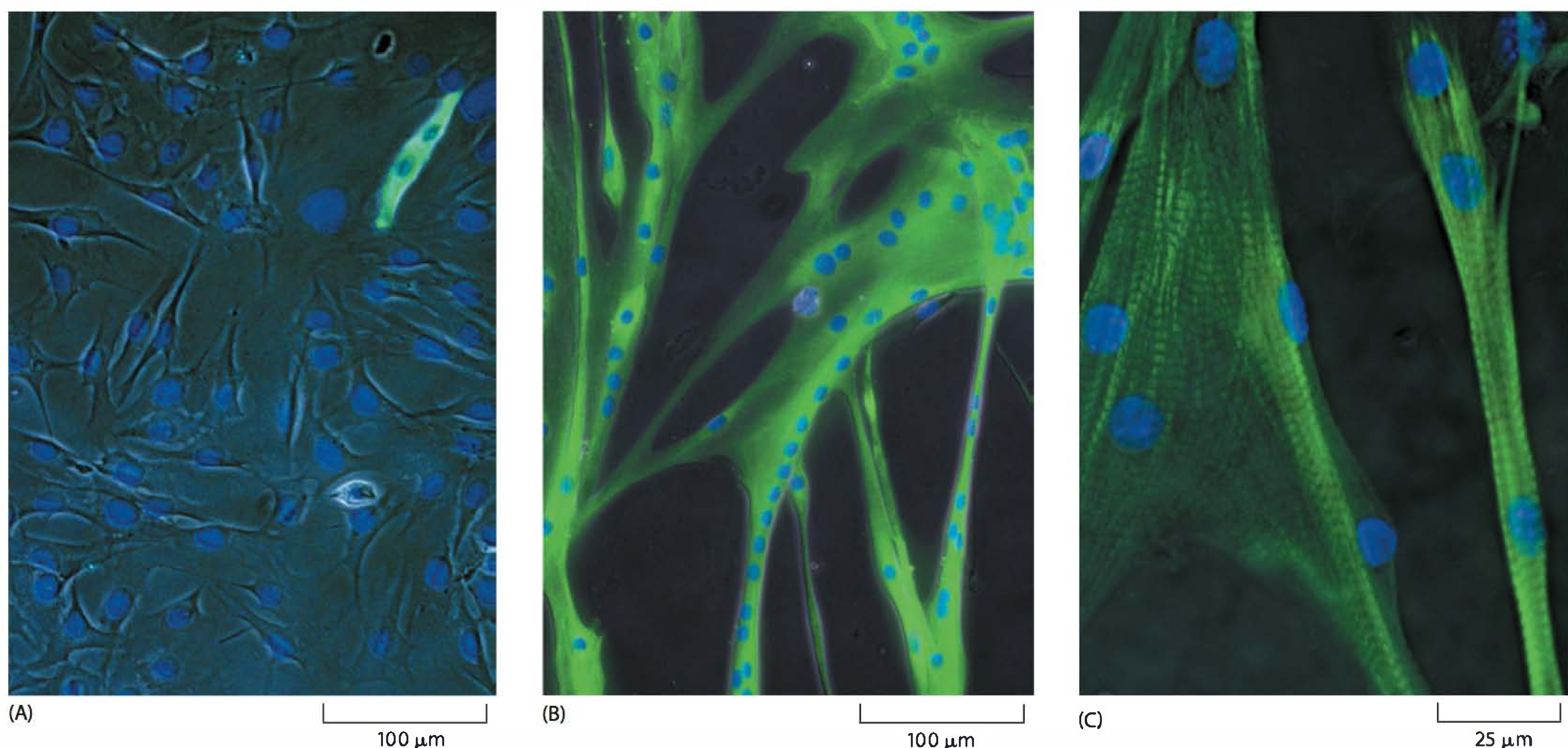
cm de comprimento e 100 μm de diâmetro em um humano adulto) e muitas vezes são chamadas de *fibras musculares*, por causa de sua forma altamente alongada. Cada uma é um sincício, contendo muitos núcleos dentro de um citoplasma comum. Os outros tipos de células musculares são mais convencionais, geralmente tendo apenas um núcleo. As **células do músculo cardíaco** se parecem com fibras musculares esqueléticas, porque seus filamentos de actina e de miosina estão alinhados em arranjos muito ordenados para formar uma série de unidades contráteis chamadas de *sarcômeros*, de maneira que as células têm uma aparência estriada (listrada). As **células do músculo liso** são assim chamadas porque não parecem estriadas. As funções do músculo liso variam muito, desde impulsionar o alimento ao longo do trato digestivo até eriçar os pelos em resposta ao frio ou ao medo. As **células mioepiteliais** também não têm estriações, mas, ao contrário de todas as outras células musculares, elas estão situadas em epitélios e derivam do ectoderma. Elas formam o músculo dilatador da íris do olho e servem para expelir a saliva, o suor e o leite das glândulas correspondentes, como discutido anteriormente (ver Figura 23-11). As quatro categorias principais de células musculares podem ser divididas ainda em subtipos distintos, cada um com seus próprios aspectos característicos.

Os mecanismos de contração muscular são discutidos no Capítulo 16. Aqui será levado em consideração como o tecido muscular é originado e mantido. O enfoque será a fibra muscular esquelética, a qual tem uma forma curiosa de desenvolvimento, uma capacidade impressionante para modular seu caráter diferenciado e uma estratégia incomum para reparo.

Os mioblastos fundem-se para formar novas fibras musculares esqueléticas

O Capítulo 22 descreveu como certas células, originadas dos somitos de um embrião de vertebrado em um estágio muito precoce, são destinadas a diferenciar-se como **mioblastos**, os precursores das fibras musculares esqueléticas. O comprometimento para ser um mioblasto depende de proteínas reguladoras de genes de pelo menos duas famílias – um par de proteínas homeodomínio chamadas de Pax3 e Pax7 e a *família MyoD* de proteínas hélice-volta-hélice (discutido no Capítulo 7). Estas atuam de forma combinada para dar ao mioblasto uma memória de seu estado comprometido e, eventualmente, para regular a expressão de outros genes que dão à célula muscular madura sua característica especializada (ver Figura 7-75). Após um período de proliferação, o mioblasto sofre uma mudança dramática de estado: ele para de se dividir, ativa a expressão de uma bateria inteira de genes músculo-específicos necessária à diferenciação definitiva e fundem-se uns com os outros para formar fibras musculares esqueléticas multinucleadas (**Figura 23-48**). A fusão envolve moléculas de adesão célula-célula específicas que medeiam o reconhecimento entre os mioblastos

Figura 23-48 Fusão de mioblastos em cultivo. O cultivo está corado com anticorpo fluorescente (verde) contra a miosina do músculo esquelético, que marca as células musculares diferenciadas, e com um corante DNA-específico (azul) para mostrar os núcleos celulares. (A) Pouco tempo após a troca para um meio de cultivo que favorece a diferenciação, apenas dois dos muitos mioblastos no campo visual interromperam a produção de miosina e se fundiram para formar uma célula muscular com dois núcleos (em cima à direita). (B) Um pouco mais tarde, quase todas as células tinham se diferenciado e fundido. (C) Observação em maior magnitude, mostrando as estriações características (listras transversais finas) em duas das células musculares multinucleadas. (Cortesia de Jacqueline Gross e Terence Partridge.)



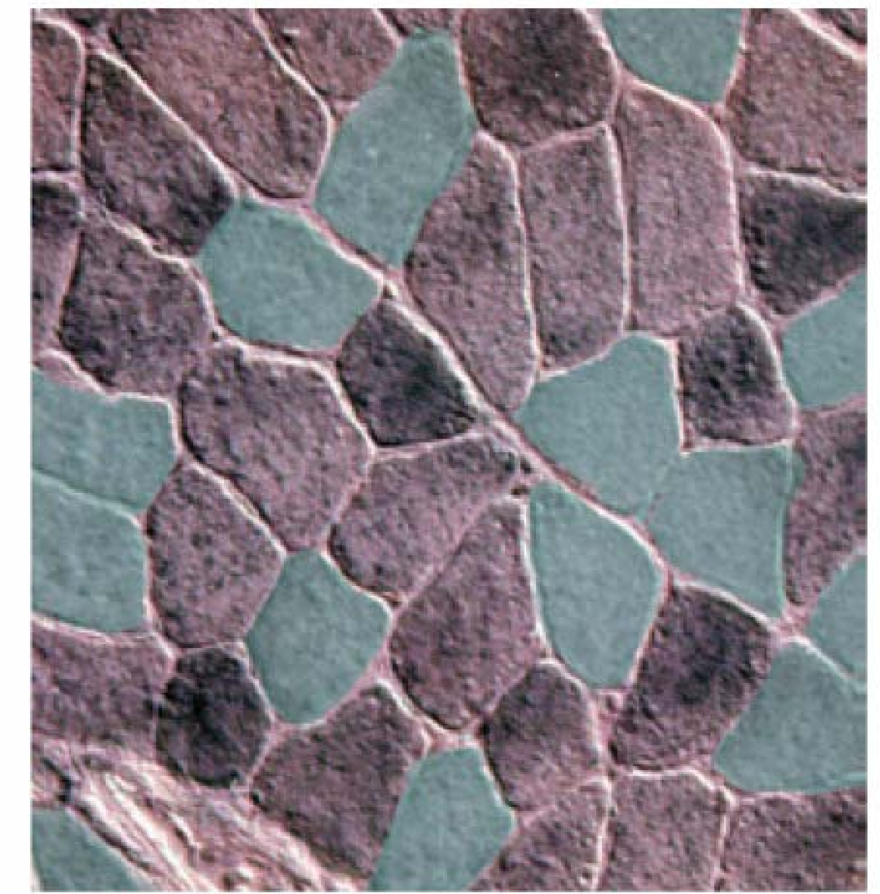


Figura 23-49 Fibras musculares rápidas e lentas. Duas secções transversais consecutivas do mesmo pedaço de músculo da perna de camundongo adulto foram coradas com anticorpos distintos, cada um específico para uma isoforma diferente da cadeia pesada da proteína miosina, e as imagens das duas secções foram sobrepostas para mostrar o padrão dos tipos de fibra muscular. As fibras coradas com anticorpo contra miosina "rápida" (cinza) são especializadas em produzir contrações rápidas; as fibras coradas com anticorpo contra miosina "lenta" (rosa) são especializadas em produzir contrações lentas e contínuas. As fibras de contração rápida são conhecidas como fibras musculares brancas, porque contêm relativamente pouca coloração pela proteína ligadora de oxigênio mioglobina. As fibras musculares lentas são chamadas de fibras musculares vermelhas, porque contêm muito mais mioglobina. (Cortesia de Simon Hughes.)

recém-diferenciados e as fibras. Uma vez que tenha ocorrido a diferenciação, as células não se dividem, e os núcleos jamais replicam seu DNA novamente.

Os mioblastos que são mantidos proliferando em cultivo por períodos longos de até dois anos ainda mantêm a capacidade de se diferenciar e podem se fundir para formar células musculares em resposta a uma mudança adequada nas condições de cultivo. Os sinais proteicos apropriados no meio de cultivo, como o fator de crescimento de fibroblasto ou de hepatócito (FGF ou HGF), podem manter os mioblastos no estado proliferativo indiferenciado: se esses fatores solúveis são removidos, as células param rapidamente de se dividir, diferenciar e fundir. No entanto, o sistema de controles é complexo, e a ligação à matriz extracelular também é importante para a diferenciação do mioblasto. Além disso, o processo de diferenciação é cooperativo: os mioblastos em diferenciação secretam fatores que aparentemente estimulam outros mioblastos a se diferenciar.

As células musculares podem variar suas propriedades mudando as isoformas das proteínas que contêm

Uma vez formada, a fibra muscular esquelética cresce, amadurece e modula suas características. O genoma contém múltiplas cópias diferentes dos genes que codificam muitas das proteínas características da célula muscular esquelética, e os transcritos de RNA de muitos desses genes podem ser submetidos ao *splicing* de diversas maneiras. Como resultado, as fibras musculares produzem muitas formas variantes (isoformas) das proteínas do sistema contrátil. À medida que a fibra muscular amadurece, ela sintetiza isoformas diferentes, para satisfazer as demandas de mudanças na rapidez, na força e na resistência pelo feto, recém-nascido e adulto. Em um único músculo adulto, diversos tipos diferentes de fibras musculares esqueléticas, cada uma com tipos diferentes de isoformas proteicas e propriedades funcionais distintas, podem ser encontrados lado a lado (**Figura 23-49**). As características dos diferentes tipos de fibra são determinadas em parte antes do nascimento pelo programa genético de desenvolvimento em parte na vida pós-parto por meio de atividade e treinamento. Diferentes tipos de neurônios motores inervam fibras musculares lentas (para contração contínua) e fibras musculares rápidas (para contração rápida), e a inervação pode regular a expressão dos genes e o tamanho da fibra muscular, por meio dos padrões diferentes de estímulo elétrico liberados por esses neurônios.

As fibras musculares esqueléticas secretam miostatina para limitar o seu próprio crescimento

Um músculo pode crescer de três maneiras: suas fibras podem aumentar em número, em comprimento ou em diâmetro. Como as fibras musculares esqueléticas não são capazes de se dividir, novas fibras só podem ser produzidas pela fusão de mioblastos e, na verdade, o número de fibras musculares esqueléticas multinucleadas do adulto é adquirido cedo – antes do nascimento, nos humanos. Uma vez formada, geralmente, uma fibra muscular esquelética sobrevive durante toda a vida do animal. No entanto, os núcleos musculares individuais podem ser adicionados ou perdidos. O grande aumento no volume muscular após o nascimento ocorre por aumento celular. O crescimento em comprimento depende do recrutamento de mais mioblastos para dentro das fibras multinucleadas existentes, o que aumenta o número de núcleos em cada célula. O crescimento em diâmetro, como ocorre nos músculos dos halterofilistas, envolve tanto o recrutamento de mioblastos quanto um aumento no tamanho e no número de miofibrilas contráteis que cada núcleo de fibra muscular sustenta.

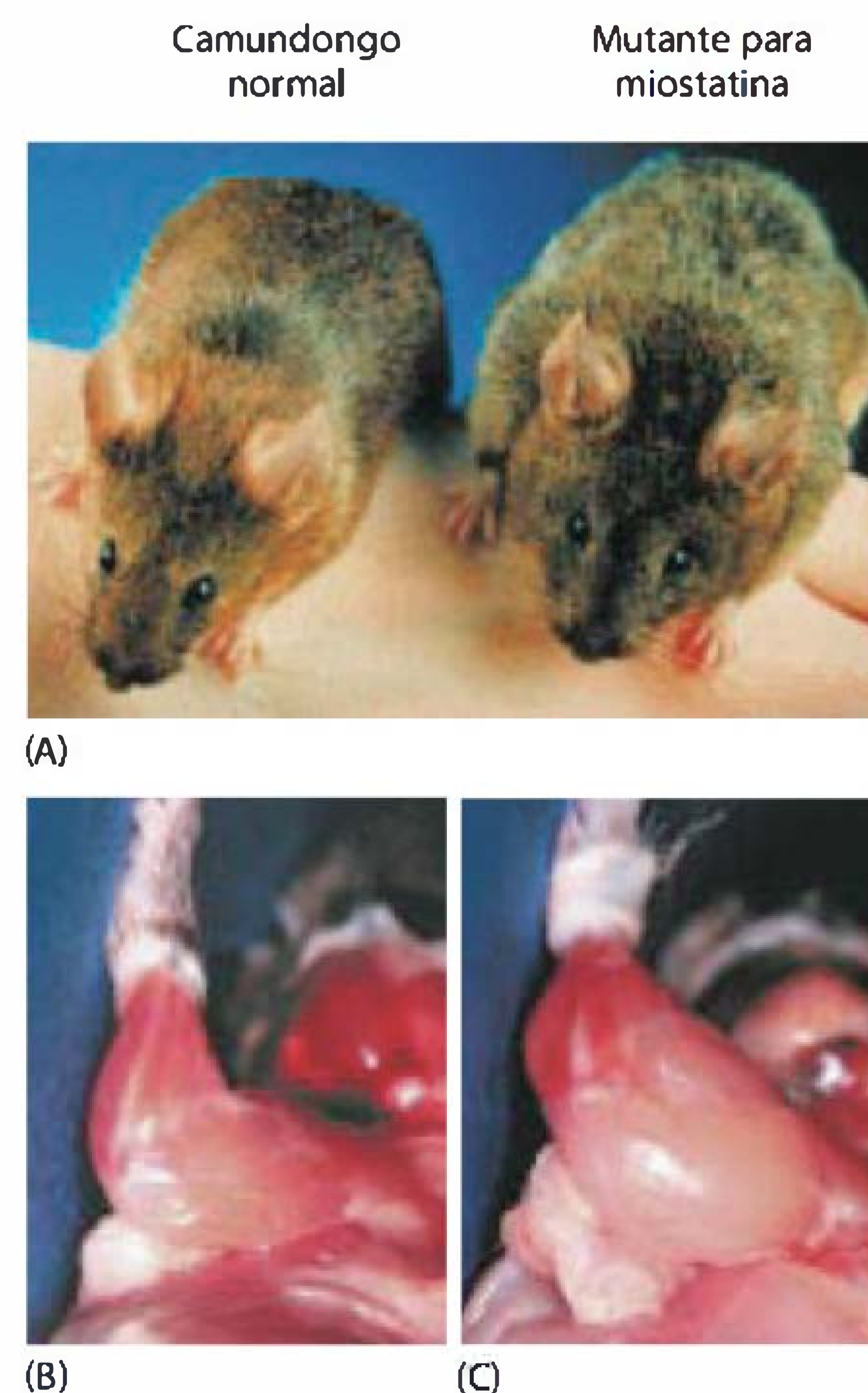


Figura 23-50 Regulação do tamanho do músculo pela miostatina. (A) Um camundongo normal comparado com um camundongo mutante deficiente em miostatina. (B) Perna de um camundongo normal e (C) de um deficiente em miostatina, com a pele removida para mostrar o grande aumento da musculatura no mutante. (De S. J. Lee e A. C. McPherron, Curr. Opin. Genet. Devel. 9:604-607, 1999. Com permissão de Elsevier.)

Portanto, quais são os mecanismos que controlam o número de células musculares e o tamanho da célula muscular? Uma parte da resposta encontra-se em uma proteína-sinal extracelular chamada de *miostatina*. Os camundongos com uma mutação de perda de função no gene da miostatina têm músculos enormes – duas ou três vezes maiores que o normal (**Figura 23-50**). Tanto o número como o tamanho das células musculares parecem estar aumentados. Mutações no mesmo gene estão presentes nas raças de bovinos ditos de "musculatura dupla" (ver Figura 17-69): ao selecionarem para músculos maiores, os criadores de bovinos selecionam, sem querer, para deficiência de miostatina. A miostatina pertence à superfamília de proteínas-sinal TGFβ. Normalmente, ela é produzida e secretada por células musculares esqueléticas, e atua de maneira eficaz sobre mioblastos, inibindo tanto a proliferação quanto a diferenciação. Evidentemente, sua função é providenciar a regulação inibidora (*feedback* negativo) para limitar o crescimento muscular, na vida adulta e durante o desenvolvimento. O crescimento de alguns outros órgãos é controlado de forma semelhante pela ação de *feedback* negativo de um fator que eles próprios produzem. Encontraremos outro exemplo em uma seção posterior.

Alguns mioblastos continuam como células-tronco quiescentes (inativas) no adulto

Mesmo que, normalmente, os humanos não produzam novas fibras musculares esqueléticas na vida adulta, eles ainda têm a capacidade para produzi-las, e as fibras musculares existentes podem retomar o crescimento quando surge a necessidade. Células com capacidade de atuar como mioblastos são conservadas na forma de células pequenas, achatadas e inativas, situadas em contato íntimo com as células musculares maduras e estando contidas dentro da sua bainha de lâmina basal (**Figura 23-51**). Se o músculo é lesado ou estimulado a crescer, estas ***células satélite*** são ativadas a proliferar, e sua progênie pode se fundir para reparar o músculo lesado ou para permitir o crescimento muscular. Como os mioblastos, elas são reguladas pela miostatina. Portanto, as células satélite, ou algum subgrupo de células satélite, são as células-tronco do músculo esquelético adulto, normalmente mantidas como reserva em um estado quiescente, mas disponíveis quando necessárias como fonte autorrenovável de células diferenciadas definitivas. Estudos destas células têm fornecido a mais clara evidência para a hipótese da "fita imortal" de divisão assimétrica de célula-tronco, como ilustrado anteriormente na Figura 23-10.

No entanto, o processo de reparo muscular por meio de células satélite é limitado no que ele pode obter. Em uma forma de *distrofia muscular*, por exemplo, um defeito genético na proteína de citoesqueleto distrofina causa lesão nas células musculares esqueléticas diferenciadas. Como resultado, as células satélite proliferam para reparar as fibras musculares lesadas. Contudo, esta resposta regenerativa é incapaz de acompanhar a lesão e, por fim, o tecido conectivo substitui as células musculares, impedindo qualquer possibilidade remota de regeneração. Uma perda semelhante de capacidade para regeneração parece contribuir para o enfraquecimento do músculo nos idosos.

Na distrofia muscular, em que as células satélite são constantemente recrutadas para proliferar, sua capacidade de divisão pode sofrer esgotamento em consequência do encurtamento progressivo de seus telômeros durante cada ciclo celular (discutido no Capítulo 17). As células-tronco de outros tecidos parecem ser limitadas da mesma maneira, como observamos anteriormente no caso de células-tronco hemopoiéticas: normalmente elas dividem-se

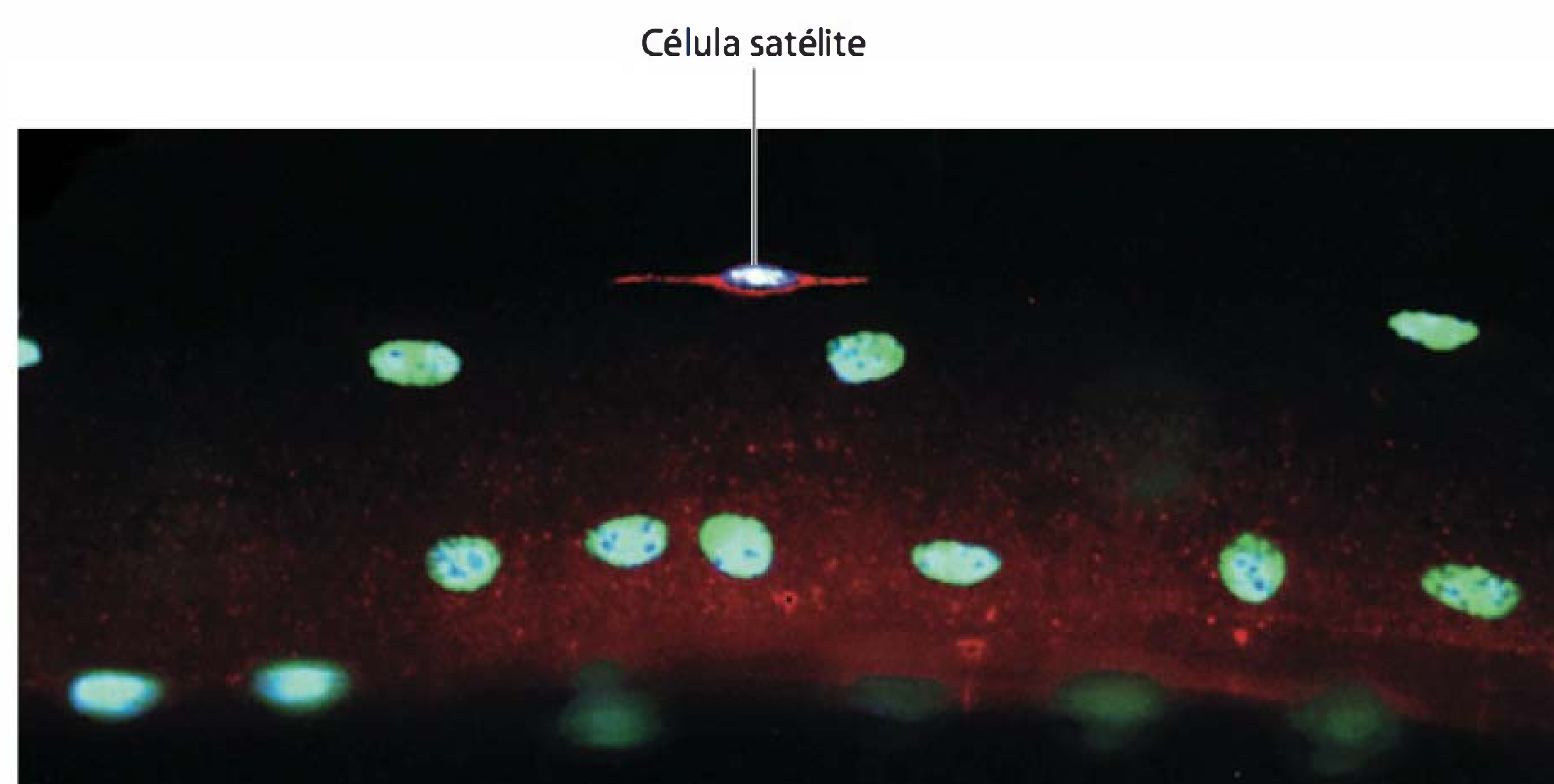


Figura 23-51 Uma célula satélite sobre uma fibra muscular esquelética. A amostra está corada com um anticorpo (vermelho) contra uma caderina muscular, M-caderina, que está presente tanto na célula satélite como na fibra muscular e está concentrada no local em que suas membranas estão em contato. Os núcleos da fibra muscular estão corados de verde, e o núcleo da célula satélite está corado em azul. (Cortesia de Terence Partridge.)

apenas a uma taxa lenta, e mutações ou circunstâncias excepcionais que causem uma divisão mais rápida podem levar à exaustão prematura do suprimento de células-tronco.

Resumo

As fibras musculares esqueléticas são uma das quatro categorias principais de células de vertebrados especializadas em contração e são responsáveis por todos os movimentos voluntários. Cada fibra muscular esquelética é um sincício e se desenvolve pela fusão de muitos mioblastos. Os mioblastos proliferam muito, mas uma vez que tenham se fundido, não podem mais se dividir. A fusão geralmente resulta do começo da diferenciação do mioblasto, na qual muitos genes que codificam proteínas musculares específicas estão ligados coordenadamente. Alguns mioblastos persistem em um estado quiescente na forma de células satélite no músculo adulto; quando um músculo é lesado, essas células são reativadas a proliferar e se fundem para substituir as células musculares que foram perdidas. O volume muscular é regulado homeostaticamente por um mecanismo de feedback *negativo (regulação inibidora), no qual o músculo existente secreta miostatina, que inibe o crescimento muscular adicional.*

FIBROBLASTOS E SUAS TRANSFORMAÇÕES: A FAMÍLIA DE CÉLULAS DO TECIDO CONECTIVO

Muitas das células diferenciadas no corpo adulto podem ser agrupadas em famílias cujos membros estão intimamente relacionados quanto as suas origens e características. Um exemplo importante é a família de **células do tecido conectivo**, cujos membros não estão apenas relacionados, mas também, geralmente, são conversíveis entre si. A família inclui os *fibroblastos*, as *células cartilaginosas* e as *células ósseas*, os quais são todos especializados na secreção de matriz extracelular rica em colágeno e são, em conjunto, responsáveis pela arquitetura estrutural do corpo. A família do tecido conectivo inclui também as *células adiposas* e as *células musculares lisas*. Esses tipos celulares e as interconversões que se acredita que ocorram entre eles são ilustradas na **Figura 23-52**. As células do tecido conectivo contribuem para o suporte e o reparo de quase todo tecido e órgão, e a capacidade de adaptação de seu estado diferenciado é uma característica importante das respostas a muitos tipos de lesão.

Os fibroblastos mudam suas características em resposta aos sinais químicos

Os fibroblastos parecem ser as células menos especializadas na família do tecido conectivo. Eles estão dispersos no tecido conectivo de todo o corpo e secretam uma matriz extracelular não-rígida que é rica em colágeno do tipo I ou tipo III, ou ambos, como foi discutido no Capítulo 19. Quando um tecido é lesado, os fibroblastos próximos proliferam, migram para a ferida e produzem grandes quantidades de matriz rica em colágeno, que ajuda a isolar e a reparar o tecido lesado. Sua capacidade de proliferação em caso de lesão, juntamente com seu estilo de vida solitário, pode explicar por que os fibroblastos são as células mais fáceis de crescer em cultivo – uma característica que tem feito delas o assunto preferido para estudos de biologia celular (**Figura 23-53**).

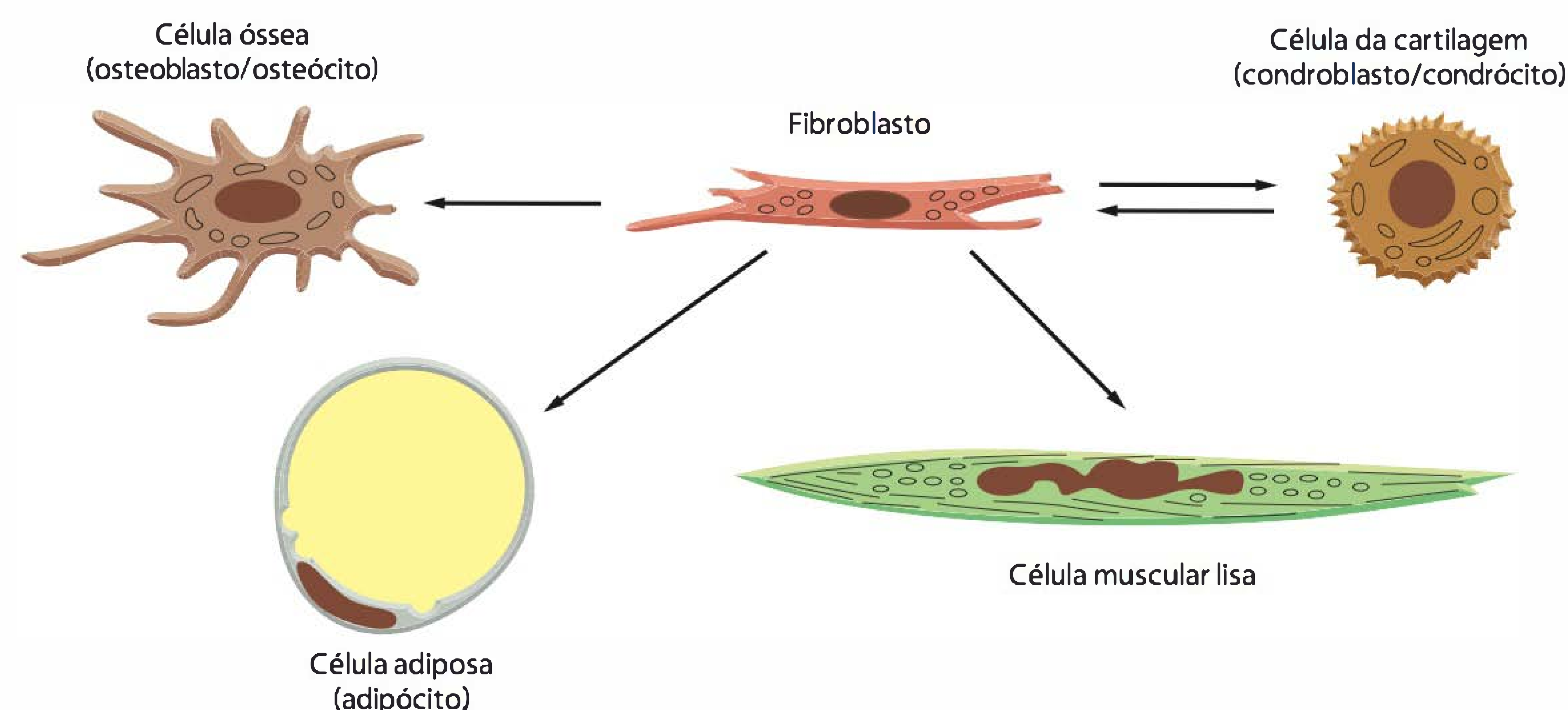


Figura 23-52 A família das células do tecido conectivo. As setas mostram as interconversões que se acredita que ocorram dentro da família. Para simplificar, o fibroblasto é mostrado como um tipo celular único, mas de fato é incerto quantos tipos de fibroblasto existem e se a diferenciação potencial de tipos diferentes é limitada de formas diferentes.



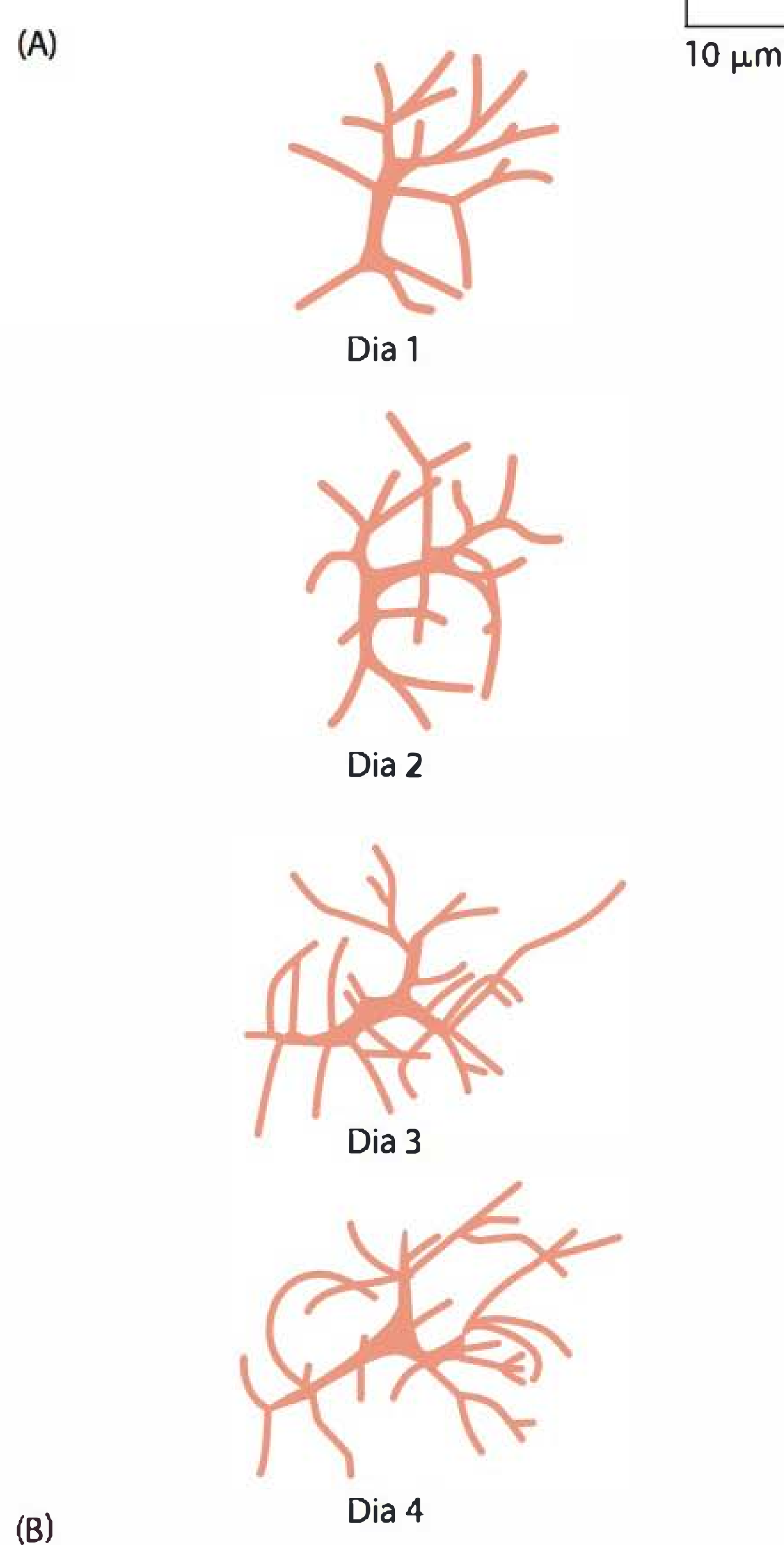


Figura 23-53 O fibroblasto. (A) Uma fotomicrografia em contraste de fase de fibroblastos em cultivo. (B) Estes desenhos de uma célula viva semelhante a fibroblasto, na cauda transparente de um girino, mostram as mudanças em sua forma e em sua posição em dias sucessivos. Note que apesar de os fibroblastos se tornarem achatados em cultivo, eles podem ter uma morfologia mais complexa, com muitos processos celulares, nos tecidos. Ver também Figura 19-54. (A, de E. Pokorna et al., Cell Motil. Cytoskeleton. 28:25-33, 1994; B, redesenhado de E. Clark, Am. J. Anat. 13:351-379, 1912. Ambos com permissão de Willey-Liss.)

Como indicado na Figura 23-52, os fibroblastos também parecem ser as células mais versáteis do tecido conectivo, mostrando uma capacidade notável de diferenciar-se em outros membros da família. No entanto, há incertezas a respeito de suas interconversões. Os fibroblastos em diferentes partes do corpo são intrinsecamente diferentes, e pode haver diferenças entre eles mesmo em uma mesma região. Os fibroblastos "maduros" com uma menor capacidade de transformação podem, por exemplo, coexistir lado a lado com os fibroblastos "imaturos" (frequentemente chamados de células mesenquimais), que podem se desenvolver em uma grande variedade de tipos celulares maduros.

As células do estroma da medula óssea, mencionadas anteriormente, proporcionam um bom exemplo de versatilidade do tecido conectivo. Estas células, que podem ser consideradas um tipo de fibroblasto, podem ser isoladas da medula óssea e propagadas em cultivo. Grandes clones de progênie podem ser produzidos dessa maneira, a partir de um único ancestral de células do estroma. De acordo com as proteínas-sinal que são adicionadas ao meio de cultivo, os membros de um determinado clone podem continuar proliferando para produzir mais células do mesmo tipo, ou podem se diferenciar como células adiposas, células de cartilagem ou células ósseas. Por causa de sua característica multipotente de autorrenovação, são referidas como *células-tronco mesenquimais*.

Os fibroblastos da camada dérmica da pele são diferentes. Quando colocados nas mesmas condições de cultivo, eles não apresentam a mesma plasticidade. Além disso, eles também podem ser induzidos a modificar suas características. Por exemplo, na cicatrização da ferida, eles alteram sua expressão do gene de actina e adquirem algumas das propriedades contráteis das células musculares lisas, auxiliando, desse modo, a aproximar as margens do ferimento; tais células são chamadas de *miofibroblastos*. De forma mais drástica, se uma preparação de matriz óssea, obtida após moer o osso em um pó fino e dissolver o componente mineral rígido, é implantada na camada dérmica da pele, algumas das células (provavelmente fibroblastos) se transformarão em células cartilaginosas e, um pouco mais tarde, serão modificadas em células ósseas, criando, assim, uma pequena protuberância de osso. Esses experimentos sugerem que os componentes da matriz extracelular podem influenciar drasticamente a diferenciação de células do tecido conectivo.

Veremos que transformações celulares semelhantes ocorrem no reparo natural de fraturas ósseas. Na verdade, a matriz óssea contém altas concentrações de várias proteínas-sinal que podem afetar o comportamento de células do tecido conectivo. Estas incluem membros da superfamília TGFβ, inclusive BMPs e o próprio TGFβ. Estes fatores regulam o crescimento, a diferenciação e a síntese de matriz pelas células do tecido conectivo, exercendo uma variedade de ações, dependendo do tipo de célula-alvo e da combinação de outros fatores e componentes da matriz que estejam presentes. Quando injetados em um animal vivo, eles podem induzir a formação de matriz cartilaginosa, óssea ou fibrosa, de acordo com o local e as circunstâncias da injeção. O TGFβ é especialmente importante na cicatrização da ferida, onde estimula a conversão de fibroblastos em miofibroblastos e promove a formação de um tecido cicatricial rico em colágeno que dá resistência à ferida cicatrizada.

A matriz extracelular pode influenciar a diferenciação das células do tecido conectivo por influenciar na forma e na ligação celular

A matriz extracelular pode influenciar o estado diferenciado das células do tecido conectivo por meio de efeitos físicos e químicos. Isto tem sido demonstrado em estudos com cultivo de células de cartilagem, ou **condrócitos**. Sob condições de cultivo adequadas, essas células proliferam e mantêm sua característica diferenciada, continuando a sintetizar, durante muitas gerações celulares, grandes quantidades de uma matriz cartilaginosa muito característica, com a qual elas mesmas se cercam. No entanto, se as células são mantidas em uma densidade relativamente baixa e permanecem como uma monocamada sobre a placa

de cultivo, ocorre uma transformação. Elas perdem sua forma arredondada característica, tornam-se achatadas sobre o substrato e param de produzir matriz cartilaginosa: cessam a produção de colágeno tipo II, característico da cartilagem, e começam a produzir o colágeno tipo I, característico dos fibroblastos. Ao final de um mês em cultivo, quase todas as células cartilaginosas interrompem sua expressão gênica de colágeno e adquirem a aparência de fibroblastos. A modificação bioquímica deve ocorrer bruscamente, uma vez que poucas células são observadas produzindo ambos os tipos de colágeno simultaneamente.

A alteração bioquímica parece ser induzida, ao menos em parte, pela modificação na forma e na ligação celular. Por exemplo, as células cartilaginosas que fizeram a transição para uma característica semelhante a do fibroblasto podem ser suavemente separadas da placa de cultivo e transferidas para uma placa de agarose. Por formar um gel em torno delas, a agarose mantém as células suspensas sem nenhuma fixação a um substrato, forçando-as a adotar uma forma arredondada. Nestas circunstâncias, as células prontamente revertem à característica de condrócitos e começam a produzir novamente colágeno tipo II. A forma e a fixação celular podem controlar a expressão de genes através de sinais intracelulares produzidos em contatos focais por integrinas que atuam como receptores da matriz, como discutido no Capítulo 19.

Para muitos tipos de células, e especialmente para uma célula do tecido conectivo, as possibilidades para ligação e fixação dependem da matriz circundante, que normalmente é produzida pela própria célula. Assim, uma célula pode criar um ambiente que atua de volta sobre ela própria, reforçando seu estado diferenciado. Além disso, a matriz extracelular que uma célula secreta faz parte do ambiente para as suas vizinhas, assim como do ambiente da própria célula, e tende, dessa forma, a fazer as células da vizinhança se diferenciarem da mesma maneira. Um grupo de condrócitos que formam um nódulo de cartilagem, por exemplo, tanto no corpo em desenvolvimento quanto em uma placa de cultivo, pode ser visto aumentando de tamanho pela conversão de fibroblastos vizinhos em condrócitos.

Os osteoblastos produzem matriz óssea

A cartilagem e o osso são tecidos de características muito diferentes; contudo, eles estão estreitamente relacionados na origem, e a formação do esqueleto depende de uma íntima associação entre eles.

A **cartilagem** é um tecido estruturalmente simples, composto de células de um tipo – os condrócitos – embebidas em uma matriz mais ou menos uniforme altamente hidratada, que consiste em proteoglicanos e colágeno tipo II, cujas propriedades notáveis já discutimos anteriormente no Capítulo 19. A matriz cartilaginosa pode alterar sua forma, e o tecido cresce por expansão à medida que os condrócitos se dividem e produzem mais matriz (**Figura 23-54**). O **osso**, ao contrário, é denso e rígido; ele cresce por aposição – isto é, por deposição de matriz adicional sobre as superfícies livres. Como o concreto armado, a matriz óssea é predominantemente uma mistura de fibras rígidas (fibrilas de colágeno tipo I), que resistem às forças de distensão, e de partículas sólidas (fosfato de cálcio na forma de cristais de *hidroxiapatita*), que resistem à compressão. As fibrilas de colágeno no osso adulto estão arranjadas em camadas regulares semelhantes à madeira compensada, com as fibrilas de cada camada dispostas paralelamente umas em relação às outras, mas em ângulos retos em relação às fibrilas nas camadas de ambos os lados adjacentes. O volume ocupado pelas fibrilas de colágeno é aproximadamente igual àquele ocupado pelo fosfato de cálcio. A matriz óssea é secretada por **osteoblastos** que se localizam na superfície da matriz existente e depositam camadas frescas de osso sobre ela. Alguns dos osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros tornam-se gradativamente embebidos em sua própria secreção. Este material recém-produzido (constituído basicamente de colágeno tipo I) é chamado de *osteoide*. Ele é rapidamente convertido em matriz óssea dura pela deposição de cristais de fosfato de

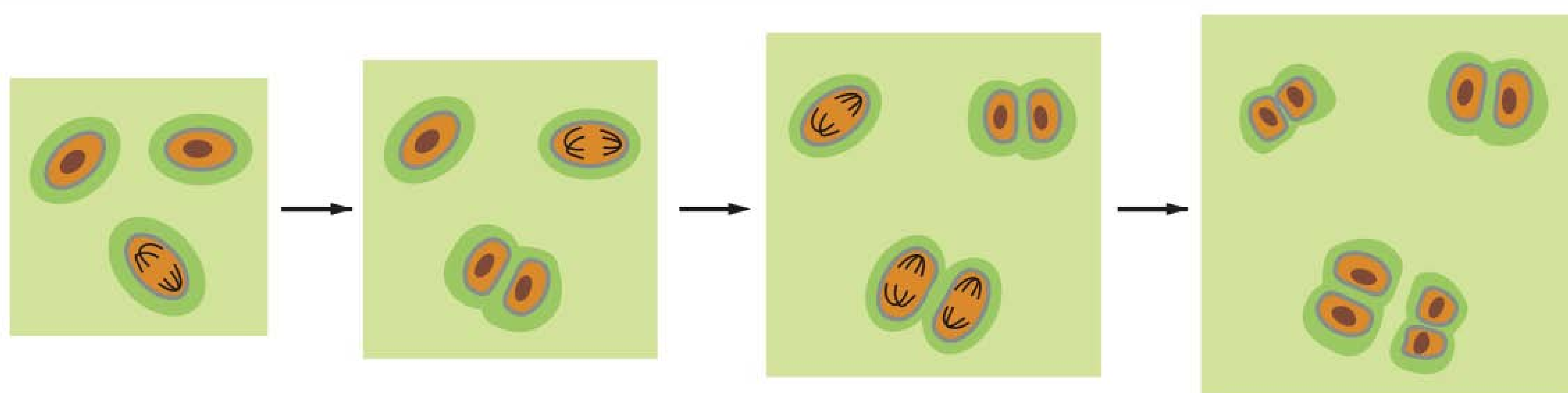


Figura 23-54 O crescimento da cartilagem. O tecido expande enquanto os condrócitos se dividem e produzem mais matriz. A matriz recém-sintetizada com a qual cada célula cerca a si própria é sombreada em verde-escuro. A cartilagem também pode crescer pelo recrutamento de fibroblastos do tecido que a envolve e pela conversão destes em condrócitos.

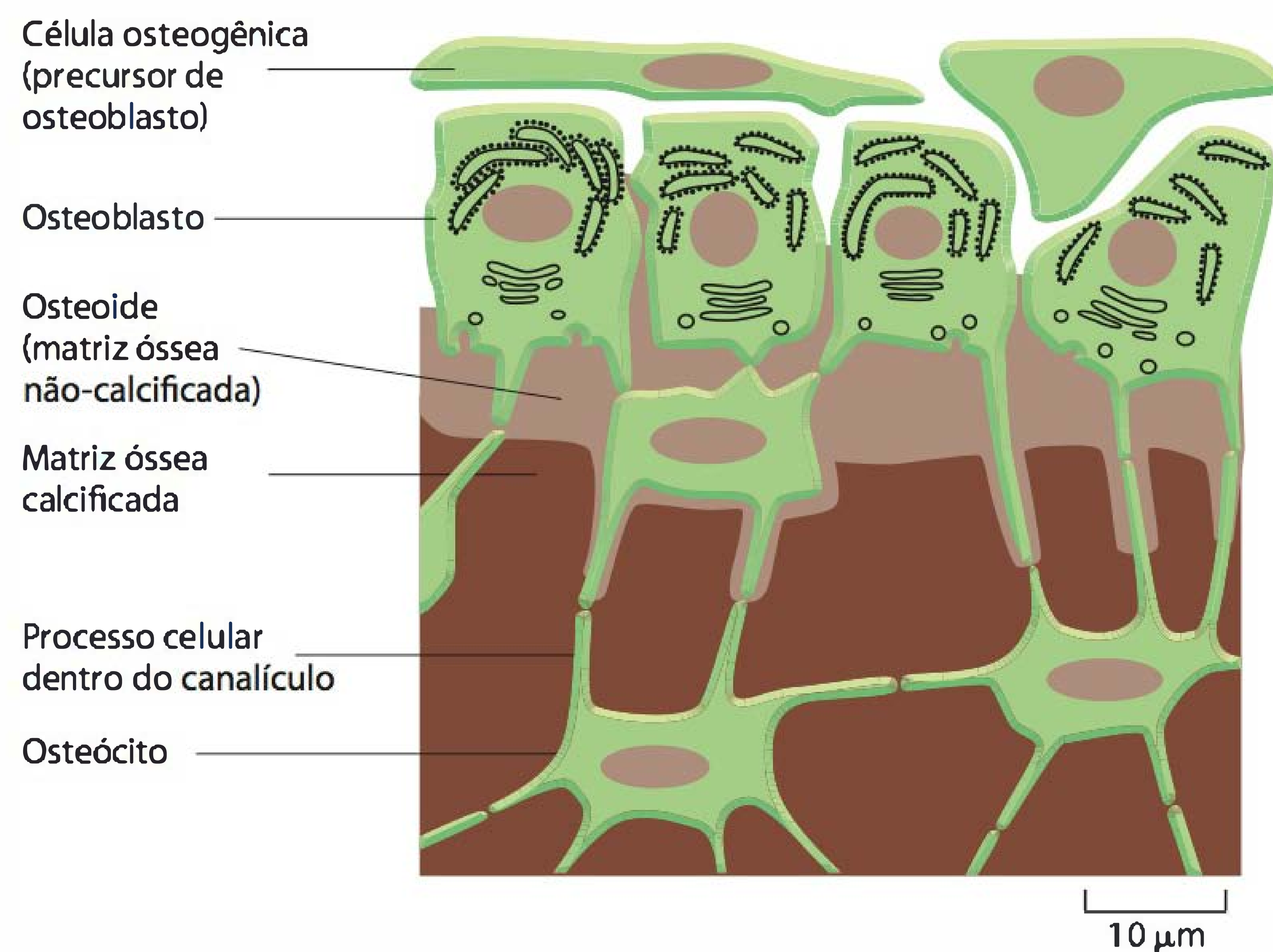


Figura 23-55 Deposição de matriz óssea por osteoblastos. Os osteoblastos que revestem a superfície do osso secretam a matriz orgânica do osso (osteoide) e são convertidos em osteócitos quando eles se tornam embebidos nesta matriz. A matriz calcifica logo após ter sido depositada. Acredita-se que os próprios osteoblastos sejam derivados de células-tronco osteogênicas que estão intimamente relacionadas aos fibroblastos.

cálcio dentro dele. Uma vez aprisionada na matriz dura, a célula formadora de osso original, agora chamada de **osteócito**, não tem oportunidade de se dividir, embora continue a secretar mais matriz, em pequenas quantidades, em torno de si mesma. O osteócito, da mesma forma que o condrócito, ocupa uma pequena cavidade, ou *lacuna*, na matriz, mas, ao contrário do condrócito, ele não está isolado de seus companheiros. Canais muito pequenos, ou *canalículos*, irradiam de cada lacuna e contêm processos celulares do osteócito que está nesta lacuna, permitindo-lhe formar junções comunicantes com osteócitos vizinhos (**Figura 23-55**). Embora as próprias redes de osteócitos não realizem a secreção ou a erosão de quantidades substanciais de matriz, eles provavelmente são responsáveis por parte do controle das atividades das células que as fazem. Vasos sanguíneos e nervos passam através do tecido, mantendo as células ósseas vivas e reagindo quando o osso é lesionado.

Um osso maduro tem uma arquitetura complexa e bela, na qual placas densas de tecido de *osso compacto* circundam espaços atravessados por estruturas leves de *osso trabecular* – uma filigrana de hastes entrelaçadas de tecido ósseo, com medula mole nos interstícios (**Figura 23-56**). A produção, a manutenção e o reparo desta estrutura não dependem apenas das células da família do tecido conectivo que sintetizam matriz, mas também de uma classe separada de células chamadas de *osteoclastos*, que a degradam, como discutiremos a seguir.

A maioria dos ossos é construída em torno de modelos cartilaginosos

A maioria dos ossos, e particularmente os ossos longos dos membros e do tronco, origina-se a partir de pequenos "modelos em escala" formados primeiramente de cartilagem no embrião. Cada modelo cresce e, enquanto nova cartilagem é formada, a cartilagem antiga é substituída por osso. O processo é conhecido como formação óssea *endocondral* (ou *ossificação endocondral*). O crescimento e a erosão da cartilagem e a deposição de osso são tão engenhosamente coordenados que o osso adulto, embora possa ter meio metro de comprimento, tem quase a mesma forma que o modelo cartilaginoso inicial, que não tinha mais que uns poucos milímetros.

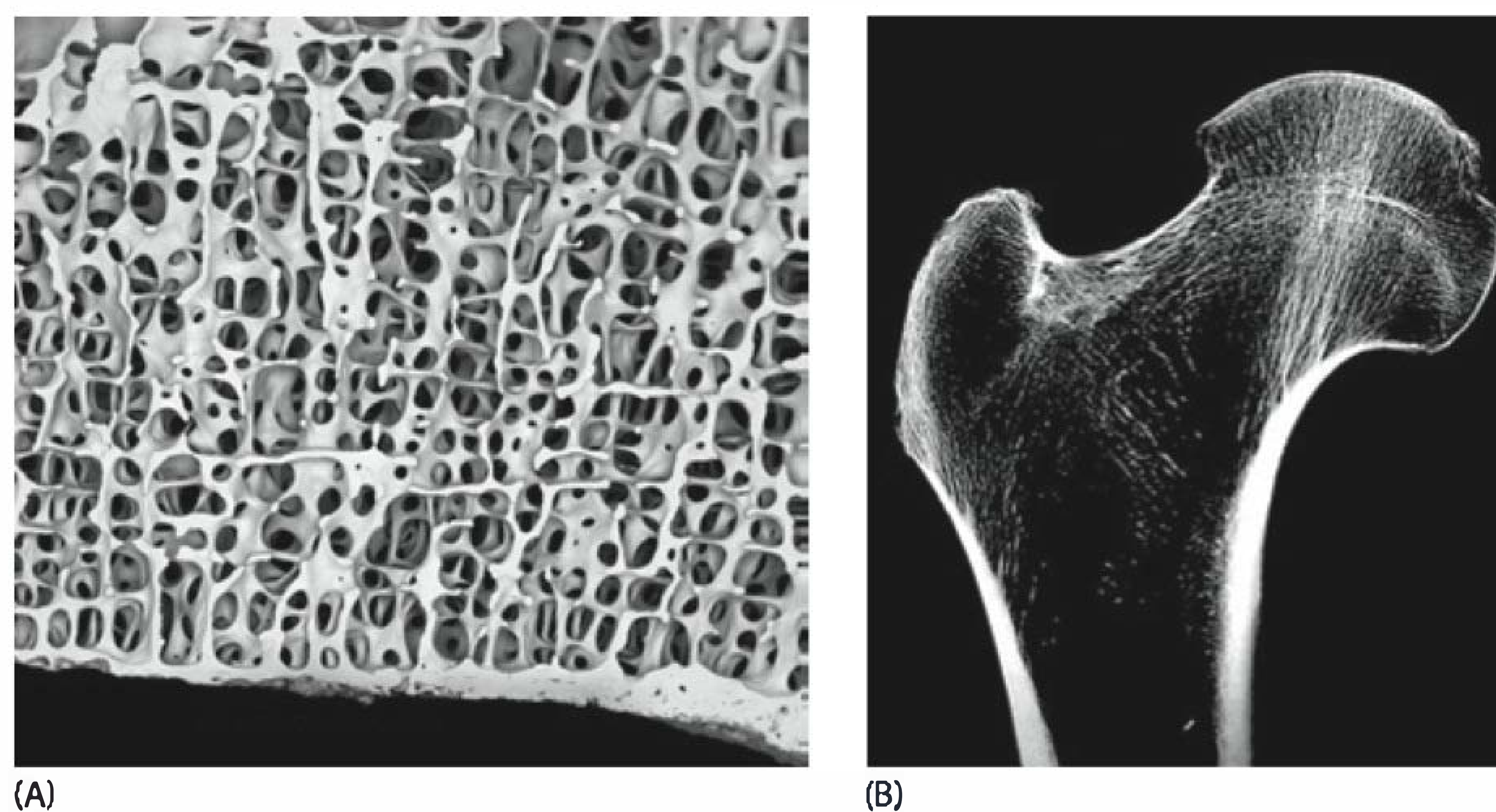


Figura 23-56 Osso trabecular e compacto. (A) Eletromicrografia de varredura em baixa magnitude de osso trabecular na vértebra de um homem adulto. O tecido mole da medula foi dissolvido e retirado. (B) Um corte sagital através da cabeça do fêmur, com a medula óssea e outros tecidos moles igualmente dissolvidos e retirados, revela o osso compacto do tubo ósseo e o osso trabecular no interior. Em função da maneira pela qual o tecido ósseo remodela a si próprio em resposta à carga mecânica, as trabéculas tornam-se orientadas ao longo do eixo principal de tensão dentro do osso. (A, cortesia de Alan Boyde; B, de J. B. Kerr, Atlas of Functional Histology. Mosby, 1999.)

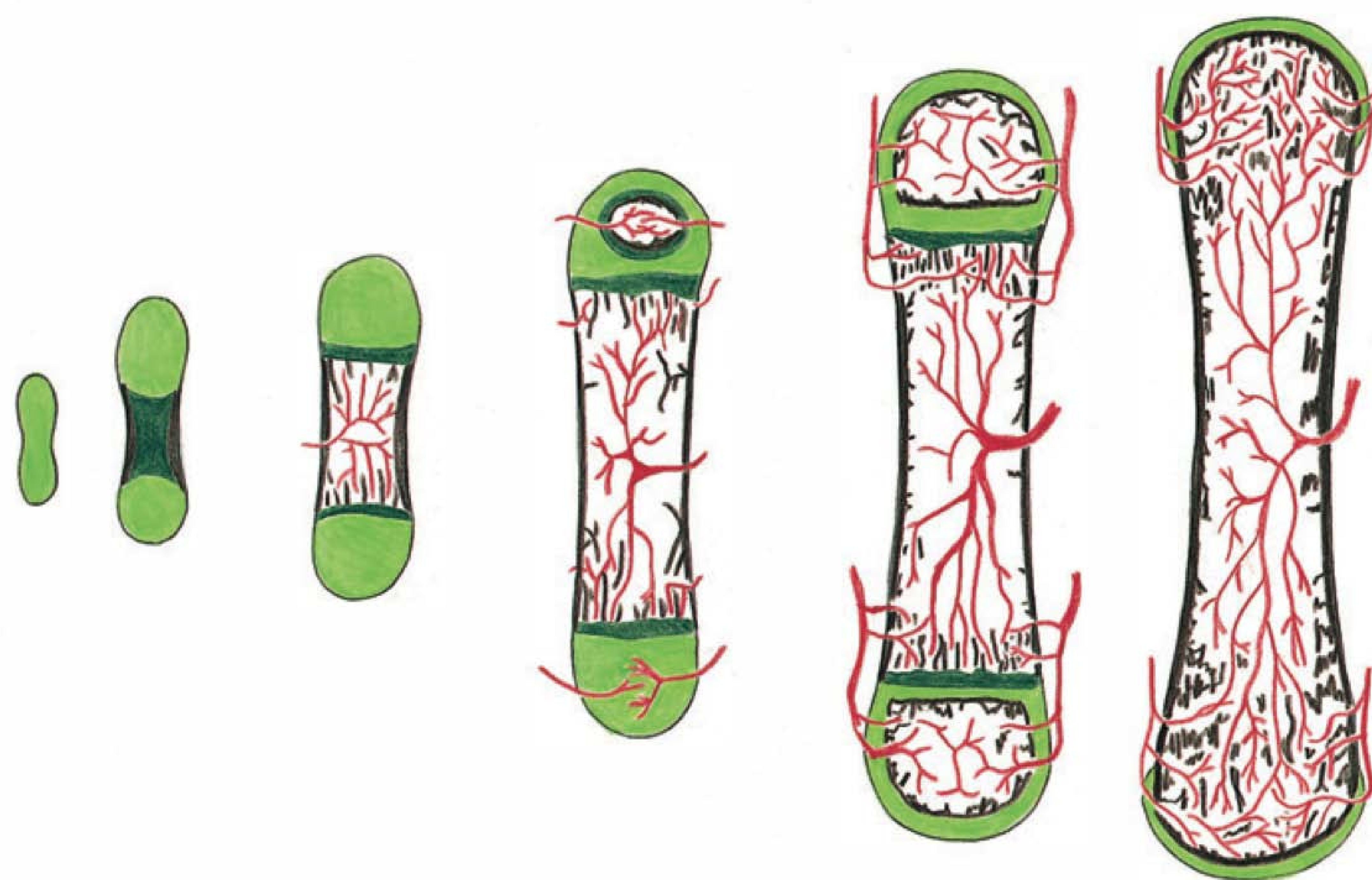


Figura 23-57 O desenvolvimento de um osso longo. Os ossos longos, como o fêmur ou o úmero, desenvolvem-se a partir de um modelo de cartilagem em miniatura. A cartilagem não-calcificada é mostrada em verde-claro; a cartilagem calcificada, em verde-escuro; o osso, em preto, e os vasos sanguíneos, em vermelho. A cartilagem não é transformada em osso, mas é gradativamente substituída por ele pela ação de osteoclastos e de osteoblastos, que invadem a cartilagem em associação com vasos sanguíneos. Os osteoclastos promovem a erosão da matriz da cartilagem e do osso, enquanto os osteoblastos secretam matriz óssea. O processo de ossificação inicia no embrião e não é completado até o fim da puberdade. O osso resultante consiste em um cilindro de osso compacto oco com parede espessa, que cerca uma cavidade central grande ocupada pela medula óssea. Notar que nem todos os ossos se desenvolvem desta maneira. Os ossos membranosos do crânio, por exemplo, são formados diretamente como placas ósseas, não a partir de um modelo prévio de cartilagem. (Adaptada de D. W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12th ed. New York: Chapman and Hall, 1994.)

O processo começa no embrião com o aparecimento de "condensações" indistintamente definidas – grupos de células de tecido conectivo embrionário que se tornam mais intimamente unidas que suas vizinhas e começam a expressar um grupo característico de genes – incluindo, em especial, *Sox9* e, após um ligeiro intervalo, *Runx2*. Estes dois genes codificam proteínas reguladoras de genes que são críticas para o desenvolvimento de cartilagem e osso, respectivamente. Células mutantes que não têm *Sox9* são incapazes de se diferenciar como cartilagem, mas podem formar osso (e em algumas partes do corpo formarão osso onde deveria haver cartilagem). Ao contrário, animais sem *Runx2* funcional não produzem osso e nascem com um esqueleto composto unicamente de cartilagem.

Logo após a expressão de *Sox9* ter iniciado, as células no centro da condensação começam a secretar matriz cartilaginosa, dividindo-se e se expandindo individualmente à medida que fazem isso. Desse modo, elas formam uma haste de cartilagem cercada por células não-cartilaginosas mais densamente unidas. As células cartilaginosas no segmento central da haste tornam-se hipertrofiadas (bastante expandidas) e cessam a divisão; e, ao mesmo tempo, elas começam a secretar Indian Hedgehog – uma molécula-sinal da família Hedgehog. Isto, por sua vez, provoca aumento da produção de certas proteínas Wnt, que ativam a via Wnt em células que circundam a haste de cartilagem. Como resultado, elas desligam a expressão de *Sox9*, mantêm a expressão de *Runx2* e começam a se diferenciar em osteoblastos, criando um colar de osso em torno da haste do modelo de cartilagem. A superativação artificial da via Wnt induz uma proporção maior de células a produzir osso ao invés de cartilagem; um bloqueio artificial da via de sinalização Wnt faz o oposto. Portanto, neste sistema a sinalização Wnt controla a opção entre caminhos alternativos de diferenciação, com a expressão de *Sox9* levando a via em direção à cartilagem, e a expressão de *Runx2* levando a via em direção ao osso.

As células cartilaginosas hipertrofiadas na haste do modelo de cartilagem logo morrem, deixando cavidades grandes na matriz, e a própria matriz torna-se mineralizada, como osso, pela deposição de cristais de fosfato de cálcio. Osteoclastos e vasos sanguíneos invadem as cavidades e coroem a matriz cartilaginosa residual, criando um espaço para a medula óssea, e osteoblastos, seguindo no seu rastro, começam a depositar osso trabecular em partes da cavidade onde fragmentos de matriz cartilaginosa permanecem como um molde. O tecido cartilaginoso nas extremidades do osso é substituído por tecido ósseo em um estágio muito posterior, por um processo um pouco semelhante, como mostrado na **Figura 23-57**. O alongamento contínuo do osso, até o momento da puberdade, depende de uma cartilagem da placa de crescimento (disco ou placa epifisária) entre a haste (diáfise) e a cabeça (epífise) do osso. O crescimento defeituoso de cartilagem desta placa, como resultado de uma mutação dominante no gene que codifica para um receptor FGF (FGFR3), é responsável pela forma mais comum de nanismo, conhecida como *acondroplasia* (**Figura 23-58**).

A cartilagem da placa de crescimento finalmente é substituída por osso e desaparece. O único remanescente vivo de cartilagem no osso longo adulto é uma camada fina, porém



Figura 23-58 Acondroplasia. Este tipo de nanismo ocorre em um a cada 10.000-100.000 nascimentos; em mais de 99% dos casos, resulta de uma mutação em um local idêntico do genoma, que corresponde ao aminoácido 380 (uma glicina no domínio transmembrana) do FGFR3, um receptor de FGF. A mutação é dominante, e quase todos os casos se devem a novas mutações que ocorrem de forma independente, sugerindo uma taxa extraordinariamente alta de mutação neste local particular do genoma. O defeito na sinalização FGF causa nanismo por interferir com o crescimento da cartilagem em ossos longos em desenvolvimento. (Da pintura de Velasquez, de Sebastian de Morra. © Museo del Prado, Madrid.)

importante, que forma uma cobertura lisa e escorregadia nas superfícies ósseas de junções, onde um osso se articula com outro (ver Figura 23-57). A erosão desta camada de cartilagem, durante o envelhecimento, lesão mecânica ou doença autoimune, leva à *artrite*, um dos mais comuns e mais dolorosos sofrimentos da velhice.

O osso é remodelado constantemente pelas células em seu interior

Apesar de toda sua rigidez, o osso não é de modo algum um tecido permanente e imutável. Passando através da matriz extracelular rígida há canais e cavidades ocupados por células vivas, que correspondem a cerca de 15% do peso do osso compacto. Essas células estão envolvidas em um processo incessante de remodelação: enquanto os osteoblastos depositam matriz óssea nova, os osteoclastos destroem a matriz óssea velha. Esse mecanismo proporciona a contínua renovação e substituição de matriz no interior do osso.

Os **osteoclastos** (**Figura 23-59**) são células multinucleadas grandes que se originam, como os macrófagos, de células-tronco hemopoiéticas na medula óssea. As células precursoras são liberadas como monócitos na corrente sanguínea e juntam-se em locais de reabsorção óssea, onde se fundem para formar os osteoclastos multinucleados, que se aderem às superfícies da matriz óssea e a corroem. Os osteoclastos são capazes de abrir um túnel profundo na substância-matriz do osso compacto, formando cavidades que são invadidas por outras células. Um capilar sanguíneo cresce em direção ao centro de um desses túneis, e

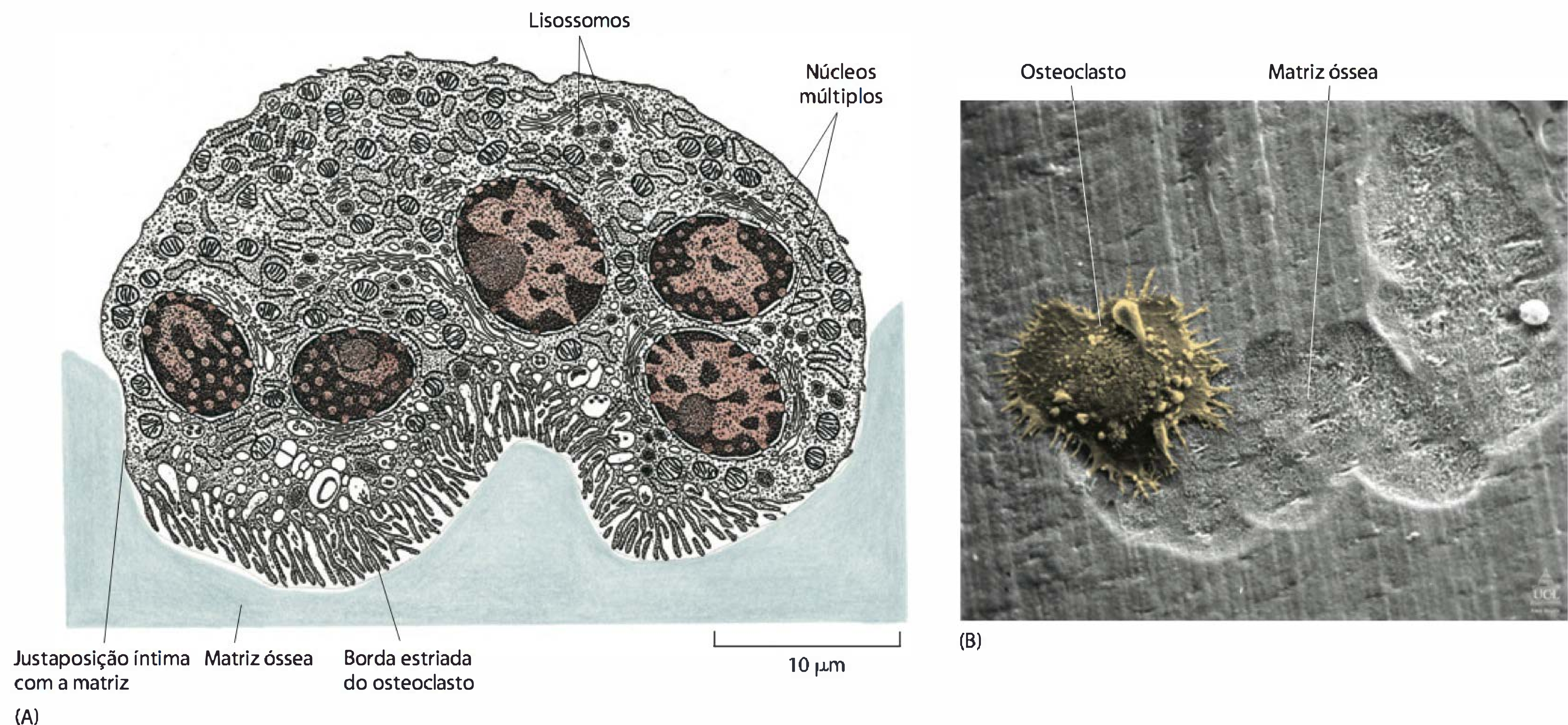


Figura 23-59 Osteoclastos. (A) Esquema de um osteoclasto em corte transversal. Esta célula gigante, multinucleada, promove erosão da matriz óssea. A "borda estriada" é um local de secreção de ácidos (para dissolver os minerais do osso) e de hidrolases (para digerir os componentes orgânicos da matriz). Os osteoclastos variam em forma, são móveis e frequentemente emitem processos para reabsorver osso em vários locais. Eles se desenvolvem a partir de monócitos e podem ser vistos como macrófagos especializados. (B) Um osteoclasto na matriz óssea, visto por microscopia eletrônica de varredura. O osteoclasto se arrasta lentamente sobre a matriz, promovendo sua erosão e deixando uma trilha de crateras onde ele causou erosão. (A, de R. V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1979; B, cortesia de Alan Boyde.)

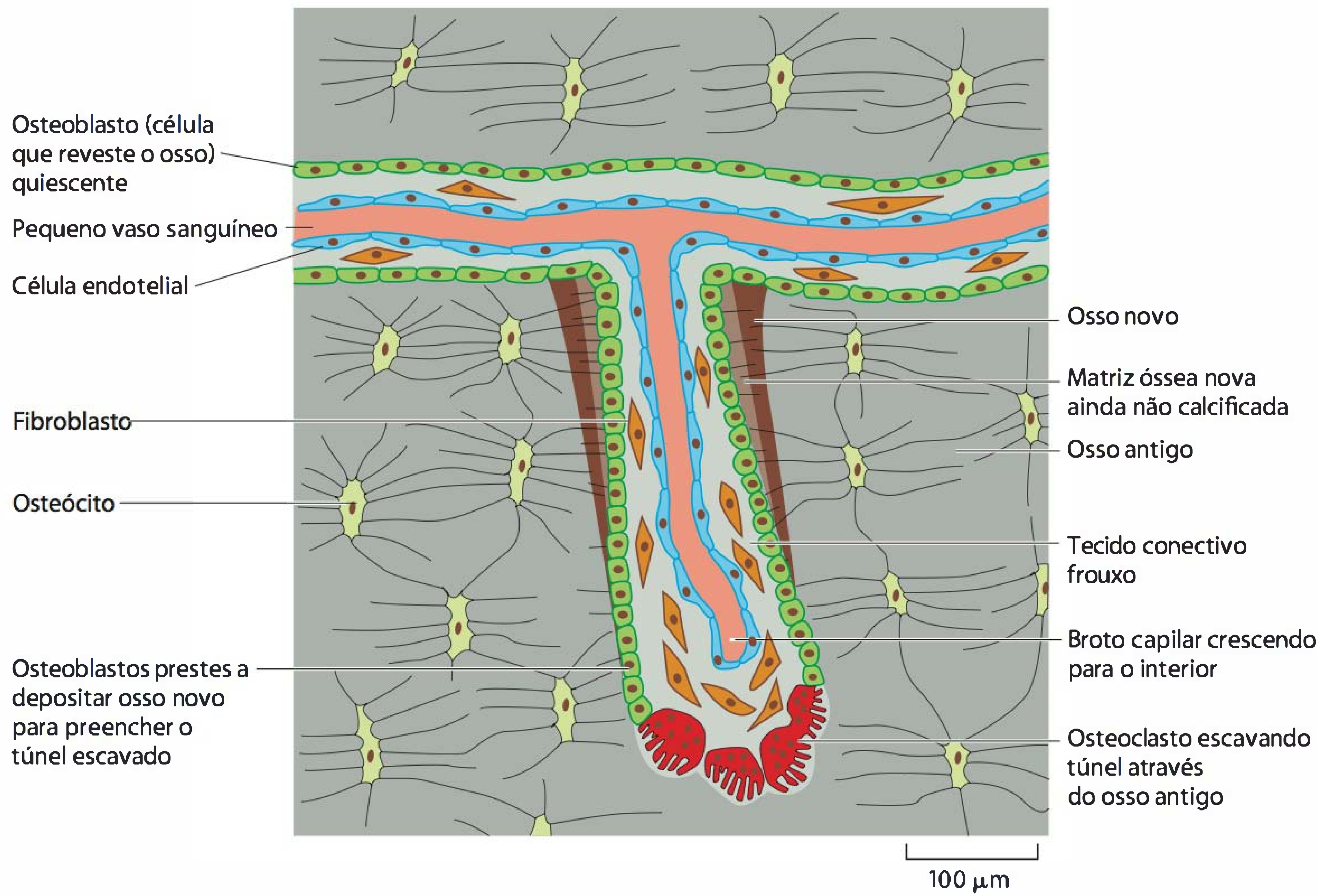


Figura 23-60 O remodelamento do osso compacto. Os osteoclastos atuando juntos em um pequeno grupo escavam um túnel no osso antigo, avançando em uma taxa de cerca de 50 mm por dia. Os osteoblastos entram no túnel atrás deles, revestem suas paredes e começam a formar osso novo, depositando camadas de matriz a uma taxa de 1 a 2 mm por dia. Ao mesmo tempo, um capilar brota em direção ao centro do túnel. O túnel finalmente torna-se preenchido com camadas concêntricas de osso novo, apenas com um canal central estreito remanescente. Cada um desses canais, além de proporcionar um caminho de acesso para os osteoclastos e osteoblastos, contém um ou mais vasos sanguíneos que transportam os nutrientes que as células ósseas necessitam para sobreviver. Caracteristicamente, cerca de 5 a 10% do osso em um mamífero adulto saudável são substituídos desta maneira a cada ano. (Com base em Z. F. G. Jaworski, B. Duck e G. Sekaly, J. Anat. 133:397-405, 1981. Com permissão de Blackwell Publishing.)

as paredes do túnel tornam-se revestidas com uma camada de osteoblastos (**Figura 23-60**). Para produzir a estrutura semelhante à madeira compensada do osso compacto, estes osteoblastos depõem camadas concêntricas de matriz nova, que gradualmente preenchem a cavidade, deixando somente um canal estreito em torno do novo vaso sanguíneo. Muitos dos osteoblastos são capturados pela matriz óssea e sobrevivem como anéis concêntricos de osteócitos. Ao mesmo tempo que alguns túneis são preenchidos totalmente com osso, outros estão sendo perfurados por osteoclastos, que cortam através de sistemas concêntricos mais velhos. As consequências deste remodelamento perpétuo são mostradas no padrão de camadas sobrepostas de matriz observado no osso compacto (**Figura 23-61**).

Os osteoclastos são controlados por sinais de osteoblastos

Os osteoblastos que produzem a matriz também produzem os sinais que recrutam e ativam os osteoclastos para degradá-la. Duas proteínas parecem ter este papel: uma é o CSF

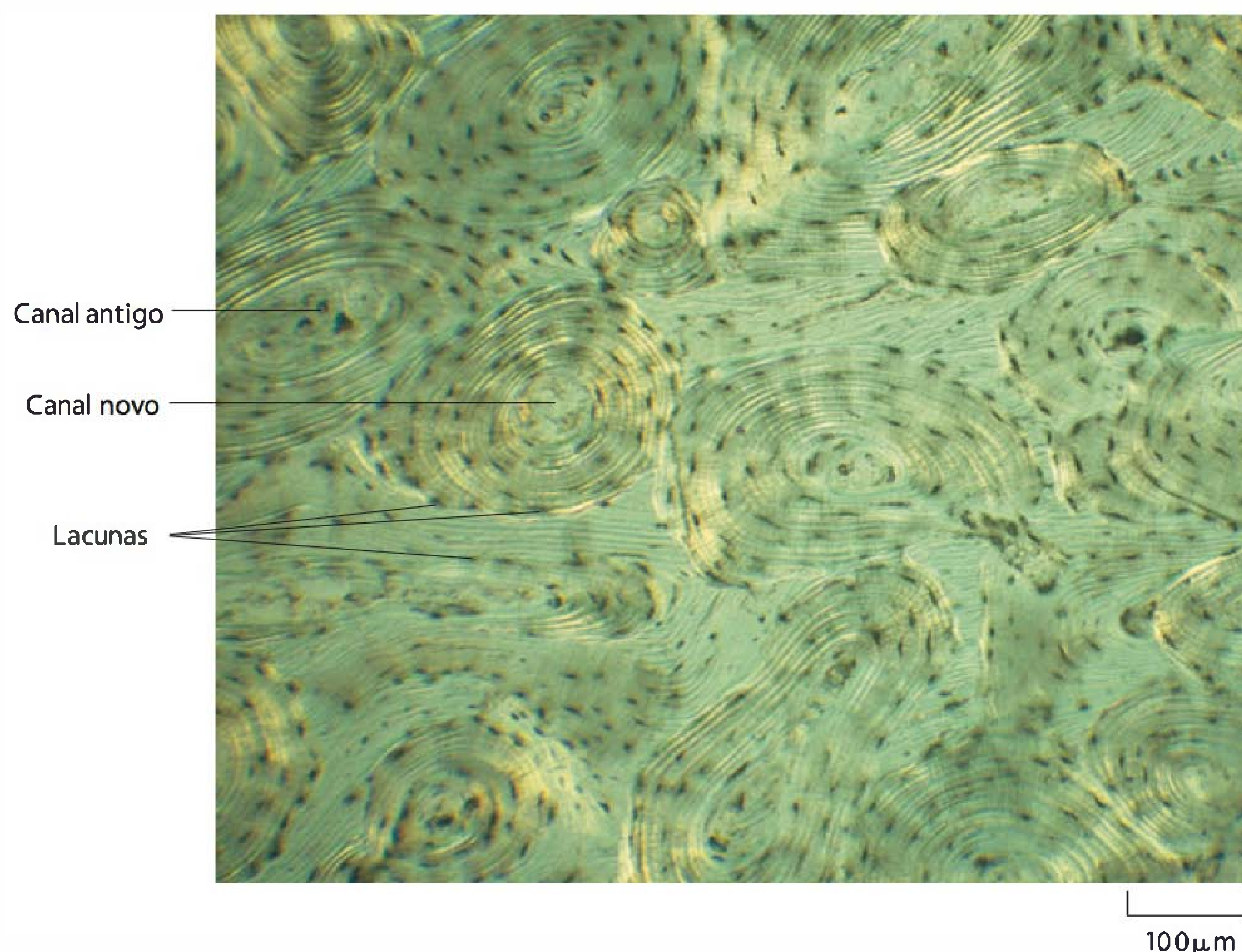


Figura 23-61 Um corte transversal de uma porção externa compacta de um osso longo. A micrografia mostra os contornos de túneis formados por osteoclastos e depois preenchidos por osteoblastos durante sucessivas rodadas de remodelamento ósseo. O corte foi preparado por desgaste. A matriz dura foi preservada, mas não as células. No entanto, as lacunas e os canalículos que foram ocupados por osteócitos são claramente visíveis. Os anéis concêntricos claros e escuros que se sucedem correspondem a uma orientação alternada das fibras de colágeno em camadas sucessivas de matriz óssea depositada pelos osteoblastos que revestiam a parede do canal em vida. (Este padrão é revelado aqui pela visualização da amostra entre filtros que polarizam o corte parcialmente.) Notar como os sistemas mais antigos de camadas concêntricas de osso foram parcialmente cortados e substituídos por sistemas mais novos.

de macrófago (MCSF), que encontramos anteriormente em nosso relato de hemopoiese (ver Tabela 23-2); a outra é TNF11, um membro da família TNF (também chamado de RANKL). O comportamento dos osteoblastos na atração de seus oponentes pode parecer contraproducente, mas tem uma função útil na localização de osteoclastos no tecido onde são necessários.

Para evitar a degradação excessiva de matriz, os osteoblastos secretam, juntamente com MCSF e TNF11, outra proteína, a *osteoprotegerina*, que tende a bloquear a ação de TNF11. Quanto mais alto o nível de ativação Wnt nos osteoblastos, mais osteoprotegerina eles secretam e, consequentemente, menor o nível de ativação de osteoclastos e menor a taxa de degradação de matriz óssea. Assim, a via de sinalização Wnt parece ter duas funções distintas na formação óssea: nos estágios precoces, ela controla o comprometimento inicial de células com um destino para osteoblasto; mais tarde, ela atua nos osteoblastos diferenciados para ajudar a dirigir o balanço entre a deposição e a erosão da matriz.

Distúrbios deste balanço podem levar à *osteoporose*, na qual há excessiva erosão da matriz óssea e enfraquecimento do osso, ou à condição oposta, *osteopetrose*, na qual o osso se torna excessivamente espesso e denso. Sinais hormonais, incluindo estrógenos, andrógenos e o hormônio peptídico *leptina*, famoso por seu papel no controle do apetite (discutido a seguir), têm efeitos potentes neste balanço. Pelo menos alguns destes efeitos são mediados por influências sobre a produção de TNF11 e osteoprotegerina dos osteoblastos.

Os hormônios circulantes afetam os ossos por todo o corpo. Não menos importantes são os controles locais que permitem ao osso ser depositado em um local enquanto é reabsorvido em outro. Por estes controles sobre o processo de remodelamento, os ossos são dotados de uma habilidade notável para adaptar sua estrutura em resposta a variações de longa duração na carga imposta a eles. É isso que torna possível, por exemplo, a ortodontia: uma força constante aplicada a um dente com um grampo fará com que ele se mova gradativamente, durante muitos meses, pelo osso da mandíbula, através do remodelamento do tecido ósseo na frente e atrás dele. O comportamento adaptativo do osso sugere que a deposição e a erosão da matriz são controladas de alguma maneira pelo estresse mecânico local (ver Figura 23-56). Algumas evidências sugerem que isso ocorre porque o estresse mecânico sobre o tecido ósseo ativa a via Wnt nos osteoblastos ou nos osteócitos, regulando, dessa maneira, sua produção de sinais que regulam a atividade dos osteoclastos.

O osso também pode sofrer uma reconstrução muito mais rápida e dramática quando surge a necessidade. Algumas células capazes de formar cartilagem nova persistem no tecido conectivo que cerca um osso. Se o osso é quebrado, as células na vizinhança da fratura o reparam por meio de uma espécie de retomada do processo embrionário original: primeiro é depositada cartilagem para preencher a fenda e depois é substituída por osso. A capacidade para autorreparo, tão impressionantemente ilustrada pelos tecidos do esqueleto, é uma propriedade das estruturas vivas que não tem paralelo entre os objetos feitos atualmente pelo homem.

As células adiposas podem desenvolver-se a partir de fibroblastos

As **células adiposas**, ou **adipócitos**, também derivam de células semelhantes a fibroblasto, tanto durante o desenvolvimento normal dos mamíferos como em várias circunstâncias patológicas. Na distrofia muscular, por exemplo, na qual as células musculares morrem, elas são gradativamente substituídas por tecido conectivo adiposo, provavelmente pela conversão de fibroblastos locais. A diferenciação (normal ou patológica) de células adiposas começa com a expressão de duas famílias de proteínas reguladoras de genes: a família *CEBP* (de *CCAAT/enhancer binding protein*) e a família *PPAR* (de *peroxisome proliferator-activated receptor*), especialmente PPARγ. Como as famílias MyoD e MEF2 no desenvolvimento do músculo esquelético, as proteínas CEBP e PPARγ regulam e mantêm a expressão uma da outra, por meio de várias vias de controle de regulação cruzada e de autorregulação. Elas funcionam juntas para controlar a expressão dos outros genes característicos de adipócitos.

A produção de enzimas para importação de ácidos graxos e glicose e para síntese de gordura leva ao acúmulo de gotículas de gordura, que consistem principalmente em triacilglicerol (ver Figura 2-81). Estas, então, se fundem e aumentam de volume até que a célula seja bastante distendida (acima de 120 μm de diâmetro), com apenas uma borda estreita de citoplasma em torno da massa de lipídeo (**Figura 23-62** e **Figura 23-63**). As lipases também são produzidas em células adiposas, dando-lhes a capacidade de reverter o processo de acúmulo de lipídeo, pela degradação de triacilglicerol em ácidos graxos que podem ser

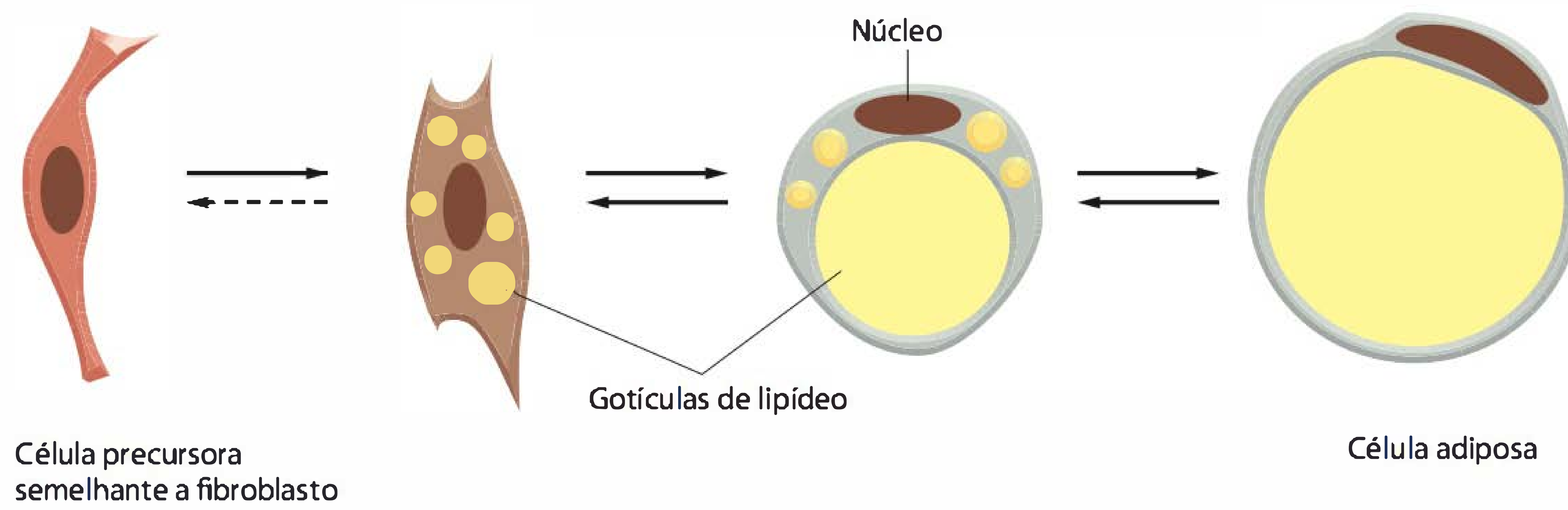


Figura 23-62 Desenvolvimento de uma célula adiposa. Uma célula precursora semelhante a fibroblasto é convertida em uma célula adiposa madura pelo acúmulo e pela fusão de gotículas de lipídeo. O processo é pelo menos em parte reversível, como indicado pelas setas; a seta tracejada indica a incerteza quanto à possibilidade de uma célula adiposa diferenciada poder sempre reverter a um estado de fibroblasto pluripotente. As células nos estágios iniciais e intermediários podem se dividir, mas a célula adiposa madura não pode.

secretados para consumo por outras células. A célula adiposa altera seu volume cerca de mil vezes quando acumula e libera lipídeo.

A leptina secretada por células adiposas promove o *feedback* para regular o consumo de alimento

Quase todos os animais sob circunstâncias naturais têm que competir pelos suprimentos de alimentos que são variáveis e imprevisíveis. As células adiposas têm o papel vital de armazenamento de reservas de alimento em momentos de fartura e de sua liberação em momentos de escassez. Por isso, é essencial para a função do tecido adiposo que sua quantidade seja ajustada durante toda a vida, de acordo com a oferta de nutrientes. Para nossos antepassados, isso foi uma benção; na metade bem-alimentada do mundo moderno, tornou-se uma maldição. Nos Estados Unidos, por exemplo, aproximadamente 30% da população sofre de obesidade, definida como um índice de massa corporal (peso/altura^2) maior que 30 kg/m^2, o que equivale a cerca de 30% acima do peso ideal.

Não é fácil determinar até que ponto as alterações na quantidade de tecido adiposo dependem de alterações no número de células adiposas, ou de alterações no tamanho das células de gordura. As mudanças no tamanho celular provavelmente são o principal fator em adultos normais não-obesos, mas, pelo menos na obesidade grave, o número de células adiposas também aumenta. Os fatores que controlam o recrutamento de novas células adiposas não são bem-compreendidos, embora se acredite que entre eles se incluam o hormônio do crescimento e o IGF1 (fator de crescimento 1 semelhante à insulina, de *insulinlike growth factor-1*). No entanto, é evidente que o aumento ou a diminuição do tamanho da célula adiposa é regulado diretamente pelos níveis de nutrientes circulantes e por hormônios, como a insulina, que refletem os níveis de nutrientes. Dessa forma, o excesso de alimento ingerido acima das necessidades energéticas controla diretamente o acúmulo de tecido adiposo.

Contudo, como são reguladas a ingestão de alimento e a energia gasta? Fatores tais como a colecistoquinina, secretada pelas células intestinais em resposta à presença de alimento no lúmen intestinal, como discutido anteriormente, são responsáveis pelo controle a curto prazo, pelo período de uma refeição ou de um dia. Mas também necessitamos de controles a longo prazo, para não nos tornamos irremediavelmente gordos ou magros ao longo de toda a vida. O mais importante, de um ponto de vista evolutivo e por nossos antepassados terem competido por fontes de alimento que muitas vezes eram escassas e incertas, a fome deve provocar o apetite e obrigar a procura de alimento. Aqueles que têm real conhecimento de fome prolongada testemunharam a irresistível força desta compulsão. O sinal-chave parece ser um hormônio proteico chamado de **leptina**, que circula na corrente sanguínea quando as reservas de gordura são adequadas, e desaparece, produzindo fome crônica, quando não são. Camundongos mutantes que carecem de leptina ou do receptor apropriado para leptina são extremamente gordos (**Figura 23-64**). As mutações nos mesmos genes algumas vezes ocorrem em humanos, embora de forma muito rara. As consequências são semelhantes: fome constante, ingestão em excesso e obesidade mórbida.

A leptina normalmente é produzida por células adiposas; quanto maiores elas são, mais elas produzem. A leptina atua em muitos tecidos e, em especial, no cérebro, em células das regiões do hipotálamo que regulam o comportamento de ingestão. A ausência de leptina é um sinal de fome, conduzindo ao comportamento que irá restaurar as reservas de gordura ao seu nível apropriado. Assim, a leptina, como a miostatina liberada pelas células musculares, proporciona um mecanismo de *feedback* negativo (regulação inibidora) para regular o crescimento do tecido que a secreta.

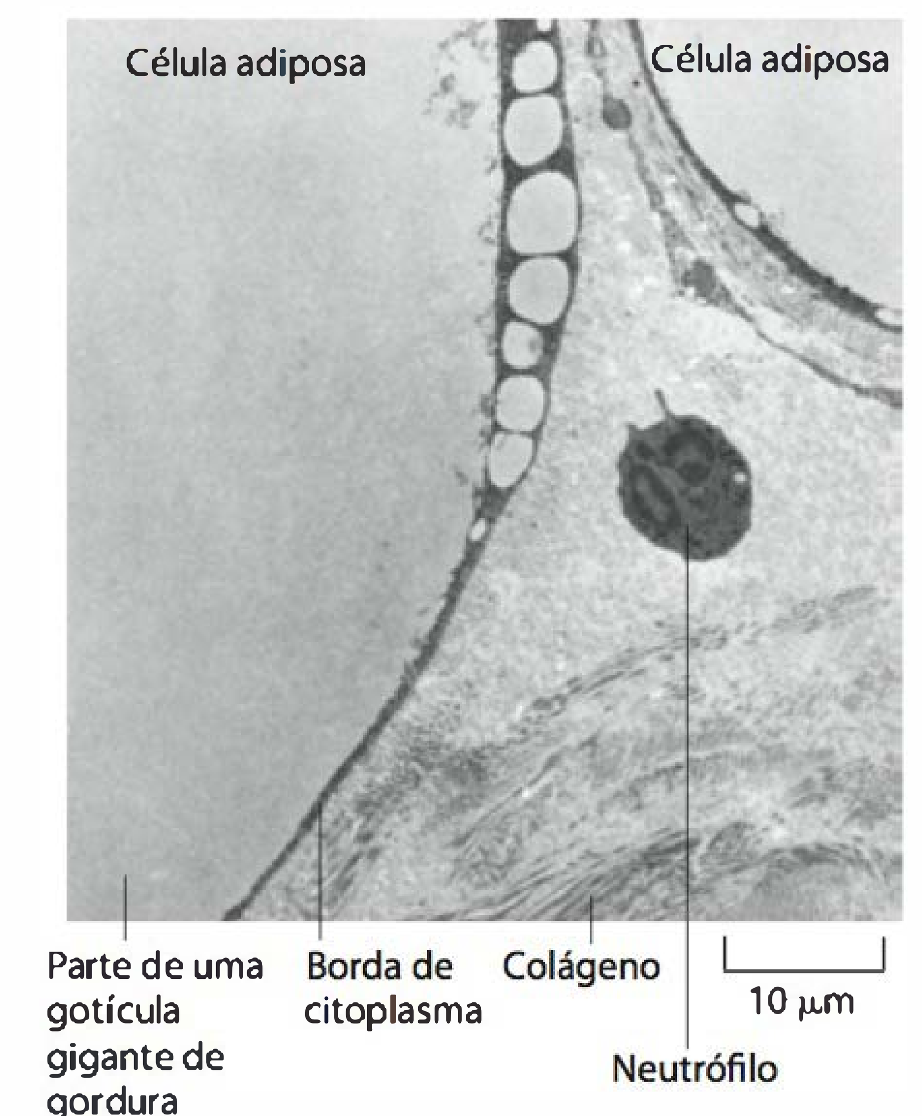


Figura 23-63 Células adiposas. Esta eletromicrografia de baixa magnitude mostra partes de duas células adiposas. Um neutrófilo que casualmente está presente no tecido conectivo adjacente dá uma noção de escala; cada uma das células adiposas é mais de 10 vezes maior que o neutrófilo em diâmetro e está quase inteiramente cheia com uma única gotícula grande de gordura. As pequenas gotículas de gordura (formas ovais claras) na borda de citoplasma remanescente estão destinadas a fundir-se com a gotícula central. O núcleo não é visível em nenhuma das células adiposas na imagem. (Cortesia de Don Fawcett, de D. W. Fawcett, A Textbook of Histology, 12th ed. New York: Chapman and Hall, 1994.)



Figura 23-64 Efeitos da deficiência de leptina. Um camundongo normal (à direita) comparado com um camundongo que tem uma mutação no gene da obesidade, que codifica para leptina (à esquerda). O mutante deficiente em leptina deixa de limitar sua ingestão e torna-se grotescamente gordo (três vezes o peso de um camundongo normal). (Cortesia de Jeffrey M. Friedman.)

Na maioria das pessoas obesas, os níveis de leptina na corrente sanguínea são constantemente altos, e mesmo assim o apetite não é suprimido, embora os receptores de leptina também estejam presentes e funcionais. O controle envolvido no *feedback* da leptina parece nos salvar da morte pela fome ao invés da obesidade pelo excesso de ingestão de alimentos. Nas regiões bem-alimentadas do mundo, dependemos de um complexo de outros mecanismos, muitos deles ainda pouco compreendidos, para manter-nos produzindo mais gordura.

Resumo

A família de células do tecido conectivo inclui fibroblastos, células cartilaginosas, células ósseas, células adiposas e células musculares lisas. Alguns tipos de fibroblastos, como as células-tronco mesenquimais da medula óssea, parecem ser capazes de se transformar em qualquer dos outros membros desta família. Essas transformações de tipos celulares de tecido conectivo são reguladas pela composição da matriz extracelular circundante, pela forma celular e por hormônios e fatores de crescimento.

Tanto a cartilagem como o osso consistem em células e matriz sólida que as células secretam em torno delas mesmas – condrócitos na cartilagem, osteoblastos no osso (osteócitos são osteoblastos que tornaram-se aprisionados dentro da matriz óssea). A matriz da cartilagem é capaz de alterar sua forma de modo que o tecido possa crescer por expansão, enquanto o osso é rígido e pode crescer apenas por aposição. Os dois tecidos têm origens relacionadas e colaboram intimamente. Dessa forma, a maioria dos ossos longos se desenvolve a partir de "modelos" de cartilagem em miniatura, os quais, à medida que crescem, servem como molde para a deposição de osso. A sinalização Wnt regula a escolha entre os dois caminhos de diferenciação – como condrócito (necessitando da expressão de Sox9) ou como osteoblasto (necessitando da expressão de Runx2). Enquanto os osteoblastos secretam matriz óssea, eles também produzem sinais que recrutam monócitos da circulação para tornarem-se osteoclastos, os quais degradam a matriz óssea. Os osteoblastos e os osteócitos controlam o balanço de deposição e degradação de matriz ajustando os sinais que eles enviam para os osteoclastos. Pela atividade destas classes de células antagonistas, o osso é submetido à remodelação perpétua pela qual ele pode se adaptar à carga que pode suportar e alterar sua densidade em resposta aos sinais hormonais. Além disso, o osso adulto conserva uma capacidade de reparar a si próprio se sofre uma fratura, por reativação dos mecanismos que controlam seu desenvolvimento embrionário; as células na vizinhança da fratura convertem o tecido em cartilagem, que, depois, é substituída por osso.

Enquanto a principal função da maioria dos membros da família do tecido conectivo é secretar a matriz extracelular, as células adiposas servem como locais de armazenamento de gordura. O controle por feedback *mantém a quantidade de tecido adiposo baixa: as células adiposas liberam um hormônio, a leptina, que atua no cérebro, e o desaparecimento de leptina atua como um sinal de perigo de fome, conduzindo ao comportamento que irá restaurar as reservas de gordura ao seu nível apropriado.*

MODIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

Como temos observado, muitos dos tecidos do corpo não estão apenas se autorrenovando, mas também se autorreparando, e isso graças às células-tronco e aos controles de *feedback*

que regulam seu comportamento. Contudo, onde os mecanismos da própria Natureza falham podemos intervir e fazer melhor? Podemos encontrar maneiras de obter células para reconstruir tecidos vivos que tenham sido perdidos ou feridos por doenças ou lesões e que são incapazes de reparo espontâneo? Uma estratégia óbvia é explorar as capacidades de desenvolvimento especial das células-tronco ou progenitoras das quais derivam normalmente os componentes do tecido perdido. Contudo, como tais células são obtidas, e como podemos colocá-las em uso? Este é o tópico desta seção final.

Células-tronco hemopoiéticas podem ser usadas para substituir células sanguíneas doentes por outras saudáveis

Anteriormente neste capítulo, vimos como camundongos podem ser submetidos a radiação para matar suas células hemopoiéticas e, então, ser salvos por uma transfusão de células-tronco novas, as quais repovoam a medula óssea e restabelecem a produção de células sanguíneas. Da mesma maneira, pacientes com leucemia, por exemplo, podem ser submetidos a radiação ou tratados quimicamente para destruir suas células cancerosas juntamente com o restante de seu tecido hemopoiético e, então, podem ser salvos por uma transfusão de células-tronco hemopoiéticas saudáveis, não-cancerosas, que podem ser colhidas da medula óssea de um doador adequado. Isto cria problemas de rejeição imunológica se a medula óssea do doador e do receptor diferirem geneticamente, mas a comparação cuidadosa do tecido e o uso de fármacos imunossupressores podem reduzir estas dificuldades para um nível tolerável. Em alguns casos, onde a leucemia surge de uma mutação em um tipo especializado de célula sanguínea progenitora ao invés de nas próprias células-tronco hemopoiéticas, é possível tratar o paciente com suas próprias células. Uma amostra de medula óssea é colhida antes da realização da radiação e selecionada para obter uma preparação de células-tronco hemopoiéticas livre de células leucêmicas. Esta preparação purificada então é transfundida de volta para o paciente após ele sofrer a radiação.

A princípio, a mesma tecnologia também abre outro caminho para uma forma de terapia gênica: células-tronco hemopoiéticas podem ser isoladas em cultivo, modificadas geneticamente por transfecção de DNA ou alguma outra técnica para introduzir um gene desejado e, então, transfundidas de volta em um paciente no qual o gene está ausente, para suprir uma fonte autorrenovável do componente genético perdido. Uma versão desta abordagem está sendo testada para o tratamento da AIDS. Células-tronco hemopoiéticas podem ser coletadas do paciente infectado com HIV, modificadas geneticamente por transfecção com material genético que torne as células-tronco e sua progênie resistentes à infecção pelo HIV e transfundidas de volta no mesmo paciente.

Populações de células-tronco epidérmicas podem ser expandidas em cultivo para o reparo de tecido

Outro exemplo simples de uso de células-tronco é no reparo da pele após queimaduras extensas. Por meio do cultivo de células de regiões não-lesionadas da pele de um paciente queimado, é possível obter células-tronco epidérmicas rapidamente e em grande número. Estas podem ser utilizadas, então, para repovoar a superfície lesionada do corpo. No entanto, para bons resultados após uma queimadura de terceiro grau é fundamental providenciar primeiramente uma substituição imediata da derme perdida. Para isso, pode ser utilizada a derme retirada de um cadáver humano, ou uma derme artificial substituta. Essa ainda é uma área de ativa experimentação. Em uma técnica, uma matriz artificial de colágeno misturada a um glicosaminoglicano é produzida em uma placa, com uma membrana fina de borracha de silicone cobrindo sua superfície externa como uma barreira à perda de água, e esta pele substituta (chamada de Integra) é colocada sobre a superfície queimada do corpo após o tecido lesionado ter sido retirado. Os fibroblastos e os capilares sanguíneos dos tecidos vivos mais profundos do paciente migram para a matriz artificial e a substituem gradativamente com novo tecido conectivo. Ao mesmo tempo, as células epidérmicas são cultivadas até haver o suficiente para formar uma camada fina de extensão adequada. Duas ou mais semanas após a operação inicial, a membrana de borracha de silicone é removida cuidadosamente e substituída por esta epiderme cultivada, de modo a reconstruir uma pele completa.

As células-tronco neurais podem ser manipuladas em cultivo

Enquanto a epiderme é um dos tecidos mais simples e mais facilmente regenerados, o sistema nervoso central (o SNC) é o mais complexo e parece ser o mais difícil de ser reconstruído na vida adulta. O cérebro e a medula espinal do mamífero adulto têm capacidade muito pequena para autorreparo. As células-tronco capazes de originar neurônios novos são difíceis de encontrar nos mamíferos adultos – realmente tão difíceis de encontrar que até recentemente pensava-se que elas estavam ausentes.

No entanto, agora sabemos que as células-tronco neurais do SNC capazes de dar origem tanto a neurônios como a células da glia persistem no cérebro mamífero adulto. Além disso, em certas partes do cérebro elas produzem continuamente neurônios novos para substituir aqueles que morrem (**Figura 23-65**). A renovação neuronal ocorre em uma escala mais dramática em certos pássaros, nos quais muitos neurônios morrem a cada ano e são substituídos por neurônios recém-nascidos como parte do processo pelo qual o pássaro aprende uma nova canção em cada estação reprodutiva.

A prova de que o cérebro mamífero adulto contém células-tronco neurais resultou de experimentos nos quais pedaços do tecido cerebral foram dissociados e usados para estabelecer cultivos celulares. Em condições de cultivo adequadas, células derivadas de uma região apropriada do cérebro formarão "neurosferas" flutuantes – grupos que consistem em uma mistura de células-tronco neurais, com neurônios e células da glia, derivadas das células-tronco. Estas neurosferas podem ser propagadas por muitas gerações celulares, ou suas células podem ser coletadas a qualquer tempo e implantadas de volta no cérebro de um animal normal. Aí elas produzirão uma progênie diferenciada, na forma de neurônios e células da glia.

Utilizando condições de cultivo levemente diferentes, com as combinações adequadas de fatores de crescimento no meio, as células-tronco neurais podem ser cultivadas como uma monocamada e induzidas a proliferar como uma população quase pura de células-tronco sem uma progênie diferenciada concomitante. Por meio de uma modificação adicional nas condições de cultivo, estas células podem ser induzidas a qualquer momento a diferenciar para originar uma mistura de neurônios e células da glia (**Figura 23-66**), ou apenas um destes dois tipos celulares, de acordo com a composição do meio de cultivo.

Os cultivos puros de células-tronco neurais, que se dividem para formar mais células-tronco neurais, são mais valiosos do que apenas uma fonte de células para transplante. Eles devem ajudar na análise dos fatores que definem o estado de célula-tronco e controlam a ativação para diferenciação. Uma vez que as células podem ser manipuladas geneticamente por transfecção de DNA e outras formas, eles abrem caminhos para novas maneiras de investigar o papel de genes específicos nestes processos e nas doenças genéticas do sistema nervoso, como as doenças neurodegenerativas. Eles também criam oportunidades, ao menos a princípio, para a manipulação genética de células neurais para tratar doenças.

As células-tronco neurais podem repovoar o sistema nervoso central

As células-tronco neurais enxertadas em um cérebro adulto apresentam uma extraordinária capacidade de ajustar seu comportamento a sua nova localização. Por exemplo, as células-tronco do hipocampo do camundongo implantadas no caminho precursor do bulbo olfatório (ver Figura 23-65) originam neurônios que se tornam incorporados corretamente ao bulbo olfatório. Esta capacidade das células-tronco neurais e sua progênie de se adaptar a

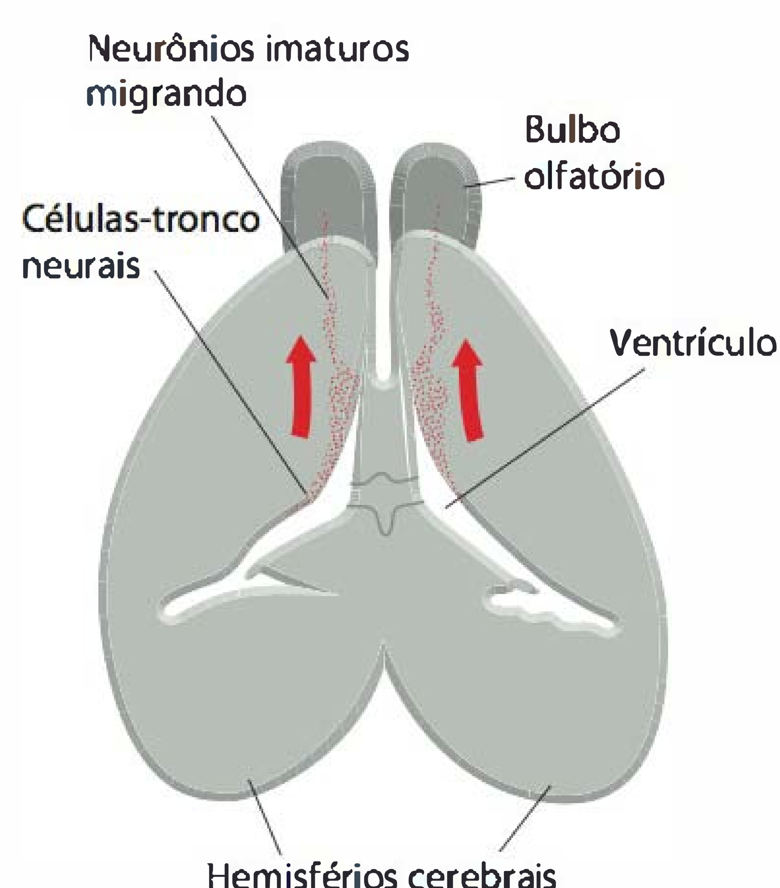


Figura 23-65 A produção continuada de neurônios em um cérebro de camundongo adulto. O cérebro é visto de cima, em um corte transversal, para mostrar a região que reveste os ventrículos do prosencéfalo, onde são encontradas as células-tronco neurais. Estas células continuamente produzem progênie que migra para o bulbo olfatório, onde elas se diferenciam como neurônios. A constante renovação de neurônios no bulbo olfatório provavelmente está ligada, de alguma maneira, à renovação dos receptores olfatórios dos neurônios que se projetam para ele a partir do epitélio olfatório, como foi discutido anteriormente. Há também uma contínua renovação de neurônios no hipocampo adulto, uma região relacionada especialmente com o aprendizado e a memória, na qual a plasticidade de função adulta parece estar associada à renovação de um subgrupo específico de neurônios. (Adaptada de B. Barres, Cell 97:667-670, 1999. Com permissão de Elsevier.)

um ambiente novo promete ter aplicações clínicas importantes no tratamento de doenças nas quais os neurônios degeneram ou perdem sua bainha de mielina, assim como em lesões do sistema nervoso central. Deste modo, células-tronco neurais (derivadas de tecido fetal humano) têm sido enxertadas em medula espinal de camundongos que foram paralisados por lesões da medula espinal ou por mutação que leve à mielinização defeituosa; os camundongos escolhidos eram de uma cepa imunodeficiente e assim não rejeitaram as células enxertadas. Então, as células enxertadas deram origem tanto a neurônios que se conectaram com os neurônios do hospedeiro, quanto a oligodendrócitos que formaram novas bainhas de mielina em torno dos axônios desmielinizados do hospedeiro. Como resultado, os camundongos hospedeiros recuperaram parte de seu controle sobre seus membros.

Tais achados trazem a esperança de que, apesar da extraordinária complexidade dos tipos de células nervosas e de conexões neuronais, possa ser possível utilizar células-tronco neurais para reparar ao menos alguns tipos de lesões e de doenças no sistema nervoso central.

No organismo adulto, as células-tronco são específicas para o tecido

Quando as células são removidas do corpo e mantidas em cultivo ou são transplantadas de um local do corpo para outro, como nos procedimentos que acabamos de descrever, elas geralmente se conservam plenamente fiéis a suas origens. Os queratinócitos continuam a comportar-se como queratinócitos, as células hemopoiéticas como células hemopoiéticas, as células neurais como células neurais, e assim por diante. É verdade que, se colocadas em um ambiente anormal, as células diferenciadas podem parar de apresentar a série normal inteira de características diferenciadas, e as células-tronco podem perder sua característica de célula-tronco e se diferenciar; porém, elas não mudam tanto a ponto de expressar as características de outro tipo celular radicalmente diferente. Assim, cada tipo de célula especializada tem uma memória de sua história de desenvolvimento e parece fixada em seu destino especializado. Certamente, algumas transformações limitadas podem ocorrer, como vimos em nossa descrição da família de células do tecido conectivo, e algumas células-tronco podem produzir uma variedade de tipos celulares diferenciados, mas as possibilidades são restritas. Cada tipo de célula-tronco serve para a renovação de um tipo particular de tecido.

Obviamente, as oportunidades práticas seriam muito maiores se as células-tronco fossem mais versáteis e não tão especializadas – se pudéssemos tirá-las de um tipo de tecido onde elas estão facilmente disponíveis e usá-las para reparar um tecido diferente, onde elas são necessárias. Deste modo, houve grande alvoroço na década passada em função dos rela-

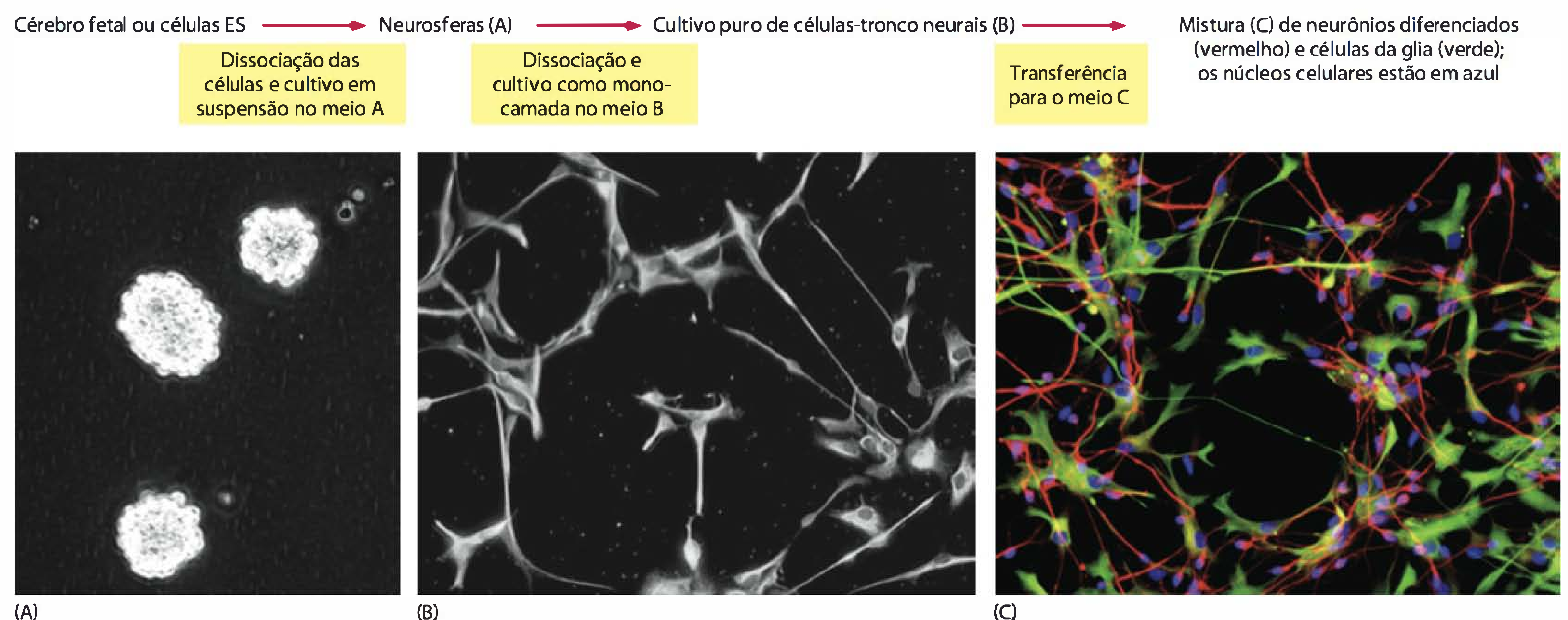


Figura 23-66 Células-tronco neurais. As fotografias mostram as etapas que levam do tecido cerebral fetal, por neurosferas (A), até um cultivo puro de células-tronco neurais (B). Estas células-tronco podem ser mantidas em proliferação desta forma, indefinidamente, ou, através de uma alteração do meio, podem ser levadas a diferenciarem-se (C) em neurônios (vermelho) e células da glia (verde). As células-tronco neurais com as mesmas propriedades também podem ser derivadas, através de uma série de etapas semelhantes, de células ES. (Fotomicrografias de L. Conti et al., *PLoS* 3:1594-1606, 2005. Com permissão de Public Library of Science.)

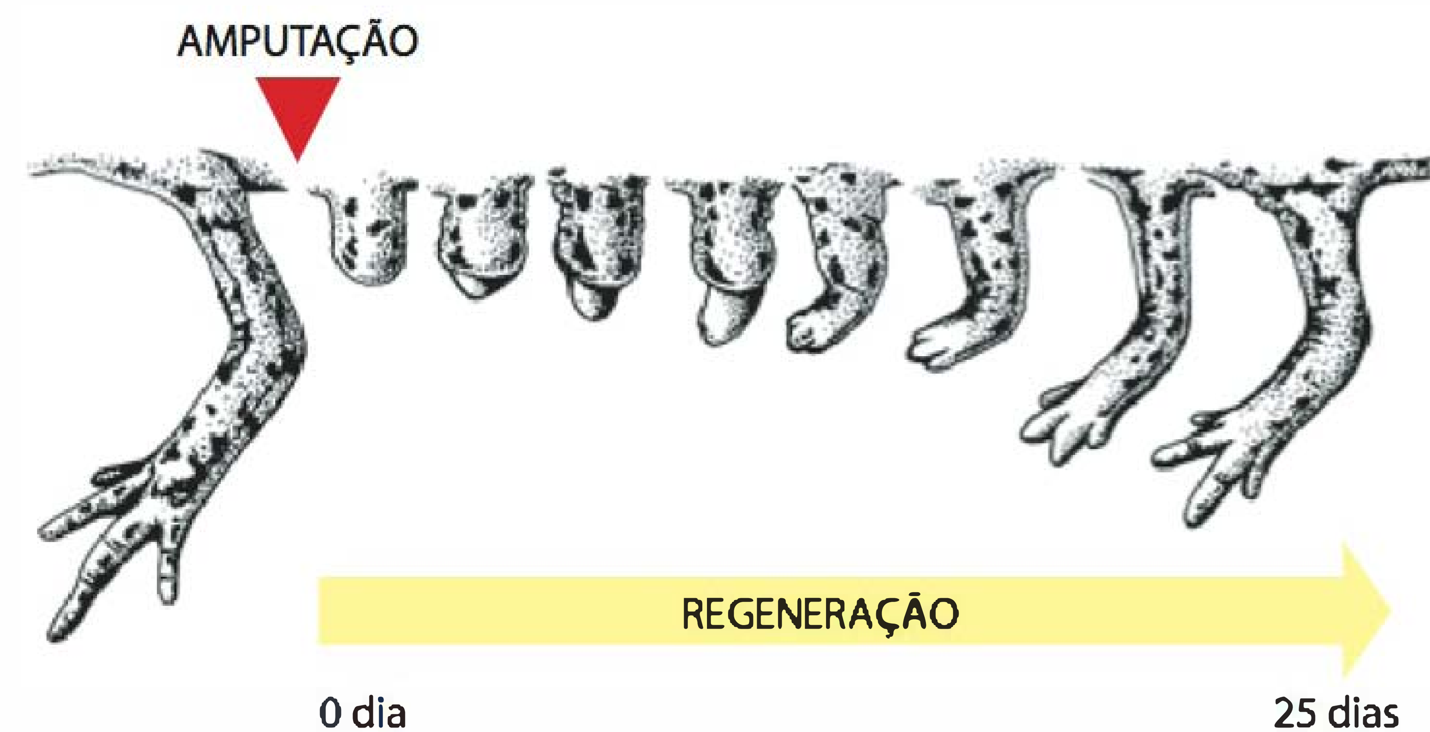


Figura 23-67 Regeneração do membro da lagartixa. Uma sequência do intervalo de tempo mostrando o progresso da regeneração do membro em uma salamandra a partir da amputação ao nível do úmero. A sequência mostra os estágios de cicatrização da ferida, volta a um estado não-diferenciado, fase de blastema (dispersão na forma de células mononucleadas) e volta ao estado de diferenciação, envolvidos no processo de regeneração. O tempo total mostrado é de aproximadamente 20 a 30 dias. (Cortesia de Susan Bryant e David Gardiner.)

tos de que as células-tronco de vários tecidos especializados podem, em certas circunstâncias, mostrar espantosa plasticidade de desenvolvimento, dando origem a células de tipos radicalmente diferentes – células-tronco hemopoiéticas a neurônios, por exemplo, ou células-tronco neurais a músculo. Contudo, a validade destes achados é debatida calorosamente, e têm sido encontradas falhas em algumas das evidências-chave. Por exemplo, agora se acredita que muitos casos aparentes de trocas de destino celular sejam, realmente, o resultado de eventos de fusão celular, através dos quais os núcleos de um tipo de célula especializada são expostos ao citoplasma de um outro tipo celular e, consequentemente, ativam um grupo de genes modificado. Em todo caso, a maioria dos relatos de interconversão entre linhagens celulares adultas radicalmente diferentes concorda que estes são eventos raros. Enquanto a pesquisa sobre estas formas extremas de plasticidade de células-tronco continua, não sabemos ainda como fazer tais interconversões diretas acontecerem em escala suficientemente, ou totalmente, larga ou segura para aplicação na prática médica.

Isto não quer dizer que a transformação radical de células de uma característica diferenciada para outra é um sonho impossível ou que nunca serão descobertas maneiras eficientes de fazê-lo. De fato, algumas espécies não-mamíferas podem regenerar tecidos e órgãos perdidos justamente por meio destas interconversões. Por exemplo, uma lagartixa pode regenerar um membro amputado por um processo no qual células diferenciadas parecem reverter a uma característica embrionária e retomar o desenvolvimento embrionário. Células musculares multinucleadas diferenciadas na ponta remanescente do membro voltam a entrar no ciclo celular, voltando a um estado não-diferenciado e se dispersando como células mononucleadas; estas, então, proliferam para formar um broto semelhante ao broto do membro de um embrião e, finalmente, voltam a se diferenciar nos vários tipos celulares necessários para reconstruir a parte perdida do membro (**Figura 23-67**). Por que uma lagartixa pode manipular isso – assim como muitas outras façanhas extraordinárias de regeneração – mas um mamífero não pode, ainda é um profundo mistério.

As células-tronco embrionárias podem produzir qualquer parte do corpo

Enquanto as células-tronco dos tecidos mamíferos adultos parecem estar inteiramente restritas àquilo que podem fazer, um outro tipo de células-tronco de mamíferos é extraordinariamente versátil. Como descrito nos Capítulos 8 e 22, é possível coletar um embrião precoce de camundongo no estágio de blastocisto e, através de cultivo celular, originar a partir dele uma classe de células-tronco chamadas de **células-tronco embrionárias**, ou **células ES** (de *embryonic stem cells*). As células ES podem ser mantidas proliferando em cultivo indefinidamente e ainda conservar um potencial de desenvolvimento ilimitado. Se as células ES são recolocadas em um blastocisto, elas tornam-se incorporadas ao embrião e podem originar todos os tecidos e tipos celulares do corpo, incluindo as células germinativas, integrando-se perfeitamente em qualquer lugar que possam vir a ocupar e adotando a característica e o comportamento que a células normais apresentariam neste local. Pode-se pensar no desenvolvimento em termos de uma série de escolhas apresentadas às células enquanto elas seguem um caminho que leva desde o ovo fecundado até a diferenciação definitiva. Após sua longa temporada em cultivo, as células ES e sua progênie evidentemente ainda podem interpretar os sinais em cada bifurcação no caminho e responder como as células embrionárias normais o fariam. Porém, se células ES são implantadas diretamente em um embrião em um estágio mais tardio ou em um tecido adulto, elas deixam de receber uma sequência adequada de sinais; logo, sua diferenciação não é controlada de forma apropriada e elas muitas vezes darão origem a um tumor.

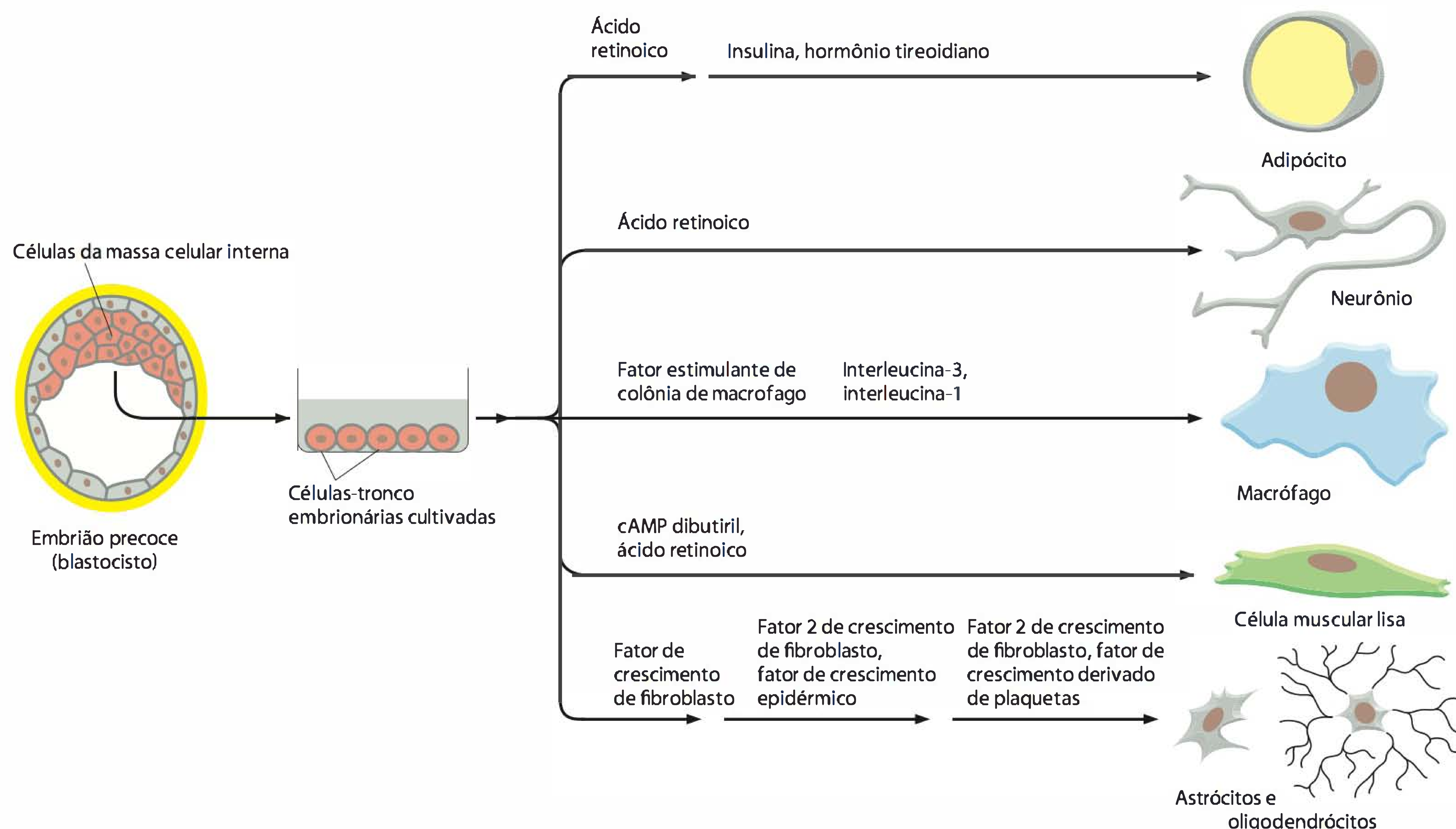


Figura 23-68 **Produção de células diferenciadas em cultivo a partir de células ES de camundongo.** As células ES derivadas de um embrião precoce de camundongo podem ser cultivadas indefinidamente como uma monocamada ou deixadas para formar agregados chamados de corpos embrioides, nos quais as células começam a se especializar. As células dos corpos embrioides, cultivadas em meios adicionados com diferentes fatores, podem depois ser direcionadas para se diferenciar em várias vias. (Com base em E. Fuchs e J. A. Segre, Cell 100:143-155, 2000. Com permissão de Elsevier.)

Células com propriedades semelhantes àquelas de células ES de camundongo agora podem ser produzidas a partir de embriões humanos precoces e de células germinativas fetais humanas, criando um suprimento potencialmente inesgotável de células que podem ser usadas para a substituição e o reparo de tecidos humanos maduros que estão lesados. Embora possa haver objeções éticas para tal uso de embriões humanos, vale a pena levar em consideração as possibilidades que estão surgindo. Colocando de lado o sonho de produzir órgãos inteiros a partir de células ES pela retomada do desenvolvimento embrionário, os experimentos em camundongos sugerem que seria possível, no futuro, usar células ES para repor as fibras musculares esqueléticas que degeneram em vítimas de distrofia muscular, as células nervosas que morrem em pacientes com doença de Parkinson, as células secretoras de insulina que estão faltando em diabéticos do tipo I, as células musculares cardíacas que morrem em um ataque cardíaco, e assim por diante.

Se as células ES vão ser utilizadas para este tipo de reparo de tecido, primeiro elas têm de ser induzidas ao longo da via de desenvolvimento desejada. Na verdade, as células ES podem ser induzidas a se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares em cultivo (**Figura 23-68**), pelo tratamento com combinações apropriadas de proteínas-sinal e fatores de crescimento. Por exemplo, elas podem ser usadas para produzir neurosferas e células-tronco neurais. Células-tronco neurais derivadas de células ES de camundongo, como aquelas derivadas de tecido cerebral, podem ser enxertadas no cérebro de um camundongo hospedeiro adulto, onde elas se diferenciarão para produzir neurônios e células da glia. Se o hospedeiro é deficiente em oligodendrócitos que formam a mielina, um enxerto de precursores de oligodendrócitos derivados de células ES pode corrigir a deficiência e produzir bainhas de mielina para os axônios que carecem delas.

Células-tronco embrionárias específicas para o paciente poderiam resolver o problema da rejeição imunológica

Há muitos problemas para serem resolvidos antes que as células ES possam ser utilizadas de forma eficaz para o reparo de tecido em pacientes humanos. Um dos mais graves, que tam-

bém limita o uso de células-tronco adultas, é a rejeição imunológica. Se as células derivadas de células ES de um determinado genótipo são enxertadas em um indivíduo geneticamente diferente, as células enxertadas provavelmente são rejeitadas pelo sistema imune como estranhas. Formas de resolver este problema usando fármacos imunossupressores têm sido desenvolvidas para o transplante de órgãos, como rins e coração, mas estão longe da perfeição.

Para evitar completamente os problemas imunológicos, é necessário enxertar células que são geneticamente idênticas àquelas do hospedeiro. Então, como podem ser produzidas células ES por encomenda, com o mesmo genótipo de determinado paciente humano adulto que necessita de um transplante? Como discutido no Capítulo 8, um caminho possível é via *transferência nuclear de células somáticas*. Neste método – ainda não realizado com células humanas, apesar de algumas falsas esperanças – o núcleo seria retirado de uma célula somática do paciente e injetado em um oócito fornecido por uma doadora (em geral, uma mulher que não seja paciente), substituindo o núcleo original do oócito. A partir deste oócito híbrido, um blastocisto poderia ser obtido, e a partir do blastocisto, células ES. Estas células e sua progênie conteriam o genoma nuclear do paciente e, a princípio, deveriam ser transplantadas sem risco de rejeição imunológica. Contudo, o procedimento completo envolve muitas dificuldades e está muito longe do estágio em que poderia ser utilizado para tratamento.

Seria preferível se pudéssemos coletar células de um paciente adulto e convertê-las a uma característica semelhante à de células ES, de forma mais direta, por manipulação da expressão gênica. Uma primeira etapa ao longo deste caminho é identificar os determinantes-chave da característica de células ES – as principais proteínas reguladoras que especificam esta característica, se existirem. Comparações bioquímicas de células ES com outros tipos celulares sugerem um grupo de candidatos para este papel. Estes candidatos podem ser testados pela introdução de construções apropriadas de expressão de DNA em células diferenciadas que podem se desenvolver em cultivo, como fibroblastos. Uma combinação destes transgenes, que codificam para um grupo de quatro proteínas reguladoras de genes (Oct3/4, Sox2, Myc e Klf4), na verdade parece ser capaz de converter fibroblastos em células com características semelhantes às de células ES, incluindo a capacidade de se diferenciar de diversas maneiras. A taxa de conversão é baixa – apenas uma proporção pequena de fibroblastos contendo os transgenes sofre a modificação – e as células convertidas são diferentes das células ES verdadeiras em aspectos importantes. Contudo, estes experimentos mostram um caminho possível para a produção de células com versatilidade semelhante às células ES a partir de células somáticas adultas.

Células-tronco embrionárias são úteis para a descoberta de fármacos e a análise de doenças

Embora o transplante de células derivadas de células ES para o tratamento de doenças humanas ainda pareça estar em um futuro distante, há outras vias em que as células ES prometem ter valor de forma mais imediata. Elas podem ser usadas para gerar grandes populações homogêneas de células diferenciadas de um tipo específico em cultivo; e estas podem servir para testar os efeitos de um grande número de compostos químicos na busca de novos fármacos com ações úteis sobre um determinado tipo celular humano. Além disso, por meio de técnicas como aquelas recém-descritas, pode ser possível produzir células semelhantes a células ES que contêm os genomas dos pacientes que sofrem de uma determinada doença genética, e usar estas células-tronco específicas do paciente para a descoberta de fármacos úteis no tratamento dessa doença. Tais células seriam valiosas também para a análise dos mecanismos de doenças. E, em um nível mais básico, a manipulação de células ES em cultivo nos ajudaria a compreender alguns dos muitos mistérios inexplicáveis da biologia das células-tronco.

Questões éticas sérias precisam ser resolvidas, e problemas técnicos enormes devem ser superados antes que a tecnologia de células-tronco possa produzir todos os benefícios com os quais sonhamos. Contudo, por uma via ou outra, parece que a biologia celular está começando a fornecer novas oportunidades para aperfeiçoar os mecanismos naturais de reparo de tecidos, tão notáveis quanto estes próprios mecanismos.

Resumo

As células-tronco podem ser manipuladas artificialmente e utilizadas tanto para o tratamento de doenças quanto para outros propósitos, como a descoberta de fármacos. Por exemplo, as células-tronco hemopoiéticas podem ser transfundidas em pacientes com leucemia para restabelecer um

sistema hemopoiético doente, e as células-tronco epidérmicas coletadas da pele não-lesada de um paciente severamente queimado podem ser rapidamente produzidas em grande número em cultivo e enxertadas de volta com o objetivo de reconstruir uma epiderme para cobrir as queimaduras. Células-tronco neurais podem ser derivadas de algumas regiões do cérebro fetal ou adulto e, quando enxertadas em um cérebro que está lesado, podem se diferenciar em neurônios e células da glia que tornam-se integrados ao tecido hospedeiro e podem ajudar a ocasionar um reparo parcial, ao menos em estudos experimentais com animais.

No corpo adulto normal, cada tipo de célula-tronco dá origem a um grupo restrito de tipos celulares diferenciados. Embora haja muitos relatos sobre a plasticidade da célula-tronco que quebra estas restrições, a evidência ainda é controversa. Porém, as células-tronco embrionárias (células ES) são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular no organismo e podem ser induzidas a se diferenciar em muitos tipos celulares diferentes em cultivo. A partir de células ES é possível, por exemplo, gerar linhas de células-tronco neurais que proliferarão indefinidamente como culturas puras de células-tronco, mas que podem responder a uma mudança apropriada das condições de cultivo a qualquer momento para que se diferenciem em neurônios e glia. Métodos para produzir células semelhantes às células ES a partir de células de tecidos adultos estão em desenvolvimento. Em princípio, tais células semelhantes às células ES, carregando o genoma de um paciente específico, poderiam ser utilizadas para o reparo de tecido, evitando os problemas de rejeição imunológica. De forma mais imediata, elas fornecem um terreno para testes in vitro *na investigação da fisiologia e farmacologia de células de qualquer genótipo normal ou patológico, assim como para a descoberta de fármacos com efeitos úteis sobre estas células.*

REFERÊNCIAS

Geral

Fawcett DW (1994) Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology, 12th ed. New York/London: Arnold/Chapman & Hall.

Kerr JB (1999) Atlas of Functional Histology. London: Mosby.

Lanza R, Gearhart J, Hogan B et al (eds) (2004). Handbook of Stem Cells. Amsterdam: Elsevier.

Young B, Lowe JS, Stevens A & Heath JW (2006) Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas, 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.

A epiderme e sua renovação por meio de células-tronco

Fuchs E (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature* 445:834–842.

Imagawa W, Yang J, Guzman R & Nandi S (1994) Control of mammary gland development. In The Physiology of Reproduction (Knobil E & Neill JD eds), 2nd ed, pp 1033–1063. New York: Raven Press.

Ito M, Yang Z, Andl T et al (2007) Wnt-dependent *de novo* hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447:316–320.

Jacinto A, Martinez-Arias A & Martin P (2001) Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biol* 3:E117–123.

Jensen UB, Lowell S & Watt FM (1999) The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126:2409–2418.

Prince JM, Klinowska TC, Marshman E et al (2002) Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland *in vivo*. *Dev Dyn* 223:497–516.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ et al (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439:84–88.

Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D & Tajbakhsh S (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature Cell Biol* 8:677–687.

Stanger BZ, Tanaka AJ & Melton DA (2007) Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 445:886–891.

Steinert PM (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J Cell Biol* 151:F5–F8.

Watt FM, Lo Celso C & Silva-Vargas V (2006) Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev* 16:518–524.

Epitélio sensorial

Axel R (2005) Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 44:6110–6127.

Buck LB (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611–618.

Howard J & Hudspeth AJ (1988) Compliance of the hair bundle associated with gating of mechanoelectrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1:189–199.

Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K et al (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature Med* 11:271–276.

Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nature Neurosci* 4:877–886.

Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713–737.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C et al (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675–686.

Morrow EM, Furukawa T & Cepko CL (1998) Vertebrate photoreceptor cell development and disease. *Trends Cell Biol* 8:353–358.

Pazour GJ, Baker SA, Deane JA et al (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol* 157:103–113.

Stone JS & Rubel EW (2000) Cellular studies of auditory hair cell regeneration in birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11714–11721.

Vollrath MA, Kwan KY & Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30:339–365.

As vias aéreas e o intestino

Batlle E, Henderson JT, Beghtel H et al (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251–263.

Bjerknes M & Cheng H (1999) Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116:7–14.

Crosnier C, Stamataki D & Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Rev Genet* 7:349–359.

Dor Y, Brown J, Martinez OI & Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41–46.

Fre S, Huyghe M, Mourikis P et al (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435:964–968.

Haramis AP, Begthel H, van den Born M et al (2004) *De novo* crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303:1684–1686.
Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE et al (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121:823–835.
Li L & Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annu RevCell Dev Biol* 21:605–631.
Sancho E, Batlle E & Clevers H (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:695–723.
Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ et al (2004) Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18:1385–1390.
Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:836–847.
van Es JH, van Gijn ME, Riccio O et al (2005) Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435:959–963.

Vasos sanguíneos, linfáticos e células endoteliais

Adams RH (2003) Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* 202:105–112.
Carmeliet P & Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193–200.
Folkman J & Haudenschild C (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288:551–556.
Folkman J (1996) Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 275:150–154.
Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M et al (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163–1177.
Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ et al (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445:776–780.
Lawson ND & Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248:307–318.
Lindahl P, Johansson BR, Leveen P & Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277:242–245.
Oliver G & Alitalo K (2005) The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu RevCell Dev Biol* 21:457–483.
Pugh CW & Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Med* 9:677–684.

Renovação por células-tronco multipotentes: formação de células do sangue

Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB & Weissman IL (2003) Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102:517–520.
Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841–846.
Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM et al (2004) Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:1002–1007.
Metcalf D (1980) Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5327–5330.
Metcalf D (1999) Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Annu NY Acad Sci* 872:289–303.
Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Rev Genet* 1:57–64.
Reya T, Duncan AW, Ailles L et al (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423:409–414.
Shizuru JA, Negrin RS & Weissman IL (2005) Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 56:509–538.
Wintrobe MM (1980) Blood, Pure and Eloquent. New York: McGraw-Hill.

Origem, modulação e regeneração do músculo esquelético

Andersen JL, Schjerling P & Saltin B (2000) Muscle, genes and athletic performance. *Sci Am* 283:48–55.
Bassel-Duby R & Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19–37.
Buckingham M (2006) Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 16:525–532.
Collins CA, Olsen I, Zammit PS et al (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122:289–301.
Lee SJ (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:61–86.
Weintraub H, Davis R, Tapscott S et al (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761–766.

Fibroblastos e suas transformações: a família de células do tecido conectivo

Benya PD & Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215–224.
Day TF, Guo X, Garrett-Beal L & Yang Y (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8:739–750.
Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337–350.
Glass DA, Bialek P, Ahn JD et al (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751–764.
Karsenty G & Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2:389–406.
Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332–336.
Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO & Chang HY (2006) Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2:e119.
Rosen ED & Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847–853.
Schafer M & Werner S (2007) Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* in press.
Seeman E & Delmas PD (2006) Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354:2250–2261.
Zelzer E & Olsen BR (2003) The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423:343–348.

Modificação das células-tronco

Brockes JP & Kumar A (2005) Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 310:1919–1923.
Brustle O, Jones KN, Learish RD et al (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285:754–756.
Conti L, Pollard SM, Gorba T et al (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3:e283.
Eggan K, Baldwin K, Tackett M et al (2004) Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428:44–49.
Lee TI, Jenner RG, Boyer LA et al (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125:301–313.
Ming GL & Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* in press.
Raff M (2003) Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:1–22.
Schulz JT, 3rd, Tompkins RG & Burke JF (2000) Artificial skin. *Annu Rev Med* 51:231–244.
Suhonen JO, Peterson DA, Ray J & Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature* 383:624–627.
Wagers AJ & Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639–648.

Patógenos, Infecção e Imunidade Inata

24

Neste capítulo

INTRODUÇÃO AOS PATÓGENOS 1486

BIOLOGIA CELULAR DA INFECÇÃO 1501

BARREIRAS CONTRA INFECÇÃO E O SISTEMA IMUNE INATO 1524

As doenças infecciosas e parasitárias são responsáveis, atualmente, por cerca de um terço de todos os óbitos humanos no mundo, um número maior do que o das mortes provocadas por todos os diferentes tipos de câncer combinados. Em adição ao contínuo ônus de velhas doenças, como a tuberculose e a malária, novas doenças infecciosas emergem continuamente, entre elas a atual pandemia (epidemia mundial) de AIDS (*síndrome da imunodeficiência adquirida*), que já provocou mais de 25 milhões de mortes no mundo inteiro. Além disso, descobrimos que outras doenças, que imaginávamos serem devidas a outros fatores, estão, na verdade, associadas a infecções. A maioria das úlceras gástricas, por exemplo, não é causada pelo estresse ou por uma alimentação rica em temperos fortes, como se pensava anteriormente, mas por uma infecção bacteriana do estômago causada pela *Helicobacter pylori*.

O ônus das doenças infecciosas e parasitárias não se encontra distribuído igualmente sobre o planeta. Os países e as comunidades pobres sofrem desproporcionalmente. Com frequencia, existe uma correlação entre a prevalência de uma determinada doença infecciosa e as baixas condições sanitárias e de higiene e os sistemas públicos de saúde deficientes, os quais se encontram mais comprometidos com desastres naturais ou inquietações políticas. Algumas doenças infecciosas, entretanto, ocorrem principalmente, ou exclusivamente, em comunidades industrializadas: a doença dos legionários, comumente disseminada através dos ductos de sistemas de ar condicionado, é um exemplo recente.

O homem tem sofrido há muito tempo o fascínio e os infortúnios das doenças infecciosas. Os primeiros registros escritos de como retardar a disseminação da raiva podem ser datados de três mil anos. Desde a metade do século XIX, os médicos e os cientistas têm lutado para identificar os agentes causadores das doenças infecciosas, coletivamente denominados **patógenos**. Mais recentemente, o advento da genética microbiana e da biologia molecular da célula tem aumentado nosso conhecimento sobre as causas e os mecanismos das doenças infecciosas. Atualmente, sabemos que os patógenos, com frequência, exploram os atributos biológicos das células hospedeiras para poder infectá-las. Este conhecimento tanto pode nos fornecer novas informações sobre a biologia normal da célula quanto pode ser útil ao desenvolvimento de estratégias de prevenção das doenças infecciosas.

Em um mundo repleto de patógenos hostis, inteligentes e que evoluem rapidamente, como uma criatura frágil e de evolução lenta como o ser humano pode sobreviver? Como acontece com todos os outros organismos pluricelulares, desenvolvemos mecanismos para resistir à infecção por patógenos. Primeiro, barreiras físicas, como as nossas resistentes camadas mais externas da pele, e defesas químicas associadas, como o ácido do estômago, previnem que a maioria dos micro-organismos (micróbios) tenha contato com os tecidos estéreis do nosso corpo. Segundo, as células humanas individuais possuem capacidade de defesa intrínseca; por exemplo, as células degradam agressivamente moléculas de RNA de dupla-fita, uma caracteristica de certos tipos de infecção viral. Para combater especialmente patógenos poderosos que ultrapassam estas barricadas, os vertebrados usam dois tipos de defesa imune, que são realizados por células e proteínas especializadas: **as respostas imunes inatas** entra em ação imediatamente após a implantação de uma infecção e não dependem da exposição anterior do hospedeiro, enquanto as **respostas imunes adaptativas** mais poderosas operam por último em uma infecção e são altamente específicas para o patógeno que as induz.

Neste capítulo, inicialmente abordaremos os diferentes organismos que provocam as doenças. A seguir, discutiremos a biologia celular da infecção e, finalmente, consideraremos a imunidade inata. A imunidade adaptativa é tratada no Capítulo 25.

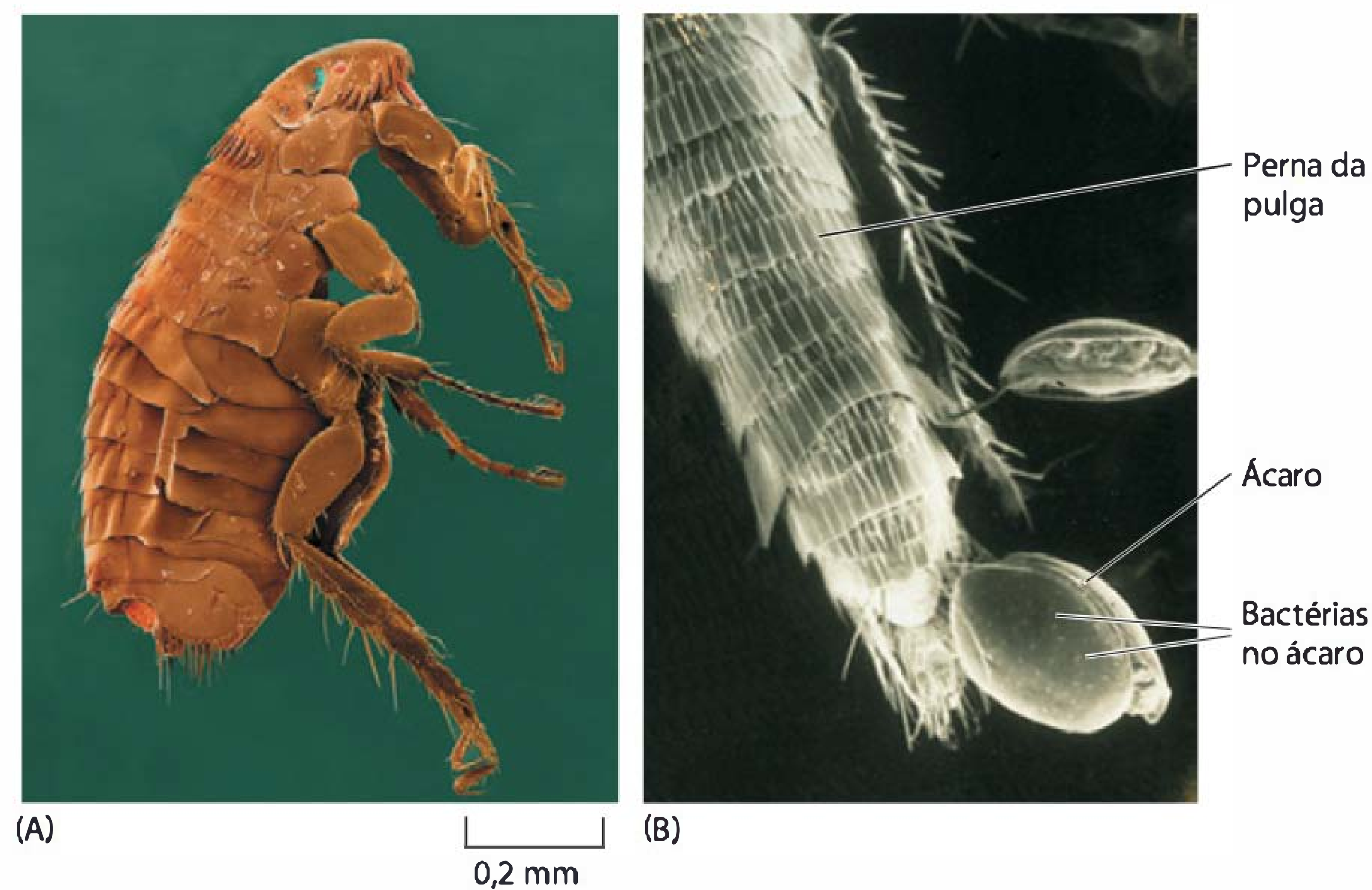


Figura 24-1 Parasitismo em todos os níveis. (A) Microscopia eletrônica de varredura de uma pulga. A pulga é um parasita comum de mamíferos – como cães, gatos, ratos e seres humanos. Ela alimenta-se do sangue de seu hospedeiro. A picada da pulga transmite a peste bubônica pela passagem da bactéria patogênica *Yersinia pestis* da corrente sanguínea de um hospedeiro infectado para outro. (B) Visão aumentada da pata de uma pulga revela que ela também possui um parasita, um tipo de ácaro. O ácaro, por sua vez, está coberto por bactérias. É bem possível que estas bactérias estejam parasitadas por *bacteriófagos*, que são vírus bacterianos. Uma observação semelhante foi feita por Jonathan Swift em 1733: assim, observa o naturalista, uma pulga é presa de pulgas menores; e estas têm menores ainda para picá-las; e assim prossegue, *ad infinitum*. (A, cortesia de Tina Carvalho/MicroAngela; B, cortesia de Stanley Falkow.)

INTRODUÇÃO AOS PATÓGENOS

Normalmente, pensamos nos patógenos como invasores hostis que atacam nossos corpos. Porém, um patógeno, como qualquer outro organismo, está simplesmente cumprindo o seu imperativo biológico para viver e procriar. Viver às custas de um organismo hospedeiro é uma estratégia bastante atrativa, e é possível que todo organismo vivo na terra seja vítima de algum tipo de infecção (**Figura 24-1**). Um hospedeiro humano é um ambiente rico em nutrientes, aquecido e agradável, que se mantém a uma temperatura uniforme e que se renova constantemente. Dessa forma, não é surpresa o fato de que muitos micro-organismos tenham desenvolvido a capacidade de sobreviver e de se reproduzir em um nicho tão desejável. Nesta seção, discutiremos algumas das características comuns que os micro-organismos devem apresentar para serem infecciosos. A seguir, exploraremos a grande diversidade de organismos conhecidos por causarem doenças em humanos.

Os patógenos desenvolvem mecanismos específicos de interação com seus hospedeiros

O corpo humano é um ecossistema próspero e complexo. Nele estão contidas aproximadamente 10^{13} células humanas, além de aproximadamente 10^{14} células de bactérias, fungos e protozoários, que representam milhares de espécies microbianas. Estes micróbios comensais, denominados **flora normal**, encontram-se geralmente limitados a certas áreas do corpo, incluindo a pele, a boca, o intestino grosso e a vagina. A flora normal não são somente os comensais habitantes do ecossistema que é o corpo humano; ela também pode afetar nossa saúde. As bactérias anaeróbias que habitam intestinos contribuem para a digestão do alimento e são também essenciais para o desenvolvimento apropriado do trato gastrintestinal das crianças. A flora normal da pele e de outras localidades também nos ajuda pela competição com micro-organismos causadores de doenças. Além disso, os seres humanos são constantemente infectados por vírus; a grande maioria desses vírus raramente é sintomática.

Se é tão natural vivermos nesta íntima relação com uma grande variedade de micro-organismos, como é possível que alguns deles sejam capazes de causar doenças ou mesmo provocar nossa morte? Como veremos, a questão tem diversas respostas e a habilidade de um micro-organismo particular de causar lesões e doenças em um hospedeiro dependerá bastante de influências externas. **Patógenos primários**, que podem causar doenças na maioria das pessoas sadias, em geral são distintos daqueles da flora normal. Eles diferem dos organismos comensais em suas habilidades de romper barreiras e sobreviver em ambientes inóspitos onde outros micro-organismos não poderiam. Nossos habitantes microbianos normais apenas causam algum dano ou problema se nossos sistemas de defesa encontram-se enfraquecidos, ou se ganham acesso a regiões de nosso corpo que normalmente são estéreis (p.ex. quando uma perfuração no intestino permite o acesso da flora intestinal a cavidade peritoneal de nosso abdome, ocasionando uma *peritonite*; ocasionalmente, eles causam doenças se nossa resposta imune a eles for inapropriadamente fraca. Em contraste,

os patógenos primários não necessitam de um hospedeiro imune comprometido ou com alguma lesão. Os patógenos primários desenvolveram mecanismos altamente especializados para romper as barreiras celulares e bioquímicas e induzir respostas específicas no organismo hospedeiro que contribuirão para a sobrevivência e a multiplicação do patógeno. Para alguns patógenos, esses mecanismos são adaptados para uma única espécie de hospedeiro, enquanto para outros eles em geral são suficientes para que o patógeno possa invadir, sobreviver e vicejar em uma ampla variedade de hospedeiros.

Alguns patógenos causam infecções epidêmicas agudas e são forçados a se espalharem rapidamente de um hospedeiro doente ou moribundo para outro; historicamente, exemplos importantes incluem a peste bubônica e a varíola. Outros causam infecções persistentes que podem durar anos em um único hospedeiro, sem necessariamente causar a doença; os exemplos incluem o vírus de Epstein-Barr (que pode causar uma doença severa – a mononucleose – com sintomas semelhantes à gripe em algumas pessoas), a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (que causa a tuberculose, infecção pulmonar com risco de vida) e o verme intestinal *Ascaris*. Apesar de cada patógeno poder fazer com que algumas pessoas fiquem criticamente doentes, bilhões de pessoas podem estar infectadas, transportando-os, sem saber, de maneira assintomática, o que torna difícil traçar uma linha entre infecção persistente e comensalismo. Neste capítulo, continuaremos a reconhecer a diversidade de patógenos e infecções enquanto focamos nos princípios da biologia celular comuns à maioria deles.

Com o objetivo de sobreviver e se multiplicar no hospedeiro, um patógeno de sucesso deve ser capaz de: (1) colonizar o hospedeiro; (2) localizar um nicho nutricional compatível no corpo do hospedeiro; (3) evitar, subverter ou escapar das respostas imunes adaptativas e inatas do hospedeiro; (4) replicar, usando os recursos do hospedeiro, e (5) sair e disseminar-se para um novo hospedeiro. Sob alta pressão seletiva e visando induzir apenas as respostas corretas das células hospedeiras que lhe permitam desempenhar esse complexo conjunto de tarefas, os patógenos desenvolveram mecanismos que maximizam a biologia de seus organismos hospedeiros. Muitos dos patógenos que serão discutidos neste capítulo são hábeis e práticos biólogos celulares. Poderemos aprender muito sobre biologia celular por meio da observação desses organismos.

Ao mesmo tempo em que a nossa constante exposição aos patógenos influenciou fortemente a evolução humana, o desenvolvimento do sistema imune adaptativo extraordinariamente preciso em vertebrados, descrito no Capítulo 25, foi uma importante escalada na "corrida armamentista" que sempre existiu entre o patógeno e seus hospedeiros. Nos tempos modernos, os humanos aumentaram as apostas pela alteração deliberada do comportamento para limitar a habilidade do patógeno de infectar. Melhorias do sistema público de saúde, incluindo a construção de redes de esgoto e o suprimento de água potável, contribuíram para o declínio gradativo na frequência do total de mortes devido às doenças infectocontagiosas nos últimos séculos. As sociedades que empregaram recursos para melhorar a nutrição infantil foram beneficiadas pela melhoria geral do estado de saúde, incluindo uma grande redução da taxa de morte por infecções precoces da infância. Intervenções médicas, como vacinações, fármacos antimicrobianos, testes rotineiros no sangue antes de usá-lo em transfusões, também reduziram substancialmente a carga de doenças infecciosas na humanidade. À medida que aprendemos mais sobre os mecanismos pelos quais os patógenos causam doenças (patogênese), nossos cérebros continuarão a servir como uma extensão do nosso sistema imune no combate às doenças infecciosas.

Os sinais e os sintomas de uma infecção podem ser causados pelo patógeno ou pela resposta do hospedeiro

Apesar de podermos facilmente compreender por que os micro-organismos infecciosos desenvolveram mecanismos de reprodução em um hospedeiro, não está tão claro por que desenvolvem doenças neles. Uma explicação para isso pode ser que, em alguns casos, as respostas patológicas geradas pelo micro-organismo aumentam a eficiência de sua disseminação e de sua propagação e, desse modo, conferem claramente uma vantagem seletiva ao patógeno. Na genitália, as lesões que contêm vírus causadas por infecção pelo *herpes simples*, por exemplo, facilitam a disseminação direta do vírus de um hospedeiro infectado para um parceiro não-infectado, durante contato sexual. De forma semelhante, as infecções diarreicas são eficientemente transmitidas do paciente aos servidores do hospital. Em muitos casos, no entanto, a indução de uma doença não mostra vantagem aparente para o patógeno. Algumas respostas do hospedeiro à infecção, como letargia e

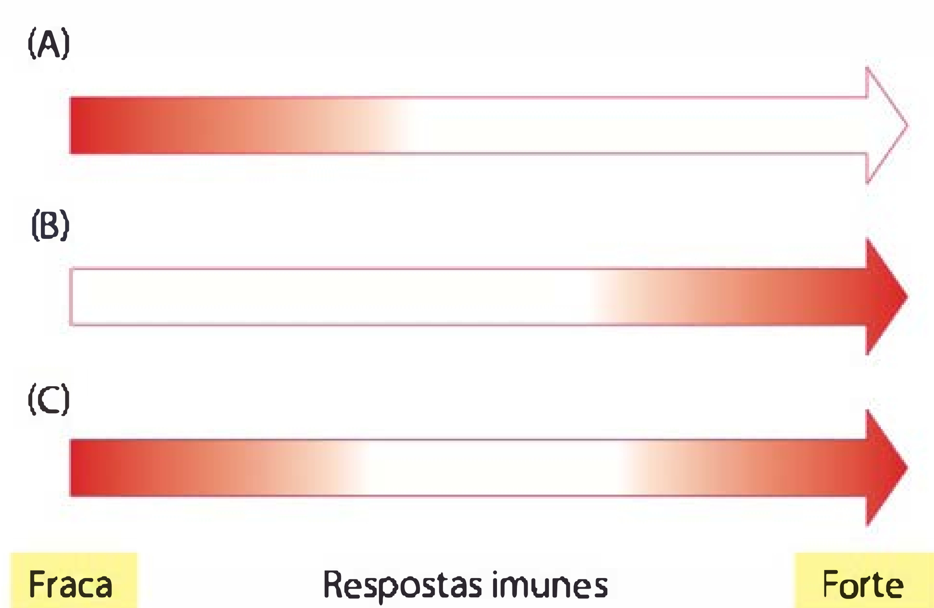


Figura 24-2 Interação entre micróbios e a resposta imune na patogênese microbiana. O poder da resposta imune aumenta na direção das setas, enquanto a quantidade de danos ao hospedeiro é indicada pelo aumento de *sombreamento vermelho* nas setas. (A) Flora normal como a bactéria *Staphylococcus epidermidis* e o fungo *Pneumocystis carinii* somente causa doença quando o sistema imune é anormalmente fraco. (B) Para alguns patógenos, como o paramyxovírus que causa caxumba e a bactéria *Chlamydia trachomatis* que causa uma doença sexualmente transmitida comum, é a resposta imune, mais do que o patógeno, que é primariamente responsável pelo dano tecidual. (C) Para muitos patógenos, hospedeiros com resposta imune normal podem ser colonizados assintomaticamente, porém hospedeiros com resposta imune muito fraca ou muito forte podem sofrer danos severos e mesmo a morte. Muitos micro-organismos se comportam assim, incluindo *o Mycobacterium tuberculosis*, o fungo *Aspergillus* e o vírus da herpes simples.

retirada dos ambientes de interações sociais, parecem inibir a propagação do patógeno. Humanos infectados podem, de maneira altruística, tentar evitar a infecção de amigos ou de membros da família, e humanos saudáveis podem de maneira consciente evitar os doentes; comportamento semelhante foi observado em lagostas tropicais. Estas são respostas adaptativas que foram selecionadas na população hospedeira com tendências de vida em grupo.

Muitos dos sintomas e sinais que geralmente associamos às doenças infecciosas são manifestações diretas do sistema imune do hospedeiro em ação. Alguns sinais característicos no sítio da infecção bacteriana, incluindo o inchaço, o rubor e a produção de pus (principalmente composto por células sanguíneas brancas mortas), são o resultado direto das tentativas das células do sistema imune de destruir os micro-organismos invasores. Também a febre é uma resposta defensiva, pois o aumento na temperatura corporal pode inibir o crescimento de alguns micro-organismos. Em casos extremos, a mais severa e danosa consequência de uma doença infecciosa é diretamente causada por uma resposta imune superzelosa: a destruição massiva de tecidos vista em casos de leishmaniose (uma infecção causada por patógenos eucarióticos membros do gênero *Leishmania*) é um bom exemplo. Assim, a compreensão da biologia de uma doença infecciosa requer a apreciação da contribuição dada tanto pelo patógeno quanto pelo hospedeiro.

Para se entender as contribuições relativas do micro-organismo infectante e do hospedeiro em causar os sinais e sintomas da doença, é apropriado considerar a causa e a extensão do dano no tecido do hospedeiro durante a infecção. Cada interação entre um micro-organismo particular e um determinado hospedeiro é um fenômeno único, e o resultado depende de uma constante mudança do panorama da atividade microbiana e da função do sistema imune do hospedeiro. A extensão dos danos causados no hospedeiro dependerá da interação destes fatores. Em alguns casos, um micro-organismo em particular poderá agir como inofensivo ou mesmo como um comensal benéfico em muitas pessoas, muitas vezes, porém, poderá também causar doença invasiva em pessoas com o sistema imune enfraquecido; isto é verdadeiro para o habitante comum da pele *Staphylococcus epidermidis*, por exemplo (**Figura 24-2**A). Outro micro-organismo, como o vírus que causa a caxumba, causará danos severos apenas na presença de uma forte resposta imune (Figura 24-2B). Uma categoria interessante ilustrando perfeitamente a importância da interação entre o hospedeiro e os fatores microbianos que causam as lesões, é a dos patógenos que causam uma doença severa em pessoas com uma resposta imune muito forte ou muito fraca, mas não causam danos em pessoas com uma resposta imune intermediária (Figura 24-2C). Um excelente exemplo é a tuberculose que correntemente infecta entre 1 e 2 bilhões de pessoas no planeta (geralmente nos pulmões), apesar de a maioria dos infectados não perceber por que o sistema imune efetivamente bloqueou a infecção. Quando, no entanto, uma pessoa com tal forma latente de infecção pelo *M. tuberculosis* se torna imuno deprimida, por terapia com fármacos imunossupressores ou infecção com o vírus da imunodeficiência (HIV), por exemplo, o equilíbrio delicado entre a bactéria e o sistema imune é modificado em favor da bactéria, que agora se replica de maneira incontrolada, levando a uma doença séria, frequentemente com uma tosse dolorida que produz um escarro sanguinolento. Inversamente, quando a resposta imune contra o bacilo é exacerbada, poderá destruir uma quantidade extensiva de tecido pulmonar.

Os patógenos são filogeneticamente diversos

Muitos tipos de patógenos podem provocar doenças em seres humanos. Destes, os mais comuns são os vírus e as bactérias. Os vírus provocam doenças que vão da AIDS e da varíola ao resfriado comum. Eles são, essencialmente, fragmentos de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que codificam um número relativamente pequeno de produtos gênicos, envelopados em uma concha protetora de proteínas e (em alguns casos) em uma membrana (**Figura 24-3**A). Os vírus não possuem capacidade metabólica para uma atividade independente e assim dependem de maneira absoluta da energia metabólica suprida pelo hospedeiro. Todos eles usam a maquinaria básica de síntese proteica da célula hospedeira para a sua replicação, e muitos deles dependem também da maquinaria de transcrição.

De todas as bactérias que encontramos ao longo de nossa vida, apenas uma pequena parcela são patógenos primários. Muito maiores e mais complexas do que os vírus, as bactérias são células que geralmente apresentam vida livre e que podem realizar a maior parte das funções metabólicas básicas por si mesmas, dependendo dos hospedeiros primariamente para a nutrição (Figura 24-3B).

Outros agentes infecciosos são organismos eucariotos. Estes variam desde fungos e protozoários unicelulares (Figura 24-3C), até grandes e complexos metazoários, como os vermes. Uma das doenças infecciosas mais comuns no mundo, que hoje afeta aproximadamente um bilhão de pessoas, é a infestação intestinal pelo nematódeo *Ascaris lumbricoides*. O *Ascaris* é bastante semelhante ao seu primo *Caenorhabditis elegans*, utilizado mundialmente como organismo-modelo em pesquisas de genética e de biologia do desenvolvimento (discutido no Capítulo 22). O *C. elegans*, no entanto, tem cerca de 1 mm de comprimento, ao passo que os *Ascaris* podem alcançar 30 cm (Figura 24-3D).

Algumas doenças neurodegenerativas raras, incluindo a "doença da vaca louca", são causadas por uma partícula infecciosa atípica denominada *príon*, a qual é constituída unicamente por proteína. Apesar de o príon não conter um genoma, ele pode replicar e provocar a morte do hospedeiro.

Mesmo dentro de cada classe de patógeno, existe uma diversidade impressionante. Os vírus apresentam uma enorme variedade em relação ao tamanho, à forma e ao conteúdo (DNA *versus* RNA, envelopados ou não, e assim por diante). Esta mesma situação de diversidade é real para outros tipos de patógenos. A capacidade de causar doença é um nicho evolutivo não uma herança comum entre seres intimamente relacionados.

Cada patógeno individual provoca doença de uma forma diferente, e o mesmo patógeno pode causar diferentes doenças em diferentes hospedeiros, o que constitui um desafio para o entendimento da biologia básica da infecção. Contudo, quando consideramos as interações dos agentes infecciosos com seus hospedeiros, emergem alguns temas comuns da patogênese. Estes temas comuns são o foco deste capítulo.

Inicialmente, introduziremos os mecanismos básicos de cada um dos principais tipos de patógenos antes de examinar os mecanismos que os patógenos usam para controlar seus hospedeiros e a resposta imune inata que os hospedeiros usam para controlar os patógenos.

As bactérias patogênicas possuem genes especializados em virulência

As **bactérias** são pequenas e estruturalmente simples. A maioria delas pode ser classificada, de forma geral, por suas formas como bastonetes, esferas ou espirais (**Figura 24-4**A) e por suas propriedades frente à coloração de Gram (Figura 24-4B e C). Seus tamanhos relativamente pequenos com poucas formas guardam seus extraordinários metabolismos moleculares e sua diversidade ecológica. Ao nível molecular, as bactérias são mais diversas que os eucariotos, e podem com sucesso ocupar nichos ecológicos em condições extremas de

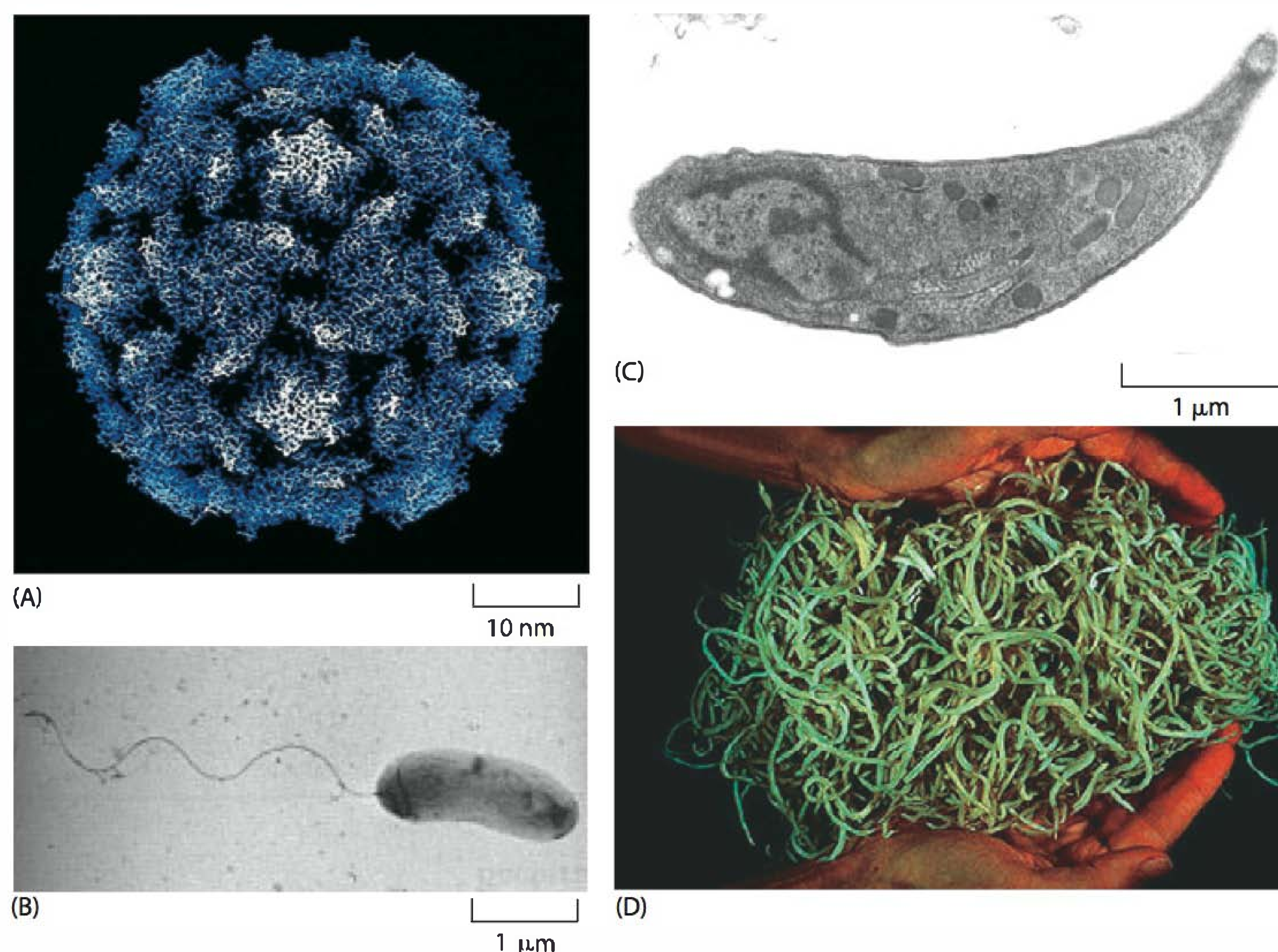


Figura 24-3 Patógenos em diferentes formas. (A) A estrutura da capa proteica, ou *capsídeo*, do poliovírus. Este vírus é o agente da paralisia (poliomielite). Comum por muito tempo, esta doença está hoje praticamente erradicada devido à vacinação generalizada. (B) A bactéria *Vibrio cholerae*, agente causador da doença diarreica epidêmica cólera. (C) O protozoário parasita *Toxoplasma gondii*. Este organismo normalmente é um parasita de felinos, de gatos domésticos a tigres, porém causa sérias infecções no cérebro e nos músculos de pessoas imunocomprometidas com AIDS. (D) Esta massa de nematódeo, *Ascaris*, foi removida do intestino obstruído de um menino de dois anos de idade. (A, cortesia de Robert Grant, Stephan Crainic e James M. Hogle; B, não conseguimos contato com o detentor dos direitos e, ficaremos gratos se pudermos contatá-lo; C, cortesia de John Boothroyd e David Ferguson; D, de J. K. Baird et al., *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 35:314-318,1986. Fotografia de Daniel H. Connor.)

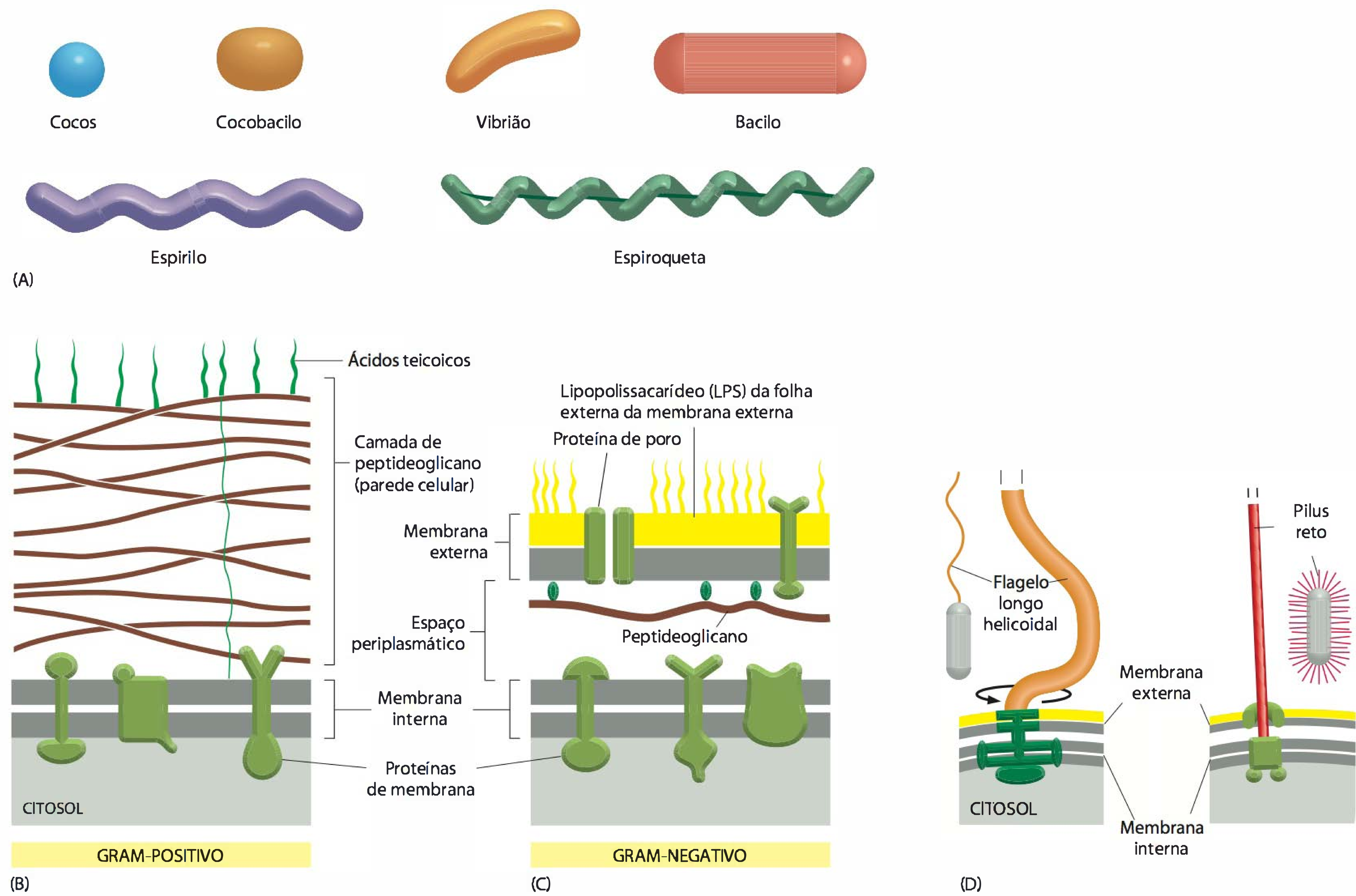


Figura 24-4 Morfologia da célula bacteriana e estruturas de superfície. (A) As bactérias são classificadas pela forma (B e C). Elas também são classificadas em gram-positivas e gram-negativas. (B) As bactérias como o *Streptococcus* e o *Staphylococcus* possuem uma única membrana e uma parede celular espessa constituída de *peptideoglicano* com ligações cruzadas. Elas retêm o corante violeta utilizado nos processos de coloração de Gram e são, portanto, denominadas gram-positivas. As bactérias gram-negativas, como a *E. coli* e a *Salmonella*, têm duas membranas, separadas por um *espaço periplasmático* (ver Figura 11-18). A camada de peptideoglicano na parede celular desses organismos está localizada no espaço periplasmático e é mais delgada do que a das gram-positivas: elas, portanto, não retêm o corante utilizado no processo de coloração de Gram. A membrana interna da bactéria gram-negativa é uma bicamada fosfolipídica, e o folheto interno da membrana externa também é primordialmente constituído por fosfolipídeos; o folheto externo da membrana exterior, no entanto, é composto por um lipídeo glicosilado característico, denominado lipopolissacarídeo (LPS) (ver Figura 24-47). (D) Os apêndices da superfície celular são importantes para o comportamento bacteriano. Muitas bactérias nadam pela rotação de um flagelo helicoidal (ver Figura 15-71). A bactéria ilustrada tem um único e simples flagelo em um dos polos; outras, como a *E. coli*, possuem múltiplos flagelos. Os *pili* retos (também chamados de *fímbrias*) são usados para aderir em superfícies do hospedeiro e para facilitar a troca de material genético entre bactérias. Tanto o flagelo quanto os pili estão ancorados na superfície celular por grandes complexos multiproteicos.

temperatura, sal e limitação de nutrientes que intimidariam o mais intrépido dos eucariotos. Apesar de não possuírem a variedade de morfologias das células eucarióticas, as bactérias apresentam um surpreendente arranjo de apêndices que permitem que elas nadem ou tenham aderência a superfícies desejadas (Figura 24-4D). Seus genomas são pequenos, tipicamente entre 1.000.000 e 5.000.000 de pares de nucleotídeos (comparado aos 12.000.000 da levedura e mais de 3.000.000.000 do homem).

Como já enfatizado, apenas uma minoria de espécies bacterianas possui a habilidade de causar doenças em humanos. Alguns dos causadores de doenças que somente podem se replicar no interior do corpo dos seus hospedeiros são chamados de *patógenos obrigatórios*. Outros se replicam no meio ambiente, na água ou no solo e somente causam doença se encontrarem um hospedeiro suscetível sendo, então chamados de *patógenos facultativos*. Muitas bactérias normalmente são inofensivas, porém possuem uma habilidade latente de causar doenças em um hospedeiro ferido ou imunocomprometido, sendo denominados *patógenos oportunistas*. Como discutido previamente, se uma bactéria causa doença em um hospedeiro particular ou não dependerá de uma ampla variedade de fatores, incluindo o estado geral de saúde do hospedeiro; muitos membros da flora normal, por exemplo, podem causar severas infecções em indivíduos com AIDS.

Alguns patógenos bacterianos são exigentes em sua escolha de hospedeiros e somente infectarão uma espécie única ou um grupo de espécies relacionadas, enquanto outros são generalistas. *Shigella flexneri,* por exemplo, que causa a disenteria epidêmica (diarreia sanguinolenta) em áreas do planeta que não possuem suprimento de água tratada, infectará somente o homem ou outros primatas. Ao contrário, a bactéria estreitamente relacionada *Salmonella enterica*, uma causa comum de infecção alimentar em humanos, pode também infectar muitos outros vertebrados, incluindo aves e tartarugas. O generalista campeão é o patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, que é capaz de causar doenças em plantas assim como em animais.

Um número relativamente pequeno de genes causa a diferença significativa entre um patógeno virulento e o seu parente não-patogênico e estreitamente relacionado. Genes que contribuem para a habilidade de um organismo de causar doença são chamados de **genes de virulência**, e as proteínas que eles codificam são chamadas de **fatores de virulência**. Os genes de virulência frequentemente são aglomerados em grupos chamados de *ilhas de patogenicidade* no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos extracromossômicos chamados de *plasmídeos de virulência* (**Figura 24-5**). Estes genes também poderão ser transportados em *bacteriófagos* móveis (vírus bacterianos). Dessa forma, ao que parece, um novo patógeno surge quando grupos de genes de virulência são transferidos em uma bactéria previamente avirulenta. À medida que novos genomas de bactérias patogênicas e não-patogênicas são completamente sequenciados, torna-se claro que a aquisição de grandes nacos de DNA e outras alterações grosseiras contribuíram para a evolução bacteriana, permitindo às espécies bacterianas habitar novos nichos ecológicos e nutricionais, assim como causar doenças. Mesmo dentro de uma única espécie bacteriana, a quantidade de variações cromossômicas é atordoante; cepas diferentes de *E. coli* podem ter 25% ou mais de diferenças em seus genomas.

A aquisição de genes ou aglomerados de genes poderá conduzir a rápida evolução dos patógenos e tornar não-patógenos em patógenos. Consideremos, por exemplo, *Vibrio cholerae* – a bactéria gram-negativa que causa a diarreia epidêmica chamada de cólera. Os genes que codificam as duas subunidades da toxina que causa a diarreia são transportados por bacteriófagos móveis (**Figura 24-6**A e B). Das centenas de cepas de *Vibrio cholerae* encontradas em lagos, na natureza, as únicas que causam a pandemia da doença humana são as infectadas com o vírus bacteriano. Como resumido na Figura 24-6C, houve oito pandemias de *V. cholerae* desde 1817. As primeiras seis foram causadas pela reemergência periódica de cepas semelhantes, chamadas de cepas Clássicas. Ao lado da toxina codificada pelo bacteriófago e das ilhas de patogenicidade, as cepas Clássicas possuem em comum um antígeno de superfície que é um carboidrato primário, chamado de O1, que é parte do lipopolissacarídeo constituinte da folha mais externa da membrana externa (ver Figura 25-4C). Em 1961, começou a sétima pandemia, causada por uma nova cepa (denominada "El Tor"), que era marcadamente diferente das cepas Clássicas e ao que parece surgiu quando uma cepa expressando o antígeno O1 adquiriu na natureza dois bacteriófagos, assim como pelo menos duas ilhas de patogenicidade, não encontrados nas amostras Clássicas. A cepa El Tor eventualmente deslocou as cepas clássicas em todo mundo. Em 1991, começou a oitava epidemia, dessa vez com o alarmante fato de que mesmo pessoas que tiveram cólera previamente não eram imunes devido ao antígeno O diferente, tornando os anticorpos antiO1 presentes no sangue dos sobreviventes da epidemia anterior ineficientes contra a nova cepa. A nova cepa era semelhante à cepa El Tor em outras características; aparentemente, ela simplesmente adquiriu um aglomerado de genes para a síntese de um tipo diferente de antígeno O.

Quais são os genes que capacitam uma bactéria a causar uma doença em um hospedeiro saudável? Muitos genes de virulência codificam para proteínas que interagem diretamente com células hospedeiras. Dois transportados pelo fago do *Vibrio cholerae*, por exemplo,

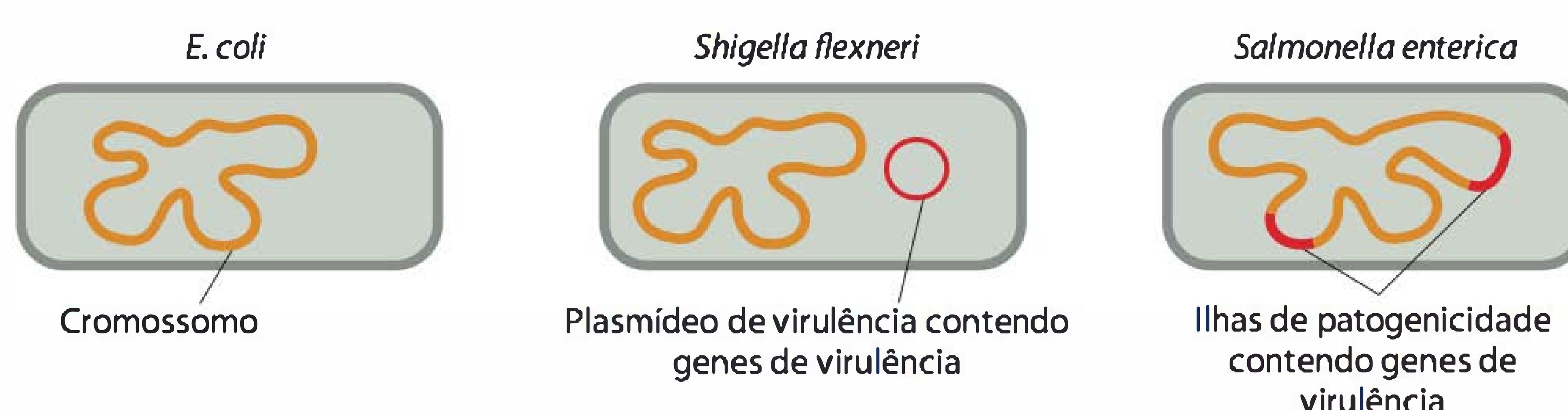


Figura 24-5 Diferenças genéticas entre bactérias patogênicas e não-patogênicas. A *E. coli* não-patogênica possui um único cromossomo circular. A *E. coli* é bastante próxima de dois tipos de patógenos encontrados em alimentos – *Shigella flexneri*, que causa disenteria, e *Salmonella enterica*, causa comum de infecção alimentar. Se estes três organismos fossem descritos hoje, com base em técnicas moleculares, seriam classificados em um mesmo gênero e, talvez, em uma mesma espécie. O cromossomo de *S. flexneri* difere do cromossomo de *E. coli* em uns poucos loci; a maioria dos genes necessários à patogênese (genes de virulência) encontra-se em um plasmídeo extracromossômico virulento. O cromossomo de *S. enterica* possui dois grandes insertos (ilhas de patogenicidade) que não são encontrados no cromossomo de *E. coli*; cada um desses insertos contêm vários genes de virulência.

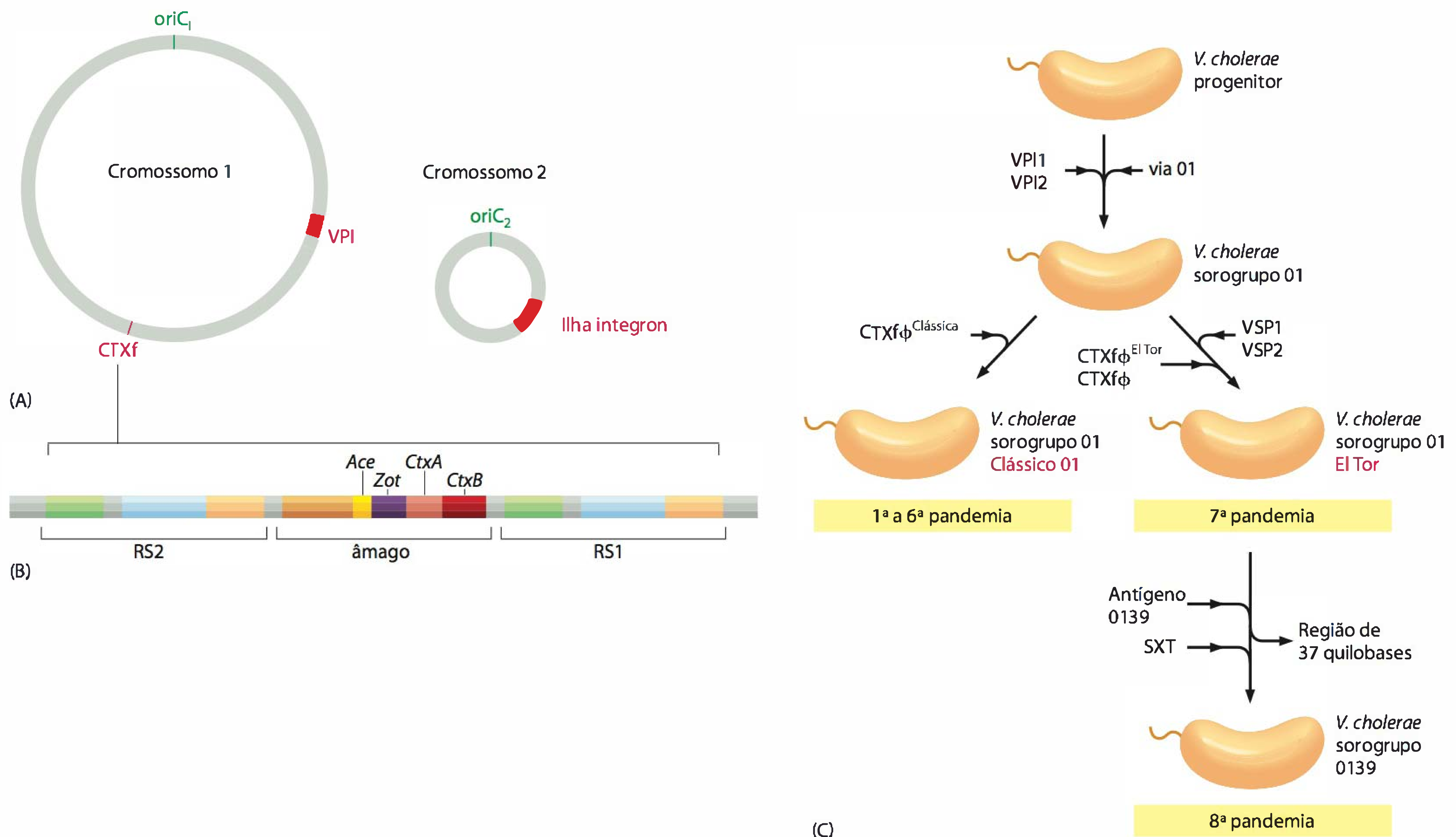


Figura 24-6 Organização genética do *Vibrio cholerae*. Uma micrografia eletrônica do *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) é mostrada na Figura 24-3B. (A) *Vibrio cholerae* é incomum por ter dois cromossomos circulares em vez de apenas um. Os dois cromossomos têm origens de replicação distintas ($OriC_1$ e $OriC_2$). Três loci das linhagens patogênicas de *V. cholerae* estão ausentes nas linhagens não-patogênicas e parecem ser uma aquisição recente. O CTXϕ no cromossomo 1 é um genoma bacteriófago integrado e carrega os genes para a toxina da cólera. A ilha de patogenicidade VPI do cromossomo 1 inclui genes de fatores necessários para a colonização intestinal. A *ilha integron* no cromossomo 2 facilita a inserção de fragmentos de DNA recentemente adquiridos *downstream* de um forte promotor transcricional, promovendo assim a aquisição sequencial de novos genes. Apesar de ainda não ter sido demonstrado que esta ilha integron é necessária à virulência em *V. cholerae*, ilhas integron semelhantes em muitos outros patógenos contêm genes de virulência e genes envolvidos em resistência a antibióticos. (B) Mapa do lócus CTXϕ. Os genes codificantes das duas subunidades da toxina da cólera são *CtxA* e *CtxB*. Outros genes da região central (*Ace* e *Zot*) também encontram-se envolvidos em virulência. As duas sequências flanqueadoras repetidas RS2 e RS1 estão envolvidas na inserção do genoma do bacteriófago no cromossomo 1. (C) Modelo com base em genômica comparativa para a evolução das cepas patogênicas de *V. cholerae*. As cepas progenitoras na natureza primeiro adquiriram a via de biossíntese necessária para fazer o antígeno Tipo O1 da cadeia de carboidrato do lipopolissacarídeo da membrana externa (ver Figuras 24-4C e 24-47) e talvez também tenham adquirido uma ou duas ilhas de patogenicidade do *Vibrio* (VPI1 e VPI2). Incorporação do bacteriófago CTXϕ criou a cepa patogênica Clássica responsável pelas seis primeiras epidemias globais de cólera entre 1817 e 1923. Em alguma época do século XX, uma cepa O1 foi invadida pelo CTXϕ novamente, e também pelo bacteriófago associado RS1ϕ e duas novas ilhas de patogenicidade (VSP1 e VSP2), criando a amostra El Tor que emergiu como a sétima pandemia global em 1961. Antes de 1991, a cepa El Tor adquiriu um novo aglomerado de genes, capacitando-a a produzir o antígeno Tipo O139 da tipo cadeia de carboidrato em vez do O1. Esse fato alterou sua interação com o sistema imune humano, sem diminuir sua virulência engatilhando o começo da oitava pandemia; esta bactéria adquiriu uma nova ilha de patogenicidade (SXT) e perdeu a maior parte da ilha VPI2.

codificam para duas subunidades da **toxina da cólera** (ver Figura 24-6B). A subunidade B dessa proteína tóxica secretada liga-se a um componente glicolipídico da membrana plasmática das células epiteliais do intestino de uma pessoa que consumiu água contaminada com a *Vibrio cholerae*. A subunidade B transfere a subunidade A através da membrana plasmática. A subunidade A é uma enzima que catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD^+ para a proteína trimérica G_s, que normalmente ativa a enzima adenilil-ciclase para que converta 5' AMP em cAMP (AMP cíclico) (discutido no Capítulo 15). A ADP-ribosilação da proteína G resulta em um acúmulo exagerado de cAMP e em um desbalanço de íons, levando a uma diarreia aquosa massiva, associada à cólera. A infecção então se espalha para novos hospedeiros pela rota fecal-oral via água e alimentos contaminados.

Alguns patógenos usam diversos mecanismos independentes para causar toxicidade nas células do hospedeiro. *Antraz*, por exemplo, é uma doença infecciosa aguda de ovinos, bovinos e outros herbívoros e ocasionalmente humanos. Em geral é causada pelo contato com esporos da bactéria gram-positiva *Bacillus anthracis*. Ao contrário da cólera,

antraz não é transmitida de pessoa para pessoa. Esporos dormentes podem sobreviver por um longo período de tempo no solo e são altamente resistentes às condições adversas do meio, incluindo calor, radiação ionizante e ultravioleta, pressão e reagentes químicos. Após os esporos serem inalados, ingeridos ou esfregados na pele não íntegra, os esporos germinam e a bactéria começa a replicar-se. Ela secreta duas toxinas, denominadas **toxina letal** e **toxina causadora de edema**, e qualquer uma sinaliza a infecção. Como a toxina colérica, ambas as toxinas do antraz são feitas de duas subunidades. A subunidade B é idêntica nas duas toxinas e liga-se a uma proteína receptora na superfície celular para transferir as duas subunidades A para a célula hospedeira (**Figura 24-7**). A subunidade do edema é uma adenilil-ciclase que diretamente converte o ATP da célula hospedeira em cAMP, levando ao desequilíbrio iônico que causa um acúmulo de fluidos extracelulares (*edema*) na pele infectada ou no pulmão. A subunidade A da toxina letal é uma protease que hidrolisa diversos membros de proteínas da família MAP-cinase-cinase (ver Figura 15-60). Injeção da toxina letal na corrente sanguínea de um animal causa choque (queda da pressão sanguínea) e morte. Os mecanismos moleculares que levam à morte no antraz são incertos.

Estes exemplos ilustram um tema comum entre os fatores de virulência. Os fatores frequentemente são proteínas tóxicas (*toxinas*) que interagem diretamente com proteínas estruturais ou sinalizadoras para induzir uma resposta da célula do hospedeiro que é benéfica à colonização do patógeno ou à replicação, ou elas são proteínas necessárias para conduzir tais toxinas aos alvos na célula hospedeira. Um mecanismo de entrega comum e particularmente eficiente encontrado em muitos patógenos gram-negativos, chamado de **sistema de secreção tipo III**, atua como uma minúscula seringa que injeta proteínas tóxicas do citoplasma de uma bactéria extracelular diretamente no citoplasma de uma célula hospedeira adjacente (**Figura 24-8**). As proteínas efetoras que tais dispositivos injetam no citoplasma das células do hospedeiro podem induzir uma variedade de respostas celulares que capacitam a bactéria a invadir ou sobreviver. Existe um alto grau de similaridade entre a seringa do sistema tipo III e a base de um flagelo bacteriano (ver Figura 15-71), e muitas das proteínas nas duas estruturas são homólogas. Dado que o flagelo é encontrado em uma grande variedade de bactérias em número maior do que o sistema de secreção tipo III, parece que o sistema de secreção é uma adaptação específica para a patogênese, sendo bem provável que o sistema de secreção tipo III tenha evoluido do flagelo e não o contrário. Outros tipos de sistemas especializados de direcionamento de toxinas encontrados em patógenos, ao que parece, evoluíram independentemente. Por exemplo, o *sistema de secreção tipo IV*, usado por diversos patógenos para direcionar toxinas para o citoplasma da célula hospedeira, é muito próximo do aparelho de conjugação que muitas bactérias usam para a troca de material genético.

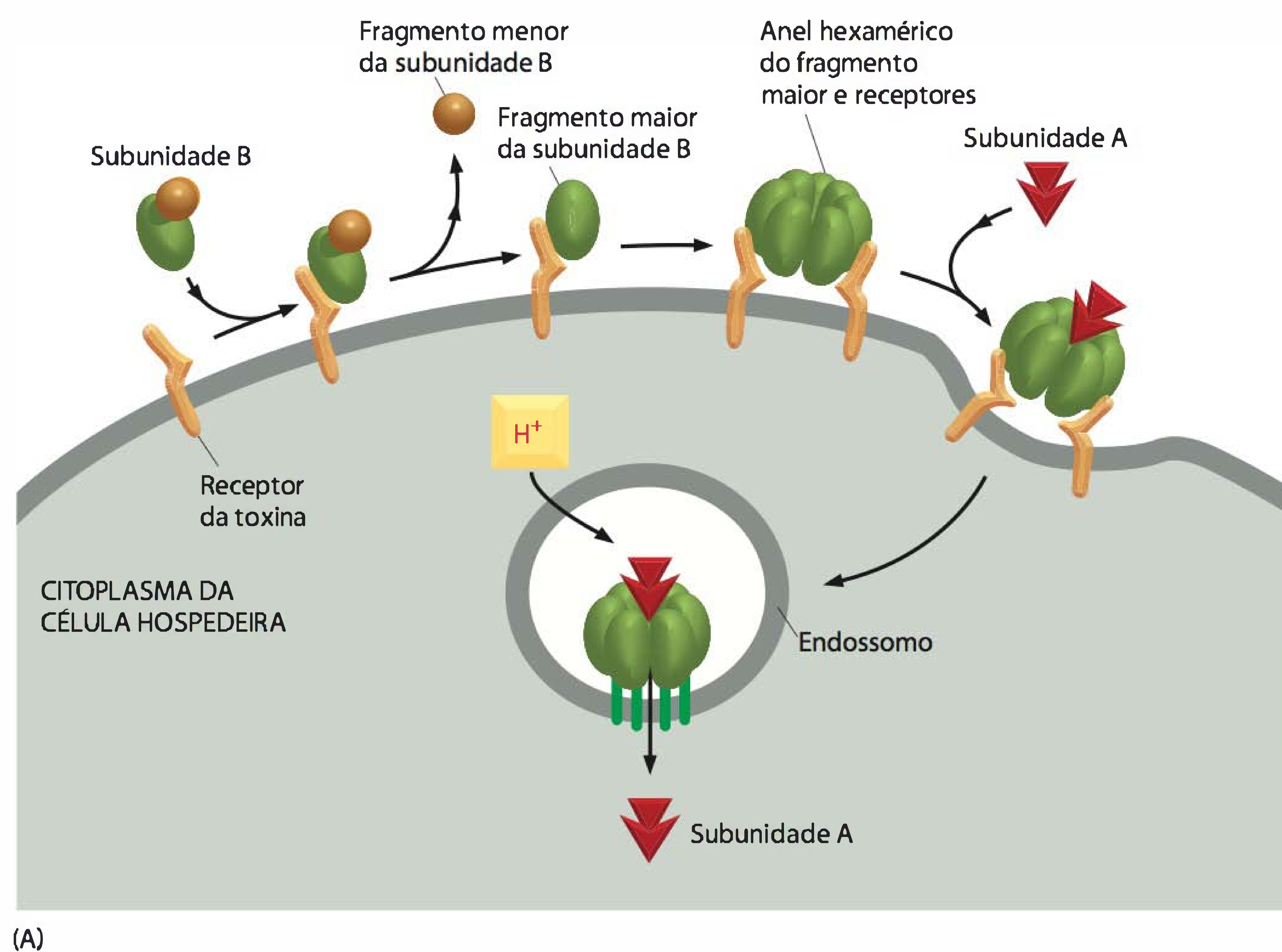




Figura 24-7 Entrada da toxina do antraz nas células hospedeiras. (A) As subunidades B da toxina formam um poro para transportar a subunidade A enzimaticamente ativa no citoplasma da célula hospedeira. A subunidade B liga-se a uma proteína receptora na superfície da célula do hospedeiro, onde é clivada autocataliticamente, liberando um pequeno fragmento e um fragmento maior que permanece ligado ao receptor. Sete cópias do fragmento maior e seus receptores associados se agregam na superfície celular para formar um anel heptamérico. A subunidade A da toxina se liga então ao anel heptamérico e é endocitada juntamente com o anel. Como o pH diminui no endossomo, o anel passa por uma dramática mudança conformacional que gera um poro na membrana endossomal, e a subunidade A é entregue no citosol da célula hospedeira, através do poro. (B) Estrutura cristalina, obtida por difração por raios X, vista de cima e de lado. (B, de C. Petosa et al., *Nature* 385:833-838, 1997, com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

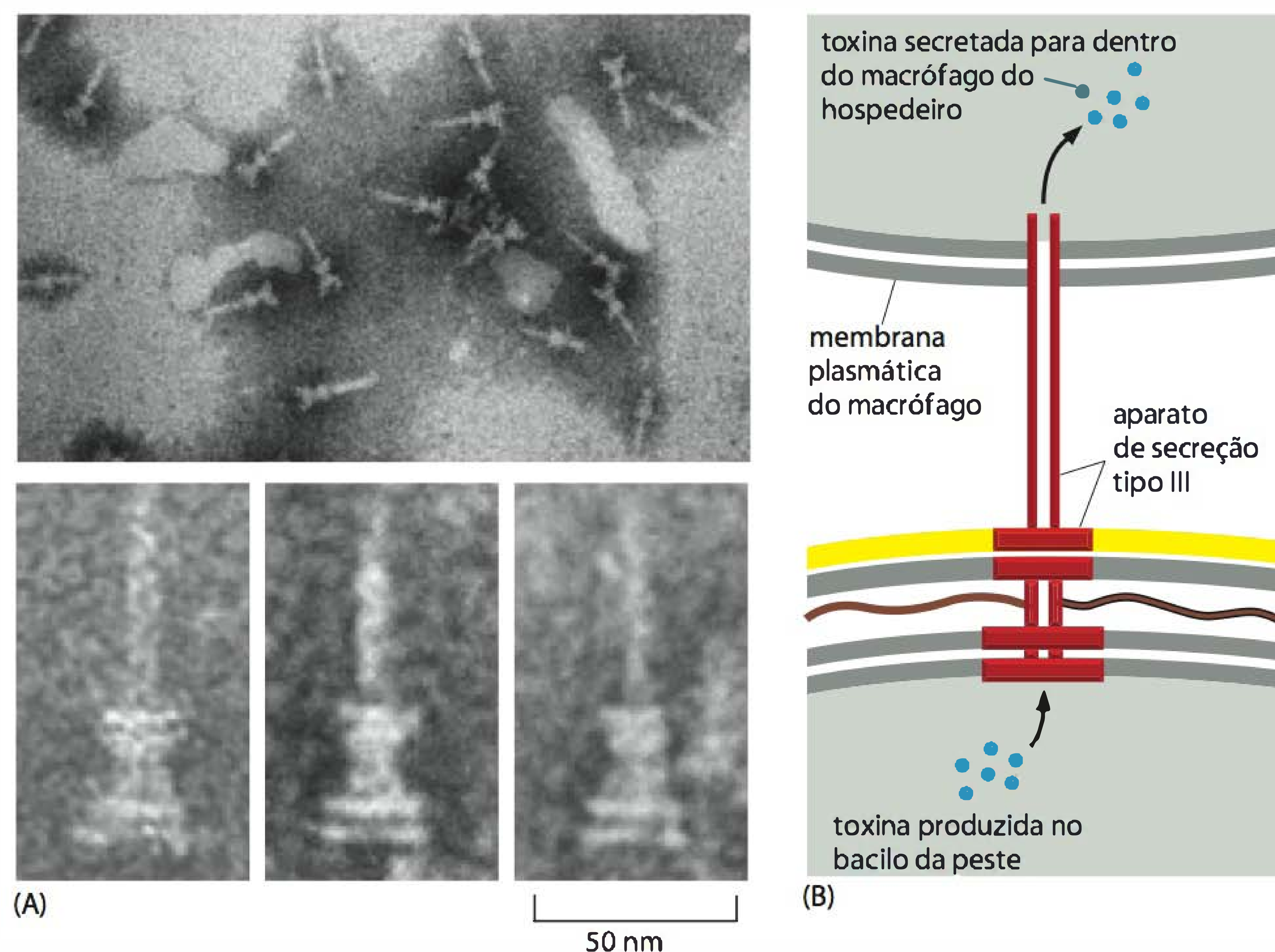


Figura 24-8 Sistemas de secreção tipo III que podem depositar fatores de virulência no interior do citoplasma das células hospedeiras. (A) Micrografias eletrônicas de sistemas de secreção e tipo III purificados. Aproximadamente duas dúzias de proteínas são necessárias para formar as estruturas completas, as quais podem ser vistas nas três micrografias eletrônicas aumentadas. (B) O anel maior inferior está inserido na membrana interna, e o anel menor superior á inserido na membrana externa. Durante a infecção, o contato entre a extremidade do tubo e a membrana citoplasmática da célula hospedeira desencadeia a secreção. Aqui, o bacilo da peste, *Yersinia pestis*, injeta toxinas em um macrófago. (A, de K. Tamano et al., *EMBO J*. 19:3876-3887, 2000. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Os fungos e os protozoários parasitas têm um ciclo de vida complexo com formas diversas

Os fungos patogênicos e os protozoários parasitas são eucariotos. Desse modo, é mais difícil o desenvolvimento de fármacos que atuarão sobre eles sem afetar o hospedeiro. Consequentemente, os fármacos antifúngicos e antiparasitários em geral são menos eficientes e mais tóxicas do que os antibióticos. Uma segunda característica das infecções fúngicas e parasitárias que as torna mais difíceis de tratar é a tendência apresentada pelos organismos infectivos de assumir diferentes formas durante seu ciclo celular. Muitas vezes um fármaco eficiente na indução da morte de um estágio do parasita é ineficiente para outro que, portanto, sobreviverá ao tratamento.

O ramo dos **fungos** no reino eucariótico inclui tanto as *leveduras* unicelulares (como o *Saccharomyces cerevisiae* e o *Schizosaccharomyces pombe*) quanto os fungos filamentosos pluricelulares ou *mofo* (como o que aparece nas frutas ou no pão). A maioria dos principais fungos patogênicos apresenta *dimorfismo* – habilidade de crescer tanto na forma unicelular quanto na forma filamentosa. A transição unicelular-filamentosa e filamentosa-unicelular frequentemente está associada com a infecção. O *Histoplasma capsulatum*, por exemplo, cresce sob a forma filamentosa no solo, a baixas temperaturas, mas assume a forma unicelular quando inalado, alojando-se nos pulmões, onde causa a doença chamada de histoplasmose (**Figura 24-9**).

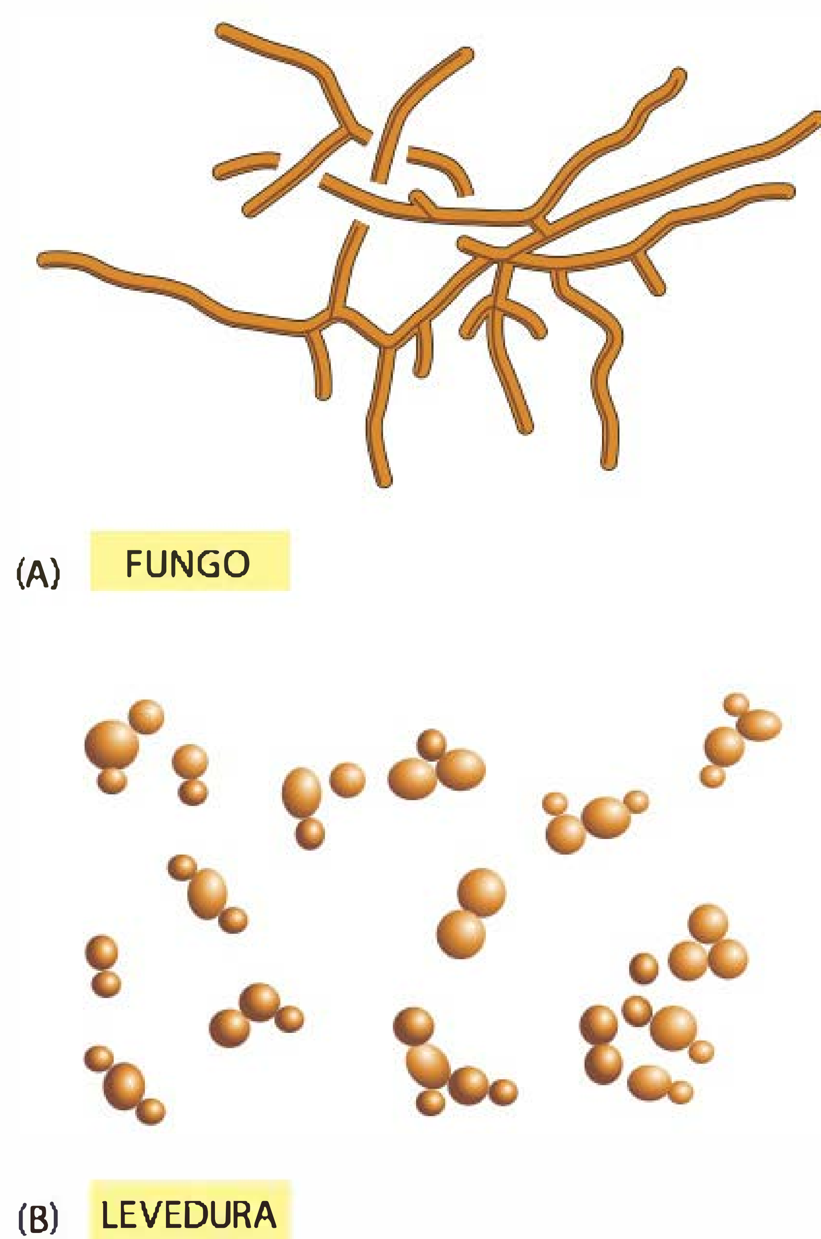
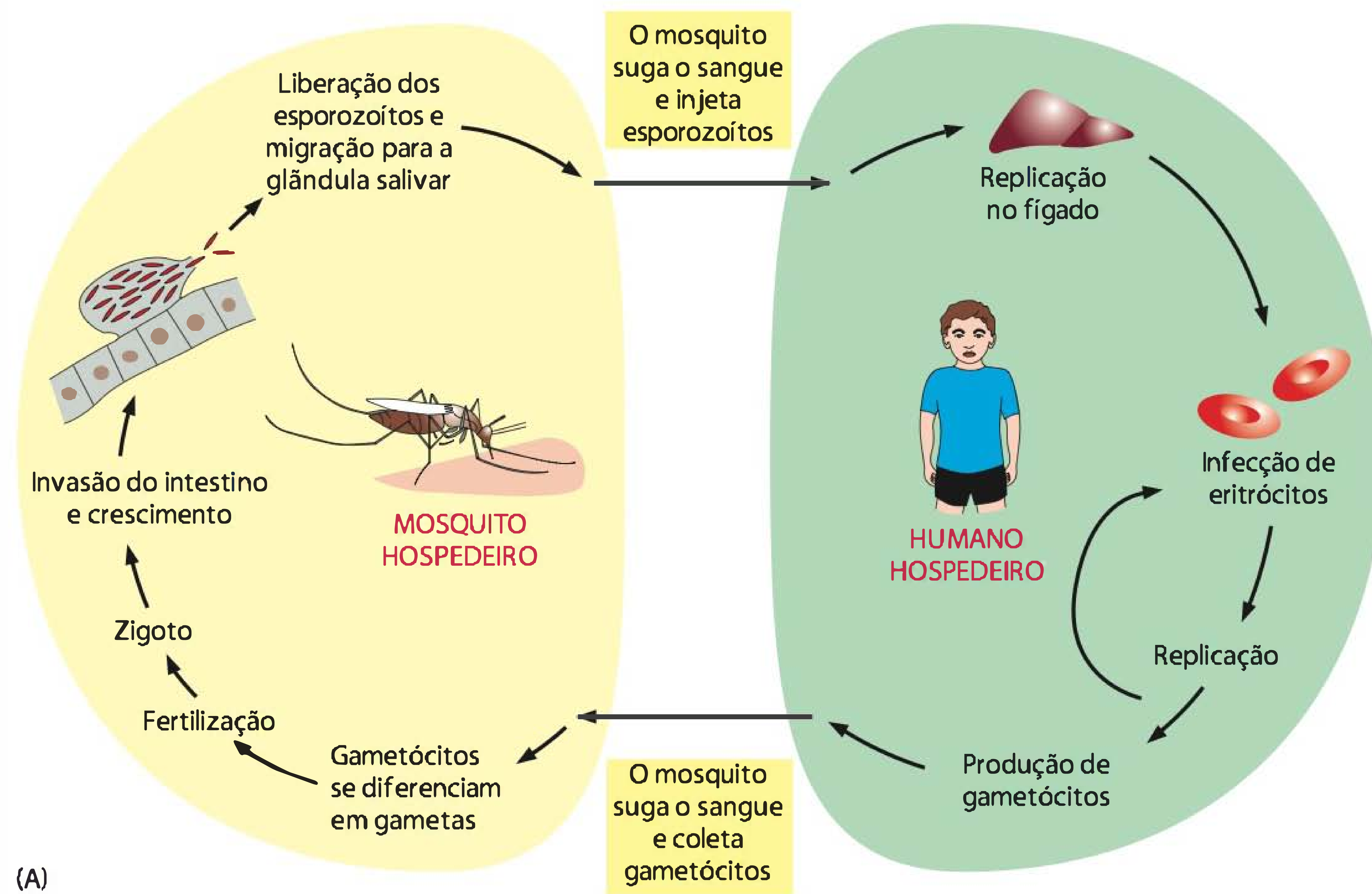
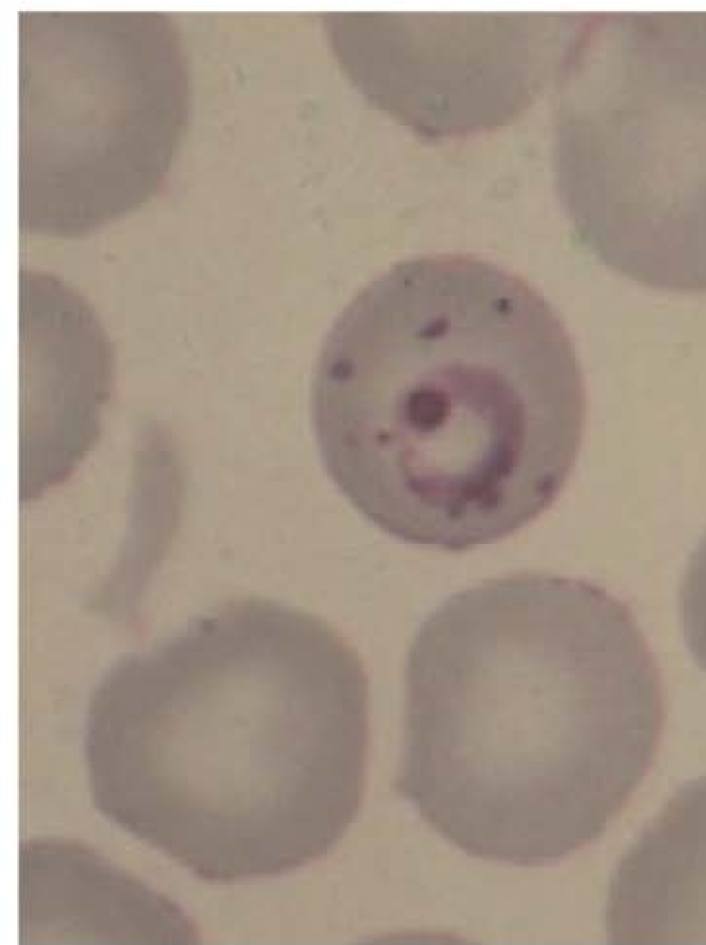


Figura 24-9 Dimorfismo no fungo patogênico *Histoplasma capsulatum*. (A) A baixas temperaturas no solo, o *Histoplasma* cresce como um fungo filamentoso. (B) Após ser inalado para o interior do pulmão de um mamífero, ele sofre uma modificação morfológica induzida pela mudança de temperatura. Nesta forma semelhante a uma levedura, assemelha-se muito ao *Saccharomyces cerevisiae*.

Os **protozoários parasitas** são eucariotos unicelulares com um ciclo de vida mais elaborado do que o dos fungos. Estes ciclos frequentemente necessitam da participação de mais de um hospedeiro. A **malária** é a mais comum das doenças provocadas por protozoários, infectando de 200 a 300 milhões de pessoas a cada ano e provocando a morte de 1 a 3 milhões delas. A doença é causada por quatro espécies de *Plasmodium*, as quais são transmitidas para o homem pela picada da fêmea de qualquer uma das 60 espécies de mosquitos *Anopheles*. O *Plasmodium falciparum* – o mais estudado dos parasitas causadores da malária – apresenta não menos do que oito formas e necessita tanto de hospedeiros humanos quanto de mosquitos para completar seu ciclo sexual (**Figura 24-10**A). Os gametócitos são formados na corrente sanguínea de seres humanos infectados, mas só poderão se diferenciar em gametas e fusionar para a formação do zigoto no intestino de um mosquito. Três das formas de *Plasmodium* são altamente especializadas na invasão e na replicação em tecidos específicos – as células de revestimento do intestino do inseto, o fígado humano e as células vermelhas do sangue humano. Mesmo no interior de um dos tipos de células, o eritrócito, o parasita *Plasmodium* passa por uma sequência complexa de eventos ligados à diferenciação, refletidos nas mudanças morfológicas notáveis (Figura 24-10B, C, D) assim como na regulação estágio-específica da maioria dos seus transcritos (**Figura 24-11**).





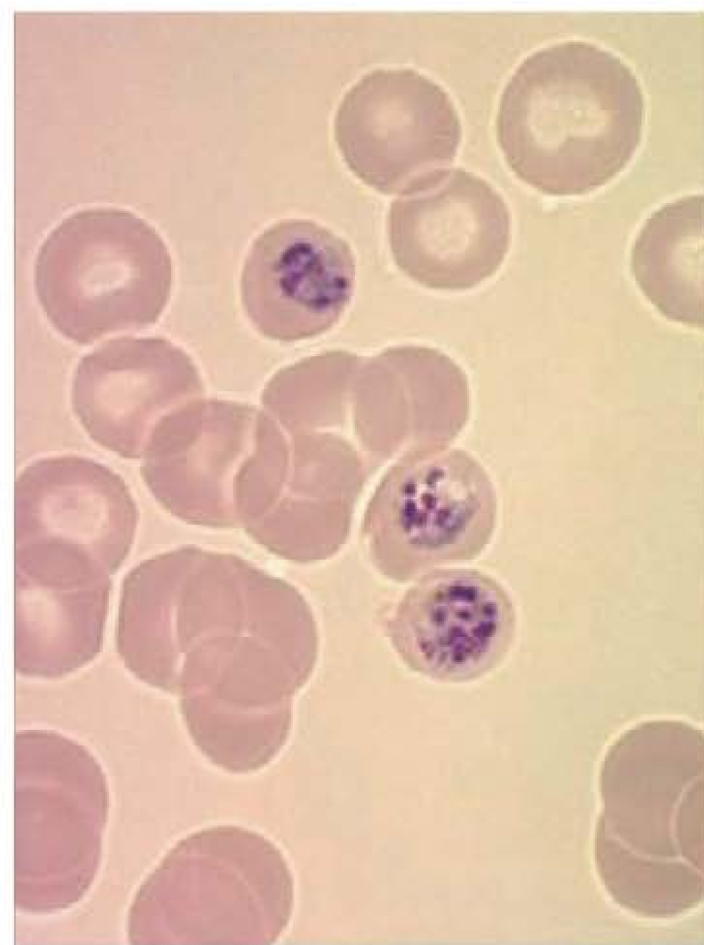
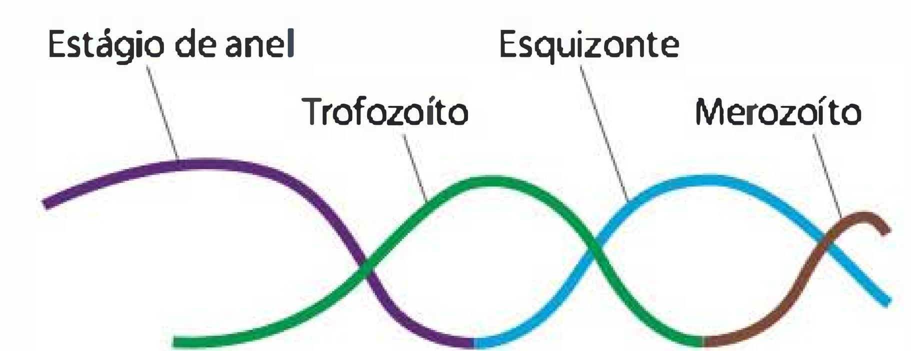




Figura 24-10 O complexo ciclo de vida do parasita da malária. (A) O ciclo sexual do *Plasmodium falciparum* requer a passagem por um hospedeiro humano e por um inseto hospedeiro. (B)-(D) Esfregaços de sangue de pessoas infectadas com malária mostrando três diferentes formas do parasita que aparecem nas células vermelhas do sangue: (B) estágio de anel; (C) esquizonte; (D) gametócito. (Micrografias cortesia do Centro para o Controle de Doença, Divisão de Doenças Parasitárias, DPDx.)

Como a malária é extremamente devastadora e amplamente distribuída, tem atuado como fator de forte pressão seletiva sobre as populações humanas nas áreas com presença do mosquito *Anopheles*. A *anemia falciforme*, por exemplo, é uma doença genética recessiva causada por uma mutação pontual no gene que codifica a cadeia β da hemoglobina, sendo comum em áreas da África com alta incidência da forma mais grave de malária (causada pelo *Plasmodium falciparum*). Os parasitas da malária apresentam crescimento deficiente nas células vermelhas do sangue de pacientes homozigotos para a anemia falciforme e de portadores heterozigotos saudáveis. Como resultado, a malária raramente é encontrada em portadores desta mutação. Por essa razão, a malária tem mantido uma alta frequência da mutação da anemia falciforme nestas regiões da África.



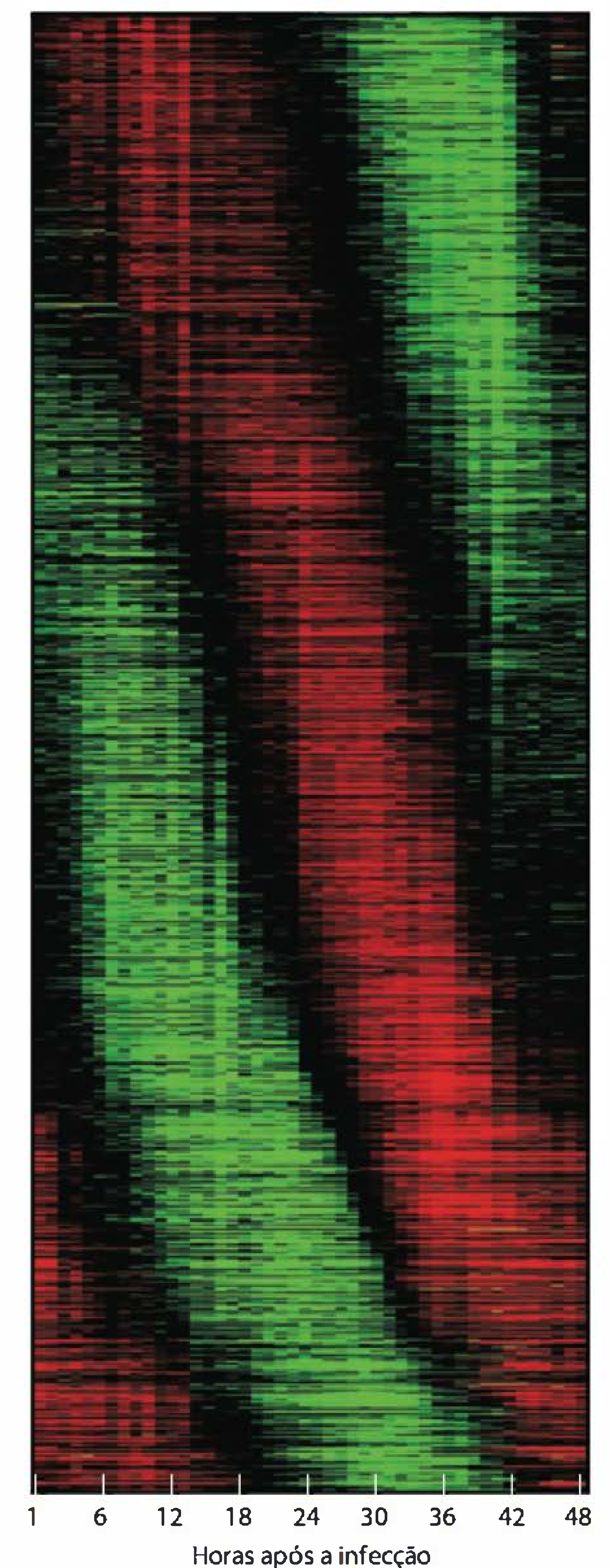


Figura 24-11 Programa transcricional tempo-dependente em parasitas da malária se desenvolvendo em eritrócitos. O RNA foi isolado de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* a intervalos de 1 hora em 48 horas. Na imagem, cada linha horizontal representa um dos ~2.700 genes nos quais o nível de transcrição muda significativamente durante o curso da infecção. *Vermelho* indica um aumento na abundância de mRNA com relação à média *verde* indica um decréscimo. Os genes foram arranjados em ordem da parte superior para a inferior, de acordo com as fases relativas de sua ativação transcricional. Esta progressão ordenada regular da expressão gênica tem um paralelismo com a diferenciação morfológica do *Plasmodium* através dos estágios de anel, trofozoíto, esquizonte e merozoito, todos observados no interior do eritrócito em humanos infectados (ver Figura 24-10B, C, D) (Adaptada de Z. Bosdech et al., *PLoS Biol*. 1:E5, 2003. Com permissão da Public Library of Science.)

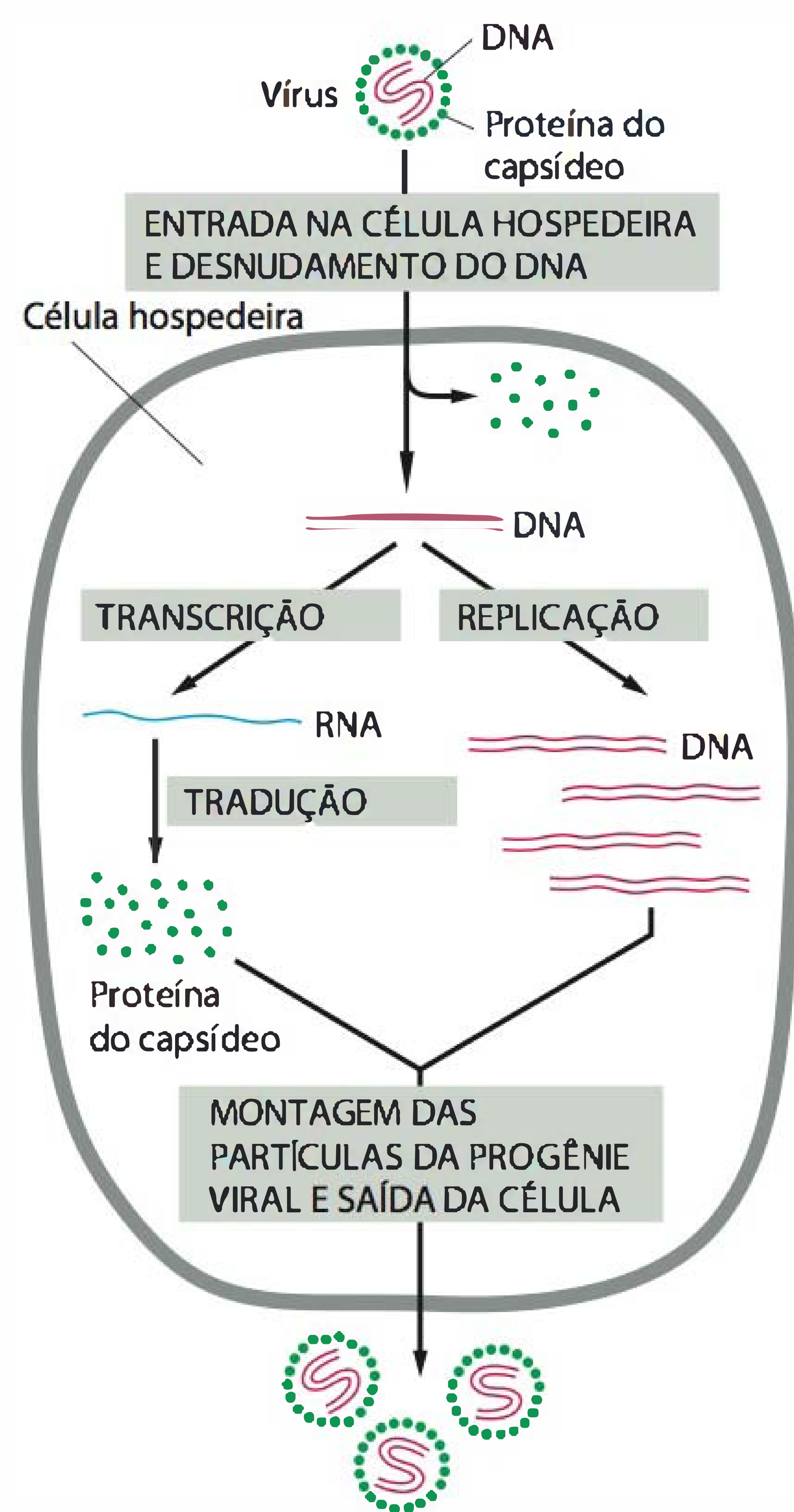


Figura 24-12 Ciclo simples de vida viral. O vírus hipotético mostrado consiste em uma molécula de DNA de fita dupla que codifica uma única proteína do capsídeo viral. Nenhum vírus conhecido é tão simples.

Os vírus utilizam a maquinaria da célula hospedeira em todos os aspectos de sua multiplicação

As bactérias, os fungos e os parasitas eucariotos são células. Mesmo quando são patógenos intracelulares, eles usam sua própria maquinaria de replicação, de transcrição e de tradução de DNA, provendo eles próprios seus recursos de energia metabólica. Os **vírus**, em contraste, são os supremos "caroneiros", carregando pouca informação sob a forma de ácido nucleico. A informação é totalmente replicada, empacotada e preservada pelas células hospedeiras (**Figura 24-12**). O vírus tem um genoma pequeno, constituído de um único tipo de ácido nucleico – ou DNA ou RNA – o qual, em ambos os casos, poderá ser de fita simples ou fita dupla. O genoma é empacotado em um envelope proteico, que em alguns vírus é por sua vez empacotado em um envelope lipídico.

Os vírus se replicam por meio de vários mecanismos. Em geral, a replicação envolve (1) desmonte da partícula infecciosa viral, (2) replicação do genoma viral, (3) síntese das proteínas virais pela maquinaria de tradução da célula hospedeira e (4) reorganização e montagem desses componentes, formando as novas partículas virais. Uma única partícula viral (*vírion*) que infecta uma única célula hospedeira pode produzir milhares de partículas novas nesta célula infectada. Essa prodigiosa multiplicação viral frequentemente é suficiente para provocar a morte da célula hospedeira: esta célula sofre rompimento (lise) e, assim, proporciona à progênie viral acesso às células adjacentes. Muitas das manifestações clínicas das infecções virais são os reflexos deste *efeito citolítico* dos vírus. Tanto as feridas formadas pelo vírus do *herpes simplex* quanto as lesões causadas pelo vírus da *varíola*, por exemplo, refletem a morte de células epidérmicas em uma região infectada da pele. Como discutido anteriormente, a morte de algumas células do hospedeiro é causada pela resposta imune do hospedeiro contra o vírus.

Os vírions existem sob uma extensa variedade de formas e de tamanhos e, diferente das formas de vida celulares, não é possível classificá-los sistematicamente por meio de suas relações em uma única árvore filogenética. Em razão de seu tamanho diminuto, já foi possível estabelecer as sequências genômicas completas de praticamente todos os vírus de importância clínica. Os vírions dos *poxvírus* estão entre os maiores, alcançando até 450 nm de comprimento, que é o tamanho de algumas bactérias pequenas. Seu genoma de DNA de fita dupla consiste em aproximadamente 270 mil pares de nucleotídeos. Na outra extremidade da escala, encontram-se os parvovírus, com menos de 20 nm de comprimento e um genoma de DNA de fita simples com menos de 5 mil nucleotídeos (**Figura 24-13**). A informação genética nos vírus pode ser transportada sob uma série de formas de ácidos nucleicos pouco comuns (**Figura 24-14**).

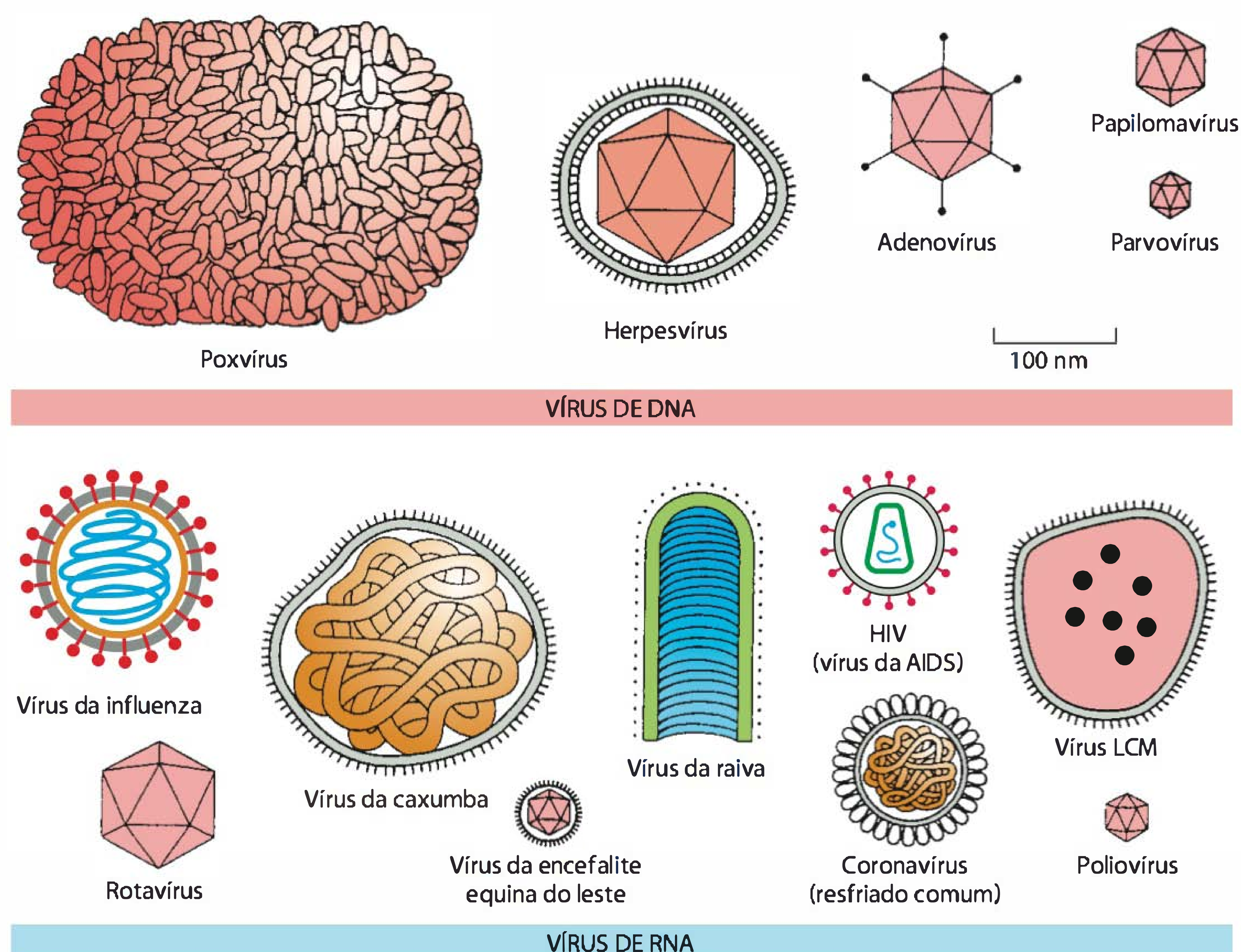


Figura 24-13 Exemplos de morfologia viral. Como pode ser observado, ambos os vírus de DNA e RNA apresentam grande diversidade de forma e de tamanho.

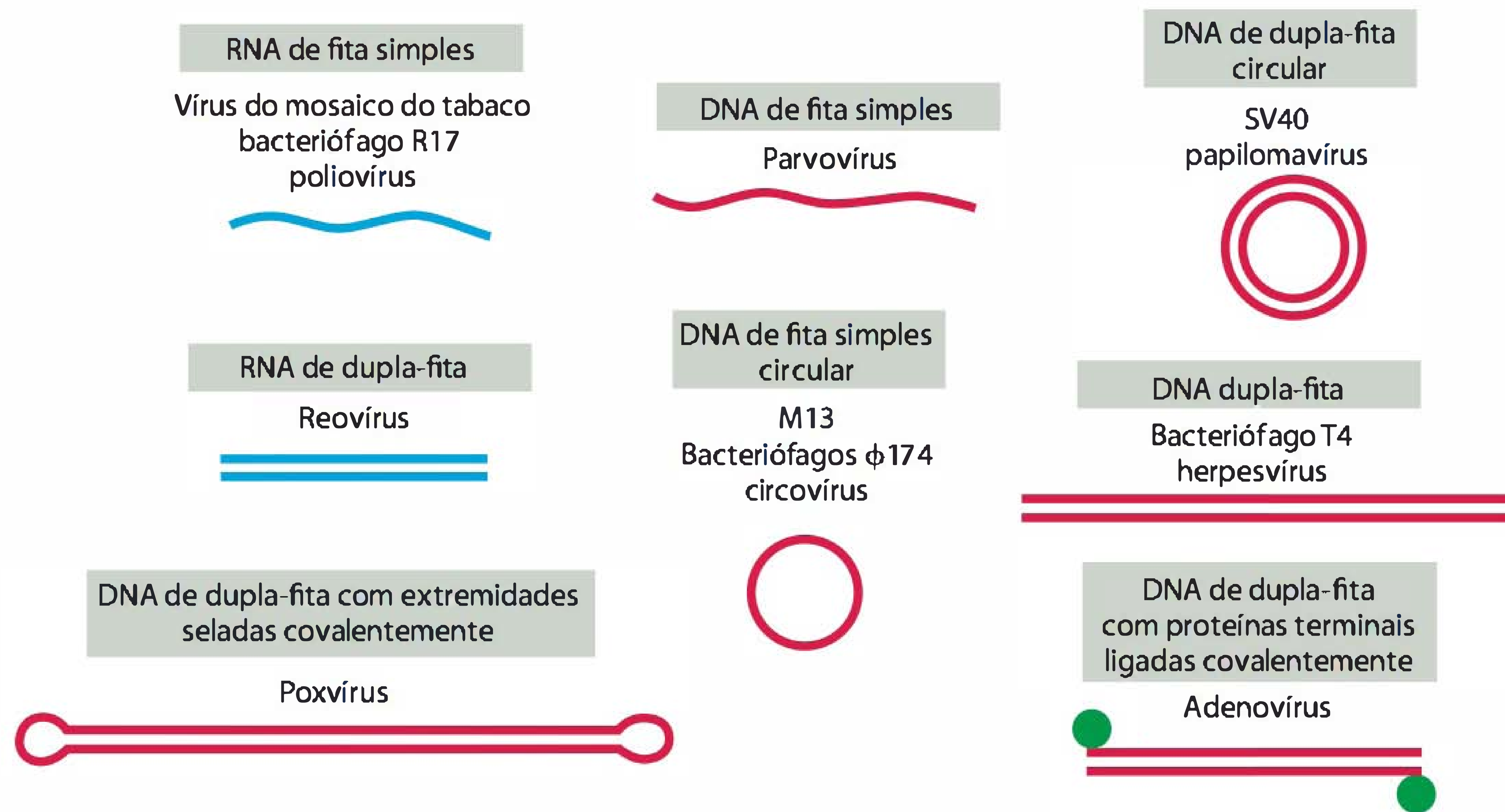


Figura 24-14 Esquemas de vários tipos de genomas virais. Os menores vírus contêm poucos genes e podem ter tanto genoma de RNA quanto de DNA. Os vírus maiores contêm centenas de genes e apresentam genoma de DNA dupla-fita. Extremidades peculiares (assim como formas circulares) são utilizadas para suplantar a dificuldade relativa à replicação dos nucleotídeos terminais da fita de DNA (apresentado no Capítulo 5).

O **capsídeo** que envolve o genoma viral é constituído por uma ou por várias proteínas, organizadas em camadas e padrões regularmente repetidos; o genoma viral junto com o capsídeo é chamado de **nucleocapsídeo**. Em *vírus envelopados*, o capsídeo será por sua vez envolvido em uma membrana constituída por uma bicamada lipídica que é adquirida durante o processo de brotamento a partir da membrana plasmática da célula hospedeira (**Figura 24-15**). Os *vírus não-envelopados* geralmente saem de uma célula infectada por meio de lise da mesma, ao passo que os vírus envelopados deixam a célula por brotamento, sem o rompimento da membrana plasmática e, consequentemente, sem provocar a morte da célula. Os vírus envelopados podem causar infecções crônicas que podem durar anos, frequentemente sem causar nenhum efeito deletério no hospedeiro.

Apesar dessa diversidade, todos os genomas virais contêm três tipos de proteínas: proteínas para a replicação do genoma, proteínas para o empacotamento do genoma e o direcionamento da infecção de novas células e proteínas que modificam a estrutura ou a função da célula hospedeira visando adequá-la à replicação dos vírions (**Figura 24-16**). Na segunda seção deste capítulo, abordaremos principalmente esta terceira classe de proteínas. Muitos

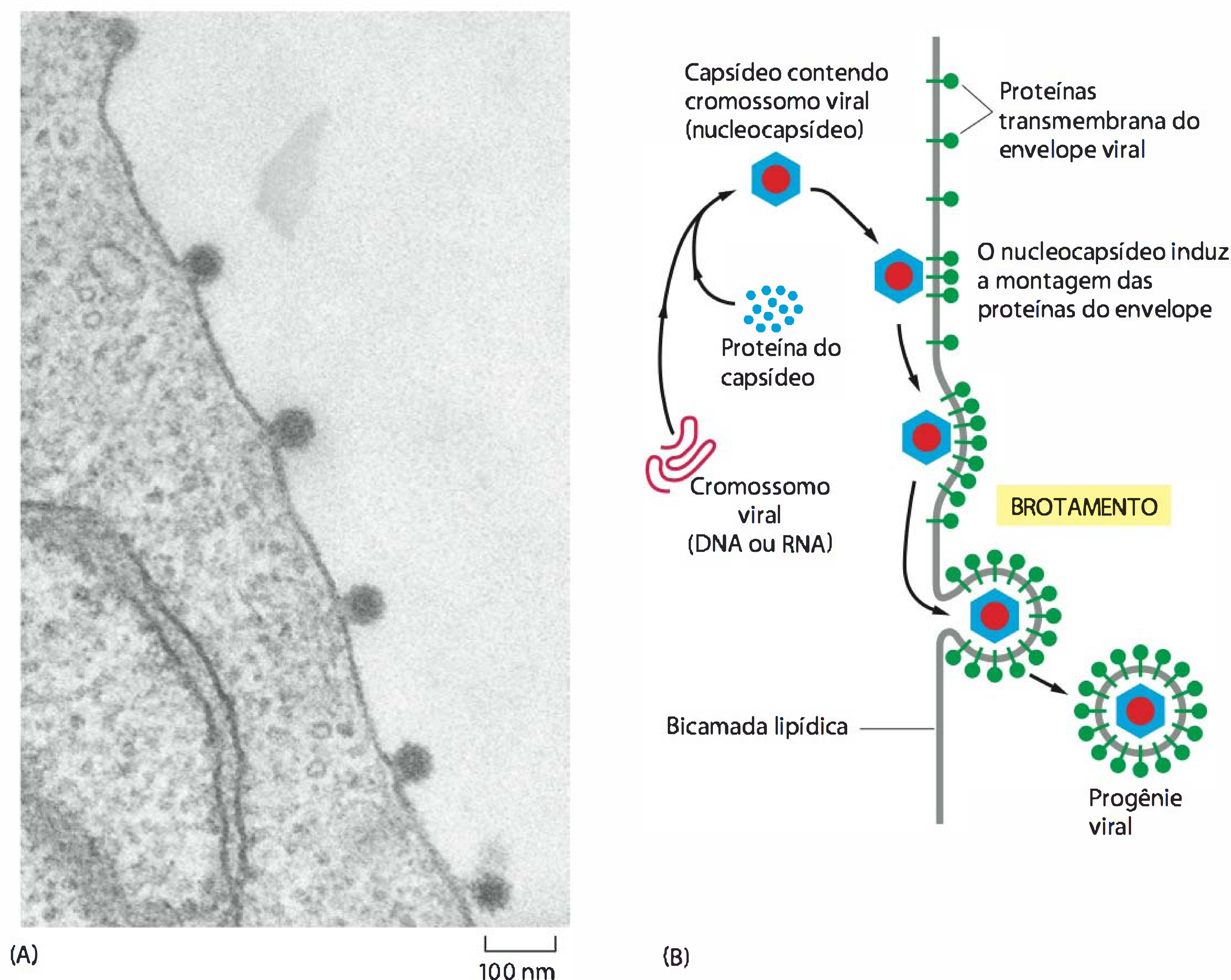


Figura 24-15 A aquisição de um envelope viral. (A) Micrografia eletrônica de uma célula animal a partir da qual estão brotando seis cópias de um vírus envelopado (*vírus da floresta Semlik*). (B) Esquema de montagem de envelope e processo de brotamento. A bicamada lipídica que envolve o capsídeo viral é derivada diretamente da membrana citoplasmática da célula hospedeira. Em contraste, as proteínas nesta bicamada lipídica (em *verde*) são codificadas pelo genoma viral. (A, cortesia de M. Olsen e G. Griffith.)

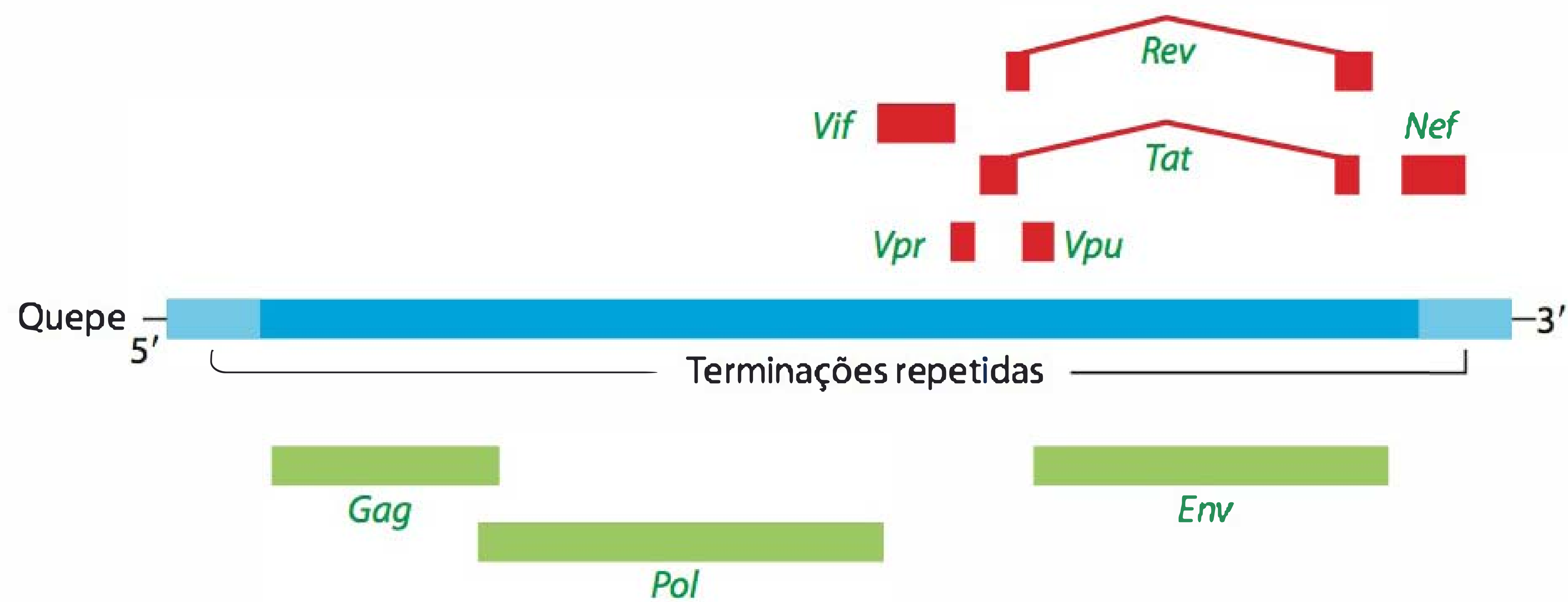


Figura 24-16 Um mapa do genoma do HIV. Este genoma retroviral consiste em aproximadamente 9 mil nucleotídeos e contém nove genes, cujas localizações estão mostradas em *verde* e em *vermelho*. Três destes genes (*verde*) são comuns para todos os retrovírus: *Gag* codifica proteínas do capsídeo, *Env* codifica proteínas do envelope e *Pol* codifica a transcriptase reversa (que copia o RNA em DNA) e as proteínas integrase (que inserem a cópia do DNA no genoma da célula hospedeira) (discutido no Capítulo 5). O genoma do HIV é incomumente complexo, porque, além dos três grandes genes (*verde*) normalmente necessários ao ciclo de vida viral, contém 6 genes pequenos (*vermelho*). Pelo menos alguns desses pequenos genes codificam proteínas que regulam a expressão gênica viral (*Tat* e *Rev* – ver Figura 7-103); outros codificam proteínas que alteram processos celulares do hospedeiro, como o tráfego de proteínas (*Vpu* e *Nef*) e a progressão do ciclo celular (*Vpr*). Como indicado pela linha *vermelha*, o *splicing* de RNA (utilizando o spliceossomo do hospedeiro) é necessário para a produção das proteínas Rev e Tat.

genomas virais codificam uma quarta classe de proteínas, que modulam ou subvertem os mecanismos de defesa imune normal do hospedeiro. Muitas delas são descritas na seção final deste capítulo.

Dado que os passos críticos da replicação viral são realizados pela maquinaria da célula hospedeira, a identificação de fármacos antivirais eficientes é bastante problemática. O antibiótico tetraciclina, por exemplo, bloqueia especificamente os ribossomos bacterianos, mas não é possível identificar um fármaco que bloqueie especificamente os ribossomos virais, pois os vírus utilizam os ribossomos da célula hospedeira para fazer suas proteínas. A melhor estratégia para a contenção de doenças virais é a prevenção por vacinação dos possíveis hospedeiros. Os programas de vacinação alcançaram enorme sucesso eliminando eficientemente a varíola de nosso planeta, e a erradicação da poliomielite é iminente (**Figura 24-17**).

Os príons são proteínas infecciosas

Toda a informação em sistemas biológicos é estruturalmente codificada. Estamos acostumados a pensar em informação biológica sob a forma de sequências de ácidos nucleicos (como na descrição dos genomas virais), mas a sequência por si só é um código, uma forma simplificada de descrever a estrutura do ácido nucleico. A replicação e a expressão da informação codificada sob a forma de DNA e RNA são estritamente dependentes da estrutura desses ácidos nucleicos e das interações com outras macromoléculas. A propagação da informação genética necessita primeiramente que esta esteja estocada em uma estrutura que possa ser duplicada a partir de precursores não-estruturados. As sequências de ácidos nucleicos são a solução mais simples e consistente que os organismos encontraram para o problema de fidelidade de replicação de uma estrutura.

Entretanto, os ácidos nucleicos não são a única solução para o problema. Os **príons** são agentes infecciosos que são replicados em um hospedeiro por meio da cópia de uma estrutura proteica aberrante. Os príons foram encontrados a partir de leveduras a moluscos marinhos até o homem e causam várias doenças neurodegenerativas em mamíferos. A mais estudada dessas infecções por príons é a *encæfalopatia espongiforme bovina* (BSE ou doença-da-vaca louca), que, eventualmente, pode infectar humanos que se alimentaram de partes infectadas de bovinos (**Figura 24-18**); também pode ser transmitida do homem para o homem via transfusão sanguínea. O isolamento do príon infeccioso que causa a doença *scrapie* em ovinos, seguido de anos de árduo trabalho laboratorial na caracterização de camundongos infectados pelo scrapie, finalmente demonstrou que a proteína é infecciosa por si mesma.

O mais intrigante é que não somente a proteína é produzida pelo hospedeiro, mas a sequência de aminoácidos é idêntica à da proteína normal. Além disso, é impossível diferenciar o príon da forma proteica normal com base nas modificações pós-tradução. A única

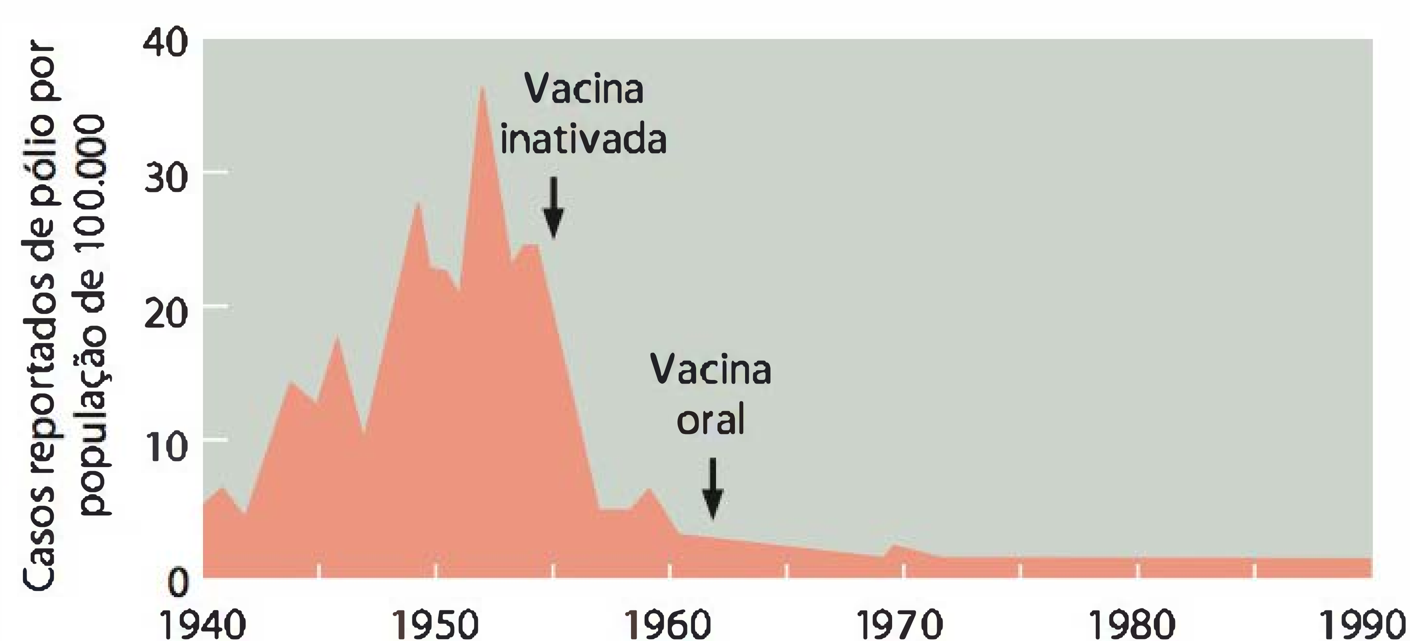


Figura 24-17 Erradicação de uma doença viral pela vacinação. O gráfico mostra o número de casos de poliomielite registrado por ano nos Estados Unidos. As *setas* indicam a introdução da vacina Salk (vírus inativado, administrado por injeção) e a vacina Sabin (vírus vivo atenuado, administrado oralmente).

diferença entre as duas formas parece ser a conformação tridimensional da estrutura. A proteína príon dobrada de maneira irregular tende a formar agregados, formando fibras helicoidais regulares denominadas *fibras amiloides*. As fibras amiloides crescem nas extremidades, como os filamentos de proteínas de citoesqueleto, discutido no Capítulo 16, exceto que as subunidades da proteína sofrem uma conversão estrutural do dobramento normal da proteína para o dobramento anormal à medida que se tornam parte do polímero amiloide (ver Figura 6-95). Em outras palavras, o príon dobrado de forma incorreta tem a notável capacidade de induzir a proteína normal a adotar sua conformação anômala e, assim, tornar-se infecciosa, que é o equivalente a uma replicação do príon no hospedeiro. Quando uma das fibrilas amiloides é fragmentada em pedaços menores, cada um deles torna-se uma semente para o processo de conversão em uma nova célula; então, o príon poderá se propagar assim como se replicar. Se ingerido por um hospedeiro suscetível, o príon inadequadamente dobrado poderá transmitir a infecção de organismo para organismo.

Não está estabelecido como a maioria das proteínas normais é capaz de encontrar um único e correto dobramento entre os bilhões de possibilidades conformacionais, sem que fiquem presas em intermediários semelhantes a "becos sem saída" (discutido nos Capítulos 3 e 6). Os príons são um bom exemplo de como a dobradura de proteínas pode tomar um caminho perigosamente errado. Contudo, por que as doenças priônicas são incomuns? Quais são os controles que determinam se uma proteína com dobradura incorreta vai se comportar como um príon, ou simplesmente ser redobrada ou degradada pela célula que a sintetizou? Não sabemos ainda as respostas para estas questões, e o estudo dos príons permanece uma área de intensa investigação.



Figura 24-18 Degeneração neural em uma infecção priônica. Esta micrografia mostra uma fatia do cérebro de uma pessoa que morreu de kuru. Kuru é uma doença humana causada por príon muito semelhante à encefalopatia espongiforme bovina (BSE), que era transmitida de pessoa à pessoa por rituais mortuários na Nova Guiné (Papua). Os grandes orifícios cheios de fluido são os locais de morte neuronal. Os orifícios característicos servem para designar a doença como *encefalopatia espongiforme*. (Cortesia de Gary Baumbach.)

Agentes causais das moléstias infecciosas estão ligados ao câncer, a doenças cardíacas e a outras doenças crônicas

Até aqui, consideramos os micro-organismos primariamente nos seus papéis de agentes causais de doenças infecto-contagiosas. Entretanto, está claro que em muitos casos as infecções bacterianas e virais podem contribuir para a patogênese de doenças importantes, com risco de vida e que não são classificadas normalmente como doenças infecciosas. Um exemplo óbvio é o câncer. O conceito de oncogene que define que certos genes alterados podem engatilhar a transformação celular e o desenvolvimento de tumores surgiu inicialmente dos estudos com o *vírus do sarcoma de Rous*, que causa uma forma de câncer (sarcomas) em galináceos. Um dos genes encontrados no vírus foi descoberto como codificador de uma tirosina-cinase hiper-ativa homóloga à tirosina-cinase Src do hospedeiro, que desde então tem sido implicada em muitos tipos de câncer.

Apesar de o vírus do sarcoma de Rous não causar cânceres em humanos, sabe-se agora que muitos cânceres humanos têm uma origem viral. O *papilomavírus humano*, por exemplo, que causa as verrugas genitais, também é responsável por mais de 90% dos cânceres da cérvice uterina. Em termos globais, o câncer de cérvice é o segundo mais comum em mulheres, com uma taxa de mortalidade de 40%. Nos países ricos, medidas preventivas intensas, como a realizacão do exame de Papanicolau, reduzaram a incidência e a severidade do câncer cervical, contudo ainda é muito comum nos países em desenvolvimento. O desenvolvimento recente de uma vacina contra as amostras do papilomavírus associadas ao câncer mais comum, traz esperança de que esta forma de câncer poderá ser amplamente prevenida em escala global por uma medida simples e econômica.

O *vírus de Epstein-Barr* (*EBV*, *Esptein-barr vírus*) fornece um exemplo mais complexo de um câncer humano ligado a uma infecção viral. A infecção por este vírus de DNA é tão comum que cerca de 90% dos adultos nos Estados Unidos acima dos quarenta anos possuem níveis detectáveis de anticorpos anti-EBV no sangue. O EBV prefere invadir as células B do sistema imune adaptativo, especialmente as células B de memória de vida longa (discutido no Capítulo 25). Em sua maioria, as pessoas infectadas quando crianças apresentam poucos sintomas e não percebem que foram infectadas, porém adolescentes e adultos jovens infectados pela primeira vez frequentemente desenvolvem *mononucleose infecciosa* (também chamada de *febre glandular*), uma doença severa semelhante à gripe que leva a febres altíssimas, inchaço doloroso dos linfonodos e fadiga que pode perdurar por vários meses. Após o desaparecimento dos sintomas, o EBV pode permanecer dormente na célula B pelo resto da vida, com o seu genoma sendo mantido como um plasmídeo extracromossômico no núcleo da célula B. Alguns dos produtos gênicos codificados pelo genoma do EBV inibem a apoptose e, dessa forma, presumivelmente ajudam a prevenir a eliminação do vírus do corpo humano. Assim, quando uma célula B adquire as chamadas mutações promotoras de

câncer, o mecanismo usual de eliminação das células pré-cancerosas por apoptose é inibido, e uma forma de câncer de células B chamada de linfoma de Burkitt se estabelece.

Em alguns casos, danos teciduais crônicos causados por infecções podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento do câncer no tecido infectado. A bactéria habitante do estômago *Helicobacter pylori* tem sido implicada como uma grande causa de cânceres ou úlceras estomacais, e os *vírus da hepatite* que causam infecções crônicas no fígado (hepatite crônica) estão associados a mais de 60% dos cânceres do fígado.

Ao lado do câncer, a outra maior causa de óbitos nos países industrializados é a doença cardiovascular, frequentemente associada à *aterosclerose*, o acúmulo de depósitos de gorduras nos vasos sanguíneos que podem bloquear o fluxo normal do sangue. A isquemia resultante tem consequências terríveis para o coração e para o cérebro. Uma característica marcante da aterosclerose precoce é o aparecimento, na parede dos vasos sanguíneos, de aglomerados de macrófagos de aparência anormal, chamados de células espumosas por estarem cheios de glóbulos de gordura engolfados. As células espumosas secretam citocinas que recrutam outras células brancas para a *placa aterosclerótica* em formação, que, por sua vez, acumula matriz extracelular. O contínuo acúmulo de células e matriz extracelular poderá gradualmente bloquear o fluxo sanguíneo, ou, alternativamente, a placa poderá ser liberada, causando um trombo, que agudamente bloqueia a circulação sanguínea; por outro lado, pedaços do trombo poderão se fragmentar e formar êmbolos que bloqueiam a passagem do sangue pelos vasos menores abaixo do trombo. Um fato interessante é que as células espumosas nas placas ateroscleróticas frequentemente contêm a bactéria patogênica *Chlamydia pneumoniae*, que comumente causa pneumonia em humanos (**Figura 24-19**). Numerosas linhas de evidência sugerem que a infecção pela *C. pneumoniae* é um fator de risco significativo para a aterosclerose em homens e modelos animais. O DNA de outras espécies bacterianas tem sido encontrado nas placas ateroscleróticas, incluindo bactérias comumente associadas a dentes e gengivas, como a *Porphyromonas gingivalis*. A conexão entre agentes infecciosos e aterosclerose é motivo de intensa pesquisa.

Em adição à contribuição para doenças de risco como o câncer e doenças cardiovasculares, agentes infecciosos também podem ter um papel importante nas doenças crônicas, apesar de ser difícil dizer se uma infecção é a causa das doenças crônicas ou é a consequência das doenças. Um exemplo claro de uma causa infecciosa para uma doença crônica é a *doença de Lyme*, uma infecção bacteriana causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. A infecção é adquirida pela picada de carrapato e pode causar uma artrite crônica e dolorosa se não for detectada e tratada imediatamente com antibióticos. Muitas outras infecções bacterianas, particularmente infecções por cocos gram-positivos e por pequenas bactérias desprovidas de parede celular, chamadas de *Mycoplasma*, poderão engatilhar uma resposta imune levando à artrite. Em algumas pessoas, *Mycoplasma, Chlamydia pneumoniae*, ou ambos, estão associados à asma crônica. À medida que aprendemos mais sobre a interação entre patógenos e o corpo humano, é bem provável que mais e mais doenças crônicas sejam encontradas em associação a um agente infeccioso. Como o caso da úlcera péptica, a cura da infecção cura a doença, ou pelo menos alivia os sintomas dolorosos.

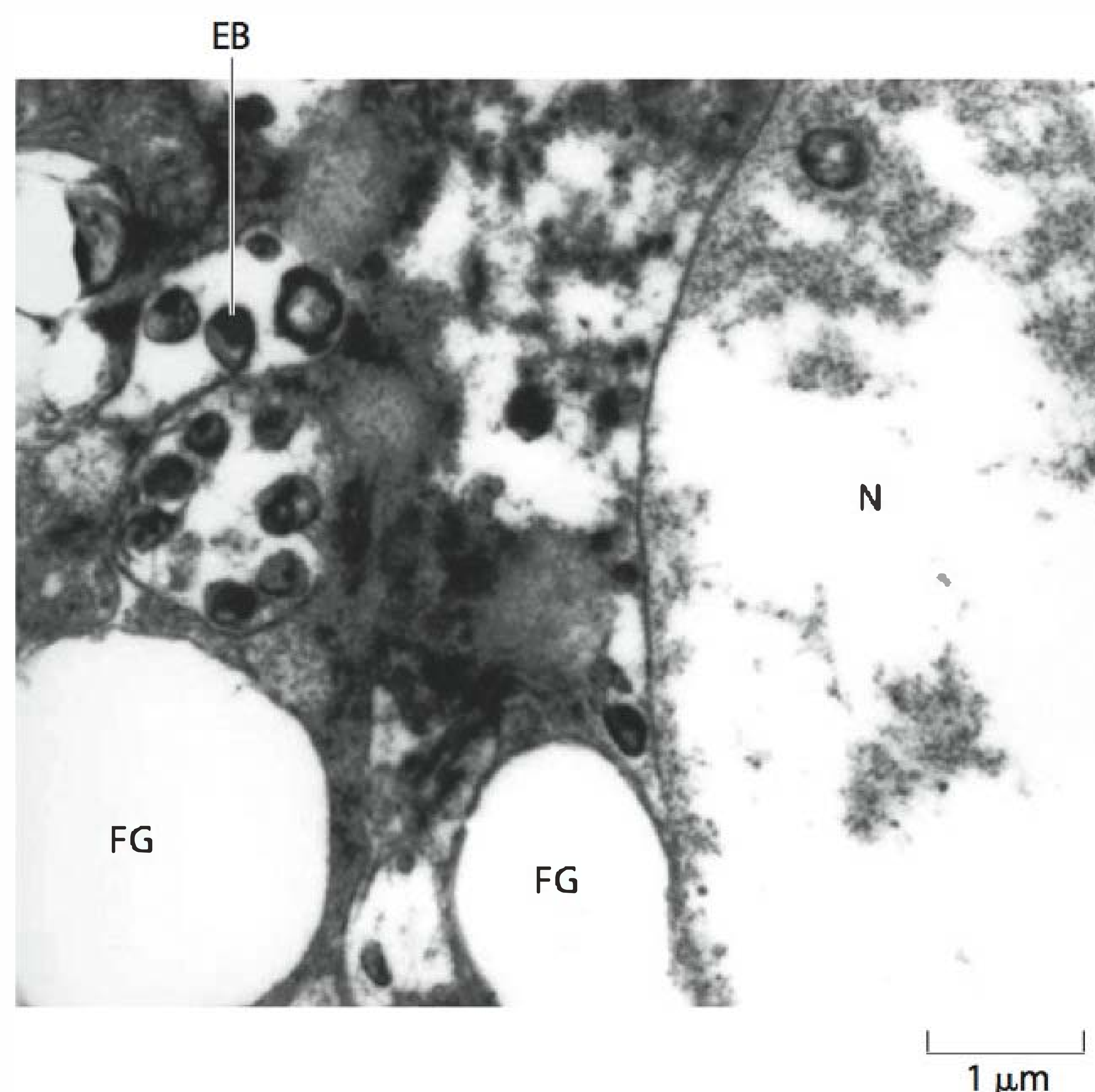


Figura 24-19 ***Chlamydia pneumoniae* dentro de um macrófago espumoso em uma placa aterosclerótica.** Os marcadores nesta micrografia eletrônica indicam: EB, corpo elementar (bactéria); FG (glóbulo de gordura); N, núcleo do macrófago. (De L. A. Campbell e C. C. Kuo, *Nat. Rev. Microbiol.* 2:23-32, 2004. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

Resumo

As doenças infecciosas são causadas por patógenos, que incluem bactérias, fungos, protozoários, vermes, vírus e mesmo proteínas infecciosas denominadas príons. Todos os patógenos devem ter mecanismos para penetrar seus hospedeiros e evitar sua destruição imediata pelo sistema imune do hospedeiro. A maioria das bactérias não é patogênica. Aquelas que o são possuem genes específicos de virulência que medeiam interações com o hospedeiro e provocam respostas particulares das células hospedeiras, promovendo sua replicação e disseminação. Os fungos patogênicos, os protozoários e os outros parasitas eucarióticos, tipicamente, passam por uma série de diferentes estágios ao longo do curso da infecção; a capacidade de passar de um estágio para outro geralmente é necessária para que o parasita seja capaz de sobreviver em um hospedeiro e provocar a doença. Em alguns casos, como na malária, os parasitas devem passar sequencialmente por diversas espécies para completar seu ciclo de vida. Diferentemente das bactérias e dos parasitas eucarióticos, os vírus não possuem nem metabolismo próprio, nem capacidade intrínseca de produzir as proteínas codificadas pelos seus genomas de DNA ou de RNA. Eles se apoiam totalmente na subversão da maquinaria das células hospedeiras para produzir suas proteínas e replicar seus próprios genomas. Os príons, os menores e mais simples dos agentes infecciosos, não contêm ácidos nucleicos; em vez disso, eles são proteínas pouco comuns que sofreram uma estruturação conformacional anormal e que se replicam catalisando o dobramento aberrante de proteínas normais do hospedeiro que possuem a mesma sequência primária de aminoácidos.

BIOLOGIA CELULAR DA INFECÇÃO

Os mecanismos que os patógenos usam para causar doenças são tão diversos quanto os próprios patógenos. Não obstante, todos os patógenos realizam tarefas comuns: eles devem colonizar o hospedeiro, alcançar um nicho apropriado, evitar as defesas do hospedeiro, replicar, e sair de um hospedeiro infectado para infectar um hospedeiro sadio. Nesta seção, examinaremos as estratégias comuns que muitos patógenos usam para realizar tais tarefas.

Os patógenos atravessam barreiras protetoras para colonizar o hospedeiro

O primeiro passo de uma infecção é a colonização do hospedeiro pelo patógeno. A maior parte das regiões do corpo humano está bem-protegida do ambiente por uma cobertura espessa e bastante resistente de pele. As barreiras protetoras em alguns outros tecidos humanos (olhos, narinas e trato respiratório, boca e trato digestivo, trato urinário e trato genital feminino) são menos resistentes. Por exemplo, nos pulmões e no intestino delgado, onde o oxigênio e os nutrientes são absorvidos do ambiente, respectivamente, a barreira é uma simples monocamada de células epiteliais.

A pele e as outras barreiras epiteliais de superfície em geral encontram-se densamente colonizadas pela flora normal. Algumas bactérias e fungos patogênicos também colonizam essas superfícies na tentativa de substituir a flora normal, mas a maioria dos patógenos (assim como todos os vírus) evita essa competição atravessando as barreiras para ganhar acesso a nichos desocupados no interior do hospedeiro.

As lesões na barreira epitelial, inclusive na pele, permitem o acesso dos patógenos diretamente aos nichos. Esta via de entrada não requer muita especialização por parte do patógeno para ser utilizada. Mais do que isso, muitos membros da flora normal podem causar sérias doenças se penetrarem os ferimentos. As bactérias anaeróbias do gênero *Bacteroides*, por exemplo, estão presentes como flora inócua em alta densidade no intestino grosso, mas podem causar peritonites graves se penetrarem a cavidade peritoneal pela perfuração do intestino causada por traumatismo, por cirurgia ou por infecções da parede intestinal. Os *Staphylococcus* presentes na pele e no nariz, ou o *Streptococcus* da garganta ou da boca, também são responsáveis por muitas infecções sérias resultantes de quebras das barreiras epiteliais.

Os patógenos declarados, no entanto, não necessitam esperar que ocorra uma lesão no momento adequado para que acessem o hospedeiro. Um mecanismo particularmente eficiente para que o patógeno atravesse a pele é "pegar uma carona" na saliva da picada de um artrópode. Muitos insetos e carrapatos alimentam-se pela sucção de sangue, e um grupo diversificado de bactérias, vírus e protozoários desenvolveu a capacidade de sobrevivência nos artrópodes de modo a utilizá-los como *vetores* de disseminação de um mamífero hospedeiro para outro. Como discutido anteriormente, o protozoário *Plasmodium*, que causa a malária,

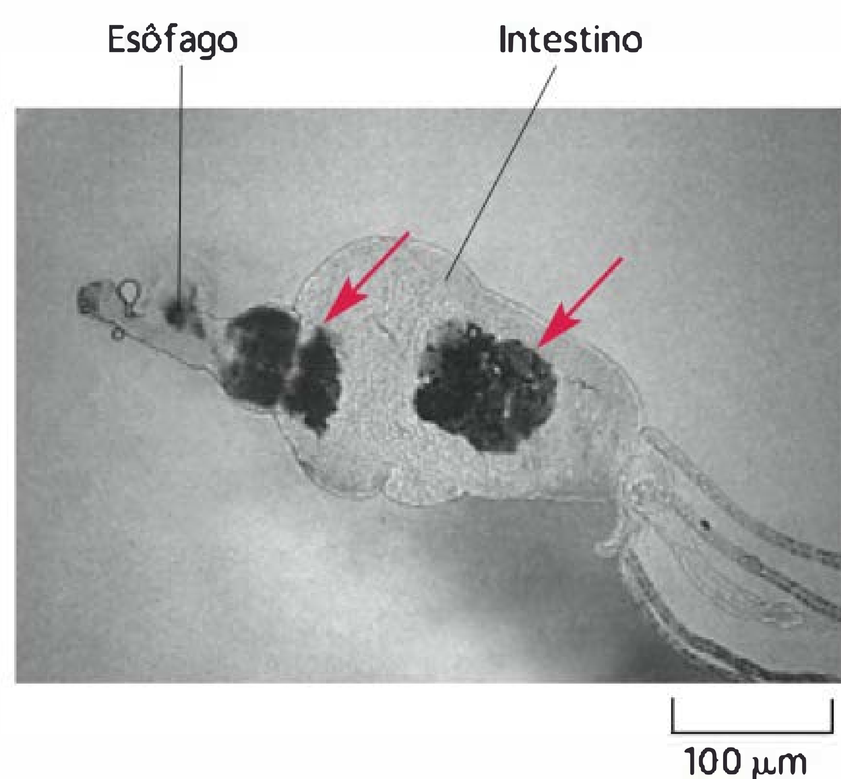


Figura 24-20 A bactéria da peste no interior de uma pulga. Esta micrografia mostra o trato digestivo dissecado de uma pulga que se alimentou há aproximadamente duas semanas do sangue de um animal infectado pela bactéria da peste, *Yersinia pestis*. A bactéria se multiplicou no intestino da pulga para produzir grandes agregados coesivos, indicados pelas *setas vermelhas*; a massa bacteriana, à esquerda, está impedindo a passagem entre o esôfago e o intestino. Este tipo de bloqueio evita que a pulga realize a digestão do sangue ingerido, fazendo com que ela pique mais frequentemente, transmitindo a infecção. (De B. J. Hinnebusch, E. R. Fischer e T. G. Schawann, *J.Infect. Dis* 178:1406-1415, 1998. Com permissão de The University of Chicago Press.)

tem seu ciclo de vida e desenvolvimento em vários estágios, incluindo alguns que são especializados para sobreviver em humanos e outros especializados para sobreviver no mosquito (ver a Figura 24-10). Entre os vírus disseminados pelas picadas de insetos estão os agentes causais de diferentes tipos de febre hemorrágica, incluídas aqui a febre amarela e a dengue, bem como os agentes de muitos tipos de encefalites virais (inflamações do cérebro). Todos esses vírus desenvolveram a habilidade de replicar tanto em células de insetos quanto em células de mamíferos, pois isso era necessário para que utilizassem um inseto como vetor. Os vírus que se desenvolvem exclusivamente no sangue e não são capazes de replicação nos insetos, como é o caso HIV, raramente, ou nunca, são transmitidos do inseto para o ser humano.

A transmissão eficiente do patógeno via um inseto vetor necessita que um único inseto, individualmente, alimente-se do sangue de numerosos mamíferos hospedeiros. Em poucos e surpreendentes casos, o patógeno parece ser capaz de alterar o comportamento do inseto de forma a tornar a transmissão mais provável. Como a maioria dos animais, a mosca tsé-tsé (cujas picadas disseminam o protozoário parasita *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono na África) para de se alimentar quando está saciada. Contudo as moscas tsé-tsé, que carregam tripanossomos picam com mais frequência e ingerem muito mais sangue do que aquelas que não estão infectadas. A presença do tripanossomo desregula o funcionamento de mecanorreceptores do inseto que medem a pressão do fluxo de sangue pela garganta para acessar a quantidade de conteúdo do estômago, enganando efetivamente a mosca, que acredita ainda estar com fome. A bactéria *Yersinia pestis*, que causa a peste bubônica, usa um mecanismo diferente para assegurar que a pulga que a transporta picará repetidas vezes: ela multiplica-se no intestino da pulga formando agregados que ocasionalmente aumentam de tamanho e bloqueiam fisicamente o trato digestivo. Desse modo, o inseto não será capaz de alimentar-se normalmente e começará a definhar. Ao longo das repetidas tentativas de satisfazer seu apetite, algumas bactérias do intestino serão descarregadas na região da picada, transmitindo a peste para novos hospedeiros (**Figura 24-20**).

Os patógenos que colonizam o epitélio evitam ser eliminados pelo hospedeiro

"Pegar uma carona" em um proboscídeo de inseto para atravessar a pele é apenas uma das estratégias que os patógenos utilizam para atravessar a barreira inicial das defesas do hospedeiro. Apesar de algumas zonas de barreiras como a pele e o revestimento da boca e do intestino grosso serem densamente habitadas pela flora normal, outras, incluindo o revestimento dos pulmões, do intestino delgado e da bexiga, normalmente são mantidas praticamente estéreis, apesar de possuírem um acesso relativamente direto ao ambiente. Como o epitélio nessas regiões resiste ativamente à colonização bacteriana? Como discutido no Capítulo 22, o epitélio respiratório está coberto por uma camada de muco protetor, e o batimento coordenado dos cílios prende as bactérias e os resíduos e varre o muco, levando-o para fora do pulmão. O epitélio de revestimento da bexiga e do trato gastrintestinal superior também apresenta uma espessa camada de muco, sendo esses órgãos constantemente lavados pela micção e pelo peristaltismo, respectivamente, o que elimina os micróbios indesejáveis. As bactérias patogênicas e parasitas que infectam essas superfícies epiteliais possuem mecanismos específicos para escapar dos mecanismos de limpeza do hospedeiro. Os organismos que infectam o trato urinário, por exemplo, resistem à ação de lavagem pela urina por meio de forte adesão ao epitélio da bexiga via **adesinas** específicas, que são proteínas ou complexos proteicos que reconhecem e se ligam a moléculas da superfície das células do hospedeiro. Um importante grupo de adesinas em linhagens de *E. coli* uropatogênicas é composto pelos membros dos *pili P* que ajudam a bactéria a se aderir nas células epiteliais dos rins. Estas projeções da superfície da bactéria podem medir vários micrômetros de comprimento, sendo, assim, capazes de atravessar a espessa camada de muco protetor (ver Figura 24-4D). Na extremidade de cada pilo existe uma proteína que se liga firmemente a um determinado glicolipídeo associado a um dissacarídeo encontrado na superfície das células renais. Cepas de *E. coli* que infectam a bexiga expressam um segundo tipo de pilo que permite uma adesão às células epiteliais da bexiga. A especificidade de adesão das adesinas da extremidade dos dois tipos de pilo é responsável pela colonização bacteriana em diferentes partes do trato urinário (**Figura 24-21**). A especificidade das adesinas também restringe o leque de hospedeiros a estas e a outras bactérias patogênicas.

Um dos mais difíceis órgãos a ser colonizado por um micro-organismo é o estômago. Além da lavagem por peristaltismo e da proteção de uma espessa camada de muco, o estômago está repleto de ácido (pH médio em torno de dois). Esse ambiente extremo é letal

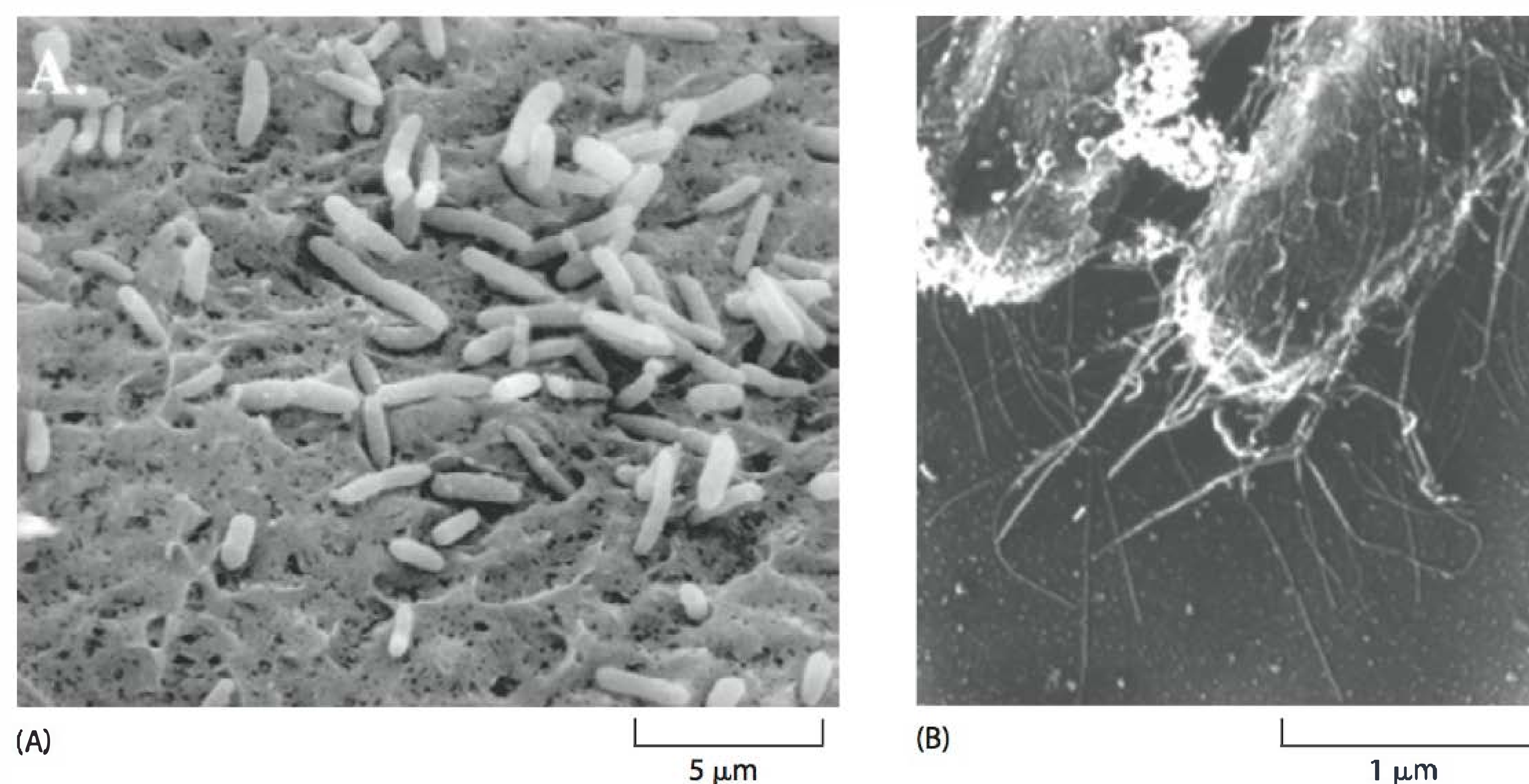


Figura 24-21 ***E. coli*** **uropatogênica na bexiga infectada de um camundongo.** (A) Micrografia eletrônica de varredura de *E. coli* uropatogênica, um agente comum de infecções renais e da bexiga, ligada à superfície de células epiteliais que revestem a bexiga de um camundongo infectado. (B) Um aumento mostrando o pilo na superfície. (A, de G. E. Soto e S. J. Hultgren, *J. Bact.* 181:1059-1071, 1999; B, cortesia de D. G. Thanassi e S. J. Hultgren, *Meth. Comp. Meth. Enzym.* 20:111.126, 2000. Com permissão de Academic Press.)

para a maioria das bactérias ingeridas junto com a alimentação. No entanto, ele é passível de colonização pela resistente e audaz bactéria *Helicobacter pylori*, a qual foi recentemente reconhecida como a principal causadora de úlceras estomacais e, possivelmente, de câncer do estômago. Notável é sua habilidade de persistir por toda a vida como um comensal inofensivo na maioria dos hospedeiros. Apesar dos antigos tratamentos para úlcera (fármacos redutores de acidez e dieta leve) ainda serem usados para reduzir a inflamação, um tratamento curto e relativamente barato com antibióticos pode efetivamente curar um paciente acometido por úlceras recorrentes de estômago. A hipótese de que as úlceras de estômago podiam ser causadas por infecções bacterianas persistentes foi encarada inicialmente com bastante ceticismo. A prova foi finalmente dada por um jovem médico australiano que fez a descoberta inicial: ele bebeu um frasco de cultura pura de *H. pylori* e desenvolveu uma úlcera típica. Um mecanismo utilizado por *H. pylori* para sobreviver no estômago é a produção da enzima *urease*, que converte ureia em amônia e em dióxido de carbono; desse modo, a bactéria envolve-se em uma camada de amônia, a qual neutraliza a acidez do estômago em torno dela. A bactéria também expressa pelo menos cinco diferentes tipos de adesinas, as quais possibilitam sua adesão ao epitélio do estômago e também produzem várias citotoxinas que destroem as células epiteliais do estômago, gerando dolorosas úlceras. A inflamação crônica resultante provoca proliferação celular e, desse modo, predispõe o indivíduo infectado ao desenvolvimento de câncer de estômago.

Um exemplo mais extremo de colonização ativa é dado pela *Bordetella pertussis*, a bactéria que causa a coqueluche. O primeiro passo na infecção por *B. pertussis* é a colonização do epitélio respiratório. A bactéria escapa do mecanismo normal de limpeza (o *elevador mucociliar* descrito no Capítulo 23) por meio de forte ligação à superfície das células ciliadas que recobrem o trato respiratório seguido de multiplicação nestas células. A *B. pertussis* expressa pelo menos quatro tipos de adesinas que se ligam fortemente a glicolipídeos característicos das células ciliadas. A bactéria aderente produz uma série de toxinas que eventualmente provocarão a morte da célula ciliada, comprometendo a habilidade do hospedeiro de eliminar a infecção. A mais conhecida delas é a *toxina pertussis*, a qual – assim como a toxina da cólera – é uma enzima de ADP-ribosilação. Ela ADP-ribosila a subunidade da proteína G tipo G_i, inibindo a proteína G de suprimir a atividade da adenilil-ciclase da célula hospedeira e a superprodução do AMP cíclico (discutido no Capítulo 15). A toxina também interfere com a via quimiotática que os neutrófilos usam para caçar e eliminar as bactérias invasoras. (ver Figura 16-101). Não satisfeita com isso, a *B. pertussis* também produz uma adenilil-ciclase própria, a qual é inativa a menos que se ligue à proteína eucariótica calmodulina, uma proteína ligadora de Ca^{2+} no citoplasma da célula hospedeira. Apesar de tanto a *B. pertussis* quanto a *V. cholerae* apresentarem efeito similar de aumentar os níveis de cAMP drasticamente nas células hospedeiras às quais elas se aderem, os sintomas das doenças são bastante diferentes devido às diferentes regiões de colonização no hospedeiro: *B. pertussis* coloniza o trato respiratório e causa a tosse convulsa, enquanto *V. cholerae* coloniza o intestino e causa a diarreia aquosa.

Nem todos os exemplos de colonização específica necessitam que a bactéria expresse adesinas que se ligam a proteínas ou a glicolipídeos da célula hospedeira. A *E. coli* enteropatogênica que causa diarreia em crianças utiliza, em vez de adesinas, o sistema de secreção tipo III (ver a Figura 24-8) para introduzir na célula hospedeira o receptor proteico por ela

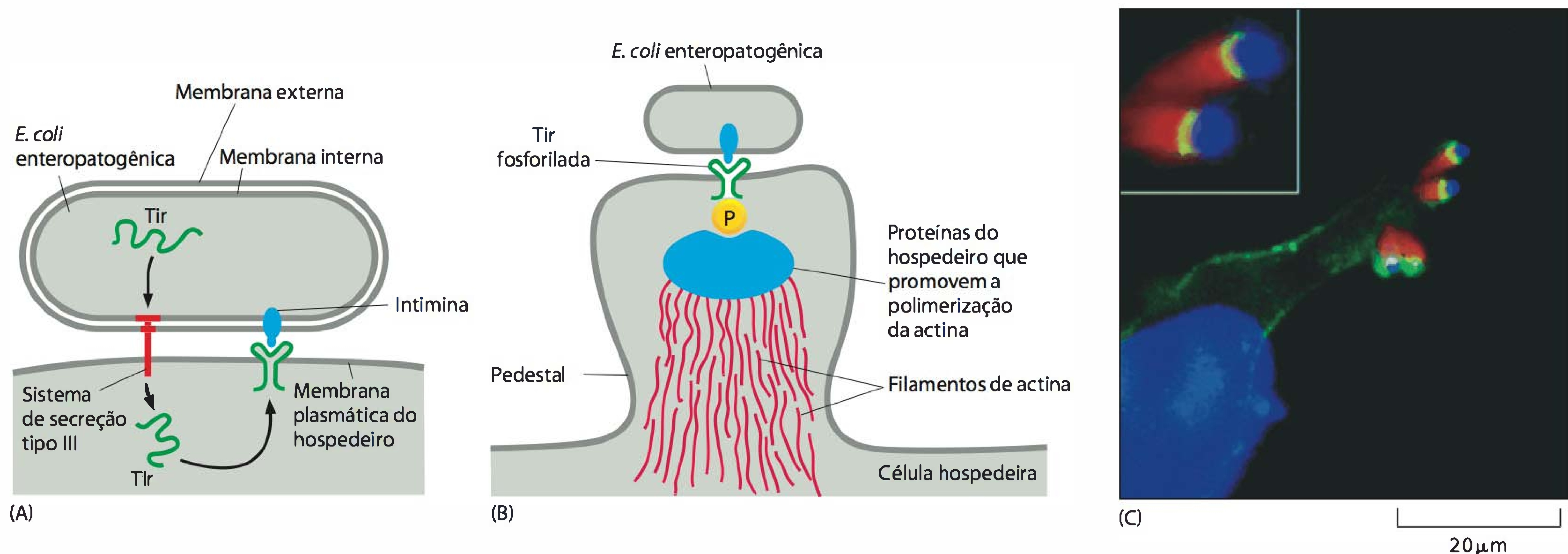


Figura 24-22 Interação da *E. coli* enteropatogênica (EPEC *enteropathogenic E. coli*) com células hospedeiras do intestino. (A) Quando a EPEC entra em contato com as células do revestimento epitelial do intestino humano, ela injeta a proteína bacteriana Tir no interior das células hospedeiras, utilizando o sistema de secreção tipo III. A Tir será então inserida na membrana citoplasmática da célula hospedeira, onde funcionará como um receptor para a adesina bacteriana intimina. (B) O domínio intracelular de Tir é fosforilado em um resíduo tirosina pela enzima tirosina-cinase da célula hospedeira. A Tir fosforilada recruta várias proteínas da célula hospedeira, que engatilha a polimerização de actina. Consequentemente, um feixe de filamentos de actina é montado abaixo da bactéria, formando-se um pedestal de actina. (C) EPEC em um pedestal. Nesta micrografia de fluorescência, o DNA de EPEC e o da célula hospedeira estão corados em *azul*; a proteína Tir está corada em *verde*, e os filamentos de actina da célula hospedeira estão corados em *vermelho*. O quadro em destaque mostra um aumento de duas bactérias em pedestais. (C, de D. Goosney et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16:173-189, 2000. Com permissão de Annual Reviews.)

produzido (denominado Tir) (**Figura 24-22**A). Após a inserção de Tir na membrana da célula hospedeira, uma proteína de superfície da bactéria liga-se ao domínio extracelular de Tir, engatilhando uma espetacular série de eventos no interior da célula hospedeira. Inicialmente, os resíduos de tirosina da proteína receptora Tir são fosforilados por uma proteína tirosina-cinase hospedeira, o que não é comum, porque as bactérias geralmente não fosforilam seus resíduos de tirosina. A seguir, é provável que a proteína Tir fosforilada recrute um membro da família Rho de pequenas GTPases, o qual promove a polimerização de actina por meio de uma série de passos intermediários (discutidos no Capítulo 16). A actina polimerizada forma uma protuberância característica na superfície celular, denominada *pedestal*, que empurra a bactéria fortemente aderida a aproximadamente 10 μm da superfície da célula hospedeira (Figura 24-22B, C).

Esses exemplos de colonização bacteriana ilustram a importância da comunicação entre o patógeno e o hospedeiro durante o processo de infecção e sua evolução. Os organismos patogênicos adquiriram genes que codificam proteínas que interagem especificamente com moléculas particulares das células hospedeiras. Em alguns casos, como o da adenilil-ciclase de *B. pertussis*, um ancestral do patógeno deve ter adquirido o gene da ciclase de seu hospedeiro, ao passo que em outros, como em Tir, mutações ao acaso podem ter dado origem às sequências em proteínas que são reconhecidas pela proteína eucariótica tirosina-cinase.

Os patógenos intracelulares possuem mecanismos tanto para a penetração quanto para a saída das células hospedeiras

Muitos patógenos, incluindo *V. cholerae* e *B. pertussis*, infectam seus hospedeiros sem penetrar as células hospedeiras e são conhecidos como *patógenos extracelulares*. Outros, entretanto, incluindo todos os vírus e muitas bactérias e protozoários, são **patógenos intracelulares**. Seu nicho preferido para replicação e sobrevivência é o interior do citosol ou os compartimentos intracelulares de determinadas células hospedeiras. Esta estratégia apresenta uma série de vantagens. Os patógenos não estão acessíveis aos *anticorpos* (discutidos no Capítulo 25) e não são alvos fáceis para as células fagocíticas (discutido adiante); assim, eles são banhados em uma fonte rica em muitos açúcares, aminoácidos e outros nutrientes presentes no citoplasma da célula hospedeira. Esse estilo de vida, no entanto, necessita que o patógeno desenvolva mecanismos para a penetração na célula hospedeira, para a localização do nicho subcelular adequado, onde ele poderá replicar, bem como de mecanismos de

saída da célula infectada para disseminação da infecção. No restante desta seção, consideraremos algumas das diversas maneiras utilizadas por patógenos intracelulares específicos para modificar a biologia da célula hospedeira e satisfazer suas necessidades.

Partículas virais ligam-se a moléculas apresentadas na superfície da célula hospedeira

O primeiro passo para qualquer patógeno intracelular é a adesão à superfície da célula hospedeira-alvo. O vírus realiza essa ligação por meio da associação de uma proteína da superfície viral com um receptor específico da superfície da célula hospedeira. Obviamente, nenhuma célula hospedeira desenvolveu um receptor com o objetivo único de servir de base de ancoramento para um patógeno; todos os receptores realizam outras funções. O primeiro desses "receptores virais" a ser identificado foi uma proteína de superfície de *E. coli* que permite a ligação do bacteriófago lambda à bactéria. Sua função normal é a de proteína de transporte responsável pela internalização da maltose. Os receptores não precisam ser proteínas, no entanto; o vírus do herpes simples, por exemplo, liga-se ao proteoglicano sulfato de heparana através de proteínas específicas da membrana viral.

Os vírus que infectam células animais geralmente utilizam moléculas receptoras da superfície celular que são extremamente abundantes (como os oligossacarídeos que contêm ácido siálico, os quais são utilizados pelo vírus influenza) ou são encontradas exclusivamente naquelas células em que o vírus pode se replicar (como é o caso do uso do receptor de fator de crescimento neuronal, o receptor nicotínico de acetilcolina ou a proteína de adesão célula/célula N-CAM, todos usados pelo vírus da raiva, que infecta especificamente os neurônios). Frequentemente, um único tipo de receptor é utilizado por uma gama de vírus, e alguns vírus diferentes podem utilizar receptores diferentes. Dessa maneira, vírus diferentes que infectam o mesmo tipo de célula devem usar receptores diferentes. Por exemplo, membros de pelo menos seis famílias de vírus que preferencialmente replicam em células hepáticas (hepatócitos) causam hepatite. Já foram identificados receptores para quatro vírus da hepatite, e todos eles diferem uns dos outros. Muitos vírions se ligam a receptores expressos nas células do sistema imune. Embora pareça paradoxal, como se espera, que a ativação de uma resposta imune não aumente a chance de sobrevivência viral, a invasão de uma célula do sistema imune poderá ser uma maneira de viajar pelo corpo para alcançar um órgão linfoide, que é repleto de outras células do sistema imune.

Frequentemente, os vírus necessitam tanto de um receptor principal quanto de um correceptor secundário para que ocorra uma ligação eficiente e uma penetração na célula hospedeira. Um exemplo importante é o vírus da AIDS, o HIV. O seu receptor principal é a molécula CD4, uma proteína da superfície celular de células T auxiliares e macrófagos que está envolvida no reconhecimento imune (discutido no Capítulo 25). A penetração do vírus requer a presença de um correceptor, o CCR5 (um receptor de β-quimiocinas) ou o CXCR4 (um receptor de α-quimiocinas), dependendo da variante específica do vírus (**Figura 24-23**). Os macrófagos são suscetíveis apenas às variantes de HIV que utilizam o CCR5 para entrada, ao passo que as células T são mais eficientemente infectadas por variantes que utilizam o CXCR4. Os vírus encontrados nos primeiros meses após uma infecção com HIV quase que invariavelmente necessitam do CCR5, o que potencialmente explica por que os indivíduos que carregam um

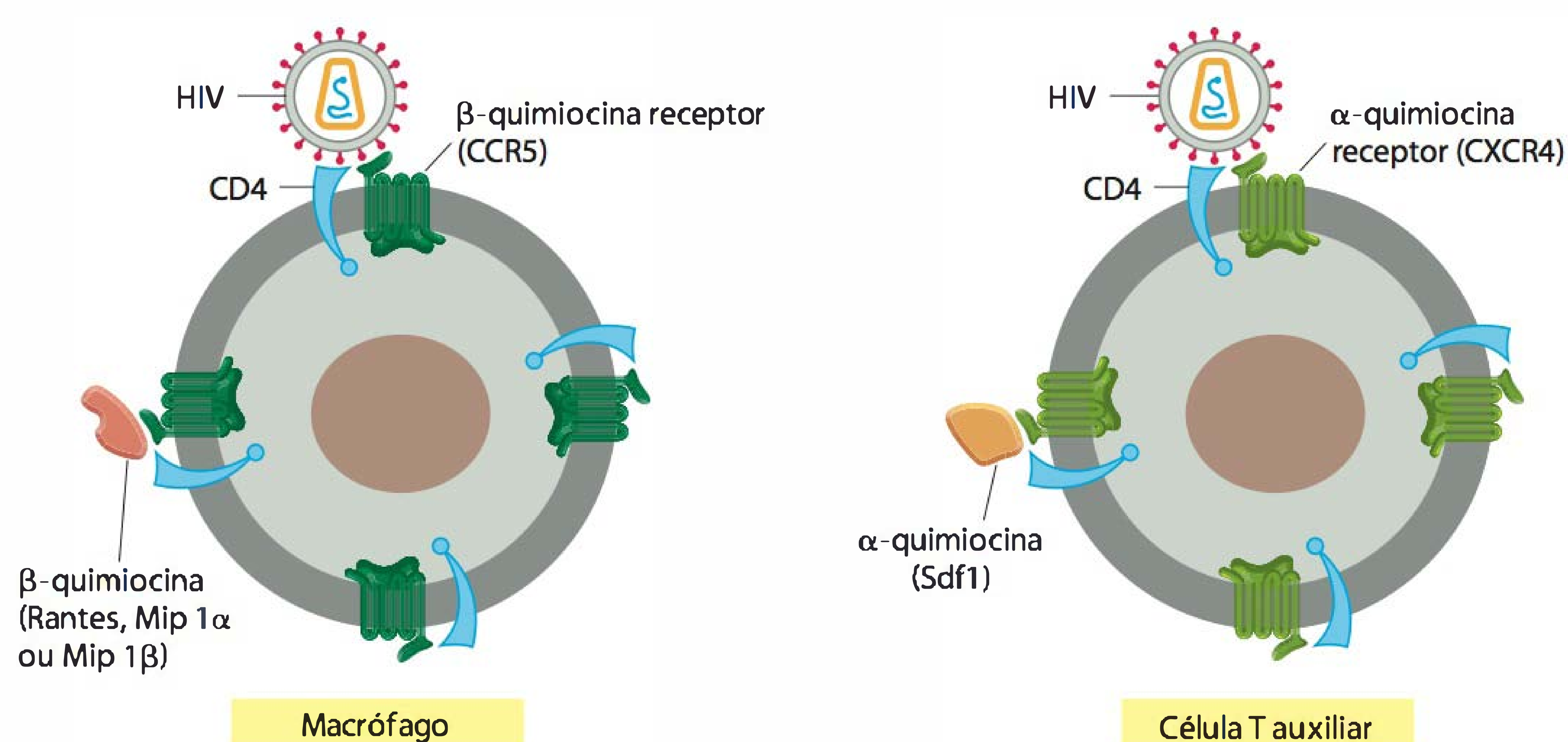


Figura 24-23 Receptor e correceptores para o HIV. Todas as linhagens de HIV necessitam do CD4 como receptor principal. Em uma infecção inicial, a maioria dos vírus utiliza CCR5 como correceptor, o que lhes permite infectar os macrófagos e seus precursores, os monócitos. Conforme a infecção progride, surgem variantes mutantes que utilizam CXCR4 como correceptor, fazendo com que essas variantes sejam eficientes na infecção de células T. Os ligantes naturais para os receptores de quimiocinas (Sdf-I para CXCR4; Rantes, Mip-1α ou Mip-1β para CCR5) bloqueiam a função do correceptor e previnem a infecção viral.

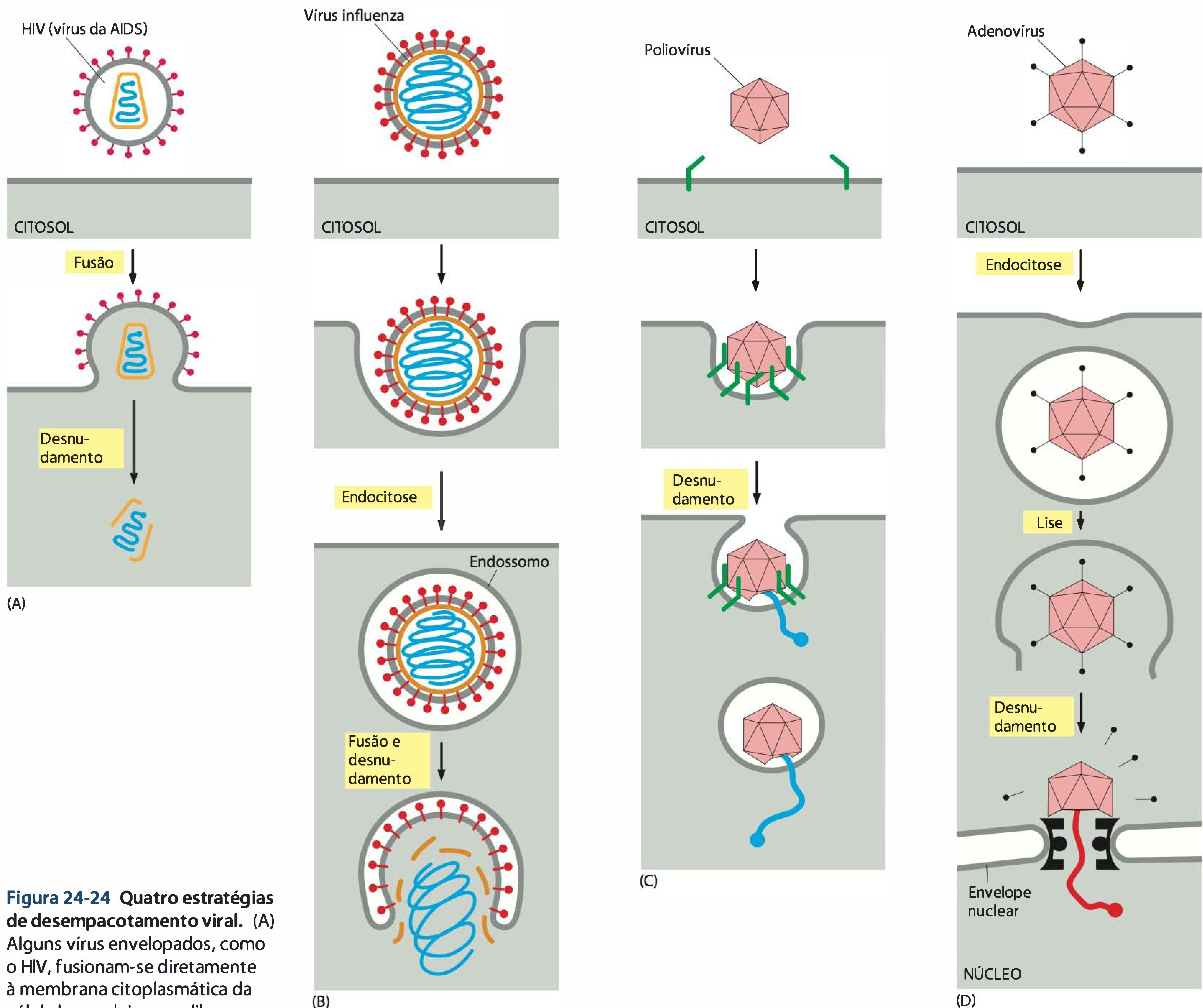


Figura 24-24 Quatro estratégias de desempacotamento viral. (A) Alguns vírus envelopados, como o HIV, fusionam-se diretamente à membrana citoplasmática da célula hospedeira para liberar seu genoma (*azul*) e proteínas do capsídeo (*laranja*) no interior do citosol. (B) Outros vírus envelopados, como o vírus da influenza, primeiro ligam-se a receptores de superfície celular e então engatilham a endocitose mediada por receptores. Quando o endossomo acidifica, o vírus envelopado fusiona com a membrana endossomal, liberando seu genoma (*azul*) e proteínas do capsídeo (*laranja*) no interior do citosol. (C) O poliovírus, um vírus não-envelopado, liga-se a um receptor (*verde*) na superfície e, então, forma poros na membrana da célula hospedeira para a extrusão de seu genoma de RNA (*azul*). (D) O adenovírus, outro vírus não--envelopado, usa uma estratégia mais complicada. Ele induz endocitose mediada por receptores e então provoca a disrupção da membrana endossomal, liberando parte do capsídeo no citosol. O capsídeo, finalmente, irá ancorar sobre um poro nuclear e liberar seu genoma de DNA (*vermelho*) diretamente no interior do núcleo.

gene *Ccr5* defectivo não são suscetíveis à infecção pelo HIV. Nos estágios tardios da infecção, os vírus podem passar a utilizar o correceptor CXCR4, ou adaptarem-se para o uso de ambos os correceptores; com este processo, o vírus pode modificar o tipo de célula que ele infecta durante a progressão da doença.

Os vírions penetram as células hospedeiras por fusão de membrana, por formação de poros ou por rompimento da membrana

Após o reconhecimento e a ligação à superfície da célula hospedeira, o vírus deve penetrar essa célula e liberar seu genoma de ácido nucleico que se encontra no interior do capsídeo proteico ou do envelope lipídico. Na maior parte das vezes, o ácido nucleico liberado permanece complexado a algumas proteínas virais. Os **vírus envelopados** penetram a célula hospedeira por meio da fusão com a membrana plasmática ou com a membrana endossomal, seguida de endocitose (**Figura 24-24**A, B). A fusão provavelmente ocorre via um mecanismo similar à fusão de vesículas mediada por SNARE, durante o tráfego intracelular vesicular normal (discutido no Capítulo 13).

A fusão é regulada tanto para garantir que as partículas virais apenas se fusionem com a membrana da célula hospedeira apropriada quanto para prevenir que elas fusionem umas às outras. No caso de vírus como o HIV, que se fusiona à membrana plasmática sob pH neutro, a ligação a receptores ou a correceptores geralmente engatilha modificações conforma-

cionais na proteína do envelope viral, fazendo com que seja exposto um peptídeo de fusão que normalmente se encontra inacessível (ver a Figura 13-16). Outro vírus envelopado, como o vírus da influenza, somente se fusiona com a membrana da célula hospedeira após a endocitose; nesse caso, geralmente é o ambiente ácido do endossomo precoce que engatilha a mudança conformacional das proteínas virais que irá expor o peptídeo de fusão (ver Figura 24-24B). O H^+ bombeado no endossomo precoce penetra a partícula do vírus da influenza através de um canal iônico e provoca um *desempacotamento* do ácido nucleico do vírus, o qual é diretamente liberado no interior do citosol assim que o vírus se fusiona à membrana endossômica. Em alguns vírus, o desempacotamento ocorre após a liberação no citosol. No caso do vírus Semliki forest, por exemplo, a ligação dos ribossomos do hospedeiro ao capsídeo causa a separação das proteínas do capsídeo do genoma viral.

É mais difícil visualizar o mecanismo de penetração das células hospedeiras por vírus **não-envelopados**, pois não está claro o processo pelo qual grandes conjuntos de proteínas e de ácidos nucleicos conseguem atravessar as membranas plasmática ou endossômica. Segundo o que conhecemos dos mecanismos de penetração, os vírus não-envelopados, geralmente, formam poros na membrana celular para transportar seu genoma para o interior do citoplasma, ou então provocam a rompimento da membrana do endossomo após endocitose.

O *poliovírus* usa a primeira estratégia. Sua ligação ao receptor engatilha tanto uma endocitose mediada pelo receptor quanto uma modificação conformacional na partícula viral. A modificação conformacional expõe uma projeção hidrofóbica em uma das proteínas do capsídeo, a qual, aparentemente, insere-se na membrana do endossomo para formar um poro. O genoma viral, então, penetra o citoplasma através desse poro, deixando o capsídeo no endossomo ou na superfície da célula, ou mesmo em ambas as localizações (ver a Figura 24-24C).

O *adenovírus* utiliza a segunda estratégia. Inicialmente é internalizado por endocitose mediada pelo receptor. Conforme o endossomo amadurece e torna-se mais ácido, o vírus passa por múltiplas etapas de desempacotamento nas quais as proteínas estruturais são removidas sequencialmente do capsídeo. Alguns desses passos precisam da ação da protease viral, que é inativa nas partículas virais extracelulares (provavelmente devido às ligações dissulfeto entre as cadeias, mas é ativada no ambiente redutor do endossomo). Uma das proteínas liberadas do capsídeo provoca a lise da membrana do endossomo, liberando os remanescentes do vírus no citosol. Este vírus modificado ancora-se no complexo do poro nuclear, e o DNA genômico viral é transportado através do poro no interior do núcleo, onde é transcrito (ver Figura 24-24D).

Nessas diferentes estratégias de penetração, o vírus explora uma grande diversidade de processos e de moléculas da célula hospedeira, incluindo componentes da superfície celular, da endocitose mediada por receptor e das etapas da maturação endossomal e do transporte nuclear. Essas estratégias, mais uma vez, ilustram os mecanismos sofisticados que os patógenos desenvolveram para utilizar a biologia celular básica de seus hospedeiros.

As bactérias penetram as células hospedeiras por fagocitose

As bactérias são muito maiores do que os vírus e são também muito grandes para serem captadas por endocitose mediada por receptores. Em vez disso, elas penetram as células do hospedeiro por meio de fagocitose. A fagocitose de bactérias é uma função normal dos macrófagos. Eles patrulham os tecidos do corpo e ingerem e destroem micróbios indesejáveis. Alguns patógenos, entretanto, adquiriram a capacidade de sobreviver e de replicar no interior dos macrófagos após terem sido fagocitados.

O *Mycobacterium tuberculosis* é um desses tipos de patógenos. Como discutido anteriormente, ele causa a **tuberculose**, uma infecção grave dos pulmões, bastante comum entre algumas populações urbanas. A tuberculose geralmente é adquirida por inalação da bactéria nos pulmões, onde é fagocitada pelos macrófagos alveolares. Apesar de este micróbio poder sobreviver e se replicar no interior dos macrófagos, os macrófagos da maioria dos indivíduos saudáveis, com a ajuda do sistema imune adaptativo, conseguem conter a infecção dentro de uma lesão denominada *tubérculo*. Na maior parte dos casos, a lesão fica isolada dentro de uma cápsula fibrosa que sofre calcificação, podendo facilmente ser observada em raios X dos pulmões. Uma característica incomum do *M. tuberculosis* é a sua capacidade de sobreviver por décadas dentro dos macrófagos presos nessas lesões. Mais tarde, no decorrer da vida, especialmente quando o sistema imune encontra-se enfraquecido por doenças ou fármacos, a infecção pode ser reativada, disseminando-se nos pulmões e, mesmo, em outros órgãos.

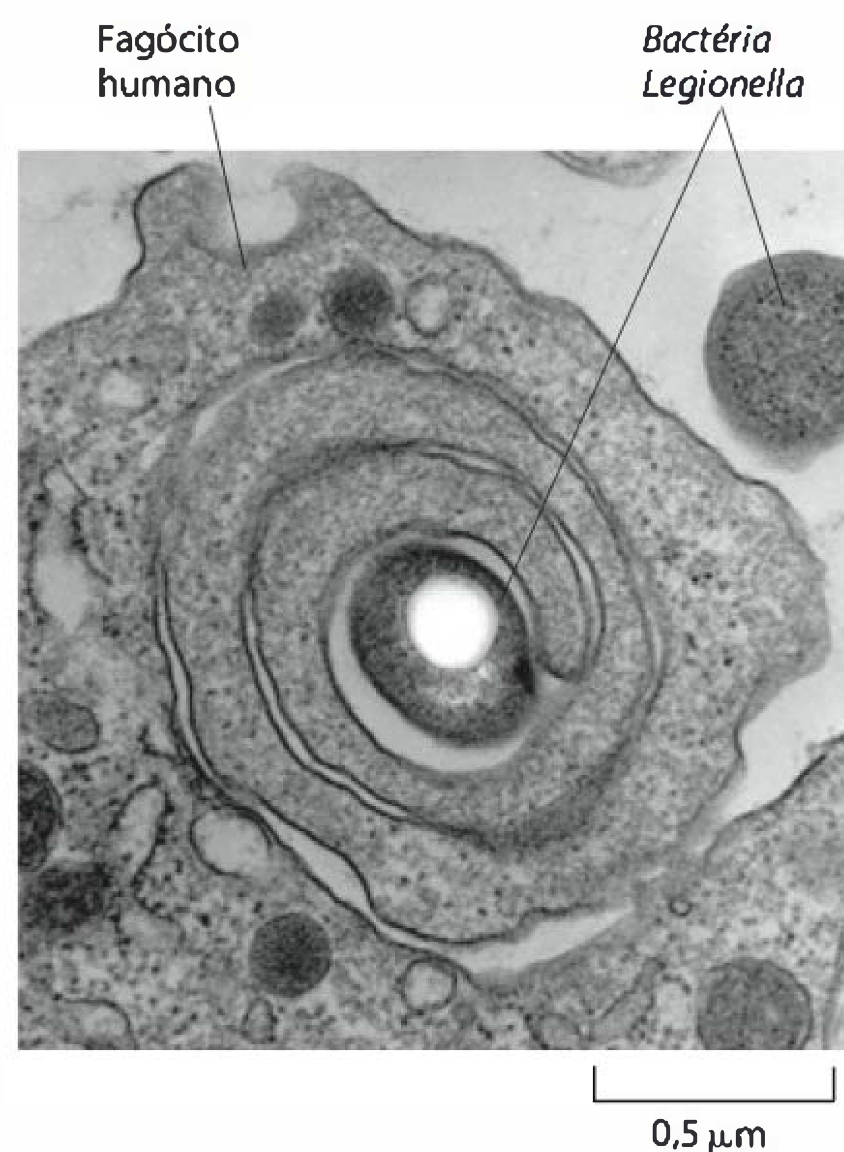


Figura 24-25 Captura de *Legionella pneumophila* por um fagócito humano. Esta micrografia eletrônica mostra uma estrutura pouco comum em espiral induzida pela bactéria na superfície de um fagócito. Alguns outros patógenos, incluindo a bactéria *Borrelia burgdorferi*, agente causal da doença de Lyme, o patógeno eucariótico *Leishmania* e a levedura *Candida albicans*, podem algumas vezes invadir as células usando este tipo de fagocitose espiral. (De M. A. Horwitz, *Cell* 36:27-33, 1984. Com permissão de Elsevier.)

A tuberculose tem sido uma presença constante junto a populações humanas há milhares de anos, mas outra bactéria que vive dentro dos macrófagos alveolares só foi identificada como patógeno humano em 1976. A *Legionella pneumophila* normalmente é um parasita da ameba de água doce, que a ingere por fagocitose. Quando pequenas gotas de água contendo *L. pneumophila* ou amebas infectadas são inaladas e penetram os pulmões, a bactéria pode invadir e viver no interior dos macrófagos alveolares (**Figura 24-25**), os quais se assemelham, para a bactéria, a grandes amebas. Essa infecção leva a um tipo de pneumonia conhecido como **doença dos legionários**. O patógeno pode ser eficientemente disseminado pelos sistemas de ar condicionado centrais, tendo em vista que as amebas, que são o hospedeiro natural dessas bactérias, são particularmente peritos na colonização e no crescimento em torres de refrigeração de condicionadores de ar; além disso, os sistemas de refrigeração produzem microgotas de água que são facilmente inaladas. A incidência da doença dos legionários tem aumentado drasticamente nas últimas décadas, e os surtos frequentemente ocorrem devido a sistemas de ar condicionado de prédios comerciais, hospitais e hotéis. Outra forma moderna de produção de aerossóis, incluindo chafarizes decorativos e fontes produtoras de aerossol em supermercados, também tem sido implicada em surtos desta doença.

Algumas bactérias invadem células que normalmente não apresentam capacidade fagocítica. Uma das formas pelas quais as bactérias podem forçar uma célula a fagocitá-las é pela expressão de uma adesina que se liga com alta afinidade a uma proteína de adesão celular normalmente usada pela célula-alvo para aderir à outra célula ou à matriz extracelular (discutido no Capítulo 19). Por exemplo, a bactéria causadora de diarreia, *Yersinia pseudotuberculosis* (parente próxima da bactéria que provoca a peste *Yersinia pestis*), expressa uma proteína chamada de *invasina*, que se liga às integrinas β1, e a *Listeria monocytogenes*, que causa uma forma rara, mas grave de intoxicação alimentar, expressa uma proteína que se liga à caderina-E. A ligação dessas proteínas de adesão transmembrana funciona como um falso sinal de formação de junção celular para a célula hospedeira e provoca a iniciação de um movimento de actina e de outros componentes do citoesqueleto para a região de ligação da bactéria. Tendo em vista que a bactéria é pequena em relação ao tamanho da célula, a tentativa desta última em ligar-se à superfície adesiva da bactéria resulta no englobamento e na fagocitose dessa bactéria – um processo conhecido como *mecanismo* de ziper de invasão (**Figura 24-26**A). A similaridade entre essa forma de invasão e o processo natural de adesão celular foi colocada em evidência com a determinação da estrutura tridimensional da invasina. Esta proteína bacteriana possui uma sequência RGD cuja estrutura é praticamente idêntica à sequência encontrada na região do sítio ligador de integrina da proteína de matriz extracelular laminina (discutido no Capítulo 19).

Uma segunda via por meio da qual as bactérias podem invadir células não-fagocíticas é conhecida como *mecanismo de gatilho* (Figura 24-26B). Este mecanismo é utilizado por vários patógenos, incluindo a *Salmonella enterica*, um agente de intoxicação alimentar. Esta dramática forma de invasão é iniciada quando uma bactéria injeta um conjunto de moléculas efetoras no interior da célula do hospedeiro pelo sistema de secreção tipo III. Algumas moléculas efetoras ativam GTPases da família Rho, as quais estimulam a polimerização de actina (discutido no Capítulo 16). Outras interagem mais diretamente com elementos do citoesqueleto, interferindo nos filamentos de actina e provocando o rearranjo das proteínas de ligação cruzada. O objetivo propriamente dito é causar um ondulamento acentuado na superfície da célula hospedeira (Figura 24-26C), a qual produzirá grandes protrusões ricas em actina, que se elevarão, prendendo a bactéria no interior de grandes vesículas endocíticas denominadas *macropinossomos* (Figura 24-26D). A aparência geral de uma célula sendo invadida por meio do mecanismo de gatilho assemelha-se ao ondulamento acentuado observado em reposta a certos fatores de crescimento, sugerindo que as cascatas de sinalização intracelulares semelhantes devem ser ativadas nas duas situações.

Os parasitas eucarióticos intracelulares invadem de forma ativa a célula hospedeira

A célula hospedeira supre a energia necessária para a internalização dos vírus pela endocitose mediada pelo receptor e das bactérias pela fagocitose ou macropinocitose. O patógeno é um participante relativamente passivo, em geral, puxando o gatilho para o início do processo de invasão. Ao contrário, a invasão de parasitas eucarióticos intracelulares, que são tipicamente maiores do que as bactérias, pode ocorrer por vários caminhos complexos que geralmente necessitam de um gasto de energia significativo por parte do parasita.

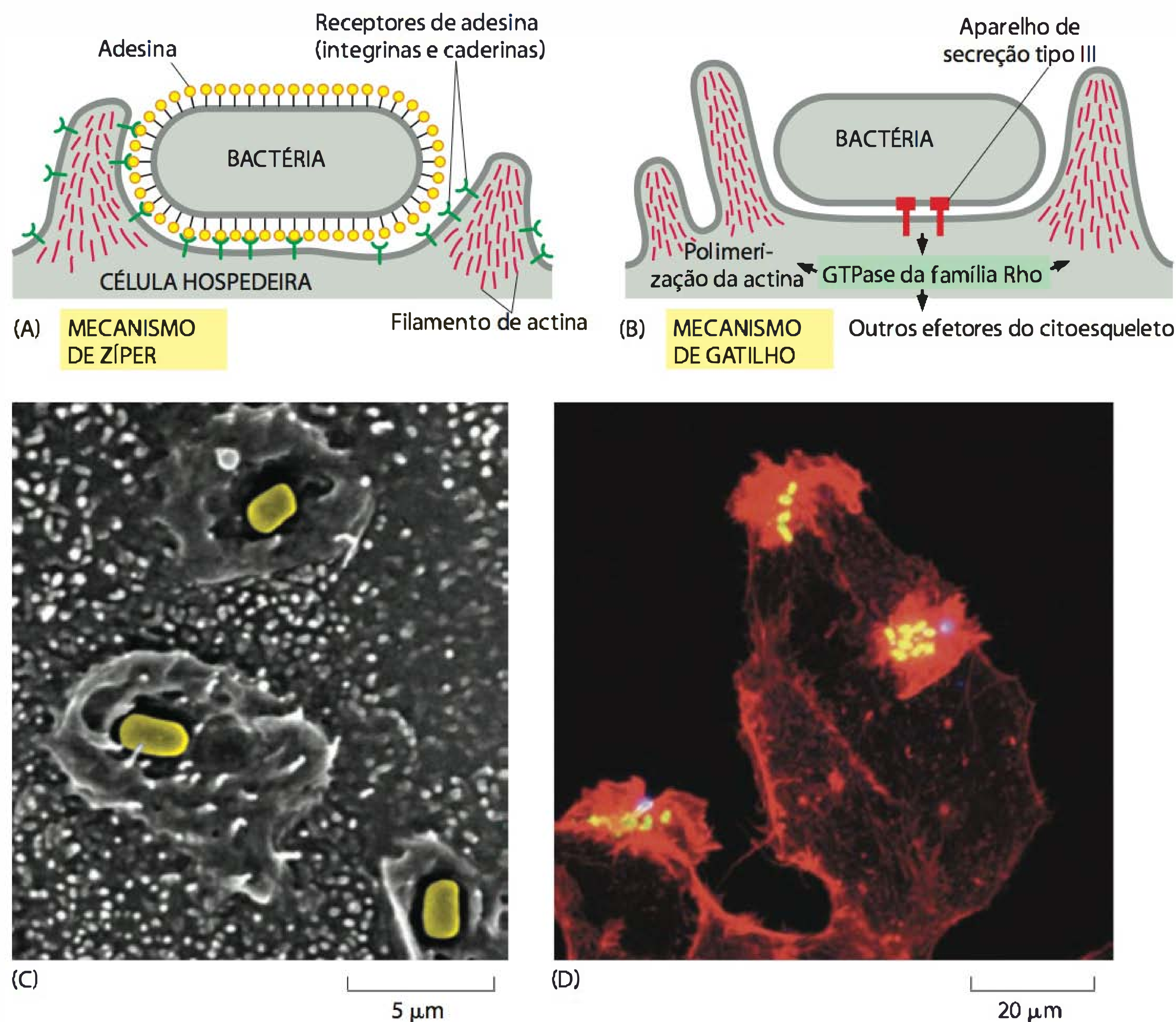


Figura 24-26 Mecanismos usados pela bactéria para induzir fagocitose por células não-fagocíticas. (A) O mecanismo de zíper e (B) o mecanismo de gatilho para a fagocitose induzida pelo patógeno requerem a polimerização da actina no ponto de entrada da bactéria. (C) Micrografia eletrônica de varredura mostrando um estágio precoce da invasão de *Salmonella enterica* pelo mecanismo de gatilho. Cada uma das três bactérias (pseudocoloridas em *amarelo*) é circundada por uma pequena protrusão de membrana. (D) Micrografia fluorescente mostrando que a protrusão maior que engolfa a *Salmonella* é rica em actina. A bactéria é marcada em *verde* e os filamentos de actina, em *vermelho*; por causa da sobreposição das cores, a bactéria aparece em *amarelo*. (De J. E. Galan, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:53-86, 2001. Com permissão de Annual Reviews.)

O *Toxoplasma gondii*, um parasita de gatos que pode causar sérios problemas ao infectar humanos, é um exemplo bastante instrutivo. Quando este protozoário entra em contato com a célula hospedeira, ele faz a protrusão de uma estrutura com base em microtúbulos chamada de conoide. O parasita então vagarosamente força sua entrada na célula hospedeira. A energia necessária para a invasão parece vir unicamente do parasita, e o processo requer pelo menos uma miosina incomum (Classe XIV; ver a Figura 16-57); a despolimerização do citoesqueleto de actina no parasita, mas não a despolimerização do hospedeiro interrompe este processo. Conforme o parasita movimenta-se dentro da célula hospedeira, uma membrana derivada da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira o circunda. Notavelmente, o parasita de alguma maneira remove proteínas da transmembrana circundante à medida que ela se forma para protegê-lo em um compartimento membranoso fechado que não é fusionado ao lisossomo e não participa no processo de tráfego da membrana plasmática (**Figura 24-27**). A membrana especializada permite ao parasita internalizar metabólitos intermediários e nutrientes do citosol da célula hospedeira excluindo as moléculas maiores. O parasita da malária invade eritrócitos usando um mecanismo similar.

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas, bastante prevalente no México, na América Central e na América do Sul, usa uma estratégia de invasão peculiar e inteiramente diferente. Após a ligação aos receptores da superfície celular, o parasita induz uma elevação do Ca^{2+} no citosol da célula hospedeira. A sinalização de Ca^{2+} recruta lisossomos para o sítio de ligação do parasita, os quais se fusionam com a membrana plasmática, durante o processo de internalização, permitindo o rápido acesso do parasita ao compartimento lisossomal (**Figura 24-28**). Como discutiremos a seguir, a maioria dos patógenos intracelulares faz o possível para evitar a sua exposição ao meio hostil e proteolítico do lisossomo, no entanto *Trypanosoma cruzi* usa o lisossomo como porta de entrada na célula. No compartimento lissossômico, o parasita secreta uma enzima que remove o ácido siálico das glicoproteínas lissossômicas e o transfere para suas moléculas de superfície, recobrindo-se dessa maneira com açúcares da célula hospedeira. A seguir, o parasita secreta uma toxina formadora de poros que lisa a membrana lisossômica e libera o parasita no citosol celular, onde ele se prolifera.

Os *microsporídios* talvez usem o mais bizarro dos mecanismos ativos de invasão. Este diminuto parasita eucariótico, intracelular obrigatório, tem um tamanho de 5 μm e um genoma de 2.900.000 pares de nucleotídeos, estando entre os menores genomas para uma célula eucariótica. Normalmente, os microsporídios causam doenças primariamente em insetos,

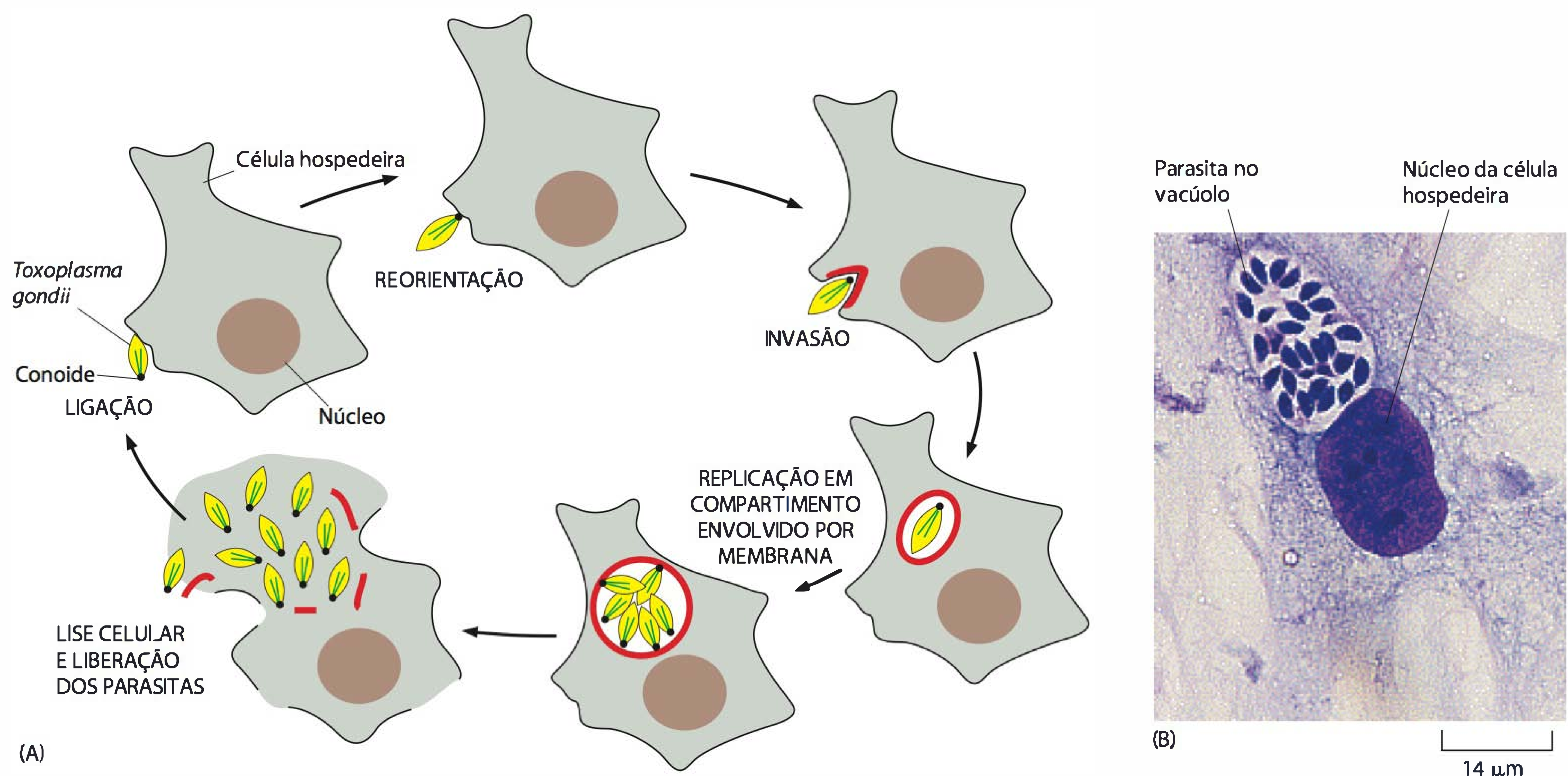
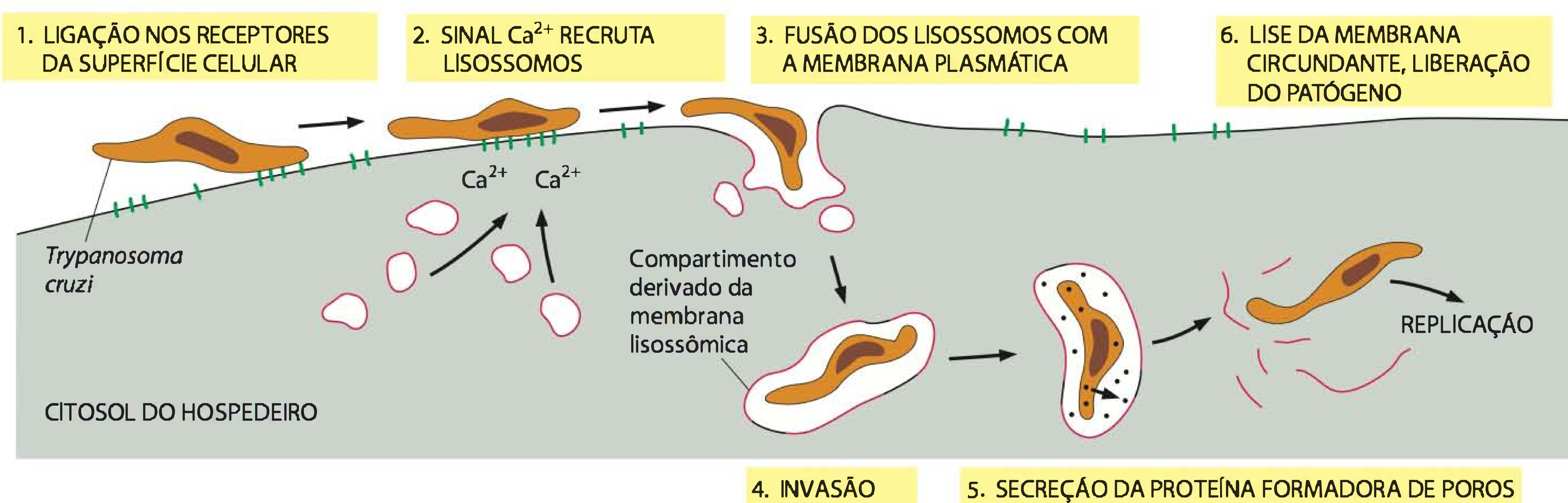


Figura 24-27 O ciclo de vida do parasita intracelular *Toxoplasma gondii*. (A) Após a ligação à célula hospedeira, *T. gondii* usa seu corpo conoide para forçar sua entrada na célula hospedeira. À medida que a membrana da célula hospedeira se invagina para circundar o invasor, o parasita de alguma maneira remove as proteínas das células hospedeiras associadas aos fagossomos ou endossomos normais para que não haja fusão do compartimento (mostrado em *vermelho*) com o lisossomo. Depois de várias rodadas de replicação, o parasita rompe o compartimento e ocorre lise celular, liberando a progênie no espaço extracelular, a partir do qual eles infectam outras células hospedeiras. (B) Micrografia óptica do *T. gondii* se replicando dentro de um compartimento embutido na membrana de uma célula em cultivo. (B, cortesia de Manuel Campos e John Boothroyd.)

porém podem causar doenças oportunistas em pacientes com AIDS. Tendo sido adaptados por um longo período a um estilo de vida parasitário, eles dependem da célula hospedeira para algumas funções metabólicas e perderam muito dos genes e estruturas celulares requeridos para uma existência independente; por exemplo, eles não possuem mitocôndrias ou peroxissomos, no entanto possuem um estranho aparato de extrusão, o tubo polar, que os habilita a invadir as células hospedeiras. No estágio de esporo do seu ciclo de vida, resistente às intempéries do meio, o tubo polar encontra-se espiralado em volta do núcleo (**Figura 24-29**A). No contato com uma célula hospedeira apropriada, o tubo polar projeta-se de uma maneira explosiva, desenrolando-se em menos de dois segundos para formar uma estrutura madura que poderá ter dez vezes o tamanho do esporo. A ponta do tubo polar em projeção movendo-se a uma velocidade de 100 μm/seg penetra a célula hospedeira e transfere (aparentemente por pressão osmótica) o conteúdo interno do esporo, incluindo o núcleo do microsporídio, no citoplasma da célula hospedeira, onde o parasita se replica para formar uma progênie de centenas (Figura 24-29B e C). Finalmente, a progênie torna-se esporos e a célula hospedeira lisa para liberá-los. Os esporos dos microsporídios são suficientemente pequenos para serem fagocitados por macrófagos, porém quando são fagocitados eles movimentam o seu tubo polar dos confins do fagossomo, liberando o seu conteúdo no citosol da célula hospedeira.

Figura 24-28 A invasão da célula hospedeira pelo *Trypanosoma cruzi*. O parasita recruta lisossomos da célula hospedeira para o seu sítio de ligação. Os lisossomos fusionam-se com a membrana citoplasmática invaginada para criar um compartimento intracelular construído quase que exclusivamente de membranas lisossomais. Após um pequeno período no vacúolo, o parasita secreta uma proteína formadora de poros que rompe a membrana circundante, permitindo que o parasita escape para o interior do citosol da célula hospedeira e prolifere.



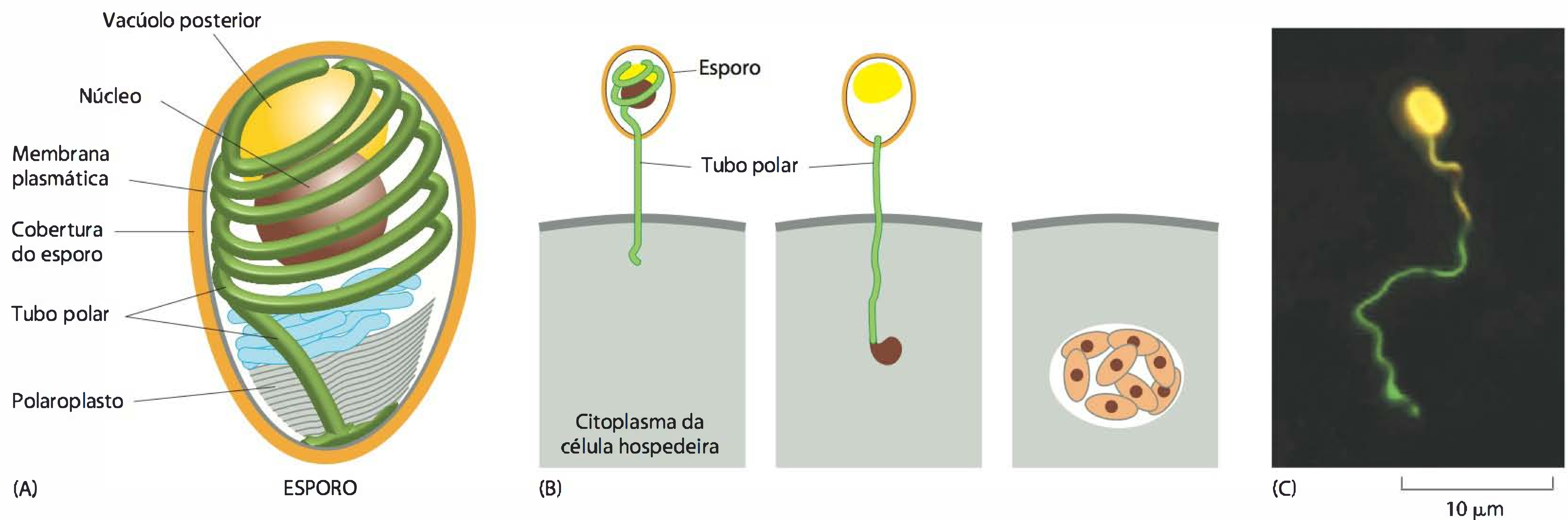


Figura 24-29 Invasão da célula hospedeira por microsporídios. (A) A forma esporulada do parasita é recoberta por uma cobertura rígida e envolve um tubo polar espiralado que se enrola várias vezes no núcleo. (B) O tubo polar se estende de maneira explosiva quando o esporo entra em contato com uma célula hospedeira apropriada, que é penetrada com a liberação do núcleo e de outros componentes do esporo no citoplasma da célula hospedeira. Os microsporídios então proliferam na célula. (C) Micrografia imunofluorescente de um esporo do microsporídio *Encephalitozoon cuniculi*. As partes do esporo que estão fora do hospedeiro estão coradas em *amarelo* e as partes no interior da célula estão coradas em *verde*. A projeção do tubo polar muda de *amarelo* para *verde* no ponto de entrada na célula, que não é visível. Escala 10 μm. (C, de C. Franzen, *Trends Parasitol*. 20:275-279, 2004. Com permissão de Elsevier.)

Muitos patógenos alteram o tráfego da membrana de células hospedeiras

Os três exemplos de parasitas intracelulares discutidos há pouco levantam um problema de ordem geral que abrange todos os patógenos intracelulares, incluindo vírus, bactérias e parasitas eucarióticos. De alguma maneira, eles têm que negociar com o tráfego da membrana da célula hospedeira. Após endocitose por uma célula hospedeira, eles se encontram em um compartimento endossômico que normalmente se fusionaria com o lisossomo para formar o *fagolisossomo*. Então, eles têm que modificar o compartimento para prevenir a fusão com o lisossomo, escapar do compartimento antes da fusão, escapar após a fusão mas antes de serem digeridos, ou encontrar uma maneira de sobreviver no ambiente inóspito do fagolisossomo (**Figura 24-30**).

A maioria dos patógenos usa a primeira ou a segunda estratégia. Como vimos, *Trypanosoma cruzi* usa a via de escape, como essencialmente fazem todos os vírus (ver Figura 24-24). A bactéria *Listeria monocytogenes* também usa tal estratégia. Ela entra na célula via mecanismo de zíper discutido anteriormente e secreta uma proteína chamada de *listeriolisina O* que forma grandes poros na membrana fagossômica, liberando as bactérias no citosol antes de serem digeridas. Uma vez no citosol, a bactéria continua secretando a listeriolisina O, porém não destrói outras membranas plasmáticas celulares, por duas razões: primeiro, ela é 10 vezes mais ativa no pH ácido encontrado no fagossomo do que no pH neutro do ci-

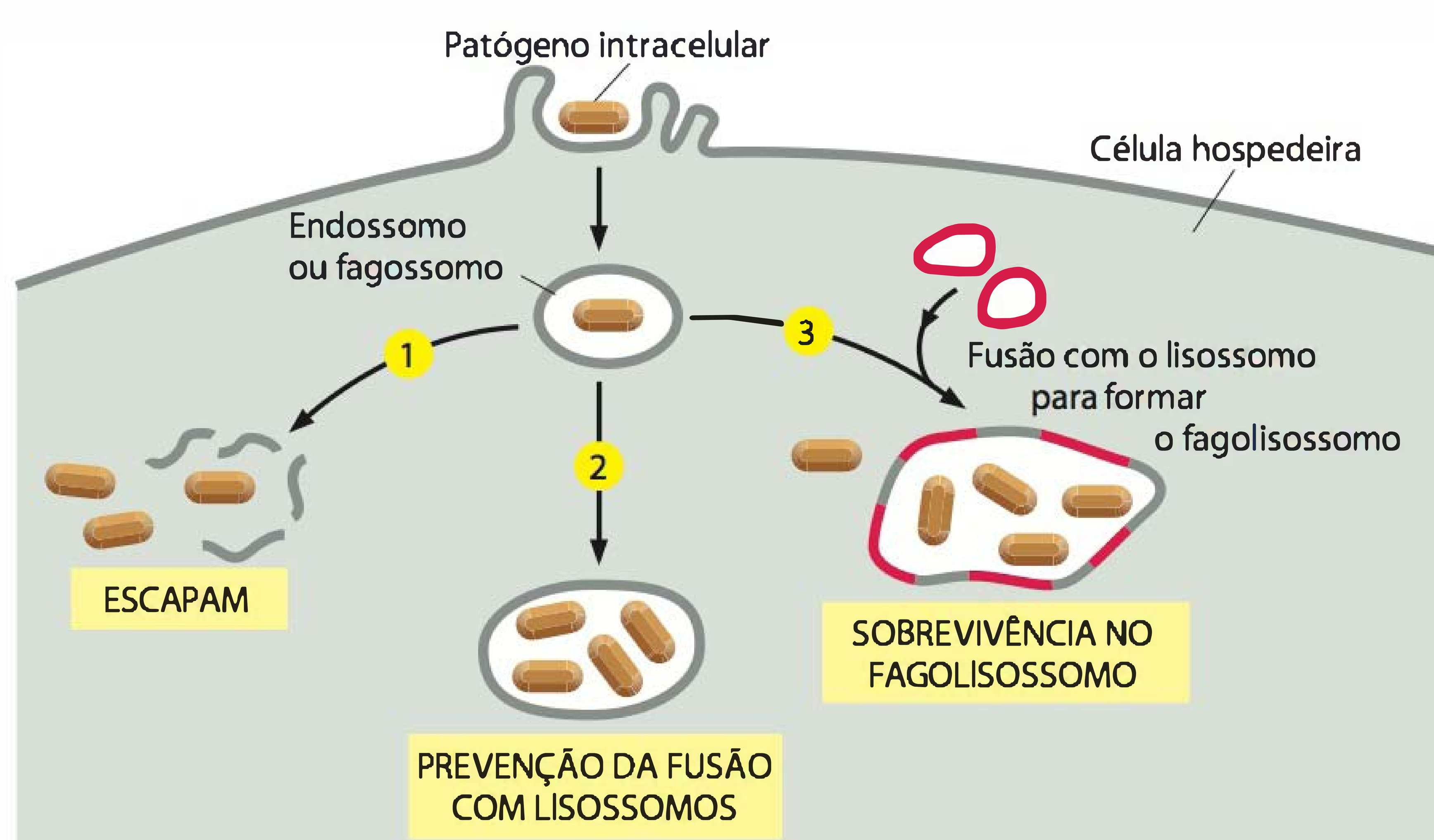


Figura 24-30 As escolhas enfrentadas por um patógeno intracelular. Após a entrada na célula, geralmente por endocitose mediada por receptores ou por fagocitose no interior de um compartimento delimitado por uma membrana, os patógenos intracelulares podem usar uma de três estratégias para sobreviver e replicar. Incluídos no grupo de patógenos que seguem a estratégia (1) estão todos os vírus, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri*. Dentre aqueles que seguem a estratégia (2) podemos citar *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia trachomatis*. Dentre aqueles que seguem a estratégia (3) estão *Coxiella burnetii* e *Leishmania*.

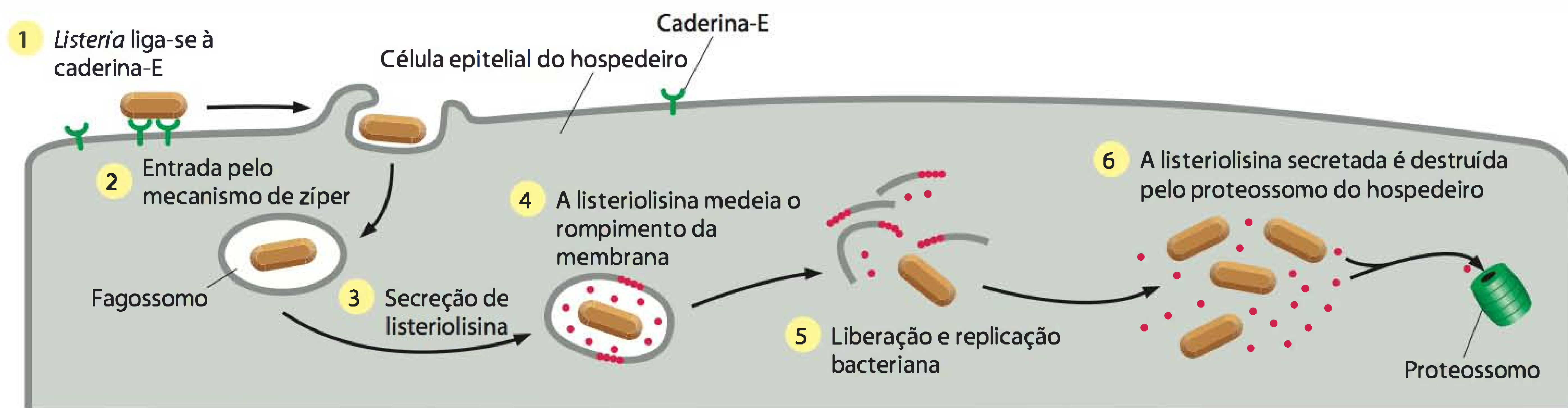


Figura 24-31 Destruição seletiva da membrana do fagossomo pela *Listeria monocytogenes*. A *L. monocytogenes* liga-se caderina-E na superfície de células epiteliais e induz sua internalização pelo mecanismo de zíper (ver Figura 25-26A). Dentro do fagossomo, a bactéria secreta a proteína hidrofóbica listeriolisina O, que forma oligômeros na membrana da célula hospedeira, criando poros e, em consequência, provocando rompimento da membrana. Uma vez no citosol da célula hospedeira, a bactéria inicia sua replicação e continua a secretar a listeriolisina O. Como a listeriolisina O é rapidamente degradada pelos proteossomos, a membrana da célula hospedeira permanece intacta.

tosol; segundo, ela é rapidamente degradada no citosol pelo proteossomo celular (ver Figura 6-80), que não tem acesso à listeriolisina O no fagossomo (**Figura 24-31**).

Se um patógeno sobreviver e replicar na célula hospedeira, em um compartimento circundado por membrana, terá de modificar o tráfego da membrana da célula hospedeira, o que é feito de várias maneiras. O compartimento deverá ser modificado em pelo menos duas maneiras: primeiro, deverá prevenir a fusão lisossomal e prover uma via para importação de nutrientes do citosol da célula hospedeira. Em adição, muitos patógenos (particularmente os vírus) alteram o tráfego na membrana para prevenir que sejam apresentados como antígenos estranhos na superfície da célula; do contrário, células T poderão detectar a sua presença e matar a célula hospedeira (discutido no Capítulo 25).

Diferentes patógenos possuem diferentes estratégias para alterar o tráfego de membrana na célula hospedeira (**Figura 24-32**). Como vimos, *Toxoplasma gondii* cria um compartimento protegido por membrana que não participa do tráfego normal das membranas das células hospedeiras e ainda assim especificamente permite a importação de nutrientes. *Mycobacterium tuberculosis* de alguma maneira previne o endossomo precoce que o contém de maturar, de maneira que o endossomo nunca acidifica ou adquire as características de endossomo tardio ou lisossomo. Endossomos de *Salmonella enterica*, ao contrário, não só acidificam como adquirem características de endossomos tardios, porém param a maturação em um estágio antes da fusão com o lisossomo. Outras bactérias parecem encontrar refúgio em compartimentos intracelulares que são completamente distintos da via endocítica normal. *Legionella pneumophila*, por exemplo, replica-se em compartimentos que são recobertos por camadas do retículo endoplasmático (RE) rugoso (**Figura 24-33**). *Chlamydia trachomatis*, patógeno bacteriano sexualmente transmitido que pode causar cegueira ou esterilidade, é um compartimento que parece similar a uma parte da via exocítica. Alguns patógenos bacterianos intracelulares parecem ser capazes de manipular a

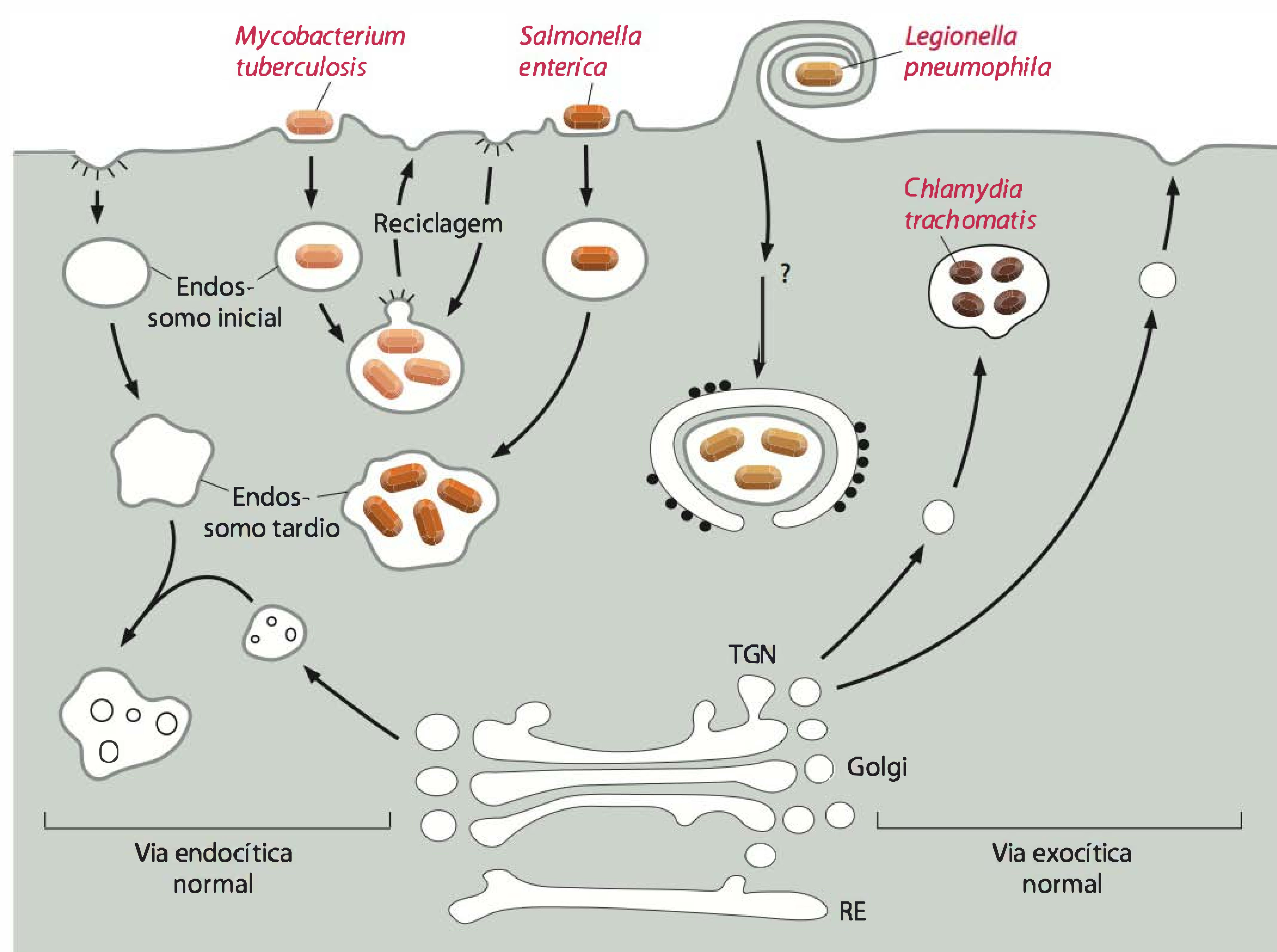


Figura 24-32 Modificação do tráfego de membrana da célula hospedeira por patógenos bacterianos. Quatro patógenos bacterianos intracelulares, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia trachomatis* replicam-se em compartimentos delimitados por membrana que diferem entre si. *M. tuberculosis* permanece em um compartimento que tem marcas precoces do endossomo e continua a se comunicar com a membrana plasmática via vesículas de transporte. *S. enterica* se replica em um compartimento que possui marcas tardias do endossomo e não se comunica com a membrana plasmática. *L. pneumophila* se replica em um compartimento incomum que é embrulhado em várias camadas de membrana do retículo endoplasmático (RE) rugoso; apenas uma camada é mostrada para simplificação. *C. trachomatis* se replica em um compartimento exótico que se fusiona a vesículas provenientes da rede de *trans* Golgi (TGN, *trans Golgi network*).

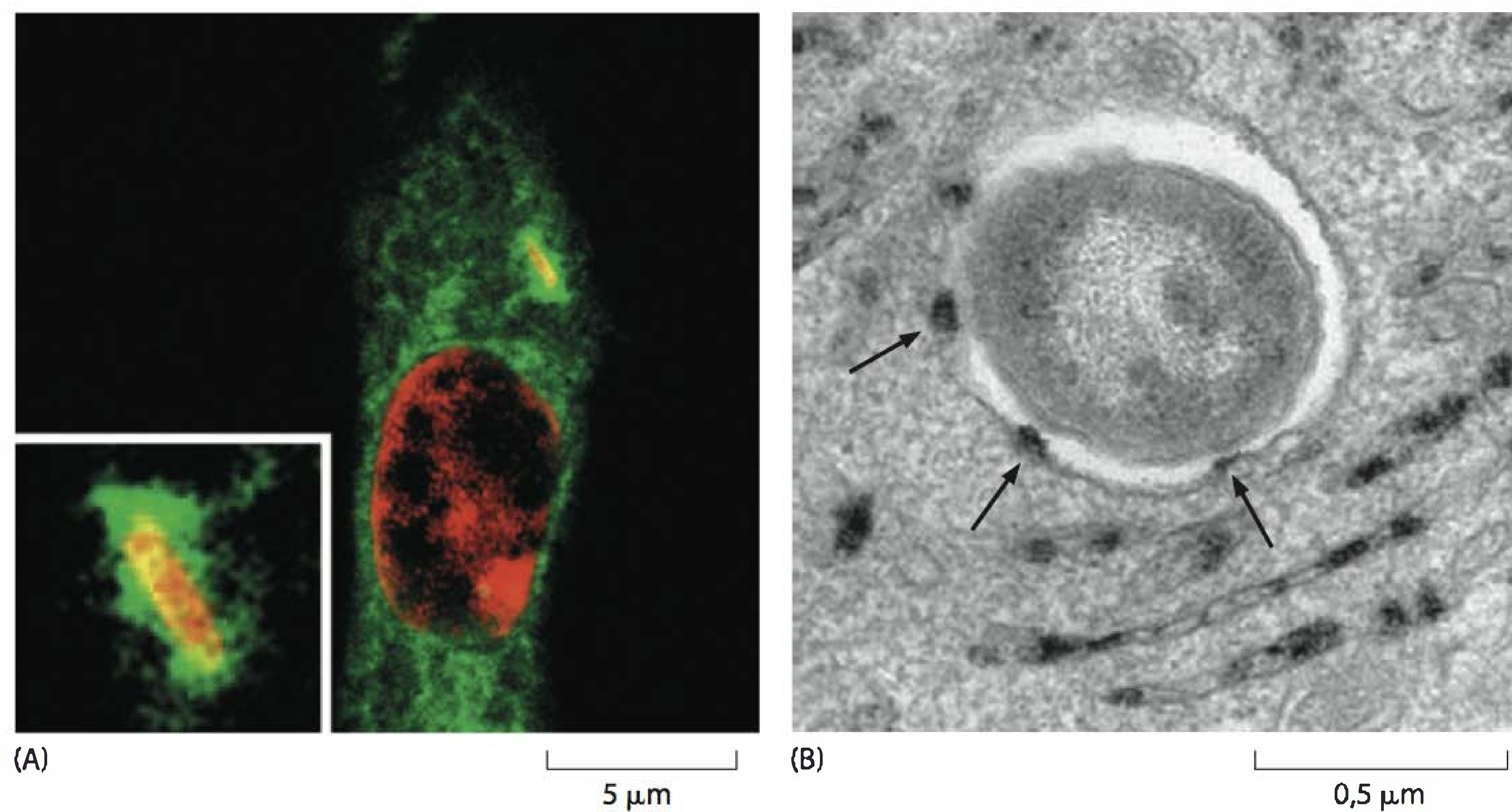


Figura 24-33 Associação da membrana do retículo endoplasmático (RE) com patógenos bacterianos intracelulares. (A) Pouco tempo após a infecção com *Legionella pneumophila*, o RE (*verde*) do hospedeiro é recrutado para envolver a bactéria intracelular. O DNA da bactéria e o da célula hospedeira estão marcados em *vermelho*. Em destaque, a associação do RE e da bactéria. (B) *Brucella abortus*, uma bactéria gram-negativa causadora de abortos em bovinos, também se multiplica dentro de um compartimento associado ao RE. Na micrografia eletrônica, as marcas escuras dentro do RE indicam a presença da enzima específica de RE, glicose-6-fosfatase. A *seta preta* mostra a concentração da enzima na membrana que recobre a bactéria, indicando que ela fusionou-se diretamente ao RE. (A, de J. C. Kagan e C. R. Roy, *Nat. Cell Biol.* 4:945-954, 2002. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd; B, de J. Celli e J. P. Gorvel, *Curr. Opin. Microbiol.* 7:93-97, 2004. Com permissão de Elsevier.)

localização de outras organelas delimitadas por membrana, não em contato físico direto com o seu compartimento. Por exemplo, endossomos tardios contendo *Salmonella* normalmente são encontrados em posição próxima e contrária ao aparelho de Golgi (**Figura 24-34**). Os mecanismos usados por estes organismos para alterar seus compartimentos de membrana e outros aspectos do tráfego de membrana na célula hospedeira são ainda pouco entendidos.

Os vírus também alteram o tráfego de membrana da célula hospedeira. Os vírus envelopados adquirem sua membrana de fosfolipídeos da célula hospedeira. No mais simples dos casos, proteínas codificadas pelo vírus são inseridas na membrana do RE e seguem o caminho normal através do aparelho de Golgi para a membrana plasmática, passando por várias modificações pós-tradução na rota. O capsídeo viral e o genoma são montados na membrana plasmática e brotam na superfície celular. Este é um mecanismo usado pelo HIV. Outros vírus envelopados interagem de maneira mais complexa com a via do tráfego de membrana da célula hospedeira (**Figura 24-35**). Mesmo vírus não-envelopados alteram o tráfego de membrana na célula hospedeira para o seu próprio proveito. Por exemplo, uma RNA-polimerase codificada pelo vírus e associada à membrana é responsável pela replicação do poliovírus. A replicação procede mais rapidamente se a superfície da área da membrana do hospedeiro aumenta. Para realizar a tarefa, o vírus induz a síntese aumentada de lipídeos na célula hospedeira e bloqueia o transporte de membrana do RE. A membrana do RE desta forma acumula expandindo a área de superfície onde a replicação viral ocorre (**Figura 24-36**). Muitos patógenos virais e bacterianos frequentemente são encontrados em associação com autofagossomos, que se formam por autofagia (discutido no Capítulo 13). Na maioria dos casos, não está claro se a célula hospedeira inicia a indução da autofagia como uma resposta protetora ou o patógeno invasor engatilha a autofagia para auxiliá-lo em sua replicação.

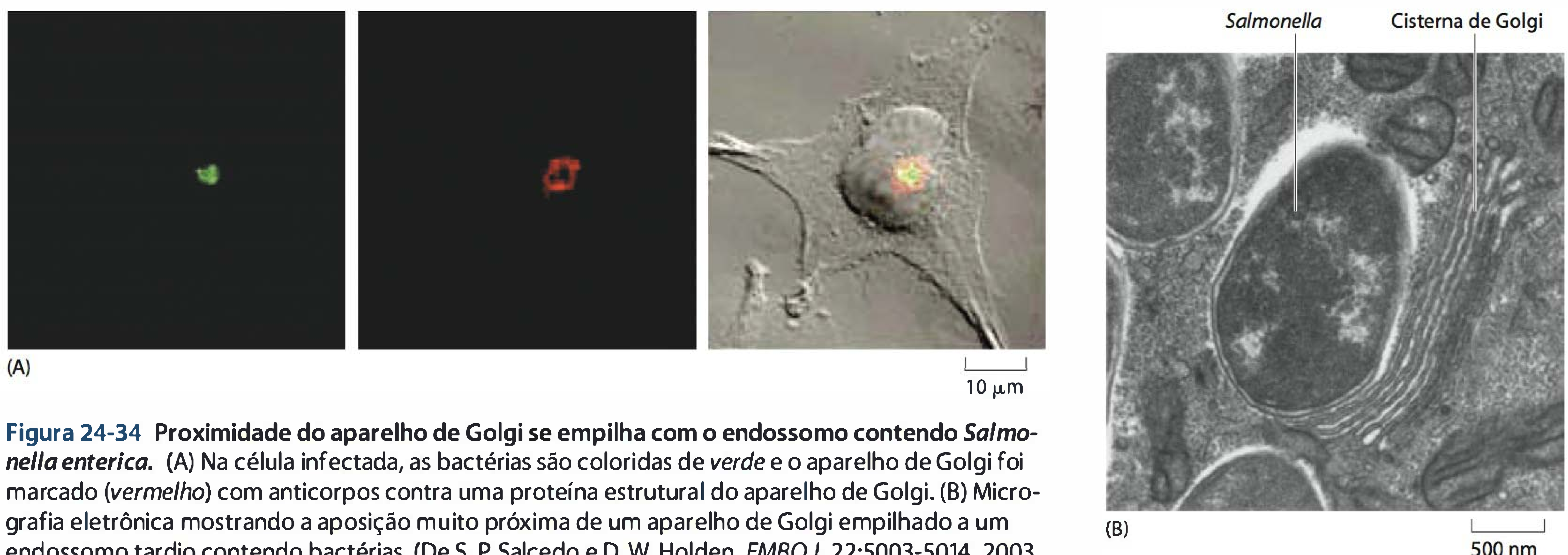


Figura 24-34 Proximidade do aparelho de Golgi se empilha com o endossomo contendo *Salmonella enterica*. (A) Na célula infectada, as bactérias são coloridas de *verde* e o aparelho de Golgi foi marcado (*vermelho*) com anticorpos contra uma proteína estrutural do aparelho de Golgi. (B) Micrografia eletrônica mostrando a aposição muito próxima de um aparelho de Golgi empilhado a um endossomo tardio contendo bactérias. (De S. P. Salcedo e D. W. Holden, *EMBO J.* 22:5003-5014, 2003. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

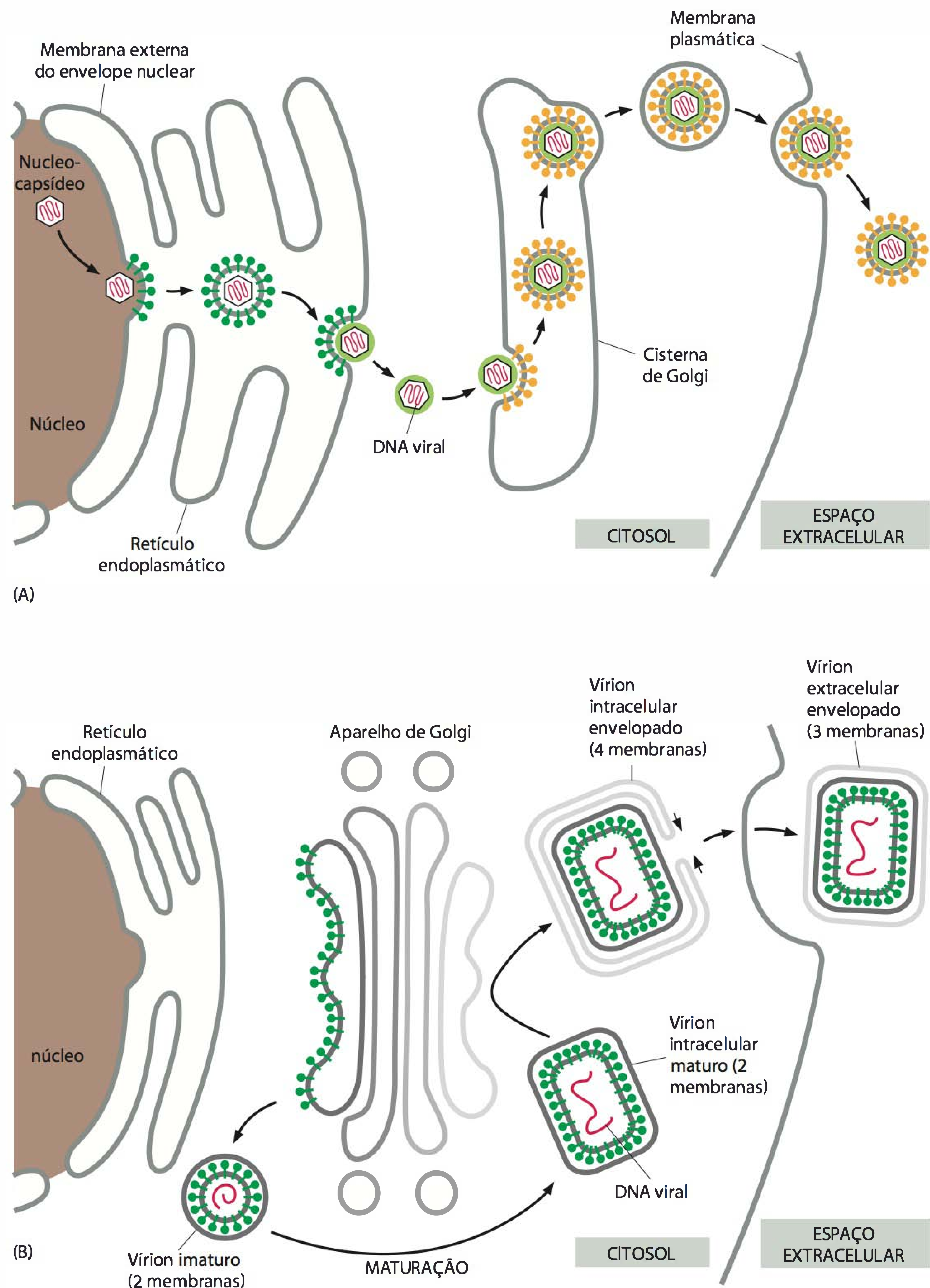


Figura 24-35 Estratégias complicadas para a aquisição do envelope viral. (A) O nucleocapsídeo do vírus herpético é montado no núcleo e então brota através da membrana nuclear interna no espaço entre as membranas interna e externa, adquirindo assim uma capa membranosa. As partículas virais então aparentemente perdem a capa quando se fusionam com a membrana nuclear externa para escapar para o citosol. Subsequentemente, os nucleocapsídeos brotam para dentro do aparelho de Golgi e de novo brotam para o exterior do outro lado, adquirindo assim duas novas capas de membranas. O vírus então finalmente brota da célula com uma única membrana, dado que sua membrana externa se fusiona com a membrana celular. (B) O vírus da vacínia (que é relacionado intimamente com o vírus que causa a varíola, sendo usado como vacina contra esta doença) é montado em "fábricas de replicação" dentro do citosol, longe da membrana plasmática. A primeira estrutura montada contém duas membranas, ambas adquiridas do aparelho de Golgi por um mecanismo de empacotamento ainda não bem definido. Algumas das partículas virais são então engolfadas pelas membranas de uma segunda estrutura delimitada por membrana; estas partículas virais possuem um total de quatro camadas de membrana. Após a fusão com a membrana plamática o vírus escapa das células com apenas três camadas de membrana.

Os vírus e as bactérias utilizam o citoesqueleto da célula hospedeira para seus movimentos intracelulares

O citoplasma das células dos mamíferos é extremamente viscoso. Ele está repleto de organelas e tem como suporte uma malha de filamentos do citoesqueleto, que inibe a difusão de partículas do tamanho de uma bactéria ou de um capsídeo viral. Se um patógeno pretende chegar a um local determinado da célula para realizar parte de seu ciclo de replicação, ele deve movimentar-se ativamente. Assim como o transporte intracelular de organelas, os patógenos geralmente utilizam o citoesqueleto celular para o movimento ativo.

Várias bactérias que replicam no citosol da célula hospedeira (em vez de utilizarem compartimentos delimitados por membranas) adotaram impressionantes mecanismos para movimentação que dependem de polimerização de actina. Estas bactérias, entre elas *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia rickettsii* (que causa a febre maculosa das montanhas rochosas), *Burkholderia pseudomallei* (que causa melioidose) e *Mycobacterium marinum* (parente próximo da bactéria da tuberculose), induzem o agrupamento e a nucleação dos filamentos de actina da célula hospedeira em um dos polos da bactéria. O crescimento dos filamentos gera uma força substancial capaz de fazer a bactéria avançar

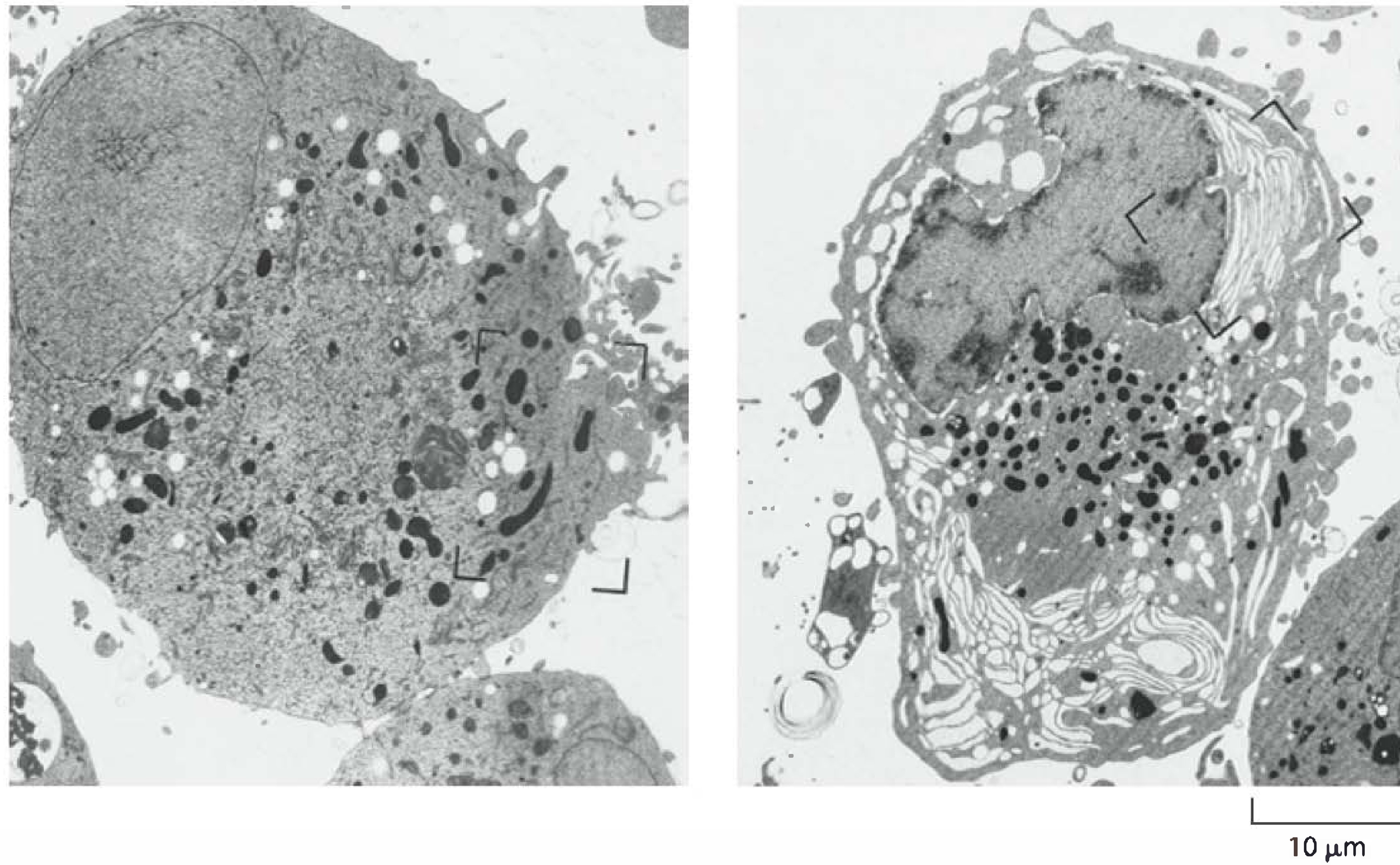
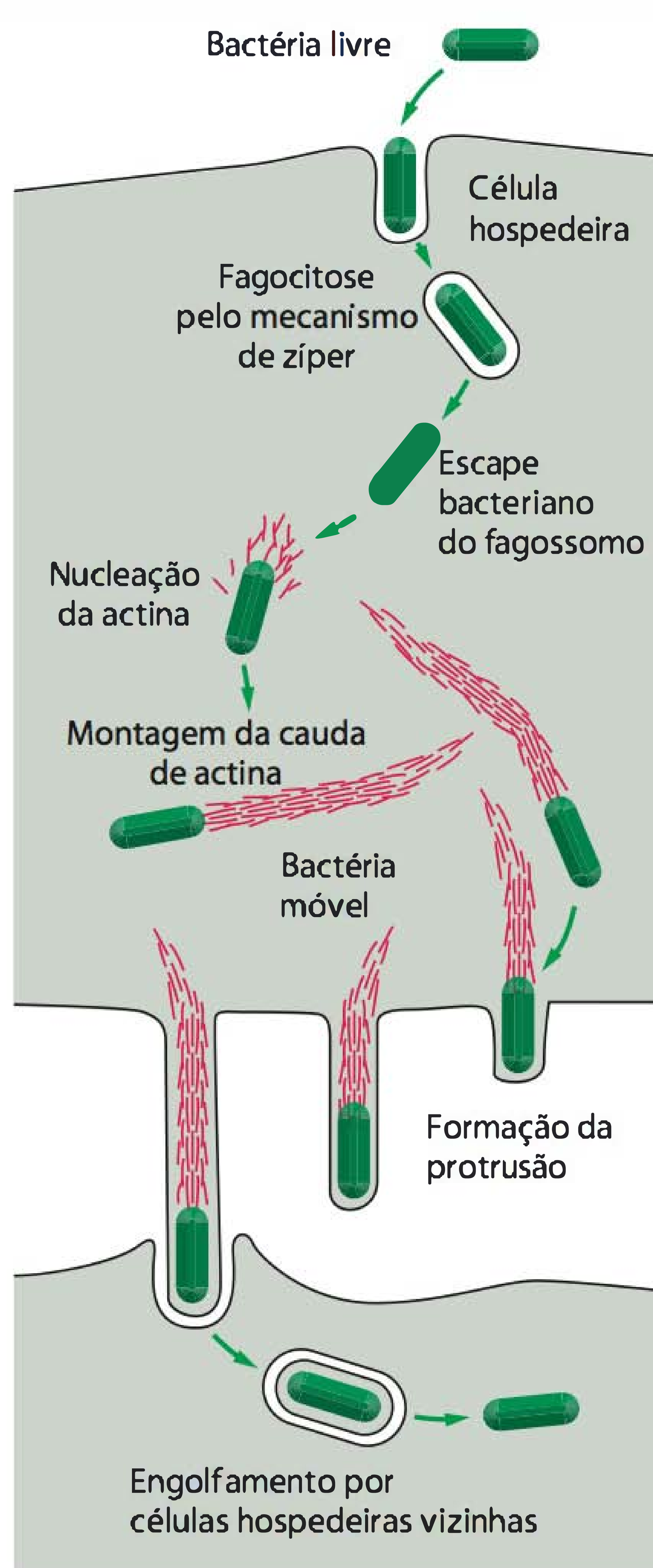


Figura 24-36 Alterações de membranas intracelulares induzidas por uma proteína do poliovírus. Os poliovírus, assim como outros vírus de RNA de fita simples positiva, replicam seu genoma de RNA usando uma polimerase que associa-se às membranas intracelulares. Várias das proteínas codificadas por seu genoma alteram a dinâmica de comportamento das organelas delimitadas por membrana da célula hospedeira. Estas micrografias eletrônicas mostram uma célula de rim de macaco não-transfectada (*esquerda*) e o mesmo tipo de célula (*direita*) expressando um transgene que codifica a proteína 3A de poliovírus. Na célula transfectada, o RE apresenta um inchaço, porque a proteína codificada pelo transgene inibe o tráfego do RE para o aparelho de Golgi. (De J. J. R. Doedens, T. H. Giddings Jr. e K. Kirkegaard, *J. Virol.* 71:9054-9064, 1997.)

pelo citoplasma a taxas de até 1 μm/seg. Novos filamentos formam-se atrás de cada bactéria e, conforme ela avança, vão sendo deixados para trás como o rastro de um foguete, sendo despolimerizados novamente dentro de aproximadamente um minuto, assim que entram em contato com fatores de despolimerização presentes no citosol. Quando uma bactéria em movimento alcança a membrana citoplasmática, ela continua sua trajetória rumo ao exterior, induzindo a formação de uma longa e fina protuberância que contém a bactéria em sua extremidade. Esta projeção muitas vezes será englobada por uma célula adjacente, permitindo que a bactéria penetre o citoplasma da célula vizinha sem a necessidade de exposição ao ambiente extracelular e, consequentemente, evitando o reconhecimento por anticorpos produzidos pelo sistema imune adaptativo do hospedeiro (**Figura 24-37**).



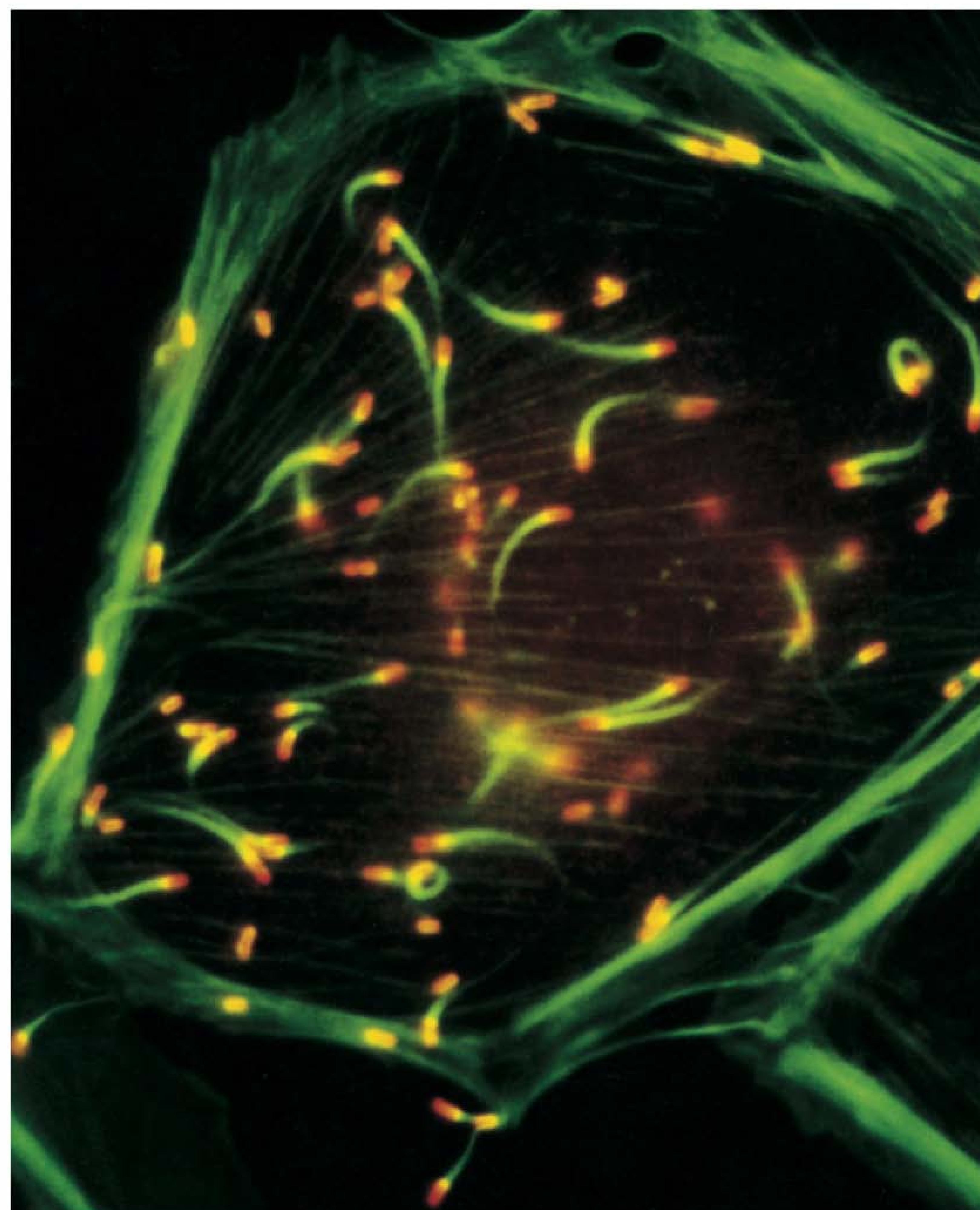


Figura 24-37 O movimento com base em actina de *Listeria monocytogenes* no interior e entre as células hospedeiras. Estas bactérias induzem a montagem de caudas ricas em actina no citoplasma das células hospedeiras que lhes permitem uma rápida locomoção. As bactérias móveis passam de uma célula a outra por meio da formação de protuberâncias envoltas por membrana que são englobadas pelas células adjacentes. (B) A micrografia fluorescente de bactérias em movimento no interior de uma célula que foi corada para revelar tanto as bactérias (*vermelho*) quanto os filamentos de actina (*verde*). Notar a cauda semelhante a um cometa formada pelos filamentos de actina atrás de cada bactéria em movimento. As regiões sobrepostas de fluorescências verdes e vermelhas aparecem em *amarelo*. (B, cortesia de Julie Theriot e Tim Mitchison.)

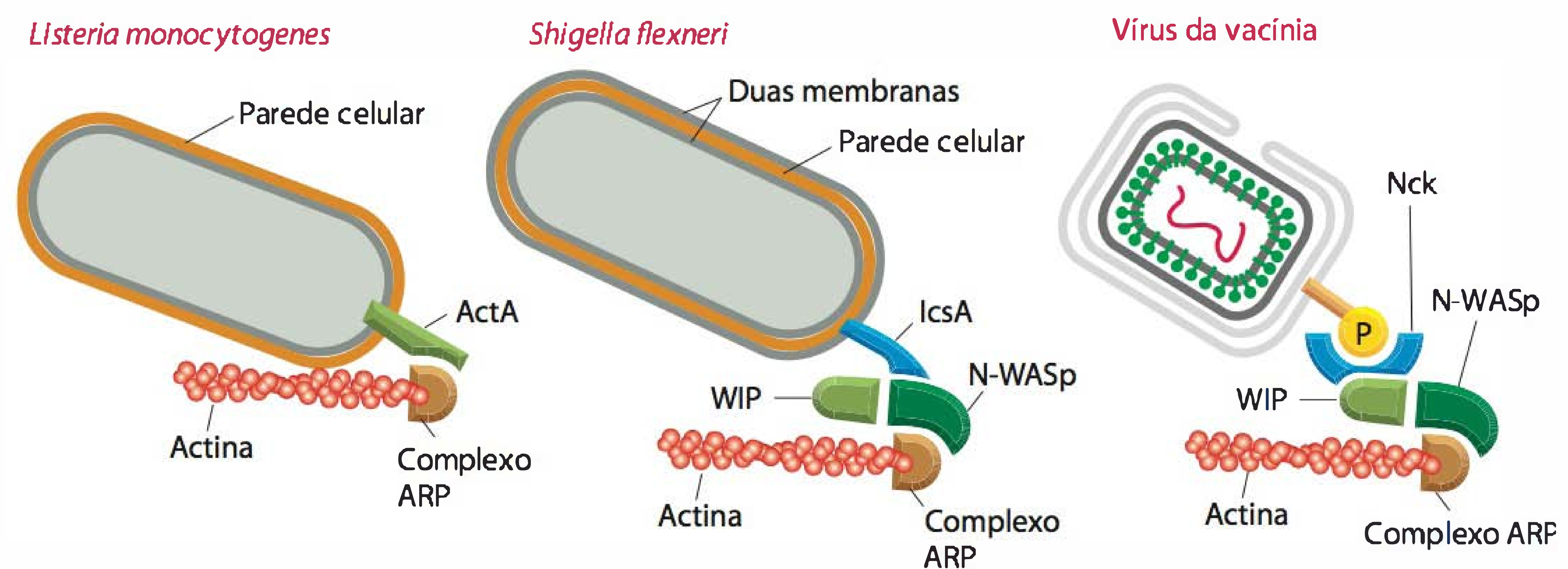


Figura 24-38 Mecanismos moleculares para a nucleação da actina por vários patógenos. As bactérias *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri* e o vírus da vacínia movem-se intracelularmente utilizando a polimerização da actina. Para induzir a nucleação da actina, estes patógenos recrutam e ativam o complexo ARP (ver Figura 16-34), embora cada patógeno use uma estratégia diferente de recrutamento. *L. monocytogenes* expressa uma proteína de superfície, ActA, que se liga diretamente e ativa o complexo ARP. *S. flexneri* expressa uma proteína de superfície, IcsA (não-relacionada à ActA), que recruta a proteína sinalizadora do hospedeiro N-WASp, que por sua vez recruta o complexo ARP e outras proteínas do hospedeiro, incluindo WIP (proteína de interação com WASp, de *WASp-interacting protein*). O vírus da vacínia expressa uma proteína de envelope que é fosforilada em um resíduo de tirosina por uma proteína tirosina-cinase da célula hospedeira. A proteína fosforilada recruta então Nck, que liga WIP. WIP, por sua vez, liga-se a N-WASp que então recruta e ativa ARP. O mecanismo mais complicado usado pelo vírus da vacínia é semelhante ao modo como fatores quimiotáticos ativam o complexo ARP em células eucarióticas móveis. Apesar das diferentes estratégias moleculares usadas na montagem, as caudas de actina com a aparência de cometa formadas pelos três patógenos são bem semelhantes. Os patógenos se movem com velocidade semelhante no interior da célula infectada.

O mecanismo molecular da polimerização de actina induzida pelo patógeno já foi determinado para muitas dessas bactérias. Os mecanismos são diferentes para diferentes patógenos, sugerindo que eles evoluíram de forma independente. Apesar de ambos utilizarem a mesma via metabólica da célula hospedeira que controla a nucleação de filamentos de actina, eles exploram pontos diferentes dessa via. Como discutido no Capítulo 16, a ativação da pequena GTPase Cdc42 por certos sinais extracelulares que leva à ativação de uma proteína denominada N-WA-Sp, que, por sua vez, ativa o complexo ARP, que pode induzir a nucleação e o crescimento de um novo filamento de actina. Em *L. monocytogenes*, uma proteína de superfície liga-se diretamente ao complexo ARP, ativando-o para iniciar a formação da cauda de actina. *B. pseudomaltei* e *R. Rickettsii* usam uma estratégia similar, no caso de *S. flexneri*, uma proteína de superfície não-relacionada liga-se a N-WASp, ativando-a, e esta, por sua vez, ativará o complexo ARP. Surpreendentemente, o vírus da vacínia usa outro mecanismo para movimentação intracelular pela indução de polimerização de actina nessa mesma via metabólica (**Figura 24-38**).

Outros patógenos apoiam-se principalmente no transporte com base em microtúbulos para movimentar-se dentro das células hospedeiras. Esse sistema de movimento é particularmente bem-ilustrado por vírus que infectam os neurônios. Um exemplo importante é dado pelo *herpesvírus alfa neurotrópico*, um grupo no qual se insere o vírus da varíola de galinhas. Os vírus entram nos neurônios sensoriais na extremidade dos seus axônios e são transportados para o núcleo por um sistema de transporte com base em microtúbulos, do nucleocapsídeo do axônio para o núcleo neuronal, provavelmente mediado pela ligação de proteínas do capsídeo à proteína motora dineína. Após a replicação e a montagem no núcleo, o vírus envelopado é transportado por microtúbulos para longe do corpo da célula neuronal ao longo do axônio, provavelmente pela ligação a uma proteína motora quinesina (**Figura 24-39**). Um grande número de vírions, incluindo os da AIDS (HIV), raiva, influenza,

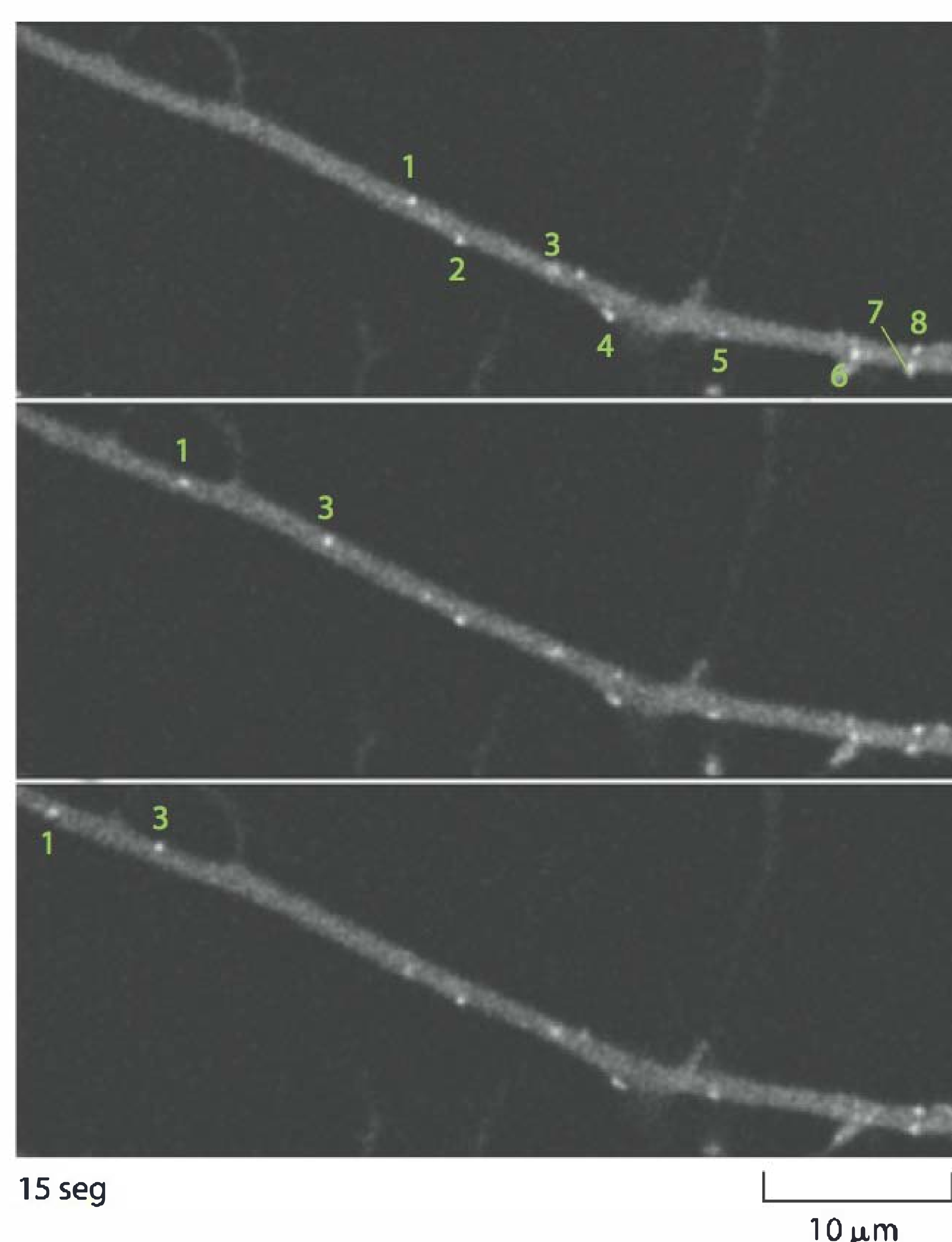


Figura 24-39 Micrografia fluorescente de um herpesvírus movendo-se em um axônio. Esta célula neuronal foi infectada com o vírus da herpes alfa, o qual foi geneticamente projetado para expressar a proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*) fusionada a uma de suas proteínas do capsídeo. Neste segmento do axônio, várias partículas virais podem ser observadas, e duas delas (indicadas pelos números um e três) estão movendo-se para longe do corpo da célula, que é para a direita e fora da fotografia. (De G. A. Smith, S. P. Gross e L. W. Enquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3466-3470, 2001. Com permissão de National Academy of Sciences.)

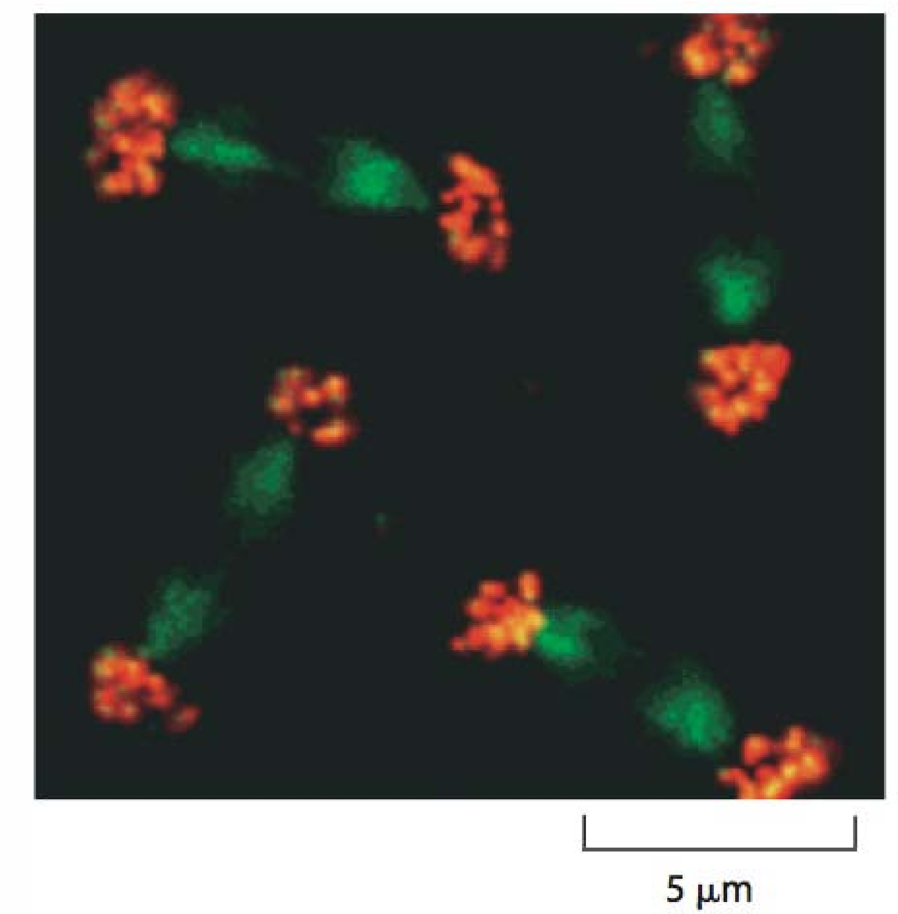


Figura 24-40 A associação da *Wolbachia* com microtúbulos. Esta micrografia fluorescente mostra a *Wolbachia* (*vermelho*) associada a microtúbulos (*verde*) de quatro fusos mitóticos no sincício de um embrião de *Drosophila*. Os grumos de bactérias nos polos do fuso segregarão com os cromossomos (não-visível no equador do fuso) quando estes segregarem. (De H. Kose e T. L. F. Karr, *Mech. Cell Dev*. 51:275-288, 1995. Com permissão de Elsevier.)

adenovírus, parvovírus canino e vírus da vacínia (o parente do vírus da varíola usado para vacinação), conforme demonstrado, associam-se às proteínas motoras dineína ou quinesina e são diretamente movimentados ao longo dos microtúbulos em algum ponto da replicação. Uma função primária dos microtúbulos, vistos como uma autopista nas células eucarióticas, é servir como uma estrada sinalizada para o tráfego de membrana; não é surpresa que muitos vírus independentemente desenvolveram a habilidade de engajar-se nestes sistemas de transporte para realçar sua própria replicação.

Sabe-se que uma bactéria que se associa a microtúbulos é a *Wolbachia*. Este fascinante gênero inclui muitas espécies que são parasitas ou simbiontes de insetos ou de outros invertebrados e que vivem no citosol de cada célula do animal. A infecção é transmitida verticalmente de mãe para filho, visto que a *Wolbachia* também está presente nos ovos. A bactéria garante sua transmissão em todas as células pela ligação com microtúbulos e consequente segregação junto ao fuso mitótico, simultaneamente com a segregação cromossômica, quando da divisão de uma célula infectada (**Figura 24-40**). Como discutiremos a seguir, a infecção por *Wolbachia* pode alterar significativamente o comportamento reprodutivo dos insetos hospedeiros.

As infecções virais apropriam-se do metabolismo das células hospedeiras

Muitas bactérias e parasitas intracelulares carregam consigo a informação genética básica necessária a seu próprio metabolismo e replicação e dependem das células hospedeiras apenas para os nutrientes. Os vírus, ao contrário, usam a maquinaria básica da célula hospedeira para a maior parte dos aspectos referentes a sua replicação: eles dependem dos ribossomos da célula hospedeira para a produção de suas proteínas, e alguns utilizam as enzimas DNA e RNA-polimerase da célula hospedeira para a sua replicação e transcrição, respectivamente.

Muitos vírus codificam proteínas que modificam o aparato de transcrição ou de tradução do hospedeiro com o objetivo de favorecer a síntese de proteínas virais em detrimento da síntese das proteínas da célula hospedeira. Como resultado, a capacidade de síntese da célula hospedeira é direcionada principalmente para a produção de novas partículas virais. O poliovírus, por exemplo, codifica uma protease que cliva especificamente o fator ligador de TATA, componente do TFIID (ver Figura 6-18), desligando efetivamente toda a transcrição da célula hospedeira via RNA-polimerase II. O vírus influenza produz uma proteína que bloqueia tanto o *splicing* quanto a poliadenilação dos RNAs mensageiros (mRNAS) transcritos, que, consequentemente, não serão exportados do núcleo (ver Figura 6-40).

A iniciação da tradução da maioria dos mRNAs da célula hospedeira depende do reconhecimento de seu quepe 5' por um grupo de fatores iniciadores da transcrição (ver Figura 6-72). A iniciação da tradução dos mRNAs da célula hospedeira frequentemente está inibida durante uma infecção viral, de tal forma que os ribossomos da célula hospedeira podem ser usados de forma eficiente para a síntese de proteínas virais. Alguns genomas virais como o da influenza, codificam endonucleases que clivam o quepe 5' dos mRNAs da célula hospedeira. Alguns inclusive usam o quepe 5' liberado dessa maneira como iniciador para a síntese de mRNAs virais, um processo chamado de *tomada rápida do quepe*. Vários outros genomas virais de RNA codificam proteases que clivam fatores de iniciação da tradução determinados. Estes vírus apoiam-se na tradução do RNA viral independente do quepe 5,' usando sítios de entrada interna de ribossomos (IRESs, *internal Ribosome entry sites*) (ver Figura 7-108).

Alguns poucos vírus usam a DNA-polimerase da célula hospedeira para replicar seu genoma. Infelizmente para o vírus, a DNA-polimerase é expressa em altos níveis apenas durante a fase S do ciclo celular, e a maioria das células que os vírus infectam passa grande parte de seu tempo em fase G_1. Os adenovírus desenvolveram um mecanismo de indução que faz com que a célula hospedeira entre na fase S, produzindo grandes quantidades de DNA-

-polimerase que então replicam o genoma viral. Seu genoma codifica proteínas que inativam tanto Rb quanto p53, dois genes supressores-chave da progressão do ciclo celular (discutido no Capítulo 17). Como era de se esperar em qualquer mecanismo que induz desregulação da replicação de DNA, esses vírus frequentemente são oncogênicos.

Os patógenos podem alterar o comportamento do organismo hospedeiro para facilitar a sua disseminação

Como vimos anteriormente, os patógenos normalmente alteram o comportamento da célula hospedeira de modo a beneficiar a sua própria sobrevivência e replicação. De maneira semelhante, os patógenos com frequência alteram o comportamento do organismo hospedeiro como um todo para facilitar a sua disseminação, como vimos no caso do *Trypanosoma brucei* e de *Yersinia pestis*. Em alguns casos, é difícil dizer se uma resposta particular do hospedeiro é mais favorável ao hospedeiro ou ao patógeno. Os patógenos que causam diarreia, como a *Salmonella enterica*, por exemplo, em geral provocam infecções autolimitantes, pois a diarreia pode eficientemente eliminar o patógeno. As bactérias eliminadas no fluxo, no entanto, podem disseminar a infecção, atingindo novos hospedeiros. De forma análoga, a tosse e o espirro ajudam a eliminar o patógeno do trato respiratório, mas também podem espalhar a infecção para novos hospedeiros. Uma pessoa com um resfriado comum pode produzir 20 mil microgotas em um único espirro, todas transportando rinovírus ou coronavírus.

Um exemplo assustador de modificação do comportamento do hospedeiro pelo patógeno é visto na raiva, já descrita por escribas egípcios há mais de três mil anos. Esse vírus replica nos neurônios e provoca nas pessoas e nos animais infectados um comportamento "rábico": eles se tornam incomumente agressivos e desenvolvem um forte desejo de morder. O vírus aloja-se na saliva e é passado através da lesão causada pela mordida para a corrente sanguínea da vítima, transmitindo a infecção para o novo hospedeiro.

Contudo, a *Wolbachia* exibe o mais dramático exemplo de modificação comportamental de um hospedeiro pela ação de um patógeno. Esta bactéria manipula o comportamento sexual de seu hospedeiro para maximizar sua própria disseminação. Como descrito anteriormente, a *Wolbachia* é transmitida verticalmente para a prole por meio dos ovos. Se a bactéria vive em um macho, entretanto, ela encontra-se em um "beco sem saída", pois os parasitas são excluídos dos espermatozoides. Em algumas espécies de *Drosophila*, a *Wolbachia* modifica o espermatozoide de seu hospedeiro de tal forma que ele poderá fertilizar apenas os ovos das fêmeas infectadas. Esta modificação cria uma vantagem reprodutiva para as fêmeas infectadas sobre as fêmeas não-infectadas, de tal modo que a proporção média de carreadores de *Wolbachia* aumenta. Em outras espécies hospedeiras, uma infecção por *Wolbachia* mata o macho e poupa a fêmea, aumentando o número de fêmeas na população e, assim, aumentando o número de indivíduos que podem produzir ovos para passar a infecção. Em alguns poucos tipos de vespas, a infecção por *Wolbachia* permite que as fêmeas produzam ovos que se desenvolvem por partenogênese, sem a necessidade de fertilização por espermatozoides; nessas espécies, os machos foram completamente eliminados. Para alguns de seus hospedeiros, a *Wolbachia* tornou-se um simbionte indispensável, e a cura da infecção causa a morte do hospedeiro. Em pelo menos uma situação os seres humanos estão usando esta dependência: o nematódeo que causa a cegueira dos rios na África (uma filária) é difícil de eliminar com medicamentos antiparasitários, mas quando as pessoas acometidas pela cegueira dos rios são tratadas com antibióticos que curam a infecção por *Wolbachia* do parasita, a infecção de nematódeos também é eliminada.

Os patógenos evoluem rapidamente

A complexidade e a especificidade das interações moleculares entre os patógenos e os seus hospedeiros sugerem que a virulência deve ser uma característica difícil de ser adquirida por mutações ao acaso. Mesmo assim, novos patógenos estão surgindo constantemente, e patógenos antigos estão sob constante modificação, de tal modo que as infecções comuns tornam-se difíceis de ser tratadas. Os patógenos apresentam duas grandes vantagens que permitem sua rápida evolução. Primeiro, eles replicam rapidamente, fornecendo uma grande quantidade de matéria-prima para a atuação da seleção natural. Se os humanos e os chimpanzés apresentam uma diferença de 2% entre suas sequências genômicas após aproximadamente 8 milhões de anos de divergência evolutiva, o poliovírus atinge a marca de 2% de mudanças no seu genoma em cinco dias, o tempo aproximado necessário para que

o vírus passe da abertura bucal humana e chegue ao intestino. Segundo, pressões seletivas encorajam a rápida variação genética. O sistema imune adaptativo do hospereiro e os modernos fármacos antimicrobianos, os quais são destruidores de patógenos que falham em mudar, são as principais fontes dessas pressões seletivas.

Em muitos casos, mudanças no comportamento humano exacerbam a emergência e a evolução de novas moléstias infecciosas. Nas cidades medievais, as condições de vidas sujeitas à sujeira e ao superpovoamento, por exemplo, contribuíram para a disseminação da bactéria *Yersinia pestis* nos humanos a partir das pulgas habitantes de seus hospedeiros roedores que transmitiam a peste. A tendência do homem moderno de viver em grandes cidades com grande densidade populacional criou a oportunidade para os organismos infecciosos iniciarem epidemias, como a influenza, a tuberculose e a AIDS, que não se disseminariam tão rapidamente se a população humana fosse esparsa. Viagens aéreas podem em princípio permitir que um hospedeiro, recentemente infectado, mas assintomático, transporte uma epidemia para uma população não exposta dentro de poucas horas ou dias.

A variação antigênica nos patógenos ocorre por mecanismos múltiplos

Um exemplo em miniatura da constante batalha entre a infecção e a imunidade é o fenômeno da **variabilidade antigênica**. Uma importante resposta imune adaptativa contra muitos patógenos é a produção de anticorpos que reconhecem especificamente os *antígenos* de superfície dos patógenos (discutido no Capítulo 25). Muitos patógenos escapam da eliminação completa pelos anticorpos por meio da modificação desses antígenos no curso da infecção. Alguns parasitas eucarióticos, por exemplo, passam por uma sequência programada de rearranjo de genes que codificam os antígenos de sua superfície. O exemplo mais impressionante ocorre em tripanossomos africanos, como o *Trypanosoma brucei*, o parasita agente da doença do sono, disseminado por um inseto vetor (*T. brucei* é um parasita próximo do *T. cruzi* – ver a Figura 24-28 – mas ele sofre replicação extracelular em vez de replicar no interior das células). O *T. brucei* encontra-se envolto por um único tipo de glicoproteína chamada de *glicoproteína variante-específica (VSG, variant-specific glycoprotein)*, que induz uma resposta de anticorpos protetores que rapidamente elimina os parasitas. O genoma do tripanossomo, no entanto, contém aproximadamente mil genes de VSG, cada um codificando uma VSG com propriedades antigênicas distintas. Apenas um desses genes é expresso por vez, por meio de cópia para uma região de expressão ativa do genoma. O rearranjo gênico que copia novos alelos no sítio de expressão repetidamente muda o gene *Vsg* expresso. Dessa forma, alguns poucos tripanossomos que expressam uma VSG alterada escapam da eliminação mediada pelos anticorpos específicos, replicam e são a causa da recorrência da doença, levando ao estabelecimento de uma infecção crônica cíclica (**Figura 24-41**). Muitos outros parasitas eucarióticos, incluindo o protozoário *Plasmodium*

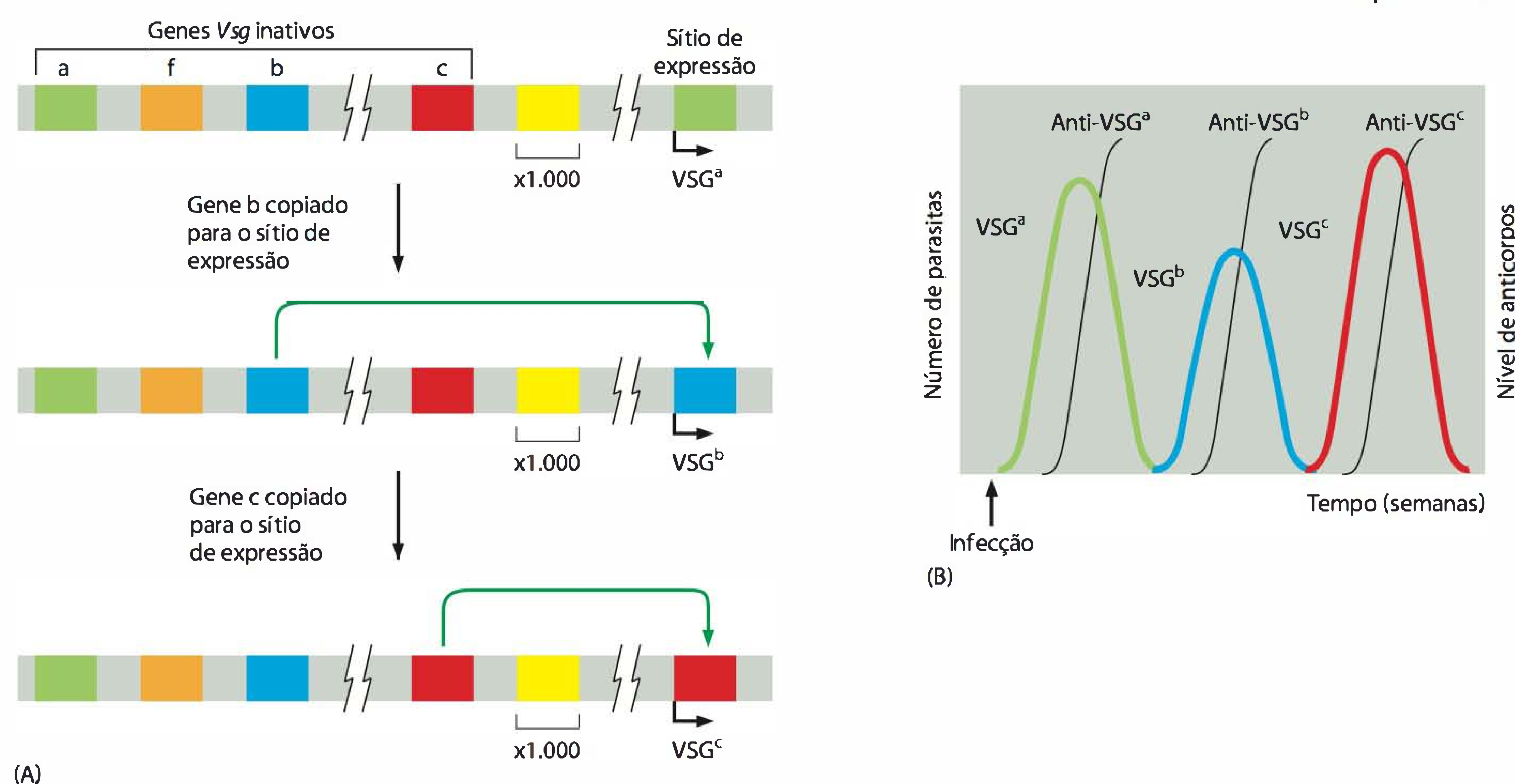


Figura 24-41 Variação antigênica em tripanossomos. (A) Existem cerca de 1.000 genes *Vsg* distintos em *Trypanosoma brucei*, por apenas um sítio para a expressão do gene *Vsg*. Um gene inativo é copiado no sítio de expressão por conversão gênica, onde é agora expresso. Cada *gene Vsg* codifica uma proteína (antígeno) de superfície diferente. Raros eventos de comutação permitem repetidamente ao tripanossomo mudar o antígeno de superfície expresso. (B) Uma pessoa infectada com tripanossomos expressando uma VSG^a produz uma resposta protetora de anticorpos, que liquida a maioria dos parasitas expressando o antígeno. No entanto, uma pequena proporção dos parasitas pode ter comutado para expressar VSG^b, podendo agora proliferar até que anticorpos anti-VSG^b liquide-os. Nesse tempo, no entanto, alguns parasitas terão comutado para VSG^c, e assim o ciclo se repetirá indefinidamente.

falciparum, que causa a malária, e o fungo *Pneumocystis carinii*, que causa pneumonia em pacientes com AIDS, usam estratégias muito semelhantes para escapar da resposta imune adaptativa. Patógenos bacterianos também podem mudar rapidamente seus antígenos de superfície. As espécies do gênero *Neisseria* são as campeãs. Estes cocos gram-negativos podem causar meningites e doenças sexualmente transmitidas, que empregam um surpreendente número de mecanismos para promover a variação antigênica. Primeiro, eles passam por recombinação genética, muito semelhante à descrita para patógenos eucarióticos, que os capacita a variar (com o tempo) a proteína pilina usada para fazer as fímbrias da superfície celular: por recombinação de múltiplas cópias silenciosas de genes variantes de *pilina*, em um único lócus de expressão eles podem expressar dezenas de versões de proteínas levemente diferentes. Segundo, muitas proteínas da superfície celular, assim como muitas das enzimas biossintéticas envolvidas na síntese de carboidratos da superfície celular, possuem seus níveis de expressão continuamente alterados por erros inesperados ao acaso e reparo dos nucleotídeos repetidos na região promotora ou nas sequências codificadoras dos seus genes, que modulam a transcrição ou a tradução. *Neisseria*, por exemplo, possui cerca de dez tipos diferentes de genes que codificam variantes da família Opa de proteínas de membranas externas, sendo que cada uma realiza variações ao acaso dos níveis de expressão de proteínas e, dessa maneira, cria um excesso de composições diferentes de proteínas de superfície para confundir o sistema imune adaptativo do hospedeiro. Análise, de sequências do genoma de diversas espécies de *Neisseria* sugerem que mais de 100 genes podem variar os seus níveis de expressão usando algum tipo de variação deste mecanismo. Terceiro, *Neisseria* é capaz de captar DNA do meio ambiente e incorporá-lo nos seus genomas, contribuindo assim para sua extraordinária variabilidade. Finalmente, *Neisseria* não possui vários sistemas de reparo de DNA presentes em outras bactérias como a *E. coli*, e a possibilidade de adquirir novas mutações é mais alta do que a média. Com todos estes mecanismos trabalhando em conjunto, não é surpresa que até o momento não se desenvolveu uma vacina efetiva contra infecções por *Neisseria*.

Apesar de a *Neisseria* ser um exemplo extremo, muitos outros patógenos bacterianos empregam um ou mais destes mecanismos para aumentar sua variação antigênica. Além disso, vários estudos mostraram que patógenos bacterianos isolados de pacientes com sintomas da doença são muito mais passíveis de ter defeitos nas suas vias de reparo de DNA do que isolados do mesmo patógeno provenientes de reservatórios do meio ambiente.

A evolução rápida em bactérias frequentemente acontece por *transferência horizontal de genes*, e não por mutação pontual. A transferência horizontal em bactérias em geral é mediada por bacteriófagos ou pela aquisição de plasmídeos. A bactéria adquire com facilidade ilhas de patogenicidade e plasmídeos virulentos de outras bactérias (ver Figura 24-5). Uma vez adquirido um novo grupo de genes relacionados à virulência, ela pode rapidamente estabelecer-se como agente de uma nova doença epidêmica humana. A *Yersinia pestis*, por exemplo, é uma bactéria endêmica de ratos e de outros roedores e apareceu pela primeira vez na história humana em 542 D.C., quando a cidade de Constantinopla foi devastada pela peste. A comparação de sequência da *Y. pestis* com sua aparentada mais próxima, a *Y. pseudotuberculosis*, agente de uma doença diarreica grave, sugere que a *Y. pestis* pode ter emergido como uma linhagem distinta não mais do que poucos milhares de anos atrás, não muito antes de sua devastadora emergência como agente causador da peste negra.

Replicação propensa a erros dominou a evolução viral

A replicação propensa a erros, mais do que rearranjos genômicos, é a principal responsável pela variação antigênica dos vírus. Os genomas retrovirais, por exemplo, adquirem na média uma mutação pontual a cada ciclo de replicação, porque a transcriptase reversa que produz DNA a partir do RNA viral não pode corrigir os erros de incorporação incorreta de nucleotídeos. Uma infecção típica por HIV não-tratada produzirá genomas de HIV com todas as possíveis mutações pontuais. De algum modo, a alta taxa de mutações é benéfica para o patógeno. Pelo processo microevolutivo da mutação e seleção dentro de cada hospedeiro, a maioria dos vírions muda com o tempo de uma forma eficiente para infectar macrófagos para uma forma mais eficiente para infectar células T, como descrito anteriormente (ver Figura 24-23). De maneira semelhante, uma vez que o paciente é tratado com um antirretroviral, o genoma viral pode rapidamente mutar e ser selecionado para resistência ao fármaco utilizado no tratamento. Se, no entanto, a taxa de erro da transcriptase reversa for muito alta, mutações deletérias poderão acumular-se rapidamente para a sobrevivência viral. Deste

modo, uma variante que obtém sucesso em um hospedeiro não necessariamente poderá se espalhar para outros, dado que um vírus mutado talvez não seja capaz de infectar um novo hospedeiro. Para o HIV-1, podemos estimar a extensão do impedimento pelo exame da diversidade de sequências entre diferentes indivíduos infectados. Notável é que um terço das posições dos nucleotídeos na sequência codificante do genoma viral não varia, e sequências nucleotídicas em algumas áreas do genoma, como o gene *env*, podem variar em torno de 30%. Esta extraordinária plasticidade genômica complica bastante as tentativas de obtenção de uma vacina contra o HIV, e poderá também levar à rápida emergência de cepas resistentes a fármacos (discutido adiante), assim como a rápida emergência de novas cepas de HIV. Comparações das sequências entre várias amostras de HIV e o vírus muito semelhante da imunodeficiência símia (SIV) de uma variedade de espécies de macacos diferentes sugerem que o tipo mais virulento de HIV, HIV-1, talvez tenha passado dos chimpanzés para os humanos por volta de 1930 (**Figura 24-42**).

Os vírus da influenza são uma importante exceção à regra de que as mutações propensas a erros dominaram a evolução viral. Eles são incomuns, pois seus genomas consistem em muitas (em geral oito) fitas de RNA. Quando duas amostras do vírus da influenza infectam o mesmo hospedeiro, as fitas das duas cepas podem se recombinar para formar um novo tipo de vírus da influenza. Antes de 1900, a cepa do vírus da influenza que infectava os humanos causava uma doença branda; uma cepa diferente do vírus da influenza infectava aves como galinhas e patos, porém raramente o homem. Em 1918, uma variante virulenta do vírus da influenza de aves (pássaros) cruzou a barreira natural entre as espécies para infectar o homem, engatilhando a epidemia catastrófica de 1918, chamada de gripe espanhola, que matou entre 20 e 50 milhões de pessoas no planeta, mais do que a I Guerra Mundial. Subsequentemente, a pandemia de influenza foi engatilhada por recombinação, na qual um novo segmento de DNA de uma forma aviária do vírus substituiu um ou mais segmentos do DNA viral que governa a resposta imune humana contra o vírus (**Figura 24-43**). Tais eventos de recombinação permitiram que o novo vírus se replicasse rapidamente e se espalhasse na população humana imunologicamente desprotegida. Geralmente, dentro de dois a três anos, a população humana desenvolve imunidade para o novo tipo recombinante do vírus, e como resultado a taxa de infecção diminui para um estágio estacionário. Em anos ditos normais, a influenza é uma doença branda em adultos saudáveis, porém pode colocar em risco de morte as crianças e os idosos. Nos anos de pandemia, no entanto, especialmente na pandemia de 1918, adultos saudáveis pareciam incomumente suscetíveis à infecção letal por influenza, talvez devido ao dano tecidual causado por uma resposta imune exacerbada. Dado que os eventos recombinatórios não são previsíveis, não é possível saber quando a próxima pandemia de influenza ocorrerá e quão severa ela será.

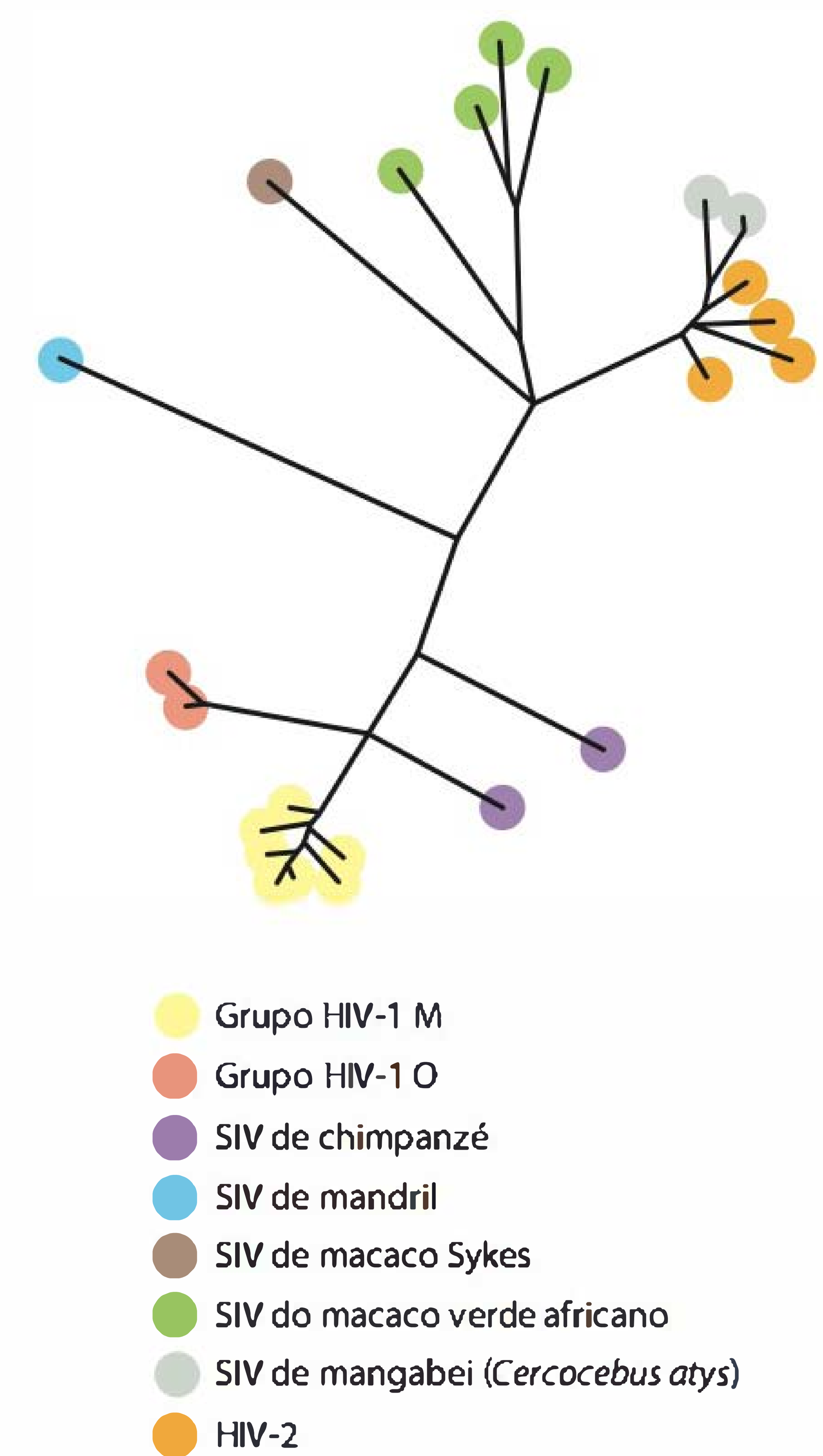


Figura 24-42 Diversificação do HIV-1, do HIV-2 e de cepas relacionadas de SIV. A distância genética entre qualquer duas amostras isoladas é encontrada seguindo o caminho mais curto que os relacionados na árvore. HIV-1 é dividido em dois grupos, maior (M) e forasteiro (O). O grupo HIV-1 é o responsável pela epidemia global da AIDS. HIV-1 ainda é subdividido em vários subtipos (de A a G, não nomeados na figura). O subtipo B é dominante na América e na Europa; B, C e E são dominantes na Ásia; e todos os subtipos são encontrados na África. Pelo menos dois vírus de macaco, chimpanzé e mandril são mais relacionados ao HIV-1 do que ao HIV-2, sugerindo que HIV-1 e HIV-2 surgiram de maneira independente. É estimado que a divergência de HIV-1 e SIV de chimpanzé tenha ocorrido pelos anos de 1930. A árvore foi construída a partir da sequência nucleotídica do gene *Gag*, usando um banco de dados contendo cerca de 16.000 sequências do vírus, isoladas ao redor do planeta.

Os patógenos resistentes a fármacos são um problema crescente

Se algumas atividades humanas, como viagens aéreas, têm favorecido a disseminação de certas doenças infecciosas, os avanços na saúde pública e na medicina têm evitado ou aliviado o sofrimento causado por muitas outras. As vacinas efetivas e os programas mundiais de vacinação eliminaram a varíola e reduziram enormemente a poliomielite, além de fazer com que muitas doenças infecciosas típicas da infância, como a caxumba e o sarampo, sejam hoje raridade nos países ricos e desenvolvidos. No entanto, ainda existem no mundo inteiro muitas doenças infecciosas graves, como a malária, para as quais não existe vacina disponível.

O desenvolvimento de fármacos curativos, em vez de fármacos que previnam as infecções, teve também um grande impacto na saúde humana. A classe de medicamentos de maior sucesso é a dos **antibióticos**, que matam as bactérias. A penicilina foi um dos primeiros antibióticos usados para o tratamento de infecções em humanos. Esse antibiótico foi introduzido na clínica no momento exato, evitando milhares de mortes de indivíduos infectados nos campos de batalha da II Guerra Mundial. Dado que as bactérias formam um reino distinto dos eucarióticos que elas infectam, muito da sua maquinaria básica para replicação, transcrição, tradução de DNA e metabolismo fundamental difere de seus hospedeiros. Tais diferenças nos permitiram achar fármacos antibacterianos que especificamente inibem tais processos em bactérias sem afetá-los no hospedeiro. A maioria dos antibióticos usados para tratar infecções bacterianas são pequenas moléculas que inibem a síntese macromolecular em bactérias por visar enzimas bacterianas que são distintas das enzimas dos eucariotos ou estão envolvidas em vias metabólicas, como biossíntese da parede, que estão ausentes no homem (**Figura 24-44** e Tabela 6-3).

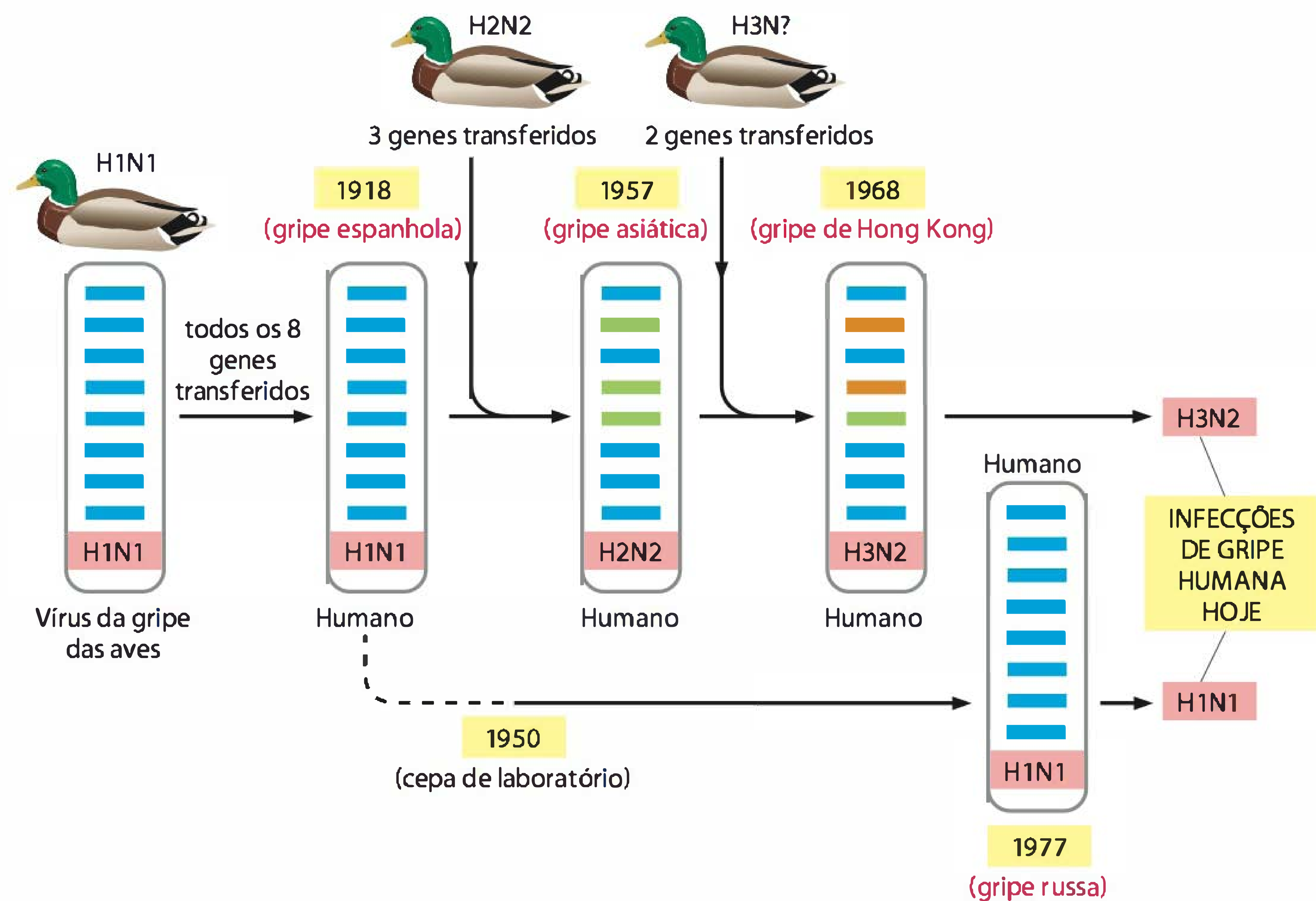


Figura 24-43 Modelo para a evolução da cepa pandêmica do vírus da influenza por recombinação. O vírus da influenza A é um patógeno natural de pássaros, particularmente aves aquáticas, e está sempre presente na população de aves selvagens. Antes de 1900, o vírus da influenza causava infecções brandas no homem. Em 1918, uma forma particularmente virulenta do vírus cruzou a barreira de espécies dos pássaros para os humanos e causou uma epidemia global devastadora. Esta amostra foi denominada H1N1, com referência à forma específica dos seus antígenos principais, hemaglutinina (HA ou H) e neuraminidase (NA ou N). Alterações no vírus geraram uma amostra menos virulenta, e a ascensão da imunidade adaptativa na população humana preveniu a pandemia de continuar em estações subsequentes, apesar de a cepa H1N1 continuar causando casos sérios da doença anualmente, sobretudo em crianças e idosos. Em 1957, uma nova pandemia emergiu quando os genes codificantes de HA e NA foram substituídos por genes equivalentes de um vírus de aves (*barras verdes*); a nova cepa (designada H2N2) não era sensível aos anticorpos gerados pelas pessoas previamente infectadas pela cepa H1N1 da influenza. Em 1968, outra pandemia foi engatilhada quando o gene HA de H2N2 foi substituído por outro gene de um vírus de aves; o novo vírus foi designado H3N2. Em 1977, houve uma re-emergência do vírus H1N1, que tinha sido previamente substituído quase que completamente pela cepa N2. Informação das sequências moleculares sugere que esta pandemia menor foi causada por uma liberação acidental de uma amostra de influenza conservada em laboratório desde 1950. Como indicado, a maioria das infecções humanas por influenza, hoje, é causada por cepas H1N1 e H3N2.

Os aviários trazem o homem para um contato próximo com um grande número de pássaros que podem transportar diferentes versões do vírus influenza. Os vírus de aves ocasionalmente podem causar uma doença fatal em humanos com contato direto com pássaros infectados (chamada de gripe das aves), porém até o momento estes vírus não adquiriram a capacidade de espalhar-se efetivamente de homem para homem. Monitorar o cruzamento de espécies e tentar predizer a origem da próxima epidemia séria de influenza permanece um desafio significante para a saúde pública.

A rápida evolução dos patógenos, no entanto, permitiu que as bactérias-alvo desenvolvessem resistência aos antibióticos muito rapidamente, sendo o espaço de tempo entre a introdução de um novo antibiótico na prática médica e o aparecimento de linhagens resistentes de não mais do que poucos anos. Do mesmo modo, a resistência a fármacos é um fenômeno comum entre vírus, quando as infecções são tratadas com agentes antivirais. A população viral em uma pessoa infectada com HIV tratada com o inibidor da transcriptase reversa AZT, por exemplo, irá desenvolver resistência ao fármaco em um espaço de poucos meses. O protocolo atual de tratamento de infecções por HIV envolve o uso simultâneo de três fármacos, o que minimiza a possibilidade de desenvolvimento de resistência.

Existem três estratégias gerais pelas quais os patógenos desenvolvem resistência aos fármacos. Os patógenos podem (1) alterar o alvo molecular do fármaco, de tal forma que este não seja mais sensível ao fármaco, (2) produzir uma enzima que destrói o fármaco, ou (3) evitar a chegada do fármaco ao alvo, por exemplo, por um bombeamento ativo do fármaco para o exterior do patógeno (**Figura 24-45**).

Geralmente, tendo o patógeno encontrado uma estratégia efetiva de resistência a fármaco, os novos genes adquiridos ou mutados que conferem resistência são disseminados na população de patógenos e podem até mesmo ser transferidos para patógenos de outras espécies que sejam tratados com o mesmo fármaco. O antibiótico *vancomicina*, bastante efetivo e caro, por exemplo, tem sido usado como uma última opção de tratamento em muitas infecções hospitalares graves de origem bacteriana que já tenham se mostrado resisten-

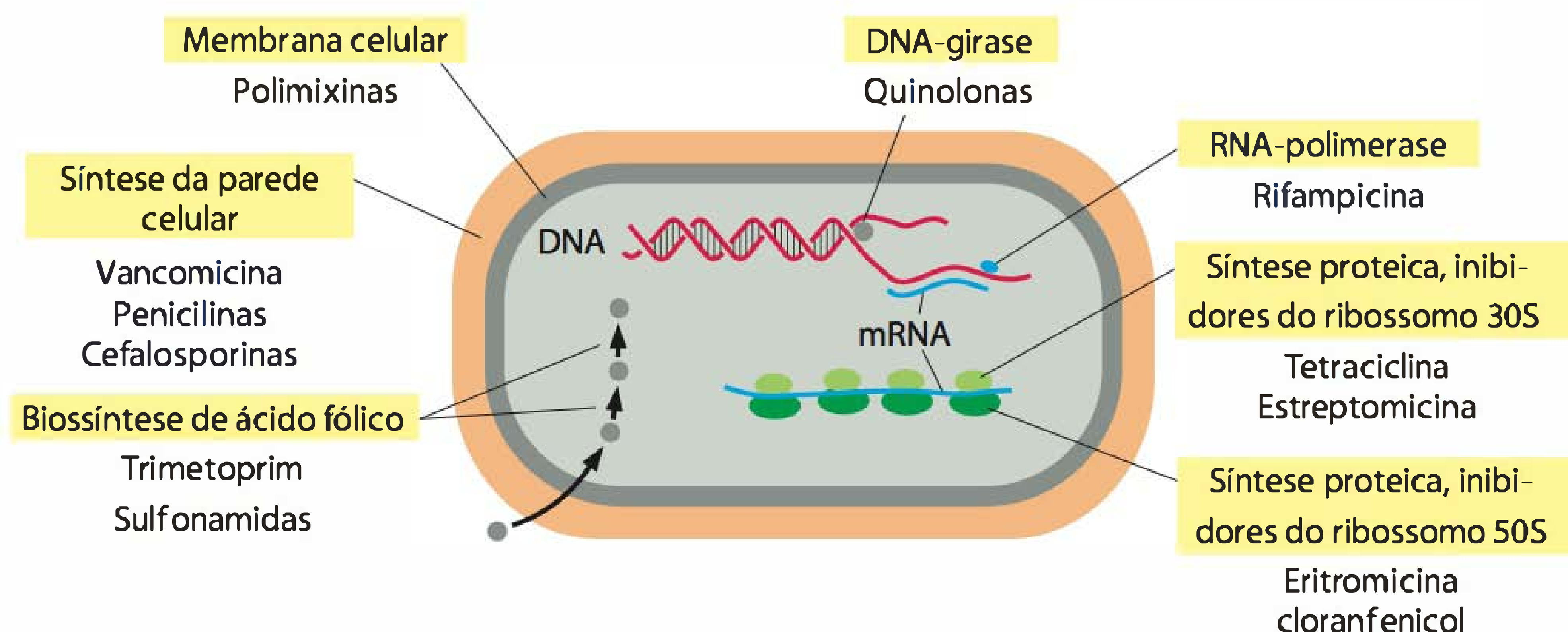


Figura 24-44 Alvos dos antibióticos. Apesar do número de antibióticos em uso clínico, eles possuem alvos limitados, realçados em *amarelo*. Alguns antibióticos representativos de cada classe estão listados. Quase todos os antibióticos usados para tratar infecções se encontram em uma ou outra categoria. A maioria inibe a síntese proteica bacteriana ou a síntese da parede bacteriana.

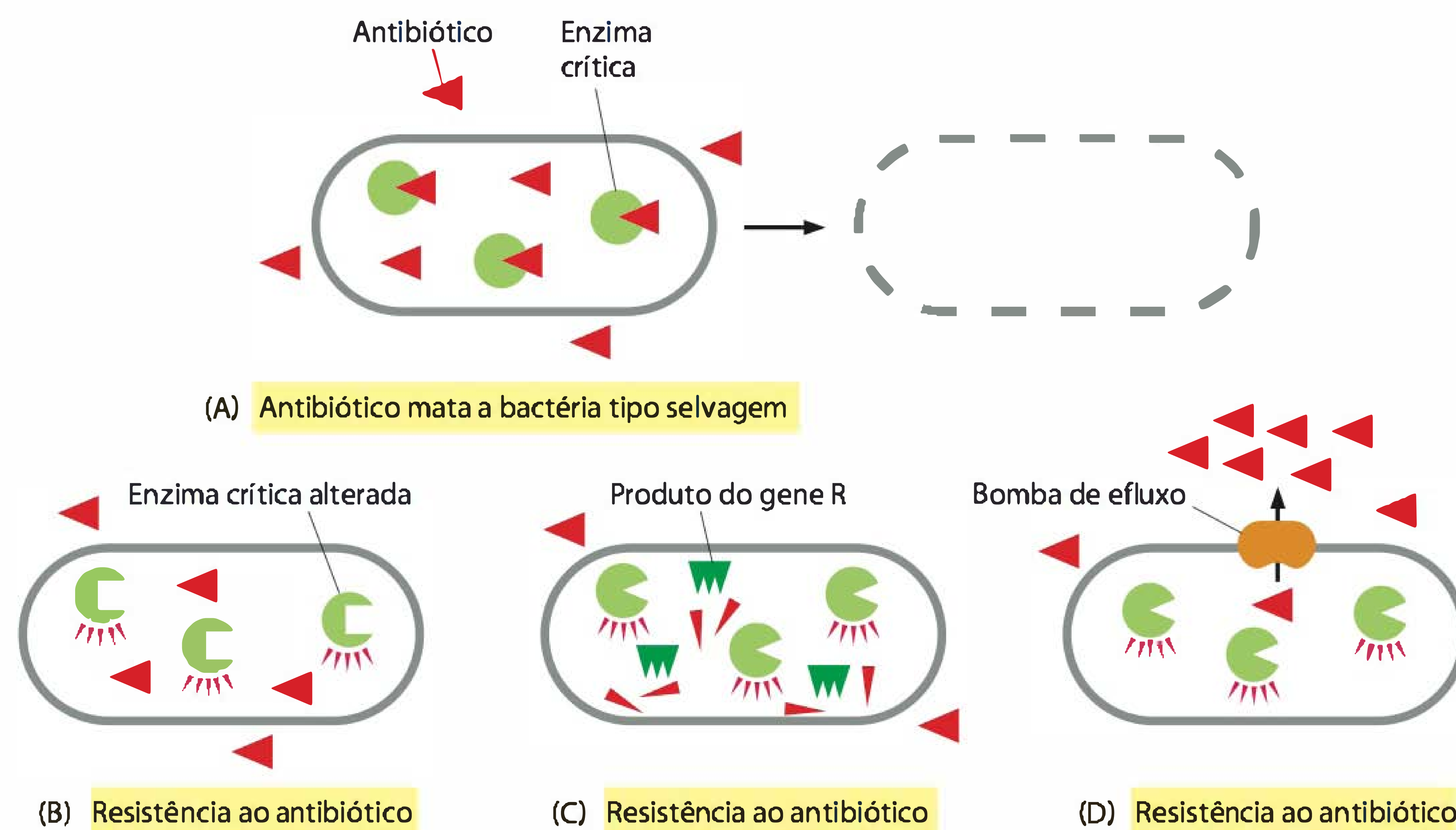


Figura 24-45 Três mecanismos gerais da resistência aos antibióticos. (A) Bactérias sensíveis imersas em um fármaco (*triângulos vermelhos*) que se liga a uma enzima crítica e a inibe (*verde-claro*) serão mortas devido à inibição da enzima. (B) Bactérias com enzima-alvo alterada não mais ligam ao fármaco, e assim sobrevivem e proliferam. Em muitos casos, ocorre resistência devida a mutações pontuais no gene que codifica a proteína-alvo. (B) Bactérias que expressam um gene de resistência (Fator R) que codifica uma enzima (*verde-escuro*) que degrada ou se liga covalentemente ao fármaco sobrevivem e proliferam. Algumas bactérias resistentes, por exemplo, sintetizam as enzimas β-lactamases, que clivam a penicilina e compostos semelhantes. (D) Outras bactérias resistentes expressam ou super-regulam uma bomba de efluxo que ejeta o fármaco do citoplasma bacteriano usando energia derivada da hidrólise do ATP ou do gradiente eletroquímico que cruza a membrana-plasmática bacteriana. Algumas bombas de efluxo como a bomba de efluxo TetR que confere resistência à tetraciclina, são específicas para um único fármaco; outras, chamadas de bombas de efluxos para resistência a múltiplos fármacos (MDR, *multi-drug resistance*), são capazes de exportar uma ampla variedade de fármacos que são diferentes estruturalmente e podem tornar uma bactéria resistente a um grande número de antibióticos diferentes em um único passo.

tes à maioria dos outros antibióticos conhecidos. A vancomicina interfere em um passo da via de biossíntese da parede celular bacteriana, por meio da ligação a uma região da cadeia de peptideoglicano em crescimento, evitando que ela sofra ligações cruzadas com outras cadeias (ver Figura 24-4). Pode ocorrer resistência se a bactéria sintetizar outro tipo de parede celular, usando subunidades diferentes que não liguem a vancomicina. O tipo mais eficiente de resistência à vancomicina depende de um transposon contendo sete genes; os produtos destes genes trabalham em conjunto, identificando a presença da vancomicina, desligando a via normal de síntese da parede bacteriana e, finalmente, produzindo uma parede celular diferente. Apesar de a união destes sete genes em um único transposon ter sido uma árdua tarefa evolutiva (o aparecimento de resistência à vancomicina levou 15 anos, bem mais do que o espaço típico de um ou dois anos), o transposon pode agora ser facilmente transmitido para muitas outras espécies de bactérias patogênicas.

De onde são originários os genes de resistência? Algumas vezes quando as bactérias estão sob pressão seletiva devido à exposição a fármacos, genes de resistência surgem por mutações espontâneas e se expandem dentro de uma população. Em muitos casos, no entanto, eles aparecem no genoma de um patógeno como um novo segmento de DNA adquirido por transferência horizontal, frequentemente transportados por transposons ou plasmídeos replicativos. Ao contrário das células eucarióticas, as bactérias comumente trocam materiais genéticos que cruzam a fronteira de espécies.

Genes de resistência a fármacos adquiridos por transferência horizontal parecem se originar de reservatórios ambientais, onde possuem um papel importante na competição entre os micro-organismos. Quase todos os antibióticos usados hoje para tratar infecções bacterianas não são criações sintéticas de químicos; ao contrário, a maioria deles são produtos naturais produzidos por fungos ou bactérias: a penicilina, por exemplo, é um produto do fungo *Penicillium*, e mais de 50% dos antibióticos correntemente usados na clínica são produzidos pelo gênero gram-positivo *Streptomyces.* Acredita-se que estes micro-organismos produzam compostos antimicrobianos como armas na sua competição com outros micro-organismos no meio ambiente. Muitos destes compostos provavelmente existem na Terra por pelo menos centenas de milhões de anos, o que é um amplo período de tempo para outros micro-organismos, assim como para os produtores, terem desenvolvido mecanismos de resistência. Testes às escuras de bactérias isoladas de amostras do solo que nunca foram deliberadamente expostas aos antibióticos revelam que tais bactérias são tipicamente resistentes a sete ou oito antibióticos amplamente usados na prática clínica. Quando micro-organismos patogênicos enfretam a pressão seletiva estabelecida pelo tratamento com antibióticos, eles podem aparentemente apelar para esta ampla e essencialmente inesgotável fonte de material genético para adquirirem resistência.

Assim como muitos outros aspectos das doenças infecciosas, o problema de resistência a fármacos tem sido exacerbado pelo comportamento humano. Muitos pacientes ingerem antibióticos no tratamento de doenças virais que não são afetadas por estes medicamentos, incluindo influenza, resfriados, dor de garganta e otites. O uso persistente e inadequado de antibióticos nesses casos pode, finalmente, levar ao desenvolvimento de resistência ao

antibiótico na flora normal; essa resistência pode subsequentemente ser transmitida aos patógenos. Por exemplo, vários surtos de diarreia causada por *Shigella flexneri* resistente a antibióticos originam-se dessa forma. O problema é especialmente grave em países onde os antibióticos são adquiridos sem a necessidade de uma receita médica, como é o caso do Brasil, onde mais de 80% das linhagens de *S. flexneri* encontradas em pacientes infectados são resistentes a quatro ou mais antibióticos. Os antibióticos também são usados de forma inadequada na agricultura e na pecuária, onde são comumente empregados como aditivos na alimentação dos animais para promover seu crescimento e saúde. Um antibiótico bastante semelhante à vancomicina comumente era utilizado na alimentação de bovinos na Europa. O aparecimento de resistência na flora normal desses animais é a explicação mais aceita para a origem da resistência à vancomicina, o que atualmente ameaça a vida de pacientes hospitalizados.

Dado que a aquisição de resistência a fármacos é quase inevitável, é crucial que continuemos a desenvolver tratamentos inovadores para doenças infecciosas. Devemos também tentar retardar o aparecimento da resistência a fármacos.

Resumo

Todos os patógenos compartilham a habilidade de interagir com as células hospedeiras por meio de mecanismos que promovam a replicação e a disseminação do patógeno; no entanto, existe uma grande diversidade de interações hospedeiro-patógeno. Os patógenos frequentemente colonizam o hospedeiro pela adesão ou pela invasão através das superfícies epiteliais que recobrem os pulmões, o intestino, a bexiga e outras superfícies de contato direto com o ambiente. Os patógenos intracelulares, incluindo todos os vírus, muitas bactérias e protozoários, replicam no interior da célula hospedeira, a qual foi invadida por uma série de mecanismos diferentes. Os vírus dependem muito da endocitose mediada por receptores para a invasão da célula hospedeira, ao passo que as bactérias exploram a fagocitose e as vias de adesão celular; em ambos os casos, a célula hospedeira providencia a maquinaria e a energia. Os protozoários, ao contrário, empregam estratégias características de invasão que, normalmente, necessitam de um gasto metabólico significativo por parte do invasor. Uma vez dentro da célula hospedeira, os patógenos devem procurar um nicho favorável para sua replicação, o que fazem frequentemente alterando o tráfego de membrana da célula hospedeira e explorando o citoesqueleto para a movimentação intracelular. Além de alterar o comportamento de células hospedeiras individuais, os patógenos em geral alteram o comportamento do organismo como um todo, com o objetivo de favorecer sua disseminação para outros hospedeiros. Os patógenos evoluem com rapidez, normalmente ocorrendo o aparecimento de novas doenças infecciosas e a aquisição, por parte de agentes de doenças infecciosas antigas, de novos mecanismos de escape das tentativas humanas de tratamento, de prevenção e de erradicação.

BARREIRAS CONTRA INFECÇÃO E O SISTEMA IMUNE INATO

Os seres humanos estão expostos a milhões de patógenos potenciais diariamente por meio de contato, de ingestão e de inalação. Nossa capacidade de evitar uma infecção depende, em parte, de nosso sistema imune adaptativo (discutido no Capítulo 25), que é capaz de lembrar contatos prévios com patógenos específicos e destruí-los quando acontece um novo ataque. As respostas imunes adaptativas, no entanto, são de desenvolvimento lento em uma primeira exposição a um novo patógeno, visto que os clones específicos de células B e T devem ser ativados e expandidos; assim, pode ser necessária uma semana ou mais para que esse processo seja efetivo. Em contraste, uma única bactéria, com tempo médio de duplicação de uma hora, poderá produzir aproximadamente 20 milhões de células-filhas e desencadear uma infecção plena, em um único dia. Assim, durante as primeiras horas críticas e os primeiros dias de exposição a um novo patógeno, dependemos de nosso **sistema imune inato** para nossa proteção. Como discutido no Capítulo 25, dependemos também do sistema imune inato para ativar a resposta imune adaptativa.

As respostas do sistema imune inato não são específicas para patógenos em particular, como o são as respostas imunes adaptativas. Geralmente, existem três linhas da defesa imune inata que podem prevenir uma infecção ou pará-la no começo, antes do sistema imune adaptativo ser ativado. A primeira delas são as barreiras físicas e químicas que previnem o

fácil acesso de micro-organismos ao interior do corpo humano. As barreiras incluem a grossa camada de células queratinizadas mortas que forma a superfície de nossa pele, as junções compactas entre as células epiteliais, o pH ácido do estômago e os componentes da camada de muco que inibem a colonização e mesmo matam bactérias patogênicas. A flora normal também tem um papel protetor nas superfícies corporais contra invasores por competir pelo mesmo nicho ecológico, e assim limitar a colonização.

A segunda linha de defesa inata compreende as respostas intrínsecas da célula pelas quais uma célula individual reconhece que está sendo infectada e toma medidas para danificar ou matar o invasor. A maioria das células que ingerem uma bactéria por fagocitose mediada pelo patógeno (ver Figura 24-26), por exemplo, imediatamente posiciona o fagossomo para ser fusionado ao lisossomo, expondo o organismo invasor a uma barragem de enzimas digestivas. Outro mecanismo de defesa intrínseco é a habilidade da célula hospedeira em degradar RNA de dupla-fita que é um intermediário comum da replicação viral; as células infectadas podem mesmo degradar um RNA de fita simples que possua identidade de sequência com a fita dupla gatilho. Esse mecanismo não apenas serve como uma defesa intrínseca efetiva contra muitas infecções virais, mas também permite que biólogos celulares manipulem a expressão gênica usando a técnica de RNA de interferência (RNAi).

A terceira linha da defesa imune inata depende de um conjunto de proteínas e células fagocíticas que reconhecem características conservadas do patógeno e se ativam rapidamente para ajudar a destruir o invasor. Entre elas estão as células fagocíticas profissionais, como os neutrófilos e macrófagos, as células matadoras naturais e o sistema do complemento. Enquanto o sistema adaptativo em termos evolutivos tem menos de 500 milhões de anos e está confinado a vertebrados, a resposta imune inata opera nos vertebrados e invertebrados, assim como em plantas, e os mecanismos básicos que a regulam são semelhantes nesses organismos. Como discutido no Capítulo 25, a resposta imune inata em vertebrados também é requerida para ativar a resposta imune adaptativa pela produção de sinais moleculares que ajudam a chamar o sistema imune adaptativo para a ação.

A superfície epitelial e as defensinas ajudam a prevenir a infecção

Em vertebrados, a pele e outras superfícies epiteliais, incluindo as que recobrem os tratos respiratório, intestinal e urinário (**Figura 24-46**), fornecem uma barreira física entre a parte interna do corpo e o mundo exterior. Uma camada de muco fornece uma proteção adicional contra danos de origem microbiana, química e mecânica do interior das superfícies epiteliais; muitos anfíbios e peixes possuem uma camada mucosa cobrindo suas peles. A cobertura de muco viscoso é feita primariamente de mucina secretada e outras glicoproteínas, e fisicamente ajuda a prevenir a adesão de patógenos ao epitélio, assim como facilita também a limpeza de patógenos pelo batimento dos cílios nas células epiteliais (discutido no Capítulo 23).

A camada de muco também contém substâncias que matam patógenos ou inibem sua proliferação. Entre os mais abundantes estão os peptídeos antimicrobianos chamados de **defensinas**, que são encontrados em todos os animais e plantas. Eles geralmente são curtos (12 a 50 aminoácidos), positivamente carregados e possuem domínios hidrofóbicos ou anfipáticos. Eles compreendem uma família diversa com um amplo espectro de atividades antimicrobianas, incluindo a habilidade de matar ou inativar bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos (incluindo leveduras), parasitas (incluindo protozoários e nematoides) e até vírus envelopados como o HIV. As defensinas são as mais abundantes proteínas em neutrófilos (ver adiante), que as usa para matar patógenos fagocitados.

É ainda incerta a maneira como as defensinas matam patógenos. Uma possibilidade é usarem seus domínios anfipáticos ou hidrofóbicos para se inserirem nas membranas de seus alvos e dessa forma romper a integridade da membrana. Um pouco de sua seletividade para patógenos e não para as células do hospedeiro pode vir da preferência por membranas que não possuem colesterol. Após o rompimento da membrana do patógeno, os peptídeos positivamente carregados também podem interagir com componentes internos da célula bacteriana, incluindo DNA. Por causa da natureza relativamente inespecifíca, da interação entre peptídeos antimicrobianos e os micróbios que eles matam é difícil para os patógenos adquirirem resistência a eles. Assim, em princípio, as defensinas e outros peptídeos antimicrobianos podem ser úteis como agentes terapêuticos para combater infecções, sozinhos ou em combinação com outros fármacos tradicionais.

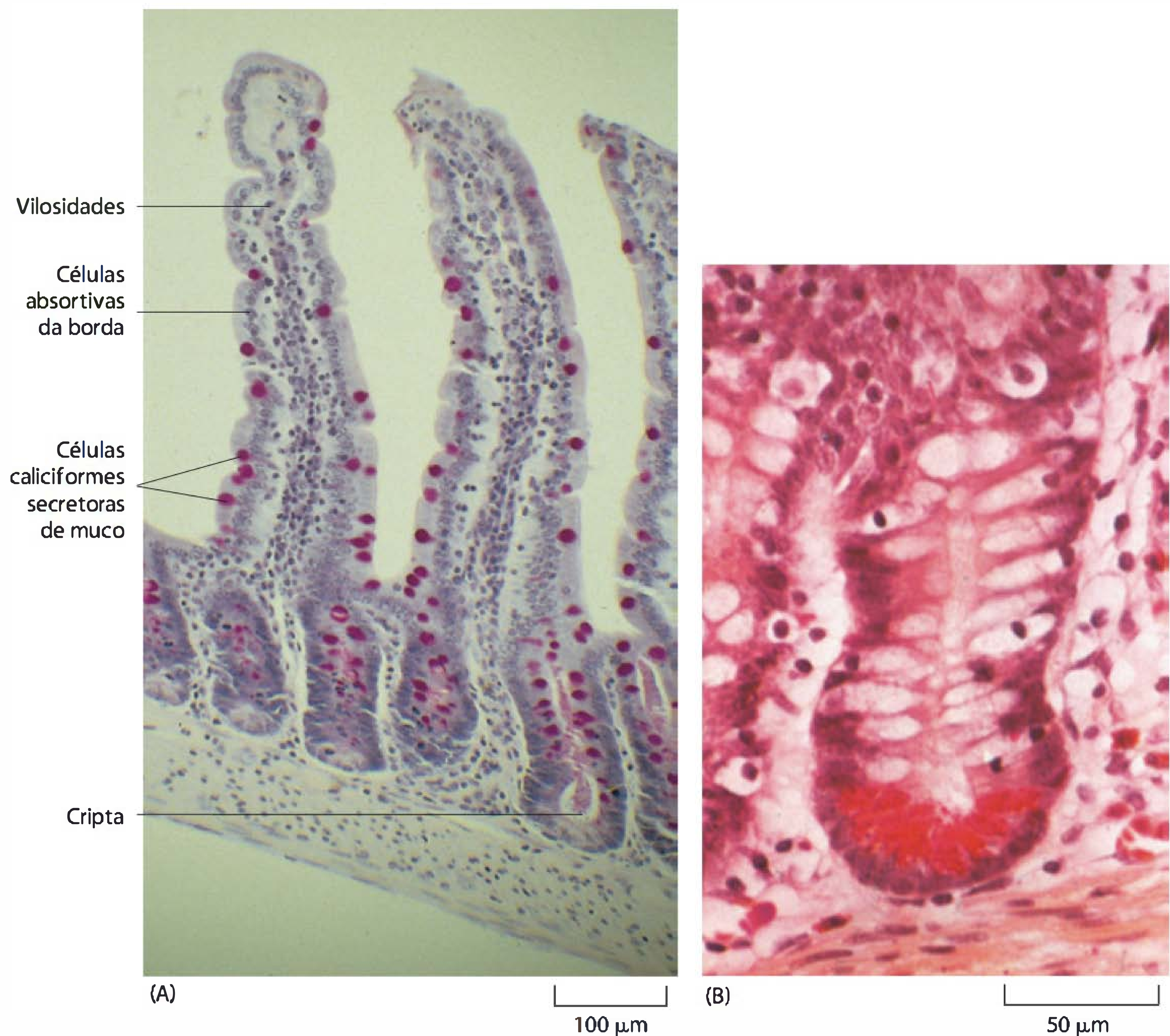


Figura 24-46 Defesas epiteliais contra a invasão microbiana. (A) Micrografia óptica de uma secção longitudinal através da parede do intestino delgado mostrando três vilosidades. As células caliciformes secretoras de muco estão coradas em *magenta*. A camada protetora de muco recobre a superfície exposta das vilosidades. Na base das vilosidades localizam-se as *Criptas*, onde as células epiteliais proliferam. (B) Aumento da cripta, corada por um método para mostrar os grânulos das células de Paneth (*escarlate*). Estas células secretam grandes quantidades de peptídeos antimicrobianos e defensinas no lúmen intestinal. (B, cortesia de H. G. Burkitt, de P. R. Wheater, Functional Histology, 2nd ed.London: Churchill-Livingstone, 1987.)

Células humanas reconhecem características conservadas dos patógenos

Micro-organismos algumas vezes ultrapassam as barreiras epiteliais. Depende então dos sistemas imune inato e adaptativo entrarem em ação para reconhecê-los e destruí-los sem afetar o hospedeiro. Consequentemente, o sistema imune deve ser capaz de distinguir o próprio do não-próprio. Discutiremos no Capítulo 25 como o sistema imune adaptativo faz isso. O sistema imune inato repousa sobre o reconhecimento de tipos particulares de moléculas que são comuns a muitos patógenos, mas ausentes no hospedeiro. As moléculas associadas a patógenos (chamadas de *patógeno-associadas* ou *imunoestimulantes associados a micróbio*) engatilham dois tipos de resposta imune inata – *resposta inflamatória* (discutida a seguir) e fagocitose por fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos) e por *células dendríticas,* que ativam células T do sistema imune adaptativo (discutido no Capítulo 25). Ambas as respostas inflamatória e fagocítica podem ocorrer rapidamente, mesmo que o hospedeiro nunca tenha sido previamente exposto a um patógeno em particular.

Os **imunoestimulantes associados a micróbio** são de vários tipos, vendo que a maioria não é exclusiva para patógenos, mas são encontrados em muitas bactérias benignas, assim como as prejudiciais. O início da tradução em bactérias difere do início da tradução em eucariotos pelo fato de uma *metionina formilada* em vez de uma metionina regular normalmente ser usada como primeiro aminoácido. Sendo assim, qualquer peptídeo contendo formilmetionina na porção N-terminal deve ser de origem bacteriana. Peptídeos contendo formilmetionina atuam como potentes quimioatraentes para neutrófilos, que migram rapidamente para a fonte de tais peptídeos e engolfam a bactéria que os está produzindo (ver Figura 16-101).

Em adição, moléculas que não ocorrem em hospedeiros multicelulares compõem a superfície externa de muitos micro-organismos, e estas moléculas também agem como imunoestimulantes. Elas incluem o peptideoglicano da parede celular e o flagelo da bactéria, assim como lipopolissacarídeos (LPSs) em bactérias gram-negativas (**Figura 24-47**) e ácidos

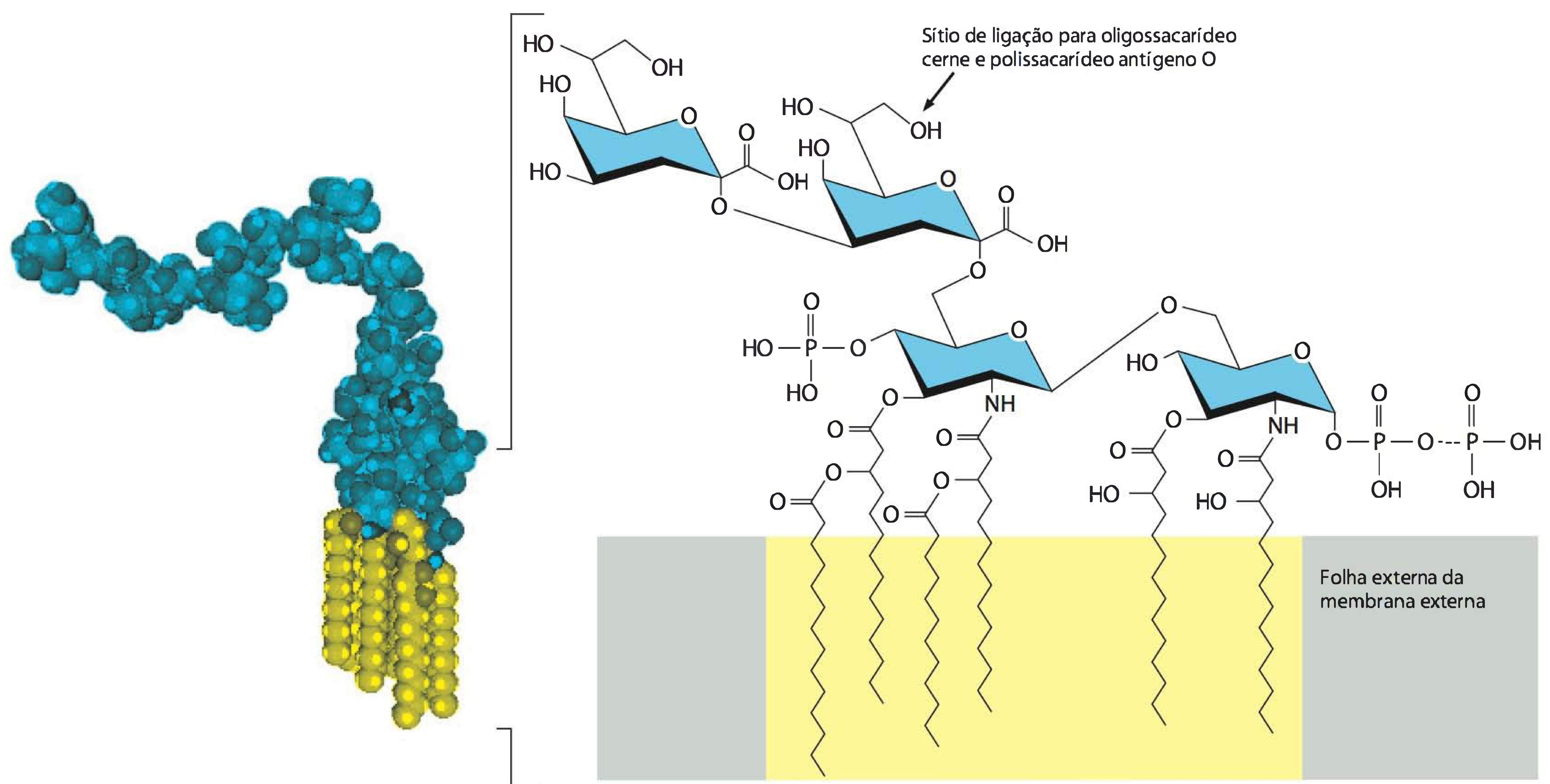


Figura 24-47 Estrutura do lipopolissacarídeo (LPS). À *esquerda* está representada a estrutura tridimensional da molécula de LPS, com os ácidos graxos mostrados em *amarelo* e os açúcares em *azul*. A estrutura molecular da base de LPS é mostrada à *direita*. A âncora de membrana hidrofóbica é feita de dois açúcares glicosamina ligados e atracados a três fosfatos e seis caudas de ácidos graxos. Ligada a esta estrutura básica está uma longa cadeia de açúcares, em geral bastante ramificada. Este esquema mostra o tipo mais simples de LPS que permite a sobrevivência de *E. coli*; ele possui apenas duas moléculas de açúcar na cadeia, e ambas são iguais (3-desoxi-D-mano-ácido octulossônico). Na posição indicada por uma *seta*, as bactérias gram-negativas tipo selvagem também ligam um *oligossacarídeo cerne* feito de 8 a 12 açúcares e um *antígeno O* longo, que é composto de uma unidade de oligossacarídeos repetida até 40 vezes. Os açúcares que compõem o oligossacarídeo cerne e o antígeno O são diferentes de uma espécie de bactéria para outra e mesmo entre diferentes linhagens da mesma espécie. Todas as formas de LPS são altamente estimulantes de uma forte resposta imune inata.

teicoicos em bactérias gram-positivas (ver Figura 24-4B). Eles também incluem moléculas da parede celular de fungos, incluindo manana, glucana e quitina. Muitos parasitas eucarióticos também contêm componentes únicos de membranas que atuam como imunoestimulantes, incluindo glicosifosfatidilinositol em *Plasmodium*. Para evitar uma resposta imune desnecessária, o hospedeiro tem de ser capaz de distinguir entre um imunoestimulante produzido por patógenos e as moléculas muito semelhantes ou idênticas liberadas pela flora normal. Em muitos casos, diferenças na concentração do imunoestimulante podem ser o suficiente; uma concentração crônica baixa da molécula pode ser monitorada pelo sistema imune sem provocar uma reação, enquanto o repentino aumento na concentração ou no aparecimento do imunoestimulante em áreas normalmente estéreis do corpo engatilhará uma resposta imune inata.

Sequências curtas no DNA bacteriano ou viral também podem agir como imunoestimulantes. O culpado é o "motivo CpG", que consiste no dinucleotídeo não-metilado CpG flanqueado por dois resíduos de purinas e dois 3′ pirimidinas. Esta sequência curta é pelo menos 20 vezes menos comum no DNA de vertebrados do que em DNA bacteriano ou viral, o que pode ativar uma resposta imune inata.

As várias classes de imunoestimulantes associados a micróbio frequentemente ocorrem em padrões repetidos, os quais são deste modo chamados de *padrões moleculares associados a patógenos* (*PAMPs, pathogen-associated molecular paterns*). Muitos tipos de receptores dedicados no hospedeiro, coletivamente chamados de **receptores de reconhecimento de padrões**, reconhecem tais padrões. Estes receptores incluem receptores solúveis no sangue (componentes do *sistema do complemento,* que será discutido adiante) e receptores embutidos na membrana, externos ou internos à célula do hospedeiro (incluindo membros da *família dos receptores semelhantes a Toll*, considerados mais tarde). Os receptores associados à célula têm duas funções: eles iniciam a fagocitose do patógeno e ativam um programa de

expressão gênica na célula do hospedeiro responsável pela resposta imune inata. Alguns dos componentes do sistema do complemento também ajudam na fagocitose e, em alguns casos, na morte direta do invasor, como discutido a seguir.

A ativação do complemento marca os patógenos para fagocitose ou para lise

O **sistema do complemento** consiste em aproximadamente 20 proteínas solúveis interativas, produzidas principalmente pelo fígado, que circulam no sangue e nos fluidos extracelulares. A maior parte destas proteínas é inativa até o momento inicial de uma infecção. Elas foram inicialmente identificadas pela capacidade de amplificar e "complementar" a ação dos anticorpos, mas alguns dos componentes do complemento são receptores de reconhecimento de padrões que podem ser ativados diretamente por imunoestimulantes associados a patógeno.

Os *componentes precoces do complemento* são ativados primeiro. Existem três grupos de componentes do complemento, pertencentes a três vias distintas de ativação do complemento – *a via clássica*, a *via de lectina* e a *via alternativa*. Os componentes iniciais do complemento das três vias atuam localmente para ativar C3, que é o componente-chave do sistema do complemento (**Figura 24-48**). Indivíduos com deficiência de C3 são suscetíveis a infecções bacterianas repetidas. Os componentes precoces e o C3 são proenzimas, as quais são ativadas em sequência por clivagem proteolítica. A clivagem de cada proenzima ativa, em série, o próximo componente que gerará uma serino-protease, a qual cliva a próxima proenzima da série e assim por diante. Como cada enzima ativada cliva várias moléculas da próxima proenzima da cadeia, a ativação dos componentes iniciais gera uma *cascata proteolítica* amplificadora.

Várias dessas clivagens liberam um pequeno fragmento de peptídeo ativo biologicamente que atrai células fagocíticas como neutrófilos e um fragmento maior que se liga à membrana. A ligação do fragmento maior a uma membrana celular, geralmente a membrana do patógeno, auxilia na passagem para a reação subsequente. Desse modo, a ativação do complemento fica bastante restrita à superfície particular da célula na qual o processo teve início. O fragmento grande de C3, chamado de C3b, liga-se covalentemente à superfície do patógeno, e então recruta fragmentos de C2 e C3 clivados para formar um complexo proteolítico (C4b, C2b, C3b) que catalisa os passos subsequentes na cascata do complemento. Receptores específicos nas células fagocíticas que aumentam a capacidade dessas células de fagocitarem o patógeno também reconhecem C3b. Adicionalmente, nas células B reconhecem C3b, que é a razão de patógenos recobertos por C3b serem especialmente eficientes na estimulação das células B para fazer anticorpos (discutido no Capítulo 25). O fragmento menor de C3 (chamado de C3a), assim como os fragmentos de C4 e C5

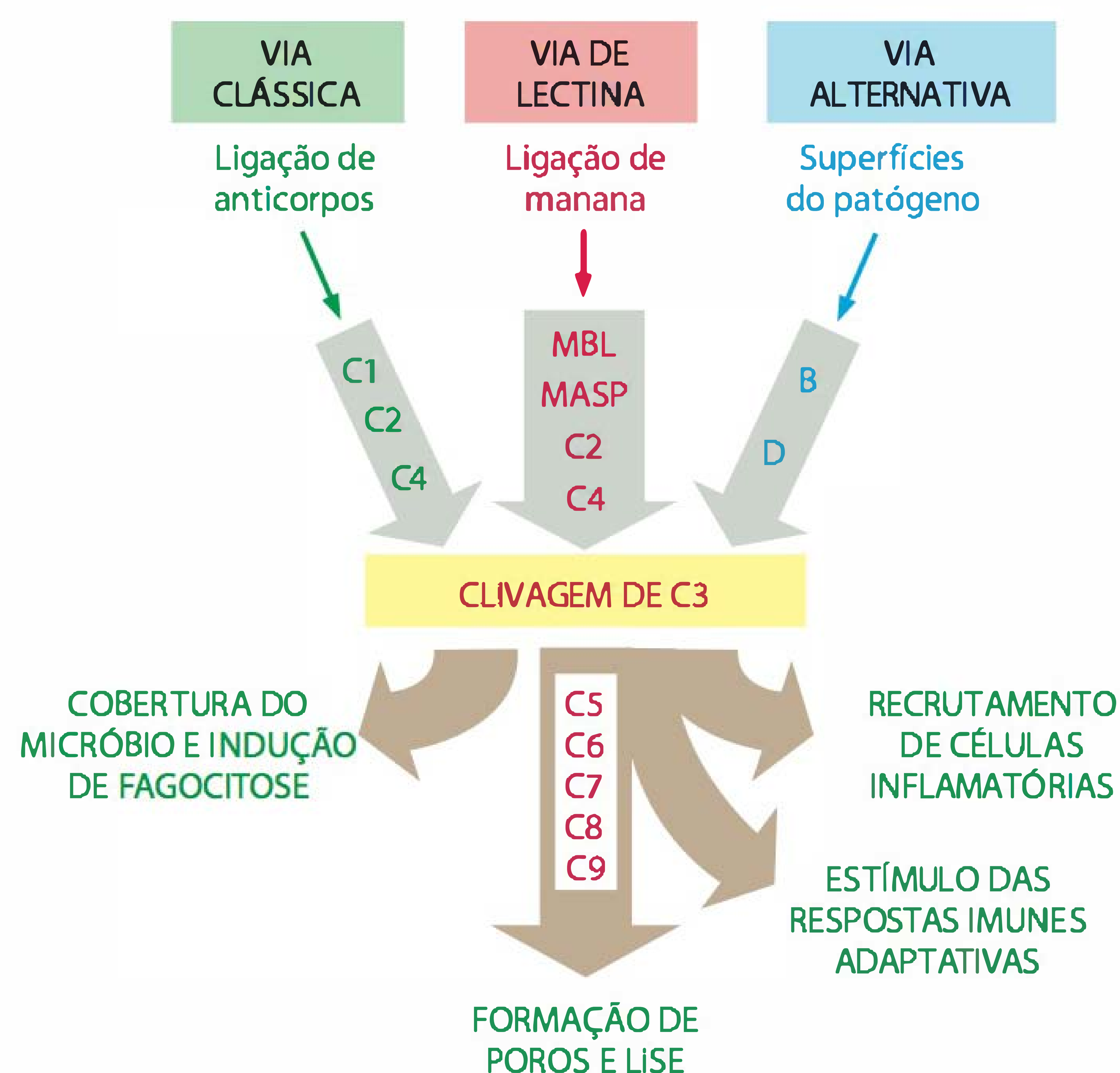


Figura 24-48 Os principais estágios na ativação do complemento pelas vias clássica, de lectina e alternativa. Nas três vias as reações de ativação do complemento em geral acontecem na superfície de um micróbio invasor, como as bactérias, e leva à clivagem de C3. C1-C9, lectina ligadora de manose (MBL), e serina-protease associada a MBL (MASP) e os fatores B e D são os componentes centrais do sistema do complemento; vários outros componentes regulam o sistema. Os componentes precoces são mostrados dentro de *setas em cinza*, enquanto os componentes tardios são vistos dentro de *setas em marrom*.

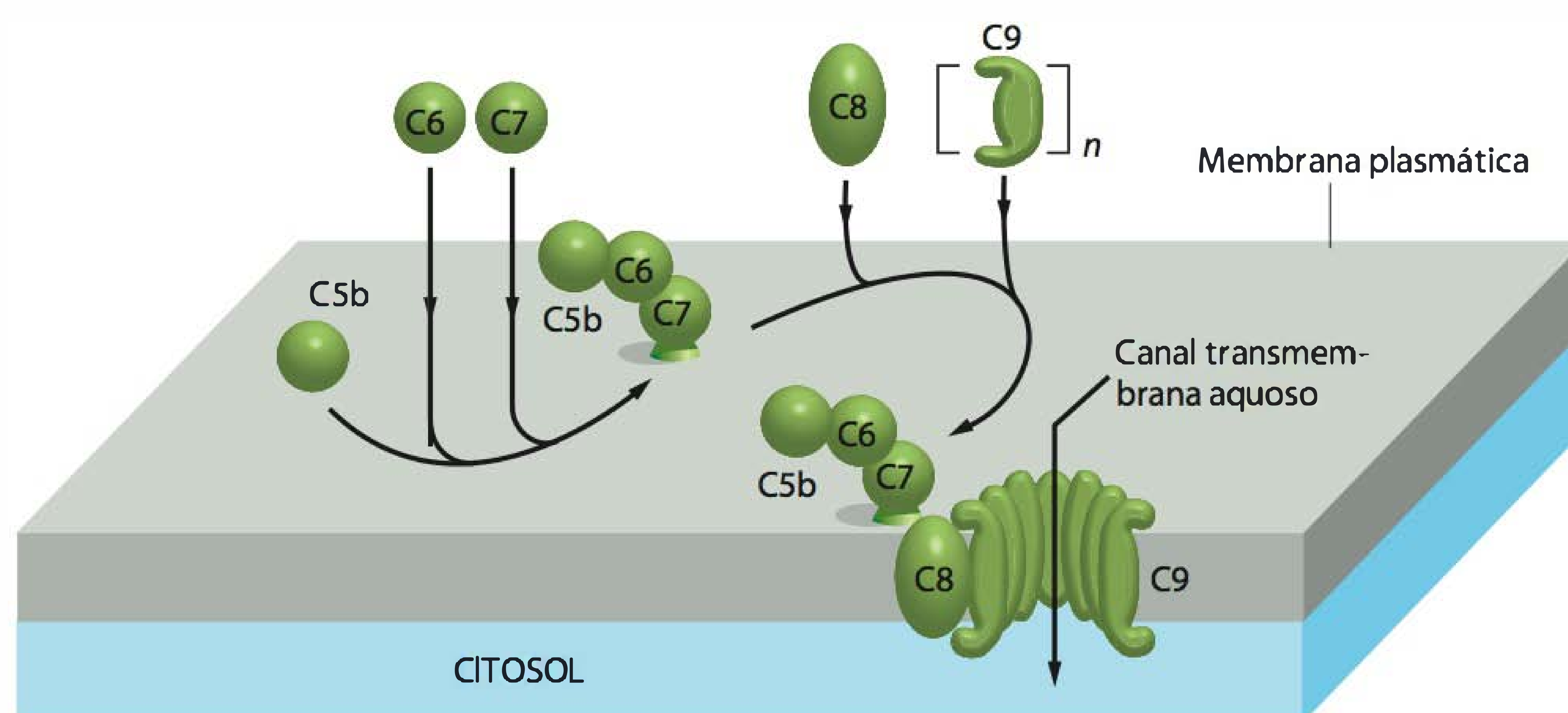


Figura 24-49 Montagem dos componentes tardios do complemento para formar o complexo de ataque à membrana. Quando C3b é produzido por uma das três vias de ativação do complemento, ele se torna imobilizado na membrana, onde recruta C4b e C2b para formar um complexo proteolítico. Este complexo então cliva o primeiro dos componentes tardios, C5, para produzir C5a (não-mostrado) e C5b, que permanece frouxamente ligado a C3b (não-mostrado) e rapidamente se associa com C6, C7 para formar C567, que então se liga via C7, firmemente à membrana, como ilustrado. Ao complexo é adicionado uma molécula de C8 para formar C5678. A ligação de uma molécula de C9 a C5678 induz uma mudança conformacional em C9 que expõe uma região hidrofóbica e faz com que C9 se insira na bicamada lipídica da célula-alvo, o que começa uma cadeia de reações na qual C9 alterado liga uma segunda molécula de C9, que se liga a outra molécula de C9, e assim por diante. Deste modo, uma cadeia de moléculas C9 forma um grande canal transmembrana na membrana do patógeno.

(ver Figura 24-48), atuam independentemente como sinais de difusão para promover respostas inflamatórias por meio do recrutamento de linfócitos e de fagócitos para a região da infecção.

Moléculas de anticorpos tipo IgG ou IgM (discutidas no Capítulo 25) ligadas à superfície do micróbio ativam a **via clássica**. A **lectina ligadora de manana**, a proteína que inicia a segunda via de ativação do complemento, é uma proteína sérica que forma arranjos de seis unidades de cabeças ligadoras de carboidratos, reunidas em torno de uma haste central semelhante à estrutura em pedúnculo do colágeno. Este arranjo liga-se especificamente a resíduos de manose e de fucose da parede celular da bactéria, os quais apresentam espaçamento e orientação que permitem um encaixe perfeito dos seis sítios ligadores de carboidratos, fornecendo um excelente exemplo de receptor de reconhecimento de padrões. Esses eventos iniciais de ligação nas vias clássica e de lectina provocam o recrutamento e a ativação dos componentes precoces do complemento. Moléculas na superfície dos patógenos frequentemente ativam a **via alternativa**; ativação da via clássica ou da via de lectina também ativa a via alternativa, formando uma alça de retroalimentação que amplifica os efeitos das vias clássica e de lectina.

As células hospedeiras produzem várias proteínas e modificações de superfície que previnem a reação do complemento que se realize na superfície. A molécula mais importante é a porção carboidrato ácido siálico, um constituinte comum de glicoproteínas e glicolipídeos da superfície celular. Dado que os patógenos geralmente não possuem tais componentes de superfície, eles são marcados para a destruição, enquanto as células hospedeiras são preservadas. Pelo menos um patógeno, *Neisseria gonorrhoeae*, a bactéria que causa a doença sexualmente transmissível gonorreia, desenvolveu a habilidade de explorar tais características de autoproteção do hospedeiro, recobrindo-se com uma camada de ácido siálico e efetivamente se escondendo do sistema de ativação do complemento.

C3b imobilizado à membrana, produzido por qualquer das três vias, engatilha uma cascata de reações ulteriores que leva à montagem dos componentes tardios do complemento para formar os *complexos de ataque à membrana* (**Figura 24-49**). Estes complexos são montados na membrana do patógeno, perto do sítio de ativação de C3, e possuem uma aparência característica em micrografias eletrônicas coradas negativamente, onde podem ser vistos formando poros aquosos através da membrana (**Figura 24-50**). Por esta razão, e também porque eles perturbam a estrutura da bicamada na sua vizinhança, eles fazem a membrana vazar e podem, em alguns casos, causar a lise da célula microbiana, semelhante às defensinas mencionadas anteriormente.

As propriedades autoamplificável, inflamatória e destrutiva da cascata do complemento tornam essencial que os componentes-chave sejam rapidamente inativados após serem gerados para garantir que o ataque não se espalhe pelas células hospedeiras vizinhas. A inativação é alcançada de pelo menos duas maneiras. Primeiro, proteínas específicas inibidoras no sangue ou na superfície das células hospedeiras encerram a cascata por clivagem ou ligação a certos componentes uma vez ativados por clivagem proteolítica. Segundo, muitos dos componentes ativados na cascata são instáveis; a menos que se liguem imediatamente a outro componente da cascata ou a uma membrana próxima, eles são rapidamente inativados.

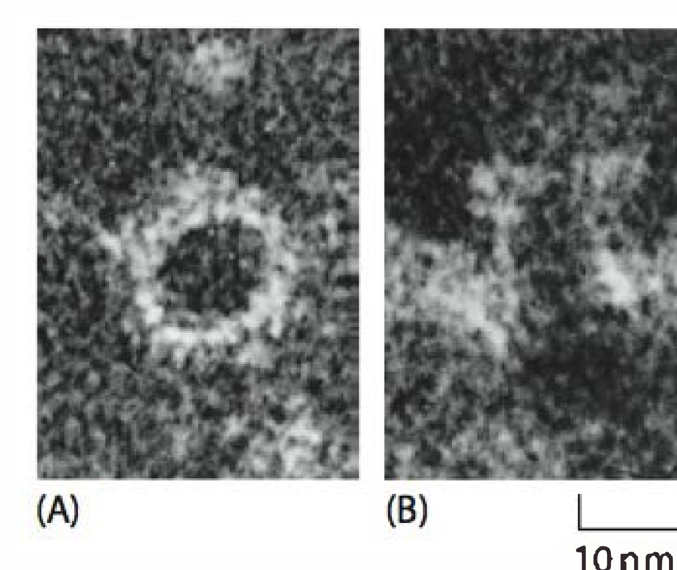


Figura 24-50 Micrografia eletrônica de lesões na membrana plasmática de um eritrócito negativamente corado. A lesão em (A) é vista *na face*, enquanto que em (B) é vista de lado como um canal transmembrana aparente. O corante negativo preenche o canal, que então parece negro. O eritrócito foi deliberadamente sensibilizado para ser suscetível à lise pelo complemento. (De R. Dourmashkin, *Immunology* 32:205-212, 1978. Com permissão de Blackwell Publishing).

As proteínas semelhantes a Toll e NOD pertencem a uma antiga família de receptores de reconhecimento de padrões característicos

Vários receptores de reconhecimento de padrões da superfície de células de mamíferos, responsáveis pelo engatilhamento da resposta imune inata, são membros da família do **receptor semelhantes a Toll** (**TLR**, *Toll-like receptor*). Toll em *Drosophila* é uma proteína transmembrana com um domínio extracelular consistindo em uma série de repetições ricas em leucina (ver Figura 15-82). Foi originalmente identificado como uma proteína envolvida no estabelecimento da polaridade dorso-ventral durante o desenvolvimento de embriões de mosca (discutido no Capítulo 22). No entanto, Toll também está envolvido na resistência da mosca adulta a infecções por fungos. A via intracelular de transdução de sinal ativada *downstream* de Toll, quando a mosca é exposta a um fungo patogênico, leva à translocação da proteína NF-κB (discutida no Capítulo 15) para o interior do núcleo, onde esta ativa uma série de genes, incluindo aqueles que codificam defensinas antifúngicas. As repetições ricas em leucina encontradas em Toll e TLR são motivos estruturais que são úteis para ligar uma ampla variedade de ligantes. Ao lado do seu papel no reconhecimento de patógenos em animais e plantas, proteínas com repetições ricas em leucina têm um papel importante em transdução de sinal, reparo de DNA e adesão célula-célula e célula--matriz.

Nos humanos existem pelo menos dez TLRs, tendo sido demonstrado que vários deles participam ativamente no reconhecimento de imunoestimulantes de bactéria, vírus, fungos e parasitas. Diferentes ligantes ativam TLRs diferentes: TLR4, por exemplo, reconhece lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de bactérias gram-negativas, TLR reconhece DNA CpG, e TLR reconhece a proteína do flagelo. A maioria dos TLRs está na superfície celular; eles são abundantes, por exemplo, na superfície de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, assim como na superfície de células epiteliais que revestem os tratos respiratório e intestinal. Outros, no entanto, estão associados a membranas intracelulares, onde podem detectar patógenos intracelulares. Os TLRs atuam como um sistema de alarme para alertar aos sistemas de resposta imune inato e adaptativo que uma infecção irá ocorrer. Em mamíferos, eles ativam uma variedade de vias de sinalização intracelulares que por seu turno estimulam a transcrição de centenas de genes, especificamente aqueles que promovem a resposta inflamatória (discutido adiante) e ajudam a induzir uma resposta imune adaptativa (**Figura 25-51**).

Uma segunda família de receptores de reconhecimento de padrões é exclusivamente intracelular. Eles são chamados de **proteínas NOD** e também possuem motivos repetidos

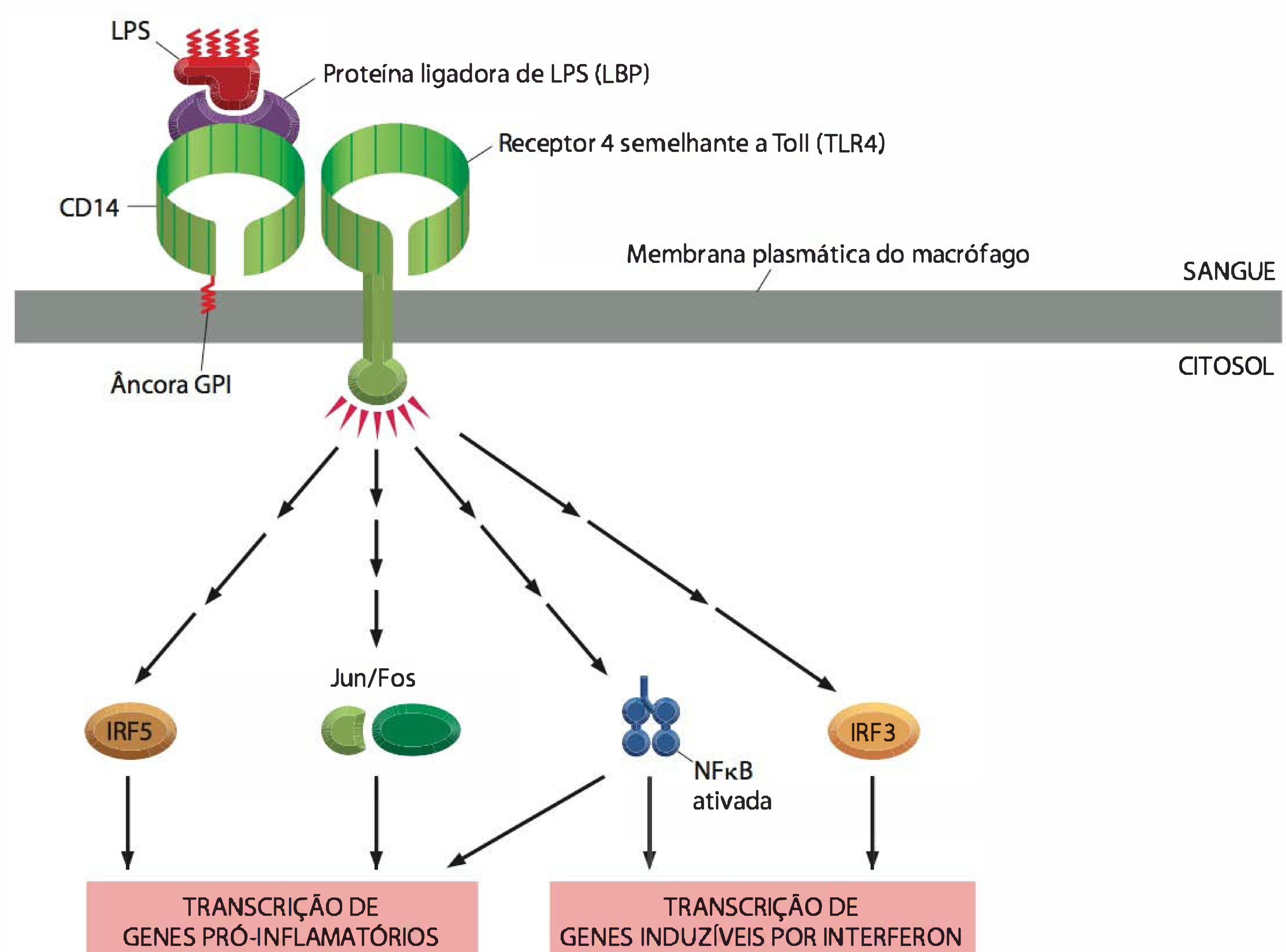


Figura 24-51 A ativação de macrófagos por lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é ligado à proteína ligadora de LPS (LBP, *LPS-Binding protein*) no sangue, e este complexo liga-se ao receptor CD14 que se encontra ancorado por GPI à superfície do macrófago. A seguir, este complexo ternário ativa o receptor 4 semelhante a Toll (TLR4), que por sua vez ativa múltiplas vias de sinalização *downstream*. Como resultado, quatro proteínas reguladoras de genes são ativadas, incluindo NFκB, um complexo AP1 de Jun e Fos, e dois fatores reguladores de interferons, IRF3 e IRF5. Essa resposta transcricional, forte e multifacetada resulta na produção de interferons e citocinas pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas que recrutam várias células brancas do sangue para o local da ativação de macrófagos, refletindo o perigo significante que o macrófago percebe quando encontra uma alta concentração de LPS.



Figura 24-52 Doença microbiana em uma planta. As folhas de tomate aqui mostradas estão infectadas com o fungo de folhas *Cladosporium fulvum*. Resistência a esse tipo de infecção depende do reconhecimento de uma proteína fúngica por receptores da célula hospedeira que são estruturalmente relacionados a TLRs. (Cortesia de Jonathan Jones.)

ricos em leucina. Funcionalmente, são semelhantes aos TLRs, porém reconhecem um conjunto distinto de ligantes, incluindo componentes da parede bacteriana. As formas alélicas diferentes de NODs e TLRs que um indivíduo expressa desempenham uma parte importante em influenciar a suscetibilidade a certas doenças infecciosas; polimorfismos particulares em TLR4 e TLR5, por exemplo, correlacionam-se com susceptibilidade a *Legionella pneumophila,* e membros de famílias que expressam um alelo particular de NOD2 têm uma grande e crescente chance de sofrer da doença de Crohn, uma doença inflamatória do intestino delgado que, ao que parece, é engatilhada por uma infecção bacteriana.

Proteínas relacionadas a Toll, TLRs e NODs estão aparentemente envolvidos com a imunidade inata em todos os organismos multicelulares. Em plantas, proteínas com repetições ricas em leucina e com domínios homólogos à porção citosólica dos TLRs são requeridas para resistência aos patógenos virais, bacterianos e fúngicos (**Figura 24-52**). Assim, pelo menos duas famílias de proteínas que funcionam na imunidade inata – as defensinas e as famílias TLR/NOD – parecem ser evolutivamente muito antigas, talvez de muito antes da divisão entre animais e plantas, há mais de um bilhão de anos. Sua conservação durante a evolução ressalta a importância da resposta imune inata na defesa contra patógenos microbianos.

As células fagocíticas caçam, englobam e destroem os patógenos

Em todos os animais, tanto nos vertebrados quanto nos invertebrados, o reconhecimento de invasores microbianos normalmente é seguido por seu rápido englobamento pelas células fagocíticas. As plantas, no entanto, não possuem este tipo de resposta imune inata. Nos vertebrados, os *macrófagos* são fagócitos profissionais que residem em todos os tecidos do corpo e são especialmente abundantes em áreas que apresentam alto potencial de sofrer infecção, como os tratos respiratório e intestinal, por exemplo. Também estão presentes em grande número nos tecidos conectivos, no fígado e no baço. Estas células de longa duração patrulham os tecidos do organismo e estão entre as primeiras células a estabelecer contato com os micróbios invasores. Pertencentes à segunda maior família de células fagocíticas nos vertebrados, os *neutrófilos* são células de curta duração, abundantes no sangue, mas normalmente ausentes em tecidos saudáveis normais. Eles são rapidamente recrutados para a região de infecção tanto por macrófagos ativados quanto por moléculas como os peptídeos contendo formilmetionina liberados pelos próprios patógenos e pelos fragmentos de peptídeos de componentes do complemento. Neutrófilos podem detectar quimioatraentes derivados do complemento em concentrações tão baixas quanto 10^{-11} M.

Os macrófagos e os neutrófilos apresentam uma grande diversidade de receptores de superfície celular que permitem a estas células reconhecer e englobar os patógenos. Entre esses receptores encontram-se os receptores de reconhecimento de padrões, como os TLRs, receptores para anticorpos produzidos pelo sistema imune adaptativo e receptores para o componente C3b do complemento. A ligação do ligante em qualquer um desses receptores induz a polimerização de actina na região de contato com o patógeno, fazendo com que a membrana citoplasmática do fagócito envolva o patógeno e englobe-o em um grande fagossomo delimitado por membranas (**Figura 24-53**). Apesar de algumas bac-

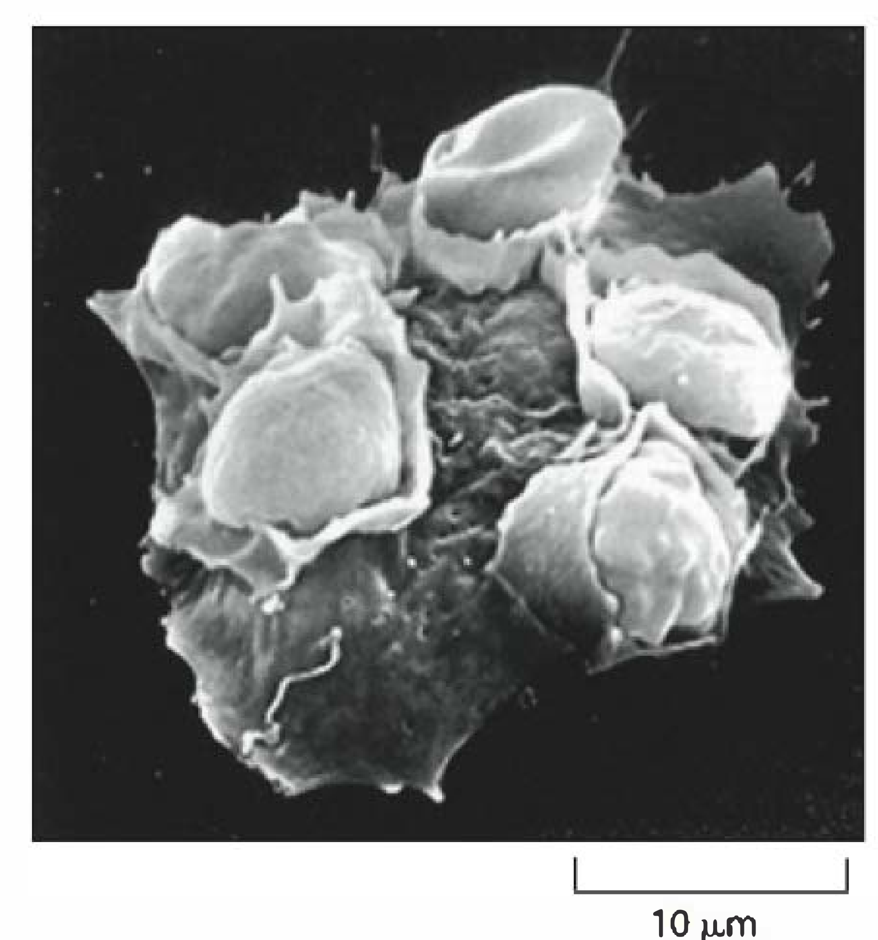


Figura 24-53 Fagocitose. Esta micrografia eletrônica de varredura mostra um macrófago em vias de destruir cinco células vermelhas sanguíneas que foram recobertas com um anticorpo contra glicoproteínas de superfície. (De E. S. Gold et al., *J. Exp. Med.* 190:1849-1856, 1999. Com permissão de Rockefeller University Press.)

térias poderem ativamente induzir uma célula hospedeira, como uma célula epitelial, a fagocitá-las como um mecanismo para invasão da célula (ver Figura 24-25) a fagocitose por macrófagos ou neutrófilos em geral leva à morte do patógeno ingerido. Não é surpreendente que alguns patógenos usem mecanismos específicos para evitar a fagocitose por macrófagos ou neutrófilos. Uma estratégia é secretar uma grossa camada de polissacarídeos, chamada de *cápsula,* que bloqueia o acesso de componentes do complemento à superfície bacteriana e ainda torna fisicamente difícil para a célula fagocítica se ligar e englobar a bactéria. Outra estratégia usada por *Yersinia pestis* (o agente causal da peste bubônica), por exemplo, é secretar uma toxina dentro do macrófago via sistema de secreção tipo III (ver a Figura 24-8) que rompe a montagem do citoesqueleto de actina e assim previne a fagocitose.

Uma vez que o patógeno tenha sido fagocitado, os macrófagos ou os neutrófilos utilizam uma incrível diversidade de armas para matá-lo. Exposição aos imunoestimulantes derivados de micróbios ou a sinais químicos produzidos pela resposta imune contra o patógeno aumenta o poder de fagocitar e de matar do fagócito. Esta exposição é considerada "ativada" porque o fagócito fica em um estado de alerta alto, no qual não apenas é mais efetivo na fagocitose e na liquidação de patógenos, como também libera citocinas para atrair mais células brancas para o sítio da infecção. A localização do armamento do fagócito é prontamente visível no microscópio óptico ou eletrônico como organelas densas delimitadas por membranas chamadas de *grânulos*. Estes derivativos especializados do lisossomo se fusionam com o fagossomo liberando enzimas como a lisozima e hidrolases ácidas que degradam a parede celular e proteínas do patógeno. Os grânulos contêm também defensinas, os peptídeos antimicrobianos que representam 15% do total de proteínas nos neutrófilos. Em adição, os fagócitos montam *complexos NADPH-oxidase* na membrana do fagolisossomo, que catalisa a produção de compostos altamente tóxicos, incluindo superóxido (O_2^-) hipoclorito (HOCl, o ingrediente ativo da clorofina), água oxigenada e radicais hidroxila. Um aumento transiente no consumo de oxigênio pelas células fagocíticas, chamado *de explosão respiratória*, acompanha a produção dos compostos tóxicos. Não são somente os compostos derivados do oxigênio altamente reativos que lesionam o patógeno na armadilha do fagolisossomo. A ação da NADPH-oxidase transporta elétrons para o fagolisossomo e induz um movimento compensatório de K^+ em conjunto com o elétron cujo efeito imediato é a diminuição do pH. O pH alto no fagolisossomo ativa um grupo potente de proteases neutras, as quais o pH baixo nos grânulos lisossomais conservou inativas antes da fusão com o fagossomo. As proteases neutras rapidamente destroem o patógeno encarcerado no fagolisossomo. Enquanto os macrófagos geralmente sobrevivem à matança e vivem para matar de novo, os neutrófilos em geral não sobrevivem. Neutrófilos mortos e morrendo são o maior componente do pus que se forma em feridas agudamente infectadas. A coloração esverdeada do pus ocorre devido à presença em abundância no neutrófilo da enzima contendo cobre mieloperoxidase, que é um dos componentes ativos na explosão respiratória.

Se um patógeno é grande demais para ser fagocitado (p. ex., um grande parasita como um nematódeo), um grupo de macrófagos, de neutrófilos ou de eosinófilos (discutidos no Capítulo 23) vai juntar-se em torno do invasor. Eles vão secretar suas defensinas e outros produtos lisossomais por exocitose e liberar os produtos tóxicos do espasmo respiratório (**Figura 24-54**). Esta barreira geralmente é suficiente para a destruição do patógeno. Em alguns casos foi observado que neutrófilos ejetam grandes quantidades de sua cromatina com o conteúdo dos seus grânulos. O DNA ejetado com suas histonas ligadas forma uma rede pegajosa que prende as bactérias próximas, prevenindo o escape (**Figura 24-55**). Dado que sua função precípua é se sacrificar para matar os patógenos invasores, os neutrófilos não hesitam em usar todas as armas disponíveis incluindo o seu próprio DNA, para cumprir a tarefa.

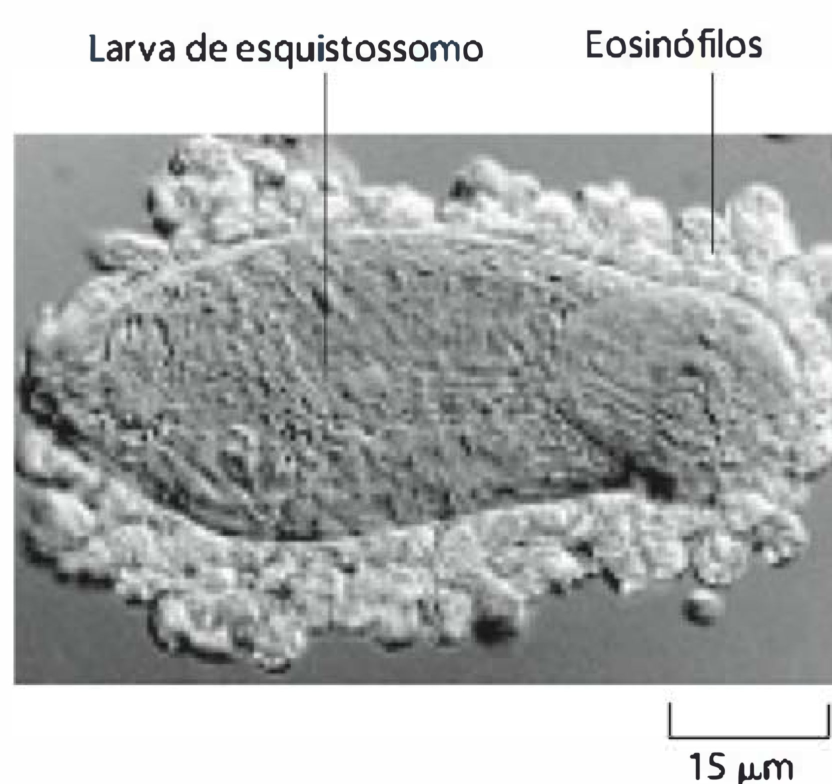


Figura 24-54 Eosinófilos atacando uma larva de esquistossomo. Os parasitas grandes, como os vermes, não podem ser ingeridos por fagócitos. Quando a larva é recoberta por anticorpos ou por complemento, no entanto, os eosinófilos e as outras células brancas do sangue podem reconhecê-lo e atacá-lo coletivamente. (Cortesia de Anthony Butterworth.)

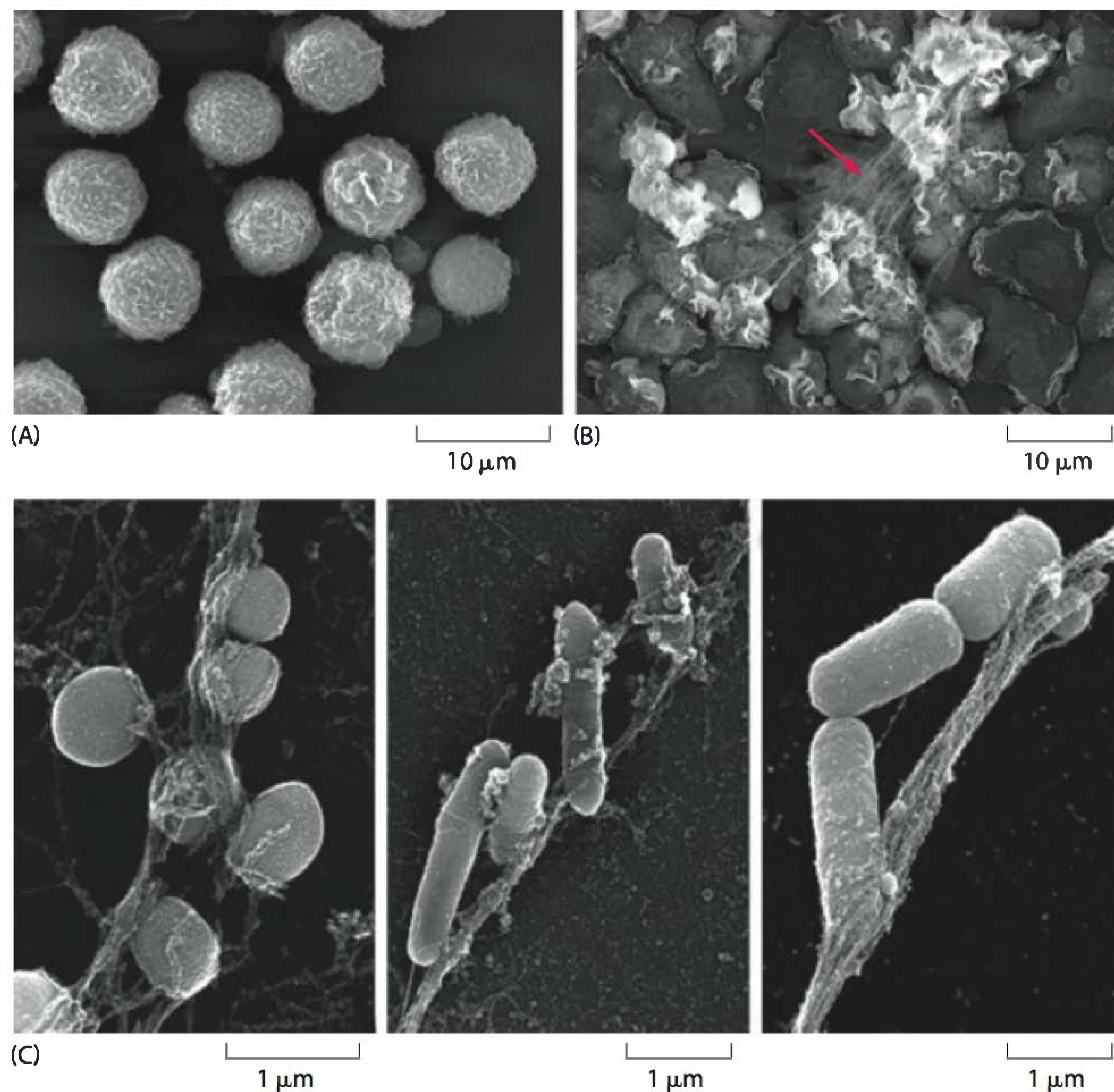


Figura 24-55 Neutrófilos ejetam a sua cromatina para prender as bactérias em uma rede pegajosa. (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando neutrófilos em repouso. (B) Neutrófilos ativados com muitas protrusões e associados a fitas fibrosas (*seta*). As fitas contêm DNA e histonas, e parece ser cromatina do núcleo do neutrófilo que foi ejetado durante o processo de ativação. (C) A cromatina pegajosa pode encarcerar muitos tipos diferentes de bactérias, incluindo (da esquerda para a direita) *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Shigella flexneri*. (De V. Brinkmann et al., *Science* 303:1532-1535, 2004. Com permissão de AAAS.)

Os macrófagos ativados contribuem para a resposta inflamatória nos sítios da infecção

Quando um patógeno invade um tecido, ele quase sempre provoca uma **resposta inflamatória**. Esta resposta é caracterizada por dor, vermelhidão, calor e inchaço no local da infecção (os médicos reconheceram estes quatro sinais da inflamação, em latim *dolor, rubor, calor* e *turgor*, há milhares de anos). Os vasos sanguíneos se dilatam e se tornam permeáveis aos fluidos e às proteínas, levando a um inchaço localizado e ao acúmulo de proteínas sanguíneas que auxiliam na defesa, como os componentes da cascata do complemento. Ao mesmo tempo, as células epiteliais que revestem os vasos sanguíneos locais são estimuladas e expressam moléculas de adesão celular (discutido no Capítulo 19) que facilitam a ligação e o extravasamento de células brancas do sangue, como neutrófilos, linfócitos e monócitos (os precursores sanguíneos dos macrófagos).

Enquanto os macrófagos em geral morrem no sítio da inflamação, os macrófagos frequentemente sobrevivem ao encontro inicial com o invasor e podem migrar para outras partes do corpo. Patógenos que sobrevivem dentro do macrófago como a bactéria *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, por exemplo, podem usar o macrófago para disseminar a infecção localizada para sítios distantes no corpo, convertendo uma invasão local menor do intestino em uma doença severa sistêmica, a febre tifoide.

Várias moléculas de sinalização medeiam a resposta inflamatória no local da infecção. A ativação de TLRs resulta na produção tanto de moléculas sinalizadoras lipídicas, como as prostaglandinas, quanto proteicas (ou peptídeos), como as citocinas (discutidas no Capítulo 15), todas contribindo para a resposta inflamatória, assim como fazem fragmentos do complemento liberados durante a ativação do complemento. Algumas das citocinas produzidas pelos macrófagos ativados são quimioatratores (conhecidas como *quimiocinas*). Algumas quimiocinas atraem neutrófilos, os quais serão as primeiras células recrutadas em grandes quantidades para o local da nova infecção. Outras citocinas engatilham a *febre*, um aumento da temperatura corporal. No balanço geral, a febre ajuda a combater a infecção, porque a maioria dos patógenos bacterianos e virais prolifera melhor a temperaturas mais baixas,

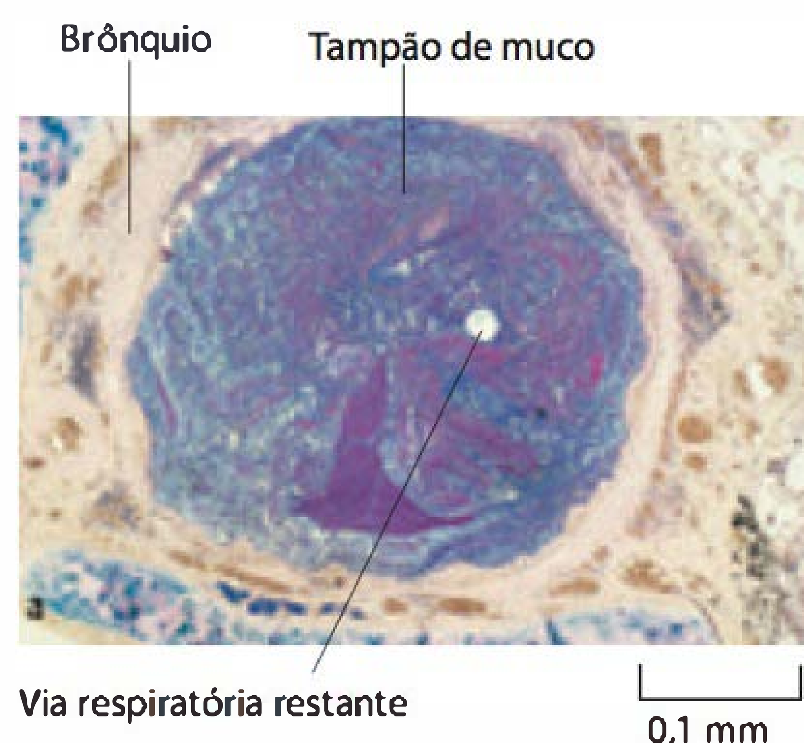


Figura 24-56 Inflamação das vias respiratórias na asma severa. Micrografia óptica de uma secção através de um brônquio de um paciente que morreu durante um ataque severo e prolongado de asma. Existe uma quase total oclusão da via respiratória por um tampão de muco. O tampão de muco é um denso infiltrado que inclui eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. (Cortesia de Thomas Krausz.)

enquanto a resposta imune adaptativa é mais potente a temperaturas mais altas. Algumas moléculas pró-inflamatórias de sinalização estimulam as células endoteliais a expressarem proteínas que engatilham a formação de coágulos em pequenos vasos locais. Por meio da oclusão de vasos, evitando o fluxo de sangue, esta resposta pode auxiliar na prevenção da entrada do patógeno na corrente sanguínea e sua consequente disseminação para outras partes do organismo.

As mesmas respostas inflamatórias, tão eficientes no controle local de infecções, podem, no entanto, ter consequências desastrosas se ocorrerem em uma infecção disseminada na corrente sanguínea, condição esta denominada *sepsis*. A liberação sistêmica de moléculas de sinalização pró-inflamatórias no sangue causa dilatação dos vasos sanguíneos, perda do volume de plasma e coagulação sanguínea generalizada, que causa uma queda acentuada da pressão sanguínea, ou *choque*; adicionalmente, existe formação disseminada de coágulos. O resultado final é conhecido por *choque séptico*, geralmente fatal. As respostas inflamatórias inapropriadas ou extremamente fortes estão também associadas com algumas doenças crônicas, como a *asma* (**Figura 24-56**) e a artrite.

Alguns patógenos desenvolveram mecanismos para evitar a consequência final da fagocitose, alguns desenvolveram mecanismos para evitar as respostas inflamatórias ou, em alguns casos, aproveitam-se dessas respostas para disseminar a infecção. Muitos vírus, por exemplo, codificam potentes antagonistas de citocinas que bloqueiam diversos pontos da resposta inflamatória. Alguns desses antagonistas são simplesmente formas modificadas de receptores de citocinas, codificadas por genes adquiridos do hospedeiro pelo genoma viral. Eles se ligam às citocinas com alta afinidade e bloqueiam seu funcionamento. Algumas bactérias, como a *Salmonella*, induzem uma resposta inflamatória no intestino nos estágios iniciais da infecção, recrutando macrófagos e neutrófilos e, a seguir, invadem-nas e literalmente pegam carona para outros tecidos do organismo.

As células infectadas por vírus desenvolvem medidas drásticas para evitar a replicação viral

Os imunoestimulantes associados aos micróbios presentes na superfície das bactérias e dos parasitas, e que são importantes na indução de respostas imunes inatas, geralmente não se encontram presentes na superfície dos vírus. As proteínas virais são construídas pelos ribossomos da célula hospedeira, e as membranas de vírus envelopados são compostas pelos lipídeos das próprias células hospedeiras. A única maneira pela qual uma célula hospedeira pode reconhecer a presença de um vírus é a detecção de um elemento incomum do genoma viral, como o RNA de fita dupla (dsRNA, *double-stranded RNA*), uma forma intermediária no ciclo de vida de vários vírus. Genomas de vírus de DNA frequentemente contêm uma quantidade significante do dinucleotídeo CpG, que pode ser reconhecido pelo receptor semelhante a Toll TLR9, como discutido anteriormente.

Células de mamíferos são particularmente pródigas em reconhecer a presença de dsRNA e mobilizar um programa de resposta intracelular para eliminá-lo. O programa ocorre em duas etapas. Primeiro, a célula degrada o dsRNA em fragmentos pequenos (de cerca de 21 a 25 pares de nucleotídeos em tamanho) usando a enzima *Dicer*. Os fragmentos de fita dupla se ligam a qualquer RNA fita simples (ssRNA, *Single-Stranded RNA*) na célula hospedeira que tenha a mesma sequência de qualquer das fitas do fragmento do dsRNA, levando à destruição do ssRNA. O dsRNA que dirige a destruição do ssRNA é a base da técnica do *RNA de interferência* (RNAi) que os pesquisadores usam para destruir RNAs mensageiros (mRNAs) especificos e desta forma bloquear a expressão gênica específica (discutido no Capítulo 8). Segundo, o dsRNA induz a célula hospedeira a produzir e secretar, duas citocinas – **interferon α** (IFNα) e **interferon** *β* (**IFNβ**), que atuam tanto de modo autócrino, sobre a célula infectada, quanto parácrino, sobre as células vizinhas não-infectadas. A ligação das

moléculas de interferon em seus receptores de superfície celular estimula a transcrição gênica específica através da via de sinalização intracelular Jak/STAT (ver Figura 15-68), levando à produção de mais de 300 produtos gênicos, incluindo um amplo número de citocinas, refletindo assim a complexidade de resposta celular aguda a uma infecção viral.

A resposta ao interferon parece ser uma reação geral de uma célula de mamífero a uma infecção viral, e componentes virais além do dsRNA podem engatilhá-la. Adicionalmente aos seus efeitos na transcrição gênica da célula hospedeira, os interferons ativam uma ribonuclease latente, que de maneira inespecífica degrada ssRNA. Eles também indiretamente ativam uma proteína-cinase que fosforila e inativa o fator de iniciação de síntese proteica eIF-2, e dessa maneira inibe a maior parte da síntese proteica da célula que luta contra o vírus. Aparentemente, pela destruição de grande parte de seu RNA e transitoriamente parando a sua síntese proteica, a célula do hospedeiro inibe a replicação viral sem morrer. Porém, se estas medidas falham, as células tomam então medidas *in extremis,* suicidando-se por apoptose para evitar a replicação viral, frequentemente com ajuda do linfócito *killer*, como discutiremos a seguir e no Capítulo 25.

As células de mamíferos possuem um mecanismo especial de defesa para ajudá-las contra os retrovírus. Estes vírus ativam uma família de proteínas chamadas de APOBEC (denominadas assim por também serem membros do complexo de edição que modifica o mRNA da proteína ApoB, o maior componente proteico da lipoproteína de baixa densidade, LDL). Esta enzima desamina citosinas em DNA complementar (cDNA) viral nascente, convertendo-as a uridina e, dessa forma, gerando um grande número de mutações, o que leva eventualmente ao término da replicação viral.

Não é surpresa que muitos vírus adquiriram mecanismos para derrotar ou evitar estes processos intracelulares de defesa. O vírus da influenza codifica uma proteína que bloqueia o reconhecimento do dsRNA pela proteína Dicer. O HIV codifica uma proteína que medeia a ubiquitinilação e a degradação mediada pelo proteossomo do complexo proteico APOBEC. Muitos vírus, incluindo muitos que são capazes de causar doenças em pacientes saudáveis, usam vários mecanismos para bloquear a ativação das vias do interferon. Alguns vírus também inibem a apoptose da célula hospedeira, cujo efeito colateral é o desenvolvimento de câncer; esta é uma maneira que o vírus de Epstein-Barr usa para ocasionalmente causar o linfoma de Burkitt.

As células matadoras naturais induzem as células infectadas por vírus a cometer suicídio

Os interferons têm outras maneiras menos diretas de bloquear a replicação viral. Uma delas é aumentar a atividade de **células matadoras naturais** (**células NK**, de *natural killer*) que são parte do sistema imune inato. Como as células T citotóxicas do sistema imune adaptativo (discutido no Capítulo 25), as células NK destroem as células infectadas pelos vírus por indução ao suicídio apoptótico. A maneira pela qual as células T citotóxicas e as células NK distinguem as células infectadas pelos vírus das não-infectadas, no entanto, é diferente.

Ambas, as células T citotóxicas e as células NK, reconhecem a mesma classe especial de proteínas de superfície para detectar células do hospedeiro infectadas. As proteínas são chamadas de **proteínas MHC de classe I**, porque são codificadas por genes no complexo de histocompatibilidade maior; quase todas as células de vertebrados expressam tais genes, e serão discutidos em detalhes no Capítulo 25. As células T citotóxicas reconhecem fragmentos de peptídeos de proteínas virais ligados a estas proteínas do complexo de histocompatibilidade maior na superfície das células infectadas. Ao contrário, as células NK monitoram o nível de proteínas do complexo MHC de classe I na superfície das células hospedeiras. Altos níveis inibem a atividade assassina das células NK e, assim, as células NK seletivamente matam células hospedeiras expressando baixos níveis, que são em sua maioria células infectadas por vírus ou células cancerosas (**Figura 24-57**).

A razão de os níveis das proteínas do MHC I estarem sempre baixos em células infectadas é porque muitos vírus desenvolveram mecanismos para inibir a expressão de tais proteínas na superfície das células que eles infectam, para evitar a detecção por linfócitos T citotóxicos. Adenovírus e HIV, por exemplo, codificam proteínas que bloqueiam a transcrição dos genes MHC de classe I. Os vírus herpes simples e citomegalovírus bloqueiam os

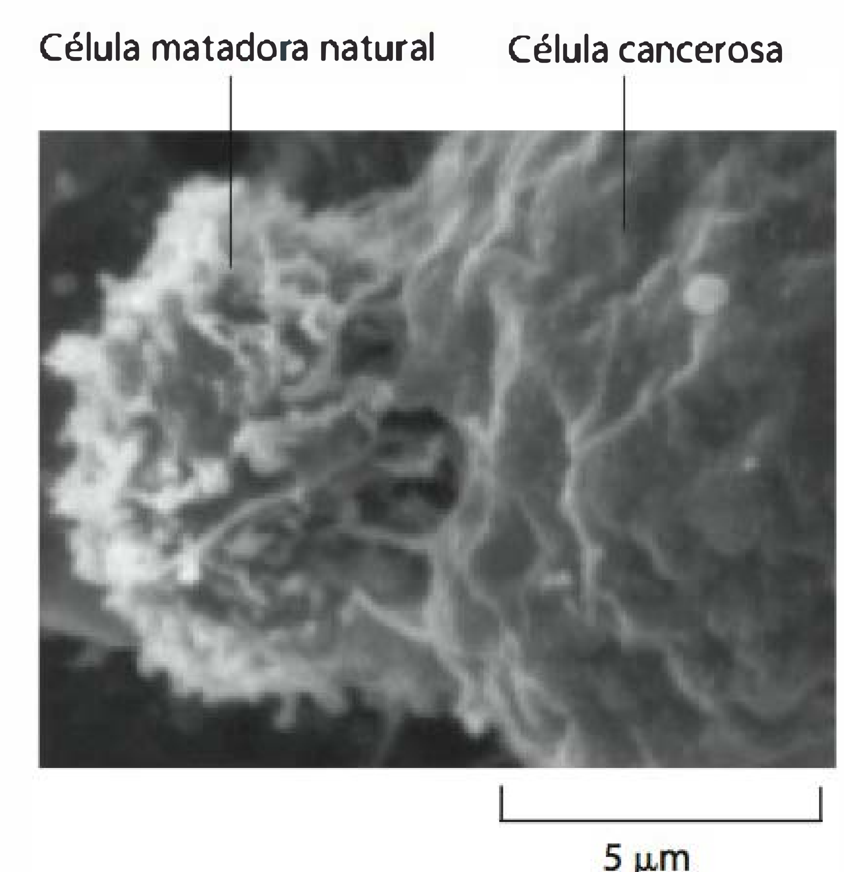


Figura 24-57 Uma célula matadora natural (NK) atacando uma célula cancerosa. A célula NK é a célula menor à *esquerda*. Esta micrografia eletrônica de varredura foi tomada um pouco depois da interação da célula NK, mas antes de ela induzir a célula cancerosa a suicidar-se. (Cortesia de J. C. Hiserodt, em Mechanisms of Cytotoxicity by Natural Killer Cells [R. B. Herberman and D. Callewaert, eds.]. New York: Academic Press, 1995.)

translocadores de peptídeos na membrana do RE que transportam fragmentos de peptídeos derivados do proteossomo de proteínas virais e proteínas da célula hospedeira do citosol para o lúmen do RE; tais peptídeos são requeridos para a montagem das proteínas do MHC de classe I na membrana do RE, para serem transportadas via aparelho de Golgi para a superfície celular como peptídeos do complexo MHC (ver Figura 25-59). Citomegalovírus causa a retrotranslocação das proteínas do complexo MHC I da membrana do RE para o citosol, onde são rapidamente degradadas no proteossomo. Proteínas codificadas por outros vírus da classe infectante previnem a entrega de proteínas do MHC de classe I do RE para o aparelho de Golgi ou do aparelho de Golgi para a membrana plasmática.

Pela evasão do reconhecimento por células T citotóxicas desta maneira, no entanto, o vírus se vê frente a frente com o poder raivoso das células NK. A produção local de INFβ ativa a propriedade assassina das células NK e também aumenta a expressão de proteínas do MHC de classe I em células não-infectadas. As células infectadas com um vírus que bloqueia a expressão das proteínas do MHC de classe I são, dessa forma, expostas como sendo diferentes e se tornam vítimas das células NK ativadas. Assim, é muito difícil para um vírus se esconder simultaneamente das células T citotóxicas e das células NK. Notavelmente, entretanto, alguns vírus grandes de DNA incluindo o citomegalovírus, codificam proteínas semelhantes às do MHC de classe I que são expressas nas superfícies das células hospedeiras que eles infectam. Como as *bona fide* (pretensas) proteínas do MHC de classe I, estas proteínas fajutas ativam receptores inibidores nas células NK e bloqueiam a atividade letal das células NK.

Ambos, células NK e linfócitos T citotóxicos, matam as células-alvo por induzi-las à apoptose antes de os vírus terem a chance de se replicar. Não é surpreendente, então, que muitos vírus tenham desenvolvido mecanismos para inibir a apoptose, particularmente nos estágios iniciais da infecção. Como discutido no Capítulo 18, a apoptose depende de uma cascata proteolítica intracelular que as células citotóxicas podem engatilhar ou pela ativação dos receptores de superfície de morte celular ou pela injeção de uma proteína na célula-alvo (ver Figura 24-47). As proteínas virais podem interferir em quase todos os passos dessas vias.

As células dendríticas suprem a ligação entre as respostas inata e adaptativa do sistema imune

As **células dendríticas** são cruciais no sistema imune inato que é distribuído amplamente nos tecidos e órgãos dos vertebrados. Elas mostram uma enorme quantidade de receptores de padrões de reconhecimento, incluindo as proteínas TLRs e NOD, que capacitam as células a reconhecer e fagocitar patógenos invasores e se tornar ativadas no processo. As células dendríticas clivam as proteínas dos patógenos em fragmentos peptídicos que se ligam então a proteínas do MHC que transportam o fragmento para a superfície celular. As células dendríticas ativadas carregam, agora, os peptídeos derivados do patógeno complexados com proteínas do complexo MHC para um órgão linfoide próximo, como um linfonodo, onde elas ativam células T do sistema imune adaptativo chamando-as para entrarem na batalha contra o invasor específico. Adicionalmente ao complexo das proteínas MHC e dos peptídeos microbianos expostos na sua superfície, as células dendríticas ativadas também expõem uma proteína de superfície coestimuladora que ajuda a ativar as células T. As células dendríticas ativadas também secretam uma variedade de citocinas que influenciam o tipo de resposta que as células T farão, garantindo que ela seja apropriada para combater um patógeno particular. Dessa maneira, as células dendríticas servem como uma ligação crucial entre o sistema imune inato, que propicia uma linha de defesa primária contra os patógenos invasores, e o sistema imune adaptativo, que apesar da lentidão providencia uma maneira mais poderosa e altamente específica de atacar o invasor.

A batalha entre os patógenos e as defesas do hospedeiro é notavelmente balanceada. No presente, os humanos parecem estar com uma pequena vantagem pelo uso de medidas de saneamento, vacinas e fármacos para ajudar os esforços dos nossos sistemas imunes inato e adaptativo. No entanto, doenças infecciosas são globalmente a principal causa de morte, e novas epidemias como a AIDS continuarão a emergir. A evolução rápida dos patógenos e a quase infinita variedade de maneiras pelas quais eles invadem o corpo humano e enganam a resposta imune indicam que jamais seremos os vencedores desta batalha.

No próximo capítulo, consideraremos as estratégias únicas e notáveis que o nosso sistema imune adaptativo desenvolveu para nos defender contra nossos poderosos oponentes. Surpreendentemente, este sistema imune pode montar uma resposta imune patógeno-específica contra patógenos que nunca existiram.

Resumo

As barreiras físicas prevenindo infecções, as respostas intrínsecas da célula às infecções e a reposta imune inata providenciam as primeiras linhas de defesa contra patógenos invasores. Todos os organismos multicelulares possuem tais defesas. Nos vertebrados, respostas imunes inatas podem recrutar a específica e mais poderosa resposta imune adaptativa. A resposta imune inata depende da habilidade do corpo de reconhecer características conservadas das moléculas na superfície dos micróbios e das moléculas de RNA de fita dupla de alguns vírus. Muitas destas moléculas microbianas são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões, incluindo os receptores semelhantes a Toll (TLRs) encontrados em plantas e animais. Nos vertebrados, moléculas de superfície dos micróbios também ativam o complemento, um grupo de proteínas do sangue ativadas em sequência para marcar o micróbio para fagocitose pelos macrófagos ou neutrófilos, que rompem a membrana do micróbio e produzem uma resposta inflamatória. Os fagócitos usam uma combinação de enzimas degradativas, peptídeos antimicrobianos e moléculas de oxigênio reativas para matar os micro-organismos invasores; adicionalmente, eles secretam moléculas sinalizadoras que engatilham uma resposta inflamatória. Células infectadas por vírus produzem interferons, que induzem uma série de respostas celulares, inibem a replicação viral e ativam a atividade assassina das células NK. As células dendríticas do sistema imune inato ingerem micróbios no sítio da infecção e os carregam assim como seus produtos para os linfonodos locais, onde eles ativam células T do sistema imune adaptativo para fazer uma resposta específica contra o micróbio.

REFERÊNCIAS

Geral

Cossart P, Boquet P & Normark S (eds) (2005) Cellular Microbiology, 2nd ed. Washington: ASM Press.
Flint SJ, Enquist LW et al (2003) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, 2nd ed. Washington: ASM Press.
Murphy KM et al (2008) Janeway's Immunobiology, 7th ed. New York: Garland Science.
Salyers A & Whitt DD (2001) Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach, 2nd ed. Washington: ASM Press.
Schaechter M (ed) (1998) Mechanisms of Microbial Disease, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

Introdução aos patógenos

Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35:235–241.
Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL et al (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 1:E5.
Brown NF, Wickham ME, Coombes BK & Finlay BB (2006) Crossing the line: selection and evolution of virulence traits. *PLoS Pathog* 2:e42.
Crick FHC & Watson JD (1956) Structure of small viruses. *Nature* 177374–475.
Gal-Mor O & Finlay BB (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8:1707–1719.
Galan JE & Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567–573.
Hacker J & Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641–679.
Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC et al (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–483.
Lorber B (1996) Are all diseases infectious? *Annu Intern Med* 125:844–851.
Poulin R & Morand S (2000) The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75:277–293.
Prusiner SB (1996) Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:473–493.
Rappleye CA & Goldman WE (2006) Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60:281–303
Rixon FJ (1990) Structure and assembly of herpesviruses. *Semin Virol* 1:477–487.
Stebbins CE & Galan JE (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412:701–705.

Biologia celular da infecção

Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM & Domingo E (2001) Evolution of cell recognition by viruses. *Science* 292:1102–1105.
Berger EA, Murphy PM & Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657–700.
Cossart P & Sansonetti PJ (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242–248.
Deitsch KW, Moxon ER & Wellems TE (1997) Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:281–293.
Garoff H, Hewson R & Opstelten DJ (1998) Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1171–1190.
Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M et al (2005) Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437:1162–1166.
Goldberg MB (2001) Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:595–626.
Hackstadt T (2000) Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* 1:93–99.
Jones NC (1990) Transformation by the human adenoviruses. *Semin Cancer Biol* 1:425–435.

Kaariainen L & Ranki M (1984) Inhibition of cell functions by RNA-virus infections. *Annu Rev Microbiol* 38:91–109.
Keeling PJ & Fast NM (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56:93–116.
Kenny B, DeVinney R, Stein M et al (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511–520.
Knodler LA, Celli J & Finlay BB (2001) Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:578–88.
Lyles DS (2000) Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:709–724.
Mullins JI & Jensen MA (2006) Evolutionary dynamics of HIV-1 and the control of AIDS. *Curr Top Microbiol Immunol* 299:171–192.
Overbaugh J & Bangham CR (2001) Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 292:1106–1109.
Parrish CR & Kawaoka Y (2005) The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol* 59:553–586.
Pizarro-Cerda J & Cossart P (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124:715–727.
Poranen MM, Daugelavicius R & Bamford DH (2002) Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* 56:521–538.
*Sibley LD & Andrews NW (2000) Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1:100–106.
Skehel JJ & Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569.
Sodeik B (2000) Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* 8:465–472.
Stephens EB & Compans RW (1988) Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annu Rev Microbiol* 42:489–516.
Tilney LG & Portnoy DA (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597–1608.
Walsh C (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406:775–781.
Wright GD (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev Microbiol* 5:175–186

Barreiras contra infecção e o sistema imune inato

Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593–623.
Banchereau J, Briere F, Caux C et al (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.
Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535.
Ganz T & Lehrer RI (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41–44.
Girardin SE, Sansonetti PJ & Philpott DJ (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens—common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* 10:193–199.
Guidotti LG & Chisari FV (2001) Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65–91.
Hedrick SM (2004) The acquired immune system: a vantage from beneath. *Immunity* 21:607–615.
Janeway CA Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216.
Kimbrell DA & Beutler B (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev Genet* 2:256–267.
Kopp E & Medzhitov R (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:396–401
Muller-Eberhard HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57:321–347.
Murphy PM (2001) Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature Immunol* 2:116–122.
Ploegh HL (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* 280:248–253.
Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197–223.
Super M & Ezekowitz RA (1992) The role of mannose-binding proteins in host defense. *Infect Agents Dis* 1:194–199.
Tomlinson S (1993) Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5:83–89.
Yang RB, Mark MR, Gray A et al (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284–288.
Yang D, Biragyn A, Kwak LW & Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291–296.
Yokoyama WM, Kim S & French AR (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22:405–429

25

O Sistema Imune Adaptativo

O **sistema imune adaptativo** protege-nos contra a morte causada por infecções. Um recém-nascido com um sistema imune adaptativo com defeito severo morrerá em seguida, a não ser que sejam tomadas medidas drásticas para isolá-lo e evitar o contato com agentes infecciosos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas. Todos os organismos multicelulares precisam se defender contra infecções por esses invasores potencialmente perigosos, coletivamente denominados **patógenos**. Os invertebrados utilizam estratégias de defesa relativamente simples, que consistem principalmente em barreiras de proteção, moléculas tóxicas e células fagocíticas que ingerem e destroem desde micro-organismos invasores (*micróbios*) a grandes parasitas (como os vermes). Os vertebrados também dependem da **resposta imune inata** como sua primeira linha de defesa (discutida no Capítulo 24), mas, além disso, podem montar defesas muito mais sofisticadas, denominadas **respostas imunes adaptativas**. Nos vertebrados, a resposta inata recruta a resposta adaptativa, e ambas atuam em conjunto para eliminar os patógenos (**Figura 25-1**).

Ao contrário das respostas imunes inatas, que são reações de defesa gerais, as respostas adaptativas são altamente específicas a um determinado patógeno particular que as induziu, gerando proteção por longos períodos. Uma pessoa que se recupera do sarampo, por exemplo, fica protegida por toda a vida contra o sarampo por meio do sistema imune adaptativo; contudo, não fica protegida contra outras viroses comuns, como a caxumba e a catapora. Neste capítulo, vamos nos concentrar nas respostas imunes adaptativas e, a não ser que esteja indicado, o termo "respostas imunes" refere-se às respostas adaptativas.

A resposta imune adaptativa elimina ou destrói os patógenos invasores e quaisquer moléculas tóxicas que eles produzem. Considerando que essas respostas são destrutivas, é importante que sejam direcionadas somente contra moléculas estranhas ao hospedeiro e não atuem contra as moléculas do próprio organismo. O sistema imune usa múltiplos mecanismos para evitar o dano contra as próprias moléculas. Entretanto, ocasionalmente este mecanismo falha e o sistema se volta contra o hospedeiro, causando as *doenças autoimunes*, as quais podem ser fatais.

Muitas moléculas estranhas que entram no organismo são inofensivas, e não faria sentido montar-se uma resposta imune adaptativa contra elas. As doenças alérgicas, como a febre do feno e a asma alérgica, são exemplos de resposta imune adaptativa deletéria contra moléculas estranhas aparentemente inofensivas. Um indivíduo normalmente evita essas respostas imunes inadequadas porque o sistema imune inato ativa as respostas imunes adaptativas somente quando reconhece padrões conservados de moléculas especificamente expressas por patógenos invasores. O sistema imune inato pode distinguir entre diferentes classes de patógenos e recrutar a forma mais eficaz de resposta imune adaptativa para eliminá-los.

Qualquer substância capaz de estimular a resposta imune adaptativa é denominada **antígeno** (gerador de anticorpo). A maior parte do que sabemos sobre essa resposta é proveniente de estudos em que um pesquisador desafia o sistema imune adaptativo de um animal de laboratório (geralmente um camundongo) a responder contra uma molécula estranha inofensiva, como uma proteína estranha. Isso é feito injetando-se a molécula inofensiva junto com um imunoestimulador (geralmente de origem microbiana), denominado *adjuvante*, que ativa o sistema imune inato. Este processo é denominado **imunização**. Se administrada desta maneira, praticamente qualquer macromolécula, desde que seja estranha ao receptor, pode induzir uma resposta imune adaptativa que é específica à macromolécula administrada. Notavelmente, o sistema imune adaptativo pode distinguir entre antígenos que são muito semelhantes – como entre duas proteínas que diferem em um único aminoácido ou

Neste capítulo

LINFÓCITOS E AS BASES CELULARES DA IMUNIDADE ADAPTATIVA 1540

CÉLULAS B E ANTICORPOS 1551

A GERAÇÃO DA DIVERSIDADE DOS ANTICORPOS 1562

CÉLULAS T E PROTEÍNAS DO MHC 1569

CÉLULAS T AUXILIARES E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS 1589

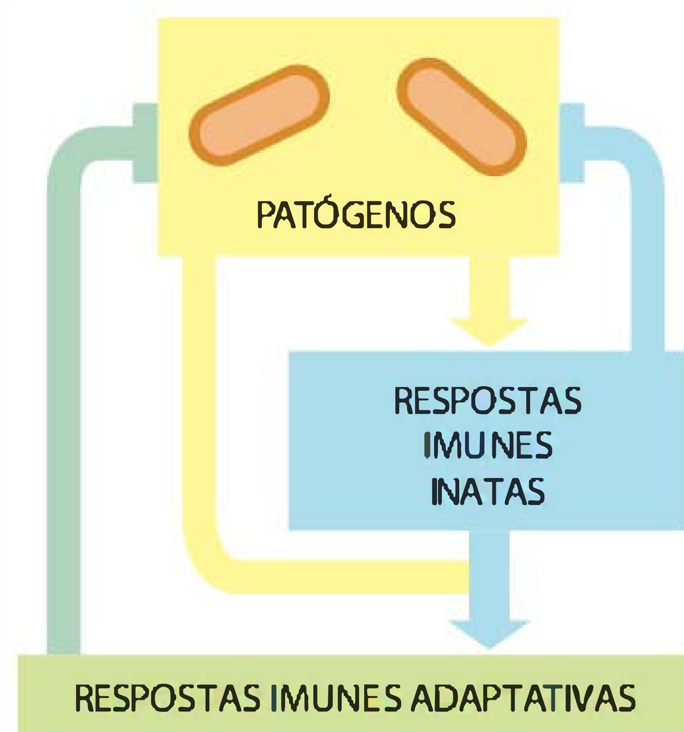


Figura 25-1 Respostas imunes inatas e adaptativas. As respostas imunes inatas são ativadas diretamente pelos patógenos e defendem todos os organismos multicelulares contra as infecções. Nos vertebrados, os patógenos, junto com as respostas imunes inatas que eles ativam, estimulam as respostas imunes adaptativas, as quais atuam juntamente com as respostas imunes inatas, auxiliando na defesa contra infecções.

entre dois isômeros ópticos da mesma molécula. O sistema imune adaptativo reconhece finos detalhes moleculares das macromoléculas.

As respostas imunes adaptativas são realizadas por leucócitos denominados **linfócitos**. Existem duas grandes classes dessas respostas – *respostas mediadas por anticorpos* e *respostas imunes mediadas por células T*, que são mediadas por diferentes classes de linfócitos, denominados de células B e células T, respectivamente. Nas **respostas mediadas por anticorpos**, as células B são estimuladas a secretar anticorpos, que são proteínas denominadas *imunoglobulinas*. Os anticorpos circulam na corrente sanguínea e permeiam os outros fluidos corporais, onde se ligam especificamente ao antígeno estranho que estimulou sua produção (**Figura 25-2**). A ligação do anticorpo inativa vírus e toxinas microbianas (como as toxinas tetânica ou diftérica) bloqueando sua capacidade de se ligar a receptores nas células do hospedeiro. A ligação do anticorpo também marca os patógenos invasores para serem destruídos, principalmente facilitando o processo de fagocitose pelas células do sistema imune inato que irão digeri-los.

A **resposta imune mediada por células T**, a segunda classe das respostas imunes adaptativas, ativa células T a reagirem diretamente contra antígenos estranhos que são apresentados a elas na superfície de uma célula hospedeira, a qual é referida como *célula apresentadora de antígeno*. A célula T, por exemplo, pode matar uma célula hospedeira infectada por vírus que apresente antígenos virais em sua superfície, eliminando a célula infectada antes que o vírus tenha a chance de se replicar (ver Figura 25-2). Em outros casos, a célula T produz moléculas sinalizadoras que tanto ativam macrófagos a destruir os micróbios invasores que fagocitaram quanto auxiliam na ativação das células B para produzirem anticorpos contra os micróbios.

Iniciaremos este capítulo com a discussão das propriedades gerais dos linfócitos. Consideraremos as características funcionais e estruturais que permitem aos anticorpos reconhecer e neutralizar os micróbios extracelulares e as toxinas por eles produzidas. A seguir, discutiremos como as células B podem produzir um número praticamente ilimitado de moléculas de anticorpos diferentes. Finalmente, abordaremos as características especiais das células T e as respostas imunes por elas mediadas.

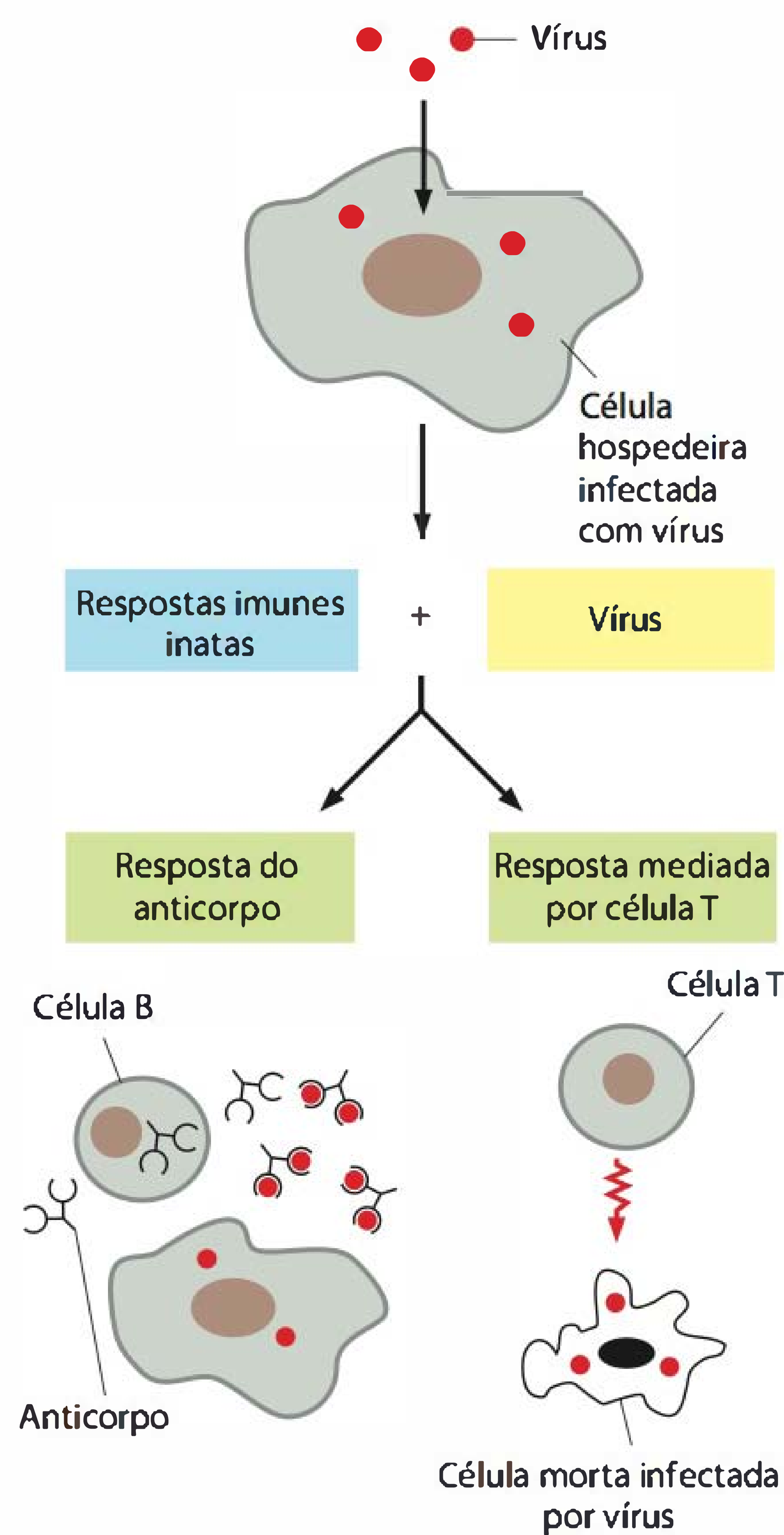


Figura 25-2 Os dois principais tipos de respostas imunes adaptativas. Os linfócitos participam dos dois tipos de resposta. Aqui, eles encontram-se respondendo a uma infecção viral. Em um dos tipos de resposta adaptativa, as células B secretam anticorpos que neutralizam os vírus. No outro tipo, uma resposta mediada por células T, as células T matam as células infectadas por vírus. Nos dois casos, a resposta imune inata auxilia na ativação das respostas imunes adaptativas por vias aqui não apresentadas.

LINFÓCITOS E AS BASES CELULARES DA IMUNIDADE ADAPTATIVA

Os linfócitos são responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imunes adaptativas. Eles estão presentes em grande número na corrente sanguínea e na linfa (o fluido incolor presente nos vasos linfáticos que conectam os linfonodos do organismo uns com os outros e com a corrente sanguínea). Eles também estão concentrados nos **órgãos linfoides**, como o timo, os linfonodos (também conhecidos como glândulas linfoides), o baço e o apêndice (**Figura 25-3**). Nesta seção, discutiremos as propriedades gerais dos linfócitos, que podem ser aplicadas tanto às células B, quanto às T.

Os linfócitos são necessários à imunidade adaptativa

Existem cerca de 2×10^{12} linfócitos no corpo humano, o que torna sua massa celular comparável à do fígado ou à do cérebro. Apesar de sua abundância, sua principal função na imunidade adaptativa não havia sido demonstrada até o final da década de 1950. Experimentos cruciais foram realizados em camundongos e em ratos que foram submetidos a altas doses de radiação para matar a maioria de seus leucócitos, incluindo os linfócitos. Este tratamento incapacita os animais de promover respostas imunes adaptativas. Assim, pela transferência de vários tipos de células para os animais, foi possível definir quais células tinham a capaci-

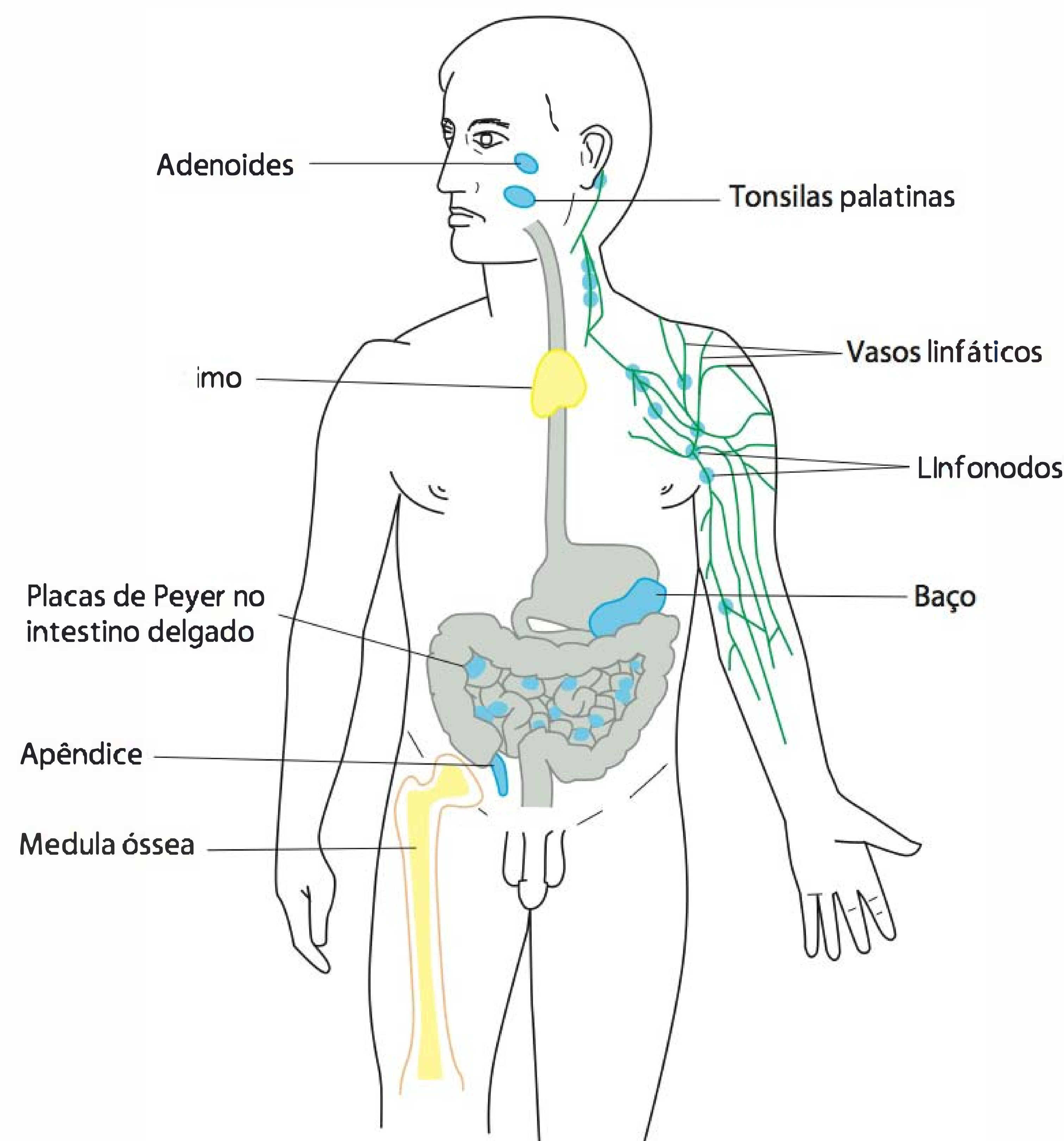


Figura 25-3 Órgãos linfoides humanos. Os linfócitos se desenvolvem no timo e na medula óssea (*amarelo*) e por isso são chamados de *órgãos linfoides centrais* (ou *primários*). Os linfócitos recém-formados migram dos órgãos linfoides primários para os *órgãos linfoides periféricos* (ou *secundários*), onde podem reagir com os antígenos estranhos. Somente alguns dos órgãos linfoides periféricos (*azul*) e vasos linfáticos (*verde*) estão representados; vários linfócitos, por exemplo, são encontrados na pele e no trato respiratório. Conforme será discutido posteriormente, os vasos linfáticos desembocam na corrente sanguínea (não-representado).

dade de reverter aquela deficiência. Somente os linfócitos restauraram as respostas imunes adaptativas nos animais irradiados, indicando que são necessários para essas respostas (**Figura25-4**).

Os sistemas imunes inato e adaptativo atuam conjuntamente

Conforme mencionado anteriormente, os linfócitos respondem a antígenos estranhos somente quando o **sistema imune inato** é ativado anteriormente. Conforme discutido no Capítulo 24, a rapidez das respostas imunes inatas a uma infecção depende dos **receptores de reconhecimento de padrões** feitos pelas células do sistema imune inato. Estes recepto-



Figura 24-4 Um experimento clássico demonstrou que os linfócitos são necessários para as respostas imunes adaptativas contra antígenos estranhos. Um requisito fundamental para todos os experimentos de transferência de células é que elas sejam transferidas entre animais de uma mesma linhagem homozigota. Os membros de uma mesma linhagem homozigota são geneticamente idênticos. Se os linfócitos são transferidos para animais geneticamente diferentes que tenham sido irradiados, estes reagem contra os antígenos"estranhos" do hospedeiro e podem matar o animal. No experimento demonstrado, a injeção de linfócitos restaura tanto as respostas imunes adaptativas mediadas por anticorpos quanto as mediadas por célulasT, indicando que os linfócitos são necessários para ambos os tipos de respostas.

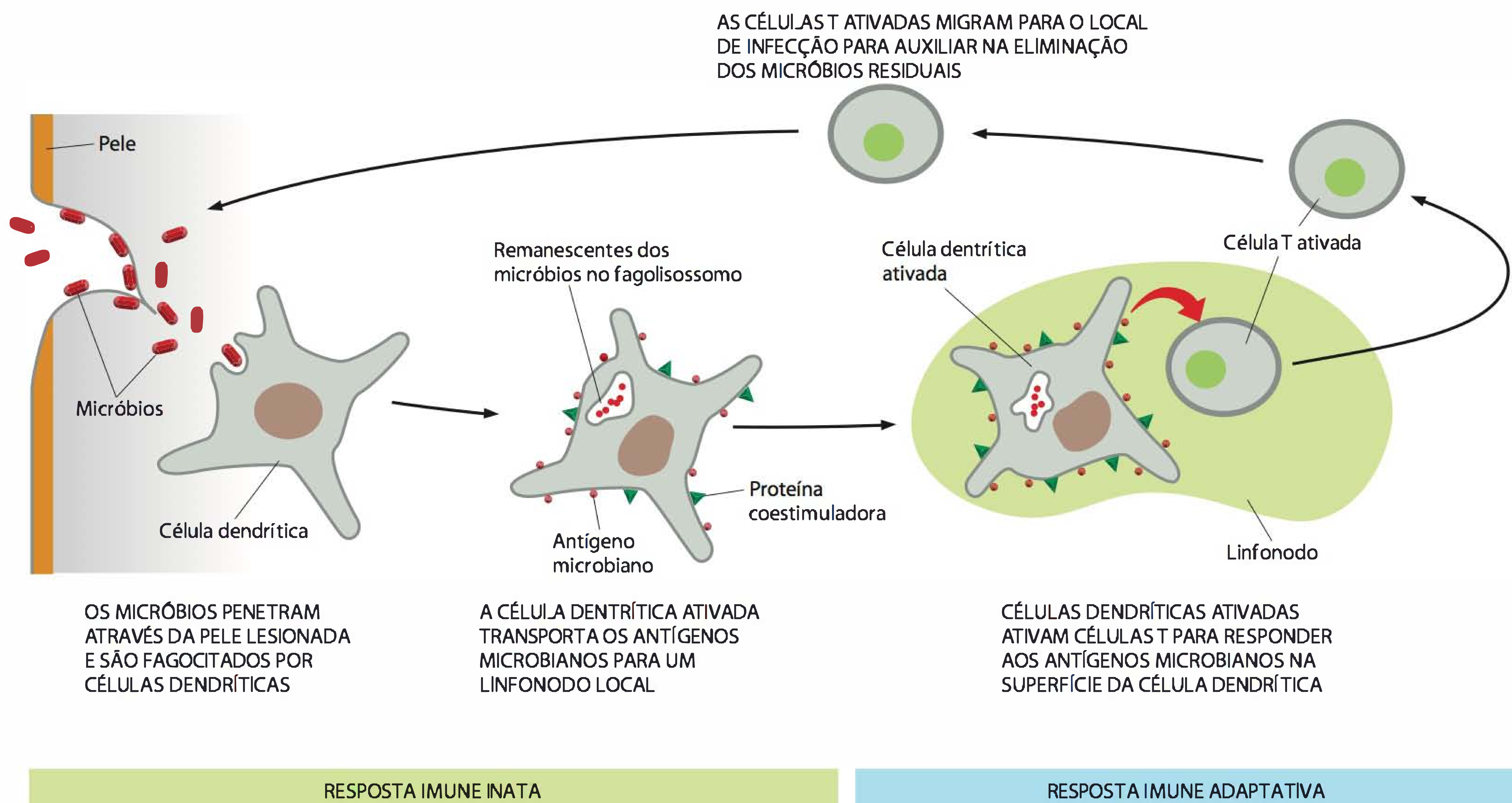


Figura 25-5 Uma maneira pela qual o sistema imune inato auxilia a ativação do sistema imune adaptativo. As células dendríticas internalizam micro-organismos invasores ou seus produtos no local de infecção. Os PAMPs microbianos ativam as células a expressar *proteínas coestimuladoras* em sua superfície e migrar para os linfonodos vizinhos através dos vasos linfáticos. Nos linfonodos, as células dendríticas ativadas ativam uma pequena fração de células T que expressam o receptor para o antígeno microbiano apresentado na superfície da célula dendrítica. Essas células T proliferam e algumas migram para o sítio de infecção, onde auxiliam a eliminar os micróbios, seja pela ativação de macrófagos ou matando as células infectadas (não-apresentado).

res reconhecem moléculas associadas a micróbios que não estão presentes no organismo hospedeiro, denominadas *imunoestimuladores associados aos patógenos*. Devido ao fato de ocorrerem em padrões repetidos, são também conhecidas como *padrões* moleculares associados *aos patógenos* (*PAMPs, pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPs incluem padrões repetidos de estruturas moleculares dos ácidos nucleicos, dos lipídeos, dos polissacarídeos e das proteínas microbianas.

Alguns dos receptores de reconhecimento de padrões estão presentes na superfície das células fagocíticas profissionais (fagócitos), como os macrófagos e os neutrófilos, onde medeiam a captura dos patógenos, que são então levados aos lisossomos para serem destruídos. Outros são secretados e ligam-se à superfície dos patógenos, marcando-os para a destruição mediada por fagócitos ou um sistema de proteínas sanguíneas coletivamente denominadas *sistema do complemento* (discutido no Capítulo 24). Outros, ainda, incluindo os *receptores semelhantes a Toll* (*TLRs*, *Toll-like receptors*), discutido no Capítulo 24, ativam as vias de sinalização intracelular que levam à secreção de moléculas sinalizadoras extracelulares que promovem a inflamação e auxiliam na ativação das respostas imunes adaptativas.

Algumas células do sistema imune inato que respondem aos PAMPs e ativam a resposta imune adaptativa mais eficientemente são as **células dendríticas**. Presentes na maioria dos tecidos, as células dendríticas expressam altos níveis de TLRs e outros receptores de reconhecimento de padrões e atuam apresentando antígenos microbianos às células T nos órgãos linfoides periféricos. Na maioria dos casos, elas reconhecem e fagocitam micro-organismos invasores ou seus produtos ou fragmentos de células infectadas no local de infecção e migram com sua presa para o órgão linfoide periférico mais próximo. Em outros casos, elas capturam diretamente os micróbios ou seus produtos nos órgãos linfoides periféricos como o baço. Nas duas situações, os PAMPs microbianos ativam as células dendríticas que, por sua vez, podem ativar diretamente as células T dos órgãos linfoides periféricos a responder contra os antígenos microbianos apresentados na superfície das células dendríticas. Uma vez ativadas, algumas células T migram para o local de infecção, onde irão auxiliar as células fagocíticas a destruir os micro-organismos (**Figura 25-5**). Outras células T ativadas permanecem no órgão linfoide, onde auxiliam a manter as células dendríticas ativas, auxiliam na ativação de outras células T e na ativação de células B para a produção de anticorpos contra os antígenos microbianos.

Assim, as respostas imunes inatas são ativadas principalmente nos locais de infecção, enquanto as respostas imunes adaptativas são ativadas, principalmente, nos órgãos linfoides periféricos como os linfonodos e o baço. Os dois tipos de resposta atuam conjuntamente para eliminar patógenos invasores e macromoléculas estranhas.

Os linfócitos B desenvolvem-se na medula óssea; os linfócitos T desenvolvem-se no timo

Os nomes das células T e das células B derivam dos órgãos nos quais se desenvolvem. As células T desenvolvem-se no *timo*, e as células B, nos mamíferos, desenvolvem-se na *medula óssea* (*bone marrow*), nos adultos, ou no fígado, nos estágios fetais.

Acredita-se que tanto as células T quanto as células B desenvolvam-se de uma mesma *célula progenitora linfoide comum*. A própria célula progenitora linfoide comum deriva de *células-tronco hemopoiéticas* multipotentes, que dão origem a todas as células sanguíneas, incluindo eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Essas células-tronco (discutidas no Capítulo 23) estão localizadas inicialmente nos tecidos *hemopoiéticos* – principalmente no fígado fetal e na medula óssea, nos adultos.

As células T desenvolvem-se no timo, a partir de células progenitoras linfoides comuns, que migram para o timo a partir dos tecidos hemopoiéticos através da corrente sanguínea. Na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e camundongos, as células B desenvolvem-se de células progenitoras linfoides nos próprios tecidos hemopoiéticos (**Figura 25-6**). Considerando que essas são áreas onde os linfócitos se desenvolvem a partir de células precursoras, o timo e os tecidos hemopoiéticos são denominados **órgãos linfoides centrais** (**primários**) (ver Figura 25-3).

Conforme discutiremos mais adiante, em sua maioria os linfócitos morrem nos órgãos linfoides centrais logo após o seu desenvolvimento, sem nunca terem atuado. Outros, no entanto, maturam e migram através do sangue para os **órgãos linfoides periféricos** (**secundários**), principalmente para os linfonodos, o baço e o tecido linfoide associado ao epitélio do trato gastrintestinal, trato respiratório e pele (ver Figura 25-3). É nos órgãos linfoides periféricos que os antígenos estranhos ativam as células T e B (ver Figura 25-6).

As células B e T podem ser distinguidas morfologicamente uma da outra somente após terem sido ativadas pelo antígeno. As células T e B não-ativadas são muito similares, mesmo quando analisadas por microscopia eletrônica. Ambas são pequenas, um pouco maiores do que os eritrócitos, e contêm pouco citoplasma (**Figura 25-7**A). Após ativação pelo antígeno, proliferam e maturam em *células efetoras*. As células B efetoras secretam anticorpos. Na sua forma mais diferenciada, quando são denominadas *células plasmáticas*, ou *plasmócitos*, elas são preenchidas com um extenso retículo endoplasmático que está ativamente produzindo anticorpos (Figura 25-7B). Contrariamente, as células T efetoras (Figura 25-7C) contêm um retículo endoplasmático pouco desenvolvido e não secretam anticorpos; ao invés disso, elas secretam uma variedade de proteínas sinalizadoras denominadas **citocinas**, as quais atuam como mediadoras.

Existem três classes principais de células T – as células T citotóxicas, as células T auxiliares e as células T reguladoras (supressoras). As *células T citotóxicas* matam as células infectadas. As *células T auxiliares* ativam os macrófagos, as células dendríticas, as células B e as células T citotóxicas através da secreção de uma variedade de citocinas e por meio da

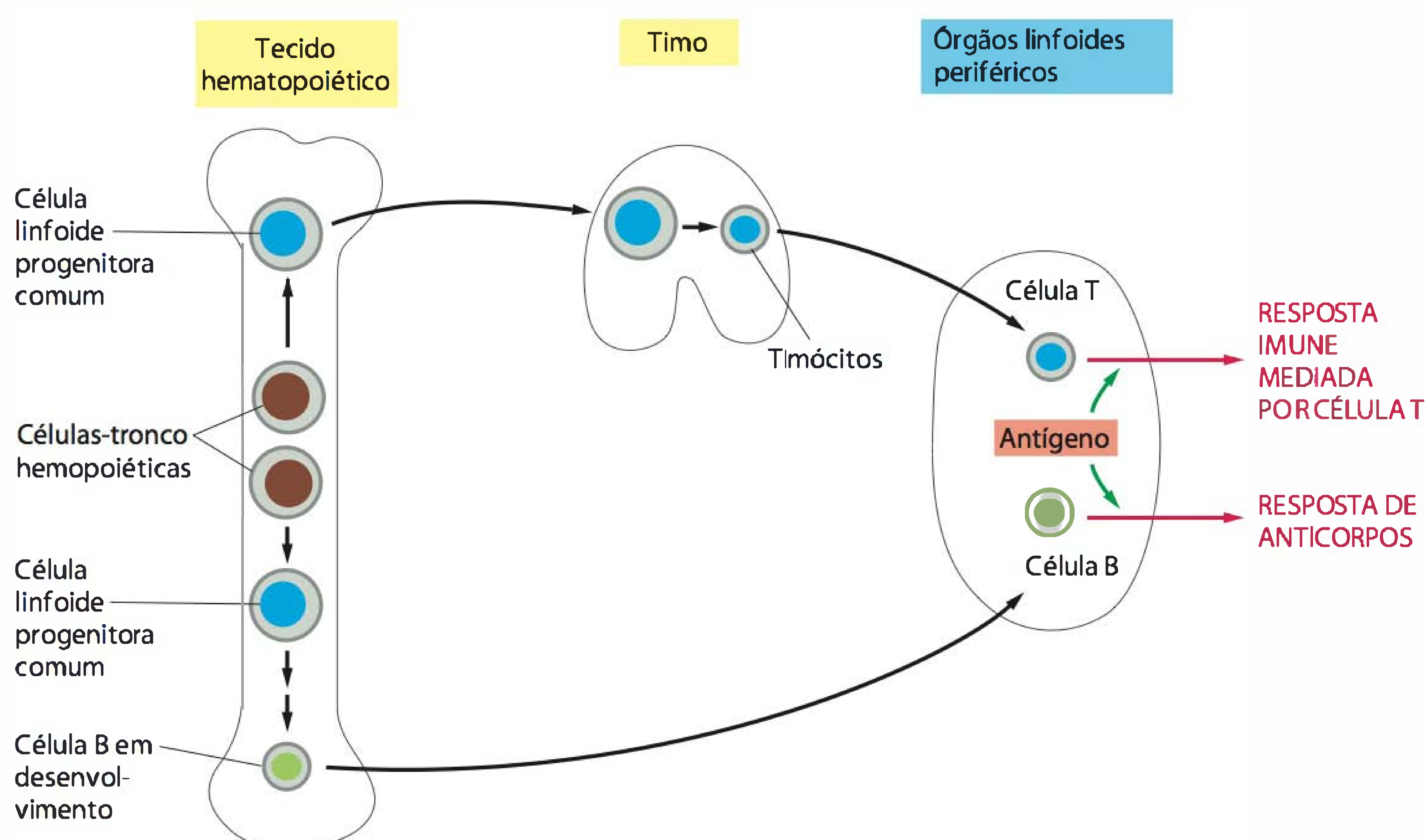
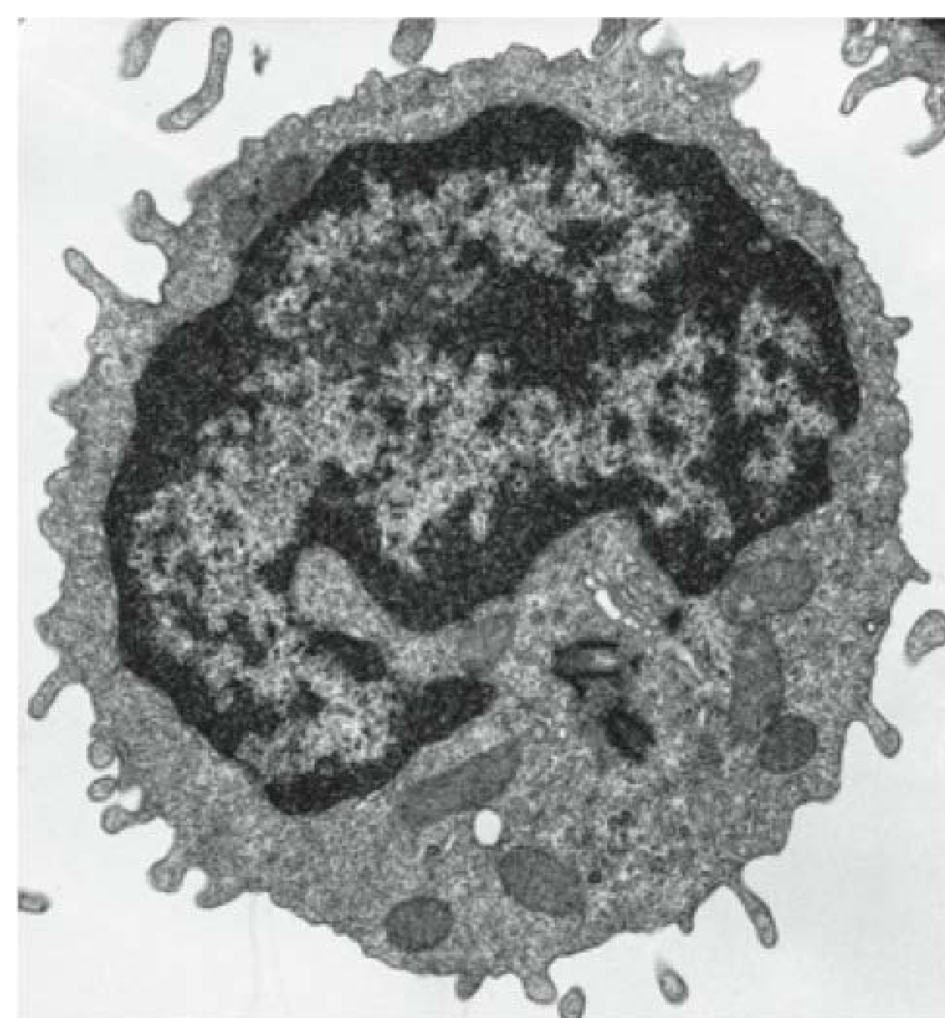


Figura 25-6 O desenvolvimento e a ativação de células T e B. Os órgãos linfoides centrais, onde os linfócitos desenvolvem-se a partir das células progenitoras linfoides, estão destacados em *amarelo*. As células progenitoras linfoides comuns se desenvolvem a partir das células-tronco hemopoiéticas multipotentes na medula óssea. Algumas células progenitoras linfoides comuns desenvolvem-se localmente na medula óssea em células B imaturas, enquanto outras migram, através da circulação sanguínea, para o timo, onde se desenvolvem em timócitos (células T em desenvolvimento). As células T e B são ativadas por antígenos estranhos principalmente nos órgãos linfoides periféricos, como os linfonodos e o baço.





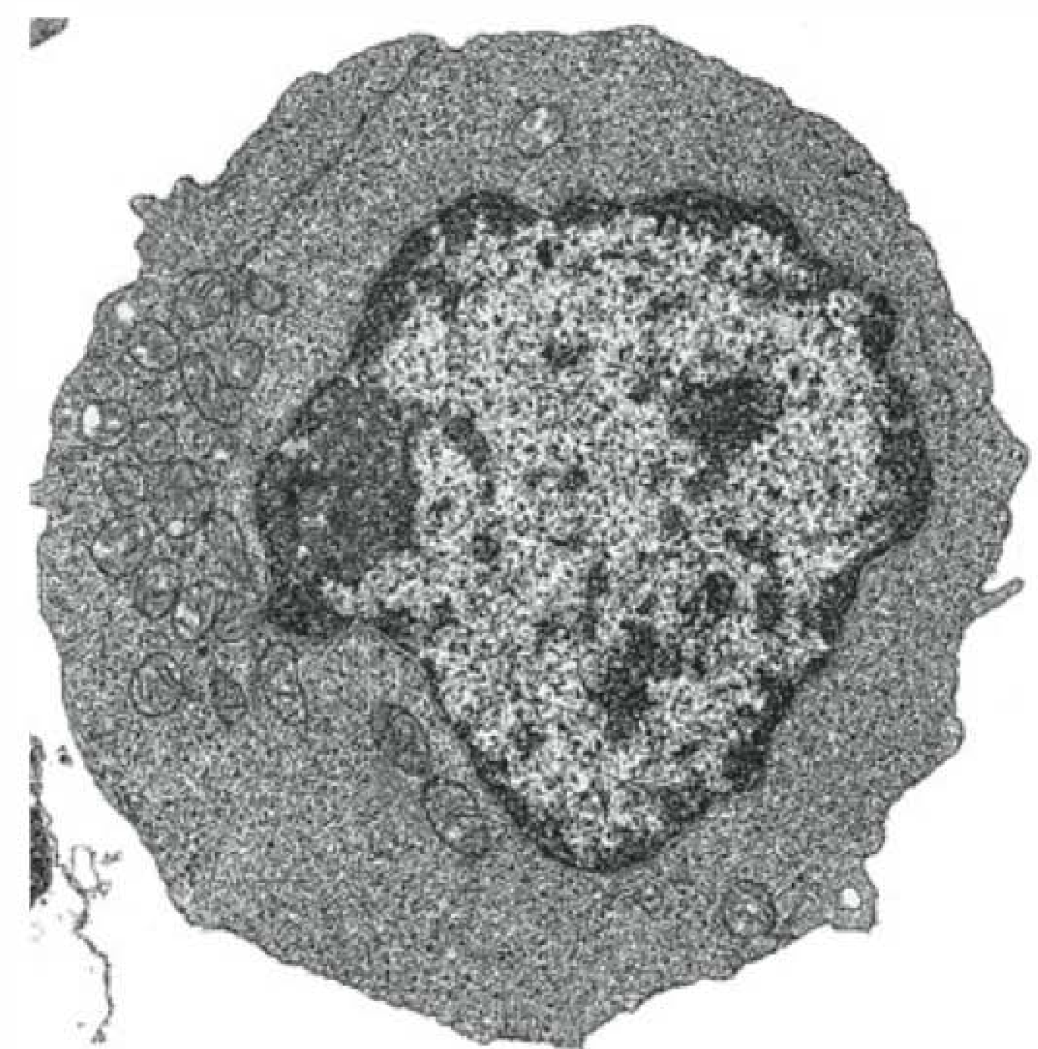


Figura 25-7 Micrografia eletrônica de linfócitos efetores e em repouso. (A) Um linfócito em repouso, que pode ser tanto uma célula T como uma célula B, uma vez que a distinção morfológica dessas células é muito difícil de ser realizada até que sejam ativadas e tornem-se células efetoras. (B) Uma célula B efetora (um plasmócito). Esta célula apresenta extenso retículo endoplasmático (RE) rugoso, que se encontra preenchido por moléculas de anticorpo. (C) Uma célula T efetora, que possui relativamente pouco RE rugoso, mas apresenta vários ribossomos livres. Repare que as três células são mostradas com o mesmo aumento. (A, cortesia de Dorothy Zucker-Franklin; B, cortesia de Carlo Grossi; A e B, de D. Zucker-Franklin et al., Atlas of Blood Cells: Function and Pathology, 2nd ed. Milan, Italy: Ed. Ermes, 1988; C, cortesia de Stefanello de Petris.)

apresentação de uma variedade de proteínas coestimuladoras em sua superfície. Acredita-se que as *células T reguladoras* usem estratégias similares para inibir a função das células T auxiliares, das células T citotóxicas e das células dendríticas. Assim, enquanto as células B podem atuar a distância por meio da secreção de anticorpos que são amplamente distribuídos pela corrente sanguínea, as células T podem migrar para sítios distantes, mas, quando ali chegam, podem agir apenas localmente sobre as células vizinhas.

O sistema imune adaptativo atua por meio da seleção clonal

A característica mais marcante do sistema imune adaptativo é a capacidade de responder a milhões de antígenos estranhos diferentes de uma maneira altamente específica. As células B humanas, por exemplo, podem produzir mais de 10^{12} anticorpos diferentes que reagem especificamente com o antígeno que induziu a sua produção. Como as células B produzem tal diversidade de anticorpos específicos? A resposta para essa questão começou a surgir na década de 1950, com a formulação da **teoria da seleção clonal**. De acordo com essa teoria, inicialmente um animal gera, de forma aleatória, uma vasta diversidade de linfócitos e seleciona para ativação somente aqueles que podem reagir contra os antígenos estranhos encontrados pelo animal. Como cada linfócito desenvolve-se em um órgão linfoide central, este se torna comprometido a reagir com um determinado antígeno antes mesmo de ser exposto a ele. A expressão desse comprometimento ocorre na forma de proteínas receptoras de superfície celular que se ligam especificamente ao antígeno. Quando um linfócito encontra seu antígeno específico em um órgão linfoide periférico, a ligação do antígeno ao receptor ativa o linfócito, induzindo-o a proliferar, produzindo mais células com o mesmo receptor, processo denominado *expansão clonal* (as células derivadas de um ancestral comum são denominadas *clone*). O encontro com o antígeno também faz com que as células se diferenciem em *células efetoras*. Portanto, um antígeno estimula seletivamente aquelas células que expressam receptores complementares específicos para o antígeno e que estão previamente comprometidas a responder a ele (**Figura 25-8**). Essa combinação é que torna as respostas imunes adaptativas específicas ao antígeno.

Fortes evidências sustentam a principal teoria da seleção clonal. Contudo, como o sistema imune adaptativo produz linfócitos que coletivamente apresentam tamanha diversidade de receptores, incluindo aqueles que reconhecem moléculas sintéticas que nunca haviam sido encontradas na natureza? Veremos mais adiante que, no homem, os receptores antígeno-específicos tanto das células B quanto das células T são codificados por genes que são reunidos a partir de uma série de segmentos gênicos por uma forma especial de recombinação genética que ocorre inicialmente no desenvolvimento dos linfócitos, antes que tenham tido contato com o antígeno. Este processo de rearranjo gera uma enorme diversidade de receptores e de linfócitos, possibilitando que o sistema imune responda a praticamente uma infinidade de antígenos.

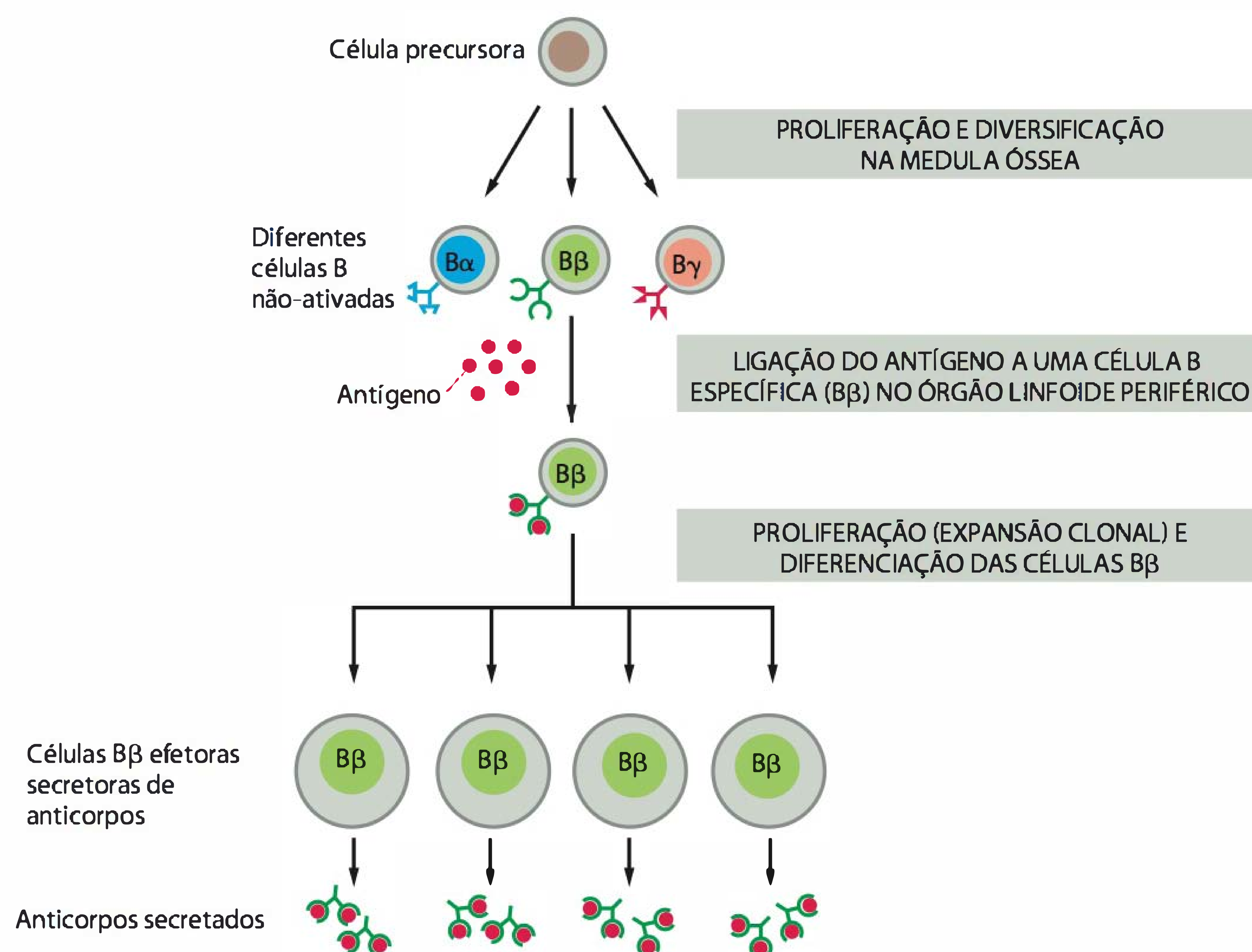


Figura 25-8 A teoria da seleção clonal. Um antígeno ativa somente aqueles linfócitos que já se encontram comprometidos a responder a eles. Uma célula comprometida a responder a um determinado antígeno apresenta receptores de superfície celular que reconhecem especificamente o antígeno. Acredita-se que o sistema imune humano tenha milhões de clones de linfócitos diferentes, com as células de um mesmo clone expressando o mesmo receptor. Antes de encontrar-se com um antígeno pela primeira vez, um clone contém, normalmente, somente um ou um pequeno número de células. Um mesmo antígeno em particular pode ativar centenas de clones diferentes. Embora somente as células B estejam representadas aqui, as células T atuam de forma similar. Note que os receptores nas células B são moléculas de anticorpos, e aqueles representados por "Bβ" neste diagrama se ligam ao mesmo antígeno que os anticorpos secretados pelas células efetoras "Bβ".

A maioria dos antígenos ativa vários clones de linfócitos diferentes

A maioria das moléculas grandes, incluindo praticamente todas as proteínas e muitos polissacarídeos, podem atuar como antígenos. As regiões do antígeno que se ligam com o sítio de ligação do antígeno em uma molécula de anticorpo ou em um receptor de linfócito são denominadas **determinantes antigênicos** (ou *epítopos*). A maioria dos antígenos tem uma grande variedade de determinantes antigênicos que podem estimular a produção de anticorpos, de respostas T específicas, ou de ambos. Alguns determinantes de um antígeno produzem respostas mais intensas que outros, assim a reação contra eles pode ser predominante quando analisamos a resposta como um todo. Estes determinantes são ditos *imunodominantes*.

Qualquer determinante antigênico é passível de ativar muitos clones de linfócitos, cada um dos quais produz uma molécula com um sítio de ligação ao antígeno com características próprias de afinidade para o determinante. Até mesmo uma estrutura relativamente simples, como o grupo de *dinitrofenil* (*DNP*) na **Figura 25-9**, pode ser "vista" de várias maneiras. Quando está acoplado a uma proteína, conforme representado na figura, ele geralmente estimula a produção de centenas de espécies de anticorpos anti-DNP, cada um produzido por um clone de célula B diferente. Este tipo de resposta é dita *policlonal*. Quando somente alguns clones são ativados, a resposta é dita *oligoclonal*, e quando a resposta envolve somente um único clone de células B ou T, é dita *monoclonal*. Os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados como ferramentas em biologia e em medicina, mas precisam ser produzidos de uma maneira especial (ver Figura 8-8), uma vez que as respostas à maioria dos antígenos é do tipo policlonal.

A memória imunológica é decorrente tanto da expansão clonal quanto da diferenciação de linfócitos

O sistema imune adaptativo, assim como o sistema nervoso, pode lembrar-se de experiências anteriores. Este é o motivo pelo qual desenvolvemos imunidade por toda a vida contra várias doenças infecciosas comuns após o nosso primeiro contato com o patógeno e é a razão da eficiência dos programas de vacinação. O mesmo fenômeno pode ser demonstrado

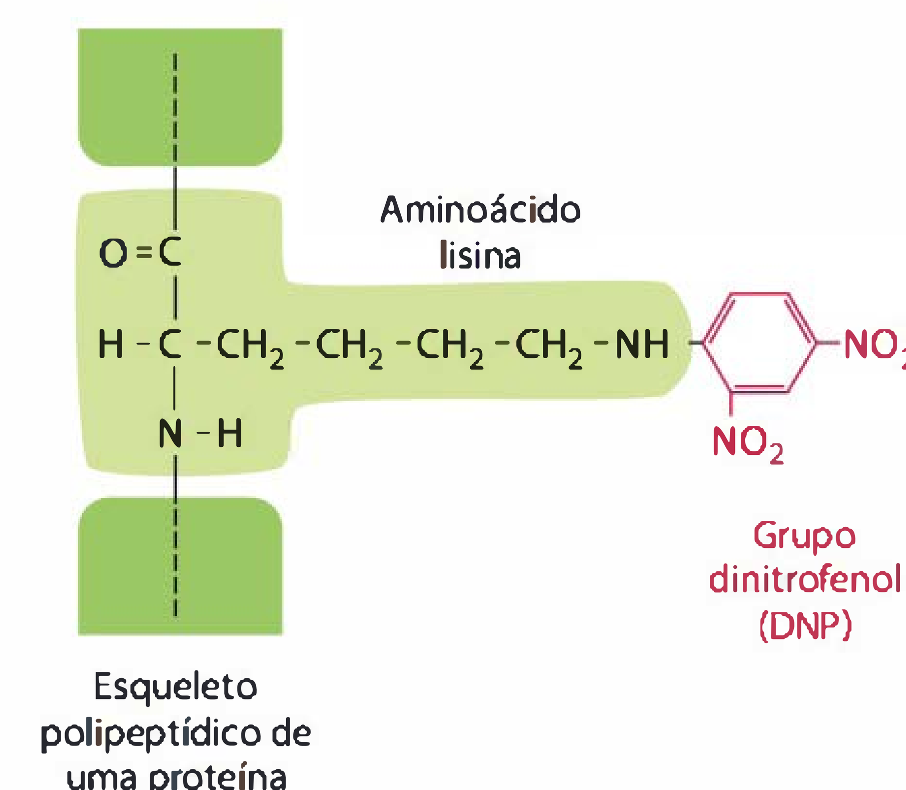


Figura 25-9 O grupo dinitrofenil (DNP). Apesar de este grupo ser extremamente pequeno para poder induzir uma resposta imune por si só, quando se encontra acoplado covalentemente a uma cadeia lateral de lisina em uma proteína, conforme ilustrado, o DNP estimula a produção de centenas de diferentes tipos de anticorpos, que se ligam especificamente a ele.

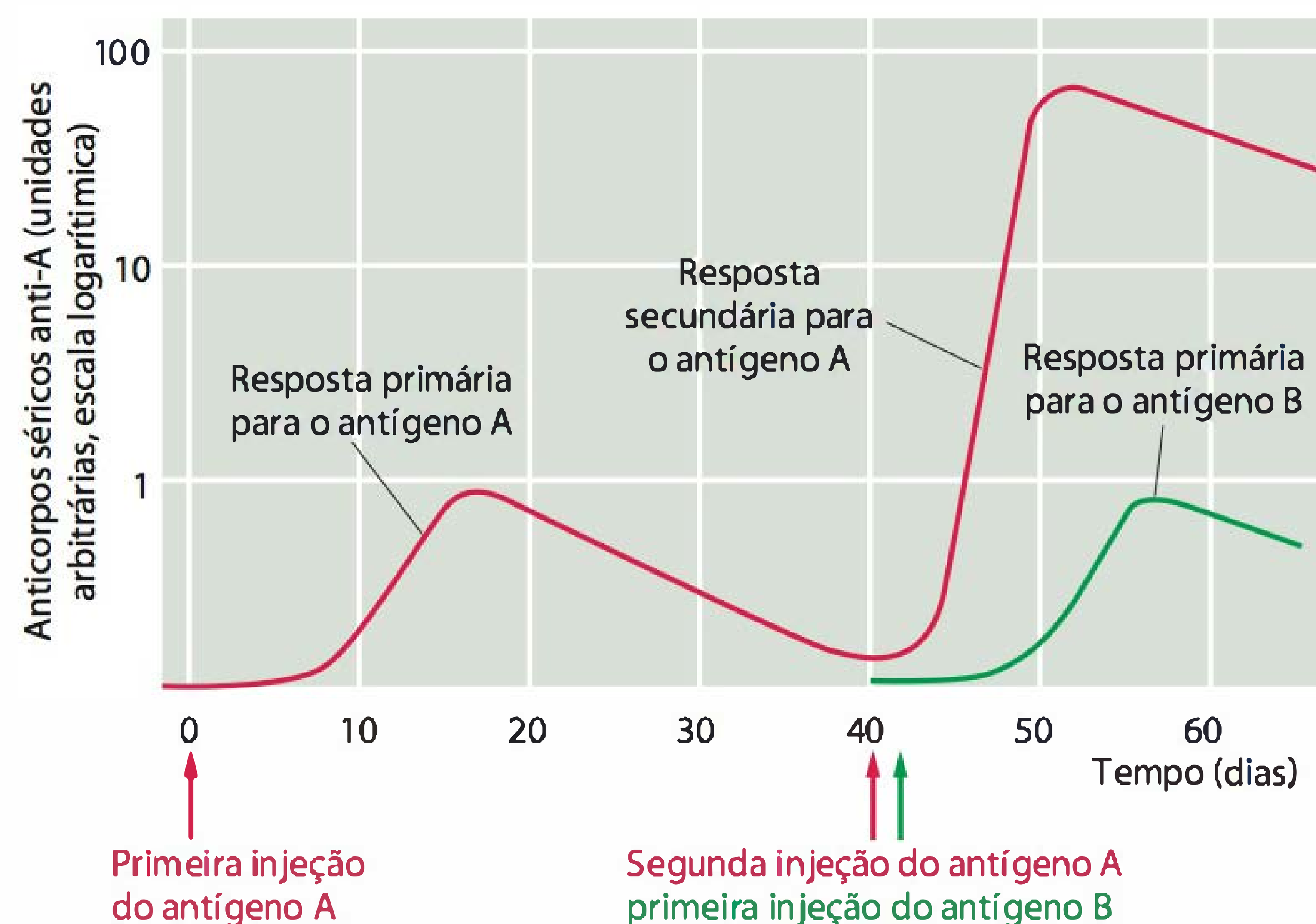


Figura 25-10 Respostas primária e secundária de anticorpos. A resposta secundária, induzida pelo segundo contato com o antígeno A, é mais rápida e mais intensa do que a resposta primária, sendo específica para o antígeno A, o que indica que o sistema imune adaptativo tem uma memória especial desencadeada pelo contato anterior com o antígeno A. O mesmo tipo de memória imune pode ser observada nas respostas mediadas por células T. Como discutiremos mais tarde, os tipos de anticorpos produzidos na resposta secundária são diferentes daqueles produzidos na resposta primária, e esses anticorpos se ligam ao antígeno mais fortemente.

em animais experimentais. Se um animal for imunizado uma única vez com um antígeno A, após alguns dias pode-se detectar uma resposta imune (mediada por anticorpos, mediada por células T, ou ambas); ela aumenta rápida e exponencialmente e, após, decresce gradualmente. Este é o perfil característico da **resposta imune primária**, que ocorre caracteristicamente em um animal que tenha tido o primeiro contato com o antígeno. Se, algumas semanas ou meses após este evento, ou mesmo com um intervalo de anos, o mesmo animal for reinjetado com o antígeno A, ele geralmente produzirá uma **resposta imune secundária**, que difere da resposta imune primária, onde o intervalo é menor, e a resposta é mais intensa e eficiente. Essas diferenças indicam que o animal "lembra-se" do primeiro contato com o antígeno A. Se um animal entra em contato com outro antígeno (p. ex., um antígeno B), mesmo depois da segunda injeção do antígeno A, o perfil da resposta imune decorrente é tipicamente de resposta primária e não secundária. A resposta secundária deve, portanto, refletir a **memória imunológica** antígeno-específica para o antígeno A (**Figura 25-10**).

A teoria da seleção clonal estabelece um conceito de interação em rede que auxilia no entendimento das bases celulares da memória imunológica. Em um animal adulto, os órgãos linfoides periféricos contém uma mistura de linfócitos que se encontram em pelo menos três estágios de maturação: *células virgens*, *células efetoras* e *células de memória*. Quando as **células virgens** encontram o antígeno pela primeira vez, algumas delas são estimuladas a proliferar e diferenciar-se em **células efetoras**, que são então as células que produzem uma resposta imune (as células B efetoras secretam anticorpos, enquanto as células T efetoras matam as células infectadas ou influenciam a resposta de outras células). Algumas células virgens estimuladas pelo antígeno proliferam e se diferenciam em **células de memória**, as quais não estão envolvidas diretamente com a resposta imune, mas que são mais fácil e rapidamente induzidas a se tornarem células efetoras pelo contato posterior com o mesmo antígeno. Quando elas encontram o antígeno, as células de memória (como as células virgens) podem originar tanto células efetoras como outras células de memória (**Figura 25-11**).

Assim, a resposta imune primária gera memória imunológica devido à expansão clonal, onde a proliferação das células virgens estimuladas pelos antígenos gera várias células de memória, em parte porque as células de memória são capazes de responder de forma mais sensível ao mesmo antígeno do que as células virgens. Além disso, ao contrário da maioria das células efetoras, que morrem dentro de dias ou de semanas, as células de memória podem viver por toda a vida do animal, mesmo na ausência de seus antígenos específicos, fornecendo uma memória imunológica para toda a vida.

Como discutiremos mais adiante, as células B de memória produzem anticorpos de diferentes classes e de maior afinidade para o antígeno do que aquelas produzidas pelas célu-

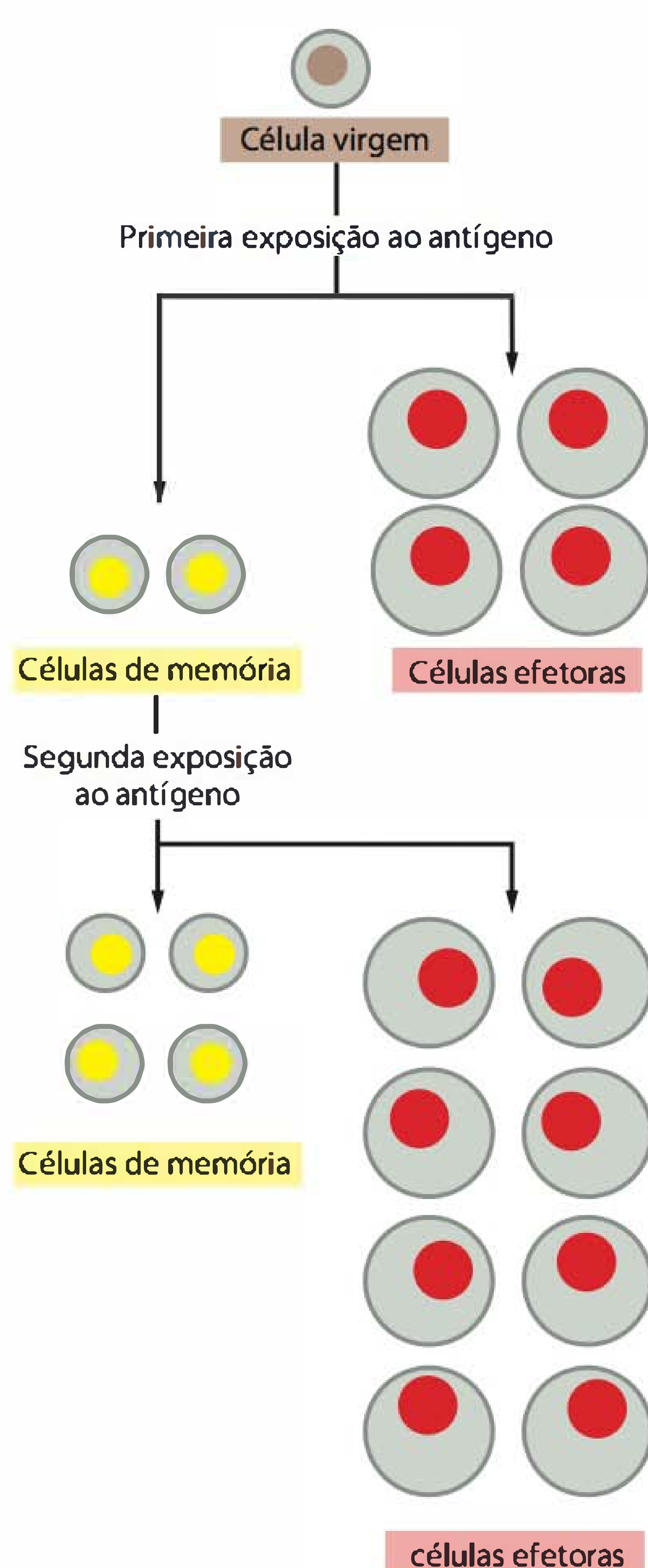


Figura 25-11 Um modelo para as bases celulares da memória imunológica. Quando os linfócitos virgens são estimulados pelos seus antígenos específicos, eles proliferam e diferenciam-se. A maioria transforma-se em células efetoras, que atuam e morrem, enquanto outros se tornam células de memória. Durante as exposições subsequentes ao mesmo antígeno, as células de memória respondem mais pronta e rapidamente do que as células virgens: elas proliferam e geram células efetoras e mais células de memória. No caso das células T, as células de memória também podem desenvolver-se a partir de células efetoras (não-apresentado).

las B virgens. Esta é a principal razão pela qual as respostas secundárias de anticorpos são mais eficazes na eliminação dos patógenos do que as respostas primárias.

Embora a maioria das células T e B efetoras morra após o final da resposta imune, algumas células efetoras sobrevivem e auxiliam na proteção duradoura contra o patógeno. Uma pequena proporção de células plasmáticas produzidas na resposta de células B primária, por exemplo, pode sobreviver por muitos meses na medula óssea, onde continuam a secretar anticorpos específicos para a corrente sanguínea.

A tolerância imunológica garante que os antígenos próprios não sejam atacados

Conforme discutido no Capítulo 24, as células do sistema imune inato usam os receptores de reconhecimento de padrões para distinguir os patógenos das moléculas normais do hospedeiro. O sistema imune adaptativo requer um sistema de reconhecimento muito mais sofisticado: ele precisa ser capaz de responder de forma específica a praticamente um número ilimitado de macromoléculas estranhas, e evitar a resposta a um grande número de moléculas produzidas pelo próprio organismo. Como isto é possível? Pode-se dizer que as moléculas próprias não induzem as reações imunes inatas necessárias para ativar as respostas imunes adaptativas. No entanto, mesmo quando uma infecção ou um dano ao tecido estimula uma reação inata, um grande número de moléculas próprias presentes normalmente não induzem uma resposta imune adaptativa. Por que não?

Uma resposta a esta questão é que o sistema imune adaptativo "aprende" a não reagir contra os antígenos próprios. Experimentos com transplantes proporcionaram inúmeras evidências para este processo de aprendizagem. Quando os tecidos são transplantados de um indivíduo para outro (e estes indivíduos não são gêmeos idênticos), o sistema imune do receptor geralmente reconhece as células do doador como estranhas e as destrói. (Por motivos que serão discutidos posteriormente, os antígenos estranhos das células do doador são tão poderosos que podem estimular uma resposta imune adaptativa extremamente intensa mesmo na ausência de agente infeccioso, dano ou adjuvante.) Se, no entanto, as células de uma linhagem de camundongos são introduzidas em um camundongo neonato de outra linhagem, algumas delas sobreviverão por toda a vida do animal receptor, e este animal receptor agora irá aceitar um enxerto do doador original, mesmo que rejeite um enxerto de um terceiro doador. Aparentemente, os antígenos não-próprios podem, em algumas circunstâncias, fazer com que o sistema imune torne-se especificamente não-responsivo a eles. Esta não-responsividade específica para alguns antígenos estranhos é conhecida como *tolerância imunológica adquirida* (**Figura 25-12**).

A não-responsividade do sistema imune adaptativo de um animal a suas próprias macromoléculas (*tolerância imunológica natural*, ou **autotolerância**) é adquirida da mesma forma. Um camundongo normal, por exemplo, não produz resposta imune contra um de seus próprios componentes proteicos do sistema do complemento denominado C5 (discutido no Capítulo 24). No entanto, um camundongo mutante que perdeu a sequência gênica que codifica para o C5 (mas que ainda assim é geneticamente idêntico ao camundongo normal) pode produzir uma forte resposta imune a esta proteína sérica, quando imunizado com ela. Igualmente, seres humanos que não possuem o gene normal que codifica para uma



Figura 25-12 Tolerância imunológica adquirida. O enxerto de pele aqui apresentado foi transplantado de um camundongo adulto marrom para um camundongo adulto branco. Este enxerto sobreviveu por várias semanas somente porque o camundongo branco, no período de seu nascimento, recebeu uma injeção de células da medula óssea do camundongo marrom, e assim tornou-se imunologicamente tolerante. Algumas das células da medula óssea do camundongo marrom (e de sua progênie) persistiram no camundongo adulto branco e continuaram a induzir tolerância nos linfócitos recém-formados que, de outro modo, reagiriam contra a pele marrom. (Cortesia de Leslie Brent, de I. Roitt, Essential Immunology, 6th ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1988.)

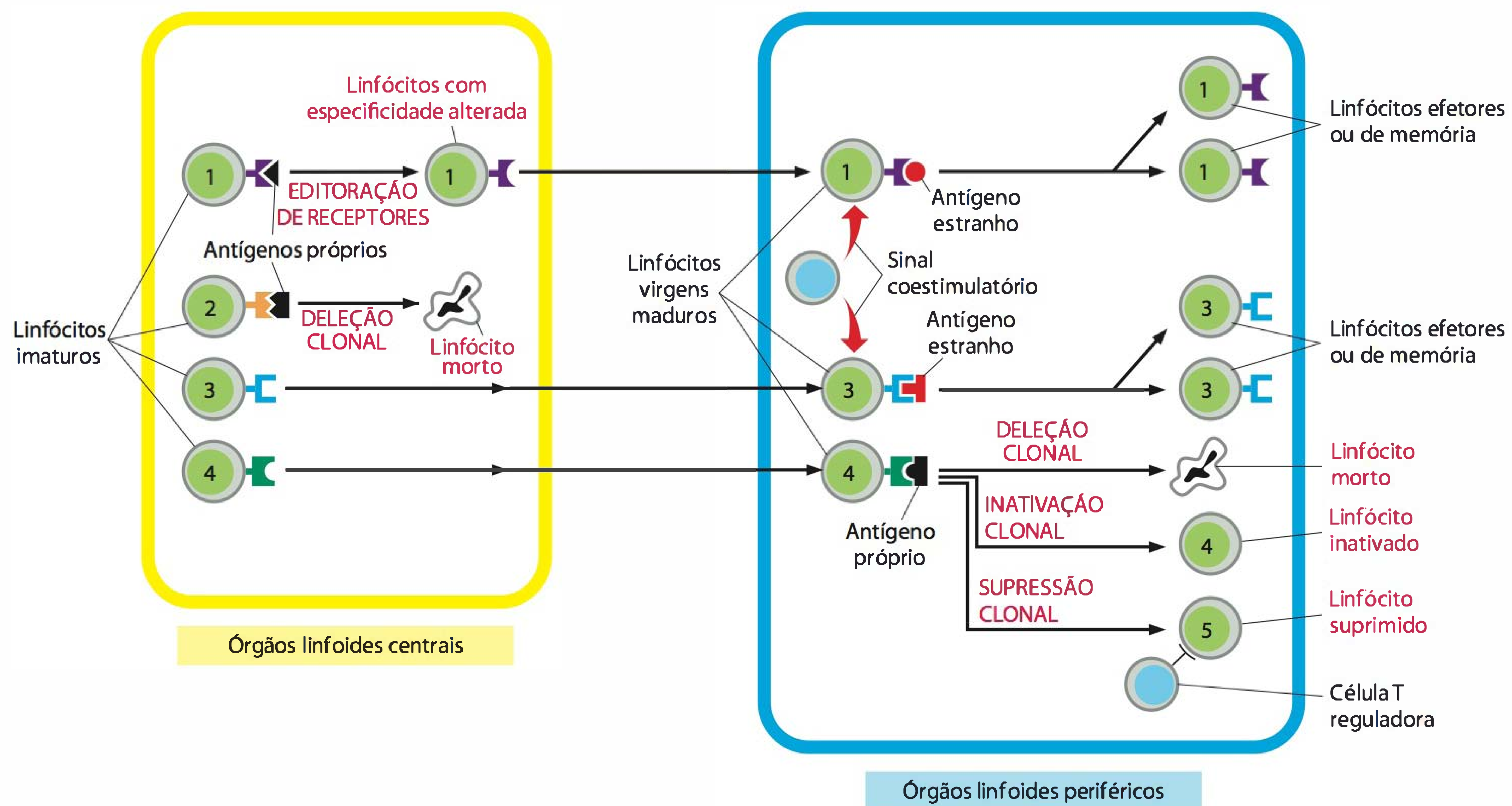


Figura 25-13 Mecanismo de indução de tolerância imunológica aos antígenos próprios. Quando linfócitos imaturos autorreativos ligam-se a seus próprios antígenos nos órgãos linfoides centrais, onde a célula é produzida, isso pode induzir uma alteração no seu receptor de antígeno de modo que ele não seja mais autorreativo (célula 1). Esse processo é denominado editoração do receptor e parece ocorrer principalmente nas células B em desenvolvimento. Alternativamente, a célula pode morrer por apoptose, processo este denominado deleção clonal (célula 2). Como essas duas formas de tolerância (apresentadas à esquerda) ocorrem nos órgãos linfoides centrais, são denominadas *tolerância central*. Quando um linfócito virgem autorreativo escapa da indução de tolerância nos órgãos linfoides centrais e liga-se aos seus antígenos próprios nos órgãos linfoides periféricos (célula 4), ele normalmente não será ativado, porque a sinalização geralmente ocorre sem o sinal coestimulador adequado, e a célula morre por apoptose (frequentemente após um período de proliferação), ou será inativada, ou subsequentemente suprimida por células T reguladoras (se o linfócito autorreativo for uma célula T efetora). Estas formas de tolerância, apresentadas à direita, são denominadas *tolerância periférica*.

proteína de coagulação, Fator VIII (e que, portanto, sangram excessivamente) produzem anticorpos contra a proteína quando administrada para o controle do sangramento.

A tolerância imunológica natural para uma determinada molécula própria mantém-se apenas enquanto a molécula continuar presente no corpo. Se uma proteína própria, como o C5, é removida experimentalmente de um animal adulto, o camundongo adquire a capacidade de responder a ela depois de algumas semanas ou meses. Assim, o sistema imune é geneticamente capaz de responder a moléculas próprias, mas aprende a não fazê-lo.

A autotolerância depende de vários mecanismos distintos:

1. No *editoramento do receptor*, os linfócitos em desenvolvimento que reconhecem as moléculas próprias (*linfócitos autorreativos*) mudam seus receptores de antígeno de modo que não reconheçam mais os autoantígenos.
2. Na *deleção clonal*, os linfócitos autorreativos morrem por apoptose quando se ligam aos autoantígenos.
3. Na *inativação clonal* (também denominada anergia clonal), os linfócitos autorreativos tornam-se funcionalmente inativados quando encontram os autoantígenos.
4. Na *supressão clonal*, as células T reguladoras eliminam a atividade dos linfócitos autorreativos.

Alguns desses mecanismos, especialmente os dois primeiros, editoramento do receptor e deleção clonal, atuam nos órgãos linfoides centrais quando os linfócitos autorreativos recém-formados encontram pela primeira vez seus autoantígenos, sendo responsáveis pelo processo de *tolerância central*. A inativação clonal e a supressão clonal, ao contrário, atuam principalmente quando os linfócitos encontram seus autoantígenos nos órgãos linfoides periféricos, sendo, então, responsáveis pelo processo de *tolerância periférica*. A deleção clonal e a inativação clonal, entretanto, atuam tanto na periferia quanto nos órgãos centrais (**Figura 25-13**).

Por que a ligação a um antígeno próprio leva à tolerância em vez de ativação? A resposta ainda não é completamente conhecida. Conforme será discutido posteriormente, para um linfócito ser ativado nos órgãos linfoides periféricos, ele precisa não só ligar-se ao seu antígeno, mas também receber sinais coestimuladores ligados à membrana e secretados (os sinais secretados são várias citocinas). Estes dois sinais são produzidos pelas células T auxiliares, no caso de um linfócito B, e por uma célula dendrítica ativada, no caso de um linfócito T. Como a produção desses sinais depende da exposição a um patógeno, um linfócito autorreativo normalmente encontra seu antígeno na ausência de tais sinais. Sob essas condições, uma célula B interagindo com o seu antígeno ou uma célula T interagindo com seu antígeno na superfície de uma célula dendrítica não-ativada não falhará na sua ativação e, frequentemente, irá tornar-se tolerante, sendo morta, inativada ou ativamente suprimida por uma célula T reguladora (ver Figura 25-13). Como discutiremos posteriormente, nos ór-

gãos linfoides periféricos, a ativação ou a tolerância de uma célula T ocorre, normalmente, na superfície de uma célula dendrítica.

Algumas vezes os mecanismos de tolerância falham, fazendo com que as células T ou B (ou ambas) reajam contra os antígenos tissulares do próprio organismo. A *miastenia grave* é um exemplo de tal **doença autoimune**. Os indivíduos afetados produzem anticorpos contra os receptores de acetilcolina de suas células musculoesqueléticas. Esses anticorpos interferem com o funcionamento normal desses receptores e, assim, o paciente torna-se fraco e pode morrer por não poder respirar. Igualmente, no *diabete juvenil* (*tipo 1*), reações autoimunes contra as células secretoras de insulina do pâncreas matam essas células, levando a uma deficiência severa de insulina.

Os mecanismos responsáveis pela quebra de tolerância aos antígenos próprios nas doenças autoimunes são desconhecidos. Existem evidências, no entanto, de que a ativação do sistema imune inato por infecções ou danos ao tecido pode auxiliar na estimulação de determinadas respostas contra o próprio em indivíduos com defeitos em seus mecanismos de autotolerância, levando à autoimunidade.

Os linfócitos circulam continuamente através dos órgãos linfoides periféricos

Os patógenos geralmente entram no organismo através das superfícies epiteliais, na maioria das vezes através da pele, do intestino ou do trato respiratório. Para induzir uma resposta imune adaptativa, os antígenos microbianos devem migrar dessas regiões até os órgãos linfoides periféricos como os linfonodos ou o baço, onde os linfócitos são ativados (ver Figura 25-5). A via a ser percorrida e o destino dependem do local onde ocorreu a entrada do patógeno. Os vasos linfáticos (ver Figura 25-3) levam os antígenos que entram através da pele ou do trato respiratório para os linfonodos locais. Os antígenos que entram através do intestino são destinados aos órgãos linfoides periféricos associados aos intestinos, como as placas de Peyer, e aqueles que penetram a corrente sanguínea são filtrados pelo baço. Como discutido anteriormente, na maioria dos casos, as células dendríticas transportam os antígenos do sítio de infecção para os órgãos linfoides periféricos, onde atuam na ativação das células T (ver Figura 25-5).

Somente uma pequena parcela da população total de linfócitos pode reconhecer um determinado antígeno microbiano no órgão linfoide periférico (estimado entre 1/10.000 e 1/100.000 de cada classe de linfócitos). Como essas células raras encontram a célula apresentadora de antígeno portando o seu antígeno complementar? A resposta é que os linfócitos circulam constantemente, alguns entre os órgãos linfoides periféricos e outros através da linfa e do sangue. No linfonodo, por exemplo, eles deixam continuamente a corrente sanguínea, passando entre as células endoteliais especializadas que revestem as pequenas veias denominadas *vênulas pós-capilares*. Após permearem pelo linfonodo, acumulam-se em pequenos vasos linfáticos que deixam o linfonodo e conectam-se com outros vasos linfáticos, que passam através de outros linfonodos posteriores (ver Figura 25-3). Passando por vasos cada vez maiores, os linfócitos eventualmente penetram o vaso linfático principal (o *ducto torácico*), que os transporta de volta ao sangue (**Figura 25-14**).

Esse fluxo contínuo entre o sangue e a linfa termina somente se um linfócito for ativado por seu antígeno específico em um órgão linfoide periférico. A partir desse momento, o linfócito fica retido no órgão linfoide periférico, onde prolifera e diferencia-se em células efetoras ou células de memória. Algumas dessas células T efetoras deixam o órgão linfoide e migram através da linfa até a corrente sanguínea, pela qual serão levadas até o local de infecção (ver Figura 25-5) por dias até morrerem; outras migram para a medula óssea, onde

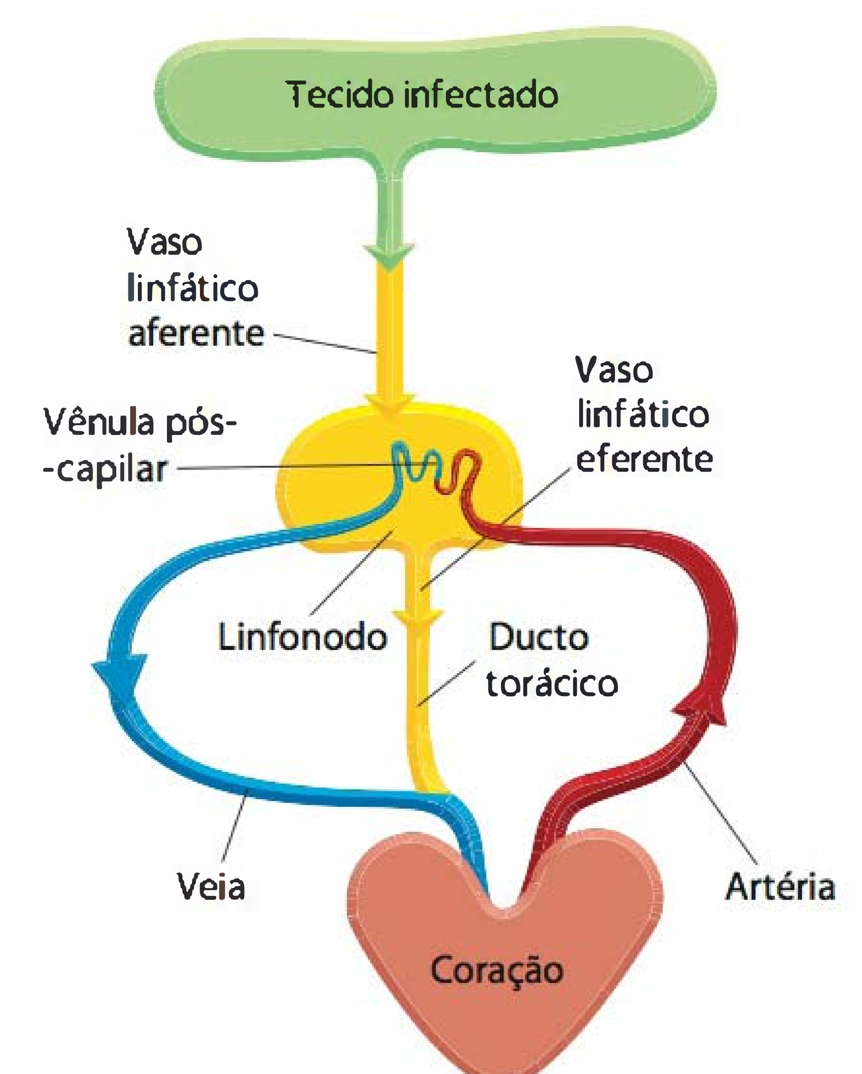


Figura 25-14 A via de circulação dos linfócitos entre a linfa e o sangue. A circulação através de um linfonodo (*amarelo*) é demonstrada aqui. Os antígenos microbianos são transportados para dentro do linfonodo por uma célula dendrítica (não-apresentado), que entra nos linfonodos via vasos linfáticos aferentes, drenando um tecido infectado (*verde*). As células T e B, ao contrário, entram no linfonodo através de uma artéria e migram para fora da corrente sanguínea através das vênulas pós-capilares. A não ser que encontrem seus antígenos, as células T e B deixam o linfonodo através dos vasos linfáticos eferentes, que, eventualmente, conectam-se com o ducto torácico. O ducto torácico se liga a uma veia de grande calibre, que transporta sangue para o coração, completando ao processo de circulação das células T e B. Um ciclo de circulação típico ocorre em cerca de 12 a 24 horas.

secretam anticorpos para a corrente sanguínea por meses ou até anos. As células T e B de memória juntam-se aos linfócitos recirculantes.

A recirculação dos linfócitos depende de interações específicas entre a superfície celular do linfócito e a superfície das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos dos órgãos linfoides periféricos. Vários tipos celulares encontrados no sangue entram em contato com essas células endoteliais especializadas que revestem as vênulas pós-capilares dos linfonodos, mas somente os linfócitos aderem-se a elas e migram para fora da corrente sanguínea para os nodos. Os linfócitos, inicialmente, aderem-se às células do endotélio via *receptores de alojamento* (*homing*) que se ligam a ligantes específicos (geralmente denominados *contrarreceptores*) da superfície das células endoteliais. A migração dos linfócitos para os linfonodos, por exemplo, depende da expressão de um receptor de alojamento denominado *L-selectina*, um membro da família das selectinas, uma das lecitinas de superfície celular. Essa proteína liga-se a grupos de açúcares específicos em um contrarreceptor que é expresso exclusivamente na superfície de células endoteliais especializadas que revestem as vênulas pós-capilares dos linfonodos, fazendo com que os linfócitos fiquem fracamente aderidos às células endoteliais, rolando lentamente na sua superfície. Este rolamento continua até que ocorra outro tipo de adesão mais forte mediada por proteínas quimiotáxicas (denominadas *quimiocinas*; ver a seguir) secretadas pelas células endoteliais. Essa forte adesão é mediada por membros da família das *integrinas* das moléculas de adesão celular, as quais se tornam ativadas na superfície dos linfócitos. Neste momento, os linfócitos cessam o rolamento e atravessam os vasos sanguíneos para o interior do linfonodo (**Figura 25-15**). Tanto as selectinas quanto as integrinas foram discutidas no Capítulo 19.

As **quimiocinas** são um tipo de citocinas. Elas são proteínas pequenas, secretadas, carregadas positivamente e que têm papel fundamental no direcionamento da migração de vários tipos de células, incluindo os leucócitos. Elas são estruturalmente semelhantes entre si e ligam-se à superfície das células endoteliais, bem como aos proteoglicanos carregados negativamente presentes na matriz extracelular dos órgãos. Por meio da ligação aos receptores associados à proteína G (discutido no Capítulo 15) na superfície de células sanguíneas específicas, as quimiocinas atraem as células da corrente sanguínea para um órgão, guiando-as para um local específico dentro do órgão e auxiliando-as a cessar o processo de migração. (Infelizmente, o vírus da AIDS, o HIV, também se liga a determinados receptores de quimiocinas, bem como ao correceptor CD4 discutido mais adiante, permitindo que o vírus infecte o leucócito.) As células T e B inicialmente entram na mesma região de um linfonodo, mas a seguir diferentes quimiocinas as guiam para regiões distintas do linfonodo – as células T dirigem-se para a região *paracortical*, e as células B, para os *folículos linfoides* (**Figura 25-16**).

Se as células T ou B não encontrarem seus antígenos, deixarão o linfonodo através dos vasos linfáticos eferentes. Porém, se as células encontrarem seu antígeno, serão estimuladas a apresentarem seus receptores de adesão que aprisionam as células nos linfonodos. As células acumulam-se nas junções entre as áreas de células B e células T, onde as poucas células T e B podem interagir para proliferar e diferenciar-se em células efetoras e em células de memória. Muitas células efetoras deixam o linfonodo, expressando diferentes receptores para quimiocinas que irão auxiliar no direcionamento para os seus novos destinos – as células T para o local de infecção, e as células B para a medula óssea.

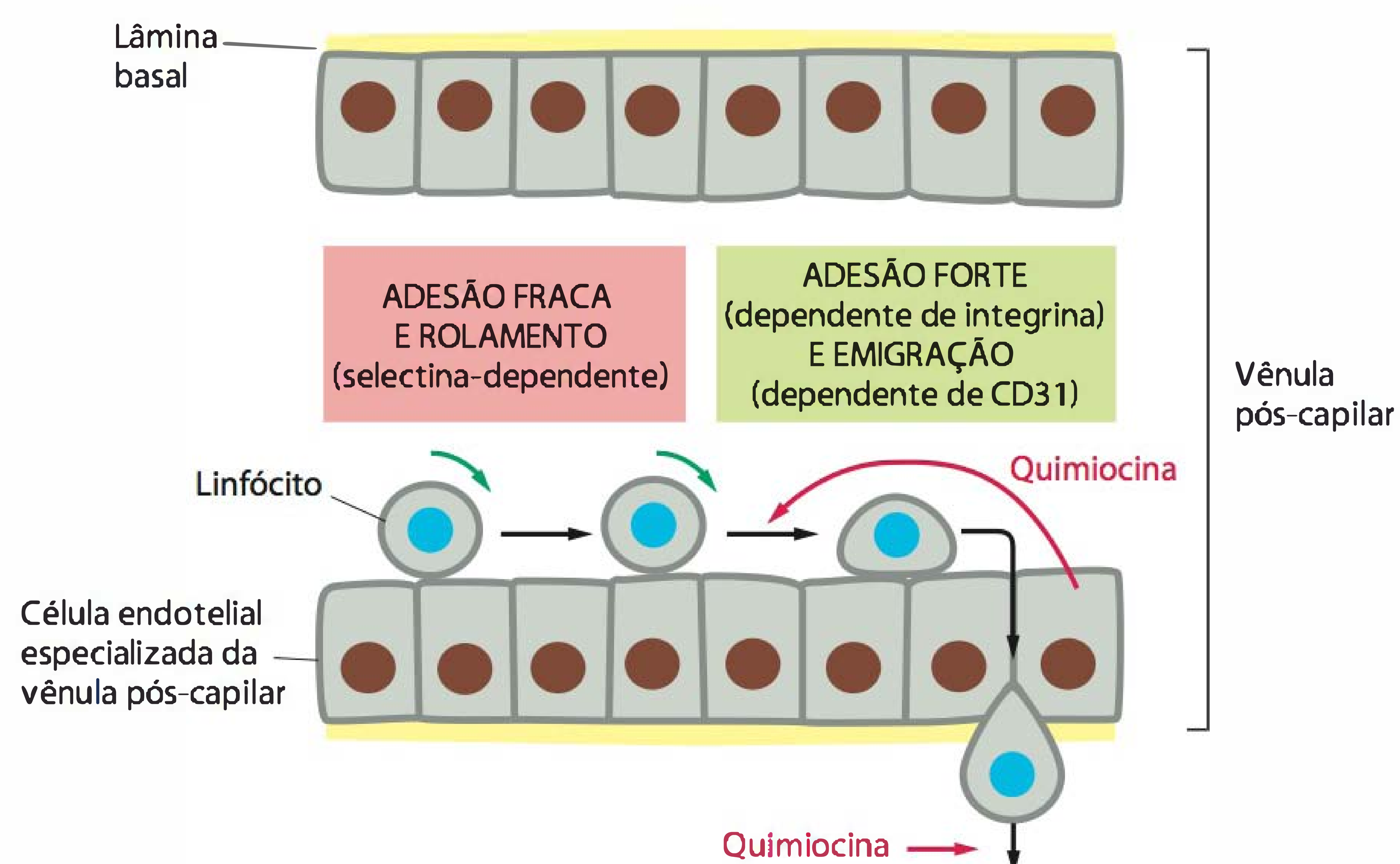


Figura 25-15 A migração dos linfócitos da corrente sanguínea para o linfonodo. Um linfócito circulante adere fracamente à superfície de uma célula endotelial especializada que reveste a vênula pós-capilar em um linfonodo. Esta adesão inicial é mediada por selectina-L na superfície do linfócito. A adesão é suficientemente fraca para permitir que os linfócitos rolem sobre a superfície das células endoteliais, empurrados pelo fluxo sanguíneo. Estimulados por citocinas que são secretadas pelas células endoteliais (*seta curva em vermelho*), os linfócitos rapidamente ativam um forte sistema de adesão mediado por integrinas. Esta adesão forte possibilita que a célula pare de rolar. Os linfócitos então usam uma proteína de adesão (CD31) para se ligar às junções entre as células endoteliais adjacentes e migrar para fora da vênula. A CD31 está localizada na superfície do linfócito e nas junções entre as células endoteliais. A migração subsequente dos linfócitos para dentro dos linfonodos dependente das quimiocinas produzidas dentro do linfonodo (*setas retas em vermelho*). A migração de outras células brancas do sangue da corrente sanguínea para os locais de infecção ocorre de maneira similar.

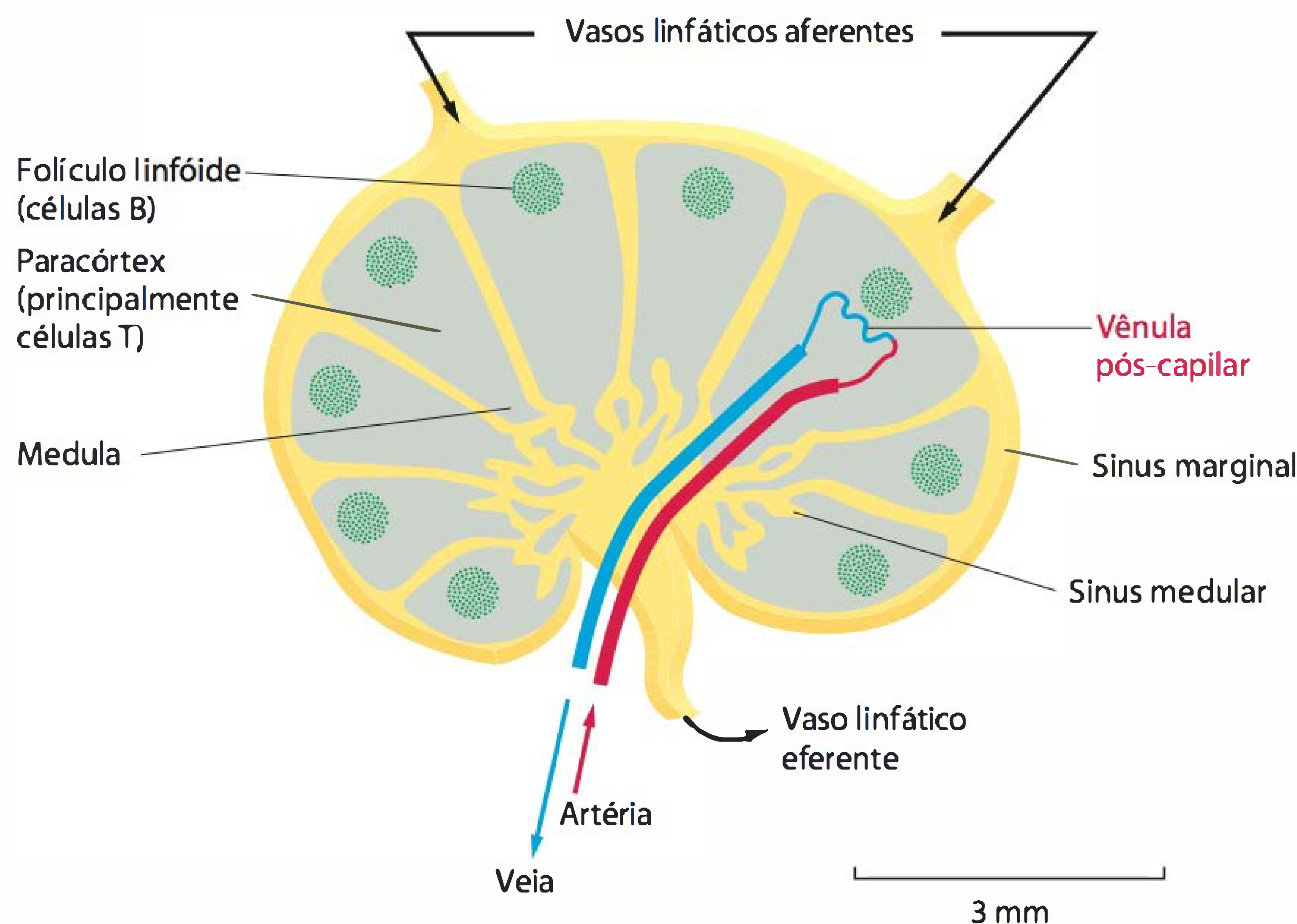


Figura 25-16 Um esquema simplificado do linfonodo humano. As células B são inicialmente agrupadas em estruturas denominadas folículos linfoides, enquanto que as células T ficam concentradas principalmente no paracórtex. Ambos os tipos de linfócitos são atraídos por quimiocinas a entrar no linfonodo, deixando o sangue via vênulas pós-capilares (ver Figura 25-15). As células T e B então migram para suas respectivas áreas, atraídas por diferentes quimiocinas. Se elas não encontrarem seus antígenos específicos, tanto as células T como as células B entram no sinusoide medular e deixam o linfonodo via vaso linfático eferente. Este vaso desemboca na corrente sanguínea, possibilitando que os linfócitos iniciem outro ciclo de circulação através dos órgãos linfoides periféricos (ver Figura 25-14). Se elas encontram seus antígenos específicos, as células B e T são retidas no linfonodo e são ativadas a tornarem-se células efetoras ou de memória. As células T e B que responderem ao mesmo patógeno poderão interagir dentro e próximo dos folículos linfoides.

Resumo

As respostas imunes inatas são ativadas no local de infecção por padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), os quais são reconhecidos por meio dos receptores de reconhecimento de padrões produzidos pelas células do sistema imune inato. Além de combaterem diretamente a infecção, essas respostas imunes inatas auxiliam na ativação das respostas imunes adaptativas nos órgãos linfoides periféricos. Diferentemente das respostas imunes inatas, as respostas adaptativas apresentam memória imunológica e, portanto, proporcionam uma proteção duradoura contra os patógenos que as induziram.

O sistema imune adaptativo é composto por milhões de clones de linfócitos, sendo que as células de cada clone compartilham um receptor de superfície celular exclusivo que permite que elas se associem a um antígeno em particular. A ligação de um antígeno a estes receptores, no entanto, normalmente não é suficiente para estimular a proliferação e a diferenciação dos linfócitos em células efetoras com a capacidade de eliminar o patógeno. Sinais coestimuladores ligados à membrana e uma variedade de sinais secretados (citocinas) por outras células especializadas dos órgãos linfoides também são necessários. As células T auxiliares fornecem tais sinais para as células B, enquanto as células dendríticas emitem tais sinais para as células T. As células B efetoras secretam anticorpos que podem atuar em locais distantes para auxiliar na eliminação de patógenos extracelulares e suas toxinas. As células T efetoras, ao contrário, agem localmente no sítio da infecção, matando as células hospedeiras infectadas ou auxiliando outras células a eliminar os patógenos. Como parte da resposta imune adaptativa, alguns linfócitos proliferam e diferenciam-se em células de memória, as quais são capazes de responder de forma mais rápida e eficiente no contato subsequente com o mesmo patógeno invasor. Tanto as células T quanto as células B circulam continuamente entre os órgãos linfoides periféricos e entre o sangue e os linfonodos. Somente quando encontram o antígeno estranho específico no órgão linfoide periférico é que irão parar de migrar, proliferarão e se diferenciarão em células efetoras ou células de memória. Os linfócitos que reagem contra as moléculas próprias podem ser tanto induzidos a alterar seus receptores quanto ser eliminados, inativados ou suprimidos por células T reguladoras, de modo que o sistema imune adaptativo normalmente evita o ataque contra as moléculas e células do próprio hospedeiro.

CÉLULAS B E ANTICORPOS

Os vertebrados, inevitavelmente, morrem de infecção se não forem capazes de produzir anticorpos. Os anticorpos defendem-nos contra infecções ligando-se aos vírus e às toxinas microbianas, inativando-os (ver Figura 25-2). Quando os anticorpos se ligam aos patógenos invasores, eles também recrutam alguns componentes do sistema imune inato, incluindo vários tipos de leucócitos, e componentes do sistema do complemento (discutido no Capítulo 24). Os leucócitos e os componentes do complemento ativados agem em conjunto para atacar os invasores.

Sintetizados exclusivamente pelas células B, os anticorpos são produzidos em bilhões de formas, cada uma com uma sequência de aminoácidos diferente. Coletivamente denomi-

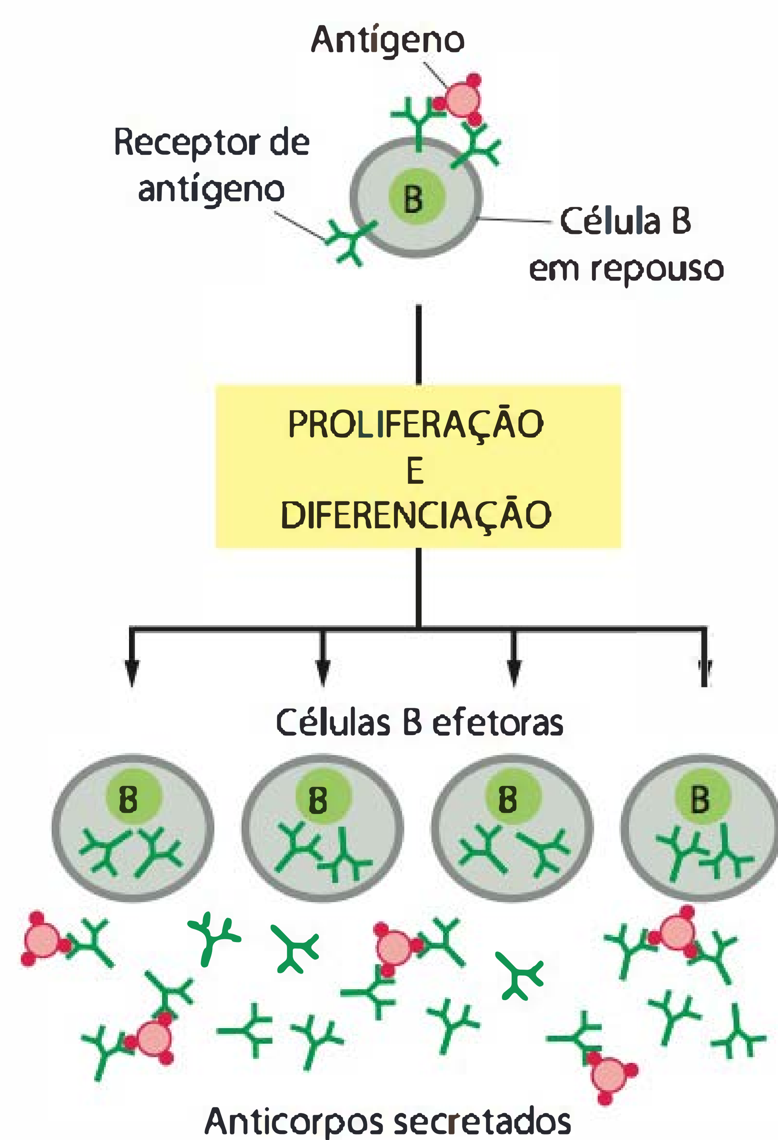


Figura 25-17 Anticorpos de membrana e anticorpos secretados produzidos por um clone de células B. Quando as células B virgens ou de memória são ativadas pelo antígeno (e por células T auxiliares, não-representadas), elas proliferam e se diferenciam em células efetoras. As células efetoras produzem e secretam anticorpos com um mesmo tipo de sítio de ligação ao antígeno, que é o mesmo que originalmente interagiu com os anticorpos associados à membrana que serviram como receptores de antígenos.

nadas **imunoglobulinas** (cuja forma abreviada é **Ig**), estão entre os componentes proteicos mais abundantes no sangue, constituindo em torno de 20% do peso total das proteínas presentes no plasma. Os mamíferos produzem cinco classes de anticorpos; cada uma medeia uma resposta biológica característica após a ligação com o antígeno. Nesta seção, iremos tratar da estrutura e da função dos anticorpos e de como eles interagem com os antígenos.

As células B produzem anticorpos que atuam tanto como receptores de superfície celular quanto como proteínas secretadas

Todas as moléculas de anticorpos produzidas por uma mesma célula B possuem o mesmo sítio de ligação para o antígeno. Os primeiros anticorpos produzidos por um linfócito B recém-formado não são secretados, mas são inseridos na membrana plasmática, onde atuam como receptores de antígenos. Cada célula B tem aproximadamente 10^5 desses receptores na membrana plasmática. Conforme será discutido posteriormente, cada um desses receptores está associado de forma estável a um complexo de proteínas transmembrana que ativam as vias de sinalização intracelular quando um antígeno do lado de fora da célula se liga ao receptor.

Cada clone de célula B produz um único tipo de anticorpo, cada um com um único sítio de ligação ao antígeno. Quando um antígeno (com o auxílio de uma célula T) ativa uma célula B virgem ou de memória, esta célula B prolifera e se diferencia em uma célula efetora secretora de anticorpos. Estas células efetoras produzem e secretam grandes quantidades de anticorpos solúveis (em vez dos associados à membrana), os quais possuem os mesmos sítios de ligação do antígeno que o anticorpo de superfície celular que serviu anteriormente como receptor de antígeno (**Figura 25-17**). As células B efetoras podem começar a secretar anticorpos enquanto ainda são pequenos linfócitos, mas, no estágio final de sua maturação, tornam-se grande células plasmáticas (ver Figura 25-7B), que secretam anticorpos continuamente em um nível surpreendente, em torno de 5 mil moléculas por segundo. Apesar de muitas delas morrerem após alguns dias, algumas sobrevivem na medula óssea por meses ou anos e continuam a secretar anticorpos na corrente sanguínea, proporcionando proteção duradoura contra o patógeno que estimulou sua produção.

Um anticorpo típico possui dois sítios idênticos de ligação a antígenos

A forma simplificada de uma molécula de anticorpo é um Y com dois sítios idênticos de ligação a antígenos, um em cada extremidade dos braços do Y (**Figura 25-18**). Por causa de seus dois sítios de ligação ao antígeno, eles são descritos como *bivalentes*. Considerando que um antígeno tem três ou mais determinantes antigênicos, as moléculas de anticorpos bivalentes podem se intercruzar, formando uma grande rede (**Figura 25-19**) que os macrófagos podem fagocitar e degradar facilmente. A eficiência da ligação com o antígeno e da ligação cruzada pode ser incrementada pela flexibilidade da *região da dobradiça* na maioria dos anticorpos, a qual permite que a distância entre os dois sítios de ligação do antígeno varie (**Figura 25-20**).

O efeito protetor dos anticorpos não é simplesmente determinado pela sua habilidade de se ligar ao antígeno e fazer intercruzamento. A cauda da molécula em forma de Y medeia outras atividades dos anticorpos. Conforme discutiremos a seguir, os anticorpos com seus dois sítios idênticos de ligação ao antígeno podem possuir qualquer uma das várias regiões caudais distintas. Cada tipo de região caudal confere ao anticorpo propriedades funcionais diferentes, como a habilidade de ativar o sistema do complemento, promover a ligação com células fagocíticas ou atravessar a placenta da mãe para o feto.

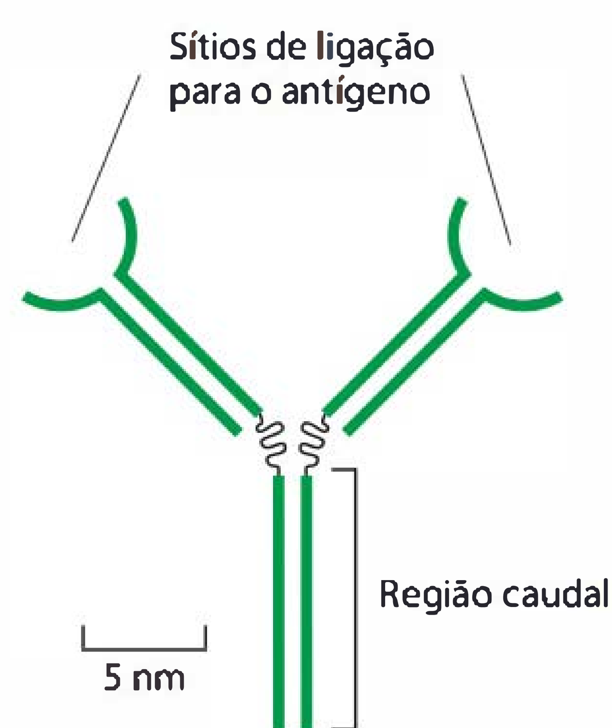


Figura 25-18 Representação simples de uma molécula de anticorpo. Note que existem dois sítios idênticos de ligação ao antígeno.

Uma molécula de anticorpo é composta por cadeias pesadas e cadeias leves

A unidade estrutural básica de uma molécula de anticorpo consiste em quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas **cadeias leves** (**L**) idênticas entre si (cada uma contendo em torno de 220 aminoácidos) e duas **cadeias pesadas** (**H**) também idênticas entre si (cada uma contendo em torno de 440 aminoácidos). As quatro cadeias são mantidas unidas por meio da combinação de ligações não-covalentes e covalentes (dissulfeto). A molécula é composta por duas metades idênticas, cada uma com o mesmo sítio de ligação ao antígeno. Em geral,

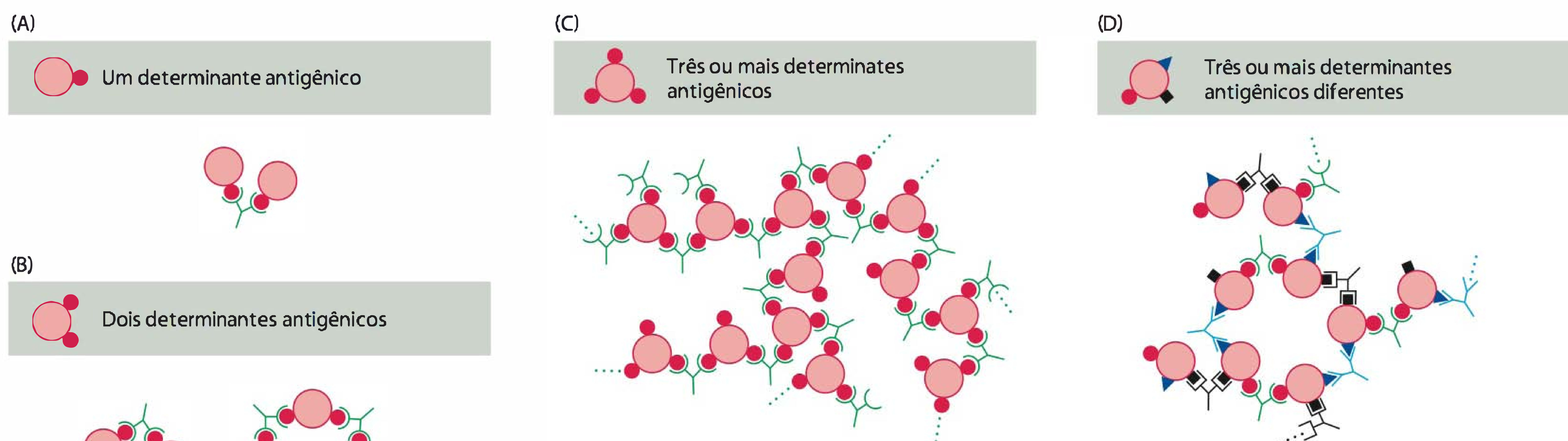


Figura 25-19 Interações antígeno-anticorpo. Uma vez que os anticorpos possuem dois sítios de ligação aos antígenos, eles podem interligar antígenos. Os tipos formados de complexos antígeno-anticorpo dependem do número de determinantes antigênicos existentes no antígeno. (A-C) Uma única espécie de anticorpo (um anticorpo monoclonal) é capaz de associar-se a antígenos contendo uma, duas ou três cópias de um mesmo tipo de determinante antigênico. Antígenos com dois determinantes antigênicos podem formar pequenos complexos cíclicos ou cadeias lineares com anticorpos, enquanto antígenos com três ou mais determinantes antigênicos podem formar grandes redes, que prontamente precipitam. (D) A maioria dos antígenos possui vários determinantes antigênicos diferentes (ver Figura 25-29A), e diferentes anticorpos que reconhecem diferentes determinantes antigênicos podem cooperar para interligar os antígenos em grandes redes tridimensionais.

tanto as cadeias leves como as pesadas colaboram para compor a superfície do sítio de ligação ao antígeno (**Figura 25-21**).

Existem cinco classes de cadeias pesadas de anticorpos, cada uma com atividades biológicas diferentes

Nos mamíferos, existem cinco *classes* de anticorpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uma com sua própria classe de cadeia pesada – α, δ, ϵ, γ e μ, respectivamente. As moléculas de IgA possuem cadeias α, as moléculas de IgG possuem cadeias γ, e assim por diante. Além disso, existem algumas subclasses de moléculas de imunoglobulinas IgG e IgA; por exemplo, existem, nos humanos, quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), com suas respectivas cadeias γ_1, γ_2, γ_3 e γ_4. As várias cadeias pesadas têm uma conformação característica desde a região da dobradiça até a cauda dos anticorpos, e é por isso que cada classe (e subclasse) tem características próprias.

A **IgM** possui uma cadeia pesada μ e é sempre a primeira classe de anticorpo produzida pelas células B em desenvolvimento, embora muitas células B eventualmente mudem a classe de anticorpos produzida conforme o antígeno que as estimulou. As primeiras células da linhagem de células B que produzem Ig são as *células pró-B*, as quais produzem somente cadeias μ. Elas dão origem às *células pré-B*, nas quais as cadeias μ se associam às *cadeias leves substitutas* (que serão substituídas pelas autênticas cadeias leves) que são inseridas na membrana plasmática. A sinalização deste receptor de células pré-B é necessária para que a célula progrida para o próximo estágio de desenvolvimento, quando então produzirá a verdadeira cadeia leve. As cadeias leves combinam-se com as cadeias μ, tomando o lugar das cadeias leves substitutas, para formar as quatro moléculas de IgM (cada uma com duas cadeias M e das cadeias leves). Essas moléculas então se inserem na membrana plasmática, onde atuam como receptores de antígenos. Nesta fase, a célula é denominada *célula B virgem imatura*. Após deixar a medula óssea, a célula começa a produzir também moléculas de **IgD** de superfície celular, com o mesmo sítio de ligação ao antígeno presente nas moléculas de IgM. A partir dessa etapa, a célula é denominada *célula B virgem madura*. Esta é a célula que pode responder a antígenos estranhos nos órgãos linfoides periféricos (**Figura 25-22**).

A IgM não é só a primeira classe de anticorpos a aparecer na superfície da célula B em desenvolvimento. Ela é também a principal classe secretada na corrente sanguínea nos estágios iniciais da resposta primária de anticorpos, na primeira exposição a um antígeno. (Ao contrário das moléculas de IgM, as moléculas de IgD são secretadas somente em pequenas quantidades e parecem atuar principalmente como receptores de superfície celular para an-

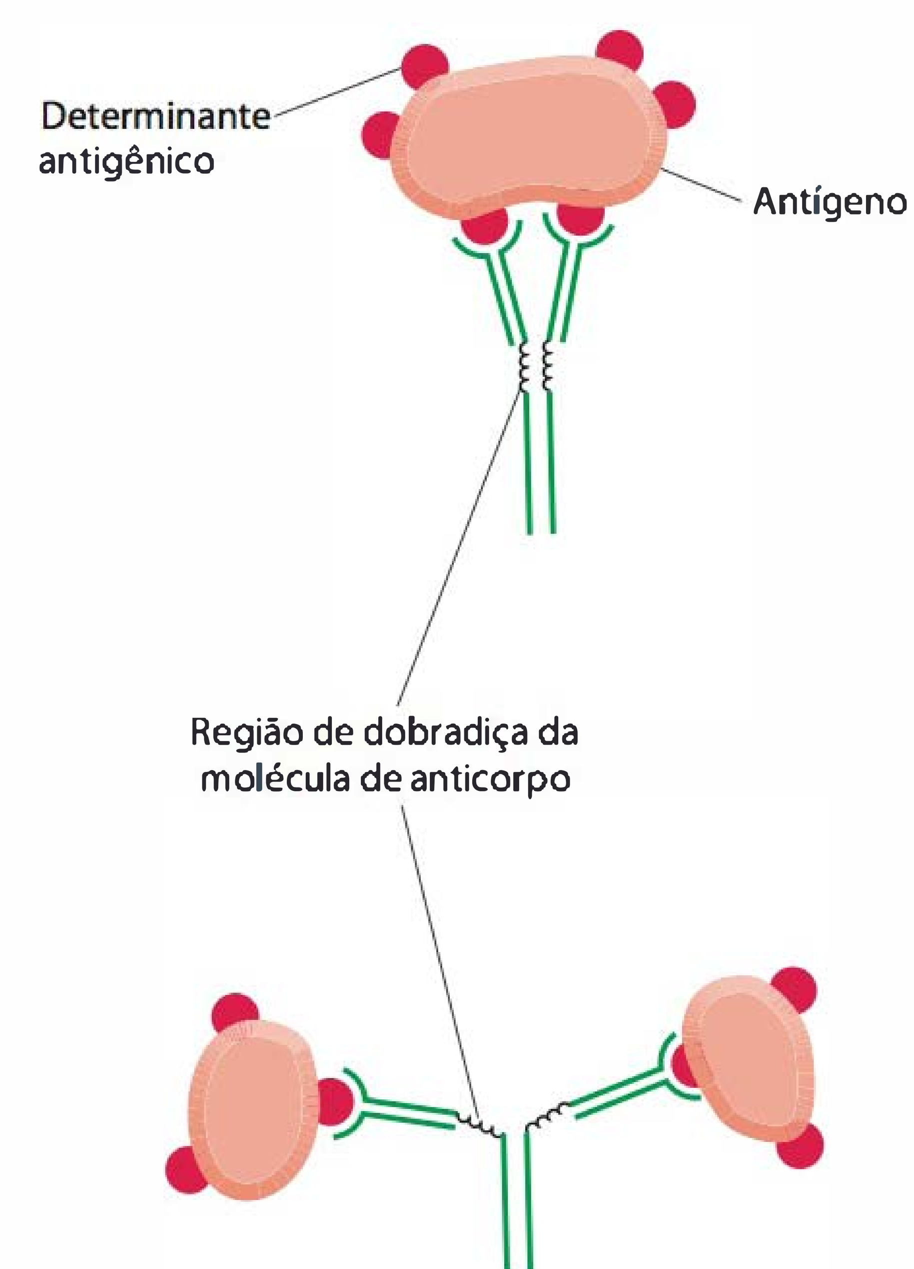


Figura 25-20 A região de dobradiça de uma molécula de anticorpo. Considerando a sua flexibilidade, a região de dobradiça confere maior eficiência na ligação ao antígeno e em sua interligação.

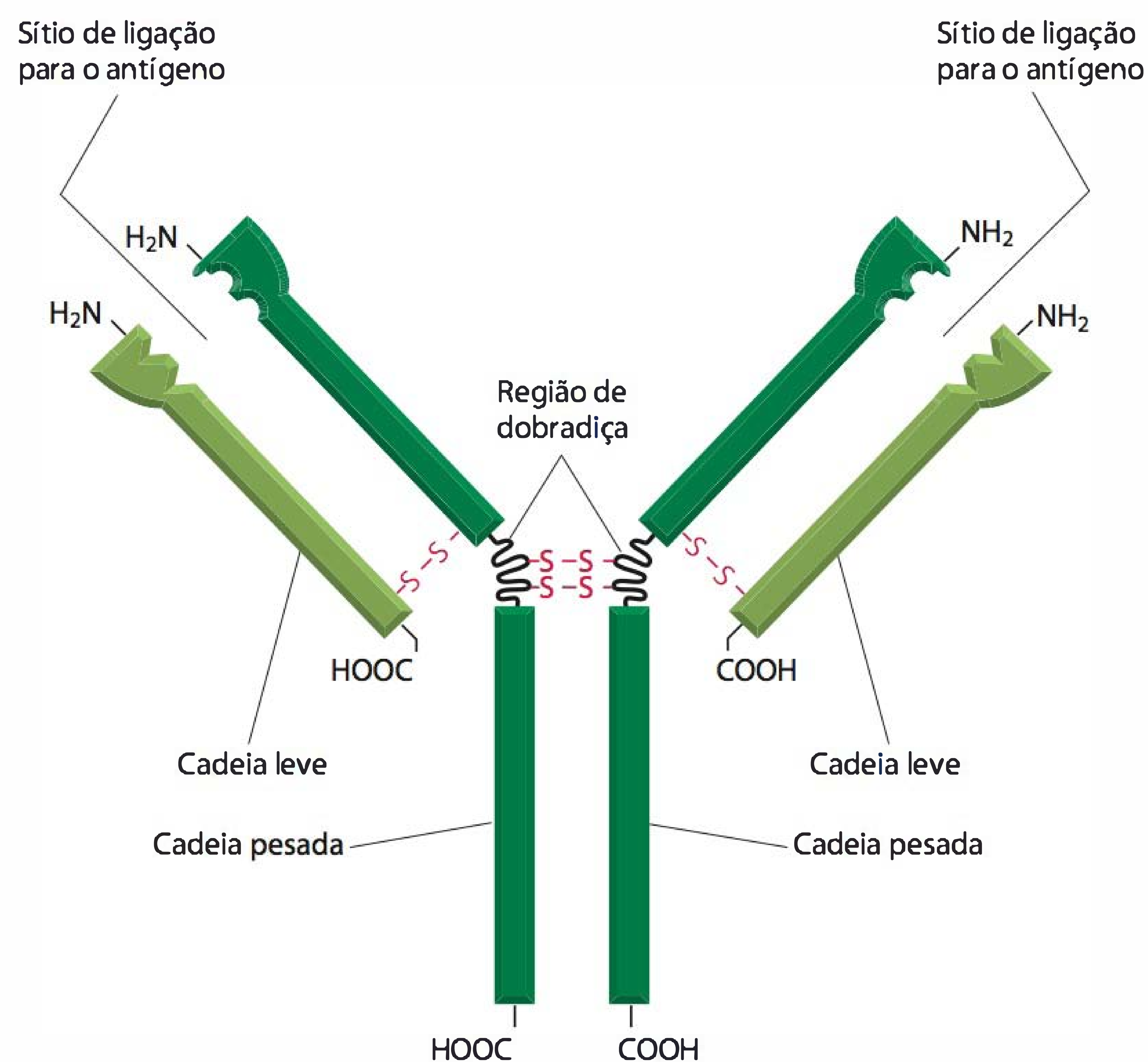


Figura 25-21 Desenho esquemático de uma molécula de anticorpo bivalente. Ela é composta por quatro cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Os dois sítios de ligação ao antígeno são idênticos, cada um formado por regiões N-terminais das cadeias leves e por regiões N-terminais das cadeias pesadas. As duas cadeias pesadas formam a região da cauda e a região da dobradiça da molécula de anticorpo.

tígenos.) Na sua forma secretada, a IgM é um pentâmero composto por cinco unidades de quatro cadeias, formando assim um total de 10 sítios de ligação ao antígeno. Cada pentâmero contém uma cópia de outra cadeia polipeptídica, denominada *cadeia J* (*junção*). A cadeia J é produzida pelas células secretoras de IgM e é covalentemente inserida entre duas regiões terminais adjacentes (**Figura 25-23**).

Quando um antígeno com múltiplos determinantes antigênicos idênticos (ver Figura 25-19) se liga a uma única molécula pentamérica de IgM secretada, ela altera a estrutura do pentâmero, permitindo a ativação do sistema do complemento. Conforme discutido no Capítulo 24, quando o antígeno está na superfície de um patógeno invasor, a ativação do complemento pode tanto marcar o patógeno para fagocitose quanto destruí-lo diretamente. Como discutiremos mais adiante, a ativação do complemento também pode intensificar a resposta imune contra um antígeno: a ligação de um componente ativado do complemento ao complexo antígeno-anticorpo, por exemplo, pode aumentar a capacidade do antígeno de estimular uma resposta de célula B em mais de mil vezes (ver Figura 25-71A).

A principal classe de imunoglobulinas presentes no sangue é a **IgG**, a qual é um monômero com quatro cadeias (ver Figura 25-21) produzido em grandes quantidades durante a resposta imune secundária. Além de ativar o complemento, a porção terminal de uma molécula de IgG liga-se a receptores específicos em macrófagos e em neutrófilos. É principalmente por meio destes **receptores Fc** (assim chamados porque as porções terminais dos

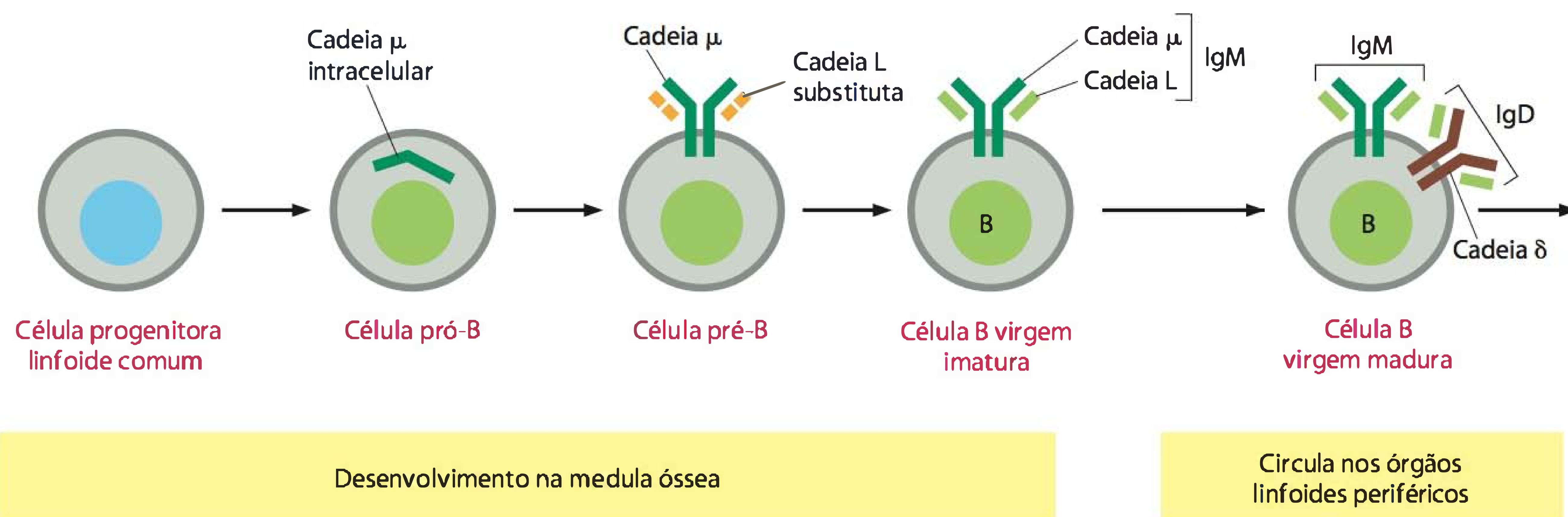


Figura 25-22 Os principais estágios do desenvolvimento da célula B. Todos os estágios representados ocorrem independentemente do antígeno. As células pró-B produzem cadeias μ, mas elas permanecem no retículo endoplasmático até que a cadeia leve substituta seja produzida. Embora não esteja representado na figura, todas as moléculas de Ig de superfície celular estão associadas a proteínas transmembrana que auxiliam na transmissão de sinais para o interior da célula (ver Figura 25-70). Quando são ativadas pelo antígeno estranho específico e pelas células T auxiliares nos órgãos linfoides periféricos, as células B virgens maduras proliferam e diferenciam-se em células secretoras de anticorpos e células de memória (não-representado).

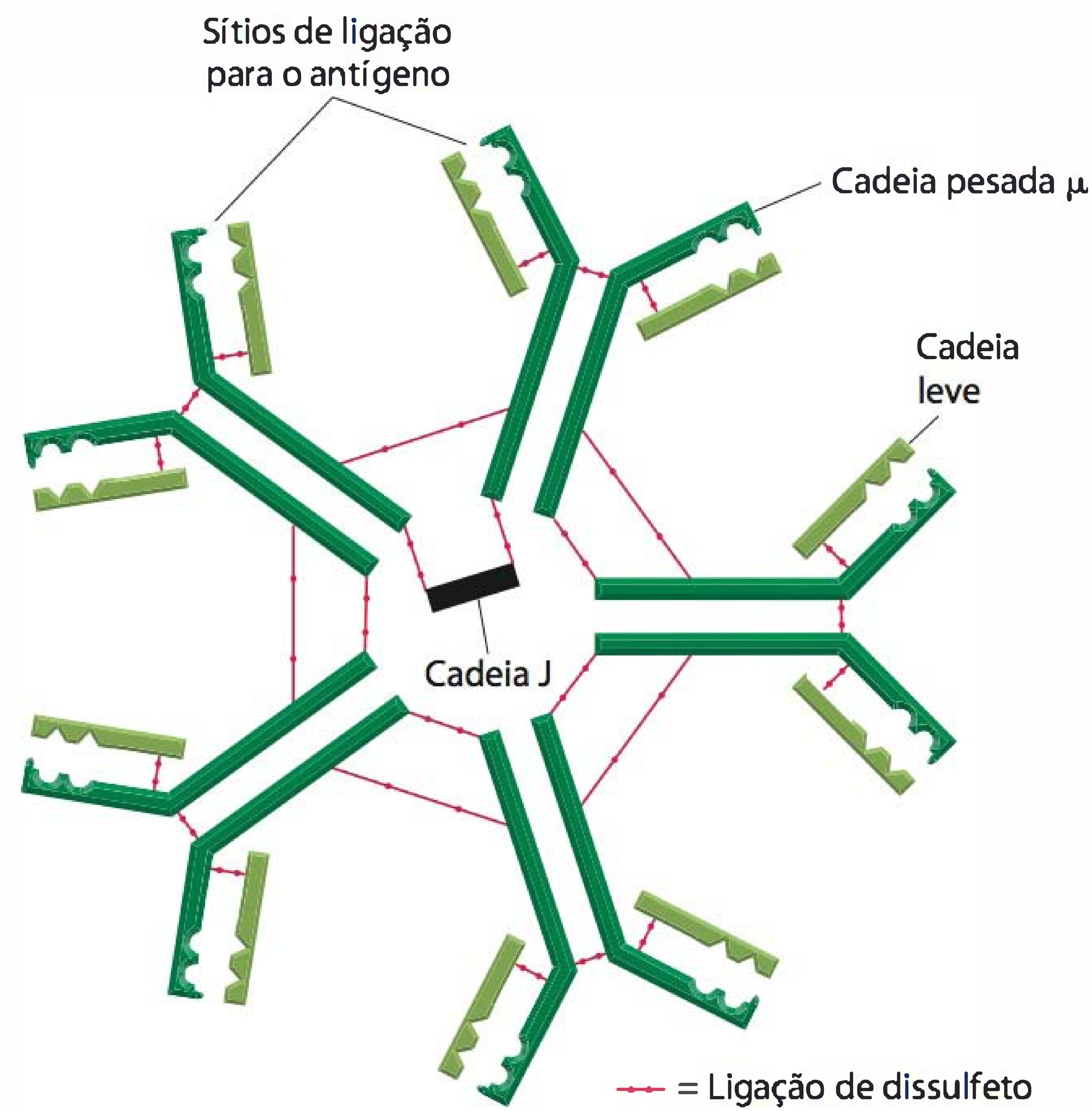


Figura 25-23 Uma molécula de IgM pentamérica. As cinco subunidades de quatro cadeias são mantidas unidas por ligações dissulfeto (*vermelho*). Uma única cadeia J, com uma estrutura similar a um único domínio de Ig (será discutido adiante), encontra-se covalentemente ligada a duas caudas μ de cadeias pesadas por ligações dissulfeto. A cadeia J é necessária à formação do pentâmero. A adição sucessiva de cada subunidade de IgM composta por quatro cadeias requer uma cadeia J, que é posteriormente descartada, com exceção da última, que é mantida. Repare que as moléculas de IgM não possuem regiões de dobradiça.

anticorpos são denominadas regiões *Fc*) que estas células fagocíticas ligam-se, ingerem e destroem micro-organismos infecciosos que estão recobertos por anticorpos IgG produzidos em resposta à infecção (**Figura 25-24**).

Algumas subclasses de IgG são os únicos anticorpos que podem passar da mãe para o feto através da placenta. As células da placenta que estão em contato com o sangue materno possuem receptores Fc que se ligam às moléculas de IgG recém-chegadas e transportam-nas para o sangue fetal. As moléculas de anticorpos ligadas aos receptores são levadas inicialmente para dentro das células placentárias por endocitose mediada por receptores. Elas são então transportadas em vesículas, atravessando as células e sendo liberadas, por exocitose, no sangue fetal (processo denominado *transcitose*, ver Figura 25-26). Pelo fato de outras classes de imunoglobulinas não se ligarem a este receptor Fc específico, elas não podem

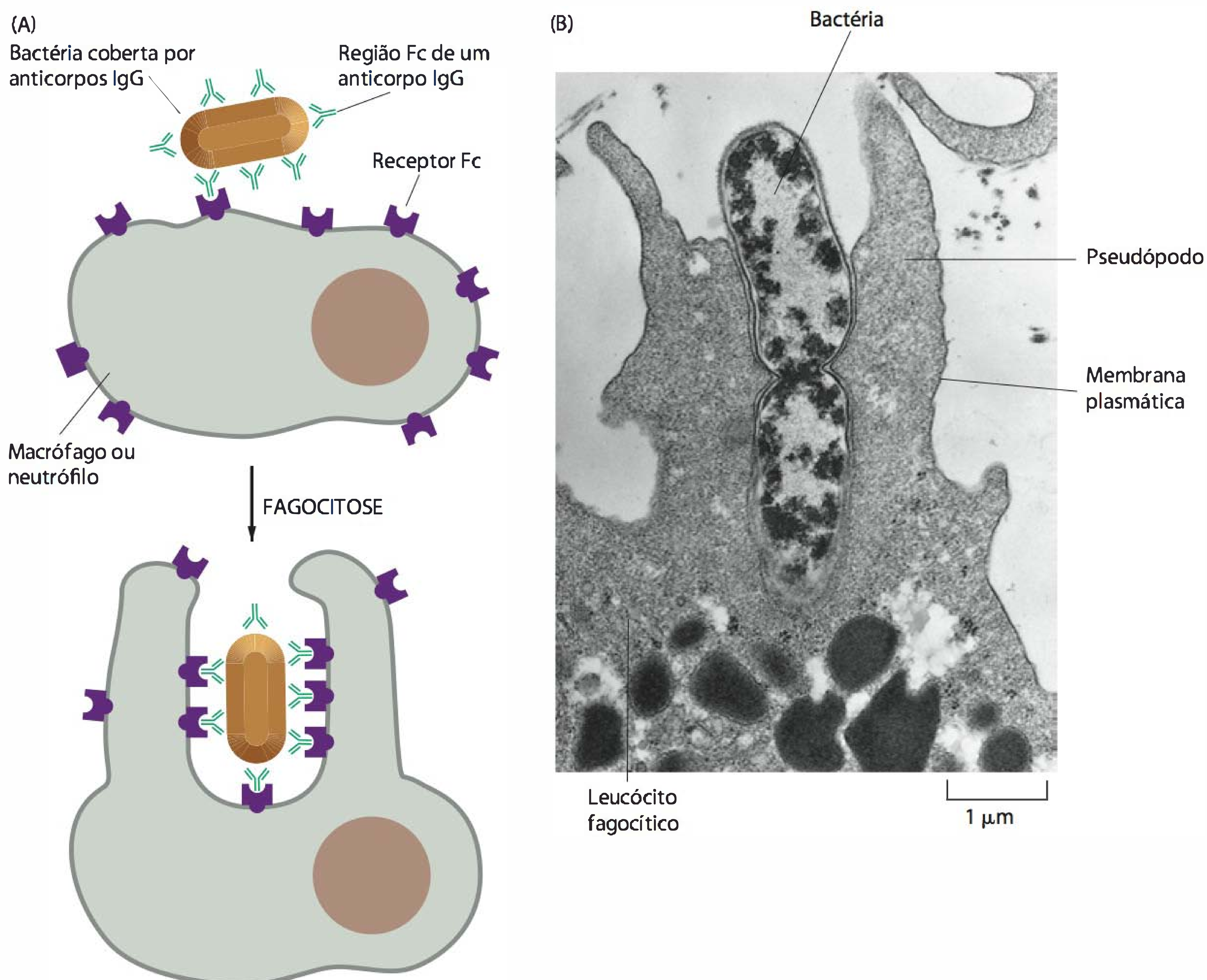


Figura 25-24 Fagocitose ativada por anticorpo. (A) Uma bactéria recoberta por anticorpos IgG é eficientemente fagocitada por um macrófago ou um neutrófilo que possui receptores de superfície celular que se ligam à região caudal (Fc) das moléculas de Ig. A ligação da bactéria recoberta por anticorpo aos receptores de Fc ativa o processo de fagocitose. A região caudal de uma molécula de anticorpo é denominada região Fc, porque, quando os anticorpos são clivados pela enzima proteolítica papaína, os fragmentos que contêm as regiões caudais cristalizam facilmente. (B) Micrografia eletrônica de um neutrófilo fagocitando uma bactéria recoberta por IgG, que se encontra no processo de divisão. O processo no qual o anticorpo (ou o complemento) recobre o patógeno e aumenta a eficiência na qual é fagocitado é denominado *opsonização*. (B, cortesia de Dorothy F. Bainton, de R. C. Williams, Jr. e H. H. Fudenberg, Phagocytic Mechanisms in Health and Disease. New York: Intercontinental Book Corporation, 1971.)

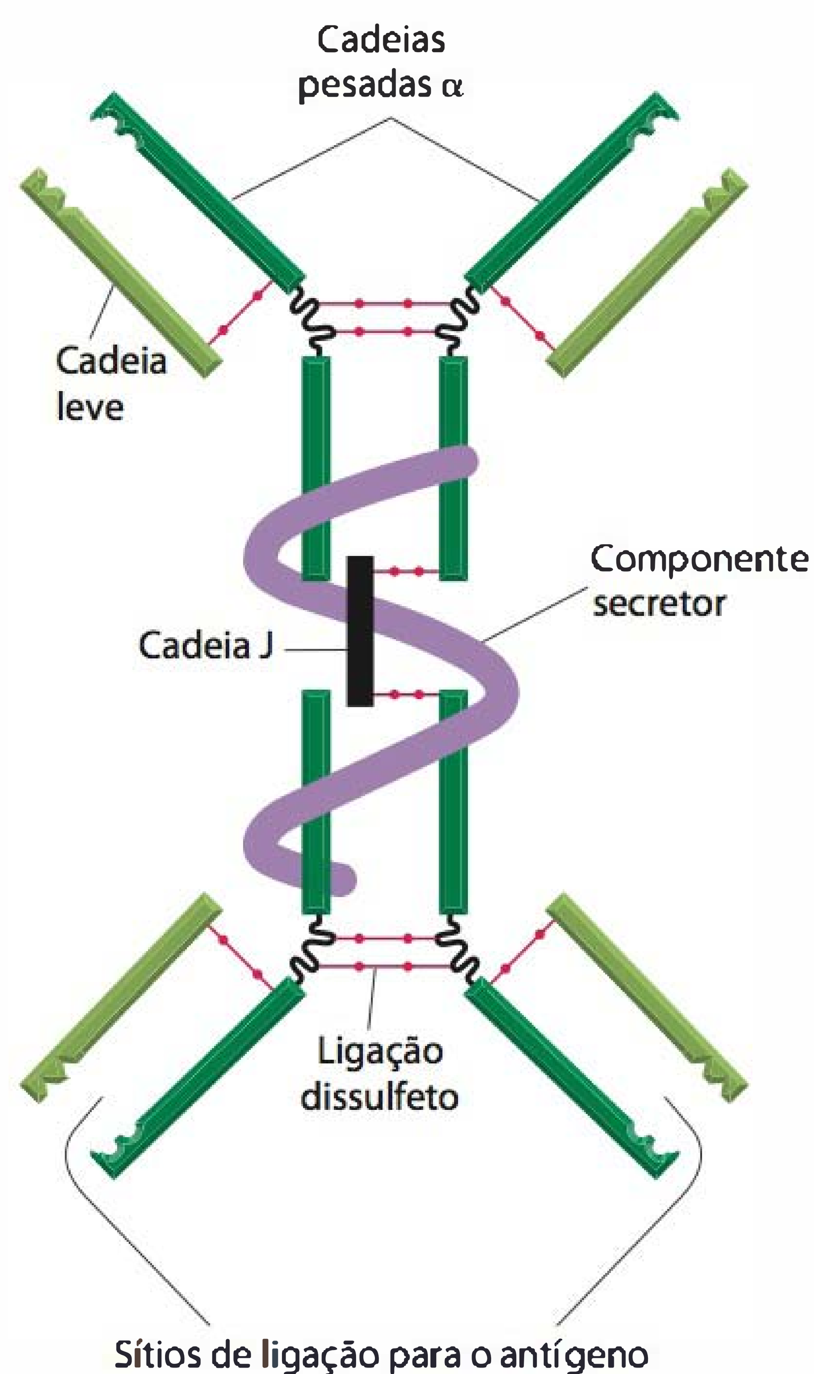


Figura 25-25 Um diagrama altamente esquematizado de uma molécula de IgA dimérica encontrada nas secreções. Além dos dois monômeros de IgA, existe uma única cadeia J e uma cadeia polipeptídica adicional denominada *componente secretor*, derivado do receptor Fc (ver Figura 25-26) e que parece proteger as moléculas de IgA contra a digestão proteolítica das enzimas das secreções.

atravessar a placenta. Mais tarde, a IgG é secretada para o leite materno e é absorvida pelo intestino do neonato para sua corrente sanguínea por transcitose, fornecendo proteção para o bebê contra infecções.

A **IgA** é a principal classe de anticorpos nas secreções, incluindo a saliva, as lágrimas, o leite e as secreções respiratórias e intestinais. Apesar de a IgA ser um monômero com quatro cadeias quando encontrada no sangue, nas secreções a IgA é um dímero com oito cadeias (**Figura 25-25**). Ela é transportada através de células epiteliais secretoras do fluido extracelular para o fluido secretado por outro tipo de receptor Fc, que é exclusivo do epitélio secretor (**Figura 25-26**). Esse receptor Fc pode, também, transportar IgM para as secreções (mas com menor eficiência), e este pode ser o motivo pelo qual os indivíduos com uma deficiência seletiva de IgA, a forma mais comum de deficiência de anticorpos, são apenas parcialmente afetados pela deficiência.

A região caudal das moléculas de **IgE**, que é um monômero com quatro cadeias, liga-se com uma afinidade altíssima ($K_a \sim 10^{10}$ litros/mol), pouco comum, a uma outra classe de receptores Fc. Esses receptores estão localizados na superfície de *mastócitos* nos tecidos e em *basófilos* no sangue. As moléculas de IgE ligadas a eles funcionam como receptores naturais para antígenos. A ligação com o antígeno leva os mastócitos ou os basófilos a secretarem uma série de citocinas e de aminas biologicamente ativas, principalmente a *histamina* (**Figura 25-27**). A histamina causa a dilatação dos vasos, tornando-os permeáveis, o que auxilia os leucócitos, os anticorpos e os componentes do complemento a migrarem para o local onde os mastócitos foram ativados. A liberação de aminas pelos mastócitos e basófilos causa os sintomas das reações *alérgicas*, como febre do feno, asma e urticária. Além disso, os mastócitos secretam fatores que atraem e ativam leucócitos denominados *eosinófilos*. Os eosinófilos possuem receptores Fc que se ligam a moléculas de IgE e podem matar vários tipos de parasitas extracelulares, especialmente se estiverem recobertos por anticorpos IgE.

Além das cinco classes de cadeias pesadas encontradas nas moléculas de anticorpos, os vertebrados superiores apresentam dois tipos de cadeias leves, κ e λ, que parecem ser funcionalmente indistinguíveis. Ambos os tipos de cadeia leve podem ser associados a qualquer uma das cadeias pesadas. Uma molécula individual de anticorpo, no entanto, sempre contém cadeias leves idênticas e cadeias pesadas idênticas: uma molécula de IgG, por exemplo, pode possuir cadeias leves κ ou λ, mas não uma de cada. Como resultado, os sítios de ligação a antígeno de um anticorpo são sempre idênticos. Esta simetria é crucial para a função de ligação cruzada dos anticorpos secretados (ver Figura 25-19).

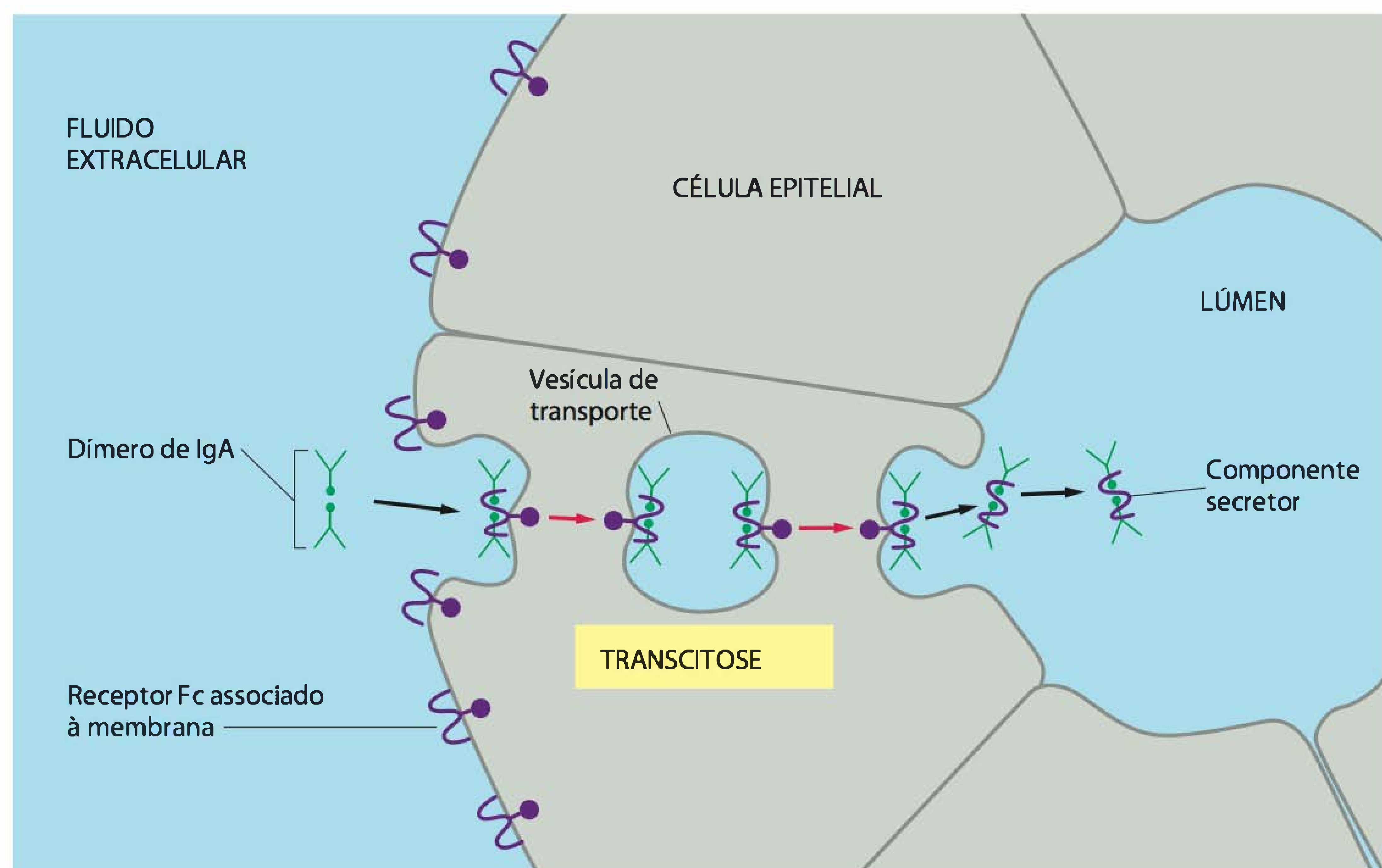


Figura 25-26 O mecanismo de transporte da molécula de IgA dimérica através de uma célula epitelial. A molécula de IgA, na forma de um dímero que contém a cadeia J, liga-se a uma proteína receptora transmembrana na superfície da célula epitelial na face oposta ao lúmen do vaso. (A cadeia J não está representada nesta figura por questões de clareza.) Os complexos receptor-IgA são internalizados pelo processo de endocitose mediada pelo receptor; o complexo é transferido, atravessando o citoplasma da célula epitelial dentro de vesículas, e é secretado no lado oposto da célula, no lúmen, por exocitose. Quando exposta ao lúmen, uma parte da proteína receptora Fc, que está associada ao dímero de IgA (o *componente secretor*), é clivada da sua cauda transmembrana, liberando o anticorpo na forma apresentada na Figura 25-25.

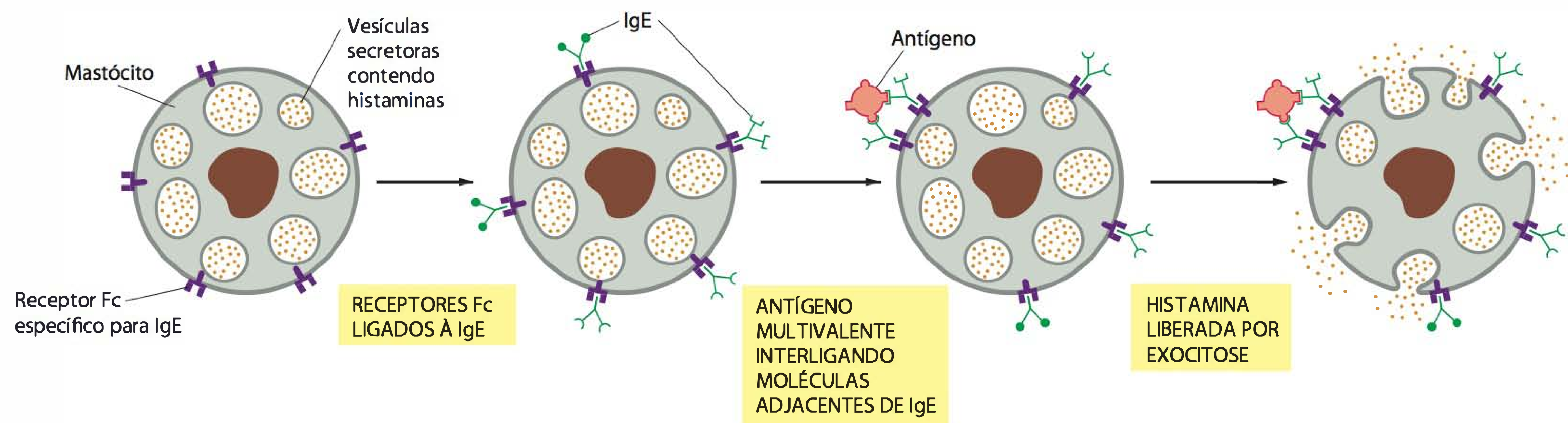


Figura 25-27 O papel da IgE na secreção de histamina pelos mastócitos. Um mastócito (ou basófilo) liga-se a moléculas de IgE após elas terem sido secretadas por células B efetoras. Os anticorpos IgE na forma solúvel ligam-se à proteína receptora Fc, na superfície do mastócito, que reconhece especificamente a região Fc destes anticorpos. As moléculas de IgE ligadas servem como receptores de superfície celular para antígenos. Assim, diferentemente dos linfócitos B, cada mastócito (e basófilo) possui um conjunto de anticorpos de superfície celular com uma alta variedade de sítios de ligação ao antígeno. Quando uma molécula de antígeno se liga a estes anticorpos IgE associados à membrana, promovendo a interligação entre os receptores vizinhos, ocorre uma emissão de sinal para o mastócito liberar histamina e outros mediadores locais por exocitose.

Todas as classes de anticorpos podem ser expressas na membrana ou na forma solúvel secretada. As duas formas diferem somente na porção C-terminal de sua cadeia pesada. As cadeias pesadas das moléculas de anticorpos ligados à membrana possuem uma região transmembrana C-terminal hidrofóbica, que ancora a cadeia pesada na bicamada lipídica da membrana plasmática das células B. Por outro lado, as cadeias pesadas das moléculas de anticorpos secretados possuem uma porção C-terminal hidrofílica, que permite que elas saiam de dentro da célula. Esta mudança no caráter da molécula de anticorpo ocorre porque a ativação da célula B pelo antígeno (e pelas células T auxiliares) induz uma mudança no modo pelo qual os transcritos de RNA de cadeia H são produzidos e processados no núcleo (ver Figura 7-99).

As propriedades das várias classes dos anticorpos em humanos estão resumidas na **Tabela 25-1**.

A intensidade de interação antígeno-anticorpo depende do número e da afinidade dos sítios de ligação ao antígeno

A ligação de um antígeno a um anticorpo, como a ligação de um substrato a uma enzima, é reversível. Ela é mediada pela soma de várias forças não-covalentes relativamente fracas, incluindo ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas de van der Waals e interações iônicas. Essas forças fracas são efetivas somente quando a molécula de antígeno está próxima o suficiente para permitir que seus átomos encaixem-se em bolsas complementares na superfície do anticorpo. As regiões complementares de uma unidade de anticorpo de quatro cadeias são seus dois sítios de ligação ao antígeno idênticos; a região correspondente a esta no antígeno é denominada determinante antigênico (**Figura 25-28**). Em sua maioria, as ma-

Tabela 25-1 Propriedades das principais classes de anticorpos humanos

PROPRIEDADES	CLASSE DO ANTICORPO				
	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Cadeias pesadas	μ	δ	γ	α	ϵ
Cadeias leves	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
Número de unidades com quatro cadeias	5	1	1	1 ou 2	1
Porcentagem total de Ig no sangue	10	< 1	75	15	< 1
Capacidade de ativar o complemento	++++	—	++	—	—
Capacidade de atravessar a placenta	—	—	+	—	—
Capacidade de ligar-se a macrófagos e neutrófilos	—	—	+	—	—
Capacidade de ligar-se a mastócitos e basófilos	—	—	—	—	+

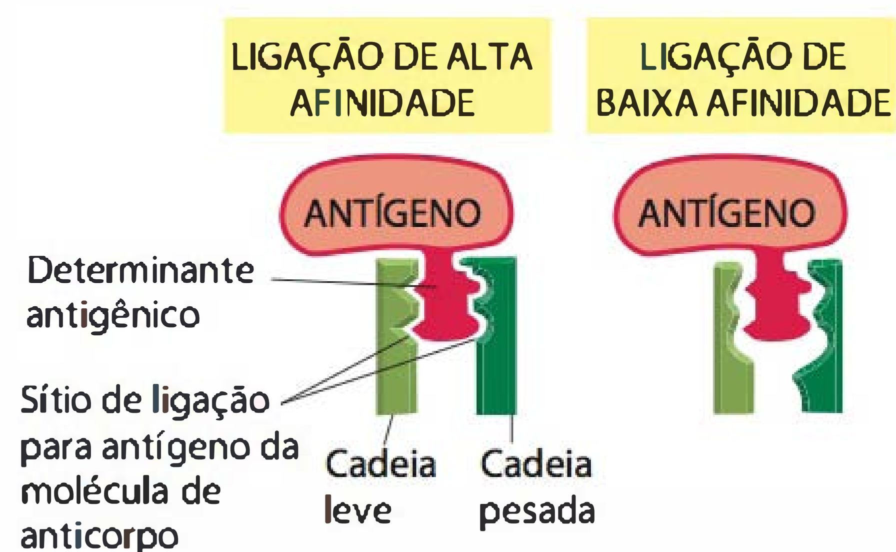
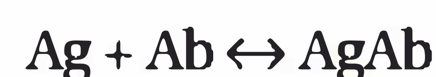


Figura 25-28 Antígeno ligando-se a um anticorpo. Neste diagrama altamente esquemático, encontra-se representada a interação de um determinante antigênico de uma macromolécula com dois sítios de ligação a antígenos de moléculas de anticorpos diferentes, uma de alta afinidade e outra de baixa afinidade. O determinante antigênico é mantido associado ao sítio de ligação por várias forças não-covalentes fracas; o sítio que apresentar maior complementaridade ao antígeno será o de maior afinidade. Note que as cadeias leves e pesadas da molécula de anticorpo em geral contribuem para formar o sítio de ligação ao antígeno.

cromoléculas antigênicas possuem vários determinantes antigênicos diferentes, e são ditas *multivalentes*; se duas ou mais delas são idênticas (como em um polímero com estruturas repetitivas), o antígeno é definido como *polivalente* (**Figura 25-29**).

A reação de ligação reversível entre um antígeno com um único determinante antigênico (referido como Ag) e um único sítio de ligação para o antígeno (definido como Ab) pode ser expressa como:



$$\text{Ag} + \text{Ab} \leftrightarrow \text{AgAb}$$

O ponto de equilíbrio depende tanto da concentração de Ab como da concentração de Ag e do grau de interação entre eles. Em suma, as concentrações superiores de Ab vão estar associadas a mais Ag à medida que a concentração de Ag aumenta. O grau de interação geralmente é expresso com **constante de afinidade** (**K_a**) (ver Figura 3-43), onde

$$K_a = [\text{Ag Ab}]/[\text{Ag}]\ [\text{Ab}]$$

(os colchetes indicam a concentração de cada componente no ponto de equilíbrio).

A constante de afinidade, algumas vezes denominada constante de associação, pode ser determinada pela quantificação da concentração de Ag livre necessária para ocupar metade dos sítios de ligação de antígeno em um anticorpo. Quando metade dos sítios está ocupada, [AgAb] = [Ab] e $K_a = 1/[\text{Ag}]$. Assim, a recíproca da concentração do antígeno que produz metade da ligação máxima é igual à constante de afinidade do anticorpo pelo antígeno. Os valores frequentemente variam entre 5×10^4 e 10^{11} litros/mol.

A **afinidade** de um anticorpo por um determinante antigênico descreve o grau de ligação de uma única cópia de um determinante antigênico com um único sítio de ligação para o antígeno, e isto é independente do número de sítios de ligação do antígeno. Quando, no entanto, um antígeno polivalente, que possui várias cópias do mesmo determinante antigênico, combina-se a um anticorpo IgM polivalente (ver Figura 25-23), a intensidade de ligação é fortemente aumentada porque todas as ligações antígeno-anticorpo precisam ser quebradas simultaneamente antes que o antígeno possa ser dissociado do anticorpo. Mesmo uma molécula de IgG bivalente pode ligar-se pelo menos cem vezes mais fortemente a um antígeno polivalente, se ambos os sítios de ligação do antígeno estiverem participando da ligação, em vez de somente um desses sítios. A intensidade total de ligação de um anticorpo polivalente com um antígeno polivalente é referida como **avidez** de interação.

Se a afinidade dos sítios de ligação para o antígeno em uma molécula de IgG ou de IgM é a mesma para um antígeno multivalente, a molécula de IgM (com 10 sítios de ligação) terá uma avidez muito maior do que a molécula de IgG (que possui dois sítios de ligação). Esta diferença em avidez, geralmente 10^4 vezes superior ou mais, é importante, porque os anticorpos que são produzidos no início da resposta imune geralmente possuem afinidade muito inferior do que aqueles que são produzidos posteriormente. Por conta desta alta avidez, a IgM – a principal classe de Ig produzida nas respostas imunes iniciais – pode agir efetivamente, mesmo quando cada sítio de ligação tem uma baixa afinidade.

Até agora consideramos a estrutura geral e a função dos anticorpos. A seguir, analisaremos em detalhe suas estruturas, definidas por estudos de suas sequências de aminoácidos e de sua estrutura tridimensional.

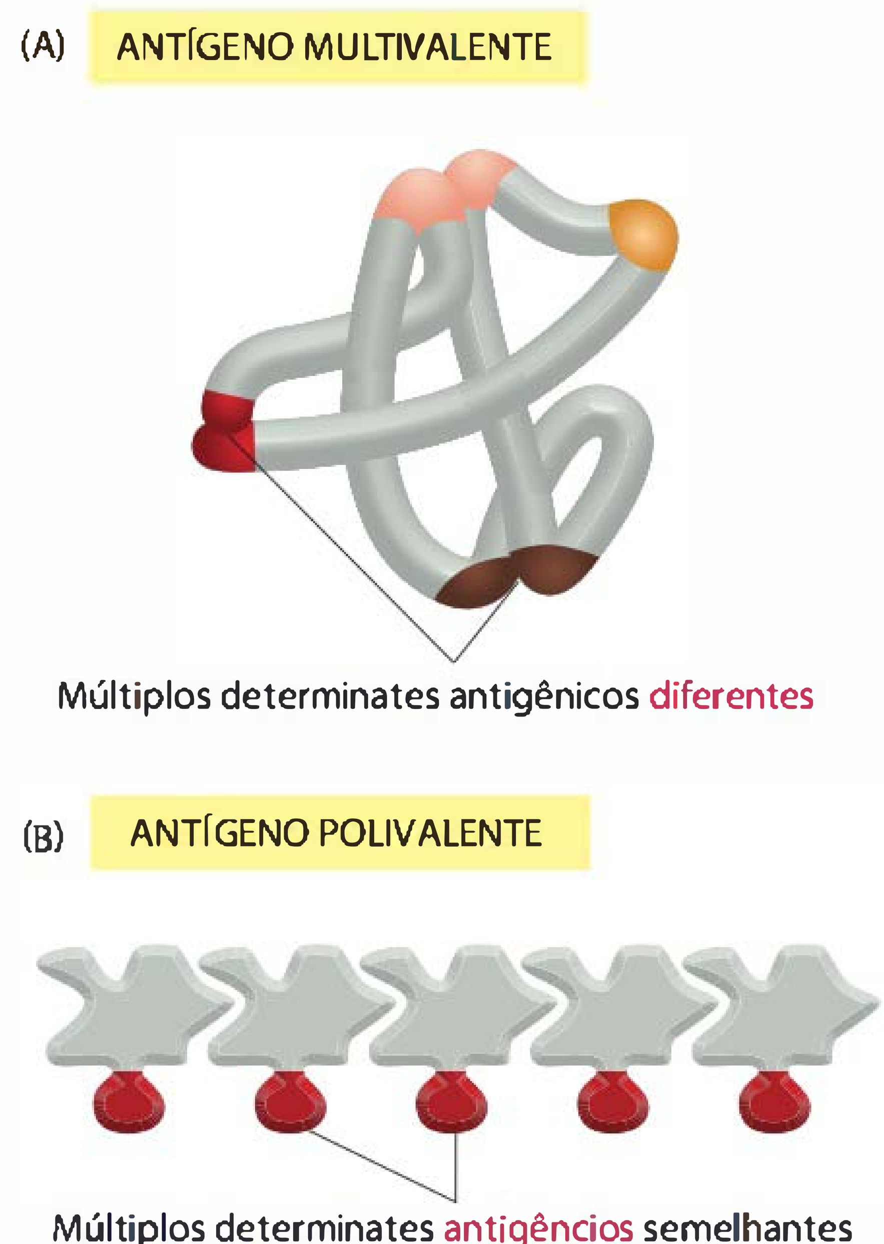


Figura 25-29 Moléculas com múltiplos determinantes antigênicos. (A) Uma proteína globular é representada com vários determinantes antigênicos *diferentes*. Distintas regiões da cadeia polipeptídica em geral associam-se na estrutura dobrada de cada determinante antigênico na superfície da proteína, como representado para três dos quatro determinantes. (B) Uma estrutura polimérica é representada com vários determinantes antigênicos *idênticos*.

As cadeias leves e pesadas dos anticorpos são compostas por regiões constantes e variáveis

A comparação das sequências de aminoácidos de diferentes moléculas de anticorpos revelou características interessantes, com importantes implicações genéticas. Tanto as cadeias leves como as pesadas apresentam uma sequência variável na região N-terminal, mas uma

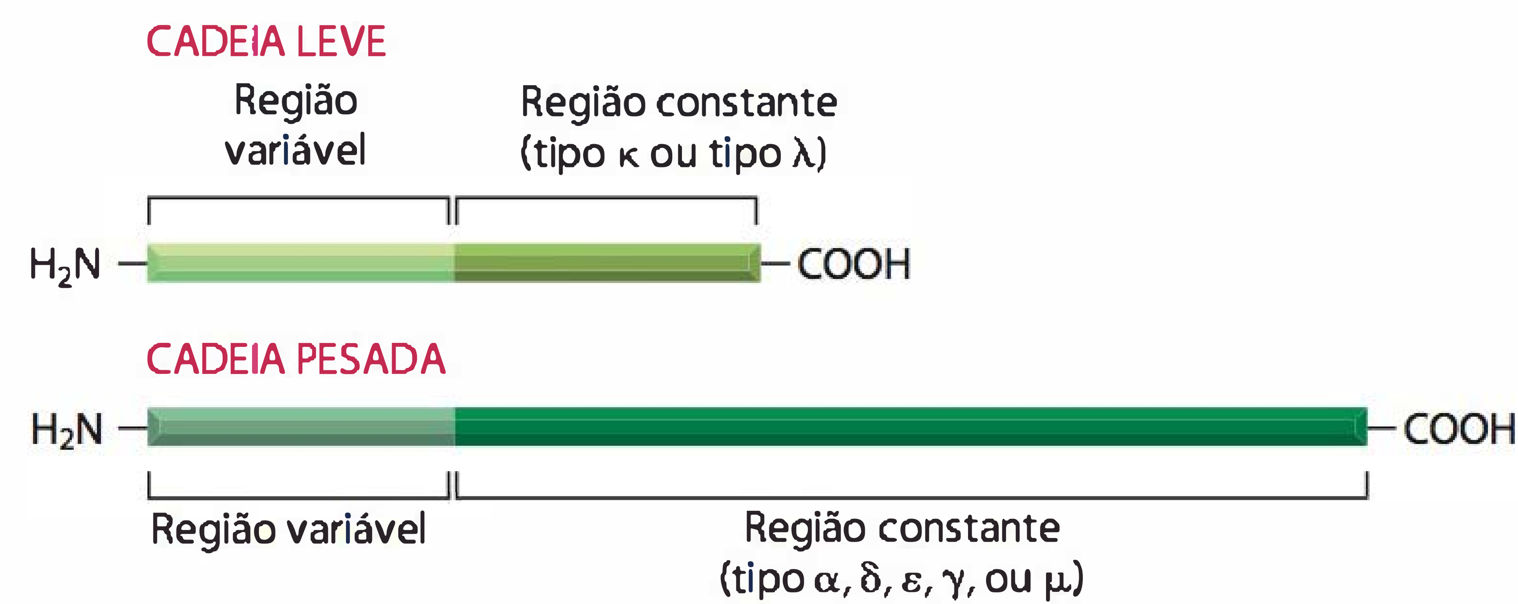


Figura 25-30 Regiões constantes e variáveis das cadeias de imunoglobulinas. As regiões variáveis das cadeias leve e pesada formam o sítio de ligação ao antígeno, enquanto que a região constante das cadeias pesada determinam as outras propriedades biológicas dos anticorpos.

sequência constante na região C-terminal. Consequentemente, quando as sequências de aminoácidos de diferentes cadeias κ são comparadas, as porções C-terminais são idênticas, ou apresentam pequenas diferenças, enquanto as porções N-terminais são todas diferentes. As cadeias leves apresentam **regiões constantes** compostas por aproximadamente 110 aminoácidos e **regiões variáveis** do mesmo tamanho. A região variável das cadeias pesadas (na porção N-terminal) também é composta por cerca de 110 aminoácidos, mas as regiões constantes das cadeias pesadas são três ou quatro vezes mais longas (330 ou 440 aminoácidos), dependendo da classe da imunoglobulina (**Figura 25-30**).

As regiões N-terminais das cadeias leves e pesadas se encontram para formar o sítio de ligação ao antígeno, e a variabilidade de suas sequências de aminoácidos confere a base estrutural da diversidade dos sítios de ligação ao antígeno. A maior parte da diversidade ocorre em três pequenas regiões denominadas **regiões hipervariáveis**, localizadas nas regiões variáveis tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada. As partes restantes das regiões variáveis, conhecidas como *regiões estruturais*, são relativamente constantes.

Somente de 5 a 10 aminoácidos de cada região hipervariável formam o sítio de ligação ao antígeno (**Figura 25-31**). Como resultado, em geral o tamanho do determinante antigênico que um anticorpo reconhece é comparativamente pequeno. Pode ser composto por até menos de 10 aminoácidos na superfície de uma proteína globular, por exemplo.

As cadeias leves e pesadas são compostas por domínios de Ig repetitivos

Tanto as cadeias leves como as pesadas são compostas por segmentos repetitivos – sendo cada um composto por 110 aminoácidos e com uma ligação dissulfeto intracadeia. Esses segmentos repetitivos dobram-se independentemente para formar unidades funcionais compactas denominadas **domínios de imunoglobulinas** (**Ig**s). Conforme ilustrado na **Figura 25-32**, a cadeia leve possui um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L) (equivalentes às regiões variáveis e constantes mostradas na metade superior da Figura 25-30). O domínio V_L pareia com o domínio variável da cadeia pesada (V_H) para formar a região de ligação ao antígeno. O domínio C_L pareia com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_H1), e o restante dos domínios constantes das cadeias pesadas formam a região Fc, que determina as outras propriedades biológicas do anticorpo. A maior parte das cadeias pesadas possui três domínios constantes (C_H1, C_H2 e C_H3), mas os anticorpos IgM e IgE possuem quatro.

A similaridade entre seus domínios sugere que as cadeias de anticorpos foram formadas, durante a evolução, por uma série de duplicações gênicas; inicialmente, eram genes

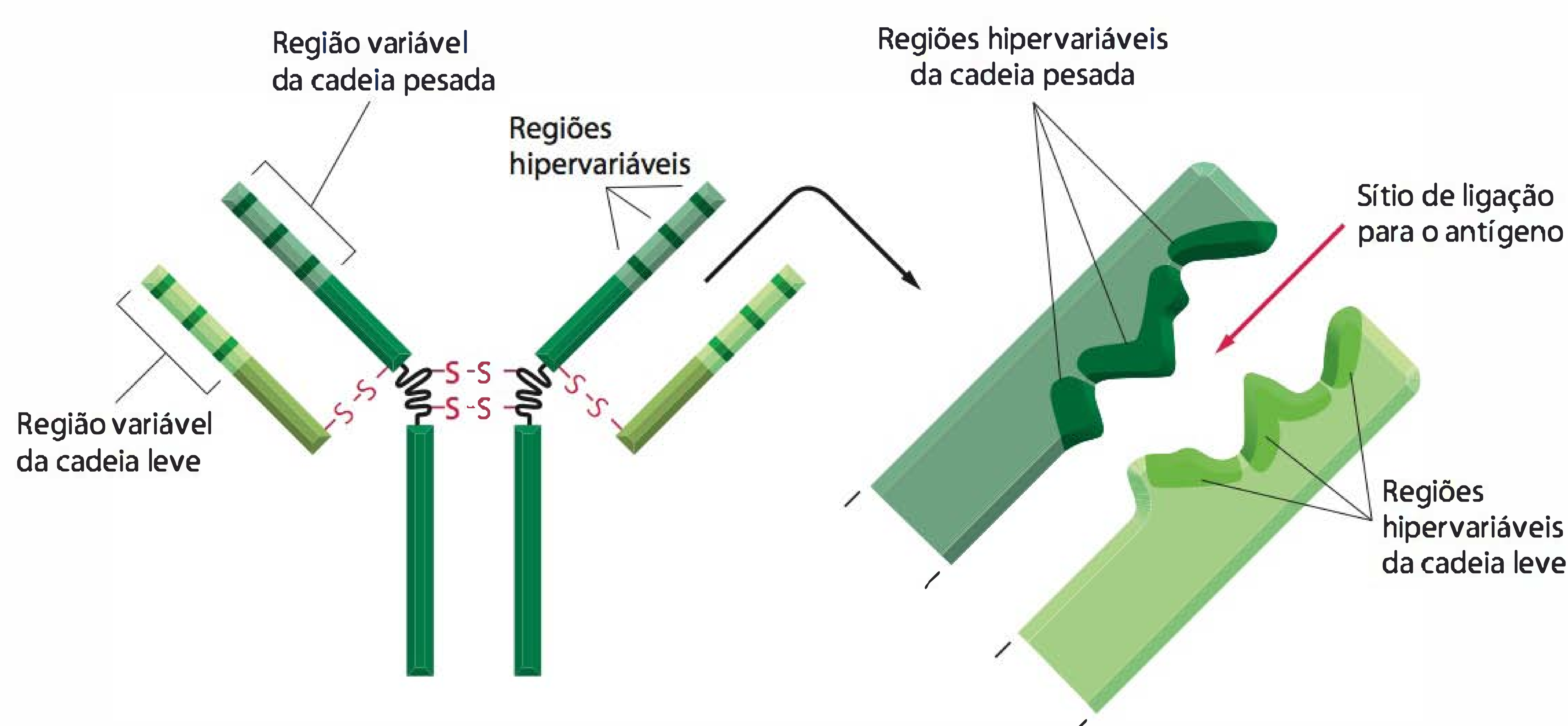


Figura 25-31 Regiões hipervariáveis dos anticorpos. Um desenho altamente esquematizado representando como três regiões hipervariáveis em cada cadeia leve e pesada juntas formam o sítio de ligação ao antígeno em uma molécula de anticorpo.

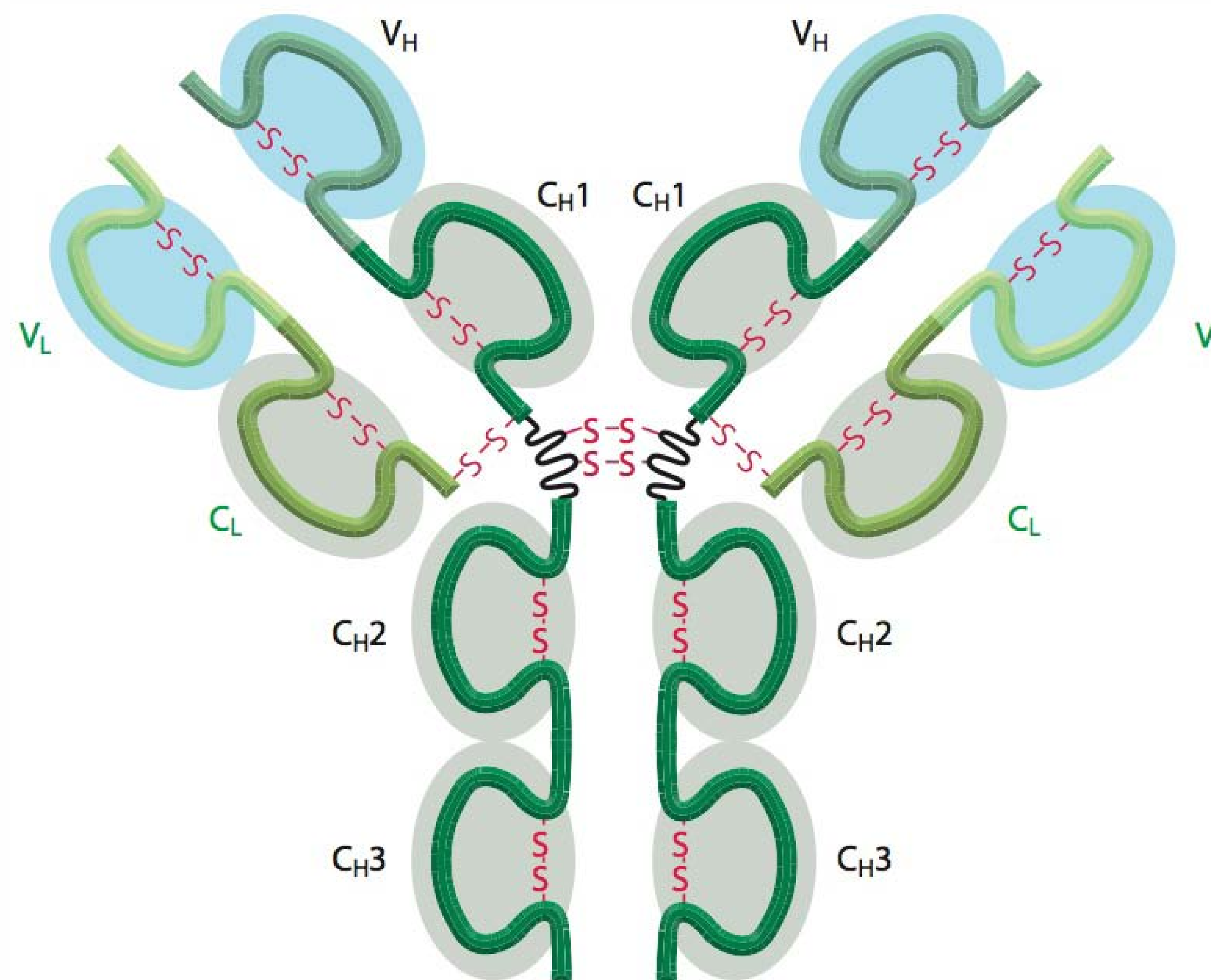


Figura 25-32 Domínios de imunoglobulinas. As cadeias leves e pesadas em uma molécula de anticorpo são, cada uma, dobradas em domínios repetitivos similares. Os domínios variáveis (marcados em *azul*) das cadeias leves e pesadas (V_L e V_H) formam os sítios de ligação ao antígeno, enquanto os domínios constantes da cadeia pesada (principalmente C_H2 e C_H3) determinam a outra propriedade biológica da molécula. As cadeias pesadas dos anticorpos IgM e IgE não possuem região de dobradiça, mas têm um domínio constante extra (C_H4). As interações hidrofóbicas existentes entre os domínios de cadeias adjacentes desempenham o papel fundamental de manter as cadeias unidas na molécula de anticorpo: V_L liga-se com V_H, C_L liga-se com C_H1, e assim por diante (ver Figura 25-34). Todos os anticorpos são glicosilados nos seus domínios C_H2 (não-apresentado); a cadeia de oligossacarídeo ligada varia de anticorpo para anticorpo e influencia a propriedade biológica do anticorpo.

primordiais que codificavam para um único domínio com 110 aminoácidos, com função desconhecida. Esta hipótese é corroborada pela constatação de que cada domínio da região constante de uma cadeia pesada é codificado por uma sequência codificante separada (éxon) (**Figura 25-33**).

Um sítio de ligação a antígenos é construído por alças hipervariáveis

Uma série de fragmentos de anticorpos, assim como moléculas intactas de anticorpos, foi estuda por cristalografia por raios X. A partir desses resultados, podemos entender como bilhões de diferentes sítios de ligação ao antígeno são construídos com uma base estrutural comum.

Conforme ilustrado na **Figura 25-34**, cada domínio de Ig tem uma estrutura tridimensional extremamente similar, com base no que foi denominado estrutura de imunoglobulina, que é composta por um "sanduíche" de duas cadeias de folhas β unidas por ligações dissulfeto. Conforme veremos adiante, várias outras proteínas de superfície de linfócitos e de outras células, muitas das quais atuam como moléculas de adesão célula-célula (discutido no Capítulo 19), contêm domínios similares e, por isso, são membros da numerosa família de proteínas denominada *superfamília de imunoglobulinas* (*Ig*s).

Os domínios variáveis das moléculas de anticorpos são únicos, uma vez que cada um possui seu grupo particular de três regiões hipervariáveis, que são organizadas em três *alças hipervariáveis* (ver Figura 25-34). As alças hipervariáveis, tanto dos domínios variáveis das cadeias leves como das cadeias pesadas, agrupam-se para formar o sítio de ligação ao antígeno. Devido ao fato de a região variável de uma molécula de anticorpo ser constituída

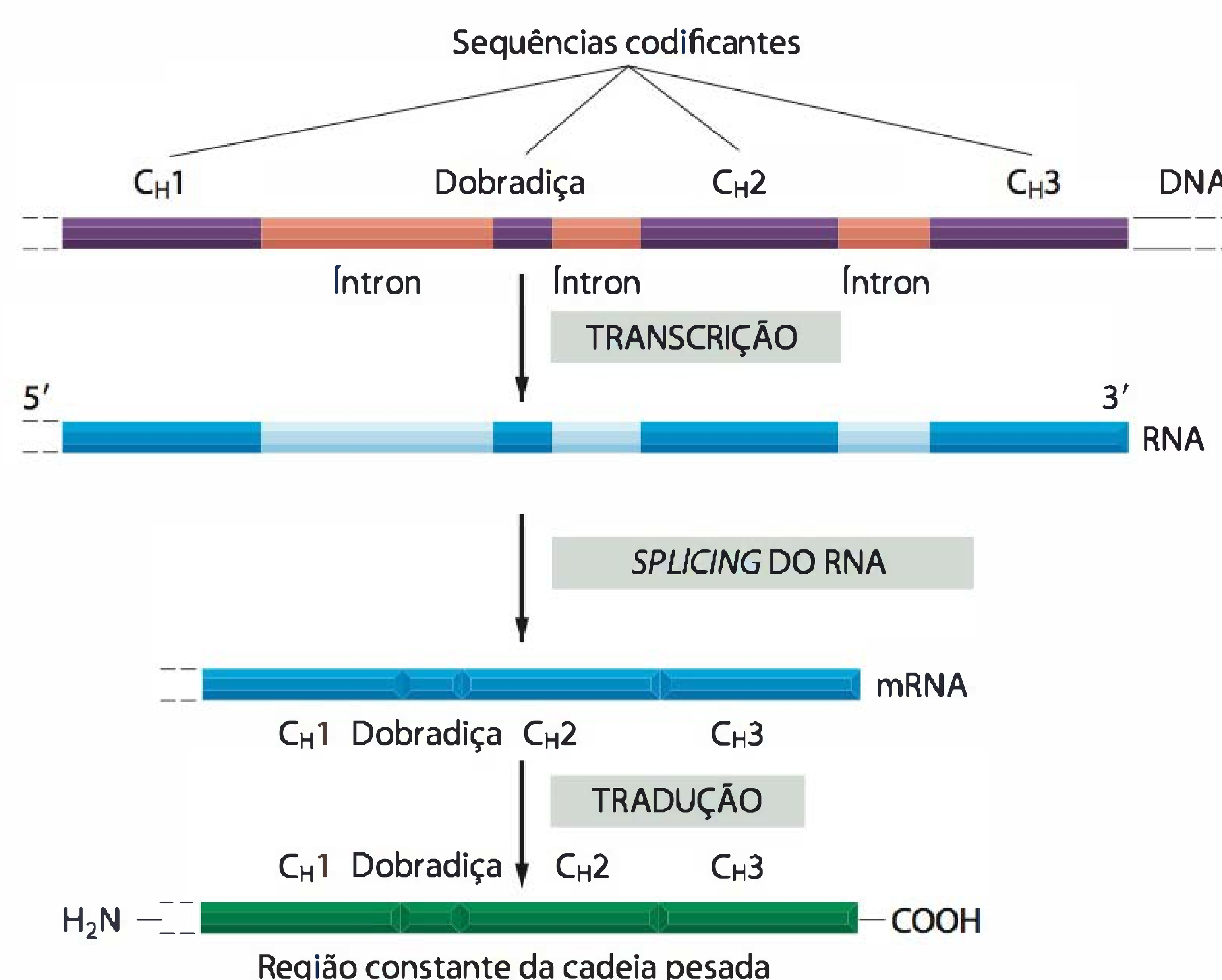


Figura 25-33 A organização da sequência de DNA que codifica a região constante da cadeia pesada de um anticorpo. As sequências codificantes (éxons) para cada domínio e para a região de dobradiça são separadas por sequências não-codificadoras (íntrons). As sequências intrônicas são removidas durante o *splicing* do transcrito primário de RNA, originando o mRNA. Acredita-se que a presença dos íntrons no DNA tenha facilitado as duplicações acidentais dos segmentos de DNA que originaram os genes dos anticorpos, durante a evolução (discutido no Capítulo 4). As sequências de DNA e de RNA que codificam as regiões variáveis da cadeia pesada não estão apresentadas.

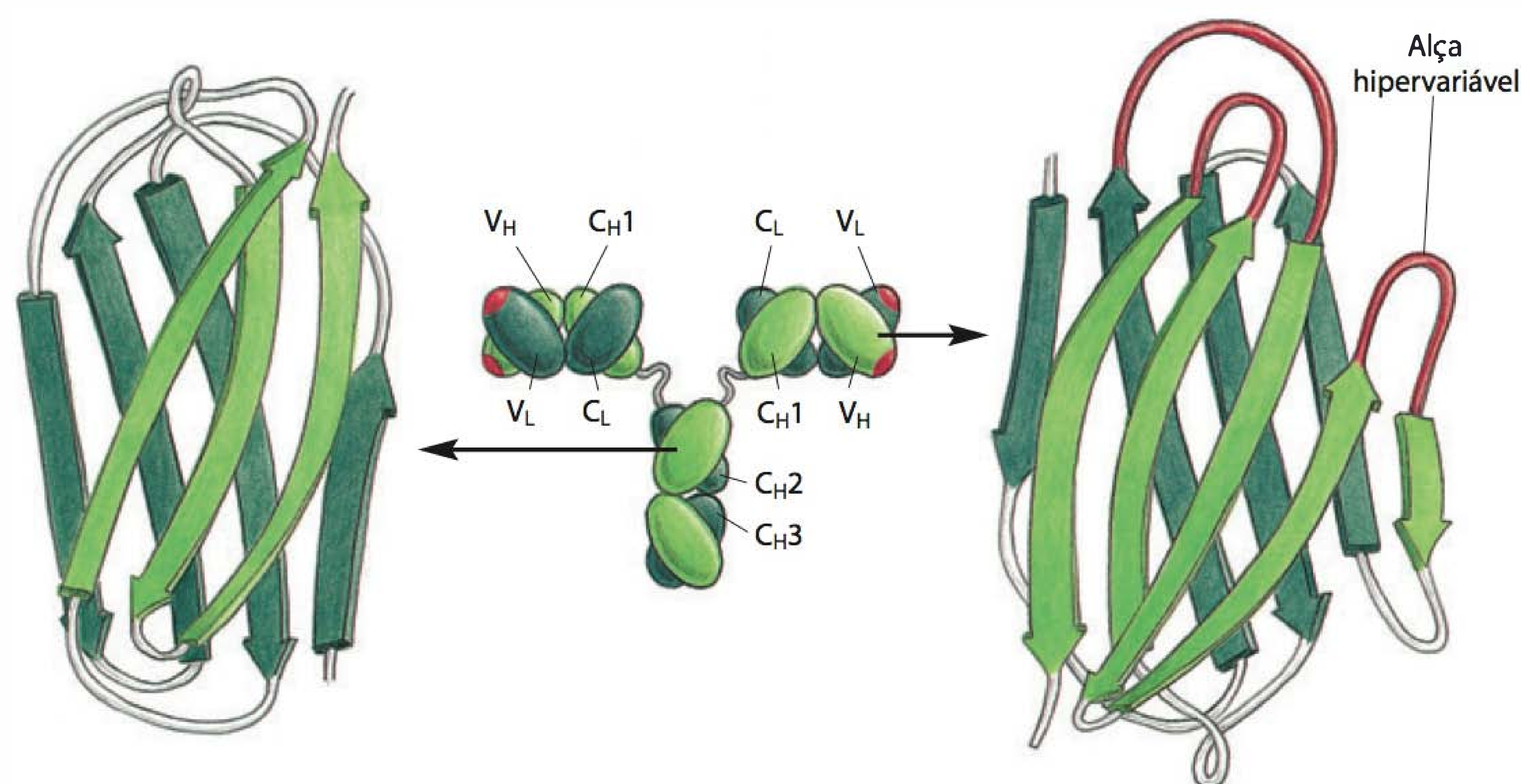


Figura 25-34 O arranjo estrutural de uma molécula de anticorpo IgG definido por estudos de cristalografia por raios X. A estrutura da proteína inteira está representada no centro, enquanto a estrutura do domínio constante está representada no lado esquerdo, e a do domínio variável, no lado direito da figura. Os dois domínios consistem em duas folhas β que são unidas por ligações dissulfeto (não-representadas). Repare que todas as regiões hipervariáveis (*vermelho*) formam alças nas porções mais distais do domínio variável, onde se associam para formar o sítio de ligação ao antígeno (ver também Figura 3-41).

por uma estrutura rígida altamente conservada, com as alças hipervariáveis ligadas a uma das extremidades, alterações na extensão e na sequência de aminoácidos podem gerar uma grande diversidade de sítios de ligação ao antígeno. A estrutura tridimensional geral, necessária para o anticorpo agir, permanece constante.

As análises de raios X dos cristais dos fragmentos de anticorpos ligados a um determinante antigênico revelaram exatamente como as alças hipervariáveis dos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas cooperam para formar a superfície do sítio de ligação do antígeno em casos particulares. O tamanho e a forma de cada porção dos diferentes sítios variam dependendo da conformação da cadeia polipeptídica das alças hipervariáveis, que, por sua vez, são determinadas pela sequência de aminoácidos das cadeias laterais de cada alça. A forma dos sítios de ligação varia bastante – bolsas, fendas, superfícies onduladas mais planas e até protrusões – dependendo do anticorpo (**Figura 25-35**). Os ligantes menores tendem a ligar-se a bolsas profundas, enquanto os ligantes maiores tendem a ligar-se a superfícies mais planas. Além disso, o sítio de ligação pode alterar sua forma após a ligação do ligante para melhor acomodá-lo.

Após termos discutido a estrutura e a função dos anticorpos, estamos prontos para considerar questões cruciais que intrigaram os imunologistas durante vários anos – quais são os mecanismos genéticos que possibilitam que cada um de nós possa produzir vários bilhões de moléculas de anticorpos?

Resumo

Os anticorpos defendem os vertebrados contra infecções por meio da inativação de vírus e de toxinas microbianas, pelo recrutamento do sistema do complemento e de vários tipos de leucócitos capazes de eliminar os patógenos invasores. Uma molécula típica de anticorpo tem a forma da letra "Y," com dois sítios idênticos de ligação ao antígeno nas extremidades do "Y", e sítios de ligação a componentes do sistema do complemento e/ou vários receptores de superfície celular na cauda do "Y".

Cada clone de célula B produz moléculas de anticorpos com um único tipo de sítio de ligação ao antígeno. Inicialmente, durante o desenvolvimento da célula B na medula óssea, as moléculas de anticorpo são inseridas na membrana plasmática, onde atuam como receptores de antígeno. Nos órgãos linfoides periféricos, os antígenos se ligam a esses receptores e, junto com os sinais coestimuladores fornecidos por células T auxiliares, ativam as células B a proliferar e diferenciar-se em células de memória ou em células efetoras secretoras de anticorpos. As células efetoras secretam grandes quantidades de anticorpos com o mesmo tipo de sítio de ligação ao antígeno dos anticorpos ligados à membrana.

Uma molécula de anticorpo típica é composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Normalmente, porções das cadeias leves e das cadeias pesadas combinam-se para formar os sítios de ligação ao antígeno. Existem cinco classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), cada uma com cadeias pesadas distintas (α, δ, ϵ, γμ e μ, respectivamente). As cadeias pesadas também formam a cauda (região Fc) do anticorpo, a qual determina quais proteínas irão se ligar ao anticorpo e, portanto, definir as propriedades biológicas que esta classe de anticorpo possui. Da mesma forma, as cadeias leves (κ ou λ) podem ser associadas a cadeias pesadas de qualquer classe, mas o tipo de cadeia parece não influenciar nas propriedades do anticorpo, exceto pela própria especificidade ao antígeno.

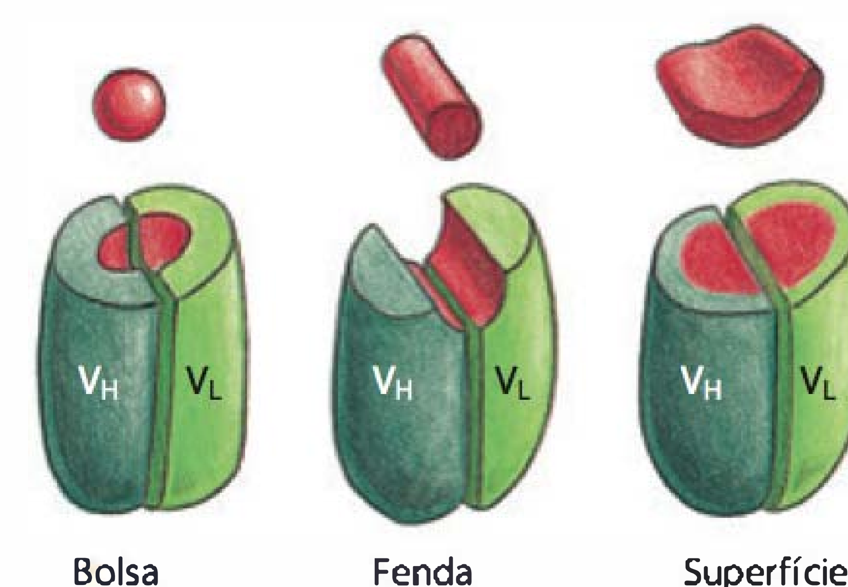


Figura 25-35 Diferentes superfícies de ligação a antígenos nos anticorpos. As alças hipervariáveis de diferentes domínios V_L e V_H podem combinar-se para formar uma grande variedade de superfícies de ligação. Os determinantes antigênicos e os sítios de ligação do antígeno em um anticorpo encontram-se representados em *vermelho*. Somente um sítio de ligação do antígeno está representado em cada anticorpo.

Cada cadeia leve e pesada é composta por uma série de domínios de Ig – estruturas β pregueadas contendo em torno de 110 aminoácidos. A cadeia leve possui um domínio variável (V_L) e um constante (C_L), enquanto a cadeia pesada possui um domínio variável (V_H) e três ou quatro domínios constantes (C_H). A variação da sequência de aminoácidos no domínio variável, tanto da cadeia leve como da cadeia pesada, é restrita principalmente a algumas pequenas regiões hipervariáveis, que se projetam como alças em uma extremidade dos domínios, para formar o sítio de ligação ao antígeno.

A GERAÇÃO DA DIVERSIDADE DOS ANTICORPOS

Mesmo na ausência da estimulação antigênica, é provável que o homem possa, produzir mais do que 10^{12} moléculas diferentes de anticorpos – o seu **repertório de anticorpo primário**. O repertório primário consiste em anticorpos IgM e IgD e é aparentemente grande o suficiente para garantir que existirá um sítio de ligação ao antígeno capaz de combinar-se com praticamente todos os possíveis determinantes antigênicos existentes, mesmo que com baixa afinidade. (Os sítios de ligação ao antígeno de muitos anticorpos podem reagir de forma cruzada com vários determinantes antigênicos distintos, mas relacionados, tornando esta defesa de anticorpos primários ainda mais formidável.)

Após a estimulação pelo antígeno (e as células T auxiliares), as células B podem mudar a produção de anticorpos IgM ou IgD para a produção de outras classes de anticorpos, um processo denominado *troca de classe*. Além disso, a afinidade desses anticorpos pelo seu antígeno aumenta progressivamente com o tempo, um processo denominado *maturação da afinidade*. Assim, a estimulação como antígeno produz um **repertório de anticorpo secundário** de diversidade ainda mais aumentada tanto da classe de Ig quanto dos sítios de ligação ao antígeno.

Os anticorpos são proteínas, e as proteínas são codificadas por genes. Portanto, a diversidade de anticorpos é decorrente de um mecanismo genético especial: como pode um animal produzir um número superior de anticorpos em comparação ao número de genes disponíveis no genoma? (O genoma humano, por exemplo, contém cerca de 25.000 genes.) Esta questão não chega a ser tão formidável quanto parece. Lembre que tanto as regiões variáveis das cadeias leves quanto as das cadeias pesadas dos anticorpos, normalmente, formam o sítio de ligação ao antígeno. Assim, um animal com mil genes codificando cadeias leves e mil genes codificando cadeias pesadas pode, em princípio, combinar seus produtos de 1.000 x 1.000 maneiras diferentes e produzir 10^6 sítios diferentes de ligação ao antígeno (na realidade, porém, nem todas as cadeias leves podem combinar-se às cadeias pesadas para gerar um sítio de ligação ao antígeno). No entanto, mecanismos genéticos específicos evoluíram, permitindo que o sistema imune adaptativo produza um número praticamente ilimitado de diferentes cadeias leves e pesadas de forma extremamente econômica.

Nem todos os vertebrados usam o mesmo mecanismo genético de diversidade de anticorpos, e há diferenças substanciais nos mecanismos de diferentes mamíferos. Discutiremos os mecanismos usados pelo homem e por camundongos, nos quais a diversidade de anticorpos é produzida em duas etapas. Primeiro, antes do estímulo pelo antígeno, as células B em desenvolvimento unem *segmentos gênicos* que estão separados no DNA para formar genes que codificam o repertório primário de anticorpos IgM e IgD de baixa afinidade. Segundo, após o estímulo antigênico, a reunião dos genes que codificam os anticorpos pode sofrer duas mudanças posteriores: mutações que podem aumentar a afinidade do sítio de ligação ao antígeno e rearranjos no DNA que trocam a classe de anticorpo produzida. Juntamente, essas mudanças produzem o repertório secundário de anticorpos IgG, IgA e IgE de alta afinidade.

Iniciaremos esta seção com a discussão dos mecanismos utilizados pelas células B para produzir o repertório primário de anticorpos, e então discutiremos os mecanismos usados para produzir o repertório secundário de anticorpos.

Os genes que codificam os anticorpos são combinados a partir de segmentos de genes separados durante o desenvolvimento da célula B

Camundongos e seres humanos produzem seu repertório primário de anticorpos reunindo **segmentos gênicos** separados durante o desenvolvimento das células B. Cada tipo de cadeia de anticorpo cadeias leves – κ e λ e cadeias pesadas – é codificado em lócus gênico separado em cromossomos distintos. Cada lócus contém um grande número de segmentos gênicos

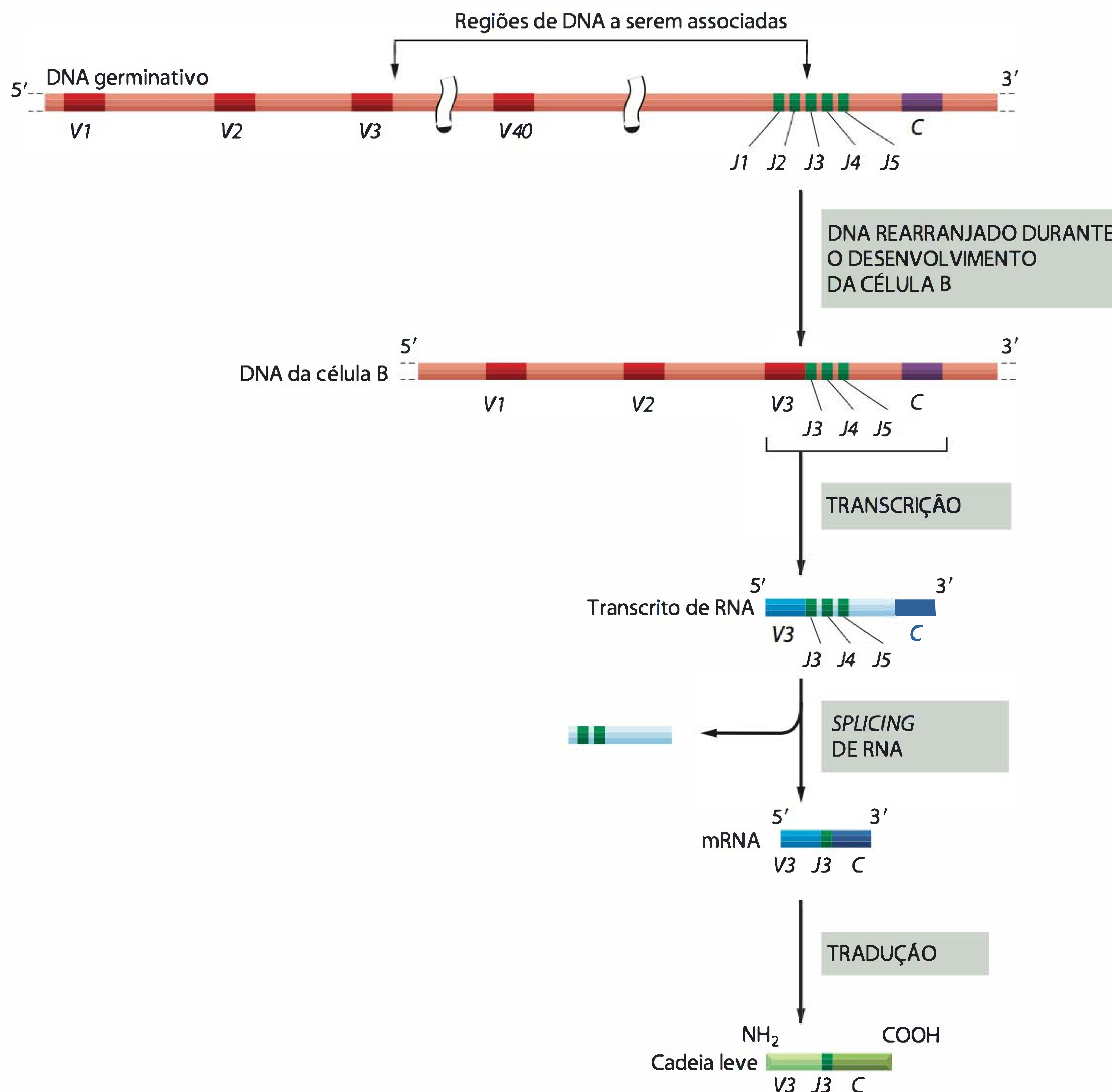


Figura 25-36 Os processos de associação entre V-J envolvidos na construção da cadeia leve humana κ. No DNA germinativo (no qual os genes dos anticorpos não foram rearranjados e, portanto, não são expressos), o agrupamento dos cinco segmentos gênicos J encontram-se separados das sequências codificadoras da região C por um pequeno íntron, e dos 40 segmentos gênicos V por milhares de pares de nucleotídeos. Durante o desenvolvimento de uma célula B, um segmento gênico V aleatoriamente escolhido (*V3*, neste caso) é posicionado precisamente próximo a um dos segmentos gênicos J (*J3*, neste caso). Os segmentos J "restantes" (*J4* e *J5*) e a sequência do íntron são transcritos (junto com os segmentos gênicos *V3* e *J3* associados e a sequência que codifica a região C) e removidos durante o *splicing* do RNA, dando origem à molécula de mRNA, na qual as sequências *V3*, *J3* e *C* encontram-se contíguas. Estes mRNAs são traduzidos em cadeias leves κ. Um segmento gênico *J* codifica 15 ou mais aminoácidos da porção C-terminal da região *V*, e uma pequena sequência contendo o segmento de junção V-J codifica a terceira região hipervariável da cadeia leve, que é a porção mais variável de uma região V.

que codificam a região V de uma cadeia de anticorpo e um ou mais segmentos gênicos que codificam a região C. Durante o desenvolvimento de uma célula B na medula óssea (ou fígado fetal), uma sequência codificadora completa para cada uma das duas cadeias de anticorpo que serão sintetizadas é reunida por recombinação gênica sítio-específica (discutido no Capítulo 5). Além disso, para reunir os segmentos gênicos separados dos genes de anticorpos, esses rearranjos também ativam a transcrição de promotores gênicos por meio de mudanças nas posições relativas dos intensificadores e silenciadores que atuam em cada gene. Assim, uma cadeia de anticorpo completa pode ser sintetizada somente após o rearranjo do DNA.

Cada região V de cadeia leve é codificada por uma sequência de DNA que é reunida a partir de dois segmentos gênicos – um **segmento gênico *V*** longo e um pequeno segmento de *ligação*, ou **segmento gênico *J*** (não confunda com a *cadeia J* de proteína [ver Figura 25-23], a qual é codificada em uma outra região do genoma). A **Figura 25-36** ilustra a sequência de eventos envolvidos na produção do polipeptídeo de cadeia leve κ humano a partir de seus segmentos gênicos separados. Cada região V de cadeia pesada é construída de maneira similar por meio da combinação de segmentos gênicos, mas há um *segmento de diversidade* adicional, ou **segmento gênico *D***, que também é necessário (**Figura 25-37**).

O grande número de segmentos gênicos *V*, *J* e *D* herdados disponíveis para codificar as cadeias de anticorpos contribui substancialmente para a diversidade de anticorpos, e a ligação combinatória desses genes (denominada *diversidade combinatória*) aumenta bastante esta contribuição. Qualquer um dos 40 segmentos gênicos *V* do lócus de cadeia leve κ humano, por exemplo, pode ser unido a qualquer um dos 5 segmentos *J* (ver Figura 25-36), de modo que este lócus pode codificar pelo menos 200 (40 × 5) diferentes regiões V de cadeia κ. Igualmente, qualquer um dos 40 segmentos gênicos *V* do lócus de cadeia pesada pode se unir a qualquer um dos 25 segmentos gênicos *D* e a qualquer um dos 6 segmentos gênicos *J* para codificar pelo menos 6.000 (40 × 25 × 6) regiões V de cadeia pesada.

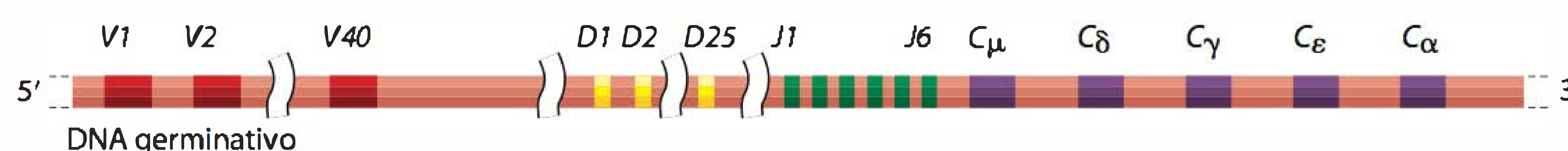


Figura 25-37 O lócus da cadeia pesada humana. Existem 40 segmentos *V*, 25 segmentos *D*, seis segmentos *J* e um agrupamento ordenado de sequências que codificam a região *C*, onde cada agrupamento codifica uma classe diferente de cadeia pesada. Os segmentos *D* (e parte do segmento *J*) codificam os aminoácidos da terceira região hipervariável, que é a porção mais variável da região V de cadeia pesada. Os mecanismos genéticos envolvidos na produção de uma cadeia pesada são os mesmos mostrados na Figura 25-36 para as cadeias leves, com exceção das duas etapas de rearranjo do DNA. Inicialmente, um segmento *D* associa-se a um segmento *J*, e então um segmento *V* associa-se ao segmento *DJ* rearranjado. A figura não está representada em escala e omite alguns detalhes como, por exemplo, o tamanho total do lócus de cadeia pesada é maior que dois megabases.

A diversidade combinatória resultante da reunião de diferentes combinações de segmentos gênicos *V*, *J* e D é um importante mecanismo para a diversidade dos sítios de ligação ao antígeno dos anticorpos. Somente por esse mecanismo, denominado *recombinação V(D)J*, o homem pode produzir 320 diferentes regiões V_L (200 κ e 120 λ) e 6.000 diferentes regiões V_H. Em princípio, estas podem então ser combinadas para produzir cerca de $1{,}9 \times 10^6$ (320 x 6.000) sítios de ligação ao antígeno diferentes. Além disso, como veremos a seguir, o mecanismo de ligação aumenta bastante o número de possibilidades (provavelmente mais de 10^8 vezes), tornando o repertório primário de anticorpos muito maior do que o número total de células B (cerca de 10^{12}) no homem.

As junções imprecisas dos segmentos gênicos aumentam a diversidade das regiões V

No processo de **recombinação V(D)J**, a recombinação sítio-específica une segmentos gênicos que se encontram separados para formar sequências codificantes funcionais para as regiões V_L ou V_H. As *sequências-sinal de recombinação* conservadas flanqueiam cada segmento gênico e servem como sítios de reconhecimento para o processo de junção, garantindo que somente os segmentos gênicos apropriados se recombinem. Assim, por exemplo, um segmento *V* de cadeia leve irá sempre associar-se a um segmento *J*, mas não a outro segmento *V*. As junções são mediadas por um complexo enzimático denominado *recombinase V(D)J*. Este complexo contém duas proteínas que são específicas dos linfócitos em desenvolvimento, assim como enzimas que auxiliam no reparo de danos ao DNA, presentes em todas as nossas células.

Dois genes associados denominados *Rag1* e *Rag2* (*genes de ativação da recombinação*, de *recombination activating genes*) codificam proteínas específicas de linfócitos da recombinase V(D)J, RAG1 e RAG2. Para mediar a união V(D)J, as duas proteínas associam-se para formar um complexo (denominado **RAG**), que atua como uma endonuclease, introduzindo quebras na fita dupla de DNA precisamente entre os segmentos gênicos a serem unidos e suas sequências-sinal de recombinação. A RAG então inicia o processo de reunião recrutando as enzimas envolvidas no reparo da fita dupla de DNA em todas as células (**Figura 25-38**). Camundongos ou humanos deficientes em um dos dois genes *Rag* ou na união de extremidades não-homólogas são altamente suscetíveis a infecções porque são incapazes de realizar a recombinação V(D)J e, consequentemente, não possuem células B e células T funcionais,

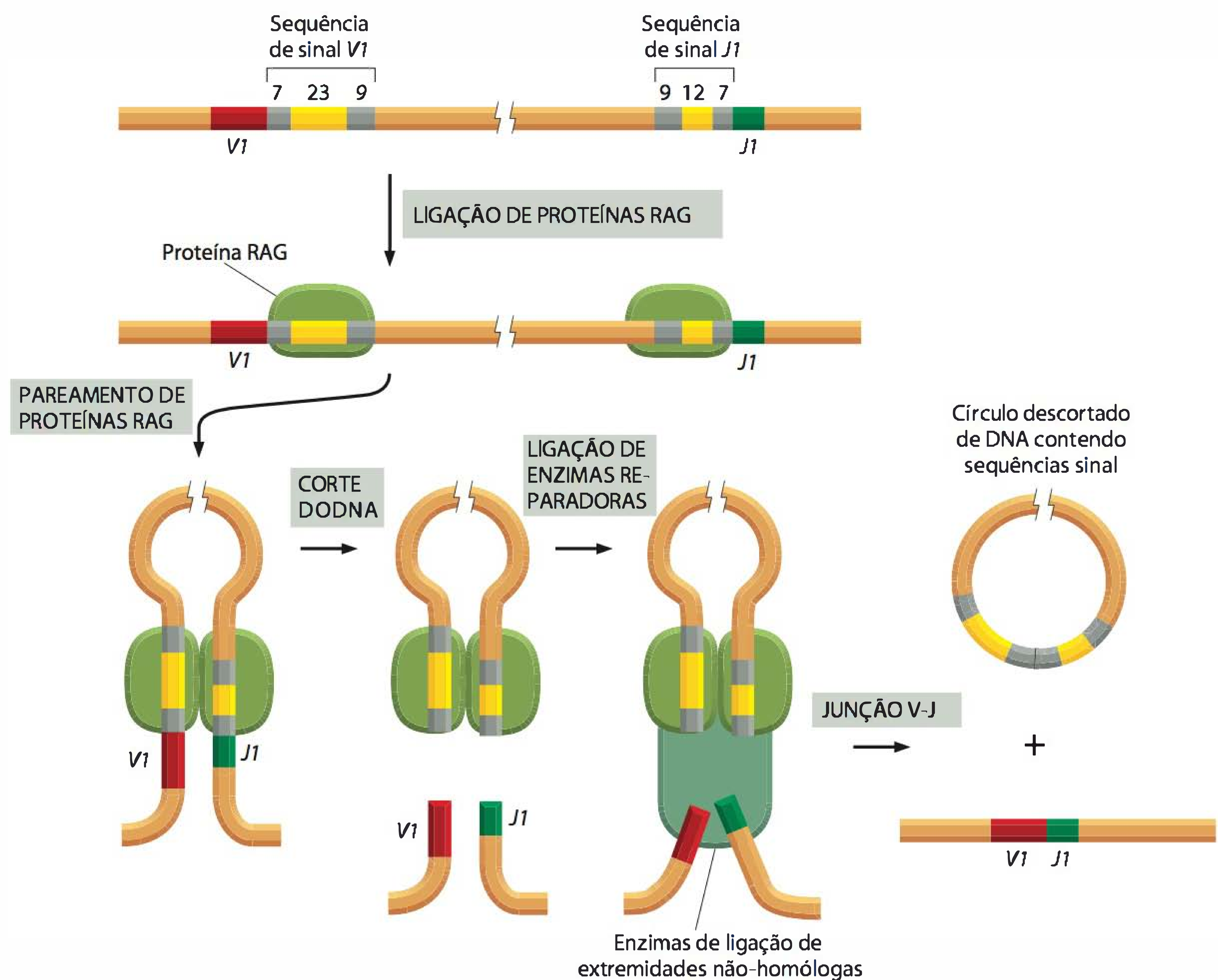


Figura 25-38 O papel das sequências-sinal de recombinação na ligação dos segmentos gênicos mediada por RAG. No caso apresentado, V1 é ligado a J1 em um lócus de cadeia leve. Dois tipos de sequência-sinal de DNA estão envolvidos na recombinação V(D)J, a qual ocorre somente entre tipos diferentes: ambos possuem a mesma sequência de 7 pares de bases (pb) em uma extremidade e a mesma sequência de 9 pb na outra extremidade. No entanto, em um tipo, as extremidades estão separadas por um espaçador de 12 pb e, em outro, por um espaçador de 23 pb, e as duas proteínas RAG se ligam a cada um deles, fazendo a justaposição entre as duas sequências-sinal diferentes. Então, o complexo RAG corta as duas sequências-sinal nos seus últimos 7 pb, e a enzima de reparo do DNA liga os segmentos V1 e J1. As sequências-sinal são então unidas e descartadas como um pequeno círculo de DNA que contém todo o DNA originalmente localizado entre V1 e J1. O mesmo processo de sequência-sinal é usado para unir os segmentos gênicos V, D e J do lócus de cadeia pesada. O arranjo das sequências-sinal e a "regra 12/23" descrita assegura que somente os segmentos gênicos adequados se recombinem.

uma condição denominada *imunodeficiência combinada severa* (*SCID, severe combined immunodeficiency*). (Como discutiremos mais adiante, as células T usam a mesma recombinase V(D)J para unir os segmentos gênicos que codificam seus receptores antígeno-específicos.)

Durante a junção dos segmentos gênicos dos anticorpos (e dos receptores de células T), assim como na união das extremidades não-homólogas (ver Figura 5-51A), um número variável de nucleotídeos frequentemente é perdido das extremidades dos segmentos gênicos de recombinação, e um ou mais nucleotídeos escolhidos aleatoriamente também podem ser inseridos. Esta perda e aquisição aleatória de nucleotídeos nas regiões de união é denominada **diversidade juncional**, e aumenta bastante a diversidade das sequências codificantes para as regiões V criadas por meio da recombinação V(D)J, especificamente na terceira região hipervariável. No entanto, esse aumento de diversidade tem seu preço. Em muitos casos, isso resultará em um deslocamento do quadro de leitura, o que gerará um gene não-funcional. Dessa maneira, cerca de dois em cada três rearranjos são "improdutivos", e vários linfócitos B em desenvolvimento nunca produzem moléculas de anticorpos funcionais e, portanto, morrem na medula óssea.

As células B que produzem moléculas de anticorpos funcionais e que interagem fortemente com os antígenos próprios na medula óssea podem ser perigosas. Tais células B mantêm a expressão das proteínas RAG e podem realizar uma segunda etapa de recombinação V(D)J no lócus de cadeia leve (normalmente o lócus κ), alterando a especificidade de seu anticorpo de superfície celular – um processo referido como **editoração do receptor**. Como um meio adicional de proteção, a deleção clonal elimina as células B autorreativas que falham na alteração de sua especificidade (ver Figura 25-13).

O controle da recombinação V(D)J assegura que as células B sejam monoespecíficas

As células B são *monoespecíficas*. Ou seja, todos os anticorpos produzidos por uma célula B apresentam sítios de ligação a antígenos idênticos. Esta característica permite que os anticorpos interliguem os antígenos, formando grandes agregados e promovendo, assim, a eliminação dos antígenos (ver Figura 25-19). Isso também significa que uma célula B ativada secreta anticorpos com a mesma especificidade de seu receptor de anticorpo ligado à membrana, garantindo a especificidade da resposta de anticorpos (ver Figura 25-17).

Para atingir a monoespecificidade, cada célula B deve produzir somente um tipo de região V_L e um tipo de região V_H. As células B, assim como a maioria das outras células somáticas, são diploides, cada célula apresentando seis loci que codificam as cadeias de anticorpos: dois loci de cadeia pesada (um de cada um dos pais) e quatro loci de cadeia leve (um do tipo κ e outro do tipo λ de cada um dos pais). Se os rearranjos de DNA ocorrerem independentemente em cada lócus de cadeia pesada e em cada lócus de cadeia leve, uma única célula pode produzir até oito anticorpos diferentes, cada um com diferentes sítios de ligação a antígenos.

No entanto, cada célula B utiliza somente dois dos seis loci de anticorpos: um dos dois loci de cadeia pesada e um dos quatro loci de cadeia leve. Assim, cada célula B precisa escolher não somente entre os seus loci de cadeia leve κ ou λ, mas também entre os loci de cadeias leves e pesadas maternos e paternos. Esta segunda escolha é denominada **exclusão alélica**. Esse processo também ocorre na expressão de alguns genes que codificam os receptores de células T e genes que codificam os receptores olfatórios nasais (discutido no Capítulo 15). Entretanto, em sua maioria as proteínas codificadas por genes autossômicos, tanto os genes maternos como os paternos, são igualmente expressas em uma célula.

A exclusão alélica e a escolha entre as cadeias leves κ ou λ durante o desenvolvimento de uma célula B dependem da regulação de retroalimentação negativa do processo de recombinação V(D)J. Um rearranjo funcional em um lócus de anticorpo suprime rearranjos em todos os outros loci remanescentes que codificam para o mesmo tipo de cadeia de anticorpo (**Figura 25-39**). Nos clones de células B isolados de um camundongo transgênico que expressa um gene de cadeia μ rearranjado, por exemplo, o rearranjo de todos os genes das cadeias pesadas endógenos geralmente é suprimido. Resultados comparáveis foram obtidos para as cadeias leves. A supressão não ocorre se o produto do gene rearranjado não gerar um receptor que se insira na membrana plasmática. Dessa forma, tem sido proposto que tanto o processo de reunião do receptor por si só como os sinais extracelulares que atuam nos receptores estão envolvidos na continuidade da supressão dos rearranjos gênicos.

Apesar de não haver diferenças biológicas detectáveis entre as regiões constantes das cadeias leves κ ou λ, há uma vantagem na existência dos dois loci de segmentos gênicos separados codificando para as regiões variáveis das cadeias leves. A presença de dois loci sepa-

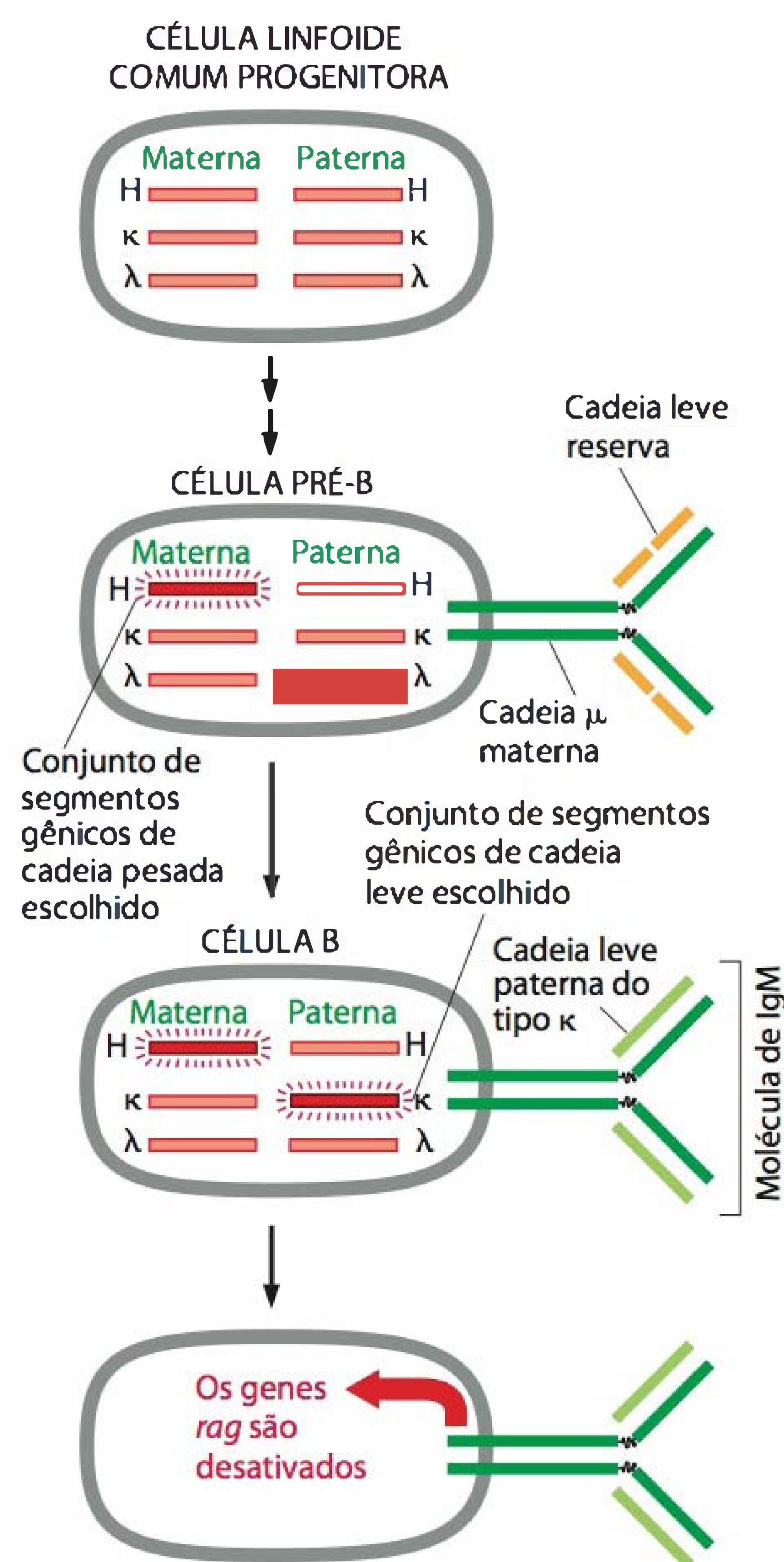


Figura 25-39 Seleção dos loci de anticorpo durante o desenvolvimento das células B. Para produzir anticorpos com um único tipo de sítio de ligação ao antígeno, uma célula B em desenvolvimento deve utilizar somente um único lócus de cadeia L e um único lócus de cadeia H. Apesar de, aparentemente, a escolha entre o conjunto materno ou paterno ser randômica, a reunião das sequências que codificam a região V em uma célula B em desenvolvimento ocorre em uma sequência ordenada, um segmento de cada vez, em geral iniciando com o lócus da cadeia H. Neste lócus, os segmentos *D* primeiramente associam-se a um segmento J_H em ambos os cromossomos paternos. A seguir, ocorre a associação do V_H ao DJ_H em um destes cromossomos (não-representado). Se este rearranjo produzir um gene funcional, a produção resultante de cadeias μ completas (sempre a primeira cadeia H a ser produzida) leva a sua expressão na superfície celular em associação às cadeias leves substitutas (ver Figura 25-22). A célula, nesta etapa, suspende todo o processo de rearranjo de todos os outros segmentos que codificam para a região V_H e inicia o rearranjo de V_L. O rearranjo de V_L em geral ocorre primeiro no lócus κ e, somente se este processamento falhar, ocorrerá o processamento em outro lócus κ ou no lócus λ. Se, em qualquer momento, a junção em fase de V_L com J_L levar à produção de cadeias leves, estas se combinam com as cadeias μ pré-formadas e dão origem às moléculas de anticorpos IgM, que serão inseridas na membrana plasmática. Acredita-se que o receptor de superfície celular do tipo IgM possa habilitar as células B recém-formadas a receber sinais extracelulares que irão suspender todas as recombinações V(D)J subsequentes, suspendendo a expressão dos genes *Rag1* e *Rag2*.

Se uma célula B em desenvolvimento produzir um receptor de alta afinidade para um antígeno próprio, a expressão do gene *Rag* é mantida e a célula sofre nova recombinação V(D)J no lócus de cadeia L (processo denominado editoração do receptor; ver Figura 25-13), dessa forma, promovendo a troca da especificidade de seu receptor (não-representado). Se uma célula não produzir um rearranjo funcional de uma região codificadora para a região V_H e a região V_L, ela é incapaz de produzir moléculas de anticorpo e morre por apoptose (não-representado).

rados aumenta a chance de que a célula pré-B faça o rearranjo das sequências codificantes das regiões V_H com sucesso, e que venha também a ter sucesso no rearranjo das sequências codificantes das regiões V_L, tornando-se, assim, uma célula B. Esta chance é posteriormente aumentada, porque antes que uma célula pré-B produza cadeias leves padrão, ela produz cadeias leves substitutas (ver Figura 25-22), que se combinam com cadeias pesadas do tipo μ. Os receptores resultantes são expressos na superfície celular e possibilitam que a célula prolifere, produzindo grande número de células-filhas, sendo provável que algumas delas possuam competência para produzir as legítimas cadeias leves.

A produção de uma célula B funcional é um processo altamente complexo e seletivo. No final, todas as células B que falham na produção de moléculas de anticorpos intactas morrem por apoptose.

Passaremos agora, após discutir os mecanismos responsáveis pela produção do repertório primário de anticorpos antes da estimulação antigênica, para aqueles mecanismos responsáveis pelo repertório secundário de anticorpos após o estímulo antigênico. Iniciaremos pelo notável mecanismo darwiniano responsável pelo aumento da afinidade dos sítios de ligação ao antígeno dos anticorpos por seus antígenos específicos.

As hipermutações somáticas dirigidas por antígenos determinam respostas precisas de anticorpos

Conforme mencionado anteriormente, com o passar do tempo após uma imunização, de modo geral, ocorre um aumento progressivo da afinidade dos anticorpos produzidos contra o antígeno utilizado na imunização. Este fenômeno, conhecido como **maturação da afinidade**, é devido ao acúmulo de mutações pontuais específicas nas sequências que codificam as regiões V tanto das cadeias pesadas como das cadeias leves. As mutações ocorrem muito depois de as regiões codificantes terem sido reunidas. Após o estímulo das células B pelo antígeno e pelas células T auxiliares nos órgãos linfoides periféricos, algumas células B proliferam rapidamente nos folículos linfoides (ver Figura 25-16), formando estruturas denominadas *centros germinativos*. Ali as células B mutam a uma taxa de cerca de uma mutação por sequência codificadora de região V por geração de células. Devido ao fato de essa taxa ser cerca de um milhão de vezes mais elevada do que a de mutações espontâneas em outros genes e ocorrer em células somáticas e não em células germinativas (discutido no Capítulo 21), o processo é denominado **hipermutação somática**.

Poucos anticorpos alterados produzidos por hipermutação terão um aumento da afinidade pelo antígeno. Os receptores de antígeno da superfície das células B são produzidos pelos mesmos genes de anticorpos e, portanto, o antígeno irá estimular preferencialmente aquelas células B que produzem tais anticorpos com afinidade aumentada pelo antígeno. Clones dessas células B alteradas irão sobreviver e proliferar, especialmente quando a quan-

tidade de antígeno decrescer a níveis baixíssimos durante a resposta. A maioria das células B dos centros germinativos morrerá por apoptose. Assim, depois de repetidos ciclos de hipermutação somática e após a proliferação ativada pelo antígeno de clones selecionados de células B efetoras e de memória, anticorpos de altíssima afinidade tornam-se abundantes durante a resposta imune, melhorando progressivamente a proteção contra o patógeno. (Em alguns mamíferos, incluindo ovinos e gado, ocorre um processo semelhante de hipermutação somática que desempenha um papel fundamental na diversificação do repertório primário de anticorpos antes que a célula B encontre o seu antígeno.)

A principal vitória para a compreensão do mecanismo molecular de hipermutação somática ocorreu quando uma enzima que é necessária para esse processo foi identificada. Ela é denominada **desaminase induzida pela ativação** (**AID**, *activation-induced deaminase*), sendo expressa especialmente em células B ativadas, e desamina a citosina (c) para uracila (U) no DNA que codifica a região V transcrita. A desaminação produz um erro de pareamento U:G na fita dupla de DNA, e o reparo desse erro produz vários tipos de mutações, dependendo do mecanismo de reparo utilizado (**Figura 25-40**). A hipermutação somática afeta somente as sequências codificadoras da região V ativamente transcrita, provavelmente porque a enzima AID é carregada especificamente em transcritos de RNA (discutido no Capítulo 7). A AID também é necessária quando as células B ativadas trocam a produção de IgM pela produção de outras classes de anticorpos, como veremos a seguir.

As células B podem trocar a classe dos anticorpos que produzem

Como discutido anteriormente, todas as células B iniciam a síntese de anticorpos produzindo moléculas de IgM e inserindo-as em suas membranas plasmáticas, onde atuarão como receptores para antígenos. Depois que as células B deixam a medula óssea, mas antes que interajam com o antígeno, elas começam a produzir moléculas de IgM e de IgD como receptores de antígenos associados à membrana, ambos com o mesmo sítio de ligação ao antígeno (ver Figura 25-22). A estimulação pelo antígeno e pela célula T auxiliar ativa muitas dessas células a tornarem-se células efetoras secretoras de anticorpos IgM, que predominam na resposta primária de anticorpos. Mais tarde, na resposta imune, quando a célula B ativada sofre hipermutação somática, a combinação do antígeno com citocinas secretadas pelas células T auxiliares induz várias células B a trocarem a produção de IgM e IgD de ligação à membrana pela produção de anticorpos IgG, IgA ou IgE, processo denominado **troca de classe**. Algumas destas células tornam-se células de memória, que expressam a classe correspondente de moléculas de anticorpo em sua superfície, enquanto outras se tornam células efetoras secretoras de anticorpos. As moléculas de IgG, IgA e IgE são coletivamente denominadas *classes secundárias* de anticorpos, porque são produzidas somente após a estimulação antigênica e porque são as moléculas predominantes em uma resposta secundária de anticorpos. Conforme visto anteriormente, cada classe de anticorpos é especializada em atacar patógenos de diferentes formas e em diferentes locais.

A região constante da cadeia pesada de um anticorpo determina a classe do anticorpo. Assim, a habilidade das células B em trocar a classe dos anticorpos que produzem, sem trocar o sítio de ligação ao antígeno, implica que a mesma sequência codificante da região

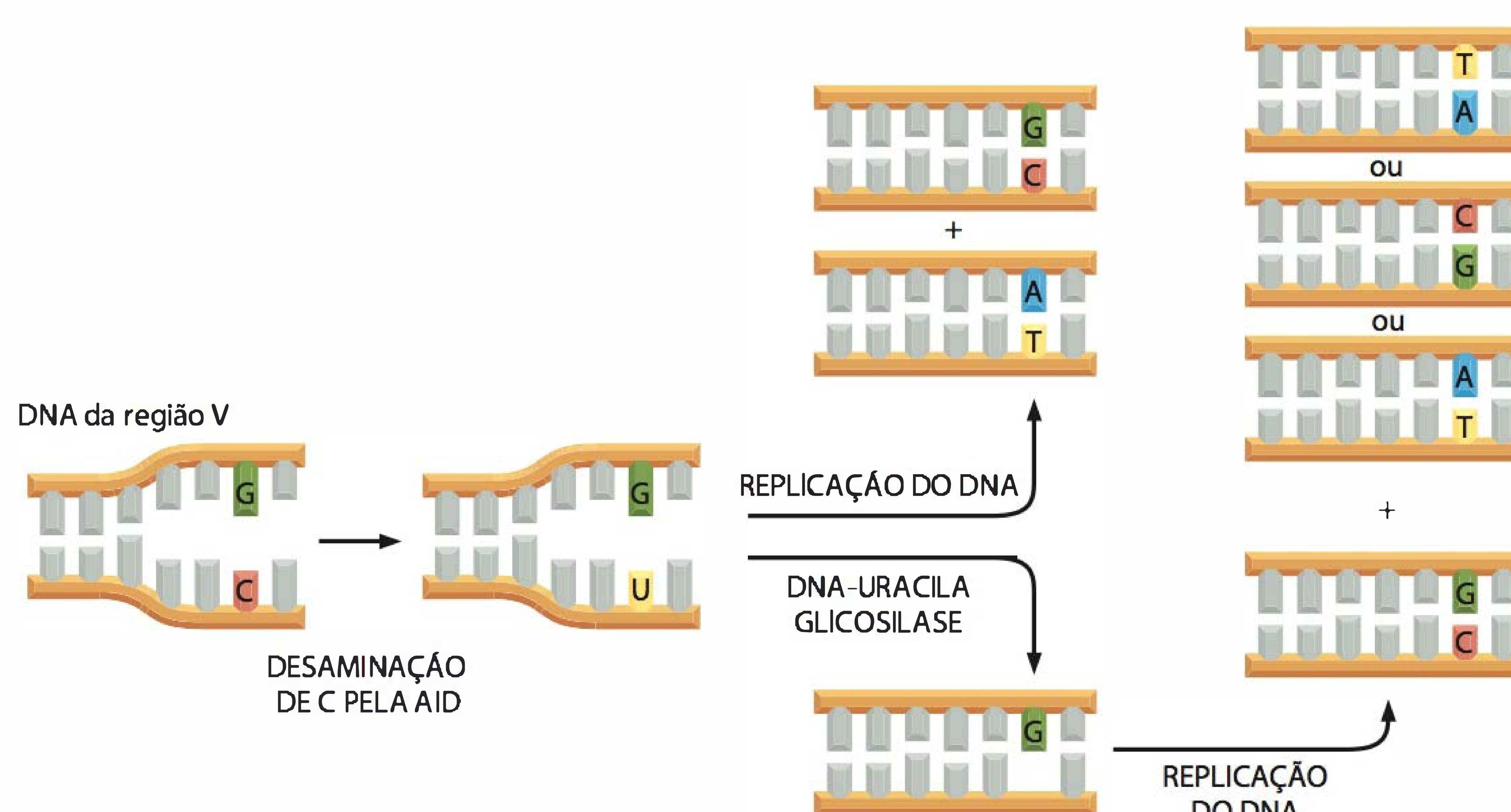


Figura 25-40 Algumas das maneiras nas quais a AID pode causar mutações durante a hipermutação somática. A AID desamina algumas citosinas em uracila no DNA que codifica a região V transcrita, causando o pareamento incorreto U:G, o qual leva a mutações de várias formas. Algumas mutações ocorrem quando o DNA contendo o pareamento incorreto U:G não-processado é replicado (ver Figura 5-49A). Outras ocorrem quando a uracila é removida pela DNA-uracila glicosilase antes da replicação do DNA, gerando aposição em uma fita do DNA com ausência de uma base para a cópia pela DNA-polimerase. Ainda outras (não apresentadas), ocorrem quando a área ao redor do pareamento incorreto U:G é excisada pelo sistema de reparo de pareamento incorreto (discutido no Capítulo 5), produzindo um espaço que pode ser reparado por DNA-polimerases sujeitas a erro, gerando mutações nos pares A:T e C:G.

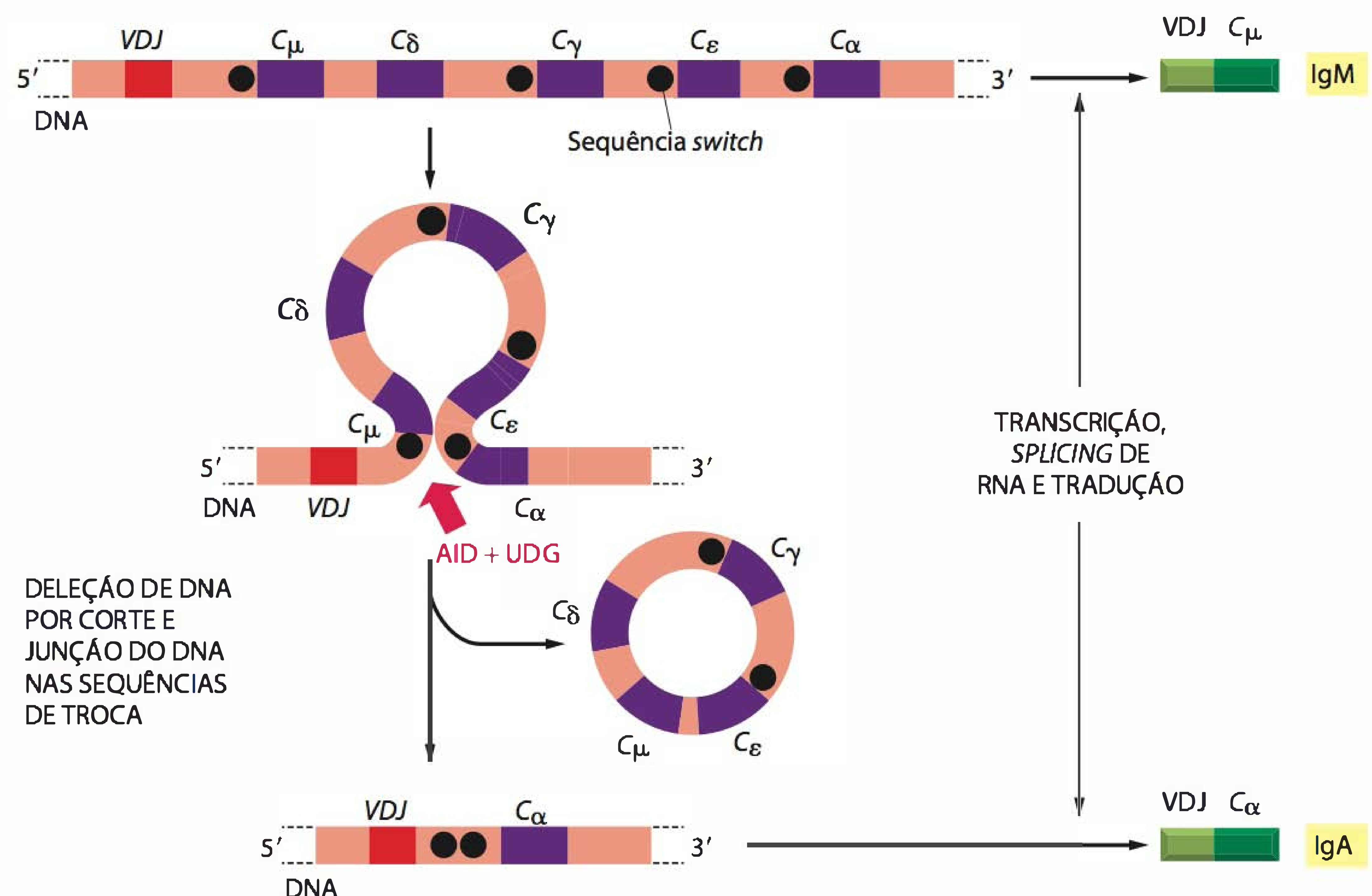


Figura 25-41 Exemplo de um rearranjo de DNA que ocorre na recombinação de troca de classe. Uma célula B produzindo um anticorpo IgM a partir de uma sequência de DNA *VDJ* rearranjada é estimulada a trocar a classe e produzir um anticorpo IgA. Neste processo, ela deleta o DNA existente entre a sequência *VDJ* e a sequência codificante C_α. As sequências específicas de DNA (*sequências de troca*) localizadas após cada sequência codificante C_H recombinam-se uma com a outra com a deleção da sequência de DNA interveniente. O processo de recombinação para a troca de classes, como discutido no texto, depende da AID e da DNA-uracila glicosilase (UDG), as mesmas enzimas envolvidas na hipermutação somática (ver Figura 25-40).

V_H rearranjada (que especifica a porção da cadeia pesada que se liga ao antígeno) possa, a seguir, associar-se a diferentes sequências codificantes de regiões C_H. Este fato apresenta implicações funcionais importantes. Isso significa que, em um dado animal, um determinado sítio de ligação ao antígeno que foi selecionado pelos antígenos do ambiente pode ser expresso sob a forma de distintas classes de anticorpos, adquirindo, assim, diferentes propriedades biológicas, típicas de cada classe.

Quando uma célula B realiza a troca de classe e deixa de produzir IgM e IgD e passa a produzir uma das classes secundárias de anticorpos, ocorre uma alteração irreversível ao nível de DNA – um processo denominado **recombinação para troca de classe**. Este processo leva à deleção do DNA que contém todas as sequências codificantes de C_H existentes entre a sequência codificante de VDJ rearranjada e uma determinada sequência codificante de C_H que a célula está destinada a expressar. A recombinação para troca de classe difere da recombinação V(D)J de várias maneiras. (1) Ocorre após o estímulo antigênico, principalmente nos centros germinativos e depende de células T auxiliares. (2) Utiliza diferentes sequências-sinal de recombinação, denominadas *sequências de troca*, as quais são compostas de pequenos motivos repetidos em sequência por várias quilobases. (3) Envolve o corte e a ligação de sequências de troca, as quais são sequências não-codificadoras, de modo que a sequência codificadora não seja afetada (**Figura 25-41**). (4) E, mais importante, o mecanismo molecular é diferente. Ele depende da AID, a qual também está envolvida na hipermutação somática, ao invés da RAG, a qual é responsável pela recombinação V(D)J.

As citocinas que ativam a troca de classe induzem a produção de fatores de transcrição que ativam a transcrição das sequências de troca relevantes, permitindo que a AID se ligue a essas sequências. Uma vez ligada, a AID inicia a troca por recombinação pela desaminação de algumas citosinas para uracila nas vizinhanças da sequência de troca. Acredita-se que a excisão dessas uracilas pela DNA-uracila glicosilase (ver Figura 25-40) leve, de alguma forma, a quebras na fita dupla nas regiões de troca, as quais são então unidas para formar extremidades de ligação não-homólogas (discutido no Capítulo 5).

Assim, enquanto o repertório primário de anticorpos no homem e em camundongos é produzido pela ligação V(D)J mediada pela RAG, o repertório secundário de anticorpos é produzido por hipermutação somática e recombinação para troca de classe, ambas mediadas pela enzima AID. A **Figura 25-42** resume os principais mecanismos envolvidos na diversificação dos anticorpos discutidos neste capítulo.

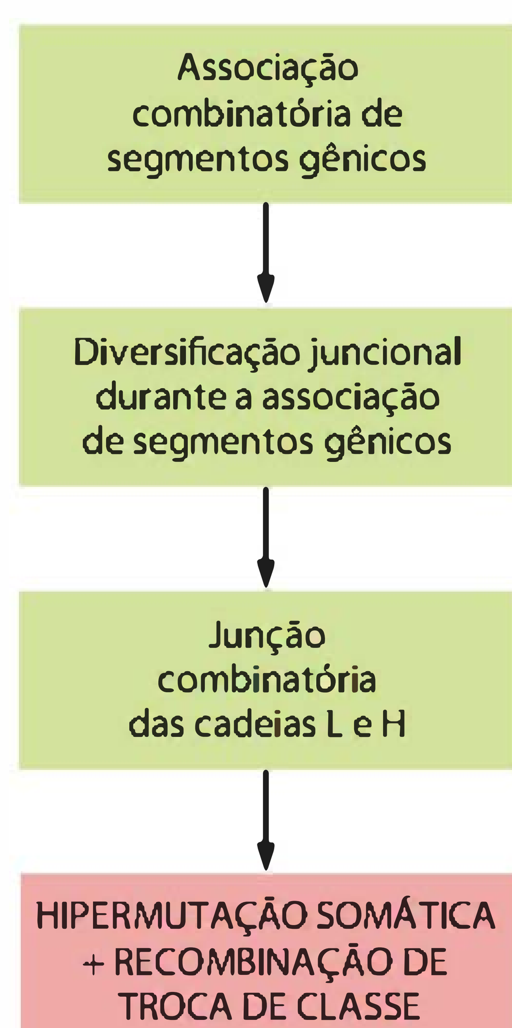


Figura 25-42 Os principais mecanismos envolvidos na diversidade de anticorpos no homem e em camundongos. Aqueles marcados em *verde* ocorrem durante o desenvolvimento das células B na medula óssea (ou no fígado fetal), enquanto que os mecanismos marcados em *vermelho* ocorrem quando a célula B é estimulada por um antígeno estranho e pelas células T auxiliares, localizadas nos órgãos linfoides periféricos, tanto no final da resposta primária quanto na resposta secundária.

Resumo

Os anticorpos são produzidos por três loci gênicos em cromossomos separados, cada um produzindo uma cadeia polipeptídica diferente. Um codifica as cadeias leves do tipo κ, outro codifica as cadeias leves do tipo λ e um outro codifica as cadeias pesadas. Cada lócus de anticorpos contém segmentos gênicos separados que codificam para diferentes porções das regiões variáveis de uma

determinada cadeia de anticorpo. Cada lócus de cadeia leve contém uma ou mais sequências que codificam a região constante (C) e uma série de segmentos gênicos variáveis (V) e de junção (J). O lócus de cadeia pesada contém sequências que codificam a região C e vários segmentos gênicos V, de diversidade (D) e J.

Durante o desenvolvimento das células B na medula óssea (ou no fígado fetal), antes da estimulação pelo antígeno, segmentos gênicos separados são unidos por uma recombinação sítio-específica que depende do complexo RAG. Um segmento gênico V_L *recombina-se com um segmento gênico* J_L*, para produzir uma sequência de DNA codificante para a região V de uma cadeia leve, e um segmento gênico* V_H *recombina-se com um segmento gênico D e um segmento gênico* J_H *para produzir uma sequência de DNA codificante para a região V de uma cadeia pesada. Cada sequência codificante de região V rearranjada é então transcrita simultaneamente com a sequência da região C apropriada para produzir uma molécula de RNA que codificará a cadeia polipeptídica completa. As células que produzem cadeias pesadas e leves funcionais que formam o sítio de ligação ao antígeno encerram o processo de associação V(D)J a fim de garantir que cada célula B produza somente um tipo de sítio de ligação ao antígeno.*

Os humanos podem produzir centenas de cadeias leves diferentes e milhares de cadeias pesadas diferentes por meio da combinação randômica de segmentos gênicos herdados, que codificam para as regiões V_L *e* V_H *durante o desenvolvimento da célula B. Uma vez que o sítio de ligação ao antígeno é resultante da associação das alças hipervariáveis de* V_L *e* V_H *na forma estrutural final do anticorpo, as cadeias pesadas e leves podem parear e gerar anticorpos com milhões de sítios diferentes de ligação ao antígeno. Este número é bastante aumentado pela perda e aquisição de nucleotídeos na região de junção de segmentos gênicos. Esses anticorpos produzidos pela recombinação V(D)J dependente de RAG antes do estímulo pelo antígeno são anticorpos do tipo IgM e IgD de baixa afinidade, e constituem o repertório primário de anticorpos.*

Posteriormente, os anticorpos são diversificados após o estímulo antigênico nos órgãos linfoides periféricos por um processo de hipermutação somática dependente de células T e AID e pela recombinação para troca de classe, que produz anticorpos IgG, IgA e IgE de alta afinidade que constituem o repertório secundário de anticorpos. A troca de classe permite que o mesmo sítio de ligação do antígeno seja incorporado em anticorpos com diferentes propriedades biológicas.

CÉLULAS T E PROTEÍNAS DO MHC

Assim como as respostas de anticorpo, as respostas imunes mediadas pelas células T são excepcionalmente antígeno-específicas e são tão importantes quanto os anticorpos na defesa dos vertebrados contra as infecções. De fato, a maioria das respostas imunes adaptativas, incluindo as respostas mediadas por anticorpos, necessita das células T auxiliares para sua ativação. Podemos destacar que, ao contrário das células B, as células T podem eliminar patógenos que, por se encontrarem dentro de células do hospedeiro, estariam invisíveis. A maior parte do restante deste capítulo trata sobre como as células T desempenham esta façanha.

As respostas mediadas pelas células T diferem das respostas mediadas pelas células B em pelo menos duas maneiras essenciais. Primeiro, as células T são ativadas por antígenos estranhos a proliferarem e diferenciarem-se em células efetoras somente quando os antígenos encontram-se na superfície de *células apresentadoras de antígeno*, normalmente células dendríticas, nos órgãos linfoides periféricos. As células T necessitam das células apresentadoras de antígeno para ativação porque a forma do antígeno que elas reconhecem é diferente daquela reconhecida pelas células B. Enquanto as células B reconhecem antígenos intactos, as células T reconhecem fragmentos de antígenos proteicos que tenham sido parcialmente degradados dentro de uma célula apresentadora de antígeno. Os fragmentos do peptídeo são então transportados para a superfície da célula apresentadora de antígeno associados a moléculas especiais denominadas *proteínas do MHC* (discutido no Capítulo 24), que apresentam os fragmentos para as células T.

A segunda diferença é que, quando ativada, a célula T efetora atua apenas localmente, tanto dentro dos órgãos linfoides secundários, quanto após terem migrado para o local de infecção. As células B, ao contrário, secretam anticorpos que podem agir em regiões distantes. As células T efetoras interagem diretamente com outras células do hospedeiro, as quais serão mortas (no caso de células infectadas) ou marcadas de alguma maneira (no caso de uma célula B ou um macrófago). Iremos nos referir a tais células hospedeiras como *células-alvo*. Entretanto, pelo fato de estas células apresentarem o antígeno ligado a uma proteína do MHC em sua superfície para uma célula T que a reconheça, elas também são células apresentadoras de antígeno.

Existem três principais populações de células T – as células T citotóxicas, as células T auxiliares e as células T reguladoras (supressoras). As *células T citotóxicas* efetoras matam diretamente as células que estão infectadas por vírus ou por algum outro patógeno intracelular. As *células T auxiliares* efetoras estimulam a resposta de outras células, principalmente macrófagos, células dendríticas, células B e células T citotóxicas. As *células T reguladoras* impedem a atividade de outras células, principalmente de células T efetoras autorreativas.

Nesta seção, iremos descrever essas três populações de células T e suas respectivas funções. Discutiremos como elas reconhecem os antígenos estranhos na superfície das células apresentadoras de antígeno e nas células-alvo, considerando o papel crucial desempenhado pelas proteínas do MHC no processo de reconhecimento. Finalmente, descreveremos como as células T são selecionadas durante o seu desenvolvimento no timo a fim de garantir que somente células com receptores potencialmente funcionais sobrevivam e maturem. Iniciaremos considerando a natureza dos receptores de superfície das células T utilizados para reconhecer o antígeno.

Os receptores de células T são heterodímeros semelhantes a anticorpos

Uma vez que as respostas das células T dependem do contato direto com a célula apresentadora de antígeno ou com a célula-alvo, os **receptores de células T** (**TCRs**, *T cell receptors*), ao contrário dos anticorpos produzidos pelas células B, existem somente na forma associada à membrana e não são secretados. Por essa razão, os TCRs são difíceis de ser isolados, e isso só foi realizado na década de 1980, quando os pesquisadores identificaram sua estrutura molecular. Os TCRs assemelham-se a anticorpos. São compostos por duas cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto, e cada uma possui dois domínios semelhantes a Igs, um variável e um constante (**Figura 25-43**A). Além disso, a estrutura tridimensional da porção extracelular do TCR foi determinada por difração de raios X e assemelha-se muito a um braço da forma de "Y" da molécula de anticorpo (Figura 25-43B).

Na maioria das células T, os TCRs possuem uma cadeia α e uma cadeia β. Os loci gênicos que codificam as cadeias α e β encontram-se localizados em cromossomos diferentes. Assim como o lócus das cadeias pesadas de anticorpos, o lócus do TCR contém segmentos gênicos V, D e J separados (ou apenas os segmentos gênicos V e J, no caso do lócus da cadeia α) que são unidos por recombinações sítio-específicas durante o desenvolvimento da célula T no timo. Com uma exceção, as células T usam os mesmos mecanismos para gerar a diversidade dos TCRs que as células B usam para gerar a diversidade de anticorpos. De fato, as mesmas recombinases para a associação V(D)J são utilizadas, inclusive as proteínas RAG discutidas anteriormente. O mecanismo que não está envolvido com a geração da diversidade das cé-

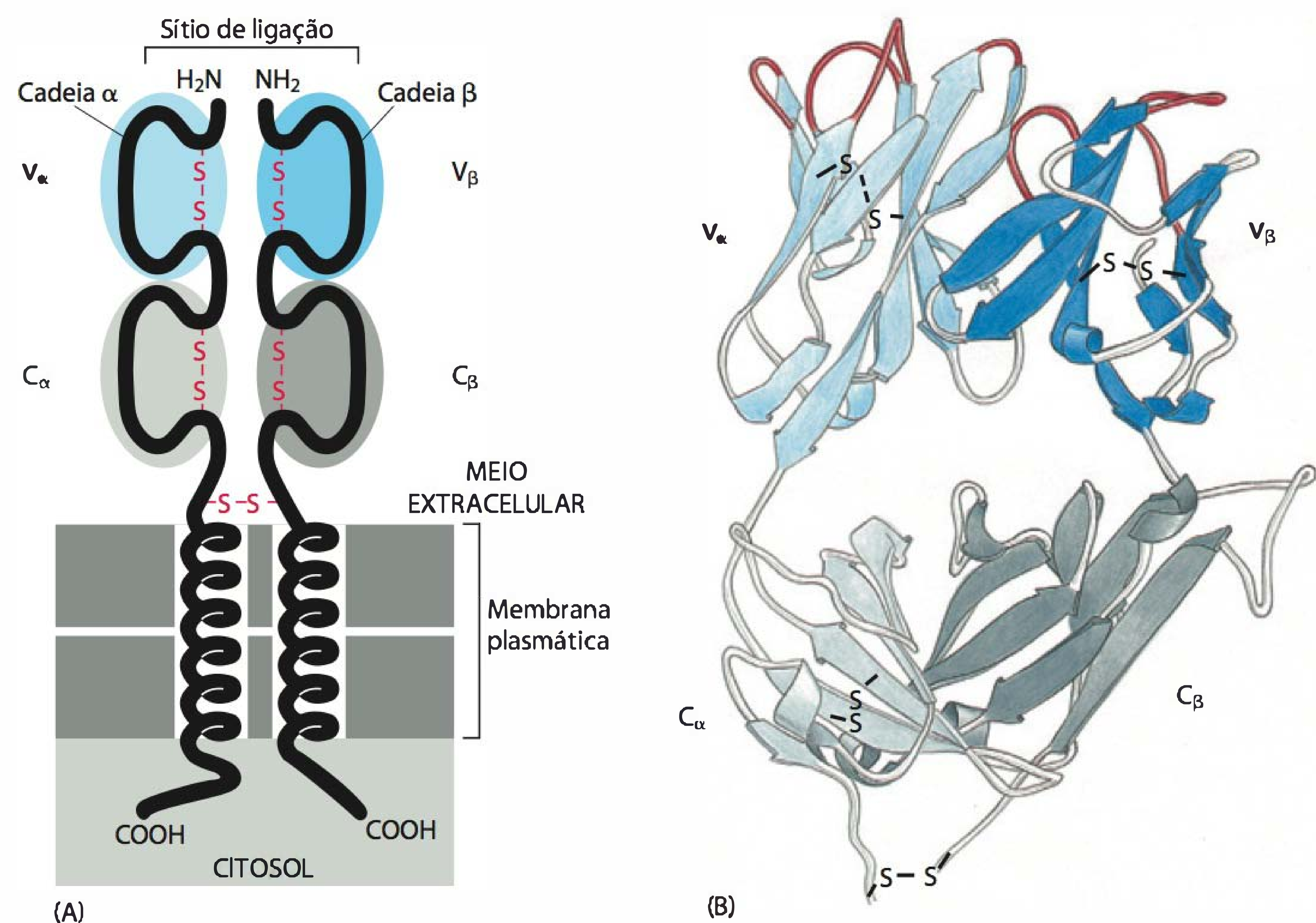


Figura 25-43 Um **receptor de célula T (TCR) heterodímero.** (A) Desenho esquemático demonstrando que o receptor é composto por cadeias polipeptídicas α e β. Cada cadeia tem aproximadamente 280 aminoácidos de comprimento e apresenta uma grande porção extracelular com dobras semelhantes a dois domínios típicos das Igs – um variável (V) e outro constante (C). O sítio de ligação ao antígeno é formado por domínios $V\alpha$ e $V\beta$ (marcados em *azul*). Ao contrário dos anticorpos, que possuem dois sítios de ligação a antígenos, os TCRs possuem somente um. O heterodímero $\alpha\beta$ é associado não-covalentemente a um grande número de proteínas invariantes associadas à membrana (não-representadas), que auxiliam na ativação da célula T, quando os TCRs se ligam aos antígenos. Uma célula T típica possui em torno de 30 mil destes complexos em sua superfície. (B) Estrutura tridimensional da porção extracelular do TCR. O sítio de ligação ao antígeno é formado por alças hipervariáveis tanto nos domínios $V\alpha$ como nos domínios $V\beta$ (*vermelho*), e sua dimensão e geometria, de modo geral, são similares às do sítio de ligação de uma molécula de anticorpo. (B, com base em K. C. Garcia et al., Science 274:209-219, 1996. Com permissão de AAAS.)

lulas T é a hipermutação somática dependente do antígeno. Portanto, a afinidade dos receptores mantém-se baixa (K_a ~10^5–10^7 litros/mols), embora células T com afinidades mais altas sejam preferencialmente selecionadas pelo antígeno para persistirem como células de memória. As células T podem compensar parcialmente esta baixa afinidade aumentando a avidez, que ocorre quando múltiplos TCRs se ligam simultaneamente a múltiplos ligantes ligados à membrana (o complexo peptídeo:MHC descrito mais adiante). Além disso, vários correceptores e proteínas de adesão célula-célula aumentam fortemente a ligação da célula T à célula apresentadora de antígeno ou à célula-alvo.

Um pequeno número de células T, em vez de produzir cadeias α e β, produz um receptor heterodímero diferente, porém semelhante, composto por cadeias γ e δ. Embora estas células correspondam de 5 a 10% das células T sanguíneas, são encontradas principalmente no epitélio (na pele e no intestino, p. ex.). Suas funções não são bem-conhecidas, e não iremos nos ater a elas.

Assim como os receptores de antígenos das células B, os TCRs estão firmemente associados à membrana plasmática, com várias proteínas invariáveis ligadas à membrana que estão envolvidas com a transmissão de sinais do receptor ativado pelo antígeno para o interior da célula (ver Figura 25-66). Trataremos dessas proteínas de forma mais detalhada a seguir. Primeiramente, no entanto, precisamos considerar a forma especial como as células T reconhecem antígenos estranhos na superfície das células apresentadoras de antígeno.

A apresentação de antígenos pelas células dendríticas pode ativar ou tornar as células T tolerantes

As células T auxiliares ou citotóxicas devem ser ativadas para proliferarem e diferenciarem-se em células efetoras antes que possam matar as células-alvo. Esta ativação ocorre nos órgãos linfoides periféricos na superfície das **células dendríticas** (**Figura 25-44**) que apresentam o antígeno estranho complexado com proteínas do MHC na sua superfície, juntamente com proteínas coestimuladoras. Por outro lado, as células T de memória podem ser ativadas por outros tipos de células apresentadoras de antígeno, incluindo os macrófagos e as células B, bem como as células dendríticas.

Vários tipos de células dendríticas interagem com as células T, mas todos possuem um única função conhecida, que é a apresentação de antígenos que ativam ou inibem as células T. As células dendríticas estão localizadas nos tecidos de todo o organismo, incluindo os órgãos linfoides centrais e periféricos. Se elas encontram um micro-organismo invasor, elas endocitam o patógeno ou seus produtos. Se o encontro ocorre fora dos órgãos linfoides, as células dendríticas levam o antígeno estranho pela linfa para os linfonodos locais ou para os órgãos linfoides associados ao intestino. O encontro com o patógeno ativa os receptores de reconhecimento de padrões das células dendríticas e faz com que a célula dendrítica torne-se madura, deixando de ser uma célula com capacidade de capturar antígenos e passando a ser uma célula apresentadora de antígeno com capacidade de ativar células T (ver Figura 25-5). As células dendríticas devem ser ativadas para ativarem as células T virgens, podendo também ser ativadas por um dano ao tecido ou por células T auxiliares efetoras. Acredita-se que o dano aos tecidos ative as células dendríticas pela liberação de proteínas de choque térmico e de cristais de ácido úrico quando as células morrem por necrose ao invés de apoptose (discutido no Capítulo 18).

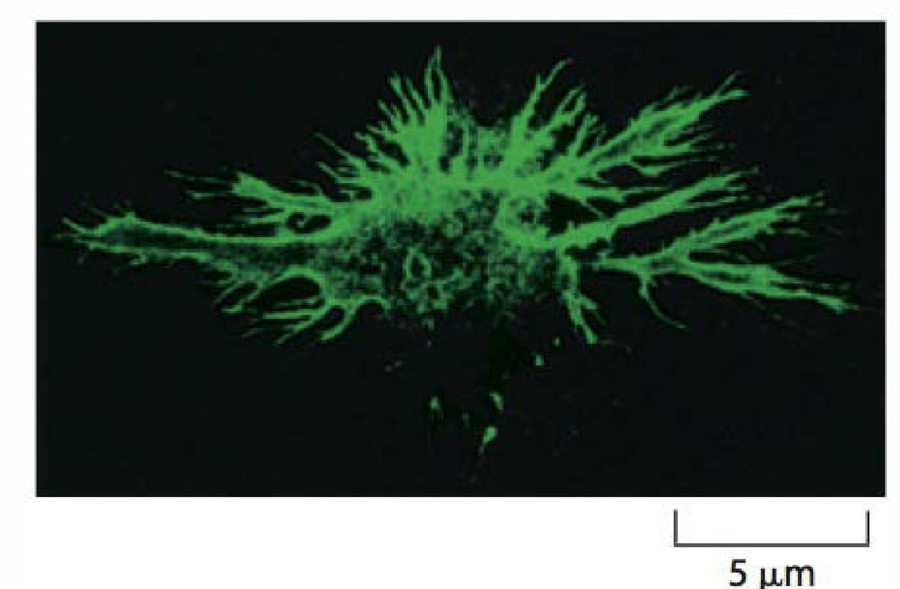


Figura 25-44 Micrografia de imunofluorescência de uma célula dendrítica em cultura. Esta célula apresentadora de antígeno deriva seu nome de seus longos apêndices, ou "dendritos". Esta célula foi marcada com um anticorpo monoclonal que reconhece antígenos de superfície nessas células. (Cortesia de David Katz.)

As células dendríticas ativadas apresentam três tipos de moléculas proteicas em suas superfícies que têm um papel na ativação das células T, para tornarem-se células efetoras ou células de memória (**Figura 25-45**): (1) as *proteínas do MHC*, que apresentam antígenos estranhos ao TCR, (2) as *proteínas coestimuladoras*, que se ligam a receptores complementares na superfície da célula T, e (3) as *moléculas de adesão célula-célula*, que possibilitam à célula T ligar-se à célula apresentadora de antígeno pelo tempo suficiente para ser ativada, o que normalmente leva horas. Além disso, as células dendríticas secretam várias citocinas que podem influenciar o tipo de células T auxiliares efetoras a ser desenvolvido (discutido mais adiante), bem como para onde elas irão migrar após serem estimuladas. As células T ativadas pelas células dendríticas isoladas das placas de Peyer associadas ao intestino (ver Figura 25-3), por exemplo, mas não por aquelas isoladas dos órgãos linfoides, migram para o intestino delgado, onde seus antígenos provavelmente estarão localizados.

As células dendríticas não-ativadas também têm papel importante. Elas auxiliam a indução de células T autorreativas para tornarem-se tolerantes, tanto no timo quanto nos outros órgãos. Tais células dendríticas apresentam autoantígenos na ausência de moléculas coestimuladoras necessárias para a ativação das células T virgens. Elas induzem tolerância de duas

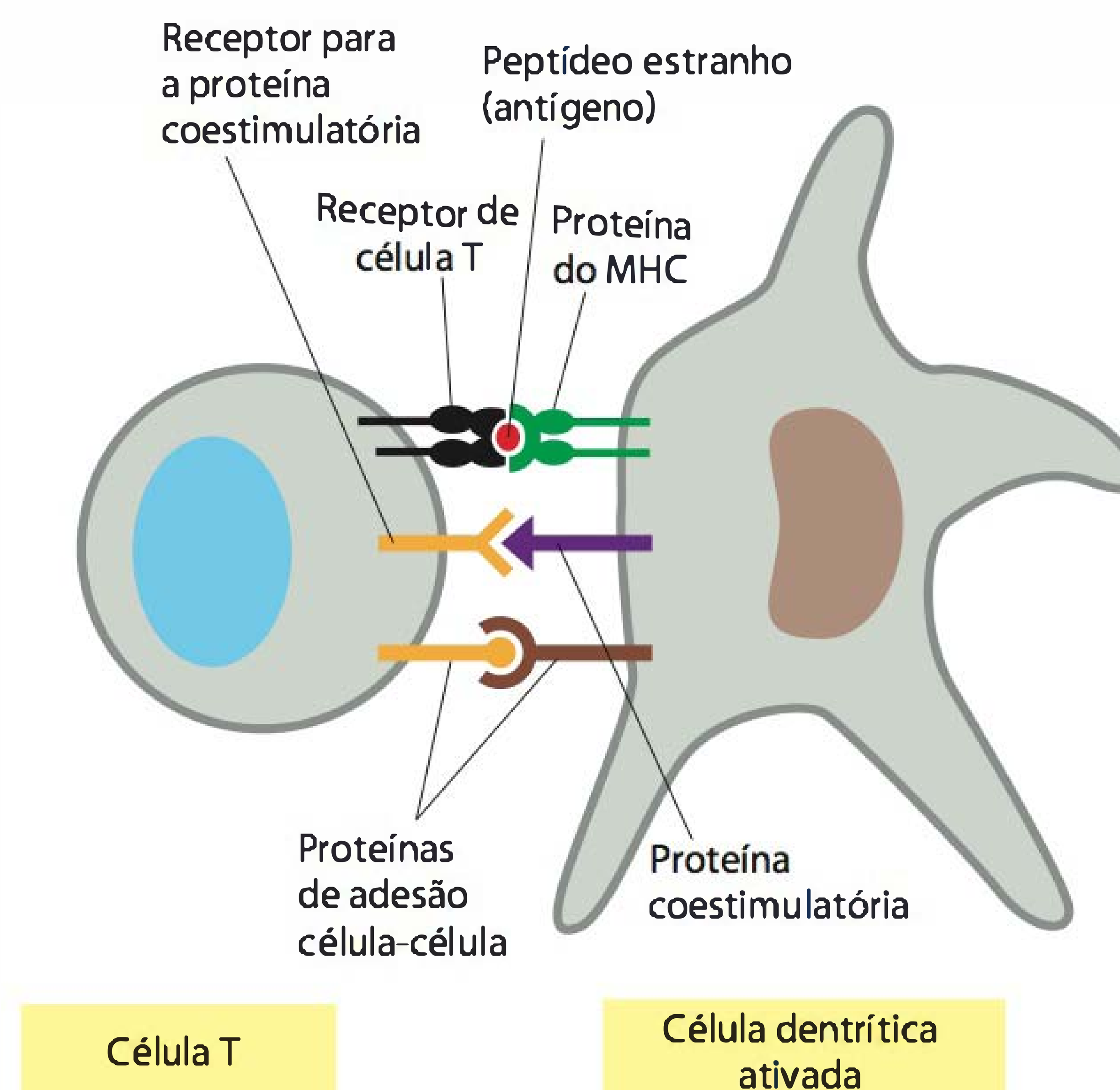


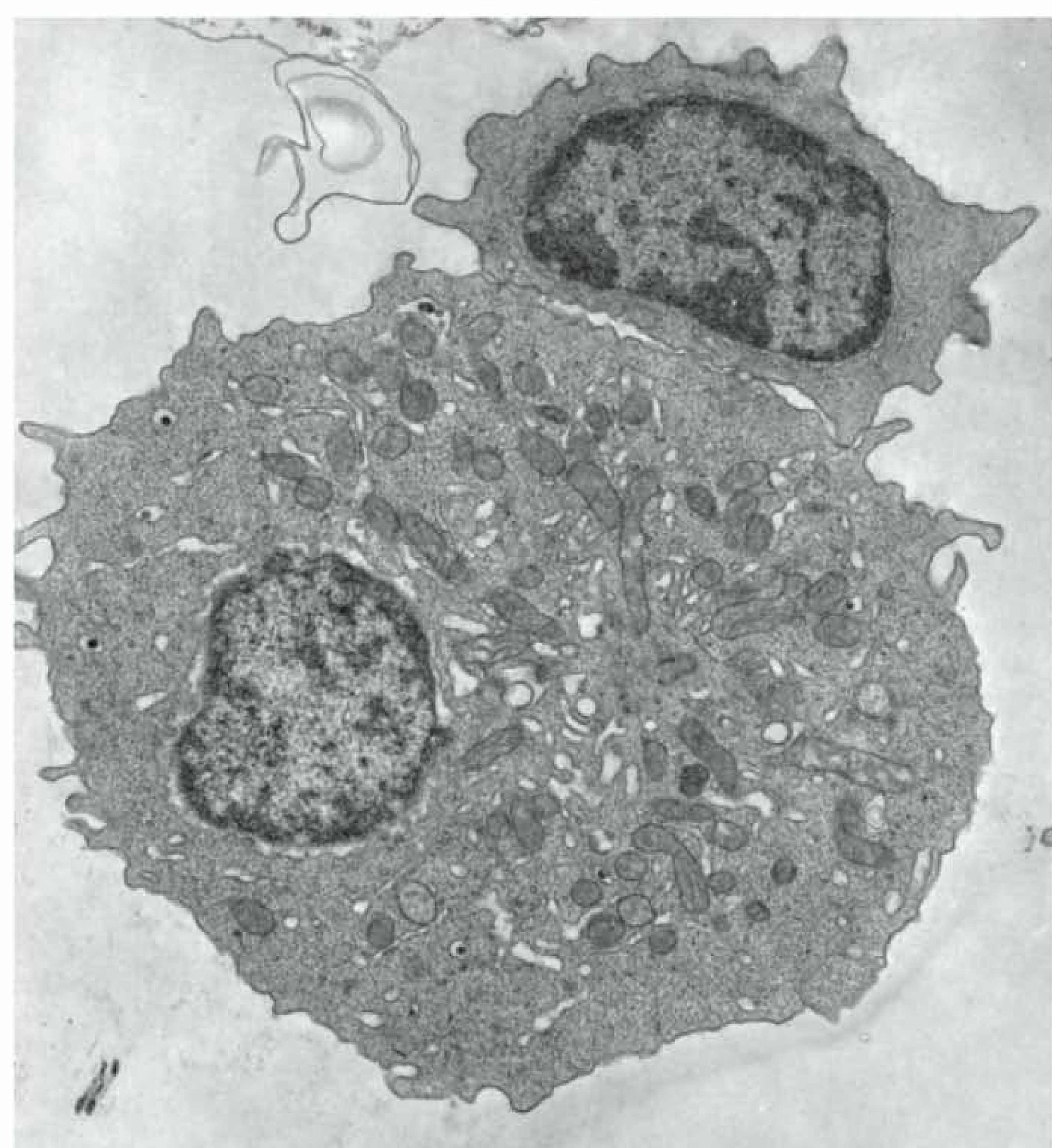
Figura 25-45 Três tipos de proteínas encontradas na superfície de uma célula dendrítica ativada envolvida na ativação de uma célula T. A cadeia polipeptídica invariável que sempre está estavelmente associada ao receptor de célula T (TCR) não está representada.

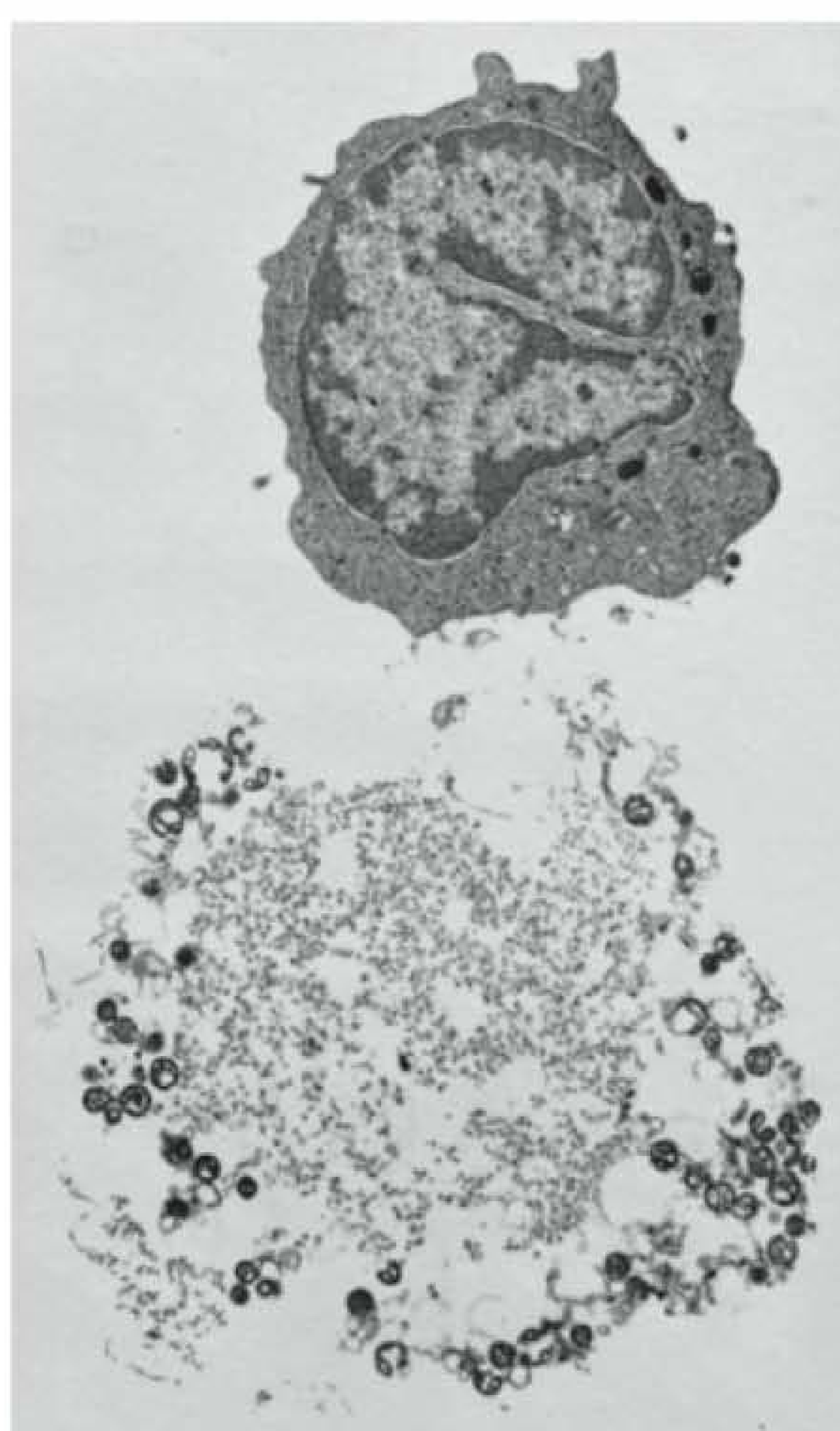
maneiras: elas podem estimular respostas abortivas nas células T que levam à inativação ou à apoptose, e podem ativar células T reguladoras a suprimir a atividade de outras células T.

As células T citotóxicas efetoras induzem a morte das células-alvo

As **células T citotóxicas** protegem os vertebrados contra patógenos intracelulares como os vírus, algumas bactérias e parasitas que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira, onde se encontram protegidos dos ataques dos anticorpos. As células T citotóxicas conferem essa proteção induzindo a morte da célula infectada antes que os micróbios possam proliferar, escapar e infectar células vizinhas. Como discutiremos posteriormente, os micróbios intracelulares podem ser reconhecidos pelas células T porque as células dos vertebrados possuem mecanismos para a apresentação de fragmentos de suas proteínas intracelulares na superfície celular, onde estão ligadas às proteínas do MHC.

Uma vez ativada por uma célula apresentadora de antígeno infectada, uma célula T citotóxica torna-se uma célula efetora, que pode matar qualquer célula-alvo infectada com o mesmo patógeno. Usando seu TCR, a célula T citotóxica efetora reconhece o antígeno microbiano ligado a uma proteína do MHC na superfície da célula-alvo infectada. Isso faz com que a célula T reorganize seu citoesqueleto e focalize seu aparelho secretor de morte diretamente no alvo (**Figura 25-46**). O alvo é atingido quando os TCRs agregam-se ativamente





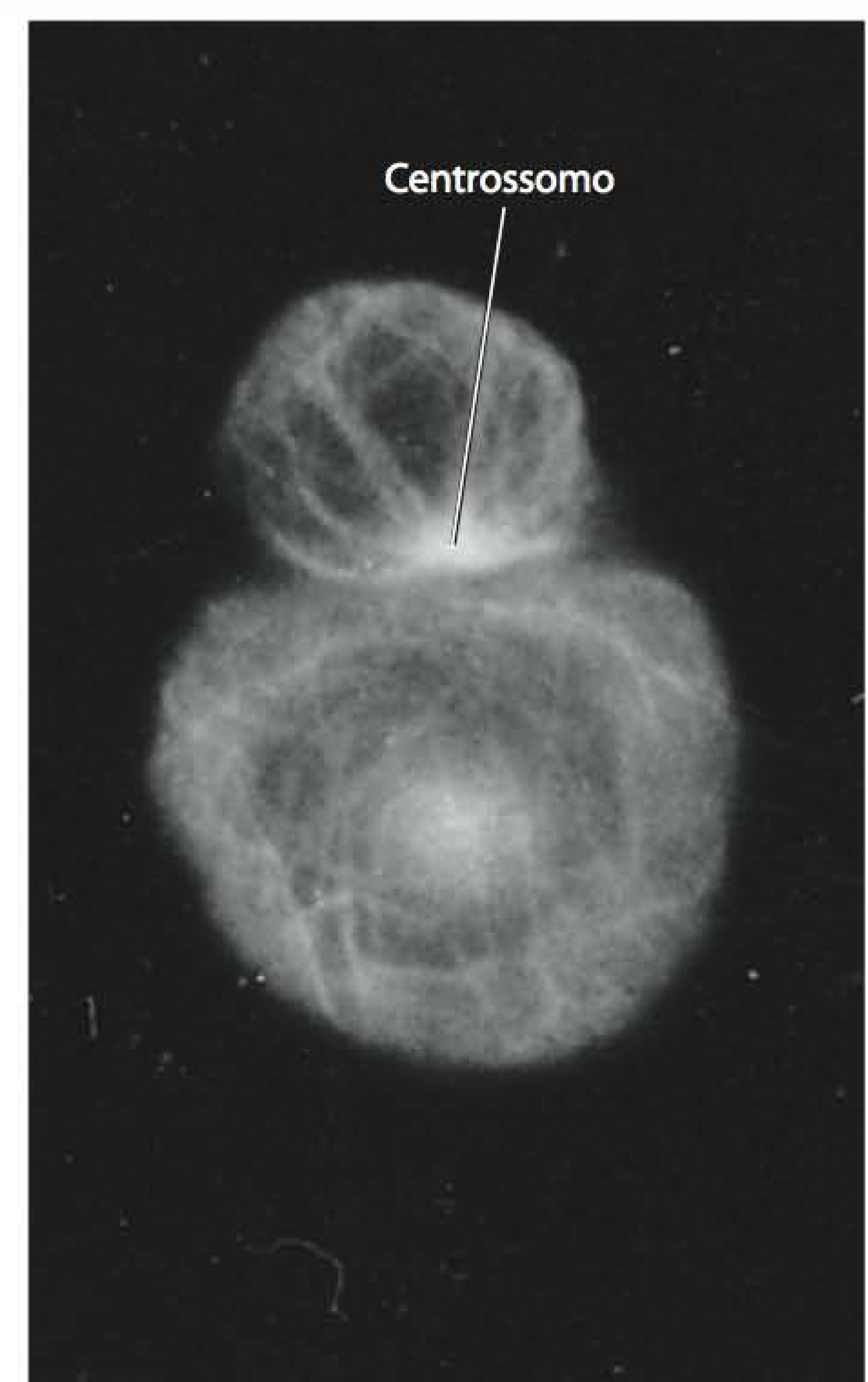


Figura 25-46 Células T citotóxicas efetoras matando uma célula-alvo em cultura. (A) Micrografia eletrônica mostrando uma célula T citotóxica efetora ligada à célula-alvo. As células T citotóxicas foram obtidas de camundongos imunizados com células-alvo, que são células de um tumor estranho. (B) Eletromicrografia eletrônica mostrando uma célula T citotóxica e uma célula tumoral, que foi morta pela célula T. Em um animal, diferentemente do que ocorre em cultura, a célula-alvo morta pode ser fagocitada por células vizinhas mesmo após ter se desintegrado, como na forma vista aqui. (C) Micrografia de imunofluorescência de uma célula T e de uma célula tumoral após a marcação com anticorpos antitubulina. Repare que os centrossomos da célula T encontram-se orientados em direção ao ponto de contato célula-célula com a célula-alvo, uma sinapse imunológica. Os grânulos secretores (não-visíveis) das células T são inicialmente transportados junto aos microtúbulos para o centrossomo, o qual então move-se para a sinapse imunológica, levando os grânulos onde eles podem liberar seu conteúdo. Ver também Figura 16-103. (A e B, de D. Zagury et al., *Eur. J. Immunol.* 5:818-822, 1975. Com permissão de John Wiley & Sons, Inc. C, reproduzida de B. Geiger, D. Rosen e G. Berke, *J. Cell Biol.* 95:137-143, 1982. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

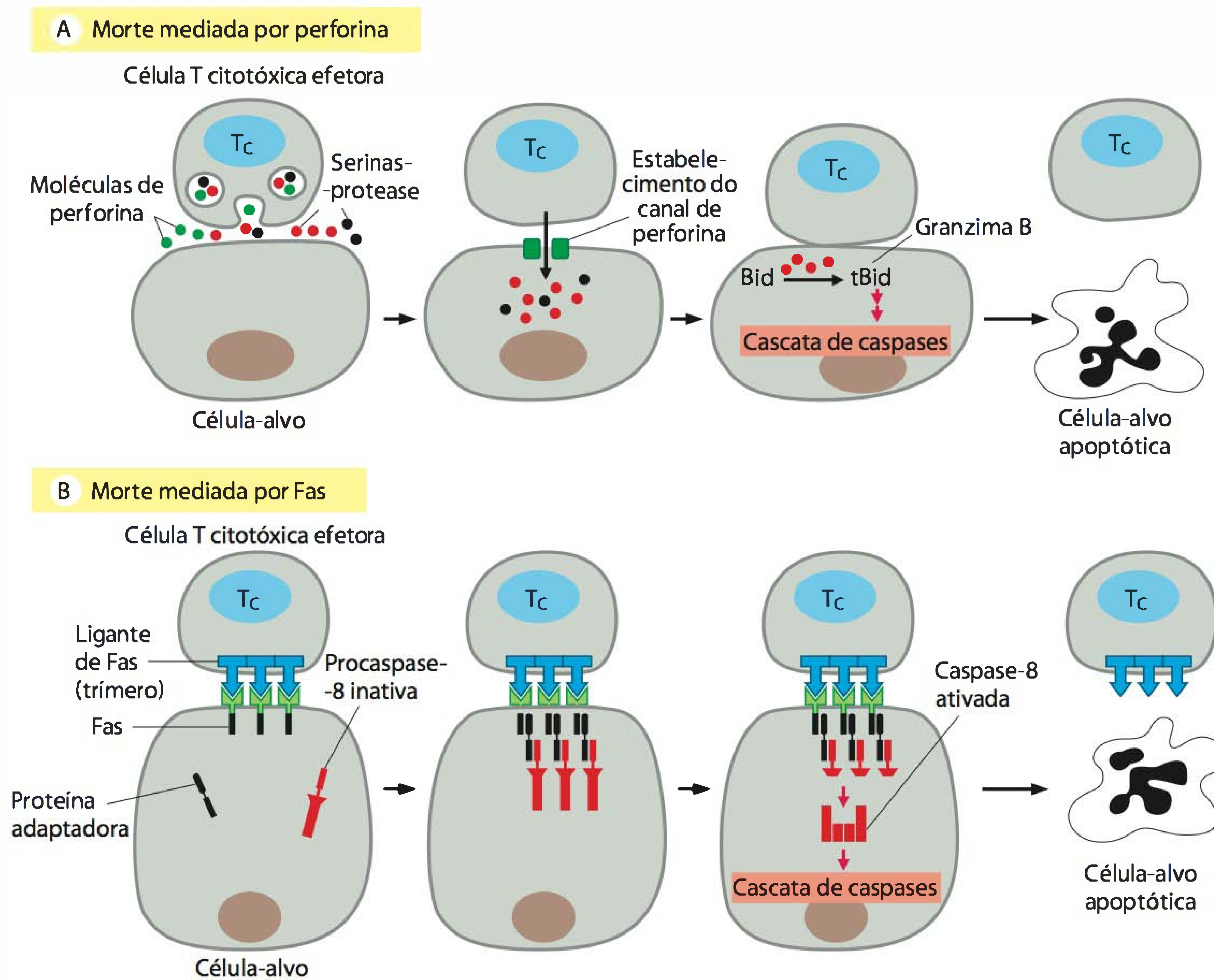


Figura 25-47 Duas estratégias pelas quais as células T citotóxicas efetoras matam suas células-alvo. Nos dois casos, a célula T deve fazer contato com a célula-alvo para matá-la, e uma única célula T citotóxica pode matar várias células-alvo em sequência. (A) A célula T citotóxica (Tc) libera perforina e enzimas proteolíticas na superfície da célula-alvo infectada por exocitose localizada. As altas concentrações de Ca^{2+} nos fluidos extracelulares facilita a localização da perforina em canais transmembrana na membrana plasmática da célula-alvo. Os canais permitem que as enzimas proteolíticas entrem para o citosol da célula-alvo. Uma destas enzimas, a granzima B, cliva a proteína Bid para produzir a forma truncada tBid, a qual libera o citocromo *c* da mitocôndria, iniciando a cascata de caspases e levando à apoptose. (B) O ligante de Fas homotrimérico na superfície da célula T citotóxica liga-se e ativa a proteína Fas na superfície da célula-alvo. A cauda citosólica de Fas contém um *domínio de morte* que, quando ativado, liga-se a uma proteína adaptadora que, por sua vez, recruta uma pró-caspase específica (a *pró-caspase-B*). As moléculas de pró-caspase-8 agrupadas tornam-se ativadas e iniciam a cascata proteolítica das caspases, levando à apoptose (ver Figura 18-6).

com vários correceptores, moléculas de adesão e proteínas sinalizadoras na interface entre a célula T e a célula-alvo, formando a *sinapse imunológica*. Uma sinapse similar é formada quando uma célula T auxiliar efetora interage com sua célula-alvo. Desse modo, as células T efetoras evitam a emissão de sinais às células vizinhas.

Uma vez ligada à sua célula-alvo, a célula T citotóxica efetora pode empregar, pelo menos, duas estratégias para matar a célula-alvo; em ambos os casos, a célula T age induzindo a célula-alvo a morrer por apoptose (discutido no Capítulo 18). Ao matar uma célula-alvo infectada, a célula T citotóxica em geral libera uma proteína formadora de poros denominada **perforina**, que é homóloga ao componente C9 do complemento (ver Figura 24-49). A perforina é armazenada nas vesículas secretoras das células T citotóxicas e é liberada por exocitose local no ponto de contato com a célula-alvo. A perforina polimeriza-se na membrana plasmática da célula-alvo para formar canais transmembrana. As vesículas secretoras também contêm serina-proteases que, aparentemente, penetram o citosol da célula-alvo através dos canais de perforina. Uma das proteases, denominada *granzima B*, ativa uma proteína Bcl2 pró-apoptótica denominada *Bid*, produzindo uma forma truncada da proteína denominada *tBid*. A tBid então libera o citocromo *c* da mitocôndria, ativando a cascata proteolítica de caspases que mata a célula por apoptose (discutido no Capítulo 18) (**Figura 25-47**A). Os camundongos com o gene da perforina inativado não podem gerar células T citotóxicas específicas para patógenos e apresentam um aumento na suscetibilidade a certas infecções causadas por vírus e por bactérias intracelulares.

Na segunda estratégia de morte, a célula T citotóxica também ativa a cascata de caspases indutora de morte na célula-alvo, mas não tão diretamente. Uma proteína homotrimérica presente na superfície da célula T citotóxica denominada **ligante de Fas** liga-se a proteínas receptoras transmembrana na célula-alvo denominadas **Fas**. A ligação provoca uma alteração nas proteínas Fas, e a agregação de suas caudas citosólicas recruta procaspase-8 para o complexo por meio de uma proteína adaptadora. As moléculas de procaspase-8 recrutadas tornam-se ativadas e iniciam a cascata de caspases que leva à apoptose (Figura 25-47B).

As células T auxiliares efetoras ajudam na ativação de outras células dos sistemas imunes inato e adaptativo

Ao contrário das células T citotóxicas, as **células T auxiliares** são fundamentais para a defesa contra patógenos, tanto extracelulares como intracelulares. Elas ajudam a estimular as células B a produzirem anticorpos que auxiliam a inativação ou a eliminação de patógenos

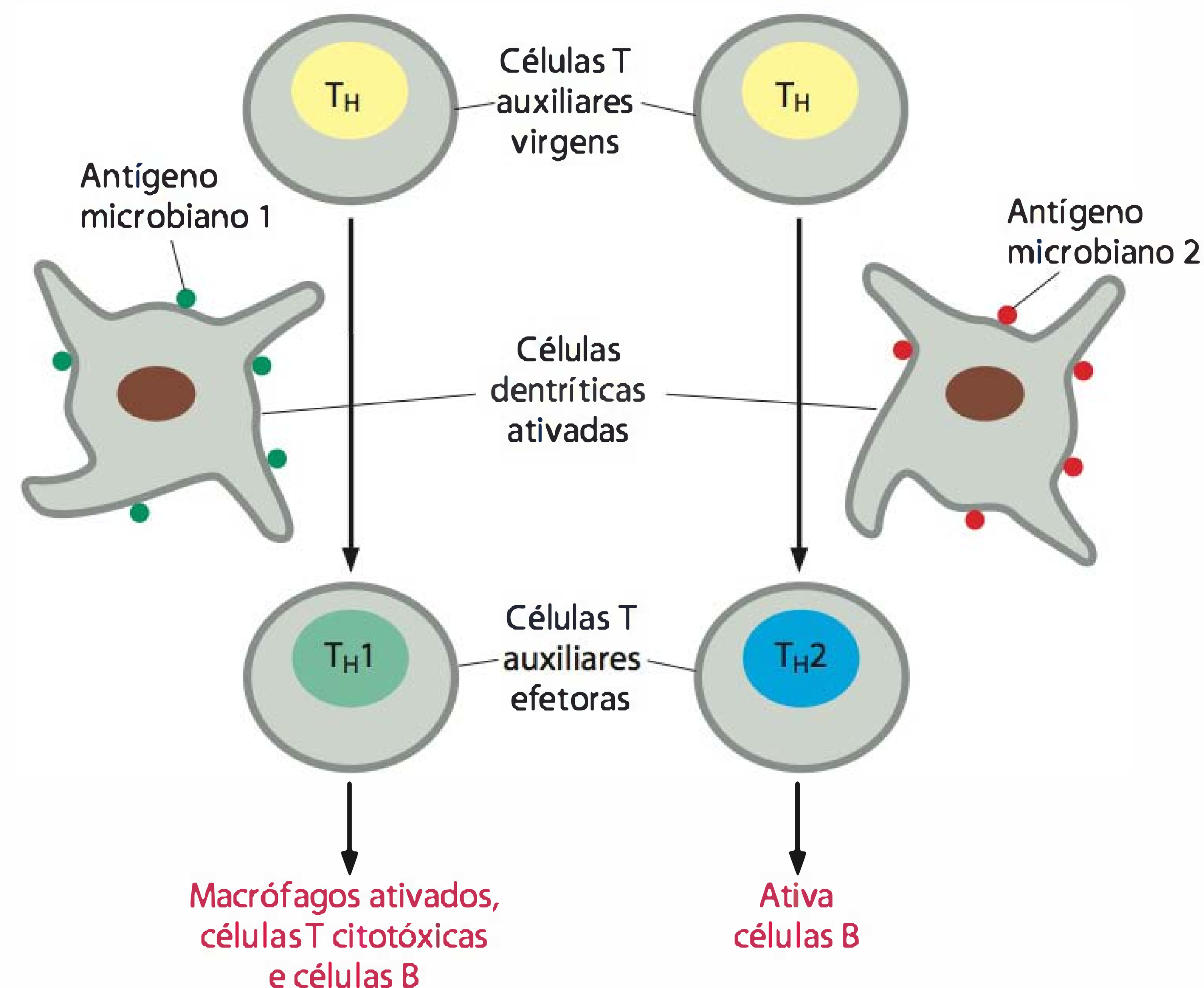


Figura 25-48 Diferenciação de células T auxiliares virgens em células auxiliares efetoras T_H1 ou T_H2 nos órgãos linfoides periféricos. A natureza da célula dendrítica e as características do patógeno que a ativou são os principais fatores que determinam que tipo de célula T auxiliar efetora irá se desenvolver.

extracelulares e seus produtos tóxicos. As células T auxiliares também ativam os macrófagos para destruir qualquer patógeno intracelular que esteja se multiplicando no interior de seus fagossomos, e auxiliam a ativar as células T citotóxicas para matar as células-alvo infectadas. Elas também podem estimular as células dendríticas a manter um estado ativado.

Quando uma célula T auxiliar é ativada por uma célula apresentadora de antígeno, torna-se uma célula efetora e pode, então, auxiliar a ativar outras células. Essa função é realizada tanto pela secreção de várias citocinas como pela expressão de proteínas coestimuladoras em sua superfície. Quando ativada por sua ligação a um antígeno em uma célula dendrítica, uma célula T auxiliar virgem pode diferenciar-se em um de dois tipos distintos de células auxiliares efetoras, denominadas T_H1 e T_H2. As *células T_H1* estão, principalmente, envolvidas na imunidade contra patógenos intracelulares e auxiliam na ativação de macrófagos, células T citotóxicas e células B. As *células T_H2* estão envolvidas, principalmente, na imunidade contra patógenos extracelulares, como parasitas multicelulares, e auxiliam as células B na produção de anticorpos contra o patógeno (**Figura 25-48**). Conforme discutido anteriormente, a natureza do patógeno invasor e os tipos de respostas imunes inatas envolvidos interferem no tipo de resposta que as células T auxiliares irão desenvolver. Estas, por sua vez, determinam a natureza das respostas imunes adaptativas que serão mobilizadas para combater os invasores.

Em alguns casos, as células T auxiliares virgens que encontram seu antígeno nos órgãos linfoides periféricos se desenvolvem em células efetoras que suprimem ao invés de auxiliar na resposta imune. Tais *células T reguladoras*, entretanto, desenvolvem-se, em sua maioria, no timo, como uma classe distinta de célula T, discutido a seguir.

As células T reguladoras suprimem a atividade de outras células T

As **células T reguladoras** são difíceis de estudar e caracterizar, principalmente porque, até recentemente, não existiam bons marcadores para identificá-las. Na verdade, por muitos anos os imunologistas questionaram se tais células realmente existiam. Elas foram originalmente identificadas por sua capacidade de inibir a atividade de outros linfócitos, sendo, portanto, denominadas *células T supressoras*. Quando os marcadores tornaram-se disponíveis, elas passaram a ser denominadas *células T reguladoras* e mostraram-se capazes de inibir a atividade de células T citotóxicas e auxiliares efetoras, assim como de células dendríticas. Embora sejam menos de 10% das células T da circulação sanguínea e dos órgãos linfoides periféricos, as células T reguladoras desempenham um papel fundamental na autotolerância imune inibindo a atividade das células T citotóxicas e auxiliares efetoras autorreativas. Elas também auxiliam na prevenção da resposta excessiva das células T aos antígenos microbianos nas infecções crônicas. Nos dois casos, elas auxiliam na prevenção do dano aos tecidos pela resposta imune adaptativa.

Uma importante descoberta para o entendimento das células T reguladoras foi que somente elas expressam o fator de transcrição *Foxp3*, o qual atua como um marcador único dessas células e é o controlador-chefe de seu desenvolvimento. Por exemplo, quando o gene que codifica esta proteína está inativado, em camundongos e no homem, os indivíduos não produzem unicamente as células T reguladoras e desenvolvem uma doença autoimune pre-

coce e fatal, envolvendo múltiplos órgãos. Ainda não se sabe ao certo como as células T reguladoras impedem a ação das células T efetoras ou das células dendríticas, mas acredita-se que uma das vias envolva a secreção de citocinas inibidoras *TGFβ* e *interleucina 10* (*IL10*).

As células T reconhecem peptídeos estranhos ligados às proteínas do MHC

Conforme discutido anteriormente, tanto as células T citotóxicas como as células T auxiliares são inicialmente ativadas nos órgãos linfoides periféricos pelo reconhecimento de antígenos estranhos na superfície de uma célula apresentadora de antígeno, geralmente uma célula dendrítica, no caso de uma célula T virgem. Os antígenos encontram-se na forma de fragmentos peptídicos gerados pela degradação de antígenos proteicos estranhos que se encontram no interior da célula apresentadora de antígeno. O processo de reconhecimento depende da presença de **proteínas do MHC** na célula apresentadora de antígeno. Estes fragmentos são ligados, transportados para a superfície celular e apresentados no meio extracelular, juntamente com sinais coestimuladores, para as células T. Uma vez ativada, a célula T efetora reconhece o mesmo complexo peptídeo:MHC na superfície da célula-alvo que a ativou. No caso de uma célula T auxiliar, pode ser uma célula B, uma célula T citotóxica, ou um macrófago infectado. No caso de uma célula T citotóxica pode ser qualquer célula hospedeira infectada por vírus e, no caso de uma célula T auxiliar, pode ser também a própria célula dendrítica.

As proteínas do MHC são codificadas por um extenso complexo de genes denominado **complexo de histocompatibilidade principal** (**MHC**, *major histocompatibility complex*). Existem duas classes principais de proteínas do MHC com estrutura e função distintas: as *proteínas do MHC de classe I*, que apresentam peptídeos estranhos para as células T citotóxicas, e as *proteínas do MHC de classe II*, que apresentam peptídeos estranhos para as células T auxiliares e reguladoras (**Figura 25-49**).

Antes de analisarmos os diferentes mecanismos pelos quais os antígenos proteicos são processados para serem apresentados às células T, precisamos analisar de forma mais detalhada as próprias proteínas do MHC, que desempenham um papel fundamental na função da célula T.

As proteínas do MHC foram descritas nas reações a transplantes antes que suas funções fossem conhecidas

As proteínas do MHC foram inicialmente identificadas como os principais antígenos reconhecidos nas **reações a transplantes**. Quando são transplantados órgãos entre indivíduos adultos, de uma mesma espécie (*alotransplante*) ou entre espécies diferentes (*xenotransplante*), eles em geral são rejeitados. Em torno de 1950, experimentos com enxertos de pele entre linhagens diferentes de camundongos demonstraram que a *rejeição aos enxertos* é um mecanismo de resposta imune adaptativa contra os antígenos estranhos presentes na superfície das células transplantadas. A rejeição é mediada principalmente por células T, que reagem contra versões de proteínas de superfície celular geneticamente estranhas denominadas *moléculas de histocompatibilidade* (do grego, *histos* = tecido). As proteínas do MHC codificadas por genes agrupados no complexo de histocompatibilidade principal (MHC) provavelmente sejam as mais importantes dentre elas. As proteínas do MHC são expressas nas células de todos os vertebrados superiores. Elas foram inicialmente descritas em camundongos, onde foram chamadas de *antígenos H-2* (antígenos de histocompatibilidade-2). No

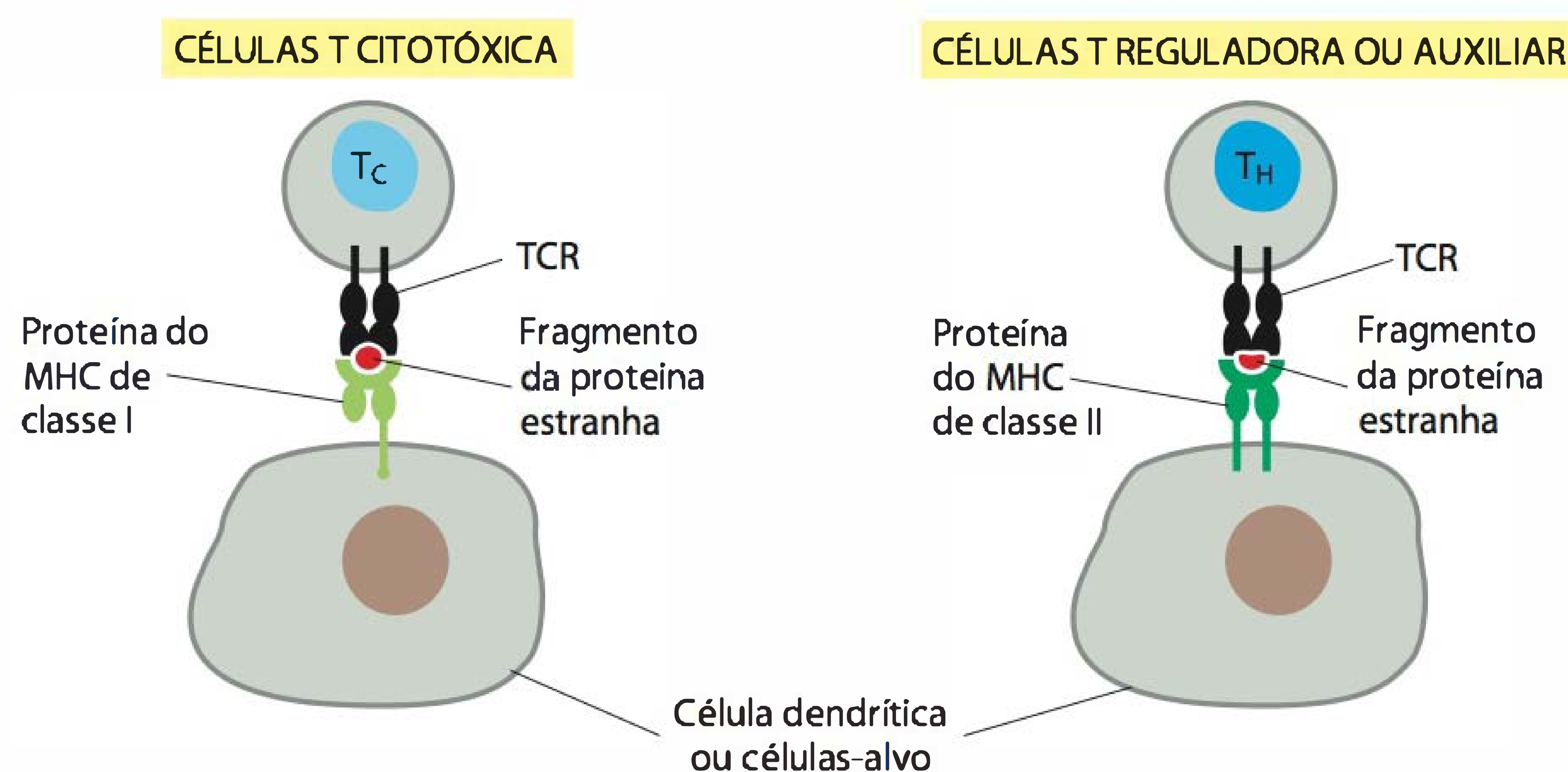


Figura 25-49 O reconhecimento de peptídeos estranhos associados às proteínas do MHC pelas células T. As células T citotóxicas reconhecem os peptídeos estranhos em associação com proteínas do MHC de classe I, enquanto que as células T auxiliares e as células T reguladoras reconhecem os peptídeos estranhos em associação com proteínas do MHC de classe II. Em ambos os casos, as células T reconhecem os complexos peptídeo-MHC na superfície de uma célula dendrítica ou em uma célula-alvo.

homem, são denominadas *antígenos HLA* (de *human-leucocyte-associated antigens*) antígenos associados a leucócitos humanos porque foram inicialmente identificadas nos leucócitos (células brancas do sangue).

Três características marcantes das proteínas do MHC intrigaram os imunologistas por muitos anos. Primeiro, essas proteínas do MHC sobressaem-se como os antígenos preferencialmente reconhecidos nas reações de rejeição de transplantes mediadas por células T. Segundo, uma grande fração de células T é capaz de reconhecer proteínas do MHC estranhas, enquanto menos de 0,001% das células T virgens de um indivíduo responde a um antígeno viral típico e até 10% delas respondem a proteínas do MHC estranhas de outro indivíduo. Em terceiro lugar, alguns dos genes que codificam para as proteínas do MHC são os mais *polimórficos* já identificados em vertebrados superiores. Isto é, em uma mesma espécie, existe um número extraordinariamente grande de *alelos* (formas alternativas do mesmo gene) presentes (em alguns casos, mais de 400), sem que haja predominância de qualquer um deles. Como cada indivíduo possui, pelo menos, 12 genes que codificam para as proteínas do MHC (descrito a seguir), é muito raro que dois indivíduos não-relacionados apresentem um conjunto idêntico de proteínas do MHC. Essa grande diferença torna muito difícil a compatibilidade entre um doador e um receptor para transplante de órgão, a não ser que ambos tenham um parentesco bastante próximo.

É claro que um vertebrado não precisa proteger-se contra células invasoras estranhas de vertebrados. Assim, a aparente obsessão das células T contra proteínas estranhas do MHC e o alto polimorfismo destas moléculas constituiam-se em um grande enigma. O enigma foi parcialmente desvendado somente quando pesquisadores descobriram que (1) as proteínas do MHC ligam-se a fragmentos de proteínas estranhas e os apresentam nas superfícies das células hospedeiras para serem reconhecidos pelas células T e (2) as células T respondem a proteínas do MHC estranhas da mesma maneira que respondem às suas próprias proteínas do MHC que apresentem antígenos estranhos associados a elas.

As proteínas do MHC de classe I e de classe II são heterodímeros estruturalmente similares

As proteínas do MHC de classe I e de classe II apresentam uma estrutura geral muito semelhante. Ambas são heterodímeros transmembrana com domínios N-terminais extracelulares que se ligam aos antígenos para apresentá-los às células T.

As **proteínas do MHC de classe I** são constituídas por uma cadeia α transmembrana, que é codificada por genes do MHC de classe I, e uma pequena proteína extracelular denominada *β_2-microglobulina* (**Figura 25-50**A). A β_2-microglobulina não atravessa a membrana

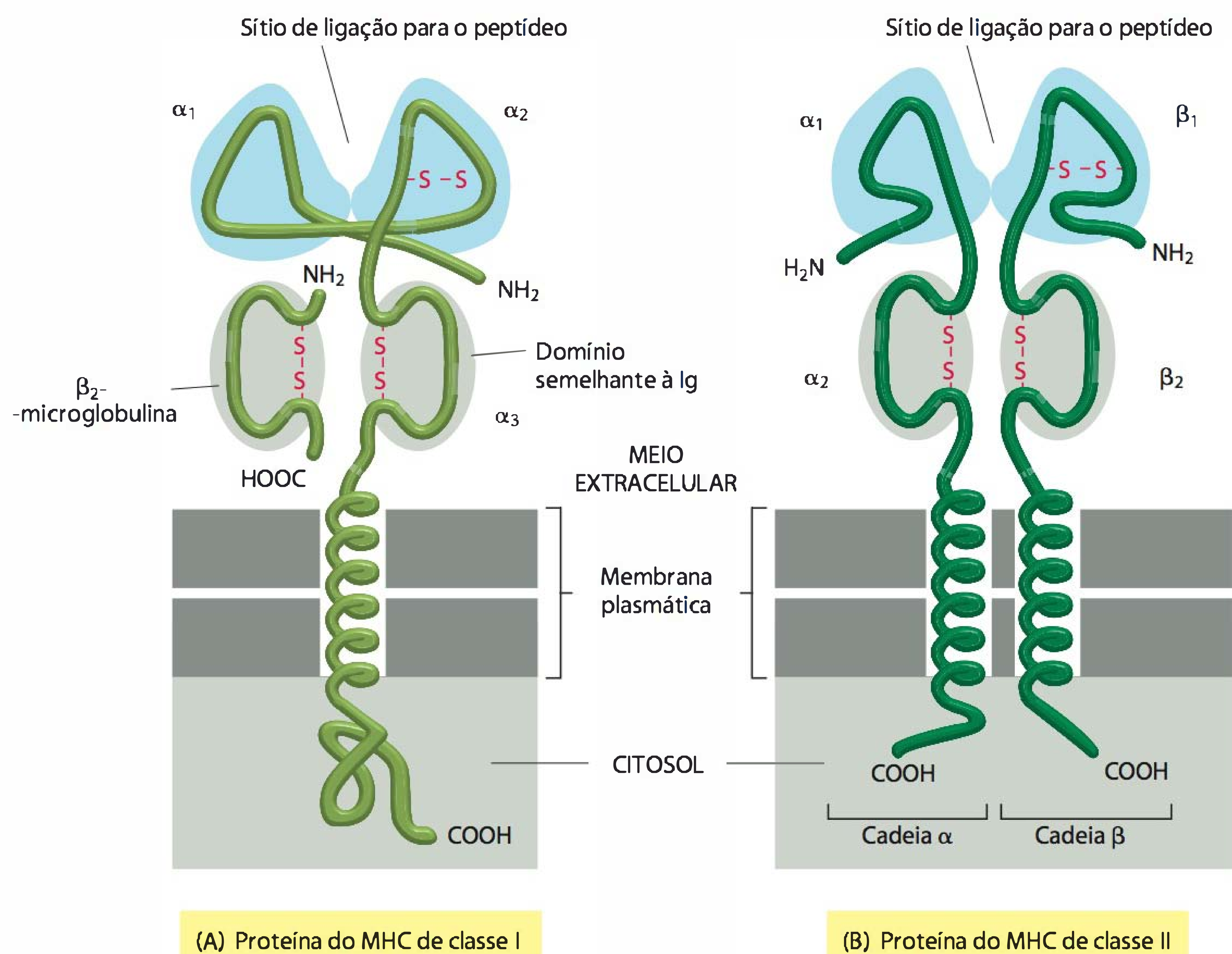


Figura 25-50 Proteínas do MHC de classe I e classe II. (A) As cadeias α de uma molécula de classe I possuem três domínios extracelulares, α_1, α_2 e α_3, que são codificados por éxons separados. Estes encontram-se associados, de forma não-covalente, a uma pequena cadeia polipeptídica, a β_2-microglobulina, que não é codificada dentro da mesma região do MHC. O domínio α_3 e a β_2-microglobulina são semelhantes às Igs. Enquanto a β_2-microglobulina é invariante, a cadeia α é extremamente polimórfica, principalmente os domínios α_1 e α_2. (B) Nas proteínas do MHC de classe II, ambas as cadeias são polimórficas, principalmente os domínios α_1 e β_1. Os domínios α_2 e β_2 são semelhantes às Igs. Assim, existem surpreendentes similaridades entre as proteínas do MHC de classe I e as de classe II. Em ambos os casos, os domínios externos (marcados em *azul*) são polimórficos e interagem para formar a fenda de ligação dos fragmentos peptídicos das proteínas estranhas, apresentando-as, assim, para as células T.

e é codificada por um gene que não se localiza junto ao agrupamento dos genes do MHC. A cadeia α encontra-se dobrada em três domínios globulares extracelulares (α_1, α_2 e α_3), e o domínio α_3 e a proteína β_2-microglobulina encontram-se próximos à membrana, gerando uma estrutura similar a um domínio de Ig. Os dois domínios N-terminais da cadeia α que se encontram mais afastados da membrana contêm os aminoácidos polimórficos (variáveis) que são reconhecidos pelas células T nas reações aos transplantes. Esses domínios ligam-se a peptídeos e os apresentam às células T citotóxicas.

Assim como as proteínas do MHC de classe I, as **proteínas do MHC de classe II** são heterodímeros com dois domínios semelhantes a Igs conservados, próximos à membrana, e dois domínios N-terminais polimórficos (variáveis) mais distantes da membrana. Nestas proteínas, no entanto, ambas as cadeias (α e β) são codificadas por genes do MHC e ambas inserem-se na membrana (Figura 25-50B). Os dois domínios polimórficos ligam peptídeos e os apresentam para as células T auxiliares ou reguladoras.

A presença de domínios semelhantes a Igs nas proteínas de classe I e de classe II sugere que as proteínas do MHC e os anticorpos apresentam uma origem evolutiva comum. A localização dos genes que codificam para as proteínas do MHC de classe I e de classe II em humanos encontra-se indicada na **Figura 25-51**, onde ilustramos como um indivíduo pode produzir seis tipos de proteínas do MHC de classe I e mais de seis tipos de proteínas do MHC de classe II.

Além da proteína do MHC de classe I clássica, existem várias *proteínas não-clássicas do MHC de classe I* que formam dímeros com a β_2-microglobulina. Estas proteínas são codificadas por genes fora do MHC e são menos polimórficas do que as proteínas do MHC, mas algumas apresentam antígenos microbianos específicos, incluindo alguns lipídeos e glicolipídeos, para as células T. Embora a função da maioria delas ainda seja desconhecida, algumas têm papel fundamental no desenvolvimento cerebral.

Uma proteína do MHC liga-se a um peptídeo e interage com o receptor de célula T

Um indivíduo pode produzir somente pequenas quantidades de proteínas do MHC diferentes que, em conjunto, precisam ser capazes de apresentar fragmentos peptídicos de praticamente todas as proteínas estranhas para as células T. Assim, diferentemente das moléculas de anticorpos, cada proteína do MHC precisa ser capaz de ligar-se a um número muito grande de peptídeos diferentes. As bases estruturais dessa versatilidade surgiram com as análises de difração de raios X das proteínas do MHC.

Conforme ilustrado na **Figura 25-52**A, uma proteína do MHC de classe I possui um único *sítio de ligação ao peptídeo* localizado em uma extremidade da molécula, voltada para o lado oposto da membrana plasmática. Este sítio consiste em uma fenda profunda entre duas hélices α longas. Uma fenda estreita-se em ambas as extremidades e tem, assim, um tamanho apenas suficiente para acomodar um peptídeo linear com 8 a 10 aminoácidos. De fato, quando uma proteína do MHC de classe I foi analisada pela primeira vez, por cristalografia por raios X, esta fenda continha peptídeos associados que foram cristalizados junto com a proteína do MHC (Figura 25-52B), sugerindo que, quando um peptídeo associa-se a esta fenda, ele normalmente não se dissocia.

Um peptídeo típico liga-se à fenda da proteína do MHC de classe I na sua conformação linear, com seu grupo aminoterminal ligado a aminoácidos invariáveis da proteína do MCH em uma das extremidades da fenda, e o seu grupo carboxiterminal ligado a aminoácidos invariáveis na outra extremidade da fenda (**Figura 25-53**). Algumas cadeias laterais de aminoácidos dos peptídeos se ligam a aminoácidos variáveis (polimórficos) da proteína do MHC ao longo da fenda, enquanto outras cadeias laterais apontam para o exterior, de forma que possam ser reconhecidas pelos TCRs das células T citotóxicas. Como os aminoácidos invariáveis da proteína do MHC das extremidades da fenda reconhecem as características da estrutura do peptídeo que são comuns a todos os peptídeos, cada forma alélica de uma proteína do

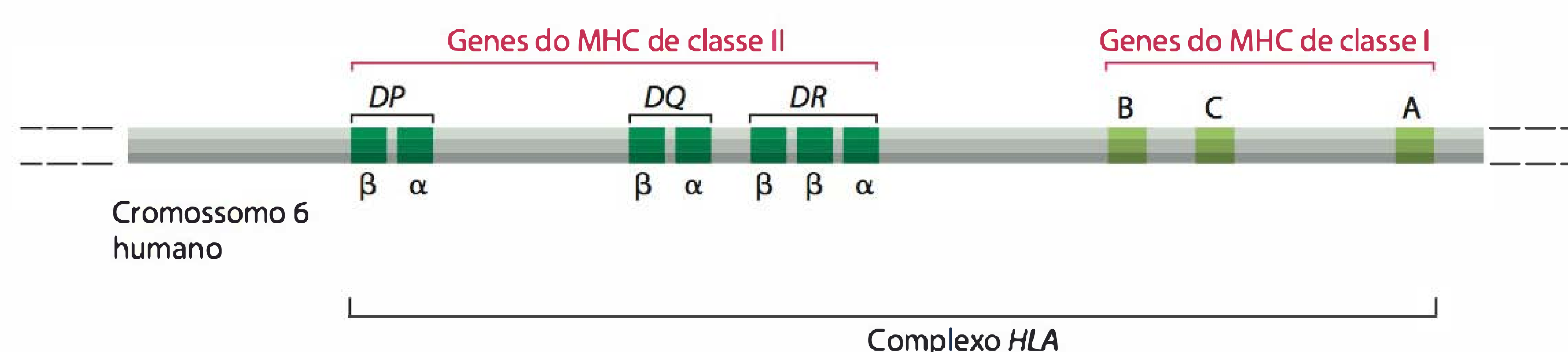


Figura 25-51 Os genes do MHC humano. Este desenho esquemático simplificado representa a localização dos genes que codificam as subunidades transmembrana das proteínas do MHC de classe I (*verde-claro*) e de classe II (*verde-escuro*). Os genes mostrados codificam três tipos de proteínas de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e três tipos de proteínas do MHC de classe II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR). Cada indivíduo pode produzir seis tipos de proteínas do MHC de classe I (três codificadas pelos genes maternos e três codificadas pelos genes paternos) e mais de seis tipos de proteínas do MHC de classe II pois existem dois genes DRβ e as cadeias polipeptídicas codificadas pelos genes materno ou paterno podem, às vezes, parear.

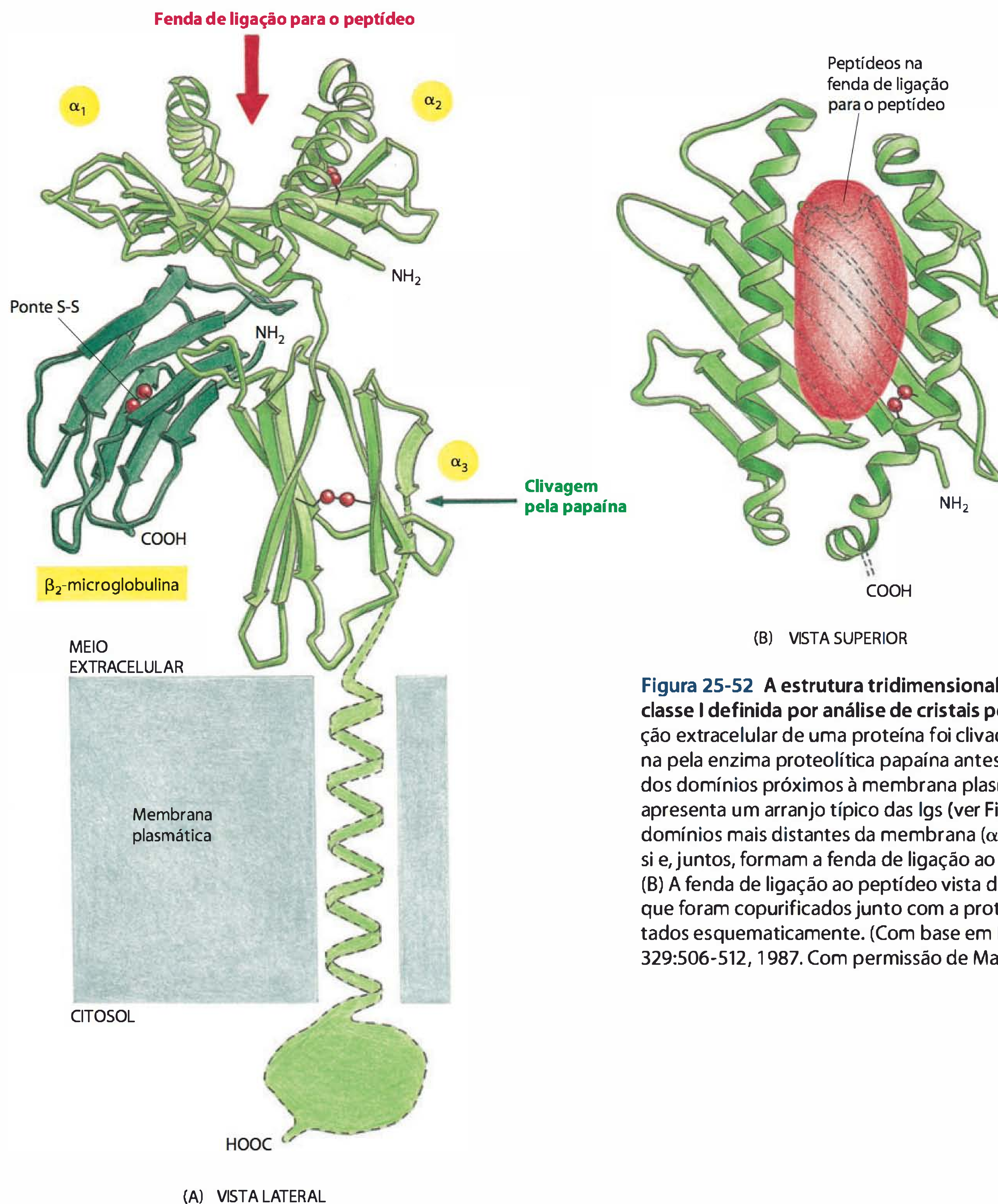


Figura 25-52 A estrutura tridimensional de uma proteína do MHC de classe I definida por análise de cristais por difração de raios X. A porção extracelular de uma proteína foi clivada do segmento transmembrana pela enzima proteolítica papaína antes da cristalização. (A) Cada um dos domínios próximos à membrana plasmática (α_3 e β_2-microglobulina) apresenta um arranjo típico das Igs (ver Figura 25-34), enquanto os dois domínios mais distantes da membrana (α_1 e α_2) são muito similares entre si e, juntos, formam a fenda de ligação ao peptídeo no topo da molécula. (B) A fenda de ligação ao peptídeo vista de cima. Os pequenos peptídeos que foram copurificados junto com a proteína do MHC são representados esquematicamente. (Com base em P. J. Bjorkman et al., *Nature* 329:506-512, 1987. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

MHC de classe I pode ligar uma grande variedade de peptídeos com diversas sequências. Ao mesmo tempo, os aminoácidos polimórficos do MHC ao longo da fenda, que se ligam às cadeias laterais específicas do peptídeo, garantem que cada forma alélica se ligue e apresente um grupo de peptídeos com características distintas. Assim, os seis tipos de proteínas do MHC de classe I em um indivíduo podem apresentar vários tipos de peptídeos estranhos para as células T citotóxicas, mas em cada indivíduo eles o fazem de forma ligeiramente diferente.

As proteínas do MHC de classe II possuem uma estrutura tridimensional muito similar à estrutura das proteínas do MHC de classe I, mas suas fendas de ligação ao antígeno não se estreitam nas extremidades e, assim, elas podem acomodar peptídeos lineares maiores, que geralmente possuem de 12 a 20 aminoácidos. Além disso, o peptídeo não se encontra ligado às extremidades da fenda, mas são mantidos por interações com os aminoácidos invariáveis da proteína do MHC dispostos ao longo de toda a fenda (**Figura 25-54**). Como no caso das proteínas do MHC de classe I, as cadeias laterais dos outros aminoácidos do peptídeo se ligam aos aminoácidos polimórficos da proteína do MHC ao longo da fenda, ou apontam para o exterior para serem reconhecidas pelos TCRs das células T auxiliares ou reguladoras. As fendas de ligação das moléculas do MHC de classe II podem interagir com um grupo de peptídeos mais heterogêneo do que as fendas das moléculas do MHC de classe I. Assim, apesar de um indivíduo produzir somente um pequeno número de tipos diferentes de proteínas de classe II, cada tipo com sua respectiva fenda de ligação ao peptídeo, juntas essas

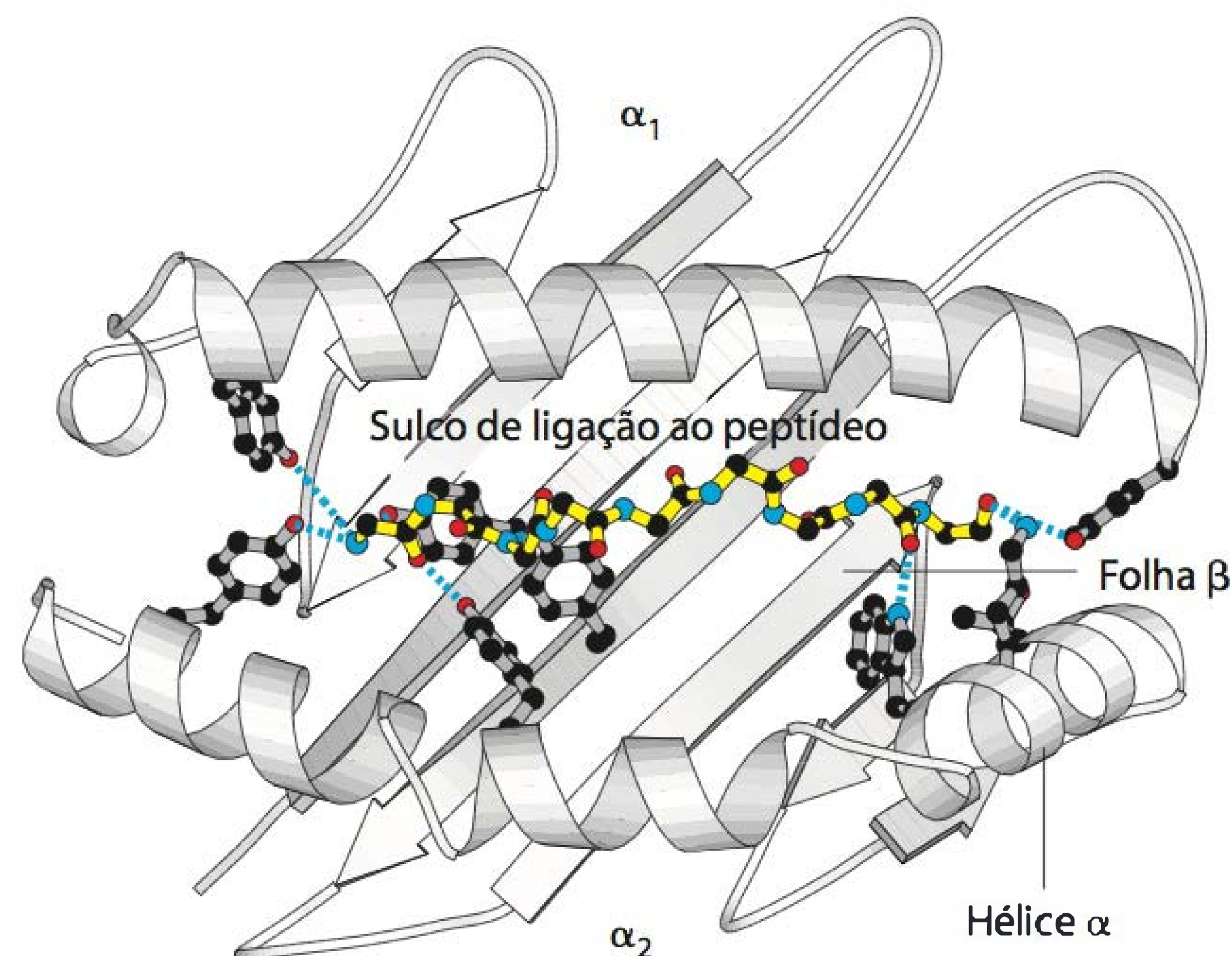


Figura 25-53 Um peptídeo ligado à fenda da proteína do MHC de classe I. Representação esquemática da vista superior da fenda. O diagrama de fitas da fenda do MHC é apresentado em *cinza*. Ele é formado pelos domínios α_1 e α_2 da proteína (ver Figuras 25-50A e 25-52A). O corpo do peptídeo é mostrado em *amarelo*, com os átomos de carbono em *preto*, os átomos de oxigênio em *vermelho* e os átomos de nitrogênio em *azul*. A porção aminoterminal do peptídeo está à esquerda. Observe que os grupos amino e carboxiterminais do corpo do peptídeo ligam-se por ligações de hidrogênio e iônicas (apresentadas como *linhas pontilhadas azuis*) às cadeias laterais de aminoácidos invariáveis do MHC de proteínas MHC em direção das extremidades da fenda. Embora não mostrado no desenho, as cadeias laterais de alguns aminoácidos do peptídeo ligado a aminoácidos variáveis (polimórficos) da fenda, enquanto outros dirigem-se para fora e podem ser reconhecidos pelos TCRs das células T citotóxicas. (Cortesia de Paul Travers.)

proteínas podem ligar-se e apresentar uma grande variedade de peptídeos estranhos para as células T auxiliares, que desempenham um papel fundamental em praticamente todos os mecanismos de resposta imune adaptativa.

A maneira pela qual os TCRs reconhecem o fragmento peptídico associado a uma proteína do MHC foi revelada por análises de cristalografia por raios X do complexo formado entre um receptor solúvel e uma proteína do MHC solúvel associada a um peptídeo em sua fenda de ligação. As proteínas solúveis para estes experimentos foram produzidas por meio da tecnologia de DNA recombinante. Em cada caso estudado, o TCR acomoda-se em diagonal sobre a fenda de ligação do peptídeo e se liga às alças hipervariáveis V_α e V_β, com ambas as paredes internas da fenda e com o peptídeo (**Figura 25-55**). Os complexos solúveis peptídeo-MHC são agora amplamente utilizados para detectar células T com uma determinada especificidade. Eles geralmente são ligados de forma cruzada a tetrâmeros, de modo que possam se ligar a quatro TCRs na superfície da célula T com forte avidez.

As proteínas do MHC auxiliam a direcionar as células T a seus alvos apropriados

As proteínas do MHC de classe I são expressas em praticamente todas as células nucleadas de vertebrados. Isto provavelmente deve-se ao fato de que as células T citotóxicas efetoras precisam ser capazes de localizar e matar qualquer célula do corpo que se torne infectada por um micróbio intracelular, como um vírus. As proteínas de classe II, ao contrário, encontram-se expressas em um grupo restrito de células que possuem a capacidade de internalizar antígenos estranhos do meio extracelular e que podem interagir com as células T auxiliares. Essas células também expressam proteínas do MHC de classe I, incluindo as células dendríticas, que inicialmente ativam células T auxiliares virgens, e os alvos das células T auxiliares efetoras, como os macrófagos e as células B.

É fundamental que as células T citotóxicas efetoras direcionem seus ataques para células que *produzem* antígenos estranhos (como as proteínas virais), enquanto que as células T auxiliares devem direcionar suas ações principalmente para as células que tenham a capacidade de

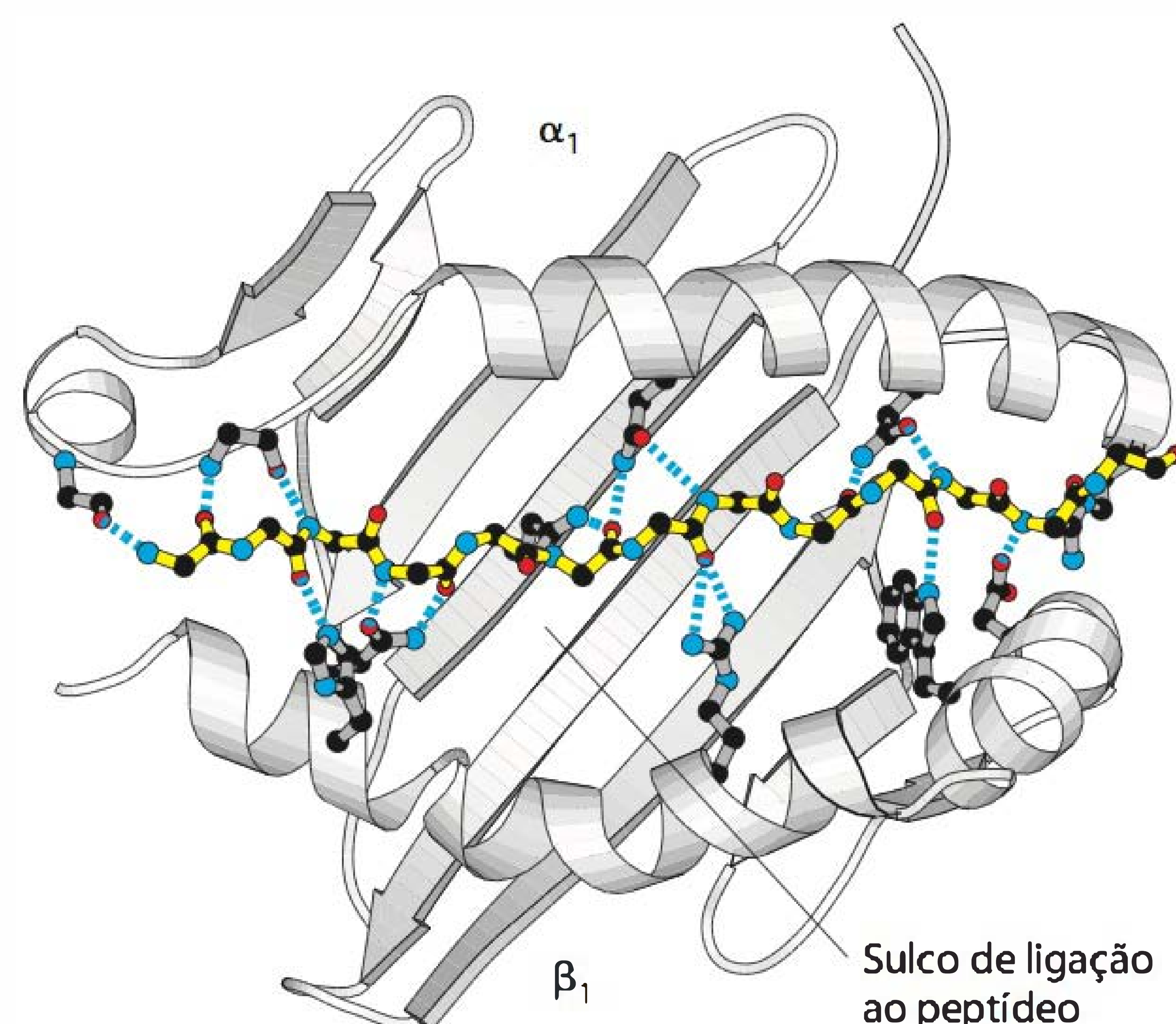


Figura 25-54 Um peptídeo ligado à fenda da proteína do MHC de classe II. Um desenho esquemático similar àquele apresentado na Figura 25-53. O sulco é formado pelos aminoácidos dos domínios terminais das cadeias α e β (α_1 e β_1, ver Figura 25-50B). Observe que o peptídeo se estende além do final do sulco e que sua estrutura se liga por ligações de hidrogênio distribuídas ao longo do peptídeo às cadeias laterais dos aminoácidos invariáveis do sulco. (Cortesia de Paul Travers.)

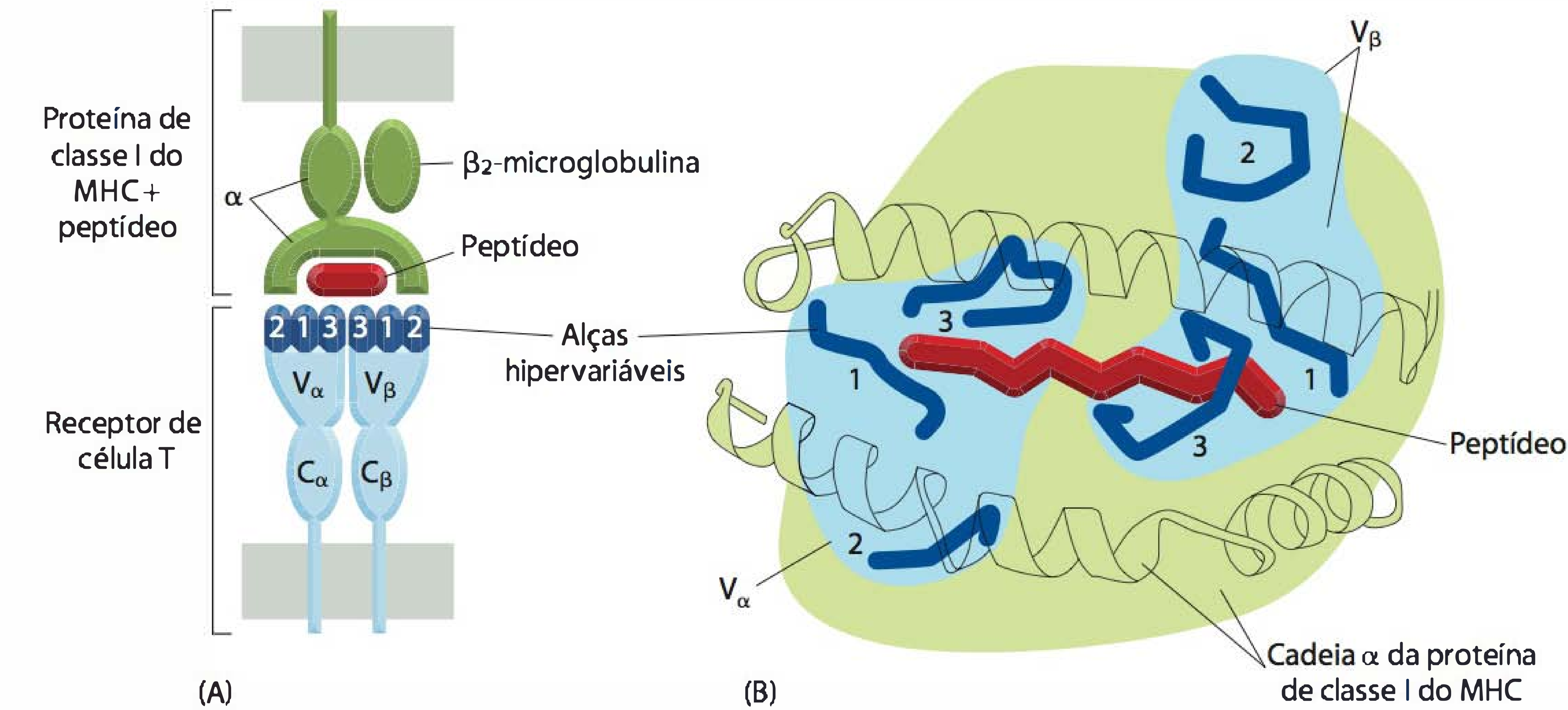


Figura 25-55 A interação entre o receptor de célula T e um peptídeo viral ligado à proteína do MHC de classe I. (A) Vista esquemática das alças hipervariáveis dos domínios V_α e V_β do receptor de célula T interagindo com o peptídeo e as paredes da fenda de ligação ao antígeno da proteína do MHC. Observe que a terceira alça hipervariável, a qual é a mais variável, interage primeiramente com as paredes do sulco de ligação ao peptídeo. (B) Desenho de uma imagem de "vista superior" dos domínios V (*azul*) e das alças hipervariáveis (*azul-escuro*) do receptor sobre a fenda de ligação ao peptídeo, conforme determinado por difração de raios X. O domínio V_α cobre a porção aminoterminal do peptídeo, enquanto que o domínio V_β cobre a porção carboxiterminal. Repare que o receptor encontra-se orientado diagonalmente sobre a fenda de ligação ao peptídeo. (B, adaptada de D. N. Garboczi et al., *Nature* 384:134-141, 1996. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)

internalizar antígenos estranhos do meio extracelular. Uma vez que as primeiras células-alvo mencionadas são uma ameaça potencial constante, enquanto as últimas são essenciais para as defesas imunes adaptativas do organismo, é de vital importância que as células T nunca confundam os dois tipos de células-alvo para que não direcionem de forma inadequada as funções citotóxicas e auxiliares. Por isso, além do receptor de antígenos, que reconhece o complexo peptídeo-MHC, cada uma das três principais classes de células T também expressa um *correceptor*, que reconhece uma região determinada e invariável da classe apropriada da proteína do MHC. Estes dois correceptores, denominados CD4 e CD8, auxiliam as células T auxiliares (e reguladoras) e citotóxicas a direcionar, respectivamente, suas funções para seus alvos apropriados. As propriedades das proteínas do MHC de classe I e de classe II estão comparadas na **Tabela 25-2**.

Os correceptores CD4 e CD8 ligam-se a porções invariáveis das proteínas do MHC

Em geral, a afinidade dos TCRs com os complexos peptídeo-MHC, em uma célula apresentadora de antígeno, ou em uma célula-alvo, não é suficiente para intermediar uma interação funcional entre as duas células. As células T normalmente necessitam do auxílio dos *receptores acessórios*, que estabilizam a interação, aumentando a força de adesão célula-célula. Diferentemente dos TCRs ou das proteínas do MHC, os receptores acessórios não se ligam a antígenos estranhos e são invariáveis.

Quando os receptores acessórios desempenham um papel direto na ativação das células T, por meio da geração de sinais intracelulares para a própria célula, eles são denominados **co-receptores**. Os mais importantes e mais conhecidos correceptores das células T são as proteínas CD4 e CD8, ambas proteínas transmembrana de passagem única com domínios extracelulares semelhantes a Igs. Como os TCRs, esses correceptores reconhecem proteínas do MHC, mas, ao contrário dos TCRs, eles ligam-se a porções invariáveis da proteína, distantes da fenda de ligação ao peptídeo. O **CD4** é expresso nas células T auxiliares e reguladoras e liga-se às proteínas do MHC de classe II, enquanto que o **CD8** é expresso nas células T citotóxicas e se liga às proteínas do MHC de classe I (**Figura 25-56**). Assim, o CD4 e o CD8 contribuem para o reconhecimento feito pela célula T por meio do direcionamento específico da interação com uma determinada proteína do MHC, direcionando também a interação

Tabela 25-2 Propriedades das proteínas do MHC de classe I e de classe II humanas

	CLASSE I	CLASSE II
Loci genético	*HLA-A, HLA-B, HLA-C*	*DP, DQ, DR*
Estrutura de cadeias	Cadeia α + β_2-microglobulina	Cadeia α + cadeia β
Distribuição celular	A maioria das células nucleadas	Células dendríticas, células B, macrófagos, células epiteliais tímicas e algumas outras
Envolvidas em apresentar antígenos a	Células T citotóxicas	Células T auxiliares, células T reguladoras
Tipo de fragmento peptídeo	Proteínas produzidas no citoplasma	Proteínas endocitadas através da membrana plasmática e das proteínas extracelulares
Domínios polimórficos	$\alpha_1 + \alpha_2$	$\alpha_1 + \beta_1$
Reconhecidas pelos correceptores	CD8	CD4

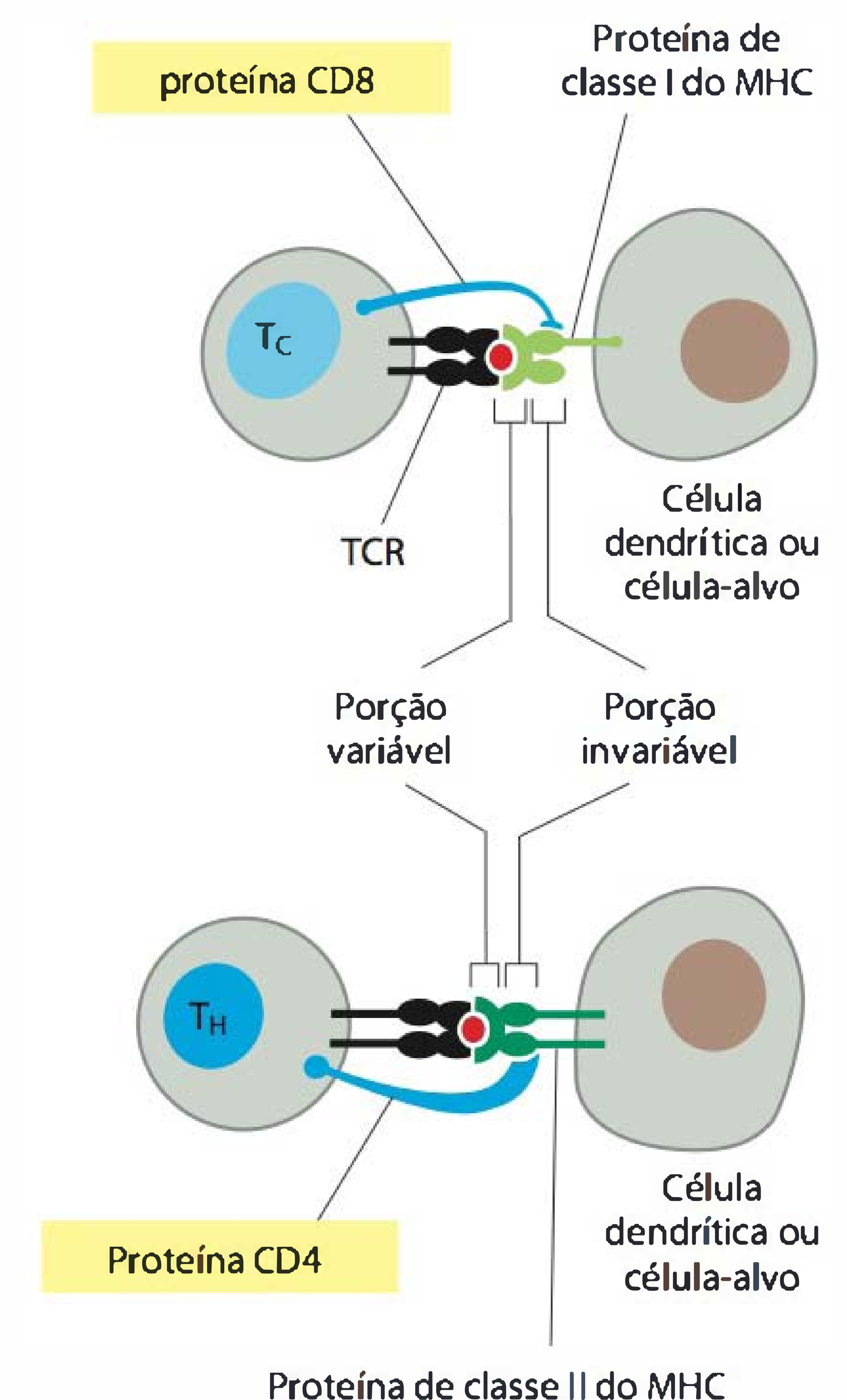


Figura 25-56 Os correceptores CD4 e CD8 na superfície das células T. As células T citotóxicas (T_C) expressam CD8, que reconhece proteínas do MHC de classe I, enquanto as células T auxiliares (T_H) e as células T reguladoras (não-apresentadas) expressam CD4, que reconhece proteínas do MHC de classe II. Repare que os correceptores ligam-se à mesma proteína do MHC à qual o TCR se ligou, de forma que eles se associam com os TCRs durante o processo de reconhecimento do antígeno. O TCR se liga às porções variáveis (polimórficas) da proteína do MHC que forma a fenda de ligação ao antígeno, e o correceptor liga-se à porção invariável, em uma região distante da fenda.

entre determinados tipos de células-alvo: o reconhecimento das proteínas do MHC de classe I permite que as células T citotóxicas focalizem qualquer célula hospedeira, enquanto o reconhecimento de uma molécula do MHC de classe II permite que células T auxiliares focalizem uma pequena subpopulação celular, como células dendríticas, macrófagos ou células B. A cauda citoplasmática das proteínas CD4 e CD8 encontra-se associada a um membro da família de proteínas citoplasmáticas Src, a proteína tirosina-cinase denominada *Lck*, que fosforila várias proteínas citoplasmáticas nas tirosinas e, assim, participa da ativação da célula T (discutido no Capítulo 15). Os anticorpos contra CD4 e CD8 foram amplamente utilizados como ferramentas para se fazer a distinção entre as principais classes de células T tanto no homem como em animais experimentais. Somente as células T citotóxicas expressam CD8, enquanto as células T reguladoras e auxiliares expressam CD4.

Ironicamente, o vírus da AIDS (HIV) utiliza as moléculas de CD4 (assim como os receptores de quimiocinas) para penetrar as células T auxiliares. É esta eventual depleção de células T auxiliares que torna os pacientes com AIDS suscetíveis a infecções causadas por micróbios que normalmente não são perigosos. Consequentemente, a maioria dos pacientes com AIDS morre por infecções que surgem após vários anos do estabelecimento dos sintomas da doença, a não ser que sejam tratados com uma potente combinação de fármacos anti-HIV. O HIV igualmente utiliza o CD4 e os receptores de quimiocinas para penetrar os macrófagos, que também apresentam esses receptores em suas superfícies.

Antes que uma célula T possa reconhecer uma proteína estranha, ela precisa ser processada dentro de uma célula apresentadora de antígeno ou em uma célula-alvo e, então, deve ser apresentada como um complexo peptídeo-MHC na superfície da célula. Inicialmente consideraremos como uma célula apresentadora de antígeno infectada por vírus ou uma célula-alvo processa as proteínas virais para apresentá-las à célula T citotóxica. Após, discutiremos como uma proteína estranha internalizada é processada para a apresentação às células T auxiliares.

As células T citotóxicas respondem a fragmentos de proteínas citosólicas estranhas associadas às proteínas do MHC de classe I

Um experimento realizado em 1970 forneceu uma das primeiras e mais dramáticas demonstrações de que as proteínas do MHC de classe I estão envolvidas no reconhecimento de antígenos virais pelas células T citotóxicas. Os pesquisadores observaram que as células T citotóxicas efetoras de um camundongo infectado por um vírus poderiam matar células cultivadas, infectadas com o mesmo vírus, somente se estas células-alvo expressassem as mesmas proteínas do MHC de classe I encontradas nas células infectadas do camundongo. Esse experimento demonstrou que as células T citotóxicas de qualquer indivíduo podem reconhecer um antígeno estranho específico em uma célula-alvo somente quando a célula-alvo expressa pelo menos algumas formas alélicas das proteínas do MHC de classe I expressas por esse indivíduo, um fenômeno conhecido como *restrição ao MHC* (**Figura 25-57**).

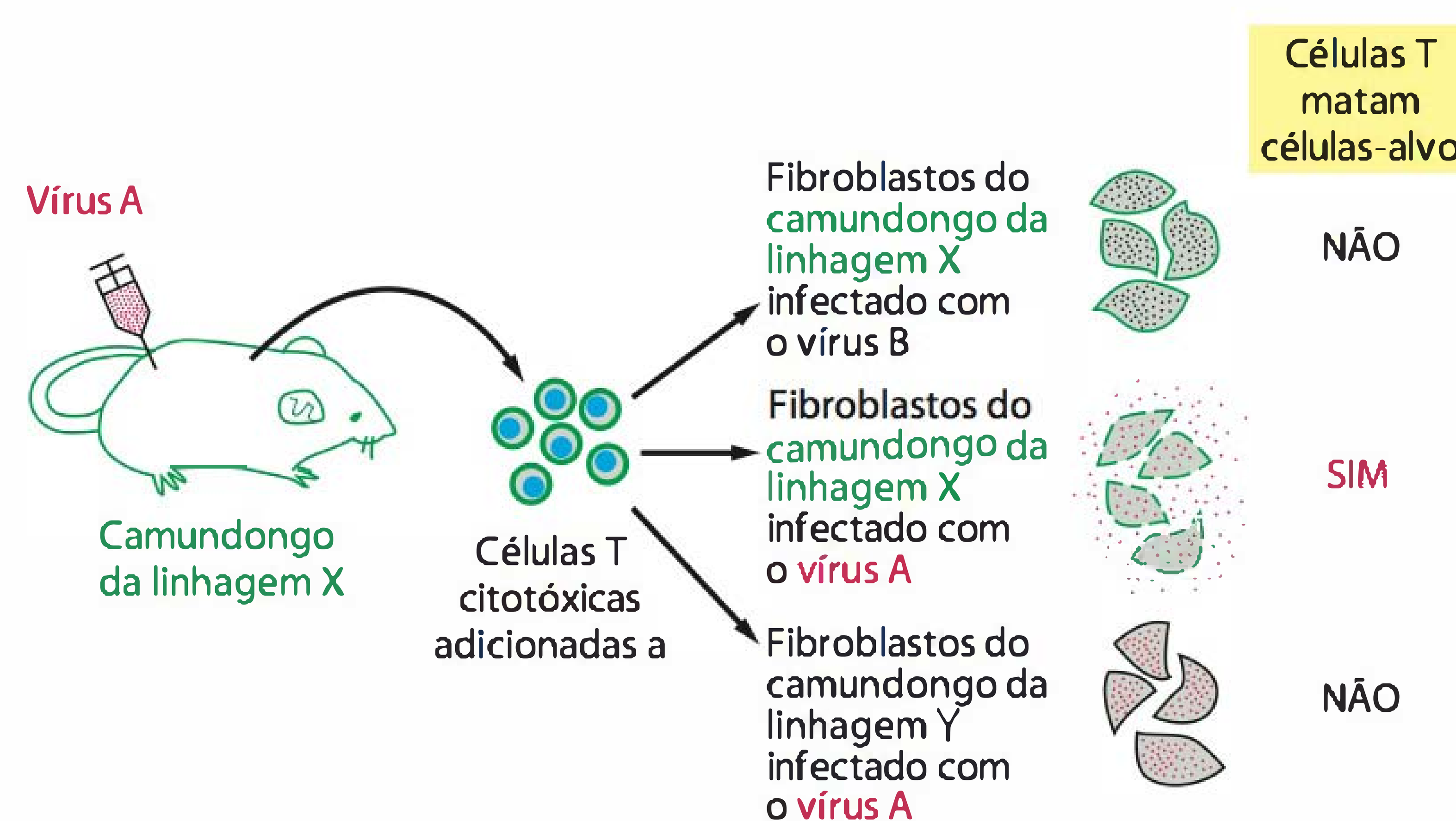


Figura 25-57 Experimento clássico demonstrando que as células T citotóxicas reconhecem alguns aspectos da superfície da célula-alvo, além do antígeno viral. Os camundongos da linhagem X foram infectados com o vírus A. Sete dias após, o baço destes camundongos continha células T citotóxicas efetoras capazes de matar células infectadas pelo vírus, fibroblastos da linhagem X em cultura de células. Conforme o esperado, elas matam somente os fibroblastos infectados com o vírus A e não aqueles infectados com o vírus B. Assim, as células T citotóxicas são vírus-específicas. As mesmas células T, no entanto, também não são capazes de matar fibroblastos da linhagem de camundongo Y infectada com o mesmo vírus A, indicando que as células T citotóxicas reconhecem diferenças genéticas entre dois tipos de fibroblastos e não somente o vírus. Para identificar as diferenças, foi necessário utilizar duas linhagens especiais de camundongos (conhecidas como *linhagens congênitas*) que são geneticamente idênticas, exceto para os alelos dos loci das moléculas do MHC de classe I, ou são geneticamente diferentes, exceto para estes alelos. Desta maneira, foi demonstrado que a morte das células-alvo infectadas requer que elas expressem pelo menos um dos mesmos alelos do MHC de classe I que é expresso pelo camundongo que foi originalmente infectado. Isso sugere que as proteínas do MHC de classe I devem ser necessariamente apresentadas junto com os antígenos virais na superfície celular para a célula T citotóxica efetora e que elas realizam esta função de maneira altamente específica.

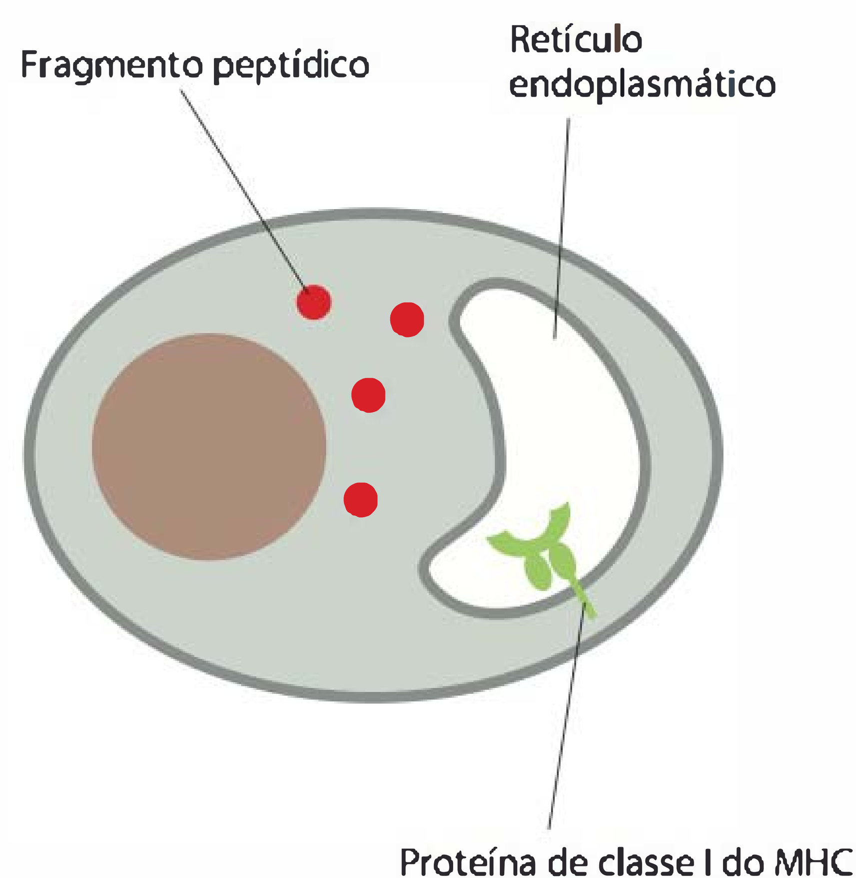


Figura 25-58 A questão do transporte peptídico. Como os fragmentos peptídicos saem do citosol, onde são produzidos, e entram no lúmen do RE, onde a fenda de ligação ao peptídeo das proteínas do MHC de classe I está localizada? Um processo de transporte especial faz-se necessário.

Evidências subsequentes indicaram que, durante a morte das células infectadas por vírus, uma célula T citotóxica reconhece fragmentos degradados de proteínas internas dos vírus que estão ligadas às proteínas do MHC de classe I na superfície da célula infectada. A célula T pode reconhecer quantidades mínimas de antígeno (1 a 10 complexos peptídeo-MHC por célula T com receptores de alta afinidade são o suficiente). Assim, basta que apenas uma fração dos fragmentos gerados pelas proteínas virais ligue-se às proteínas do MHC de classe I e chegue à superfície celular para que os fragmentos sejam atacados pelas células T citotóxicas.

As proteínas virais internas são sintetizadas no citosol da célula infectada. Conforme discutido no Capítulo 3, a degradação proteolítica que ocorre no citoplasma é mediada principalmente por mecanismos dependentes de ATP e de ubiquitina, que atuam através de grandes complexos de enzimas proteolíticas denominados *proteossomos*, compostos por diferentes subunidades proteicas. No entanto, é provável que todos os proteossomos sejam capazes de gerar fragmentos peptídicos de tamanho adequado para encaixar no sulco das proteínas do MHC de classe I. Mesmo os proteossomos das bactérias clivam as proteínas em peptídeos com o comprimento complementar ao tamanho da fenda da proteína do MHC de classe I, sugerindo que a fenda do MHC evoluiu para se adequar a peptídeos deste tamanho. Entretanto, alguns proteossomos são aparentemente especializados para produzir peptídeos para as proteínas do MHC de classe I, pois contêm duas subunidades que são codificadas por genes localizados na região cromossomal do MHC.

Como os peptídeos gerados no citosol entram em contato com a fenda de ligação aos peptídeos das proteínas do MHC de classe I no lúmen do retículo endoplasmático (RE) (**Figura 25-58**)? A resposta para esta questão foi descoberta a partir da observação de células mutantes, nas quais as proteínas do MHC de classe I não são expressas na superfície celular, mas são degradadas no interior da célula. Os genes mutantes destas células provaram codificar subunidades de uma proteína pertencente à família dos *transportadores ABC*, discutidos no Capítulo 11. Esses transportadores proteicos encontram-se localizados na membrana do RE e utilizam a energia da hidrólise do ATP para bombear peptídeos do citosol para dentro do lúmen do RE. Os genes que codificam estas duas subunidades estão localizados na região cromossomal do MHC e, se um dos genes é inativado por mutação, as células ficam impossibilitadas de fornecer os peptídeos para as proteínas do MHC de classe I. As proteínas do MHC de classe I, nessas células mutantes, são degradadas no interior da célula, mas não atingem a superfície, porque a ligação com o peptídeo normalmente é necessária para que ocorra o dobramento adequado dessas proteínas. Até que se associe a um peptídeo, a proteína do MHC de classe I fica no RE, conectada a um transportador ABC por uma chaperonina. Sem a ligação do peptídeo, as proteínas do MHC aprisionadas nas células mutantes eventualmente sofrem proteólise (**Figura 25-59**).

Em todas as células, os fragmentos peptídicos vêm do próprio citosol da célula e das proteínas nucleares que são geradas no processo normal de degradação das proteínas, no processo de síntese de novo de proteínas e nos mecanismos de controle de qualidade. (Surpreendentemente, mais de 30% das proteínas produzidas pelas células de mamíferos aparentemente são defeituosas, sendo degradadas por proteossomos logo após sua síntese.) Estes peptídeos são bombeados constantemente para o interior do RE e transportados para a superfície celular pelas proteínas do MHC de classe I. Os peptídeos não são antigênicos, porque as células T citotóxicas, que poderiam reconhecê-los, foram eliminadas, inativadas ou suprimidas por células T reguladoras no processo de autotolerância (ver Figura 25-13).

Quando as células T citotóxicas e algumas células T auxiliares T_H1 são ativadas pelo antígeno para tornarem-se células efetoras, as células efetoras secretam a citocina **interferon-γ (IFNγ)**, que aumenta bastante as respostas antivirais. O IFNγ atua nas células hospedeiras infectadas por vírus de duas maneiras. Ele bloqueia a replicação viral e aumenta a expressão de vários genes localizados na região cromossomal do MHC. Estes genes incluem aqueles que codificam as proteínas do MHC de classe I, as duas subunidades especializadas do proteossomo e as duas subunidades do peptídeo transportador localizado no RE (**Figura 25-60**). Assim, toda a maquinaria da célula hospedeira necessária à apresentação dos antígenos virais para as células T citotóxicas é coordenada pela ação do IFNγ, criando um mecanismo de estimulação positivo que amplifica a resposta imune e culmina com a morte da célula infectada.

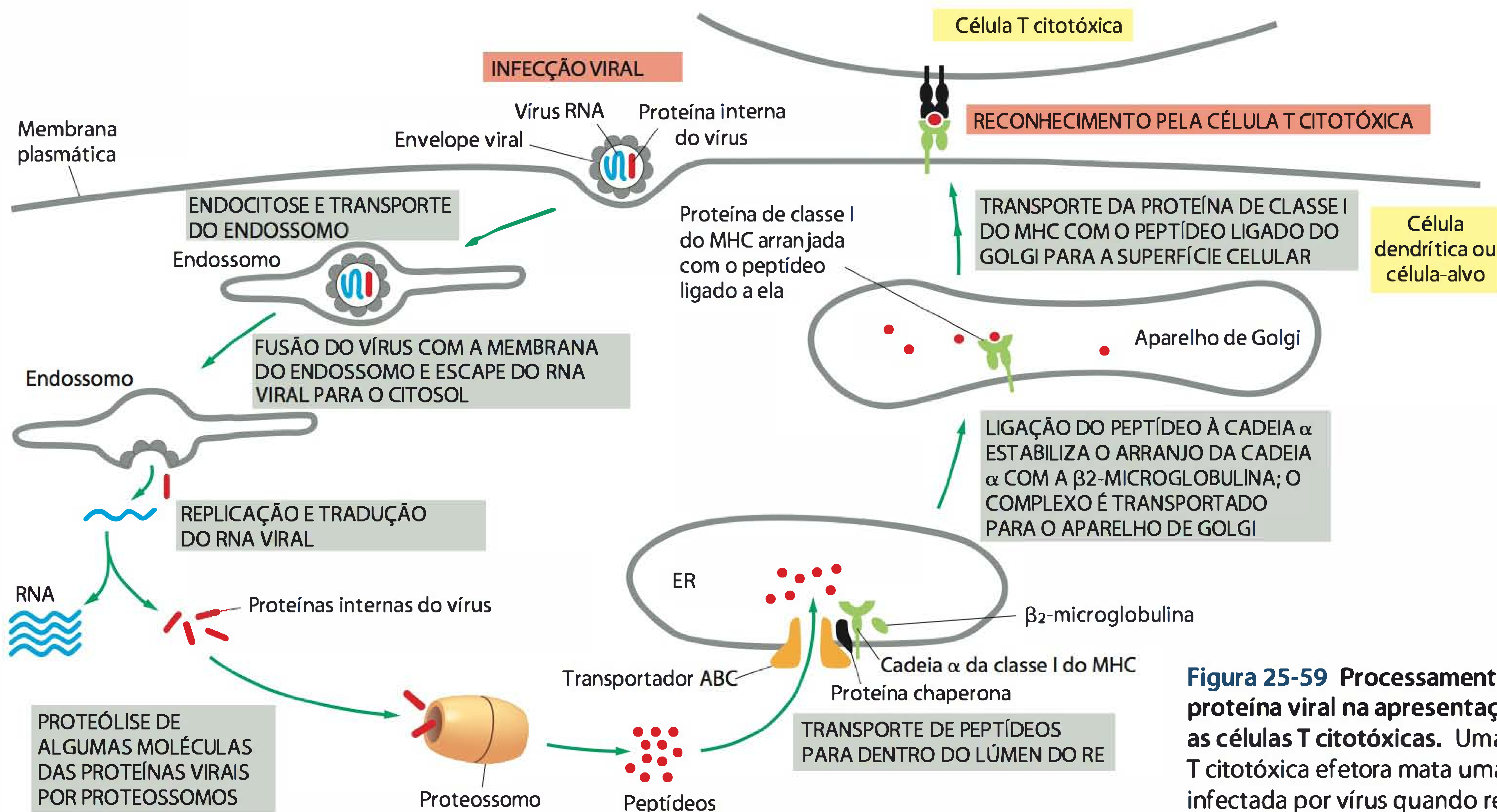


Figura 25-59 Processamento da proteína viral na apresentação para as células T citotóxicas. Uma célula T citotóxica efetora mata uma célula infectada por vírus quando reconhece fragmentos das proteínas internas virais associados às proteínas do MHC de classe I na superfície da célula infectada. Nem todos os vírus entram nas células como este vírus de RNA envelopado, mas os fragmentos das proteínas internas do vírus sempre seguem a via representada. Somente uma pequena porção das proteínas virais sintetizadas no citosol é degradada e transportada para a superfície celular, mas isso é suficiente para atrair uma célula T citotóxica e ser atacada por ela. Várias proteínas chaperonas (somente uma delas está representada) do lúmen do RE auxiliam no dobramento e na reunião das proteínas do MHC de classe I. As chaperonas ligam-se à cadeia α do MHC de classe I e atuam sequencialmente. A última liga a proteína do MHC ao transportador ABC, conforme representado. A união da proteína do MHC de classe I e o seu transporte para a superfície celular requerem a ligação do peptídeo.

As células T auxiliares reconhecem fragmentos de uma proteína estranha endocitada em associação com as proteínas do MHC de classe II

Diferentemente das células T citotóxicas, as células T auxiliares não atuam diretamente matando a célula infectada para eliminar os micróbios. Em vez disso, elas estimulam os macrófagos a tornarem-se mais eficientes para destruir micro-organismos intracelulares e auxiliam as células B e as células T citotóxicas a responder aos antígenos microbianos.

Assim como as proteínas virais apresentadas para as células T citotóxicas, as proteínas apresentadas para as células T auxiliares (pela célula dendrítica ou pela célula-alvo) são fragmentos degradados de proteínas estranhas. A associação dos fragmentos às proteínas do MHC de classe II ocorre de forma muito semelhante à associação dos peptídeos derivados de vírus às proteínas do MHC de classe I. Contudo, tanto o tipo de fragmento peptídico a ser apresentado como a via de associação às proteínas do MHC são diferentes.

Em vez de serem derivados da síntese proteica ocorrida no citosol da célula, os peptídeos estranhos apresentados para as células T auxiliares são derivados de endossomos. Alguns são provenientes de micróbios, ou de seus produtos, que a célula apresentadora de antígeno tenha endocitado e degradado no ambiente ácido dos endossomos. Outros são provenientes de micróbios que estão crescendo dentro do compartimento endocítico da célula apresentadora de antígeno. Estes peptídeos não precisam ser bombeados através da membrana porque são produzidos em um compartimento que é topologicamente equivalente ao espaço extracelular. Ao invés de entrarem no lúmen do RE, onde as proteínas do MHC de classe II são sintetizadas e reunidas, eles se ligam a heterodímeros de classe II pré-organizados em um compartimento endossomal especializado. Quando o peptídeo se liga, a proteína

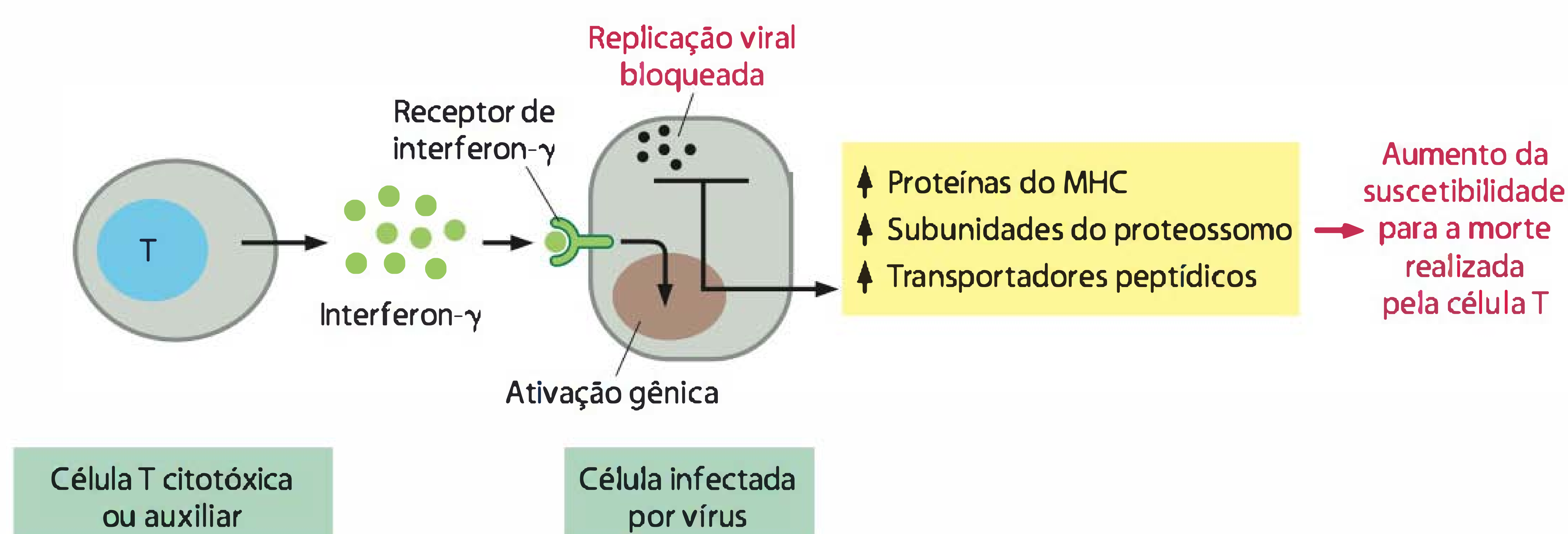


Figura 25-60 Alguns efeitos do interferon-γ (IFNγ) sobre as células infectadas por vírus. Os receptores do IFNγ ativados sinalizam para o núcleo, alterando a transcrição gênica, o que leva aos efeitos indicados. Os efeitos marcados em *amarelo* tendem a tornar a célula infectada um alvo mais vulnerável para o processo de morte realizado pelas células T citotóxicas efetoras.

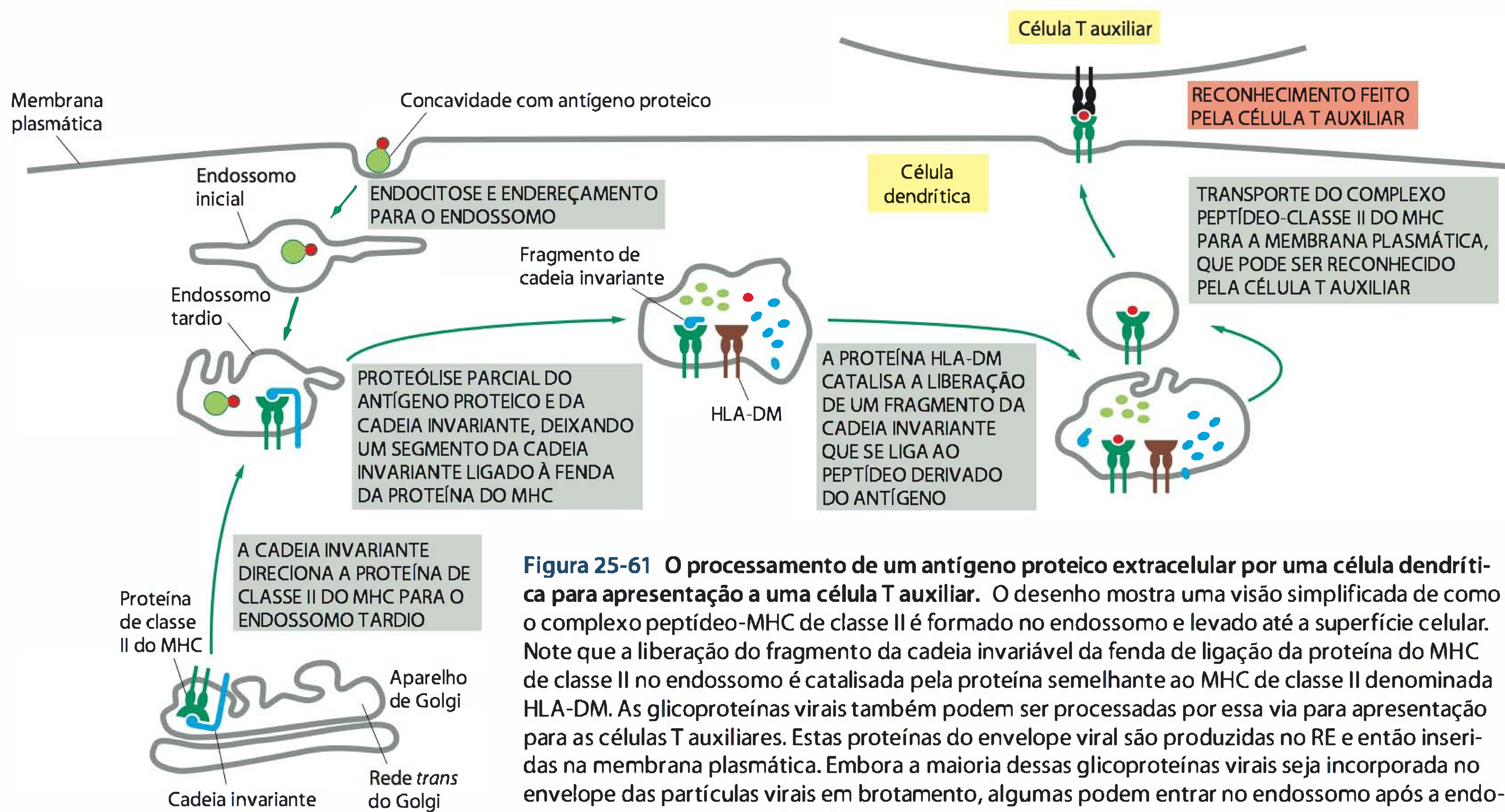


Figura 25-61 O processamento de um antígeno proteico extracelular por uma célula dendrítica para apresentação a uma célula T auxiliar. O desenho mostra uma visão simplificada de como o complexo peptídeo-MHC de classe II é formado no endossomo e levado até a superfície celular. Note que a liberação do fragmento da cadeia invariável da fenda de ligação da proteína do MHC de classe II no endossomo é catalisada pela proteína semelhante ao MHC de classe II denominada HLA-DM. As glicoproteínas virais também podem ser processadas por essa via para apresentação para as células T auxiliares. Estas proteínas do envelope viral são produzidas no RE e então inseridas na membrana plasmática. Embora a maioria dessas glicoproteínas virais seja incorporada no envelope das partículas virais em brotamento, algumas podem entrar no endossomo após a endocitose e entrar na via do MHC de classe II.

do MHC de classe II altera sua conformação, aprisionando o peptídeo em sua fenda para apresentá-lo na superfície celular a uma célula T auxiliar.

Uma proteína do MHC de classe II recém-sintetizada precisa evitar que sua fenda de ligação se torne obstruída prematuramente, ainda dentro do lúmen do RE, por peptídeos bombeados do citosol. Um polipeptídeo especial, denominado **cadeia invariante**, garante a futura disponibilidade da fenda por meio da associação a heterodímeros do MHC de classe II quando esta se encontra em fase inicial de síntese no RE. Parte desta cadeia polipeptídica interage com a fenda de ligação ao antígeno da proteína do MHC, impedindo que a fenda interaja com outros peptídeos no lúmen do RE. A cadeia invariante também direciona as proteínas do MHC de classe II da rede *trans* de Golgi para compartimentos endossômicos mais maduros. Nestes compartimentos, a cadeia invariante é clivada por proteases, restando somente um pequeno fragmento ligado à fenda de ligação ao peptídeo da proteína do MHC. Esses fragmentos são então liberados, liberando também a proteína do MHC para que ela possa ligar peptídeos derivados das proteínas endocitadas (**Figura 25-61**). Dessa forma, as diferenças funcionais entre as proteínas do MHC de classe I e de classe II encontram-se asseguradas – as primeiras apresentam as moléculas que são produzidas no citosol, e as últimas apresentam as moléculas provenientes dos compartimentos endocíticos.

Entretanto, esta distinção entre a apresentação de antígeno para as células T citotóxicas e para as células T auxiliares não é absoluta. As células dendríticas, por exemplo, precisam ser capazes de ativar as células T citotóxicas para matar as células infectadas por vírus, mesmo que o vírus não infecte as próprias células dendríticas. Para isso, as células dendríticas usam um processo denominado **apresentação cruzada**, o qual inicia quando elas fagocitam fragmentos de células infectadas por vírus. Elas então transportam ativamente as proteínas virais dos fagossomos para o citosol, onde são degradadas nos proteossomos. Os fragmentos resultantes das proteínas virais são então transportados para o lúmen do RE, onde são carregados para as proteínas do MHC de classe I que estão sendo montadas. A apresentação cruzada nas células dendríticas também atua para ativar as células T citotóxicas contra antígenos tumorais de células cancerosas e contra proteínas do MHC de enxertos de órgãos estranhos.

A maioria das proteínas do MHC de classe I e de classe II presentes na superfície das células-alvo possui peptídeos derivados de proteínas próprias na suas fendas de ligação. Para as proteínas do MHC de classe I, os fragmentos são principalmente derivados da degradação citosólica e de proteínas nucleares. Para as proteínas do MHC de classe II, são principalmente derivados de proteínas degradadas originadas na membrana plasmática ou nos fluidos ex-

tracelulares e que são endocitadas. Somente uma pequena fração de cerca de 10^5 proteínas do MHC de classe II da superfície de uma célula apresentadora de antígeno terá peptídeos estranhos ligados a ela. Entretanto, mesmo uma única cópia do complexo peptídeo-MHC em uma célula dendrítica é suficiente para ativar uma célula T auxiliar que possui um TCR que liga esse complexo com alta afinidade.

As células T potencialmente eficientes são selecionadas positivamente no timo

Conforme visto anteriormente, as células T reconhecem os antígenos associados às proteínas do próprio MHC, mas não com proteínas estranhas do MHC (ver Figura 25-57): isso significa que as células T possuem *restrição ao MHC*. Esta restrição resulta de um processo de **seleção positiva** durante o desenvolvimento da célula T no timo. Neste processo, as células T imaturas (*timócitos*) que poderão ser capazes de reconhecer peptídeos estranhos apresentados pelas proteínas do próprio MHC são selecionadas para sobreviver e maturar, ao passo que as restantes, as quais não teriam utilidade, são encaminhadas para apoptose. Assim, a restrição ao MHC é uma propriedade adquirida do sistema imune que surge durante o desenvolvimento das células T no timo.

A maneira mais direta de estudar o processo de seleção é acompanhar o destino de um grupo de células T em desenvolvimento com especificidade conhecida. Isso pode ser feito com a utilização de camundongos transgênicos que expressam um determinado par de genes TCR α e β derivados de um clone de células T com especificidade antigênica e de MHC conhecida. Tais experimentos demonstram que as células T transgênicas maturam no timo e povoam os órgãos linfoides periféricos somente se o camundongo transgênico também expressar a mesma forma alélica da proteína do MHC que é reconhecida pelos TCRs transgênicos. Se o camundongo não expressar a proteína do MHC adequada, as células T transgênicas morrem no interior do timo. Assim, a sobrevivência e a maturação das células T em desenvolvimento dependem de uma combinação entre seu TCR e as proteínas do MHC expressas no timo (as quais têm peptídeos próprios derivados das próprias proteínas ligadas a eles). Experimentos similares utilizando camundongos transgênicos, com expressão do MHC restrita a um tipo celular específico no timo, indicaram que existem proteínas do MHC expressas nas células epiteliais no córtex do timo que são responsáveis por esse processo de seleção positiva (**Figura 25-62**).

Depois da seleção positiva, as células T deixam o timo, e a manutenção de suas vidas depende da estimulação contínua realizada pelos complexos peptídeo-MHC próprios (e a citocina *IL7*). Esta estimulação é suficiente para promover a sobrevivência celular, mas não é suficiente para ativar as células T a proliferar e tornarem-se células efetoras ou de memória.

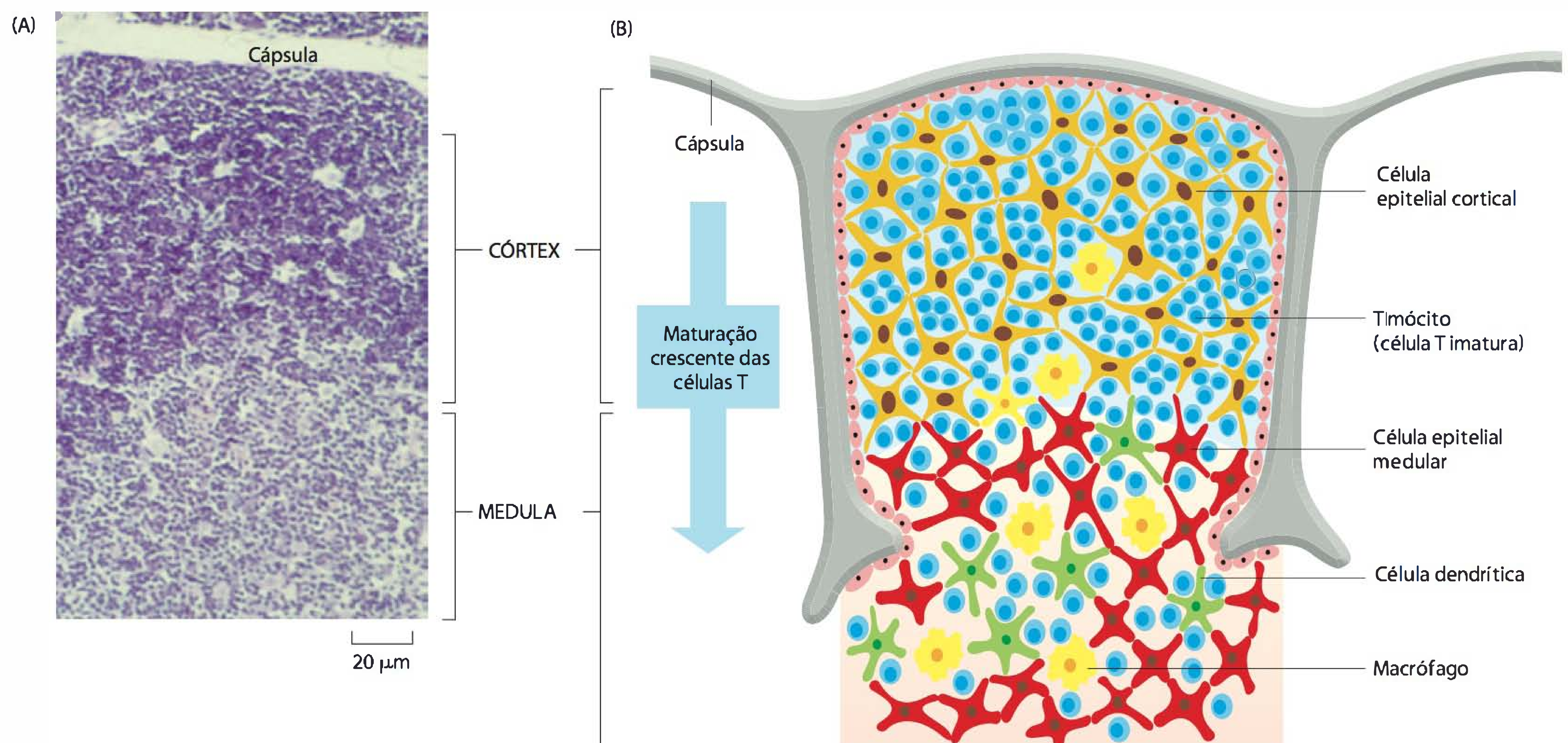


Figura 25-62 A organização celular do timo humano. (A) Micrografia de uma secção de um lóbulo tímico corada, mostrando o córtex (exterior) e a medula (interior). (B) Diagrama esquemático de um lóbulo mostrando a composição celular. O córtex contém timócitos imaturos e a medula contém timócitos maduros. Os timócitos, os macrófagos e as células dendríticas se desenvolvem de células que migraram da medula óssea. As funções dessas diferentes regiões e tipos celulares serão discutidas mais adiante, quando veremos como os timócitos em desenvolvimento são selecionados para sobreviver. Devido a esse processo de seleção, mais de 95% dos timócitos produzidos no timo morrem por apoptose. As células mortas são rapidamente fagocitadas e digeridas pelos macrófagos. (Adaptada de K. Murphy Et al., Janeway's Immunobiology, 7th ed. New York: Garland Science, 2008.)

Como parte do processo de seleção positiva no timo, as células T em desenvolvimento que expressam TCRs que reconhecem as proteínas do MHC de classe I são selecionadas para tornarem-se células T citotóxicas, enquanto que células T que expressam os TCRs que reconhecem proteínas do MHC de classe II são selecionadas para tornarem-se células T auxiliares ou células T reguladoras. Assim, os camundongos que foram geneticamente modificados e que não possuem as proteínas do MHC de classe I em sua superfície perdem, especificamente, as células T citotóxicas, enquanto que os camundongos que não possuem as proteínas do MHC de classe II em sua superfície perdem, especificamente, as células T auxiliares e as células T reguladoras. O desenvolvimento das células T reguladoras depende de um grupo especial de células epiteliais da medula tímica denominadas *corpúsculos de Hassall*.

As células que estão sendo selecionadas de forma positiva, inicialmente expressam os correceptores CD4 e CD8, os quais são necessários ao processo de seleção. Na ausência de CD4, não ocorre o desenvolvimento de células T auxiliares e células T reguladoras, e sem o CD8, as células T citotóxicas não se desenvolvem. Uma vez desenvolvidas, as células T citotóxicas perdem o CD4 e as células T auxiliares ou reguladoras perdem o CD8.

Ainda resta um sério problema que não foi resolvido pela seleção positiva. Se as células T auxiliares e citotóxicas em desenvolvimento, com receptores que reconhecem peptídeos próprios em associação a proteínas do próprio MHC, maturam no timo e migram para os órgãos linfoides periféricos, elas poderão causar uma trágica destruição. Um segundo processo, o de *seleção negativa* no timo, é necessário para evitar esse desastre em potencial.

Várias células T auxiliares e citotóxicas em desenvolvimento que podem ser ativadas por complexos peptídeo-MHC próprios são eliminadas no timo

Conforme discutido anteriormente, uma característica fundamental do sistema imune adaptativo é que ele pode distinguir entre o que lhe é próprio e o que não é, e normalmente não reage contra suas próprias moléculas. Um mecanismo importante para a obtenção desse estado de autotolerância imunológica é a deleção, no timo, das células T auxiliares e citotóxicas autorreativas em desenvolvimento – isto é, as células T cujos TCRs se ligam com força suficiente ao complexo de peptídeos próprios e às proteínas do próprio MHC para tornarem-se ativados. Conforme será discutido adiante, uma vez que a maioria das células B necessita da ajuda das células T auxiliares para responder ao antígeno, a eliminação das células T auxiliares autorreativas também serve para garantir que as células B autorreativas que escapam dos mecanismos responsáveis pela indução de tolerância das células B sejam inofensivas (ver Figura 25-13).

Antes de discutirmos o processo de seleção negativa, que remove as células T autorreativas do timo, será interessante observar a lógica por trás do sistema de duas etapas que culmina na seleção de uma pequena fração de células T em desenvolvimento que expressam um TCR que se liga fracamente, e não com alta afinidade, à proteína do próprio MHC que porta um peptídeo próprio. Como ilustrado na **Figura 25-63**, acredita-se que a produção de um grande repertório de tais células T garanta que pelo menos algumas células T sejam capazes de se ligar fortemente a um complexo contendo um peptídeo estranho com a mesma proteína do MHC, ativando a resposta imune adaptativa. Entretanto, é lógico que não é suficiente o timo selecionar somente as células T que reconhecem as próprias proteínas do

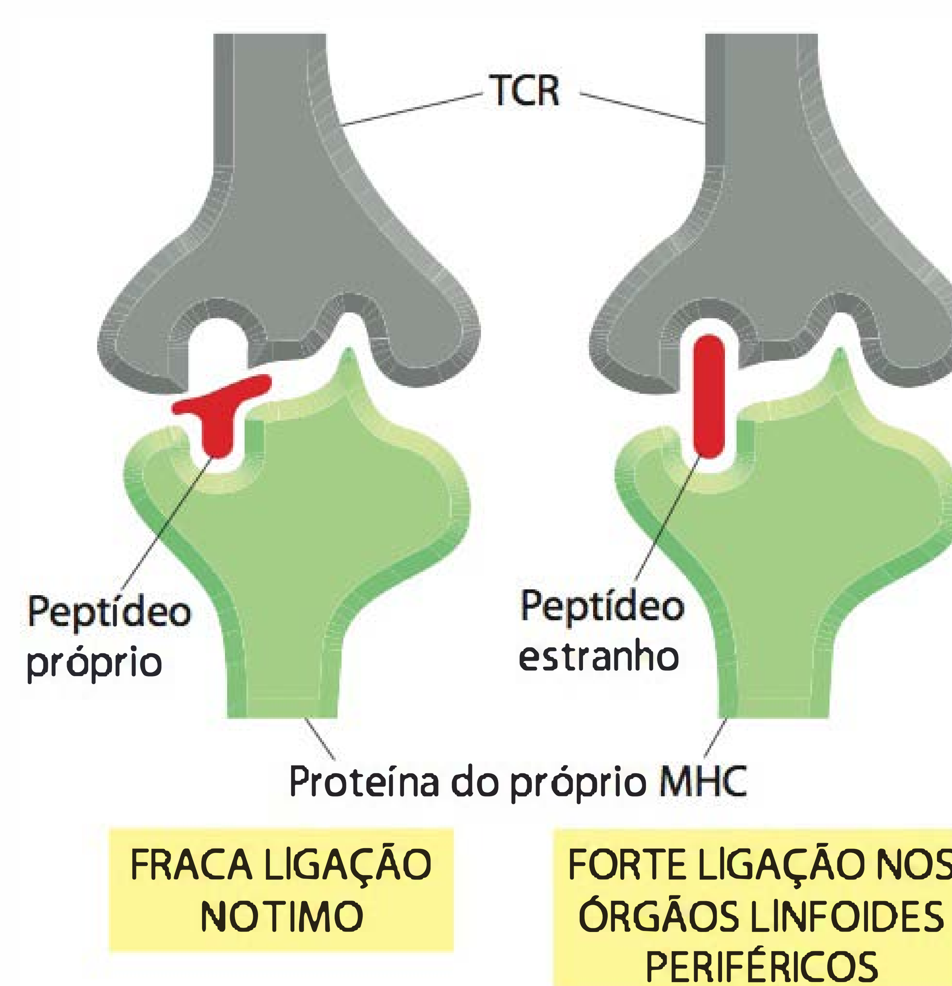


Figura 25-63 Diagrama esquemático mostrando como um TCR é selecionado no timo devido a sua fraca ligação com uma proteína do MHC própria complexada com um peptídeo próprio que se liga fortemente à mesma proteína do MHC ligada a um peptídeo estranho. Devido à fraca ligação do peptídeo próprio ao complexo e à ausência do peptídeo estranho no timo, uma célula T expressando este TCR no timo será positivamente selecionada e evitará a seleção negativa.

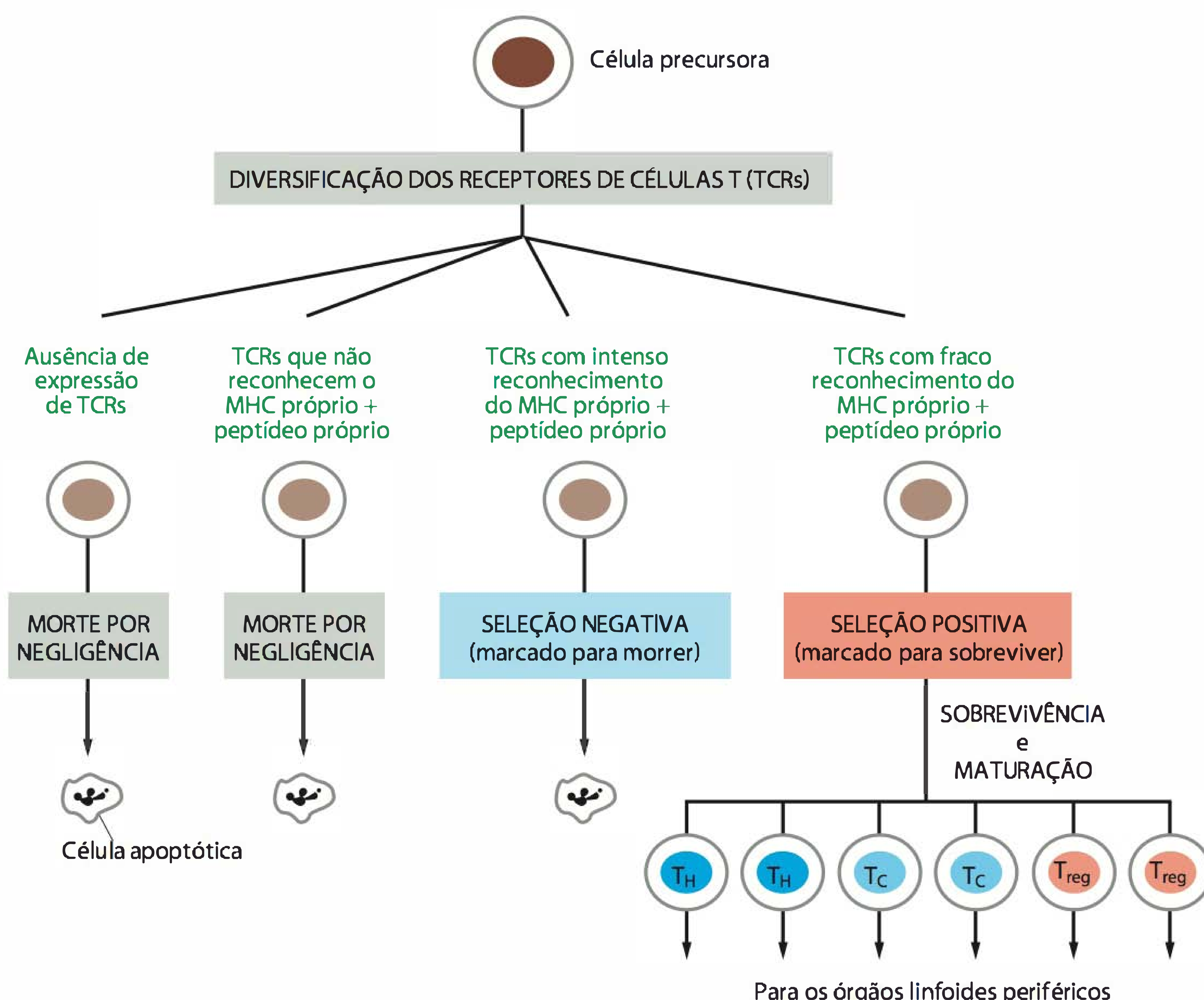


Figura 25-64 Resultado da seleção positiva e negativa no timo. As células com TCRs que podem ser capazes de responder a peptídeos estranhos em associação a proteínas próprias do MHC (ver Figura 25-63) são positivamente selecionadas: elas sobrevivem, amadurecem e migram para os órgãos linfoides periféricos. Todas as outras células sofrem apoptose, por não expressarem o TCR que reconhece a proteína do próprio MHC ligada a um peptídeo próprio ou por reconhecerem tais complexos tão bem que sofrem seleção negativa.

Embora não apresentado, as células que sofrem seleção positiva inicialmente expressam tanto os correceptores CD4 como os CD8. Durante o processo de seleção positiva, as células T auxiliares (T_H), as células T citotóxicas (T_C) e as células T reguladoras (T_{reg}) divergem parcialmente por mecanismos que não são bem compreendidos. Neste processo, as células auxiliares e as células reguladoras desenvolvem-se e expressam CD4, mas não CD8, e reconhecem peptídeos estranhos em associação às proteínas do MHC de classe II, enquanto as células citotóxicas desenvolvem-se e expressam CD8, mas não CD4, e reconhecem peptídeos estranhos em associação às proteínas do MHC de classe I.

MHC; ele tem que selecionar negativamente as células T citotóxicas e auxiliares que poder tornar-se ativadas pelas próprias proteínas do MHC associadas a peptídeos próprios nos órgãos linfoides periféricos. Assim, a meta desejada é alcançada (1) assegurando-se a morte das células T auxiliares e citotóxicas que se ligam *fortemente* ao complexo peptídeo-MHC próprio no timo, enquanto (2) promove-se a sobrevivência das células com ligações fracas e (3) permite-se a morte daquelas que absolutamente não fazem ligações. O processo 2 constitui a principal parte da seleção positiva recém-discutida. O processo 1 é chamado de **seleção negativa**, ou deleção clonal no timo (ver Figura 25-13). Nos processos 1 e 3, as células morrem por apoptose (**Figura 25-64**).

A evidência mais convincente da seleção negativa no timo é proveniente, uma vez mais, de experimentos realizados com camundongos transgênicos. O estabelecimento de transgênicos para o TCR que reconhecem antígenos peptídicos específicos de machos, por exemplo, resulta em um grande número de células T maduras expressando o receptor transgênico no timo e nos órgãos linfoides de uma fêmea, a qual não expressa o peptídeo. No entanto, poucos foram encontrados no camundongo macho, no qual as células T morrem no timo antes de terem a chance de maturar. Assim como na seleção positiva, a seleção negativa requer a interação de TCRs e correceptores CD4 ou CD8 com a proteína adequada do MHC. Ao contrário da seleção positiva das células T auxiliares e citotóxicas em desenvolvimento, que ocorre principalmente na superfície das células epiteliais do córtex tímico, a seleção negativa destas células ocorre na medula tímica, principalmente na superfície das células dendríticas e dos macrófagos, que são descendentes de células que migraram da medula óssea para o timo.

Algumas proteínas órgão-específicas são expressas ectopicamente na medula tímica

Após a descoberta da seleção negativa das células T em desenvolvimento no timo, os imunologistas se perguntaram como as células T evitam as respostas contra as proteínas próprias que não estão presentes no timo. Uma explicação é que algumas células T autorreativas são deletadas ou funcionalmente inativadas após deixarem o timo. Isto ocorre quando as células reconhecem os próprios peptídeos ligados às proteínas do MHC na superfície das células dendríticas que não foram ativadas pelos patógenos e não fornecem os sinais ativadores adequados. Isso também pode ocorrer com as células T reguladoras na periferia que impedem a atividade de algumas células T efetoras autorreativas. Esses dois mecanis-

mos são exemplos de *tolerância periférica*, porque, diferentemente da deleção das células T no timo (*tolerância central*), eles ocorrem após as células T deixarem o timo (ver Figura 25-13).

Recentemente, uma terceira explicação foi descoberta. Uma classe especial de células epiteliais da medula tímica expressa ectopicamente proteínas que se acreditava previamente serem expressas somente fora do timo, em órgãos específicos: a insulina, por exemplo, a qual é produzida por células β do pâncreas, também é produzida por uma pequena subpopulação de células epiteliais da medula tímica. A expressão ectópica de muitas dessas proteínas, incluindo a insulina, depende de uma proteína nuclear denominada *reguladora autoimune* (*AIRE*, *autimmune regulater*), a qual é especificamente expressa nas mesmas células epiteliais da medula tímica. A inativação do gene que codifica a AIRE em camundongos ou no homem resulta em uma doença auto-imune de multiplos órgãos, indicando a importância da tolerância central dependente da AIRE para, pelo menos, algumas proteínas próprias órgão-específicas. Ainda é um mistério a forma pela qual a AIRE promove esta expressão ectópica de genes na medula tímica.

As funções das proteínas do MHC explicam seu polimorfismo

O papel das proteínas do MHC na ligação com peptídeos estranhos e na apresentação destes às células T fornece uma explicação para o alto polimorfismo observado nestas proteínas. Na disputa evolutiva entre os patógenos e o sistema imune adaptativo, os patógenos tendem a mudar seus antígenos para evitar a associação com as proteínas do MHC. Quando um patógeno tem sucesso, pode se alastrar em uma população, causando uma epidemia. Nesta circunstância, os poucos indivíduos que possuem uma nova proteína do MHC que pode se associar ao antígeno alterado de um patógeno têm uma grande vantagem seletiva. Além disso, os indivíduos que possuem dois alelos quaisquer diferentes do lócus do MHC (heterozigoto) apresentam uma chance muito maior de serem resistentes a essa infecção do que aqueles que apresentam alelos idênticos do lócus, uma vez que os primeiros apresentam uma capacidade aumentada para apresentar peptídeos de uma ampla gama de patógenos. Assim, este tipo de seleção tende a promover e manter a alta diversidade das proteínas do MHC na população. Fortes evidências para a hipótese de que as doenças infecciosas ocasionam o alto polimorfismo do MHC vêm de estudos realizados no oeste da África. Nesta região, foi demonstrado que indivíduos com alelos do MHC específicos apresentavam suscetibilidade reduzida a uma forma grave de malária. O alelo é encontrado em 25% da população da África Ocidental, onde essa forma de malária é comum, embora seja raro nas outras regiões.

Se a alta diversidade do MHC significa alta resistência a infecções, por que possuímos tão poucos genes que codificam para estas moléculas? Por que não desenvolvemos estratégias para aumentar a diversidade das proteínas do MHC – por meio do *splicing* alternativo do RNA, por exemplo, ou por mecanismos de recombinação genética que são utilizados para diversificar os anticorpos e os TCRs? É provável que existam limites, pois a cada vez que uma nova proteína do MHC é adicionada ao repertório, é necessário eliminar as células T que reconhecem os peptídeos a elas associados, para manter a tolerância. A eliminação dessas células T retiraria a vantagem de introduzir-se uma nova proteína do MHC. Assim, acredita-se que o número de proteínas do MHC que expressamos pode representar um equilíbrio entre a vantagem de apresentar um amplo espectro de peptídeos estranhos para as células T e a desvantagem de restringir severamente o repertório de células T durante a seleção negativa no timo. Esta explicação tem como base estudos de modelagem molecular.

Resumo

Existem três principais classes de células T funcionalmente distintas. As células T citotóxicas matam células infectadas diretamente induzindo-as a entrar em processo de apoptose. As células T auxiliares auxiliam na ativação de células B para produzir respostas de anticorpos, de células T citotóxicas para matar suas células-alvo, de células dendríticas para estimular uma resposta de células T e de macrófagos mais potentes para destruir micro-organismos que os tenham invadido ou que tenham sido por eles internalizados. Finalmente, as células T reguladoras impedem a atividade das células T efetoras e das células dendríticas, sendo cruciais para a autotolerância.

Todos os tipos de células T expressam receptores semelhantes a anticorpos (TCRs) de superfície celular, os quais são codificados por genes que são rearranjados a partir de múltiplos segmentos gênicos durante o desenvolvimento da célula T no timo. Os TCRs reconhecem fragmentos de proteínas

estranhas que são apresentados na superfície da célula hospedeira em associação a proteínas do MHC. As células T são ativadas nos órgãos linfoides periféricos por células apresentadoras de antígeno, as quais expressam complexos peptídeo-MHC, proteínas coestimuladoras e várias moléculas de adesão célula-célula em sua superfície. As mais potentes células apresentadoras de antígeno são as células dendríticas, as quais são especializadas na apresentação de antígenos estranhos e são necessárias à ativação das células T virgens.

As proteínas do MHC de classe I e de classe II desempenham um papel crucial na apresentação de antígenos proteicos estranhos para as células. As proteínas do MHC de classe I apresentam antígenos estranhos para as células T citotóxicas, e as proteínas de classe II, para as células T auxiliares e reguladoras. Enquanto as proteínas de classe I são expressas por quase todas as células de vertebrados, as proteínas de classe II normalmente estão restritas aos tipos celulares que interagem com as células T auxiliares, como as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B.

Ambas as classes de proteínas do MHC possuem uma única fenda de ligação ao peptídeo, à qual se ligam os pequenos fragmentos peptídicos derivados das proteínas. Cada proteína do MHC pode ligar-se a um grande grupo de peptídeos, os quais são constantemente produzidos intracelularmente por meio da degradação de proteínas. Entretanto, as proteínas do MHC de classe I geralmente ligam fragmentos produzidos no citosol, enquanto as proteínas do MHC de classe II ligam os fragmentos produzidos nos compartimentos endocíticos. Após terem sido formados no interior da célula-alvo, os complexos peptídeo-MHC são transportados para a superfície celular. Os complexos que contiverem o peptídeo derivado de uma proteína estranha são reconhecidos pelos TCRs, que interagem tanto com o peptídeo como com as paredes da fenda de ligação ao peptídeo da molécula do MHC. As células T também expressam os correceptores CD4 e CD8, que reconhecem, simultaneamente, regiões não-polimórficas das proteínas do MHC na célula apresentadora de antígeno ou na célula-alvo. As células T auxiliares e as células reguladoras expressam o CD4, que reconhece proteínas do MHC de classe II, enquanto as células T citotóxicas expressam o CD8, que reconhece proteínas do MHC de classe I.

A combinação dos processos de seleção positiva e negativa atua durante o desenvolvimento das células T no timo para moldar o repertório dos TCRs. Estes processos auxiliam a garantir que somente células T com receptores de superfície potencialmente úteis sobrevivam e maturem, enquanto todas as outras morrem por apoptose. Primeiro, as células T que podem responder aos peptídeos complexados com as proteínas do próprio MHC são positivamente selecionadas. Subsequentemente, as células T desse grupo que reagem fortemente com os peptídeos próprios complexados com proteínas do próprio MHC são eliminadas. As células T auxiliares e citotóxicas que deixam o timo com receptores que podem reagir com autoantígenos são eliminadas, funcionalmente inativadas ou suprimidas quando reconhecem autoantígenos em células dendríticas não-ativadas.

CÉLULAS T AUXILIARES E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS

As células T auxiliares são indiscutivelmente as células mais importantes na imunidade adaptativa, uma vez que são necessárias à maioria das respostas imunes adaptativas. Elas não só auxiliam na ativação das células B para secretarem anticorpos, mas também auxiliam os macrófagos a destruir os patógenos internalizados e auxiliam as células T citotóxicas ativadas a matar as células-alvo infectadas, estimulando as células dendríticas a ativarem células T citotóxicas virgens mais eficientemente. Conforme demonstrado de forma dramática nos pacientes portadores de AIDS, sem células T auxiliares não podemos nos defender contra vários micróbios que normalmente são inofensivos.

As células T auxiliares, no entanto, podem atuar somente quando estimuladas a tornarem-se células efetoras. As células auxiliares virgens são ativadas na superfície celular das células dendríticas, as quais são ativadas durante a resposta imune inata em decorrência de uma infecção. As respostas inatas, principalmente via células dendríticas ativadas, também determinam em que tipo de célula efetora a célula T vai se transformar, e, assim, determinam a natureza da resposta imune adaptativa decorrente.

Nesta seção final, discutiremos os múltiplos sinais que auxiliam na ativação de uma célula T e como uma célula T auxiliar, uma vez ativada, torna-se uma célula efetora e auxilia a ativação de outras células. Também consideraremos como as respostas imunes inatas determinam a natureza das respostas adaptativas por meio da estimulação de células T auxiliares para diferenciarem-se em diferentes tipos de células efetoras. Finalmente, discutiremos a provável origem evolutiva da superfamília de proteínas Ig, as quais incluem proteínas do MHC, anticorpos e TCRs.

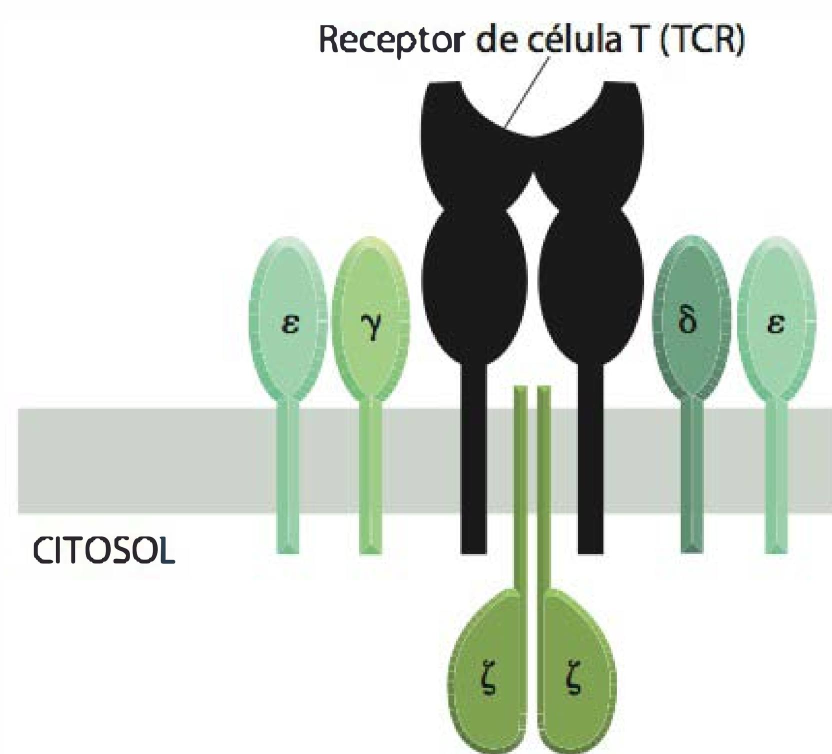


Figura 25-65 O TCR e seu complexo CD3 associado. Todas as cadeias polipeptídicas do CD3 (representadas em *verde*), exceto pelas cadeias ζ (zeta), possuem um domínio extracelular semelhante a Igs, sendo, assim, membros da superfamília das Igs. Todos os quatro tipos de cadeias polipeptídicas CD3 formam heterodímeros ou homodímeros (como representado) e são rapidamente fosforilados nas tirosinas de seus domínios intracelulares após a ativação do TCR (não-apresentado). Algumas dessas tirosinas fosforiladas atuam como sítios de ancoramento para as proteínas de sinalização intracelular, como apresentado na Figura 25-66.

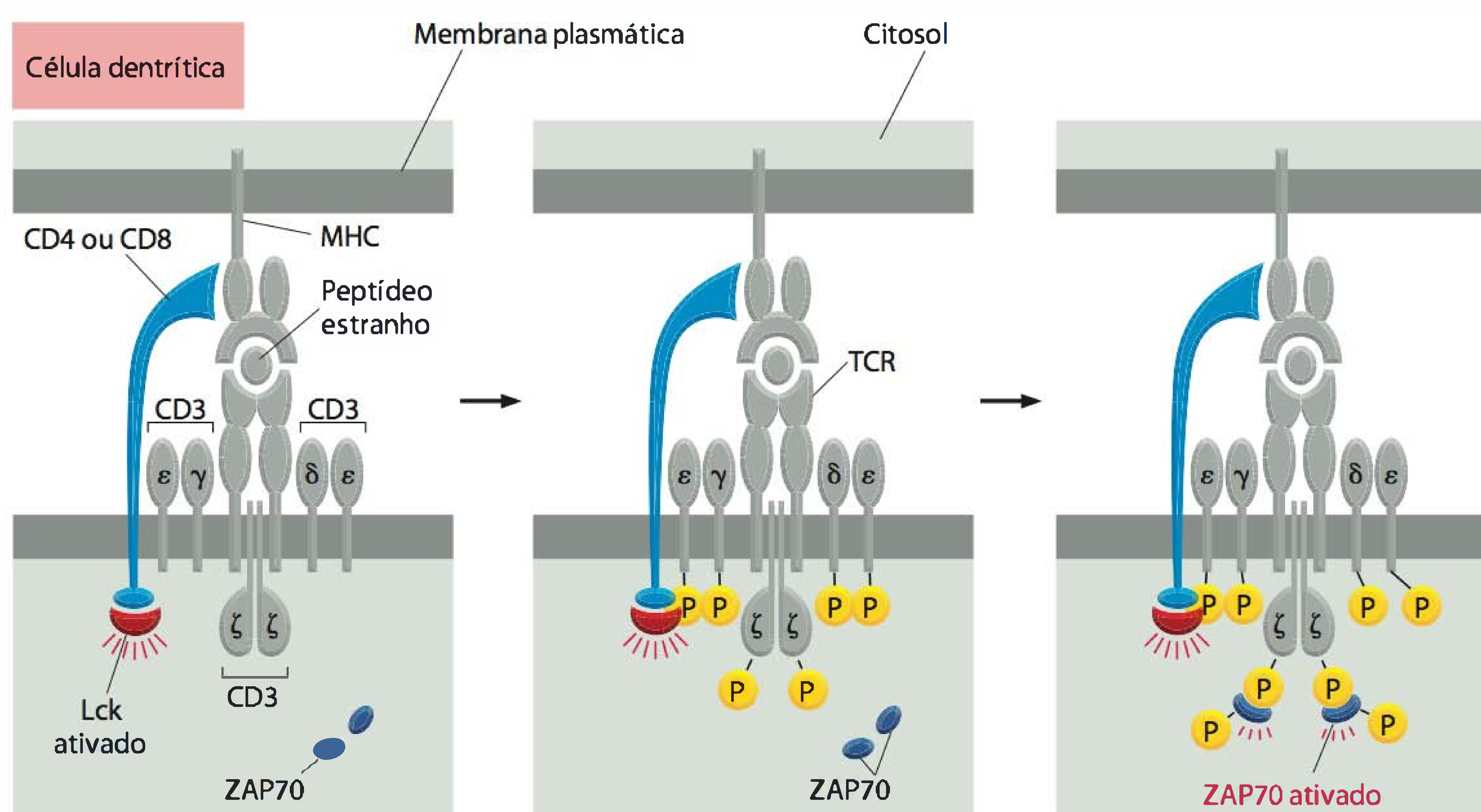
As células dendríticas ativadas usam múltiplos mecanismos para ativar as células T

Quando uma célula dendrítica é ativada durante uma infecção, ela muda sua forma e seu comportamento migratório, aumenta as quantidades de proteínas do MHC apresentadas na sua superfície, ativa suas vias de processamento do antígeno e inicia a produção de proteínas de superfície celular coestimuladoras e citocinas secretadas (incluindo quimiocinas). As mudanças dramáticas também capacitam as células dendríticas a migrarem para os órgãos linfoides periféricos e ativarem as células T a tornarem-se células efetoras.

Inicialmente, as células dendríticas sinalizam para as células T através dos receptores de células T (TCRs), os quais ligam peptídeos estranhos complexados a proteínas do MHC de classe II na superfície da célula dendrítica oposta. Entretanto, o TCR não atua sozinho na transmissão do sinal para a célula T. Ele é auxiliado por um complexo de proteínas transmembrana invariáveis denominadas **CD3**, às quais o TCR se associa (**Figura 25-65**). Além disso, o correceptor CD4 em uma célula T auxiliar ou reguladora e o correceptor CD8 em uma célula T citotóxica se ligam à mesma proteína do MHC, à qual o TCR se ligou, e também desempenham um papel crucial na transmissão do sinal, como ilustrado na **Figura 25-66**.

Além da sinalização através do TCR e suas proteínas associadas e correceptores, as proteínas coestimuladoras da superfície das células dendríticas ligam-se a outros receptores da superfície das células T. Entre as proteínas coestimuladoras das células dendríticas ativadas, estão as **proteínas B7**, as quais são reconhecidas pela proteína coreceptora **CD28** da superfície da célula T. Uma vez ativada, a própria célula T expressa uma proteína coestimuladora denominada *ligante CD40*, a qual atua no *receptor CD40* da superfície da célula dendrítica

Figura 25-66 Os eventos de sinalização iniciados pela ligação dos complexos peptídeo-MHC aos TCRs. Quando os TCRs (e o CD3) são agregados pela ligação com os complexos peptídeo-MHC em uma célula dendrítica, as moléculas CD4 das células T auxiliares ou as moléculas CD8 das células T citotóxicas também são agregadas a eles, ligando-se a porções invariáveis da mesma molécula do MHC de classe II ou de classe I, respectivamente, na célula dendrítica. Isto faz com que a tirosina-cinase Lck citoplasmática, semelhante à Src, aproxime-se e ative o complexo. A ativação da Lck também depende de uma proteína tirosina fosfatase transmembrana da superfície das células T denominada CD45, a qual remove as fosfatases inibidoras da Lck (não-apresentada). Uma vez ativada, a Lck inicia a cascata de fosforilação das tirosinas, fosforilando as tirosinas de toda a cadeia do complexo CD3. As fosfotirosinas da cadeia ζ do complexo CD3 agora atuam como sítios de ancoramento para outras tirosina-cinases citoplasmáticas denominadas *ZAP70*. A Lck fosforila e então ativa a ZAP70. Apesar de não estar representada, a ZAP-70 fosforila tirosinas na cauda de outras proteínas transmembrana (denominadas LAT), que irão funcionar como sítios de ancoramento para uma série de proteínas adaptadoras e enzimas. Estas proteínas auxiliam na transmissão de sinais para o núcleo e para outras partes da célula pela ativação do fosfolipídio inositol e da via de sinalização das MAP-cinases (discutido no Capítulo 15), assim como as GTPases da família Rho, que regulam o citoesqueleto de actina (discutido no Capítulo 16).



para aumentar e manter a ativação da célula dendrítica, criando uma associação positiva que amplifica a resposta da célula T.

Uma vez ligada à superfície da célula dendrítica, uma célula T aumenta a força de ligação pela ativação da proteína de adesão integrina, a qual tende a ligar-se mais fortemente ao seu ligante semelhante a Igs da superfície da célula dendrítica. Esse aumento da adesão permite que a célula T permaneça ligada à célula apresentadora de antígeno por tempo suficiente para tornar-se ativada.

Esta sinalização inicial através de TCR e proteínas associadas ativa a reunião de uma **sinapse imunológica** na interface entre a célula T e a célula dendrítica. Nessas estruturas-alvo, os TCRs e suas subunidades do CD3 associadas, correceptores e proteína de sinalização intracelular estão agrupadas no centro, com as proteínas de adesão célula-célula formando um anel periférico. Estruturas similares se formam quando uma célula T efetora ou citotóxica interage com a célula-alvo. Nem todos os TCRs das sinapses se ligam aos peptídeos estranhos complexados com a proteína do MHC; alguns se ligam aos peptídeos próprios ligados à proteína do MHC, e esses TCRs também contribuem para a ativação da célula T (lembre que todas as células T são inicialmente selecionadas de forma positiva no timo por seu fraco reconhecimento de tais complexos peptídeo MHC-próprio.

A ação combinada dos vários sinais discutidos estimula a célula T a proliferar e a começar a diferenciar-se em célula efetora por meio de um mecanismo indireto curioso. Os sinais estimulam a autoproliferação e a diferenciação das células T, que são induzidas a secretar uma citocina denominada **interleucina-2** (**IL2**) e, simultaneamente, a sintetizar receptores de superfície celular de alta afinidade, com os quais se ligam. A ligação da IL2 aos receptores de IL2 ativa a via de sinalização intracelular, que ativa os genes que auxiliam as células T a proliferarem e a diferenciarem-se em células T efetoras (**Figura 25-67**). Embora algumas células T não produzam IL2, enquanto elas estiverem ativadas pelo antígeno e, portanto, expressarem o receptor IL2, elas podem auxiliar a proliferação e a diferenciação por IL2 produzida por células T ativadas vizinhas. A IL2 também desempenha um papel importante no desenvolvimento das células T reguladoras no timo, porque sem ela essas células não se desenvolvem.

As células dendríticas não são apenas importantes para a ativação das células T, elas também são importantes para a inativação ou a eliminação de células T autorreativas. Quando as células T reconhecem complexos peptídeo MHC-próprios na superfície das células dendríticas que não foram ativadas por um patógeno, elas são inativadas, de modo que não respondem mais ao complexo peptídeo-MHC, mesmo em células dendríticas ativadas, ou proliferam rapidamente e então morrem por apoptose. Esses dois mecanismos de deleção clonal ou inativação clonal contribuem para a autotolerância periférica. As células dendríticas também contribuem para a autotolerância periférica ativando células T reguladoras, as quais então suprimem a atividade de células T efetoras autorreativas, embora os detalhes de como as células dendríticas ativam seletivamente as células T reguladoras ainda sejam pouco entendidos (ver Figura 25-13).

A ativação das células T é controlada por retroalimentação negativa

Durante os múltiplos passos da ativação da célula T, a célula passa a expressar uma proteína de superfície denominada *CTLA4*, que atua inibindo a sinalização intracelular. Esta proteína assemelha-se ao CD28, e, como o CD28, liga-se a proteínas B7 da superfície das células dendríticas ativadoras (ver Figura 25-67). O CTLA4 se liga a B7 com afinidade muito superior do

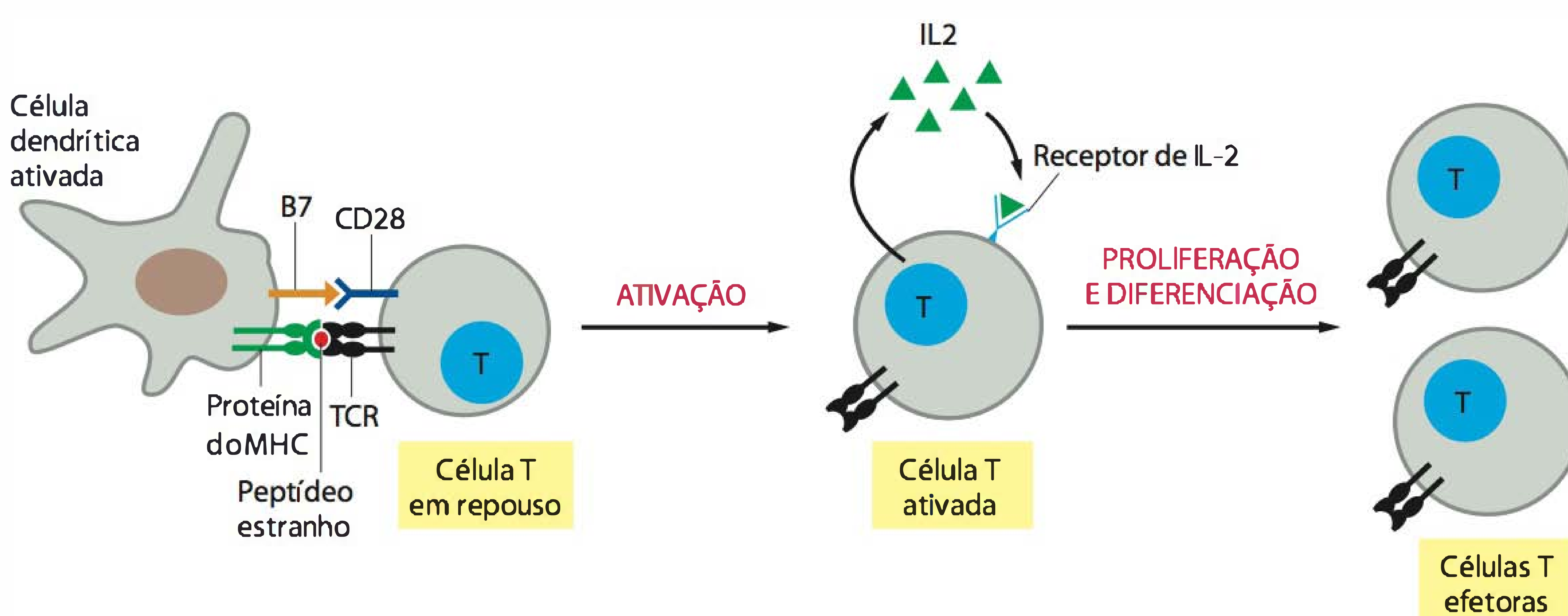


Figura 25-67 O estímulo das células T pela IL-2. Este modelo pode ser aplicado para as células T auxiliares ou citotóxicas, pelo menos em cultura. A combinação dos complexos peptídeo-MHC e a molécula coestimuladora B7 (seja B7-1 ou B7-2, também denominadas CD80 e CD86, respectivamente) na superfície de uma célula dendrítica ativa auxilia na estimulação da célula T em repouso para produzir receptores de alta afinidade para a IL-2 e secretar IL-2. A ligação da IL-2 com seus receptores auxilia na estimulação da célula T, que irá proliferar e diferenciar-se em células efetoras. As várias proteínas associadas aos TCRs (ver Figura 25-65) não estão representadas.

Tabela 25-3 Algumas proteínas acessórias na superfície das células T

PROTEÍNA*	SUPERFAMÍLIA	EXPRESSA EM	LIGANTE SOBRE A CÉLULA-ALVO	FUNÇÕES
Complexo CD3	Ig (exceto para ζ)	Todas as células T	–	Auxilia na transdução de sinais, quando os complexos antígeno-MHC ligam-se aos TCRs; auxilia no transporte dos TCRs para a superfície celular
CD4	Ig	Células T auxiliares e células T reguladoras	MHC de classe II	Promove a adesão entre as células dendríticas e as células-alvo
CD8	Ig	Células T citotóxicas	MHC de classe I	Promove a adesão entre as células dendríticas e as células-alvo infectadas; sinalização das células T
CD28	Ig	A maioria das células T	Proteínas B7 (CD80 e CD86)	Auxilia na ativação das células T
CTLA4	Ig	Células T ativadas	Proteínas B7 (CD80 e CD86)	Inibe a ativação das células T
Ligante CD40	família do ligante Fas	Células T auxiliares efetoras	CD40	Proteína coestimuladora que auxilia na ativação de macrófagos, células B e células dendríticas

*CD significa grupo de diferenciação, de *cluster of differentiation*, uma vez que cada proteína CD foi originalmente definida como "antígeno de diferenciação" reconhecido por múltiplos anticorpos monoclonais. Sua identificação resultou de estudos em grande escala realizados em colaboração nos quais centenas desses anticorpos, gerados em vários laboratórios, foram comparados e determinados em poucos grupos (*clusters*), cada um reconhecendo uma única proteína de superfície celular. Desde os estudos iniciais, mais de 240 proteínas CD já foram identificadas.

que ao CD28 e, quando esta interação ocorre, a atividade de ativação do CD28 é bloqueada, fornecendo uma retroalimentação negativa que interrompe o processo de ativação, colocado-o em xeque. Assim, camundongos com o gene *Ctla4* rompido morrem com acúmulo maciço de células T ativadas.

A **Tabela 25-3** resume alguns dos correceptores e proteínas acessórias encontradas na superfície das células T discutidas neste capítulo.

A maioria das células T (e B) efetoras produzidas durante uma resposta imune precisa ser eliminada após ter cumprido seu trabalho. Embora a maioria das células morra por apoptose, os mecanismos extracelulares responsáveis por sua eliminação ainda não são bem compreendidos. Uma possibilidade é que, à medida que os níveis de antígenos e a resposta diminuem, as células T efetoras deixam de ser estimuladas pelos antígenos e pelas citocinas que elas necessitam para sobreviver, de modo que somente as células de memória e algumas células efetoras de vida longa sobrevivem. A morte das células T efetoras, entretanto, não ocorre somente pela falta de sinais de sobrevivência. No caso das células T citotóxicas efetoras, por exemplo, a citocina *interferon-γ* (*IFNγ*) desempenha um importante papel na indução da morte celular. Como as células T citotóxicas efetoras produzem IFNγ (ver Figura 25-60), esta é outra fonte de retroalimentação negativa.

Antes de considerar como das células T auxiliares efetoras potencializam a ativação dos macrófagos e das células B, precisamos discutir as duas subclasses funcionalmente diferentes de células T auxiliares efetoras, as células T_H1 e T_H2, e como elas são geradas.

A subclasse de célula T auxiliar efetora determina a natureza da resposta imune adaptativa

Quando uma célula dendrítica ativada ativa uma célula T auxiliar virgem nos órgãos linfoides periféricos, a célula T pode diferenciar-se em célula T auxiliar efetora T_H1 ou T_H2. O resultado depende da afinidade do TCR da célula dendrítica pelo complexo peptídeo-MHC, da densidade do complexo na superfície da célula dendrítica e da natureza da célula dendrítica.

As duas principais subclasses de células T auxiliares efetoras podem ser distinguidas por meio das citocinas que secretam. As **células T_H1** secretam *IFNγ* e o *fator de necrose tumoral-α* (*TNF-α*, *tumor necrosis factor-α*), que ativarão os macrófagos para matarem micróbios localizados dentro dos fagossomos dos macrófagos. Elas irão também ativar as células T citotóxicas para matar em células infectadas. Desse modo, as células T_H1 irão defender um organismo, principalmente, contra patógenos intracelulares. Entretanto, elas também estimulam as células B a secretar subclasses específicas de anticorpos do tipo IgG, os quais podem revestir os micróbios extracelulares e ativar o complemento, auxiliando na eliminação de micróbios extracelulares.

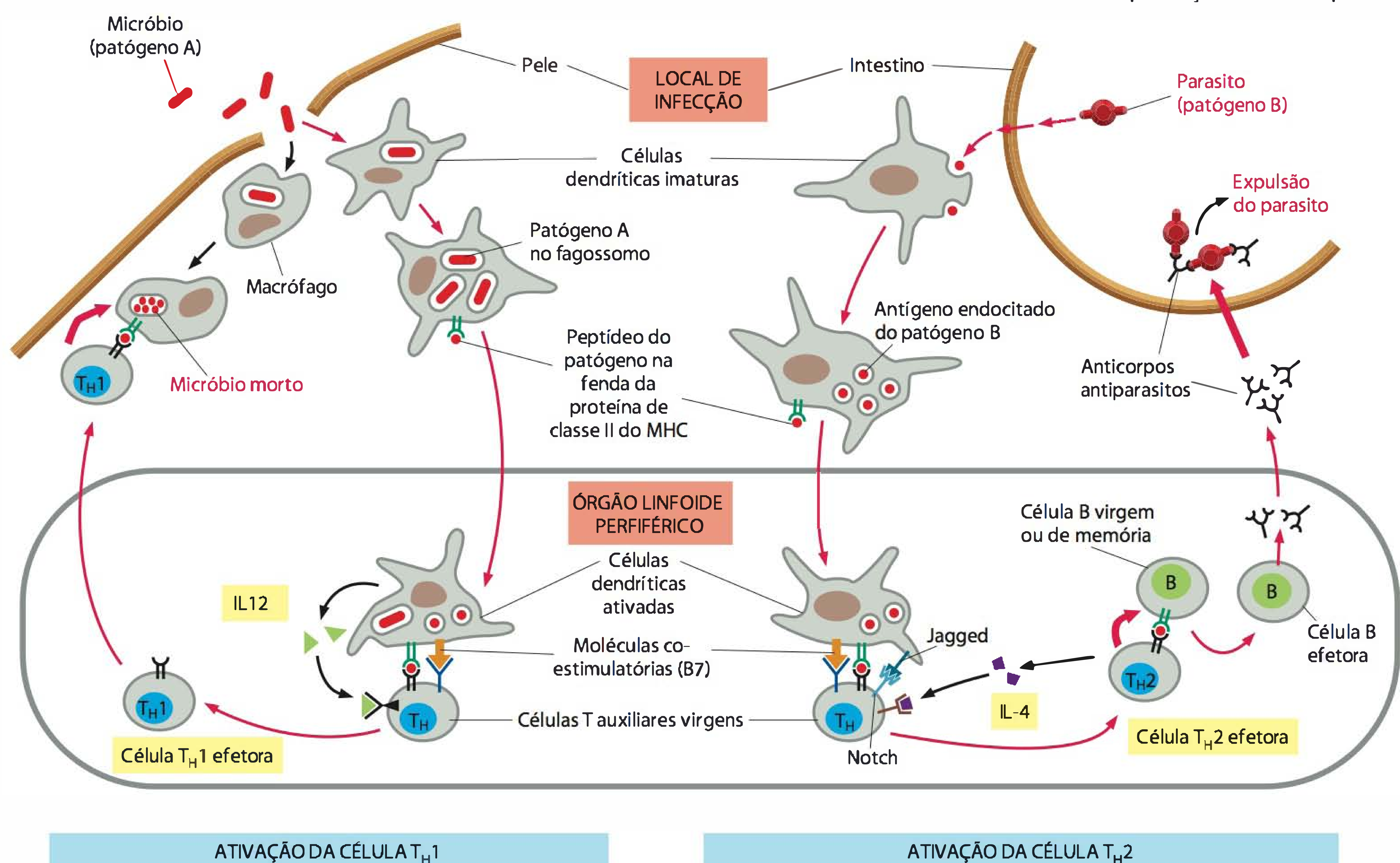
As **células T_H2**, por outro lado, defendem o organismo, principalmente, contra patógenos extracelulares, incluindo micróbios e parasitas extracelulares. Elas secretam uma variedade de citocinas, incluindo as *interleucinas 4 e 10* (*IL4 e IL10*) e irão estimular as células B a produzir a maioria das classes de anticorpos, incluindo IgM, IgA, IgE e algumas subclasses de IgG. Alguns desses anticorpos se ligam a mastócitos, a basófilos e a eosinófilos. Quando ativadas pela ligação do antígeno, estas células liberam localmente mediadores que causam espirros, tosse ou diarreia e auxiliam na expulsão de micróbios extracelulares e de parasitas maiores das superfícies epiteliais do corpo.

Assim, a decisão das células T auxiliares virgens de diferenciarem-se em células efetoras T_H1 ou T_H2 influencia o tipo de resposta imune adaptativa que será montada contra o patógeno, se este será dominado pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos. As citocinas específicas presentes durante o processo de ativação das células T auxiliares influenciam no tipo de célula efetora que será produzida. Algumas bactérias intracelulares, por exemplo, estimulam as células dendríticas a produzir *IL12*, a qual induz o desenvolvimento das células T_H1 e, portanto, a ativação de macrófagos. Conforme esperado, os camundongos deficientes em IL12 ou seu receptor são mais suscetíveis a infecções bacterianas do que os camundongos normais. Vários parasitas, protozoários e vermes, ao contrário, estimulam células dendríticas a expressar a *proteína Jagged* em sua superfície. A Jagged é um ligante ativador do receptor Notch (discutido no Capítulo 15) da superfície das células T, e a sinalização resultante de Notch auxilia na indução do desenvolvimento de células T_H2 e na produção de IL4. As células T_H2 e a IL4 estimulam a produção de anticorpos e a ativação de eosinófilos, ocasionando a expulsão do parasita (**Figura 25-68**). IL4 também gera uma retroalimentação positiva como potente indutor do desenvolvimento das células T_H2.

Uma vez formadas as células T_H1 ou T_H2 efetoras, ocorre a inibição da diferenciação do outro tipo de célula T auxiliar. O IFNγ produzido pelas células T_H1 inibe o desenvolvimento das células T_H2, enquanto a IL4 e a IL10, produzidas pelas células T_H2, inibem o desenvolvimento das células T_H1. Assim, no decorrer das respostas, ocorre um reforço da escolha inicial pelo seu próprio efeito na resposta de outras células T vizinhas.

Indivíduos infectados com o *Mycobacterium leprae*, a bactéria que causa a lepra, demonstram a importância da decisão T_H1/T_H2. Esta bactéria replica, principalmente, dentro de macrófagos e causa duas formas de doença, dependendo principalmente do perfil genético do indivíduo infectado. A forma *tuberculoide* da doença acomete alguns pacientes. As

Figura 25-68 A ativação das células T_H1 e T_H2. A diferenciação das células T auxiliares virgens em células efetoras T_H1 ou T_H2 determina a natureza das respostas imunes adaptativas subsequentes. Para uma célula T auxiliar virgem tornar-se uma célula T_H1 ou T_H2, depende, principalmente, das proteínas sinalizadoras presentes no momento em que uma célula dendrítica ativada em um órgão linfoide periférico estimula uma célula T auxiliar. Os tipos de proteínas sinalizadoras produzidas dependem do microambiente e da natureza do patógeno que ativou a célula dendrítica no local de infecção. A IL12 secretada pelas células dendríticas ativadas promove o desenvolvimento de células T_H1. Os dois ligantes transmembrana, Notch e Jagged, da superfície das células dendríticas ativadas e a IL4 produzida por basófilos, mastócitos e células T_H2 promovem o desenvolvimento em células T_H2. Nesta figura, a célula T_H1 efetora, produzida nos órgãos linfoides periféricos, migra para o local de infecção e auxilia o macrófago a matar os micróbios que foram fagocitados. A célula T_H2 efetora permanece nos órgãos linfoides e auxilia na ativação de células B para produzirem anticorpos contra o parasita. Além da ligação dos anticorpos aos parasitas, os anticorpos ligam-se aos receptores Fc de mastócitos, basófilos e eosinófilos (ver Figura 25-27), os quais auxiliam na expulsão dos parasitas do intestino. Embora não esteja aqui representado, as células T_H1 também auxiliam na ativação das células B na produção de anticorpos.



células T_H1 desenvolvem-se e estimulam os macrófagos infectados a matar as bactérias. Isto induz uma reação inflamatória local, que danifica a pele e os nervos, o que resulta em uma doença crônica que progride lentamente, mas que não mata o hospedeiro. Diferentemente, em outros pacientes, ocorre a forma *lepromatosa* da doença. As células T_H2 desenvolvem-se e estimulam a produção de anticorpos. Como os anticorpos não podem atravessar a membrana plasmática para atacar a bactéria intracelular, a bactéria prolifera de forma descontrolada e eventualmente pode matar o hospedeiro. Por razões desconhecidas, há também uma redução geral da imunidade mediada por células T contra a maioria dos antígenos na forma lepromatosa da doença.

Células T auxiliares também podem desenvolver-se em um terceiro tipo de célula efetora, recentemente descrito, denominado *célula* T_H17, pois secreta a interleucina pró-inflamatória IL17. As células T_H17 auxiliam na defesa contra patógenos extracelulares, mas também desempenham um papel importante em muitas doenças autoimunes. Elas se desenvolvem quando algumas células T auxiliares são ativadas pelo antígeno na presença de TGFβ e de IL6.

As células T_H1 ativam macrófagos infectados e estimulam uma resposta inflamatória

Os macrófagos e as células dendríticas ingerem os patógenos e seus produtos no local de infecção. As células dendríticas tornam-se ativadas e carregam antígenos microbianos para os órgãos linfoides periféricos, onde, preferencialmente, induzem o desenvolvimento de células T_H1. As células T_H1 migram para os locais de infecção para auxiliar na ativação dos macrófagos infectados (ver Figura 25-68).

As células T_H1 efetoras usam dois sinais para ativar macrófagos específicos que reconhecem. Elas secretam IFNγ, que se liga aos receptores de IFNγ na superfície dos macrófagos, e apresentam a proteína coestimuladora, o ligante de CD40, que se liga ao CD40 no macrófago (**Figura 25-69**). (Veremos a seguir que o ligante de CD40 também é utilizado pelas células T auxiliares para ativar as células B.) Uma vez ativados, os macrófagos podem matar os micróbios em seus fagossomos: os lisossomos podem agora fusionar-se mais eficientemente com os fagossomos, desencadeando o ataque hidrolítico, e os macrófagos ativados produzem radicais de oxigênio e de óxido nítrico, ambos altamente tóxicos para os micróbios (conforme discutido no Capítulo 24). Como as células dendríticas também expressam o CD40, as células T_H1 nos locais de infecção também podem ativá-las, resultando em um aumento na produção de proteínas do MHC de classe II, nas proteínas coestimuladoras B7 e em várias outras citocinas, especialmente a IL12. Isto as torna mais efetivas na estimulação da diferenciação de células T auxiliares virgens em células T_H1 efetoras nos órgãos linfoides periféricos, proporcionando um sinal de retroalimentação positiva que aumenta a produção das células T_H1 e, consequentemente, a ativação de macrófagos.

As células efetoras T_H1 estimulam uma *resposta inflamatória* (discutido no Capítulo 24) por meio do recrutamento de mais células fagocíticas para o local de infecção. Elas o fazem de três maneiras:

1. Secretam citocinas que agem na medula óssea para aumentar a produção de monócitos (precursores de macrófagos que circulam no sangue) e de neutrófilos.
2. Secretam outras citocinas que ativam as células endoteliais revestindo os vasos sanguíneos locais a expressarem moléculas de adesão celular, fazendo com que os monócitos e os neutrófilos do sangue fiquem aderidos a elas.
3. Secretam quimiocinas que direcionam a migração de monócitos e de neutrófilos aderentes da corrente sanguínea para o local de infecção.

As células T_H1 também podem auxiliar na ativação das células T citotóxicas nos órgãos linfoides periféricos, produzindo quimiocinas que atraem as células citotóxicas para o local de interação entre as células T_H1 e as células dendríticas, enquanto, ao mesmo tempo, estimulam as células dendríticas a produzirem mais proteínas coestimuladoras. Além disso, as células T_H1 também podem auxiliar as células T citotóxicas efetoras a matar células-alvo infectadas por vírus, por meio da secreção de IFNγ, que aumenta a eficiência das células-alvo em processar os antígenos virais para apresentá-los às células T citotóxicas (ver Figura 25-60). Uma célula T_H1 efetora também pode matar diretamente algumas células por si só, incluindo linfócitos efetores: pela expressão do *ligante Fas* em sua superfície, essa célula pode

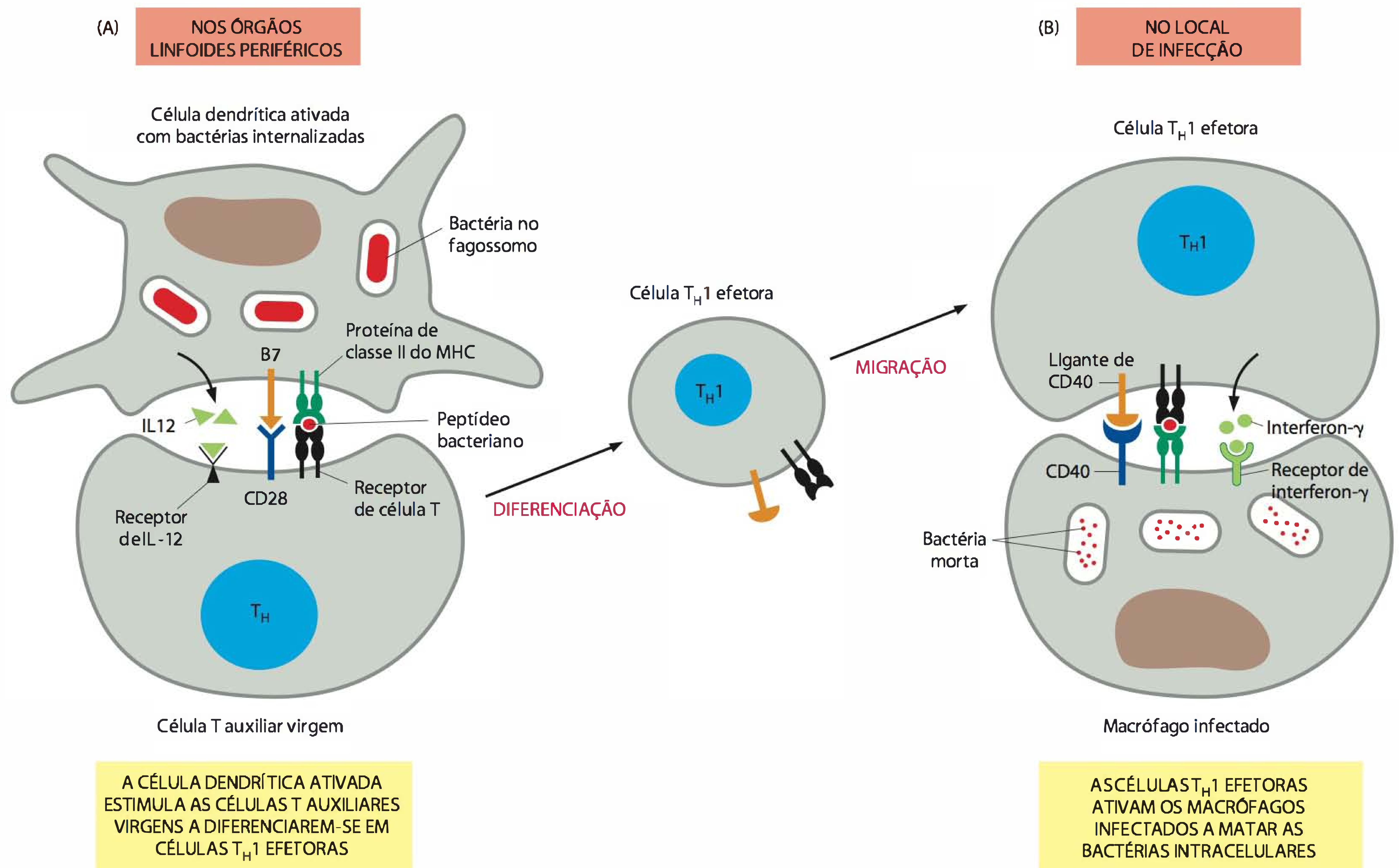


Figura 25-69 A diferenciação das células T_H1 e sua ação na ativação dos macrófagos. (A) Uma célula dendrítica ativada que tenha ingerido uma bactéria no local de infecção e migrado para os órgãos linfoides periféricos ativa células T auxiliares virgens a diferenciarem-se em células T_H1 efetoras. As células dendríticas usam a proteína coestimuladora de superfície celular como a proteína B7 e a IL12 secretada para induzir a diferenciação da célula T_H1. (B) Uma célula T efetora T_H1 que tenha migrado dos órgãos linfoides periféricos para o local de infecção, onde auxilia na ativação dos macrófagos para matarem as bactérias de seus fagossomos. Como indicado, ela realiza esta função por meio da secreção de IFNγ e do ligante CD40 ligado à membrana, que se liga ao CD40 do macrófago.

induzir as células T ou B efetoras que expressam a proteína de superfície celular *Fas* a sofrerem apoptose (ver Figura 25-47B).

Tanto as células T_H1 como as células T_H2 podem auxiliar na estimulação das células B para proliferarem e diferenciarem-se, trocando de classe de anticorpos, de IgM e IgD para uma das classes secundárias de anticorpos. Antes de analisarmos como as células T auxiliares fazem isso, precisamos discutir o papel do receptor de antígenos das células B na ativação das células B.

A ligação do antígeno aos receptores de células B é somente um dos passos da ativação das células B

Assim como as células T, as células B necessitam de múltiplos sinais extracelulares para tornarem-se ativadas. Um sinal é dado pela ligação do antígeno ao **receptor de célula B** (**BCR**, ***B cell receptor***), o qual, como discutido anteriormente, é uma molécula de anticorpo ligada à membrana plasmática. Normalmente, uma célula T fornece o outro sinal necessário. Se a célula B recebe somente o primeiro sinal, ela pode ser eliminada ou funcionalmente inativada, o que é uma das maneiras pelas quais as células B podem tornar-se tolerantes a seus próprios antígenos.

A sinalização por meio do BCR ocorre praticamente da mesma maneira que aquela apresentada para o TCR (ver Figura 25-66). O receptor é associado a cadeias proteicas invariantes, Igα e Igβ, que auxiliam a converter a ligação do antígeno com o BCR em sinais intracelulares. Quando os antígenos interligam os BCRs na superfície da célula B, isto faz com que eles se associem às proteínas de cadeias invariáveis para agruparem-se em pequenos agregados. Essa agregação promove a reunião de um complexo de sinalização intracelular e o início da cascata de fosforilação da tirosina (**Figura 25-70**).

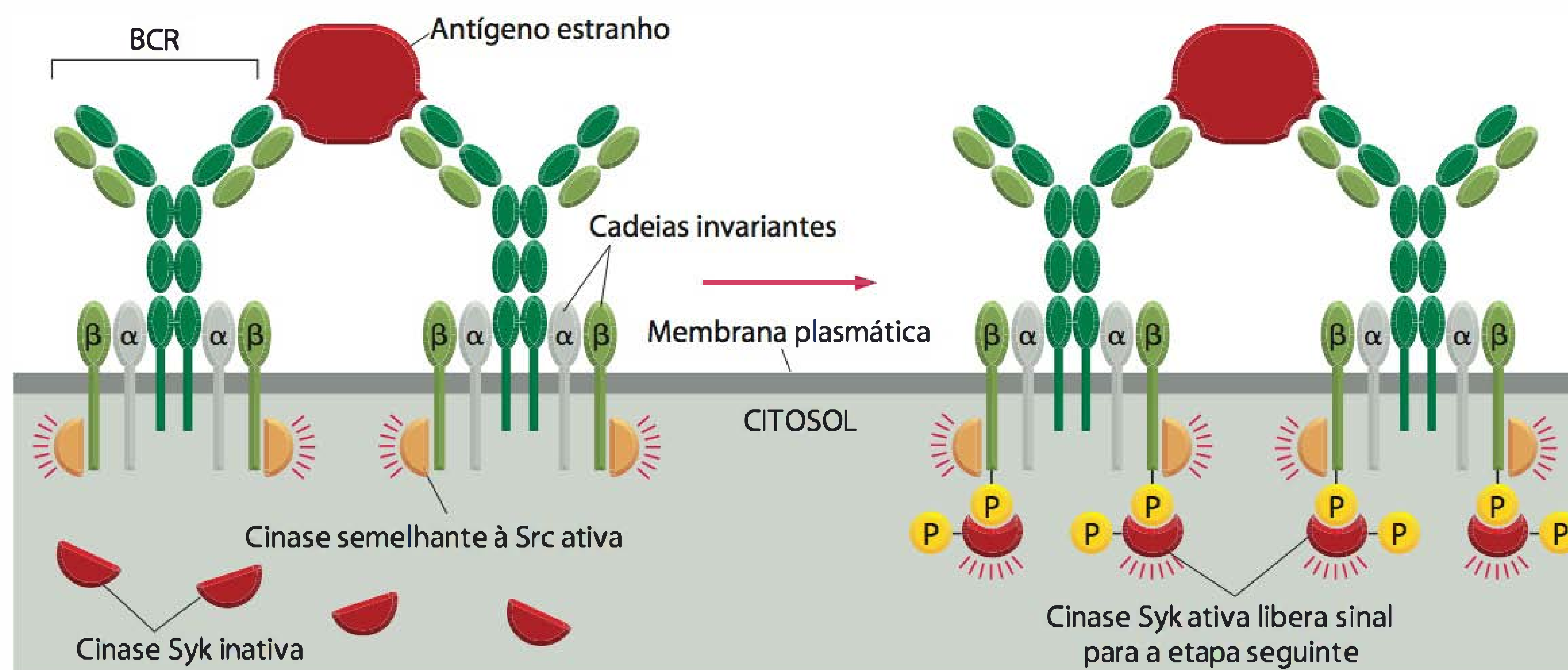


Figura 25-70 Eventos de sinalização iniciais nas células B ativados pela ligação do antígeno ao BCR. O antígeno interliga BCRs adjacentes, que são moléculas de anticorpos transmembrana. A interligação desses receptores faz com que se agreguem às suas cadeias invariantes associadas (Igα e Igβ). A tirosina-cinase citoplasmática semelhante a Src, que pode ser *Fyn*, *Blk* ou *Lyn*, associa-se à cauda citoplasmática da Igβ. Isso liga os grupos e fosforila as cadeias Igα e Igβ (para simplificar, somente a fosforização da Igβ está representada). No caso da ativação do TCR, a proteína tirosina fosfatase CD45 também é necessária para ativar as cinases Src (não-apresentado). As fosfotirosinas resultantes associadas às Igα e Igβ atuam como sítios de ancoramento para outra tirosina-cinase semelhante a Src, denominada *Syk*, que é homologa a ZAP70 das células T (ver Figura 25-66). Assim como a ZAP70, a Syk torna-se fosforilada e ativada, disparando o sinal para as etapas seguintes.

O complexo do correceptor que liga as proteínas do complemento aumenta bastante a eficiência da sinalização por BCR e suas cadeias invariáveis associadas. Se um micróbio ativa diretamente o sistema do complemento (discutido no Capítulo 24), as proteínas do complemento geralmente são depositadas na superfície do micróbio, aumentando imensamente a resposta da célula B aos micróbios. Quando um micróbio agrupa os BCRs da célula B, os *complexos de correceptores de ligação do complemento* se juntam a este agrupamento, aumentando a potência da sinalização pela ativação da cinase PI-3 (discutido no Capítulo 15) (**Figura 25-71**A). Conforme esperado, as respostas de anticorpo são muito reduzidas em camundongos que não possuem um dos componentes do complemento ou uma das subunidades do correceptor de ligação do complemento nas células B.

Mais tarde, na resposta imune, de forma contrária, quando os anticorpos IgG ligam-se à superfície dos micróbios, um correceptor diferente passa a atuar, desativando a resposta mediada pelas células B. Estes são os *receptores Fc,* que se ligam à cauda dos anticorpos IgG. Eles recrutam enzimas fosfatases e lipídeos para o complexo de sinalização, enfraquecendo a sinalização (Figura 25-71B). Desta maneira, os receptores Fc das células B agem como correceptores inibidores, assim como as proteínas CTLA4 fazem com as células T. Assim, os correceptores nas células T ou nas células B permitem que as células recebam informações adicionais sobre o antígeno que se encontra ligado a seus receptores, tornando as células mais informadas para decidirem como responder.

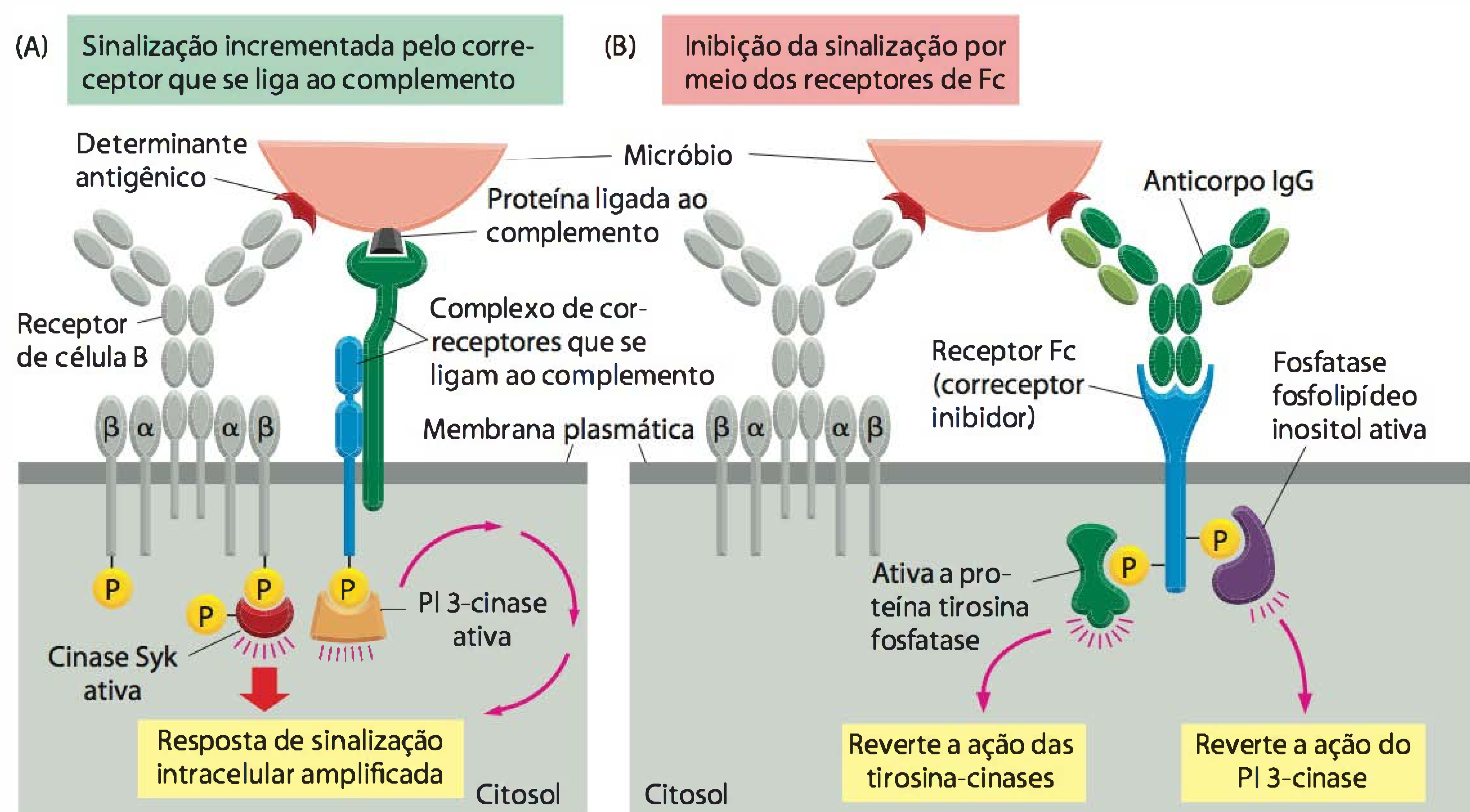


Figura 25-71 A influência dos correceptores das células B na eficácia da sinalização pelo BCR. (A) A ligação dos complexos micróbio-complemento aos BCRs interliga os BCRs ao complemento ligado ao correceptor. A cauda citosólica de um componente do complexo do correceptor torna-se fosforilada nas tirosinas, que atuam como sítios de ancoramento para a PI 3-cinase. Conforme discutido no Capítulo 15, a PI 3-cinase é ativada e fosforila um fosfolipídeo inositol específico da membrana plasmática, que atua como sítio de ancoramento para recrutar proteínas sinalizadoras intracelulares (não-representadas). Estas proteínas sinalizadoras agem conjuntamente com os sinais gerados pela cinase Sky, que amplifica a resposta. (B) Quando os anticorpos IgG ligam-se a antígenos estranhos, geralmente em uma resposta tardia, as regiões Fc dos anticorpos ligam-se aos receptores Fc, na superfície da célula B, e são recrutadas para o complexo de sinalização. Os receptores Fc tornam-se fosforilados nas tirosinas, que atuam como sitios de ancoramento para dois tipos de enzimas fosfatases: (1) a fosfatase fosfolipídeo inositol, que desfosforila os sítios de ancoragem do fosfolipídeo inositol da membrana plasmática gerados pela PI 3-cinase, revertendo os efeitos de ativação da PI 3-cinase; (2) as proteínas tirosinas fosfotases, que inibem a sinalização pela atividade de tirosina-cinases.

Células T auxiliares antígeno-específicas são essenciais para a ativação da maioria das células B

Enquanto as células apresentadoras de antígeno como as células dendríticas e os macrófagos são onívoras e ingerem e apresentam antígenos em suas proteínas do MHC de forma inespecífica, geralmente uma célula B apresenta somente peptídeos derivados de um antígeno que é especificamente reconhecido usando seus BCRs. Assim, os BCRs fazem mais do que apenas ligar antígenos para iniciar o processo de ativação da célula B; eles também desempenham um papel crucial no recrutamento de células T auxiliares. Eles apresentam seus antígenos proteicos ligados, após endocitose, a um compartimento endossômico, onde o antígeno é degradado em peptídeos. Muitos desses peptídeos são devolvidos para a superfície das células B ligados às proteínas do MHC de classe II (ver Figura 25-61). Esses complexos peptídeo-MHC de classe II são reconhecidos por células T auxiliares específicas para o antígeno, as quais então emitem mais sinais para as células B que são necessários a sua proliferação e secreção de anticorpo (**Figura 25-72**).

Como se originam as células T antígeno-específicas necessárias à ativação das células B? Como discutido previamente, durante a resposta primária de anticorpo, as células T auxiliares virgens são ativadas nos órgãos linfoides periféricos ligando-se a peptídeos estranhos ligados às proteínas do MHC de classe II na superfície de células dendríticas ativadas. As células T auxiliares efetoras resultantes dessa ativação podem então ativar as células B que apresentam o mesmo complexo de peptídeos estranhos e proteínas do MHC de classe II em sua superfície. Assim, as células T auxiliares ativam somente as células B com BCRs que reconhecem especificamente o antígeno que inicialmente ativou as células T, mesmo que os BCRs e os TCRs reconheçam diferentes determinantes antigênicos de um mesmo antígeno (ver Figura 25-72). Estas exigências de *reconhecimento ligado* do antígeno por uma célula T e uma célula B evitam respostas autoimunes pelas células B, as quais necessitariam da presença simultânea de células B e células T auxiliares que reconheçam o mesmo autoantígeno.

Na resposta secundária de anticorpos, as próprias células B de memória podem atuar como células apresentadoras de antígeno e ativar as células T, bem como serem o alvo subsequente das células T auxiliares efetoras. As ações mutuamente reforçadas das células T auxiliares e das células B levam a uma resposta de anticorpos intensa e altamente específica.

Uma vez que a célula T auxiliar tenha sido ativada para tornar-se uma célula efetora e contata uma célula B, o contato inicia um rearranjo interno no citoplasma das células auxiliares. A célula T orienta seu centrossomo e aparelho de Golgi em direção à célula B, como descrito anteriormente, quando uma célula T citotóxica efetora entra em contato com seu alvo (ver Figura 25-46). Entretanto, nesse caso, acredita-se que a orientação permita que a célula T auxiliar efetora direcione tanto as citocinas ligadas à membrana como as secretadas para a superfície da célula B (ver Figura 25-72). Uma molécula sinalizadora crucial ligada à membrana é o ligante CD40, o qual apresentamos anteriormente. Ele é expresso na superfície da célula T auxiliar efetora, mas não é expresso nas células T de memória ou em células T virgens não-ativadas, sendo reconhecido pela proteína CD40 presente na superfície das células B. Esta interação entre o CD40 e seu ligante CD40 é necessária para que as células T

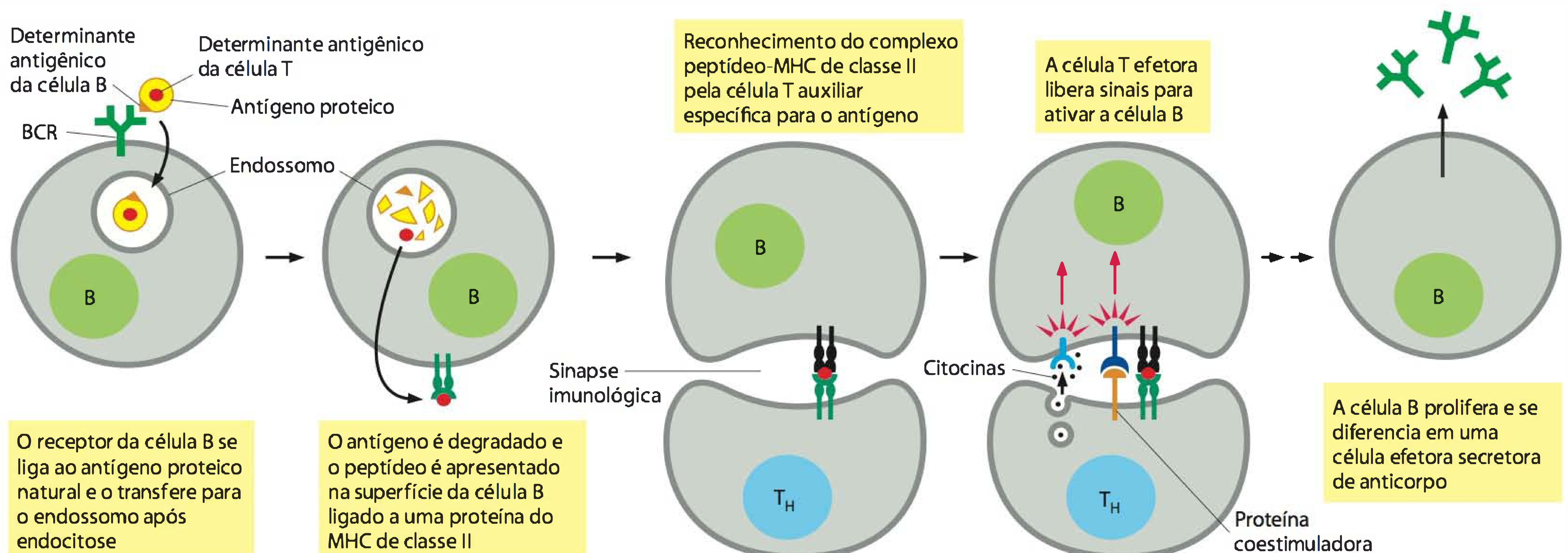


Figura 25-72 A ativação de uma célula B por um antígeno proteico e por uma célula T auxiliar efetora. Observe que a célula B e a célula T reconhecem diferentes determinantes antigênicos e que a célula T efetora usa as duas moléculas coestimuladoras ligadas à membrana e secretadas para auxiliar na ativação da célula B.

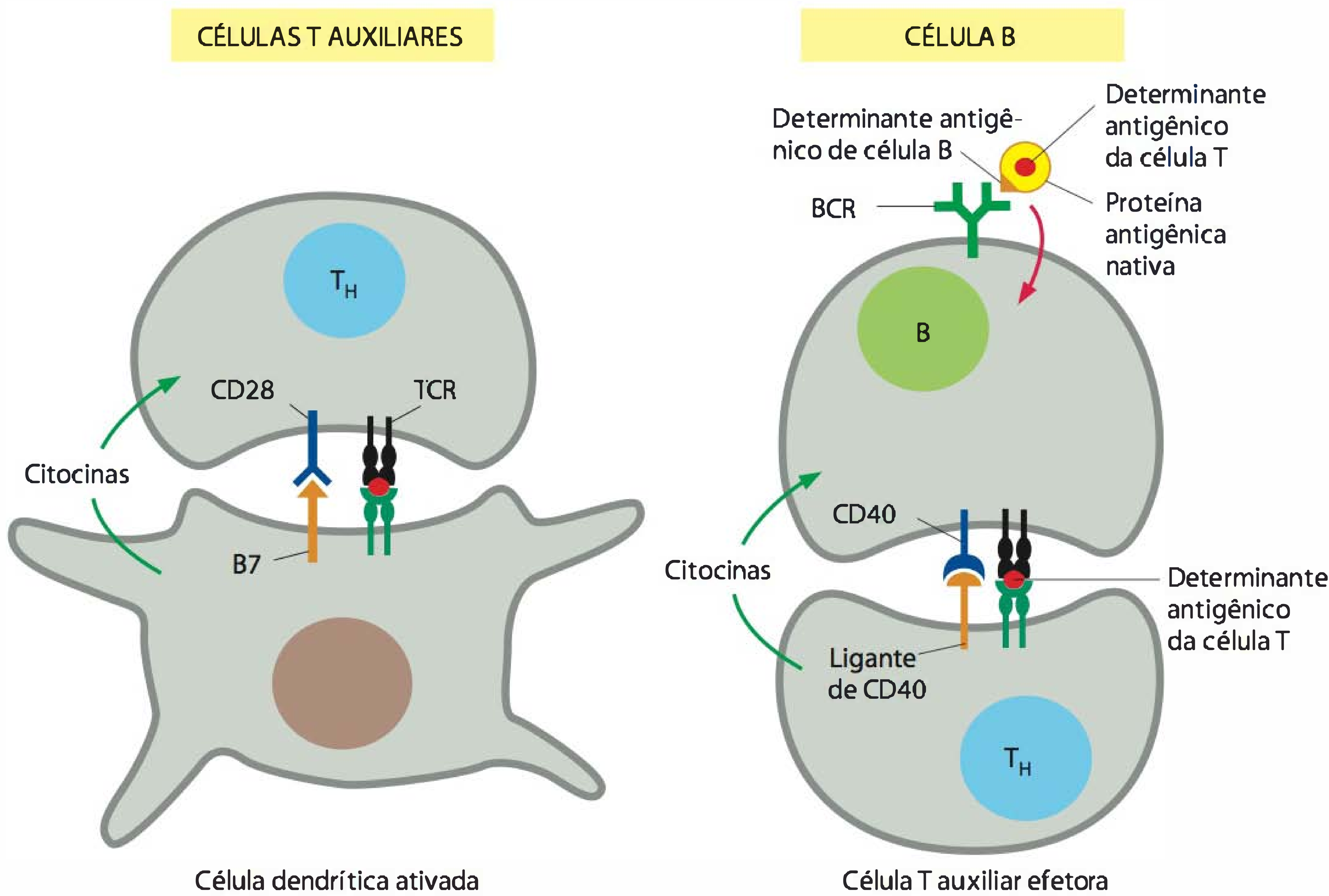


Figura 25-73 Comparação entre os sinais necessários para ativar uma célula T auxiliar ou uma célula B com o mesmo antígeno proteico. Repare que, em ambos os casos, as moléculas que são secretadas ou associadas à membrana podem cooperar no processo de ativação. As *setas vermelhas* indicam a endocitose do antígeno proteico. Apesar de não representado, o ligante CD40 também é usado pela célula T auxiliar efetora para aumentar e manter a ativação das células dendríticas maduras, que expressam o CD40, criando uma retroalimentação positiva.

O determinante antigênico reconhecido pela célula T auxiliar é apresentado tanto na superfície de células dendríticas como nas células B sob a forma de um fragmento peptídico ligado às proteínas do MHC de classe II. De forma contrária, as células B reconhecem um determinante antigênico diferente na superfície da estrutura proteica nativa.

auxiliares ativem as células B a proliferar e se diferenciar em células efetoras produtoras de anticorpos e células B de memória. Indivíduos que não possuem o ligante CD40 são imunodeficientes. Eles são suscetíveis às mesmas infecções que ocorrem nos pacientes afetados pela AIDS cujas células T auxiliares foram destruídas.

As células T auxiliares também secretam citocinas para auxiliar a proliferação e a diferenciação das células B e, em alguns casos, a troca de classe de anticorpo que elas produzem. As citocinas, incluindo a IL2 e a IL4, por exemplo, são produzidas por células T_H2 e colaboram com o ligante CD40 estimulando a proliferação e a diferenciação das células B, e também promovem a troca de produção de anticorpo para IgE. Camundongos deficientes na produção de IL4 são severamente prejudicados na sua capacidade de produzir IgE.

A **Figura 25-73** compara os sinais necessários à ativação das células T e B, e a **Tabela 25-4** apresenta algumas das citocinas discutidas neste capítulo.

Uma classe especial de células B reconhece antígenos independentes de células T

Alguns antígenos podem estimular a proliferação e a diferenciação de células B em células efetoras secretoras de anticorpos sem o auxílio das células T. Em sua maioria esses *antígenos independentes de células T* são polissacarídeos microbianos que não ativam as células T auxiliares. Alguns ativam diretamente as células B fornecendo tanto o sinal antigênico quanto os sinais acessórios normalmente emitidos pelas células T auxiliares. Outros são grandes

Tabela 25-4 Propriedades de algumas citocinas

CITOCINA	ALGUMAS FONTES	ALGUNS EFEITOS
IL2	Todas as células T auxiliares, algumas células T citotóxicas	Estimula a proliferação e a diferenciação de células T ativadas; necessária ao desenvolvimento das células T reguladoras no timo
IL4	Células T_H2, basófilos e mastócitos	Estimula a proliferação, a diferenciação e a mudança de classe de IgG1 para IgE nas células B; promove T_H2 e inibe o desenvolvimento das células T_H1
IL7	Muitas células não-T	Promove a sobrevivência das células T de memória
IL10	Células T_H2, macrófagos e células dendríticas	Inibe macrófagos e o desenvolvimento das células T_H1
IL12	Células B, macrófagos, células dendríticas e granulócitos	Induz o desenvolvimento das células T_H1 e inibe o desenvolvimento das células T_H2
IL15	Muitas células não-T	Promove a sobrevivência das células T de memória
IL17	Algumas células T auxiliares efetoras	Estimula a resposta inflamatória
IFNγ	Células T_H1 e células T citotóxicas	Ativa macrófagos; aumenta a expressão do MHC em muitos tipos celulares
TGFβ	Células T reguladoras	Inibe a atividade de células T efetoras, células dendríticas e macrófagos
TNFα	Células T_H1 e macrófagos	Ativa células endoteliais e macrófagos

polímeros com determinantes antigênicos repetidos e idênticos (ver Figura 25-29B); seus múltiplos pontos de ligação aos BCRs podem produzir sinais fortes o suficiente para ativar diretamente as células B, sem sinais adicionais.

Como os antígenos independentes de células T não ativam as células T auxiliares, eles não induzem células B de memória, nem a maturação da afinidade ou a troca de classe, todos os processos que requerem o auxílio de células T. Portanto, eles estimulam, principalmente, a produção de anticorpos IgM de baixa afinidade (mas de alta avidez). A maioria das células B que produzem anticorpos sem o auxílio das células T pertence a uma linhagem distinta de células B. Elas são denominadas *células B1* para distinguir das *células B2*, as quais necessitam do auxílio das células T. As células B1 parecem ser especialmente importantes na defesa contra patógenos intestinais.

Moléculas de reconhecimento imune pertencem a uma antiga superfamília de imunoglobulinas

A maioria das proteínas do sistema imune que estão envolvidas no reconhecimento célula-célula contém Igs ou domínios semelhantes a Igs, sugerindo que tiveram uma história evolutiva comum. Incluídos nesta **superfamília de Igs** encontram-se os anticorpos, os TCRs, as proteínas do MHC, o CD4, o CD8, os correceptores CD28, as proteínas coestimuladoras B7 e a maioria das cadeias polipeptídicas invariáveis associadas aos TCRs e BCRs, assim como os vários receptores Fc presentes nos linfócitos e em outros leucócitos. Todas essas proteínas contêm um ou mais Igs ou domínios semelhantes a Igs. De fato, cerca de 15% de 250 ou mais proteínas que foram caracterizadas na superfície de leucócitos pertencem a essa superfamília. Várias dessas moléculas são dímeros ou oligômeros, em que as Igs ou os domínios semelhantes a Igs de uma das cadeias interagem com os da outra (**Figura 25-74**).

Os aminoácidos, em cada domínio semelhante a Igs, geralmente são codificados por éxons que se encontram separados no DNA. Isto significa que é provável que toda a superfamília gênica tenha evoluído de um gene que codifica para um único domínio semelhante a Igs – como o que codifica a β_2-microglobulina (ver Figuras 25-50A e 25-52) ou a proteína Thy-1 (ver Figura 25-74) –, que pode mediar interações célula-célula. Existem evidências de

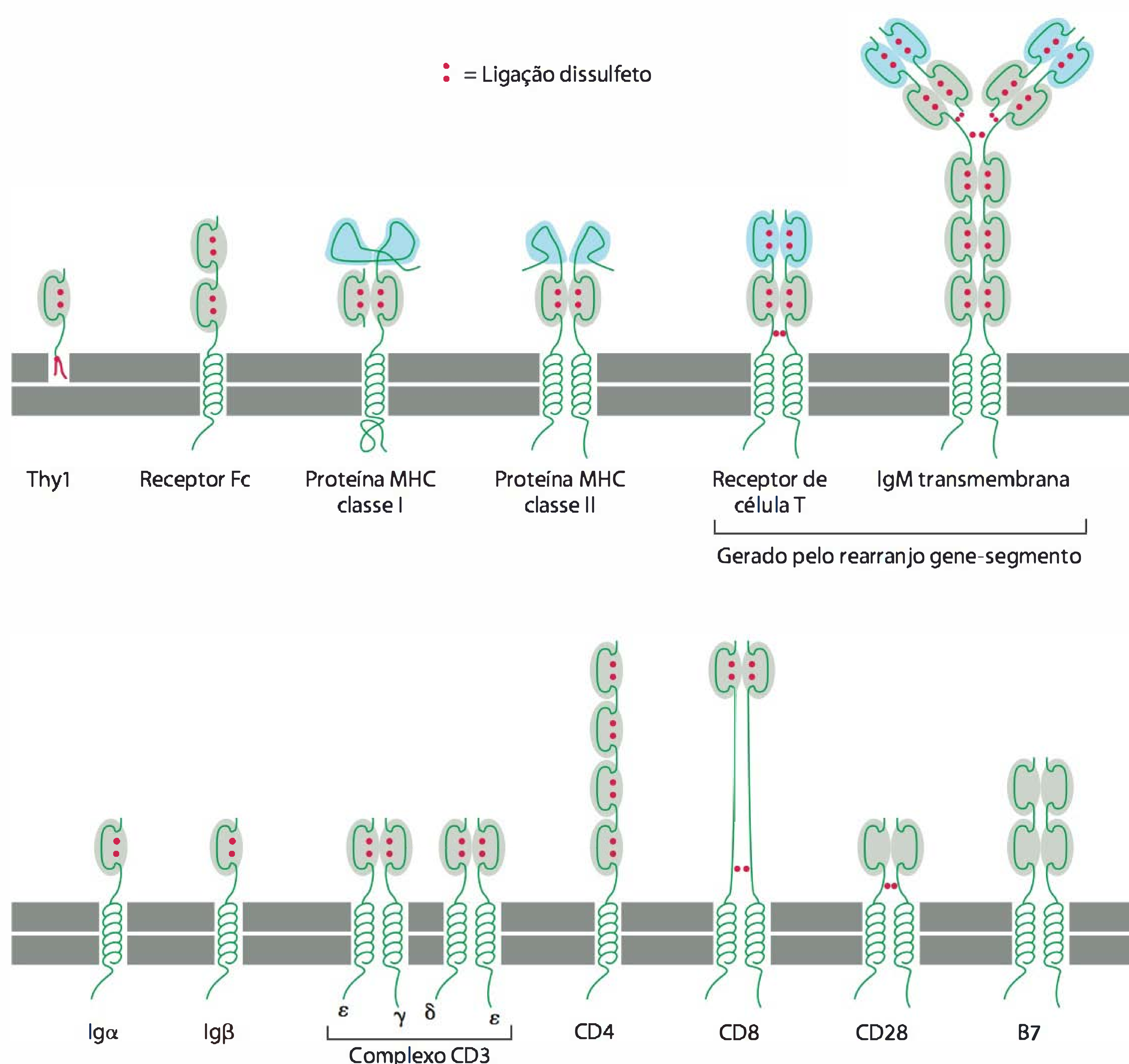


Figura 25-74 Algumas proteínas de superfície celular discutidas neste capítulo que pertencem à superfamília das Igs. As Igs e os domínios semelhantes a elas estão marcados em *cinza*, exceto os domínios de ligação aos antígenos (nem todos são domínios de Ig), que se encontram marcados em *azul*. A função de Thy1 é desconhecida, mas é mantido na membrana plasmática por um ancoramento glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo amplamente utilizado para identificar células T em camundongos. A superfamília das Igs também inclui várias proteínas de superfície celular envolvidas na interação célula-célula em funções fora do sistema imune, como a molécula de adesão celular de células nervosas (NCAM), discutida no Capítulo 19, e os receptores de vários fatores de crescimento proteicos discutidos no Capítulo 15 (não-apresentado). Existem mais de 750 membros da superfamília das Igs em humanos.

que esses genes primordiais são provenientes de ancestrais comuns, cerca de 400 milhões de anos atrás, antes de os vertebrados divergirem dos invertebrados. Os membros de famílias mais recentes presumivelmente surgiram da duplicação de genes e éxons.

Os múltiplos segmentos gênicos que codificam os anticorpos e os TCRs podem ter surgido quando um elemento transponível, ou um transposon (discutido no Capítulo 5), foi inserido em um éxon de um gene que codifica um membro da família das Igs em uma célula ancestral semelhante a um linfócito. O transposon pode ter contido os ancestrais dos genes *Rag*, que, conforme descrito anteriormente, codificam as proteínas que iniciam o processo de recombinação V(D)J; os achados de que as proteínas RAG podem atuar como transposons em testes realizados em tubo de ensaio reforçam muito essa possibilidade. Uma vez que o transposon tenha sido inserido no éxon, o gene pode ser expresso somente se o transposon for cortado por proteínas RAG e se as duas extremidades do éxon forem reunidas, como ocorre quando os segmentos gênicos *V* e *J*, dos genes das cadeias leves das Igs, são rearranjados (ver Figura 25-38). Uma segunda inserção do mesmo transposon dentro do mesmo éxon pode ter dividido o gene em três segmentos, equivalentes aos atuais segmentos gênicos *V*, *D* e *J*. As duplicações subsequentes nos segmentos gênicos individualmente, ou a subdivisão do gene como um todo, podem ter gerado o arranjo de segmentos gênicos que caracteriza os sistemas imunes adaptativos presentes atualmente nos vertebrados.

Resumo

A produção de uma célula T auxiliar efetora a partir de uma célula T auxiliar virgem requer múltiplos sinais de células dendríticas ativadas. Complexos peptídeo-MHC da superfície das células dendríticas fornecem um dos sinais, ao ligar os TCRs e o correceptor CD4 da célula T. Proteínas coestimuladoras na superfície das células dendríticas, incluindo o CD28 e as citocinas secretadas, são os outros sinais. Quando células T virgens são inicialmente ativadas por uma célula dendrítica, elas podem diferenciar-se em células efetoras T_H1 ou T_H2, dependendo das proteínas sinalizadoras presentes no seu ambiente. As células T_H1 ativam os macrófagos, as células T citotóxicas e as células B; as células T_H2 ativam principalmente as células B. Em ambos os casos, as células T auxiliares efetoras reconhecem o mesmo complexo de peptídeo estranho e proteína do MHC de classe II na superfície da célula-alvo inicialmente reconhecido como antígeno pela célula dendrítica que as ativou. Elas ativam suas células-alvo por meio de uma combinação de proteínas sinalizadoras associadas à membrana e coestimuladoras secretadas. Uma proteína sinalizadora associada à membrana usada pelas células T_H1 e T_H2 é o ligante de CD40.

Como as células T, as células B necessitam de múltiplos sinais para sua ativação. A ligação dos antígenos aos receptores de células B (BCRs) proporciona o primeiro sinal, enquanto as células T auxiliares efetoras antígeno-específicas fornecem o outro sinal. A necessidade de múltiplos sinais para ativar as células T ou B auxilia na prevenção da ativação inapropriada dos linfócitos, incluindo os linfócitos autorreativos.

A maioria das proteínas do sistema imune envolvidas no reconhecimento célula-célula e no reconhecimento do antígeno, incluindo anticorpos TCRs e proteínas do MHC, bem como vários correceptores discutidos neste capítulo, pertence ao antigo grupo da superfamília das Igs. Acredita-se que esta superfamília tenha evoluído de um gene primordial que codifica um único domínio semelhante a Igs. Os mecanismos para a diversificação dos anticorpos e dos receptores de células T pela recombinação dos segmentos gênicos podem ter surgido quando um transposon se inseriu em um éxon de um gene que codificava um membro da família das Igs.

REFERÊNCIAS

Gerais

Abbas AK, Lichtman AH & Pober JS (2005) Cellular and Molecular Immunology, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M & Shlomchik M (2005) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 6th ed. London: Garland Science.

Linfócitos e as bases celulares da imunidade adaptativa

Ahmed R & Rousse BT (Eds) (2006) Immunological memory. *Immunol Rev* 211:5-337.

Ebert LM, Schaerli P & Moser B (2005) Chemoline-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 42:799-809.

Godnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B & Vinuesa CG (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590-597.

Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D & Ahmed R (2004) Generation and maitenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323-333.

Janeway CA, Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.

Kyewski B & Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24:571-606.

Singh NJ & Schwartz RH (2006) Primer: mechanisms of immunologic tolerance. *Nature Clin Pract Rheumatol* J2:44-52

Steinman RM & Hemmi H (2006) Dendritic cells: translating innate to adapatative immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17-58.
Wiedle G, Dunon D & Imhof BA (2001) Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. RevClin Lab Sci* 38:1-31.

Células B e anticorpos

Burton DR & Woof JM (1992) Human antibody effector function. *Adv Immunol* 51:1-84.
Davies DR & Cohen GH (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7-12.
Davies DR, Padlan EA & Sherrif S (1990) Antigen-antibody complexes. *Ann Rev Biochem* 59:439-473.
Jimenez R, Salazar G, Baldridge KK & Romesberg FE (2003) Flexibility and molecular recognition in the immune system. *Proc. Natl Acad Sci USA* 100:92-97.
Padlan EA (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31:169-217.
Zhang M, Srivastava G & Lu L (2004) The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol* 1:89-94.

A geração da diversidade dos anticorpos

Besmer E, Gourzi P & Papavasiliou FN (2004) The regulation of somatic hypermutation. *CurrOpin Immunol* 16:241-245.
Corcoran AE (2005) Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17:141-154.
Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH & Alt FW (2005) Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86:43-112.
Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R & Muramatsu M (2005) AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunol* 6: 655-661
Jung D & Alt FW (2004) Unraveling V(D)J recombination, insights into gene regulation. *Cell* 116:299-311.
Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R & Alt FW (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24:541-570.
Longerich S, Basu U, Alt F & Storb U (2006) AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *CurrOpin Immunol* 18:164-174.
Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. Annu Rev Genet 39:23-46.
Neuberger M & Di Noia JM (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: in press.
Neuberger MS, Harris RS, Di Noia JM & Petersen-Mahrt SK (2003) Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* 28:305-312.
Selsing E (2006) Ig class switching targeting the recombinatorial mechanism. *CurrOpin Immunol* 18:249-254.

Células T e proteínas do MHC

Coutinho A, Caramalho I, Seixas E & Demengeot J (2005) Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selction that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Cur Top Microbial Immunol* 293:43-71.
Krogsgaard M & Davis MM (2005) How T cells 'see' antigen. Nature Immunol 6:239-245.
Loureiro J & Ploegh HL (2006) Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-patogen interactions. *Adv. Immunol* 92:225-305.
McDevitt HO (2000) Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu Rev Immunol* 18:1-17.
Mellman I & Steinman RM (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
Pulendran B (2004) Immune activation: death, danger and dendritica cells. *Curr Biol* 14:R30-32.
Reis e Souza C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nature Rev Immunol* 6:476-483.
Rudolph MG, Stanfield RL & Wilson IA (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Ann Rev Immunol* 24:419-466.
Russel JH & Ley TJ (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20-323-370.
Sallusto F, Geginat J & Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cells subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.
Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al (2006) Foxp3$^+$CD25$^+$CD4$^+$ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:8-27.
Starr TK, Jameson SC & Hogquist KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
Steinman RM, Bonifaz L, Fujii S et al. (2005) The innate functions of dendritica cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol* 560:83-97.
Trombeta ES & Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. Annu Rev Immunol 23:974-1028.
Villasenor J Benoist C & Mathis D (2005) AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:156-164.
von Boehmer H (2004) Selection of T-cell repertoire:receptor controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol* 84:201-238.
Watanabe N, Wang YH, Lee HK ET AL (2005) Hassal´s corpuscles instruct dendrítica cells to induce CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181-1185.

Células T auxiliares e ativação de linfócitos

Abbas AK (2003) The control of T cell activation vs tolerance. *Autoimmun Rev* 2:115-118.
Alegre ML, Frauwirth KA & Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Rev Immunol* 1:220-228.
Barclay AN (2003) Membrane proteins with immunoglobulin-like domains- a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15:215-223.
Castellino F & Germain RN (2006) Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immnol* 24:519-540.
Deane JA & Fruman DA (2004) Phosphoinositide 3-kinase diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22:563-598.
Dustin ML, Tseng SY, Varma R & McHeyzer-Williams MG (2006) T cell-dendritic cell immunological sinapses. *Curr Opin Immunol* 18:512-516.
Eason DD, Cannon JP, Haire RN et al (2004) Mechanisms of antigen receptor evolution. *Semin Immunol* 16:215-226.
Matthews SA & Cantrell DA (2006) The role of serine/threonine kinases in T-cell activation. *CurrOpin Immunol* 18:314-320.
McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP & McHeyzer-Williams MG (2006) Helper T cell-regulated B cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:59-83.
Mills DM & Cambier JC (2003) B Lymphocyte activation during cognate interactions with CD4$^+$ T Lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin Immunol* 15:325-329.
Murphy KM & Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature Rev Immunol* 2:933-944.
Peggs KS & Allison JP (2005) Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. *B J Haematol* 130:809-824.
Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE & Locksley RM (2006) T helper cell effector fates- who, how and where? *CurrOpin Immunol* 18:271-277.
Reth M & Brummer T (2004) Feedback regulation of lymphocyte signaling. *Nature Rev Immunol* 4:269-277.
Samelson LE (2002) Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 20:371-394.
Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendrítica cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
Villers MB, Perrin-Cocon L, Marche PN & Villiers C (2004) Complement receptors and B lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 24:465-478.

Glossário

aceptor de elétrons
Átomo ou molécula que capta elétrons prontamente, dessa forma ganhando um elétron e se tornando reduzida.

acetil (—$COCH_3$)
Grupo químico derivado do ácido acético (CH_3COOH). Os grupos acetil são importantes no metabolismo e também são adicionados covalentemente a algumas proteínas como uma modificação pós-traducional.

acetil-CoA
Pequena molécula carreadora solúvel em água. Consiste em um grupo acetil ligado à coenzima A (CoA) por uma ligação tioéster facilmente hidrolisável. (Figura 2-62)

acetilcolina (ACh)
Neurotransmissor que funciona nas sinapses colinérgicas. Encontrada tanto no encéfalo quanto no sistema nervoso periférico. É o neurotransmissor das junções neuromusculares dos vertebrados. (Figura 15-9)

ácido
Um doador de prótons. Substância que libera prótons (H^+) quando dissolvida em água, formando íons hidrônio (H_3O^+) e baixando o pH. (Painel 2-2, p. 108-109)

ácido desoxirribonucleico – *ver* DNA

ácido graxo
Ácido carboxílico com uma longa cauda hidrocarbonada. Principal fonte de energia durante o metabolismo e o ponto inicial da síntese de fosfolipídeos. (Painel 2-5, p. 114-115)

ácido nucleico
RNA ou DNA, uma macromolécula constituída por uma cadeia de nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster.

ácido ribonucleico – *ver* RNA

acoplamento quimiosmótico (quimiosmose)
Mecanismo pelo qual um gradiente de íons hidrogênio (um gradiente de pH ou de prótons) através de uma membrana é utilizado para dirigir um processo que requer energia, como a produção de ATP, ou a rotação do flagelo bacteriano.

actina
Proteína abundante que forma filamentos de actina em todas as células eucarióticas. A forma monomérica é, algumas vezes, chamada de globular, ou actina G; a forma polimérica é chamada de filamentosa, ou actina F. (Painel 16-1, p. 968, Figura 16-12)

açúcar
Pequeno carboidrato com uma unidade monomérica de fórmula geral $(CH_2O)n$. Exemplos são os monossacarídeos de glicose, frutose e manose e os dissacarídeos de sacarose (ligados a glicose e frutose). (Painel 2-4, p. 112-113)

adaptação
(1) Adaptação (dessensibilização): ajuste da sensibilidade seguida de estímulos repetidos. O mecanismo que permite que uma célula reaja a pequenas variações de um estímulo mesmo com um nível elevado de estimulação do ambiente. (2) Adaptação evolutiva: um traço evoluído.

adenilil-ciclase (adenilato-ciclase)
Enzima ligada à membrana que catalisa a formação de AMP cíclico a partir de ATP. É um componente importante de algumas vias de sinalização intracelulares.

adesão focal (contato focal, placa de adesão)
Um tipo de junção celular de ancoramento que forma uma pequena região na superfície de um fibroblasto ou de outra célula que esteja ancorada à matriz extracelular. Essa ligação é mediada por proteínas transmembrana, como as integrinas, que são ligadas, através de outras proteínas, a filamentos de actina no citoplasma.

ADP (5′-difosfato de adenosina)
Nucleotídeo produzido pela hidrólise do fosfato terminal do ATP. Ele regenera ATP, quando fosforilado através de um processo gerador de energia, como a fosforilação oxidativa. (Figura 2-57)

adrenalina (epinefrina)
Hormônio liberado pelas células cromafínicas (na glândula adrenal), especialmente em resposta ao estresse, que se liga a GPCRs específicos. Pode iniciar e coordenar respostas de "luta-ou-fuga", incluindo aumento da frequência cardíaca e dos níveis sanguíneos de açúcar. Também é um neurotransmissor de catecolamina.

aeróbio
Descreve um processo que necessita ou ocorre na presença de oxigênio molecular (O_2).

afinidade
A força de ligação de uma molécula ao seu ligante em um único sítio ativo.

α-hélice – *ver* alfa-hélice

Akt (proteína-cinase B, PKB)
Serina/treonina proteína-cinase que atua na via de sinalização intracelular PI 3-cinase/Akt envolvida especialmente na sinalização de células para crescimento e sobrevivência. Também chamada de proteína-cinase B (PKB). (Figura 15-64)

alcalino – *ver* básico

aldeído
Composto orgânico que contém o grupo . Um exemplo é o gliceraldeído. Pode ser oxidado a um ácido, ou reduzido a um álcool. (Painel 2-1, p. 107)

alelo
Uma das várias formas alternativas de um gene. Em uma célula diploide, cada gene terá dois alelos, cada um ocupando a mesma posição (lócus) em cromossomos homólogos.

alfa-hélice (α-hélice)
Padrão de dobramento comum em proteínas, no qual uma sequência linear de aminoácidos se dobra em uma hélice voltada para a direita e estabilizada por ligações de hidrogênio internas entre os átomos da estrutura (esqueleto) da hélice. (Figura 3-7)

alga
Termo informal usado para descrever uma numerosa gama de organismos fotossintéticos, tanto unicelulares simples como eucariotos multicelulares. Exemplos incluem *Nitella, Volvox* e *Fucus.*

alosteria (adjetivo alostérico)
Mudança na conformação de uma proteína causada pela ligação de um ligante regulatório (em um sítio diferente do sítio catalítico), ou por modificação covalente. A mudança na conformação altera a atividade da proteína e pode formar as bases do movimento dirigido. (Figuras 3-58 e 16-61)

alvéolos
Bolsos externos pequenos e dilatados de um epitélio, especialmente o epitélio do pulmão, onde formam milhões de sacos cheios de ar. Estruturas similares são encontradas no epitélio glandular secretor de leite das mamas.

ameba
Protozoário unicelular carnívoro que rasteja utilizando pseudópodos.

amida
Molécula contendo um grupo carbonila ligado a uma amina. (Painel 2-1, p. 107)

amido
Polissacarídeo composto exclusivamente por unidades de glicose, usado como um estoque de energia nas células vegetais. (Figura 2-75)

amina
Grupo químico que contém nitrogênio e hidrogênio. Ele se torna positivamente carregado na água. (Painel 2-1, p. 107)

aminoácido
Molécula orgânica que contém tanto um grupo amino quanto um grupo carboxila. Os aminoácidos que servem como tijolos na construção de proteínas são aminoácidos alfa, possuindo o grupo amina e o grupo carboxila ligados ao mesmo átomo de carbono. ($NH_2CHRCOOH$, Painel 3-1, p. 128-129)

aminoacli-tRNA-sintase
Enzima que liga o aminoácido correto à molécula de RNA para formar um aminoacil-tRNA. (Figura 6-57)

aminoterminal – *ver* N-terminal

AMP (5′-monofosfato de adenosina)
Um dos quatro nucleotídeos em uma molécula de RNA. Dois fosfatos são adicionados ao AMP para formar ATP. (Painel 2-6, p. 116-117)

AMP cíclico (cAMP)
Nucleotídeo gerado a partir do ATP pela adenilil-ciclase em resposta a vários sinais extracelulares. O cAMP atua como uma pequena molécula sinalizadora intracelular, principalmente pela ativação da proteína-cinase dependente de cAMP (PKA). Ele é hidrolisado a AMP por uma fosfodiesterase. (Figura 15-34)

anabolismo (biossíntese)
Formação de moléculas complexas a partir de substâncias simples por células vivas. (Figura 2-36)

anaeróbio
Processo que requer ou ocorre na *ausência* de oxigênio molecular (O_2).

anáfase
(1) Estágio da mitose durante o qual cromátides-irmãs separam-se e distanciam-se uma da outra. Composta de anáfase A (cromossomos movem-se em direção aos dois polos do fuso mitótico) e anáfase B (os polos separam-se). (2) Anáfase I e II: estágios da meiose durante os quais pares de cromossomos homólogos separam-se (I), e então cromátides-irmãs se separam (II). (Painel 17-1, p. 1072-1073)

âncora de glicosilfosfatidilinositol – *ver* âncora GPI

âncora GPI (âncora de glicoslifosfatidilinositol)
Tipo de ligação lipídica pela qual algumas proteínas de membrana são ligadas à membrana. A proteína é unida, através de um oligossacarídeo, à âncora de fosfatidilinositol à medida que se move ao longo do retículo endoplasmático. (Figura 10-19[6])

anel contrátil
Anel que contém actina e miosina e que se forma sob a superfície das células animais que estão passando por divisão celular. Contrai para separar as duas células-filbas. (Figura 17-50)

anfipático
Que possui tanto regiões hidrofílicas quanto hidrofóbicas, como um fosfolipídeo ou uma molécula de detergente.

angiogênese
Crescimento de novos vasos sanguíneos por brotamento a partir de vasos já existentes.

Ångstrom (Å)
Unidade de comprimento usada para medir átomos e moléculas. Equivalente a 10^{-10} metros ou 0,1 nanômetro (nm).

ânion
Íon negativamente carregado.

antibiótico
Substância tóxica para os microrganismos, como penicilina ou estreptomicina. Geralmente, um produto de uma planta ou microrganismo específico.

anticódon
Sequência de três nucleotídeos em uma molécula de RNA transportador (tRNA) que é complementar ao códon de três nucleotídeos em uma molécula de RNA mensageiro (mRNA).

anticorpo (imunoglobulina, Ig)
Proteína produzida pelas células B em resposta a uma molécula estranha ou microrganismo invasor. Liga-se fortemente à molécula ou célula estranha, dessa forma inativando-a ou marcando-a para destruição por fagocitose ou lise induzida por complemento.

anticorpo monoclonal
Anticorpo secretado por uma linhagem celular de hibridoma. Como o hibridoma é gerado pela fusão de uma única célula B com uma célula cancerosa, todas as moléculas de anticorpo que ele produz são idênticas. (Figura 8-8)

antígeno
Uma molécula que pode induzir uma resposta imune adaptativa ou que pode se ligar a um anticorpo ou receptor de uma célula T.

antiparalelo
Descreve a orientação relativa das duas fitas em uma dupla-hélice de DNA ou em duas regiões pareadas de uma cadeia polipeptídica; a polaridade de uma fita é orientada na direção oposta da polaridade da outra.

antiporte
Proteína carreadora que transporta dois íons diferentes ou pequenas moléculas através de uma membrana em direções opostas, simultaneamente ou em sequência. (Figura 11-8)

aparelbo de Golgi (complexo de Golgi)
Complexo de organela delimitada por membrana em células eucarióticas, formado por um empilhamento de membranas achatadas, onde as proteínas e os lipídeos produzidos no retículo endoplasmático são modificados e organizados. É o local de síntese de muitos polissacarídeos da parede celular nas plantas e de glicosaminoglicanos da matriz extracelular nas células animais. (Figura 13-25)

APC – *ver* polipose adenomatosa coli

APC/C – *ver* complexo promotor da anáfase

apical
Referente à extremidade de uma célula, estrutura ou órgão. A superfície apical de uma célula epitelial é a superfície livre exposta, oposta à superfície basal. A superfície basal repousa sobre a lâmina basal, que separa o epitélio dos outros tecidos.

apoptose
Forma de morte celular programada, na qual um "suicídio" programado é ativado dentro da célula animal, levando a uma rápida morte celular mediada por enzimas proteolíticas chamadas de caspases.

aquoso
Ligado à água, como uma solução aquosa.

Arabidopsis thaliana
Pequena erva florida relacionada à mostarda. Organismo-modelo para plantas floridas e modelo primário para estudos de genética molecular de planta.

Archaeon (arquebactéria)
Organismo unicelular sem núcleo, superficialmente similar à bactéria. Em nível molecular, mais próxima à bactéria na maquinaria metabólica, mas mais similar a eucariotos na maquinaria genética. Arquebactérias e bactérias juntas formam os procariotos. (Figura 1-21)

ARF (fator de ribosilação de ADP, proteína ARF)
GTPase monomérica na superfamília Ras responsável por regular tanto a montagem do revestimento por COPI quanto a montagem do revestimento por clatrina, nas membranas do aparelho de Golgi. (Tabela 15-5, p. 926)

aromático
Molécula que contém átomos de carbono em um anel, comumente representado alternando ligações simples e duplas entre os átomos de carbono. Normalmente uma molécula relacionada ao benzeno.

ARS – *ver* sequência autonomamente replicante

áster
Sistema com forma estelar de microtúbulos que emanam de um centrossomo ou do polo de um fuso mitótico.

atenuação da transcrição
Inibição da expressão gênica pelo término prematuro da transcrição.

ativador (proteína ativadora de genes, ativador transcricional)
Proteína reguladora de genes que, quando ligada a sua sequência regulatória de DNA, ativa a transcrição.

ativador da transcrição – *ver* ativador

ATM (proteína mutada de ataxia telanglectasia)
Proteína-cinase ativada por quebras no DNA de dupla-fita. Se as quebras não forem reparadas, a ATM inicia uma cascata de sinais que culmina na interrupção do ciclo celular. Relacionada à ATR.

ATP (5′-trifosfato de adenosina)
Nucleosídeo trifosfatado composto por adenina, ribose e três grupos fosfato. O principal transportador de energia química nas células. Os grupos fosfato terminais são altamente reativos, de forma que sua hidrólise ou transferência para outra molécula ocorre com liberação de grande quantidade de energia livre. (Figura 2-26)

ATPase
Enzima que catalisa a hidrólise de ATP. Várias proteínas possuem atividade de ATPase.

ATPase F_0F_1 – *ver* ATP-sintase

ATP-sintase (F_0F_1ATPase)
Complexo enzimático localizado na membrana interna de mitocôndrias e na membrana tilacoide de cloroplastos. Catalisa a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese, respectivamente. Também está presente na membrana de bactérias.

ATR (ataxia telangiectasia e proteína relacionada com Rad3)
Proteína-cinase ativada por dano a DNA. Se o dano permanece não reparado, a ATR ajuda a iniciar uma cascata de sinal que culmina no ciclo de aprisionamento celular. Relacionada à ATM.

atração de van der Waals
Tipo de ligação não-covalente (individualmente fraca) que se forma muito próxima entre átomos apolares. (Tabela 2-1, p. 53, e Painel 2-3, p. 110-111)

autofagia
Digestão de organelas esgotadas pelos lisossomos da própria célula.

autorradiografia
Técnica na qual um objeto radiativo produz uma imagem dele mesmo em um filme ou emulsão fotográfica.

autossomo
Qualquer cromossomo que não seja um cromossomo sexual.

auxina
Hormônio vegetal, comumente ácido indol-3-acético, com numerosos papéis no crescimento e desenvolvimento vegetal.

avidez
A intensidade da ligação de um anticorpo polivalente com um antígeno polivalente.

axonema
Feixe de microtúbulos e proteínas associadas que formam o cerne de cílios e flagelos em uma célula eucariótica, responsável pelos seus movimentos.

axônio
Projeção celular nervosa longa, capaz de conduzir rapidamente os impulsos nervosos por longas distâncias de modo a espalhar sinais para outras células.

BAC – *ver* cromossomo bacteriano artificial

bactéria (eubactéria)
Membro do domínio bactéria, um dos três principais ramos da árvore da vida (arquebactérias, bactérias e eucariotos). Bactérias e arquebactérias não possuem um compartimento nuclear distinto, e juntas compreendem os procariotos. (Figura 1-21)

bacteriófago (fago)
Qualquer vírus que infecte as bactérias. Os fagos foram os primeiros organismos utilizados para o estudo de genética molecular e atualmente são muito utilizados como vetores de clonagem. *Ver também* bacteriófago lambda.

bacteriófago lambda (bacteriófago λ, lambda)
Vírus que infecta *E. coli*. Amplamente utilizado como vetor de clonagem.

bacteriorrodopsina
Proteína pigmentada encontrada na membrana plasmática de uma bactéria halofílica, *Halobacterium salinarium* (*Halobacterium halobium*). Essa proteína bombeia prótons para fora da célula em resposta à luz. (Figura 10-33)

bainha de mielina
Camada isolante de membrana celular especializada enrolada ao redor dos axônios de vertebrados. Produzida pelos oligodendrócitos, no sistema nervoso central, e pelas células de Schwann, no sistema nervoso periférico. (Figura 11-32)

balsa lipídica
Pequena região da membrana plasmática, enriquecida em esfingolipídeos e colesterol. (Figura 10-14)

banda pré-prófase
Banda circunferencial de microtúbulos e filamentos de actina que se forma ao redor de uma célula vegetal, sob a membrana plasmática, antes da mitose e da divisão celular. (Figura 17-57)

basal
Situado próximo à base. Oposta à superfície apical.

base
Uma substância que pode reduzir o número de prótons em solução, tanto por aceitar diretamente íons H^+ quanto por liberar íons OH^-, os quais se combinam a H^+ e formam H_2O. As purinas e as pirimidinas do DNA e do RNA são bases orgânicas nitrogenadas e com frequência são referidas simplesmente como bases. (Painel 2-2, p. 108-109)

básico (alcalino)
Que tem as propriedades de uma base.

β-catenina – *ver* beta-catenina

benigno
Descreve um tumor com crescimento autolimitante e não-invasivo.

beta-catenina (β-catenina)
Proteína citoplasmática multifuncional envolvida na adesão célula-célula mediada por caderina, ligando caderinas ao citoesqueleto de actina. Também pode atuar independentemente, como uma proteína de regulação gênica. Desempenha um importante papel no desenvolvimento animal, como parte de uma via de sinalização Wnt.

biblioteca de DNA
Coleção de moléculas de DNA clonadas, representando o genoma inteiro (biblioteca genômica) ou cópias de DNA complementar a partir do mRNA produzido por uma célula (biblioteca de cDNA).

bicamada lipídica (bicamada fosfolipídica)
Fina camada dupla de moléculas de fosfolipídeos, formando a base estrutural de todas as membranas celulares. As duas camadas de moléculas de lipídeos são empacotadas com suas caudas hidrofóbicas direcionadas para dentro e suas cabeças hidrofílicas para fora, expostas à água. (Figura 2-22 e Painel 2-5, p. 114-115)

biologia química
Nome dado a uma estratégia que utiliza a varredura em larga escala de centenas de milbares de pequenas moléculas em ensaios biológicos para identificar compostos que afetam um determinado processo biológico e que então podem ser usados para estudá-lo.

biorientação
A ligação das cromátides-irmãs a polos opostos do fuso mitótico, de modo que elas se movem para extremidades opostas da célula quando se separam na anáfase.

biosfera
Todos os organismos vivos na Terra.

biossíntese – *ver* anabolismo

biotina
Composto de baixo peso molecular utilizado como coenzima. Muito útil em técnicas de laboratório, como um marcador covalente para proteínas, permitindo sua detecção usando a avidina – uma proteína do ovo – que se liga fortemente à biotina. (Figura 2-63)

bivalente
Uma estrutura com quatro cromátides formada durante a meiose, consistindo em um cromossomo duplicado fortemente pareado com seu homólogo.

blastômero
Uma das muitas células formadas pela clivagem de um óvulo fertilizado. (Figura 22-69)

blástula
Estágio inicial de um embrião animal, geralmente consistindo em uma bola oca de células epiteliais envolvendo uma cavidade cheia de fluidos, antes do início da gastrulação.

bloco haplótipo
Combinação de alelos e marcadores de DNA que são herdados em um grande bloco ligado, em um cromossomo de um par de cromossomos homólogos, ao longo de diversas gerações, sem sofrer alterações por recombinação gênica.

blotting
Técnica bioquímica na qual macromoléculas separadas em um gel são transferidas para uma membrana de náilon ou folha de papel, dessa forma sendo imobilizadas para posterior análise. (*Ver Northern blotting*, *Southern blotting* e *Western* [imuno-] *blotting*.) (Figura 8-38)

bomba
Proteína transmembrana que promove o transporte ativo de íons ou pequenas moléculas através da bicamada lipídica.

bomba de Ca^{+2} (bomba de cálcio, Ca^{+2}-ATPase)
Proteína transportadora, presente na membrana do retículo sarcoplasmático das células musculares (e outros tipos celulares). Bombeia Ca^{+2} do citoplasma para dentro do retículo sarcoplasmático, usando a energia de hidrólise de ATP.

bomba de cálcio – *ver* bomba de Ca^{+2}

bomba Na^+-K^+ (ATPase Na^+-K^+)
Proteína carreadora transmembrana, encontrada na membrana plasmática da maioria das células animais, que bombeia Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula, usando energia derivada da hidrólise do ATP. (Figura 11-14)

borda em escova
Revestimento denso formado pelas microvilosidades na superfície apical das células epiteliais do intestino e dos rins.

cadeia H – *ver* cadeia pesada

cadeia L – *ver* cadeia leve

cadeia lateral
A parte de um aminoácido que difere entre tipos de aminoácidos. As cadeias laterais conferem a cada tipo de aminoácido suas propriedades químicas e físicas específicas. (Painel 3-1, p. 128-129)

cadeia leve (cadeia L)
Um dos menores polipeptídeos de uma proteína composta por várias subunidades, como a miosina (Figura 16-72) ou a imunoglobulina. (Figura 25-21)

cadeia pesada (cadeia H)
O maior dos dois tipos de cadeia polipeptídica de uma molécula de imunoglobulina.

cadeia respiratória – *ver* cadeia transportadora de elétrons

cadeia transportadora de elétrons
Série de reações nas quais moléculas carreadoras de elétrons transportam elétrons do nível de maior energia para níveis sucessivos de menor energia, até uma molécula aceptora final. A energia liberada durante o movimento dos elétrons pode ser utilizada para suprir a energia necessária a vários processos. A cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial interna (chamada de cadeia respiratória) e na membrana do tilacoide de cloroplastos gera um gradiente de prótons através da membrana que é usado para dirigir a síntese de ATP. *Ver especialmente* Figuras 14-3 e 14-10.

caderina
Membro da grande superfamília de proteínas de adesão transmembrana. Medeiam a adesão célula-célula dependente de Ca^{+2} em tecidos animais. (Figura 19-4, Tabela 19-2, p. 1135)

Caenorhabditis elegans
Um verme nematoide pequeno (~1 mm) bastante usado como organismo-modelo na biologia molecular e de desenvolvimento.

CAK – *ver* cinase ativadora de cdk

calmodulina
Proteína intracelular ligadora de Ca^{+2} que sofre uma grande mudança conformacional pela ligação de Ca^{+2}, permitindo que regule a atividade de muitas proteínas. Em sua forma ativada (ligada a Ca^{+2}), é chamada de Ca^{+2}/calmodulina. (Figura 15-43)

caloria
Unidade de energia de calor, igual a 4,2 joules. Uma caloria ("c" minúsculo) é a quantidade de calor necessária para elevar em 1°C a temperatura de 1 grama de água. Uma quilocaloria (1.000 calorias) é a unidade utilizada para descrever o conteúdo energético de alimentos.

CAM (molécula de adesão celular)
Proteína presente na superfície de uma célula animal que faz a mediação da ligação célula-célula ou da ligação célula-matriz.

camada germinativa
Uma das três camadas de tecido inicial (endoderme, mesoderme e ectoderme) do embrião animal. (Figura 22-70)

CaM-cinase II
Proteína-cinase multifuncional, dependente de Ca^{+2}/calmodulina, que fosforila a si mesma e várias outras proteínas-alvo quando ativada. Encontrada na maioria das células animais, é especialmente abundante nas sinapses no cérebro, estando envolvida em algumas formas de plasticidade sináptica em vertebrados. (Figura 15-44)

CaM-cinase
Serina/treonina proteína-cinase que é ativada por Ca^{+2}/calmodulina. Indiretamente faz a mediação dos efeitos de um aumento no Ca^{+2} citosólico pela fosforilação de proteínas-alvo específicas. (Figura 15-43)

cAMP – *ver* AMP cíclico

canais de vazamento de K^+
Canal iônico que transporta K^+ presente na membrana plasmática de células animais e que permanece aberto mesmo em uma célula "em repouso". (Painel 11-3, p. 679)

canal (canal de membrana)
Complexo de proteínas transmembrana que permite a difusão passiva de íons inorgânicos ou outras moléculas menores através da bicamada lipídica. (Figuras 11-3 e 11-4)

canal de cátions regulado por voltagem
Tipo de canal iônico encontrado nas membranas de células excitáveis eletricamente (como células nervosas, endócrinas, do óvulo e musculares). Abre-se em resposta a uma variação no potencial de membrana que ultrapasse um valor limiar.

canal de membrana – *ver* canal

canal iônico
Complexo proteico transmembrana que forma um canal cheio de água através da bicamada lipídica, pelo qual íons inorgânicos específicos podem se difundir de acordo com seus gradientes eletroquímicos. (Figura 11-21)

canal iônico regulado por transmissor (receptor acoplado a canal iônico, receptor ionotrópico)
Canal iônico presente nas sinapses químicas nas membranas plasmáticas pós-sinápticas das células nervosas e musculares. Se abre apenas em resposta à ligação de um neurotransmissor extracelular específico. O influxo de íons resultante leva à geração de um sinal elétrico local na célula pós-sináptica. (Figuras 15-16 e 11-35)

câncer
Doença que apresenta controle anormal e impróprio da divisão celular, resultando em crescimentos invasivos, ou tumores, que podem se espelhar por todo o corpo. (Figura 20-37)

capsídeo
Carapaça proteica de um vírus, formada pela autoassociação de uma ou mais subunidades proteicas, gerando estruturas geometricamente regulares. (Figura 3-30)

característica complexa
Característica herdável cuja transmissão para a progênie não segue as simples leis de Mendel. Tais características ocorrem devido à interação de múltiplos genes e/ou interações gene-meio ambiente.

característica poligênica
Característica herdável influenciada por múltiplos genes, cada um fazendo uma pequena contribuição para o fenótipo.

carboidrato
Termo geral para designar açúcares e compostos relacionados contendo carbono, hidrogênio e oxigênio, geralmente com a fórmula empírica $(CH_2O)_n$.

carboxiterminal – *ver* C-terminal

carcinógeno
Qualquer agente, como compostos químicos e formas de radiação, que causa câncer.

carcinoma
Câncer de células epiteliais. A forma de câncer mais comum em humanos.

cariótipo
Conjunto total de cromossomos de uma célula, organizado de acordo com o tamanho, a forma e o número.

carreador ativado
Pequena molécula que se difunde nas células e armazena energia facilmente intercambiável, na forma de uma ou mais ligações covalentes ricas em energia. Exemplos são ATP, acetil-CoA, $FADH_2$, NADH e NADPH. (Figura 2-55)

carreador de elétrons
Molécula, como citocromo *c*, NADH, NADPH e $FADH_2$, que transporta e transfere um elétron de uma molécula doadora para uma molécula aceptora. *Ver também* cadeia transportadora de elétrons, e Figura 2-60.

cartilagem
Forma de tecido conectivo, composta por células (condrócitos) embebidas em uma matriz rica em colágeno tipo II e proteoglicano sulfato de condroitina.

cascata – *ver* cascata de sinalização

cascata de fosforilação
Série de fosforilações sequenciais de proteínas mediada por várias proteína-cinases, onde cada uma fosforila e ativa a próxima cinase na cadeia. Tais cascatas são comuns nas vias de sinalização intracelulares. (Figura 15-60)

cascata de sinalização
Sequência de reações intracelulares ligadas, tipicamente envolvendo múltiplas etapas de amplificação em uma cadeia interligada, acionada por um receptor de superfície celular ativado.

caspase
Protease intracelular que está envolvida na mediação dos eventos intracelulares da apoptose.

catabolismo
Termo geral utilizado para as reações catalisadas por enzimas em uma célula, através das quais moléculas complexas são degradadas a moléculas mais simples, com liberação de energia. (Figura 2-36)

catalisador
Substância que pode diminuir a energia de ativação de uma reação (dessa forma aumentando a sua velocidade), sem ser consumida pela reação.

cátion
Íon carregado positivamente.

cauda poli A – *ver* poliadenilação

cavéolo
Invaginações na superfície celular que brotam internamente para formar vesículas pinocíticas. Imagina-se que se formem a partir de balsas lipídicas, regiões da membrana ricas em certos lipídeos.

CD28
Proteína correceptora em células T que se ligam à proteína coestimulatória B7 em células dendríticas, fornecendo um sinal adicional requerido para ativação de células T imaturas pelo antígeno.

CD4
Proteína correceptora encontrada em células T auxiliares, células T regulatórias e macrófagos. Liga-se a proteínas MHC de classe II (em células apresentadoras de antígenos) fora do canal de ligação de peptídeos.

CD8
Proteína correceptora encontrada em células T citotóxicas. Liga-se a proteínas MHC de classe I (em células apresentadoras de antígenos) fora do canal de ligação de peptídeos.

Cdc20
Subunidade ativadora do complexo promotor de anáfase (APC/C).

Cdc25
Proteína-fosfatase que desfosforila Cdks e aumenta sua atividade.

Cdc6
Proteína essencial na preparação do DNA para replicação. Com Cdt1, ela se liga ao complexo de reconhecimento de origem no DNA cromossomal e ajuda a carregar as proteínas Mcm no complexo para formar o complexo pré-replicativo.

Cdk – *ver* cinase dependente de ciclina

Cdk de fase M – *ver* M-Cdk

Cdk-M (Cdk de fase M)
Complexo ciclina-dependente, formado por uma M-ciclina e a cinase dependente de ciclina correspondente (Cdk), nas células dos vertebrados. (Figura 17-16 e Tabela 17-1, p. 1063)

cDNA
Molécula de DNA sintetizada como uma cópia de mRNA e, portanto, sem os íntrons que estão presentes no DNA genômico.

Cdt1
Proteína essencial na preparação do DNA para replicação. Com Cdc6, ela se liga ao complexo de reconhecimento de origem nos cromossomos e ajuda a carregar as proteínas Mcm no complexo, formando o complexo pré-replicativo.

célula amplificadora em trânsito
Célula derivada de uma célula-tronco que se divide um número limitado de ciclos antes de finalmente se diferenciar. (Figura 23-7)

célula apresentadora de antígeno
Célula que mostra em sua superfície antígenos estranhos complexados com uma proteína MHC para apresentação a linfócitos T.

célula B (linfócito B)
Tipo de linfócito que produz anticorpos.

célula branca do sangue (leucócito)
Nome geral para todas as células sanguíneas nucleadas, desprovidas de hemoglobina. Inclui linfócitos, granulócitos e monócitos.

célula capilar auditiva (célula capilar sensorial)
Células sensoriais no ouvido interno, responsáveis por detectar som pela conversão de estímulos mecânicos (as vibrações causadas pelas ondas sonoras) na liberação de neurotransmissores. (Figuras 23-13 a 23-15)

célula da glia
Célula auxiliar do sistema nervoso. Inclui oligodendrócitos e astrócitos no sistema nervoso central de vertebrados, e células de Schwann no sistema nervoso periférico.

célula de músculo liso – *ver* célula muscular

célula de Schwann
Célula da glia responsável pela formação da bainha de mielina no sistema nervoso periférico. *Comparar com* oligodentrócito. (Figura 11-32)

célula dendrítica
O tipo mais potente de célula apresentadora de antígeno, que capta o antígeno e o processa para sua apresentação para as células T.

célula efetora
Célula que desempenha a função ou resposta final de um processo específico. As principais células efetoras do sistema imune, por exemplo, são os linfócitos e os fagócitos ativados que ajudam a eliminar os patógenos.

célula endócrina
Célula animal especializada que secreta um hormônio no sangue. Normalmente é parte de uma glândula, como a tireoide ou a pituitária.

célula endotelial
Tipo de célula achatada que forma uma camada (o endotélio) revestindo internamente todos os vasos sanguíneos e linfáticos.

célula ES – *ver* célula-tronco embrionária

célula folicular
Um dos tipos de células que envolvem um oócito ou óvulo em desenvolvimento. (Figura 21-24)

célula germinativa
Célula da linhagem germinativa de um organismo, incluindo os gametas haploides e suas respectivas células precursoras diploides. As células germinativas contribuem para a formação de uma nova geração de organismos e são distintas das células somáticas, que formam o corpo e não deixam descendentes.

célula germinativa primordial
Célula em um embrião que é precursora das células que dão origem aos gametas. (Figuras 21-17, 21-23 e 21-30)

célula matadora (*killer cell*)
Qualquer célula eucariótica capaz de matar diretamente outra célula eucariótica.

célula matadora natural (célula NK)
Célula citotóxica do sistema imune inato que pode matar células infectadas por vírus e alguns tipos de células cancerosas. (Figura 24-57)

célula mieloide
Qualquer célula branca do sangue que não seja um linfócito. (Figura 23-42)

célula mioepitelial
Tipo de célula muscular não-estriada encontrada em epitélios, como na íris do olho e no tecido glandular. (Figura 23-47)

célula muscular cardíaca – *ver* célula muscular

célula muscular esquelética – *ver* célula muscular

célula muscular
Tipo de célula especializado em contração. Os três tipos principais são esquelética, cardíaca e muscular lisa. (Figura 23-47)

célula nervosa – *ver* neurônio

célula NK – *ver* célula matadora natural

célula nutridora
Célula do ovário de invertebrados que é conectada através de pontes citoplasmáticas a um oócito em desenvolvimento e que, portanto, fornece ribossomos, mRNAs e proteínas necessárias para o desenvolvimento inicial do embrião. (Figura 21-24)

célula pilosa – *ver* estereocílio

célula pilosa sensorial – *ver* célula pilosa auditiva

célula sanguínea vermelha – *ver* eritrócito

célula somática
Qualquer célula de uma planta ou animal diferente das células da linhagem germinativa. Do grego *soma*, corpo.

célula T (linfócito T)
Tipo de linfócito responsável pelas respostas imunes adaptativas mediadas por células T. A classe inclui células T citotóxicas, células T auxiliares e células T reguladoras.

célula T auxiliar
Tipo de célula T que ajuda a estimular as células B a sintetizarem anticorpos e macrófagos para que matem os microrganismos ingeridos. Também auxilia na ativação de células dendríticas e células T citotóxicas.

célula T citotóxica (célula T matadora)
Tipo de célula T responsável pela destruição de células do hospedeiro infectadas com um vírus ou outro tipo de patógeno intracelular.

celularização
Formação de células ao redor de cada núcleo em um citoplasma multinucleado, transformando-o em uma estrutura multicelular.

células HeLa
Linhagem "imortal" de células epiteliais humanas que cresce ativamente em cultura. Derivada de um carcinoma cervical humano em 1951.

célula-tronco
Célula não-diferenciada que pode continuar a se dividir indefinidamente, gerando células-filhas que podem sofrer diferenciação ou permanecer sendo células-tronco (no processo de autorrenovação). (Figura 23-5)

célula-tronco embrionária (célula ES)
Célula derivada da massa celular interna dos estágios iniciais de embriões de mamíferos. Capaz de originar todas as células do organismo. Ela pode ser crescida em cultura, geneticamente modificada e inserida dentro de um blastocisto para desenvolver um animal transgênico.

célula-tronco hematopoiética
Célula da medula óssea, capaz de autorrenovação, que origina os diversos tipos de células sanguíneas, assim como outros tipos celulares.

celulose
Polissacarídeo estrutural constituído por longas cadeias de unidades de glicose covalentemente ligadas. Fornece força tensora à parede celular de plantas. (Figuras 19-78 e 19-79)

centríolo
Disposição cilíndrica e curta de microtúbulos, muito semelhante estruturalmente ao corpo basal. Um par de centríolos em geral é encontrado no centro de um centrossomo em células animais. (Figura 16-31)

centro de inativação do X (XIC)
Local em um cromossomo X no qual a inativação é iniciada e se espalha para o exterior.

centro de reação fotoquímica
A parte de um fotossistema que converte energia luminosa em energia química na fotossíntese. (Figura 14-43).

centro ferro-enxofre
Grupo transportador de elétrons constituído por dois ou quatro átomos de ferro ligados a um número igual de átomos de enxofre; encontrado em uma classe de proteínas transportadoras de elétrons. (Figura 14-23)

centro organizador de microtúbulos (MTOC)
Região em uma célula, como um centrossomo ou um corpo basal, da qual os microtúbulos se originam.

centrômero
Região constrita do cromossomo durante a mitose, que mantém as cromátides-irmãs unidas. É também o local do DNA onde o cinetocoro é formado apreendendo microtúbulos do fuso mitótico. (Figura 4-50)

centrossomo
Organela de células animais, com localização central, que é o centro primário de organização dos microtúbulos (MTOC) e atua como polo do fuso durante a mitose. Na maioria das células animais, o centrossomo contém um par de centríolos. (Figuras 16-30 e 17-29)

cetona
Molécula orgânica contendo um grupo carbonila ligado a dois grupos alquila. (Painel 2-1, p. 107)

CGN – *ver* complexo *cis* de Golgi

chaperona (chaperona molecular)
Proteína que auxilia a guiar o enovelamento apropriado de outras proteínas, ou ajuda evitando vias incorretas de enovelamento. Inclui as proteínas de choque térmico (Hsp).

ChIP – *ver* imunoprecipitação de cromatina

ciclina G_1
Ciclina presente na fase G_1 do ciclo celular eucariótico. Forma complexos com Cdks e ajuda a controlar a atividade das ciclinas G_1/S, que comandam a progressão da fase S.

ciclina G_1/S
Ciclina que ativa Cdks no estágio final da fase G_1 no ciclo celular das células eucarióticas, ajudando a desencadear a progressão da fase inicial, resultando no comprometimento da célula em entrar no ciclo celular. Esse estágio ocorre no início da fase S. (Figura 17-16)

ciclina M
Tipo de ciclina encontrada em todas as células eucarióticas e que promove os eventos da mitose. (Figura 17-16)

ciclina
Proteína que tem sua concentração periodicamente elevada ou reduzida de acordo com o ciclo celular em eucariotos. As ciclinas ativam proteína-cinases essenciais (chamadas de proteína-cinases dependentes de ciclina, ou Cdks) e, portanto, auxiliam no controle da progressão de um estágio do ciclo celular para o próximo.

ciclo celular (ciclo de divisão celular)
Ciclo reprodutivo de uma célula: a sequência ordenada de eventos pelos quais uma célula duplica seus cromossomos e, normalmente, seu conteúdo, dividindo-se em duas. (Figura 17-4)

ciclo de Calvin – *ver* ciclo de fixação do carbono

ciclo de fixação de carbono (ciclo de Calvin)
Principal rota metabólica em organismos fotossintéticos pela qual CO_2 e H_2O são convertidos em carboidratos. Requer ATP e NADPH. (Figura 14-40)

ciclo de Krebs – *ver* ciclo do ácido cítrico

ciclo do ácido cítrico (ciclo do ácido tricarboxílico [TCA], ciclo de Krebs)
Rota metabólica central encontrada em organismos aeróbicos. Oxida grupos acetil derivados das moléculas de alimento, gerando os carreadores ativados NADH e $FADH_2$, algum GTP e perda de CO_2. Em células eucarióticas, o ciclo ocorre na mitocôndria. (Painel 2-9, p. 122-123)

ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) – *ver* ciclo do ácido cítrico

ciclo do TCA (ácido tricarboxílico) – *ver* ciclo do ácido cítrico

ciclossomo – *ver* complexo promotor de anáfase

ciliado
Organismo eucariótico unicelular (protozoário) caracterizado por vários cílios na sua superfície.

cílio
Extensão em forma de fio de cabelo de uma célula eucariótica, contendo um feixe central de microtúbulos. Várias células contêm um único cílio não envolvido na mobilidade, enquanto outras contêm grandes números que realizam movimentos repetidos, como batimentos. *Comparar com* flagelo.

cílio primário
Cílio curto, único, que não é de movimento, desprovido de dineína, que surge a partir de um centríolo e se projeta a partir da superfície de vários tipos de células. Algumas proteínas de sinalização estão concentradas no cílio primário. (Figura 15-48)

cinase
Enzima que catalisa a adição de grupos fosfato a moléculas. *Ver também* proteína-cinase.

cinase ativadora de Cdk (CAK)
Proteína-cinase que fosforila Cdks em complexos ciclina-Cdk, ativando a Cdk.

cinase de adesão focal (FAK)
Tirosina-cinase citoplasmática presente nas junções célula-matriz (adesão focal) em associação às caudas citoplasmáticas de integrinas.

cinase dependente de ciclina (Cdk)
Proteína-cinase que deve ser complexada com uma proteína ciclina para agir. Complexos distintos de Cdk-ciclina ativam diferentes estágios do ciclo de divisão celular, pela fosforilação específica de proteínas-alvo. (Figura 17-15)

cinesina
Membro de uma das duas principais classes de proteínas motoras que utilizam a energia da hidrólise do ATP para se deslocar ao longo de um microtúbulo. (Figura 16-58)

cinetócoro
Estrutura proteica complexa formada por proteínas no cromossomo mitótico, à qual os microtúbulos se ligam. Desempenha papel ativo no movimento dos cromossomos para os polos. Forma-se no centrômero do cromossomo. (Figura 17-36)

cis
Do mesmo lado.

cisterna
Compartimento achatado, delimitado por membrana, encontrado no retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi. (Figuras 13-3 e 13-25)

citocina
Proteína ou peptídeo de sinalização extracelular que atua como um mediador local na comunicação célula-célula.

citocinese
Divisão do citoplasma das células animais ou vegetais em dois, diferente da divisão associada de seus núcleos (que é mitose). Parte da fase M. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

citocromo
Proteína colorida, contendo o grupo heme, que transfere elétrons durante a respiração celular e a fotossíntese.

citocromo *c*
Componente solúvel da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Sua liberação para dentro do citosol a partir do espaço intermembrana mitocondrial também inicia a apoptose. (Figura 14-26)

citoesqueleto
Sistema de filamentos proteicos no citoplasma de uma célula eucariótica que confere a forma celular e a capacidade de movimento direcionado. Seus componentes mais abundantes são filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.

citoplasma
Conteúdo de uma célula contido em sua membrana plasmática, mas, no caso das células eucarióticas, o que fica fora do núcleo.

citosol
Conteúdo do compartimento principal do citoplasma, excluindo organelas delimitadas por membrana, como o retículo endoplasmático e a mitocôndria.

CKI – *ver* proteína inibidora de Cdk

clatrina
Proteína que se associa em uma gaiola poliédrica na face citoplasmática de uma membrana, de modo a formar uma fossa revestida de clatrina, que é liberada por endocitose, formando uma vesícula revestida de clatrina. (Figura 13-6)

clivagem
(1) Divisão física de uma célula em duas. (2) Tipo especializado de divisão celular visto nos estágios iniciais do desenvolvimento de muitos embriões, no qual uma grande célula é subdividida em várias células menores, sem ocorrer crescimento do embrião.

clone
População de indivíduos idênticos (células ou organismos) formada por divisões repetidas (assexuadas) a partir de um ancestral comum. Também utilizado como um verbo: "clonar um gene", significando produzir muitas cópias de um gene por meio do crescimento de um clone de células carreadoras (como *E. coli*), nas quais um gene foi introduzido e das quais ele pode ser recuperado, por técnicas de DNA recombinante.

clorofila
Pigmento verde que absorve a luz e desempenha uma parte central na fotossíntese em bactérias, plantas e algas.

cloroplasto
Organela presente nas algas verdes e plantas que contém clorofila e realiza fotossíntese. É uma forma especializada de plastídeo.

coativador
Proteína que não se liga ao DNA, mas se monta sobre outras proteínas reguladoras gênicas que se ligam ao DNA para ativar a transcrição de um gene. (Figura 7-51)

código das histonas
Combinação de modificações químicas sofridas pelas histonas (p. ex., acetilação, metilação) e que determinam como e onde o DNA empacotado nos nucleossomos pode ser acessado (p. ex., para replicação ou transcrição). (Figura 4-44)

código genético
Conjunto de regras que especifica a correspondência entre as trincas de nucleotídeos (códons) no DNA ou no RNA, e os aminoácidos das proteínas. (Figura 6-50)

códon
Sequência de três nucleotídeos em uma molécula de DNA ou mRNA que representa a instrução para a incorporação de um aminoácido específico em uma cadeia polipeptídica crescente.

coenzima A (CoA)
Pequena molécula utilizada na transferência enzimática de grupos acil. (*Ver também* acetil-CoA e Figura 2-62)

coenzima
Pequena molécula, fortemente associada a uma enzima, que participa na reação catalisada por essa enzima, frequentemente pela formação de uma ligação covalente com o substrato. Exemplos incluem biotina, NAD^+ e coenzima A.

coesina, complexo de coesina
Complexo de proteínas que mantém as cromátides-irmãs juntas, ao longo de seu comprimento, antes de sua separação. (Figura 17-24)

cofator
Íon inorgânico ou coenzima necessária à atividade de uma enzima.

coimunoprecipitação (co-IP)
Método de isolamento de proteínas que forma um complexo entre elas usando um anticorpo específico para uma das parceiras.

colágeno
Proteína fibrosa rica em glicina e prolina que é o principal componente da matriz extracelular nos animais, conferindo força tensora. Existe em muitas formas: o tipo I, mais comum, é encontrado na pele, nos tendões e nos ossos; o tipo II é encontrado nas cartilagens; o tipo IV está presente na lâmina basal. (Figuras 3-23 e 19-66)

colesterol
Molécula lipídica abundante com uma estrutura característica de quatro anéis esteroides. Um componente importante das membranas plasmáticas das células animais. (Figura 10-4)

complementação (complementação gênica)
Fenômeno no qual o cruzamento de dois indivíduos, cada um apresentando um fenótipo anormal, resulta em descendentes nos quais o fenótipo normal (tipo selvagem) foi restabelecido. Base de um teste para saber se duas mutações estão no mesmo gene ou em genes diferentes. (Painel 8-1, p. 554-555)

complementar
(1) Duas sequências de ácidos nucleicos são ditas complementares se podem formar uma dupla-hélice com as bases perfeitamente pareadas. (Figura 4-4) (2) Outras moléculas que interagem, como uma enzima e seu substrato: que possuem características bioquímicas ou estruturais que se combinam, de modo que a ligação não-covalente é facilitada. (Figura 2-16)

complexo anelar da gama-tubulina (γTuRC)
Complexo proteico que contém γ-tubulina e outras proteínas que são nucleadores eficazes dos microtúbulos e que protegem suas extremidades negativas.

complexo antena
Parte de um fotossistema que captura energia luminosa e a canaliza para dentro de um centro de reação fotoquímica. Consiste em um complexo de proteínas que ligam um grande número de moléculas de clorofila e outros pigmentos.

complexo ARP (proteína relacionada à actina) (complexo ARP2/3)
Complexo de proteínas que provoca a nucleação do crescimento do filamento de actina a partir da extremidade menos (—).

complexo ciclina-Cdk
Complexos de proteínas formados periodicamente durante o ciclo celular de eucariotos, conforme o aumento no nível de ciclina. Uma cinase dependente de ciclina (Cdk) então se torna parcialmente ativada. (Figuras 17-15 e 17-16, e Tabela 17-1, p. 1063)

complexo citocromo b-c_1
A segunda das três bombas de prótons dirigidas por elétrons na cadeia respiratória. Aceita elétrons da ubiquinona. (Figura 14-26)

complexo citocromo-oxidase
A terceira das três bombas de prótons dirigidas por elétrons na cadeia respiratória. Aceita elétrons do citocromo *c* e gera água utilizando o oxigênio molecular como um aceptor de elétrons. (Figura 14-26)

complexo de γ-tubulina em anel (γ-TuRC) – *ver* complexo de gama-tubulina em anel

complexo de poro nuclear (NPC)
Grande estrutura multiproteica formando um canal (o poro nuclear) no envelope nuclear, permitindo o movimento de moléculas selecionadas entre o núcleo e o citoplasma. (Figura 12-9)

complexo de recombinação
Na meiose, um complexo proteico que se monta em uma quebra de DNA de dupla-fita e ajuda a mediar a recombinação homóloga.

complexo de reconhecimento de origem (ORC)
Grande complexo proteico ligado ao DNA na origem de replicação nos cromossomos eucarióticos, durante o ciclo celular. (Figura 5-36)

complexo de remodelamento da cromatina
Complexo enzimático que altera as configurações histona-DNA nos cromossomos eucarióticos, alterando a acessibilidade do DNA a outras proteínas, notavelmente aquelas envolvidas na transcrição.

complexo enzimático respiratório
Qualquer um dos principais complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial que atua como uma bomba de prótons guiada por elétrons para gerar o gradiente de prótons através da membrana interna. (Figuras 14-14 e 14-26)

complexo MHC (complexo principal de histocompatibilidade)
Complexo de genes que codificam uma grande família de glicoproteínas da superfície celular (proteínas MHC). (Figura 25-51)

complexo NADH-desidrogenase
Primeira das três bombas de prótons dirigidas por elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Aceita elétrons do NADH. (Figura 14-26)

complexo pré-iniciação
Complexo multiprotéico montado na origem de replicação no início da fase S do ciclo celular eucariótico. Inicia a síntese de DNA por meio do desenrolamento da hélice de DNA e do carregamento das DNA-polimerases e outras enzimas de replicação sobre as fitas de DNA. (Figura 17-23)

complexo pré-replicativo (pré-RC)
Complexo multiproteico montado na origem de replicação durante o final da mitose e o início da fase G_1 do ciclo celular; um pré-requisito para permitir a montagem do complexo de pré-iniciação e o início da replicação subsequente do DNA. (Figuras 17-22 e 17-23)

complexo principal de histocompatibilidade – *ver* MHC

complexo promotor da anáfase (APC/C) (ciclossomo)
Ubiquitina-ligase que catalisa a ubiquitilação e destruição de securina e M- e S-ciclinas, iniciando a separação das cromátides-irmãs na transição de metáfase para anáfase durante a mitose.

complexo sinaptonemático
Estrutura que mantém os cromossomos homólogos emparelhados unidos durante a prófase I da meiose e promove as últimas etapas da recombinação genética. (Figuras 21-8 e 21-9)

complexo TOM
Complexo proteico com várias subunidades que transporta proteínas através da membrana mitocondrial externa. (Figura 12-23)

complexos TIM
Transportadores proteicos presentes na membrana mitocondrial interna. O complexo TIM23 medeia o transporte de proteínas dentro da matriz e a inserção de algumas proteínas dentro da membrana interna; o complexo TIM22 medeia a inserção de um subgrupo de proteínas dentro da membrana interna. (Figura 12-23)

concentração crítica
Concentração de um monômero de uma proteína, como a actina ou a tubulina, que está em equilíbrio com a forma polimérica da proteína (i.e., reunida em filamentos de actina ou microtúbulos, respectivamente). (Painel 16-2, p. 978-979)

condensina (complexo de condensina)
Complexo de proteínas envolvidas na condensação dos cromossomos antes da mitose. Alvo para a M-Cdk. (Figura 17-27)

condições permissivas (não-restritivas)
Circunstâncias (como temperatura ou disponibilidade de nutrientes) nas quais o efeito fenotípico de uma mutação condicional está ausente; ou seja, onde o fenótipo é normal. (Figura 8-55 e Painel 8-1, p. 554-555)

condições restritivas (não-permissíveis)
Circunstâncias (como temperatura ou disponibilidade de nutrientes) nas quais o efeito fenotípico de uma mutação condicional será evidente. (Figura 8-55 e Painel 8-1, p. 554-555)

condrócito (célula cartilaginosa)
Célula do tecido conectivo que secreta a matriz de cartilagem.

cone de crescimento
Porção móvel migratória de um axônio ou dendrito em crescimento. (Figura 16-105)

conexina
Componente proteico de junções tipo fenda, uma proteína de quatro passagens pela membrana. Seis conexinas se unem na membrana plasmática para formar um conexon, ou "canal hemi". (Figura 19-34)

conexon
Poro cheio de água, localizado na membrana plasmática, formado por um anel de seis subunidades proteicas. É parte de uma junção do tipo fenda: conexons de duas células adjacentes unem-se formando um canal contínuo pelo qual íons e pequenas moléculas podem passar. (Figura 19-34).

constante de afinidade (constante de associação) (K_a)
Medida da intensidade de ligação dos componentes em um complexo. Para os componentes A e B e um equilíbrio de ligação A + B = AB, a constante de associação é dada por [AB] / [A] [B], sendo maior quanto mais forte a ligação entre A e B. (Figura 3-43)

constante de associação – *ver* constante de afinidade

constante de dissociação (K_d)
Medida da tendência de dissociação de um complexo. Para os componentes A e B e o equilíbrio de ligação A + B □ AB, a constante de dissociação é dada por [A] [B] / [AB], sendo menor quanto mais forte for a ligação entre A e B. A constante de dissociação (K_d) é a recíproca de K_a. *Ver também* constante de afinidade, constante de equilíbrio. (Figura 3-43)

constante de equilíbrio (K)
Taxa das constantes de reação direta e reversa de uma mesma reação. Igual à constante de associação ou de afinidade (K_a) para uma reação simples (A + B ↔ AB). *Ver* também constante de afinidade, constante de dissociação. (Figura 3-43)

constante de Michaelis-Menten – *ver* K_M

constitutivo
Que é produzido em quantidades constantes, independentemente das circunstâncias; oposto de regulado.

controle da atividade proteica
Ativação, inativação, degradação ou compartimentalização seletiva de proteínas específicas depois de serem produzidas. Um dos meios pelos quais uma célula controla quais proteínas são ativas em um determinado momento ou local na célula.

controle pós-transcricional
Qualquer controle da expressão gênica exercido após a transcrição do gene ter iniciado. (Figura 7-92)

conversão gênica
Processo pelo qual a informação de uma sequência de DNA pode ser transferida de uma hélice de DNA (que permanece inalterada) para outra hélice de DNA, cuja sequência é alterada. Frequentemente é acompanhada por eventos de recombinação. (Figura 5-66)

cooperatividade
Fenômeno em que a ligação de uma molécula de ligante à molécula-alvo promove a ligação de sucessivas moléculas ligantes. Esse fenômeno é visto na formação de grandes complexos e em enzimas e receptores compostos de várias subunidades alostéricas, quando há uma modulação da resposta ao ligante. (Figura 15-25)

corpo basal
Disposição cilíndrica e pequena de microtúbulos e proteínas associadas encontradas na base de cílios ou flagelos de células eucarióticas. Serve como um sítio para nucleação do crescimento do axonema. A sua estrutura é muito semelhante ao centríolo.

corpo médio
Estrutura formada no final da clivagem, podendo persistir por algum tempo como uma ponte entre as duas células-filhas em animais. (Figura 17-51)

corpo polar
A menor das duas células-filhas produzidas durante a meiose pela divisão assimétrica de um oócito primário ou secundário; a outra filha (maior) é o oócito ou o próprio óvulo. Os corpos polares finalmente degeneram. (Figura 21-23)

correção
Processo pelo qual erros em potencial na replicação, na transcrição e na tradução do DNA são detectados e corrigidos.

correceptor
Em imunologia: receptor nas células B ou células T que não se liga ao antígeno, mas se liga a outras moléculas e auxilia os receptores de ligação ao antígeno a ativar o linfócito. (Figura 25-57) Mais geral: um receptor que colabora com outro receptor convencional de superfície da célula, ajudando-a a responder a proteínas-sinal secretadas. Exemplos são LRP (na via de sinalização Wnt/β-catenina) e os proteoglicanos na superfície da célula. (Figura 15-77)

correpressor
Proteína que não se liga diretamente ao DNA, mas se liga a outras proteínas reguladoras gênicas que se ligam ao DNA para inibir a expressão de um gene. (Figura 7-51)

córtex celular
Camada especializada do citoplasma na face interna da membrana plasmática. Nas células animais, esta é uma camada rica em actina, responsável pelos movimentos da superfície celular.

cotraducional
Ocorre à medida que a tradução ocorre. Exemplos incluem a importação de uma proteína para dentro do retículo endoplasmático, antes que a cadeia polipeptídica esteja completamente sintetizada (translocação cotraducional, Figura 12-35), e o enovelamento de uma proteína nascente em sua estrutura secundária e terciária à medida que emerge de um ribossomo. (Figura 6-84)

cotransporte (transporte acoplado)
Processo de transporte através da membrana em que a transferência de uma molécula depende da transferência simultânea ou sequencial de uma segunda molécula. (Figura 11-8)

Cre/lox
Sistema de recombinação sítio-específica usado para produzir mutações condicionais nas quais o gene-alvo pode ser retirado de um tecido específico ou em um determinado momento. Uma recombinase (Cre) sítio-específica é introduzida sob o controle de um promotor que a ativará quando necessário. O gene a ser interrompido é flanqueado por sequências lox introduzidas, nas quais a Cre ativada opera para retirar o gene. (Figura 5-79)

criptocromo
Flavoproteína responsiva à luz azul, encontrada em plantas e animais. Nos animais, está envolvida com o ritmo circadiano.

crista
Invaginação da membrana mitocondrial interna.

crista neural
Conjunto de células localizadas ao longo de uma linha de onde o tubo neural se diferencia a partir da epiderme adjacente, no embrião dos vertebrados. As células da crista de deslocam para originar uma variedade de tecidos, incluindo neurônios e glia no sistema nervoso periférico, células de pigmento na pele, ossos da face e mandíbula. (Figuras 19-11, 22-84 e 22-97)

cristalografia por raio X (difração de raios X)
Técnica para a determinação do arranjo tridimensional de átomos em uma molécula, com base no padrão de difração de raios X passando através de um cristal dessa molécula. (Figura 8-28)

cromátide
Uma das duas cópias de um cromossomo duplicado formada pela replicação do DNA durante a fase S. As duas cromátides, chamadas de cromátides-irmãs, são unidas no centrossomo.

cromátides-irmãs
Par de cromossomos ligados firmemente que surge a partir de duplicações de cromossomos durante a fase S. Eles se separam durante a fase M e segregam para diferentes células-filhas. (Figura 17-26)

cromatina
Complexo de DNA, histonas e outras proteínas não-histonas, encontrado no núcleo de uma célula eucariótica. É o material do qual são feitos os cromossomos.

cromatografia
Técnica bioquímica em que uma mistura de substâncias é separada por carga, tamanho, hidrofobicidade, afinidades de ligação não-covalentes, ou alguma outra propriedade, através de sua partição entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Usada para separar misturas de proteínas ou ácidos nucleicos. Ver também cromatografia de afinidade, cromatografia de afinidade de DNA e cromatografia líquida de alta performance. (Figuras 8-13 e 8-14)

cromatografia de afinidade por DNA
Técnica para purificação de proteínas que se ligam ao DNA em sequências específicas por sua ligação a uma matriz, à qual estão ligados os fragmentos de DNA apropriados. (Figura 7-28)

cromatografia de afinidade
Tipo de cromatografia em que uma mistura de proteínas a ser purificada é passada através de uma matriz à qual ligantes específicos para a proteína de interesse estão ligados, de modo que a proteína de interesse é retida pela matriz. (Figura 8-13)

cromatografia líquida de alta performance (HPLC)
Tipo de cromatografia que utiliza colunas empacotadas com minúsculas contas de matriz; a solução a ser separada é passada através da coluna sob alta pressão.

cromossomo
Estrutura composta por uma molécula de DNA muito longa e proteínas associadas, contendo toda ou parte da informação genética de um organismo. É especialmente evidente em células de plantas e animais durante a meiose ou a mitose, quando cada cromossomo é condensado, formando uma estrutura semelhante a um carretel, compacta e visível sob microscópio óptico.

cromossomo bacteriano artificial (BAC)
Vetor de clonagem que pode acomodar grandes fragmentos de DNA de até 1 milhão de pares de base.

cromossomo mitótico
Cromossomo duplicado altamente condensado, com os dois novos cromossomos ainda unidos através do centrômero, como cromátides-irmãs.

cromossomo plumoso
Cromossomo gigante, pareado durante a meiose em ovos imaturos de anfíbios, nos quais a cromatina forma grandes alças rígidas que se estendem a partir do eixo linear do cromossomo. (Figura 4-54)

cromossomo politênico
Cromossomo gigante cujo DNA passou por repetidas replicações e suas cópias permaneceram juntas. (Figuras 4-58 e 4-59)

cromossomo sexual
Cromossomo que pode estar presente ou ausente, ou presente em um número variável de cópias, determinando o sexo do indivíduo; em mamíferos, os cromossomos X e Y.

cromossomo X
Um dos dois cromossomos sexuais de mamíferos. As células de mulheres contêm dois cromossomos X, enquanto que as de homens contêm apenas um.

cromossomo Y
Um dos dois cromossomos sexuais dos mamíferos. As células do homem contêm um cromossomo Y e um X.

cromossomos homólogos (homólogos)
Cópia maternal e paternal de um cromossomo específico em uma célula diploide.

C-terminal (carboxiterminal)
A extremidade de uma cadeia polipeptídica que contém um grupo carboxil livre (–COOH). (Figura 3-1)

DAG – *ver* **diacilglicerol**

dálton
Unidade de massa molecular. Aproximadamente igual à massa do átomo de hidrogênio (1,66 x 10^{-24} g).

decaimento de mRNA mediado por alterações sem sentido
Mecanismo para a degradação de mRNA aberrante que contenha códons de parada em fase de leitura antes que seja traduzido em uma proteína. (Figura 6-80)

dedos de zinco
Motivo estrutural de ligação ao DNA presente em muitas proteínas de regulação gênica. Todos os motivos dedo de zinco incorporam um ou mais átomos de zinco que ajudam a manter a conformação da proteína.

degenerado
Não é um julgamento moral, mas um adjetivo que descreve múltiplos estados que produzem a mesma coisa: por exemplo, as diferentes combinações dos trípletes dos nucleotídeos (códons) que codificam para o mesmo aminoácido.

delta *G* – *ver* variação de energia livre

delta *G*° – *ver* variação de energia livre padrão

dendrito
Extensão de uma célula nervosa, muitas vezes ramificada de forma elaborada, recebendo estímulos vindos de outras células nervosas.

dependência de ancoragem
Dependência de crescimento, proliferação e sobrevivência celular na ancoragem a um substrato.

derme
Camada espessa debaixo do tecido conectivo na pele, logo abaixo da epiderme. Rica em colágeno.

desidrogenase
Enzima que remove um íon hidreto (H^-), equivalente a um próton mais dois elétrons de uma molécula de substrato.

desmossomo
Tipo de junção de ancoramento entre células, normalmente formada entre duas células epiteliais. Caracterizado por densas placas proteicas nas quais filamentos intermediários das duas células são inseridos. (Figura 19-3)

desnaturação
Alteração dramática na conformação de uma proteína ou um ácido nucleico, causada pelo calor ou pela exposição a compostos químicos. Normalmente resulta na perda da atividade biológica.

desoxirribose
Componente monossacarídico de cinco carbonos do DNA. Difere da ribose por ter H na posição do carbono 2 ao invés de OH. $C_5H_{10}O_4$. *Comparar com* ribose.

despolarização
Mudança no potencial de membrana da célula para um valor menos negativo dentro.

dessensibilização – *ver* adaptação

destino celular
Em biologia do desenvolvimento, descreve o que uma célula específica originará em um determinado estágio de desenvolvimento, se o desenvolvimento ocorrer normalmente.

determinação
Em biologia do desenvolvimento, uma célula embrionária é dita determinada se ela se torna comprometida com uma via especializada de desenvolvimento específica. Essa determinação reflete uma alteração do caráter interno da célula e precede o processo de diferenciação celular detectado de forma muito mais fácil.

determinante antigênico (epítopo)
Região específica de um antígeno que se liga a um anticorpo ou receptor de célula T.

ΔG – *ver* variação de energia livre

ΔG^0 – *ver* variação-padrão de energia livre

diacilglicerol (DAG)
Lipídeo produzido pela clivagem dos fosfolipídeos do inositol em resposta a sinais extracelulares. É composto por duas cadeias de ácidos graxos ligadas ao glicerol e atua como uma molécula sinalizadora para auxiliar a ativação da proteína-cinase C (PKC). (Figura 15-38)

diferenciação
Processo pelo qual uma célula sofre uma alteração tornando-se um tipo celular verdadeiramente especializado.

difusão facilitada – *ver* transporte passivo

difusão
Fluxo contínuo de moléculas na direção de concentrações mais baixas, devido a movimentos térmicos aleatórios.

dinamina
GTPase citosólica que se liga ao pescoço de uma vesícula revestida por clatrina no processo de brotamento a partir da membrana; está envolvida na finalização da formação da vesícula.

dineína
Grande proteína motora que executa movimentos dependentes de ATP ao longo dos microtúbulos.

diploide
Que contém um genoma duplo (dois conjuntos de cromossomos homólogos e, portanto, duas cópias de cada gene ou lócus genético). *Comparar com* haploide.

disco imaginal
Grupo de células deixadas de lado no embrião de *Drosophila*, aparentemente não diferenciadas, e que desenvolverão uma estrutura do adulto, por exemplo, olho, perna, asa. A diferenciação ocorre durante a metamorfose. (Figura 22-51)

disco Z (linha Z)
Região em forma de disco de um sarcômero muscular, à qual as extremidades mais dos filamentos de actina estão ligadas. Visualizado em micrografia como uma linha transversal escura.

divisão celular
Separação de uma célula em duas células-filhas. Em células eucarióticas, a divisão celular consiste na divisão do núcleo (mitose) imediatamente seguida pela divisão do citoplasma (citocinese).

DNA (ácido desoxirribonucleico)
Polinucleotídeo formado por unidades de desoxirribonucleotídeos ligadas covalentemente. Serve como o armazenador da informação hereditária dentro de uma célula e como o carreador dessa informação de uma geração para a outra. (Figura 4-3 e Painel 2-6, p. 116-117)

DNA complementar – *ver* cDNA

DNA duplex
DNA de dupla-fita.

DNA genômico
DNA que constitui o genoma de uma célula ou de um organismo. Frequentemente utilizado em contraposição ao termo cDNA (DNA obtido por transcrição reversa, a partir de mRNA). Clones de DNA genômico representam o DNA clonado diretamente a partir do DNA cromossômico; uma coleção desses clones, de um determinado genoma, é chamada de biblioteca de DNA.

DNA recombinante
Qualquer molécula de DNA formada pela ligação de segmentos de DNA de diferentes origens.

DNA satélite
Regiões de DNA altamente repetitivo em um cromossomo eucariótico, geralmente identificadas pela sua composição incomum de nucleotídeos. Normalmente presente nos centrômeros (assim como em outros locais) em eucariotos superiores. Acredita-se que tenha um papel na função do centrômero. (Figura 4-49)

DNA-helicase
Enzima envolvida na abertura da hélice do DNA em fitas simples para a replicação do DNA.

DNA-ligase
Enzima que une as extremidades de duas fitas de DNA por meio de uma ligação covalente, formando uma fita de DNA contínua.

DNA-polimerase
Enzima que sintetiza DNA pela união de nucleotídeos, usando um molde de DNA como guia.

DNA-primase
Enzima que sintetiza uma fita curta de RNA a partir de um molde de DNA, produzindo um iniciador (*primer*) para a síntese de DNA. (Figura 5-11)

doador de elétrons
Molécula que facilmente doa um elétron, tornando-se oxidada no processo.

doença autoimune, resposta auto-imune
Estado patológico no qual o corpo monta uma resposta imune neutralizadora adaptativa contra uma ou mais de suas moléculas.

doença do príon
Encefalopatias espongiformes transmissíveis – como Kuru e a doença de Creutzfeld-Jacob (CJD) em humanos, *scrapie* em ovelhas e encefalopatia espongiforme bovina (BSE, ou "doença da vaca louca") – que são causadas e transmitidas por uma proteína infecciosa mal dobrada (príon). (Figura 24-18)

dominante
Em genética, refere-se ao membro de um par de alelos que é expresso no fenótipo do organismo, enquanto o outro alelo não é, mesmo quando os dois alelos estão presentes. Oposto de recessivo. (Painel 8-1, p. 554-555)

domínio (domínio proteico)
Porção de uma proteína com uma estrutura terciária particular. As proteínas grandes são em geral compostas por vários domínios, cada um conectado ao próximo através de regiões flexíveis curtas da cadeia polipeptídica. Domínios homólogos são reconhecidos em várias proteínas diferentes.

domínio de homologia com plecstrina (domínio PH)
Domínio proteico encontrado em algumas proteínas de sinalização intracelular. Alguns domínios PH nas proteínas de sinalização intracelular se ligam ao fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato produzido pela PI 3-cinase, levando a proteína de sinalização para a membrana plasmática quando a PI 3-cinase é ativada.

domínio de imunoglobulina (domínio de Ig)
Domínio proteico característico de aproximadamente 100 aminoácidos que é encontrado na cadeia leve e na cadeia pesada de imunoglobulinas. Domínios similares, conhecidos como domínios do tipo imunoglobulina (do tipo Ig), estão presentes em muitas outras proteínas envolvidas em interações célula-célula e no reconhecimento de antígenos, definindo a superfamília Ig. (Figura 25-32)

domínio PDZ
Domínio de ligação a proteínas presente em diversas proteínas estruturais, frequentemente utilizado como local de ancoragem pelas caudas intracelulares das proteínas transmembrana. (Figura 19-21)

domínio PH – *ver* domínio de homologia com plecstrina

domínio proteico – *ver* domínio

domínio SH2
Região 2 de homologia src, um domínio proteico presente em muitas proteínas sinalizadoras. Se liga a uma sequência curta de aminoácidos contendo uma tirosina fosforilada. (Painel 3-2, p. 132-133)

Drosophila melanogaster
Espécie de mosca pequena, comumente chamada de mosca-da-fruta. Um organismo-modelo em genética molecular.

E. coli* – *ver Escherichia coli

ectoderma
Tecido epitelial embrionário que é o precursor da epiderme e do sistema nervoso.

edição de RNA
Tipo de processamento de RNA que altera a sequência de nucleotídeos de um transcrito de pré-mRNA depois de ser sintetizado pela inserção, deleção ou alteração de nucleotídeos individuais.

efeito de posição
Diferença na expressão gênica que depende da posição do gene no cromossomo e, provavelmente, reflete diferenças no estado da cromatina ao longo do cromossomo. Quando um gene ativo é colocado próximo à heterocromatina, a influência de inativação da heterocromatina pode se espalhar e afetar o gene com graus variáveis, dando origem à *variegação do efeito posicional*. (Figura 4-36)

efrina
Uma de uma família de proteínas ligadas à membrana, ligante dos receptores Eph de tirosina-cinase (RTKs) que, dentre diversas outras funções, estimulam as respostas de repulsão ou de atração que guiam a migração de células e de axônios das células nervosas durante o desenvolvimento animal.

eIF – *ver* fator de iniciação eucariótico

elastina
Proteína extracelular que forma as fibras extensíveis (fibras elásticas) nos tecidos conectivos.

elemento genético móvel
Elemento genético (segmento de DNA) capaz de mover-se ou copiar-se de uma posição para outra no genoma.

elemento isolador
Sequência de DNA que impede que uma proteína de regulação gênica ligada ao DNA na região de controle de um gene influencie a transcrição de genes adjacentes. (Figura 7-62)

elemento transponível (transposon)
Segmento de DNA que se move de uma posição no genoma para outra por transposição. (Tabela 5-3, p. 318)

eletroforese
Técnica para a separação de moléculas (geralmente proteínas ou ácidos nucleicos) com base na sua velocidade de migração através de um meio poroso submetido a um forte campo eletrônico.

elétron
Partícula subatômica negativamente carregada que orbita o núcleo de um átomo. (Figura 2-1)

eletroporação
Método utilizado para a introdução de DNA nas células, especialmente em bactérias, no qual um breve choque elétrico torna a membrana celular temporariamente permeável ao DNA exógeno.

endocitose
Incorporação de material para dentro da célula, através de uma invaginação da membrana plasmática, e a sua internalização em uma vesícula delimitada por membrana. *Ver também* pinocitose e fagocitose.

endocitose mediada por receptor
Internalização de complexos receptor-ligante da membrana plasmática, por endocitose. (Figura 13-53)

endócrino
Relativo a hormônios ou às glândulas que os secretam.

endoderme
Tecido embrionário que é o precursor do intestino e dos órgãos associados.

endonuclease
Enzima que cliva ácidos nucleicos *componentes* de uma cadeia polinucleotídica. *Compare com* exonuclease.

endossomo
Organela delimitada por membrana, em células animais, que transporta materiais recém-ingeridos por endocitose e transfere muitos desses materiais para a degradação nos lisossomos.

endossomo de reciclagem
Grande vesícula intracelular delimitada por membrana formada de um fragmento de um endossomo; um estágio intermediário na passagem de receptores reciclados de volta à membrana celular. (Figura 13-60)

energia de ativação
Energia extra que deve ser adquirida pelos átomos ou moléculas além da energia de seu estado fundamental para atingir o estado de transição e sofrer uma reação química particular. (Figura 2-44)

energia de ligação
Força da ligação química entre dois átomos, medida pela energia necessária para quebrá-la, em quilocalorias ou quilojoules.

energia livre (*G*) (energia livre de Gibbs)
Energia que pode ser retirada de um sistema e ser empregada em reações. Leva em consideração alterações na energia e entropia. (Painel 2-7, p. 118-119)

energia livre de Gibbs – *ver* energia livre

engenharia genética (tecnologia do DNA recombinante)
Conjunto de técnicas por meio das quais segmentos de DNA de diferentes origens são combinados para originar um novo DNA, frequentemente chamado de DNA recombinante. A tecnologia do DNA recombinante é amplamente utilizada na clonagem de genes, na modificação genética de organismos e na biologia molecular em geral.

ensaio de atividade de mobilidade em gel
Técnica para a detecção de proteínas ligadas a sequências específicas de DNA, com base no fato de que a proteína ligada limita a migração do fragmento de DNA no gel durante a eletroforese. (Figura 7-27)

entropia (*S*)
Quantidade termodinâmica que mede o grau de desordem ou a aleatoriedade de um sistema; quanto maior a entropia, maior a desordem. (Painel 2-7, p. 118-119)

envelope nuclear (membrana nuclear)
membrana dupla (duas bicamadas) que circunda o núcleo. Composta por uma membrana externa e uma membrana interna, sendo perfurada por poros. A membrana externa é contínua com o retículo endoplasmático. (Figuras 4-9 e 12-8)

envelope viral
Bicamada fosfolipídica, derivada da membrana plasmática da célula hospedeira, que cobre um vírus envelopado. Recobre o nucleocapsídeo. (Figura 24-15)

enzima
Proteína que catalisa uma reação química específica.

enzima proteolítica – *ver* protease

epiderme
Camada epitelial que recobre a superfície externa do corpo. Apresenta diferentes estruturas em diferentes grupos animais. A camada externa dos tecidos das plantas também é chamada de epiderme.

epinefrina – *ver* adrenalina

epistático
Descreve a mutação em um gene que mascara o efeito da mutação de outro gene, quando as duas mutações estiverem presentes em um mesmo organismo ou em uma mesma célula.

epitélio
Camada de célula que recobre a superfície externa de uma estrutura ou que recobre uma cavidade.

epítopo – *ver* determinante antigênico

equação de Nernst
Expressão quantitativa que relaciona a proporção de equilíbrio das concentrações de um íon de cada lado de uma membrana permeável à diferença de voltagem através da membrana. (Painel 11-2, p. 670)

eritrócito (célula vermelha do sangue)
Pequena célula sanguínea que contém hemoglobina, nos vertebrados, e que é responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos, e de dióxido de carbono dos tecidos. (Figura 11-40)

eritropoetina
Um hormônio produzido pelo rim e que estimula a produção de células vermelhas do sangue, na medula óssea.

***Escherichia coli* (*E. coli*)**
Bactéria em forma de bastonete, normalmente encontrada no cólon de humanos e outros mamíferos, amplamente utilizada em pesquisa biomédica.

esfingolipídeo
Fosfolipídeo derivado da esfingosina. (Figura 10-3)

espectrina
Proteína abundante associada à face citosólica da membrana plasmática das células sanguíneas vermelhas, formando uma rede rígida que suporta a membrana. Também está presente em outras células. (Figura 10-41)

espectrometria de massa (MS)
Técnica utilizada para a identificação de compostos com base na sua relação precisa entre carga e massa. Ferramenta poderosa para a identificação de proteínas e o sequenciamento de polipeptídeos. (Figura 8-21)

espermatogênese
Desenvolvimento do espermatozoide no testículo. (Figura 21-30)

espermatozoide
O gameta masculino maduro em animais. Ele é móvel e geralmente pequeno, em comparação ao óvulo. (Figura 21-27)

espliceossomo
Grande grupo de RNA e moléculas de proteína que executam o *splicing* do pré-mRNA nas células eucarióticas. (Figuras 6-29 e 6-30)

estado de transição
Estrutura que se forma transientemente durante uma reação química e que possui o maior valor de energia livre de qualquer intermediário da reação. Sua formação é o passo limitante da velocidade de uma reação. (Figura 3-46)

éster
Molécula formada pela reação de condensação de um grupo álcool com um grupo ácido. Grupos fosfato geralmente formam ésteres quando ligados a uma segunda molécula. (Painel 2-1, p. 106-107)

estereocílio
Microvilosidade grande e rígida, encontrada formando um tipo de ducto, presente na superfície apical das células pilosas presentes no ouvido. Um estereocílio contém um feixe de filamentos de actina, ao invés de microtúbulos; portanto, não é um cílio verdadeiro. (Figuras 23-13 e 23-15)

esteroide
Molécula lipídica hidrofóbica com uma estrutura de quatro anéis característica, derivada do colesterol. Vários hormônios importantes, incluindo cortisol, estrogênio e testosterona que ativam receptores nucleares intracelulares. (Painel 2-5, p. 114-115)

estimulador
Sequência reguladora de DNA à qual se ligam as proteínas reguladoras, aumentando a taxa de transcrição de um gene estrutural, que pode estar localizado a diversas centenas de pares de base de distância.

estocástico
Aleatório. Envolvendo chance, probabilidade e variedades randômicas.

estroma
(1) Tecido conectivo no qual o epitélio glandular ou outro epitélio está embebido. Células do estroma fornecem o meio necessário para o desenvolvimento de outras células dentro do tecido. (Figura 20-19) (2) Grande espaço no interior de um cloroplasto, contendo enzimas que incorporam CO_2 em açúcares. (Figura 12-21)

estrutura primária
Sequência linear de unidades monoméricas em um polímero, como a sequência de aminoácidos em uma proteína.

estrutura quaternária
Relação tridimensional entre as diferentes cadeias polipeptídicas em uma proteína com múltiplas subunidades ou complexo proteico.

estrutura secundária
Padrão estrutural (enovelamento) local e regular de uma molécula polimérica; em proteínas, α-hélices e folhas β.

estrutura terciária
Forma complexa tridimensional de uma cadeia polimérica enovelada, especialmente uma proteína ou molécula de RNA.

eubactérlas
Bactérias verdadeiras, em contraposição às arquebactérias. (Figura 1-21)

eucarloto
Organismo composto de uma ou mais células e que apresenta um núcleo distinto. Membro de uma das três principais divisões dos organismos vivos, sendo os outros dois as bactérias e as arquebactérias. (Figura 1-21)

eucromatina
Região de um cromossomo que se cora difusamente durante a interfase; é a cromatina "normal", ao contrário da heterocromatina, que é mais condensada.

exclusão alélica
A expressão de uma proteína a partir de apenas um dos dois alelos do gene que codifica para a proteína na célula, como ocorre, por exemplo, na expressão de uma imunoglobulina ou corrente de receptores de células T ou um receptor olfativo.

exocitose
Processo através do qual a maioria das moléculas é secretada de uma célula eucariótica. Essas moléculas são englobadas por vesículas delimitadas por membrana que se fundem com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o exterior.

éxon
Segmento de um gene eucariótico que consiste em uma sequência de nucleotídeos que será representada no mRNA, ou no tRNA final, no rRNA, ou na molécula madura de RNA. Em genes que codificam proteína, os éxons codificam os aminoácidos da proteína. Um éxon geralmente está adjacente a um segmento de DNA não-codificante, chamado de íntron.

exonuclease
Enzima que cliva um nucleotídeo de cada vez nas extremidades dos polinucleotídeos. *Compare com* endonuclease.

expressão gênlca
Produção, por um gene, de um produto molecular observável (RNA ou proteína).

extensão convergente
Rearranjo celular dentro de um tecido, causando a extensão em uma dimensão e a diminuição em outra. (Figura 22-76)

extremidade mais (+)
Extremidade de um microtúbulo ou filamento de actina na qual a adição de monômeros ocorre prontamente; é a extremidade de "crescimento rápido" de um microtúbulo ou filamento de actina. A extremidade mais de um filamento de actina também é conhecida como extremidade pontiaguda. (Painel 16-2, p. 978-979)

extremidade menos (–)
Extremidade de um microtúbulo ou filamento de actina na qual a adição de monômeros de actina ocorre menos prontamente; extremidade de "crescimento lento" de um microtúbulo ou filamento de actina. A extremidade menos de um filamento de actina também é conhecida por extremidade pontiaguda. (Painel 16-2, p. 978-979.)

FAD/FADH$_2$ (flavlna adenlna dinucleotídeo/flavina adenlna dlnucleotídeo reduzido)
Sistema transportador de elétrons que atua no ciclo do ácido cítrico. Uma molécula de FAD recebe dois elétrons e dois prótons, tornando-se a molécula carreadora ativada, FADH$_2$. (Figura 2-83)

fago – *ver* bacteriófago

fagócito
Termo genérico usado para uma célula fagocítica especializada – isto é, uma célula como um macrófago ou neutrófilo, especializada na incorporação de partículas e microrganismos por fagocitose. (Figuras 13-46 e 13-47)

fagocitose
Processo pelo qual células, debris e outros materiais particulados indesejados são endocitados ("ingeridos") por uma célula. Proeminente em células carnívoras, como a *Amoeba proteus*, e em macrófagos e neutrófilos de vertebrados. Do grego *phagein*, comer. (Figura 24-53)

fagossomo
Grande vesícula intracelular delimitada por membrana formada como resultado da fagocitose. Contém material extracelular ingerido. (Figura 24-30)

FAK – *ver* clnase de adesão focal

família Bcl2
Família de proteínas intracelulares que tanto promovem quanto inibem a apoptose pela regulação da liberação de citocromo *c* e outras proteínas mitocondriais do espaço intermembrana no citosol.

família de inlbidores de apoptose – *ver* família IAP

família de receptores do tipo Toll (TLR)
Importante família de receptores de reconhecimento de padrão em mamíferos, abundantes sobre ou dentro de células do sistema imune inato. Reconhecem imunoestimulantes associados a patógenos, como lipopolissacarídeo e peptideoglicano. (Figura 24-51)

família IAP (inlbldores de apoptose)
Proteínas intracelulares que inibem a apoptose.

Fas (proteína Fas, receptor de apoptose Fas)
Receptor transmembrana de apoptose que inicia o processo de apoptose quando ligado ao seu ligante extracelular (ligante Fas). (Figura 18-6)

fase aberta de leitura (ORF)
Uma sequência contínua de nucleotídeos que não apresente códons de parada em ao menos uma das três fases de leitura possíveis (e, portanto, com potencial para codificar uma proteína).

fase de leitura
Fase na qual os nucleotídeos são lidos em conjuntos de três, para codificar uma proteína. Uma molécula de mRNA pode ser lida em qualquer uma de três fases de leitura, contudo apenas uma originará a proteína requerida. (Figura 6-51)

fase G$_0$
Estado estacionário do ciclo de divisão celular dos eucariotos pela entrada em uma digressão quiescente a partir da fase G$_1$. Estado comum, em alguns casos permanente, das células diferenciadas.

fase G$_1$
Fase 1 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas, entre o final da mitose e o início da síntese de DNA. (Figura 17-4)

fase G$_2$
Fase 2 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas, entre o final da síntese de DNA e o início da mitose. (Figura 17-4)

fase M
Período do ciclo celular dos eucariotos durante o qual os cromossomos estão condensados e o núcleo e o citoplasma se dividem. (Figura 17-4 e Painel 17-1, p. 1072-1073)

fase S
Período do ciclo celular das células eucarióticas em que ocorre síntese de DNA. (Figura 17-4)

fator de catástrofe
Proteína que desestabiliza os arranjos de microtúbulos pelo aumento na frequência de desmontagem rápida de subunidades de tubulina de uma das extremidades (catástrofe). (Figura 16-16)

fator de crescimento
Proteína de sinalização extracelular que pode estimular o crescimento celular. Esses fatores frequentemente possuem outras funções, incluindo o estímulo à sobrevivência e à proliferação celular. Exemplos incluem o fator de crescimento de epiderme (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
Proteína secretada que estimula o crescimento de vasos sanguíneos. (Tabela 15-4, p. 923, e Figura 23-35)

fator de elongação (EF)
Nomenclatura utilizada tanto na transcrição quanto na tradução. Na transcrição, fatores de elongação se associam à RNA-polimerase e permitem que ela transcreva longas porções de DNA sem que se dissocie. Na tradução, os fatores de elongação se ligam ao ribossomo e, pela hidrólise de GTP, medeiam a adição de aminoácidos à cadeia nascente de polipeptídeos.

fator de iniciação (IF e eIF)
Proteína que promove a associação adequada dos ribossomos com mRNA e é necessária para iniciar a síntese proteica. Abreviada como eIF em eucariotos e IF em procariotos. eIFs ajudam a ligar o Met-tRNAi ao ribossomo, iniciando a tradução. (Figura 6-72)

fator de iniciação eucariótico (eIF)
Proteína que auxilia a ligação do tRNA ao ribossomo, iniciando, portanto, a tradução.

fator de liberação
Proteína que permite a liberação de proteínas recém-sintetizadas a partir de ribossomos pela ligação ao ribossomo no local do tRNA (cuja estrutura ele mimetiza). (Figura 16-74)

fator de necrose tumoral (TNFα)
Citocina especialmente importante em induzir a resposta inflamatória. (Figura 15-79)

fator de sobrevivência
Sinal extracelular que promove a sobrevivência de uma célula pela inibição da apoptose. (Figura 18-14)

fator de transcrição
Termo indistintamente aplicado a qualquer proteína necessária para iniciar ou regular a transcrição em eucariotos. Inclui as proteínas de regulação gênica, os fatores gerais de transcrição, os coativadores, as enzimas modificadoras de histonas e os complexos de remodelamento da cromatina. (Figuras 6-19 e 7-44)

fator estimulador de colônia (CSF)
Nome geral para numerosas moléculas sinalizadoras que controlam a diferenciação das células do sangue.

fator geral de transcrição
Qualquer uma das proteínas cuja ligação ao promotor é necessária à ligação e ativação da RNA-polimerase e para o início da transcrição. (Tabela 6-3, p. 341)

fator permutador de nucleotídeo de guanina (GEF)
Proteína que se liga a uma GTPase causando a sua ativação, por estimular a liberação do GDP, que está fortemente ligado a ela e, dessa forma, permitindo a ligação do GTP em seu lugar. (Figura 3-73)

fenótipo
Caráter observável em uma célula ou organismo (incluindo aparência física e comportamento). (Painel 8-1, p. 554-555)

fermentação
Via metabólica anaeróbia produtora de energia. Na glicólise anaeróbica, o piruvato é convertido em lactato ou etanol, com a conversão de NADH em NAD^+. (Figura 2-71)

fertilização
Fusão de um gameta masculino e um feminino (ambos haploides), formando um zigoto diploide, que se desenvolve em um novo indivíduo.

fertilização *in vitro* (IVF)
Um tratamento para a infertilidade onde os óvulos são fertilizados com esperma fora do corpo da mãe; os óvulos fertilizados com sucesso são cultivados por alguns dias, e os embriões iniciais são então transferidos para o útero da mãe.

fibra elástica
Fibras extensoras formadas pela proteína elastina em diversos tecidos conectivos animais, como pele, vasos sanguíneos e pulmões, conferindo a sua propriedade de elasticidade e estiramento.

fibroblasto
Tipo celular comum encontrado nos tecidos conectivos. Secreta uma matriz extracelular rica em colágeno e outras macromoléculas de matriz extracelular. Migra e prolifera prontamente em tecidos danificados e em cultura de tecidos.

fibronectina
Proteína da matriz extracelular que está envolvida na adesão de células à matriz e na orientação das células que estão migrando durante a embriogênese. As integrinas presentes na superfície celular são receptores para a fibronectina.

filamento de actina (microfilamento)
Filamento de proteína em hélice formado pela polimerização de moléculas de actina globular. É o principal constituinte do citoesqueleto de todas as células eucarióticas e parte do aparato contrátil do músculo esquelético. (Painel 16-1, p. 968)

filamento intermediário
Proteína filamentosa fibrosa (com cerca de 10 nm de diâmetro) que forma redes com forma de corda em células animais. Um dos três tipos mais importantes de filamentos do citoesqueleto. (Painel 16-1, p. 968-969)

filogenia
História evolutiva de um organismo ou grupo de organismos, geralmente apresentada na forma de diagrama como uma árvore filogenética. (Figuras 4-75 e 14-72)

filopódio (microespículas)
Protuberância fina, em forma de espinho, com um núcleo de actina, gerada na superfície de uma célula animal que está se movimentando. (Figura 16-47)

filtro de seletividade
Parte da estrutura de um canal iônico que determina quais íons o canal pode transportar. (Figuras 11-23 e 11-24)

FISH – *ver* hibridização fluorescente *in situ*

fita retardada
Uma das duas fitas de DNA recém-sintetizadas encontradas na forquilha de replicação. A fita retardada é sintetizada em fragmentos descontínuos que são, posteriormente, ligados covalentemente. (Figura 5-7)

fita-líder
Uma das duas fitas de DNA recém-sintetizadas encontradas na forquilha de replicação. A fita-líder é formada por síntese contínua na direção 5' para 3'. (Figura 5-7)

fixação de nitrogênio
Processo bioquímico executado por bactérias específicas que reduz o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia, levando, ao final do processo, a vários metabólitos contendo nitrogênio.

fixador
Reagente químico, como formaldeído, glutaraldeído ou tetróxido de ósmio, utilizado para preservar células para microscopia. As amostras tratadas com esses reagentes são ditas "fixadas" e o processo é chamado de fixação.

flagelo
Protusão longa, como um chicote, cujas ondulações conduzem uma célula através de um meio líquido. Os flagelos eucariotos são versões longas dos cílios. Os flagelos de bactérias são menores e completamente diferentes quanto à construção e ao mecanismo de ação. *Comparar com* cílio.

flavina adenina dinucleotídeo – *ver* FAD/$FADH_2$

fluorescência
Emissão de luz realizada por algumas substâncias (fluorocromos) quando seus elétrons, tendo sido excitados pela absorção de luz, retornam para seus estados normais, e mais baixos, de energia. A radiação emitida é sempre de uma energia mais baixa (maior comprimento de onda) do que a radiação absorvida.

fluxo de microtúbulos
Movimento de moléculas individuais de tubulina nos microtúbulos do fuso, em direção aos polos, com perda de tubulina na extremidade

negativa. Ajuda a gerar o movimento em direção aos polos das cromátides-irmãs, após a sua separação na anáfase. (Figura 17-41)

folha β — *ver* folha beta

folha beta (folha β)
Motivo estrutural comum em proteínas no qual diferentes seções da cadeia polipeptídica se alinham uma ao lado da outra, unidas por ligações de hidrogênio entre os átomos do esqueleto polipeptídico. Também conhecida como uma folha β pregueada. (Figura 3-7)

***footprinting* – *ver footprinting* de DNA**

***footprinting* de DNA**
Técnica para determinar a sequência de DNA à qual uma proteína ligadora de DNA se liga. (Figura 7-29)

força hidrofóbica
Força exercida por uma rede de água mantida por ligações de hidrogênio, que aproxima duas superfícies apolares, através da exclusão da água entre elas. (Painel 2-3, p. 110-111)

força próton-motriz
Força exercida por um gradiente de prótons eletroquímico motriz que move prótons através de uma membrana. (Figura 14-13)

forquilha de replicação
Região em forma de Y de uma molécula de DNA em replicação na qual as duas fitas de DNA estão sendo separadas e as fitas-filhas estão sendo formadas. (Figuras 5-7 e 5-19)

fosfatase
Enzima que catalisa a remoção hidrolítica de grupos fosfato de uma molécula.

fosfatidilcolina (lecitina)
Lipídeo comum presente em abundância na maioria das membranas biológicas. (Figura 10-3)

fosfatidilinositol 3-cinase (PI 3-cinase)
Enzima ligada à membrana, componente da via de sinalização intracelular da PI 3-cinase/Akt. Ela fosforila fosfatidilinositol 4,5-bifosfato na posição 3 do anel inositol para produzir sítios de ancoramento para o PIP_3 na membrana para outras proteínas de sinalização intracelular. (Figura 15-64)

fosfatidilinositoi 4,5-bifosfato (PI[4,5]P_2, PIP_2)
Um fosfolipídeo inositol de membrana (um fosfoinositídeo) que é clivado pela fosfolipase C em IP_3 e diacilglicerol no início da via de sinalização de fosfolipídeo inositol. Também pode ser fosforilado pela PI 3-cinase para originar sítios de ancoragem PIP_3 para proteínas de sinalização na via de sinalização PI 3-cinase/Akt. (Figuras 15-38 e 15-64)

fosfatidilinositol
Um fosfolipídeo de inositol. (Figura 15-37)

fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo – *ver* $NADP^+$/NADPH

fosfogiicerídeo
Fosfolipídeo derivado de um glicerol, abundante nas biomembranas. (Figuras 10-2 e 10-3)

fosfoinositídeo – *ver* fosfolipídeo inositol

fosfolipase C (PLC)
Enzima ligada à membrana que cliva fosfolipídeos de inositol para produzir IP_3 e diacilglicerol na via de sinalização do fosfolipídeo de inositol. PLCβ é ativado por GPCRs via proteínas G específicas, enquanto PLCγ é ativado por RTKs. (Figuras 25-39 e 15-55)

fosfolipídeo
A principal categoria de lipídeos utilizada na construção de membranas biológicas. Normalmente composto de dois ácidos graxos ligados por fosfato de glicerol (ou esfingosina) a um grupo polar, dentre uma variedade de grupos polares possíveis. (Figura 10-3 e Painel 2-5, p. 114-115)

fosfolipídeos de inositol (fosfoinositídeos)
Um lipídeo que contém um derivado do inositol fosforilado. É um componente secundário da membrana plasmática, mas importante na demarcação de diferentes membranas e na transdução de sinais intracelulares em células eucarióticas. (Figura 15-37)

fosforilação
Reação na qual um grupo fosfato é covalentemente acoplado a uma outra molécula.

fosforilação oxidativa
Processo que ocorre em bactérias e em mitocôndrias no qual a formação de ATP é direcionada pela transferência de elétrons através de uma cadeia transportadora de elétrons, até uma molécula de oxigênio. Envolve a produção intermediária de um gradiente de prótons (gradiente de pH) através da membrana e o acoplamento quimiosmótico desse gradiente à ATP-sintase. (Figuras 14-10 e 14-14)

fotoativação
Técnica para estudar processos intracelulares nos quais uma forma inativa de uma molécula de interesse é introduzida na célula, sendo então ativada por um feixe de luz focalizado em um ponto preciso na célula. (Figura 9-30)

fotofosforilação não-cíclica
Processo fotossintético que produz ATP e NADPH em plantas e cianobactérias. (Figura 14-49)

fotorreceptor
Célula ou molécula sensível à luz.

fotorreceptor bastonete
Célula fotorreceptora na retina de vertebrados responsável pela visão não colorida com pouca luz. (Figura 23-17)

fotorrespiração
Processo metabólico dispendioso que ocorre em plantas em condições de baixo CO_2 no qual o O_2 é usado e o CO_2 é liberado sem a produção de carboidratos para armazenamento.

fotossíntese
Processo por meio do qual plantas, algas e algumas bactérias utilizam a energia do sol para sintetizar moléculas orgânicas a partir de dióxido de carbono e água. (Figuras 2-40 e 14-38)

fotossistema
Complexo multiproteico envolvido na fotossíntese que captura a energia da luz solar e a converte em formas utilizáveis de energia. (Figura 14-43)

fragmento de restrição
Fragmento de DNA gerado pela ação de enzimas de restrição.

fragmentos de Okazaki
Pequenos segmentos de DNA produzidos na fita descontínua, durante a replicação do DNA. Eles são rapidamente unidos pela ação da enzima DNA-ligase, formando uma fita contínua de DNA. (Figura 5-7)

fragmoplasto
Estrutura composta de microtúbulos e filamentos de actina que se forma no plano equatorial (prospectivo) de divisão de uma célula vegetal e guia a formação da placa celular. (Figura 17-57)

FRAP – *ver* recuperação da fluorescência após fotodegradação

FRET – *ver* transferência de energia por ressonância de fluorescência

fungo
Reino de organismos eucariotos que inclui leveduras, mofos e cogumelos. Muitas doenças de plantas, e um número relativamente menor de doenças de animais, são causadas por fungos.

fuso mitótico
Disposição dos microtúbulos e das moléculas associadas formada entre os polos opostos de uma célula eucariótica durante a mitose, atuando no afastamento dos cromossomos duplicados. (Figura 17-28 e Painel 17-1, p. 1072-1073)

***G* – *ver* energia livre**

G_1/S-Cdk
Complexo ciclina-Cdk formado nas células dos vertebrados pela ciclina G_1/S e a cinase dependente de ciclina (Cdk) correspondente. (Figura 17-16 e Tabela 17-1, p. 1063)

G_1-Cdk
Complexo ciclina-Cdk formado, nas células de vertebrados, por uma ciclina G_1 e a cinase dependente de ciclina (Cdk) correspondente. (Tabela 17-1, p. 1063)

GAG – *ver* **glicosaminoglicanos**

gameta
Célula haploide especializada (um espermatozoide ou um oócito), formada a partir da célula germinativa primordial por meio de meiose; especializada na reprodução sexual. *Ver também* célula germinativa.

gânglio
Conjunto composto principalmente por células nervosas e células da glia associadas, localizado fora do sistema nervoso central.

gangliosídeo
Qualquer glicolipídeo contendo um ou mais resíduos de ácido siálico em sua estrutura. Encontrado na membrana plasmática de células eucarióticas; especialmente abundante nas células nervosas. (Figura 10-18)

GAP – *ver* **proteína ativadora de GTPase**

gastrulação
Estágio na embriogênese animal durante o qual o embrião se transforma de uma bola de células em uma estrutura com uma cavidade abdominal rudimentar (uma gástrula). (Figura 22-3)

GEF – *ver* **fator de troca de nucleotídeos de guanina**

gema
Reservas nutricionais ricas em lipídeos, proteínas e polissacarídeos, presentes nos óvulos de muitos animais.

geminina
Proteína que previne a formação de novos complexos pré-replicativos durante a fase S e a mitose, garantindo que os cromossomos tenham sido replicados apenas uma vez em cada ciclo celular.

gene
Região do DNA transcrita como uma única unidade e que carrega informações sobre uma característica hereditária particular, geralmente correspondente a (1) uma única proteína (ou conjunto de proteínas relacionadas, geradas pelo processamento pós-transcricional) ou (2) um único RNA (ou conjunto de RNAs relacionados).

gene *Cdc* (gene de ciclo de divisão celular)
Gene cujo produto (uma proteína Cdc) controla uma etapa específica ou um conjunto de etapas no ciclo celular eucariótico. Originalmente identificado em leveduras.

gene de manutenção (*housekeeping*)
Gene que desempenha uma função necessária a todos os tipos de células de um organismo, independentemente da função especializada de cada célula.

gene de polaridade de segmento
No desenvolvimento da *Drosophila*, um gene envolvido na especificação da organização ântero-posterior de cada segmento do corpo. (Figuras 22-37 e 22-41)

gene de rRNA
Gene que especifica um rRNA.

gene de virulência
Gene que contribui para a habilidade de um organismo de causar doença.

gene do ciclo de divisão celular – *ver* **gene *Cdc***

gene estrutural
Região do DNA que codifica para uma proteína ou para uma molécula de RNA que é parte de uma estrutura ou possui uma função enzimática. Diferente de regiões do DNA que regulam a expressão gênica.

gene gap
No desenvolvimento de *Drosophila*, um gene que é expresso em locais específicos do corpo, ao longo do eixo ântero-posterior, no embrião inicial, e que ajuda a determinar as principais divisões do corpo do inseto. (Figura 22-37)

gene marcador selecionável
Gene incluído em uma construção de DNA para sinalizar a presença da construção em uma célula e tornar possível a seleção de células de acordo com a presença ou não da construção.

gene pair-rule
No desenvolvimento de *Drosophila*, gene expresso em uma série de listras transversais ao eixo do corpo do embrião, ajudando a determinar os diferentes segmentos corporais. (Figura 22-37)

gene pró-neural
Gene cuja expressão determina as células com o potencial para se desenvolverem como tecido neural.

gene repórter
Construção genética, normalmente artificial, na qual uma cópia do DNA regulador de um gene de interesse está ligada a uma sequência que codifica para um produto facilmente detectável. A presença ou ausência desse produto (a proteína repórter) em uma célula contendo a construção indica se o gene de interesse é ativo ou inativo. (Figura 8-70)

gene seletor homeótico
No desenvolvimento de *Drosophila*, o gene que define e preserva as diferenças entre os segmentos do corpo.

gene supressor de tumor
Gene que parece ajudar a impedir a formação de um câncer. Mutações com perda de função nesses genes favorecem o desenvolvimento do câncer. (Figura 20-27)

genes de efeito materno
Genes que atuam na mãe, especificando moléculas de mRNA materno e proteínas no óvulo. Mutações de efeito materno afetam o desenvolvimento do embrião, mesmo que o embrião não tenha herdado o gene mutado.

genes do complexo *Hox*
Grupos de genes de codificam fatores de regulação gênica, onde cada gene contém um homeodomínio e especifica diferenças entre os segmentos corporais. As mutações *hox* geralmente acarretam transformações homeóticas.

genética
O estudo dos genes de um organismo quanto à sua hereditariedade e variação.

genética reversa
Abordagem para descobrir a função dos genes que começa no DNA (gene) e seu produto proteico e então cria mutantes para analisar a função do gene.

genoma
Informação genética total que pertence a uma célula ou a um organismo; em particular, a informação mantida no DNA.

genômica
Estudo das sequências de DNA e das propriedades dos genomas totais.

genótipo
Constituição genética de uma célula individual ou de um organismo. Combinação particular de alelos observada em um indivíduo específico. (Painel 8-1, p. 554-555)

GFP – *ver* **proteína verde fluorescente**

G_i – *ver* **proteína G inibitória**

giga-
Prefixo que denota um bilhão (10^9).

glicerol
Pequena molécula orgânica precursora de diversas pequenas moléculas presentes nas células, incluindo os fosfolipídeos. (Painel 2-5, p. 114-115)

glicogênio
Polissacarídeo composto exclusivamente por unidades de glicose. Utilizado no armazenamento de energia nas células animais. Grandes grânulos de glicogênio são encontrados em abundância nas células hepáticas e musculares. (Figura 2-75 e Painel 2-4, p. 112-113)

glicolipídeo
Molécula de lipídeo ligada a um resíduo de açúcar ou de oligossacarídeo. (Painel 2-5, p.114-115)

glicólise
Via metabólica universal que ocorre no citosol na qual açúcares são degradados de maneira incompleta, com a produção de ATP. Literalmente, "quebra do açúcar". (Figura 2-70 e Painel 2-8, p. 120-121)

glicoproteína
Qualquer proteína com uma ou mais cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente à cadeia lateral dos aminoácidos. A maior parte das proteínas secretadas e a maior parte das proteínas expostas na face externa da membrana plasmática é de glicoproteínas.

glicosaminoglicanos (GAG)
Polissacarídeo longo, linear e altamente carregado, composto pela repetição de um par de açúcares, um dos quais sendo um açúcar amino. Encontrado principalmente ligado de forma covalente a proteínas centrais na matriz extracelular de proteoglicanos. Exemplos incluem sulfato de condroitina, hialuronan e heparina. (Figura 19-55)

glicose
Açúcar de seis carbonos que desempenha papel central no metabolismo das células vivas. Armazenado na forma de polímeros, como glicogênio nas células animais e como amido nas células das plantas. (Painel 2-4, p. 112-113)

glicosilação
Adição de um ou mais açúcares a uma proteína ou a uma molécula de lipídeo.

glicosilase – *ver* DNA-glicosilase

glucagon
Hormônio produzido no pâncreas e que estimula as células hepáticas a converter o glicogênio armazenado em glicose, levando a um aumento dos níveis de açúcar do sangue. Efeito oposto ao da insulina.

GMP cíclico (cGMP)
Nucleotídeo gerado a partir de GTP pela enzima guanilil-ciclase, em resposta a vários sinais extracelulares.

gordura
Lipídeo de armazenamento de energia nas células. Composto por triglicerídeos – ácidos graxos esterificados ao glicerol.

G_q
Classe de proteína G que acopla GPCRs à fosfolipase C-β, ativando a via de sinalização do fosfolipídeo de inositol.

gradiente eletroquímico
A influência combinada de uma diferença na concentração de um íon nos dois lados da membrana e a diferença de carga elétrica através da membrana (potencial de membrana). Íons ou moléculas carregadas podem se mover passivamente a favor do seu gradiente eletroquímico.

grampo deslizante
Complexo proteico que segura a DNA-polimerase sobre o DNA durante a replicação do DNA. (Figura 5-18)

grana
Discos de membrana empilhados (tilacoides) presentes nos cloroplastos, contendo clorofila e sendo o local das reações de captação de luz na fotossíntese. (Figuras 14-35 e 14-36)

grânulo cortical
Vesícula secretora especializada presente sob a membrana plasmática de óvulos não-fertilizados, inclusive em óvulos de mamíferos. O conteúdo dos grânulos corticais, liberado por exocitose após a fertilização, altera a cobertura do óvulo de modo a prevenir a entrada de outros espermatozoides.

granulócito
Categoria de célula branca do sangue que se distingue pela presença constante de grânulos no seu citoplasma. Inclui neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Formado a partir de uma célula precursora de granulócito/macrófago (GM). (Figura 23-37)

grupo acila (—CO—R)
Grupo funcional derivado de um ácido carboxílico($R—C(=O)OH$).

grupo alquila (C_nH_{2n+1})
Termo geral para um grupo de átomos de carbono e hidrogênio covalentemente ligados, como os grupos metil ($—CH_3$) ou etil ($—CH_2CH_3$). Geralmente existem como parte de moléculas orgânicas maiores. Sozinhos, eles formam radicais livres extremamente reativos.

grupo amino ($—NH_2$)
Grupo funcional fracamente básico derivado de amônia (NH_3) no qual um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por outro átomo. Em soluções aquosas, ele pode receber um próton e carregar uma carga positiva ($—NH_3^+$).

grupo carbonila (C=O)
Átomo de carbono ligado a um oxigênio por ligação dupla. (Painel 2-1, p.107)

grupo carboxila (–COOH)
Átomo de carbono ligado a um átomo de oxigênio por ligação dupla e a um grupo hidroxila. Moléculas contendo um grupo carboxila são ácidos fracos – ácidos carboxílicos. (Painel 2-1, p.107)

grupo metil ($–CH_3$)
Grupo químico hidrofóbico derivado do metano (CH_4).

G_s – *ver* proteína G estimulatória

GTP (5'-trifosfato de guanosina)
Trifosfato de nucleosídeo produzido pela fosforilação do GDP (difosfato de guanosina). Assim como o ATP, libera grandes quantidades de energia livre pela hidrólise do seu grupo fosfato terminal. Possui papel especial na formação dos microtúbulos, na síntese proteica e na sinalização celular. (Figura 2-83)

GTPase monomérica – *ver* GTPase

GTPase
Enzima que converte GTP em GDP. As GTPases são divididas em duas grandes famílias. As grandes **proteínas G triméricas** são compostas por três subunidades distintas e ligam, principalmente, GPCRs a enzimas ou canais iônicos na membrana plasmática. As pequenas **proteínas monoméricas ligadoras de GTP** (também chamadas de **GTPases monoméricas**) são compostas por uma única subunidade e auxiliam na transmissão de sinais a partir de diversos tipos de receptores celulares de superfície, regulando o tráfego de vesículas intracelulares, e na sinalização com o citoesqueleto. Tanto as proteínas G triméricas quanto as GTPases monoméricas sofrem ciclos entre as formas ativa, ligada ao GTP, e inativa, ligada ao GDP, frequentemente atuando com interruptores moleculares nas vias de sinalização. (Figura 15-19)

H^- – *ver* íon

H^+ – *ver* próton

haploide
Que possui apenas uma única cópia do genoma (um conjunto de cromossomos), como em um espermatozoide, em um oócito não-fertilizado, ou em uma bactéria. *Comparar com* diploide.

haplótipo
Genótipo haploide.

helicase – *ver* DNA-helicase

dupla-hélice
Estrutura tridimensional do DNA, em que duas cadeias de DNA antiparalelas, unidas por meio de ligações de hidrogênio entre as bases, estão enroladas em uma hélice. (Figura 4-5)

hélice-alça-hélice (HLH)
Motivo estrutural de ligação ao DNA, presente em diversas proteínas de regulação gênica, composto por uma pequena α-hélice conectada, através de uma alça flexível, a uma α-hélice longa. Sua estrutura permite que duas proteínas que contenham o domínio HLH formem dímeros, em um complexo que se liga ao DNA. Não confundir com o motivo estrutural hélice-volta-hélice. (Figura 7-23)

hélice-volta-hélice (HTH)
Motivo estrutural de ligação ao DNA, presente em diversas proteínas de regulação gênica, composto por duas α-hélices mantidas ligadas em um ângulo fixo através de uma pequena cadeia de ami-

noácidos que compõe uma volta. As proteínas que apresentam esse motivo estrutural frequentemente formam dímeros simétricos e se ligam a sequências similares de DNA, com disposição também simétrica na cadeia de DNA. Não confundir com o motivo estrutural hélice-alça-hélice. (Figuras 7-10, 7-11, 7-12)

heme
Molécula orgânica cíclica contendo um átomo de ferro que transporta oxigênio na hemoglobina e um elétron nos citocromos. (Figura 14-22.)

hemidesmossomo
Junção celular de ancoramento especializada entre uma célula epitelial e a lâmina basal subjacente.

hemopoiese (hematopoiese)
Produção de células sanguíneas, principalmente na medula óssea. (Figura 23-42)

hepatócito
Principal tipo celular do fígado.

herança epigenética
Herança de alterações fenotípicas em uma célula ou em um organismo, que não são resultado de alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Pode ocorrer através de retroalimentação positiva de proteínas reguladoras ou através da hereditariedade de modificações na cromatina, como a metilação do DNA ou modificações nas histonas, induzindo a formação de heterocromatina. (Figuras 4-35 e 7-86)

heterocarion
Célula com dois ou mais núcleos geneticamente diferentes produzida pela fusão de duas ou mais células diferentes.

heterocromatina
Região do cromossomo que permanece na forma de cromatina anormalmente condensada; em geral, não é ativamente transcrita. *Comparar com* eucromatina.

heterodímero
Complexo proteico composto por duas cadeias polipeptídicas diferentes.

heterozigoto
Célula diploide ou indivíduo que possui dois alelos diferentes para um ou mais genes específicos.

hialuronan (ácido hialurônico)
Tipo de glicosaminoglicano não-sulfatado, com uma repetição regular na sua sequência — de até 25.000 unidades idênticas de dissacarídeo, não ligados a uma proteína central. Encontrado nos fluidos lubrificantes de articulações e em diversos outros tecidos. (Figuras 19-56 e 19-57)

hibridização
Em biologia molecular, o processo pelo qual duas fitas complementares de ácidos nucleicos formam uma dupla-hélice de DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA. É a base de uma técnica eficaz para a detecção de sequências específicas de nucleotídeos. (Figuras 5-54 e 8-36)

hibridização após transferência para gel – *ver blotting*

hibridização de ácidos nucléicos – *ver* hibridização

hibridização fluorescente *in situ* (FISH)
Técnica na qual sondas de ácidos nucleicos marcados com fluorocromos são hibridizadas com sequências específicas de DNA ou RNA, *in situ*.

hibridização *in situ*
Técnica na qual uma sonda de RNA ou DNA de fita simples é utilizada para localizar um gene ou uma molécula de mRNA em uma célula ou tecido através de hibridização.

hibridoma
Linhagem celular utilizada na produção de anticorpos monoclonais. Obtida pela fusão de linfócitos B secretores de anticorpos com células de um tumor linfoide. (Figura 8-8)

hidrocarboneto
Composto formado apenas por átomos de hidrogênio e carbono. (Ver Painel 2-1, p. 106-107)

hidrofílico
Que se dissolve rapidamente em água. Literalmente, "amante da água".

hidrofóbico (lipofílico)
Que não se dissolve rapidamente em água. Literalmente, "aversão à água".

hidrolase
Termo geral para as enzimas que catalisam reações de clivagem hidrolítica. Inclui nucleases e proteases.

hidrólise (adjetivo hidrolítico)
Clivagem de uma ligação covalente com concomitante adição de água. Fórmula geral: $AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$.

hidroxila (–OH)
Grupo químico consistindo em um átomo de hidrogênio ligado a um oxigênio, como em um álcool. (Painel 2-1, p. 106-107)

hipermutação somática
Acúmulo de mutações pontuais nas sequências codificantes montadas de regiões variáveis dos genes de imunoglobulinas que ocorre quando células B são ativadas para formar células de memória. Resulta na produção de anticorpos com sítios de ligação a anticorpos alterados.

hipertônico
Descreve qualquer meio com uma concentração suficientemente alta de solutos capaz de causar a saída de água de uma célula por osmose.

hipotônico
Descreve qualquer meio com uma concentração suficientemente baixa de solutos capaz de causar a entrada de água em uma célula por osmose.

histona
Membro de um grupo abundante de pequenas proteínas, ricas em arginina e lisina. As histonas formam a região central dos nucleossomos, ao redor dos quais o DNA se enrola, nos cromossomos eucarióticos. (Figura 4-25)

histona chaperona (fator de associação de cromatina)
Proteína que se liga às histonas livres, liberando-as quando incorporadas à cromatina recém-sintetizada.

histona H1
Histona de "ligação" (em oposição às histonas "centrais" dos nucleossomos) que se liga ao DNA na região da cadeia que não está ligada ao nucleossomo; auxilia o empacotamento dos nucleossomos sob a forma de fibra de cromatina de 30 nm. (Figura 4-34)

HIV
Vírus da imunodeficiência humana, o retrovírus causador da AIDS. (Figuras 13-19 e 24-16)

HLH – *ver* hélice-alça-hélice

homeobox
Pequena sequência conservada (180 pares de bases de comprimento) de DNA que codifica um motivo proteico de ligação ao DNA (homeodomínio); famoso por sua presença em genes que estão envolvidos na coordenação do desenvolvimento em uma grande variedade de organismos.

homeodomínio
Domínio de ligação ao DNA que define uma classe de proteínas de regulação gênicas, importantes para o desenvolvimento animal. (Figuras 3-13 e 7-13)

homologia
Genes, proteínas ou estruturas do corpo que são similares, refletindo uma origem evolutiva comum.

homólogo
Um de dois ou mais genes que possuem sequências similares, resultado da derivação a partir do mesmo gene ancestral. O termo homólogo inclui tanto ortólogos quanto parálogos. (Figura 1-25) *Ver* cromossomos homólogos.

homozigoto
Organismo ou célula diploide que possui dois alelos idênticos de um gene específico, ou conjunto de genes.

hormônio
Molécula sinalizadora secretada por uma célula endócrina para a corrente sanguínea, podendo então ser levada até células-alvo distantes.

HPLC – *ver* cromatografia líquida de alta performance

IF – *ver* fator de iniciação

Ig – *ver* anticorpo

ilha CG
Região do DNA com uma grande densidade média de sequências CG; essas regiões geralmente permanecem não-metiladas.

immunoblotting* – *ver blotting

imortalização
Produção de uma linhagem celular com capacidade aparentemente ilimitada de divisões celulares. Pode ser o resultado de uma mutação ou transformação viral, ou ainda de uma fusão das células originais com células de uma linhagem tumoral.

impressão – *ver* impressão genômica

impressão genômica
Fenômeno no qual um gene é expresso, ou não, na prole, dependendo de qual dos pais ele foi herdado. (Figura 7-82)

impulso nervoso – *ver* potencial de ação

imunoglobulina (Ig)
Uma molécula de anticorpo. Vertebrados superiores possuem cinco classes de imunoglobulinas – IgA, IgD, IgE, IgG e IgM – cada uma com uma função diferente na resposta imune adaptativa.

imunoprecipitação (IP)
Uso de um anticorpo específico para isolar o antígeno proteico correspondente a partir de uma solução. A técnica pode identificar complexos de interação de proteínas em extratos celulares, utilizando um anticorpo específico para uma das proteínas para a precipitação do complexo. *Ver também* imunoprecipitação de cromatina e coimunoprecipitação.

imunoprecipitação de cromatina (ChIP)
Técnica pela qual o DNA cromossomal ligado a uma determinada proteína pode ser isolado e identificado por meio da sua precipitação com um anticorpo contra a proteína ligada. (Figura 7-32)

in vitro
Que ocorre em um extrato isolado, que não contém células, em contrapartida a uma célula viva; também utilizado em alguns casos para distinguir estudos realizados em cultivos celulares de estudos realizados em organismos intactos. (Do latim, "no vidro".)

in vivo
Em uma célula intacta ou em um organismo. (Do latim, "em vida".)

inativação do X
Inativação de uma cópia do cromossomo X nas células somáticas das fêmeas de mamíferos.

indução
Em biologia do desenvolvimento, uma alteração no destino de desenvolvimento de um tecido causada por uma interação com outro tecido. Esse efeito é chamado de interação indutiva. (Figuras 22-10 e 22-16)

informação posicional
Informação fornecida ou contida pelas células, de acordo com suas posições em um organismo multicelular. Um registro interno da informação posicional de uma célula é chamado de seu valor posicional.

inibição por retroalimentação
Processo pelo qual o produto de uma reação inibe uma reação preliminar de uma mesma via. (Figuras 3-56 e 3-57)

iniciador
Oligonucleotídeo que forma pares com uma fita-molde de DNA ou RNA e promove a síntese de uma nova fita complementar por uma polimerase.

iniciador de RNA
Pequeno trecho de RNA sintetizado sobre um molde de DNA. É requerido pelas DNA-polimerases para o início da síntese de DNA.

início (ponto de verificação do início, ponto de restrição)
Ponto de verificação importante no final de G_1 no ciclo celular de mamíferos. A passagem pelo início compromete a célula a entrar na fase S. O termo foi originalmente utilizado apenas para esse ponto de verificação do ciclo celular de leveduras; o ponto equivalente no ciclo celular de mamíferos foi chamado de ponto de restrição. Neste livro, usaremos Início para ambos. (Figura 17-14)

inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)
Pequena molécula sinalizadora intracelular produzida durante a ativação da via de sinalização dos fosfolipídeos de inositol. Atua na liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. (Figuras 15-38 a 15-39)

inositol
Molécula de açúcar em formato de anel que compõe parte dos fosfolipídeos de inositol.

instabilidade dinâmica
Conversão súbita de forma estirada a forma encolhida, e vice-versa, em um filamento proteico como um microtúbulo ou filamento de actina. (Painel 16-2, p. 978-979)

instabilidade genética
Taxa de mutação anormalmente aumentada, como ocorre nas células cancerígenas.

insulina
Hormônio polipeptídico secretado por células β no pâncreas e que auxilia a regulação do metabolismo de glicose em animais. (Figura 3-35)

integrina
Proteína transmembrana de adesão, envolvida na adesão de células à matriz extracelular e na adesão de uma célula à outra. (Figura 19-4, e Tabela 19-2, p. 1135)

interfase
Período longo do ciclo celular, entre uma mitose e outra. Inclui as fases G1, S e G2. (Figura 17-4)

interferon (IFN)
Membro de uma classe de citocinas secretadas por células infectadas por vírus, e por certos tipos de células T ativadas. Os interferons induzem respostas antivirais, inibindo a replicação viral e estimulando macrófagos e outras células NK a matar as células infectadas por vírus. (Figura 25-60)

interleucina (IL)
Citocina secretada que medeia, principalmente, interações locais entre as células brancas do sangue (leucócitos) durante a inflamação e as respostas imunes. (Tabela 25-4, p.1598)

íntron
Região não-codificante de um gene eucarioto que é transcrita na molécula de RNA, mas é removida através do *splicing* do RNA durante a produção do mRNA ou outra estrutura de RNA funcional. (Figura 4-15)

inversão
Tipo de mutação na qual um segmento de um cromossomo é invertido. (Painel 8-1, p. 554-555)

íon
Um átomo que tenha ganhado ou perdido elétrons, adquirindo carga; por exemplo, Na^+ e Cl^-.

íon hidreto (H^-)
Um próton (H^+) com dois elétrons ($2e^-$). Equivalente a um átomo de hidrogênio com um elétron extra.

íon hidrogênio
Um próton (H^+) em uma solução aquosa. A base da acidez. Uma vez que o próton se combina rapidamente a uma molécula de água para formar H_3O^+, é mais correto chamá-lo de íon hidrônio.

íon hidrônio (H_3O^+)
Molécula de água associada em um próton adicional. Forma geralmente assumida por prótons em solução aquosa.

ionóforo
Pequena molécula hidrofóbica que se dissolve na bicamada lipídica, aumentando a permeabilidade da bicamada a íons inorgânicos específicos.

IP_3 – *ver* inositol-1,4,5-trifosfato

IRES – *ver* sítio interno de entrada de ribossomos

isoforma
Uma de um conjunto de formas variáveis de uma proteína derivada por *splicing* alternativo de um transcrito comum ou como produto de diferentes membros de um conjunto de genes homólogos.

isomerase
Enzima que catalisa o rearranjo das ligações em uma molécula. *Ver também* topoisomerase.

isômeros
Moléculas formadas pelos mesmos átomos e ligações químicas, mas que apresentam conformação tridimensional distinta. (Painel 2-4, p. 112-113)

isoprenóide (poli-isoprenoide)
Molécula lipídica com um esqueleto de carbono com base em múltiplas unidades de isopreno (com cinco carbonos). Exemplos incluem o ácido retinoico e o dolicol. (Painel 2-5, p. 114-115)

isótopo
Uma das várias formas de um átomo que diferem no peso atômico mas possuem o mesmo número de prótons e elétrons e, portanto, a mesma matéria química. Podem ser estáveis ou radiativos.

joule
Unidade-padrão de energia no sistema métrico. Um joule é a energia liberada em um segundo, por uma fonte de um watt de potência. Aproximadamente igual a 0,24 calorias.

junção aderente
Junção celular em que a face citoplasmática da membrana plasmática está ligada a filamentos de actina. Exemplos incluem os cintos de adesão que unem células epiteliais adjacentes e os contatos focais na superfície inferior de fibroblastos em cultura.

junção compacta
Junção célula-célula que sela células epiteliais adjacentes, evitando a passagem da maioria das moléculas dissolvidas de um lado para outro da camada epitelial. (Figuras 19-3 e 19-26)

junção comunicante
Junção entre células que liga o citoplasma de células adjacentes e fornece uma passagem para pequenas moléculas e íons de célula para célula. Em tecidos animais, é composta pelas proteínas conexina ou inexina. Nas plantas, uma função semelhante é realizada pelos plasmodesmatas. (Figura 19-2 e Tabela 19-1, p. 1133)

junção de ancoramento
Tipo de junção celular que une células às células vizinhas ou à matriz extracelular. (Figura 19-2 e Tabela 19-1, p. 1133)

junção de Holliday
Estrutura em forma de X observada no DNA que está passando por recombinação, onde as duas moléculas de DNA estão unidas no local de recombinação; também chamada de permuta de fitas cruzadas. (Figura 5-61)

junção neuromuscular
Sinapse química especializada entre um axônio terminal de um neurônio motor e uma célula muscular esquelética. (Figuras 11-36 e 11-39)

junção oclodunte
Tipo de junção celular que une as células de um epitélio, formando uma barreira através da qual mesmo moléculas pequenas não podem passar – tornando a camada de células uma barreira impermeável (ou seletivamente permeável). (Figura 19-2 e Tabela 19-1, p. 1133)

junção septada
Principal tipo de junção celular ocludente em invertebrados; sua estrutura é distinta daquela das junções compactas dos vertebrados. (Figura 19-28)

junção sinalizadora
Tipo complexo de junção entre células que permite que sinais sejam liberados de uma célula para outra através da sua membrana plasmática em locais de contato entre as células. Normalmente incluem proteínas de ancoramento, assim como proteínas que fazem a mediação da transdução de sinal. (Figura 19-2 e Tabela 19-1, p. 1133)

junção tipo fenda
Junção comunicante célula-célula, em forma de um canal, presente na maior parte dos tecidos animais e que permite que íons e pequenas moléculas passem do citoplasma de uma célula para o citoplasma da próxima célula.

K – *ver* constante de equilíbrio

K_a – *ver* constante de afinidade

K_d – *ver* constante de dissociação

K_M
Constante de Michaelis-Menten. Igual à concentração de substrato na qual uma enzima funciona na metade da sua velocidade máxima. Altos valores de K_M geralmente indicam que a enzima se liga ao seu substrato com baixa afinidade. (Painel 3-3)

lambda – *ver* bacteriófago lambda

lamelipódio
Projeção achatada, laminar, sustentada por uma rede de filamentos de actina, que se estende no limite de uma célula animal em movimento. (Figuras 16-86 e 16-87)

lâmina – *ver* lâmina nuclear

lâmina basal
Fina camada de matriz extracelular que separa as camadas epiteliais e muitos outros tipos celulares, como células musculares ou células de gordura, do tecido conectivo. Algumas vezes é chamada de membrana basal. (Figura 19-40)

lâmina nuclear
Rede fibrosa de proteínas na superfície interna da membrana nuclear interna. Ela é composta por uma rede de filamentos intermediários formados a partir das laminas nucleares.

lamina nuclear
Subunidade proteica dos filamentos intermediários que forma a lâmina nuclear.

laminina
Proteína fibrosa da matriz extracelular, encontrada na lâmina basal, onde forma uma rede laminar. (Figuras 19-42 e 19-43)

lecitina – *ver* fosfatidilcolina

lectina
Proteína que se liga fortemente a um açúcar específico. Lectinas presentes em grandes quantidades nas sementes das plantas frequentemente são utilizadas como reagentes de afinidade para purificação de glicoproteínas, ou para sua detecção na superfície de células.

leptina
Hormônio peptídico secretado pelos adipócitos. Ajuda a regular o desejo de comer pela supressão do apetite.

letalidade sintética
Uma interação entre dois genes mutantes na qual os dois genes mutantes juntos resultam em morte celular, enquanto que cada mutação sozinha não causa a morte.

leucemia
Câncer das células brancas do sangue.

leucócito – *ver* célula sanguínea branca

levedura
Termo comum para designar várias famílias de fungos unicelulares. Inclui espécies usadas na fabricação da cerveja e de pães, e também espécies patogênicas. Estão entre os eucariotos mais simples.

levedura de brotamento
Nome comum frequentemente dado à levedura utilizada na fabricação de pães, *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo comumente utilizado para experimentos, que se divide dando origem a um broto (uma célula menor).

levedura de fissão
Nome comum frequentemente dado à levedura *Schizosaccharomyces pombe*, um organismo-modelo. Ela se divide originando duas células de mesmo tamanho.

ligação covalente
Ligação química estável entre dois átomos, produzida pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons. (Figura 2-5 e Painel 2-1, p.106-107)

ligação de alta energia
Ligação covalente cuja hidrólise libera uma quantidade anormalmente grande de energia livre nas condições existentes na célula. Um grupo ligado a uma molécula por esse tipo de ligação é prontamente transferido de uma molécula para outra. Exemplos incluem as ligações fosfodiéster no ATP e a ligação tioéster na acetil-CoA.

ligação de hidrogênio
Ligação não-covalente na qual um átomo de hidrogênio eletropositivo é parcialmente compartilhado por dois átomos eletronegativos. (Painel 2-3, p. 110-111)

ligação dissulfeto (–S–S–)
Ligação covalente formada entre dois grupos sulfidril de cisteínas. Para proteínas extracelulares, é uma maneira comum de unir duas proteínas ou porções diferentes da mesma proteína. A ligação dissulfeto é formada no retículo endoplasmático das células eucarióticas. (Painel 2-1, p.107, e Figura 3-28)

ligação fosfoanidro
Ligação de alta energia entre grupos fosfato, como nas moléculas de ATP e GTP. (Painel 2-6, p. 116-117)

ligação fosfodiéster
Uma ligação química covalente formada quando dois grupos hidroxil formam ligações éster com o mesmo grupo fosfato, como entre nucleotídeos adjacentes no RNA e no DNA. (Figura 2-28)

ligação glicosídica
Ligação química formada pela reação de condensação entre um grupo hidroxila de um átomo de carbono do açúcar que carrega um aldeído, uma cetona ou uma outra molécula a outro açúcar. As ligações glicosídicas são encontradas em diversas estruturas, incluindo polissacarídeos, ácidos nucleicos e glicoproteínas. *Ver* oligossacarídeos de ligação *O* e de ligação *N*. (Painel 2-4, p. 112-113)

ligação heterofílica
Ligação entre duas moléculas de tipos diferentes, especialmente aquelas que envolvem adesão célula-célula. (Figura 19-8)

ligação homofílica
Ligação entre moléculas do mesmo tipo, principalmente aquelas que envolvem adesão célula-célula. (Figura 19-8)

ligação iônica
Ligação através de atração eletrostática entre dois átomos, um com carga positiva e outro com carga negativa. Um tipo de ligação não-covalente. (Figura 2-5 e Painel 2-3, p. 110-111)

ligação não-covalente (atração não-covalente, interação não-covalente)
Ligação química na qual, ao contrário da ligação covalente, os elétrons não são compartilhados. Ligações não-covalentes são relativamente fracas, mas podem ser somadas, gerando interações fortes e altamente específicas entre moléculas. (Painel 2-3, p. 110-111)

ligação peptídica
Ligação química entre o grupo carbonila de um aminoácido e o grupo amino de um segundo aminoácido – uma forma especial de ligação amídica. As ligações peptídicas unem aminoácidos em proteínas. (Painel 3-1, p. 128-129)

ligação química
Afinidade química entre dois átomos que os mantém unidos. Tipos encontrados em células vivas incluem ligações covalentes e ligações não-covalentes. *Ver também* ligação iônica, ligação de hidrogênio.

ligação tioéster
Ligação de alta energia formada pela reação de condensação entre um grupo ácido (acil) e um grupo tiol (—SH). Vista, por exemplo, na acetil-CoA e em vários complexos enzima-substrato. (Figura 2-62)

ligante
Qualquer molécula que se liga a um local específico em uma proteína ou outra molécula. Do latim *ligare*, ligar.

ligase
Enzima que liga duas moléculas em um processo dependente de energia. A DNA-ligase, por exemplo, une as extremidades de duas moléculas de DNA por uma ligação fosfodiéster.

lignina
Rede de compostos fenólicos entrelaçados que forma a rede de apoio das paredes celulares do xilema e dos tecidos lenhosos das plantas.

limite de resolução
Em microscopia, a menor distância a partir da qual dois pontos podem ser visualizados como objetos separados. De apenas 0,2 mm para os microscópios ópticos convencionais, um limite determinado pelo comprimento de onda da luz.

linfa
Fluido incolor contendo linfócitos, encontrado nos vasos linfáticos. (Figura 25-3)

linfócito
Célula branca do sangue responsável pela especificidade da resposta imune adaptativa. Existem dois tipos principais: células B, que produzem anticorpos, e células T, que interagem diretamente com outras células efetoras do sistema imune e com células infectadas. As células T se desenvolvem no timo e são responsáveis pela imunidade mediada por células. As células B se desenvolvem na medula óssea dos mamíferos e são responsáveis pela produção de anticorpos circulantes. (Figura 25-7)

linfócito B – *ver* célula B

linfócito T – *ver* célula T

linfoma
Câncer dos linfócitos, onde as células cancerígenas são encontradas principalmente nos órgãos linfoides (e não no sangue, como no caso das leucemias).

linhagem celular
População de células de origem animal ou vegetal capazes de se dividir indefinidamente em cultura.

linhagem germinativa
Linhagem celular composta por gametas haploides e suas células precursoras diploides específicas.

lipase
Enzima que catalisa a clivagem de ácidos graxos da porção glicerol de um triglicerídeo.

lipídeo
Molécula orgânica insolúvel em água, mas que tende a se dissolver em solventes orgânicos apolares. Uma classe especial, os fosfolipídeos, forma a base estrutural das membranas biológicas. (Painel 2-5, p. 114-115)

lipofílico – *ver* hidrofóbico

lipoproteína de baixa densidade (LDL)
Grande complexo composto por uma única molécula de proteína e muitas moléculas de colesterol esterificadas, juntamente com outros lipídeos. Essa é a forma na qual o colesterol é transportado na corrente sanguínea e captado pelas células. (Figura 13-50)

lipossomo
Vesícula artificial composta por uma camada dupla de fosfolipídeos, formada em uma suspensão aquosa de moléculas de fosfolipídeos. (Figura 10-9)

lise
Rompimento da membrana plasmática de uma célula, levando à liberação do citoplasma e à morte da célula.

lisossomo
Organela delimitada por membrana presente em células eucarióticas, contendo enzimas digestivas, as quais são tipicamente mais ativas no pH ácido encontrado no lúmen dos lisossomos. (Figuras 12-2 e 13-37)

lisozima
Enzima que catalisa a hidrólise de cadeias de polissacarídeos na parede celular de bactérias.

lócus
Em genética, refere-se à posição de um gene em um cromossomo. Por exemplo, em uma célula diploide, alelos diferentes do mesmo gene ocupam o mesmo lócus.

lócus do tipo de acasalamento (lócus MAT)
Em uma levedura de brotamento, lócus que determina o tipo de acasalamento (α ou a) da célula haploide da levedura. (Figura 7-65)

LTP – *ver* potencialização de longo termo

lúmen do RE
Espaço delimitado pela membrana do retículo endoplasmático (RE).

M – *ver* fase M

M6P – *ver* manose-6-fosfato

macrófago
Célula fagocitária derivada dos monócitos sanguíneos, tipicamente residente em muitos tecidos, mas capaz de se deslocar. Tem a função de "lixeiro" (*scavenger*) e de apresentador de antígeno na resposta imune. (Figura 24-53)

maligno
Descreve tumores e células tumorais que são invasivos e/ou capazes de sofrer metástase. Um tumor maligno é um câncer. (Figura 20-3)

manose-6-fosfato (M6P)
Marcador específico ligado aos oligossacarídeos em algumas glicoproteínas destinadas aos lisossomos. (Figura 13-43)

MAP – *ver* proteína associada a microtúbulos

mapa de restrição
Representação esquemática de uma molécula de DNA, indicando os sítios de clivagem para várias enzimas de restrição.

mapa haplótipo
Mapa do genoma humano, com base nos blocos haplótipos. Feito com a intenção de facilitar a identificação e a catalogação das variações genéticas observadas em humanos.

MAP-cinase (proteína-cinase ativada por mitógenos)
Proteína-cinase localizada no final de um módulo de sinalização composto por três membros, envolvida na transmissão de sinais da membrana plasmática para o núcleo.

massa celular interna
Grupo de células não-diferenciado das etapas iniciais do desenvolvimento do embrião de mamíferos a partir do qual todo o corpo do adulto é derivado. (Figura 22-88)

matriz extracelular
Rede complexa de polissacarídeos (como os glicosaminoglicanos ou a celulose) e proteínas (como o colágeno) secretados pelas células, e na qual as células estão embebidas.

matriz
Espaço ou meio de sustentação no qual alguma coisa é formada. (1) Grande compartimento interno da mitocôndria. (2) Compartimento correspondente nos cloroplastos, mais comumente conhecido como estroma. (3) Matriz extracelular. Composto extracelular de proteínas secretadas e de polissacarídeos, no qual as células estão embebidas. (Figura 14-37)

maturação da afinidade
Aumento progressivo na afinidade dos anticorpos pelo antígeno imunizante, com o passar do tempo, após a imunização.

mediador intracelular pequeno – *ver* segundo mensageiro

mediador local
Molécula sinalizadora secretada que atua sobre as células adjacentes. (Figura 15-4)

megacariócito
Grande célula mieloide, com o núcleo dividido em vários lobos, que permanece na medula óssea, quando madura. Ela origina as plaquetas a partir de longos processos citoplasmáticos. (Figuras 23-40 e 23-42)

meiose
Tipo especial de divisão celular que ocorre na reprodução sexuada. Compreende duas divisões nucleares sucessivas, com apenas uma etapa de replicação de DNA, produzindo células haploides a partir de uma célula diploide. (Figura 21-5)

melanócito
Célula que produz o pigmento escuro melanina. Responsável pela pigmentação da pele e dos cabelos. (Figura 23-1)

membrana
Bicamada lipídica e proteínas associadas que envolvem todas as células e, nas células eucarióticas, também envolvem muitas organelas. (Figura 10-1)

membrana basal – *ver* lâmina basal

membrana plasmática
Membrana que envolve uma célula viva. (Figura 10-1)

memória celular
Retenção por parte das células e seus descendentes de padrões de expressão gênica persistentemente alterados, sem nenhuma alteração na sequência de DNA. *Ver também* herança epigenética.

memória imunológica
Propriedade de longa duração do sistema imune adaptativo que se segue a uma resposta imune primária a diversos antígenos, onde um encontro subsequente com aquele antígeno provocará uma resposta imune secundária mais rápida e mais forte. (Figura 25-10)

meristema apical
Extremidade crescente do caule ou da raiz de uma planta, composta de células não-diferenciadas em divisão. (Painel 22-1, p. 1401)

meristema
Um grupo organizado de células em divisão, cujos derivados originam os tecidos e os órgãos de uma planta florescendo. Exemplos são o meristema de raiz apical e o meristema de broto apical. (Painel 22-2, p. 1404-1405, e Figura 22-118)

mesênquima
Forma imatura não-especializada de tecido conectivo em animais, consistindo em células embebidas em uma fina matriz extracelular.

mesoderme
Tecido embrionário que é o precursor dos tecidos muscular, conectivo e esquelético, e de muitos dos órgãos internos. (Figuras 22-3 e 22-70)

metabolismo
A soma total de processos químicos que ocorrem em uma célula viva. O catabolismo e o anabolismo. (Figura 2-36)

metáfase
Estágio da mitose no qual os cromossomos estão fortemente ligados ao fuso mitótico no seu equador, mas ainda não estão separados na direção dos polos opostos. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

metaloprotease da matriz
Enzima proteolítica dependente de Ca^{2+} ou Zn^{2+}, presente na matriz extracelular; degrada as proteínas da matriz. Inclui as colagenases.

metástase
Distribuição de células cancerosas do seu local de origem para outros locais do corpo. (Figuras 20-1 e 20-17)

metilação do DNA
Adição de um grupo metila ao DNA. A metilação extensiva da base citosina em sequências CG é usada pelos vertebrados para manter os genes em seu estado inativo.

método de didesoxi
O método enzimático padrão de sequenciamento de DNA. (Figura 8-50)

microarranjo – *ver* microarranjo de DNA

microarranjos de DNA
Um grande arranjo de moléculas de DNA curtas (cada uma com sequência conhecida) ligadas a uma lâmina de vidro de microscópio ou outro suporte adequado. Usados para monitorar a expressão simultânea de milhares de genes: o mRNA isolado a partir de células-teste é convertido em cDNA, que por sua vez é hibridizado ao microarranjo. (Figura 8-73)

microfilamento – *ver* filamento de actina

mícron (μm ou micrômetro)
Unidade de medida igual a 10^{-6} metros, ou 10^{-3} milímetros.

microRNA (miRNA)
Pequeno RNA (21 a 26 nucleotídeos) observado em eucariotos, gerado pelo processamento de transcritos especializados de RNA, codificados no genoma, que regulam a expressão gênica através da complementaridade de bases com o mRNA. Dependendo da extensão do pareamento de bases, o miRNA pode levar à degradação do mRNA ou ao bloqueio da sua tradução. (Figura 7-112)

microscopia eletrônica de criofratura
Técnica para estudar a estrutura de membranas, na qual a membrana de uma célula congelada é partida ao longo do interior da bicamada, sendo separada nas duas monocamadas, com as faces interiores expostas.

microscopia eletrônica de varredura
Tipo de microscopia eletrônica que produz uma imagem da superfície de um objeto.

microscópio confocal
Tipo de microscópio óptico que produz uma imagem nítida de um determinado plano dentro de um objeto sólido. Utiliza um feixe de *laser* como fonte de iluminação localizada e atravessa o plano para produzir uma "secção óptica" bidimensional.

microscópio de campo claro
Microscópio óptico normal em que a imagem é obtida pela simples transmissão da luz através do objeto que está sendo visualizado.

microscópio de contraste de fase
Tipo de microscópio óptico que explora os efeitos de interferência que ocorrem quando a luz passa através de materiais com diferentes índices de refração. (Figuras 9-7 e 22-101)

microscópio de contraste de interferência diferencial
Tipo de microscópio óptico que explora os efeitos de interferência que ocorrem quando a luz passa através de partes de uma célula com índices diferentes de refração. Usado para visualização de células vivas não-coradas.

microscópio de fluorescência
Microscópio destinado para a visualização do material marcado com corantes fluorescentes. Similar ao microscópio óptico, mas a luz passa através de um conjunto de filtros antes de chegar à amostra, para selecionar aqueles comprimentos de onda que excitam o corante, e através de um outro conjunto de filtros antes de chegar ao olho, para selecionar apenas aqueles comprimentos de onda emitidos quando o corante fluoresce.

microscópio eletrônico
Tipo de microscópio que utiliza um facho de elétrons para criar a imagem.

microssomo
Pequena vesícula derivada de fragmentos do retículo endoplasmático produzidos quando as células são homogeneizadas. (Figura 12-37)

microtúbulo
Estrutura longa, cilíndrica e oca, composta pela proteína tubulina. É uma das três principais classes de filamentos do citoesqueleto. (Painel 16-1, p. 968)

microtúbulo astral
No fuso mitótico, qualquer um dos microtúbulos que irradiam do áster e que não estão ligados a um cinetocoro de um cromossomo.

microtúbulo do cinetócoro
Em um fuso mitótico ou meiótico, um microtúbulo que conecta as fibras do fuso ao cinetócoro de um cromossomo.

microtúbulo interpolar
No fuso mitótico ou meiótico, uma intersinalização de microtúbulos na região equatorial, com os microtúbulos se projetando a partir do outro polo. (Figura 16-85)

microvilosidades
Finas projeções cilíndricas, recobertas por membrana, existentes na superfície de uma célula animal, contendo um feixe central de filamentos de actina. Presentes em número especialmente grande na superfície absortiva das células epiteliais intestinais. (Figura 16-50)

mioblasto
Célula mononuclear e indiferenciada, precursora da célula muscular. Uma célula muscular esquelética é formada pela fusão de múltiplos mioblastos. (Figura 23-48)

miofibrila
Feixe longo e altamente organizado de actina, miosina e outras proteínas, presente no citoplasma de células musculares, e que se contrai por um mecanismo de deslizamento entre os filamentos.

miosina
Qualquer uma das grandes classes de proteínas motoras que se movem ao longo de filamentos de actina. (Figura 16-57)

miRNA – *ver* microRNA

mitocôndria
Organela delimitada por membrana, com o tamanho aproximado de uma bactéria, que realiza a fosforilação oxidativa e produz a maior parte do ATP nas células eucarióticas. (Figura 1-33)

mitógeno
Molécula sinalizadora extracelular que estimula a proliferação celular.

mitose
Divisão do núcleo de uma célula eucariótica, envolvendo a condensação do DNA em cromossomos visíveis e a separação dos cromossomos duplicados para formar dois conjuntos idênticos de cromossomos. Do grego *mitos*, carretel, referindo-se à aparência exibida pelos cromossomos condensados. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

modificação pós-traducional
Alteração catalisada por enzimas em uma proteína que ocorre após sua síntese. Exemplos são acetilação, clivagem, glicosilação, metilação, fosforilação e prenilação.

módulo MAP-cinase (módulo de proteína-cinase ativada por mitógenos)
Uma rota de sinalização intracelular, composta por três proteína-cinases, atuando em sequência, sendo a MAP-cinase a última dessas proteínas. Ativada tipicamente pela proteína Ras, em resposta a sinais extracelulares. (Figura 15-78)

mol
X gramas de uma substância, onde X é a sua massa molecular relativa (peso molecular). Um mol consiste em 6,02 x 10^{23} moléculas de uma substância.

molaridade (M)
Número de moléculas de soluto por litro de solução. Uma solução "um molar" (1 M) contém um mol de soluto dissolvido em um litro de solução.

molde
Uma fita simples de DNA ou RNA, cuja sequência de nucleotídeos atua como um guia para a síntese de uma fita complementar. (Figura 1-3)

molécula chaperona – *ver* chaperona

molécula de adesão celular – *ver* CAM

molécula de adesão celular neural (NCAM)
Molécula de adesão celular da família das imunoglobulinas, expressa por diversos tipos celulares, incluindo a maioria das células nervosas. Um mediador de ligação célula-célula, independente de Ca^{2+}, nos vertebrados. (Figura 19-20)

molécula de sinalização extracelular
Qualquer sinalizador químico secretado ou presente na superfície celular e que se liga a receptores regulando a atividade da célula que expressa esse receptor.

moléculas encarceradas
Molécula orgânica sintetizada para tornar-se ativa quando irradiada com luz de determinado comprimento de onda. Um exemplo é o ATP encarcerado.

molécula-sinal
Molécula extracelular produzida por uma célula que sinaliza para outras células no organismo para alterarem seu comportamento. (Figura 15-1)

monócito
Tipo de célula branca do sangue que deixa a corrente sanguínea e matura, originando os macrófagos, nos tecidos. (Figura 23-37)

monômero
Pequeno bloco de construção molecular que atua como subunidade, podendo ser conectado a outros do mesmo tipo, formando uma molécula maior (um polímero).

monossacarídeo
Açúcar simples, com a fórmula geral $(CH^2O)n$, onde $n = 3$ a 8. (Painel 2-4, p. 112-113)

morfógeno
Molécula sinalizadora que pode impor um padrão a um grupo de células, levando células em locais diferentes a seguirem destinos diferentes. (Figura 22-13)

morte celular programada
Uma forma de morte celular na qual a célula comete "suicídio" pela ativação de um programa de morte intracelular.

mosaico (mosaico genético)
Na biologia do desenvolvimento, um organismo produzido por uma mistura de células com genótipos diferentes, mas que se desenvolve a partir de um único zigoto. Mosaicos podem se formar naturalmente, como resultado de uma mutação nas células que originam novos tecidos, ou podem ser construídos, deliberadamente, para auxiliar análises genéticas. *Comparar com* quimera.

mosaico genético – *ver* mosaico

motivo
Elemento de estrutura ou padrão repetido em vários contextos. Especificamente, é um pequeno domínio estrutural que pode ser reconhecido em várias proteínas.

mRNA – *ver* RNA mensageiro

mRNA policistrônico
mRNA individual que codifica para várias proteínas diferentes – normalmente encontrado em bactérias, mas não em eucariotos. (Figura 6-73)

MTOC – *ver* centro de organização de microtúbulos

mTOR (alvo mamífero da rapamicina)
Proteína serina/treonina-cinase de mamíferos que é um componente secundário da via de sinalização PI 3-cinase/Akt. mTOR (o homólogo em leveduras é chamado de TOR) faz parte de dois complexos proteicos distintos, um dos quais é sensível à droga rapamicina e estimula o crescimento celular, enquanto o outro atua na ativação da proteína-cinase Akt. (Figuras 15-64 e 15-65)

multimérica
Proteínas: que contêm mais de uma subunidade.

músculo cardíaco
Forma especializada de músculo estriado encontrada no coração, consistindo em células individuais de músculo cardíaco ligadas entre si por junções celulares.

músculo estriado
Músculo composto por miofibrilas com estriações transversais. Os músculos esquelético e cardíaco de vertebrados são exemplos. (Figura 16-74)

mutação
Alteração hereditária na sequência de nucleotídeos de um cromossomo. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação condicional
Uma mutação que altera uma proteína ou molécula de RNA de modo que sua função é alterada apenas sob certas condições, como temperaturas muito altas ou muito baixas. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação de perda ou ganho de função
Mutação que aumenta a atividade de um gene, ou o torna ativo em circunstâncias inapropriadas. Geralmente é uma mutação dominante. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação dominante negativa
Mutação que afeta o fenótipo de modo dominante, bloqueando a atividade gênica e causando um fenótipo perda de função mesmo na presença de uma cópia normal do gene. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação homeótica
Mutação que induz as células em uma região do corpo a se comportarem como se estivessem localizadas em outra região, causando uma desordem anormal na estrutura corporal. (Figuras 22-42 e 22-127)

mutação letal
Uma mutação que causa a morte da célula ou do organismo que a contém. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação nula
Mutação com perda de função que abole completamente a atividade de um gene. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação perda-de-função
Mutação que reduz ou abole a atividade de um gene. Geralmente é recessiva. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação pontual
Alteração de um único par de nucleotídeo, ou uma parte muito pequena de um único gene, no DNA. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutação supressora
Mutação que suprime o efeito fenotípico de uma outra mutação, de modo que o indivíduo duplo-mutante parece normal. (Painel 8-1, p. 554-555)

mutagênese sítio-dirigida
Técnica através da qual uma mutação pode ser feita em um local específico do DNA. (Figura 8-63)

mutante sensível à temperatura (ts)
Organismo ou célula contendo uma mutação que mostra seu efeito fenotípico em uma faixa de temperatura (normalmente alta), mas não em outras temperaturas (normalmente baixas). (Painel 8-1, p. 554-555, e Figura 8-55)

mutante ts – *ver* mutante sensível à temperatura

Myc
Proteína de regulação gênica ativada quando a célula é estimulada, por sinais extracelulares, a crescer e se dividir. Ela ativa a transcrição de diversos genes, incluindo os que estimulam o crescimento celular. (Figura 17-62)

NAD^+/NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo/nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido)
Sistema carreador de elétrons que participa de reações de oxidação-redução, como a oxidação de moléculas de comida. NAD^+ aceita o equivalente a um íon hidreto (H^-, um próton e dois elétrons) para se

tornar o carreador ativado NADH. O NADH formado doa seus elétrons de alta energia para uma etapa de geração de ATP da fosforilação oxidativa. (Figura 2-86)

$NADP^+$/NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo/ fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido)
Sistema carreador de elétrons, similar ao sistema NAD^+/NADH, mas de uso quase exclusivo nas vias de biossíntese redutiva, e não nas vias catabólicas. (Figura 2-60)

nanômetro (nm)
Unidade de comprimento comumente utilizada para mensurar moléculas e organelas celulares. 1 nm = 10^{-3} micrômetros (μm) = 10^{-9} metros.

não-disjunção
Evento de ocorrência ocasional durante a meiose, onde um par de cromossomos homólogos não se separa, resultando em uma célula germinativa que possui cromossomos a mais ou a menos.

não-polar (apolar)
Que carece de qualquer acumulação assimétrica de cargas positivas e negativas. As moléculas apolares geralmente são insolúveis em água. (Painéis 2-2 e 2-3, p. 108-111)

neurito
Longo processo em crescimento de uma célula nervosa em cultura. Um termo genérico que não especifica se o processo é um axônio ou um dendrito. (Figura 16-105)

neuroblasto
Precursor embrionário das células nervosas. (Figura 22-66)

neurofilamento
Tipo de filamento intermediário encontrado nas células nervosas. (Figura 16-22)

neurônio (célula nervosa)
Célula condutora de impulsos do sistema nervoso, com longos processos especializados em receber, conduzir e transmitir sinais. (Figuras 22-93 e 22-94)

neurônio sensorial olfativo
Célula sensorial no epitélio olfativo nasal responsável pela detecção de odores.

neuropeptídeo
Peptídeo secretado pelos neurônios como uma molécula sinalizadora na sinapse ou em outro local.

neurotransmissor inibitório
Neurotransmissor que abre canais de K^+ ou Cl^- controlados por transmissor na membrana pós-sináptica de uma célula nervosa ou muscular e, dessa forma, tende a inibir a geração de um potencial de ação.

neurotransmissor
Pequena molécula sinalizadora secretada por uma célula nervosa pré-sináptica em uma sinapse química para passar o sinal a uma célula pós-sináptica. Exemplos incluem acetilcolina, glutamato, GABA, glicina e muitos neuropeptídeos.

neutrófilo
Célula branca do sangue especializada na captação de material particulado através de fagocitose. Entra nos tecidos que se tornam infectados ou inflamados. (Figuras 24-55 e 25-24)

nêutron
Partícula subatômica pesada, não-carregada, que forma parte de um núcleo atômico. (Figura 2-1)

nicho de células-tronco
Microambinete especializado em um tecido no qual as células-tronco em autorrenovação podem ser mantidas. (Figura 23-27)

nicotinamida adenina dinucleotídeo – *ver* NAD^+/NADH

nm – *ver* nanômetro

NMR (ressonância magnética nuclear, espectroscopia NMR)
NMR é a absorção ressonante de radiação eletromagnética, em uma frequência específica, por um núcleo atômico em um campo magnético, devido à troca de orientação do seu momento dipolar magnético. O espectro de NMR fornece informações sobre o ambiente químico do núcleo. A NMR é amplamente utilizada para determinar a estrutura tridimensional de pequenas moléculas. Os princípios da NMR também são utilizados para o diagnóstico médico na ressonância magnética por imagem (MRI). (Figura 8-29)

NO – *ver* óxido nítrico

nocaute gênico
Uma deleção artificial ou inativação por mutação de um gene.

Northern blotting
Técnica na qual fragmentos de RNA, separados por eletroforese, são imobilizados em uma folha de papel (membrana), e uma molécula de RNA específica é então detectada por hibridização com uma sonda de ácido nucleico marcada.

NO-sintase (NOS)
Enzima que sintetiza o óxido nítrico (NO) pela desaminação da arginina. (Figura 15-12B)

Notch
Receptor proteico transmembrana (e proteína de regulação gênica latente) envolvido em muitos estágios de escolha do destino celular durante o desenvolvimento animal, como na especificação de células nervosas a partir do epitélio ectodérmico. Seus ligantes são proteínas da superfície celular, como Delta e Serrate. (Figura 15-76)

notocorda
Um bastonete rígido de células que define o eixo central de todos os embriões de cordados. Nos vertebrados, ele é incorporado à coluna vertebral. (Figura 22-97)

NPC – *ver* complexo de poro nuclear

NSF (fator de sensibilidade à N-etilmaleimida)
Proteína com atividade ATPásica que desassocia um complexo de um v-SNARE e um t-SNARE. (Figuras 13-18 e 13-22)

N-terminal (aminoterminal)
A extremidade de uma cadeia polipeptídica que possui o grupo amino livre. (Figura 3-1)

nucleação
Estágio crítico no processo de montagem de uma estrutura polimérica, como um microtúbulo, no qual um pequeno grupo de monômeros agrega-se na disposição correta para iniciar assim a polimerização rápida. (Painel 16-2, p. 978-979) Mais genericamente, a taxa de velocidade limitante em um processo de montagem de estruturas.

nuclease de restrição (enzima de restrição)
Uma entre uma enorme variedade de nucleases que podem clivar uma molécula de DNA em qualquer sítio onde uma pequena sequência de nucleotídeos ocorre. Amplamente utilizada em tecnologia de DNA recombinante. (Figuras 8-31 e 8-32)

nuclease
Enzima que cliva ácidos nucleicos através da hidrólise das ligações entre os nucleotídeos. *Ver também* endonuclease e exonuclease.

núcleo
Organela proeminente delimitada por membrana em uma célula eucariótica, contendo o DNA organizado em cromossomos.

nucleocapsídeo
Ácido nucleico viral e as proteínas de capsídeo circundantes. Se um envelope viral estiver presente, o envelope circunda o nucleocapsídeo. (Figura 13-19)

nucléolo
Estrutura no núcleo onde o rRNA é transcrito e ocorre a montagem das subunidades ribossomais. (Figura 4-9)

nucleoporina
Qualquer uma das numerosas proteínas diferentes que compõem os complexos de poro nuclear.

nucleosídeo
Base púrica ou pirimídica ligada covalentemente a uma ribose ou uma desoxirribose. (Painel 2-6, p. 116-117)

nucleossomo
Estrutura em forma de conta na cromatina eucariótica, composta por um pequeno segmento de DNA enrolado em torno de um núcleo de oito proteínas histonas. Unidade estrutural fundamental da cromatina. (Figuras 4-23 e 4-24)

nucleotídeo
Nucleosídeo com um ou mais grupos fosfato, unidos por ligações éster à molécula de açúcar. DNA e RNA são polímeros de nucleotídeos. (Painel 2-6, p. 116-117)

oligodendrócito
Tipo de célula da glia, no sistema nervoso central de vertebrados, que forma a bainha de mielina ao redor dos axônios. *Comparar com* célula de Schwann.

oligômero
Polímero curto.

oligossacarídeo ligado ao N
Cadeia de açúcares ligada a uma proteína através do grupo NH_2 da cadeia lateral de um resíduo de asparagina. *Comparar com* oligossacarídeo ligado ao O. (Figuras 12-50 e 12-51)

oligossacarídeo ligado ao *O*
Cadeia de açúcares ligada a uma proteína através do grupo OH de resíduos de serina ou treonina. *Comparar com* oligossacarídeo ligado ao *N*. (Figura 13-32)

oligossacarídeo
Pequena cadeia linear ou ramificada de açúcares ligados covalentemente. (Painel 2-4, p. 112-113)

oncogene
Um gene alterado cujo produto pode agir de modo dominante no surgimento de uma célula cancerosa. Tipicamente, um oncogene é uma forma mutante de um gene normal (proto-oncogene) envolvido no controle do crescimento ou da divisão celular. (Figura 20-27)

oócito
Óvulo em desenvolvimento, antes de completar a meiose. (Figuras 21-25 e 21-26)

oogênese
Formação e maturação dos oócitos no ovário. (Figura 21-23)

operador
Pequena região do DNA de um cromossomo bacteriano que controla a transcrição de um gene adjacente. (Figura 7-34)

operon
Em um cromossomo bacteriano, um grupo de genes consecutivos transcritos como uma única molécula de mRNA. (Figura 7-34)

ORC – *ver* complexo de reconhecimento de origem

ORF – *ver* fase aberta de leitura

organela
Compartimento subcelular, ou grande complexo macromolecular, geralmente delimitado por membrana, que possui estrutura, composição e função distintas. Exemplos são núcleo, nucléolo, mitocôndria, aparelho de Golgi e centrossomos. (Figura 1-30)

organismo transgênico
Planta ou animal que teve incorporado, de maneira estável, um ou mais genes oriundos de outra célula ou organismo (por inseção, deleção e/ou substituição) e que pode passar esses genes para as gerações sucessivas. O gene que foi adicionado é chamado de transgene. (Figuras 8-64 e 8-65)

organismo-modelo
Uma espécie estudada intensivamente por um longo período e que, portanto, serve como um "modelo" para a derivação de princípios biológicos fundamentais.

organizador (organizador de Spemann)
Tecido especializado, na extremidade dorsal do blastóporo em embriões de anfíbio; fonte de sinais que auxiliam a coordenar a formação do eixo do corpo embrionário. (Nome derivado de H. Spemann e H. Mangold, codescobridores.) (Figura 22-74)

organizador de Spermann – *ver* organizador

organizador nucleolar
Região de um cromossomo contendo um conjunto de genes codificando para rRNA, originando parte do nucléolo. (Figura 6-47)

órgão linfoide
Órgão envolvido na produção ou na função de linfócitos. Linfócitos são produzidos em órgãos linfoides primários e respondem aos antígenos em órgãos linfoides secundários. (Figura 25-3)

órgão linfoide central (órgão linfoide primário)
Órgão linfoide no qual os linfócitos são produzidos a partir de células precursoras. Em mamíferos adultos, esses órgãos são o timo e a medula óssea.

órgão linfoide periférico (órgão linfoide secundário)
Órgão linfoide no qual células T e B interagem com antígenos estranhos. Exemplos são baço, linfonodos e tecido linfoide associado a mucosas. (Figura 25-3)

origem de replicação
Local em um cromossomo no qual a replicação do DNA inicia.

origem de replicação
Local em uma molécula de DNA no qual a duplicação do DNA inicia. (Figuras 4-21 e 5-25)

ortólogos
Genes ou proteínas de diferentes espécies e que possuem sequências similares, pois são descendentes de um mesmo gene presente no ultimo ancestral comum a essas espécies. *Comparar com* parálogos. (Figura 1-25)

osmose
Movimento líquido de moléculas de água através de uma membrana semipermeável, conduzido por uma diferença na concentração de solutos em cada lado da membrana. A membrana deve ser permeável à água, mas não às moléculas de soluto. (Painel 11-1, p. 664)

osteoblasto
Célula que secreta a matriz óssea. (Figura 23-55)

osteócito
Célula localizada nos ossos e que não se divide; derivada de um osteoblasto e embebida na matriz óssea. (Figura 23-55)

osteoclasto
Célula semelhante a um macrófago que faz a erosão do osso, possibilitando a sua remodelagem durante o crescimento e em resposta ao estresse ao longo da vida. (Figura 23-59)

ovulação
Liberação de um óvulo pelo ovário. (Figura 21-26)

oxidação
Perda de elétrons de um átomo, como a que ocorre na adição de oxigênio a uma molécula, ou quando um átomo de hidrogênio é removido. O oposto de redução. (Figura 2-43)

oxidase
Enzima que catalisa uma reação de oxidação, especialmente uma em que a molécula de oxigênio seja o aceptor de elétrons.

óxido nítrico (NO)
Molécula sinalizadora gasosa bastante utilizada na comunicação célula-célula, tanto em animais quanto em plantas. (Figura 15-12)

p53
Gene supressor de tumor que se encontra mutado em aproximadamente metade dos cânceres humanos. Esse gene codifica uma proteína de regulação gênica ativada por danos ao DNA e envolvida no bloqueio da progressão do ciclo celular. (Figuras 20-37 e 20-40)

par de bases
Dois nucleotídeos em uma molécula de RNA ou DNA que estão emparelhados por ligações de hidrogênio – por exemplo, G com C e A com T ou U.

parredox
Par de moléculas no qual uma molécula atua como um doador de elétrons e a outra atua como um aceptor de elétrons em uma reação

de oxidação-redução: por exemplo, NADH (doador de elétrons) e NAD^+ (aceptor de elétrons). (Painel 14-1, p. 830)

Par3, Par6
Proteínas estruturais envolvidas na especificação da polaridade de células animais individuais. Par3 e Par6 formam um complexo com a proteína-cinase C atípica (aPKC). (Figura 19-31)

parálogos
Genes ou proteínas que são similares nas suas sequências, pois são resultado de um evento de duplicação gênica ocorrido em um organismo ancestral. *Comparar com* ortólogos. (Figura 1-25)

pareamento (pareamento homólogo)
Na meiose, o alinhamento de dois cromossomos homólogos ao longo do seu comprimento. (Figura 21-6)

parede celular
Matriz extracelular mecanicamente forte, depositada pela uma célula no exterior de sua membrana plasmática. É especialmente importante na maioria das plantas, bactérias, algas e fungos. Não está presente na maioria das células animais.

parede celular primária
A primeira parede celular produzida por uma célula vegetal em desenvolvimento. Ela é fina e flexível, permitindo espaço para o crescimento celular. (Figura 19-79)

parede celular secundária
Parede celular rígida permanente que se encontra abaixo da parede celular primária em certas células vegetais que complementaram o seu crescimento. (Figura 19-77C)

partenogênese
Produção de um novo indivíduo a partir de um óvulo na ausência de fertilização pelo espermatozoide.

partícula de reconhecimento de sinal (SRP)
Partícula de ribonucleoproteína que liga uma sequência sinalizadora do RE a uma cadeia polipeptídica parcialmente sintetizada e dirige o polipeptídeo e o seu ribossomo ligado até o retículo endoplasmático. (Figura 12-39)

patógeno
Um organismo, célula, vírus ou príon que causa doenças.

PCR (reação em cadeia da polimerase)
Técnica para a amplificação de regiões específicas de DNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos e múltiplos ciclos de síntese de DNA, cada ciclo sendo seguido por um breve tratamento por calor para separar as fitas complementares. (Figura 8-45)

pectina
Mistura de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico; forma uma matriz altamente hidratada na qual a celulose está embebida nas paredes celulares de plantas. (Figura 19-79)

pentose
Açúcar com cinco átomos de carbono.

peptidase de sinal
Enzima que remove uma sequência sinalizadora terminal de uma proteína uma vez que o processo de endereçamento esteja completo. (Figura 12-25)

peptídeo
Pequeno polímero de aminoácidos.

permease – *ver* transportador

permuta de fitas cruzadas – *ver* junção de Holliday

peroxissomo
Pequena organela delimitada por membrana que utiliza oxigênio molecular para oxidar moléculas orgânicas. Contém algumas enzimas que produzem e outras que degradam peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (Figura 12-30)

peso molecular (massa molecular relativa)
Massa de uma molécula, relativa à massa de um átomo de hidrogênio (ou relativa a 1/12 da massa de um átomo de C^{12}, ou seja, um dálton).

pH
Medida comum da acidez de uma solução: "p" refere-se à potência de 10, "H" refere-se a hidrogênio. Definido como o logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio em mol por litro (M). pH = $-\log[H^+]$. Assim, uma solução com pH 3 contém 10^{-3} M de íons hidrogênio. Valores de pH abaixo de 7 são ácidos e valores de pH acima de 7 são alcalinos.

pI – *ver* ponto isoelétrico

PI 3-cinase – *ver* fosfoinositídeo 3-cinase

pinocitose
Literalmente, "bebido pela célula". Tipo de endocitose em que os materiais solúveis são continuamente captados do meio em pequenas vesículas e movidos para dentro de endossomos junto com as moléculas ligadas à membrana. *Comparar com* fagocitose. (Figura 13-48)

pirimidina
Compostos que contêm um anel com átomo de nitrogênio encontrado no DNA e RNA: citosina, timina e uracila são pirimidinas. (Painel 2-6, pp. 116-117)

piruvato (CH_3COCOO^-)
Produto final da via glicolítica. Entra na mitocôndria e faz parte do ciclo do ácido cítrico e outras vias biossintéticas.

PKA – *ver* proteína-clnase dependente de AMP cíclico

PKB – *ver* Akt

PKC – *ver* proteína-cinase C

placa celular
Estrutura achatada ligada à membrana que se forma a partir da fusão de vesículas do citoplasma de uma célula vegetal em divisão, sendo o precursor da nova parede celular.

placa metafásica
Plano imaginário perpendicular ao fuso mitótico e equidistante dos dois polos do fuso; plano em que os cromossomos estão posicionados na metáfase. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

plaqueta
Fragmento celular, sem núcleo, que se desprende de um megacariócito na medula óssea e é encontrado em grande número na corrente sanguínea. As plaquetas auxiliam na iniciação da coagulação do sangue quando os vasos sanguíneos são danificados.

plasmídeo
Pequena molécula de DNA extracromossomal, circular, com replicação independente do genoma. Os plasmídeos modificados são amplamente utilizados como vetores para clonagem de DNA.

plasmodesma (plural plasmodesmata)
Nas plantas equivale à junção tipo fenda. Junção comunicante célula-célula em plantas na qual um canal de citoplasma revestido por membrana plasmática une duas células adjacentes, através de um pequeno poro nas suas paredes celulares.

plastídeo
Organela citoplasmática de vegetais, delimitada por membrana dupla, que transporta seu próprio DNA e normalmente é pigmentada. Os cloroplastos são plastídeos.

PLC – *ver* fosfolipase C

ploidia
Número de conjuntos completos de cromossomos em um genoma. Organismos diploides possuem dois conjuntos em suas células somáticas; organismos haploides possuem um único conjunto; organismos poliploides possuem mais do que dois.

polar
Em eletricidade, descreve uma estrutura (p. ex., uma ligação química, um grupo químico ou uma molécula) com carga positiva concentrada em uma extremidade e carga negativa concentrada em outra extremidade, como resultado de uma distribuição desigual de elétrons. As moléculas polares geralmente são solúveis em água. (Figura 2-10 e Painel 2-2, p. 108-109)

polaridade planar da célula
Tipo de simetria celular observada em alguns epitélios, de modo que cada célula tenha um vetor de polaridade orientado no plano do epitélio. (Figura 19-32)

polladenilação
Adição de uma longa sequência de nucleotídeos A (a cauda poli A) à extremidade 3' da molécula de mRNA nascente. (Figuras 6-21 e 6-38)

polimerase
Enzima que catalisa as reações de polimerização como a síntese de DNA e RNA. *Ver também* DNA-polimerase, RNA-polimerase.

polímero
Grande molécula formada por uma série de ligações covalentes que unem várias unidades idênticas ou semelhantes (monômeros).

polimórflco
Descreve um gene com dois ou mais alelos que coexistem com alta frequência em uma população.

polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP)
Variação entre indivíduos em uma população em um nucleotídeo específico nas suas sequências de DNA.

polipeptídeo
Polímero linear composto por aminoácidos. As proteínas são grandes polipeptídeos, e os dois termos podem ser usados como sinônimos. (Painel 3-1, p. 128-129)

poliploide
Célula ou organismo que contém mais de dois conjuntos de cromossomos homólogos.

polirribossomo (polissomo)
Molécula de mRNA com vários ribossomos ligados, engajados na síntese de proteínas. (Figura 6-76)

polissacarídeo
Polímeros lineares ou ramificados de monossacarídeos. Exemplos incluem glicogênio, amido, ácido hialurônico e celulose. (Painel 2-4, p. 113)

polo animal
Em ovos com gema, o polo oposto à gema. Células derivadas da região animal envolverão aquelas derivadas da região da gema (vegetal). (Figura 22-68)

polo vegetal
Extremidade na qual está localizada a maior parte da gema em um ovo animal. Extremidade oposta ao polo animal. (Figura 22-68)

ponto de restrição – *ver* Início

ponto de verificação da montagem do fuso (ponto de verificação da transição de metáfase para anáfase)
Ponto de verificação que ocorre durante a mitose para assegurar que todos os cromossomos estejam apropriadamente ligados ao fuso, antes de iniciar a separação das cromátides-irmãs. (Figura 17-14 e Painel 17-1, p. 1072-1073)

ponto de verificação G_2/M
Ponto do ciclo celular eucariótico no qual a célula verifica se a replicação do DNA está completa antes de desencadear os eventos iniciais da mitose, que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso. (Figura 17-14)

ponto de verificação
Ponto no ciclo de divisão de uma célula eucariótica no qual o ciclo pode ser suspenso até que as condições sejam apropriadas para avançar para o próximo estágio.

ponto isoelétrico (pl)
O pH no qual uma molécula em solução não possui carga elétrica e, portanto, não é deslocada em um campo elétrico. (Figura 8-22)

porina
Proteínas formadoras de canal das membranas externas de bactérias, mitocôndrias e cloroplastos.

potencial de ação
Excitação elétrica rápida, transitória e que se autopropaga na membrana plasmática de uma célula, como um neurônio ou célula muscular. Potenciais de ação, ou impulsos nervosos, tornam possível a sinalização a longa distância no sistema nervoso. (Figura 11-30)

potencial de membrana de repouso
Potencial de membrana em condições de equilíbrio em que não há fluxo líquido de íons através da membrana plasmática. *Ver também* potencial de membrana.

potencial de membrana
Diferença de voltagem através de uma membrana, devido a um leve excesso de íons positivos em um lado da membrana e de íons negativos no outro lado. Um potencial de membrana típico para uma membrana plasmática de uma célula animal é -60 mV (o interior da célula é negativo em relação ao fluido circundante). (Figura 11-22)

potencial redox
Afinidade de um par redox por elétrons, geralmente medida como a diferença de voltagem entre uma mistura equimolar do par e do padrão de referência. $NADH/NAD^+$ possui um baixo potencial redox e O_2/H_2 possui um alto potencial redox (alta afinidade por elétrons). (Painel 14-1, p. 830)

potencialização de longo termo
Aumento de longa duração (dias a semanas) na sensibilidade de certas sinapses no hipocampo. Induzida por uma curta explosão de disparos repetitivos nos neurônios pré-sinápticos. (Figura 11-42)

pré-célula B
Precursor imediato de uma célula B. (Figura 25-22)

pré-mRNA
Precursor do mRNA. Em eucariotos, inclui todos os estágios intermediários do processamento do RNA.

prenilação
Ligação covalente de um grupo lipídico isoprenoide a uma proteína. (Figura 10-20)

pressão de Turgor
Grande pressão hidrostática desenvolvida dentro da célula vegetal como resultado da captação de água por osmose; é a força que dirige a expansão celular no crescimento da planta e mantém a rigidez dos caules e das folhas das plantas. (Painel 11-1, p. 664)

primase – *ver* DNA-primase

príon
Uma forma infecciosa mal dobrada de uma proteína que é replicada no hospedeiro pela indução de proteínas normais do mesmo tipo para adotar uma estrutura aberrante. (Figuras 6-95 e 6-96)

procarioto
Microrganismo unicelular cujas células não possuem um núcleo bem-definido, envolvido por membrana. Tanto bactérias como arquebactérias. (Figura 1-21)

procaspase
Precursor inativo de uma caspase, uma enzima proteolítica normalmente envolvida na apoptose. (Figura 18-5)

processamento de RNA
Termo geral para as várias modificações que um transcrito de RNA sofre quando ele alcança sua forma madura. Pode incluir a adição do quepe 5', a poliadenilação 3', a clivagem 3', o *splicing* e a edição.

processividade
De uma enzima: capacidade de proceder ao longo de uma cadeia de polímero, catalisando a mesma reação repetidamente sem se desligar da cadeia.

prófase
Primeiro estágio da mitose, durante o qual os cromossomos são condensados, mas ainda não estão ligados a um fuso mitótico. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

progressão de tumor
O processo pelo qual uma anomalia inicial no comportamento celular gradualmente evolui para um câncer bem-desenvolvido. (Figuras 20-9 e 20-11)

pró-metáfase
Fase da mitose que precede a metáfase, na qual o envelope nuclear se rompe e os cromossomos se ligam ao fuso. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

promotor indutível
Uma sequência de DNA regulatório que permite que a expressão de um gene associado seja ativada por um estímulo físico ou molecular específico (p. ex., temperatura). (Figura 22-49)

promotor
Sequência de nucleotídeos no DNA à qual a RNA-polimerase se liga para iniciar a transcrição. *Ver também* promotor induzível. (Figura 7-44)

prospecção genética
Procedimento para a descoberta de genes que afetam aspectos específicos do fenótipo, pelo estudo de um grande número de indivíduos mutantes.

protease (proteinase, enzima proteolítica)
Enzima que degrada proteínas hidrolisando algumas das ligações peptídicas entre os aminoácidos.

proteassomo
Grande complexo proteico no citosol com atividade proteolítica responsável pela degradação de proteínas que foram marcadas para destruição por ubiquitinação ou por outros meios. (Figuras 6-89 e 6-90)

proteína
O principal componente macromolecular das células. Um polímero linear de aminoácidos ligados por ligações peptídicas em uma sequência específica. (Figura 3-1)

proteína adaptadora
Termo geral para proteínas que funcionam apenas na ligação de duas proteínas diferentes em uma via de sinalização ou em um complexo de proteínas. (Figura 15-22)

proteína associada a microtúbulos (MAP)
Qualquer proteína que se liga aos microtúbulos e modifica suas propriedades. Vários tipos diferentes foram identificados, incluindo proteínas estruturais, como a MAP2, e proteínas motoras, como a dineína. (Não confundir com "MAP" de MAP-cinase [proteína-cinase ativada por mitógenos].)

proteína ativadora de genes – *ver* ativador

proteína ativadora de GTPase (GAP)
Proteína que se liga a uma GTPase causando a sua inativação, por estimular sua atividade GTPásica, fazendo com que a enzima hidrolise em GDP o GTP que está ligado a ela. (Figura 3-71)

proteína canal
Proteína de transporte através da membrana que forma um poro aquoso na membrana, pelo qual um soluto específico, geralmente um íon, pode passar. *Comparar com* transportador.

proteína carreadora – *ver* transportador

proteína de choque térmico (proteína de resposta ao estresse, Hsp)
Proteína pertencente à grande família de chaperonas moleculares altamente conservadas, assim denominada por ser sintetizada em quantidades aumentadas em resposta a temperaturas elevadas ou outro tratamento estressante. As Hsps possuem papel importante no auxílio do enovelamento correto de proteínas. Exemplos proeminentes são a Hsp60 e a Hsp70.

proteína de ligação ao DNA de fita simples
Proteína que se liga às fitas simples da dupla-hélice de DNA aberta, impedindo que a estrutura em hélice se forme novamente, enquanto o DNA está sendo replicado. (Figura 5-16)

proteína de regulação gênica
Nome não-específico dado a qualquer proteína que se ligue a uma sequência específica de DNA, influenciando a transcrição de um gene.

proteína de repressão gênica – *ver* repressor

proteína de resistência a múltiplas drogas (proteína MDR)
Tipo de proteína transportadora ABC que pode bombear drogas hidrofóbicas (como algumas drogas antitumorais) para fora do citoplasma das células eucarióticas.

proteína de sinalização intracelular
Proteína envolvida em uma via de sinalização no interior da célula. Ela geralmente ativa a próxima proteína da via ou gera um pequeno mediador intracelular. (Figura 15-1)

proteína de suporte
Proteína que liga grupos de proteínas sinalizadoras intracelulares em complexos de sinalização, muitas vezes ancorando o complexo em um local específico na célula. (Figura 15-17)

proteína de transporte de membrana
Proteína de membrana que medeia a passagem de íons ou moléculas através de uma membrana. As duas principais classes são as proteínas transportadoras (também chamadas de carreadoras ou permeases) e os canais. (Figuras 11-3 e 11-4)

proteína E2F
Proteína reguladora de genes que ativa vários genes que codificam proteínas necessárias para entrar na fase S do ciclo celular.

proteína G (proteína trimérica de ligação ao GTP)
Proteína trimérica ligadora de GTP com atividade GTPase intrínseca, que acopla GPCRs a enzimas ou a canais iônicos na membrana plasmática. (Tabela 15-3, p. 919)

proteína G estimuladora (G_s)
Proteína G que, quando ativada, ativa a enzima adenilil-ciclase e, assim, estimula a produção de AMP cíclico. (*Ver também* proteína G e Tabela 15-3, p. 919)

proteína G inibitória (G_i)
Proteína G trimérica que pode regular canais iônicos e inibir a enzima adenilil-ciclase, na membrana plasmática. *Ver também* proteína G. (Tabela 15-3, p. 919)

proteína G trimérica (proteína trimérica de ligação a GTP) – *ver* proteína G

proteína Hedgehog
Molécula de sinalização extracelular secretada que possui diferentes papéis no controle da diferenciação celular e da expressão gênica em embriões de animais e em tecidos adultos. A sinalização excessiva via Hedgehog pode causar câncer.

proteína hnRNP (proteína ribonuclear nuclear heterogênea)
Qualquer uma de um grupo de proteínas que se associam ao RNA recém-sintetizado, organizando-o em uma forma mais compacta. (Figura 6-33)

proteína inibidora de Cdk (CKI)
Proteína que se liga e inibe complexos ciclina-Cdk, principalmente envolvida no controle das fases G1 e S.

proteína integral de membrana
Proteína fortemente mantida em uma membrana através de um ou mais domínios que se estendem ou estão embebidos na bicamada lipídica. (Figura 10-19)

proteína ligadora de actina
Proteína que se associa a monômeros de actina ou a filamentos de actina nas células e modifica suas propriedades. Exemplos incluem miosina, α-actinina e profilina. (Painel 16-3, p. 994-995)

proteína ligadora de GTP – *ver* GTPase

proteína MDR – *ver* proteína de resistência a múltiplas drogas

proteína MHC de classe I
Uma das duas classes de proteínas MHC. Está presente em quase todos os tipos celulares de vertebrados, onde pode apresentar peptídeos derivados a partir de um micróbio intracelular infectante (como um vírus) para células T citotóxicas. (Figura 25-50)

proteína MHC de classe II
Uma das duas classes de proteínas MHC. Está presente na superfície de várias células apresentadoras de antígeno, onde ela apresenta peptídeos estranhos para as células T auxiliares. (Figura 25-50)

proteína MHC
Uma de uma grande família de glicoproteínas ubíquas da superfície celular de vertebrados, membros da superfamília Ig. Proteínas MHC ligam fragmentos peptídicos de antígenos estranhos e os apresentam às células T para induzir uma resposta imune adaptativa. *Ver também* proteína MHC de classe I, proteína MHC de classe II. (Figuras 25-49 e 25-50)

proteína motora
Proteína que utiliza energia derivada da hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo para impulsionar-se ao longo de uma reta (um filamento proteico ou outra molécula polimérica).

proteína NFκB
Proteína de regulação gênica latente ativada por uma série de vias de sinalização intracelular, quando as células são estimuladas durante as respostas imune, inflamatória ou ao estresse. Também possui papel importante no desenvolvimento animal. (Figura 15-79)

proteína periférica de membrana
Proteína ligada a uma face de uma membrana, através de interações não-covalentes com outras proteínas de membrana, e que pode ser removida através de tratamentos relativamente suaves, que mantêm a bicamada lipídica intacta. (Figura 10-19)

proteína polipose adenomatosa coli (APC)
Proteína supressora de tumores que forma parte de um complexo proteico na via canônica de sinalização Wnt que recruta β-catenina citoplasmática livre e a degrada.

proteína residente no RE
Proteína que permanece no retículo endoplasmático (RE) ou na sua membrana, desempenhando a sua função nesse local, em contraste com as proteínas que estão presentes no RE apenas temporariamente.

proteína retinoblastoma (Rb)
Proteína supressora de tumor envolvida na regulação da divisão celular. Encontra-se mutada no câncer retinoblastoma, assim como em vários outros tumores. Sua atividade normal é regular o ciclo da célula eucariótica pela ligação e inibição de proteínas E2F, bloqueando assim a progressão para a replicação de DNA e a divisão celular. (Figura 17-62)

proteína Smad
Proteína reguladora de gene latente que é fosforilada e ativada por serina/treonina-cinases receptoras e que carrega o sinal a partir da superfície celular para o núcleo. (Figura 15-69)

proteína transmembrana de múltiplas passagens
Proteína de membrana cuja cadeia polipeptídica cruza a bicamada lipídica mais de uma vez. (Figura 10-19)

proteína transmembrana de passagem única
Proteína de membrana cuja cadeia polipeptídica cruza a bicamada lipídica apenas uma vez. (Figura 10-19)

proteína transmembrana
Proteína de membrana que se estende através da bicamada lipídica, com parte de sua massa de um lado e parte do outro da bicamada lipídica. (Figura 10-19)

proteína verde fluorescente (GFP)
Proteína fluorescente isolada de uma água-viva. Amplamente utilizada como marcador na biologia celular.

proteína-cinase
Enzima que transfere o grupo fosfato terminal do ATP para um ou mais aminoácidos específicos (serina, treonina ou tirosina) de uma proteína-alvo.

proteína-cinase A (PKA) – *ver* proteína-cinase dependente de AMP cíclico

proteína-cinase atípica (aPKC)
Uma forma atípica da proteína-cinase C (PKC) que não requer Ca^{+2} e fosfatidilserina para ativação. Uma aPKC desse tipo está envolvida na especificação da polaridade de células animais em alguns indivíduos.

proteína-cinase ativada por mitógenos – *ver* MAP-cinase

proteína-cinase B – *ver* Akt

proteína-cinase C (PKC)
Proteína-cinase dependente de Ca^{+2} que, quando ativada por diacilglicerol e por um aumento na concentração de Ca^{+2} citosólico, fosforila proteínas-alvo em resíduos específicos de serina e treonina. (Figura 15-39)

proteína-cinase dependente de AMP cíclico (proteína-cinase A, PKA)
Enzima que fosforila proteínas-alvo em resposta a um aumento de AMP cíclico intracelular. (Figura 15-35)

proteína-cinase dependente de Ca^{+2}/calmodulina – *ver* (CaM-cinase)

proteína-cinase dependente de cAMP – *ver* proteína-cinase A

proteínas de fusão
Proteínas modificadas que combinam dois ou mais polipeptídeos normalmente separados. Produzidas a partir de genes recombinantes.

proteínas Mcm
Proteínas das células dos eucariotos, necessárias ao início da replicação do DNA; envolvidas na formação da helicase presente na forquilha de replicação do DNA em movimento.

proteínas ricas em repetições de leucina (proteínas LRR)
Tipo comum de receptor serina-treonina-cinase de plantas, que contém um arranjo de repetições ricas em leucina em *tandem*, na sua porção extracelular.

proteínas transportadoras ABC
Grande família de proteínas de transporte que usam a energia da hidrólise do ATP para transferir peptídeos e pequenas moléculas através das membranas. (Figura 11-7)

proteína tirosina-fosfatase
Enzima que remove grupos fosfato de resíduos de tirosina fosforilados nas proteínas. (Figura 25-71)

proteoglicana
Molécula que consiste em uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos ligadas a um núcleo de proteína. (Figura 19-58)

proteólise
Degradação de uma proteína por hidrólise de uma ou mais de suas ligações peptídicas.

proteômica
Estudo de todas as proteínas, incluindo todas as formas modificadas covalentemente de cada, produzidas por uma célula, tecido ou organismo. A proteômica muitas vezes investiga alterações nesse grupo maior de proteínas no "proteoma" – causadas por alterações no meio ou por sinais extracelulares.

protistas
Eucariotos unicelulares. Incluem protozoários, algas, leveduras. (Figura 1-41)

próton
Partícula subatômica positivamente carregada que forma parte do núcleo de um átomo. O hidrogênio possui um núcleo composto de um único próton (H^+). (Figura 2-1)

proto-oncogene
Gene normal, em geral envolvido na regulação da proliferação celular, que pode ser convertido, por mutação, em um oncogene causador de câncer. (Figura 20-34)

protozoário
Organismo eucarioto unicelular móvel, de vida livre, não-fotossintético, como *Paramecium* e *Amoeba*. Os protozoários de vida livre se alimentam de bactérias ou outros microrganismos.

pseudogene
Sequência nucleotídica de DNA que acumulou múltiplas mutações, tornando um gene ancestral inativo e não-funcional.

pseudópodo (pseudópodes)
Grandes protusões da superfície celular, formadas por células ameboides à medida que se deslocam. Mais genericamente, qualquer

extensão dinâmica da superfície de uma célula animal, de forma semelhante, rica em actina. *Comparar com* filopódio, lamelipódio. (Figura 16-94)

purina
Composto que contém um anel com átomo de nitrogênio encontrado no DNA e no RNA: adenina ou guanina. (Painel 2-6, p. 116-117)

quelar
Combinar de forma reversível, normalmente com alta afinidade, a um íon metálico como ferro, cálcio ou magnésio.

queratina
Proteínas que formam os filamentos intermediários de queratina, especialmente nas células epiteliais. Queratinas especializadas são encontradas no cabelo, nas unhas e nas penas.

quiasma (plural: quiasmata)
Conexão em forma de X, visível entre os cromossomos homólogos pareados durante a meiose. Representa um local de *crossing-over* cromossomal, uma forma de recombinação genética.

quimera
Organismo inteiro formado a partir de um agregado de duas ou mais populações de células geneticamente diferentes (dois ou mais genótipos), originadas de zigotos diferentes. *Comparar com* mosaico.

quimiocina
Citocina quimiotática. Pequena proteína secretada que atrai células, como as células brancas do sangue, movendo-as em direção a sua fonte. É importante no funcionamento do sistema imune.

quimiotaxia
Movimento direcionado de uma célula ou um organismo que o aproxima ou afasta de um composto difusível.

quinona (Q)
Molécula carreadora de elétrons móvel, pequena e solúvel em lipídeos encontrada nas cadeias transportadoras de elétrons respiratória e fotossintética. (Figura 14-24)

quitina
Polissacarídeo polimérico orgânico abundante de *N*-acetilglucosamina. O principal componente dos exoesqueletos de insetos e das paredes celulares de fungos.

Rab (proteína Rab)
GTPase monomérica na superfamília Ras, presente na membrana plasmática e na membrana de organelas. Envolvida em conferir especificidade à ancoragem de vesículas. (Tabela 15-5, p. 926)

radical livre
Átomo ou molécula extremamente reativa por apresentar ao menos um elétron desemparelhado. Responsável por grande parte dos danos intracelulares ao DNA.

Ran
GTPase monomérica na superfamília Ras, presente no citosol e no núcleo. Necessária para o transporte ativo de macromoléculas para dentro e para fora do núcleo, através de complexos de poros nucleares. (Tabela 15-5, p. 926)

Ras (proteína Ras)
GTPase monomérica na superfamília Ras que auxilia na condução de sinais de receptores RTK da superfície celular para o núcleo, frequentemente em resposta a sinais que estimulam a divisão celular. Denominadas devido ao gene *ras*, primeiramente identificado em vírus que causam sarcomas em ratos. (Figura 3.72)

Rb – *ver* proteína de retinoblastoma

RE – *ver* retículo endoplasmático

reação acoplada
Par conectado de reações químicas, no qual a energia liberada por uma das reações é utilizada para efetuar a outra reação. (Figura 2-51)

reação de condensação (reação de desidratação)
Reação química em que duas moléculas são covalentemente ligadas por grupos –OH, com a remoção de uma molécula de água.

reação de desidratação – *ver* reação de condensação

reação de fixação do carbono
Processo pelo qual carbono inorgânico (como CO_2 atmosférico) é incorporado em moléculas orgânicas. O segundo estágio da fotossíntese. (Figura 14-39)

reação em cadeia da polimerase – *ver* PCR

reação redox
Uma reação na qual um componente se torna oxidado e o outro reduzido; uma reação de oxidação-redução. (Painel 14-1, p. 830)

RecA (proteína RecA)
Protótipo para uma classe de proteínas que se ligam ao DNA que catalisam a sinapse das fitas de DNA, durante a recombinação genética. (Figura 5-56)

receptor
Qualquer proteína que se liga a uma molécula-sinal específica (ligante) e inicia uma resposta na célula. Alguns estão localizados na superfície celular, enquanto outros estão no interior da célula. (Figura 15-3)

receptor associado a canais iônicos – *ver* canal iônico regulado por transmissor

receptor associado à histidina-cinase
Tipo de receptor transmembrana encontrado na membrana plasmática das bactérias, leveduras e células de plantas e que está envolvido, por exemplo, na percepção de estímulos que causam quimiotaxia bacteriana. Está associado a uma histidina-cinase em sua região citoplasmática.

receptor associado à proteína G (GPCR)
Receptor de superfície celular que atravessa a membrana sete vezes; quando ativado pelo seu ligante extracelular, ativa a proteína G, que por sua vez ativa uma enzima ou um canal iônico na membrana plasmática. (Figuras 15-16 e 15-30)

receptor associado a uma enzima
Principal tipo de receptor de superfície celular, no qual o domínio citoplasmático tem atividade enzimática própria ou está associado a uma enzima intracelular. Em ambos os casos, a atividade enzimática é estimulada pela ligação do ligante ao receptor. (Figura 15-16)

receptor de acetilcolina (AChR)
Proteína de membrana que responde à ligação da acetilcolina (ACh). O AChR nicotínico é um canal iônico regulado por transmissor que se abre em resposta à ACh. O AChR muscarínico não é um canal iônico e sim um receptor de superfície celular acoplado à proteína G.

receptor de citocina
Receptor da superfície celular que se liga a citocinas específicas ou hormônios e atua por meio da via de sinalização Jak-STAT. (Figura 15-68)

receptor de morte
Proteína receptora transmembrana que pode sinalizar à célula para sofrer apoptose quando ele se liga ao seu ligante extracelular. (Figura 18-6)

receptor de reconhecimento de padrões
Receptor presente na superfície ou no interior das células do sistema imune inato e que reconhece e responde a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – como carboidratos de superfície em bactérias e vírus e sequências não-metiladas de GC no DNA de bactérias.

receptor de transporte nuclear (carioferina)
Proteína que transporta macromoléculas para dentro ou para fora do núcleo: receptor de importe nuclear ou receptor de exporte nuclear. (Figura 12-15)

receptor Eph
O tipo mais numeroso de receptores tirosina-cinase (RTK), que reconhece efrinas. (Figura 15-52)

receptor Fc
Um de uma família de receptores de superfície celular, que se liga à região da cauda (região Fc) de um anticorpo (imunoglobulina). Receptores Fc diferentes são específicos para diferentes classes de anticorpos, como IgG, IgA ou IgE.

receptor IP_3 (canal de liberação de Ca^{2+} regulado por IP_3)
Canais de Ca^{2+} na membrana do RE que se abrem com a ligação de IP_3 na face citosólica, liberando no citosol o Ca^{2+} armazenado. (Figura 15-39)

receptor para serina/treonina-cinase
Receptor da superfície celular com um domínio extracelular de ligação ao ligante e um domínio intracelular de cinase que fosforila proteínas de sinalização em resíduos de serina e treonina em resposta à ligação do ligante. O receptor para TGFβ é um exemplo. (Figura 15-69)

receptor para tirosina-cinase (RTK)
Receptor da superfície celular com um domínio extracelular de ligação ao ligante e um domínio intracelular de cinase que fosforila proteínas de sinalização em resíduos de tirosina em resposta à ligação do ligante. (Figura 15-52 e Tabela 15-4, p. 923)

recessivo
Em genética, refere-se ao membro do par de alelos que não é expresso no fenótipo do organismo quando o alelo dominante está presente. Também se refere ao fenótipo de um indivíduo que possui apenas o alelo recessivo. (Painel 8-1, p. 554-555)

recombinação (recombinação genética)
Processo no qual moléculas de DNA são clivadas e os fragmentos são religados em novas combinações. Pode ocorrer naturalmente em células vivas – por exemplo, por entrecruzamento (*crossing-over*) durante a meiose – ou *in vitro* usando DNA purificado e enzimas que cortam e ligam fitas de DNA. Três classes amplas são recombinação homóloga (geral), sítio-específica conservadora e transposicional.

recombinação cromossômica (quiasma)
Na recombinação meiótica, local nos cromossomos pareados onde um segmento de uma cromátide materna é trocado por um segmento correspondente de uma cromátide paternal homóloga. (Figuras 21-6 e 21-10)

recombinação genética – *ver* recombinação

recombinação geral, recombinação genética geral – *ver* recombinação homóloga

recombinação homóloga
Troca gênica entre pares de sequências idênticas, ou bastante similares, de DNA; principalmente aquelas localizadas nas duas cópias de um mesmo cromossomo. (Figuras 5-51, 5-53, 5-59 e 5-64)

recombinação sítio-específica
Tipo de recombinação que ocorre em sequências específicas de DNA e que é realizada por proteínas específicas que reconhecem essas sequências. Pode ocorrer entre duas moléculas de DNA diferentes ou dentro de uma única molécula de DNA.

recombinação V(D)J
Processo de recombinação somática pelo qual os segmentos gênicos são unidos para formar um gene funcional para uma cadeia polipeptídica de uma imunoglobulina ou receptor de células T. (Figuras 25-36, 25-37 e 25-38)

recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP)
Técnica para o monitoramento de parâmetros cinéticos de uma proteína através da análise da intensidade de fluorescência de moléculas proteicas que se movem em uma área clareada por um feixe de *laser*.

redução
Adição de elétrons a um átomo, como ocorre durante a adição de hidrogênio a uma molécula biológica ou a remoção de oxigênio desta. Contrário de oxidação. (Figura 2-43)

redundância genética
A presença de dois ou mais genes similares, com funções sobrepostas.

regeneração intercalar
Tipo de regeneração que completa o tecido faltante, quando duas porções não-correspondentes de uma estrutura são enxertadas juntas. (Figura 22-56)

região de controle gênico
Conjunto de sequências ligadas de DNA que regula a expressão de um gene em particular. Inclui o promotor e as sequências regulatórias necessárias para iniciar a transcrição do gene e controlar a sua taxa de iniciação. (Figuras 7-37 [procariotos] e 7-44 [eucariotos])

região hipervariável
Qualquer uma das três pequenas regiões da porção variável de uma imunoglobulina, ou da cadeia receptora de células T, que apresente maior variabilidade de uma molécula para outra. Essas regiões determinam a especificidade do sítio de ligação do antígeno. (Figura 25-31)

região sinalizadora
Sinal de endereçamento de proteínas que consiste em um arranjo tridimensional específico de átomos na superfície das proteínas dobradas. (Figura 13-45)

região variável
Região de uma cadeia leve ou pesada de uma imunoglobulina que difere de uma molécula para outra e forma um sítio de ligação ao antígeno. (Figuras 25-30 e 25-31)

Registro do *patch-clamp*
Técnica eletrofisiológica na qual uma pequena ponta de um eletrodo é selada em um fragmento de membrana celular, tornando possível registrar o fluxo de corrente através de canais iônicos individuais, presentes no fragmento. (Figura 11-33)

regulador
De embriões ou parte dos embriões: autoajustante, de modo que uma estrutura normal emerge mesmo se as condições iniciais são perturbadas.

regulador da sinalização da proteína G (RGS)
Uma proteína GAP que se liga a uma proteína G trimérica e aumenta sua atividade de GTPase, ajudando assim a limitar a sinalização mediada pela proteína G. (Figura 15-19)

regulador de crescimento vegetal (hormônio de planta)
Molécula sinalizadora que auxilia na coordenação do crescimento e do desenvolvimento. Exemplos são etileno, auxinas, giberelinas, citocinas, ácido abcísico e brassinoesteroides.

relógio circadiano (ritmo circadiano)
Processo cíclico interno que produz uma variação específica em uma célula ou um organismo, em um período de aproximadamente 24 horas; por exemplo, o ciclo de sono-vigília dos humanos.

reparo de pareamento incorreto
Processo de reparo de DNA que corrige nucleotídeos pareados erroneamente, inseridos durante a replicação do DNA. Um trecho curto do DNA recém-sintetizado, incluindo o nucleotídeo pareado erroneamente, é removido e substituído pela sequência correta em relação à fita-molde. (Figura 5-20)

reparo por excisão – *ver* reparo por excisão de base

reparo por excisão de base
Via de reparo do DNA na qual uma única base defeituosa é removida da hélice de DNA e substituída. *Compare* com reparo por excisão de nucleotídeo. (Figura 5-48)

reparo por excisão de nucleotídeos
Tipo de reparo de DNAque corrige danos causados à dupla-hélice de DNA, como os danos causados por agentes químicos ou radiação UV, pela clivagem e retirada da região danificada de uma das fitas, com a nova síntese utilizando a fita não-danificada como molde. *Comparar com* reparo por excisão de bases. (Figura 5-48)

replicação – *ver* replicação de DNA

replicação de DNA
Processo pelo qual uma cópia de uma molécula de DNA é feita.

repressor (proteína repressora de genes, repressor transcricional)
Proteína que se liga a uma região específica do DNA para evitar a transcrição de um gene adjacente.

repressor da transcrição – *ver* repressor

reprodução assexuada
Qualquer tipo de reprodução (como o brotamento em *Hydra*, a fissão binária em bactérias ou a divisão mitótica em microrganismos eucariotos) que não envolve a mistura de dois genomas diferentes. Produz um indivíduo geneticamente idêntico ao progenitor.

respiração
Termo genérico para um processo gerador de energia em células envolvendo a hidrólise oxidativa de açúcares ou outras moléculas orgânicas e que requer a captação de O_2 enquanto produz CO_2 e H_2O como produtos residuais. (Figura 2-41)

resposta de proteínas desenoveladas
Resposta celular engatilhada pelo acúmulo de proteínas desenoveladas no retículo endoplasmático. Envolve o aumento da transcrição de chaperonas do RE e de enzimas de degradação. (Figura 12-55)

resposta imune
Resposta produzida pelo sistema imunológico quando uma substância estranha ou um microrganismo entra no corpo; geralmente se refere à resposta imune adaptativa. *Ver também* resposta imune inata, resposta imune adaptativa, resposta imune primária e resposta imune secundária.

resposta imune adaptativa
Resposta do sistema imune dos vertebrados a um antígeno específico, tipicamente gerando memória imunológica. (Figuras 25-1 e 25-2)

resposta imune inata
Resposta imune (tanto em animais quanto em plantas) a um patógeno, envolvendo as defesas preexistentes do corpo (o sistema imune inato), como moléculas antimicrobianas e fagócitos. Essa resposta não é específica para o patógeno, ao contrário da resposta imune adaptativa.

resposta imune mediada por células T
Qualquer resposta imune adaptativa mediada por células T antígeno-específicas.

resposta imune primária
Resposta imune adaptativa a um antígeno gerada no primeiro encontro com o antígeno. (Figura 25-10)

resposta imune secundária
Resposta imune adaptativa a um antígeno que é produzida em um segundo ou subsequente encontro com esse antígeno. Ela é iniciada de forma mais rápida e forte do que a resposta imune primária. (Figura 25-10)

resposta inflamatória
Resposta local de um tecido a uma lesão ou infecção – caracterizada por vermelhidão do tecido, inchaço, calor e dor. Causada pela invasão de células brancas do sangue, que liberam vários mediadores locais, como a histamina.

ressonância magnética nuclear – *ver* NMR

ressonância plasmônica de superfície (SPR)
Técnica utilizada para caracterizar as interações moleculares, como ligação antígeno-anticorpo, acoplamento ligante-receptor e ligação de proteínas ao DNA. As interações de ligação são direcionadas pelo monitoramento da reflexão dos feixes de luz sobre a interface entre a solução aquosa de moléculas de ligação em potencial e um biossensor de superfície carregando a proteína-isca imobilizada.

retículo endoplasmático (RE)
Compartimento em forma de labirinto, delimitado por membrana, localizado no citoplasma das células eucarióticas, no qual são sintetizados lipídeos, proteínas ligadas à membrana e proteínas que serão secretadas. (Figura 12-36)

retículo endoplasmático liso (RE liso)
Região do retículo endoplasmático não-associada a ribossomos. Está envolvido na síntese de lipídeos. (Figura 12-36)

retículo endoplasmático rugoso (RE rugoso)
Retículo endoplasmático com ribossomos em sua face citosólica. Envolvido na síntese de proteínas ligadas à membrana e proteínas secretadas.

retículo sarcoplasmático
Tipo especializado de retículo endoplasmático no citoplasma das células musculares que contêm altas concentrações de Ca^{2+} sequestrado, que é liberado no citosol durante a excitação muscular. (Figura 16-77)

retroalimentação negativa
Mecanismo de controle onde o produto de uma reação ou de uma via inibe a primeira etapa dessa mesma via.

retroalimentação positiva
Mecanismo de controle pelo qual o produto final de uma reação ou via estimula sua própria produção ou ativação.

retrotransposon não-retroviral – *ver* retrotransposon

retrotransposon
Tipo de elemento transponível que se move por ser inicialmente transcrito em uma cópia de RNA que é, então, reconvertida a DNA por uma transcriptase reversa e inserida em outro lugar no genoma. Existem dois tipos: retrotransposons semelhantes a retrovírus e retrotransposons não-retrovirais. (Tabela 5-3, p. 318)

retrovírus
Vírus contendo RNA que se replica em uma célula, primeiramente fazendo um intermediário RNA-DNA e então uma molécula de dupla-fita de DNA que se integrará no DNA das células. (Figura 5-71)

RGS – *ver* regulador da sinalização da proteína G

Rho (família da proteína Rho)
Família de GTPases monoméricas dentro da superfamília Ras envolvida na sinalização do arranjo do citoesqueleto. Inclui Rho, Rac e Cdc42. (Tabela 15-5, p. 926)

ribonuclease
Enzima que cliva uma molécula de RNA pela hidrólise de uma ou mais das suas ligações fosfodiéster.

ribonucleoproteína nuclear pequena (snRNP)
Complexo de um snRNA com proteínas que formam parte de um espliceossomo. (Figura 6-29)

ribose
Componente monossacarídico de cinco carbonos do RNA. $C_5H_{10}O_5$. *Comparar com* desoxirribose.

ribossomo ligado à membrana
Ribossomo ligado à face citosólica do retículo endoplasmático. É o local da síntese de proteínas que entram no retículo endoplasmático. (Figura 12-41)

ribossomo livre
Ribossomo livre no citosol, não ligado a qualquer membrana.

ribossomo
Partícula composta de rRNAs e proteínas ribossomais que catalisa a síntese de proteína usando informações fornecidas pelo mRNA. (Figura 1-10)

ribozima
RNA com atividade catalítica.

RNA (ácido ribonucleico)
Polímero formado por monômeros de ribonucleotídeos covalentemente ligados. *Ver também* RNA mensageiro, RNA ribossomal, RNA transportador. (Tabela 6-1, p. 336, e Painel 2-6, p. 116-117)

RNA antissenso
RNA complementar a um transcrito de RNA específico de um gene que pode hibridizar-se com este RNA específico e bloquear sua função.

RNA de interferência (RNAi)
Como descrito originalmente, mecanismo pelo qual um RNA de dupla-fita introduzido experimentalmente induz a destruição de uma sequência específica de mRNAs complementares. O mecanismo, que está bastante conservado em eucariotos, inicia por meio de pequenos RNAs curtos de dupla-fita (siRNAs) produzidos por clivagem endonucleolítica. O termo RNAi muitas vezes é usado para incluir a inibição da expressão gênica por microRNAs (miRNAs), que são co-

dificados no próprio genoma da célula. O RNA de interferência é bastante utilizado experimentalmente para estudar os efeitos de genes inativadores específicos. (Figura 7-115)

RNA mensageiro (mRNA)
Molécula de RNA que especifica a sequência de aminoácidos de uma proteína. Produzido, em eucariotos, a partir do processamento de uma molécula de RNA, sintetizada pela RNA-polimerase como uma cópia complementar do DNA. O mRNA é traduzido em proteína em um processo catalisado pelos ribossomos. (Figuras 6-21 e 6-22)

RNA nuclear pequeno (snRNA)
Moléculas de RNA pequenas complexadas com proteínas para formar as partículas de ribonucleoproteínas (snRNPs) envolvidas no *splicing* do RNA. (Figuras 6-29 e 6-30)

RNA nucleolar pequeno (snoRNA)
Pequenos RNAs encontrados no nucléolo, com várias funções, incluindo guiar modificações de rRNAs precursores. (Tabela 6-1, p. 336, e Figura 6-43)

RNA pequeno de interferência (siRNA)
RNAs de dupla-fita curtos (21-26 nucleotídeos) que inibem a expressão gênica pelo direcionamento da destruição dos mRNAs complementares. A produção dos siRNAs é acionada por RNA de dupla-fita intruduzido exogenamente. (Figura 7-115)

RNA ribossomal (rRNA)
Qualquer uma entre várias moléculas de RNA específicas que formam parte da estrutura de um ribossomo e participam na síntese de proteínas. Normalmente distinguido por seu coeficiente de sedimentação (p. ex., rRNA 28S ou rRNA 5S).

RNA transportador (tRNA)
Conjunto de pequenas moléculas de RNA, usadas na síntese de proteínas como uma interface (adaptador) entre o mRNA e os aminoácidos. Cada tipo de molécula de tRNA é covalentemente ligada a um determinado aminoácido. (Figuras 1-9 e 6-52)

RNA-polimerase
Enzima que catalisa a síntese de uma molécula de RNA a partir de uma fita de DNA-molde e de trifosfatos de nucleosídeo precursores. (Figura 6-8)

rodopsina
Proteína de membrana de sete passagens da família GPCR que atua como um sensor de luz nas células bastonete fotorreceptoras da retina de vertebrados. Contém o grupo prostético retinol sensível à luz. (Figura 15-49)

rRNA – *ver* RNA ribossomal

RTK – *ver* receptor para tirosina-cinase

RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
Técnica na qual uma população de mRNAs é convertida em cDNAs via transcrição reversa, e os cDNAs são então amplificados por PCR.

S – *ver* fase S

S. cerevisiae* – *ver Saccharomyces

S. pombe* – *ver Schizosaccharomyces

sacarídeo
Açúcar.

sacarose
Dissacarídeo composto por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose. Principal forma pela qual a glicose é transportada entre as células vegetais. (Painel 2-4, p. 112-113)

Saccharomyces
Gênero de levedura que se reproduz assexualmente, por brotamento, ou sexualmente, por conjugação. É importante economicamente na indústria cervejeira e na panificação. *Saccharomyces cerevisiae* é bastante utilizada como um modelo de organismo simples no estudo de biologia celular das células eucarióticas. *Ver também Schizosaccharomyces.*

sarcoma
Câncer do tecido conectivo.

sarcômero
Unidade repetida de uma miofibrila em uma célula muscular, composta por uma sobreposição de filamentos espessos (miosina) e finos (actina), entre dois discos Z adjacentes. (Figura 16-74)

S-Cdk
Complexo ciclina-Cdk formado em células de vertebrados por uma S-ciclina e a cinase dependente de ciclina (Cdk) correspondente. (Figura 17-16 e Tabela 17-1, p. 1063)

SCF (proteína SCF)
Família de ubiquitina-ligases formadas como complexos de várias proteínas diferentes. Uma está envolvida na regulação do ciclo celular eucariótico, direcionando a destruição dos inibidores das S-Cdks no final de G_1 e assim promovendo a ativação de S-Cdks e a replicação de DNA. (Figuras 3-79 e 17-20)

Schizosaccharomyces
Gênero de leveduras em forma de bastão que se reproduzem por fissão binária. *S. pombae*, junto com a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*, é um organismo-modelo usado em vários estudos diferentes.

S-ciclina
Membro da classe das ciclinas que se acumula durante o final da fase G1 e se liga a Cdks logo depois da progressão por Start; ajuda a estimular a replicação de DNA e a duplicação cromossômica. Os níveis permanecem altos até o final da mitose, depois disso as ciclinas são destruídas. (Figura 17-16)

SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
Tipo de eletroforese usada para separar as proteínas por tamanho. A mistura de proteínas a ser separada é primeiro tratada com um potente detergente carregado negativamente (SDS) e com um agente redutor (β-mercaptoetanol), antes de ser aplicada a um gel de poliacrilamida. O detergente e o agente redutor desenovelam as proteínas liberando-as de associações com outras moléculas e separam as subunidades de polipeptídeos. *Ver também* eletroforese.

securina
Proteína que se liga à protease-separase e assim previne sua clivagem das ligações proteicas que mantêm as cromátides-irmãs unidas no início da mitose. A securina é destruída na transição da metáfase para a anáfase. (Figura 17-44)

segmento de gene V
Segmento gênico que codifica a maioria das regiões variáveis de uma cadeia polipeptídica de imunoglobulina ou de receptor de células T.

segundo mensageiro (mediador intracelular pequeno)
Pequena molécula de sinalização intracelular formada ou liberada para ação em resposta a um sinal extracelular e que auxilia a liberar o sinal dentro da célula. Exemplos incluem AMP cíclico, GMP cíclico, IP_3 e Ca^{2+} e diacilglicerol. (Figura 15-17)

seleção
Membro de uma família de proteínas de superfície celular que se ligam a carboidratos, fazendo a mediação transiente da adesão entre células dependentes de Ca^{2+} na corrente sanguínea – por exemplo, entre as células brancas do sangue e o endotélio da parede dos vasos sanguíneos. (Figura 19-19)

seleção de purificação
Seleção natural que ocorre para retardar a divergência nas sequências gênicas dentro de uma população no curso da evolução por meio da eliminação de indivíduos carregando mutações deletérias.

semente
Em plantas, a estrutura que contém o embrião dormente, junto com um armazenamento de alimento, envolto por uma capa protetora dura. (Painel 22-1, p. 1401)

senescência celular replicativa – *ver também* senescência
Fenômeno observado em culturas de células primárias em que a proliferação celular diminui e, finalmente, para de forma irreversível.

senescência
(1) Envelhecimento de um organismo. (2) Senescência celular replicativa: fenômeno observado em culturas de células primárias nas quais a proliferação celular diminui e finalmente para de forma irreversível.

separador de células ativadas por fluorescência (FACS)
Máquina que seleciona células de acordo com a sua fluorescência. (Figura 8-2)

separase
Protease que cliva as ligações proteicas coesivas que mantêm as cromátides-irmãs unidas. Atua na anáfase, permitindo a separação das cromátides e a segregação. (Figura 17-44)

sequência autonomamente replicante (ARS)
Origem de replicação no DNA de leveduras.

sequência de consenso
Forma média ou mais característica de uma sequência, que é reproduzida com pequenas alterações em um grupo relacionado de sequências de DNA, RNA ou proteína. Indica o nucleotídeo ou o aminoácido encontrado com maior frequência em cada posição. A preservação de uma sequência implica a importância funcional. (Figura 6-12)

sequência de regulação
Sequência de DNA à qual uma proteína de regulação gênica se liga para controlar a taxa de associação do complexo de transcrição ao promotor. (Figura 7-44)

sequência palindrômica
Sequência de nucleotídeos idêntica à sua fita complementar quando lida na mesma direção química – por exemplo, GATC. (Figura 8-31)

sequência RGD
Sequência tripeptídica de arginina-glicina-ácido aspártico que forma um sítio de ligação para integrinas, presente na fibronectina e em algumas outras proteínas extracelulares. (Figura 19-72C)

sequenciamento
Determinação da ordem dos nucleotídeos ou aminoácidos em um ácido nucleico ou molécula proteica. (Figura 8-50)

sequência-sinal
Sequência de aminoácidos curta e contínua que determina a localização final de uma proteína na célula. Um exemplo é a sequência N-terminal de aproximadamente 20 aminoácidos que direciona as proteínas de secreção e transmembrana nascentes até o retículo endoplasmático. (Tabela 12-3, p. 702)

sequência-sinal RE
Sequência-sinal N-terminal que determina o transporte de uma proteína para o retículo endoplasmático (RE). Clivada por peptidases de sequência-sinal após a sua entrada no RE.

serina/treonina-cinase
Enzima que fosforila proteínas específicas em serina ou treonina. (Figura 15-70)

serina-protease
Tipo de protease que possui uma serina reativa no sítio ativo. (Figuras 3-12 e 3-38)

simbiose
Associação íntima entre dois organismos de espécies diferentes, na qual ambos possuem vantagens seletivas duradouras. (Figura 1-16)

simporte
Proteína carreadora que transporta dois tipos de soluto através da membrana, na mesma direção. (Figura 11-8)

sinal de endereçamento
Sequência de aminoácidos que direciona uma proteína a uma localização específica, como um determinado compartimento intracelular.

sinal de exportação nuclear
Sinal de endereçamento contido na estrutura de moléculas e complexos, como RNA e novas subunidades ribossomais, que são transportadas do núcleo para o citosol, através de complexos de poros nucleares. (Figura 12-15)

sinal de início da transferência
Sequência de aminoácidos curta que possibilita a uma cadeia polipeptídica começar a ser transportada através da membrana do retículo endoplasmático por um transportador de proteínas. As proteínas de membrana de múltipla passagem possuem tanto sinais de início da transferência internos como no N-terminal. (Figuras 12-45 a 12-48)

sinal de localização nuclear (NLS)
Sequências ou regiões sinalizadoras encontradas em proteínas destinadas para o núcleo e que possibilitam o transporte seletivo para dentro do núcleo a partir do citosol, através de complexos de poros nucleares. (Figuras 12-11 e 12-15)

sinal de parada da transferência
Sequência de aminoácidos hidrofóbicos que pára o translocamento de uma cadeia polipeptídica através da membrana do retículo endoplasmático, ancorando, assim, a cadeia proteica à membrana. (Figuras 12-48 e 12-49)

sinal de retenção no RE
Curta sequência de aminoácidos que evita que uma proteína seja transportada para fora do retículo endoplasmático (RE). Encontrada em proteínas que são residentes no RE e que desempenham sua função nesse local.

sinalização autócrina
Onde uma célula secreta moléculas sinalizadoras que agem nela mesma novamente.

sinalização celular
Processo pelo qual as células são estimuladas ou inibidas por sinais extracelulares, normalmente sinais químicos produzidos por outras células.

sinalização endócrina
Sinalização mediada por hormônios liberados na corrente sanguínea pelas glândulas endócrinas e transportados até células-alvo distantes, que possuem receptores que ligam hormônios específicos. (Figuras 15-4 e 15-5)

sinalização parácrina
Comunicação célula-célula de curto alcance que ocorre através de moléculas sinalizadoras secretadas que atuam sobre as células adjacentes. (Figura 15-4)

sinapse
(1) Na recombinação genética, formação inicial de pares de base entre fitas de DNA complementares em diferentes moléculas de DNA que ocorrem em locais de recombinação genética entre cromossomos. (Figura 5-56) (2) Na meiose, formação de um complexo sinaptonemático entre dois cromossomos homólogos fortemente alinhados. (Figura 21-9)

sinapse
Junção comunicante célula-célula que permite a passagem de um sinal de uma célula nervosa para outra. Em uma sinapse química, o sinal é transportado através de um neurotransmissor difusível. (Figura 19-22) Em uma sinapse elétrica, uma conexão direta é produzida entre o citoplasma de duas células via junções tipo fenda. (Figura 19-34)

sincício
Massa de citoplasma contendo vários núcleos envolvidos por uma única membrana plasmática. Tipicamente, o resultado de uma fusão celular ou de uma série de ciclos de divisão incompletos, no qual ocorre divisão do núcleo, mas não há divisão da célula.

sintenia
Presença, em diferentes espécies, de regiões de cromossomos com os mesmos genes na mesma ordem.

siRNA – *ver* RNA pequeno de interferência

sistema complemento
Sistema de proteínas séricas ativadas pelos complexos antígeno-anticorpo ou por microrganismos. Auxilia a eliminação de microrganis-

mos patogênicos por causar diretamente a sua lise ou por promover a sua fagocitose.

sistema de controle do ciclo celular
Rede de proteínas de regulação que governa a progressão de uma célula eucariótica através do ciclo celular.

sistema de duplo híbrido – *ver* sistema de duplo híbrido em leveduras

sistema de duplo híbrido em leveduras
Técnica de genética molecular para identificar interações entre proteínas e entre proteína e DNA. (Figura 8-24)

sistema de secreção do tipo III
Sistema bacteriano para secreção de proteínas tóxicas dentro das células do hospedeiro. (Figura 24-8)

sistema imune
Sistema de linfócitos e outras células do corpo responsáveis pela defesa contra infecções. Existem dois tipos de sistema imunológico nos vertebrados – inato e adaptativo.

sistema livre de células
Homogenato fracionado de células, que retém uma função biológica específica da célula intacta, no qual as reações bioquímicas e os processos celulares podem ser estudados mais facilmente.

sítio ativo
Região da superfície de uma enzima à qual uma molécula de substrato deve se ligar para sofrer a reação catalisada. (Figura 1-7)

sítio de ligação
Uma região na superfície de uma molécula (geralmente uma proteína ou um ácido nucleico) que pode interagir com outra molécula através de uma ligação não-covalente.

sítio interno de entrada de ribossomos (IRES)
Local específico no mRNA de eucariotos, além da extremidade 5', onde a tradução pode ser iniciada. (Figura 7-108)

SNARE
Membro de uma grande família de proteínas transmembrana presentes na membrana de organelas e de vesículas derivadas de organelas. As SNAREs catalisam os vários eventos de fusão de membrana nas células. Elas existem em pares – uma v-SNARE na vesícula da membrana que se liga especificamente a uma t-SNARE complementar na membrana-alvo.

SNP – *ver* polimorfismo em nucleotídeos únicos

snRNA – *ver* RNA nuclear pequeno

soluto
Qualquer molécula dissolvida em um líquido. O líquido é chamado de solvente.

somito
Um de uma série de blocos emparelhados do mesoderma que se formam durante o desenvolvimento inicial e localizam-se em cada um dos lados da notocorda de um embrião de vertebrado. Dá origem a segmentos do eixo do corpo, incluindo vértebras, músculos e tecidos conectivos associados. (Figura 22-81)

sonda
Fragmento definido de RNA ou DNA, marcado quimicamente ou por radiatividade, utilizado para localizar sequências de ácidos nucleicos específicas, por hibridização.

Southern blotting
Técnica na qual fragmentos de DNA separados por eletroforese são imobilizados em uma membrana (folha de papel). Fragmentos de DNA específicos são então detectados com uma sonda de ácido nucleico marcada. (Nome derivado do inventor da técnica, E. M. Southern.)

***splicing*alternativo de RNA**
A produção de RNAs diferentes a partir de um mesmo gene por *splicing* do mesmo transcrito processado de maneiras diferentes. (Figura 7-94)

***splicing* de RNA**
Processo pelo qual sequências de íntrons são removidas dos transcritos de RNA no núcleo durante a formação do mRNA e de outros RNAs.

splicing
Remoção dos íntrons a partir do transcrito de pré-mRNA por *splicing* (corte e junção) dos éxons que estão de cada lado de cada íntron. *Ver também splicing* alternativo de RNA *e trans-splicing*.

Src (família da proteína Src)
Família de tirosina-cinases citoplasmáticas (pronuncia-se "sarc") que se associam aos domínios citoplasmáticos de alguns receptores da superfície celular ligados a enzimas (p. ex., o receptor de antígeno de célula T) que não possuem atividade tirosina-cinase intrínseca. Transmite um sinal adiante pela fosforilação do próprio receptor e de proteínas de sinalização intracelulares específicas nas tirosinas. (Figuras 3-10 e 15-70)

SRP – *ver* partícula de reconhecimento de sinal

STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição)
Proteína latente de regulação gênica ativada pela fosforilação por JAK-cinases e que entra no núcleo em resposta à sinalização a partir de receptores da família de receptores de citocinas. (Figura 15-68)

substrato
(1) Molécula sobre a qual uma enzima atua. (2) Superfície sólida na qual uma célula se adere.

subunidade proteica
Uma cadeia proteica individual em uma proteína composta de mais de uma cadeia.

sulfidril (tiol, –SH)
Grupo químico contendo enxofre e hidrogênio, encontrado no aminoácido cisteína e em outras moléculas. Dois grupos sulfidril podem unir-se e formar uma ligação dissulfeto. (Painel 2-1, p. 106-107, e Figura 3-28)

superfamília de receptores nucleares
Receptores intracelulares para moléculas sinalizadoras hidrofóbicas, como os hormônios esteroides e da tireoide e o ácido retinoico. O complexo receptor-ligante atua como um fator de transcrição no núcleo. (Figura 15-14)

superfamília do fator de crescimento de transformação β – *ver* superfamília TGFβ

superfamília Ig
Família grande e diversa de proteínas que contêm domínios de imunoglobulinas ou domínios semelhantes a imunoglobulinas. A maior parte dessas proteínas está envolvida em interações célula-célula ou no reconhecimento de antígenos. (Figura 25-74)

superfamília Ras
Uma grande superfamília de GTPases monoméricas (também chamadas de proteínas de ligação ao GTP) das quais Ras é o membro protótipo. (Tabela 15-5, p. 926)

superfamília TGFβ (superfamília do fator de crescimento de transformação β)
Grande família de proteínas estruturalmente relacionadas, que são secretadas e atuam como hormônios e mediadores locais para o controle de várias funções em animais, inclusive durante o desenvolvimento. Essa família inclui TGFβ/activina e subfamílias de proteínas morfogênicas do osso (BMP). (Figura 15-69)

super-hélice
Estrutura proteica em forma de bastão, especialmente estável, formada por duas α-hélices enroladas uma ao redor da outra. (Figura 3-9)

tampão
Solução de um ácido fraco ou uma base fraca que resiste a mudanças no pH quando pequenas quantidades de ácido ou base são adicionadas ou quando a solução é diluída.

***tap-tagging* (marcação para purificação por afinidade em *tandem*)**
Método altamente eficiente para purificação de proteínas, com base na construção de uma proteína de fusão na qual a proteína de interesse é ligada a dois domínios proteicos em *tandem* que atuam como marcadores para purificação por cromatografia de afinidade. Dois ciclos de purificação por afinidade, primeiro usando um marcador e depois o outro, resultam em uma preparação bastante pura.

TATA *box*
Sequência na região promotora de vários genes eucarióticos que se liga a fatores gerais de transcrição e, portanto, especifica a posição do início da transcrição. (Figuras 6-16 e 6-17)

tecido conectivo
Qualquer tecido de suporte que existe entre outros tecidos e consiste em células dispersas em uma quantidade relativamente grande de matriz extracelular. Inclui ossos, cartilagens e tecido conectivo frouxo.

tecnologia do DNA recombinante – *ver* engenharia genética

telófase
Estágio final da mitose, no qual os dois conjuntos de cromossomos separados sofrem descondensação e são envolvidos por envelopes nucleares. (Painel 17-1, p. 1072-1073)

telomerase
Enzima que alonga as sequências teloméricas no DNA e que ocorre nas extremidades dos cromossomos eucarióticos.

telômero
Extremidade de um cromossomo, associado à sequência de DNA característica que é replicada de maneira especial. Compensa a tendência de um cromossomo sofrer encurtamento a cada ciclo de replicação. Do grego *telos*, fim.

teoria da seleção clonal
Teoria que explica como o sistema imune adaptativo pode responder a milhões de antígenos diferentes de uma forma altamente específica. A partir de uma população de linfócitos com um vasto repertório de receptores antígeno-específicos gerados randomicamente, um determinado antígeno estranho ativa (seleciona) apenas aqueles clones de linfócitos que apresentam um receptor que se encaixa ao antígeno. (Figura 25-8).

terminador
Sinal, no DNA bacteriano, que termina a transcrição.

TGN – *ver* rede trans Golgi

tilacoide
Vesícula de membrana, achatada, em um cloroplasto, que contém clorofila e outros pigmentos e executa as reações de agregação de luz durante a fotossíntese. Pilhas de tilacoides formam o grana dos cloroplastos. (Figuras 14-35 e 14-36)

tiol – *ver* sulfidril

tipo selvagem
Forma normal, não mutante, de um organismo; a forma encontrada na natureza (nativa).

tirosina-cinase citoplasmática
Enzima ativada por certos receptores de superfície celular (receptores associados a tirosina-cinases) que transmite o sinal do receptor adiante por meio da fosforilação de proteínas-alvo citoplasmáticas nas cadeias laterais da tirosina.

tirosina-cinase
Enzima que fosforila proteínas específicas nas tirosinas. *Ver também* tirosina-cinase citoplasmática. (Figura 15-70)

tomografia EM – *ver* tomografia por microscopia eletrônica

tomografia por microscopia eletrônica (tomografia EM)
Técnica para a visualização tridimensional de espécimes no microscópio eletrônico, onde múltiplas imagens são obtidas em direções distintas através da manipulação do suporte do espécime. As imagens são combinadas computacionalmente, originando a imagem tridimensional.

topoisomerase (DNA-topoisomerase)
Enzima que se liga ao DNA e quebra de forma irreversível uma ligação fosfodiéster em uma ou em ambas as fitas. A topoisomerase I cria quebras transientes na fita simples, permitindo que a dupla-hélice se distorça e alivie a tensão super-helicoidal. A topoisomerase II cria quebras transientes na dupla-fita, permitindo que uma dupla-hélice passe por outra e assim resolva a torção. (Figuras 5-22 e 5-23)

totipotente
Descreve a célula que é capaz de dar origem a todos os diferentes tipos de células em um organismo.

tradução (tradução do RNA)
Processo no qual a sequência de nucleotídeos em uma molécula de mRNA direciona a incorporação de aminoácidos em uma proteína. Ocorre no ribossomo. (Figuras 6-66 e 6-67)

trans
No outro lado.

transcitose
Ingestão de material em uma face de uma célula, por endocitose, seu transporte através da célula dentro de vesículas, e seu descarte na outra face, por exocitose. (Figura 13-60)

transcrição (transcrição de DNA)
Reprodução de uma fita de DNA em uma sequência de RNA complementar, pela enzima RNA-polimerase. (Figura 6-21)

transcrição reversa
Transcrição de RNA para DNA. Essa é a direção oposta descrita pelo dogma central, que diz que o DNA é transcrito em RNA e o RNA é traduzido em proteína.

transcriptase reversa
Enzima, primeiro descoberta em retrovírus, que sintetiza uma cópia de dupla-fita de DNA a partir de uma molécula-molde de fita simples de RNA.

transcrito
Produto de RNA da transcrição de DNA. (Figura 6-21)

transcrito primário (transcrito primário de RNA)
Transcrito recém-sintetizado, antes de sofrer *splicing* ou outras modificações. (Figura 6-21)

transdução de sinal
Conversão de um sinal a partir de uma forma física ou química para outra (p. ex., conversão de luz em um sinal químico ou de sinais extracelulares em intracelulares).

transfecção
Introdução de uma molécula de DNA estranha em uma célula. Normalmente, seguida pela expressão de um ou mais genes presentes no DNA recém-introduzido.

transferência de elétrons fotossintetizantes
Reações dirigidas pela luz na fotossíntese, nas quais os elétrons se movem ao longo da cadeia transportadora de elétrons em uma membrana, gerando ATP e NADPH. (Figura 14-38)

transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)
Técnica para o monitoramento da aproximação de duas moléculas marcadas com fluorescência (e, portanto, da sua interação) nas células. (Figura 8-26)

transformação
(1) Inserção de um novo DNA (p. ex., um plasmídeo) dentro de uma célula ou organismo, como em uma *E. coli* competente. (2) Conversão de uma célula normal em uma célula que se comporta de várias maneiras, como uma célula de câncer (i.e., proliferação desregulada, crescimento em cultura independente de ancoramento).

transição metáfase-anáfase
Ponto de verificação do ciclo celular que precede a separação das cromátides-irmãs na anáfase, em eucariotos. Se a célula não estiver pronta para prosseguir para a anáfase, o ciclo celular é mantido nesse ponto. (Figura 17-14 e Painel 17-1, p. 1072-1073)

translocação
(1) Tipo de mutação em que uma porção de um cromossomo é retirada e ligada a outro cromossomo. (Painel 8-1 e Figura 20-5) (2) Processo de transferência de proteína através da membrana.

transplante nuclear
Transferência de núcleo de uma célula para outra através de microinjeção. (Figura 8-6)

transportador de proteínas
Proteína ligada à membrana que faz a mediação do transporte de outra proteína através da membrana. (Figura 12-23)

transportadora (proteína carreadora, permease)
Proteína de transporte de membrana que se liga a um soluto e o transporta através da membrana, passando por uma série de alterações conformacionais. Os transportadores podem transportar íons ou moléculas passivamente por um gradiente eletroquímico ou podem ligar as alterações conformacionais a uma fonte de energia metabólica como a hidrólise de ATP para dirigir o transporte ativo. *Comparar com* canal proteico. *Ver também* proteína de transporte de membrana. (Figura 11-3)

transporte ativo
Movimento de uma molécula através de uma membrana ou outra barreira dirigido por uma energia diferente daquela contida no gradiente eletroquímico ou de concentração da molécula transportada.

transporte axonal
Transporte intracelular direcionado de organelas e moléculas ao longo de um axônio de uma célula nervosa. Pode ser anterógrado (para fora do corpo celular) ou retrógrado (em direção ao corpo celular).

transporte de membrana
Movimento de moléculas através de uma membrana, mediado por uma proteína de transporte de membrana. (Figuras 11-3 e 11-4)

transporte passivo (difusão facilitada)
Transporte de um soluto através de uma membrana, a favor do seu gradiente de concentração, ou do seu gradiente eletroquímico, utilizando apenas a energia armazenada pelo gradiente. (Figura 11-4)

transporte transcelular
Transporte de solutos, como nutrientes, através de um epitélio, por meio de proteínas de transporte de membrana presentes nas faces apical e basal das células epiteliais. (Figura 11-11)

transporte vesicular
Transporte de proteínas de um compartimento celular para outro, por meio de intermediários delimitados por membrana, como vesículas ou fragmentos de organelas.

transposase
Enzima que corta uma sequência de transposon em um cromossomo e faz com que a sequência de DNA seja inserida em um novo local-alvo. A transposase normalmente é codificada pelo transposon sobre o qual ela atua. (Figura 5-69)

transposição (recombinação transposicional)
Movimento da sequência de DNA de um local do genoma para outro. (Tabela 5-3, p. 318)

transposição corte-e-colagem
Tipo de movimento de um elemento transponível em que ele é cortado do DNA e inserido em um novo local por uma enzima transposase especial. (Figura 5-69)

transposon – *ver* elemento transponível

transposon DNA-only
Tipo de elemento transponível que existe como DNA por todo o seu ciclo de vida. Muitos tipos se movem por transposição corte-e-colagem. *Ver também* transposon.

trans-*splicing*
Tipo de *splicing* de RNA presente em alguns organismos eucarióticos em que os éxons de dois transcritos de RNA separados são unidos para formar um mRNA. (Figura 6-34)

treadmilling
Processo pelo qual um filamento de proteína polimérico é mantido com um comprimento constante pela adição de subunidades proteicas em uma extremidade e pela perda de subunidades na outra. (Painel 16-2, p. 978-979)

triacilglicerol (triglicerídeo)
Molécula composta de três ácidos graxos esterificados ao glicerol. Principal constituinte das partículas de gordura em tecidos animais (nos quais os ácidos graxos são saturados) e óleos vegetais (nos quais os ácidos graxos são principalmente insaturados). (Painel 2-5, p. 114-115.)

trifosfato de adenosina – *ver* ATP.

trifosfato de guanosina – *ver* GTP

triglicerídeo – *ver* triacilglicerol

tRNA – *ver* RNA transportador

tRNA iniciador
tRNA especial que inicia a tradução. Ele sempre carrega o aminoácido metionina, formando o complexo Met-tRNAi. (Figura 6-72)

troca de classe
A mudança que muitas células B sofrem durante o curso de uma resposta imune adaptativa, fazendo com que uma célula que produz uma classe de imunoglobulina (p. ex., IgM) comece a produzir outra classe (p. ex., IgG). (Figura 25-41)

t-SNARE – *ver* SNARE

tubo neural
Tubo de ectoderme que formará o cérebro e a coluna vertebral em um embrião de vertebrado. (Figura 22-78)

tubulina
Subunidade proteica dos microtúbulos. (Painel 16-1, p. 968, e Figura 16-11)

tumor
Massa anormal de células resultante de um defeito no controle da proliferação celular. Um tumor pode ser não-invasivo (benigno) ou invasivo (canceroso, maligno). (Figura 20-3)

tumor primário
Tumor no local original no qual o câncer surgiu primeiro. Tumores secundários se desenvolvem em qualquer local por metástase.

ubiquitina
Pequena proteína, altamente conservada, presente em todas as células eucarióticas, que se liga covalentemente a lisinas de outras proteínas. A ligação de uma cadeia curta de ubiquitinas a um resíduo de lisina marca a proteína para destruição proteolítica intracelular por um proteassomo. (Figura 6-92)

ubiquitina-ligase
Qualquer uma do grande número de enzimas que ligam ubiquitina a uma proteína, muitas vezes marcando-a para destruição em um proteassomo. O processo catalisado pela ubiquitina-ligase é chamado de ubiquitinação. (Figura 3-79)

uniporte
Proteína carreadora que transporta um único soluto de um lado da membrana para o outro. (Figura 11-8)

UTR (região não-traduzida)
Região não-codificante de uma molécula de mRNA. A UTR 3' se estende desde o códon de parada que termina a síntese proteica até o início da cauda poli A. (Figura 7-105) A UTR 5' se estende desde o quepe 5' até o códon de início que inicia a síntese proteica.

vacúolo
Vesícula muito grande, repleta de fluido, encontrada na maioria das células de plantas e fungos, tipicamente ocupando mais de um terço do volume da célula. (Figura 13-39)

valência
Número de elétrons que um átomo deve ganhar ou perder (por compartilhamento ou por transferência) para preencher a sua camada externa. A valência de um átomo é igual ao número de ligações únicas que o átomo pode formar.

variação antigênica
Habilidade de alterar os antígenos apresentados na superfície de uma célula; uma propriedade de alguns microrganismos patogênicos que os capacita a evadirem do ataque pelo sistema imunológico adaptativo.

variação de energia livre (ΔG)
Variação na energia livre durante uma reação: a energia livre das moléculas do produto menos a energia livre das moléculas dos reagentes. Um alto valor de ΔG negativo indica que a reação tem uma forte tendência a ocorrer. (Painel 2-7, p. 118-119)

variação de energia livre padrão ($\Delta G°$)
Variação de energia livre de duas moléculas que estão reagindo à temperatura e pressão-padrão, quando todos os componentes estão presentes na concentração de 1 mol por litro. (Tabela 2-4, p. 77, e Figura 14-18)

VEGF – *ver* fator de crescimento endotelial vascular

vesícula
Pequena organela, delimitada por membrana, presente no citoplasma de uma célula eucariótica, muitas vezes esférica. (Figura 11-35)

vesícula acrossômica
Região na extremidade da cabeça de um espermatozoide que contém um saco de enzimas hidrolíticas usadas para digerir o revestimento protetor do óvulo. Quando um espermatozoide começa a entrar no óvulo, o conteúdo da vesícula é liberado (reação acrossômica), ajudando o espermatozoide a penetrar a zona pelúcida. (Figuras 21-33 e 21-27)

vesícula revestida
Pequena organela delimitada por membrana com uma "gaiola" de proteínas (o revestimento) em sua face citosólica. É formada pela invaginação de uma região revestida da membrana (fossa revestida). Alguns revestimentos são feitos de clatrina, enquanto outros são feitos de outras proteínas.

vesícula secretora
Organela delimitada por membrana na qual moléculas destinadas à secreção são armazenadas antes de sua liberação. Algumas vezes é denominada grânulos secretores, devido ao aspecto escuro de seu conteúdo quando corado, tornando a organela visível como um pequeno objeto sólido. (Figuras 13-63 e 13-66)

vesícula sináptica
Vesícula secretora pequena, cheia de neurotransmissores, formada nos terminais do axônio de uma célula nervosa. Seu conteúdo é liberado na fenda sináptica por exocitose, quando um potencial de ação chega ao terminal do axônio.

vetor de clonagem
Uma molécula de DNA pequena, geralmente derivada de um bacteriófago ou plasmídeo, usada para carregar o fragmento de DNA a ser clonado para dentro da célula recipiente possibilitando que este fragmento de DNA seja replicado. (Figura 8-39)

vetor de expressão
Um vírus ou um plasmídeo que porta uma sequência de DNA em uma célula hospedeira adequada, e que direciona a síntese da proteína codificada na sua sequência. (Figura 8-48)

vetor
Em biologia celular, DNA de um agente (vírus ou plasmídeo) utilizado para transmissão de material genético a uma célula ou organismo. *Ver também* vetor de clonagem, vetor de expressão. (Figura 8-39)

via de sinalização dos fosfolipídeos de inositol
Via de sinalização intracelular que inicia com a ativação da fosfolipase C e a geração de IP_3 e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolipídeos de inositol na membrana plasmática. O DAG auxilia na ativação da proteína-cinase C. (Figuras 15-38 e 15-39)

via de sinalização JAK-STAT
Via de sinalização ativada por citocinas e alguns hormônios, fornecendo uma via rápida a partir da membrana plasmática até o núcleo, afetando a transcrição gênica. Envolve Janus cinases (JAKs) citoplasmáticas, transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs).

via de sinalização Wnt
Via de sinalização ativada pela ligação de uma proteína Wnt a receptores na superfície celular. A via possui várias ramificações. Na ramificação maior (canônica), a ativação faz com que quantidades aumentadas de catenina-β entrem no núcleo, onde regulam a transcrição de genes que controlam a diferenciação celular e a proliferação. A superativação da via Wnt/catenina-β pode levar ao câncer. (Figura 15-77)

via secretora constitutiva (via-padrão)
Via presente em todas as células através da qual moléculas, como as proteínas da membrana plasmática, são continuamente levadas para a membrana plasmática a partir do aparelho de Golgi, em vesículas que se fundem à membrana. É a via padrão para a membrana plasmática caso nenhum outro sinal de endereçamento esteja presente. (Figura 13-63)

via secretora padrão – *ver* via secretora constitutiva

vírion
Uma única partícula viral. (Figura 24-13)

vírus
Partícula que consiste em ácido nucleico (DNA ou RNA) envolvido por uma carapaça proteica, com capacidade de replicar-se dentro de uma célula hospedeira e disseminar-se de célula para célula. (Figura 24-13)

vírus de DNA tumorais
Um termo geral para uma grande variedade de vírus de DNA diferentes que podem causar tumores. (Figura 20-43)

vírus envelopado
Vírus com um capsídeo circundado por uma membrana lipídica (o envelope), que é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, quando o vírus brota da célula. (Figura 24-15)

vírus não-envelopado
Vírus constituído apenas por um cerne de ácido nucleico e capsídeo proteico. (Figura 24-24C e D)

vírus tumorais
Vírus que podem tornar cancerosas as células que eles infectam.

$V_{MÁX}$
Velocidade máxima de uma reação enzimática. (Figura 3-45 e Painel 3-3, p. 162-163)

v-SNARE – *ver* SNAREs

Wee1
Proteína-cinase que inibe a atividade de Cdk pela fosforilação de aminoácidos no sítio ativo de Cdk. Importante na regulação da entrada na fase M do ciclo celular.

***Western blotting* (*immunoblotting*)**
Técnica pela qual as proteínas são separadas por eletroforese e imobilizadas em uma folha de papel (membrana) e então analisadas, geralmente por meio de um anticorpo marcado.

Wnt (proteína Wnt)
Membro de uma família de proteínas-sinal secretadas que possuem vários papéis diferentes no controle da diferenciação celular, proliferação e expressão gênica em embriões animais e tecidos adultos.

***Xenopus laevis* (rã africana)**
Espécie de rã (não sapo) frequentemente utilizada em estudos de desenvolvimento inicial de vertebrados.

XIC – *ver* centro de inativação do X

zigoto
Célula diploide produzida pela fusão de um gameta masculino e um feminino. Um oócito fertilizado.

zíper de leucina
Motivo estrutural visto em muitas proteínas de ligação ao DNA, onde duas α-hélices de proteínas separadas são unidas em uma região helicoidal (como em um zíper), formando um dímero proteico. (Figura 7-19)

zona de adesão — *ver* banda de adesão

zona pelúcida
Camada de glicoproteínas na superfície de um oócito não-fertilizado. Frequentemente é uma barreira a fertilização entre espécies. (Figura 21-22)

Índice

Os números de página em **negrito** referem-se a textos de discussão principal do termo; os números de página com um F referem-se a figuras, com um FF a figuras que seguem consecutivamente; os números de página com um T referem-se a tabelas; *vs.* significa comparar/comparação.
As páginas 1269 a 1602 são encontradas nos Capítulos 21 a 25, que estão no CD-ROM que acompanha a obra.

A

Abertura numérica, lentes de microscópio, 581,581–582F
Absorção de nutrientes, fígado, 1442
Acanthamoeba castellanii, miosina, 1013
Acetato de tetradecanoilforbol, como promotor de tumor, 1226
Acetilação, histonas, 223F, 290
Acetil-CoA (Acetil-Coenzima A), 84T, 96–97
  armazenamento de energia, 96
  estrutura, 83F
  oxidação de ácidos graxos, 97F
  produção mitocondrial 96, 97F, 817
    ver também Ciclo do ácido cítrico
Acetilcolina (ACh)
  concentração na fenda sináptica, 882
  efeitos diferentes sobre diferentes células, 885, 885F
  estrutura, 885F
  função neurotransmissora, 684, 808
  óxido nítrico em vasos sanguíneos, 888
  receptores *ver* Receptores de acetilcolina (AChRs)
Ácido aspártico, estrutura, 129F
Ácido cítrico, 98, 98F, 122F
Ácido desoxirribonucleico *ver*DNA
Ácido esteárico, 114F
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 502
Ácido fórmico, oxidação, 871, 871F
Ácido γ-aminobutírico (GABA) *ver* GABA (ácido γ-aminobutírico)
Ácido giberélico (GA3), 1406F
Ácido *N*-acetilneuramínico, 628F, 774F, 775F. *Ver também* Ácido siálico (NANA)
Ácido oleico, 114F
Ácido retinoico, 889F, 890, 1285
Ácido ribonucleico *ver* RNA (ácido ribonucleico)
Ácido siálico (NANA), 628F, 774F, 775F
Ácido(s), 52–53, 109F
  em água, 53F
  medição *ver* pH
  secreção, estômago, 1436
Ácido(s) nucleico(s), **117F**
  biossíntese, 85, 85F, 86, 87F
    ver também Síntese de DNA; Síntese de RNA
  DNA *ver*DNA (ácido desoxirribonucleico)
  estrutura, 117F
  hibridização
    condições de hibridização, 535–536,537F
    Northern blotting, 538–539, 539F
    Southern blotting, 539–540, 539F
    tecnologia do DNA recombinante, 532,537F
    ver também Hibridização de DNA
  origem da vida, 401–402
    ver também Origem da vida; Hipótese do mundo de RNA
  propriedades, 401
    pareamento de bases *ver*Pareamento de bases
  química, 116–117F
  RNA *ver* RNA (ácido ribonucleico)
  subunidades de nucleotídeo, 61–62
Ácidos graxos, **58–59**, 58F, 95, **114–115FF**
  componentes da membrana celular, 58–59, 59F
    ver também Membrana(s); Fosfolipídeo(s)
  mobilização, 96F
  oxidação, 96–97, 97F
  síntese, 855
  ver também tipos específicos
Ácidos teicoicos, 1527
Acil-CoA graxo, 96
Aconitase, 122F
Acoplamento de reações, 75F, 78F, 824–825
  formação de carreador ativado, 79–80
  função do ATP, 81
  glicólise,**91**
  modelo mecânico, 80F
  ver também Energia livre
Acoplamento quimiosmótico, **813–814**, 814F
  bacteriano, **839–840**, 839F
  produção de ATP, 817–819, 819F
    ver também Síntese de ATP
  ver também Cadeia(s) transportadora(s) de elétrons
ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), 803F, 907T
α-Actina, empacotamento dos filamentos de actina, 994F, 1007, 1007F
Actina/filamentos de actina, 611F, 965F
  alongamento, modificações por proteínas, 999–1000
  anel contrátil (citocinese), 966, **1093–1094**
    RhoA e, 1095, 1095F
  arranjos, 1006
  capeamento, 1003, 1003F
  comportamento dinâmico, 966, 1037
  cones de crescimento neuronal, 1387F
  conservação evolutiva, 982–983
  contração muscular, **1026–1028**
  córtex celular, 1036, 1037
  deposição da parede celular vegetal, 1202
  despolimerização, 1001
    cofilina *ver* Cofilina (fator de despolimerização de actina)
  drogas que afetam o, 987, 988T
  estrutura, 145F, 968, 968F, 974–975
    subunidades, 971
  estrutura do axônio, 1048
  extremidade (–)
    movimento da miosina, 1013
    proteína de capeamento, 1003
  extremidade (–), tropomodulina, 1003
  forma D (ligada ao ADP), 980
  forma T (ligada ao ATP), 980
  homólogo bacteriano 990, 990F
  indução/montagem, induzida por patógenos 1515–1516, 1515F
    mecanismo de nucleação, 1516F
    ver também Polimerização de actina
  interações com proteínas em leveduras, 969, 979F
  isoformas, 982–983
  junção de ancoramento, 1133T, 1134, 1135T
    anexo à integrina, 1170, 1170F
    junções aderentes e motilidade celular, **1142**
    via cateninas, **1142**, 1142F
  montagem *ver* Polimerização de actina,
  nucleação *ver* Polimerização de actina
  organização, efeito de Rac, Rho e Cdc42, 1042–1043, 1042F, 1043F
  polimerização *ver* Polimerização de actina
  propriedades, 965
  proteínas acessórias *ver* Proteínas ligadoras de actina
  regulação proteica de ERM, 1009
  Saccharomyces cerevisiae, 969–970
  sítio de ligação a nucleotídeo, 973–974, 973–974F
  treadmiling, 976–980, 977F, 977FF, 979, 979F
  velocidade de crescimento das extremidades (+)/(–), 976
Actinomicina, 385T
Açúcares, **55–58, 112–113FF**
  armazenagem, 94F
    ver também Amido
  biossíntese via fotossíntese, 69, 70F, 845–846, 845F
    ver também Fotossíntese
  como blocos de construção, 56
  derivados, 113F
  estrutura, 55–56, 57F, 112F, 113F
  fonte de energia, **55–58**, 88F, 96–97, 824T
  polimerização, 56
  ver também Carboidratos; Monossacarídeos; Polissacarídeos; *açúcares individuais*
Adaptação
  canal iônico de potássio ativado por cálcio, 690
  down-regulation de receptores, 903, 903F
  fotorreceptores, 917–918
  inativação de receptores, 903F, 920–921
  quimiotaxia bacteriana, 944
  sequestro de receptores, 919–920
  transduçãovisual, 919–920
Adaptina, vesículas revestidas por clatrina, 756F
ADARs *ver* Adenosina-desaminase(s) (ADARs)
Adenina, 116F, 197, 301F
  desaminação, 301F
  estrutura do RNA, 331–332
  pareamento de bases, 198F
Adenocarcinoma, definição, 1206
Adenoma, definição, 1206
Adenosina-desaminase(s) (ADARs), 484, 484F
  taxas de reação, 161F
Adenovírus, 1496F
  entrada e desnudamento, 1506F, 1507
  movimento dos microtúbulos com base em axônios, 1517
Adesão à matriz celular ligada à actina, 1133T, 1134, 1135T
Adesão célula-célula
  adesão seletiva, **1139–1140**, 1139F, 1140F
  classificação seletiva, **1140–1141**, 1140F, 1141F 1142F
  Ensaios, 1135
  formação da sinapse e, **1147–1149**, 1149F
  função do Ca^{2+}, **1135–1136**
  ligação heterofílica *vs.* homofílica, 1138F
  moléculas de adesão celular, 1177T
    caderinas, **1133–1150**
    células dendríticas, 1571
    integrinas, 1134, 1145, 1146
    selectinas, **1145–1146**
    superfamília das imunoglobulinas, 1145, **1146–1147**
  proliferação celular e, 1153–1155
  proteína de sustentação, 1145, **1148–1149**
  sinalização, **1145**
  ver também Junção celular; Adesão célula-matriz; Matriz extracelular (ECM)
Adesão célula-matriz, 1133T, 1134, 1134F, 1135T, **1169–1178**
  CAMs, 1177T
  fibronectina e, 1191
  hemidesmossomo *ver* Hemidesmossomo
  ligada à actina, 1133T, 1134, 1135T
  ver também Adesão célula-célula; Junção celular; Matriz extracelular (ECM); Integrina(s)
Adesão celular, **1131–1204**, 1177T
  adesão célula-célula *ver* Adesão célula-célula,

invasão bacteriana de células hospedeiras, 1508
matriz celular *ver* Adesão célula-matriz
tração para movimento celular, **1040–1041**
ver também Moléculas de adesão celular (CAMs); Junção celular; Matriz extracelular (ECM)
Adesão focal, 1170, 1176–1177, 1176F
Adesão homofílica, 1137–1139
heterofílica *vs.*, 1138F
Adesinas
adesão bacteriana ao epitélio, 1502
fagocitose induzida por bactéria, 1508, 1509F
Adipócitos *ver* Células de gordura
Adjuvante(s), 1539
ADP (difosfato de adenosina)
actina na forma D, 980
produção a partir de ATP, 80, 90F
proporção ATP: ADP, 823–824
Adrenalina (epinefrina), 907T
controle do músculo liso, 1030
hidrólise de glicogênio, 900
receptores ligados à proteína G, 904
Aequoria victoria, 592
Aequorina, concentração iônica intracelular, 596–597, 597F
Aeropyrum pernix, tamanho do genoma, 18T
Afinidade, anticorpo para determinante antigênico, 1558–1559
Aflatoxina B1, 1225, 1226F, 1229
Agentes danificadores do DNA
carcinógenos *ver* Carcinógenos
radiações ionizantes, 300–301
ver também Radiação ultravioleta (UV)
sensibilidade, defeitos no reparo de DNA, 295T
ver também Mutagênese
Agentes desacopladores, 836, 838
Agrecan, 1181, 1182, 1182F, 1184T
Agregação de proteínas
doenças humanas, 397–398, 397F
estado, epigenético, 472F
resistência proteolítica, 397
vulnerabilidade do SNC, 397
ver também Doenças de príon
Agrina, NMJ, 1168
Agrupamentos tubulares de vesículas, **768–769**
formação, 769, 769F
micrografia eletrônica, 769F, 772F
transporte do RE para o aparelho de Golgi, fusão homotípica de membranas, 768, 769F
via de recuperação (retrógrada), 769, 769F, 770F
Água, **108–109FF**
canal *ver* Canais de aquaporina
comportamento de prótons, 828, 828F
conteúdo celular, 51–52
estrutura, 52F, 108F
fonte de elétrons, 851, 873
papéis funcionais, proteínas, 154
propriedades químicas, 51–52
solvente, 109F
AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), 1477, 1581
ver também HIV
Akt (proteína-cinase B)
em câncer, 1244
Alanina, estrutura, 129F
Albinismo (hipopigmentação), 786
Albumina, caracterização do gene, 539–540
Alça de DNA, 437F, 438F
regulação da transcrição, 438, 438F, 480–481
Alças das hastes, estrutura do RNA, 403F
Alças de alimentação direta, circuito de transcrição, 459, 459F
Alças T, 292, 293F
Álcool, produção por fermentação, 90, 90F
Álcool-desidrogenase, estrutura, 144F
Aldeídos, oxidação na glicólise, 92F
Aldolase, 120F
Aldoses, 112F
Alelos, 314, 554F, 558
de proteínas do MHC, 1576
efeitos da seleção natural, 561–562, 562F
frequência, blocos haplótipos, 562F
Alergia/reações alérgicas, 1556, 1557, 1557F
Algas, 32
evolução, 874, 875F
Alinhamento da sequência BLAST, análise de proteína, 531, 531F
Alinhamento de sequências FASTA, análise de proteínas, 531
Aloenxerto, 1575
Alterações induzidas por drogas, polimerização dos filamentos do citoesqueleto, **987–989**, 988T
Alvéolos
glândula mamária, 1427–1428, 1427F
pulmonar, 1434, 1435F
α-Amanitina, 385T
Amebas, 33F
arrastamento celular, 1036
disseminação da doença do Legionário, 1508
regulação osmótica, 663
Amido
biossíntese, 846
estrutura, 94F
grânulos
amiloplastos, 841, 841F
cloroplastos, 94F, 95, 841, 842F
síntese, 95
Amiloplastos, 841, 841F
Aminoácido âncora, ligação de peptídeos a proteínas do MHC, 1578–1579, 1579F
Aminoácido(s), 5, 59–60, 125
aminoacilação, 370, 371F
ver também RNA transportador
análise, resultado da taxa de mutação, 264
carga (valores de pK), 60F
ciclo do nitrogênio, **100–101**
codificação para, 199–200, 200F
ver também Código genético
essencial, 101, 101F
estrutura, 59–60, 59F, 128F
cadeias laterais
famílias, 128
ácidas, 128, 128F, 129F
apolares, 127F, 129F
básicas, 128, 128F
polares (não-carregados), 127F, 129F
fontes de energia, 99, 101
ver também Ciclo do ácido cítrico
função na estrutura das proteínas, **125–137**
função no dobramento das proteínas, 130, 130F
importância na função das proteínas, 152
efeitos da cadeia lateral, 154–155, 154F
isômeros ópticos, 128F
subunidades proteicas, 59, 126F
ver também Proteína(s); *aminoácidos individuais*
Aminoacil-tRNA-sintetases, 370, **370–371**
estrutura, 371–372, 372F
exatidão, 371–372, 377–378
reação catalítica, 371, 371F
revisão, 370, 372, 372E
ribozimas sintéticas, 407
ver também RNA transportador
AMP (monofosfato de adenosina)
cíclico *ver* AMP cíclico
produção a partir de ATP, 86, 86F
AMP cíclico (cAMP), 117F, **905–909**, 906F, 907F, 907T
ação de toxinas bacterianas, 1503
ativação de genes por, 909F
canais de cátions regulados por AMP cíclico, 917
regulação, proteína G, 905–906
regulação de PKA, 908, 908F
síntese e degradação, 905–906, 907F
Anabaena, 15F
Anabolismo, *ver* Biossíntese
Anáfase,
meiose,
anáfase I, 1091, 1091F
anáfase II, 1091F
mitose, 1054, 1073F, 1089F
anáfase A, **1089–1090**
anáfase B, **1089–1090**
pontos de checagem na montagem dos fusos, 1088
Análise da expressão de uma única célula, 575–576, 576F
Análise de agrupamentos de expressão gênica, 575, 575F
Análise de epistasia, 558–559
Análise de ligação, 559–560
localização de genes, **559–560**, 560F
mapeamento de gene, **559–560**, 560F
ver também Recombinação homóloga (*crossing over*)
Análise de proteínas
cromatografia, **512–514**, 513F, 514F, 515F
determinação da estrutura, 139, **517–532**
análise por difração de raios X, 139, **526–529**, 527–528F
estudos NMR, 139, **529–530**
ressonância magnética nuclear, 139
SDS-PAGE, 517
dinâmica, visualização por marcação com GFP, 593, 594F
eletroforese, 518FF
focalização isoelétrica, 522F
2D-PAGE, 521–522, **521–522**, 521F,522FF
Western blotting, 518, 519F
espectrometria de massa, **519–521**, 520F
interações proteína-proteína, 523–524, 524F, **525–526**, 525F
medida hidrodinâmica, 522–523
proteômica, 519
sequenciamento
alinhamento de sequência, 531, 531F
busca de homologias, 139, 139F
espectrometria de massa, **519–521**
identificação do sítio de ligação ao ligante, 155
ver também sequenciamento de DNA
ver também Microscopia; Identificação de proteínas; Purificação de proteínas
Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), 630, 636, **742–743**, 742F, 807
proteoglicano de superfície celular, 1183
Âncoras de lipídeos, proteínas de membrana, 630
Anéis de Balbiani, exportação de mRNA, 359, 359F
Anéis de porfirina, grupos heme, 830F, 831
Anel contrátil *ver* Citocinese
Anel Z, formação durante a divisão celular, 989, 989F
Anemia, 452, 646
Anemia falciforme, 1495
Anergia clonal, 1548, 1548F
ver também tolerância imunológica
Aneuploidia
não-disjunção meiótica, 1278–1279
polispermia, 1300
Anfíbios
cromossomo plumoso, 234F, 235F
embrião
gastrulação, 1364–1369
polaridade, 1364
ver também Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
tamanho do genoma, 30–31
ver também Xenopus, espécies individuais
Angiogênese, 1446, 1448–1449
crescimento tumoral, **1220–1221**, 1448
formação de capilares, 1447, 1447F
função das células endoteliais, 1446, 1447F
inibidores, em terapia de câncer, 1262
processo, 1446–1447, 1449F
resposta a ferimentos e danos, 1448, 1448F
Anidrase carbônica, taxas de reação, 161F
Anidridos ácidos, 107F
Animais nocaute *ver* Genes nocaute
Ânion, definição, 47
Anisomicina, 385T
Anomalias congênitas, defeito reparo do DNA, 295T
Anormalidades cromossômicas
análises *ver* Citogenética; Cariótipo
câncer, 1215F, 1231, 1254F
erros meióticos, **1278–1279**
ver também tipos específicos
Antecessor evolutivo comum, 862
Antibióticos, **1521–1522**
alvos/mecanismo de ação, 1494F, 1522F
inibidores da síntese de proteína, 384, 384F, 385T
mal uso de, 1524
resistência, 1521–1524
alterações enzimáticas, 1522, 1523F
bomba de ativação, 1522, 1523F
elementos genéticos móveis, 318F
pressão seletiva, 1523
produto gene R, 1522, 1523F
reservatórios ambientais, 1523–1524
transferência, 1522–1523
transferência horizontal de genes, 22
Anticódon(s), 6, 7F, **368–369**, 368F, 369F, 377
oscilação, 369, 369F
Anticorpos catalíticos, 160, 161F
Anticorpos monoclonais, **508–509**, 509F
microscopia imunofluorescente, 587F, 588F, 589
na terapia do câncer, 1260
Anticorpos primários, microscopia de imunofluorescência, 588
Anticorpos *ver* Imunoglobulinas

Antígeno independente de células T, 1598–1599
Antígeno multivalente, 1557
Antígeno(s), 156, 1539, 1557
especificidade monoclonal, 508–509
polivalente(s), 1557
Antígenos HLA (associação a leucócitos humanos) *ver* MHC (complexo de histocompatibilidade principal)
Antiporte(s),656
bomba de sódio-potássio (ATPase), 660–663, 839–840
mecanismo, 656F
permutador cloro-carbonato dirigido por sódio, 657–658
permutador cloro-carbonato independente de sódio, 657–658
permutador sódio-cálcio, 660
permutador sódio-próton, 839–840
ver também tipos específicos
Antirrhinum (boca-de-leão), mutação transformando flor em broto de folha, 32
Antissoro, 589
Antraz, 1493, 1493F
Apaf1, apoptose, 1121, 1122F
Aparelho de Golgi (complexo de Golgi), **766**
cisternas, 771–772, 771F, 778F
compartimentalização funcional, 778F
compartimentalização molecular, 773
distribuição celular, 772
distribuição durante a citocinese, 1098
enzimas, importância, 731
estrutura, 696, **771–773**, 771F, 778F
face de saída, 772, 778F
face *trans* (face de saída), **772**, 778F
formação de vesículas revestidas por clatrina, **754–758**, 756F
microtúbulos motores, organização da membrana, 1020–1021
modelo de maturação das cisternas, de transporte através de, **778**
modelo de transporte vesicular, de transporte através de, **777–778**
montagem de proteoglicanos, **775–776**
posição na célula, 697
processamento da cadeia de oligossacarídeos, **773–775**, 775F, 777
processamento/apresentação de antígeno, 1583F
proteínas de membrana, glicosilação, 635
quantidades de membrana, 697T
rede *cis* de Golgi (CGN) *ver* Rede *cis* de Golgi (CGN)
rede *trans* de Golgi (TGN) *ver* Rede *trans* de Golgi (TGN)
retenção seletiva de proteínas, 731
transporte a partir do RE, **766–787**
ver também Retículo endoplasmático (RE)
transporte através de, **777–778**
transporte para a superfície celular, **799–809**
ver também Exocitose
transporte para os lisossomos, **779–787**, 785F
adição de M6P, **785**
GlcNAc fosfotransferase, 785, 786F
receptor de M6P, 783–784
volume, 697T
APC (polipose adenomatosa de cólon) gene/proteína, 949, 950, 1252
câncer colorretal, 1252T, 1253
APC/C *ver* Complexo promotor de anáfase (APC/C)
Ape(s), relações evolutivas, 247, 247F, 248F
Apetala2 mutante de *Arabidopsis*, 1413, 1413F
Apetala2/proteína de ligação ao elemento que responde a etileno, 1400T
Apetala3 mutante de *Arabidopsis*, 1413, 1413F
Aplysia, movimento celular, 1040
APOBEC, 1535
Apoptose (morte celular programada), **1115–1129**, 1116F
ativação/indução
Apaf-1, 1121, 1122F
dano no DNA, 1106
estimulação mitogênica anormal, **1107–1108**, 1108F
ligante Fas/receptor Fas, 1120, 1571, 1573F, 1594
procaspases, 1118, 1119F, 1120F, 1121
câncer e, 1127, 1215–1216, 1216F, **1245–1246**
cascata proteolítica, caspases *ver* Caspase(s)
dano do DNA, 1117, 1118F
desenvolvimento, 1126
C. elegans, 1327
metamorfose de girino, 1116, 1117F
pata de camundongo, 1116, 1116F
doenças associadas, **1127**
eliminação celular, **1115–1117**
em glândula mamária, 1428
fagocitose, 787, 1115
fagocitose por macrófagos, 787
fosfatidilserina, 627
hematopoiese, 1462
neurônios, 1389–1390
potencial de membrana, 1118
produção de proteínas de morte celular mediada por IRES, 491
proteínas mitocondriais, 856
reconhecimento celular, bioquímico, **1117–1118**
regulação
proteínas antiapoptóticas, 1122–1123
proteínasAP, **1124–1125**
proteínas Bcl2, **1121–1124**
proteínas pró-apoptóticas, 1122–1123
sinalização celular, 884, 885F
trocas celulares, 1115
membrana plasmática, 1117
via extrínseca, **1120–1121**
via intrínseca, **1121**, 1124F, 1125F
Aprendizado associativo, 1396–1397
Apresentação cruzada, apresentação de antígeno, **1584**
Apresentação de antígeno, **1590–1591**
apresentação cruzada, **1584**
CD28, 1590
citotóxicas *vs.* células T auxiliares, 1584–1585
proteínas B7, 1590
Aquifex
na árvore da vida, 16F
tamanho do genoma, 18T
Arabidopsis thaliana (erva daninha), 36f, 39F, 1398FF
embriogênese, **1400**, **1402**, 1402F
expressão de genes seletores homeóticos na flor, 1414F
flores, 1412F
mutações homeóticas, 1413F
genoma, 142, 147, 569, **1399–1400**
tamanho, 18T
planta-modelo, **36**, **37–39**, 568–569, **1398–1399**
plântulas mutantes, 1402F
proteínas de regulação gênica em, 1400
sondagem genética, 1399F, 1402
transgênica, 569
Archaea (arquebactérias), 16, 16F, **17**, 18T
bacteriorrodopsina, 640–642
composição da membrana, 624
Archaeoglobus fulgidus, tamanho do genoma, 18T
Arcos branquiais, 1345
Arginina, estrutura, 128F
ARP (proteína relacionada à actina), 494F, 997, 1022
Arranjo(s) de DNA *ver*Microarranjo(s) de DNA
Arranjos de proteína de alta densidade, interação proteína-proteína, 523
Arrestinas, 919–921, 920–921F
ARS (sequência de replicação autônoma), 286, 287F
Artéria, 1445F
Artrite, infecções crônicas, 1500
Artrópodes
infecções transmitidas por, 1501–1502
polissacarídeos ECM, 1180
ver também espécies individuais
Árvore da vida, 11–13, **11–13**, **15–16**
Árvore filogenética, 16F, 247, 247F, 248
Ascaris, 1487, 1489F
Ascaris lumbricoides, 1489
Asma, 1500, 1534F
Asparagina, estrutura, 129F
Aspartato (ácido aspártico), estrutura, 129F
Aspartato-transcarbamoilase
estrutura, 144F, 173, 174F
mecanismo catalítico, 173–174, 175F
transições alostéricas cooperativas, 173–174, 174F
Assimetria da divisão, em produção de células-tronco, 1421, 1421F
Assuntos éticos, clonagem reprodutiva, 1302–1303
AT-AC espliceossomo, 353–354, 354F
Ataxia telangiectasia (AT), 295T, 304
mutação, 295T, 304, 1106
Atenuação, regulação gênica bacteriana, 477–478
Atenuação da transcrição, 477–478
Aterosclerose, 791, 1500
Ativador de plasminogênio, 1194
tipo urocinase (uPA), 1194
Ativador(es) da transcrição, 341, 342–343, 343F, **435**
em eucariotos, 436F
coativadores, 445, 447F
estrutura, 441, 442, 442F
ver também Motivos de ligação ao DNA
formação de complexo, 447, 447FF
interação com holoenzima, 438F
interações com repressor, 445, 446F
sinergia transcricional, 444–445, 444F
ver também RNA-polimerase II
mecanismos, 436F
procariotos, 418T, 420F, **435–436**, 436, 436F
Atividade elétrica, na manutenção da sinapse e eliminação, **1393–1397**
ATM proteína-cinase
dano no DNA e, 1105
defeitos, 295T, 304
mutação, 1106
Átomos, 45–48, 46, 47F, 48F
estrutura atômica, 45–46F
elétrons *ver* Elétron(s)
interações atômicas, 46–48
modelos de preenchimento espacial, 51
raio atômico, 51
valência, 47
ATP (trifosfato de adenosina), 8–9
abundância, 81
aspectos históricos, 90
carreador de energia 61, 62F, 78, **80–81**
estrutura química, 61F, 117F
função biossintética, 81, 81F
hidrólise *ver* hidrólise de ATP
medida da utilização, 168
radiomarcação, 603F
síntese *ver* Síntese de ATP
transporte, 822
ATPase (transporte de íons), **659–660**, 665
ver também bombas específicas/proteínas
ATPases transposrtadoras de cátion *ver* Bomba de cálcio (Ca^{2+}-ATPase)
ATP-sintase, 660, 813, 814F
bacteriana, 839
dirigida por sódio, 839–840
estrutura, 822F
fosforilação oxidativa, **821–822**, 821F
localização em cloroplastos, 855F
localização mitocondrial, 821, 855F
mecanismo de ação, 822–823
reversibilidade, **826–827**, 826F
bactérias, 839
energética, 826–827
ver também Hidrólise de ATP; Síntese deATP, 80
ATR proteína-cinase, dano ao DNA e, 1105
Atrofia muscular (espinal herdada), mutação da proteína SMN, 364–365
Atrofia muscular espinal herdada, mutação da proteína SMN, 364–365
Autocatálise, origem da vida, 7F, **401**
Autofagia, **782–783**, 783F, 784F
apoptose, 1126
Autofagossomo(s), 782–783, 784F
Autofosforilação, 915, 915F, 922
Automontagem, bicamada lipídica, 9, 10F
Autorradiografia, 601, **602–603**, 603F
com ^{3}H-uridina, 603
forquilhas de replicação em eucariotos, 282–283, 284F
microscopia eletrônica, 603F
2D-PAGE, 522F
3H-timidina, 282–283, 284F
3H-uridina, 603
Auto-splicing de RNA, 356–357, 356F
ver também RNA catalítico
Autossomo(s), 473, 554F, 1271
Auxina, 959, 1403–1404, **1408–1409**
ácido indol-3-acético, 959F, 1406F
transporte em plantas, 959–961
Axilar, 1410
Axina,949
Axonema, espermatozoide, 1293, 1293F
Axônio(s), 680F, 1047
bainha de mielina, 678, 680F
citoesqueleto, **1047–1050**
ver também Transporte axonal
comissurais, 1388, 1388F
desenvolvimento, 1386–1387, 1387F
diferenciação a partir de dendritos, 1386
mecanismos de direcionamento, 1140, 1147, 1177, 1387–1389, 1388F
projeção retinotectal, 1391–1393
gigante de lula, experimentos clássicos, 678,679, 679F
neurossinalizadores, 675
orientação dos microtúbulos, 1047
propagação do potencial de ação, 677F
ver também Potencial de ação
ver também Dendrito(s)

Azida, ligação à citocromo-oxidase, 834
Azul de Coomassie, corante de proteína, 517, 518F

B

Bacilli, 1490F
Bacillus, 16F, 18T
Bacillus anthracis, 1493
Bacillus subtilis, 18T, 20F
BACs (cromossomos artificiais de bactérias), vetores de clonagem de DNA, 541, 552
Bactéria, 16, 16F, 1488, 1489–1490
  ação e alvos de antibióticos, 1494F
  acoplamento quimiosmótico, 839–840, 839F
  adesão de bacteriófago, 1504–1505
  arquebactérias e eucariotos *vs*. 16, 17F
  composição química, 55T, 63T
  controle de qualidade da tradução, 387, 387F
  cromossomos, 202, 149F
    origem de replicação, 282, 283F
  diversidade, 15
  E. coli como modelo, 24–25, 25F
  entrada em células hospedeiras por fagocitose, **1507–1508**
  epigenética,472
  estrutura(s), 1490F
    cápsulas, 1532
    flagelo *ver* Flagelo
    formas, 13–14F, 1490F
    membrana externa 1490F
    membrana plasmática, 839–840, 1490F
    parede celular, 13–14, 1490F, 1527
    pilus (fímbrias), 1490F
    projeções da superfície celular, 1490F
    ribossomo, 612F
    tamanhos, 13–14F, 17
  expressão gênica, 345F
    ver também Transcrição
  flora normal, 1486, 1501
  fontes de energia, 839
  fotossintética, 840, 863, **872–875**
    ver também Cianobactéria; Fotossíntese; Bactéria púrpura
  genes e fatores de virulência, 1491
  genomas
    sequenciados, 18T
    tamanho, **17**, 18T, 1488
  gram-negativa, 1490, 1527
  gram-positiva, 1490F, 1527
  inserção de porinas, 717, 717F
  invasão das células hospedeiras, **1507–1508**, 1509F
  litotróficas, em fendas hidrotermais, 11–12
  movimento intracelular, **1513–1517**
  mRNA, 346–347, 380,381F
  patogênicas, **1489–1494**
    invasão, **1507–1511**
    não-patogênicas vs., 1492F
    organização do genoma, 1492F
    patógenos facultativos, 1490
    patógenos obrigatórios 1490–1491
    patógenos oportunistas, 1490
  regulação gênica *ver* Regulação da expressão gênica bacteriana
  replicação de DNA, 280, 282, 283F
    ver também Replicação de DNA
  ribocontroles, 478–479
  sequências de DNA como imunoestimulantes, 1527
  síntese de proteína, 345, 380
    inibidores, 384, 385T
      ver também Antibióticos
    ribossomos, 612F
    ver também Síntese de proteína; Tradução
  toxinas *ver* Toxinas bacterianas
  transcrição *ver sobre* Transcrição
  transporte de elétrons, 873F
    evolução, **871–872**
    ver também Cadeia transportadora de elétrons
  variação de fase, rearranjos do DNA, 454–455
  vírus de *ver* Bacteriófago(s)
  ver também organismos específicos
Bactéria púrpura
  centro de reação fotossintética, 827F, 850, 850F, 854F
  evolução mitocondrial, papel, 860
Bactéria sulfurosa verde, transporte de elétron, 873F
Bacteriófago CTXΦ, 1492F
Bacteriófago lambda
  adesão bacteriana, 1504–1505
  ciclo de vida, 327F
    estado herdável, 458, 458F
    estado lítico, 458, 458F
    excisão, 324
    integração, 324, 325F
    profago, 457, 458F
  circuito de transcrição, 459
  recombinação sítio-específica conservativa **324**, 325F
    excisionase, 326
    integrase, 294, 324, 325F
  regulação gênica, 457–458, 458F
    correpressão, 457, 458F
    repressor Cro, 421F, 457–458, 458F
      dimerização, 142, 142F
      reconhecimento da sequência, 421F
    repressor lambda, 416, 418T, 457, 458F
    ver também Repressor Cro; Repressor lambda
Bacteriófago(s), 21, 22F, 1492, 1492F
  adesão bacteriana, 1504–1505
  integração ao genoma, **324**, 325F
    ver também Transposição
  transferência de genes de virulência, 1491–1492
  ver também vírus individuais
Bacteriorrodopsina, **640–642**, 640F, 641F
Bacteroides, 1501
Baiacu (*Fugu rubripes*), 30, 31F, 251F
Bainha de mielina
  estrutura, 680F
  propagação do potencial de ação, **678–680**, 679F
    ver também Potencial de ação
Bak, apoptose, 1122
Balanço metabólico, 102
Balsa(s) (plataformas) lipídica(s), 625, 625F, 807, 807F
  formação de cavéolos, 790
  montagem, 742–743, 742F
Bandeamentos de cromossomo, 202–203, 202–203FF, 237FF
Base de dados, 530–531
Base de dados de proteína, 139, 139F
Base(s) (ácido nucleico)
  DNA, 197–199, 198F, 198FF
    dano, 296, 296F
    não-naturais,301F
    naturais, 301F
    tautômeros, 268–269, 270F
  estrutura de nucleotídeos, 61, 116F
  pareamento *ver* Pareamento de bases
  pirimidina, 61, 116F
  purinas *ver* Base(s) púrica(s)
  RNA, 300
Base(s) (química), 53, 109F
  medida *ver* pH
Base(s) pirimídica(s), 61, 116F
  ver também Citosina; Timina; Uracila
Base(s) púrica(s), 61, 116F
  depurinação, 296, 297F
  ver também Adenina; Guanina
Basófilos, 1452F, 1556, 1557F
Baterias de genes, coordenadas por proteínas de regulação crítica, 463–464
Bax, apoptose, 1122
Beggiatoa, 15F
Benzopireno, função no câncer, 1225
Betaglicanos, 1184, 1184T
Bexiga
  câncer, 1210F, 1228, 1229
  infecção, *E. coli* uropatogênica, 1502, 1503F
Biblioteca de DNA, **540–542**, **541–542**
  Cdna, 542, 543F, 544
  em sistema híbrido duplo em leveduras, 524
  Genômico, 542, 542F
    cDNA vs., 543F, 544
  ver também Clonagem de DNA
Biblioteca de DNA genômico, 542
  Humano, 542F
  vs. Cdna, 543F, 544
Bicamada(s) lipídica(s), 9, **617–629**, 618F, 625F
  assimetria, **626–627**, 626F
  associação de proteínas de membrana *ver* Proteína(s) de membrana
  composição, **622–624**, 624F
  difusão, 622, 652
  estrutura, 620F, 621–622
  fluidez, **621–624**, 621F
  formação do domínio, **624–625**
  formação espontânea, **620–621**
  função de barreira, 651
  fusão, proteínas SNARE, 763F, 764
  membranas negras, 622
  montagem, 620–621, 622, **743–745**, 744F
    ver também Fosfolipídeos
  motilidade, 622, 623F
  origem, 405–406, 407F
  permeabilidade, 624, 631, **652**
  permeabilidade relativa, 652F, 653F
  sinalização, 626
Bid, apoptose, 1124
1, 3-Bifosfoglicerato, 121F
Bile, 1443
Biologia química, 526–527
Biologia sintética, 460, 461F
Bioluminescência, 596–597
Biossíntese, 66
  carreadores ativados, 79F, 81, 81F
    ver também carreadores específicos
  catabolismo vs. 67F
  colesterol, 83F
  inibição por retroalimentação, 170, 170F
  macromoléculas, 63
    necessidade de energia, **84–87**
  ordem biológica, **65–87**
  ver também vias específicas
Biotina, 84F, 167, 167T
Biotina carboxilada, 84F
BiP, 736, **736**, 767
Blastocisto, 1379–1380, 1379FF, 1381F
Blastoderme, 1329–1331, 1329–1330F
Blastômeros, 1365, 1365F, 1379F
Blástula, 1363F, 1365
Blatóforo, 1366, **1367–1368**, 1367F
Blocos de haplótipos, 561–562, 562F
Blotting
  membranas, 538
  Northern blotting, 538–539, 539F
  Southern blotting, 539–540, 539F
  Western blotting, 519F
  ver também Hibridização de DNA
Bolsa invariante, proteína de MHC, 1577–1578, 1579F
Bolsas específicas, proteína MHC, 1577–1578, 1579F
Bomba de Ca^{+2} *ver* Bomba de Ca^{+2} (Ca^{+2}–ATPase)
Bomba de cálcio (Ca^{+2}–ATPase), **660–661**
  autofosforilação, 660
  contração muscular, 660
  estrutura, 660–661, 660–661F
  mecanismo, 660–661F
Bomba de dióxido de carbono (CO_2), fixação de carbono 846–847
Bomba de íon hidrogênio (bomba de H^+) *ver* Bombas de prótons
Bomba sódio-potássio (ATPase), **660–663**, 661–662F
  ciclo da bomba, 661–662F
  regulação osmótica, 669
  seletividade, 671
Bomba tipo P (ATPase), 659, 660F
  ver também Bomba de cálcio; Bomba sódio-potássio (ATPase)
Bomba tipo V (ATPase), 660
Bombas de próton, 827–828, 829F
  alosteria, 836
  bacteriorrodopsina, **640–642**
  detalhe atômico, 835
  evolução, 871
  fotossíntese, 851, 854
  mecanismo geral, 837F
  no lisossomo, 780, 780F
  potenciais redox, 835, 835F
  ver também Complexos enzimáticos respiratórios
Bombas eletrogênicas, 661–663, 671
Bombas tipo F (ATPase), 659–660, 660F
Bombas *ver*Proteína(s) carreadora(s)
Borda da asa, 1201, 1352
Borda em escova, 806, 1437F, 1438F
Bordetella pertussis, 1503–1504
Borrelia burgdorferi, doença crônica, 1500
Botão do membro (vertebrados), 1355F, 1374F
Brassinoesteroides (BBP), 350F
BrdU (bromodesoxiuridina), 310
  análise do ciclo celular, 285, 285F, 1059, 1059F
  divisão das células da epiderme, 1422
  divisão das células musculares, 1425
Bronquíolo, 1435F
Brotamento axilar, 1410, 1411F
Broto da asa, 1355F
Brown, Louise, 1301
Bulbo olfatório, células-tronco neurais e renovação neuronal, 1430
α-Bungarotoxina, efeito sobre receptores de acetilcolina

C

C. elegans ver Caenorhabditis elegans
Ca^{+2} ATPase *ver* Bomba de cálcio (Ca^{+2}–ATPase)
Ca^{+2}/calmodulina *ver em* Calmodulina
Cabos de actina, em leveduras, 967–970, 970F
Cadeia δ, receptor de célula T, 1571
Cadeia invariante, 1584, 1596F
Cadeia J (junção)
  IgA, 1556F
  IgM, 1554, 1555F
Cadeia leve (L) (anticorpos), 1552–1553, 1554F, 1556, 1557T, 1558–1559F
  domínios constantes, **1558–1559**, 1560F
  domínios repetitivos, **1559**, 1560F
  domínios variáveis, 1558–1559, 1560F
  geração de diversidade, 1562–1566
Cadeia leve reguladora de miosina (RMLC), fosforilação mediada por Rho, 1095
Cadeia mu, IgM, 1553

Cadeia pesada (H) (anticorpos), 157F, **1553–1557**, 1554F
conjunto de segmentos gênicos, 1563–1564F
domínios constantes, **1558–1559**, 1559F, 1560F
domínios repetitivos, **1559**
domínios variáveis, **1558–1559**, 1559F, 1560F
IgM, 1555F
Cadeia respiratória *ver* Cadeia de transporte de elétrons
Cadeia(s) carreadora(s) de elétrons fotossintéticos, 827F, **843–844**, 844F, **849–850**, 850F, 852F, 873F
através da membrana tilacoide, 852F
ver também Tilacoide(s)
carreadores de elétrons, 850–853, 852F
carreadores de elétrons mitocondriais *vs.*, 815F, 853–854, 855F
centro de reação, 848, 849–850, 850F
enzima que rompe a molécula de água, 851, 852F, 873
esquema Z, 852
evolução, **872–875**
potencial redox, 852F, 853
ver também Fixação de carbono; Cloroplato(s)
Cadeia(s) tranportadora(s) de elétrons, **827–840**
bactéria, 839–840, 839F, 873F
implicações evolutivas, **871–872**
centros de ferro-enxofre, 101
cianobactéria, 872, 873–875
cloroplastos *ver* Cadeias de transporte de elétrons fotossintéticos
energia, 820–821
evolução, **870–876**
bactérias anaeróbias, 871–872
bactérias fotossintéticas, 872
cianobactéria, 872, 873–875
fermentação, 870–871
fotossíntese *ver* Cadeias de transporte de elétrons fotossintéticos
mitocondriais *ver* Cadeias de transporte de elétrons mitocondriais
síntese de ATP, 100, 100F, **817–819**, 819F
desacoplamento, 836
gradientes de prótons, **821–823**, 821F
movimento de prótons, 828, 828F, 829F
ver também ATP-sintase; Gradientes de prótons eletroquímicos; Bom-bas de prótons
ver também ATP (trifosfato de adenosina); Transferência de elétrons
Cadeia(s) transportadora(s) de elétron(s) mitocondrial(ais), 814, **819–820**, 827F, **831–839**
afunilamento eletrônico, 823–824
armazenamento de energia, 821
carreadores de elétron, **829, 831**
citocromos, 829, 830F, 831
ver também Citocromo(s)
coenzima Q (ubiquinona), 831, 832F
colisão randômica, 834
espectrometria, 831, 832F
proteína ferro-enxofre, 830F, 831
ver também Complexo respiratório enzimático
cloroplastos *vs.*, 814, 815F, 853–854, 855F
complexo enzimático *ver* Complexo respiratório enzimático
controle respiratório, **837–838**
desacoplamento, 836
energia, 819, 820F
fluxo reverso de elétron, 838
natural (gordura marrom), 838
potencial redox, 835, 835F
ver também Fosforilação oxidativa
Cadeias leves substitutas, pré-células B, 1553, 1565–1566, 1566F
T-caderina, 1136–1137, 1138T
Caderina E, 1136, 1138T
em invasividade de câncer, 1249–1250
transições epitélio-mesênquima, 1141
Caderina N (caderina neural), 1136, 1138T, 1388
Caderina P, 1136, 1138T
Caderina(s), **1133–1150**
adesão célula-célula mediada por Ca^{+2}, **1135–1136**, 1137–1138
adesão homofílica, 1137–1139, 1138F
ligação por afinidade, 1138
"Princípio do velcro", 1138, 1136, 1139F
segregação de tecidos e, 1140–1141
caderinas clássicas, 1136, 1138T, 1177T
caderina E, 1136, 1138T, 1141, 1249–1250
caderina N, 1136, 1138T, 1388
caderina P, 1136, 1138T
caderina VE, 1138T, 1145
estrutura, 1139F
ligação de catenina ao citoesqueleto de actina, **1142**, 1142F
repetições do domínio de caderina, 1137
sinalização, 1145
caderinas não-clássicas, 1136–1137, 1138T, 1177T
caderina 23, 1138T
caderina T, 1136–1137, 1138T
desmocolinas, 1136, 1138T
desmogelinas, 1136, 1138T
proteína Flamingo, 1137, 1138T, 1145
proteínas Fat, 1137, 1138T
protocaderinas, 1136, 1138T
repetições do domínio de caderina, 1137
sinalização, 1145
β-catenina e, 949, 1142
desenvolvimento da expressão
adesão seletiva, **1139–1140**, 1139F, 1140F
classificação seletiva, **1140–1141**, 1141F, 1142F
compactação embrionária, 1136, 1136F
desenvolvimento neural, 1140, 1140F, 1141, 1388
distribuição, 1135, 1136, 1136F
diversidade, **1136–1137**, 1137, 1138T
estrutura, 1136–1137, 1137F, 1139F
domínios intracelulares, 1142
motivo do domínio de caderina, 1137
mudanças conformacionais, 1138
formação da sinapse e, 1148
funções de sinalização, **1136–1137**, 1145
genes, na orientação neuronal, 1138
invasão bacteriana e, 1508
membros da família, 1138T
tecido nervoso, 1136–1136, 1388
ver também tipos específicos
Caenorhabditis elegans, 37f, 39F, **1321–1328**, 1322F
anatomia do adulto, **1321**
apoptose, ICE, 1118
ciclo de muda, 1322
como organismo-modelo, 36–37, 39
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*
determinação do sexo, 1282F, 1286
genes
compensação de dose, 475, 476F
para desenvolvimento multicelular, 1323
ver também em Desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*
genoma, 18T, 20T, 552
hermafroditas, 1321
mapa de interação de proteínas, 188
microtúbulos, 982F
mutantes, 557F, 564F
número de célula, 1321
proteína de regulação gênica, 1400T
reprodução sexuada, 1321
RNA de interferência (RNAi), 571, 571F
tamanho, 1489
Cálcio/íon cálcio (Ca^{+2})
adesão célula-célula mediada por caderina, **1135–1135**
armazenagem, retículo sarcoplasmático, 725–726
ativação do óvulo, **1299**
como mensageiro intracelular, **912–916**
concentração no citosol, 660
liberação de transmissores nas sinapses, 804, 808, 912–913
medida intracelular, 596–597, 597F
permeabilidade das junções tipo fenda, 1161–1162
regulação da concentração de citosol,912–913
regulação da concentração no citosol,912–913
sinalização *ver* Sinalização por cálcio
Calmodulina, **914–916**
ação sobre CaM-cinase II, **915**, 915F
Ca^{+2}/calmodulina, 914
estrutura, 744F
ligação à adenilil-ciclase de *Bordetella*, 1503
ligação de Ca^{+2}, 1030
Calnexina, como proteína chaperona, 738–739, 767
Calreticulina, função de proteína chaperona, 738–739
Camada granular, da epiderme, 1419, 1419F
Camada subcutânea (hipoderme) da pele, 1418, 1418F
Camada vitelínica, 1287
Camadas germinativas, 1365–1366, 1365F
CaM-cinase (Proteína-cinase dependente de Ca^{+2}/calmodulina), **915–916**, 915F, 916F
cAMP *ver* AMP cíclico
Campos minados, 1162
Camundongo
como organismo-modelo, **39–40**, 43F, 1378
genética *vs.* humanos, 1378
produção de camundongos transgênicos, 567F
quimeras, 1380, 1380F, 1381F
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento do camundongo
genoma
cromossomos, 293–294
genômica comparativa *vs.* humanos, 249F
impressão, 469F, 470F
ver também Impressão genômica
sintenia conservada, 207, 208F, 250
transposons, 323, 323F
nocaute
organismo(s) transgênico(s), **566–568**, 568F
produção, 567F
ver também Genes nocaute
Camundongo de sexo revertido, 1284
Canais de cloro, 666, 673, 674F
Canais de Na^{+} controlados por voltagem *ver* Canais de sódio controlados por voltagem
Canais de potássio (Canais de K^{+})
bacteriano, estrutura, **671–673**, 672F
canais de cloro *vs.*, 674F
canais de vazamento, **669**
condutância, 671
controlados por voltagem *ver* Canais de potássio controlados por voltagem
controle, 672
filtro de seletividade, 673F
Canais de potássio ativados por cálcio, 690
Canais de potássio controlados por voltagem, 677
atrasados ou tardios, 678, 689
epilepsia, 682
inativação, modelos de bola corrente, 678F
mutantes, 678
relações evolutivas, **682**
Canais de sódio controlados por voltagem
estado, 676–677
junções neuromusculares, 687
mecanismo de inativação, 676
Canais de vazamento de potássio (canais de vazamento de K^{+}), **669**
Canais iônicos, **667–692**
Abundância, 668
controlados, 668, 668F, 1431, 1431F
controlados por voltagem, **676–678**
eficiência no transporte, 667
famílias, 692T
função, 667, 668
mudanças conformacionais, 668F
mutações, 682
registro *patch clamp*, 651F, **680–682**, 681FF
regulados por ligante *ver* Canais iônicos regulados por ligante
regulados por nucleotídeos cíclicos, 916, 917
seletividade, **667–669**
ver também tipos individuais
Canais iônicos controlados por transmissor, **682–684**, 892
como receptores de acetilcolina, **684–686**
efeitos de drogas psicoativas, **686–687**
junções neuromusculares, **684–686, 687–688**
localização, 683
troca de permeabilidade, 683
ver também receptores específicos
Canais iônicos regulados por ligante
controlados por neurotransmissor *ver* Canais iônicos controlados por transmissor
receptores ligados a canais iônicos, 892, 893F
regulados mecanicamente, 1431, 1431F
Canais K^{+} retardados, 689
Canal de aquaporinas, **673–675**, 673F
estrutura, 633F, 674, 674F
modo de ação, 674, 675
Canal de cálcio, 912, 913
canais liberadores de Ca^{+2} regulados por IP3, 910, 911
receptores de rianodina, 912
Canal de cálcio regulado por voltagem, **682, 687–688**
Canal iônico regulado por voltagem, **676–678**
ver também tipos específicos
Canalículos, 1442

Câncer, **1205–1267**
angiogênese na córnea, 1448
apoptose, 1127
benigno *vs.* maligno, 1206, 1207F
causa/patogênese, 1208
alterações epigenéticas, 1208, **1213**
carcinógenos *ver* Carcinógenos
defeitos no reparo de DNA, 277–278, 295–296, 295T, **1216–1217**
ver também reparo de DNA
fatores do meio, 1224, 1224F
genes *ver* Genes críticos para o câncer
mutações somáticas, 265, **1208**, 1209
prevenção, **1224–1230**
ver também Oncogene(s); Genes supressores de tumor (TSGs)
células *ver* células cancerígenas
células-tronco, **1217–1218**
origem, **1218–1219**
propriedades, 1219
clonalidade
evolução clonal, 1212–1213, 1212F, 1227
origem de uma única célula mutante, **1207–1208**, 1209F
ver também células cancerígenas
como um processo microevolutivo, **1205–1224**
crescimento/progressão, **1210**
degradação ECM, 1193
diferenciação celular defeituosa, **1215–1216**
invasividade, 1220
ver também Metástase
metástase *ver* Metástase
morte celular defeituosa, **1215–1216**
oxigênio como fator limitante, 1220
proliferação celular, **1107–1108**
propriedades que contribuem, 1223
seleção natural, **1212–1213**
degradação ECM, 1194, 1194F
epidemiologia, 265, 1229–1230
epigenéticas *vs.* mudanças genéticas, 1214F
incidência
em função da idade, 1209, 1209F
EUA, 1207F, 1229F
fatores ambientais, 1224, 1224F
Mórmons, 1225
variação entre países, 1228T
iniciação, 1226, 1227
mortalidade, EUA, 1229F
nomenclatura, 1206
prevenção, **1224–1230**
primária, 1207
progressão, 1210
câncer colorretal, **1250–1255**, 1255F
efeitos da instabilidade genética, **1214–1215**
microambiente, **1221–1222**, 1221–1222F
seleção natural, **1212–1213**
propagação, função das células-tronco, 1218
recorrência, 1219
transição epitelial-mesenquimal, 1141
tratamento, **1256–1256**
evolução da resistência à terapia, 1259
novas terapias, **1257–1360**
proteínas oncogênicas alvo de anticorpos, 1260
sensibilidade, 1219
taxol, 988
terapias tradicionais, **1257**
velocidade de crescimento, 1212
ver também Mutações; *cânceres específicos*
Câncer cervical, **1211–1212**, 1211F
Câncer colorretal, **1250–1255**, 1352F
anomalias genéticas, **1251–1253**, 1252T, 1438
detecção e triagem, 1251–1252
etapas de progressão, 1250–1252, 1254–1256, 1352F
heterogeneidade, 1256
reparo de pareamento incorreto, 277, 295T, **1254**
sequência de mutações, 1255, 1255F
Câncer de células pequenas do pulmão, mutação associada, 1256
Câncer de cólon hereditário não-polipomatoso (HNPCC), 277, 1254
Câncer de cólon *ver* Câncer colorretal
Câncer de mama
anormalidades cromossômicas, 1215F
crescimento típico, 1208F
defeitos no reparo do DNA, 295T
incidência dependente da história reprodutiva, 1229, 1229F
proteínas Brca1/Brca2, 310
Câncer gástrico, associado a *Helicobacter pylori*, *1503*
Canhão de emissão de campo, 604, 609
Capa GTP, microtúbulos, 977, 979, 979F
Capacitação, 1294, **1297**
Capas de ATP, filamentos de actina, 979, 979F
Capeamento, de filamentos de actina *ver* Filamentos de actina
Capeamento 5′ de mRNA eucariótico, 334–335, 346–347, 346–347F
complexo de ligação ao quepe, 346–347
decapping, 492
funções, 346–347
ordenação pré-mRNA, 352
reação, 346–347, 347F
reação fosfatase, 346–347
reação guaniltransferase, 346–347
reação metiltransferase, 346–347
Capilares, 1446–1447, 1446F
resposta a ferimentos, 1448, 1448F
ver também Angiogênese
Capsídeo(s) (viral), 148, 148F, 149F, 150F, 1489F, 1497, 1513
Cápsulas, mecanismo de resistência dos fagócitos, 1532
Características complexas, 563
Características poligênicas, 563
Carbamoil-fosfato-sintase, afunilamento molecular, 167–168, 168F
Carboidrato, 55
biossíntese, 844
ver também Fixação de carbono
ver também Polissacarídeos; Açúcares
Carbono
componentes celulares, 54–55
esqueletos, 106F
estrutura atômica, 46F
ligações duplas entre, 106F
Carboxipeptidase, dependência do íon zinco, 167
Carcinogênese, 1208
Carcinógenos, 1208
ativação metabólica, 1225, 1225F
câncer após exposição, 1210, 1210F, 1225
identificação para prevenir câncer, **1229–1230**
industrial, riscos, 1230
mutagenicidade, 1225, 1225F
tipos, 1225–1229
Carcinoma, 1206, 1234
Cardiolipina, 867–867, 868F
Cardiomiopatia hipertrófica familiar, 1031
Carga, 749, 750F, 767F
Cariótipo, 202–203
Análise, 202–203FF
Humano, 202–203F
veado muntjac, 204F, 205F
ver também Cromossomos mitóticos
Carreadores ativados no metabolismo, **79–86**, 84T
formação, 78–79
glicólise, 92F
ver também Glicólise
reação de acoplamento, 79–80, 82–83, 824–825
ver também carreadores específicos
Cartilagem, 1568–1469
células, 1467, 1468–1469, 1469F
ver também Condrócitos
crescimento, 1468–1469, 1469F
defeituoso em acondroplasia, 1471–1472, 1472F
erosão por osteoclastos, 1472–1473
mineralização, 1471
"modelos" em desenvolvimento ósseo, 1470, 1471F
reparo ósseo, 1471
substituição por osso, 1470–1471–1471F
Cascata de sinalização, **895**
Cascata reguladora, 170, 482–483, , 482F
Caseína-cinase, 1, 949
Caspase(s), **1118–1120**
ativação, 1118, 1119, 1120F
ver também Procaspase(s)
caspase-3, 1119
caspase-8, 1573F
domínio de recrutamento de caspase, 1119
enzima de conversão interleucina-1, 1118
humana, 1119T
inibição, **1124–1125**, 1127
vias de sinalização, 1119
Cassetes de deleção, mutagênese de leveduras, 570
Catabolismo, **88–103**
anabolismo vs., 67F
carreadores ativados, 79F
definição, 66, 88
oxidação de moléculas orgânicas, 70, 100F
açúcares, **55–58**, 88
ciclo do ácido cítrico *ver* Ciclo do ácido cítrico
fosforilação oxidativa *ver* Fosforilação oxidativa
glicólise *ver* Glicólise
Catalase, 144F, 721
Catálise
autocatálise e origem da vida, 7F, **401**
barreiras de energia, 72–73
catalisadores, 73, 158–159
ver também Enzima(s); Ribozimas
no uso controlado de energia nas células, **65–87**
por RNA *ver* RNA catalítico; Ribozimas
Catálise enzimática, **159–169**
afunilamento molecular, 167–168, 168F
analogias com bolas flutuantes, 74F
anticorpos catalíticos, 160, 161F
catálise da lisozima, 163–165
cinética *ver* Cinética enzimática
complexo enzima-produto, 164F, 166, 166F
energia, 72–73
energia de ativação, 72, 73F, 160, 160F
energia livre, 72
energia térmica, 74
interação enzima-substrato *ver* Interações enzima-substrato
limitada por difusão, 163, 163T, 169
mecanismos, 74F, 159–160, 160, 164F, 166F
pontos de equilíbrio, 76, 78F
Catálise enzimática limitada por difusão, 163, 163T, 169
Catanina, 770, 995F, 1000, 1001F
Catástrofe, em instabilidade dinâmica, 1003, 1080
Catenação de DNA, 1071
Catenina(s)
adesão célula-célula e sinalização intracelular, 949, 1142, 1145
catenina p120, 1142
β-catenina
câncer colorretal, 1253
ligação em caderina, 949, 1142
γ-Catenina (placoglobina), ligação em caderina, 1142
ligação de caderinas clássicas em filamentos de actina, **1142**, 1142F
Cátion, definição, 47
Cauda poli-A *ver* Poliadenilação (extremidade 3′ do mRNA)
Caulobacter cresentus, forma de citoesqueleto, 991
Caveolina, **790**
Cavéolo, **790**, 790F
CBC (complexo de ligação ao quepe), 347
CCR5, receptor de HIV, 1504–1506, 1504–1505F
CD28, 1590, 1591F, 1592T
CD80, 1592T
CD86, 1592T
CD9, ligação espermatozoide-óvulo, 1298–1299
Cdc20, regulação APC/C, 1064, 1066, 1066T, 1087, 1100
Cdc42, 1042F, 1043, 1156, 1516
Cdc6, 288, 289F, 1068
Cdh1, regulação APC/C, 1064, 1066T, 1101
Cdk (cinase dependente de ciclina) *ver* Cinases dependentes de ciclina (Cdks)
S-Cdk, 1066, **1067–1069**, 1068
Cdk4, em câncer, 1243, 1244F
CDNA, 542
clones, 542, 543, 543F, 544
clonagem por PCR, 546F
bibliotecas, 542, 543F, 544
síntese, 543F, 574
Cdt1, ligação a ORC, 1068
Cegueira dos rios, 1518
Célula B virgem imatura, 1553
Célula ciliada, 609F, 1429, **1430–1432**, 1431FF
Célula da epiderme, **1419–1420**
Célula da glia, 680F, **1383–1384**
produção de mielina, 678
radial, 1385F
Célula de Purkinje, cálcio intracelular, 597F
Célula endotelial, **1445–1450**, 1447F
estrutura, 1445
origem embrionária, 1446
resposta inflamatória, 1534
Célula epitelial
área de superfície, 1007
distribuição das proteínas de membrana, 645
domínio apical, 798, 799F, 806, 806F
endocitose, 798, 799F
formação de microvilosidades, 1007
glicolipídeo, 628
junções compactas, 806
polaridade, **798**, 799F, 806F
transporte de IgA, 1556A
Célula espinhosa, 1419, 1419F
Célula folicular primordial, 1291, 1291F

Célula fundadora, em *C. elegans*, 1322–1323
Célula mesenquimal (fibroblastos "imaturos"), 1468
Célulapré-B, **1553**
Célula satélite, músculo esquelético, 1466
Célula senescente replicativa, 293, 505, 1059, 1107, 1217
Célula(s)
árvore da vida
células bacterianas, 13–14F, **15–16**, 15F, 25, 25F
células de arquebactérias, **16**
células eucarióticas, **13–14**, 26–32
autorreprodução por autocatálise, 7F
componentes químicos, **45–65**
compostos de carbono, 54–55
pequenas moléculas, 55
comportamento
envolvimento do citoesqueleto, **1025–1050**
ver também Motilidade/movimento celular
diferenciação terminal, 1103
energia livre
obtida da luz (células fototróficas), 11–12
obtida de fontes químicas inorgânicas (células litotróficas), 11–12, 12–13FF
obtida de outros organismos vivos (células organotróficas), 11–12
transmissão da informação, 8
genoma *ver* Genoma(s)
isolamento, **501–517**
suspensões misturadas, 502
técnicas de separação, **502**, 502–503F, 502–503FF
origens da vida, 400–408
polarização *ver* Polaridade/polarização
procariotos, diversidade, 13–15, 13F–15F
propriedades universais
ATP como moeda energética, 8–9
DNA como armazenador da informação hereditária, 2, 3F
famílias de genes em comum, 23, 24T
maquinaria ribossomal para síntese de proteínas, 6–7, 8F
membrana plasmática, 9–10, 10F
pequenas moléculas e química fundamental, 8–9, **45–123**
proteínas como moléculas catalisadoras e executoras, 5–6, 6F
RNA como intermediário no transporte da informação, 4, 5F
unidades de materia vida, 1
veículo da informação hereditária, 2
ver também entrada na célula inicial/celular; componentes específicos; tipos específicos
Célula(s) B, 1540
ativação, **1543–1544**, 1543F, 1552, 1554F, **1568**, 1568F, 1569F
células T auxiliares (T_H), 1574–1575, 1597–1598, 1597F
receptor de células B, 1595, 1596F
seleção do conjunto de genes de anticorpos, **1565–1566**, 1566F
troca de classe, 482–483
célula B1, 1599
célula B2, 1599
correceptor, 1594–1595, 1596F
desenvolvimento, **1543–1544**, 1543F, 1552, 1553–1554, 1554F
seleção do conjunto de genes de anticorpos, **1565–1566**, 1566F
troca de classe, 482–483, 1568F
ver também Imunoglobulina(s)
eventos de sinalização, 1416F, 1596F
memória, 1546
monoespecificidade, 1565–1566
produção de hibridoma, **508–509**, 509F
receptor de células B, 1416F, **1595–1596**, 1596F
receptor células T vs. 1595–1596
recirculação, folículos linfoides do linfonodo 1550
regulação, sinalização do receptor Fc, 1596
repouso, 1544F
sinapse imunológica, 1597T
síntese de anticorpos, 1552
controle pós-transcricional, 482–483
Célula(s) eucariótica(s)
ciclo celular *ver* Ciclo celular
compactação do DNA, 202–203
ver também Cromatina; Cromossomo(s)
compartimentalização, 169
localização do DNA, 200–201
ver também Núcleo
membranas intracelulares, 169
ver também Organela(s); *compartimentos específicos*
composição química, mamíferos, 63T
divisão *ver* Divisão celular
estrutura de genes *ver* Estrutura de genes, eucariótico
expressão gênica, 345F, 412
coordenação, 462, 463F
proteína de regulação *ver em* Proteína(s) de regulação gênica
regulação da transcrição *ver* Controle transcricional da expressão gênica
ver também Expressão gênica; Transcrição
fosforilação de proteínas, 176–177
linhagens celulares, 505, 506T
mRNA *ver* RNA mensageiro, eucariótico
replicação do DNA *ver* Replicação do DNA
RNA-polimerase(s) *ver* RNA-polimerase(s)
rRNAs *ver* RNA ribossomal, eucariótico
síntese de proteínas *ver* Tradução
taxa metabólica, 169
tipos celulares, 411
ver também Diferenciação celular
transcrição *ver* Transcrição
Célula(s) matadora(s) natural(is) (células NK), 1453, 1453T, **1535–1536**
ativação, interferon-β (INFβ), 1536
destruição de células infectadas por vírus, 1535–1536
reconhecimento de células infectadas por vírus, 1536
reconhecimento do MHC de classe I, 1535–1536
Célula(s) muscular(es)
cardíaca, 1463–1464
crescimento descoordenado e divisão, 1109
diferenciação, 464, 464F, 1464, 1480
ver também Mioblastos; Proteína(s) miogênica(s)
esquelético *ver* Músculo esquelético
isoformas de proteína, 1465
lisas, 888, 1450, 1463–1464, 1463F
sincício, 1464
visualização, 1425
Célula(s) T, **1392–1409**, **1540**, **1569–1589**
ativação, 711F, 1543F, **1571–1572**, 1572T, 1590F, **1591–1592**, 1591F
auxiliares *ver* Células T auxiliares (TH)
CD4 *ver* Células T auxiliares
classes principais, 1543
descanso, 1544F
desenvolvimento, 1543F
direcionamento para alvos, **1579–1580**
integrinas, 1174, 1174F
interação de proteínas do MHC, **1569–1589**, **1575**
nódulo linfático, 1551F
polarização do citoesqueleto nas, 1047, 1573
propriedades gerais, **1540–1551**
receptores acessórios, 1580–1581
recirculação, 1549–1551, 1550
reconhecimento de antígeno, **1575**
restrição à classe MHC, **1579–1580**
seleção no timo, 1585–1586, **1585–1586**, 1587F
tolerância, células dendríticas não-ativadas, 1571
ver também Célula(s) T CD4; Célula(s) T CD8; Células T citotóxicas(TC); Células T reguladoras; Receptor(es) de células T
Célula(s) T CD4, 1580, 1592T, 1599F
seleção negativa, 1587, 1587F
seleção positiva, 1586, 1587F
ver também Células T auxiliares (TH)
Célula(s) T CD8, 1580, 1592T, 1599F
seleção negativa, 1587, 1587F
seleção positiva, 1586, 1587F
ver também Células T citotóxicas (Tc)
Célula(s)-tronco
Célula(s)-tronco, **1417–1484**
assimetria dos destinos das células-filhas, 1421, 1421F
embrionária *ver* Células-tronco embrionária (ES)
engenharia, **1476–1483**
epidérmica, **1417–1428**
taxa de divisão, 1420, 1425
Célula(s)-tronco embrionária(s), 505–507, 1283
camundongos, 567F, 1480
"clonagem terapêutica", 507
controle de diferenciação por diferentes fatores, 1481F
derivação, 505–507, 506F
descoberta de drogas, 1482
"personalizada", 1303, 1303F, 1481–1482
problemas da rejeição imune, 1481–1482
produção celular diferenciada *in vitro*, 1481
reparo em tecidos, 1481–1482
Célula(s)-tronco hemopoiética(s), **1450–1463**
autorrenovação, 1458
comprometida, 1456–1458
dependência de contato com célula do estroma, 1458–1459, 1458F
marcadores de superfície celular, 1456
na medula óssea, 1454–1462
pluripotente, origem de linfócito, 1543
recuperação de indivíduos irradiados, 1456
taxa de divisão, 1458
terapia gênica potencial, 1456
ver também Hemopoiese
Célula-mãe sensorial, 1356–1357, 1356FF
Celularização, 1099
Células absortivas (borda em escova), 1437, 1437F, 1438F
Células alveolares, tipo I/II, 1434
Células amplificadoras transitórias, 1422–1424, 1422F
Benefícios, 1425–1426
epitélio intestinal, 1437
estratégia de controle celular, **1423**
Células apresentadoras de antígeno, 1540, 1542, 1542F, **1571–1572**, 1571F
moléculas coestimuladoras, 1572F
ver também Macrófago(s)
Células auxiliares, 1290, 1290F
Células β (secretoras de insulina), 1444, 1444F
Células B de memória, 1546
Células B efetoras, 1543, **1546**, 1546F, 1552F
Células B virgens maduras, 1553
Células basais
de carcinoma, 951
epiderme, 1419, 1419F
epitélio olfatório, 1429F, 1430
Células brancas do sangue *ver* Leucócito(s*); tipos celulares individuais*
Células cálice, 1434–1436
aparelho de Golgi, 772
epitélio respiratório, 1435, 1435F
estrutura, 774F
intestino, 1525–1526F
secreção mucosa, 772, 774F, 1437
Células ciliadas, trato respiratório, 1434–1436
Células da bainha do feixe, 846
Células da extremidade, brotamento capilar, 1447
Células da granulosa, 1291, 1291F, 1298
Células de câncer, **1241–1255**
atividade da telomerase, 1217
caracterização molecular, microarranjos de DNA 412, 414F
células-tronco, 1217–1219
colonização sem restrição, **1206–1207**
deslocamento celular, 1008
linhagens celulares, 506T
mudanças epigenéticas, metilação de DNA, **1213**
perda da inibição de contato, 1233F
propriedades herdáveis, 1206
reprodução sem restrição, **1206–1207**
separador de células ativado por fluorescência, 1218, 1218F
suplementação de sangue, dependência, 1262
taxa de divisão celular, 1209
Células de gordura, 625, 1474–1476, 1475F, 1475FF
regulação da expressão gênica, glicocorticoides, 415
Células de Kupffer, 1443F
Células de Langerhans *ver* Células dendríticas
Células de Leydig, desenvolvimento, 1285
Células de mamífero
composição química, 63T
cultura de células, análise do ciclo celular, 1059, 1059F
DNA mitocondrial, 859
edição do mRNA, 484
replicação do DNA, 281F, 283–284
senescência replicativa, 1059
Células de memória, imunidade adaptativa, 1546, 1546F
Células de Paneth, 1437–1438, 1437F, 1440, 1525–1526F
Células de Schwann, produção de mielina, 678
Células de Sertoli, desenvolvimento, 1284–1285, 1286F
Células de suporte, epitélio olfativo, 1429, 1429F
Células de tabaco, micrografia de cultura de células, 504F

Células dendríticas, 1533, 1542, **1571–1572**, 1571F
Ativação, 1571, 1590–1591
distribuição, 1571
eliminação de células T autorreativas, 1591
expressão MHC, 1571, 1590
fagocitose, **787**, 1452
função, 1542, 1542F, 1593F, 1594
maturação, 1571
moléculas de adesão célula-célula, 1571
não-ativadas, 1571
proteínas coestimuladoras, 1571
proteínas NOD, 1536
receptores de reconhecimento de padrões, 1536, 1571
receptores semelhantes a Toll (TLRs), 1531, 1536
Células diploides
ciclo celular de leveduras, 34, 34F
genética clássica, 554F
reprodução sexual, 1269, 1270F
ver também Meiose
Células dirigidas de modo binocular, no córtex visual, 1395–1396
Células do gânglio retinal, 1391, 1432
Células do sangue, 1451–1453, 1451F, 1452–1453, 1452F, 1453T
formação *ver* Hemopoiese
funções, 1453T
ver também tipos individuais
Células endócrinas, 882
intestino (células enteroendócrinas), 1437, 1437F
no epitélio respiratório, 1435
Células enteroendócrinas, 1437, 1437F
Células ES *ver* Células-tronco embrionárias
Células esponjosas, 1500, 1500F
Células exócrinas do pâncreas, organelas, quantidade de membrana, 697T
Células fagocíticas, **1531–1534**
ver também Macrófago(s); Neutrófilo(s)
Células foliculares, 1290–1291, 1290F
Células germinativas, 1271
Caenorhabditis elegans, 1322–1323
determinantes, 1282, 1282F
inserção de genes, engenharia genética, 565–566
ver também Óvulo; Gametas; Espermatozoide
Células germinativas embrionárias, 1283
Células germinativas primordiais (PGCs), **1282–1286**
especificações por células germinativas determinantes, 1282, 1282F
especificações por células vizinhas em mamíferos, **1282–1283**
migração para as gônadas, **1283**, 1283F, 1285, 1288
pluripotência, 1283
Células hemopoiéticas, 1461–1462
Células híbridas
hibridoma *ver* Hibridoma
produção, 509F
Células hospedeiras
desligamento da transcrição, 1517
invasão por patógeno, 1501, 1503–1505
bactéria, 1507–1511, 1508F, 1509F
evasão de defesas, **1502–1504**
parasitas intracelulares, 1508–1511
vírus, 1504–1505, 1506F
mudanças metabólicas induzidas por vírus, 1517–1518
resposta a patógenos, 1488
tráfego de membrana e estratégias dos patógenos, **1510–1514**, 1510–1511F
Células mesófilas, 846
Células mioepiteliais, 1427F, 1463–1464, 1463F
Células multinucleadas, mitose sem citocinese, 1099
Células nervosas *ver* Neurônios
Células osteogênicas, 1470F
Células pilosas do ouvido, 1429, **1430–1432**, 1431F, 1431FF
Células plasmáticas (células B efetoras), 1543, 1544F, 1547, 1552
ver também Célula(s) B
Células progenitoras, 1386F, 1456–1458
ver também Células-tronco
Células sensoriais, como transdutoras, 1429
ver também tipos específicos
Células sincronizadas, 285
Células somáticas, 1271
funções, 265F
mutações, 265, **1208**, 1209
recombinação induzida, 1348, 1349F
recombinação induzida por choque térmico, 1348
Células T auxiliares (T_H), 1570, **1574–1575**, 1583–1585
ativação de célula B, 1574–1575, **1597–1598**
escolha TH1 *vs.* TH2, 1574F, **1592–1594**, 1593F
papel do correceptor CD4, 1580–1581, 1581F
produção de citocina por, 1598T
reconhecimento de antígeno, **1583–1585**
seleção no timo, **1585–1586**, 1587F
sinapse imunológica, 1597T
tipo 1 (TH1), 1574F, 1575, **1592**
ativação de células dendríticas, 1593F
ativação de macrófagos, **1594–1595**, 1595F
TH2 *vs.*, 1574F, 1592–1594, 1593F
tipo 2 (TH2), 1574F, 1575, **1592–1593**
ativação de células B, 1598
ativação de células dendríticas, 1593F
citocinas, 1593
TH1 *vs.*, 1574F, **1592–1594**, 1593F
troca de classe, 1568
ver também Célula(s) T CD4; Célula(s) T
Células T citotóxicas (T_C), 1535, 1560–1562, **1572–1573**, 1581–1582
apresentação de antígeno, **1581–1582**, 1583F
células T auxiliares *vs.*, 1584
ativação, de células T auxiliares (TH), 1574–1575
células infectadas por vírus, 1581F
efeito do interferon-γ, 1592
experimentos de transferência, 1581F
função do correceptor CD8, 1580–1581, 1581F, 1586
mecanismo para eliminação de células, **1572–1573**, 1573F
seleção no timo, **1585–1586**, 1587F
ver também célula(s) T CD8
Células T efetoras, 1543, 1544F, **1546**, 1546F, 1552F
Células T reguladoras, 1543–1544, 1569–1570, **1574–1575**
Células T_H17, 1594
Células vegetais, 846
ausência de centrossomo, 1081
células da bainha, 846
células do mesófilo, 846
citocinese em, **1097–1098**, 1097F, 1098F
cultura, 504–505, 568
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento e crescimento vegetal
diferenciação celular, preservação do genoma, 411, 413F
divisão, 1195
fixação do carbono *ver* Fixação do carbono; Fotossíntese
microtúbulos, 1097–1098, 1200–1202, 1200F, 1201F
organelas fotossintéticas *ver* Cloroplasto(s)
origem evolutiva, 29
parede celular *ver* Parede celular vegetal
plasticidade, 5568
plastídeos, 841–842, 841F
pressão de turgor, 1197
totipotência, 568
transformação, 570F
vacúolos *ver* Vacúolos vegetais
Células vermelhas do sangue *ver* Eritrócito(s)
Células virgens, resposta imune, 1546, 1546F
Celulase, estrutura de proteína, 529F
Células-tronco hemopoiéticas pluripotentes, origem dos linfócitos, 1543
Células-tronco multipotentes *ver* Célula(s)-tronco
Células-tronco neurais, 1478–1479, 1480
Célula-tronco mesenquimal, 1468
Celulose
controle da expansão orientada de células vegetais, **1406**
microfibrilas, **1197–1198**, 1197–1198F
direção do crescimento e, 1199–1200, 1199F
estrutura, 1197, 1197F
ligação cruzada de glicanos, 1196, 1197–1198, 1197–1198F, 1199T
parede celular vegetal, 1196, **1197–1198**, 1197–1198F, 1199T
microtúbulos e deposição, **1200–1202**, 1200F, 1201F
Celulose-sintase, 1199–1200, 1201
CENP-A, 230–231, 232F
Centrifugação por gradiente de densidade, 511, 512F, 522
Centríolo(s), 993, 993F, 1076, 1076F
Replicação, 1078, 1078F
Zigoto, **1301**, 1301F
Centro de inativação do X (X1C), 474
Centro de organização de microtúbulo (MTOC), 992
ver também Centrossomo
Centro de reação fotoquímica, 848, 849F, 854F
bacteriano, 850, 850F, 853–854
fotossistema I, 854F
transferência de elétron, 849
Centro de reação fotossintéticos, 848, 849F, 854F
bacteriano, 642, 642F
complexo fotossistema II, 642
potencial redox, 852F
transferência de elétron, 849–850, 850F
Centro ferro-cobre, complexo citocromo-oxidase, 832–834
Centro germinativo, maturação da afinidade dos anticorpos, 1566
Centrômero(s), **228–230**
estrutura, 229–230, 229F
estrutura da cromatina, 231–233, 231F
circuitos de memória, 231, 233F
heterocromatina, 228–229, 232F
histonas, variante CENP-A de H3, 230–231, 232F
ver também Cromatina
plasticidade229–230, 230F
replicação dos cromossomos, 209–210,210, 210F, 1076, 1076F
sequência de DNA, 210, 229–230
Centrossomo, 1076, 1076F
"busca e captura" de cromossomos, 1082, 1084F
Comportamento de centralização, 996F
Composição, 992
duplicação e montagem do fuso, **1078**, 1078F, 1079
maturação, 1079
microtúbulos irradiando do, **992–996**, 993F
reorientação, na locomoção celular, 1046
Ceramida, biossíntese, 744–745
Cerdas sensoriais, **1356**, 1356F
Cérebro, mapas sensoriais, 1391–1395, 1392FF
α-Cetoglutarato, 99, 122F, 123F
Cetoses, monossacarídeos, 112F
CGN *ver* Rede *Cis* Golgi (CGN)
Chaperonas
bacterianas, GroEL, 390F
eucarióticas, 388–390, 390F, 715, 716F, 717
importação de proteínas mitocondriais, 715, 716–717, 716F
importância no dobramento de proteínas, 130–131, **388–390**
TCP-I, 390F
ver também moléculas específicas
Chaperonas moleculares *ver* Chaperonas
CheA, 943, 944, 944F
Chimpanzé(s), relações evolutivas, 247, 247F, 248F
Chlamydia pneumoniae, 1500, 1500F
Chlamydia trachomatis, 1510F–1512F, 1513
Chlamydomonas, flagelo, 1032–1033
Choqueséptico, 1534
Choque térmico
indução de recombinação somática, 1348
proteínas (HSPs), 388
ver também Chaperonas; *proteínas específicas*
ver também reparo do DNA
Cianeto, ligação à citocromo-oxidase, 834
Cianobactérias
fotossíntese, 827F, 840
na árvore da vida, 16F
significância evolutiva, **873–875**
Ciclina G_1, 1062
Ciclina(s), 1062
APC/C e, 1087
ciclina G_1, 1062
ciclina M, 395, 1062, 1064, 1074, 1087, 1101
ciclina S, 1062, 1064, 1087
ciclinas G_1/S, 1062
como instrumento de integração de sinais, 177–178, 177F
complexos Cdk *ver* Complexos ciclina-Cdk
expressão gênica, 1101
levedura, 1063F
trocas cíclicas, 1062, 1063
vertebrados, 1063F
Ciclina-S, 1062, 1064, 1087
Ciclinas G_1/S, 1062
Ciclo celular, 554F, **1053–1113**, 1054F
alterações nos cromossomos, 208–209, 208F, 209–210, 209F
alterações nucleolares, 363, 363F
análises
análise de progressão, 1059
citometria de fluxo, 1059–1060, 1060F
cultura de células de mamífero, **1059**, 1059F

embriões de animal, **1057–1058**, 1057F, 1058F
leveduras mutantes, **1056–1057**, 1056F, 1057F
marcação com BrdU, 285, 285F, 1059, 1059F
microarranjos de DNA, 1064–1065
células de câncer, **1107–1108**
fases, 208F, 285F, 1054–1055, 1054F, 1055F
características universais, 1053l
fase G_1, 285F, 1055, **1100–1101**, 1100F
ativação da mitose, 1103
fase G_2, 285F, 1055
fase M, 208F, 285F, 1054, 1071
citocinese *ver* Citocinese
mitose *ver* Mitose
ver também Meiose
fase S (síntese de DNA), 285F, **1067–1071**
células marcadas, 1059F
coesão das cromátides-irmãs, 1070–1071
duplicação do cromossomo, 1054, 1067, 1068F, **1069–1070**
meiótica, 1090, 1272
momento, 284, 285
produção de cromatina, 1074
replicação do DNA, 284, 285, **1067–1069**
síntese de histona, 289–290
ver também Replicação do DNA
G_0 (G zero), 488–489, 489, **1103**
regulação elF-2, 488–489
interfase, 208F, 209, 1055
momento, 1056
ponto de início (restrição), 1055, 1061, 1066, 1105
pontos de verificação *ver* Controle do ciclo celular
repouso, 1061
danos ao DNA e, 303–303, 1105–1106, 1106F
fase G_0, **1103**
gametas masculinos, 1281
sinal anormal de proliferação, **1107–1108**, 1108F
sistemas de controle *ver* Controle do ciclo celular
visão geral, **1054–1060**
ver também Divisão celular; Crescimento celular; Proliferação celular
Ciclo da ureia, mitocôndria, 867
Ciclo de Calvin *ver* Ciclo de fixação do carbono
Ciclo de fixação do carbono, 71F, **844–847**, 845F
Ciclo de *Krebs ver* Ciclo do ácido cítrico
Ciclo do ácido cítrico, 97–99, 102F, 817
geração de elétrons, **817**
vias, 98F, **122–123FF**, 122F, 123F
Ciclo do ácido tricarboxílico *ver* Ciclo do ácido cíclico
Ciclo do glioxilato, 722
Ciclo do nitrogênio, **100–101**
Ciclo endocítico-exocítico, 789
Ciclo Q, 835–836
Ciclo TCA *ver* Ciclo do ácido cítrico
Ciclo-hexamida, 384, 385T
Ciclostoma *ver* Complexo promotor de anáfase (APC/C)
Ciliados, 28F
Cilío primário, 899
Cílios, **1031–1034**
comparação de flagelos, 1031
corpos basais, 1032–1033, 1032–1033F
do domínio apical de células epiteliais, 806
microtúbulos em, 1032F
motilidade, 1031, 1031F
na assimetria esquerda-direita, 1376F, 1377
polaridade, dos batimentos no trato respiratório, 1435F
primário, 1034
Cinase ativadora de cinases dependentes de ciclina (CAK), 1063, 1063F, 1066T
Cinase Aurora, 1074
Cinase Aurora B, 1084
Cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), 1024, 1025F, 1030
Cinase de adesão focal (FAK), 937, **1176–1177**, 1176F
Cinase IκB (IKK), 953
Cinase receptora de BrI1, 957
Cinase semelhante a Src, sinalização de células B, 1596F
Cinase Syk, sinalização de células B, 1596F
Cinase TOR, 934, 1108
CinaseWee1, 1063, 1074, 1074F
Cinase(s) dependentes de ciclina (Cdks), **1062–1063**
ativação por desfosforilação, 75F, 177, 1063, 1063F, 1066T, **1074–1075**, 1074F
complexos de ciclinas *ver* Complexos de ciclinas Cdk
evolução, 177F
inativação/inibição
fase G_1, **1100–1101**
fosforilação, **1063–1064**, 1064F, 1066T
levedura, 1062, 1063F
mudanças cíclicas na atividade, 1062
pontos de verificação G2/M, 1062
regulação, 177–178, 177F
vertebrados, 1062, 1063F
ver também Serina/treonina-cinases; *cinases específicas*
Cinases de lipídeos, 627
ver também cinases específicas
Cinases dos receptores associados à proteína G (GRKs), 920–921, 920–921F
Cinases *ver* Proteína-cinases
Cinesina(s), 526–527, 1014, 1014F
ciclos mecanoquímicos, 1016–1017, 1018F
desmontagem de microtúbulos, 995F
estrutura, 1014F
fuso mitótico, 1034, 1077, 1079, 1082F
geração de força, 1016–1019
hidrólise de ATP, 1018F
núcleo central e geração de força, 1016
origem evolutiva, 1015–1016
processividade, 1019–1020
região de ligação, 1016
sítio de ligação a microtúbulos, 1014, 1014F
transporte axonal, 1020–1021
velocidade de movimento, 1019–1020
ver também cinesinas individuais
Cinética
catálise enzimática *ver* Cinética enzimática
proteínas motoras, **1019–1021**
Cinética enzimática, 159–160, **162–163FF**
cinética de Michaelis-Menten, 162F, 163
estado estacionário, 162F-163F
gráfico duplo recíproco, 163
K_{cat}, 162F, 163
Km, 160, 160F, 162F, 163
número de renovação, 159–160, 162F
taxas de reação, 159–160, 160F, 161F
complexos multienzimáticos, 169
ligantes inibidores, 173, 173F
$V_{máx}$, 159, 160F
Cinetocoro(s), 210, 1076F, **1082–1083**
Bipolaridade, 1075–1076, 1076F
estrutura, 1083F
meiose I, 1277–1278
microtúbulos
anexos, 1082, 1083F, 1084F
forças agindo sobre, 1085–1087, 1085F, 1086F, 1089
mitótico, 1035F, 1076, 1076F
tensão, 1084, 1086
pontos de verificação na montagem de fusos, 1088
Cinta deslizante, 274, 275F, 281F
Cinto de adesão (zonas aderentes), 1142, 1143F
Circuito de regulação gênica, modelo matemático, 35, 35F
Circuito de transcrição, 459–460, 459F, 460F
Cisteína, 101, 129F
Cistinúria, 652
Citocalasina, 988T
Citocina(s)
antagonistas, codificadas por vírus, 1534
células dendríticas, 1413F, **1592–1593**
células T, 1582
resposta inflamatória, 1533–1534
ver também Interleucina(s); *moléculas específicas*
Citocinese, 1054, 1055, 1055F, 1073F, **1092–1101**, 1093F
alargamento da membrana plasmática, 805
anel contrátil, 1093F
actina e miosina II como geradores de força, 1093–1094
ver também Filamentos de actina; Miosina
comportamento dinâmico, 966
função RhoA, **1094–1095**, 1095F
locais de montagem, 1097
montagem, **1093–1094**, 1093F
assimétrica, **1099**, 1099F
corpo mediano, 1094, 1094F
distribuição das organelas, **1098**
função do fragmoplasto em plantas superiores, **1097–1098**, 1097F, 1098F
fuso mitótico e plano de divisão das células animais, **1095–1097**
modelo de estimulação astral, 1096, 1096F
modelo de estimulação do fuso central, 1096, 1096F, 1097F
modelo de relaxamento astral, 1096–1097, 1096F
sulco de clivagem, 1093, 1093F
tempo, 1095
ver também Mitose
Citocromo, **829**, **831**, 832–833, 833F, 852F
ver também citocromos individuais
Citocromo b_{562}, estrutura, 137F
Citocromo *c*, 833F
apoptose, 1118, 1121, 1121F, 1122F
estrutura, 144
taxa de mutação, 265
Citocromo P-450 oxidases, ativação de carcinógenos, 1225
Citoesqueleto, 26, **965–1053**, 965F
espectrina (citoesqueleto da membrana), 646, 646–647f
estabilidade, **969**
filamentos helicoidais, 143, 145
função, 965
influência do comportamento celular, **1025–1050**
ligação das junções celulares, 1131, 1142, 1142F
ligação de integrinas, **1170**, 1170F
localização do RNA, **1022–1023**
polaridade celular, 969, 1044
propriedades, 965
proteínas âncora intracelulares, 1142
proteínas motoras *ver* Proteína(s) motora(s)
proteínas Rho, **1041–1043**
utilização por patógenos, **1513–1517**
ver também Filamentos de actina/actina; Filamentos do citoesqueleto; Filamentos intermediários; Microtúbulo(s); *componentes específicos*
Citogenético, 202–203, 202–203F, 202–203FF, 204F
Citomegalovírus (CMV), inibição da translocação de proteínas MHC de classe I, 1536
Citometria de fluxo, 576, 1059–1060, 1060F
Citoplasma, 74–75, 75F, 696
divisão de *ver* Citocinese
faixas em células vegetais, 782F
óvulo, 1287
ver também Citosol; *componentes específicos*
Citoquímica de análogo fluorescente, 597
Citosina, 116F, 197, 301F
desaminação, 296, 297F, 298F, 301F
edição C-para-U, 484
estrutura do RNA, 331–332
pareamento de base, 198F
Citosol, 696
regulação do pH, **657–658**, 660–662
volume, 697T
Citrato-sintase, 122F
Clatrina, estrutura, **754**, 755F
Claudina, 1153
CLAVATA 1, 957F
CLAVATA 3, 956, 957F
Clonagem "aleatória" de genes, 542, 551
Clonagem, 507–508
clonagem de DNA *ver* Clonagem de DNA
reprodutiva *ver* Clonagem reprodutiva
terapêutica, 507F, 508
vetores (DNA) *ver em* Clonagem de DNA
Clonagem de DNA, 532, **540–541**
fragmentos de restrição, 540
genética reversa, 575
produção de biblioteca genômica, 540–541, 542F
reação de ligação, 540, 541F
vetores de clonagem, **540–541**, 541FF, 542F
ver também cDNA; Biblioteca de cDNA
Clonagem de genes, 542
clonagem por PCR, **544–546**, 545F
por "bombardeamento", 542
ver também Clonagem de DNA
Clonagem reprodutiva, 507, 507F, 1302–1303, 1303F
Dolly, a ovelha, 1287
Clonagem terapêutica, 507, 507F, 508
Clone de DNA genômico, 542
clonagem por PCR, **544–546**, 545F, 546F
Cloranfenicol, 384, 385T
Clorofila(s), 848F
Fotoquímica, **847–848**, 848F, 849–850, 849F, 850F
ver também Fotossíntese; Fotossistema(s)
ver também Cloroplasto(s)
Cloroplasto(s), 30F, **840–855**
biogênese, 856, 856F, 867
crescimento e divisão, 857–858

desenvolvimento, 698, 699F
distribuição durante a citocinese, 1098
estrutura, 713F, **842–843**, 842F, 843F
fotossíntese *ver* Fotossíntese
função, 696
genoma, **856–870**
diversidade, 857T, **859**
evolução, **859–860**, **868–870**
genes, 863, 864F
hepáticas, 864F
herança materna, **866**, 866F
íntrons, 863
mutantes, 867
número de cópias, 858
plantas superiores, **863–864**, 864F
replicação, 858
transferência de genes, 864
variegação e, 866, 866F
ver também Herança não-Mendeliana
glicólise, 854–855
grânulos de amido, 94F, 95, 841, 842F
importação de proteínas, **719–720**, 720F
interconversões de energia, 842
mitocôndria *vs.*, 842–843, 843F
origem evolutiva, 29, 31F, 840–841, **859–860**, 874, 875F
hipótese endossimbiótica, 859–860, 863–864
manutenção, **868–870**
transferência de genes organela-núcleo, 859–860
proteínas barril β, 635
proteínas tecido-específicas codificadas no núcleo, 867
reações biossintéticas, 855
semelhança com bactérias, 857, 863
síntese de lipídeos, 867
síntese de proteínas, 856–857, 856F, 869F
sistema genético, **868–870**, 869F
sistemas livres de células, 511
transporte, **854–855**
transporte de elétron *ver*Cadeia(s) transportadora(s) de elétrons fotossintético
ver também Clorofila(s)
Cloroquina, resistência de *Plasmodium falciparum*, 666
CLV1 (CLAVATA 1), meristema do caule, 957F
CLV3 (CLAVATA 3), 956, 957F
Coagulação sanguínea
agentes anticoagulantes, desintegrinas, 1193
degradação ECM, 1194
Coativador(es), 445, 447F
Cocos, 1490F
Código genético, 199–200
códons *ver* Códons
estrutura do DNA e hereditariedade, 199
evolução, 300, 407–408
fases de leitura, 368, 368F
redundância, 247, 354, 367, 368
universal, 367
variações, **382–383**
códon CUG de *Candida*, 383
recodificação traducional, 383, 383F, 384F
variações mitocondriais, 367, 383, 862, 862T
ver também Tradução
Código HOX, determinação do eixo ântero-posterior, **1342–1346**
Códon de iniciação, 367F, 380, **489–491**
Códon de parada, 367F, 381
Códons, 6, 367, 367F, 368F
códon CUG de *Candida*, 383
códon de iniciação, 367F, 380, **489–491**
códons de parada, 367F, 381
em pêndulo, 369, 369F
genoma mitocondrial, 861–862
redundância, 246–247
sinônimos, 247
ver também Anticódon
Coeficiente de sedimentação, 511, 522
Coenzima A (CoA), 83–84, 84T, 117F
ver também Acetil-CoA
Coenzima Q, 831, 832F, 835
Coenzimas, 167, 167T
ver também tipos específicos
Coesina(s), **1070–1071**, 1087, 1272
degradação do N-terminal, 395
estrutura, 1070F
Cofilina (fator de despolimerização de actina), 994F, 1001, 1002F
hidrólise de nucleotídeos, 1002
lamelipódio, 1038F
Cofilina, localização nuclear, 365F
Coifa da raiz, 1407F
Coimunoprecipitação, 458, 523
Colagenase, 1194
Colágeno fibrilar, **1184–1189**, 1186T
associado a fibrilas *vs.*, 1188–1189
ver também Colágeno(s)
Colágeno(s), 1131, **1184–1186**, 1186T, 1467
associado a fibrilas, 1185, **1187–1189**, 1189F
fibrilar *vs.*, 1188–1189
degradação, 1194
em ossos, 1469
estrutura, 144F, 146F, 1184, 1185F
fibrilas, 1185, 1185F, 1187, 1187F, 1189, 1189F
modificações pós-traducionais, **1186**, 1187F
proteína fibrosa, 146
fibrilar, **1184–1189**, 1186T
associado a fibrilas *vs.*, 1188–1189
força de tensão, 1187–1188, 1189
genes, 1184–1185
evolução, 1185–1186
mutação, 1187
síntese, 1186
cadeias pró-α, 1186
colágeno fibrilar, 1187, 1188F
pró-colágeno, 1186, **1187**
pró-peptídeos, 1186
tipo I, 1185, 1186T, 1187
tipo II, 1186T, 1187, 1469
tipo III, 1186T, 1187
tipo IV, 1165, **1166–1167**, 1167F, 1168, 1185, 1186T
tipo V, 1186T
tipo VII, 1185, 1186T
tipo IX, 1185, 1189, 1189F
tipo XI, 1186T
tipo XII, 1185, 1189
tipo XVII, 1185, 1186T
tipo XVIII, 1165, 1185, 1186T
Colágeno(s) associados a fibrilas, 1185, **1187–1189**, 1189F
Colchicina (colcemida), 987, 988T, 1020–1021
Colecistoquinina, em células enteroendócrinas, 1437
Cólera, transmissão, 1491
Colesterol
biossíntese, 83F, 743, 744–745, 791
estrutura, 620, 620F, 620FF
membranas, 620, 623
transporte *ver* Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs)
Colina, 114F
Coloração de elétrons, 606, 607F
Coloração de revestimento, efeito materno, 474, 474F
ver também Inativação do X
Coloração de tecidos, 554–555, 579, 585F
Coloração histoquímica, 554–555, 579, 585F
Coloração negativa, microscopia eletrônica, **610**, 611F
Coluna vertebral
cultura de tecidos, 504
desenvolvimento, 1385–1386, 1386F
Colunas de dominância ocular, 1395F
Combustão, 820F
Compactação, 1379, 1379F
Compartimento intermediário *ver* Rede de Golgi *cis* (CGN)
Compartimento(s), 1352–1355, 1352F
compartimentalização da célula, **695–704**
de discos imaginais, 1352, **1353–1354**
intracelular *ver* Compartimentos intracelulares
Compartimentos intracelulares, **695–748**, 696F
manutenção, **750–766**
via endocítica, 751F
ver também Organela(s)
Compensação de dose, 473, 475–476, 476F
Competição
entre axônios pelo território sináptico, 1393–1394, 1394F
reprodução sexual e, **1271–1272**, 1271F
Complementação, 527–528F
Complexo α-cetoglutarato-desidrogenase, 123F
Complexo anel de γ-tubulina (γ-TuRC), 992, 992F, 994F, 1077, 1079
Complexo Antenna, 848, 848F
Complexo ARP (ARP 2/3 complex), 997, 997F
em lamelipódio, 1038, 1038F
movimento de patógenos, 1516
Complexo Bithorax, **1342**, 1342F
Complexo CD3, células T, 1590F, 1592T, 1599F
Complexo citocromo b_6–f, fotossistema II, 851, 852F
Complexo citocromo b-c_1, 832, 833F
bomba de próton, 835
ciclo Q, 835–836
estrutura, 836F
Complexo citocromo-oxidase, 832, 833F
centro de ferro-cobre, 834
envenenamento, 834
estrutura, 833F, 834, 834F
mamíferos, 834
natureza essencial, 834
redução do oxigênio, **832–834**, 833F
Complexo de ataque à membrana, 1529, 1529F
Complexo de Crumbs, polaridade epitelial ápico-basal, 1156, 1157F
Complexo de histocompatibilidade principal *ver* MHC (complexo de histocompatibilidade principal)
Complexo de iniciação, transcricional, 341
Complexo de iniciação da transcrição, 341–342
Complexo de junção de éxon (EJC), degradação do mRNA mediada por ausência de sentido, 386
Complexo de leitura do código, 225–226, 225F
Complexo de ligação ao quepe (CBC), **346–347**
Complexo de oligossacarídeo(s), **773–775**, 774F
Complexo de recombinação, 1280
Complexo de reconhecimento de origem (ORC), 287, 288, 288F, 289F, 1068
Complexo de silenciamento gênico transcricional induzido por RNA (RITS), 496
Complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), 494, 494F
Complexo do sinaptonema, 1274, **1275–1276**, 1275F
Complexo enzimático SCF, 184–185, 185F, 1064, 1064–1065F, 1066T
mapa de interação de proteína, 188, 190F
Complexo Hox
comparação entre insetos e mamíferos, 1346F
determinação do eixo ântero-posterior, **1342–1346**
expressão da sequência gênica, 1343–1344
expressão em camundongos, 1346F
padrão de expressão em *Drosophila*, 1343F
Complexo HoxB, expressão em camundongos, 1346F
Complexo juncional, 1153, 1154F
organização, **1148–1149**, 1148F, 1149F
proliferação celular e, **1153–1155**
ver também Proteínas Scaffold
Complexo multienzimático, 168–169, 169, 169F
ver também Complexo de proteína (montagens)
Complexo NADH-desidrogenase, 832, 833F, 836
Complexo NADPH-oxidase, 1532
Complexo OXA, 715, 718, 718F
Complexo Par3/Par6/aPKC, divisão celular de neuroblastos, 1361
Complexo peptídeo-MHC, 1577–1579, 1578F, 1579F, 1580F
ver também MHC (complexo de histocompatibilidade principal)
Complexo piruvato-desidrogenase, 96,96F
Complexo pré-iniciação, 1067
Complexo pré-replicação (pré-RC), 1067–1068, 1068F
Complexo pré-replicativo ORC, 288
Complexo promotor de anáfase (APC/C), 1064, 1066T
alvos/mecanismos de ação, 1064–1065F, 1071, 1100
destruição da geminina, 1068–1069
destruição da securina, 1064
início da replicação do DNA e, 1068
M-ciclina, 1064
S-ciclina, 1064
fase G_1 e, 1100–1101, 1087F, 1088F
proteólise regulada, 395, 396F
regulação, 1064, 1066T, 1087, 1100–1101
separação da cromátide e finalização da mitose, 1066, 1087, 1087F, 1088
Complexo SAM, **715**
Complexo *scribble*, polaridade do epitélio ápico-basal, 1156, 1157F
Complexo sinalizador indutor de morte (DISC) apoptose, 1120, 1120F
Complexo TIM, **714–715**
associação de membrana, 714F
importação de proteína mitocondrial, mecanismo, 716–717, 716F, 718F, 719
Complexo TOM, **714–715**, 714F, 716–717, 716F, 718F
Complexo(s) de poro nuclear, 358, **705**
estrutura, 358, 359F, 705, 706F
exclusão de tamanho, 705, 706F
mecanismo de ação, 706–707
Ran GTPase, 708–709
transporte de mRNA, 329F, 358, 359F, 487
visualização, 706–707, 707F

Complexos ciclina- Cdk, 177–178, 177F, 1062, 1062F, 1063F
G_1/S-Cdk, 1062, 1066, **1103–1105**
G_1-Cdk, 1062, 1066, **1103–1105**
ligação CKI, 1063–1064
M-Cdk, 1062, 1066
ativação por desfosforilação, **1074–1075**, 1074F
dinâmica dos microtúbulos, 1080
entrada na mitose, **1071**, **1074**
função da montagem dos fusos, **1078–1079**, 1079F, 1080
mecanismo de ação, 1062–1063, 1062F
S-Cdk, 1062, 1066, **1067–1069**, 1068
ver também Ciclina(s); Cinase(s) dependente(s) de ciclina (Cdks)
Complexos correceptores ligantes de complemento, 1596
Complexos de captação de luz, 848, 848F
Complexos enzimáticos respiratórios, **819–820, 831–839**
complexo citocromo *b-c*$_1$, 832, 833F, 835–836, 836F
complexo citocromo-oxidase, 832–834, 833F, 834, 834F
complexo NADH-desidrogenase, 832, 833F, 836
energética, 819, 819F, 835, 835F
ver também Bombas de próton
identificação, **831–832**
localização, 831–832, 833F
ver também Estrutura mitocondrial
Complexos imunes, 1553F
Complexos proteicos (montagem), 142–143, 145F
complexos proteicos reguladores de genes em eucariotos, 447, 447FF
cooperatividade, 172–173, 173F
ver também Regulação alostérica
ligação proteína-proteína, 141F, 142–143, 143F
montagens, **148–152**
automontagem, 149–151
dímeros, 142, 142F
efeitos da fosforilação, 175
em vírus, 148, 148F, 149
fatores de montagem, 151
ribossomos, 149
ver também Máquinas proteicas; Interações proteína-proteína
Componente secretor, 1556F
Comportamento do hospedeiro, modificação para facilitar disseminação do patógeno, 1518
Comunicação celular, **879–903**
acasalamento em levedura de brotamento, 880, 880F
adaptação, 902, 920–921, 920–921F
autócrina, 881
dependente(s) de contato, 881, 881F
ver também Efrina(s); Proteína receptora Notch
endócrina, **882–883**, 882F, 883F
ver também Hormônios
evolução, **955**
junções tipo fenda, **884**, 884F
monóxido de carbono, 889
óxido nítrico, **887–889**, 888F
parácrina, **881**, 882F, 883
plantas, **955–962**
receptor(s) da superfície celular *ver* Receptor(es) da superfície celular
respostas diferentes em tipos de células-alvo, 885, 885F
sinais extracelulares, ação combinada, 884, 885F
velocidades da resposta, **886–887**, 887F
ver também Junções celulares; Neurotransmissor(es); Receptor(es); Molécula(s) sinalizadora(s); Transdução de sinal; *moléculas e vias de sinalização individuais*
Comutadores genéticos
desenvolvimento complexo, 447–448,448F
ver também Gene *eve* (*even-skipped*)
evolução, 439–440
mecanismos, **432–454**, 436F
ativadores da transcrição *ver* Ativador(es) da transcrição
operadores, 433–434, 433F, 434F
repressores *ver* Proteína(s) repressora(s)
sequências de DNA, 418
ver também Motivos de ligação ao DNA
Comutadores moleculares, 895, **895–897**, 895F
controle do ciclo celular, 1061, **1064–1066**, 1075
GTPases, 179, 179F
família de GTPases Rho, 1042–1043
GTPase Ran, 708–709
na montagem de revestimento vesicular, 759–760
ver também proteínas individuais
Conceito de "fábrica de RNA", RNA polimerase-II, 346–347, 347F
Concentração iônica intracelular, 596, 597F, 652T
Condensação de cromossomo, 243, 244F, 1075F
compactação da cromatina, 243, 244F
condensação da cromatina, 1070
condensinas *ver* Condensina(s)
função do M-Cdk, 1071
hidrólise de ATP, 243
inativação do cromossomo X *ver também* Inativação do X
variação com o ciclo celular, 208–209, 208F, 209
ver também Cromossomo(s) mitótico(s)
Condensina(s), 243, 244F, 245F, **1075**
Condroblasto, produção de ECM, 1179
Condrócitos, 1468–1469, 1469F
Condrodisplasia, 1187
Condroma, definição, 1206
Condrossarcoma, definição, 1206
Condução saltatória, propagação do potencial de ação, 680
Cone axonal, canais iônicos, 689
Cones (fotorreceptores cones), 1432, 1432F
Cones de crescimento, neuronal, 1048, 1049F, **1386–1389**, 1386F, 1447F
alteração na sensibilidade, **1389**
colapso, 932F
direcionamento de neuritos em desenvolvimento, **1387–1389**
Conexina-26, 1161
Conexinas, **1159–1161**, 1160F, 1290
Conexões, **1159–1161**, 1160F
Conexões sinápticas, remodelamento, 1393, 1396–1397
Conexões visuais, no córtex de mamíferos, 1395–1396
moldadas pela experiência, 1395–1396, 1395F
segregação de *inputs* do olho direito e do olho esquerdo, 1395, 1395F
Conservação evolutiva, 17, 17F
desenvolvimento multicelular, 1306F, 1307
elementos do citoesqueleto, 982–983
histonas, 213
homeodomínio de proteína, 138F, 420–421
meiose, 1280, 1286
sequência do genoma, 39–40, 207, 208F, 246, 250, 292
Constante de afinidade (K_a), 158F
ligação antígeno-anticorpo, **1558–1559**
Constante de associação (K_a), 158F
Constante de dissociação (K_d), 158F
Constante de equilíbrio (K), 157–159
relação para variações de energia livre, 76, 77T, 157, 158F, 159F
Contador de cintilações, 601
Contador Geiger, 601
Contato célula-célula
medula óssea, 1458
polimerização da actina via Rac, 1047
ramificação capilar, 1448
ver também Adesão célula-célula; Junção celular
Controle, canais iônicos *ver* Canal(is) iônico(s)
Controle combinatório, 425
determinação celular, 465–466
diferenciação celular, 464–465, 465F
formação de complexo, 477, 477FF
gene *Eve de Drosophila, 448–450, 449F*
heterodimerização, **424–425**, 425F, 425FF
integração do promotor, 449–450, 450F
Controle do ciclo celular, 177–178, **1060–1067**, 1066F
análises
cultura celular de mamíferos, **1059**, 1059F
embriões animais, **1057–1058**, 1057F, 1058F
importância, 1053
leveduras mutantes, **1056–1057**, 1056F, 1057F
ativação intracelular de eventos do ciclo celular, replicação de DNA, **1067–1069**, 1068F
câncer e, 1216–1217, 1243, 1244F
cronômetro, 1060, 1061F
funções, 1060–1061
pontos de verificação, 505, 1061
dano de DNA, 303, **1105–1107**
defeitos que tornam células cancerosas vulneráveis, 1216–1217
início (pontos de restrição), 1055, 1061, 1066, 1105
meiótica, 1281
pontos de verificação G_2/M, 1061, 1062, 1066, 1105
pontos de verificação na montagem do fuso, **1088**, 1088F
transição da metáfase para a anáfase, 1061, 1066, 1071
proteínas de regulação, 1066T
Cdks *ver* Cinase(s) dependente(s) de ciclina (CDKs)
ciclinas *ver* Ciclina(s)
fosforilação inibidora, 1063–1064
p53 e, 1105
proteínas E2F, 1103–1105
proteínas Rb, 1104–1105, 1104F
ubiquitina-ligases *ver* Ubiquitina-ligase(s)
ver também proteínas específicas
proteólise cíclica, **1064**, 1064–1065F, 1066T
APC/C *ver* complexo promotor da anáfase (APC/C)
complexo enzimático SCF, 1064, 1064–1065F
recomposição, 1069
regulação transcricional, **1064–1065**, 1104, 1104F
similaridades eucarióticas, 1056
trocas moleculares/bioquímicas, 1061, 1064–1066, 1075
Controle por retroalimentação positiva, 901,901F
acoplamento conformacional, 171, 172F
assimetria celular, 1314–1315
circuito transcricional, 459, 459F
epigenético, 471, 472F
memória celular, 458, 458F, 466
Controle respiratório, **837–838**
Controle traducional da expressão gênica, 379F, 415, **488**
degradação do mRNA, **492–493**, 492F
negativo, 488, 490F
poliadenilação citoplasmática, **493**
regulação da iniciação, **489–491**, 490F
sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), 491
ver também RNA mensageiro (mRNA)
Controle transcricional da expressão gênica, 379F, 415, **432–477**
ativadores *ver* Ativador(es) da transcrição
em eucariotos
"ação à distância", 438F
atenuação transcricional, 478
complexidade, 434–436
controle do ciclo celular, **1064–1065**, 1104, 1104F
elementos reguladores, 438F, 440
isoladores, 453
regiões de controle de lócus (LCRs), **450–452**, 452F
TATA box *ver* TATA box
formação de alça no DNA, 438F
procariotos *vs.*, 434–436
promotores, 339, 438F, 440
ver também Elementos promotores
proteínas reguladoras de genes *ver em* Proteínas reguladoras de genes
sinergia transcricional, 444–445, 444F, 464–465
ver também Motivos de ligação ao DNA; Fatores de transcrição, geral (TFII)
evolução, 439–440
herdabilidade, 458, 458F
procariotos (bactérias), 436FF, 438–439, 439F, 439T, 477–478
eucariotos *vs.*, 434–436
operon lac *ver* Operon lac (*Escherichia coli*)
proteínas reguladoras *ver* Proteínas reguladoras de genes
repressor(es) *ver* Proteínas repressoras
ver também RNA-polimerase(s)
Conversão gênica, 314–315
em perda de genes supressores de tumor, 1236F
junções Holliday, 311, 314–315
reparo de pareamento incorreto, 315F
Conversas cruzadas, prevenção entre MAP-cinases, **930**
Cooperatividade (interações proteicas)
forquilha de replicação de DNA, 273, 274F, 276
hemoglobina, 256, 256F
transições alostéricas, 173–174, 173F, 174F, 175F
ver também Regulação alostérica
Cor dos olhos, como característica poligênica, 563
Corante, histoquímica, 554–555, 579, 585F

Corante de proteína, Azul de Coomassie, 517, 518F
Corantes Alexa, 587, 587F
Corantes de ligação ao DNA, análise do ciclo celular, 1059
Cordados, 1370
Cordina, 940, 1336
Coronavírus, 1496F
Corpo polar, 1289, 1289F
  do fuso, 993
Corpos de Cajal, 241, 241F, 363–364, 365F, 594F
Corpos de processamento (corpos P), 494, 495F
Corpos multivesiculares, **795–797**, 795F, 796F, 797F
Corpúsculo de Barr, inativação do X, 473
Correção de erro, DNA-polimerase, 269–270, 270FF
Correção de pareamento incorreto, 277–279, 277F, 315–316, 315F
  conversão gênica, 315F
Correção exonucleolítica, 269–270, 270F
Correção por DNA-polimerase, 269–270, 270FF
  ver também Reparo do pareamento incorreto
Correceptor, célula T
  CD4, **1580–1581**, 1580T, 1581F
    ver também Células T auxiliares (TH)
  CD8, **1580–1581**, 1580T, 1581F
    ver também Células T citotóxicas (Tc)
  desenvolvimento da(s) célula(s) T, 1586, 1587, 1587F
  estrutura, 1599F
Correceptor, Células T, 1580–1581, 1580T, 1581F
Correpressor(es), 445, 447F, **457–458**, **458–459**, 458F
  ver também Cooperatividade (interações proteicas)
Córtex cerebral, 1386F
  Homúnculo, 1391
  migração neuronal, 1385F
  região somatossensorial, 1395F
Córtex rico em actina, 1036F, 1037
Córtex visual, coluna dominante ocular, 1395F
Corticotropina (ACTH), 803F
Cortisol, 463, 889, 889F
  receptor, 891F
  regulação da expressão gênica, 463
CPI, expressão gênica de β-globina, 451F
CPSF (fator específico de clivagem e poliadenilação), 357–358, 357F
CRE (elemento de resposta ao AMP cíclico), 908
Creatina-fosfocinase, especialização de mioblastos, 464
CREB (proteína de ligação a CRE), 908, 908F
Crescimento, retardo, defeito no reparo do DNA, 295T
Crescimento celular, 1053
  controle, **1101–1112**
  crescimento celular coordenado e divisão, **1108–1110**, 1109F
  crescimento de organismo, **1108**
  crescimento de órgão, **1108**
  dependência de ancoragem, 1175–1176, 1175F
  ver também Ciclo celular; Divisão celular; Proliferação celular
Crescimento de organismo
  controle total de massa celular, 1102, **1111–1112**
  crescimento celular e, 1102, **1108**
  fatores inibidores, 1110, 1111F
  ver também Desenvolvimento; Multicelularidade
Crick, Francis H.C., 196
Criptas, do intestino delgado, 1436, 1436F, 1441F
Criptas de Langerhans, 1525–1526F
Criptidinas, 1437
Criptocromo, 961
Cristalização, proteínas, 527–528
Cristalografia
  elétrons, 611–612
  raios X *ver* Cristalografia por raios X
Cristalografia eletrônica, 611–612
Cristalografia por raios X
  aspectos históricos, 530T
  determinação da estrutura de proteína, 139, **526–529**, 527–528F
  DNA, 195–196, 197
  estrutura da IgG, 1516F
  mapa de densidade eletrônica, 527–528
Cromátide(s)-irmã(s),243FF, 1054
  meiótica, 1273
  mitótica, 243, 243FF
    coesão, 1054, **1070–1071**, 1070F
    fuso anexo, **1083–1085**, 1084F
    resolução, 1075
    separação, 1075, **1087**, 1087F, 1088, 1088F, **1089–1090**, 1089F
Cromátides *ver* Cromátide(s)-irmã(s)
Cromatina "colar de contas", 211, 211F, 212F
Cromatina, 202, 365F
  condensação, 243, 286, 288, 1070
    ver também Condensação de cromossomos; Heterocromatina
  empacotamento, 243, 244F
  estrutura *ver* Estrutura da cromatina
  eucromatina, 220
  fatores de associação da cromatina (CAFs), 290
  heterocromatina *ver* Heterocromatina
  imunoprecipitação, 431–432, 432F
  remodelamento *ver* Remodelamento da cromatina
  sítio nuclear, 239–240, 239F, 240F, 241F
  ver também Estrutura de cromossomos; Genoma(s); Nucleossomo(s)
Cromatografia, **512–514**, 513F, 534F
  ver também Purificação de proteína; *tipos específicos*
Cromatografia de afinidade, 512, 514F
  interações proteína-proteína, 523
  marcação de proteínas, 515F
  matrizes, 534F
  princípios, 428–429
  proteínas que ligam DNA, 428–429, 429F
  purificação/separação de proteínas, 428–429, 429F, **513–514**, 515F
    ver também Alvos proteicos
Cromatografia de afinidade por metal, 514
Cromatografia de filtração em gel, 512, 514F
  matrizes, 534F
  purificação de proteína, 535F
Cromatografia de troca iônica, 512, 514F
  matrizes, 534F
  purificação de proteína, 535F
Cromatografia hidrofóbica, 512
Cromatografia líquida, 522
Cromatografia líquida de alta performance (HPLC), 513
Cromocentro, cromossomos politênicos de *Drosophila, 237F*
Cromocinese, 1077
Cromômeros, 234, 235F
Cromoplasto(s), desenvolvimento, 699F
Cromossomo Filadélfia, na leucemia mieloide crônica, 1208, 1208F, 1261, 1261F
Cromossomo gigante *ver* Cromossomo(s) gigantes (politênicos)
Cromossomo X, 202, 473, 1271, 1284
  inativação *ver* Inativação do X
  pareamento meiótico, 1275
Cromossomo Y, 202, 473, 1271, 1284
  gene *Sry*, 1284
  pareamento meiótico, 1275
Cromossomo(s), 195–196, **202–205**, 554F
  aberrante *ver* Anormalidades cromossômicas
  análise, 195F, 196, 196F, 202–203, 202–203F, 202–203FF, 237FF, 285F, 535F, 590F
    ver também técnicas específicas
  autossomos, 1271, 1284F
  bacteriano, 202, 282, 283F, 1491F
  conteúdo genético, 204–205, 204F
    ver também Genoma(s)
  cromossomo(s) plumoso(s), 234, 234F, 1288
  cromossomo(s) politênico(s) *ver* Cromossomo(s) gigantes (politênicos)
  cromossomos sexuais *ver* Cromossomos sexuais
  diferenças entre espécies, 204–205, 205F
  empacotamento, 1069
    cromossomo pós-mitótico, 1090
    DNA, **202–219, 202–219**
    ver também Cromatina; Condensação de cromossomos; Estrutura de cromossomo(s)
  estrutura *ver* Estrutura de cromossomos
  evolução, 207, 208F
  funções biológicas, 204
  homólogos *ver* Cromossomos homólogos (homólogos)
  humano, 202, 202–203F, 202–203FF
    camundongo *vs*., 249–250, 249F
    cromossomo 22, 205F, 206T
    evolução, 207, 208F
    evolução do cromossomo 3, 208F
    organização de genes, 205F
    origem da replicação, 287–288
    taxa de replicação, 283
    translocação do cromossomo 12, 204F
    ver também Genoma humano
  mitóticos *ver* Cromossomo(s) mitótico(s)
  pesquisa histórica, 195–196, 196
  puffs, **220–222**, 239, 239F
    ver também Cromossomo(s) politênico(s)
  rearranjos, 1231
    ver também Anormalidades cromossômicas; *rearranjos específicos*
  replicação *ver* Replicação de cromossomo
  ver também Citogenética; Cariótipo; *cromossomos individuais*
Cromossomo(s) da interfase, 208F, 209
  alças, 234–236, 235F
  cromossomos plumosos, 234, 234F, 235F, 1288
  modificação das histonas, 238, 238F
  organização da cromatina, 236F, 243
    ver também Heterocromatina
  politenia, **236–238**
  ver também Ciclo celular; Estrutura de cromossomos; Cromossomo(s) politênicos
Cromossomo(s) mitótico(s), 208–209, 208F, 209, **243**, 243F, 244F, **245**
  condensação, 243, 244F, 1075F
    M-Cdk e, 1071
    condensação de cromatina, 1070
    função da condensina, **1075**
  cromátides-irmãs, 243, 243FF
    ligação ao fuso, **1082–1083**
    mecanismo de biorientação, **1083–1085**, 1084F
    separação, **1087**, 1087F, 1088, 1088F
  duplicação do centrossomo, **1078**
  ligação ao fuso, **1082–1083**, 1084F
    cromossomos não-ligados, **1088**
    forças agindo sobre, **1085–1087**, 1085F, 1086F, 1089
    mecanismo de biorientação, **1083–1085**, 1084F
    ver também Cinetocoro
  metáfase, 243, 243F
  montagem do fuso bipolar, **1081–1082**
  separação/segregação, 865, 865F, **1087**, 1087F, **1089–1090**
Cromossomo(s) sexual(is), 202, 473, 554F
  determinação do sexo e, 1271, 1284F
  pareamento meiótico, 1275
  ver também Cromossomo X; Cromossomo Y
Cromossomos artificiais, vetores de clonagem de DNA, 541, 542F
Cromossomos artificiais de bactérias (BACs), 541, 552
Cromossomos artificiais de levedura (YACs), 541, 542F
Cromossomos gigantes (politênicos), **236–238**
  Drosophila melanogaster, 38, 38F, 236–237, 236–238, 237FF
    deconvolução da imagem, 590F
    expressão gênica, 220–222
    ligação ao isolador, 413, 453F
    microscopia, 590F
    modificação de histonas, 238F
    ver também Estrutura de cromossomo
  puffs cromossômicos, 220–222
  síntese de RNA, 239F
  visualização, 236
  ver também Puffs cromossômicos
Cromossomos homólogos (homólogos), 202, 1090, 1271
  centros axiais, 1275
  pareamento meiótico, 1091–1092, 1271, 1273–1274, **1274–1275**, 1274F, 1276F
    complexo do sinaptonema, 1274F, **1275–1276**, 1275F
    cromossomos sexuais, 1275
    diversidade genética, 1271, **1279–1280**, 1279F
    filamentos transversos, 1276, 1277F
    formação bivalente, 1274, 1274F, 1276F
    não-disjunção, 1236F, 1278–1279
    quebra da fita dupla, 1275, 1280
    regiões de pareamento, 1274
    sinapse, 1275, 1276F
    telômeros e, 1274, 1274F
    trocas morfológicas, 1275
    ver também Recombinação homóloga (*crossing-over*)
  segregação meiótica, **1276–1278**, 1277F
    não-disjunção, 1236F, 1278–1279
Cromossomos plumosos, **234**, 234F, 235F, 1288
Crossing-over cromossomal *ver* Recombinação homóloga (*Crossing-over*)
Crossing-over ver Recombinação homóloga (*Crossing-over*)
CstF (fator F de estimulação à clivagem), 357–358, 357F, 482–483
CTLA4, ligação à B7, 1591–1592
Cultura de células, **501–517**
  aspectos históricos, 504

bacterianas, produção de vetores de clonagem, 540, 541F
células em cultura, 504F
culturas primárias, 504
culturas secundárias, 504
definição, 502–504
dependência de ancoragem, 1175–1176, 1175F
mamíferos
análise do ciclo celular, **1059**, 1059F
"imortalizada", 1059
senescênia replicativa, 1059, 1107
plantas, 504–505, 568
segregação de tecido em, 1140–1141, 1142F
ver também Linhagem celular; Cultura de tecidos
Cultura de tecidos, **502–504**
aspectos históricos, 504
enxertos, 504
medula espinal, 504
necessidades, 502–504
ver também Cultura de células
Cultura primária, 504
Cultura secundária, 504
Currais, divisão de membrana, 646–647, 648F
Curvaturas do DNA
interação nucleossomo-DNA, 214F
proteínas, formação de enhanceossomo, 446, 447F
ver também Proteína de ligação ao DNA
CXCR4, 1375, 1504–1506, 1504–1505F

D

Dachsous, polaridade de células planares, 1158
Dálton, definição, 45
Dano ao DNA, 296, 296F, 297F
agentes causadores *ver* Agentes danificadores do DNA
alterações espontâneas, 296, 296F
ver também tipos específicos
alterações volumosas, 298
apoptose, 1106, 1117
câncer e, 1216–1217, **1225**, 1246
ver também Carcinógenos; Mutação(ões)
ciclo celular e, 303–304
pontos de verificação, 303, **1105–1107**, 1106F
falha no reparo, 1106
ver também Câncer; Mutação(ões)
ligações cruzadas, 296, 297F
reparo *ver* Reparo de DNA
replicação, 296, 298F
ver também Mutação(ões)
vias de sinalização ATM/ATR, 1105
ver também Reparo de DNA
Dano oxidativo, DNA, 296, 296F
Data de nascimento, neuronal, 1385–1386, 1386F
Decapping, 492
Decorina, 1181–1182, 1182F, 1184T
Defeitos do reparo de DNA, 277, 295–296, 295T, 304, 1106
ver também Câncer; *defeitos específicos*
Defensinas, 1525–1526, 1533
Defesas do hospedeiro, 1501–1502
evasão por patógenos, **1502–1504**
variação antigênica, 1519–1520
superfícies epiteliais, 1525–1526
Defesas do intestino, contra patógenos, 1525–1526F
Deficiência na adesão de leucócitos, 1174
Degradação de mRNA independente de desadenilação, 492, 492F
Degradação de mRNA mediada por desadenilação, 492,492F
Degradação mRNA mediada por ausência de sentido, **385–387**, 386F
Degradação N-terminal, 395–396
Deleção, cromossomal *ver* Deleção de cromossomo
Deleção clonal, 1548, 1548F
ver também Tolerância imunológica
Deleção cromossomal
evolução do genoma, 246–247
importância no câncer, 235F, 1234–1236, 1236F
Delta G (ΔG) *ver* Variações na energia livre Delta G (ΔG)
Delta G (ΔG) *ver* Energia livre troca Delta G (ΔG)
Dendrito(s), 1047, 1050F, 1386–1387, 1387F
computação neuronal, 688F
neurossinalização, 675
orientação de microtúbulos, 1049
Dependência de ancoragem, **1175–1176**, 117F
Depressão de longo termo (LTD), controle sináptico, 690–691
Depurinação, 296, 297–298, 297F, 298F, 299F
Derme, 1418, 1418F, 1477
Desaminação, 296, 297F, 301F
mecanismo de mutagênese, 298F, 300–301
5-metilcitosina, 470
papel da metilação do DNA, 300–301F
produção de hipoxantina, 300, 301F
produção de inosina, 369, 369F, 484, 484F
Desaminase induzida por ativação (AID), 1567F, 1568
Desensibilização *ver* Adaptação
Desenvolvimento, **1305–1320**
C. elegans ver Desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*
camadas germinativas e gastrulação, **1307**, 1307F
camundongo *ver* Desenvolvimento do camundongo
clivagem do óvulo, 1307
conservação evolutiva entre animais, 1306F, 1307
controles posicionais, 1111
destino celular, **1311–1312**
determinação celular, **1311–1312**, 1312F
divisão celular assimétrica, 1099, 1289–1290, 1289F, **1313–1315**, 1314F
DNA regulador define o programa de, **1309**, 1309–1310, 1309F
dobramento epitelial, 1142, 1143F
Drosophila melanogaster ver Desenvolvimento de *Drosophila*
embriologia descritiva, 1310
embriologia experimental, 1310, 1310F
genético *ver* Desenvolvimento genético e regulação gênica
indução sequencial, **1319**, 1320F
inibição lateral, 1314, 1315F
interações e sinais indutivos, 1310, 1313, 1313F, 1316T
junção tipo fenda, 1161
marcador de tempo, 1319–1320, 1320F
massa celular total, 1111
memória celular, 1305, 1312, 1315
migração celular, 1140, 1140F
mitose na ausência de citocinese, **1099–1100**
morfogenes e gradientes, 1316–1317, 1318–1319F
organismos-modelo, 1311
plantas *ver* Desenvolvimento vegetal e crescimento
quatro processos essenciais, 1305, 1306F
rastreamento de linhagens celulares, 1310–1311, 1311F
sistema nervoso, **1383–1397**
ver também Desenvolvimento neural
transição epitelial-mesenquimal, 1141
valores posicionais, **1312–1313**, 1312F, 1313F
vertebrados *ver* Desenvolvimento de vertebrados
Xenopus laevis ver Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
ver também Embrião/embriogênese; Sinalização molecular/via(s); processos e organismos individuais
Desenvolvimento das gônadas
gene *Sry* e desenvolvimento de teste, **1283–1285**, 1286F
migração PGC, **1283**, 1283F, 1285
Desenvolvimento de assimetria esquerda-direita, **1376–1377**
Desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*, **1321–1328**
célula ABa, 1324, 1324F, 1324FF
célula E, 1324, 1324FF
célula EMS, 1324, 1324F, 1324FF
célulasABp, 1324, 1324F, 1324FF
células fundadoras, 1322
células germinativas, 1322–1323, 1323
células MS, 1324, 1324FF
células P2, 1324, 1324FF
destino celular, 1322
determinação do sexo, 1282F, 1286
divisão celular assimétrica, **1323–1324**, 1323F
formação de padrão celular, **1324**
genes, 1323
efeito maternal, **1323–1324**
genes heterocrônicos e momento, 1326–1327, 1326F
mom (*mais mesoderma*), 1325
pop (*abundância de faringe*), 1325
ver também genes individuais
grânulos P, 1323–1324, 1323F
interações indutivas entre células, 1324, 1324FF
intestino, 1322F
linhagem celular, 1321, **1322**, 1322F, 1324
mecanismo de polaridade epitelial ápico-basal, 1155–1156
morte celular, **1327–1328**, 1327F
óvulo, 1323
pop-1, 1325
precisão, 1322
proteína de regulação gênica, 1400T
proteína Vasa, 1324
sinal de polarização, 1323
via de sinalização Wnt, 1324, 1324F, 1325
Desenvolvimento de *Drosophila*, **1328–1341**
análise do ciclo celular, 1058
celularização, 1099, 1100F
chave para mecanismos de desenvolvimento em outros animais, 38
controle genético/regulação gênica, **408–409**, **447–450**, 448F, 449F, 449FF
Even-skipped ver Gene *Eve* (*Even-skipped*)
gene *Ey, 466, 466F*
genes de segmentação *ver* Genes de segmentação de *Drosophila melanogaster*
genes homeóticos *ver* Genes homeóticos de *Drosophila melanogaster*
papel de Ras no desenvolvimento dos olhos, 927, 927F
ver também genes específicos
determinação do sexo, 481–482, 481F, 482F
discos imaginais, 1331
ver também Discos imaginais
embrião jovem e gênese do plano corporal, 1328–1341
blastoderma, 1329–1331, 1329–1330FF
determinação do sexo, 1286
especificação dos eixos do corpo, 1332F, 1333–1334, 1334F
formação do sincício, 1099, 1100F
gastrulação e formação do mesoderma, 1335, 1336F, 1340
genes da polaridade do óvulo *ver* Genes da polaridade do óvulo (*Drosophila*)
genes de segmentação *ver* Genes de segmentação de *Drosophila melanogaster*
gradientes de morfógeno, 1333–1334, 1334FF, 1335F, 1335FF, 1336
localização de Mrna, 487, 488F, 1333–1334, 1334F
mapa de destinos, 1331F, 1332F
oócito, 1333F
óvulo, 1329–1330, 1331F
padrão dorsoventral, 1334–1337, 1335F, 1335FF
polaridade de célula planar, 1157, 1157F
regulação hierárquica, genes, 1338F
relação com plano do corpo de vertebrados *vs.*, 1336F
sinais de polarização do óvulo fornecidos pelo folículo, 1333F
sinopse, 1329F
transição de sincicial para celular, 1329–1331
formação da oogônia, 1290, 1290F
modelo genético, 1329
organogênese e padronização dos órgãos acessórios, 1347–1362, 1347–1363
compartimentos, **1352–1355**, 1352FF, 1353F
desenvolvimento do olho, 466, 466F
discos imaginais, **1349–1351**, 1350F, 1356–1357
especificados individualmente pelos genes seletores homeóticos, 1351
fronteiras de compartimentos como centros de sinaliza-ção, 1353–1335, 1353F
regeneração intercalar, **1354**, 1354F
regulação de tamanho, 1353–1354
padrão ântero-posterior, **1341–1347**
ver também Genes homeóticos de *Drosophila melanogaster*
parassegmentos *vs.* segmentos, 1329–1330, 1329–1330F
técnicas genéticas, 1329
triagem genética para padronização inicial, 1332
Desenvolvimento de mamíferos, **1378–1383**
assimetria esquerda-direita, 1376–1377, 1376F
células-tronco embrionárias (células ES), 1380–1381, 1381F

estágios iniciais e membranas extra-embrionárias, 1379–1380, 1379F
morfogênese de ramificações (do pulmão), 1381–1382, 1382F
propriedades de regulação do embrião jovem, 1380
ver também Desenvolvimento de camundongo, *espécies individuais*
Desenvolvimento de olhos, controle genético, 466, 466F
ver também genes específicos
Desenvolvimento de *spisula*, análise do ciclo celular, 1058
Desenvolvimento de vertebrados, **1363–1378**
caderinas e, 1139–1140, 1140–1141, 1140F, 1141F
ver também Caderina(s)
camundongo *ver* Desenvolvimento de camundongo
crista neural, 1140, 1140F
formação do tubo neural, 1140, 1141F
movimentos celulares e plano do corpo, 1363–1378
adesão celular e separação, 1369–1370, 1370F
assimetria do óvulo em anfíbios, 1364, 1364F
assimetria esquerda-direita, **1376–1377**, 1376F
blástula, 1363F, 1365, 1366F
células migratórias, 1373–1375
células pigmentadas, 1375, 1376F
clivagem, 1365, 1365F
crista neural, **1374**, 1374F
extensão convergente, **1368–1369**, 1369F
formação de somitos, **1371–1372**, 1372F
gastrulação, **1365–1369**, 1366F, 1367F
migração do mioblasto, 1373–1374, 1374F
neurulação, 1370–1371, 1370F, 1372F
notocorda, **1370–1371**
transição da blástula média, 1365
ver também em Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
Xenopus laevis ver Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
ver também espécies e processos individuais
Desenvolvimento de *Xenopus laevis*, 1363F
efeito no bloqueio da sinalização Notch, 1359–1360F
embrião
análise do ciclo celular, 1057–1058, 1057F
clivagem, 1058F
gastrulação, **1365–1369**, 1366F, 1367F, 1368F, 1369F
alteração no empacotamento celular (extensão convergente), 1368–1369, 1369F
controle de sinais, 1367
movimento celular, **1365–1367**, 1365F, 1366F, 1367F
movimento celular durante o desenvolvimento, 1363
óvulo, 1364F
crescimento, 1058F
dinâmica de microtúbulos durante a meiose, 1080, 1081F
fertilização, 1057
sistemas livres de célula, 1058, 1058F
Desenvolvimento do camundongo, **1378–1383**
células-tronco embrionárias (células ES), **1380–1381**, 1381F
embrião, 1379, 1379F, **1380**
estágios iniciais e membranas extra-embionárias, 1379
morfogênese da ramificação (do pulmão), 1381–1382, 1382F
óvulo, 1379
Desenvolvimento do eixo ântero-posterior
Drosophila, **1331–1334**, 1331F, 1332F, 1334F
função dos genes seletores homeóticos, **1341–1347**, 1342F, 1343F
vertebrados
embrião de anfíbio, 1366
função dos genes seletores homeóticos, **1344–1347**, 1346F, 1347F
Desenvolvimento genético e regulação gênica, 450–451, 451F, 1308, 1309
controle combinatório de genes, 464–465, 465F
diferenciação celular, 464–465, 465F
DNA regulador define o programa de, **1309**, 1309–1310, 1309F
Drosophila ver em Desenvolvimento de *Drosophila*
formação de órgão, 465–466, 466F
genes especiais necessários, 1308
prospecção genética, 1308
sinergia transcricional, 464
ver também Diferenciação celular; *genes específicos*
Desenvolvimento neural, **1383–1397**
caderinas e, 1140–1141, 1140F, 1141F
cones de crescimento, 1049, 1049F, **1386–1388**, 1386F, 1447F
orientação, 1140, 1387–1388, 1388F, 1393F
crista neural *ver* Migração das células da crista neural
data de nascimento de neurônios e diversificação, 1385–1386, 1386F
distinção dendrito-axônio, 1, 1383, 1386–1387, 1387F
efeitos da experiência, 1395–1396, 1395F, 1396–1397
eliminação e remodelamento da sinapse, 1393–1395, 1394F, 1395F
especificidade neural, **1391–1394**
fases, 1383, 1384F
fatores neurotróficos, 1389–1390, 1390F
formação da sinapse, 1149F, 1393–1394
CAMs, **1147–1148**
proteína de sustentação, **1148–1149**, 1148F
formação do mapa neural, **1391–1392**, 1391FF, 1392F, 1393F
remodelamento dependente de atividade, 1393–1395
integrinas e, 1177
junção tipo fenda, 1161
migração neural, 1385F, 1370–1371, 1370F
ver também Migração das células da crista neural
morte de neurônios, 1389–1390
neurito(s), 1390F
neuroblastos, 1359–1360
neurogênese, 1359–1360, 1359–1360F, **1383–1385**
neurulação, 1370–1371, 1370F, 1371
origens embrionárias iniciais, 1383
cérebro e medula espinal (CNS), 1367F
crista neural, 1374
embrião de galinha, 1384F
sistema nervoso periférico (SNP), 1384
ver também Migração das células da crista neural
placa neural, 1367F, **1370–1371**, 1370F
tubo neural, 1370, 1370F, 1384, 1385F
Desenvolvimento vegetal e crescimento, **1398–1415**, **1401F**
Arabidopsis ver Arabidopsis thaliana
crescimento de módulos vegetais a partir do primórdio, **1407–1408**
desenvolvimento da flor, **1413–1414**, 1413F, 1414F
determinação da forma e pela divisão celular orientada, **1406**
embriogênese, 1400, 1401F, 1402F
formação da parede celular *ver* Parede celular vegetal
influências ambientais, 1403
meristemas *ver* Meristema(s)
microtúbulos, **1200–1202**, 1201F
mutações reguladoras no milho, **1410–1412**, 1411FF
óvulo (zigoto), divisão assimétrica, 1400
padrões repetitivos, 1408F
pressão de turgor, 1197, 1199
reprodução sexual, células haploides, 1270
sequencial, pelos meristemas, **1403**
sinais hormonais, de longo alcance, **957**, **1403**, **1406**, 1406F
sinais para o desenvolvimento da plântula, 1399F, **1401**, 1403
sinalização celular, **1409–1410**
Desfosforilação, 176, 176F
ver também Proteína-fosfatase(s)
Desintegrinas, 1193
Deslizamento do nucleossomo, 215–216, 215F
Deslocamento celular, 1006, 1008, **1036**, 1036F
atividades envolvidas, 1036
borda anterior, 1040F
ver também Motilidade celular/movimento
Deslocamento de, proteínas *ver* Retrotranslocação, proteínas malenoveladas
Desmina, 985T, 987
Desmocolina, 1136, 1138T
Desmogelina, 1136, 1138T
Desmossomo(s), 1134, 1134F, 1135T, **1143–1144**, 1144F, 1177T
filamentos de queratina, 986
Desmotúbulo, 1162
Desnaturação, proteína, 130
Desoxirribose, 116F, 331–332F
Detergente(s), 517, 517F, 638F, 639F
iônico *vs.* não-iônico, 636
solubilidade de proteínas de membrana, **636–640**
ver também detergentes específicos
Determinação celular, 1311–1312, 1312F
controle combinatório, 465–466
Determinação do peso molecular, técnicas de centrifugação, 522–523
Determinação do sexo, **1282–1286**
desenvolvimento das gônadas, 1283, **1283–1285**, 1283F, 1286F
Drosophila melanogaster, 481–482, 481F, 482F
variação entre espécies, 1286
ver também Células germinativas primordiais (PGCs)
Determinação *ver* Determinação celular
Determinantes antigênicos (epítopos), **1545**, 1558–1559F
Determinantes do destino celular, divisão celular assimétrica, 1099
Diabete melito tipo 1, 1549
Diacilglicerol, 910
Diacinese, 1275, 1276
Diapedese *ver* Linfócito(s), recirculação
Diarreia
disseminação da infecção, 1487–1488
disseminação de *Salmonella enterica*, 1518
E. coli enteropatogênica, 1503–1504
sanguinolenta, em disenteria, 1491
Dictyostelium, 16F
localização de miosina I e II em amebas em movimento, 1041, 1041F
Quimiotaxia, 1045
Didinium, 28F
Diferenças dos sexos, regulação da meiose, **1280–1281**
Diferenças nas espécies
cromossomos, 204–205, 205F
determinação do sexo, 1286
reprodução sexual, 1282, **1285–1286**
Xenopus laevis, 38–39
Diferenciação celular, 411, **454–477**
câncer e, **1215–1216**
constância do genoma, 411–412, 413F
diferenças de proteínas, 412
diferentes respostas a sinais extracelulares, 415, 464
especialização, 412
padrões de expressão gênica, 412, 464–465, 464F, 465F
ver também Controle combinatório
processos comuns, 412
rearranjos de DNA, variação de fase bacteriana, 454–455, 454–455f
término, 1103
ver também Genética do desenvolvimento; Regulação da expressão gênica
Diferenciação celular, função da proteína Notch, 1362
Diferenciação de células *ver* Diferenciação celular
Diferenciação terminal, 1103, 1420
Difosfato de adenosina *ver* ADP
Difração óptica, 581
Difusão, natureza randômica, 74, 75F
Difusão facilitada, 653
Difusão lateral (proteína de membrana), 643, 646F
Difusão rotacional, proteínas de membrana, 642
Digestão, 88, 1436
ver também Lisossomo(s)
Diidrofolato-redutase, tratamento de câncer, 1260
Diidrouridina, modificação do Trna, 368F, 369F
Diidroxiacetona, 112F
Dimetilbenzoantraceno (DMBA), 1226, 1238
Dineína ciliar (do axonema), 1031–1032, 1032F–I033F
hereditariedade defeituosa, 1032–1033
Dineína(s), **1014–1015**, 1015F, 1018, 1091F
axonema, 1015
batimento ciliar e assimetria esquerda-direita, 1377
ciclo mecanoquímico, 1019
citoplasmática, 1014
explosão de força, 1019, 1019F
força de geração, 1018
fuso mitótico, 1077, 1077F, 1079
hidrólise de ATP, 1019
ligação a organelas delimitadas por membrana, 1022, 1022F
região de ligação, 1019
Dineínas citoplasmáticas, 1014
Dineínas do axonema, 1015, 1032–1033, 1032–1033F
Dinitrofenil, 1545, 1545F
2, 4–Dinitrofenol, 836

Dióxido de carbono (CO_2)
fixação *ver* Fixação de carbono
produção metabólica, 98–99
ver também Ciclo do ácido cítrico
Diplóteno, 1275–1276, 1280, 1288
Dipolos, ligações covalentes, 50
Direção das vias de migração celular, **1045**, 1140
neuronal, 1140, 1147, 1177, 1188F, **1385–1389**
Direcionamento por contato, 1140, 1387–1388
Disceratose congênita, 294
Disco imaginal da asa, 1356F
Disco Z, 1026, 1027F
Discos imaginais, **1349–1351**
controle do crescimento, 1353–1354
disco imaginal da asa, 1356F
Disenteria epidêmica, 1491
Dispositivos de ativação-desativação (*microchips*), proteína-cinase, 177–178, 177F, 179F
Dissacarídeos, 56, 57F, 113F
Distrofia muscular, 1005, 1169, 1173–1174, 1466
Distrofina, 1466
Divergência (evolutiva)
análise da taxa de mutação, 264
filogenética, 247, 247F, 248F
ver também Duplicações gênicas
Divergências nas espécies, taxa de mutação, 264
"*Diverse animalcules*", Leeuwenhoek, Anton van, 501F
Diversidade genética, função da meiose, **1271**, **1279–1280**, 1279F
Diversificação combinatória, cadeias de anticorpo, 1563–1564
Diversificação juncional, junção de segmentos de genes de anticorpos, 1564–1565
Divisão assimétrica, oócito, 1289, 1289F
Divisão celular, 1053, 1055F
Assimétrica, **1099**, 1099F
desenvolvimento da planta, 1400
embrião de *C. elegans*, **1323–1324**, 1323F
oócitos, 1289–1290, 1289F
atraso, 1103
balanço de morte celular, 1102
célula(s) de planta, 1195
célula-tronco, 1425
controle, **1101–1112**
dependente da densidade (inibição por contato), **1110**, 1110F
mitógenos *ver* Mitógeno(s)
resposta ao dano de DNA, **1105–1107**
ver também fatores específicos
controle da massa celular total, **1111–1112**
crescimento coordenado e divisão, **1108–1110**, 1109F
função do citoesqueleto, 966–967, 967F
inibição dependente da densidade (inibição por contato), 1110, 1233–1234
limite, 1059, **1107**
dependente da densidade, 1110, 1233–1234
ver também Senescência celular replicativa
número celular e, 1102
plano de, **1095–1097**
ver também Ciclo celular; Crescimento celular; Proliferação celular; Citocinese; Meiose; Mitose
Divisão celular assimétrica, **1099**, 1099F
células-tronco, 1421, 1421f
oócitos, 1289–1290, 1289F
DMBA (dimetilbenzoantraceno), como carcinógeno químico mutagênico, 1226, 1238
DNA (ácido desoxirribonucleico), 3,3F
amplificação via PCR *ver* Reação em cadeia da polimerase (PCR)
análise, **532–553**
catenação, 1071
clonagem *ver* Clonagem de DNA
codificação da informação, 199–200, 329, 330F, 331
como estoque de informação universal, **2**, 297, 408
do DNA para RNA para proteína, 331,331F
relacionado às proteínas, **199–200**, 199F
ver também Sequência de DNA; Código genético; Genoma(s)
compactação, 210–211
complementar *ver* cDNA
cromatografia, proteínas que ligam DNA, 428–429, 429F
curvaturas do DNA
danos *ver* Danos ao DNA
desenrolamento
replicação, 273, 273F
transcrição, 333–334
empacotamento, **202–219**, **202–219**
compactação, 210–211
empacotamento de cromatina, 243, 244F
ver também Cromatina; Nucleossomo
ver também Cromossomo(s); Estrutura do cromossomo
estabilidade térmica, 296
estrutura *ver* Estrutura de DNA
fingerprinting, 546, 547F
hibridização *ver* Hibridização do DNA
interações com proteínas *ver* Interações DNA-proteína
ligante, 211
locação, 200–201, 201F
ver também Núcleo
macromolécula da célula, 62F
manipulação *ver* Tecnologia do DNA recombinante
manutenção, **263–265**
falhas, 263, 265, 1212
ver também Câncer; Dano no DNA; Mutações na evolução do genoma, 246–247
ver também Reparo de DNA
marcação, 534
não-codificante *ver* DNA não-codificante
pesquisa histórica, 195–196, 195–197, 329
elucidação da estrutura, 195–196, 196, 197, 329
experimentos com *Streptococcus pneumoniae*, 196F, 198F
identificação como material genético, 195–196, 196F, 197, 198F
polaridade, 3F
polimerização pelo molde, **3–4**, 3F
reação de passagem da hélice, DNA topoisomerase II, 281F
recombinação *ver* Recombinação
regulação *ver* DNA de regulação
reparo *ver* Reparo de DNA
repetitivo *ver* DNA repetitivo
replicação *ver* Replicação de DNA
síntese química, 548
síntese *ver* Síntese do DNA
telomérico, 210
ver também Telômero(s)
ver também entradas do início do DNA
DNA complementar *ver* cDNA
DNA de fita simples, efeito de SSBs, 273,274F
DNA de ligação, 211
"DNA egoísta" definição, 317
DNA *fingerprinting*, 546, 547F
DNA lixo, 204, 860
ver também DNA não-codificante
DNA microssatélite, hiperváriavel (VNTRs), 547F
DNA mitocondrial *ver* Genoma mitocondrial
DNA não-codificado, 31, 204
elementos repetitivos *ver* DNA repetitivo
genoma rico em, 331
íntrons *ver* Íntron(s)
mitocôndria a partir de, 860
DNA regulador, 7–8, 206
especialidade de eucariotos, 31–32
organização modular do gene *eve*, 1340F
padrão do embrião de *Drosophila*, 1332
programação do desenvolvimento, 1309, 1309F
DNA repetitivo
genoma humano, 207F, 323F
marcadores genéticos, VNTRs, 547F
multiplicação no genoma, 323F
recombinação induzida por repetições, 315F
repetições curtas em *tandem*, microssatélites hipervariáveis, 547F
RNA pol II CTD, 346–347
sequência centromérica, 210–211
sequências teloméricas, 210, 292
ver também Transposon(s); *tipos específicos*
DNA superenrolado *ver* Superenrolamento
DNA-glicosilases, 297–298
mecanismo, 299F
reconhecimento de dano ao DNA, 300–301, 300F
DNA-helicase(s), 273, 274F
Defeitos, 295T
Ensaio, 273F
fatores de transcrição TFIIH, 340–341
inibição, proteína DnaC, 283F
mecanismo de ação, 273, 282, 283F
proteína DnaB, 283F
DNA-ligase(s)
clonagem de DNA, 540–541, 541F
mecanismo de reação, 273F
reparo de DNA, 295T, 302–303
síntese da fita retardada do DNA, 272
DNA-metilase(s) *ver* DNA-metiltransferase(s)
DNA-metiltransferase *de novo*, metilação de DNA, 467
DNA-metiltransferase(s), 284F, 467
DNA-polimerase(s), 266
alongamento da cadeia de 5'-3', 267, 268F
cinta deslizante, 274–275, 275–276, 275F, 276F
cooperatividade, 275–276
correção, 269–270, 270F
ver também Reparo de pareamento incorreto
dNTPs como substratos, 266, 267F, 268F
estrutura, 268F
eucariótica, 280, 281F, 293F, 294F, 295T
fidelidade, 269
mecanismo catalítico, 267F, 268F
movimento ao longo do DNA, 273–274
reparo de DNA, 302
RNA-polimerases vs., 334–336
T7 polimerase, 269
Termofílica, 544
ver também Reação em cadeia da polimerase (PCR)
viral, 1517
ver também enzimas específicas
DNA-primases, 272, 272F, 273, 276F
dnaG bacteriana, 283F
eucariótica, 280
mecanismo de ação, 282, 283F
DNAs repetidos *ver* DNA repetitivo
DNA-topoisomerases, 278
importância na replicação de DNA, **278–280**
ver também Replicação de DNA
integrase lambda *vs.*, 324
mecanismo de ação, 278–279, 279F, 280F
reação catalítica, 279F
topoisomerase I, 278, 279F
topoisomerase II, 278–279, 280F, 281F
dNTPs *ver* Trifosfatos de desoxirribonucleosídeo (dNTPs)
Dobramento da ligase, 406F
Dobramento de imunoglobulina, 140F
Dobramento de proteína, 126, **387–390**, 1498–1499
anormal, 391, 391F, 397–398
ver também Proteína de príon (PrP); Proteólise
calreticulina e calnexina, 738–739
chaperonas, **388–390**, 390F, **738–739**, 739F, 767
ver também Chaperonas
controle de qualidade, **390–391**, 391F, **767–768**
cotradutional, **387–388**, 388F
criação do sítio de ligação, 154F
energético, **130–131**
função ERp57, 739F
glóbulo maleável, 387–388, 388F
interações não-covalentes, 64, 64F, 126–127, 130F
limitações, 126
monitoramento, 738–739
papel da cadeia lateral de aminoácido, 130, 130F
papel da glicosilação ligada a *N*, 737F, 747F
papel da glicosil-transferase, 739, 739F
proteínas de príon, 1498–1499
ver também Proteína de príon (PrP)
proteínas mal-enoveladas, **739–741**, 740F
RE, **736**
reenovelamento, 131, 131F, 391, 391F
ver também Chaperonas
relação com síntese, 387
vias, 388F
Dobramento HDV, 406F
Dodecil sulfato de sódio *ver* SDS (dodecil sulfato de sódio)
Doença autoimune, 1539, 1549
Doença cardiovascular, 1500
Doença da inclusão celular (doença celular-I), 785–786
Doença da vaca louca *ver* Encefalopatia espongiforme bovina (BSE)
Doença de Alzheimer, agregados de proteínas, 397, 1001, 1020–1021
Doença de Chagas, 1509
Doença de Charcot-Marie-Tooth, 1048
Doença de Creutzfeld-Jacob (CJD), 397–398
Doença de Glanzmann, 1174
Doença de Hunter, 785
Doença de Huntington, 397, 560
Doença de Hurler, 785
Doença de Lou Gehrig, 987
Doença de Lyme, 1500
Doença do sono africana, 354

Doença dos legionários, 1508
Doenças de armazenamento lisossomal, **785–786**
Doenças de príon, 397–398, 397F
Doenças genéticas
mutação na integrina, 1172–1174
transplante nuclear somático, 508
Doenças mitocondriais, 866
Dogma central, 331
Dolicol, glicosilação de proteínas, 737, 738F, 747F
Dolicol fosfato, 115F
Dolly, a ovelha, 1287
Domínio conservado, cadeia pesada Ig, 1559F, 1560F
Domínio C-terminal (CTD), RNA-polimerase II, 341–342
Domínio de homologia com pleckstrina (PH), 933
Domínio de homologia com Src 2 (SH2) *ver* Domínio SH2
Domínio de homologia com Src 3 (SH3) *ver* Domínio SH3
Domínio de ligação à fosfotirosina (domínio PTB, sítio PTB), 898, 899F
Domínio de proteína Oct1Pou, 418T, 425F
Domínio de recrutamento de caspase (CARD), caspases, 1119
Domínio Kringle, 140F, 141
Domínio PDZ, proteína de sustentação, 1148
Domínio POU, estrutura, 425F
Domínio PTB (domínio de ligação à fosfotirosina), 898, 899F, 925
Domínio SH2 (domínio de homologia comSrc2)
estrutura, 131, 132–133FF, 136F, 141, 144F
fosforilação de proteínas, 175
interações superfície-cordão, 156, 156F
papel regulador, 178, 178F
proteínas de sinalização celular, 898, 899F, **924–926**, 925F, 936
família Src, 178, 178F
STATs, **937–938**, 938F
rastreamento evolutivo, 155, 155F
Domínio SH3 (domínio de homologia com Src 3), 898, 899F, 925, 936
estrutura, 136F, 141
papel regulador, 178, 178F
Domínio variável
cadeia de pesada IgG, 1559F, 1560F
cadeia leve de IgG, 1559F, 1560F
genes, **1563–1564**
Domínio(s) de interação, sinalização celular, 897
Domínios, do mundo vivo, 16, 16F
Domínios semelhantes a imunoglobulinas, 1560F, 1599
Dopamina, regulação da permebilidade por junções tipo fenda, 1162, 1162F
Doutrina celular, 579
Doutrina neural, 504
Drogas antimicrobianas, resistência *ver* Antibióticos, resistência
Drogas psicoativas, 686, 690
Drosophila melanogaster
anatomia do adulto, 1328–1330, 1328F
apoptose, 1125, 1126
citoesqueleto, 967, 967F, 983
como organismo-modelo, **37–38**
cromossomos, 237F
cromossomo 2, 330F
cromossomos sexuais, 481
politênico(s) *ver* Cromossomo(s) politênicos
relação cromossomo-gene, 37–38, 38F
desenvolvimento multicelular e, **447–450**, 448F, 449F, 449FF, 465–466, 466F
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento de *Drosophila*
expressão gênica
compensação de dose, 475
efeitos de posição, 220–222, 220–221F
proteínas de regulação gênica, 418T, 447, 448F, 1400T
puffs cromossômicos, 220–222
splicing alternativo, 479
genoma
elementos genéticos móveis, 318T, , 480, 556
informação codificada, 329, 330F
sequenciamento, 551, 552
tamanho, 18T
homeodomínio de proteínas, 429
ver também Proteínas de homeodomínio
homologias com vertebrados, 1306, 1306F, 1308
localização do Mrna, 1022–1023
mapas de interação de proteínas, 188
montagem de fotorreceptor, , 927F
mutantewing hair, 1157–1158, 1157F
oócito, 1022–1023
proteínas de regulação gênica, 1400T
relógio circadiano, **461–462**, 462F
RNA de interferência (RNAi), 571
Ducto torácico, 1549, 1549F
Duplicação cromossomal
ciclo celular na fase S, 1054
duplicação da cromatina, **1069–1070**
regulação da, 1067, 1068F
duplicação do centrossomo *vs.*, 1078
Duplicação de gene(s), **18**, 19F, 40F, 246
destino de duplicados, 255
divergência funcional, 40F, 246, 254–255
ver também Famílias de genes
em embaralhamento de módulos de proteínas, 140–141, 141F
evolução de proteína-cinases, 176
evolução de vertebrados, **38–39**
evolução do genoma, 253–254
genes de colágeno, 1185–1186
genoma de peixe-zebra, 255
genoma de *Xenopus*, 38–39, 39F
taxas, 255
ver também Famílias de genes; Redundância genética; Pseudogenes
Duplicação(ões) de DNA
cromossomos *ver* Duplicação de cromossomo
evolução do genoma, 246–247
genes *ver* Duplicação(ões) gênicas
genoma inteiro, 38–39, 39F, 255
recombinação de éxons, 257

E

E. coli ver Escherichia coli
Ectoderma, 1307, 1365
Edema, 1493
Edição do RNA, 483
mRNA de mamíferos, 484
mRNA mitocondrial de tripanossomo, 483, 484F
processamento de mRNA, 361, 361F, 362F
regulação da expressão gênica, 483–485
RNA transportador, 368F, 369, 369F
significado evolutivo, **483–484**
ver também RNAs-guia
Edição hidrolítica, aminoacil-tRNA sintetases, 372, 372F
EDTA, técnicas de separação celular, 502
Efeito "dois fótons", microscopia confocal, 592, 592F
Efeito citolítico, das viroses, 1496
Efeito de posição variegado (PEV), 220–221, 220–221F
Efeito posicional, 220–221, 220–221F
Efeito warburg, 1245
Efeitos de borda, 581–582F
Efeitos de interferência, 581, 581–582F
Efetor(es) Rab, **761**, 761F
Efexina, 931
Efrina A2, direcionamento do axônio retinotectal, 1393
Efrina A5, direcionamento do axônio retinotectal, 1392
Efrina B2, espalhamento capilar, 1447–1448
Efrina(s), 922, 923T, 931
receptores *ver* Receptores Eph
sinalização, migração de célula do epitélio intestinal, 1440–1441, 1441F
ver também tipos específicos
EGF *ver* Fator de crescimento epidérmico (EGF)
eIFs (fatores de iniciação eucarióticos), 380F
eIF-2, 488–489, 490F, 1535
eIF4E, 380, 491
eIF4G, 380
regulação por fosforilação, 488–489, 490–491, 490F
ver também Complexo de ligação ao quepe (CBC)
Elastase, 138F
Elastina, 1179, **1189–1191**, 1191F
Estrutura, 146–147, 146F, 1190–1191, 1191F
Síntese, 1190
Elemento Copia, 318T
Elemento de recombinação Lox *ver* Sistema Cre/Lox
Elemento de resposta ao AMP cíclico (CRE), 908
Elemento isolador, **452–453**, 452F, 453, 453F
Elemento nuclear longo interceptado *ver* Elemento LINE (L1)
Elemento responsivo Rev (RRE), 485, 485F, 486F
Elemento UAS (sequência de ativação *upstream*), 1350F
Elementos (químicos), 45, 46, 47F, 48F
Elementos Ac-Ds, 318T
Elementos Alu, 322, 323F
elementos B1, 323F
Elementos Ch4, 318T
Elementos de terminação, transcrição, 337, 338, 339
Elementos F, 318T
Elementos genéticos móveis, 316
bacterianos, 318F
Drosophila melanogaster, 318T
genoma humano, 207F, 318T
elementos semelhantes a retrovírus,207F
família Alu, 250F, 323FF
LINEs, 207F
SINEs, 207F
transposons de DNA, 207F
mecanismos de inserção *ver* Recombinação sítio-específica
ver também DNA repetitivo; Transposon(s); Vírus; *elementos individuais*
Elementos L1 *ver* Elementos LINE (L1)
Elementos limítrofes *ver* Elemento isolador
Elementos LINE (L1), 318T, 321–322, 322F
genoma humano, 207F
humano *vs.* genoma de camundongo, 323F
ver também DNA repetitivo
Elementos P, 318T, 480, 556
Elementos promotores, 336–339
assimetria, 339, 339F
em bactérias, 37F, 336–337, 338–339, 338F
eucarióticos, 440
ilhas CG (CpG), 434, 470–471
integração transcricional, 449–450,450F
sequências consenso, 339
Elementos transponíveis *ver* Transposon(s)
Eletrodos patch, 526–527
Eletroforese, 517
análise de proteína, 518, **521–522**, 521F, 522FF
campo pulsado, 534
coloração de gel, 517, 518F, 534, 535F
desnaturação de proteína, 517
fracionamento celular, 517, 518F, 521–522
gel de agarose, 534
gel de poliacrilamida *ver* Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
purificação de proteína, 517, 518FF, 521–522,522FF
tecnologia de DNA recombinante, **534**
blotting ver Blotting
gel de campo pulsado, 534, 535F
sequenciamento de DNA, 532, 534, 535F, **551**
Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), 521–522
análise da expressão gênica, 412, 414F
etapa de focalização isoelétrica, 521, 521F, 522F
etapa SDS-PAGE, 521–522
visualização, autorradiografia, 522F
Eletroforese em gel de agarose, 534
Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE),517
coloração, 517,518F
ensaio de alteração da mobilidade em gel, 426–427, 428F
géis de sequenciamento de DNA, 534, 535F
2D-PAGE, 414F, **521–522**
SDS-PAGE, 517, 518F, 637
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 517, 518F, 637
Elétron(s)
camada de elétron, 46, 48F, 49
interação atômica, 46–48
ver também Ligações químicas
orbital, 46
Eletroporação, 565–566, 598, 598F
Eliminação de sinapses dependente de atividade, 1394
Embaralhamento de segmento de DNA, 19, 19F
Embrião de galinha
desenvolvimento de membros, 1312–1313, 1313F, 1355
ver também Desenvolvimento de membros (vertebrados)
desenvolvimento neural, 1384F
somitos, 1372F
Embrião/embriogênese
análise das funções dos genes críticos para o câncer, **1241–1242**
análise do ciclo celular, **1057–1058**, 1057F, 1058F
arrastamento celular, 1036
caderinas, 1136, 1136F
células-tronco *ver* Células-tronco embrionárias
eixo ântero-posterior *ver* Desenvolvimento do eixo ântero-posterior
embriologia descritiva, 1310

  embriologia experimental, 1310, 1310F
  experimentos dissociados, 1139–1140, 1139F, 1140F
  fase G_1 do ciclo celular, 1100
  gastrulação, 1364–1369
  plantas, **1400**, 1401F, **1402**, 1402F
  polaridade, 1364
  ver também Desenvolvimento; *espécies individuais; estágios específicos*
Embriologia experimental, **1310–1311**, 1310F, 1311F
Encefalinas, processo proteolítico, 803
Encefalite, viral, 1502
Encefalopatia espongiforme bovina (BSE), 397–398, 1498–1499
  ver também Proteínas príon (PrP)
Endereçamento de proteínas
  balsas (plataformas) lipídicas, 807
  domínio apical, **806–807**
  domínio basolateral, 807
  endossomos, 807F
  glicoesfingolipídeos, **807**
  rede *trans de* Golgi, 807F
  sinais, 699, **701–702**, 701F, 702T, 703F
Endocitose, 749, **787–789**
  endossomos precoces, 782, **792**
  endossomos tardios, **782**
  fase fluida, 789
  LDLs, 791–792, 791F, 793F
  mediada por receptor *ver* Endocitose mediada por receptor
  sinais, 793
  ver também Via endocítica
Endocitose mediada por receptor, 784, **791–799**
  captação de EGF, 794
  captação de ferro, 794
  degradação de material, 793F
  endereçamento de proteína de membrana, 794F
  importação de molécula extracelular, **791–792**, 793F
  peptídeo-sinal, 792
  reciclagem do receptor, 792–794, 793F
  transcitose, 793F, **797–798**, 797F
Endoderma, 1307, 1365
Endoglicosidase H (Endo H), processamento de oligossacarídeos, 775F
Endonuclease AP, reparo por excisão de base (BER), 298, 299F
Endonuclease tRNA-*splicing*, 369, 370F
Endorfina β, produção, 803F
Endossomo(s)
  apresentação/processamento de antígenos, 1583F
  endereçamento de proteínas, 807F
  função, 696
  precoces, 782, 784F, **791**, 794F
    apical e basolateral, 799F
    células epiteliais, 798, 799F
    material de recuperação, **792–794**
  quantidades de membrana, 697T
  reciclagem, 793F, 794, 794F, **797–798**, 797F, 798F
  tardios, **782**, 784F, 794F, 798, 799F
  transporte para lisossomos, 791–792
  volume, 697T
  ver também Endocitose
Endotelina-3, 1375
Energia
  carreador de ATP, 61, 62F
    ver também Carreadores ativados no metabolismo; ATP (trifosfato de adenosina)
  cinética, 69F
  elétrica, 69F
  livre *ver* Energia livre
  luminosa, 69F
    ver também Fotossíntese
  potencial, 69F
  térmica, 67–68, 69F
    ver também Termodinâmica
  formas, 69F
  interconversões, 69F, 813
  ligações químicas, 48–49, 49F, 69F
  uso na célula
    catabolismo, 70, **88–103**
    catálise, **65–87**
    conversão de energia, **813–815**
    reações de oxidação, 70
  ver também Cloroplasto(s); Mitocôndria; *usos específicos*
Energia de ativação, 72, 73F
  diminuição por enzimas, 73F, 160, 160F
    lisozima, 162–166
Energia geoquímica, combustível para a vida, 11–12
Energia livre, **75–78**, **118–119FF**
  Catálise, 72, 164
    ver também Catálise enzimática
  fontes, para organotróficos *vs.* fototróficos *vs.* litotróficos, **11–12**
  importância para a vida, **1**, **8**
  reações favoráveis *vs.* desfavoráveis, 75F, 824–825, 825F
  tradução precisa, 385
  variações *ver* Variações na energia livre Delta *G* (ΔG)
Energia livre de Gibbs *ver* Energia livre
Energia luminosa, 697F, 598–599
  ver também Fotossíntese
Energia térmica, 67–68F, 118F
  catálise enzimática, 74
  tecido adiposo marrom, 838
Engenharia genética, 532, **564–568**
  alteração da sequência da proteína, **564–565**, 565F
  geração de mutante dominante-negativo, **564**, 564FF
  inserção de gene na célula germinativa, 565–566
  organismos transgênicos *ver* Organismo(s) transgênico(s)
  promotores induzíveis, 564
  sequência de marcação, 570
  substituição de genes, 566F
  ver também Genética; Tecnologia do DNA recombinante; *técnicas específicas*
Enhanceossomo, 447, 447F
Enolase, 121F
Ensaio de alteração da mobilidade em gel, 427–428, 428, 428F
Ensaio imunoenzimático (ELISA), 588–589
Ensaios de transformação celular, para oncogenes, 1232
Entrenós (caule de plantas), 1398F, 1407
Entropia (*S*), 66–67, 67F, 119F
Envelhecimento prematuro, defeitos no reparo do DNA, 295T
Envelope nuclear, 26, 200–201, 201F, 704
  células mitóticas, 712F, 1071, **1079–1080**, 1080, 1090
  estrutura, 201F, 705F, 706F
  ver também Lâmina nuclear
Enxertos de tecidos, 504
Enzima ativadora de ubiquitina, 393, 394F
Enzima conversora de interleucina-1 (ICE), 1118
Enzima DAN, 492F
Enzima rompedora das moléculas de água, 851, 852F, 873
Enzima(s), 6, 62–63, **72–75**, 158–159
  catálise *ver* Catálise enzimática
  classificação, 159, 159T
  coenzimas/cofatores, 167
  complexos multienzimáticos, 168–169, 169F
  energia, 72–73
  estado de transição, 160
  estrutura, 72
    sítio ativo *ver* Sítio ativo
    sítios de regulação, 170
  intermediário tetraédrico, 160
  ligação ao receptor *ver* Receptores ligados a enzimas
  mecanismo de ação, 74F
  regulação, 169–171, 170F
    cooperatividade, 172–173, 173F
    fosforilação, 175–176
    ver também Regulação alostérica; Regulação por retroalimentação
  resistência a antibióticos e, 1522, 1523F
  ver também Vias(s) metabólica(s); *enzimas individuais*
Enzimas de restrição
  função biológica, 532–533
  sequência específica, 533
  tecnologia do DNArecombinante, 532, **532–533**, 534F, 540–541
Eosina, coloração, 585F
Eosinófilos
  ataque a esquistossomas, 1532, 1532F
  citocinese, 1556
  estrutura, 1452F
  linhagem e formação, 1452F
  pré-regulação em infecções parasitárias, 1451
Eph B, migração de célula do epitélio intestinal, 1440–1441, 1441F
Epidêmico, 1487
Epiderme, **1417–1428**, 1418F
  associação estrutura/acessórios, 1418
  barreira à prova d'água, 1418, 1420–1421
  camada granular, 1419, 1419F
  células, 1419–1420
  distribuição das células-tronco, 1422F
  interfolicular, 1418–1419
  renovação por célula-tronco, **1417–1428**
    associada à via de sinalização, 1426
    sinalização, 1426
    taxa, 1420
  vegetais, 1402, 1404F
Epiderme interfolicular, 1418–1419
Epidermólise bulbosa
  juncional, 1165
  simples, 986, 1005
Epidídimo, 1294
Epigenoma, 473
Epilepsia, canais de cátion regulados por voltagem, 682
Epilepsia mioclônica e das fibras vermelhas gas-tas (MERRF), 866
Epinefrina *ver* Adrenalina (epinefrina)
Epitélio, 1131, 1132F
  adesão bacteriana, 1503
  adesão célula-célula e junções celulares, 1133–1135, 1134F
    junções de ancoramento, **1133–1150**
    junções ocludentes, 806, **1150–1158**
    mecanismo de polaridade ápico-basal, **1155–1157**, 1155F, 1156F
    mecanismo de polaridade de célula planar, **1157–1158**, 1157F
    ver também Junções aderentes; Caderinas; Adesão celular; Junção celular; Desmossomo(s)
  colunar, 1133, 1150-1151
  como barreira permeável, 1150
  defesa do hospedeiro, 1525–1526, 1525–1526F
    evasão microbiana de, **1502–1504**
    muco e, 1502, 1525
  dobramento, 1142, 1143F
  escamoso estratificado, 1434
  estrutura, 1134F, 1150
  respiratório, 1435, 1435F
    colonização, 1502, 1503
    função, 1502
    muco, como mecanismo de defesa do hospedeiro, 1502, 1525
  sensorial, 1429, **1429–1433**
  transição epitelial-mesenquimal, **1141**
  ver também Tecido conectivo
Epítopos (determinação antigênica), **1545**, 1558–1559F
Epulopiscium fishelsoni, 13–14F
Equação de Michaelis-Menten, 162F
Equação de Nernst, 669, 670
Equilíbrio
  químico, 76–77, 77F
  trocas de energia livre, 76, 77F
Eritroblastos, 1459, 1459F
Eritrócito(s), 1453T, 1459
  citoesqueleto, 646, 1008–1009
  desenvolvimento, 1454, 1457F, 1459, 1459F
    ver também Eritropoiese
  lesão complementar, 1529F
  membrana, 618F, 646
    fosfolipídeos, 626
  regulação da osmolaridade, 663, 663F
  tempo de vida e renovação, 1459
Eritromicina, 385T
Eritropoiese, 1292–1293
  função da eritropoietina, 1103, 1459–1460
  função dos fatores estimuladores de colônia, 1459–1460, 1462
Eritropoietina, 1103, 1459–1460
  células responsivas a, 1459
  células-alvo e receptores, 1460T
  síntese, 1459, 1460T
Erk (MAP-cinase), 929F
ERp57, dobramento de proteínas, 737F, 747F
Erros de replicação, 269, 271–272, 276–277
  ver também Reparo de pareamento incorreto
Escada rolante mucociliar, 1435, 1503
Escala, 580, 580F
Escamas, 1419, 1419F
Escherichia coli, 13–14F
  enteropatogênica, 1503–1504, 1503–1504F
  filogenética, árvore da vida, 16F
  fiagelo, cambalhota, 942, 943F
  genoma, 25F, 282
    cromossomo, 1491F
    replicação, 282, 283F, 284F
    sequenciamento, 552
    tamanho, 18T
  membrana dupla, 665F
  mutações, 264, 276–277
  organismo como modelo, **24–25**, 25F
  pilus P, 1502
  proteína RecA *ver* Proteína RecA
  regulação da expressão gênica, 416, 433F, 439, 439T
    operon da lactose (*Lac*) *ver* Operon *Lac* (*Escherichia coli*)
  reparo de pareamento incorreto da fita, 277
  replicação, 282, 283F
    estrutura da DNA-polimerase, 268F
    estrutura do montador da cinta, 275F
    período refratário, 282, 284F
  sequências promotoras, 338F
  transposons, 318T
  uropatogênica, 1502, 1503F

Esclerose lateral amiotrófica (ALS), montagem de neurofilamentos, 987
Esclerose múltipla, desmielinização, 678
Escorbuto, 1186
Esfingolipídeo(s), membranas lipídicas, **618–620**, 625
 ver também tipos específicos
Esfingomielina, 618, 619F, 744–745
Esfingosina, 618, 619F, 628, 744–745
Esfregaço de PAP, 1212
Espaço extracelular, 1164
Espaço perinuclear, 705F
Espaço periplasmático, 1490F
Espaço tilacoide, 843, 843F
Espalhamento de elétrons, microscopia eletrônica, 605
Espectrina
 empacotamento dos filamentos de actina, 994F
 estrutura, 1008
 formação de rede de filamentos de actina, 1008
 ligação cruzada da actina, 1007F
 membrana do citoesqueleto, 646, 646–647F
Espectrometria de massa em *tandem*, 519–521, 522
Espectrometria de massas
 análise de proteína, 519–521, 520F
 combinação com cromatografia líquida, 522
 composição da membrana, 624
 MALDI-TOF, 519–520
 precisão, 519
 princípio, 520F
 tandem, 519–521
Espectrometria NMR, 139, **529–530**, 529F, 530, 530T
Espectroscopia, carreadores de elétrons, 831, 832F
Esperma *ver* Espermatozoides
Espermátide, 1293, 1294
Espermatócito, 1293
 meiose em, 1281
 primário, 1293
 secundário, 1293, 1294
Espermatogênese
 espermátide, 1293, 1294
 espermatócito *ver* Espermatócito
 espermatogônia, 1293
 estágios, **1293–1294**, 1294F, 1295F
 regulação gênica, 1295–1296
 sincício, **1294–1296**, 1296F
Espermatogônia, 1293
Espermatozoides, **1292–1296**
 adaptação para entrega de DNA, **1292–1293**
 capacitação, 1294, **1297**
 domínios de membrana, 645, 646F
 estrutura, 1292–1293, 1293F
 ligação ao óvulo, 1270F, **1298–1299**, 1298F
  reação acrossômica, 1297, **1298**, 1299F
  reação cortical e, 1299, 1300F
  ver também Fertilização
 mitocôndria, 816F
 mobilidade, 1293, 1293F
 precursores *ver* Espermatócitos
 produção *ver* Espermatogênese
Espiroplasma, 13–14F
Espiroquetas, estrutura, 1490F
Espliceossomo(s), 349–351, **349–351**, 354F
 componentes, 350F, 352
  ver snRNAs
 espliceossomo AT-AC, 353–354, 354F
 espliceossomo *trans*, 354–355, 354F
 evolução, 355–357
 hidrólise de ATP, 351–352
 mecanismos de fidelidade, 352
 modo de ação, 350–351, 350F
 montagem, 350
 proteínas SR, 352, 353
 rearranjos RNA-RNA, 351–352, 351F, 353
 RNAs catalíticos, 352
 sítio ativo, 352
Esporo(s), 1269
Esquema Z (fotossíntese), 852
Esquistosoma, ataque de eosinófilos, 1532, 1532F
Estado de rigor, da miosina, 1019
Estado de transição, 160
 análogos, 160, 161F
 energia de ativação, 160, 160F
 estabilização, catálise enzimática, 159–160, 160, 164
Estado haploide
 estado diploide *vs.*, 34
 levedura, 34
 na reprodução sexual, **1269–1271**, 1270f, 1272, 1281
  ver também Meiose
Estatmina, 995F, 1000
Estereocílios, 609F, 1430, 1430F, 1431F
Ésteres de forbol, como promotores de tumor, 1226
Esteroides, estrutura, 115F
Esterol, lipídeo(s) de membrana, **618–620**
Estimulador, 438F, 1309
Estômago
 câncer, associação a *Helicobacter pylori*, 1228, 1229, 1503
 colonização por bactérias, 1503
 epitélio, 1436
 úlceras, 1228, 1503
Estômatos, 846
Estrabismo, 1396
Estradiol, 889F
Estreptomicina, 385T
Estresse, liberação de cortisol, 463
Estriquinina, modo de ação, 684
Estrógeno, receptor, 891F
Estroma, 1165
 células, controle da hemopoiese, 1458–1459, 1458F
 cloroplastos, 713F, 719–720, 842, 843F, 853
 glândula mamária, 1428
 papel na progressão de tumor, 1221–1222
 transporte de proteínas, 719–720, 720F
Estrutura da cromatina, **211–219**, **211–219**
 aspectos históricos, 220
 centromérica *ver também* Centrômero(s)
 "contas em um colar", 211, 211F, 212F
 cromossomos mitóticos243, 243F, 245
 duplicação durante a fase S, 1069–1070
 efeito no tempo de replicação, 285–286
 epigenética,472
 fibra de 30 nm, 211, 211F, 212F, **216–219**, 217F–219F,221–222
  ver também Histona(s); Nucleossomo(s)
 herança direta, 230–234, 232F
 hereditariedade, 473–476
  ver também Heterocromatina
 interfase, alças, 234–236, 235F
 regulação, **219–233**
 ver também Remodelação da cromatina; Estrutura do cromossomo
Estrutura de cromossomos, 554F
 centrômero *ver* Centrômero
 compactação do DNA, **202–219**, **202–219**
 cromatina *ver* Cromatina
 global (ordens superiores), **233–245**
  alças, 234–236, 234F, 235F
  condensação *ver* Condensação de cromossomos
  cromatina *ver* Cromatina
  politênicos *ver* Cromossomo(s) politênico(s)
 inativação do X *ver* Inativação do X
 linear, 209–210, 209F, 210F
 mudança no ciclo celular, 208–209, 208F, 209, 243F
  ver também Ciclo celular; Cromossomo(s) na interfase; Mitose; Cromossomo(s) mitóticos
 replicação e, 209, 210F, 1067
  ver também Replicação de cromossomo; Origem(ns) de replicação
 telômero *ver* Telômero(s)
Estrutura de genes
 eucarióticos, 347, 348F
  éxons *ver* Éxon(s)
  humanos, 205–207, 206, 206T, 348F
  íntrons *ver* Íntron(s)
  organização íntron-éxon, 348
  processamento de pré-mRNA, 347
   ver também Splicing
  regiões de controle gênico *ver* Regiões de controle gênico
 procarióticos
  cromossomos de bactéria, 202, 1491F
  operon, 433F, **462–463**
Estrutura de proteínas, 59–60, **125–152**
 análise, 139
 análise computacional, 139, 139F
 cadeia polipeptídica não-estruturada, 146–147
 componentes, 126F
 conformações, **130–131**, 154–155, 154F, 155F
  ver também Regulação alostérica; Mudança conformacional
 C-terminal, 59, 126F, **482–483**
 determinação, 139, **517–532**
  difração de raios X, 139, **526–529**, 527–528F
  SDS-PAGE, 517
 domínios, 131, 136, 348
  domínio grande da cinase, 136F
  domínio SH2, 131, 132–133FF, 136F, 155, 156
  domínio SH3, 136F
  fusão, 560F
  modelos 3-D, 131, 132–133FF, 137F
  módulos, 140–141, 140F
  pareados, 141
  rastreamento evolutivo, 155–156, 155F, 257F
 esqueleto polipeptídico, 125
 estabilidade, 137, 147–148, 147F
 estrutura central, 131, 135, 135F
 estrutura primária, **136**
  codificação, 199–200, 199F, 200F
   ver também Código genético
  predição, 550–551
 estrutura quaternária, 136
 estrutura secundária, 136
  folhas-β, **131**, 134F, **135**, 135F, **422**, 423F
  hélice-α, **131**, 134F, **135**, 135F
 estrutura terciária, 136
 filamentos helicoidais, 143, 144F, 145, 145F
  actina, 145F
   ver também Actina; Filamentos de actina
  microscopia eletrônica, 610F
  montagem, 145F
  sem direção, 143
 força não-covalente, 126–127
 N-terminal, 59, 126F
 número limite de enrolamento, 136–137
 regiões que atravessam a membrana, 135
 relação estrutura-função, 154–155
 representação, 132–133FF, 144F
 sequência de aminoácidos, **125–137**
  ver também Aminoácido(s)
 subunidades, 140F, 141F, 142–143, 143F
 ver também Ligações peptídicas; Dobramento de proteínas
Estrutura de RNA Tar, papel na atenuação da transcrição, 478
Estrutura do DNA, 62F, **195–201**, **197–201**
 análise por difração de raios X, 195–196, 196
 cadeias complementares (fitas), **197–199**, 266F
  natureza antiparalela, 198F, 199, 267
  papel em reparo, 297
  papel em replicação, 200, 200F, 201F, 266
 deformação, acoplamento para empacotamento, 213, 214F
 efeitos da sequência, 416–417
  ver também Curvaturas do DNA
 elucidação, 195–196, 196, 197
 esqueleto (açúcar-fosfato), 197, 198–199, 198F
 hélice dupla, 197–199, 198F, 199F, 338F
  cadeias complementares (fitas)
   ver Replicação do DNA
  curvaturas, 198–199, 199
  fenda maior, 199F, 416F
  fenda menor, 199F, 416F
  ligações de hidrogênio, 197–198, 198F, 199F, 417
  reparo296–297
   ver também Reparo de DNA
  rotação, 278, 278F
  separação das fitas, 273
 hélices em grampo, 273
 interações proteína-DNA, 416–417, 417F
  ver também Motivos de ligação ao DNA (proteínas)
 ligação fosfodiéster, 199F
 mecanismo de hereditariedade, **199–200**
  ver também Gene(s)
 nucleotídeos, 62, 197–199, 198F
  ver também Nucleotídeo(s)
 pareamento de bases, 197–199, 198F, 417F
 polaridade, 198F
 polaridade 3' para 5', 197
 RNA *vs.*, 408
 ver também Topologia do DNA
Estrutura do RNA, 272, 331–334, 331F–334F
 comparação com o DNA, 408
 dobramento, 331–332, 333–334F, 403–404, 403F, 404
  interações não-covalentes, 64, 64F, 403
  tRNAs, 368, 368F
 esqueleto de fosfodiéster, 331–332F
 fita dupla, RNA de interferência (RNAi), 495
 nucleotídeos, 62, 331–332
  ver também Nucleotídeo(s)
 pareamento de bases, 331–332, 333–334F, 403
 secundário, 403, 403F
  grampos, 338, 403F

Tar, papel na atenuação da transcrição, 478
Terciário, 403–404, 403F
Estrutura em folha de trevo, tRNAs, 368, 368F
Estrutura mitocondrial, 713, 713F, **815–817**, 817F, 818F
cloroplastos *vs.*, 841–842, 843F
composição da membrana, 697T
cristas, 817, 817F
espaço de matriz, **713**
espaço intermembrana, **713**, 816, 818F
função na respiração, 821
ver também Cadeia de transporte de elétron; Fosforilação oxidativa
inserção de porina, 717, 717F
matriz, 816, 818F, 853
membrana externa, **713**, 713, 816, 817F, 818F
membrana interna, **713**, 817, 817F, 818F, 821F
afunilamento eletrônico, 834–835
complexos enzimáticos respiratórios, 820, 831–832
gradiente eletroquímico, 820–821, 821F
transporte através, 822
ver também Genoma mitocondrial
Estrutura quaternária, 136
Estruturas em grampo, RNA, 338, 403F
Estudos de gêmeos, epigenética, 473, 473F
Etileno, **957–959**, 958F
Etioplastos, 841
Eubactérias *ver* Bactérias
Eucarioto(s), 13–14, 16F
características gerais, **26–32**, 27F
células *ver* Células eucarióticas
epigenética, 472
genoma
DNAregulador, 31–32
híbrido, **30**
metilação do DNA, 278
tamanho, 18T, **30–31**, 31F
não-codificante, **31**, 204
ver também DNA não-codificante
origem evolutiva, **26–27**
predadores, 26–27
proteína transmembrana, 635
Eucromatina, 220, 1070
ver também Heterocromatina
Euglena, árvore da vida, 16F
Evolução
algas, 874, 875F
análise da taxa de mutação, 264
ver também Taxa de mutação
árvore da vida, 15–17, 16F, 23
cadeia(s) de transporte de elétrons, **870–876**
câncer como um processo microevolutivo, **1205–1224**
conservação em *ver* Conservação evolutiva
divergência entre animais e vegetais, 955
eventos maiores, 874F
gene(s), **16–17**
duplicação/divergência gênica *ver* Duplicações gênicas
genes de colágeno, 1185–1186
ver também Evolução de genoma
genomas *ver* Evolução do genoma
hemoglobina (Hb), **256–257**, 256F
miosina e cinesinas, 1015–1016
molecular *ver* Evolução molecular
multicelularidade e comunicação celular, **955**
organelas, **697–699**, 700–701F
ver também organelas específicas
patógeno, **1520–1521**
planta(s), 36, 840–841
proteína *ver* Evolução de proteína
proteínas carreadoras, 655
recombinação homóloga e, 305
reprodução sexual e, **1271–1272**, 1271F
síntese de ATP, **870–876**, **871–872**, **872–875**
sistema imune inato, 1524
via(s) metabólica(as), 870–872
fixação de carbono, **872–875**
metabolismo aeróbio, 11–12, 27, 873–874
ver também Origem da vida
Evolução de proteína, **136–142**
embaralhamento de domínios, 140–141, 140F, 257, 257F
facilitada por íntrons e *splicing*, 257, 348
famílias de proteínas, 137–139, 155–156
ver também Famílias de genes
fusão de domínios, 560F
homologia de sequência, 138, 138F, 139, 155–156
módulos, 140–141,257
ver também Superfamília das imunoglobulinas
mudança de aminoácido, 137, 264, 265
taxas de mutação, 264
unidade de tempo evolutivo, 265
Evolução do genoma, **245–260**
adição, 250, 258
análise de sequência, 207, 246
conservação, 39–40, 246
identificação da sequência conservada, 252–253, 252F
mamíferos, conservação em, 39–40
polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), 258–259
sintenia conservada, 207, 208F, 250
ver também Sequenciamento do genoma
blocos de sintenia, 250
cromossomo(s), 207, 208F
divergência de sequência, **247**
árvores filogenéticas, 247, 247F
hipótese do relógio molecular, 248–249
humano-camundongo, 249F
rastreamento de ancestrais, 247, 248F
ver também Genômica comparativa
duplicações de genes, 253–254
estrutura íntron-éxon dos genes, 348
humano *vs.* baiacu, 251F
humano *vs.* camundongo, 249–250, 249F
humano *vs.* chimpanzé, 247, 247F, 248F
ilhas CG (CpG), 434, 470
integração de módulos proteicos, 140
mecanismos, **246**
duplicação do genoma, 38–39, 140–141,255
duplicações de genes *ver* Duplicação(ões) de genes
embaralhamento de éxons, 257
mutações ver Mutação
ver também Taxas de mutações
mudança de tamanho, 251
mutação neutra, 257–258
número de genes *vs.* complexidade, 246
organelas, **859–860**, 860F, 861F
peixe-zebra, 255
perdas, 250, 258
transposons, 249F, 250F, 323, 323F
troca acelerada, 253, 254F
variação entre humanos, 258–260, 258–260, 258–259F
Evolução molecular, **245–260**
filogenética, 247, 247F, 248F
hipótese do relógio, 248–249
mitocôndria, 862
Excisão de DNA, recombinação sítio-específica, 323, 324, 324F
Excisionase, fago lambda, 326
Exclusão alélica, **1565**
Exocitose, 750F, **799–809**
constitutivo, **800**, 801F
matriz extracelular, 800
neurotransmissores *ver* Vesícula(s) sináptica(s)
processamento proteolítico de moléculas de carga, 803
proteínas secretoras, 800
regulada *ver* Vias secretoras reguladas
vesículas secretoras *ver* Vesícula(s) secretora(s)
vias-padrão, **800**, 801F
Éxon(s), 346–347
eliminação, 352, 355, 355F
estrutura dos genes (eucarióticos), 206
recombinação na evolução, 255
variação do comprimento, 352, 353F
Éxons da região C, genes de anticorpos, 1562–1563, 1563–1564FF
Exossomo, 358, 485
Expansão clonal, 1546
Experiência visual, influência na coluna dominante ocular, 1395F
Experimento de pulso-caça, 602, 602F
Experimentos de seleção do RNA *in vitro*, 404F, 408
Exploração frouxa, 490
Explosão de força, da miosina, 1016
Explosão respiratória (*burst* respiratório), fagocitose, 1532
Exportina(s), transporte de mRNA do HIV, 485, 486F
Expressão gênica, 6, 199F, 200F
análises, 414FF, **553–576**
abordagens, 553
ver também Genético
ensaio de gene repórter, **572–573**, 572F
microarranjos de DNA, **34–35**, 412, 414F, 537, **574–575**, 574F, 575F
análise de grupo, 575, 575F
2D-PAGE, 412, 414F
câncer e, **1237–1239**
condensação da cromatina, 285–286
função da heterocromatina, 220
ver também Cromatina; Condensação de cromossomo; Silenciamento de genes; Heterocromatina
controle/regulação *ver* Regulação da expressão gênica
efeito de posição variegado, 220–221, 220–221F
efeitos de posição, 220, 220–221F
eficiência, 331, 331–332F
eucarióticos, 345F, 412, 462, 463F
hereditariedade, 454, 458, 458F, 466
ver também Metilação de DNA; Fenômeno epigenético; Silenciamento de genes
humano, 412
metilação de DNA e, 467–468, 468F
procariótico, 345F
proporção do genoma expresso, 412
sinal de DNA para transcrição, **336–340**
ver também Regiões de controle gênico
unidades de transcrição, 334–335F, 336–337
variação entre tipos celulares, 412
ver também Transcrição; Tradução
Expressão monoalélica, epigenética, 473
Extensão convergente, **1368**, 1369F
Extração de fenol, ácidos nucleicos, 538
Extratos celulares (homogenatos), 510,512
Ezrina, 1009

F

F_0F_1 ATPase *ver* ATP-sintase
FACS *ver* Separador ativado por fluorescência
FAD/$FADH_2$
carreador de elétrons, 818–819, 819F
ciclo do ácido cítrico, 98, 817
estrutura, 99F
oxidação de ácidos graxos, 97F
Fagocitose, 26, 27F, 28F, 784F, **787–789**, 1115, 1531F
anticorpos ativados, 1555, 1555F
entrada de bactérias nas células hospedeiras, **1507–1508**
explosão (burst) respiratória, 1532
indução por bactérias, 1508, 1509F
macrófagos, apoptose, 1117
mecanismo de resistência, **1531–1532**
micrografias eletrônicas, 788F
papel complementar, 788, **1528–1529**
patógenos, 1531–1532
processos, 1531–1532
Fagolisossomo, 1510–1512, 1510–1511f, 1513, 1531–1532
Fagossomos, 782–783, 787–788, 1452, 1531–1532
FAK (cinase de adesão focal), 937, **1176–1177**, 1176F
Faloidina, 987, 988T
Família BMP (proteína morfogenética do osso), 1336, 1441,
Família da proteína Tjp, 1154
Família de proteína vasa, 1282
Família de proteínas de membrana Opa, *Neisseria*, 1520
Família de proteínas ERM (ezrina, radixina, mesina), 1009, 1010F
Família de receptor serina-cinase, evolução, 177F
Família do fator de crescimento de transformação β (TGFβ)
ativação da via de sinalização dependente de Smad, **939–941**, 940F
ausente em *Arabidopsis*, 1400
célula(s) T reguladora(s), 1575
desenvolvimento animal, 1316F
desenvolvimento de *Drosophila*, 1336
miostatina, 1466
mutação de perda de função, 1243
pele, 1426
proteinoglicanos e, 1183
sinal inibidor, 1103, 1110, 1111F
Família efrina B, epitélio do intestino, 1440–1441
Família Fringe de glicosiltransferases, 947
Família Smad, **939–940**, 941
Família Src de proteínas tirosina-cinases, 936
deleções levando ao câncer, 1232
Estrutura, 178F
evolução, 177F
membranas, 631
regulação, 178, 178F
Src *ver* proteína Src
Família WASp, 1043, 1516, 1516F
Famílias de genes
comuns a arquebactérias, bactérias e eucariotos, **23**, 24T
evolução, **19–21**
duplicação e divergência, 255

genes da globina, 256–257, 256F
ver também Genes da globina
ver também Famílias de proteínas
Famílias de proteínas, 137–139
homologia de sequência, 138, 138F, 139, 139F
rastreamento evolutivo, 155–156, 155F
semelhança estrutural *vs.* semelhança de sequência, 138–139, 138F
ver também Famílias de genes; *tipos específicos*
FAP (polipose adenomatosa familiar de cólon), 1253, 1253F
Fasciclina 3, formação da sinapse, 1147
Fascíclos (regiões de fibras), neuronais, 1387
Fase, 581–583
Fase de leitura
aberta *ver* Fase de leitura aberta (ORF)
síntese de proteína, 368, 368F
Fase de leitura, tradutional *ver* Fase de leitura traducional
Fase de leitura traducional, 383, 384F
Fase G_1 do ciclo celular *ver* Ciclo celular
Fase G_1 do ciclo celular *ver* Ciclo celular; Controle do ciclo celular
Fase G_2 do ciclo celular *ver* Ciclo celular
Fase S do ciclo celular *ver* Ciclo celular
Fase S do ciclo celular *ver* Ciclo celular
Fases de leitura abertas (ORFs), 490, 551
Fatias de tecidos, técnicas de microdissecação, 502, 502–503F
Fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), 923T, 924, 934
Fator 2 de crescimento semelhante à insulina (IGF-2), impressão, 469–470, 470F
Fator α de necrose tumoral (TNFα), 953, 953F, 1592, 1598T
Fator de alongamento EF-1, 377F
Fator de alongamento EF-2, 377F
Fator de alongamento EF-G, 377, 377F
Fator de alongamento EF-Tu, 181, 181F
mudança conformacional, 180–181, 181F, 377
proteína ligadora de GTP, 180–181, 181F, 377
síntese de proteínas, 180, 377–378, 377F
Fator de células-tronco (SCF), 1375
Fator de crescimento da epiderme (EGF), 1103, 1238
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)
FGF10, no desenvolvimento do pulmão, 1381–1382, 1382F
ligação no sulfato de heparana, 1183
na angiogênese, 1449
proteína FGF8, 1371
Fator de crescimento de hepatócito (HGF), 1443
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), 923T, 925F, 1102, 1441, 1450
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
células endoteliais, 1448, 1449
função na progressão de tumor, 1221
junção célula-célula, 1145
ligação ECM, 1183
Fator de crescimento nervoso (NGF), 923F, 923T, 926, 930, 1109
Fator de despolimerização da actina *ver* Cofilina (fator de despolimerização da actina)
Fator de estimulação de clivagem F (CstF), poliadenilação, 357–358, 357F, 482–483
Fator de liberação de tradução (eRFI), simulação molecular, 382F
Fator de reciclagem do ribossomo, 381F
Fator de transcrição TFII *ver* Fatores de transcrição, geral
Fator de transcrição TFIIH, 340–341
Fator específico de clivagem e poliadenilação (CPSF), 357–358, 357F
Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), 1460T
função na produção de macrófagos, 1460–1461
Fator indutor da hipoxia 1 (HIF1), 1221, 1448–1449
Fator sigma, 336–337, 337F, 439, 439T
Fator Steel (SCF; fator de células-tronco), 1375
Fator V, secreção do RE, 767
Fator VIII, 348F, 767
Fator(es) de alongamento, 179–180
EF-G *ver* Fator de alongamento EF-G
EF-Tu *ver* Fator de alongamento EF-Tu
transcricional, 343–345
transducional, 376F, **377–378**, 377F
Fator(es) de sobrevivência, 1102, **1126**, 1127F
Fatores de acasalamento (levedura, 454–456)
Fatores de associação da cromatina (CAFs), 290
Fatores de catástrofe, 1080
Fatores de crescimento, 1102
competição, **1110**
mecanismo de ação, 1108, 1109F
ver também Mitógenos, *fatores específicos*
Fatores de iniciação (eucarióticos) *ver* eIFs (fatores de iniciação eucarióticos)
Fatores de liberação (traducional), 381, 381F,382F
Fatores de reparo, recombinação homóloga, 310, 310F
Fatores de transcrição, geral (TFII), **340–342**
função, 340
iniciação da transcrição, 341F
interação com a proteína ativadora, 438F
interação com a proteína repressora, 445, 446F
ligação ao TATA box, 340–341, 341–342, 341F, 342F,438F
nomenclatura, 340
Fatores de troca de GTP, 377F
Fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), 896, 896F
associação de microtúbulo, 1043–1044
ativação de RhoA, 1095
formação do fuso mitótico, 1081
papel funcional, 179, 180F
Ras GEF, 179
reciclagem de eIF-2, 488–489, 490F
Fatores de troca de nucleotídeos de guanina Ras (Ras-GEF), 927, 928F
Fatores de virulência, 1491
antraz, 1493
sistema secretor tipo III, 1493, 1494F, 1503–1504
ver também Toxinas bacterianas
Febre, 1488, 1534
Febre glandular, *vírus Epstein-Barr (EBV), 1499*
Febre hemorrágica, viral, 1502
Feixes contráteis, 1006–1007, 1007F
ver também Actina/filamentos de actina
Fenda de ligação ao peptídeo, proteína MHC, 1577, 1578F, 1579F
Fenda hidrotermal, 11–12, 12–13FF
Fenda(s) sináptica(s), definição, 682
Fenilalanina, estrutura, 129F
Fenobarbital, efeito no fígado, 1444
Fenômeno epigenético, 219, 471–473, 472F
alça de retroalimentação positiva, 471, 472F
bactéria, 472
em câncer, 1208
estado de agregação de proteína, 472F
estrutura da cromatina, 472
estudos com gêmeos, 473, 473F
eucariotos, 472
expressão monoalélica, 473
herança genética *vs.*, *219F*
herança *ver* Herança
impressão *ver* Impressão genômica
mecanismo, 472–473, 472F
metilação do DNA *ver* Metilação do DNA
modificação de histonas *ver* Modificação de histonas
silenciamento de genes de supressão tumoral, 1236, 1236F
ver também Impressão genômica
Fenômeno sintético, 559
Fenótipo, 553, 554F
análise, 556–557
ver também Sondagens genéticas
herança *ver também* Impressão genômica
"transformado", células de câncer, 506T, 1232, 1233
Ferimento
angiogênese, 1448, 1448F
cicatrização
angiogênese, 1448
controle da renovação celular, 1425–1426
função do TGFβ, 1426
via de infecção, 1501–1502
Fermentação, 90, 839
células mais primitivas, 870–871
produção de ácido láctico, 90
vias, 90F
ver também Glicólise
Feromônios, 917
Ferredoxina-NADPH-redutase, 852F
Ferridoxina, 852, 852F
Ferro, captação endocítica, 794
Fertilidade, reduzida, 1301
Fertilização, **1297–1303**
ativação do óvulo e ligação no espermatozoide, 1270F, 1287, **1298**, 1298F
aumento do Ca^{2+} e ativação do óvulo, 912, 912F, **1299**
mecanismo de fusão óvulo-espermatozoide, **1298–1299**
reação acrossômica, 1297, **1298**, 1299F
reação cortical, 1299, **1300**, 1300F
capacitação e, 1294, **1297**
doação de centríolos para o espermatozóide, 1301, 1301F
embrião de *Xenopus*, 1057
formação do zigoto, 1269
fusão de pró-núcleos, **1301**, 1301F, 1302F
in vitro (IVF) e procedimentos relacionados, **1301–1303**
capacitação, 1297
fusão de pró-núcleos, 1302F
invertebrados marinhos, 1297
ver também zigoto
Fertilização *in vitro* (IVF) e procedimentos relacionados, 1297, **1301–1303**, 1302F
FGF, *ver* Fator de crescimento de fibroblasto (FGF)
Fibra de cinetocoro, 1084
Fibras de estresse, 1093
Fibras elásticas, 146F, **1189–1191**, 1190F
Fibras musculares, 1026F, 1064, 1464–1465, 1465F
Fibrilarina, localização nuclear, 365F
Fibrilina, 1190–1191
Fibrina, formação, 264
Fibrinogênio, ativação, fibrinopeptídeos, 264
Fibrinopeptídeos, taxa de mutação, 264
Fibroblasto(s)
células rastejantes, 1036
cultura de células, microscopia de contraste de fase, 504F
diferenciação e alterações, 464, 1467–1468
funções, 1467–1468
maduros e imaturos, 1468
no reparo de ferimentos, 1467
organização de microtúbulos, 1048F
organização ECM, 1189
senescência replicativa, repetições teloméricas, 293
síntese ECM, 1179, 1179F
transformação
em cartilagem e ossos, 1468–1471
em células adiposas, 1475F
transformação de condrócitos em, 1468–1469
Fibronectina, **1191**
estrutura, 1191, 1192F
fibronectina tipo III repetida, 1191, **1193**
formação fibrilar
efeito de tensão, **1191–1193**, 1192F, 1193F
integrinas, 1192
formas solúveis, 1191
gene, 1191
lâmina basal, 1165
ligação na integrina via motivo RGD, 1193
módulos proteicos, 141F
tecido conectivo, 1188
Fibrose cística, 560, 666, 768
Fígado, **1442–1444**
câncer, 1227–1228, 1229
células *ver* Hepatócitos
estrutura, 1443F
Filamentos β cruzados, 397, 397F
Filamentos, citoesqueleto *ver* Filamentos de actina; Filamentos do citoesqueleto
Filamentos de queratina, células espinhosas da epiderme, 1419, 1419F
Filamentos do citoesqueleto, 646–647, 648F, **965–1053**
alongamento, 972F, 976
capeamento, 1003, 1003F
comportamento, **966–969**
comportamento dinâmico, **965–991**, 1002–1003
estabilização, 1001–1002
estequiometria de subunidades, 1002–1003
ligação cruzada, 1001, 1005–1008
montagem/formação
alterações induzidas por drogas, **987–989**, 988T
automontagem, **965–991**
cinética, 972–973
nucleação, 972–973, 978F, 992
subunidades, **970–971**
taxa de adição de subunidades, 977
ver também Polimerização de actina
organização, 1005–1008
regulação da nucleação, **992–1010**
ver também Filamentos de actina/actina; Filamento(s) intermediários; Microtúbulo(s)
Filamentos grossos, 1012F
ver também Miosina

Filamentos intermediários
alongamento, 972F
comportamento dinâmico, 966
distribuição global, 983
empacotamento lateral e enrolamento por supertorção, 983–985, 984FF
estabilidade mecânica, **985–987**
estrutura, 968, 968F, 983F
estrutura de polipeptídeos, 984
função na divisão celular, 966–967
isoformas, 985
ligação na junção de ancoramento, 1133T, 1134, 1143, 1144, 1144F, 1171F
ver também Desmossomo(s)
localização celular, 966
montagem, 145, 984, 984F
organização, **1005–1006**
propriedades, 965
queratinas *ver* Queratina(s)
subunidades, 971
Filamentos transversos, pareamento homólogo meiótico, 1276, 1277F
Filamina
empacotamento de filamentos de actina, 994F
formação da rede de filamentos de actina, 1008–1009
perda, motilidade celular anormal, 1008, 1009F
Filopódios, 1006, 1037
angiogênese, 1449
direcionamento de cones de crescimento neuronal, 1049, 1387, **1387–1389**
nucleação dos filamentos de actina, 996
Filtro(s) de seleção, canais iônicos, 668, 672
Fímbrias, 1490F
Fimbrina
compactação de filamentos de actina, 994F
ligação cruzada à actina, 1007, 1007F
Fita iniciadora, síntese de DNA, 267F, 268F
Fita selante, junção compacta, 1152, 1152F, 1153F
Fitocromo, **960–961**, 961F
Fixação
dióxido de carbono *ver* Fixação de carbono
nitrogênio, 12–13, **12–13**, 15F, 100
preparação de amostras para microscopia, 585, 605, 605F
Fixação de carbono, **12–13**, 69
bomba de CO_2, 846–847
cianobactéria, 840, **873–875**
cloroplastos, 69, **843–848**
CO_2 (dióxido de carbono), **12–13**, 844–845
evolução, **872–875**
hidrólise de ATP, 845, 845F
NADPH, 845, 845F
reações, 71F, **844–847**, 845F
ribulose-bisfosfato-carboxilase, **844**, 844F
Fixação de nitrogênio, 12–13, **12–13**, 15F, 100
Flagelina, 1032–1033
rearranjos de genes, 454–455, 454–455F
Flagelos, **1031–1034**
Bacterianos, 13–14F, 942, 943F, 1032–1033, 1490F
gradientes de prótons, 821–822, 823F, 839–840, 839F
comparados a cílios, 1031
espermatozoide, 1293, 1293F
motilidade, 1031F
FLIP *ver* Perda da fluorescência em fotoclareamento (FLIP)
Flor(es), 1401F
Desenvolvimento, 1413, **1413–1414**
especificação por gene seletor homeótico, 1414F
Flora microbiana
Normal, 1486, 1501
patogênica *ver* Patógeno
ver também Bactéria
Florescimento de plantas *ver* Planta(s)
FLP-recombinase, 1348, 1349F
FLP-recombinase-alvo (FRT), 1348
Fluoresceína, 586–587
Fluorescência, 586
DAPI, 587F
de Cy3, 587, 587F
de Cy5, 587, 587F
Fluxo de microtúbulo, 1085, 1086F, 1089
Fluxo em direção ao polo, 1035, 1035F
Fluxo reverso de elétron, 838, 872, 873F
Focalização isoelétrica, 2D-PAGE, 521, 521F, 522F
Folículo piloso, 1418F, 1426
Folículos
antrais, 1292
linfoides, 1550, 1551F
Folistatina, 940
Fome, liberação de cortisol, 463
Fontes de raios X síncrotron, 529
Footprinting
de DNA, 429–431, 430F
filogenético, 431, 431F
Força elétron-motriz, 814, 815F
Força polar de ejeção, 1085, 1086F
Força próton-motriz, 821, 821F, 853–854
Forças de van der Waals, 51, 51F, 54, 110F
enovelamento de proteínas, 130F
tamanho/força de ligação, 53T
Forma de laço, *splicing* de pré-mRNA, 347, 348F, 350F
Forma lepromatosa, 1593–1594
Formação bivalente, 1274, 1274F, 1276F
Formação de calos, células vegetais, 504–505, 568
Formação de dímeros
danos no DNA, 296, 298F
proteínas, 142F
ver também Proteínas de ligação no DNA
Formação de quiasma, 1274, 1274F, 1276, 1276F
Formação óssea endocondral, 1470
Formaldeído, fixação de tecidos, 585
Formilmetionina, 380, 1525–1526, 1531
Formina, 994F, 998, 999F, 1000F, 1094
Forquilha de replicação, 266, 267–268, 269F
análise de microarranjo de DNA, 285, 286F
arranjo, 276F
assimetria, 266, 268
cooperatividade, 275–276
em bactérias, 266, 276–277, 282
em eucariotos, 280, 1067
análise experimental, 284F
associação de histonas, 290
em mamíferos, 281F, 283–284
fatores de montagem da cromatina (CAFs), 290
interação dos nucleossomos, 280
montagem de nucleossomos, 289–290
resposta ao dano de DNA, 1105
taxa de movimento, 284
estrutura, 268, 269F
fita-molde, 200, 200F, 201F, 266, 266F
iniciação, 282, 282F
ver também Origem(ns) de replicação
separação das fitas, 273
ver também DNA-helicase(s): DNA-topoisomerases
síntese da fita contínua, 268, 269F, 276F, 281F
síntese da fita descontínua, 267–268, 269F, 272, 272F, 276F, 281F
ver também Replicação de DNA
Fosfatase Cdc25, 1063, 1071, 1071F
Fosfatase(s) *ver* Proteína fosfatase
Fosfatidilcolina, 618, 619F, 743, 743F
Fosfatidiletalonamina, 618 619F, 743
Fosfatidilinositol (PI), 627, 743, 796–797, 909F, 933
Fosfatidilinositol-3, 4-bifosfato [PI(3, 4)P_2], 1010
Fosfatidilinositol-3'-cinase (PI 3-cinase), **932–935**
organização da actina, 1043F, 1046
sinalização do fator de crescimento, 1108, 1109F
sinalização extracelular, 627, 627F
Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato [PI(4, 5)P_2], 909, **909**, 910F, 911FF
Fosfatidilinositol-4-fosfato [PI(4)P], 910F
Fosfatidilserina, 618, 619F, 626, 788, 1117
Fosfato diidroxiacetona, 120F
3'-Fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPs), 776, 776F
Fosfodiesterase, reparo por excisão de base (BER), 299F
Fosfodiesterase de AMP cíclico, 906, 907F
Fosfodiesterase de GMP cíclico, 918
Fosfoenolpiruvato, 121F
Fosfofrutocinase, 120F
2-Fosfoglicerato, 121F
3-Fosfoglicerato, 91, 92F, 121F
Fosfoglicerato-cinase, 91, 121F
Fosfoglicerato-mutase, 121F
Fosfoglicerídeo(s), 618, **618–620**, 619F
ver também moléculas individuais
Fosfoglicose-isomerase, 120F
Fosfoinositídeos cinase, 757, 757F
Fosfoinositídeos *ver* Fosfolipídeo(s) de inositol
Fosfoinositol (PI), 757, 757F
Fosfoinositol-cinase, 757, 757F
Fosfolipase C (PLC), **909**, 910F, 1299
Fosfolipase C fosfatidilinositol-específica, 630
Fosfolipase(s), 627
ver também fosfolipases específicas
Fosfolipídeo misturador, 627, 744–745, 744F
Fosfolipídeo(s), 9, 618
agregados, 115F
bicamadas, 59F, 405–406, 407F
ver também Bicamada(s) lipídica(s)
biossíntese, 58, 867–868
composição da membrana, 618–620
estrutura, 58–59, 59F, 114F, 618
gotículas lipídicas, **625–626**
macromoléculas celulares, 62F
moléculas anfipáticas, 58–59
propriedades, 620
síntese, estrutura, propriedades, 743–745
ver também moléculas específicas
Fosfolipídeo(s) de inositol, 624, 627F, 757, 757F, 910F, **933**
fosfatidilinositol (PI), 743, 910F
fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato [PI(4, 5)P2], 909, 910F, 911F
fosfoinositídeo-3-cinase, em câncer, 1244
localização celular, 758F
retrômero, 756
via de sinalização, **909–911**, 910F, 911FF
ver também Fosfolipase C
ver também tipos específicos
Fosfolipídeo(s) flipase, montagem da bicamada lipídica, 744, 744F
Fosforilação
cascatas, **895**
caudas de histona, 221–222, 223F
fotofosforilação acíclica *ver* Fotofosforilação acíclica
ligação de GTP vs., 180F
mediada por ATP, 84F
oxidativa *ver* Fosforilação oxidativa
proteína *ver* Fosforilação de proteínas
Fosforilação de proteínas, **175–178**
ATP como doador de fosfato, 84F
ciclos de fosforilação, 177
efeitos funcionais, 175–176, 186–187, 187F
Energética, 177
enzimas envolvidas, 176, 176F
ver também Proteína-cinase(s); Proteína-fosfatase(s)
mediado por GTP *ver* Proteínas que se ligam a GTP (GTPases)
proteínas reguladoras de genes, 450, 451F
regulação de proteína Rb, 1104
sítio de fosforilação como sinal de reconhecimento de ligação proteica, 175–176
troca GTP-GDP como alternativa para a fosforilação, 178–179
Fosforilação não-cíclica, **850–853**, 852FF
síntese de ATP, 94–95, 95F, 851
síntese de NADPH, 94, 851
Fosforilação oxidativa, 819, 819F, 820F
evolução, **870–872**, 871F
síntese de ATP, 98, 100F, 821–822, 822F, 823
transporte de elétrons *ver* Cadeia transportadora de elétrons, mitocondrial
Fósforo-32, marcador de DNA, 534
Fosfotransferase GlcNAc, 785, 786F
Fossa(s) revestida(s) por clatrina, 743F, 790F
LDLendocitose, 791–792, 791F, 793F
Pinocitose, 789–790, 789F
Fotoativação, 594–595, 595F, 596F
Fotofosforilação, **850–853**, 852FF
cíclica, 853
ver também Fotossistema(s)
Fotoproteína, 960–961
Fotorreceptores (células fotorreceptoras), 918F, 1429, **1432–1433**, 1433F
ver também Cones; Fotorreceptores Rod (rods)
Fotorreceptores Rod (rods), 1432, 1433F
amplificação de sinal na cascata de transdução visual, 919–921, 920–921F
renovação, 1433F
resposta à luz, 918F
segmento externo, renovação, 1433, 1433F
Fotorrespiração, 846–847
ver também Fixação do carbono
Fotossíntese, 69–70, **840–855**, 844F, 849–850, 850F
cloroplasto(s), **843–848**, 844F
força próton-motriz, 853–854
fotofosforilação acíclica, **850–853**, 852FF
fotofosforilação cíclica, 853
transporte de elétrons *ver também* Cadeia(s) transportadora(s) de elétrons fotossintéticos
em bactérias, 840, 863, **872–875**
ver também Cianobactérias; Bactérias púrpura
energética, **68–70**
equação, 70
estágios, 69, 70F

evolução, 840–841, 853
em bactérias, **872–875**
fixação do carbono (reações de fase escura) *ver* Fixação do carbono
fotofosforilação acíclica *ver* Fotofosforilação acíclica
fotofosforilação cíclica, 853
fotoquímica da clorofila, 847–848, 847F, 848F
ver também Clorofila(s); Fotossistema(s)
fotossistemas *ver* Fotossistemas
relação com a respiração, 70, 70F
transferência de elétrons (reações da fase luminosa) *ver* Cadeia(s) transportadora(s) de elétrons fotossintéticos
ver também componentes específicos
Fotossistema(s), **848**
centros de reação *ver* Centros de reação fotossintéticos
complexo da antena, 848, 848F
complexos de captação de luz, 848, 848F
em bactérias, 850F, 853, 854F
evolução, 853
fotossistema I, 851–852, 853, 854F
fotossistema II, 851, 851F, 852F, 853, 854F
potenciais redox, 852F, 853
relações estruturais, 853
transferência de elétrons *ver* Cadeia(s) carreadora(s) de elétrons fotossintéticos
ver também Clorofila(s); Citocromo(s)
Fototróficos, 11–12
Fototropina, **961**
Fototropismo, 961
Foxp3, células T reguladoras, 1574
Fracionamento celular, **510–512**
cromatografia, **512–514**
eletroforese, 517, 518F, 521–522
lise celular, 510
separação de macromoléculas/organelas, **510–511**, 511F
mitocôndria, 817F
sistemas livres de células *ver* Sistemas livres de células
ultracentrifugação, **510–511**, 510F, 511F,512F
ver também Análise de proteínas
Fracionamento *ver* Fracionamento celular
Fragmento de peptídeo, resposta imune, **1581–1585**
Fragmento S1, miosina, 1012
Fragmentos de Okazaki, 267–268, 269F, 272, 281F
Fragmoplasto, citocinese em vegetais superiores, **1097–1098**
FRAP *ver* Recuperação fluorescente depois de fotoclareamento (FRAP)
FRET, transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)
Frutose, estrutura, 112F
Frutose1, 6-bi-fosfato, 120F
Frutose-6-fosfato, 120F
Fugu rubripes ver Baiacu (*Fugu rubripes*)
Fumarase, 123F
Fumarato, 122F, 123F
Função de proteína, **152–196**
efeitos da fosforilação *ver* Fosforilação de proteína
enzimas *ver* Enzimas
ligação proteína-ligante *ver* Interação proteína-ligante
relação estrutura-função, 154–155
Função do ponto de espalhamento, 590
Fungos
dimorfismo, 1494
origem evolutiva, 29–30
patogênicos, **1494**
produção de antibióticos, 383–384
proteínas príon, 398
Fusão de DNA, 537F
Fusão de domínios, proteínas de ativação, 442F
Fusão de membrana heterotípica, 768
Fusão de membrana homotípica, 768, 769F
Fusão pró-núcleo, 1301, 1301F, 1302F
Fuso mitótico, 208F, 1054
como máquina com base em microtúbulo, **1075–1077**, 1076F, 1079
arranjo bipolar, **1034–1035**, 1075–1076, 1077, 1081
classes, 1034, 1035F
instabilidade, 1035, **1080**, 1081F
montagem, 1034–1035, 1035F
ver também Microtúbulo(s); Proteína(s) motora(s)
comprimento, 1079
desmontagem, 1054–1055, 1090
divisão celular assimétrica, **1099**, 1099F
filamentos intermediários, 966–967
lamelipódio, 1039
ligação dos cromossomos, **1082–1083**, 1084F
cromossomos não-ligados, 1088
forças agindo sobre, **1085–1087**, 1085F, 1089
mecanismo de biorientação, **1083–1085**, 1084F
ver também Cinetocoro
montagem, 712F, **1077–1082**, 1077F, 1078F, 1079F, 1082F, 1088
plano de divisão da citocinese, **1095–1097**
visualização da fotoativação, 594–595,595F
ver também Cromossomo(s) mitótico(s)

G

G_1/S- Cdk, 1062, 1066, **1103–1105**
G_1-Cdk, 1062, 1066, **1103–1105**
GABA (ácido γ-aminobutírico)
função como neurotransmissor, 684, 808
receptor, droga de efeito psicoativo, 686
GAGs *ver* Glicosaminoglicanos (GAGs)
Galactocerebrosidase, 628F
Galactose, em oligossacarídeos ligados ao N, 773F
Gameta(s), 1269
estado haploide, 1269, 1272, 1281
produção por divisão celular *ver* Meiose
ver também Óvulo; Espermatozoa
Gânglio simpático, 1390F
Gânglios sensoriais do crânio, 1384F
Gangliosídeo(s)
GM1, 628F, 629
Membranas, 628
GAP *ver* Proteínas ativadoras de GTPase (GAPs)
Gástrula, 1363F
Gastrulação, 1307
origem do intestino pela, 1307, 1307F
ouriço-do-mar, 1307F
Xenopus ver Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
GATA-1, 418T, 451F, 1456
GEF *ver* Fatores de troca de nucleotídeos guanina
Gel
GAGs e, 1179–1180
proteínas formadoras de gel, 1006, 1009F
Gel de eletroforese em campo pulsado, 534
Gelo vítreo, 605, 610
Gelsolina, 994F, 1000
Gema, 1287, 1290
Geminina, destruição por APC/C, 1068–1069
GEMS (geminina de corpos enrolados), 363–364, 364, 365F
Gene *Abl*, em leucemia mielogenosa crônica, 1261, 1261F
Gene *Achaete*, 1356
Gene *Agamous*, 1414F
Gene *Apetala2*, 1414F
Gene *Apetala3*, 1414F
Gene *Apterous*, 1352, 1353
Gene *Atoh1*, 1432
Gene *Bcr*, leucemia mielogenosa crônica, 1261, 1261F
Gene *Branchless*, 1382
Gene *Breathless*, 1382
Gene *Cdc*, 1056–1057
mutantes sensível à temperatura, 1057, 1057F
Gene *Ced3*, 1327, 1327F
Gene *Ced4*, 1327, 1327F
Gene *Ced9*, 1327, 1327F
Gene *Cesa* (celulose-sintase), 1199–1200
Gene *Dac* (*dachsund*), 466F
Gene de β-globina, 256
estrutura da cromatina, 288
humano *vs.* camundongo, 250F, 323F
mutações, 288, 288F, 355F, 452
ver também Talassemia, Anormalidade na estrutura da β-globina, 348F
processamento anormal do pré-mRNA, 355F
regulação da expressão gênica, 450–452, 451F
sequência de DNA humano, 199F, 200F
Gene *Decapentaplégico* (*Dpp*), 1335F
Gene *Distal-less*, 1351, 1351F, 1355
Gene *doublesex (Dsx)*, determinação do sexo em *Drosophila*, 481F, 482F
Gene Drk, 928F
Gene *Dscam*, *splicing* alternativo, 479F
Gene *Env*, HIV (vírus da imunodeficiência humana), 1521
Gene *Eve* (*eve-skipped*)
controle combinatório, 448–450, 449F
controle modular do padrão de expressão, 448–449, 448F, 449F, 1337, 1339, 1339F
Gene *Eya* (ausência de olhos), 466F
Gene *Hairy*, 1337, 1371
Gene *Hes1*, 1371
Gene heterocrônico, 1326–1327, 1326F
Gene *HIS*, *Saccharomyces cerevisiae*, 285F
Gene *Islet*, 1385
Gene *K-Ras*, 1251–1252, 1252T, 1255
Gene *lefty1*, 1377
Gene *Let7*, 1327
Gene *lim*, 1385
Gene *lin14*, 1326F
Gene *lin4*, 1326
Gene *MyoD*, 464F
Gene *Ras*, 1107, **1233–1234**, 1241, 1242, 1242F
Gene relógio *per*, 462F
Gene relógio *tim*, 462F
Gene repórter
análise da expressão gênica, **572–573**, 572F
GFP *ver* Proteína fluorescente verde (GFP)
LacZ, 442F
Gene *RhoC*, na metástase, 1249
Gene *Scute*, 1356
Gene *sex-letal* (*Sxl*), determinação do sexo em *Drosophila*, 481F, 482F
Gene *Smad4*, câncer colorretal, 1255
Gene *So (sine oculis)*, 466F
Gene *Sog*, 1335
Gene *Teosinte branched-1 (Tb1)*, 1411
Gene *toy* (*twin of eyeless*), 466F
Gene *transformador (Tra)*, determinação do sexo em *Drosophila*, 481F, 482F
Gene *Unc*, 1388
Gene *Unc6*, 1388
Gene(s)
amplificação
em câncer, oncogenes, **1237–1239**
PCR *ver* Reação em cadeia da polimerase (PCR)
críticos para o câncer *ver* Genes críticos para o câncer
definição, **7–8**, 195, 204, 440, 554F
história de conceitos, 480–481
modificações, 480–481
estrutura do DNA, **199–200**, 202
ver também Estrutura do DNA; Código genético
estrutura *ver* Estrutura de genes
expressão *ver* Expressão gênica
função(ões)
análise bioquímica, **23–24**
dedução de fenótipos mutantes, **23–24**, **553**
mutações dirigidas, 575
nocautes dirigidos, 570
manutenção, 434, 470
predição pela homologia da sequência, **22**
resistência a antibióticos, 318F
geração a partir de genes pre-existentes, **18–19**
homólogos, 20–21, 20F, 21F, 246
identificação, 207, 329, 429, 560F
ver também métodos específicos
impressão *ver* Impressão genômica
inovação evolutiva, 19
localização do cromossomo, 204–205, 204F, 554F
ver também Mapa genético
localização *ver* Mapeamento genético
manipulação *ver* Tecnologia do DNA recombinante; Organismo(s) transgênico(s)
números, 204, 204F
ortólogos, 20–21, 20F, 21F
parólogos, 20–21, 20F, 21F
perda, células de câncer, 1232
ver também Genes críticos para o câncer
pseudogenes *ver* Pseudogenes
sequenciamento *ver* Sequenciamento de DNA
unidades de transcrição, 336–337
ver também genes de início de entrada/genético
Gene(s) mutante(s), 276–277
Gene(s) precoce(s) imediato(s), 929
Gene/proteína *Daz*, regulação da espermatogênese, 1295–1296
Gene/proteína *Dishevelled*, polaridade de célula planar, 1158, 1359
Gene/proteína *Dpp* (decapentaplégico), 1335, **1353**, 1353F, 1355
Gene/proteína *engrailed*, 1306F, 1340–1341, 1340F, 1352, 1352F
estrutura de proteína *vs.* proteína de levedura alpha2, , 138F
Gene/proteína *Ey (Eyeless), 466, 466FF, 1306F, 1352*
Gene/proteína *Frizzled, 1316T*
desenvolvimento de *C. elegans, 1324, 1325*
polaridade de célula planar, 1158
via de sinalização polar, 1359
Gene/proteína *Gal4*, 1350F
reconhecimento da sequência de DNA, 418T

Gene/proteína *Lkb1*, polaridade epitelial ápico-basal, 1155–1156, 1156F
Gene/proteína *p21*, 1105, 1106F, 1246
Gene/proteína *p53*
apoptose, 1123, 1127
formas mutantes superexpressas, 1246
interação de proteína Mdm2, 1105
ligação ao DNA, 418T, 423, 424F
modificações, 187F
modo de ação, 1246, 1246F
parada do ciclo celular em resposta ao encurta-mento telomérico, 1217
pontos de verificação no DNA danificado, 1105, 1106F
supressão de tumor, mutado em câncer, 1106, 1127
câncer colorretal, 1251–1252, 1252T
inativação por proteína de vírus tumoral de DNA, 1517–1518
sua deficiência como alvo na terapia do câncer, 1257
Gene/proteína *Par*, polaridade do epitélio ápico-basal, 1155–1157, 1156F, 1157F
ver também gene/proteínas específicas
Gene/proteína *Par3*, polaridade do epitélio ápico-basal, 1156–1157, 1157F
Gene/proteína *Par4*, polaridade do epitélio ápico-basal, 1155–1156
Gene/proteína *Par6*, polaridade do epitélio ápico-basal, 1156–1157, 1157F
Gene/proteína *slug*, transição epitelial-mesenquimal, 1141
Gene/proteína *snail*, transição epitelial-mesenquimal, 1141
Genes críticos para o câncer, **1230–1241**
análise em camundongos transgênicos, **1241–1242**
análise no desenvolvimento de embriões, **1241–1242**
identificação, **1230–1241**
anomalias cromossômicas, 1231–1232
dominante *vs.* recessivo (oncogene *vs.* gene de supressão tumoral), 1232F
ensaio de transformação celular, 1232–1233
gene *Ras*, **1233–1234**
gene *Rb*, 1234–1235, 1336F
Gene/proteína p53 e, 1106
Gene/proteína *Rb*, 1104–1105, 1234–1235, 1344F
perda de heterozigose, 1236
retrovírus, 1233
síndromes de câncer hereditárias, **1234–1235**
tipos variados de mutação, 1234–1236
ver também Mutações; Oncogene(s); Genes supressores de tumor (TSGs); *genes individuais*
regulação na proliferação celular, **1242–1244**
Genes da polaridade do ovo (*Drosophila*), **1332–1335**, 1332F, 1334F
Genes Dally/similares a Dally, 1184, 1184T
Genes de efeito zigótico, 1337
Genes de globina
α-globina, 256–257
β-globina *ver* Gene de β-globina
δ-globina, **256–257**, 451, 452F
γ-globina, 451, 452F
grupos de genes, 450–451, 451F, 452F
evolução por duplicação, 256–257, 256F
pseudogenes, 257
regulação da expressão, **450–452**, 451F, 452F
ver também Regiões de controle de lócus
Genes de manutenção (*housekeeping*), ilhas CG (CpG), 434, 470
Genes de polaridade de segmento, 1333, 1338F, 1339
Genes de receptores de odor, 1430
Genes de segmentação de *Drosophila melanogaster*, **1336–1338**, *1337F, 1338F*
gene gap, 1333, 1337–1338, 1337F, 1338F
genes de polaridade do segmento, 1333, 1338F, 1339
genes pair-rule, 1333, 1337–1338, 1337F
padrão de controle do DNA de regulação (gene *eve*), 447–450, 448F, 449F, 449FF, **1339–1340**, 1339F, 1340F
ver também genes individuais
Genes de virulência, bacterianos, 1491
Genes Gap, 1333, 1337–1338, 1337F, 1338F
Genes homeobox *ver* Genes homeóticos (homeobox)
Genes homeóticos (homeobox), 420, 1338F, **1341–1347**
complexos Hox *ver* Complexos Hox
desenvolvimento floral, **1413–1414**, 1414F
Drosophila ver Drosophila melanogaster
membros da família em diferentes eucariotos, 1400T
ordenamento cromossômico nos complexos Hox, 1343–1344
ver também Proteínas de homeodomínio; Genes Hox
Genes homeóticos de *Drosophila melanogaster*, **1341–1347**
complexo Hox, **1342–1347**
ver também Complexo Hox; Genes Hox
complexos bithorax e Antennapedia, 1342, 1342F
estratégia de repetição modulada, 1341–1342
expressão sequencial do gene Hox, 1343–1344, 1343F
grupos de genes Polycomb e Trithorax, 1344, 1345F
homologias com vertebrados, **1344–1347**, 1346F, 1346FF
mecanismo de memória, 1344
mutação, 1342
valores posicionais, 1344
ver também genes específicos
Genes homólogos, 20–21, 20F, 21F
Genes Hox, 1345, 1355
Genes marcadores *ver* Gene(s) repórter(es)
Genes ortólogos, 20–21, 20F, 21F
Genes *pair-rule*, 1333, **1337–1338**, 1337F
Genes parálogos, 20–21, 20F, 21F
Genes precoces, efeito da condensação da cromatina, 285–286
Genes supressores de tumor (TSGs), 1231, 1232F
genético *vs.* mudança epigenética, 1237F
identificação, **1234–1235**
mecanismo de perda, 1236F
perda por mutação, 1235–1236
síndrome de câncer hereditário, **1234–1235**
ver também proteínas/genes individuais
Genes tardios, efeito da condensação da cromatina, 285–286
Genética
clássica, 553, **554–527**
análise de ligação, 560F
aspectos históricos, 195–196, 195–197
ciclo haploide-diploide, 554F
ver também Meiose
cromossomos *ver* Cromossomos
dois genes ou um?, 527–528F
ver também Testes de complementação
fenótipo, 553, 554F
genes *ver* Gene(s)
genótipo, 553
heterozigotos, 554F
homozigotos, 554F
mutação *ver* Mutação(ões)
recombinação *ver* Recombinação genética
teste de complementação, 527–528F, 558
reversa, 553, 563, **563–564**, **575**
alteração da sequência da proteína, 565F
geração de mutante de ganho de função, 564F
geração de mutante dominante-negativo, 564FF
mutações da linhagem germinativa, 575
mutagênese *in vitro*, 575
mutagênese sítio-dirigida, 565F
RNA de interferência (RNAi), 572
substituição de genes, 567F
ver também Recombinação; Organismo(s) transgênico(s)
técnicas, 563–564
ver também Clonagem de DNA; Engenharia genética
Genética clássica *ver* Genética, clássica
Genética de leveduras
DNA mitocondrial, 863
Herança, 864–865, 865F
mutantes petite, **866–867**
mutagênese, deleções de cassetes, 570
proteína de regulação gênica, reconhecimento da sequência de DNA, 418T
Genética de mamíferos
conservação gênica, 39–40
impressão, 468–470
proteína de regulação gênica, 418T
regiões de controle gênico, 450–453
Genética forense, 547F
Genética humana, 556
Genética reversa *ver* Genética reversa
Genoma humano, **205–206**, 206T
biblioteca de DNA genômico, 541, 542F
complexidade, 142, 205–206
composição, 207F
elementos Alu, 323F
elementos móveis, 207F, 318T, 323
ver também Elementos genéticos móveis
ver também DNA não-codificante
Cromossomos, 202, 202–203FF
alças T, 293F
cromossomo 22, 205F, 206T
organização gênica, 205F
origem de replicação, 287–288
taxa de replicação, 283
translocação do cromossomo 11–12, 204F
escala, 206F, 206T, 209F
genes, 142,206T
estrutura, 205–207, 205F, 206, 206T
ver também Estrutura de genes
regulação, 206
tamanho, 206
mitocondrial, 861–862, 861F
reconstrução de filogenia, 248F, 251F
retrotransposons tipo não-retroviral, 321–322
sequenciamento, 142, 205–206
comparativo, 207, 247, 247F, 248F
Projeto do Genoma Humano, 205–206, 206, 532
Tamanho, 18T
variação individual, 41
Genoma mitocondrial, **856–857**, 861F, **868–870**, 869F
diversidade, **859**, 861F
número de cópias, 857T, 858
tamanhos, 859F
doença mitocondrial, 866
evolução, **859–860**, 861F
manutenção, **868–870**
taxa do relógio molecular, 862
expressão gênica, 483, 484F, 861–862
transcrição, 863
herança não-mendeliana, **864–865**, 865F, **866**
humano, 861–862, 861F
mutações, 866
nucleoides, 859
número de cópias, 858
replicação do DNA, 856–857, 857F, 858
variações do código genético, 367, 862, 862T
Genoma(s), 8, 200
Arabidopsis thaliana, 142
camundongo *ver* Camundongo
clonagem, 541–542
ver também Clonagem de DNA; Bibliotecas de DNA
codificando a informação, 329, 330F, 331, 331F
dogma central *ver* RNA mensageiro; Transcrição; Tradução
potencial, 348
ver também Evolução do genoma
ver também DNA (ácido desoxirribonucleico); Expressão gênica; Código genético
complexidade, 142, 204–205
ilhas CG (CpG), 470–471
número de genes em diferentes organismos, 18T, 863–864, 864F
regiões não-codificantes *ver* DNA não-codificante
variação no comprimento íntron/éxon, 352, 353F
composição, 329
controle do desenvolvimento multicelular, **31–32**, 32F
cromossomo *ver* Cromossomo
diversidade, **11–26**
duplicações, *Xenopus*, 38–39
evolução *ver* Evolução do genoma
HIV, 485F
humano *ver* Genoma humano
mitocondrial *ver* Genoma mitocondrial
movimentos de transposons, 323
organelas
cloroplasto *ver* Cloroplasto(s), genoma
mitocondrial *ver* também Genoma mitocondrial
organismos completamente sequenciados, 18T
replicação, 200
ver também Replicação de cromossomo; Replicação do DNA
sequenciamento *ver* Sequenciamento do genoma
sintenia conservada, 207, 208F, 250
variações de tamanho, 18T, 30–31, 200, 246, 251
complemento de genes mínimo (*Mycoplasma*), 10, 570–571

mínimo para vida, 10, 11F
ver também Evolução do genoma
ver também espécies individuais
Genômica
análise da sequência do genoma, 552
comparativa *ver* Genômica comparativa
nocautes dirigidos, **569–571**
Genômica comparativa, 22, 207, **245–260**
criação da árvore filogenética, 247, 247F
humano *vs.* camundongo, 249F
humano *vs.* chimpanzé, 247, 248F
impressões de pegadas filogenéticas, 431, 431F
Genômica funcional, nocautes dirigidos, **569–571**
Genótipo, 553, 554F
Germinação, reservas de energia, 95
GFP *ver* Proteína fluorescente verde (GFP)
Giardia, na árvore da vida, 16F
Giberelinas, 957, 1403
Glândula mamária
Alvéolo, 1427–1428, 1427F
células mioepiteliais, 1427F
desenvolvimento e ciclos de regressão, 1426–1428, 1427F
lâmina basal, 1428
Glândula pineal, relógio circadiano, **461**
Glândula salivar, politenia em *Drosophila*, 236–238, 237F, 237FF
Glândula sebácea, 1418F
Gleevec (STI-751), terapia de leucemia mielogenosa crônica, 1261
Gliceraldeído, 112F
Gliceraldeído-3-fosfato, 91, 92F, 120F, 121F, 846
ciclo de fixação do carbono, 845, 845F
fonte de carboidrato, 854
glicólise, 854–855
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 91, 121F
Glicina, 129F
função do neurotransmissor, 684, 808
Glicocálice, 636, 637F
Glicocorticoide, regulação da expressão gênica, 412, 415, 463, 463F
Glicogênio, 91, 94, 94F
Glicogenio-sintase cinase 3β (GSK3β), 949, 949F
Glicolipídeo(s)
Agregados, 115F
diversidade da cadeia lateral, 636
estrutura, 115F
Membranas, 628–629, 628F
síntese, retículo endoplasmático (RE), 744–745
Glicólise, **88–91**
anaeróbia, 88, 839
ver também Fermentação
armazenamento de energia por acoplamento de reações, 91, 92F
cloroplastos, gliceraldeído-3-fosfato, 854–855
energia, 91
enzimas, 88–89, 88–89, **91**, 92F, **120–121FF**
ver também enzimas específicas
evolução, 88
função de NAD+/NADH, 89
interrelações metabólicas, 102F
produção de ATP (ganho líquido), 89, 121F
via, 89F, 91, 92F, 93F, **120–121FF**
Gliconeogênese, 102
Glicoproteína ZP1, 1298
Glicoproteína ZP2, 1298, 1300
Glicoproteína ZP3, 1298, 1300
Glicoproteína(s), **635–636**
adesão célula-célula, 636
síntese, **736–738**, 737F, 747F
Glicosaminoglicanos (GAGs), **1179–1180**
estrutura, 1179, 1179F, 1180F
forças compressivas, 1180–1181
lâmina basal, 1165
ligação proteica *ver* Proteoglicanos
produção de proteoglicanos, 776
ver também tipos específicos
Glicose
biossíntese de dissacarídeos, 57F
estrutura, 56F, 112F
oxidação, 57, 100F, 120F
rendimento total de energia, 523, 524T
ver também Glicólise,
transporte, 657, 798
Glicose-6-fosfato, 120F
Glicosfingolipídeo(s)
balsas (plataformas) lipídicas, 807
endereçamento de proteínas, **806–807**
síntese, retículo endoplasmático (RE), 744–745
Glicosilação, **776–777**
proteínas *ver* Glicosilação de proteínas
Glicosilação de proteína, 388F, **736–738**, 737F, 747F
ver também Retículo endoplasmático (RE)
Glicosil-transferase, função de dobramento da proteína, 739
Glioblastomas, fator de crescimento da epiderme (EGF), 1238
Glioxissomo(s), 722, 722F
Glipicano, 1184
Globina(s),256
Fetal, 256, 256F
genes *ver* Genes de globina
homologia e árvore evolutiva, 21F, 256F
ver também tipos específicos
Glóbulo fundido, 387–388, 388F
Glomérulo, do bulbo olfatório, 1430
Glomérulo renal, lâmina basal, 1164–1165, 1164F, 1167
Glucagon, 907T
Glutamato (ácido glutâmico)
estrutura129F
papel dos neurotransmissores, 684, 690–691, 808
Glutamina, estrutura, 129F
Glutamina-sintase, hidrólise de ATP, 81F
Glutaraldeído, 585, 605, 605F
Glutationa-dismutase, 868
Glutationa-S-transferase (GST), marcação de proteínas, 514–515, 515F, 516F
GMP cíclico (cGMP)
canal de sódio regulado por GMP cíclico, 917
fotorreceptores, **917–918**, 917F
resposta ao NO, 887, 888F
Gordura marrom, 828
Gordura(s)
armazenamento, 8F, 91, 94
Composição, 58–59
ver também Ácidos graxos
digestão, 96
estrutura, 97F
fonte de energia, 94, 94, 96, 824T
ver também Lipídeos; *tipos específicos*
Gotículas de gordura, 1474
Grades, microscopia eletrônica, 605, 605F
Gradiente de concentração, 653
Gradiente eletroquímico, 654F
Gradiente eletroquímico de prótons, 653, 813, 821F, **827–840**, **853–854**
acoplado ao transporte ativo, 822, 823F
através de membranas bacterianas, 839,839F
flagelo bacteriano, 821–822, 823F
força próton-motriz, 821, 839F
fotofosforilação não-cíclica, 850–851, 852F
geração, 100, 100F, 820–821, 821F
ver também Bombas de prótons
gradiente de Ph, 820–821, 821F
importação de proteínas mitocondriais, 716–717, 716F
membranas e, 640, 655, 820–821, 821F
produção de ATP, 661–662, **817–819**, 819F, **822–824**
ver também ATP-sintase
quimiosmose, **813–814**, 814F
Gradiente(s) morfogênico(s)
definição, 1318–1319
destino da célula dependente da posição, 886, 886F
disco imaginal da asa de *Drosophila, 1352*
ovo de *Drosophila*, 1333–1335, 1334F, 1335F
ver também morfógeno(s) específico(s)
Gradientes de cloreto de césio, 511
Gráfico de Ramachandran, ângulos das ligações peptídicas, 127F
Grampos reunidos, estrutura de RNA
Grânulo(s), células fagocitárias, 1532
Grânulo(s) secretor(es) *ver* Vesícula(s) secretora(s)
Granulócito CSF (G-CSF), 1460T
Granulócito(s), 1460, 1460T
ver também Basófilos; Eosinófilos; Neutrófilo(s)
Granulócito/macrófago (GM), células progenitoras, 1460
Granulócito/macrófago CSF (GM-CSF), 1460T, 1461T
Grânulos da gema, 1287
Grânulos P, 1323, 1323F
Grupo heme, 830F, 831
anéis de porfirina, 830F, 831
coordenação do ferro, 166, 166F
Grupo Polycomb, 1344, 1345F
Grupo trithorax, 1344
Grupos amina, 107F
Grupos carboxila, ácidos graxos, 114F
Grupos de anemia de fanconi A-G, desordens do reparo de DNA, 295T
Grupos de grânulos de intercromatina (*speckles*), 241, 241F, 363–364, 365F
Grupos fosfato, 107F, 175
Grupos químicos, 107F
GSK3β, 950, 952F
GTP (trifosfato de guanosina), 98
estrutura, 99F
fosforilação de proteína, **178–179**
GTPase monomérica *ver* Proteína ligadora de GTP (GTPase)
GTPase recrutadora de revestimento, **758–760**
ver também proteínas ligadoras de GTP (GTPases)
GTPase *ver* Proteínas de ligacão a GTP (GTPases)
Guanilil-ciclase
Regulação, 888F, 889
ver também Receptor de guanilil-ciclases
Guanil-transferase, capeamento 5′ de Mrna, 346–347, 347F
Guanina, 197
desaminação, 301F
estrutura, 116F, 301F
estrutura de RNA, 331–332
pareamento de base, 198F
Guia de RNAs, 361, 362F
edição de RNA, 483, 484F

H

H^+ (próton) *ver* Íon hidrogênio (H^+, próton)
Haemophilus influenzae, sequência genômica, 551–552
Halobacterium salinarum, **640–642**, 640F
Haloferax, na árvore da vida, 16F
HATs *ver* Histona-acetiltransferases (HATs)
HDACs *ver* Histona-desacetilases (HDACs)
Hélice
direção, 143
dupla (DNA) *ver* Estrutura do DNA
estrutura molecular comum, 143, 145
propriedades, 146F
Hélice interruptora, proteínas que se ligam a GTP, 181
Helicobacter pylori
causa de câncer de estômago, 1228, 1229
colonização no estômago, 1503
doença crônica, 1500
tamanho genômico, 18T
Hemangioblastoma, 1449
Hematoxilina, 585, 585F
Hemidesmossomo(s), 1134, 1134F, 1135T, 1170, 1171F
anexo de filamentos intermediário, 1144F, 1171F
filamentos de queratina, 986
Hemofilia, mutação, 348F
Hemoglobina (Hb), 21F
cooperatividade, 256, 256F
coordenação do ferro, 166, 166F
estrutura, 144F, 166F, 256–257
cadeias de globina, 256–257, 256F
grupos heme *ver* Grupos heme
ver também Globina(s)
evolução, **256–257**, 256F
genes, homologias, 20
ver também Genes de globina
interações de subunidades, 142–143, 143F
Hemolisina, *Listeria monocytogenes*, 1510–1512
Hemopoiese, **1450–1463**
a partir de células-tronco multipotentes, 1456
comprometimento, em, 1456–1458
ver também Células amplificadoras transitórias
controle, 1454
múltiplos pontos de controle, 1461F
por apoptose, 1462
por fatores estimuladores de colônia, **1459–1461**
diagrama de linhagem (esquema), 1457F
medula óssea, 1453–1456
morte celular em, 1462
ver também Eritropoiese; Célula-tronco hemopoiética
Hepatite, 1503
Hepatócito(s), 1442, 1443–1444
expressão gênica mediada por glicocorticoide, 412, 415, 463
micrografia eletrônica, 698F
organelas, quantidade de membranas, 697T
retículo endoplasmático liso, 725
"Herança da proteína-apenas", levedura, 398, 398F
Herança materna
genoma de cloroplasto, 866, 866F
genoma mitocondrial, 865F, 866
Herança não-mendeliana, **864–865**, 865F, **866**, 866F
Herança-citoplasmática *ver* Herança não-Mendeliana

Hereditariedade, 1, 195
Epigenética, 291, 702, 704
estrutura da cromatina, 230–234, 232F, 473–476
metilação do DNA, 467–468, 467F
modificação das histonas, 290–291,291F
"herança de proteína-apenas", levedura, 398, 398F
não-mendeliana, **864–865**, 865F
cloroplasto(s), **866**, 866F
materno, **866**
transmissão da informação, **1–5**
Hereditariedade, 195
definindo características da vida, 1
ver também Herança
Hermafrodita, *C. elegans*, 1321
Heterocárion(s), 509F, 643, 643F
Heterocromatina, **220–222**, **238–239**, 1070
centromérica (cêntrica), 220
ver também Centrômero(s)
dinâmica, 220
formas múltiplas, 238–239, 238F
função biológica, 220–221
hereditariedade, 220–221, 220–221F
inativação do X, 474–475
modificação de histona, 238–239
organização, 220–222
regulação da expressão gênica, 366, 445, 452–453
efeitos posicionais e efeito de posição variegado, 220–221, 220–221F
inativação do X, 285
silenciamento de genes, 220, 220–221F
ver também Silenciamento gênico; Elementos isoladores
repetições curtas em *tadem*, 547F
replicação, 285
Heterodúplex, recombinação meiótica, 314, 314F
Heterozigoto, definição, 554F
Hexoquinase, 120F, 159
Hexoses, 112F
Hialuronana (ácido hialurônico, hialuronato), 1179, **1180–1181**, 1180F
Hialuronidase, 1181
Hibridização de DNA, 306
coloração de cromossomos, 202–203
condições de hibridização, 535–536, 537F
hibridização DNA-RNA, 535–537, 538F
Northern blotting, 538–539, 539F
interações entre bases não-pareadas, 306F
modelo de pareamento de bases recombinacional, 306F
nucleação da hélice, 306F
Southern blotting, 539–540, 539F
tecnologia de DNA recombinante, 532
ver também Sonda(s) de DNA
Hibridização DNA-RNA, 536–537, 538F
ver também híbridos DNA-RNA
Hibridização genômica comparativa (CGH), identificação de célula tumoral, 1239, 1239F
Hibridização *in situ* (ISH), 572–573, 573F
fluorescência (FISCH), *puffs* de cromossomos, 239
Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), puffes cromossômicos, 239
Hibridomas, **508–509**, 509F
Híbridos RNA-DNA, 338, 536–537, 538F
Hidra, reprodução por brotamento, 1269, 1269F
Hidrocarboneto(s), 106F, 623, 623F
Hidrogênio, estrutura atômica, 46F
Hidrolase lisossomal, 785F, 786F
Hidrolases ácidas, lisossomos, 779–780
Hidrólise, 85F
açúcares, 56, 57F, 164–165
ATP *ver* Hidrólise de ATP
macromoléculas, energia, 84–87
nucleotídeos *ver* Nucleotídeo(s), hidrólise
Hidrólise de ATP, 80F
acoplado a reações biossintéticas, 81, 81F, 824–825
ácidos nucleicos, 86, 87F
acoplado à replicação do DNA, 273, 273F
aminoacil-tRNA-sintetases, 371
ATP-sintase, 826, 826F
condensação dos cromossomos, 243
deslizamento do nucleossomo, 215–216
energéticos, 81, 86, 86F, 824–825, 825F
espliceossomos, 351–352
fixação do carbono, 845, 845F
glutamina-sintase, 81F
importação de proteínas mitocondriais, 716–717
motilidade do espermazoide, 1293
via alternativa, 86F
Hidroxilisinas, colágenos, 1186, 1187F
Hidroxiprolinas, 1186, 1187F, 1190
5-Hidroxitriptamina (5-HT) *ver* Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT)
Hipermutação somática, anticorpos, **1566–1567**, 1567F
Hipocampo, receptor de glutamato, **690–692**
Hipoderme (camada subcutânea), 1418, 1418F
Hipopigmentação (albinismo), 786
Hipotálamo, relógio circadiano, 461
Hipótese da fita imortal, 1424–1426, 1425F
"Hipótese de definição de éxon", 352, 353F
Hipótese do código de histonas, **224–226**, 226F
Hipótese do mundo de RNA, 300, **400–404**, 402F, 408F
código genético limitado, 407
seleção natural, 404–406
sistema de autorreplicação, 401, 402F
transição a partir do mundo de RNA, 402–403
ver também RNA catalítico; Ribozimas
Hipótese do sinal, transporte de proteínas, 726–727, 727F, 728F
Hipótese endossimbiótica, origem evolutiva de organelas, 859–860
Hipoxantina, 300, 301F
Hipoxia, ativação da angiogênese, 1221
Histamina, 804, 1556
mastócitos, 1557F
liberação, **804**, 804F
secreção, **804**, 804F, 1557F
Histidina, 128F, 548
Histologia
células endoteliais, **1445–1450**
epiderme, **1417–1428**
epitélios sensoriais, **1429–1433**
fígado, **1442–1444**
intestino, **1436–1444**
vasos sanguíneos, **1445–1450**
vias aéreas, **1434–1436**
Histona chaperona *ver* Fatores de formação da cromatina (CAFs)
Histona H1, 218–219, 218–219F
Histona H2A, 211
dímero H2B, 290
interações, 212, 214F
modificações, 216F
variantes, 224F, 474–475
Histona H2B, 211
dímero H2A, 290
interações, 212, 214F
modificações, 216F
Histona H3, 211
hipótese do código de histonas, 225, 225F
interação, 212, 214F
modificações, 187, 187F, 226, 226F, 290–291, 291F
tetrâmero H4, 290–291
variante CENP-A específica do centrômero, 231–232, 232F
variantes, 224F, 475
Histona H4, 211
conservação evolutiva, 213, 265
Interação, 212, 214F, 217–219, 218–219F
Modificações, 290–291, 291F
tetrâmero H3, 290–291
variantes, inativação do X, 475
Histona(s), **211–216**
adição ao DNA (pós-replicação), 290
análise, 211F, 212F
conservação evolutiva, 213
dobramento, 212, 213F
estrutura, 212, 213, 213F, 214F
genes, 289
herança após a replicação, 290–291, 291F
interações proteína-DNA, 212–213
modificação *ver* Modificação de histonas
mutações, 213
mutagênese *in vitro*, 213
octâmero de histona, 211, 212
fase S, 1070
formação, 212, 214F
identificação, 212F
síntese na fase S, 289–290
variantes, 224, 224F
ver também histonas individuais
Histona-acetiltransferases (HATs), 221–222, 343,343F
Histona-desacetilase (HDACs), 221–222, 446F
Histoplasma capsulatum, 1494, 1494F
HIV (vírus da imunodeficiência humana), 1496F, 1581
atenuação da transcrição, 478
ciclo da vida, 321F, 486, 486F
correceptores, 1504–1506, 1504–1505F
desenvolvimento de vacina, 1521
elemento de resposta a Rev (RRE), 485, 485F, 485F
entrada na célula e desnudamento, 764–765, 765F, 1504–1506, 1506F, 1507
corpos multivesiculares, 797
estrutura da transcriptase reversa, 321F
genoma, 485F, 1498–1499F, 1521
ligação ao receptor de quimiocina, 765F
movimento de microtúbulos com base em axônios, 1517
mudança da fase de leitura traducional, 383, 384F
peptídeo de fusão, 1507
proteína Nef, 485F
proteína Rev, 443F, 485–486, 485F, 486F
proteína Tat, 478, 485F
receptores, 1504–1506, 1504–1505F
resistência a drogas, 1521
sobre câncer, 1228T
taxa de mutação, 1520–1521
transporte nuclear regulado, 443FF, **485–486**, 485F, 486F
ver também tipos específicos
HIV-1, 1521, 1521F
HIV-2, diversificação e origem, 1521F
HNPCC *ver* Câncer de cólon hereditário não-polipomatoso (HNPCC)
hnRNPs, 353F, 358
Homo sapiens ver Humano (*Homo sapiens*)
Homogenato(s) de células, 510, 512
Homologia, 20F, 246
Homozigoto, definição, 554F
Homúnculo, 1391
Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), 803F, 907T
Hormônio antimülleriano, 1285, 1286F
Hormônio da tireoide, 890, 907T
Receptor, 891F
Hormônio estimulador de melanócitos (MSH), produção, 803F
Hormônio folículo-estimulante (FSH), 1292
Hormônio luteinizante (LH), 907T, 1292
Hormônio paratireoideo, 907T
Hormônio sexual, 890
Hormônios, 882
regulação da expressão de genes, 412, 415, 463, 463F
ver também hormônios individuais
Hormônios reprodutivos, efeito na incidência de câncer, 1229
ver também hormônios específicos
Hormônios vegetais (regulação do crescimento), **957**, **1403**, **1406**, 1406F
HPLC (cromatografia líquida de alta performance), 513
Humanos (*Homo sapiens*)
como organismo-modelo, **40**
genoma *ver* Genoma humano
na árvore da vida, 16F
Huntingtin, comparações de sequência, 251F

I

ICAMs *ver* Moléculas de adesão intercelular (ICAMs)
Idade/envelhecimento
prematuro, defeitos no reparo do DNA, 295T
relação com a diminuição do telômero, 293–294
ver também Câncer
Identificação de proteína, **519–532**
espectrometria de massa, **519–521**
ver também Análise de proteínas; Purificação de proteína
IFNs *ver* Interferon(s)
IgA *ver* Imunoglobulina A (IgA)
IgD *ver* Imunoglobulina D (IgD)
IgE *ver* Imunoglobulina E (IgE)
IgG *ver* Imunoglobulina G (IgG)
IgM *ver* Imunoglobulina M (IgM)
Ilhas CG (CpG), 434, **470–471**, 1527
dano de DNA, 300–301, 470
evolução, 434, 470
função na imunidade inata, 1530
Ilhas de patogenicidade, 1491, 1491F
Ilhotas de Langerhans, 1444, 1444F
ILs *ver* Interleucina(s)
Imago, 1329
Importação de proteínas mitocondriais, **713–719**, 716FF
complexo OXA, 714F, **715**, 718, 718F
complexo SAM, **715**
complexos TIM *ver* complexos TIM
complexos TOM *ver* Complexos TOM
mecanismos, 716FF
para dentro da membrana interna ou do espaço intermem-brana, **717–719**, 718F
parada da transferência da sequência, 718
proteína chaperona, 715, 716F, 717, 717
proteínas precursoras, 713, 715
sequências-sinal, 714, 714F

sítio de contato, 715–716, 715F, 718F
transportadores de proteínas, **714–715**
uso de energia, 716–717, 716F
Impressão genômica, 468–470, 469F, 1287
como fenômeno epigenético, 472–473
fator 2 de crescimento semelhante à insulina, 469–470
ver também Silenciamento de genes; Inativação do X
Impressão *ver* Impressão genômica
Imunoblotting, 518, 519F
Imunoestimulantes, associados a patógenos, 1525–1527, 1527
Imunofluorescência indireta, 587F, 588, 588F
Imunoglobulina A (IgA), **1556**, 1556FF, 1557T
cadeia pesada, 1553
troca de classe, 1567
Imunoglobulina α (Igα), 1599F
Imunoglobulina β (Igβ), 1599F
Imunoglobulina D (IgD), 1557T
cadeia pesada, 1553
desenvolvimento de célula B, **1553**
troca de classe, 1567
Imunoglobulina E (IgE), **1556**, 1557T
cadeia pesada, 1553
reações alérgicas, 1557F
secreção de histamina, 1557F
troca de classe, 1567
Imunoglobulina G (IgG), 1553, **1554–1556**, 1557T, 1559F, 1560F
estrutura, 1561–1562F
troca de classe, 1567
Imunoglobulina M (IgM), **1553–1554**, 1555F, 1557T
ativação do complemento, 1554
transmembrana, 1599F
troca de classe, 1567, 1568F
Imunoglobulinas, 1540, **1552–1562**, **1552–1568**, 1552F, 1554F, 1557T
afinidade, 1558–1559
aplicações
anticorpos monoclonais, 509
FACS, 502, 502–503F
imunoprecipitação, 431–432, 432F
marcação fluorescente, 502, 588
microinjeção, 597, 598F
microscopia de imunofluorescência, 587F, **588–589**
microscopia imunoeletrônica, **606–607**, 607F
técnicas de separação celular, 502
avidez, 1558–1559
classes, 1553–1557, 1557T
ver também tipos específicos
diversificação, **1562–1569**, 1568F
estrutura, 156, 157F, **1558–1559**, 1558F–1560F
cadeia leve (L) *ver* Cadeia leve (L) (anticorpos)
cadeia pesada (H) *ver* Cadeia pesada (H) (anticorpos)
conjunto de segmentos gênicos, 1563–1564F
dobramento de imunoglobulina, 140F
domínios Ig, 1559, 1559F, 1560F
domínios pareados, 141
região de cauda (Fc), 1552F, 1554F, 1555, 1555F, 1559
região de dobradiça, 1552, 1553F, 1554F
região hipervariável, 157F, 1559, 1559F, **1560–1562**
sítios de ligação *ver* Sítios de ligação ao antígeno
evolução, recombinação de éxons, 257F
forma de ligação na membrana, 1557
genes
regulação pós-transcricional, 370
segmentos, 1562, 1564, 1563–1564FF, 1564–1565
seleção do conjunto de genes, desenvolvimento de células B, 1566F
imunoglobulina α (Igα), 1599F
imunoglobulina β (Igβ), 1599F
monoclonais *ver* Anticorpos monoclonais
resposta, 1540, 1540F
primária e secundária, 588, 1546F
ver também tipos específicos
síntese
in vitro, produção de hibridoma, **508–509**, 509F
no retículo endoplasmático, 768F
ver também Célula(s) B
troca de classe *ver* Troca de classe
Imunoprecipitação, 432, 432F, 458
In vitro, definição, 502–504
Inativação clonal, 1548, 1548F
Inativação do X, **473–475**, 473F, 474F
compensação de dose, 473, 475–476
corpúsculo de Barr, 473
escolha de cromossomos ao acaso, 473–474
mecanismo, 285, 473–475, 473F
mosaico, 1209F
variantes de histonas
H2A,474–475
H3,475
H4, 475
ver também Silenciamento gênico; Impressão genômica
Indicadores fluorescentes sensíveis ao cálcio, 912, 912F
Indicadores sensíveis a íons, 596, 597F
Índice de marcação, 1059
Índice mitótico, 1059
Indução sequencial, **1319–1320**
ver também Desenvolvimento de *Drosophila*
Inexinas, 1159
Infecção por hepatite B, causa de câncer de fígado, 1227–1228, 1227T
Infecção viral
interferon-y, efeito de, 1406F
vacinação, 1498–1499, 1498–1499F
ver também Vírus; *organismos/infecções específicas*
Infecção(ões)
biologia celular, **1501–1524**
como carcinogenes, **1227**
doenças crônicas, 1499–1500
patógenos intracelulares *ver* Patógenos intracelulares
respostas a *ver* Defesas do hospedeiro; Resposta/sistema imune
sinais/sintomas, 1487–1488
via, 1501–1502
ver também infecções/organismos específicos
Infertilidade, 1301
Inflamação/Resposta inflamatória, 1525–1527, **1533–1534**, 1534F
proteinoglicanos e, 1183
Informação genética
definindo as características da vida, 2
não necessariamente codificada em ácidos nucleicos (príons), 1498–1499
Informação posicional, discos imaginais, 1351
Inibição lateral
desenvolvimento de cerdas sensoriais em *Drosophila*, 1357–1358
sinalização Delta-Notch, 946–947, 947F
sinalização Wnt-Notch, 1439–1440, 1439F
Inibição por contato, 1110, 1110F, 1233, 1234F
Inibidor da dissociação do GDP do nucleotídeo de guanina (GDI), 931
Inibidor de protease, regulação, 1183
Inibidor tissular de metaloproteases (TIMP), 1194
Inibidores da apoptose (IAPs), **1124–1125**
Inibidores de moléculas pequenas, 526–527, 526–527F
Iniciação abortiva da transcrição, 337F
Iniciação da replicação de DNA, **281–282**
cromossomos bacterianos, 282, 283FF, 284F
eucariótico, 289F, 1067, 1068F
complexo de pré-iniciação, 1067
complexo pré-replicação, 1067–1068, 1068F
ORC (complexo de reconhecimento de origem), 287
origens de replicação *ver* Origem(ns) de replicação
origens *ver* Origem(ns) de replicação
proteína, 281, 282, 283F, 1067
regulação, 282
Iniciadores de RNA, replicação de DNA, 272, 272F
Iniciadores de tumor, 1226, 1227
Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), 1302, 1302F
Inosina, 369, 369F, 484, 484F
Inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP$_3$), 910, 910F, 911FF
função na ativação do óvulo, 1299
membrana, 910
Inseto(s)
como vetor para patógenos microbianos, 1501–1502
ver também Drosophila melanogaster
Instabilidade cromossomal, 1217
ver também instabilidade genética
Instabilidade dinâmica, filamentos do citoesqueleto, 980, 981F, 982F
Catástrofe, 980, 1003
catástrofe *vs.* resgate, 1080
de microtúbulos *ver* Microtúbulo(s)
hidrólise de nucleotídeos, 979F
resgate, 980, 981F
Instabilidade do genoma
defeitos no reparo do DNA, 295T
prevenção, 315F
Instabilidade genética
a partir da perda de p53 após encurtamento dos telômeros, 1217
defeitos no reparo do DNA, 295T
em câncer, **1214–1215**, 1254, 1254F
prevenção, 315T
Ínstars, 1329
Insulina, 144F
clivagem proteolítica, 151, 152F
receptor, 798, 798F, 923F, 923T, 924
secreção (células β), 1444, 1444F
Íntegra (pele substituta), 1477
Integrase,318T
integrase de lambda, 324, 325F
Integrina(s), **1169–1178**, 1173–1174T, 1177T
agrupamento e adesões fortes, **1174–1175**
ativação de dentro para fora, 1172
ativação de fora para dentro, 1172
contra-receptores, 1174
diversidade de funções, 1172–1174, 1173–1174T, 1174F
efeitos de tensão, 1169, 1171, 1171F
estrutura, **1170–1172**, 1170F, 1172F
integrina β1, 1173–1174, 1422, 1422F
integrina β2, 1174
integrina β3, 1174
invasão bacteriana e, 1508
junções aderentes, 1134, 1145
ligação à actina, 1170, 1170F
ligação à fibronectina, **1193**
ligação heterofílica, 1146
migração celular, 1170–1171
montagem da fibronectina fibrilar, 1192
mutação e doença genética, **1172–1174**
na glândula mamária, 1428
proliferação celular e sobrevivência, dependente de ancoragem, **1175–1176**, 1175F
regulação alostérica, 1171–1172, 1172F
sinalização bidirecional, 1169
sinalização intracelular, 1172, **1176–1177**, 1176F
Interação DNA-proteína *ver* Interação proteína-DNA
Interações celulares, modelos matemáticos, 35–36, 35F
Interações DNA-DNA, 306F
hibridização *ver* Hibridização de DNA
Interações eletrostáticas, 54
Interações enzima-substrato, 74, 164F
Difusão, 74, 75F, 163
efeitos cinéticos, 159–160, 162F
ver também Cinética enzimática
Encaixe, 160
ligação do substrato, 159–160, 164–165, 164F
lisozima, 164–165, 164F
Interações hidrofóbicas, 111F, 381
Interações macromoleculares
interações DNA-DNA, 306F
ver também Hibridização de DNA
interações enzima-substrato *ver* Interações enzima-substrato
interações hidrofóbicas, 111F
interações não-covalentes, 55F, 156, 158F
interações proteína-DNA *ver* Interações proteína-DNA
interações proteína-ligante *ver* Interações proteína-ligante
ver também métodos específicos
Interações não-covalentes, **53–54**, **110–111FF**
atrações de van der Waals *ver* Forças de van der Waals
forças hidrofóbicas, 111F
interações fracas, 110F
Ligações de hidrogênio *ver Ligações* de hidrogênio
ligações iônicas *ver* Ligações iônicas
macromolécula, 55F, 64, 64F, 126–127, 156, 158F
Interações proteína-DNA, 144F
enhanceossomo, 447, 447F
histonas, 212–213
iniciação da replicação, 282
interações comuns, 426, 427
papel da estrutura do DNA, 416–417
ver também Estrutura do DNA
previsão do sítio de ligação, 426
proteína Rad51, 307F
proteína RecA, 307F
proteínas de regulação gênica, 416–417, 417F, 418–419, 419F
RNA-polimerases, mudanças estruturais e, 336–337, 338
ver também Motivos de ligação ao DNA; Proteínas de ligação ao DNA
Interações proteína-ligante, 153
antígeno-anticorpo *ver* Interações antígeno-anticorpo
cadeias laterais de aminoácidos, 154–155, 154F, 155F
cooperatividade, 172–173, 173F
ver também Regulação alostérica
enzima-substrato *ver* Interações enzima – substrato
especificidade, 153

exclusão de água, 154
força de ligação, 157–158
ver também Constante de equilíbrio (K)
interações não-covalentes, 153, 153F, 154, 154F, 155F
ligação, 171–172, 172FF
regulação, 169–170
alosteria *ver* Regulação alostérica
sítios de ligação, 153, 153F, 154F, 155F
ver também Interações proteína-DNA; Interações proteína-proteína
Interações proteína-proteína, **187–190**
dimerização, 142
domínios SH2 *ver* Domínios SH2 (de homologia com Src 2)
estrutura quaternária, 136
mapas de construção, 188–190, 524
método óptico, **524–526**
métodos de análise, **523–527**
moléculas únicas, 526–527
subunidades, 140F, 141F, 142–143, 148F
tipos de interface, 156, 156F
Interações RNA mensageiro-ribossomo
sítio de ligação ao ribossomo, 375F, 376
mRNA bacteriano, 381F
sequência de Shine-Dalgarno, 380, 381f, 488
sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), **491**, 491F, 1517
Tragetória, 376f
ver também Síntese de proteína; Ribossomo(s)
Interações RNA mensageiro-RNA transportador, 180–181
ver também RNA transportador (tRNA); Tradução
Interfase, 1055
cromossomo *ver* Cromossomo(s) da interfase
dinâmica dos microtúbulos, 1080
fibras de estresse, 1093
Interferon(s)
Interferon-α (IFN-α), 1534–1535
Interferon-β (IFN-β), 1534–1535, 1536
Interferon-γ (IFN-γ)
células T citotóxicas, efeito sobre, 1592
desenvolvimento de células T, 1582
infecção viral, efeito sobre, 1406F
secreção por células T_H1, **1592**, 1595F, 1598T
Interleucina(s), 1591F, 1598T
receptores, 1591F
ver também interleucinas específicas
Interleucina-10 (IL10), 1575, 1593, 1598T
Interleucina-12 (IL12), 1593F, 1594, 1595F, 1598T
Interleucina-13 (IL13), 1593
Interleucina-17 (IL17), 1594
Interleucina-2 (IL2), 1591, 1591F
Interleucina-3 (IL3), 1460, 1460T, 1461F
Interleucina-4 (IL4), 1593, 1593F, 1598, 1598T
Interleucina-5 (IL5), 1593, 1598T
Interneurônios, 1386F
Intestino
células endócrinas (células enteroendócrinas), 1437, 1437F
colonização do *Vibrio cholerae*, 1503
desenvolvimento, 1307, 1307F, 1322F
histologia, 1436, **1436–1444**, 1436F
migração celular, 1440–1441, 1440F
renovação celular, 1436–1437
Intestino delgado, histologia, **1436–1442**, 1436F
Íntron opcional, 863
Íntron(s)
ambiguidade da sequência, 480
estrutura do gene, 206
Evolução, 348
genes humanos, 205F, 206, 206T
grupo I, 334–335, 356, 356F
grupo II, 356, 356F
importância na evolução das proteínas, 257
opcional, 863
organelar, 863
remoção por *splicing* de RNA, 345–347, **347–348**
ordem, 352–353, 353F
sinais de splicing *ver* Sinais de *splicing*
ver também Splicing
sinais de destino, 358
variação de comprimento, 349, 352, 353F
Íntrons do grupo I, 334–335, 356, 356F
Íntrons do grupo II, mecanismo de auto-*splicing*, 356, 356F
Invasão da fita, recombinação homóloga, 305, 306
Invasina, 1508
Inversões, evolução do genoma, 246–247
Invertebrados marinhos, fertilização em, 1297
Involucrina, 1419
Íon hidrogênio (H^+, próton)
Ácidos, 52
água, 828, 828F
concentração iônica intracelular, 596
gradientes para dirigir a síntese de ATP, 100F
medida de Ph, 596
movimento, 827–828, 835, 835F
ver também Gradientes eletroquímicos de prótons; Bombas de prótons
Trocas, 109F
Íon hidrônio, 52, 53, 109F, 828F
Íon hidroxila, 109F
Íon(s),47
canais de membrana *ver* Canais iônicos
concentração, 596, 597F, 652T
ver também Gradientes eletroquímicos de prótons
ver também Íons específicos
Íons hidreto, carreadores de elétrons, 82
IP_3 *ver* Inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP_3)
IRESs *ver* Sítios internos de entrada no ribossomo (IRESs)
IS1 transposons, 318T
Isocitrato, 122F, 123F
Isocitrato-desidrogenas, 123F
Isoleucina, estrutura, 129F
Isomerização da uridina, modificações do Rrna, 361, 362F
Isômeros, 56
Açúcares, 112F
Aminoácidos, 128F
Isótopos, 601, 601T
radiativos *ver* Radioisótopos
Isótopos pesados, sedimentação por equilíbrio, 511

J

Jak (Janus-cinase), **937–939**
Janus-cinase (Jak), **937–939**
Junção celular, **1131–1204**
classificação funcional, 1132, 1133T
epitelial, 1133–1135
ver também Epitélio
homofílico *vs.* heterofílico, 1137, 1138F
junções comunicantes, 1132, 1132F, 1133T, **1158–1164**
junções tipo fenda *ver* Junções tipo fenda
plasmodesma, 1158, **1162–1163**, 1163F
junções de ancoramento, 1132, 1132F, **1133–1150**, 1133T, 1135T
célula-célula, 1132, **1133–1150**, 1133T, 1135T
adesão seletiva, **1139–1140**, 1139F, 1140F
classificação seletiva, **1140–1141**, 1140F, 1141F, 1142F
desmossomo *ver* Desmossomo
junções aderentes *ver* Junções aderentes
seletinas, **1145–1146**
sinalização, **1145**
superfamílias das imunoglobulinas, 1145, **1146–1147**
ver também Caderina(s)
conexão de filamentos intermediários, 1133T
matriz celular, 1133T, 1135T, **1169–1178**
adesões focais, 1170
hemidesmossomo *ver* Hemidesmossomo
ligado à actina, 1133T, 1134, 1135T
ver também Integrina(s)
ver também Adesão célula-célula; adesão célula-matriz
junções liberadoras de sinal, 1132, 1132F, 1133T
sinalização transmembrana, 1132, 1133T
sinapse imunológica, 1132
sinapse química *ver* Sinapse química
junções ocludentes, 1132, 1132F, 1133T, **1150–1158**
junção compacta *ver* Junções compactas
septadas, 1154–1155, 1154F
proteína de adesão transmembrana, 1134–1135, 1134F, 1135T
selectinas, **1145–1146**
superfamílias das caderinas, **1133–1150**
superfamílias das imunoglobulinas, 1145, **1146–1147**
superfamílias das integrinas, 1134, 1145, 1146, **1169–1178**
ver também Moléculas de adesão celular (CAMs); *tipos específicos*
ver também Adesão celular; Matriz extracelular (ECM); *tipos específicos*
Junção de ancoramento, 1132, 1132F; **1133–1150**, 1133T, 1135T
ver também Caderina(s); Integrina(s); *tipos específicos*
Junção heterodúplex, 305F, 306, 324, 325F
Junção miotendinosa, 1170
Junção molecular (recombinação)
recombinação sítio-específica conservativa, 324, 325F
sinapse, 305F
Junção neuromuscular (NMJ), 684F
canais iônicos, **684–686**
receptores de acetilcolina, lâmina basal, 1168
regeneração, lâmina basal e, 1168–1169, 1168F
Junção sinalizadora, 1132, 1132F, 1133T
ver também tipos específicos
Junção V(D)J, **1564–1566**
controle, 1565–1566
sequência-sinal de recombinação, 1564–1565F
troca de classes, 1568
Junções aderentes, 1135T
caderinas *ver* Caderinas
cinto de adesão (zonas aderentes) 1142, 1143F
coordenação da mobilidade celular, **1142**
epitélio colunar, 1134, 1134F
interações com caderina, 1142
ocorrência, 1142
ver também Adesão celular
Junções compactas, **1150–1158**
células epiteliais, 806, 1133, 1134F, 1150–1151
como barreira de permeabilidade, 1151–1152, 1152F
complexo juncional, **1153–1155**, 1154F
estrutura, 1152–1153, 1152F, 1153F
funções, **1150–1153**
proteína de adesão transmembrana, 1153
proteína Scaffold, **1153–1155**
transporte paracelular, 1152
transporte transcelular, 1151, 1151F
Junções comunicantes, 1132, 1132F, 1133T, **1158–1164**
ver também tipos específicos
Junções de Holliday, 311, 312F
conversão gênica, 311, 314–315
dupla migração da ramificação, 312, 312F
isomerização, 311F
Junções ocludentes, 1132, 1132F, 1133T
ver também tipos específicos
Junções septadas, 1154–1155, 1154F
Junções tipo fenda, **1158–1164**
acoplamento elétrico, **1158–1159**
canais de proteína, 667
comunicação celular, **884**, 884F
determinação do tamanho, 1159, 1159F
dinâmica/renovação, 1160–1161, 1160F
epitélio colunar, 1134, 1134F
estrutura, 1159, **1159–1161**, 1159F, 1160F
ver também Conexinas
funções, **1161**
metabolismo acoplado, **1158–1159**
oócito-célula folicular, 1290
plasmodesmata *vs.*, 1163
regulação da permeabilidade, **1161–1162**, 1162F
relação estrutura-função, 1159–1160

K

Kuru, 1499F

L

Lábio dorsal, do blastoporo, 1367–1368, 1367F
Lactação, 1427–1428, 1427F
Lactose-permease, 657, 658F
Lambda, bacteriófago *ver* Bacteriófago lambda
Lamelipódio, 1037
adesão celular, 1040
células rastejantes, 1008, 1036F
cones de crescimento, 1040F, 1049
em cofilinas, 1038F
formação de rede pelo complexo ARP, 1038, 1038F
géis de actina, 1008
mecanismo de movimento, 1037–1038
nucleação de filamentos de actina, 996
ondulações na borda anterior, 1040F, 1041
organização *vs.* fuso mitótico, 1039
Lâmina basal, 1131, 1132F, **1164–1169**, 1419F
distribuição/ocorrência, **1164–1165**, 1164F

estrutura/composição, 1165, 1165F, 1166F, 1167F
colágeno tipo VI, 1165, **1166–1167**
lamininas, **1165–1166**
glândula mamária, 1428
manutenção de células-tronco epidérmicas, 1421, 1426
papéis funcionais, 1164
diversidade, **1167–1169**
funções de barreira, 1168
glomérulo renal, 1164–1165, 1164F, 1167
mecânico, 1165
regeneração e, 1168–1169, 1168F
síntese, 1165
Lâmina nuclear, 984, 985T, 200, 201F, 704, 705F, 706F
estrutura, 710
micrografia eletrônica, 711F
mitose, 711–712, 712F
Laminina(s)
estrutura, 1166F
importância no direcionamento neuronal, 1388
isoformas, 1166
lâmina basal, **1165–1166**
laminina-1 (laminina clássica), 1165–1166
ligação ao colágeno, 1166–1167, 1167F
mutações, 1167
NMJ, 1168
polaridade epitelial ápico-basal, 1155F
Larva (*Drosophila*), 1329, 1343F
banda germinativa estendida, 1329–1330F
discos imaginais, 1349, 1350F
Latente, *vírus Epstein-Barr (EBV)*, 1499
Latrunculina, 987, 988T
Lck, 1581, 1590F
ver também Família Src de proteínas tirosina-cinases
LCRs *ver* Regiões de controle do lócus
LDLs *ver* Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs)
Lecitinas de ligação à manana, 1529
Lectina(s), 1145
ativação do complemento, 1529
interação com glicocálice, 636
ligação com manose, 1529
rede *trans* de Golgi, 808
Leeuwenhoek, Anton van, 501, 501F
Legionella pneumophila
estratégias contra tráfego de membranas do hospedeiro, 1510–1511F, 1512–1513, 1512F
invasão nas células hospedeiras, 1508, 1508F
transmissão, 1508
Leishmaniose, 1488
Leite, produção e secreção, 1427, 1427F
Lentes
microscópio eletrônico, 604
microscópio óptico, 581–582, 581–582F
ver também Ondas luminosas
Lepra, 1593–1594
Leptina, 1475
comparações da sequência do gene, 248F, 249F
deficiência, 1476F
funções/efeitos, 1475–1476, 1476F
secreção de células de gordura, 1475–1476
Leptogene, 1275
Letalidade sintética, 559
Leucemia
defeitos no reparo de DNA, 295T
leucemia de linfócito B, origem, 1219
mieloide crônica *ver* Leucemia mieloide crônica (CML)
Leucemia mielogenosa crônica (CML), 1208, 1208F, 1210, 1218, 1261, 1261F, 1262F
Leucina, estrutura, 129F
Leucócito(s), 1451, 1453T
adesão nas células endoteliais, 1453, 1454F
estrutura, 1452F
integrinas, 1174
migração de capilares, 1453–1454, 1454F
polimorfonucleares *ver* Neutrófilo(s)
resposta inflamatória, 1453–1454, 1454F
tipos, **1451–1453**
Leucoplastos, 841
Levedura, brotamento
polaridade celular, 880, 1044, 1045F
tipo de acasalamento, 1044
via de sinalização, 880, 880F, 1045F
Levedura(s), 33, 606F, 1494
análise da expressão gênica, **34–35**
brotamento *ver* Levedura, brotamento
ciclos reprodutivos, 34F
como modelo eucarioto, **33–34**
controle do ciclo celular, **1056–1057**, 1056F, 1057F, 1062, 1063F
E. coli vs., 34
estudo do transporte de proteínas, 703F
fermentação, 90
ver também Glicólise
genética *ver* Genética de leveduras
genoma, 34, 318T
herança proteína-apenas, 398, 398F
leveduras de fissão *ver Schizosaccharomyces pombe*
mapa metabólico, 102F
método de dois híbridos, interações proteína-proteína, 523–524, 524F
mitocôndria, 857, 858F, 867F
DNA, 863, 864–865, 865F, **866–867**
na árvore da vida, 16F
replicação do cromossomo, 210
reprodução sexual, célula haploide *vs.* diploide, 1269–1270, 1270F
"shmoo", 1044, 1044F
utilidade como modelo de organismo, 1056
vacúolos, propriedades do lisossomo, **781–782**
Levedura(s) de brotamento, 34F
ciclos reprodutivos, 413F
como eucarioto-modelo, 33–34
E. coli vs., 34
especificação do tipo celular, **454–457**, 456F, 457F
ver também Troca do tipo de acasalamento
estado haploide *vs.* diploide, 34
genoma, 18T, 34
origens de replicação, 286, 287F
splicing alternativo, 479–480
ver também Saccharomyces cerevisiae
Leveduras de fissão
ciclo celular, 1056–1057, 1056F
formas mutantes, 24F
ver também Schizosaccharomyces pombe
LFA1 (proteína 1 associada à função linfócito), 1592T
Liberação de Pirofosfato, síntese de DNA, 268F
Ligação
clonagem de DNA, 540, 541F
síntese da fita retardada (replicação do DNA), 272
ver também DNA-ligase(s)
Ligação, interação proteína-ligante, 171–172, 172FF
Ligação à fenda menor, proteína de ligação ao DNA, 423, 424F
Ligação amida, hidrólise, 161F
Ligação Aminoacil-tRNA-ribossomo, 375, 375F
Ligação antígeno-anticorpo, 156–157, 1553F, 1558–1559F
constante de afinidade (*Ka*), **1558–1559**
número determinante, 1553F
Ligação covalente polar, 50, 51F
Ligação cruzada com DNA, 295T, 296, 297F
Ligação de extremidades homólogas, reparo da quebra da fita dupla de DNA, 303
Ligação de extremidades não-homólogas, reparo da quebra da fita dupla de DNA, 302–303, 303F
Ligação fosfoanidrido, 61, 93F
Ligação fosfodiéster, 61–62, 93F, 199F
Ligação heterofílica, 1146
homofílica *vs., 1138F*
Ligação peptidil-tRNA-ribossomo, 375, 375F
Ligações covalentes, 47, 48–50, 50F, 51F, 106F
dipolos, permanentes, 50
distância de ligação, 48, 53T
força de ligação, 48–49, 53T
fosfato
energias de ligação, 93F
fosfodiéster, 61–62, 93F
ligações fosfoanidrido, 61, 93F
geometria, 49, 50F
ligações iônicas *vs.*, 48F
ver também tipos individuais
Ligações de hidrogênio, 54, 108F, 110F
aquaporina(s), 675
comprimento/intensidade da ligação, 53T
enovelamento de proteínas, 130F
estrutura de proteínas, 126, 127, 130F
estrutura do DNA, 197–198, 198F, 199F, 417
interações proteína-DNA, 417, 417F
ligação proteína-ligante, 153, 154, 154F
modelo de esfera e bastão, 54F
na água, 108F, 110F
Ligações dissulfeto
aminoácidos, 129F, 147–148
eletroforese, 518F
estabilidade de proteína, 147–148, 147F
Ligações duplas, carbono-carbono, 106F
Ligações duplas carbono-carbono, 106F
Ligações fosfato, 107F
energia das ligações, 93F
fosfodiéster, 61–62, 93F
ligações fosfoanidrido, 61, 93F
Ligações iônicas, 47, 111F
comprimento/intensidade da ligação, 53T
dobramento de proteínas, 130F
ligações covalentes *vs.*, 48F
soluções aquosas, 111F
Ligações peptídicas, 59, 60F
ângulos de ligação, limitações estéricas, 127F
formação, 128F, 407
hidrólise, 161
Ligações químicas, **46–50**, 48F, 106F
carreadores de energia, 61, 69F
interações de elétrons, 46–47
*ver também*ATP (trifosfato de adenosina)
Ligações S-S *ver Ligações* dissulfeto
Ligante CD40, 1590, 1592T, 1594, 1595F, 1597
Ligante Fas, 1120, 1571, 1573F, 1594
Ligante(s)
abertura dos canais iônicos *ver* Canais iônicos
sítio de ligação de proteína, 153
ver também Substrato(s), ligação a enzimas
Lignina, parede celular vegetal, 1195, 1196, 1199T
Limitações estéricas, ligações peptídicas, 127F
Linfócito(s), 1452–1453, 1453T
ativação/sinal co-estimulador 1548
células de memória, 1546
células efetoras, 1546
células virgens, 1546
células-tronco hemopoiéticas, comprometidas com a via linfoide, 1456–1457
citotóxico/apoptose, 1120
origem, 1541F, 1543
princípios gerais, 1540–1551
dependência do sistema imune inato, **1541–1542**
desenvolvimento de células B, 1543–1544
desenvolvimento de células T, 1543–1544
imunidade adaptativa, 1540–1541
memória imunológica, 1546
seleção clonal, 1544
tolerância, 1548
receptores de "endereçamento" (*homing*), 1550
recirculação, **1549–1551**, 1549F
ver também Célula(s) B; Célula(s) T
Linfócitos B *ver* Célula(s) B
Linfócitos T (células T) *ver* Linfócito(s); Células T
Linfoma de Burkitt
causa viral, 1228T, 1499
translocações que ativam o gene *Myc*, 1239
Linfoma de não-Hodgkin, metástase, 1206F
Linfoma(s)0
Burkitt *ver* Linfoma de Burkitt
defeitos no reparo do DNA, 295T
não-Hodgkins, metástase, 1206F
Linhagem celular imortal/imortalidade, 504F, 506T, 1059
ver também Controle do ciclo celular
Linhagem germinativa
DNA, genes de anticorpos, 1563–1564F
função, 265F
função de grânulos P, 1323–1324
mutações, 264, 265, 575
genética reversa, 575
proteína Vasa na determinação de, 1324
substituição de genes *ver* Organismo(s) transgênico(s)
Linhagens BY2 de células imortais, micrografia de cultura celular, 504F
Linhagens de células
células híbridas, 509T
ver também Hibridomas
Eucarióticas, 505, 506T
imortais, 504F, 505, 506T, 1059
primária *vs.* secundária, 504
transformadas, 505, 506T
ver também Cultura de células
Lipídeo(s), 58, 115F
agregados, 115F
formação de bicamada *ver* bicamada(s) lipídica(s)
gotículas, 94F, 97F, 115F, 625–626, 626F
membrana celular, **617–629**, 624
ver também Bicamada(s) lipídica(s); Membrana

síntese, 867
ver também Gordura(s); *tipos específicos*
Lipopolissacarídeo (LPS), 1490F
ativação de macrófagos por, 1530F
estrutura, 1527F
imunoestimulação, 1527
Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), 791–792, 791F, 792, 793F
Lipossomo(s), 621–622, 622F, 625F
solubilidade de proteína de membrana, 638
β-Lipotropina, 803F
γ-Lipotropina, 803F
Lise/lisogenia, fago lambda, 458, 458F
Lisina, 128F, 1186, 1187F
Lisossomo(s), 779–787, 780F
bomba de prótons, 780, 780F
digestão intracelular, **779–780**, 784F
distribuição, 780–781
estrutura, 780F
exocitose, 786
função, 696, 779–780
fusão com fagossomos, 1531–1532
hidrolases ácidas, 779–780
importação de material, 782, 783, 783F, 784FF
invasão por *Trypanosoma cruzi*, 1510–1511
maturação, 781F
melanócitos, 786
membranas, 697T
transporte
a partir de endossomos, 791–792, 795F, 796F
a partir do aparelho de Golgi, **779–787**, 783–784, 785F
vacúolos de leveduras, **781–782**
vacúolos de plantas, **781–782**
vias de degradação, 784F
volume, 697T
ver também Lisozima
Lisozima
catálise, **161**, **164–165**, 164F, 165F
estrutura, 144F, 164F
funções, 163–164
ligações de dissulfeto, 148
ver também Lisossomo(s)
Listeria monocytogenes
destruição da membrana do fagossomo, 1512–1513, 1512F
escape do fagolisossomo do hospedeiro, 1510–1512, 1510–1511F
invasão de células do hospedeiro, 1508, 1512F
movimentos com base em actina, 1513–1514, 1515F, 1516, 1516F
receptores, 1508
secreção da hemolisina e ação, 1510–1512
Litotrófico(s), 11–12, 15, 15F
LPS *ver* Lipopolissacarídeo (LPS)
LRR (proteínas com repetições ricas em leucina), **956**, 956F
L-selectina, 1145, 1550, 1550F
Luz UV *ver* Radiação ultravioleta (UV)

M

M6P *ver* Manose-6-fosfato (M6P)
Macrófago(s)
apoptose, 1117
arrastamento celular, 1036
ativação, **1594–1595**
células T auxiliaries (TH), 1575, 1593F, 1595F
lipopolissacarídeo, 1530F
recrutamento celular, 1534
células esponjosas, 1500
complexo NADPH-oxidase, 1532
efeito do NO, 888
fagocitose, 787, 788F, 1531–1532
ativada por anticorpos, 1555, 1555F, 1557T
Mycobacterium tuberculosis, 1507–1508
Salmonella enterica, 1533
função, 1452
infecção por HIV, 1581
lepra, 1593–1594
linhagem e formação, 1457F
pulmão, 1434–1436
receptores, 1531–1532
receptores semelhantes a Toll, 1531
secreção de interleucinas e sensibilidade, 1598T
tempo de vida e renovação, 1460
trato respiratório, 1434–1436
tuberculose, 1507–1508, 1593–1594
ver também Células apresentadoras de antígeno
Macromolécula(s)
biossíntese, 63, 85F
necessidade de energia, 84–87
orientação, 86, 87F
especificação da forma, 63–64, 64F
fracionamento celular, **510–511**
interações *ver* Interações macromoleculares
montagem, **148–152**
polimerização, 56, 84–87
química celular, 62–63
abundância, 62F
células de mamíferos *vs.* bacterianas, 63T
composição, 335–337
subunidades de proteína, 148
subunidades, 62F, 63F, **148–152**
ver também tipos específicos
Macropinossomos, 1508
Magnésio, potencialização de longo termo, 690–691
Malária, 1494–1495, 1495, 1495F
disseminação, 1501–1502
ver também *Plasmodium falciparum*
Malato, 122F, 123F
Malato-desidrogenas, 123F
MALDI-TOF espectrometria de massa, 519–520
Malignidade *ver* Câncer
Manose-6-fosfato (M6P)
endereçamento lisossômico, 785, 786F
estrutura, 784F
importação lisossômica, 783–784
receptores, 755, 784
Mapa de densidade eletrônica, análise por difração de raios X, 527–528
Mapa neural, 1391–1393, 1391F
Mapa *tectum*-retinal, refinamento, 1393–1395, 1394F
Mapa(s) metabólico(s), 67F, 102F
Mapas (cérebro), **1391–1393**, 1392F
retinotectal, 1391F, 1392–1394
Mapas de haplótipos (*hapmaps*), 561, 562
Mapas de interação de proteína, 188–190, 189F, 190F
MAP-cinase, 928, **928–931**, 929FF, 936
efeito EGF, 929F
efeitos NGF, 930
Erk, 929, 929F
evolução, 177F
neuronal, 930
plantas, 958
ver também Ras GTPase(s)
MAP-cinase-cinase (MAPKK), 929, 929FF
MAP-cinase-cinase-cinase (MAPKKK), 929,929F
Mapeamento de genes
com base na recombinação meiótica,554F
ensaios de ligação, **559–560**, 560F
ver também Sequenciamento de DNA
Mapeamento genético físico, 560, 560F
Mapeamento íntron-éxon, 538F
MAPs *ver* Proteínas associadas a microtúbulos (MAPs)
Máquinas proteicas, **184–186**
ativação, **185–186**
estrutura, 184
minimização do gene, 184–185
partes intercambiáveis, 184–185
posição da célula, **185–186**, 186F
proteína Scaffold, 184–185, **185–186**
ver também Complexos proteicos (montagem)
Marcação com radioisótopos, 534, 602–603, 603F
Marcação de epítopos, 514, 515F, 516F
ver também Marcação de proteínas
Marcação para purificação por afinidade em sequência (*tap-tagging*), 515–516
Marcadores de DNA, 534
Marcadores de proteína
cauda de histidina, 548
clivagem, 515
cromatografia de afinidade, 515F
GST, 514–515, 516F
ver também Cromatografia de afinidade; Marcação de epítopos
Massa celular total, controle, 1102, **1111–1112**
Mastócitos, 1451, 1556
secreção de histamina, 804, 804F, 1557F
secreção de interleucina, 1598T
Matriz extracelular (ECM), **1178–1195**
adesão/interação celular *ver* Adesão na matriz celular
célula secretora/síntese, **1179**, 1179F
componentes, 1165
formas/tamanhos, 1166F
proteínas fibrosas, 145–146, 147F, 1179
ver também proteínas específicas
ver também Glicoproteína(s); *macromoléculas específicas*
degradação, **1193**
localização, **1194**
matriz metaloproteinase, 1194
serina proteinase, 1194
diversidade, 1178
exocitose, 800
força de compressão e, 1180–1181
forçastensoras, 1042F, 1187–1189
interações mecânicas, **1189**, 1189F, 1190F
montagem de fibronectina fibrilar, 1191–1193, 1192F
lâmina basal *ver* Lâmina basal
morfogênese de tecido e reparo, **1180–1181**
planta, 1180, 1195
ver também Parede celular vegetal
receptor de matriz, 1169
ver também Integrina(s)
ver também Osso; Adesão celular; Junção(ões) celulare(s)
Matriz nuclear (sustenção), 242
Matriz pericentriolar, 1076
Maturação de afinidade, produção de anticorpos, 1562–1563, 1566, **1566**
M-Cdks, 1062, 1066
ativação por desfosforilação, **1074–1075**, 1074F
dinâmica do microtúbulo e, 1080
entrada na mitose, 1071, 1074
função na montagem de fusos, **1078–1079**, 1079F, 1080
M-ciclina, 1062, 1064, 1074, 1087, 1101
Mecanorreceptor(es), cerdas mecanossensoriais, 1356F
Mediador da transcrição, 343
Mediadores inflamatórios, 1533–1534
Medula óssea
apoptose, 1117
células do estroma, função, 1458–1459
efeitos do raios X sobre, 1455–1456, 1456F
histologia, 1453–1462, 1455F
produção de células do sangue, **1453–1456**, 1453F, 1541F
controle, 1459
ver também Hemopoiese
seios sanguíneos, 1454
transfusão, 1456, 1456F
transplante, 1456, 1456F
Megacariócitos, 1099, 1453T, 1454, 1455, 1457F
ver também Células do sangue; Plaqueta(s)
Meia-vida, radioisótopos, 601, 601T
Meiose, 34, 554F, **1090–1092**, 1269, **1272–1274**, **1272–1281**
conservação evolutiva, 1280, 1286
cromossomos plumosos, 234F
diferença entre sexos, 1280–1281
diferenças de tempo, 1280, 1281F
diversidade gênica e, **1271**, 1279F
erros, **1278–1279**
experimentos de micromanipulação, 1278
fase S da meiose, 1090
meiose I, 1090–1092, 1091F, 1273–1274, 1273F
cinetocoro, 1277–1278
complexos de proteínas específicas, 1278, 1280
estágio fosfato I, 1275–1276, 1276F
meiose II, 1090, 1091F, 1092, 1273F, 1274, 1278
mitose *vs.*, 1091F, 1272, 1273F, 1276–1277, 1277F
oócitos, 1280, 1288, 1290, 1292
pareamento homólogo *ver* Cromossomos homólogos (homólogo)
pontos de verificação, 1281
recombinação homóloga/*crossing-over ver* Recombinação homóloga (*crossing-over*)
regulação, **1280–1281**
segregação homóloga, **1276–1278**, 1277F, 1278–1279
ver também Mitose
Mek-cinase, 929F
Melanócitos, 1418F
de peixe, 1023–1024
exocitose lisossomal, 786
melanossomos *ver* Melanossomos
Melanomas, definição, 1206
Melanossomos, 786, 1022, 1022F, 1024F
Melatonina, relógio circadiano, 461
Melhora da taxa metabólica, 168–169, 169
Membrana basal *ver* Lâmina basal
Membrana de náilon, *Northern blotting*, 538–539, 539F
Membrana de nitrocelulose, 519F, 538–539, 539F
Membrana nuclear, 704, 705F, 706F
Membrana plasmática, **9**, 617
alargamento, via de secreção regulada (exocitose), 805, 806F
contato com filamentos de actina, **1009–1010**, 1010F
domínio, junção compacta, 1151
lipídeos *ver* Bicamada lipídica
nucleação de filamentos de actina, **996–998**
origem, 405–406, 407F, 408F
proteoglicanos, 1183–1184
protrusão guiada pela polimerização da actina, **1037–1039**
universalidade, **9–10**
ver também Membrana(s)

Membrana tectorial, 1430, 1430F, 1431F
Membrana(s)
célula pancreática exócrina, 697T
células do fígado (hepatócitos), 697T
composição
ácidos graxos, 58–59
fosfoinositídeos, 757
lipídeo(s), **617–629**, **645**, 645F
proteínas *ver*Proteína(s) de membrana
taxa de lipídeo para proteína, 629
ver também Bicamada lipídica; Fosfolipídeos; *lipídeos individuais*
disrupção, 510
estratégia de patógenos intracelular, **1510–1514**, 1510–1511F
estrutura, **617–648**, **617–649**, 618F
ver também Bicamada lipídicas
fluidez, **621–622**
força, **646–648**
fusão, 763F, 764, 768, 769F
internas, 26
intracelular, 26, 169, 697–698, 697T
negras, 622, 622F
propriedades elétricas, **667–692**
ver também Potencial de membrana
transporte através, **651–692**
moléculas impermeáveis, 597–598
ver também Transporte de membrana; Transporte vesicular
viscosidade, 644
ver também Bicamada(s) lipídica; Balsa(s) (plataformas) lipídica(s); Membrana plasmática; *tipos/localização específica*
Memória, plasticidade sináptica, **1396**
Memória celular, 454, 458, 458F, 466
ver também Diferenciação celular
Memória imunológica, **1546**, 1546F
Mensageiro secundário, **893**
*ver também*AMP cíclico (cAMP)
β-Mercaptoetanol, 517
Meristema apical, **1403**, 1408F, 1409–1409–1410, 1410F
broto, 1163, 1401F, 1408FF, 1409–1410, 1411F
do caule, 1163, 1401F, 1408FF, 1409–1410, 1411F
manutenção por sinalização Wuschel e Clavata, 1409–1410, 1410F
raiz, 1163, 1407F
Meristema(s), 956, 1195, 1403
apical(is) *ver* Meristema apical
desenvolvimento sequencial, **1403**
flor, 1413
manutenção, **1409–1410**, 1410F
plasmodesmata, 1163
regulação por CLV1, 956, 957F
tamanho, 1409–1410
MERRF, 866
Mesênquima, 1141
Mesoderma, 1307, 1307F, 1335, 1365, 1445
Mesoderma pré-somítico, 1371
Mesófilo (parênquima), 846
Metabolismo, 66
anabolismo/biossíntese *ver* Biossíntese
aumentos das taxas por complexos multienzimáticos, 168–169
balanço, 102
catabolismo *ver* Catabolismo
cooperação, 102
diferenças entre tecidos, 102
moléculas carreadoras ativadas, **79–86**, 79F
regulação, **101–102**
ver também Vias(s) metabólica(s)
Metabolismo aeróbio, 97–98
bacteriano, 839, 839F
evolução, 11–12, 27, 873–874
Metabolismo oxidativo
Energia, 70
Glicólise, 91, 92F
ver também Glicólise
Metáfase, 1054, 1072F
dinâmica dos microtúbulos, 1080
estrutura dos cromossomos, 23, 243F
movimento dos cromossomos, 1086
ver também Cromossomos mitóticos
Metagênese randômica, análise da expressão gênica, 553, 556
Metaloproteinase de matriz (MMPs), 1194
Metamorfose, *Drosophila*, 1329, 1352
Metástases (tumores secundários), 1206, 1206F, 1220, **1220**
barreiras, 1220, 1250F
colonização de tecidos distantes, 1220, 1250
degradação ECM, 1193, 1194, 1194F
entrada na circulação, 1220, 1221F, 1250
etapas fáceis e difíceis, 1250F
invasividade/local da invasão, 122, 1249
monitoramento, 1250
mutações que levam a, **1249–1250**
processos (etapas), 1220, 1221F
Methanobacterium, 16F
Methanococcus, 16F, 18T
Metilação
caudas de histonas, 221–222, 223F
DNA *ver* Metilação do DNA
rRNA, 361, 362F
ver também Metiltransferase(s)
Metilação do DNA, 472F
células de câncer, **1213**
descontrolado, 296F
enzima, 284F, 467
eucariotos, 278
expressão gênica e, 467–468, 468F
funções de reconhecimento, 277–278, 532
herança, 467–468, 467F
ilhas CG (CpG), 434, **470–471**
importância das mutações, 300–301, 301F
impressão genômica, **468–470**
5-Metilcitosina, 467, 467F
procariotos, 277–278, 282, 284F
sistemas de modificação-restrição, 532
proteínas de ligação ao DNA metilado, 468
reconhecimento do dano, 300–301
reparo de pareamento incorreto da fita, 277–278, 277F, 284F
5-Metilcitosina, 428F
desaminação, 301F, 470
estrutura, 301F
metilação do DNA, 467, 467F
Metiltransferase de manutenção, metilação do DNA, 467
Metiltransferase(s)
capeamento 5′ do mRNA, 346–347, 347F
Metionina, 101, 129F
Metionina-aminopeptidases, 395
Método dois híbridos, 523–524, 524F
ver também Interação proteína-proteína
MHC (complexo de histocompatibilidade principal), 1397F, **1569–1589**, 1571, 1575, **1575**, 1576F
antígeno H-2 (histocompatibilidade-2), 1575
bolsa específica, 1577–1578, 1579F
bolsa não-variável, 1578, 1579F
células dendríticas, 1571
genes humanos, 1577F, 1588
interações com células T, **1569–1589**
ligação de peptídeos, 1574F, **1577–1579**, 1579F, 1580F
ver também Interação proteína-proteína
MHC de classe I, 1575, **1577–1578**, 1580T, 1581–1582, 1599T
apresentação de peptídeos, **1581–1582**, 1583F
estrutura, 1576F, 1577–1578, 1578F, 1579F
expressão em células infectadas por vírus, 1535–1536
não-clássicas, 1577
reconhecimento do correceptor, 1580–1581, 1581F
reconhecimento pelo correceptor, 1581F
reconhecimento por células matadoras naturais, 1535–1536
subtipos, 1576F
MHC de classe II, 1575, **1577**, **1577–1578**, 1580T, 1581F, 1583, 1599F
apresentação de peptídeos, **1583–1585**
estrutura, 1576F, 1577
reconhecimento do correceptor, 1581, 1581F
reconhecimento pelos correceptores, 1581F
subtipos, 1576F
polimorfismo, 1576, 1588
reações a transplantes, **1575–1576**
restrição, 1406, 1581, 1584–1585
restrição de classes, **1579–1580**
seleção de células T, **1585–1586**
Miastenia grave, 1549
Micela(s), 115F, 620, 621F, 637
Microarranjos de DNA, 574
análise da expressão gênica, 537, **574–575**
análise de grupos, 575, 575F
genes humanos, 412
tipagem de células cancerosas, 414F, 1240, 1249, 1264
análise da forquilha de replicação, 285,286F
análise do ciclo celular, 1064–1065
metástase, 1249
metodologia, 574, 574F
tamanhos, 574
Microarranjos de proteínas, 188
Microcirurgia, *C. elegans*, 1325
Microdissecação por captura a *laser*, 502, 502–503F
Microeletrodo(s), medida iônica intracelular, 596
Microfibrilas, 1190–1191, **1197–1198**, 1197F
Microfilamentos *ver* Filamentos de actina
β_2-Microglobulina, interação proteína MHC/antígeno, 1580F
Microinjeção, moléculas impermeáveis, 597–598, 598F
MicroRNA (miRNA), 336–337, **493–495**, 494F
Microscopia, 579
análise da estrutura celular, **579–591**
análise do ciclo celular, 1059
aspectos históricos, 501, 501F
escala, 580, 580F
hibridização *in situ*, 585, 586F
microscopia eletrônica *ver* Microscopia eletrônica
microscopia óptica *ver* Microscopia óptica
poder de resolução, 581F
preparação da amostra, 554–555, 585
coloração, 554–555, 579, 585, 585F
fixação, 585, 605, 605F
seccionamento, 585, 585F, 605
processamento de imagem, **582–584**, 584F
Microscopia confocal, **590–592**, 591F, 592F
Microscopia crioeletrônica, 610
Microscopia de campo claro, 582–583
Microscopia de campo escuro, 582–583
Microscopia de contraste de fase, 504F, 582–583
Microscopia de contraste de interferência diferencial de Noman-ski, 582–583
Microscopia de fluorecência de reflexão interna total (TRIF), 599, 600F
Microscopia de fluorescência, **586–589**
análise da expressão de célula única, 576
Aplicações, 587
Confocal, **590–592**, 591F, 592F
corante fluorescente, 586–587, 587F
imunofluorescência, 587F, **588–589**, 588F, 589F
interno total, 599, 600F
microscópios, 586, 586F, 591F
nanopartículas, 587, 588F
quantidade de pontos, 587, 588F
Microscopia de força atômica (AFM), 600,601F
Microscopia de interferência diferencial, 582–583
ver também Microscopia de contraste de fase
Microscopia eletrônica, **604–612**
análise de superfície, **607–609**, 608F, 609F
autorradiografia, 603F
criodecapação, 610F
espalhamento de elétrons, 605
geração de contraste, 606, 610
coloração negativa, **610**, 611F
colorações com metais pesados, 606
ouro coloidal, 606, 607F
sombreamento com metal, **608–609**, 610F
grades, 605, 605F
história, 604T
imagens, **610–612**
imunofocalização com ouro, **606–607**, 607F
lentes de elétrons, 604
localização molecular, **606–607**
microscopia crioeletrônica, 610
microscopia eletrônica de varredura (SEM), **607–608**, 608F, 609F
microscópios, 604
preparação da amostra, 605–606, 605F
profundidade de campo, 606, 608
puffes cromossômicos, 239
reconstrução 3D, 606, 607F, **611–612**
tomografia EM, 611F, 612, 612F
reconstrução de partículas únicas, 611, 612F, 613F
resolução, **604–605**, 604F, 608
SEM *ver* Microscopia eletrônica de varredura
tomografia, 611F, 612, 612F, 613F
transmissão *ver* Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)
Microscopia eletrônica de criofratura, 610F
Microscopia eletrônica de imunofocalização com ouro, **606–607**, 607FF
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), **604–607**, 604F
análise de superfície, **608–609**
sombreamento com metais, 608–609, 610F
microscopia imunoeletrônica, **606–607**, 607F
microscópio, **604–605**, 604F
preparação da amostra, **605–606**, 605F
reconstrução 3D, 606, 607F

Microscopia eletrônica de varredura (SEM), **607–608**, 608F, 609F
Microscopia óptica, **581–583**
campo claro, 582–583
campo escuro, 582–583
contraste de fase *ver* Microscopia de contraste de fase
fluorescência *ver* Microscopia de fluorescência
geração de contraste, 582–583, 582–583F 584, 584F
história, 579
imagem 3-D, 589–590
deconvolução da imagem, 590, 590F
microscopia confoca, 591, 592F
microscopia de interferência diferencial, 582–583
microscópio, 581, 581F, 604F
preparação da amostra, **554–555**, 579, **585**, 585F
processamento de imagem, **582–584**, 584F
resolução, **580–583**, 581F–582F, 590
microscopia eletrônica *vs.*, 609F
Microscópio confocal, 591F
Microsporídeo, 1509–1511, 1510–1511F
Microssomo(s), 511, 726, 726F
Micrótomo, 585, 585F
Microtúbulo(s), 965F
associação à mitocôndria, 815, 816F
astral, 1035F, 1076, 1076F
capeamento, 1003
células de plantas, 1097–1098, **1200–1202**, 1200F, 1201F
configuração, astral, 993
despolimerização, 1085, 1085F, 1089, 1201
divisão celular e, 969
ver também mitose
empacotamento, organização por MAPs, 1001, 1002F
estrutura, 968, 968F, 973–975, 973–974F
ver também Tubulina
fibroblastos, 1048F
instabilidade dinâmica, 969, 980, 981F, 982F, 1080, 1081F
função do centrossomo, **1046**
interpolar1035, 1035F
localização celular, 969
mitose, 1075–1076, 1076F
citocinesee, 1095–1097, 1096F, 1097F
efeito dos cromossomos no, 1081, 1082F
formação do fuso, 1035, 1035F, 1075–1077, 1079
instabilidade/dinâmica, **1080**, 1081F
ligação ao cinetocoro, 1082, 1083F, 1084F
ver também Mitose; Fuso mitótico
montagem, 972–975
ver também Microtúbulo(s), nucleação; Tubulina
movimento de patógeno com base em, 1516–1517
neurônios, 1020–1021, 1047–1048, 1048F
nucleação, 992, 992F, 1034
organização do aparelho de Golgi, 1020–1021
organização do retículo endoplasmático, 1020–1021
polarização celular, comunicação com citoesqueleto de actina, 1046
propriedade, 965
proteínas acessórias, 992, 995F
sítio de ligação à cinesina, 1014F
subunidades, 971
taxa de crescimento de extremidades mais (+) e menos (-), 974–976, 976F
terminações menos e mais, 973–975, 978F
tipos de proteínas motoras, **1014–1015**
ver também Cinesina(s)
treadmilling, **976–982**, 977FF
Microtúbulos interpolares, 1075, 1076F, 1079
Microvilosidades
empacotamento de filamentos de actina, 969, 970F
estrutura, 1008F
nucleação dos filamentos de actina, 996
óvulo, 1298, 1298F
transporte de membrana, 659
Mieloblasto(s),464
diferenciação, 1464
formação da fibra muscular esquelética, 1465–1466
fusão, 1464, 1464F
manutenção, sinais, 1466
micrografia de cultura celular, 504F
origem dos somitos, 1373–1374
persistência como células (tronco) satélites, 1466
recrutamento, crescimento da fibra muscular, 1466
Migração celular
degradação ECM, 1193, 1194, 1194F
desenvolvimento, 1140, 1140F, **1373–1375**
epitélio intestinal, das criptas para vilosidade, 1440F
integrinase, 1170–1171
neuronal, 1385F
sinais externos/moléculas-guia, **1045**, 1140
ver também Motilidade celular/movimento
Migração das células da crista neural, 1036, 1140, 1140F, 1374, 1374F
Migração de ramificação, 307F, 308, 308F, 312F
Migração *ver* Migração celular
Milho
Milho, 16F, 318T, 1410–1411, 1411F
Mimetismo molecular, fatores de liberação (tradução nal), 381, 382F
Mínimo de complementos de genes, 10, 570–571
Miofibrila(s), 1026, 1027F
Miofibroblastos, 1468
Mioglobina, 20, 21F, 144F
Miosina I, 1013, 1013F
Miosina II, 1011
anel contrátil (citocinese), **1093–1094**, 1095, 1095F
braço de alavanca, 1019–1020, 1019–1020F
ciclos mecanoquímicos, 1017F
contração muscular, **1026–1028**
disposição dos filamentos, 1026
estrutura, 1011F
filamento grosso, 1012F
motilidade celular, 1039F, 1041
processividade, 1019–1020
regulação por fosforilação, 1024–1025, 1025F
Miosina V, 1013, 1019–1020, 1022
Miosina(s), **1011–1014**
atividade motora da cabeça, 1012F
ciclo de mudanças estruturais, 1016
contração muscular, **1026–1028**
digestão enzimática, 1012
estado de rigidez, 1019
estrutura, 1012, 1013, 1015F, 1016
explosão de força, 1016
geração de força, 1016
hidrólise de ATP, 1012, 1017F
não-muscular, 1012–1013
origem evolutiva, 1015–1016
subtipos, 1013, 1013F
velocidade de movimento, 1019–1020
ver também tipos individuais
Miostatina, 1110, 1111F
controle do crescimento muscular, 1465, 1466F
mutação em camundongo, 1466F
mutação gênica, efeitos, 1455–1466
Miotonia, canais catiônicos controlados por voltagem, 682
Mitocôndria, 29F, 696, **815–827**
aspectos históricos, 815–816
associação a microtúbulos, 815, 816F
biogênese, 856, 856F, **866–867**, 867F
ciclo da ureia, 867
conversão de energia, **815–827**
ciclo do ácido cítrico *ver* Ciclo do ácido cítrico
complexo enzimático respiratório, **820**
elétrons de alta energia, geração, **817**
energético, 819,819F
fosforilação oxidativa *ver* Fosforilação oxidativa
oxidação de moléculas de alimentos, 97F, 819F
transporte de elétrons *ver* Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial
ver também Síntese de ATP
crescimento e divisão, 857–858, 858F
distribuição durante a citocinese, 1098
DNA *ver* Genoma mitocondrial
edição do RNA, 483, 484F
envelhecimento celular, 868
estrutura *ver* Estrutura mitocondrial
evolução, **27–28**, 29F, 699, 700–701F, **859–860**, 860F,874, 875F
semelhanças com bactéria, 857, 859
fracionamento, 511, 817F
ver também Fracionamento celular
função da apoptose, 1121, 1121F, 1122F, 1124F, 1125F
liberação de proteína, 1121, 1123
potencial de membrana, 1118
genoma *ver* Genoma mitocondrial
glutationa-peroxidase, 868
importação, **745**
ver também Importação de proteínas mitocondriais
importação de lipídeos, 867–868
importação de proteínas *ver* Importação de proteínas mitocondriais
localização, 815, 816F
manutenção da razão ATP:ADP, 823–824
metabolismo celular, 838–839, 839F
produção de calor, 838
proteína barril-β, 635
proteínas tecido-específicas codificadas no núcleo, 867
importação *ver* Importação de proteínas mitocondriais
síntese de cardiolipina, 867–868, 868F
síntese de proteínas, 856–857, 856F, 867, 869F
ver também Genoma mitocondrial
sistemas livres de célula, 511
superóxido-dismutase, 868
variabilidade com tipos celulares, 857
venenos, 834, 836
volume, 697T
Mitógeno(s), **1102–1103**
competição por, **1110**
especificidades, 1102–1103
estimulação G1/S-Cdk, **1103–1105**
estimulação G1-Cdk, **1103–1105**
via de sinalização intracelular, 1103, 1107, **1107–1108**, 1108F
ver também Fatores de crescimento; *mitógenos específicos*
Mitose, 208F, 1054, 1055F, **1071–1092**
APC/C e finalização, **1087**, 1088F
cinetocoro e, 1082–1083
condensina e, **1075**
divisão celular assimétrica, **1099**
duplicação do centrossomo, **1078**
empacotamento de cromossomo, 1070–1071, **1090**
entrada
M-Cdk e, **1071**, **1074–1075**, **1078–1079**
cinase Aurora, 1074, 1084
cinase tipo polo, 1074
dinâmica de microtúbulos, 1080, 1081F
estrutura de cromossomo *ver* Cromossomo(s) mitóticos
fases, 1071, 1072FF
anáfase, 1054, 1073F, **1089–1090**, 1089F
metáfase, 243, 243F, 1054, 1072F
prófase, 1054, 1072F
pró-metáfase, 1072F
telófase, 1055, 1073F, **1090**
ver também fases específicas
função do centríolo, 1076
fuso mitótico *ver* Fuso mitótico
inativação Cdk, **1100–1101**
instabilidade de microtúbulos e, **1080**, 1081F
lâmina nuclear, dissociação, 710–712,712F
meiose *vs.*, 1091F, 1272, 1273F, 1276–1277, 1277F
na ausência de citocinese, **1099–1100**
pontos de verificação, 1061, 1066, 1071, **1088**
ver também Controle do ciclo celular
segregação de cromossomo, **1089–1090**
ver também Ciclo celular; Citocinese; Meiose; Microtúbulos
Modelagem atômica, proteínas, 526–231
Modelo "bola-e-cadeia", inativação de canais iônicos de potássio regulados por voltagem, 678F
Modelo da maturação das cisternas, do transporte através do aparelho de Golgi, 778
Modelo de estimulação astral, 1096, 1096F
Modelo de estimulação de fuso central, 1096F, 1097F
Modelo de proteína em fita, 132F, 137F
Modelo de relaxamento astral, 1096–1097, 1096F
Modelo solenoide interdigital, estrutura da cromatina, 217–218, 217–218F
Modelo zigue-zague, formação da fibra de 30 nm, 217–218, 217–218F
Modelos de preenchimento espacial, 50
domínio proteico SH2, 133F
lisozima, 164F
moléculas proteicas, 144F
Modelos de proteína do tipo fita, 133F
Modelos de proteínas do tipo esqueleto peptídico, 132F
Modelos matemáticos, 35–36, 35F
Modificação de histonas, **221–224**, 223F
acetilação/desacetilação, 290
análise de imunoprecipitação de cromatina, 432, 432F
cadeia lateral dos aminoácidos, 221–222, 221–222F

complexo histona-desacetilase (HDACs), 221–222, 446F
cromossomos politênicos, 238F
histona-acetiltransferases (HATs), 221–222, 343, 343F
modificação da cauda de histonas, 221–222, 223F
papel funcional
epigenética, 472, 472F
hipótese do código de histonas, **224–226**, 226F
transcricional, 343
remodelação da cromatina, 432, 433F
Modificações covalentes de proteínas, **186–187**, 186T
ver também Modificações pós-traducionais; *tipos específicos*
Modificações do pré-mRNA
capeamento na extremidade 5' do mRNA eu-cariótico
empacotamento de hnRNP, 353F, 358
poliadenilação *ver* Poliadenilação (mRNA 3' terminal)
splicing ver Splicing
Modificações pós-traducionais, 388F
colágeno, **1186**, 1187F
covalente, 388F
ver também Glicosilação de proteína; Fosforilação de proteína
elastina, 1190
não-covalente, 388F
regulação da função, **186–187**, 186T
ver também modificação específica
Módulos proteicos, 140–141, 175–176
Módulos vegetais, **1407–1408**
Moesina, 1009
Molaridade, definição, 46
Molécula de adesão celular (NCAM), 1146–1147
Molécula de adesão celular vascular (VCAM), 1146
Molécula de histocompatibilidade, 1575
ver também MHC (complexo de histocompatibilidade principal)
Molécula(s),48
grandes *ver* Macromoléculas
hidrofílicas, 52
hidrofóbicas, 52
pequenas células orgânicas *ver* Moléculas orgânicas (pequenas, celulares)
representação, 51
Molécula(s)/via(s) de sinalização
adesão celular e, **1136–1137**, **1145**, 1172
caspases, 1119
cinases como dispositivos de ativação-desativação, 177F
desenvolvimento, **1316**, 1316T
C. elegans, **1325–1326**
inibidores, **1317–1319**
mecanismo de dispersão do sinal, **1318–1319**, 1318–1319F
morfogenes, **1316–1317**, 1317F–1318F
ver também Desenvolvimento; Gradiente morfogenético
DISC, 1120
extracelular *ver* Molécula(s)/via(s) de sinalização extracelulares
intracelular *ver* Molécula(s)/via(s) de sinalização intracelulares
papel no câncer, 1242–1245, 1243F
proteína sinalizadora, 627F, **630–631**
proteínas BH3-apenas, 1123
proteinoglicanos, 1183
taxa de renovação das moléculas de sinalização, **886–887**, 887F
transdução de sinal *ver* Transdução de sinal
ver também vias/componentes específicos; tipos/vias específicos
Molécula(s)/via(s) de sinalização intracelular, 880F, **893–899**, 894F
amplificação do sinal, **897**
complexo de sinalização, 897, 898F
dispositivos de ativação-desativação, 177–178
ver também Proteína-cinase
fosforilação
resíduos de tirosina *ver* Tirosina-cinase(s)
vs. ligação ao GTP, 180F
ver também Proteína-cinase
fosforilação da tirosina *ver* Tirosina-cinase(s)
integração do sinal, 897F
integrinas, 1172, **1176–1177**, 1176F
mitógenos, 1103
proteína-sinal, 893, 894F, **897–899**
ver também via(s) de sinalização de molécula(s); *moléculas específica(s)*
resposta com limiar abrupto, 900–901,901F
retroalimentação positiva, 901F
segundos mensageiros, 893
ver também Transdução do sinal; *molécula(s)/via(s) específicas*
Molécula(s)-sinal extracelular(es)/via(s), **880–881**, **880–886**
ação combinada, 884
classificadas por raio de ação, **881–883**
CO,889
competição por, **1110**
desenvolvimento, especificações das gônadas, 1283
fatores de crescimento *ver* Fatores de crescimento
fatores de sobrevivência *ver* Fator(es) de sobrevivência
hidrofóbica, 889
inibidora, 1102, 1103, 1110, 1111F
mitógenos *ver* Mitógenos
NO, **887–889**, 888F
resposta celular, **885**
tamanho da célula/número de regulação, 1102
ver também tipo/vias específicas
Moléculas anfifílicas, 618
Moléculas anfipáticas
fosfolipídeos, 58–59
importância evolutiva, 404–406
Moléculas autorreplicativas, evolução
necessidade de autocatálise, 401
polinucleotídeos, 401
polipeptídeos, 401
RNA catalítico, 404, 407F
seleção natural, 404–406
Moléculas carreadoras de oxigênio, 256–257
Moléculas de adesão celular (CAMs), 1177T
adesão célula-célula, 1177T
ver também Caderina(s); Adesão célula-célula
adesão célula-matriz, 1177T
ver também Adesão célula-matriz; Integrina(s)
caderinas *ver*Caderina(s)
formação da sinapse e, **1147–1148**
função das células T, 1571
ICAMs, 411, 1146, 1592T
selectinas, **1145–1146**
superfamília das imunoglobulinas, 1145, **1146–1147**
superfamília de integrinas *ver* Integrina(s)
ver também tipos específicos
Moléculas de adesão celular intercelular (ICAMs), 411, 1146, 1592T
Moléculas de alimento
armazenamento, **91**, **94–95**
não-fermentáveis, evolução na habilidade do uso, 872
obtenção de energia, **88–103**, 100F
ver também Catabolismo
Moléculas engaioladas, 594–595, 595F, 596F
Moléculas hidrofílicas, 52, 108F, 618, 620, 621F
ver também Água
Moléculas hidrofóbicas, 52, 108F, 618, 620,621F
Proteínas, 390–391
ver também Água
Moléculas luminescentes, 596–597
Moléculas orgânicas (pequenas, celulares), 55
ácidos graxos *ver* Ácidos graxos
açúcares *ver* Açúcares
aminoácidos *ver* Aminoácido(s)
como blocos de construção, 56F
fotossíntese, 68–70
metabolismo, 55
nucleotídeos *ver* Nucleotídeo(s)
taxa de difusão na célula, 74–75
Moléculas pequenas
orgânicas *ver* Moléculas orgânicas (pequenas, celulares)
transporte transmembrana, 651
universalidade, 8–9
Moléculas polares, 52–53
Moluscos, desenvolvimento dos olhos, Pax-6, 1306F
Monócitos, 1452, 1452F, 1453T, 1457F
Mononucleose infecciosa, 1499
Monossacarídeos, 55, 57F, 112F
Monoubiquitinação, 926
Monóxido de carbono, como um sinal intercelular, 889
Montador da cinta, 274, 275F, 276F
Monte coaxial, estrutura do RNA, 403F
Morfogênese por ramificação, 1381–1382, 1382F
Morte celular
apoptótica *ver* Apoptose (morte celular programada)
defeituosa em câncer, **1215–1216**
neurônios, 1389–1390
número de células e, 1102
programada *ver* Apoptose (morte celular programada)
ver também tipos específicos
Morte de receptor(es), apoptose, **1120–1121**, 1120F
Mórula, 1379, 1379F
Mosaico genético, desenvolvimento de *Drosophila*, 1348
Mosca-das-frutas *ver Drosophila melanogaster*
Moscas tsé-tsé, 1502
Mosquitos, transmissão do *Plasmodium*, 1494, 1501–1502
Motilidade celular/movimento
deslocamento *ver* Deslocamento celular
microscopia, 582–583
no desenvolvimento animal, 1363–1378
ver também Migração celular; Contribuição no desenvolvimento da miosina II, 1039F
protrusão, 1037–1038, 1039F
tração, 1040–1041, 1041F
via polimerização da actina, **1037–1039**
Motivo folha β, **131**, 134F, **135**, 135F
ligação ao DNA, **422**, 423F
ver também Estrutura de proteína
Motivo hélice-alça-hélice, **425–426**, 426F
Motivo hélice-volta-hélice, **419–420**, 420F
estrutura, 420F
sequência de reconhecimento, 420–421, 421F
Motivo HTH *ver* Motivo hélice-volta-hélice
Motivo RGD, ligação integrina-fibronectina, **1193**
Motivo super-hélice, 135, 135F, 145, 349F
Motivos CpG *ver* ilhas CG (CpG)
Motivos de ligação ao DNA, de proteínas, **416–454**
interações DNA-proteína, 417, 418–419
reconhecimento de pares de bases, 417,417F
ver também Estrutura do DNA
ligação ao DNA homeodomínio, domínios pareados, 141
motivo dedos de zinco, **421–422**, 422F, 423F
motivo folha β, **422**, 423F
motivo hélice-alça-hélice, **425–426**, 426F
motivo hélice-volta-hélice, **419–420**
estrutura, 419, 420F
homeodomínio, **420–421**, 421F
ver também Proteínas de homeodomínio
reconhecimento da hélice, 419, 420F
motivo zíper de leucina, **423**, 424F
proteína de regulação gênica, 418–419, 418T
ver também Interações DNA-proteína
Motivos de proteína, motivos de ligação ao DNA *ver* Motivos de ligação ao DNA (proteína)
Motivos dedo de zinco, 421, **421–422**, 422F
Motivos do homeodomínio de ligação ao DNA, **420–421**, 421F
ver também Proteínas de homeodomínio
Motores moleculares Proteína(s) motora(s)
Movimento molecular, 74–75, 75F
Movimentos intracelulares, bactéria e vírus, 1513–1517
Movimentos termais, 49, 49F
mRNA policistrônico, 380
mRNA pronto para exportação, 327, 357, 358–359, 359F
mRNA *ver* RNA mensageiro
MSH, produção, 803F
MTOR, proteína-cinase, 934, 934F
Muco
mecanismo de defesa do hospedeiro, 1502, 1525
secreção, 772, 774F, 1435, 1437
Mudança tautomérica, bases de DNA, 269,270
Mudanças conformacionais
caderinas, 1138
canais iônicos, 668F
fator de alongamento EF-Tu, 180–181, 181F, 377
integrinas, **1170–1172**, 1172F
proteína príon (PrP), 397F, 398
proteína(s) motora(s), 1016–1019
regulação alostérica *ver* Regulação alostérica
repressor de triptofano, 433–434
retroalimentação negativa (inibição da retroalimentação), 171, 172F
ribozimas, 404, 406F
Multicelularidade
especialização celular *ver* Diferenciação celular
evolução, **955**
interação célula-célula, 1131–1132
ver também Adesão celular; Junção celular; Matriz extracelular (ECM)
ver também Desenvolvimento; Tecido(s)

Multiubiquitinação, 795
Mundo de pré-RNA, origem da vida, 402–403
Músculo, **1463–1467**
cardíaco *ver* Músculo cardíaco
células *ver* Célula(s) muscular(es)
classes, 1463, 1463F
contração, **1026–1030**
controle pela troponina, 1029, 1030F
modelo do deslizamento de filamentos, 1026–1028, 1028F
papel do Ca^{2+}, **1028–1030**
coração *ver* Músculo cardíaco
desenvolvimento, 464, 464F, 1464
ver também Mioblastos; Proteína(s) miogênica(s)
diferenciação de células-tronco, 1425
dilatador, 1464
esquelético *ver* Músculo esquelético
estrutura, 1026, 1027F, 1028F, 1029, 1029F
fibras *ver* Fibra(s) muscular(es)
inervação do neurônio motor, 1385
lâmina basal, 1164F
músculo do vôo em insetos, 1027F
Músculo cardíaco, 1031
células, 1463–1434, 1463F
mitocôndria, 816F
efeitos mutacionais, 1031F
junções aderentes, 1142
sarcômeros, 1026
Músculo esquelético, **1463–1467**
células, 1463
células satélite, 1466
diferenciação, 464, 464F
tamanho celular, 1026, 1026F, 1463
ver também Fibra(s) muscular(es)
estrutura, 1012F, 1026, 1027F, 1029, 1029F
filamentos de actina, 1003, 1012
ver também Actina/filamentos de actina; Miosina(s)
gênese, **1463–1467**
modulação, **1463–1467**
regeneração, **1463–1467**
Músculo liso
células, 1463–1464, 1463F
vasos sanguíneos, 888, 1450
influxo de cálcio, 1030
mecanismo de ação, 1030
Mutação, 16–17, 263, 527–528F
alteração pontual, substituição de base, 246
condicional, 527–528F
sensível à temperatura, 557, 557F, 1057, 1057F
consequências, 264, 570
desenvolvimento de câncer, 1106, **1209–1210**, 1217
ver também Câncer; Genes críticos para o câncer
inovações evolutivas, 18, 19F, 246
ver também Evolução do genoma
deleção, 527–528F
desestabilização/deletéria, 265, 1214
dominante, 558
eliminação por seleção natural, 264, 265
em câncer, 265, 1106, **1208**, 1209, **1209–1210**, 1217, 1261
em células germinativas, 264, 265
ganho de função, 527–528F, 557–558, 564F, 1231
histonas, 213
identificação, 556–557, 559–560
ver também Sondagem genética
intragênica, 18, 19F
inversão, 527–528F
letal, 527–528F
mecanismos, 296, 298F
ver também Mutagênese
mutações neutras, 17
negativa dominante *ver* Mutação negativa dominante
nula, 527–528F
perda de função, 527–528F, 557–558, 1231
proteína, efeito sobre, 558F
recessiva, 558
silenciosa, 264
sinônimos, 247
somática, 265, **1208**, 1209
supressora, 527–528F
taxa *ver* Taxa de mutação
translocação, 527–528F, 1261
triagem, IVF, 1302
ver também tipos específicos
Mutação condicional, 527–528F
sensível à temperatura, 557, 557F, 1057, 1057F
Mutação homeótica
Arabidopsis, 1413F
Drosophila, 1342, 1342F
Mutação intragênica, 18, 19F
Mutação neural, 17
Mutação pontual, 246
Mutação por substituição de base, 246
Mutação recessiva, 558
Mutação sensível à temperatura, 557, 557F, 1057, 1057F
Mutação sinonímia, 247
Mutação somática, 265, **1208**, 1209
ver também Câncer; Mutações
Mutação(ões) de perda de função, 527–528F, 557–558
Mutação(ões) dominante negativas, 527–528F, 564F
engenharia genética, **564**
interferência de RNA, 564F
RNA antissenso, 564F
Mutação(ões) letal(is), 527–528F
Mutação(ões) Null, 527–528F
Mutações de ganho de função, 527–528F, 557–558, 564F
Mutações silenciosas, 264
Mutações supressoras, 527–528F
Mutagênese
análise da expressão gênica, 556
carcinogênese, **1208**
levedura, 570
mecanismos, 296, 298F, 303F, 527–528F, 556
ver também Elementos genéticos móveis
mutagênese *in vitro*, 575
randômica, 553, 556
sítio-dirigida, 565, 565F
ver também Mutação(ões)
Mutagênese *in vitro, 213, 575*
Mutagênese insercional, 527–528F, 556
ver também Transposon(s)
Mutagênese sítio-direcionada, 565, 565F
Mutante *Agamous Arabidopsis*, 1413, 1413F
Mutante *Bride-of-sevenless, Drosophila*, 927
Mutante *Fushi tarazu, Drosophila*, 1337
Mutante *Gooseberry, Drosophila*, 1337
Mutante *Kruppel, Drosophila*, 1337
Mutante Lakritz, 556
Mutante *petite*, **866–867**
Mutante Sevenless, *Drosophila*, 927
Mutante *son-of-sevenless, Drosophila, 928*
Mutantes comportamentais, 556, 557F
Mutantes *mom* (mais mesoderma), 1325
Mutantes *pop* (abundância de faringe), 1325
Mycobacterium tuberculosis, 1487
fagocitose e sobrevivência dentro de células fagocitárias, 1507–1508
persistência, 1507–1508
prevenção da maturação do fagossomo, 1512
tamanho do genoma, 18T
tráfego de membrana na célula hospedeira, 1512, 1512F
transmissão, 1507
Mycoplasma, 13–14F, 1500
Mycoplasma genitalium, **10**, 11F, 18T, 570–571

N

NADH/NAD^+, 78, 82–83, 92F
carreador de elétron, 82–83, 818–819, 818F, 819–820
ver também NADH/NAD+
ciclo do ácido cítrico, 98, 817
geração, 819–820
glicólise, 89, 92F, 93F
papel funcional, 83
produção a partir de piruvato, 96
NADPH/$NADP^+$, 78, 82–83, 82F
carreador de elétron, 82–83, 82F
fotossíntese, 94
fixação de carbono, 845, 845F
fotofosforilação não-cíclica, **850–853**
significância evolutiva, 872
papel funcional, 83
Não-disjunção, 1236F, 1278–1279
Nariz, origem embrionária, 1384F, 1429
N-CAM (molécula de adesão à célula neural), 1388
Nebulina, 1028, 1028F
Necessidades da dieta, nitrogênio, 101
Necrose, 1115
Neisseria, 1520
Neisseria gonorrhoeae, 22, 456
Nematódeos *ver Caenorhabditis elegans*
Neoplasma (tumor) *ver* Câncer
Nervo óptico, regeneração, em sapo, 1391
Neuraminidase, associação das subunidades, 143, 143F
Neurito(s), definição, 1047
Neuroblastos, 1359–1361
Neurodegeneração, 1048
agregados proteicos, 396–397
ver também Doenças de príons
ver também doenças específicas
Neuroesferas, 1478
Neurofibromatose, 1010
Neurofilamentos, 985T, 987, 987F, 1048
Associações, 1005
ver também Filamentos intermediários
Neuroligina, formação de sinapse, 1147–1148
Neurônio(s)
apoptose, 1126, 1126F
citoesqueleto
especialização dependente do citoesqueleto, **1047–1050**
instabilidade dinâmica, 1049
neurofilamentos, 985T, 987, 987F 1005, 1048,
ver também Filamento(s) intermediário(s)
organização de microtúbulos, 1048F
desenvolvimento, **1383–1397**
especificação (neurogênese), 1359–1360, 1359–1360F, 1383–1385
migração, 1385F
ver também Desenvolvimento neural
determinação da característica, **1385–1386**
esquemático, 675F
estrutura
axônio *ver* Axônio(s)
células polarizadas, 806, 806F
citoesqueleto *ver* Citoesqueleto
dendritos *ver* Dendrito(s)
relacionamento funcional, **675–676**, 688F, 1049F
interconexões, **1385–1386**
junção tipo fenda, 1161
membrana plasmática, 645
propriedades elétricas, **688–690**
ver também Potencial de ação
tamanho controlado, 1109, 1110F
ver também Neurotransmissor(es); Sinapse(s); *neurônios específicos*
Neurônio(s) motor(es), 688, 688F, 1385, 1386F
Neurônio(s) sensorial(is), 1386F, 1390
Neurônios sensoriais (receptores) olfativos, **917**, **1429–1430**, 1429F
Neurônios simpáticos, dependência de NGF, 1390
Neurospora, definição de gene, 481
Neurotransmissor(es), 682, 683, **684**, 882,888F
controle dos canais iônicos *ver* Canais iônicos controlados por transmissor
ver também neurotransmissor(es) individual(is)
Neutrófilo(s), 1451
apoptose, 1117
arrastamento celular, 1036
complexo NADPH-oxidase, 1532
estrutura, 1452F
fagocitose, 787, 788F, 1531–1532, 1557T
linhagem e formação, 1457F, 1460–1461
polarização, 1045F, 1046F
rearranjo do citoesqueleto, 969, 969F
receptores, 1532–1532
receptores semelhantes a Toll (TLRs), 1531
renovação rápida por apoptose, 1462
NFS, 764, 764F, 769F
NGF *ver* Fator de crescimento neural (NGF)
N-glicanase, degradação de proteínas mal-enoveladas, 740F
Nicho de células-tronco, via de sinalização, 1441, 1442F
Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato *ver* NADPH/$NADP^+$
Nicotinamida adenina dinucleotídeo *ver* NADH/NAD^+
Nidogênio, lâmina basal, 1165, 1166, 1167F
Nitroglicerina, 888
NK *ver* Célula(s) matadora(s) natural (is) (NK)
Nocautes de genes
camundongos, **566–568**, 567F, 568F
cassetes de deleção, 570
genômica funcional, **569–571**
produção, 567F
Nocautes dirigidos, genômica funcional, **569–571**
Nocodazole, 988T, 1020–1021
Nódulos em plantas, 1398F, 1407
Nódulos de Ranvier, 680, 680F
Nódulos linfoides, 1550, 1551F
Northern Blotting, hibridização de ácidos nucleicos, 538–539, 539F
Noxa, apoptose, 1123
NPCs *ver* Complexos do poro nuclear
Nucleação, do polímero citoesquelético, 972–973, 978F, 992
ver também Polimerização da actina; Microtúbulo(s)
Nuclease de *Staphylococcus*, taxas de reação, 161F
Núcleo
compartimentos, 241–243, 241F, 242F

corpos subnucleares, **363–366**, 365F
corpos de Cajal, 363–364, 364, 365F
funções, 364–366
GEMS, 363–364, 364, 365F
nucléolo *ver* Nucléolo
speckles (manchas), 363–364, 365F
visualização, 365F
estrutura, 200–201, 301F
localização do DNA, 200–201
ver também Cromossomos; DNA (ácido desoxirribonucleico)
proteínas, 358–359
quantidade de membrana, 397T
transporte dentro/fora *ver* Transporte núcleo-citoplasma
volume, 697T
ver também início da entrada no núcleo
Núcleo atômico, NMR, 529
Núcleo ferro-enxofre, 830F, 831, 852
Núcleo supraquiasmático (SCN), relógio circadiano, 461
Nucleocapsídeo, viral, 1497F
Nucleofilamentos, interações proteína RecA proteína-DNA, 307F
Nucleoides, 859
Nucléolo, 362–363, 362F, 363F, 364F
síntese de ribossomos *ver* Ribossomo(s)
Nucleoporina(s), 705
Núcleos, óvulo, 1287
Nucleossomo(s), **211–213**, **211–219**
aspectos históricos, 220
determinação da estrutura, difração de raios X, 212F
efeito transcricional, 344
estrutura dinâmica, 215–216, 215F
fibra de 30 nm, 211F, 212F
ver também Cromatina
interação de DNA, curvaturas de DNA, 214F
ligação de proteínas, 215
ligação na histona H1, 218–219, 218–219F
ligante de DNA, 211
organização estrutural, 211, 211F, 212F
partícula central, **212–214**, 212F
ver também Histona(s)
proteínas não-histonas, 211
remodelagem de cromatina, 215–216, 432, 433F
replicação de DNA, 280, 289–290
ver também Cromatina
Nucleotídeo(s), 3, **3**, 3F, 61–62, **116–117FF**
biossíntese, 101
carreadores de energia, 61
ver também ATP (trifosfato de adenosina)
dano, 296, 296F, 297F
em tRNA, 370F
estrutura, 61, 61F, 116F, 197
hidrólise
cofilina, 1002
geração de força da proteína motora, 1016–1019
montagem de microtúbulos, 973–974, 979, 979F
montagem dos filamentos de actina, 973–974, 1002
proteína FtsZ, 989
treadmilling, 976, 977F
ver também Hidrólise de ATP
nomenclatura, 117F
subunidades de ácidos nucleicos, 61, 62, 197, 331–332
ver também DNA (ácido desoxirribonucleico); RNA (ácido ribonucleico)
ver também nucleotídeos individuais
Nucleotídeos de terminação da cadeia, sequenciamento de DNA, 550
Número celular, 1102
Número de Avogrado, 45–46
Número de renovação, catálise enzimática, 159–160
Número variável de repetições em *tandem* (VNTRs), 547F

O

Obesidade, 1215, 1475
Ocludina, 1153
Octilglicosídeo, solubilidade de proteína de membrana, 637
Oligodendrócito(s), 504F, 678
Oligonucleotídeos, cromatografia de afinidade, 428, 429F
Oligossacarídeo(s), 55–56, 113F
adição de ácido siálico, 774F
complexo, 113F
diversidade da cadeia lateral, 636
processamento no aparelho de Golgi, **773–775**, 773F, 775F
processamento no RE, 775F
Oligossacarídeo(s) ligado(s) à asparagina, glicosilação de proteínas, 737, 737F, 747F
Oligossacarídeo(s) ligado(s) a *N*
estrutura tridimensional, 777F
Formação, 774–775, 774F
função no dobramento proteico, 739F
glicosilação de proteínas, 738, 776F
Oligossacarídeo(s) O-ligado(s), glicosilação de proteínas, 738, 776, 776F
Oligossacarídeo(s) ricos em manose, **774**, 774F
Oligossacarídeos resistentes a Endo H, 775F
Oligossacaril-transferase, 737, 737F, 747F
OMP-descarboxilase, taxas de reação, 161F
Oncogene(s), 1107, 1231
Ativação, 1107, 1231–1234, 1238–1239, 1241–1242
identificação, **1232**
novos métodos de identificação, 1239
superexpressão, 1237–1239
viral, 1232
ver também Genes críticos para o câncer; *proteínas/genes individuais*
Oncogene(s), retrovirose, 1232
Oncogene/proteína viral *E6*, 1248, 1249F
Oncogene/proteína viral *E7, 1248, 1249F*
Onda de cálcio, óvulos, 912, 912F, **1299**
Ondas luminosas, 581–582FF
efeitos de difração, 548, 581F–582F, 582–583
fase, 580, 581–582F, 582–583
efeitos de interferência, 581–582, 581–582F
geração de contraste, 582F–584F
momentum, 598–599
Ondulações na borda anterior das células, 1040F
Oócito, 1288, 1291F
cromossomo plumoso, 1288
desenvolvimento (oogênese), **1288–1290**, 1289F, 1291F
divisão assimétrica, 1289, 1289F
Drosophila, oogônio, 1288, 1290, 1290F
expressão de genes, 1290
folículo/células acessórias e, 1290–1292, 1290F, 1291F
maturação, 1288–1289, **1291–1292**, 1291F
mecanismo de aquisição de tamanho, **1290–1291**, 1290F
meiose, 1280, 1281, 1288, 1290, 1292
primária, 1288, 1289F, 1291F, 1292
secundária, 1289, 1289F, 1292
Oócitos primários, 1288, 1289F
Oócitos secundários, 1289, 1289F
Oogênese, **1288–1290**, 1289F, 1291F
Oogônia, 1288, 1290, 1290F
Operador(es), 433F, 434, 434F
Lambda, 457–458
Operon, 433F, **462–463**
ver também Operon lac (*Escherichia coli*)
Operon *lac* (*Escherichia coli*), 9F, 416, 418T
alça de DNA, 438
comutador de dois sinais, 436F
mutações, 264
regulação do gene *lac*, 9F, 436F
ativação de CAP, 418T, 420F, 436
repressor lac *ver* Repressor lac
ver também Proteína(s) repressora(s)
Operon triptofano, 433F
Opsina, 1433
Opsinização, 1555, 1555F, 1557T
ORC *ver* Complexo de reconhecimento de origem (ORC)
Ordem biológica, **65–87**
estrutural, 64F, 65F
termodinâmica, 66–68
entropia, 67, 67F
ver também Termodinâmica
ORFs *upstream*, 490
Organela(s), 695–697
citocinese, **1098**
cloroplastos *ver* Cloroplasto(s)
conversão de energia, 813
ver também Cloroplasto(s); Mitocôndria
desenvolvimento, 702, 704
evolução, **697–699**, 700–701F
fosfoinositídeos, 757
herança, **864–865**
membranas, 697T
métodos de análise, **509–512**
mitocôndria *ver* Mitocôndria
posição, 697
relações topológicas, 700–701F
volume, 696, 697T
ver também organelas específicas
Organismo fotossintético, 840
bactéria, 840, 863
evolução, **872–875**
ver também Cianobactérias; Bactérias púrpura
evolução, 840–841, 872–875
plantas *ver* Plantas
Organismo(s) transgênico(s), **566–568**
plantas, **568–569**, 569F, 570F
produção de, **566–568**, 570F
recombinação sítio-específica, **325–326**
sistema Cre/Lox, 567–568
ver também Nocaute de genes
Organismo(s)-modelo,25
Arabidopsis, **36**, 36F, **1398–1399**
Caenorhabditis elegans, **36–37**, 36F
camundongos, **39–40**, 43F
Drosophila melanogaster, **37–38**, 37F, **1328–1329**
E. coli, **24–25**, 25F
humanos, **40**, 43F
levedura, **33–34**, 34F
ver também modelos individuais
Organismos anaeróbios, 839, 839F
glicólise, 839
ver também Glicólise
importância evolutiva, 11–12, **870–872**
oxidação do ácido fórmico, 871, 871F
patogênica, 1501
Organização modular, gene *Eve*, 1339
Organizador (Organizador de Spemann), 1368, 1370
Organogênese, **1347–1363**
ver também Desenvolvimento; *órgãos específicos*
Organotróficos, 11–12
Órgão de Corti, 1430, 1431F
Órgão linfoide central, 1541F, 1543, 1543F
Órgão linfoide primário *ver* Órgão linfoide central
Órgão linfoide secundário *ver* Órgão linfoide periférico
Órgãos acessórios, desenvolvimento, **1347–1363**
formação de padrão mais refinado, 1356–1358, 1362
insetos, 1347–1355, 1356–1362
ver também órgãos acessórios específicos
vertebrados, 1355–1356
Órgãos linfoides, **1540**, 1541F
centrais, 1541F, 1543, 1543F
centrais *vs.* periféricos, 1543
periféricos, 1543, 1549, 1549F, 1553F
ver também Medula óssea; Linfonodo(s);Timo
Órgãos linfoides periféricos, 1541F, 1543, 1543F
Origem da replicação *ver* Origem(ns) da replicação
Origem da vida, **400–408**
bicamadas lipídicas, 405–406
DNA como material hereditário, 408
evolução da cadeia transportadora de elétrons, 871–872, **872–875**
linha de tempo, eventos maiores, 874F
moléculas autorreplicativas
polinucleotídeos, 401–402
polipeptídeos, 401
requerimento de autocatálise, 401
seleção natural, 404–406
ver também RNA catalítico
mundo de pré-RNA, 402–403, 402F
mundo de RNA *ver* Hipótese do mundo de RNA
síntese de proteínas, 407–408
ver também Evolução
Origem(ns) de replicação, 282F, 1067
cromossomal, 209, 210F
em bactérias, 282, 283FF
hemimetilação, 282, 284F
em eucariotos, 283, 285F
complexo de reconhecimento de origem (ORC), 287, 288F
em humanos, 288
S. cerevisiae, 286, 287F, 288F
unidades de replicação, 283–284
licenciamento, 1067
ligação no complexo pré-replicação (pré-RC), 1067
sequências de DNA, 210, 281, 286, 287F, 288
síntese de DNA, 281–282
Oscilação
circadiana *ver* Relógios circadianos
da expressão gênica na somitogênese, 1371–1373, 1372F, 1373F
Oscilação de genes, biologia sintética, 461F
Ósmio, corantes para microscopia eletrônica, 606
Ossificação, processo, 1470–1472, 1471F
Osso compactado, 1470F
Osso trabecular, 1470, 1470F
Osso(s), **1469–1474**
articulações, 1471–1472
canalículos, 1470, 1470F
células, 1467, 1470F
ver também Osteoblasto(s); Osteoclasto(s)
composição, 1469–1470
desenvolvimento, 1470–1472
modelo de cartilagem, 1470–1471, 1471F

estrutura, 1470F
formação, endocondral, 1470
lacunas, 1470
longos, desenvolvimento, 1470–1471, 1471F
matriz
como fonte de proteínas sinalizadoras, 1471
erosão por osteoclastos, 1471
não-calcificado (osteóide), 1469–1470, 1470F
secreção por osteoblastos, 1469–1470
produção de ECM, 1179
remodelagem, 1472–1473, 1473F
degradação de ECM, 1193
resposta de estresse, 1474
reparo, 1474
reposição de cartilagem pelos, 1470–1471, 1471F
transformação de fibroblastos em, 1468, 1469–1471
Osteoblasto(s), 1458, 1469–1470, 1470F
células precursoras, 1470F
linhagem e formação, 1467F
produção de ECM, 1179
remodelamento do osso, 1473F
Osteócitos, 1470, 1470F, 1472F
Osteoclasto(s), 1470, 1472, 1472F
arrastamento celular, 1036
erosão da cartilagem, 1472–1473, 1472F
erosão do osso, 1471
remodelamento do osso, 1473F
Osteogênese imperfeita, 1187
Osteoide, 1469–1470, 1470F
Osteopetrose, 1474
Osteoporose, 1474
Ouabaína, efeitos na bomba sódio-potássio, 663
Ouriço-do-mar, gastrulação, 1307F
Ouro coloidal, microscopia eletrônica, 606
Ouvido, origem embrionária, 1384F, 1429
Ovário
câncer, defeitos no reparo do DNA, 295T
células acessórias, 1290–1292, 1290F, 1291F
desenvolvimento, 1285, 1288
junção tipo fenda, 1161
Ovulação, depois de completar a meiose, 1280, 1290, 1292
Óvulo, **1287–1292**
ativação, 1287, **1298**
aumento do Ca^{2+}, **1299**
grânulo cortical, 1288
ligação do espermatozoide ao, 1270F, **1298–1299**, 1298F, 1300F
reação cortical, 1299, **1300**, 1300F
ver também Fertilização
C. elegans, 1323–1324
células estruturais especializadas, 288F, **1287–1288**, 1291F, 1298F
enucleação, 411, 413F
estágios de desenvolvimento, **1288–1290**, 1289F, 1291F
oócitos *ver* Oócitos
PGCs *ver* Células germinativas primordiais (PGCs)
tempo, 1288
partenogênese, 1287
tamanho, 1287, 1287F, **1290–1291**, 1290F
totipotente, 1282
Oxaloacetato, 98, 98F, 99, 122F, 123F
Óxido nítrico (NO), **887–889**, 888, 1450
Óxido nítrico-sintase, **888**, 888F
Oxigênio
afinidade por elétrons, 832–833
atmosférico, 873–874, 874F
componentes tóxicos, 1532
geração de radicais livres, 833, 874
redução pela citocromo-oxidase, 832–834, 833F
requerimento para o catabolismo, 96–97, 817–818
ver também Metabolismo aeróbico
significado evolutivo, **873–875**, 874F
transporte de moléculas, 256–257
Oxitocina, 1428

P

P_2, células no embrião de *C. elegans*, 1324–1325, 1324FF
Paciente 46BR, desordem no reparo de DNA, 295T
Padrão de difração, 527–528, 527–528F
PAGE *ver* Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
Pâncreas, 1444
Pandemia, vírus influenza, 1521, 1522F
Papila dermal, 1422F
Papilomas, 1226–1227
Papilomavírus, 1228, 1228F
oncogenes (*E6* e *E7*), 1248, 1249F
papel do câncer, 1228T, 1248
subversão do controle do ciclo celular, 1248–1249
Papilomavírus humano, câncer cervical, 1499
PAPS *ver* 3'-Fosfoadenosina- 5'-fosfossulfato (PAPS)
Paquíteno, 1275
Paracórtex, nódulo linfático, 1550, 1551F
Paramecium, na árvore da vida, 16F
Parasitas
intracelular, invasão na célula do hospedeiro, **1508–1511**
protozoários, **1494–1495**
verme, nematódeo, 1489
Parassegmentos, *Drosophila*, 1329–1330
Pareamento de bases (nucleotídeos)
estrutura do DNA e, 197–199, 198F, 198FF
ver também Estrutura do DNA
incomum, 269, 331–332
dobramento do RNA, 333–334F
origem da vida, 401
pareamento de bases tipo oscilante, 369F
RNA e, 331–332, 333F–335F
mecanismo de *splicing*
ver também RNA ribossomal; Estrutura do RNA
síntese de DNA e, 266, 266F, 268–269
ver também Replicação do DNA; Síntese de DNA
Pareamento oscilante de bases, 369, 369F
Parede celular de plantas, **1195–1202**
composição/estrutura, 1199F
celulose, 1180, 1196, **1197–1198**, 1197F–1198F
ligação cruzada com glicanos, 1196, 1197–1198, 1197–1198F, 1199T
lignina, 1195, 1196, 1199T
pectinas, 1197–1198, 1197–1198F, 1199T
proteínas, 1197–1198, 1199T
tipos celulares e, **1195–1197**
desenvolvimento e crescimento, **1195–1197**, 1196F
filamentos de actina e, 1202
microtúbulos e, **1200–1202**, 1200F
orientação da deposição, **1199–1200**
parede celular primária, 1195, **1197–1198**, 1197–1198F
parede celular secundária, 1195, 1196
importância funcional e especialização, 1196–1197, 1197F
forças de tração, 1196, **1197**, 1199
resistência compressiva, 1196
plasmodesmata, 1162–1163, 1163F
Parede celular primária, 1195, **1197–1198**, 1197–1198F
Parede celular secundária, 1195, 1196
Parede(s) Celular(es)
procariotos, 13–14, 1490F, 1527
vegetal *ver* Parede celular vegetal
Pares redox, 828
Partenogênese, 1287
Partícula(s) de reconhecimento de sinal (SRP)
estrutura, 728, 728F
transporte de proteínas, 727–730, 728,730
Parvovírus, 1496, 1496F
Parvovírus canino, movimento dos microtúbulos com base em axônios, 1517
Patogênese, definição, 1489–1490
Patógeno facultativo, 1490
Patógeno oportunista, 1490
Patógeno(s), **1485–1537**, 1539, **1539**
citoesqueleto do hospedeiro, **1513–1517**
colonização do hospedeiro, 1501–1502
dano ao tecido, 1488
disseminação, modificação do comportamento do hospedeiro, 1518
diversidade filogênica, 1488–1489
evasão das defesas do hospedeiro, **1502–1504**
evolução (rápida), **1520–1521**
evolução humana, efeito sobre, 1487
facultativos, 1490
fagocitose, **1531–1532**
infecções *ver* Infecções
interações do hospedeiro, 1486–1487
intracelulares *ver* Patógenos intracelulares
membrana celular do hospedeiro, **1510–1514**, 1510–1511F
modificação do comportamento do hospedeiro, 1518
mudanças no tráfego de membranas no hospedeiro, **1510–1514**
não-patogênicos *vs.*, 1492F
obrigatórios, bacterianos, 1490–1491
oportunistas, 1490
primária, 1486–1487
processo infeccioso, 1501–1502
reconhecimento por células hospedeiras, **1525–1528**
requerimentos para multiplicação no hospedeiro, 1487
resistência a drogas, 1521–1524
resposta do hospedeiro, sinais/sintomas, 1487–1488
resposta imune a *ver* Resposta/sistema imune
ver também Bactérias; Fungos; Parasitas; Protozoários parasíticos; Vírus
Patógeno(s) intracelular(es), 1503–1505
entrada/saída da célula hospedeira, 1503–1505, 1512F
estratégias contra tráfego de membranas no hospedeiro, **1510–1514**, 1510–1511F
fuga do fagolisossomo, 1510–1512, 1510–1511F
modificação por bactéria, 1512, 1512F
modificação por vírus, 1513–1514, 1513–1514F
prevenção da fusão do lisossomo, 1510–1511F, 1512
sobrevivência no fagolisossomo, 1510–1511F, 1513
movimento usando a ação da polimerização da actina, 1515–1516
parasitas, invasão das células hospedeiras, 1508–1511
Patógenos associados a imunoestimulantes, 1525–1527, **1539**
Patógenos obrigatórios, 1490–1491
Patógenos primários, 1486–1487
Pax3, 1464
Pax6 (e homólogo), desenvolvimento dos olhos, 466, 466F
Pax7, 1464
PCR *ver* Reação em cadeia da polimerase (PCR)
PDGF *ver* Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
PDI *ver* Proteína dissulfeto-isomerase (PDI)
Pectina, na parede celular vegetal, 1197–1198, 1197–1198F, 1199T
Peixe-zebra, 255, 556, 592F, 1391F
Pele
arquitetura, 1418, 1418F
câncer, 295T, 1226
função, 1417
mamíferos, 1418F
necessidades de suporte funcional, 1417–1418
senescência replicativa, repetições teloméricas, 293
Pênfigos, 1144
Penicilina, 1521–1522
Pentoses, 112F
Peptídeo de ácido nucleico (PNA), 402, 402F
Peptideoglicano(s), parede celular bacteriana, 1490F, 1527
Peptídeos transportadores, carregamento de proteínas de MHC de classe I, 1582, 1582F
Peptidil-transferase, 376, 379, 379F, 407
Pequenas ribonucleoproteínas nucleares *ver* snRNPs
Pequeno RNA de interferência (siRNA), 336–337
Pequenos RNAs nucleares *ver* snRNAs
Pequenos RNAs nucleares *ver* snRNAs
Perda da fluorescência em fotoclareamento (FLIP), 643, 644F, 753F
Perda por heterozigose (LOH), 310, 1236
Perforina, **1573**, 1573F
Pericitos, 1446F, 1450
Período crítico, 1396
Período refratário, replicação de *E. coli*, 282,284F
Peritonite, 1486
Perlecana, 1165, 1166, 1167F, 1184T
Permeases *ver* Proteínas carreadoras
Permutador clorina-carbonato independente de sódio, 658
Permutador sódio-cálcio, 660
Peróxido de hidrogênio, peroxissomos, 721
Peroxina(s), importação de proteínas ao peroxissomo, 722
Peroxissomo(s)
enzimas, 721
estrutura, 721
funções, 696, 721–722
importação de fosfolipídeos do RE, **745**
importação de proteínas, **721–723**
micrografia eletrônica, 721F, 723F
β-oxidação, 722
peróxido de hidrogênio, 721
plasmalógenos, 721
produção, 723F
quantidade de membrana, 697T
reações oxidativas, **721–722**
volume, 697T
ver também Glioxissomo(s)
Pertussis, 1503

Peso atômico, definição, 45
Peso molecular, definição, 45
Peste bubônica, 1502, 1502F
PEV (efeito de posição variegado), 220–221,220–221F
Ph, 52, 109F
  gradiente, 820–821, 821F
  intracelular, 596
  ver também Ácido(s); Base(s) (químicos)
PI *ver* Fosfatidilinositol (PI)
PI3-cinase *ver* Fosfatidilinositol-3'-cinase (PI 3-cinase)
Pigmentos celulares, peixe, 1023–1024, 1024F
Pili, 1490F
Pinça magnética, 526–527
Pinça óptica, 526–527
Pinças de *laser*, 599, 599F
Pinocitose, 787, **789–790**, 789F
Piranosil-RNA (p-RNA), 402F
Piruvato
  ciclo do ácido cítrico, 127F
  glicólise, 88, 89F, 121F
  oxidação a acetil-CoA, 96, 96F
  quebra anaeróbia, 89–90, 90F
  transporte, 822
Piruvato-carboxilase, uso de biotina, 84F
Piruvato-cinase, 121F
Piruvato-descarboxilase,96F
PKC *ver* Proteína-cinase C
Placa celular, 1097
Placa do assoalho, da medula espinal, direcionamento no crescimento do cone, 1388, 1388F
Placa metafásica, 1085
Placa neural, 1161, 1370–1371, 1371F
Placas ateroscleróticas, 791, 1500
Placas celulares precoces, 1098
Placenta, 1379
Placódio, 1384F
Placódio nasal, 1384F
Placoglobina (γ-catenina), ligação à caderina, 1142
Plano médio do corpo (citocinese), 1094, 1094F
Planta(s)
  anatomia comparativa, C3 *vs.* plantas C4, 846–847, 847F
  como organismo-modelo *Arabidopsis thaliana* (*wall cress*)
  desenvolvimento *ver* Desenvolvimento vegetal; Desenvolvimento e crescimento vegetal
  evolução, 36, 840–841
  flores, origem evolutiva recente, 36
  matriz extracelular, 1180, 1195
  plasmodesmata, 1158, **1162–1163**, 1163F
  transgênicos, **568–569**, 569F, 570F
Plantas C_3, 846–847, 847F
Plantas C_4, 846–847, 847F
Plaqueta(s), 1102, 1102F, 1174
Plasmalógeno(s), 721, 722F
Plasmídeo(s), 21, 540–541, 541FF, 1491–1492, 1491F, 1492F
Plasmídeos de virulência, 1491, 1491F, 1492F
Plasmina, 1194
Plasminogênio, 1194
Plasmodesmata, 1158, **1162–1163**, 1163F
Plasmodium falciparum, 1494–1495
  ciclo devida, 1495F, 1502
  DNA mitocondrial, 859
  transcrição tempo-dependente, 1495F
  transmissão e vetor, 1494–1495, 1501–1502
  variação antigênica, 1519
  ver também Malária
Plasticidade genômica, retrovírus, 1520–1521
Plastídeo(s), 696, **841–842**
  amiloplastos, 841, 841F
  cloroplastos *ver* Cloroplasto(s)
  crescimento e divisão, 857–858
  desenvolvimento, 698, 699F, 841
  diversidade, 841F
  etioplastos, 841
  evolução, 699
  genomas, 855–856
  leucoplastos, 841
Plastocianina, 852F
Plastoquinona, 852F
Plectina, 995, 1005, 1006F
Plotagem de hidropatia, proteína(s) transmembrana, 632, 633F
PNA (peptídeos de ácidos nucleicos), 402, 402F
Pneumocystis carinii, variação antigênica, 1519
Polaridade celular planar, **1157–1158**, 1157F, 1358, 1359F–1360F
Polaridade/polarização, 1042
  brotamento de levedura, 880, 1044, 1045F
  célula(s)T, 1047, 1573
  cinetocoro, 1075–1076, 1076F
  citoesqueleto e, 969, 973–975, 1044, **1046**
  controle da exocitose, **805–806**
  desenvolvimento, 1364
    ver também em desenvolvimento de Drosophila
  epitélio
    célula epitelial, **798**, 799F, 806F
    mecanismo de polaridade ápico--basal, **1155–1157**, 1155F, 1156F
    mecanismo de polaridade de célula planar, **1157–1158**, 1157F
  fitas de DNA, 3F
  fusos mitóticos, **1077–1078**, **1081–1082**
  neutrófilo(s), 1045F, 1046F
  Saccharomyces cerevisiae, 1044
  tecidos, 1155
Pólen, 592F, 1269
Poliacrilamida, 517
Poliadenilação (extremidade 3' do mRNA), 346–347, 357–358, 357F
  citoplasmática, **493**
  degradação de mRNA mediada por ausência de sentido, 386
  degradação do mRNA mediada por desadenilação, 492, 492F
  proteína CPSF, 357–358, 357F
  proteína CstF, 357–358, 357F
  RNA 3' terminal mensageiro, 357–358, 357F
  transposons não-retrovirais, 318T
Poliespermia, 1300
Poli-isoprenoide(s), 115F
Polimerase poli-A, 357F, 358
Polimerase T7, correção, 269
Polimerases
  DNA *ver* DNA-polimerase(s); Replicaçãodo DNA
  RNA ver RNA-polimerase(s)
  termofílicas, 544
  ver também Replicação do DNA; *enzimas específicas*
Polimerização da actina
  ao longo do tempo, 978F
  força para a frente, 1039
  hidrólise de nucleotídeo, 973–974, 976
  movimento intracelular bacteriano, 1515–1516, 1515F, 1516F
  nucleação, 972–973F
    da membrana plasmática, **996–998**
    função do complexo ARP, 997F
    lamelipódio, 996
    mecanismo induzido por patógeno, 1516, 1516F
    modelo de protusões do movimento celular, **1037–1038**, 1039F
    regulação, **996–998**
  processo de invasão bacteriano, 1508, 1509F
  protusões da membrana plasmática, **1037–1038**, 1039F
  subunidades, 971
  taxa, 972–973, 972–973F
Polimerização da cauda, 86, 87F
Polimerização moldada, 3–4, 3F
  DNA, 200, 200F, 201F, 266, 266F, 267F, 268F
  transmissão da informação, 3–4, 3–5, 3F, 4F, 5F, 333–334, 334–335F
  ver também Replicação do DNA; Transcrição
Polimerização pela cabeça, 86, 87F, 373
Polímeros tipo RNA, origem da vida, 402,402F
Polimorfismo, proteínas do MHC, 1575, 1588
Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), 560
  evolução do genoma, 258–259
  mapeamento físico de genes, 560, 560F
  rastreamento da herança, 562F
    ver também Blocos haplótipos
Polinucleotídeos
  DNA *ver* DNA (ácido desoxirribonucleico)
  origem da vida, 401
    ver também Hipótese do mundo de RNA
  propriedades, 401
  RNA *ver* RNA (ácido ribonucleico)
  ver também Ácido(s) nucleico(s)
Poliomielite, erradicação por vacinação, 1498–1499F
Poliovírus, 1496F, 1513–1514, 1515F
  capsídeo, 149F
  clivagem do TFIID, 1517
  desligamento da transcrição na célula hospedeira, 1517
  entrada e desempacotamento, 1506F, 1507
  estrutura, 1489F
Polipeptídeos *ver* Proteína(s)
Polipose adenomatosa de cólon *ver* gene APC (polipose adenomatosa de cólon) gene/proteína
Polipose adenomatosa familiar de cólon (FAP), 1253, 1253F
Poliproteína(s), 803
Polirribossomo(s), **381–382**, 382F, 728,730
  ver também Ribossomo(s)
Polissacarídeos, 56, 113F
  biossíntese, 85, 85F
  digestão, 88F, 164–165
  macromoléculas celulares, 62F
Poliubiquitinação, 795
Polo-cinase, 1074
Pontes citoplasmáticas, 1290, 1290F, 1294, 1296F
Ponto de iniciação (restrição) do ciclo celular, 1055, 1061, 1066, 1105
Ponto de restrição no ciclo celular, 1055, 1061, 1066, 1105
Ponto de verificação da montagem no fuso, **1088**
Pontos de verificação G_2/M, 1061, 1062, 1066, 1105
Pontos de verificação no ciclo celular *ver em* Controle do ciclo celular
Pontos fluorescentes, 586–587, 587F
Pontos quânticos, 587, 588F
População celular colonizadora, 1424F
  epitélio do intestino delgado, 1436–1437
  função no câncer, **1217–1218**, 1219
  hemopoiética *ver* Células-tronco hemopoiéticas
  hipótese da fita imortal, 1424–1426, 1425F
  multipotente, hemopoiética, **1450–1463**
  produção, 1421–1422, 1421F, 1424
Porina(s), 144F, 635, 667, 707, 707F, 717,717F
Poros nucleares, 200, 201F, 609F
  ver também Complexo(s) de poro nuclear
Porphyromonas gingivalis, doença crônica, 1500
Potenciais redox, 828–829, 830F
  cálculo ΔG, 830
  medição, 830, 830F
  mudanças de concentração, 830
  padrão, 830T
  transferência de elétrons, 829, 831, 835, 835F, 852F, 853
Potencial de ação, 679FF
  definição, 676
  esquemático, 676F
  experimentos com axônio gigante de lula, 678, 679F,679F
  iniciação, 689
  potencial pós-sináptico, 689F
  propagação, 677, 677F
    condução saltatória, 680
  registro, 679F
  voltagem, 679, 679F
Potencial de membrana, 653, 669, 671F, 821F
  membrana mitocondrial interna, 820–821,821F
  repouso, 669, 669–671,671
Potencial elétrico, neurônios, 675
Potencial pós-sináptico (PSP), 689F
  excitatório (EPSP), 688
  inibidor (IPSP), 688
Potencialização de longo termo (LTP), efeitos, 690–691, 692F
Poxvírus, 1496, 1496F
Precursor de oligossacarídeo(s), 737, 737F, 747F
Pré-peptídeo(s),803
Pré-pró-proteína, 803
Presenilina, 947
Pressão de turgor, 781, 1197, 1199
Pressão seletiva, resistência a antibióticos, 1523
Primossomo, 276, 282, 283F
"Princípio do velcro"
  adesão de caderina, 1138–1139, 1139F
  adesão de integrina, 1174
"Problema codificado", 367
"Problema do enrolamento", replicação do DNA, 278F
Problema no término da replicação, 292
Procariotos, **13–14**
  células, 13–15, 13F–15F
  diversidade, **15**
  expressão do gene, 345F
    controle transcricional, eucariotos *vs.*, 434–436
    mRNA, 346–347F, 380, 381F, 488
    repressor *ver* Proteína repressora
    transcrição *ver* Transcrição
  iniciação da tradução, 1527
  metilação do DNA *ver* Metilação do DNA
  reparo no pareamento incorreto direcionado à fita, 277
  síntese de proteína, 345F, 380
  ver também Archaea (arquebactérias); Bactérias

Procaspases, 1118, 1119F, 1120F, 1121, 1573F, 1574
Processamento de imagem
  microscopia eletrônica, **610–612**
  microscopia óptica, **582–584**, 584F
Processamento do RNA (em eucariotos), **345–347**
  capeamento do mRNA, 346–347
  edição, **483–485**
  poliadenilação, 346–347
  regulação da expressão gênica, 379F, 415, **477–485**
  mudanças em 3', **482–483**
  splicing, **477–481**
  ver também Splicing alternativo
  splicing ver Splicing
  subdomínios nucleares, **364–366**
Processo de junção V-J, produção da cadeia leve k, 1563–1564F
Processos intracelulares
  manipulação, 598–599
  visualização
  concentração iônica, **596–597**, 597F
  eletroporação, 598, 598F
  GFP, **592–593**
  ver também Proteína de fluorescência verde (GFP)
  microinjeção, 597–598, 598F
  rastreamento com radioisótopos, **602–603** *ver também* Radioisótopos
  ver também Corantes fluorescentes
Pró-colágeno, 1186, **1187**
Produção de lactato, 90
  ver também Glicólise
Produto do gene R, 1522, 1523F
Prófase
  meiose, 1091–1092, 1274, 1275–1276, 1276F
  mitose, 1054, 1072F, 1078–1079, 1080
  ver também Fuso mitótico
Profilina, 999–1000, 999F, 1000F
Profundidade de campo *ver* Microscopia eletrônica, 606, 608
Pró-insulina, 151, 152F
Projeção das bases, 298, 300F, 306, 306F
Projeção *tectum*-retinal, 1391, 1393F
Projeto do Genoma Humano, 205–206, 206,532
  ver também Genoma Humano
Proliferação celular, 1053
  células cancerígenas, **1107–1108**, **1217**
  proteínas de vírus tumorais de DNA, 1248, 1249F
  ver também Câncer
  controle total de massa celular, **1111–1112**
  crescimento e divisão coordenados, **1108–1110**
  dependência de ancoragem, 1175–1176, 1175F
  inibição dependente da densidade, 1110, 1110F
  integrinas e, **1175–1176**
  limitação, comprimento do telômero,293
  necessidades, 1244, 1245F
  proteínas de sustentação e complexo juncional, **1153–1155**
  sinais anormais/repouso do ciclo celular, **1107–1108**
  ver também Ciclo celular; Divisão celular; Crescimento celular; Célula senescente replicativa
Prolina, 129F, 1187, 1187F
Prometáfase, 1072F, 1080, 1086
Promotor(es) de tumor, 1226, 1227
Promotores induzíveis, 564
Pró-opiomelanocortina, processamento proteolítico, 803F
Proplastídeos, 698, 841
Proporção ATP:ADP, 823–824
Protease granzima B, 1571, 1573F
Protease(s), 1183, 1194, 1194F
  ver também Proteossomo(s)
Proteína (proteína G) ligadora de GTP trimérico *ver* Proteína(s) G; Proteína(s) G (Proteína/ATPase ligadora de GTP trimérico)
Proteína (sobrevivência de neurônios motores) SMN, 364–365
Proteína 1 associada à função do linfócito (LFA1), 1592T
Proteína amiloide, agregação, 396–397
Proteína argonauta, 494, 494F, 496
Proteína arquitetural, 445–446, 447F
  ver também Curvaturas do DNA
Proteína ativadora de catabólitos (CAP), 418T, 420F, 436
Proteína BAD, sinalização PI 3-cinase, 934, 934F
Proteína Bcl-X_L, integridade de membrana, 1122–1123
Proteína Bcr-Abl, 1261
  Gleevec e, 1262F
Proteína BEAF de ligação ao isolador, 453F
Proteína Bicoid, 1333, 1333F, 1334, 1334F
  ativador do gene *eve*, 448–449, 449F
  desenvolvimento de *Drosophila*, 1022–1023
  localização do mRNA, 486–487, 1022–1023
Proteína Brachyuri ("cauda curta"), 1370
Proteína Brat, 957, 1403
Proteína CapZ, 1003
Proteína C-Cbl, 926
Proteína CD4, 1580–1581, 1580T, 1581F, 1592T, 1599F
  apresentação de antígeno, 1590
  função na entrada de vírus na célula, 765F
  receptor de HIV, 1504–1505, 1504–1505F
Proteína CD8, 1580–1581, 1580T, 1581F, 1592T, 1599F
  apresentação de antígeno, 1590
Proteína Clavata 1, 1410, 1410F
Proteína Clavata 3, 1410, 1410F
Proteína Costal2, 951
Proteína CTCF, 470F
Proteína CTLA4, regulação de células T, 1592T
Proteína *Cubitus interruptus* (Ci), 951, 952F
Proteína de adesão à membrana, junção compacta, 1153
Proteína de ativação gênica *ver* Ativador(es) transcricional(is)
Proteína de capeamento, filamentos de actina, 1003
Proteína de ligação a CREB (CBP), 908, 908F
Proteína de ligação a poli-A, 357F
  polimerase poli-A, 357F, 358
  regulação gênica pós-transcricional, 370–371, 372F
Proteína de ligação a TATA (TBP), 340, 341FF, 342F
Proteína de ligação ao isolador, 452–453,453F
Proteína de ligação ao ponto de forquilha
Proteína de ligação poli-A, 357F
Proteína de regulação autoimune (AIRE), tolerância imunológica, 1588
Proteína de regulação do gene BZIP, membros da família em diferentes eucariotos, 1400T
Proteína de regulação gênicaAsh1, 1023, 1023F
Proteína de regulação gênica Mrf4, 464
Proteína de regulação gênica TCF4, câncer colorretal, 1439
Proteína de regulação Master, 1362
Proteína de sustentação, 894, **897**, 930, 931F, 1145, 1148F
  cadeia de polipeptídeo não-estruturada, 147
  domínio PDZ, 1148
  formação da sinapse e, **1148–1149**, 1149F
  junção compacta, **1153–1155**
Proteína de transporte nuclear, 709–710
Proteína Decapentaplégica (Dpp), 1335, 1335F, **1353**, 1353F
Proteína Delta
  desenvolvimento das cerdas sensoriais de *Drosophila*, **1359**
  embrião *C. elegans*, 1324
  inibição lateral, 946–947, 947F, 1358FF
  ver também Proteína receptora Notch; Via de sinalização Notch
Proteína Desert Hedgehog, 950
Proteína Dicer, RNA de interferência (RNAi), 496
Proteína Dickkopf, 1316T
Proteína dinamina, 756F, **757–758**, 758F
Proteína Discs-large (Dlg), 1148–1149, 1148F, 1154
Proteína dissulfeto-isomerase (PDI), 736
Proteína DnaB, 283F
Proteína DnaC, 283F
Proteína DnaG, 283F
Proteína Docking, substrato do receptor de insulina (IRS-1), 924
Proteína dorsal, de *Drosophila*, 1334–1335, 1335F
Proteína E2F, **1103–1105**, 1244F
Proteína efrina A, 1392–1393
Proteína ERGIC53, RE para transporte do aparelho de Golgi, 767
Proteína espliceossomal U2AF, 350F
Proteína F box, regulação SCF, 1064
Proteína FepA, estrutura, 635
Proteína FGF8, 1371
Proteína fibrosa
  colágeno *ver* Colágeno(s)
  ECM *ver* Matriz extracelular (ECM)
  lâmina basal, 1165
  ver também proteínas específicas
Proteína filagrina, 1005
Proteína Flamingo, 1137, 1138T, 1145, 1158
Proteína fluorescente verde (GFP), 592–593, 594F
  estrutura, 593F
  estudos de transporte vesicular e intracelular, 753F
  regulação da expressão gênica, 476–477
  visualização intracelular *ver também* Transferência de energia por ressonância de fluorescência
Proteína FtsZ, 989–991, 989F, 989FF
Proteína G estimuladora (G_s), 906–907, 919–920T
Proteína G inibidora (G_i), 906–907
Proteína Gcn4, 418T, 424F, 490–491
Proteína Gli, 951
Proteína Gp 120, 765F
Proteína Grb-2, **928**
Proteína Hedgehog, 950
Proteína hélice-alça-hélice, **425–426**, 426F
Proteína hélice-volta-hélice, 420, 420F
  motivo de ligação ao DNA *ver* Motivo hélice-volta-hélice
  proteínas de homeodomínio *ver* Proteínas de homeodomínio
Proteína Her2, na terapia do câncer, 1260
Proteína heterocromatina 1 (HP1), 238
Proteína HLA-DM, 1406
Proteína HS4, 227–228
Proteína Hsp60, 388, 389
  importação de proteínas mitocondriais, 717
Proteína Hsp70, 388, 389, 390F
  transporte de proteínas mitocondriais, 715, 716F, **717**
Proteína Hunchback, gene de ativação *eve*, 448–450, 449F
Proteína Ihog, 950
Proteína IκB, **953**
Proteína Indiana Hedgehog, 950
Proteína izumo, 1298
Proteína Kit, 1375, 1458, 1458F
Proteína Kruppel, 418T, 448–450, 449F
Proteína Lex A, fusão de domínio, 442F
Proteína MAP2, 995F, 1001, 1001F
Proteína matα1, 456
Proteína matα2, 418T, 425F, 456
Proteína MbI, 989, 990F
Proteína Mcm, 289F, 456F, 1068
Proteína Mdm2, 1105, 1106F, 1107
Proteína miogênica, 464, 464F
  ver também Proteína reguladora gênica *MyoD*
Proteína Miranda, 1361
Proteína MreB, 989
Proteína MutH, 277F
Proteína MutL, 277F
Proteína MutS, 277F
Proteína netrina, 1049, 1388, 1388F
Proteína NFkB, **952–954**, 953F, 1530
Proteína NOD, 1531–1532, 1536
Proteína nodal, 1376–1377
Proteína Noggin, 940, 1316T
Proteína Numb, 1358, 1359F
Proteína *p16* (INK4) CKI, em câncer, 1243
Proteína ParM, 990, 990F
Proteína Patched, **950**, 952F
Proteína PCNA, 275F
Proteína Per, 462F
Proteína pilina, *Neisseria*, 1520
Proteína Prospero, 1361
Proteína prox1, 1448
Proteína Rad51, 307F
  ver também Proteína RecA
Proteína Rad52, 308, 308F
Proteína RAG, **1563–1564**, 1564–1565, 1564–1565F, 1600
Proteína RecA
  homólogos, 307–308, 307F, 308F
  proteínas Brca1/ Brca2, 310
  interação proteína-DNA, 307F
  recombinação homóloga, 306–307, 307F
  sinapse, 307–308, 307F
Proteína receptora CD40, 1590, 1592T
  em células B, 1597, 1598T
  em macrófagos, 1593F, 1594
Proteína receptora DCC, 1388, 1388F
Proteína receptora de glicocorticoide, regulação da expressão gênica, 463, 463F
Proteína receptora Fas, 1571, 1594
Proteína receptora Notch, 777, 946, 947, 948F, 1356–1358
Proteína receptora Roundabout, 1388F, 1389
Proteína reguladora de genes latentes
  β-catenina, sinalização Wnt, **948–950**, 949F
  NFkB, **952–954**, 953F, 1530
  Notch, **946–948**
  Proteólise, **946–954**
Proteína reguladora gênica AP2/EREBP, 1400T
Proteína reguladora gênica LEF1/TCF, 950
Proteína reguladora gênica miogenina, 464

Proteína reguladora gênica Myb, 1400T
Proteína reguladora gênica *MyoD*, 418T, 464, 464F, 1464
Proteína reguladora gênica NAC, 1400T
Proteína reguladora gênica Pop1, 1325
Proteína reguladora Ntrc, alça de DNA, 438F
Proteína reguladora transmembrana da fibrose cística (CFTR), 666
Proteína relacionada à actina (ARP), 994F, 997, 1022
Proteína relacionada com receptor de LDL (LRP), 949, 949F
Proteína Rev, transporte mRNA HIV, 485–486, 485F, 486F
Proteína ribossomal, 373
  bacteriana, 378F, 379F
  controle da tradução, 488
  localização no ribossomo, 378–379, 379F
Proteína Sar1, formação de vesícula revestida, 759, 759F
Proteína semaforina, 1388F, 1389
Proteína sev, *Drosophila*, 927
Proteína Sic1, 1101
Proteína Sidekicks, formação da sinapse, 1147
Proteína slit, 1388, 1389
Proteína SMC, 243, 244F, 1070
Proteína Smoothened, **951**
Proteína SNARE
  alvo da toxina do tétano, **760**
  desmontagem, **764**, 764F
  fusão de membrana, 762–764, 763F, 768, 769F
  guia do transporte vesicular, 760
  interação do efetor Rab, 761
  membrana-alvo SNARE, 762–763, 763FF
  vesículas SNARE, 762–763, 763F
Proteína Sonic Hedgehog, 950
Proteína Sp1, reconhecimento da sequência de DNA, 418T
Proteína Spo11 meiose-específica, 1280
Proteína Src
  estrutura, 136, 136F, 178F
  importância funcional, 178, 179F
  regulação, 178, 178F
Proteína Tat, atenuação da transcrição, 478
Proteína Tau, 995F, 1001, 1002F
Proteína Thy1, 1599, 1599F
Proteína timeless, 462F
Proteína tirosina-cinase *ver* Tirosina-cinase
Proteína tirosina-fosfatase (PTP), **938–939**
Proteína torso, 1333F, 1334, 1334F
Proteína transportadora Efflux, transporte de auxina, 959
Proteína transportadora/transporte *ver* Proteínas carreadoras
Proteína Wuschel, 1410, 1410F
Proteína zíper de leucina, **423**, 424F, 425F
Proteína ZO, 1154
Proteína(s), **125–194**
  abundância na célula, 62F
  agregação *ver* Agregação de proteínas
  alostéricas, 171, 172–173
    ver também Regulação alostérica
  classificação, 138–139
  classificação *ver* Classificação de proteína
  como catalisadores, **5–6**, 6F
    ver também Enzima(s)
  como máquinas *ver* Máquinas proteicas
  componentes não-proteicos, 166–167
  controle de qualidade, **390–391**, 391F
  cristal, 527–528, 527–528F
  degradação *ver* Proteólise
  desnaturação, 130, 517
  dobramento *ver* Dobramento de proteínas
  estabilidade, 137, 147F
  estrutura *ver* Estrutura de proteínas
  evolução *ver* Evolução de proteína
  famílias *ver* Famílias de proteínas
  fibrosa, 145–146
    ver também tipos específicos
  forma/tamanho, 131
    ver também Estrutura de proteínas
  fosforilação *ver* Fosforilação de proteínas
  funções *ver* Funções de proteínas
  glicosilação *ver* Glicosilação de proteína
  globular, 143, 145
  identificação *ver* Identificação de proteínas
  interação de DNA *ver* Interação proteína-DNA
  interação de proteína *ver* Interação proteína-proteína
  marcação com GFP para visualização em células vivas, 592–593, 594F
  métodos de análise *ver* Análise de proteína
  módulos, 136, 136F, 140–141, 140F
    fosforilação, 175, 187
    ver também Estrutura de proteínas, domínios
  montagem *ver* também Complexos proteicos (montagem)
  motoras ver Proteína(s) motora(s)
  movimentos (mudanças de forma), **179–181**, 181F
  mudança conformacional *ver* Mudança conformacional
  princípios básicos, **5**
  reguladoras de genes *ver* Proteínas reguladoras de genes
  sequenciamento *ver em* Análise de proteína
  síntese química, 548
  síntese *ver* Síntese de proteínas
  sítio(s) de ligação, 142, **153–157**
    ver também Sítio ativo; Complexos proteicos
  subunidades, 141F, 142–143, 142F, 143F, 148
    ver também Complexos proteicos; Interações proteína-pro-teína
  subunidades macromoleculares, 148
  translocação *ver* Transporte de proteínas
Proteína(s) ARF, **759**, 1107
Proteína(s) de membrana, **629–649**, 630F
  âncora de glicosilfosfatidilinositol, **742–743**, 742F
  associação à bicamada lipídica, **629–630**, 631F
  complexos de multicomponentes, **642–643**
  difusão, **642–645**, 643F, **646–648**
  estrutura, 135
  exposição na superfície celular, 630
  glicosilação, **635–636**
  integral, 630
  ligação de lipídeo, 630
  ligações dissulfeto intercadeia, 636
  localização, 468–487, **645**, 645F
  monitoramento de partícula única, 644
  periféricas, 630
  quantidade, 629
  retículo endoplasmático, 468
  solubilidade, **636–640**
  transmembrana *ver* Proteína(s) transmembrana
  ver também tipos específicos/proteínas
Proteína(s) de regulação gênica, 221–222, 343, 343F, **379–471**, 418T
  controle negativo, 434, 436F
    ver também Proteína(s) repressora(as)
  controle positivo, 434, 436F
    ver também Ativador(es) da transcrição
  descoberta, 416
  eucarióticas, **399–409**, 434, 440–441
    ativador(es) *ver* Ativador(es) da transcrição
    baterias de genes *downstream*, 463–464
    controle coordenado de genes, 462–463, 463F, 464, 464F
    desenvolvimento multicelular, 465, 465F
      ver também Desenvolvimento de *Drosophila*
    diversidade, 31
    enhanceossomo,446–447, 447F
    expressão do desenvolvimento, 448, 448F, 449FF
    famílias principais, 1400T
    mecanismos, 438F, 442F, **445**, 445F, 446F
    montagem do complexo, 445–447, 447, 447FF, 464–465
      ver também Controle combinatório
    natureza modular, 442, 442F, 447–448, 449FF
    proteína receptora de glicocorticoides, 463, 463F
    regulação, 450–451, 451F
    repressor *ver* Proteína(s) repressor(as)
    sinergia transcricional, 444–445, 444F, 464–465
    ver também Fatores de transcrição, geral (TFII)
  fatores de transcrição *ver* Fatores de transcrição, geral (TFII)
  heterodimerização, **424–425**, 425F
    ver também Controle combinatório
  interações proteína-DNA, 416, 417F, 418–419,419F
    ver também Motivos de ligação ao DNA (proteínas); Interações proteína-DNA
  interações proteína-proteína *ver* Controle combinatório
  latentes *ver* Proteínas de regulação gênica latentes
  reconhecimento da sequência de DNA, 418–419, 418T
    determinação da sequência, 429–430,430F
    predição, **426**
    ver também Motivos de ligação ao DNA
  regulação da transcrição *ver* Controle da transcrição da expressão gênica
  sítios de reconhecimento *ver* Comutadores genéticos
  técnicas de análise
    cromatografia de afinidade, 428–429,429F
    determinação da sequência de DNA, 429–430, 430F
    ensaio da alteração da motilidade em gel, 427–428, 428F
    imunoprecipitação da cromatina, 431–432, 432F
  ver também proteínas específicas
Proteína(s) G (proteínas de ligação a GTP triméricas/ATPases), **892**, **905**
  ativação, 905–906, 906F
  complexo βγ, 905, 906F
  efeitos *downstream*
    cAMP, 905–906
    sinalização via fosfolipídeos de inositol, **909–911**
    sobre canais iônicos, **906–907**
  G12, 906
  Gi (proteína G inibidora), **906–907**, 919–920T
  Go, 919–920T
  Golf, 917, 919–920T
  Gq, 919–920T
  GS (proteína G estimuladora), **906–907**, 919–920T
  Gt (transducina), 918, 919–920T
  GTPases monoméricas *vs.* proteínas G, 896
  inativação, 906F
  receptor acoplado *ver* Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)
  subunidade α, 905, 906F
Proteína(s) motora(s), **181–182**, **1010–1025**
  cinética, **1019–1021**
  com base em actina *ver* Miosina(s)
  com base em microtúbulo, **1014–1015**
    ver também Dineína(s); Cinesina(s)
  funções biológicas, 181, 1010, 1020–1022
    contração muscular, **1026–1030**
    dinâmica de microtúbulos, 1080
    localização de RNA, 487F, **1022–1023**
    montagem/função do fuso mitótico, **1077**, 1077F, 1079, 1079F
    movimento do fuso mitótico, **1034–1035**
    separação do polo do fuso, 1089
    transporte axonal, 1020–1021, 1048F
    transporte em organelas, **1020–1022**
    ver também Mitose; Fuso mitótico
  hidrólise de ATP, **1016–1019**, 1017F
    ver também Hidrólise de ATP
  mecanismo, **1016–1020**
  mudança conformacional, 1016–1019
  origem evolutiva, **1015–1016**
  regulação, **1023–1025**
  ver também tipos específicos
Proteína(s) repressora(s)
  Descoberta, 416
  em eucariotos, 445, **445**, 445–447, 447F, 447FF
  em procariotos
    ligação ao operador, 434–434, 434F
    repressor Cro *ver* Repressor Cro
    repressor lac *ver* Repressor lac
    repressor lambda *ver* Repressor lambda
    repressor Met, 423F
    repressor triptofano *ver* Repressor triptofano
  ligação ao DNA, 418T, 420F, 421F, 423F
  mecanismos, 433–434, , 434F, 436F, 445,446F
  repressores traducionais, 488, 490F
Proteína(s) transmembrana, 629–630, 630F
  adesão célula-célula, 1134–1135, 1134F, 1135T, 1153
    ver também Caderinas
  adesão matriz-célula, 1169, 1177T
    ver também Integrinas
  conformação barril β, 632, **634–635**, 635F
  conformação hélice α, **631–632**, 632F
  domínios, 632

interação hélice α, **632–634**
ligações de hidrogênio, 632
montagem, 634
múltipla passagem, 632, 634F, 634FF, 653, **734–735**, **734–736**, 735F
passagem única, 632, 636F, **733–734**, 733F
plotagem de hidropatia, 632
transporte, moléculas pequenas, 651
ver também Porina(s); *tipos/proteínas específicas*
Proteína/gene *Mef2*, 464F
Proteína/gene *Myc*, 950
amplificada em carcinoma, 1238F
ativação da translocação de cromossomo, 1239
ativação do mitógeno e, 1103
como oncogene, 1107, 1238–1239, 1242, 1242F
linfoma de Burkitt, 1239
Proteína/gene *Rb* (retinoblastoma)
câncer, 1104–1105, 1234, 1235
controle do ciclo celular, 1103–1105, 1104F, 1244F
meios de perda, 1236F
nocauteado em camundongo, 1242
regulação por fosforilação, 1104
Proteína/gene retinoblastoma ver Proteína/gene *Rb* (retinoblastoma)
Proteína/gene *Sox9*, testes de desenvolvimento, 1285
Proteína/gene *Sry*, **1283–1285**, 1285, 1286F
Proteína/gene *twist*, 1141, 1335
Proteína/gene *wingless (Wg)*, 1353, 1353F
nos membros dos vertebrados, 1355
segmentação em *Drosophila*, 1340
ver também via de sinalização Wnt
Proteína/gene *Xpd*, camundongos nocaute, 568F
Proteína-alvo, apoptose, 1118–1119
Proteína-cinase, 176–178, **895**
estrutura, 141, 176F
evolução, 176, 177F
homologia da sequência, 176, 177F
inativação de Cdk, 1063–1064, 1064F, 1066T
regulação, *"microchips"*, 177–178, 177F, 179F
tirosina-cinase *ver* Tirosina-cinase
ver também enzimas individuais
Proteína-cinase B (Akt; PKB), 934, 1244
Proteína-cinase C (PKC), 185, 626, 911
Proteína-cinase C atípica (aPKC), polaridade do epitélio ápico-basal, 1156
Proteína-cinase ChK1, 1105, 1105F
Proteína-cinase ChK2, 1105, 1106F
Proteína-cinase I dependente de fosfoinositídeos, 934
Proteína-cinases ativadas por mitógenos *ver* MAP-cinases
Proteína-fosfatases, 176–177, 176F, **895**
Ativação de Cdk, 1063, 1063F, 1066T, 1074–1075
capeamento do 5' Mrna, 347F, 3446
proteína tirosina-fosfatase (PTP), **938–939**
Proteínas adaptadoras, vias de sinalização, 899, 927
Proteínas alostéricas, 171, 172–173
Proteínas ancoradas por GPI *ver* Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)
Proteínas âncoras, citoesqueleto, 1142
Proteínas associadas a microtúbulos (MAPs), 995F, 1080
Proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), 179, 180F, 896, 896F
Proteínas B7, 1592T, 1594, 1595F
apresentação de antígeno, 1590
ativação das células T, 1591F
ligação a CTLA4, 1591–1592
Proteínas barril β, como proteínas transmembrana
ver também proteínas específicas
Proteínas Bcl2, **1121–1124**, 1123F
em câncer, 1127, 1245
Proteínas BH123, apoptose, 1122, 1123F
Proteínas BH3-apenas, apoptose, 1123–1124
Proteínas Brca1/Brca2, 1361
Proteínas carreadoras, **652–667**
acoplamente aos gradientes de próton, 822–823, 823F
bombas dirigidas pela luz, 656F
bombas dirigidas por ATP, 656F, **659–660**, 660F
carreadores acoplados, 656F
cinética, 655, 655F
distribuição celular assimétrica, **658–659**
especificidade, 652
evolução, 655
localização, 1151
mecanismo, 655F
mudanças conformacionais, 653F, 665, 655F
reversibilidade, 826–827, 826F
transporte ativo, **654–667**
transporte de membrana, **652–643**
ver também Transportador(es) ABC; Transporte ativo; *proteínas específicas*
Proteínas de busca de extremidades mais (+) (+TIPs), formação dos microtúbulos, 995F, 1004, 1004F
Proteínas de canal, **652–653**
mudanças conformacionais, 653F
transporte passivo, 653, 654F
ver também Canais iônicos; *tipos específicos*
Proteínas de fusão
vírus, fusão de membrana, 764–765
ver também Marcação de proteínas; *fusão individual*
Proteínas de gordura (superfamília de caderinas), 1137, 1138T
Proteínas de homeodomínio, **420–421**
conservação evolutiva, 138F, 420–421
heterodimerização, 425F
homologias, 138, 138F, 421
isolamento, 429
ligação ao DNA, **420–421**, 421F, 426–432, 430F
plantas, 1399
Wuschel, 1410F
Proteínas de ligacão a GTP (GTPases), **178–181**
geração de movimentos, 178–181, 181
monoméricas, **179–180**, 179F, 180F, 758–760
Família Rab (endereçamento de vesículas), 760–761
família Ras *ver* GTPase Ras
família Rho *ver* GTPase Rho
GTPase Ran, **708–709**, 709F, 710F
Sar 1 (montagem do revestimento vesicular), 759, 759F
trimérica (proteína G) *vs.*, 896
ver também GTPases específicas
regulação, 179, 180F
ver também Proteínas ativadoras de GTPase (GAPs); Fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEF)
regulação celular, 178–179, 179F, 180F
foforilação *vs.*, 180F
trimérica *ver* Proteína(s) G; Proteína(s) G (ATPase/proteínas de ligação a GTP triméricas)
Proteínas de ligação ao DNA, 427F
dimerização, 420, 420F, 422
heterodimerização, **424–425**, 425FF
homodimerização, 424, 425F
importância funcional, **423**
repressor Cro, 142, 142F
histonas *ver* Histona(s)
ligação na fenda maior, 423, 424F
ligação na fenda menor, 423, 424F
motivos de ligação ao DNA *ver* Motivos de ligação ao DNA
predição do sítio de ligação, 426
proteínas dedos de zinco, **421–422**, 422F, 423F
proteínas hélice-volta-hélice, 420–421, 420F
proteínas de homeodomínio *ver* Proteínas de homeodomínio
proteínas zíper de leucina, **423**, 424F, 425F
relação estrutural do DNA, 416–417, 417F, 419
ver também Estrutura de DNA
sequência-específicas, 430F
cromatografia de afinidade, 428–429, 429F
determinação da sequência de DNA, 429–431, 430F
ensaio de alteração da mobilidade em gel, 427–428, 428F
imunoprecipitação de cromatina, 432,432F
interações dedos de zinco, 427F
SSBs *ver* Proteínas ligadoras de fitas simples de DNA (SSBs)
ver também Replicação de DNA; Proteína(s) de regulação gênica; Interações DNA-proteína
Proteínas de múltiplas passagens *ver* Proteína(s) transmembrana
Proteínas de passagem única *ver* Proteína(s) transmembrana
Proteínas de regulação gênica C2C2 (dedo de Zn)/GATA, 1400T
Proteínas de regulação gênica C6 (dedo de Zn), 1400T
Proteínas de regulação gênica MADS box, 1400T, 1414
Proteínas de transferência de fosfolipídeos, **745**
Proteínas de troca de fosfolipídeos, retículo endoplasmático (RE), **745**
Proteínas dedo de zinco, **421–422**, 422F, 423F
dedos de zinco repetidos, 421
especificidade da sequência, 427F
estrutura, 421, 422F
ligação ao DNA, 422F
tipos, 421–422, 422F, 423F
Proteínas dedos de zinco Cys-Cys-His-His, 422F
Proteínas desestabilizadoras de hélice *ver* Proteínas de ligação de fitas simples de DNA (SSBs)
Proteínas ferro-enxofre, 830F, 831
Proteínas Gag (capsídeo viral), mudança da fase de leitura tradu-cional, 383, 384F, 485F, 1498–1499F
Proteínas hélice-alça-hélice básicas (bHLH), 1356, 1362, 1400T
Proteínas hsp40, 390F
Proteínas inibidoras de cinases dependente de ciclina (CKIs), **1063–1064**, 1064F, 1066T, 1101
Proteínas ligadas ao DNA metilado, metilação de DNA, 468
Proteínas ligadoras de actina, 983F, 994F, **1006–1008**
alongamento dos filamentos, **999–1000**, 999F, 1000F
filamentos dinâmicos e, **1002–1003**, 1002F
ligação cruzada, **1006–1007**, 1007F
rede/formação de gel, 1006, **1008–1009**, 1009F
revestimento 1006–1007, 100F
quebra de proteínas, **1000**
Proteínas ligadoras de fita simples de DNA (SSBs)
cooperatividade, 273, 274F
estrutura, 275F
eucariótica, 280
função na hibridização do DNA, 306
maquinaria de replicação do DNA, 273, 274F, 276F
Proteínas mad2, pontos de verificação da montagem de fusos, 1088F
Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), 1336, 1441
Proteínas motoras com base em actina, **1011–1014**
ver também Miosina
Proteínas motoras dependentes de microtúbulos, **1014–1015**
ver também Cinesina(s)
Proteínas Nano, 1283, 1333F, 1334, 1334F
Proteínas não-comissurais, 1389
Proteínas pol, fase de leitura da tradução, 383, 384F
Proteínas príon (PrPs), 1489, **1498–1499**
degeneração neural devida a, 1498–1499, 1499F
desdobramento/agregação, 397–398
estrutura e agregação, 1498–1499
função celular positiva, 398
fungos, 398
infectividade, 397–398
mudança conformacional, 397F, 398
PrP celular normal, 397–398
replicação, 1498–1499
Proteínas quiméricas, proteína ativadora da transcrição, 442F
Proteínas receptoras de odor, no direcionamento axonal, 1430
Proteínas recombinantes
aplicação, 546, 548
marcadores de proteínas, 514–516, 548
vetor de expressão, 546, 548F
ver também Purificação de proteína
Proteínas reguladoras do gene GARP, membros da família em eucariotos diferentes, 1400T
Proteínas relacionadas com cinesina (KRPs), 1014, 1014F
Proteínas repetidas ricas em leucina (LRR), **956**, 956F
Proteínas secretoras, exocitose, 800
Proteínas semelhantes a Toll, **1530–1531**
Proteínas SR, 352, 353
Proteínas transportadoras de influxo, transporte de auxina, 959
Proteína-sinal Notch, embrião jovem de *C. elegans*, 1324
Proteoglicano(s), 1184T
agregados, 1182, 1182F, 1183F
como peneiras moleculares, 1182–1183
correceptores da superfície celular, **1183–1184**
lâmina basal, 1165
montagem/síntese, **775–776**, 1181, 1181F
proteína de membrana, 636
regulação de proteína por, **1182–1183**
tamanho, 1181–1182, 1181F
tecido conectivo, 1179, **1181–1182**
ver também tipos específicos
Proteólise,391
apoptose (morte celular programada), caspases *ver* Caspase(s)
controle do ciclo celular, **1064**
destruição regulada, **395–396**, 396F
função reguladora, **395–396**
insulina, 151, 152F
resistência de agregados de proteína, 397

sinais de degradação, 396F
ver também Proteossomo(s); Via da ubiquitina
Proteômica, **188**
Proteossomo(s), **391–394**, 392F
controle de qualidade da proteína, **391–393**, 767
degradação de proteína desenovelada, 740F
estrutura, 392–393, 392F
processamento/apresentação de antígeno, 1582, 1583F
processividade de proteólise, 392, 392F
ver também Via da ubiquitina
Protistas, **32–34**, 33F
Protocaderina, 1136, 1138T
Protofilamento, 971–972, 972F
Próton *ver* Íon hidrogênio (H^+, próton)
Proto-oncogenes, 1231, 1237, 1237F
Protozoários, 28F, 32–33
como parasitas, **1494–1495**, **1508–1511**
Protrusão, no movimento celular, da trama de actina na borda anterior, 1039F
Proximidade induzida, 185–186
Pseudogenes, 248, 255, 257
Pseudomonas aeruginosa, 1491
Pseudonó, estrutura de RNA, 403F
Pseudopódios, 1037
Pseudouridina, modificação do RNA transportador, 368F
PTEN-fosfatase (supressor de tumor), 933
Puberdade, 1288–1289, 1292, 1293
Puffs de cromossomos, 220–222, 239, 239F
ver também Cromossomo(s) politênico(s)
Pulgas, transmissoras da peste, 1502, 1502F
Pulmão, 1434–1435, **1434–1436**
Puma, apoptose, 1123
Pupa, de *Drosophila, 1329*
Purificação de proteínas
cromatografia, **512–514**, 515F, 535F
eletroforese, 517, 518FF, 521–522, 522FF
Western blotting, 519F
ver também Análise de proteínas; Proteínas recombinantes
Puromicina, 384, 385T
Pus, 1531

Q

Quebra da fita dupla de DNA (DSBs)
pareamento homólogo/recombinação meiótica, 305F, 312, 1275, 1280
produção, 300–301
produção de topoisomerase II, 280F
reparo, 302–303, 303F, 304–305, 308–309
defeito, 295T
ver também Recombinação homóloga (*crossing-over*)
Quebras de fita simples no DNA, 277, 277F, 278, 279F
ver também Reparo no pareamento incorreto direcionado à fita
Queratina, 985–986, 985T, 986F
α-queratina, 145
Queratinócitos, 1038F, 1418F, 1419
controle da diferenciação em cultura, 1422, 1426
migratórios, 1037, 1037F
Quimeras, camundongo, 1380, 1380F, 1381F
Química orgânica, 45
Quimiocina(s), 1533–1534, **1550–1551**, 1550F
na resposta inflamatória, 1453–1454
proteinoglicano e, 1183
receptor, ligação do HIV, 765F
Quimiorrepulsão, 1140
Quimiotaxia, **1045**, 1140
bacteriana, **941–945**, 943F, 945F
direcionamento do cone de crescimento, 1388, 1388F
neutrófilos, 1045, 1045F
Quimiotripsina, 138F, 144F
Quinona(s), 832F, 835, 851, 852F

R

Rab GTPase(s), 760–761, 761, 761T
Rab5, 762, 762F
Rac GTPases, 931
ativação, influência dos microtúbulos, 1043
condução do cone de crescimento, 1387
efeito na organização da actina, 1042F, 1046–1047
polaridade epitelial ápico-basal, 1155F, 1156
Radiação, efeitos no DNA, 300–301
ver também Radiação ultravioleta (UV)
Radiação ionizante, agentes que danificam o DNA, 300–301
ver também Radiação ultravioleta (UV)
Radiação ultravioleta (UV)
dano ao DNA, 296, 297F, 298
ver também Dano ao DNA; Reparo sensível ao DNA; Defeitos no reparo do DNA, 295T
Radicais livres, 832–833, 874, 1532
Radical superóxido, 833
Radiofrequência, NMR, 529
Radioisótopos, 600–601, 601T
aplicações, 534, 602, **602–603**, 602F, 603F
ver também Autorradiografia
medida, 601
Radixina, 1009
Raf-cinase (MAP-cinase-cinase-cinase), 929, 929F, 1239
Raio atômico, 51
Raio de van der Waals, 51, 110F
Raios X, 526–528
fonte síncontron, 529
sensibilidade, defeitos no reparo do DNA, 295T
Raiz
estrutura, 1404–1405F
extremidade, 1407F
meristema apical, 1163, 1401F
no desenvolvimento vegetal, 1400, 1400F
Raiz do cabelo, 1405F, 1407F
Ran GTPase(s)
compartimentalização, 709F
fator de troca de guanina (Ran-GEF), 708
formação do fuso mitótico, 1081
proteína ativadora de Ran-GTPase (Ran-GAP), 708
transporte nuclear, **708–709**, 709F, 710F
Ran-GAP, 708
Ran-GEF, 708
Ran-GTP, 711
Ras GTPase(s), 179, 180F, **926–927**, 936F
ativação da PI3-cinase, 934
ativação da via MAP-cinase, 929F
ativação de mitógenos, 1103
como oncogenes, 1107
estrutura, 180F
formas ativas e inativas, 181F
mutado no câncer, 1107, **1233–1234**, 1241
proteína normal Ras, 1234
regulação, 927, 928F
Rastreamento de linhagem, *Caenorhabditis elegans*, 1322, 1322F
Reação acromossômica, 1297, **1298**, 1299F
Reação cortical, 1299, **1300**, 1300F
Reação de hidrogenação, 71F, 72
Reação de oxidação, 71, 71F
biológica *vs.* combustão, 820F
β-oxidação, peroxissomos, 722
peroxissomos, **722**
produção de energia celular, 70, 88–103
ver também Respiração
transportadores de elétrons, 72, 828
Reação de oxidação-redução (redox), 828–829, 831
Reação de passagem da hélice, DNA-topoisomerase II, 281F
Reação de redução, 71–72, 71F, 828
Reação de transplante, **1575–1576**
Reação em cadeia da polimerase (PCR), **544–546**, 545F, 546F, 547F
Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), 573–574, 573F
Reações acopladas *ver* Acoplamento de reações
Reações de condensação (polimerização de macromoléculas), **84–87**, 85F
Açúcares, 56, 57F
Reações de desidrogenação, 71F, 72
Reações de desintoxicação, retículo endoplasmático liso, 725
Reações de oxirredução (redox), 828–829, 831
ver também Potencial redox
Reações de polimerização
actina *ver* Polimerização da actina
DNA *ver* Replicação do DNA
energética, **84–87**
polimerização da cabeça, 86, 87F, 373
polimerização da cauda, 86, 87F
ver também Macromolécula(s)
Reações de transesterificação, *splicing* do pré-mRNA, 347–348, 348F
Reações de transferência de fosfato, 80, 84F
desfosforilação, 176, 176F
fosforilação *ver* Fosforilação
glicólise, 91, 92F
ver também ATP (trifosfato de adenosina); Proteína-cinase; Proteína-fosfatase
Reações químicas, energia livre, 75F
Rearranjo(s) de DNA
recombinação sítio-específica conservativa
herdável, **325–326**
reversível, **324**, 324F
variação de fase bacteriana, 454–455, 454–455F
ver também Recombinação; *arranjos específicos*
Rearranjos RNA-RNA
mecanismos de *splicing*, 350–351, 350F, 351F
hidrólise de ATP, 351–352
spliceossomo AT-AC, 353–354
SnRNPs, 351
Receptor, 923F, 924
Receptor acessório, células T, 1580
Receptor associado à tirosina-cinase, 922, **935**
Receptor de ácido retinoico, 891F
Receptor de etileno, 958
Receptor de interleucina-2, 1591F
Receptor de proteína Trk A (receptor NGF), 1390
Receptor de proteína *ver* Receptor
Receptor de transferrina, 794
Receptor de transporte nuclear, 708
Receptor do fator de crescimento da epiderme (EGFR), captação por endocitose, 794
Receptor intracelular *ver* Receptor de hormônio nuclear; Receptor(es), intracelular(es)
Receptor nuclear de hormônio
duplicação de genes e divergência, 254, 255F
proteína de regulação gênica, 1400T
proteína dedo de zinco, 421–422, 423F
Receptor nuclear superfamília, **889–890**, 891F, 892F
Receptor tirosina-cinase (RTK), **922–924**, 923F, 923T, 924FF, **925**, 925F
ativação da via Ras, **926–930**, 928F, 929FF
desenvolvimento animal, 1316F
endereçamento com proteínas com domínio SH2, 924–925, 924F, 925F
Receptor(es)
canal iônico regulado por ligante *ver* Canal iônico regulado por ligante
de superfície celular *ver* Receptor(es) de superfície celular
edição, 1548, 1548F, 1565, **1565**
ver também Tolerância imunológica
intracelular, 881, 881F
ver também Receptor(es) nucleares de hormônios
regulação negativa, 795
ver também Endocitose mediada por receptor(es); *tipos específicos*
Receptor(es) AMPA, hipocampo, 690–691
Receptor(es) de células T, **1570–1571**, 1580F, 1599F
apresentação de antígeno, 1590
associação do complexo CD3, 1590F
cadeia γ, 1571
estrutura, 1570–1571, 1570F, 1571
função de sinalização, 1590F
interações proteínas do MHC/antígenos, 1574F, 1577–1579, 1579F, 1580F
montagem no RE, 768
receptor(es) de células B *vs.*, 1595–1596
Receptor(es) de exportação nuclear, 708
Receptor(es) de importação nuclear, **707–708**, 708F
Receptor(es) de manose-6-fosfato (M6P), 755, 784
Receptor(es) de superfície celular, **891–895**, 893F, 894F, 936F
ligado a canal iônico *ver* Canal iônico
ligado(s) às enzimas, 956, 958F
ligado(s) às proteína G *ver* Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)
na via do NFkB (família Toll), 1530
plantas, **956–960**
receptor intracelular *vs.*, 881, 881F
ver também tipos individuais
Receptor(es) Fc, **1555**, 1555F, 1596, 1596F, 1599F
função na fagocitose, 788
transcitose, 797F
Receptores acoplados à proteína G (GPCRs), 641, 892, 893F, 903F, 904, **904–921**, 904F, 905F
AMP cíclico e, **905–908**, 906F, 907F, 907T
Dessensibilização, **920–921**, 920–921F
fosfolipídeos de inositol e, 910F, 910T, 911F, 911FF, **919–921**
fotorreceptores, **917–918**
proteína Flamingo, 1145
receptores olfativos, **917**
regulação dos canais iônicos, **916**
sinal de amplificação, 919–921, 920–921F
transdução visual, 917–918, 918F
ver também receptores específicos

Receptores associados da histidina-cinases, 922, **941–942**
Receptores de carga, 755
Receptores de "endereçamento" (*homing*), linfócitos, 1550
Receptores de acetilcolina (AChRs), 1394
como canais iônicos controlados por transmissor, 684–686
estrutura, 685
história, 684
junção neuromuscular, **684–686**, 687F
ativação sequencial, **687–688**
lâmina basal e, 1168
modelo estrutural, 687F
modo de ação, 685
mudanças conformacionais, 685F
muscarínico, 916
nicotínico, 916
potencial de repouso, 685
seletividade, 685
Receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs), 916
Receptores de adesão, recirculação de linfócitos, 1550–1551
Receptores de hidrolases ácidas, retrômeros, 755
Receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), 791–794, 791F
Receptores de matriz, 1169
integrinas *ver* Integrina(s)
Receptores de reconhecimento de padrões, 1527, 1541–1542
células dendríticas, 1536, 1571
proteínas semelhantes a Toll, **1530–1531**
reconhecimento do patógeno pelo fagócito, 1531
Receptores Eph, 922, 923T, 1392–1393
Receptores guanilil-ciclase, 922
Receptores ionotrópicos *ver* Canais iônicos
Receptores ligados a enzimas, 892, **892**, 893F, **921–945**
Classes, 921
ver também receptores individuais
Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs), 916
Receptores NMDA, **690–692**
Receptores órfãos, superfamília de receptores nucleares, 889
Receptores semelhantes a Toll (TLRs), 1530–1531, 1530F, 1542
ativação, 1533–1534
células dendríticas, 1531, 1536
resposta inflamatória, 1533–1534
Receptores tipo tirosina-fosfatase, 922
ver também Proteína tirosina-fosfatases (PTPs)
Reclinomonas, 862
Recodificação traducional, 383, 383F, 384F
Recombinação, 263, 305F, 554F
cadeias de anticorpo, 1564–1565
engenharia genética *ver* Tecnologia do DNA recombinante
função no reparo de DNA, ligação de extremidades homólogas (reparo DSB),303
geral (homóloga) *ver* Recombinação homóloga (*crossing-over*)
meiótica *ver* Recombinação homóloga (*crossing-over*); Meiose
promíscua, 315–316
sítio-específica *ver* Recombinação sítio-específica
Recombinação de DNA *ver* Recombinação
Recombinação genética *ver* Recombinação
Recombinação geral *ver* Recombinação homóloga
Recombinação homóloga (*crossing-over*), **304–316**
benefícios evolutivos, 305
características comuns, **305**
controle via correção de pareamento de bases incorreto, 315F
funções biológicas, **304–305**, 305F
invasão de fita, 305
mecanismo
hibridização (sinapse), modelos, 306F
invasão de fitas, 306
junções de Holliday *ver* Junções de Holliday
junções heterodúplex, 306, 308
migração de ramificação, 307F, 308,308F
pareamento de bases, 305–306
projeção das bases, 307F
proteínas, 312F
RecA, **306–307**, **307–308**, 307F
recombinação meiótica, 305F, 312–314, 1092, 1092F, 1271, 1274–1275, 1274F, 1280F
complexo de recombinação, 1275, 1280
controle de entrecruzamento, 314
conversão gênica, 314
diversidade gênica e, 1271, **1279–1280**, 1279F
formação de quiasma, 1274, 1274F, 1276, 1276F
heterodúplex, 314, 314F
hot spots e *cold spots*, 1280
interferência de entrecruzamento, 1280
junções de Holliday duplas, 312, 313F
não-entrecruzamento, 313–314
quebra da fita dupla, 305F, 312
regulação, 314, **1280**
Spo11, 1280
reparo da quebra da fita dupla de DNA, **302–303**, 303F, 304–305, 305F, **308–309**, 309F
defeitos, 295T
"fábricas de reparo", 310, 310F
heterozigose, 310
regulação, 310–311
troca de fitas *ver* Junções de Holliday
troca genética/endereçamento, 305, 1348
ver também recombinação meiótica
ver também Análise de ligação; Meiose
Recombinação induzida por repetições, prevenção, 315F
Recombinação meiótica *ver* Recombinação homóloga (*crossing-over*)
Recombinação sítio-específica
aplicações, **325–326**
consequências
controle gênico, **325–326**
mutações, 565, 565F
rearranjo do genoma, 324, 324F, 454–455, 454–455F
mecanismos
conservativa, **324**, 324F, **325–326**
transposicional *ver* Transposição
ver também Integrase; Transposase
Recombinação sítio-específica conservativa, 316, **324**
aplicações em transgênicos, 325–326, 326F
mecanismo de controle gênico, **325–326**
rearranjo reversível do DNA, **324**, 324F, 325F
Recombinação somática induzida, 1348, 1349F
Recombinação transposicional sítio-específica *ver* Transposição
Reconhecimento da fenda principal, 419, 419F
motivo hélice-volta-hélice, 419, 420F
proteína de ligação ao DNA, 419F, 423,424F
ver também Estrutura de DNA
Reconhecimento de Kin, retenção seletiva de proteínas, 731
Reconhecimento íntron-éxon, 551
Recuperação fluorescente depois de fotoclareamento (FRAP), 595, 596F, 643, 644F, 753F
Rede *cis* de Golgi (CGN) (compartimento intermediário), 771F, **772**, 778F
Rede *trans de* Golgi (TGN), 772
compartimentalização funcional, 778F
estrutura, 771F
micrografia eletrônica, 771F
montagem das balsas (plataformas) lipídicas, 807, 807F
proteínas receptoras M6P, 784
transporte, **779–787**, 785F
ver também Exocitose
vias de endereçamento de proteínas, 801F, 807F
Redes de sinalização, analogia a "*microchip*", 177–178, 177F
Redundância genética, **39**
Regeneração
intercalar, 1354, 1354F
lâmina basal e, 1168–1169, 1168F
músculo esquelético, **1463–1467**
nervo óptico, no sapo, 1391
Regeneração de membros, salamandra, 1480, 1480F
Regeneração intercalar, 1354, 1354F
Região da cauda *ver* Região Fc, molécula de anticorpo
Região de controle do lócus, **450–452**, 452,452F
Região de dobradiça, molécula de anticorpo, 1552, 1553F
Região de ligação, (cinesinas), 1016
Região Fc, molécula de anticorpo, 1552F, 1554F, 1555, 1555F, 1559
Região hipervariável, anticorpo, **1560–1562**
Região somatossensorial, córtex cerebral, 1392F
Regiões aceleradas humanas (HARs), 253
Regiões de controle gênico, 538F, 440, 441F
estimuladores, 438F
isoladores, 452F, 453
LCRs, **450–452**, 451F
módulos de regulação
em *Drosophila* (gene *eve*), *448, 449F*
em mamíferos, **450–453**, 450F, 451F, 452F
promotores *ver* Elementos promotores
ver também Proteína(s) de regulação gênica
Regiões de fibras (fascíclos), neuronal, 1387
Regiões não-traduzidas
região não-traduzida 3', 487, 488, 488F
região não-traduzida 5', 488
Registro de *Patch-clamp*, estudo de canais controlados, **680–682**, 681F
Registro fóssil, comparação da árvore filogenética, 248
Regra de disparo, para modificação de sinapses, 1395
Regra de Hebb, 1396
Regra N-terminal *ver* Degradação N-terminal
Regulação alostérica, **171–176**
integrinas, 1171
ligação, 171–172, 172F
ver também Regulação por retroalimentação
mudanças conformacionais, 171, 172F
bombas de prótons, 835–836, 837F
mediadas por fosforilação, 175
ribozimas, 404
transições cooperativas, 173–174, 173F, 174F, 175F
ver também Cooperatividade (interações proteicas)
Regulação combinatória, microRNA (miRNA), 494–495
Regulação da clivagem do RNA, 439–441
Regulação da expressão gênica, **411–499**, 451F
comutadores genéticos *ver* Comutadores genéticos
controle combinatório, **424–425**, 425, 425F, 465, 465F
controle coordenado, 462–463, 462F, 464F
controle da atividade das proteínas, 379f, 415
controle da degradação de mRNA, 379F, 415, **492–493**
dispositivos de memória, 458, 458F
dispositivos oscilatórios, 461, 461F
etapas controláveis, 379F, 415
evolução, 439–440
hormonal, regulação por glicocorticoide, 412, 415, 463, 463F
manipulação da recombinação sítio-específica, **325–326**
papel da estrutura do DNA, 416–417, 417F
pós-transcricional *ver* Regulação gênica pós-transcricional
proteínas de regulação *ver* Proteína(s) de regulação gênica
regiões de controle gênico *ver* Regiões de controle gênico
"ruídos", 476–477
transcricional *ver* Controle transcricional da expressão gênica
ver também Puffs cromossômicos; Desenvolvimento de *Drosophila*
Regulação da expressão gênica bacteriana, **336–338**, 339F, 345
atenuação da transcrição, 477–478
operons, 433F, 462–463
ver também operon *Lac (Escherichia coli)*
proteínas de regulação gênica, 416
reconhecimento da sequência de DNA,418T
repressores, 416
ver também Comutadores genéticos; Proteínas repressoras
ver também Transcrição
Regulação da osmolaridade, 663, 664, 664F, 664FF
Regulação do crescimento em vegetais (hormônios vegetais), **957–961**
Regulação por modificações de múltiplos locais, **186–187**, 187F
Regulação por retroalimentação, 170–171
positiva *ver* Retroalimentação positiva
vias metabólicas, 170–171, 837–838
ver também Regulação alostérica; Retroalimentação negativa (inibição por retroalimentação); Cascatas de regulação
Regulação pós-transcricional, **477–499**, 477F
controle da localização do RNA, 379F, 415

controle do processamento do RNA, 379F, 415, **477–485**
ver também Splicing
controle do transporte do RNA, 379F, 415, **485–486**
genes de imunoglobulina, 370, 482–483
poliadenilação do mRNA, 370–371, 372F
splicing alternativo, **479–480**
traducional *ver* Controle da tradução da expressão gênica
Rejeição de enxerto, 1575
Relação estrutura-função de proteína, 154–155
Relógio
circadiano, **460–462**, 461F, 462F
de segmentação, **1372–1373**
gênico, 461F
molecular, **248–249**, 862
Remodelagem de conexões sinápticas, 1393
Remodelamento da cromatina, 215–216, 442–443, 443F
complexos, 215, 215F, 343, 344
efeito de posição variegado, 226–227
"enzima que escreve o código", 226–227, 227F, 228F
histonas, 216, 216F, 432, 433F
nucleossomos, 216, 432, 433F
RNA de interferência (RNAi), 443
RNA-polimerase(s), 433
sequências de barreira, 227–228
transcricional, mediado por proteína repressora, 445, 446F
Renaturação do DNA *ver* Hibridização do DNA
Renovação celular e *Turnover*
epiderme, **1417–1428**
glândula mamária, 1426–1428
intestino delgado, 1436–1438, 1436F, 1439
no fígado, 1443
ver também Regeneração;
Reovírus, defesa do hospedeiro, 1535
Reparo acoplado da transcrição, 299–300
Reparo de DNA, 263, **295–304**
acoplamento de RNA-polimerase, 299–300
atraso no ciclo celular, 303–304
defeitos *ver* Desordens no reparo de DNA
DNA-polimerase, 302
enzimas, 296, 299F
falhas *ver* Mutagênese
identificação, 295
importância, 295
importância da estrutura do DNA, 297
propensão a erros, 310–311
quebras da fita dupla, 295T, **302–303**, 303F
recombinação homóloga, 295T, 305
reparo de ligação cruzada, 295T
reparo de pareamento incorreto *ver* Reparo de pareamento incorreto
reparo por excisão de base (BER), **297–298**, 299F
reparo por excisão de nucleotídeos (NER), 295T, **298**, 299F
reversão química direta, 298
síntese translesão, 295T
transcrição acoplada, 299–300
vias múltiplas, 295, 297–298
ver também Danos ao DNA; vias *individuais de reparo*
Reparo de pareamento incorreto, 272
citosinas metiladas desaminadas, 302–303
correção exonucleolítica, 270, 270F
reparo de pareamento incorreto direcionado à fita, 272, **276–278**, 277F
disfunção e câncer, 277–278, 295–296
ver também Desordens do reparo de DNA
Reparo de pareamento incorreto direcionado à fita, 272, **276–278**, 277F
Reparo de pareamento incorreto no DNA *ver* Reparo de pa-reamento incorreto
Reparo por excisão de base (BER), **297–298**, 299F
Reparo por excisão de nucleotídeo (NER), 295T, 298, 299F
Repertório de anticorpo pré-imune, 1562–1563
Repetições invertidas, transposons DNA apenas, 318T, 319F
Replicação de cromossomo, 208–209, 209–210, 209F, 210F
centrômero, 209–210, 210, 210F
condensação da cromatina e tempo de, 285–286
ver também Condensação do cromossomo
controle *ver* Controle do ciclo celular
cromátides-irmãs *ver* Cromátide(s)-irmã(s)
duplicação durante a fase S do ciclo celular, 1054
durante a segregação *ver* Segregação de cromossomos
levedura, 210
mudanças estruturais necessárias, 1067
origem da replicação, 209, 210F
telômero, 210, 210F
ver também Telômero(s)
ver também Ciclo celular; Replicação de DNA; Síntese de DNA; Mitose
Replicação de DNA, 3, 200, 201F, 263, **266–295**
bacteriana, 280, 282, 283F
término da replicação, 292
catenação de DNA, 1071
conservação filogenética, 280
correção, 269–270, 270FF
DNA-molde, 200, 201F, 266
erros, 246–247, 269, 271–272, 276, 277
ver também Dano ao DNA; Mutação(ões)
eucariótico, 280
efeitos da cromatina, 285–286
extremidades dos cromossomos *ver* Telômero(s)
fase S do ciclo celular, 284, 285, 285F, **1067–1069**, 1068F
forquilha de replicação *ver em* Forquilha de replicação
forquilhas de replicação múltiplas, 283, 284F
iniciação *ver* Iniciação da replicação do DNA
origens de replicação *ver em* Origem(ns) de replicação
taxa de replicação, 283
tempo, 285
ver também Ciclo celular
fidelidade, 269–270, 271FT
ver também Reparo de DNA
forquilha de replicação *ver* Forquilha de replicação
iniciação *ver* Iniciação da replicação do DNA
maquinaria, 266–281, 276F
cooperatividade, 275–276
DNA-helicases, 273, 273F, 274F
DNA-ligase, 272, 273F
DNA-polimerase *ver*DNA-polimerase(s)
DNA-primase, 272, 272F, 273, 276F
DNA-topoisomerase, **278–280**, 279F, 280F
primossomo, 276
proteínas de ligação ao DNA de fita simples, 273, 274F, 275F
mitocondrial, 856–857, 857F
modelo incorreto de replicação de DNA, 269F
montagem de nucleossomos, 289–290
natureza semiconservativa, 266, 266F, 268F
origens de replicação *ver* Origem de replicação
origens *ver* Origem de replicação
pesquisa histórica, **266–267**
"problema de enrolamento", 278F
problema do término da replicação, 292
reconhecimento da fita, 277
clivagens em eucariotos, 278, 278F
ver também Quebras no DNA de fita simples
metilação em procariotos *ver* Metilação do DNA
ver também Reparo de pareamento incorreto
síntese de DNA *ver* Síntese de DNA
técnicas de análise, 282–283, 284F, 285,285F
transcrição *vs.*, 333–335
ver também Replicação de cromossomo; *componentes individuais*
Replicação de DNA semiconservativa, 266, 266F
Repressor Cro, 142, 142F, 421F, 457–458, 458F
ver também Repressor Lambda
Repressor da transcrição *ver* Proteínas repressoras
Repressor lac, 9F, 416, 418T
biologia sintética, 461F
descoberta, 416
reconhecimento da sequência de DNA, 418T
ver também Proteína(s) repressora(s)
Repressor lambda, 457–458, 458F
biologia sintética, 461F
motivo hélice-volta-hélice, 420F
proteína de regulação gênica, 416
reconhecimento da sequência de DNA, 418T
Repressor Met, motivo folha β, 423F
Repressor tet, biologia sintética, 461F
Repressor triptofano, 433–434, 433F, 434F
motivo hélice-volta-hélice, 420F
Repressores da tradução, 488, 490F
Reprodução assexuada, 1269, 1269F
Reprodução sexuada, 1269–1304
células haploides *vs.* diploides, **1269–1271**, 1270F
desenvolvimento da célula germinativa *ver* Células germinativas primordiais (PGCs)
determinação do sexo *ver* Determinação do sexo
diferenças entre espécies, **1285–1286**
diferenças estratégicas, 1282
fertilização *ver* Fertilização
perspectivas evolutivas
diversidade gênica, **1271**, **1279–1280**, 1279F
vantagens competitivas, **1271–1272**, 1271F
produção de gametas, 1090, 1269, **1272–1274**
ver também Óvulo; Meiose; Espermatozoide
transferência horizontal de gene, **22**
visão geral, 1269–1272
Reservatório ambiental, resistência a antibióticos, 1523–1524
Resfriado comum, 1518
Resgate na instabilidade dinâmica, 980, 981F, 1080
Resistência à ampicilina, elementos genéticos móveis, 318F
Resistência a drogas, **1521–1524**
Resistência a múltiplas drogas, 665–666
Respiração
aspectos evolutivos, 874–875
oxidação de moléculas orgânicas, 70
relação com a fotossíntese, 70, 70F
Resposta do anticorpo secundário, 1546F
Resposta dos anticorpos primários, 1546F
ver também Resposta/sistema imune, adaptativo
Resposta imune adaptativa *ver* Resposta imune/sistema, adaptativo
Resposta imune humoral, **1552–1568**
ver também Célula(s) B; Imunoglobulina(s)
Resposta imune inata *ver* Resposta/sistema imune, inato
Resposta imune mediada por células T, **1540**
Resposta imune primária, 1546, **1546**
ver também Resposta/sistema imune, adaptativo
Resposta imune secundária, **1546**
ver também Resposta/sistema imune, adaptativo
Resposta monoclonal (linfócitos), 1545
Resposta oligoclonal, 1545
ver também Resposta imune/sistema, adaptativo
Resposta policlonal, 1545
ver também Resposta/sistema imune; Imunoglobulina(s)
Resposta SOS, 310–311
ver também Reparo de DNA
Resposta tríplice, na plântula em crescimento, 957, 958F
Resposta tudo-ou-nada, 900
Resposta/sistema imune
adaptivo, **1541–1542**, 1542F, 1545
inato, 1485, **1524–1537**, 1539, 1540FF
adaptativo *vs.*, 1539, 1540FF
elicitores, **1525–1527**, 1527
evolução, 1524, 1531
função, 1524
papel do receptor semelhante a Toll, 1530
reconhecimento de patógenos, **1525–1528**
resposta a vírus, 1534–1536
ver também Fagocitose
mediado por células *vs.* anticorpos, 1540, 1540F
inato *vs.*, 1539, 1540FF
primário *vs.* secundário, **1546**
proteínas de MHC *ver* MHC (complexo de histocompatibilidade principal)
sistema do complemento *ver* Sistema do complemento
ver também Célula(s) B; Imunoglobulina(s); Célula(s) T
Respostas imunes mediadas por células, 1540, **1540–1551**, 1540F, **1569–1589**
patógenos intracelulares, 1572
reações a transplantes, 1575
ver também MHC (complexo principal de histocompatibilidade); Célula(s) T; Receptor(es) de células T

Ressonância magnética nuclear (NMR) *ver* Espectroscopia NMR
Ressonância plasmônica de superfície (SPR), **525–526**, 525F
Retículo endoplasmático (RE), **723–745**
apresentação/processamento de antígenos, 1583F
armazenamento de cálcio, 725–726
associação de proteínas, **736**
ligação de âncoras de GPI, **742–743**, 742F
montagem de vírus e, 1513, 1513–1514F
controle de qualidade, 767–768
degradação de proteína *ver* Proteossomo(s)
desenvolvimento, 702, 704
distribuição durante a citocinese, 1098
dobramento de proteínas, **736**
destino de proteína mal-enovelada, **739–742**, 741F
resposta de proteína desenovelada, 740–742
ver também Dobramento de proteínas
estrutura, 696, 723, 724–725F
evolução, 700–701F
formação de vesículas revestidas por COPII, **767**, 767F
glicosilação de proteína, **736–738**, 737F, 747F
liso, **724–725**, 725F, 726F
ver também Retículo sarcoplasmático
membrana, quantidade, 697T
metabolismo de lipídeos, 626
microssomos, 511, **726**
microtúbulos motores, organização da membrana, 1020–1021
montagem da bicamada lipídica, **743–745**, 744F
montagem de vírus e, 1513, 1513–1514F
montagem do receptor de células T, 768
posição na célula, 697
processamento de oligossacarídeos, 775F
proteína de membrana, 486, 630, 635
proteínas de troca de fosfolipídeos, **745**
proteínas residentes, 432F, 736, 737F, 747F, 767, 770–771, 770F
retenção seletiva, **771**
resposta de proteína desenovelada, **740–742**
rugoso, 725F, 726, 726F
sinal de retenção, 736
síntese de anticorpos, 768F
síntese de ceramidas, 744–745
síntese de colesterol, 743, 744–745
síntese de esfingomielina, 744–745
síntese de fosfolipídeos, 743, 743F
síntese de glicoesfingolipídeos, 744–745
síntese de glicolipídeos, **744–745**
síntese de glicoproteínas, **736–738**, 737F, 747F
transporte de fosfolipídeos, **745**
Via de recuperação, **769–770**, 770–771, 770F
volume, 697T
Retículo endoplasmático (RE), transporte de proteínas, **723–745**
complexo transportador de proteínas Sec61, **730–731**, 730F, 731F
controle de qualidade, **767–768**
destino de proteína mal-enovelada, **739–741**, 741F
integração de proteína transmembrana de múltiplas passagens, **734–736**, 735F
integração de proteína transmembrana de passagem única, **724–725**, 733F
para o aparelho de Golgi, **766–787**, **768–769**
partícula de reconhecimento de sinal (SRP), **727–730**, 729F
mecanismo de ação, 728, 730
proteínas MHC de classe I, inibição por vírus, 1536
receptor SRP, 728
retrotranslocação, 391, **739–740**, 740F
sequência-sinal, 726–727, 733–734
sinal de início da transferência, **732**
sinal de término da transferência, **733**, 733F
translocação cotradutional, mecanismo, 732F
translocação pós-traducional, 732F, 736
Retículo endoplasmático de transição *ver* Retículo endoplasmático (RE), liso
Retículo endoplasmático liso *ver* Retículo endoplasmático (RE), liso
Retículo endoplasmático rugoso *ver* Retículo endoplasmático (RE), rugoso
Retículo mitocondrial, em levedura, 857,858F
Retículo sarcoplasmático, 660, 725–726, 1029
Retina
especificidade neuronal e mapa *tectum* óptico, 1392–1393, 1393F
estrutura, 1432–1433, 1432F
histologia e renovação celular, **1432–1433**
junção tipo fenda, 1162, 1162F
Retina neural *ver* Retina
Retinal, 166, 166F, 640, 1432
Retinoblastoma, 1104, 1234–1235, 1235F
Retroalimentação negativa (inibição por retroalimentação), 902, 902F
acoplamento conformacional, 171, 172F
alosteria, 171, 172F
ver também Regulação alostérica
circuito de transcrição, 459, 459F
múltipla, 170F, 171
regulação, 170F, 171
taxa de inibição, 172, 173F
Retrômero, 755–756, 756, 756F
Retrotranslocação, proteínas mal-enoveladas, 391, **739–740**, 740F
Retrotransposons, 318T, 323
Ty1,318T
ver também Retrotransposons tipo retroviral
Retrotransposons tipo retroviral, 317, 318T, 320, 322F
genoma humano, 207F
LTRS, 318T
transcriptase reversa, 318T
ver também Retrovírus
Retrovírus
ciclo de vida, 321F
fase de leitura traducional, 383, 384F
genoma, 321F
HIV *ver* HIV (vírus da imunodeficiência humana)
integração do genoma, 321F
ver também Transposição
integrase *ver* Integrase
oncogênese, 1232
Proteína Gag, fase de leitura traducional, 383, 384F
proteína pol, fase de leitura traducional, 383, 384F
taxa de mutação, 1450
transcriptase reversa *ver* Transcriptase reversa
ver também Retrotransposons tipo retroviral
Revestimento celular (glicocálice), 636,637F
Revestimento(s) de clatrina, 751, 754–755, 755F, 756F
ver também Fossa(s) revestida(s) por clatrina; Vesícula(s) revestida(s) por clatrina
Rho GTPase(s)
condução do cone de crescimento, 1387
monomérico, 931, 1042–1043
organização da actina, **1041–1043**, 1042F, **1043–1045**
RhoA *ver* RhoA GTPase(s)
RhoA GTPase, **1094–1095**, 1095F, 1177
RhoGEF, 1095
Ribocontroles, 478–479, 478F, 489F
Ribonuclease, tamanho, 1182F
Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas, 353F, 358
Ribose, 112F, 116F, 331–332, 331–332F
Ribossomo(s), 6–7, 8F, 374F
atividade da ribozima, 378–379
composição *ver* Proteínas ribossomais; RNA ribossômico
eficiência, 375
em bactérias, 149–151, 378F, 379F
eucariotos *vs.*, 374F
ligação de antibióticos, 384, 384F, 385T
estrutura, 373, 374–375, 374F, **378–379**, 378F, 379F
localização da proteína, 378–379, 379F
localização do RNA, 378, 378F
sítio catalítico, 378–379
sítios de ligação, 375–376, 375F
subunidade maior, 375
subunidade menor, 375
eucariotos, 360–361, 362–363, 374F
exploração frouxa, 490
interações hidrofóbicas, 381
ligado à membrana, 728, 729F
livres, 728, 729F
montagem, 488
em bactérias, 149–151
em eucariotos, 362–363, 364F, 374–375
ver também Nucléolo
polirribossomos (polissomos) *ver* Polirribossomo(s)
RE rugoso, 724–725
reconstrução de partículas únicas por microscopia eletrônica, 612F
síntese de proteínas, **373–376**, 488
ver também Síntese de proteínas; Tradução
sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), **491**
Ribozimas, 378–379, 404FF, 406F
alosteria, 406F
catalisadores proteicos *vs.*, 404
dobramento do RNA, 404, 404F
mudanças conformacionais, 404, 406F
reações catalisadas por ribozima, 405T
ribossomos, **378–379**
sintético, 404F, 408
ver também RNA catalítico
Ribulose, 112F
Ribulose-bifosfato-carboxilase, **844**, 844F, 846
Rickettsia prowazekii, tamanho do genoma, 18T
Rickettsia rickettsia, movimento com base em actina, 1515–1516
Rifamicina, 385T
RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), 494, 494F
Ritmo diurno, **460–462**, 461F
ver também Relógio circadiano
RITS (complexo de silenciamento gênico transcricional induzido por RNA), 496
RNA (ácido ribonucleico, **4–8**, 62F)
biossíntese, 85, 85F, 86, 87F
composição, 335–337
conformação molecular, 4–5, 5F, 7F
degradação, 379F, 415, 485, **492–493**, 495
edição *ver* Edição de RNA
estrutura ver Estrutura de RNA
fita dupla (dsRNA), 1535
hibridização *in situ*, 585, 586F
localização, regulação da expressão gênica, 379F, 415, **486–488**
material genético, 300
processamento *ver* Processamento do RNA (em eucariotos)
significado evolutivo, 300, 408, 408F
ver também Hipótese do mundo de RNA
síntese, 335–337, 408
autorradiografia, 602
cromossomo(s) politênico(s), 239F
frequência de erro, 270
ver também Transcrição
splicing ver Splicing
tecnologia do DNA recombinante, 546, 548
tipos celulares, 336–337T
mRNA *ver* RNA mensageiro
não-codificante, **360–361**, 362F
ver também tipos específicos
transferência de informação, 331, 331F
ver também Transcrição
RNA antissenso, geração de mutação dominante negativo, 564, 564F
RNA catalítico
origem da vida, 401, 402, 402F
autorreplicação, 404, 407F
ribossomos, **378–379**
sítio ativo de espliceossomos, 352
ver também Ribozimas; Auto-*splicing* de RNA
RNA codificador de proteína, transcrição, RNA pol II, 340T
RNA de fita dupla (dsRNA), vírus, 1534
RNA de Interferência (RNAi), **495–497**, **571–572**
aplicações experimentais, 497, 564F
Caenorhabditis elegans, 571, 571F
destruição de ssRNA dirigida por dsRNA viral, 1535
Drosophila, 571
genética reversa, 572
identificação de célula tumoral, 1240
mecanismo de ação, 571
na doença humana, 497
proteína Dicer, 496
redução de elementos transponíveis, 496
remodelamento da cromatina, 443
técnicas, 571–572
RNA mensageiro (mRNA), 4, 331, 334–335
degradação, 485
degradação mediada por ausência de sentido *ver* Degradação do mRNA mediada por ausência de sentido
regulação da expressão gênica, 379F,415, **492–493**
RNA de interferência, 495
vias, 492, 492F
estabilidade, **482,492–493**
eucariótico, 346–347F, 487–488
capeamento da extremidade 5' *ver* Capeamento da extremidade 5' do mRNA eucariótico
clones de cDNA, 543F, 544
edição, 483–485

exportação nuclear *ver* Transporte núcleo-citoplasma
geração da extremidade 3', 357–358, 357F, **482–483**
ver também Poliadenilação (mRNA 3' terminal)
localização, 486–487, 487F
níveis de expressão, tipos celulares humanos, 412
processamento *ver* Processamento de RNA (eucariótico)
regiões não-traduzidas, 487, 488
sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), **491**, 491F, 1517
sítios de início da tradução, 379–380, 380
splicing ver *Splicing*
função, 336–337t
interação de ribossomo *ver* Interações RNA mensageiro-ribossomo
interações com RNA transportador, 180–181
localização pelo citoesqueleto, 1022–1023
poliadenilação *ver* Poliadenilação (mRNA 3' terminal)
procariótico, 346–347f, 380, 381f, 488
sinais para tradução, **379–380**, 383
splicing ver Splicing
tomada rápida do quepe, 1517
ver também Transcrição; Tradução
RNA não-codificado, **360–361**
ver também tipos específicos
RNA ribossomal (rRNA), 6–7, **6–7**, 373
em bactérias, 378F, 379F
em eucariotos, 360–361, 361F
funções, 336–337T, 378
genes, 360–361, 361F, 363, 863, 1290
modificações, 361, 361F, 362F
processamento, **360–361**, 361F, 362F
ver também SnoRNAs
síntese, 360–361
ver também RNA-polimerase I; RNA-polimerase III
transcrição, 334–335F, 335–337, 340T
RNA transportador (tRNA), **6**, 7F, 368–369
anticódons *ver* Anticódon(s)
estrutura, 368, 368F, 370F, 373F
função, 336–337T
ligação aminoacil-tRNA-ribossomo, 375–376, 375F
ligação peptidil-tRNA-ribossomo, 375–376, 375F
modificação, 368F, 369, 369F, 370F
reação de aminoacilação, **370–371**, 371F, 372F
exatidão, 371–373
origem, 407
reconhecimento da sintetase, 372–373, 372F
ver também Aminoacil-tRNA-sintetases
significado evolutivo, 407–408
transcrição, 335–337, 863
tRNAs iniciadores, 380
ver também Código genético
RNA-endonuclease, 492, 492F
RNA-polimerase I, 339, 340T, 360, 363
RNA-polimerase II, 339, 340T
conceito de "fábrica de RNA", 346–347, 347F
estrutura, 340F
domínio C-terminal (CTD), 341, 346–347
polimerase de bactérias *vs.*, 339–340, 340F
fatores gerais de transcrição, **340–342**
ver também Fatores de transcrição, gerais (TFII)
iniciação da transcrição, 341–342, 341F, 343F
ativadores transcricionais, 342–343, 343F, 440
mediador transcricional, 343
proteínas modificadoras da cromatina, 343
processividade, 357–358
terminação da transcrição, 358
RNA-polimerase III, 339, 340T, 361
RNA-polimerase(s), 334–335, 334F–336F
acoplamento do reparo de DNA, 299–300
associação do fator de alongamento, 343–344
correção, 334–336
DNA-polimerases *vs.*, 334–336
em bactérias, 336–337, 337F, 438F
ciclo de transcrição, 337F
estrutura, 337F
fatores sigma, 336–337, 439, 439T
regulação da transcrição, 438–439, 439t, 440
RNA pol II *vs.*, 339–340, 340F
em eucariotos, 339–340, 340T
efeitos da cromatina, 343, 343F, 344
funções, 339, 340T
regulação da transcrição, 440
RNA-polimerase I, 339, 340T
RNA-polimerase II, 339, 340T
RNA-polimerase III, 339, 340T
ver também Fatores de transcrição, geral (TFII)
energética, 337
estrutura, 334–335F
evolução, 335–336F
fidelidade, 270, 334–336
geração de tensão super-helicoidal, 344–345, 345F
interação proteína-DNA, mudanças estruturais acopladas à ligação ao DNA, 336–337, 338
ligação ao promotor, 337
mecanismo de reação, 334–335
orientação, 339, 339F
remodelamento da cromatina, 433
substratos de trifosfato de nucleosídeo, 334–335
ver também enzimas individuais
Rock-cinase, 1095
Rodamina, 586–587
Rodopsina, 918, 918F, 1432
integração com a membrana do RE, 735F
ligação na dineína, 1022
ligação retinal, 166, 166F
Rombômeros, 1345
Rosetas, celulose-sintase, 1199, 1201
Rota(s) Biossintética(s) secretora(s), **749–787**, 750F, **800**
controle de pH, 770, 770F
ver também Exocitose; Transporte de proteína
Rotavírus, 1496F
rRNA *ver* RNA ribossômico
RTK (receptor tirosina-cinase) *ver* Receptor tirosina-cinase (RTK)
Rubisco *ver* Ribulose-bifosfato-carboxilase
Ruído, microscopia eletrônica, 610–611
RuvA, junções de Holliday, 312F
RuvB, junções de Holliday, 312F

S

S6 cinase (S6K), 1108
Saccharomyces cerevisiae
ciclo celular, 1056–1057, 1056F
como organismo-modelo de estudos genéticos, 286–287, 864
estrutura do centrômero, 229, 229F
função do citoesqueleto, polaridade celular, 969–970
gene *His*, 285F
genoma, 286–287, 287F, 552
interações da actina com outras proteínas, 983, 983F
mapas de interação de proteína, 188, 190F
mutantes, 287
polarização celular, 1044
replicação do DNA, 286–287, 287F
"shmoo", 1044, 1044F
Saccharomyces pombe, genoma, sequenciamento, 552
Saco amniótico, 1379
Salamandra (anfíbio), regeneração de membros, 1480, 1480F
Salmonella, variação de fase, 454–455, 454–455F
Salmonella enterica, 1491
disseminação, 1518
estratégia contra o tráfego de membrana do hospedeiro, 1510–1511F, 1512, 1512F
fagocitose, 1533
ilhas de patogenicidade, 1491F
invasão das células hospedeiras, 1508, 1509F
Sapo(s), 411, 413F
ver também Xenopus laevis
Sarcoma de Kaposi, 1228, 1228T
Sarcoma(s), 1206, 1232
Sarcômero, 1026, 1028, 1028F
SCF (fator de células-tronco), 1375
Schistosoma haematobium, causa do câncer de bexiga, 1228
Schizosaccharomyces pombe, 24F, 1056–1057, 1056F
Scrapie, 397–398, 1498–1499
SDS (dodecil sulfato de sódio), 517, 517F
SDS-PAGE, 517, 518F, 637
ver também Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
solubilidade de proteína de membrana, 637
Secção por congelamento, 585
Seccionamento, preparação de amostra para microscopia, 585, 585F, 605
Seccionamento óptico, **590–592**, 590F, 592F
Secreção de ácido gástrico, 1436
Secreção lisossomal, 786
γ-Secretase, 947
Secretor C-terminal, 482–483
Securina, destruição por APC/C, 1064, 1066, 1087
Sedimentação de equilíbrio, 511, 512F
Segmentação
corpo do inseto, **1329**, 1329–1330F
ver também Desenvolvimento de *Drosophila*
genes controlados, **1336–1338**, 1337F, 1338F
ver também genes específicos
vertebrados, 1345, 1346F, **1371–1372**, 1372F
Segmentação, *Drosophila*, 1329
Segmentos T, *Drosophila*, 1329
Segregação de cromossomo
meiótico (cromossomos homólogos), **1276–1278**
falha (não-disjunção), 1236F, 1278–1279
mitótico, 865, 865F, **1089–1090**, 1089F
ver também Meiose; Mitose; Cromátide(s)-irmã(s)
Seios sanguíneos, na medula óssea, 1454
Seleção natural, **16–17**
Alelos, 561–562, 562F
conformação de proteína, 137
moléculas autorreplicadoras, 404–406
mutações, 264, 265
ver também Mutação
na progressão de tumores, **1212–1213**
reprodução sexual, 1271
seleção purificadora, 247
ver também Evolução
Seleção negativa, timo, **1586–1587**, 1587F
Seleção positiva, no timo, **1585–1586**, 1586F, 1587F
Seleção purificadora, 247
Selectina(s), **1145–1146**, 1177T
E, 1146
estrutura, 1145–1146, 1146F
função, 1145, 1146F
L, 1145, 1550, 1550F
P, 1145-1146
Selenocisteína, recodificação traducional, 383, 383F
SEM, microscopia eletrônica de varredura
Semente(s), 1402, 1404F
mutantes *Arabidopsis*, 1403F
Senescência celular
encurtamento de telômero, 293
fagocitose por macrófagos, 787
replicativa *ver* Célula senescente replicativa
Sepallata, mutante de *Arabidopsis*, 1414
Separador de células ativado por fluorescência (FACS), 502, 502–503F, 1218, 1218F
Separase, 1087, 1278
Sepse, 1534
Septina, 1097
Sequência (DNA) interferente *ver* Íntron
Sequência de (DNA) expressa *ver* Éxon(s)
Sequência de cauda, engenharia genética, 570
Sequência de DNA, 199–200
alterações na evolução do genoma, 246–247
bacteriana, como imunoestimulante, 1527
conservação evolutiva, 207, 208F, 250
efeito estrutural, 416–417
gene da β-globina humana, 199F, 200F
reconhecimento, 418–419, 418T
ver também Motivos de ligação ao DNA
técnicas de análise *ver* Sequenciamento de DNA
Sequência de replicação autônoma (ARS), 286, 287F
Sequência de Shine-Dalgarno, 380, 488,489F
Sequência KDEL, via de recuperação do RE, 770
Sequência KKXX, via de recuperação do RE, 770
Sequência(s) sinalizadora(s), **701–702**, 701F,703F
importação de proteínas no RE rugoso, 726–727
importação de proteínas nos peroxissomos, 722
proteínas da mitocôndria, 713, 714F
proteínas do cloroplasto, 719–720
sinais de localização nuclear, 705
tipos, 702T
Sequenciamento automático de DNA, 550, 550F
Sequenciamento de DNA, **548–550**
alinhamento, 530–531
aspectos históricos, 549–550
automático, 550, 550F
eletroforese em gel, 534, 535F

genomahumano, 142, 205–206
comparativo, 207, 247, 247F, 248F
genômico *ver* Análise da sequência do genoma
nucleotídeos terminadores da cadeia, 550
previsão da sequência de proteínas, 139, 550–551, 550F
previsão de fases de leitura abertas, 551
reconhecimento de íntron-éxon, 551
tecnologia do DNA recombinante, 531, **534**, 535F
Sequenciamento de DNA, pelo método de didesoxi, 549–550
Sequenciamento do genoma, 18T, 142, 551–552
comparativo *ver* Genoma comparativo
pesquisas de homologia, fusão de domínios, 560F
regiões conservadas *vs.* regiões não-conservadas, 207
ver também Evolução do genoma
Sequências consenso
elementos promotores, 338–339, 338F
sinais de poliadenilação, 357, 357F
sinais de *splicing*, 349, 349F
sítio de início da RNA-polimerase, 342F
Sequências conservadas de multiespécies, 252–253, 252F
Sequências de troca, troca de classe, 1568
Sequência-sinal de recombinação, junções V(D)J, 1564–1565F
Serina, estrutura, 129F
Serina/treonina-cinase, **941**
ligação ao receptor, 177F
regulação, 177
sinalização celular, 939, 940F
em vegetais, **956–959**
ver também cinases individuais
Serina/treonina-fosfatases, 938
Serina-protease(s)
degradação da matriz extracelular, 1194
evolução da família de proteínas, 138–139, 140–141, 140F
homologias estruturais, 137–138, 138F
sítio ativo, 154, 155F
Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), 904
células endócrinas do epitélio respiratório, 1435
papel de neurotransmissores, 684
Shigella flexneri, 1491
movimento com base em actina, 1516, 1516F
plasmídio de virulência, 1491F
resistente a antibiótico, 1524
"Shmoo", de levedura, 1044, 1044F
Shugoshinas, 1278
Silenciamento da transcrição *ver* Silenciamento de gene
Silenciamento de genes
função da heterocromatina, 220, 220–221F
gene supresor tumoral, 1236, 1236F
ilhas CG (CpG), danos ao DNA, 300–301
troca do tipo de acasalamento em levedura, 456, 457
ver também Metilação do DNA; Impressão genômica; DNA repetitivo; Inativação do X
Simbiose
origem da mitocôndria, **27–28**
origem do cloroplasto, **29**
Simporte(s), 656, 656F, 659
Simporter ligado ao sódio, 659
Sinais de exportação nuclear, 708
Sinais de localização nuclear (NLSs), **705–707**, 706F
Sinais de *splicing*, 349, 349F, 352, 352F, 355,355F
Sinais de *splicing* crípticos, 352, 352F, 355,355F
Sinal (ou peptídeo) de início de transferência, transporte, de proteína para o RE, 732
mecanismo, 733F
Sinal coestimulador
ativação de linfócitos, 1548
célula apresentadora de antígeno, 1542F, 1571, 1572F, 1593F
ver também Proteína B7; Ligante CD40
células dendríticas, 1571
Sinal de arranjo, 701–702, 701F
reconhecimento adicional M6P, **785**
sinal de localização nuclear, 705–707
Sinal de degradação, proteína(s), 396F
Sinal indutor, no desenvolvimento, 1313
função na gastrulação, 1368F
sequencial, **1319–1320**
ver também tipos específicos
Sinalização autócrina, 881
Sinalização bidirecional, receptores Eph e efrinas, 922
Sinalização celular, **879–974**
princípios gerais, **879–903**
resposta tudo-ou-nada, 901
ver também Comunicação celular; via(s) de moléculas sinalizadoras; Transdução de sinais
Sinalização das proteína-cinases ativadas por mitógenos *ver Via* de sinalização MAP-cinase
Sinalização Delta-Notch *ver* Via de sinalização Notch
Sinalização dependente de contato, 881
ver também Efrina(s); Proteína receptora Notch
Sinalização endócrina, 882–883, 882F, 883F
Sinalização parácrina, **881**, 882F, 883
Sinalização por Wnt
adesão célula-célula e, 1145
ausente em *Arabidopsis*, 1400
câncer colorretal, 1253
β-catenina, **948–950**, 949F
desenvolvimento animal, 1316F
manutenção da população de células-tronco do intestino, 1438–1441
na medula óssea, 1458
na pele, 1426
polaridade de célula planar, 1158
Sinalização sináptica, **882**, 882F
Sinalização via cálcio, **912–916**
calmodulina e, **914–916**, 914F, 915F, 1030
em sinapses, 912
entrada no citosol, **910–912**
ver também Canal de cálcio
frequência de oscilação, **912–914**
liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2}, 914
liberação de cálcio, 912, 913F
manchas de Ca^{+2}, 913, 913F
mecanismos de manutenção de baixos níveis de Ca^{+2} citosólico, 912, 912F
mediado por IP3, 910, 910F
ver também Fosfolipídeo(s) de inositol
mensageiro intracelular da ubiquitina, **912**
ondas de Ca^{+2}, fecundação, 912, 912F, **1299**
oscilações de Ca^{+2}, **912–914**, 913F
PKC e, 911
Sinapse imunológica, 1573, **1591**
células B/ células T auxiliares, 1597T
junções sinalizadoras, 1132
Sinapse(s), 682
elétrica, 1161
eliminação, 1393–1395, 1394F
fenda sináptica, 682
formação, 1149F, 1393–1394
moléculas de adesão celular e, **1147–1148**
proteína Scaffold, **1148–1149**, 1148F
imunológica, junção sinalizadora, 1132
modificação, dependência da atividade elétrica, 1395F
organização/estrutura, 1149F
química *ver* Sinapses químicas
regeneração, 1168–1169, 1168F
remodelamento, 1393, 1396–1397
sinalização, **882**, 882, 882F
vesículas *ver* Vesículas sinápticas
Sinapses, 305F, 306F, 1275, 1276F
Sinapses elétricas, junções tipo fenda, 1161
Sinapses químicas, 682, **684**
excitadora, **684**
inibidora, **684**
mecanismo de ação, 683F
receptor de acetilcolina, 684
sinalização celular, 882
ver também Junção neuromuscular (NMJ); Neurotransmissor(es)
Sinaptobrevina, v-SNARE, 763F
Sincício, 1099
célula muscular, 1464
embrião de *Drosophila*, 448F, 1329–1330
Sincronia, da atividade elétrica na modificação da sinapse, 1393–1395
Sindecana-1, 1184T
Sindecanas, 1183–1184
Síndrome Bloom, desordens do reparo de DNA, 295T
Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), 1581
ver também HIV
Síndrome de Alport, 1167
Síndrome de Cockayne, 300
Síndrome de Down, não-disjunção meiótica, 1278–1279
Síndrome de Ehlers-Danlos, 1187
Síndrome de Kartagener, 1032–1033
Síndrome de Marfan, 1190–1191
Síndrome devon Hippel-Lindau (VHL), 1449
Síndrome de Werner, desordens no reparo do DNA, 295T
Síndrome de Zellweger, 723
Síndrome Peutz-Jeghers, 1156
Síndromes cancerosas hereditárias, **1234–1235**
Sinergia transcricional, 444–445, 444F, 464–465
SINEs (elementos nucleares intercalados curtos), 207F, 322
Sintaxina, t-SNARE, 763F
Sintenia
blocos, evolução do genoma, 250
conservada, 207,250
homem-camundongo, 208F
Sintenia conservada, 207, 208F
Síntese da fita retardada (replicação do DNA), 267, 267F, 268, 268F, 269F, **271–273**, 271F, 276F
Síntese da fita retardada (replicação do DNA), 268, 269F, 272F, 276F
eucariótica, 280, 281F
fragmentos de Okazaki, 267–268, 269F, 272, 281F
ligação, 272
oligonucleotídeos iniciadores de RNA, 272, 272F
problema do término da replicação, 292
ver também Telomerase
Síntese de ATP, 80
dirigida pelo transporte de elétrons, 100F, **817–819**, 819F
desacoplamento, 836
gradientes de prótons, **821–823**, 821F
ver também Gradientes eletroquímicos de prótons; Cadeia transportadora de elétrons
energia, 80
evolução, **870–876**
anaeróbios, **871–872**
cianobactérias, **872–875**
fermentação, 870–871
fotossintético, 94–95, 95F, **850–853**
fosforilação cíclica, 853
fosforilação não-cíclica, **850–853**, 852FF
mitocondrial *ver* Fosforilação oxidativa
via glicolítica, 91, 92F, 93F, 121F
ver também Glicólise
ver também ATP-sintase; Glicólise
Síntese de DNA, **266–268**
análise
autorradiografia, 282–283, 284F, 602–603
coloração com BrdU, 285, 285F, 1059, 1059F, 1422, 1425
iniciação, 281
mecanismo, 268F
ver também DNA-polimerase(s)
necessidade de ATP, 86, 87F
química, 268F
alongamento da cadeia 5'-3', 266–267, 267F, 268F, 271–272, 271F
trifosfatos de desoxirribonucleosídeo, 266, 267F, 268F
relação com a síntese de histonas, 289–200
replicação de DNA, **266–268**
alongamento da cadeia 5'-3' (fita-líder), 267, 267F, 268, 268F, **271–273**, 271F, 276F
fita retardada *ver* Síntese da fita retardada (replicação do DNA)
fita-molde, 267F, 268F
fitas de oligonucleotídeo, 267F, 268F
liberação de pirofosfato, 267F, 268F
ver também DNA-polimerase; Síntese de DNA
ver também Replicação de DNA
Síntese de proteínas, 85, 85F, **366–400**
alterações pós-traducionais *ver* Modificações pós-traducionais
análise experimental, sistema livre de células, 512
ciclo de alongamento, 373, 373F, 376F, 377F
etapas, 375–376, 376F
fatores de alongamento, 179–180, **377–378**, 377F
peptidil-transferase, 376, 379, 379F
em eucariotos, 345F, 380, 380F, 399F
em procariotos, 345F, 380
evolução, 407–408
formação da ligação peptídica, 59, 60F, 125, 373F
inibidores, 384, 385T
ver também Antibióticos
iniciação, **379–380**, 380F
janelas de leitura, 368, 368F
localização *ver* Ribossomo(s)
níveis de regulação, 399
RE *ver* Retículo endoplasmático (RE)

relação com o DNA *ver* Expressão gênica; Código genético; RNA mensageiro
terminação, **381**, 381F
ver também Dobramento de proteínas; Tradução
Sistema de transcrição tipo III, toxinas bacterinas, 1493, 1494F, 1503–1504
Sistema do complemento, 1542
ativação, **1528–1529**, 1528F
ativação C3, 1528
ativação Ig, 1557T
C3b e C3a, 1528–1529
cascata, 1528–1529, 1528F
complexo de ataque à membrana, 1529, 1529F
componentes iniciais, 1528
componentes tardios, 1529F
fagocitose, função, 788
imunidade adaptativa, 1551–1552, 1596, 1596F
lesões em células vermelhas do sangue, 1529F
Sistema dois híbridos, 523–524, 524F
Sistema livre de célula
análise do ciclo celular, 1058, 1058F
estudo do transporte de vesículas, 752, 752F
fracionamento celular, 516
reconstrução de processos biológicos, **511–512**, 516
Sistema nervoso
apoptose, 1115–1116
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento neural
expressão de caderina, 1136, 1136F
neurônios *ver* Neurônios
ver também entradas iniciais neuro-/neural; regiões específicas/tipos celulares
Sistema nervoso central (SNC)
apoptose, 1115–1116
celulas progenitoras, 1386F
origem embrionária precoce, 1367F
reparo, 1479
vulnerabilidade na agregação de proteína, 397
ver também Sistema nervoso
Sistema reverso de dois híbridos, 524
Sistema/via de sinalização de dois componentes, 942, 944F
Sistemas Cre/Lox, 567–568, 1348, 1444
Sistemas de restrição-modificação, 532
Sítio A (ligação no ribossomo), 375F, 376
Sítio ativo, 72–13, 74F
espliceossomos, 352
função da catálise
ver também Catálise enzimática
lisozima, 164F, 165F, 166
serina-proteases, 154, 155F
Sítio de ligação do antígeno, 1552, 1552F, 1554F, 1556F, 1561–1562F
estrutura, 156, 157F, **1560–1562**
Sítio F (ligação ao ribossomo), 375F, 376
Sítio P (ligação ao ribossomo), 375F, 376
Sítios apirimídicos, 299F
Sítios apurínicos, 299F
Sítios internos de entrada no ribossomo (IRESs),**491**, 491F, 1517
Sítios *splice*, 350F
SL RNP, 353–354, 354F
v-SNAREs, 762–763, 763F
t-SNAREs *ver* Proteínas SNARE, SNAREs de membranas-alvo
SnoRNAs, 361
funções, 336–337T, 362F
localização nuclear, 365F
transcrição, 340T
snRNAs, 349–350
complexos de proteína (snRNPs) *ver* snRNPs
função 336–337T
ver também Splicing
função catalítica, 351
localização nuclear, 364, 365F
SL snRNA, 354F
Transcrição, 336–337, 340T
U1 snRNA, 349, 351, 352
U2 snRNA, 349, 352
U4 snRNA, 349
U5snRNA, 349,352
U6 snRNA, 349, 351, 352, 363
ver também Espliceossomo
snRNP triplo, mecanismo de *splicing*, 350F
snRNPs, 349–350
AT-AC do espliceossomo, **354–355**, 354F
mecanismo de *splicing*, 350F, 352
montagem, 365F
proteínas sm, 365F
rearranjos RNA-RNA, 351–352
reciclagem, 364
SL RNP, 353–354, 354F
U1 snRNP, 350F, 351, 351F
U2 snRNP, 350F, 351F
U4 snRNP, 350
U4/5/6 snRNP tripla, 350F
U5 snRNP, 350F, 351F
U6 snRNP, 350F, 351F
montagem, 363
ver também snRNAs; *Splicing*
Sobrevivência celular
integrinas e, **1175–1176**
regulação e hemopoiese, 1462
ver também Morte celular
Solvente(s), água, 109F
Somatostatina, 908
Sombreamento com metais, microscopia eletrônica, 609, 610F
Somito(s), **1371**, 1372F
Sonda(s) de DNA, 534, 536F
detecção de ácido nucleico, 539–540, 539F
ver também Hibridização de DNA
Sonda(s) de RNA, 537
Southern blotting, 539–540, 539F
Splicing, 346–347, **347–348**
alternativo *ver Splicing* alternativo
erros, 347–348, 352, 352F, 355, 355F
evolução, 355–357
vantagem evolutiva, 348
isoformas de células musculares, 1465
localização celular, 366
mecanismos, **347–348**, 350F, 354F
auto-*splicing ver* Auto-*splicing* de RNA
estrutura de laço, 347, 348F, 350F
liberação, 352
maquinaria *ver* Espliceossomo(s)
pareamento de bases, 351
rearranjos RNA-RNA, 350–351, 351–352, 351F
transesterificação, 347, 348F
plasticidade, **355**, 480
regulação, 480, 480F
regulação da expressão gênica, **477–481**
determinação do sexo em *Drosophila*, 481–482, 481F, 482F
remoção de íntron, **347–348**
sinais, 349, 349F
sítios de *splicing*, 350F, 352–353, 353F
splicing AT-AC, 353–354, 354F
splicing trans, 354–355, 354F
tRNA, 369, 369F
Splicing alternativo, 348
ambiguidade da sequência de íntrons, 480
éxon opcional, 479F
éxons mutuamente exclusivos, 479F
gene da α-tropomiosina, 349F, 480
gene *Dscam*, 479F
íntron opcional, 479F
modificação da definição de gene, 480–481
moléculas de adesão celular neuronal (NCAM), 1146–1147
padrões, 479–480, 479F
regulação, 480, 480F
regulação gênica pós-transcricional, **479–480**, 479F
sinais de *splicing*, 349, 349F
sítios internos de *splicing*, 479F
vantagens, 348, 479
SPR *ver* Ressonância plasmônica de superfície (SPR)
SRP *ver* Partícula(s) reconhecedora(s) de sinal (SRP)
Staphylococcus, via de infecção, 1501
STI-751 (Gleevec), terapia da leucemia mieloide crônica, 1261
Streptococcus, 13–14F, 1501
Substituição de genes, engenharia genética, 566F
Substrato(s), ligação à enzima, 72–73, 159–160
ver também Ligante(s)
Subunidades (macromoléculas), **148–152**
Succinato, 122F, 123F
Succinil-CoA, 122F, 123F
Succinil-CoA-sintetase, 123F
Sucrose, 511, 846
Sulco de clivagem, 1093, 1093F
Sulco genital, 1283
Sulfato de condroitina, 1179, 1388
Sulfato de heparana, 881, 1183
Sulfato de queratana, 1179
Sulfato dermatano, 1179
Sulfolobus, árvore da vida, 16F
Superenrolamento, 344–345, 344F
negativo, 344F, 345
positivo, 344F, 345
Superfamília das imunoglobulinas, 1560, **1599–1600**, 1599F
adesão celular, 1145, **1146–1147**, 1177T
formação de sinapse e, 1147–1148
estrutura, 1147F
evolução, 257F
dobramento de imunoglobulinas, 140
ligantes de integrinas β2, 1174
splicing alternativo, 1146–1147
ver também Imunoglobulinas; *membros específicos*
Superfamília TGFβ *ver* Superfamília do fator de crescimento de transformação β
Superfamílias de cinesinas *ver* Cinesina(s); Proteína relacionadas com cinesina (KRPs); Proteína(s) motora(s)
Superóxido, envelhecimento, 868
Superóxido-dismutase (SOD), 860, 868
Supressão, linfócitos autorreativos, 1548
ver também Tolerância imunológica
Supressão da imunidade, tuberculose, 1488
Surdez, mutação da conexina-26, 1161
Surfactante, 1434, 1435F
Suspensões celulares misturadas, 502
Suspensor, 1400, 1400F, 1401F
Sustentação nuclear *ver* Matriz nuclear
Swinholide, 988T
Synechocystis, tamanho do genoma, 18T

T

Tabela periódica, 49F
Talassemia, anormalidades da β-globina, 288, 288F, 355F, 452
Talina, 1170, 1170F
Tamanho celular, controle, 1109–1110
Tap-tagging, 515–516
TATA box
ligação ao fator de transcrição, 340–341, 341F, 342F
localização, 340
sequência consenso, 342F
Taxa de associação, 158F, 526
Taxa de compactação, empacotamento de DNA, 210–211
Taxa de dissociação, 158F, 526
Taxas de mutação, 246, **263–264**
aumentos, 265
ver também Câncer; Instabilidade genética
Caenorhabditis elegans, 264
defeitos no reparo do DNA, 296
DNA mitocondrial, 862
efeitos da seleção natural, 264, 265
Escherichia coli, 263–264
fibrinopeptídeos, 264
limitação do número de genes essenciais, 265
linhagem germinativa, 264
mamíferos, 264
medida, 264
significado evolutivo, 248–249, 264
subestimação, 263–264
Taxol, 988, 988F, 988T
TBP *ver* Proteína de ligação a TATA (TBP)
T_C *ver* Células T citotóxicas (T_C)
Tecido basal, de plantas, 1402, 1404F
Tecido tipo ativador do plasminogênio (tPA), 1194
Tecido vascular
das plantas, 1402, 1404F
vasos sanguíneos *ver* Vasos sanguíneos
Tecidos
conectivo *ver* Tecido conectivo
crescimento celular e, 1102, **1108**
desenvolvimento da segregação, 1140–1141, 1141F, 1142F
engenharia, 1479
enxertos, 504
epitelial *ver* Tecido epitelial
especialização, **1417–1484**
fator extracelular, 1102, 1110
interação célula-célula, 1131–1132, 1132F
adesão seletiva, **1139–1140**, 1139F, 1140F
endereçamento seletivo, **1140–1141**, 1141F, 1142F
ver também Adesão celular; Junção celular; Matriz extracelular (ECM)
lâmina basal *ver* Lâmina basal
organização e manutenção, 1140
polaridade, 1155
renovação, **1417–1484**
reparo, 1193, 1477
seccionamento, preparação de amostra para microscopia, 585, 585F, 605
variedade, 1131
ver também tipos específicos
Tecidos conectivos, 1131, 1132T, 1178F
colágeno *ver* Colágeno
lâmina basal e *ver* Células da lâmina basal, **1467–1474**, 1467F
diferenciação, 1468–1470
tipos, 1467, 1467F
ver também tipos celulares individuais
matriz extracelular, **1178–1195**
influência na diferenciação celular, 1468–1470
ver também Matriz extracelular (ECM)
ver também Epitélio
Tecidos hemopoiéticos, origem dos linfócitos, 1543
Técnica GAL4/UAS, 1350F

Técnica papanicolau, câncer cervical, 1212
Técnica TUNEL, células apoptóticas, 1117, 1118F
Técnicas de centrifugação, **510–511**, 510F, 511F, 512F
coeficiente de sedimentação, 511, 522
determinação do peso molecular, 522–523
Técnicas de microdissecação, 502, 502–503F
Tecnologia do DNA recombinante, **532–553**
aplicação da recombinação sítio-específica, 325–326
aspectos históricos, 532, 533T
bibliotecas de DNA, **540–542**, **541–542**, 542F, 543F
clonagem de DNA *ver* Clonagem de DNA
eletroforese *ver* Eletroforese
enzimas de restrição, 532, **532–533**, 534F
genes repórteres *ver* Gene(s) repórter(es)
hibridização de ácidos nucleicos, 532, 537F, 538F, 539F
hibridização *in situ*, 532
identificação da origem da reprodução, 288
ver também Genoma humano
marcação de DNA, 534, 536F
ver também Sonda(s) de DNA
microarranjos de DNA, 537
organismos transgênicos *ver* Organismo(s) transgênico(s)
PCR, **544–546**, 545F, 546F
princípios básicos, 532
produção de proteínas *ver* Proteínas recombinantes
produção de RNA, 546
sequenciamento de DNA *ver* Sequenciamento de DNA
ver também Engenharia genética; Proteína recombinante; *técnicas específicas*
Tectum óptico, 1391, 1391F
especificidade neuronal e mapa tectum-retinal, 1392–1393
Telófase, 1055, 1073F, **1090**
Telomerase, **292–294**, 505
estrutura, 292F
montagem nucleolar, 363
papel na senescência, 1107
ver também Transcriptases reversas
Telômero(s), **292–294**
câncer, 1217
célula senescente replicativa e, 293, 1107
papel da heterocromatina *ver* Heterocromatina
pareamento homólogo meiótico e, 1274, 1274F
regulação do comprimento, 293–294
levedura, 293, 294F
papel na senescência, 293, 1107
replicação, 210, 210F, 292, 294F
alças T, 292, 293F
ver também Telomerase
sequências de DNA repetitivo, 210
conservação evolutiva, 292
perda da replicação, 293
TEM *ver* Microscopia eletrônica de transmissão
Temperatura de fusão, 537F
Tempo evolutivo, unidades, 265
Tensão super-helicoidal, 344–345, 344F
Teoria da seleção clonal, imunidade adaptativa, **1544**, 1545F
Teosinte, 1411, 1411F
Termodinâmica, 66–67, **118–119FF**
entropia, 66–67, 67F
primeira lei, 67–68, 118F
segunda lei, 66–67, 118F
ver também Energia livre
Teste de Ames, 1225, 1225F
Teste de paternidade, 547F
Testes
desenvolvimento, **1283–1285**, 1286F
espermatogênese, 1293–1294, 1294F, 1295F
estrutura, 1293, 1294F
Testes complementares, 527–528F, 558
Testosterona, 889F
Tetraciclina, 318F, 385T
Tetraspanina, 1298–1299
Tetróxido de ósmio, preparação de amostra para EM, 605, 605F
TGN *ver* Rede *trans* de Golgi (TGN)
T_H *ver* Células T auxiliares (T_H)
Thermofilum, árvore da vida, 16F
Thermomicrobium, árvore da vida, 16F
Thermotoga maritima, 10F, 18T
Threading, análise computacional de proteína, 139
Tilacoide(s), 719–720, 842–843, 843
membrana, 713F, 843, 843F, 852F
transporte de proteínas, 719–720, 720F
vesículas, geração, 698
TIM23, 718
Timidina, H-timidina autorradiografia, 282–283, 284F, 602–603
Timina, 197
estrutura, 116F, 301F, 331–332F
formação de dímeros, 296, 297F
pareamento de bases, 198F
Timo, 1541F, 1585–1586
expressão de proteína órgão-específica, **1587–1588**
organização, 1585F
seleção de células T, **1585–1586**
Timosina, modificação dos filamentos de actina, 999
Tipo de acasalamento (levedura), 454–456
Tipo de acasalamento cassete, 454–456, 457F
Tipo de acasalamento comutador, 454–456, 456F, 457F, 458F
ver também Conversão de genes; Silenciamento de genes
Tirosina, estrutura, 129F
Tirosina-aminotransferase, regulação da expressão gênica, 415
Tirosina-cinase, 177F
ligação ao receptor *ver* Receptor de tirosina-cinase (RTK)
sinalização pelo receptor de células B, 1590F
sinalização pelo receptor de células T, 1590F
ver também Família Src de proteínas tirosina-cinases
Tirosina-cinase citoplasmática, 935
Tiroxina, 889F
Titina, 1028, 1028F
TNFα *ver* Fator-α de necrose tumoral (TNFα)
Tolerância imunológica, **1547–1549**
adquirida, 1546F, **1547**, 1547, 1547F
células dendríticas não-ativadas, 1571
deleção clonal, 1548, 1548F
edição de receptor, 1548, 1548F
periférica, 1587–1588
própria, 1548F
proteína reguladora autoimune (AIRE), 1588
Tolerância imunológica adquirida, **1547**
ver também Tolerância imunológica
Tolerância imunológica natural, 1547
ver também Tolerância imunológica
Tolerância periférica, 1587–1588
Tomada rápida do quepe, 1517
Tomografia, microscópio eletrônico (EM), 611F, 612, 612F
Tonoplasto(s), dos vacúolos vegetais, 782F
Topoisomerases *ver* DNA-topoisomerases
Topologia do DNA
alongamento da transcrição, **343–345**, 344F
superenrolamento *ver* Superenrolamento
ver também Nucleossomo
Tosse convulsiva (pertussis), 1503
ver também Toxina pertussis
Totipotência, células vegetais, 568
Toxina bacteriana, 1492
Bacillus anthracis, 1493
cólera, 1492, 1503–1505
diarreia devida a, 1491
mecanismo de ação, 1493–1494
cAMP superprodução devida a
sistema de secreção do tipo III para, 1493, 1494F, 1503–1504
sistema de secreção do tipo IV para, 1493–1494
toxina de edema (antraz), 1493
toxina letal (antraz), 1493
Toxina da cólera, 629, 906, 1492, 1493, 1503–1504
Toxina(s), 1493
cólera, 1492
em bactérias *ver* Toxina bacteriana
letal, 1493
mecanismo de ação, 1493–1494
pertussi, 906–907, 1503
Toxinas de edema, 1493
Toxoplasma gondii
conoide, 1509
estrutura, 1489F
formação de vacúolo e replicação, 1509, 1509–1510F
invasão das células hospedeiras, 1509, 1509–1510F
tráfego de membranas na célula hospedeira, 1512
TP53 ver Proteína/gene *p53*
TPA (acetato de tetradecanoilforbol), como promotor de tumor, 1226
Tração, movimento celular, 1040–1041, 1041F
Traço ancestral, 247, 248F
Traço evolutivo, sítios de ligação de famílias de proteínas, 155–156, 155F
Tradução, **4–8**, 4F, 331, **366–383**, 376F
alongamento da cadeia peptídica, 373F, 375F, 376F
fatores de alongamento, **377–378**
peptidil-transferase, 375–376, 379, 379F
ver também Síntese de proteínas
aspectos históricos, 366–367
controle de qualidade, **382–383**, 385–387, 387F
ver também Degradação de mRNA mediada por ausência de sentido
decodificação, 367, 367F
janelas de leitura, 368, 368F
moléculas adaptadoras, 371, 372F
ver também Código genético; RNA transportador
em eucariotos, 345F, 380, 380F, 399F
ribossomos, 360–361, 362–363, 374F
exatidão, 270, 382
gasto da energia livre, 385
papel de EF-Tu, 377–378
inibidores, 384, 385T
iniciação, 379–380, 380F
códon de iniciação, 380, 489–490
em bactérias, 380, 488
em eucariotos, 380, 380F, 487–488
em procariotos, 1527
exploração frouxa, 490
fatores de iniciação (eIFs), 380, 488–489, 490F
formilmetionina, 380
quepe do mRNA, 1517
sinais de mRNA, 379
sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), **491**
tRNA iniciador, 380
vírus, 1517
princípios básicos, **4–8**, 4F
regulação, 489F
regulação da expressão gênica *ver* Controle traducional da expressão gênica
RNA viral, 1517–1518
terminação, **381**, 381F
ver também RNA mensageiro (mRNA); Síntese de proteína; Ribossomo(s)
Tráfego através da membrana, estratégias de patógenos intracelulares, **1510–1514**, 1510–1511F
Transcitose, 793, 793F, **797–798**, 797F
endossomos de reciclagem, 798
IgA, 1556F
receptor de insulina, 798, 798F
transportadores de glicose, 798
Transcrição, **4–5**, 4F, **331–343**, 334F–336F
alongamento, **343–347**, 344F
direcionalidade, 339, 339F
em eucariotos, 339, **339–347**, 341F, 343F, 399F
alongamento, 343–345
DNA mitocondrial, 863
iniciação, 341F, 343F
processamento de RNA, **345–347**
RNA-polimerase, 339, **339–340**, 340T
ver também RNA-polimerase(s)
ver também Fatores de transcrição, gerais (TFII)
em procariotos (bactérias), 336–338, 337F, 338–339, 338F, 339F, 345F
atenuação da transcrição, 477–478
direcionalidade, 339, 339F
fator sigma, 336–337, 337F
promotores, 337, 337F, 338F
RNA-polimerases, 336–337, 337F
terminação, 337, 339
fidelidade, 270, 334–335
genes de rRNA, 361F
iniciação, 336–337
abortiva, 337F
ativadores transcricionais *ver* Ativador(es) da trancrição
complexo, 341–342
em eucariotos, 339, 340–342, 341F, 343F
leitura do código de histonas, 444F
promotores, 338–339
ver também Elementos promotores
orientação da RNA-polimerase, 339, 339F
princípios básicos, 4F, 331, **331–334**, 333–335, 334–335F, 335–337
ver também RNA mensageiro
princípios universais, **4–5**
regulação da expressão gênica *ver* Controle transcricional da expressão gênica
replicação *vs.*, 333–334
sinais de DNA, **336–340**
heterogeneidade, 338–339
promotores, 337
sequências consenso, 338–339, 338F
taxas, 334–335, 337, 370
terminação, 337, 339

Transcrição de RNA *ver* RNA mensageiro
Transcriptase reversa, 264F, 292
aplicações, clonagem de cDNA, 542, 543F
estrutura, HIV, 321F
retrotransposons, 318T
ver também Telomerase
Transdução de sinal
adaptação (dessensitização), **902**, 920–921, 920–921F
AMP cíclico, **905–909**
fotorreceptores, fotoproteínas de vegetais, **960–961**, 961F
NFκB, receptor semelhante a Toll, 1530
proteína G *ver* Proteína G (proteínas de ligação ao GTP triméricas/ATPases)
superfamília dos receptores nucleares, **889–891**, 889F, 891F
Transdução visual, **917–918**
adaptação, 920–921, 920–921F
amplificação do sinal nos fotorreceptores do tipo bastonetes, 919–921, 920–921F
células fotorreceptoras, 918
ver também Arrestina; Rodopsina; Bastonetes fotorreceptores (bastonetes)
Transdutores, 1429
Transdutores de sinal, 641, 891
Transfecção, vetores de clonagem de DNA, 540–541
Transferência de DNA *ver* Transferência horizontal de genes
Transferência de elétrons, 71–72, 100F, 813, 814F
carreadores NADH/NADPH, 82–83, 82F, 818–819, 818F
ver também Carreadores ativados no metabolismo
centros de reação fotoquímica, 848, 850F, 852F
energia, 820–821, 829, 830F
ver também ATP (trifosfato de adenosina)
fosforilação oxidativa, 100, 819, 819F
mitocôndria *vs.* cloroplasto, 814, 815F
potencial redox, 829, 831, 835, 835F, 852F, 852F, 853
prótons, 827–828, 828F
ver também Cadeia(s) transportadora(s) de elétrons; Fosforilação oxidativa
Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), 526, 526F, 593–594, , 595F
Transferência em gel *ver Blotting*
Transferência genética intercelular *ver* Transferência horizontal de genes
Transferência horizontal de genes, 19F, **21–22**
inovação evolutiva, 19
variação antigênica, 1520
Transição da blástula média, 1365
Transição de fase, membrana, 623
Transição epitelial-mesenquimal, **1141**
Transição metáfase para anáfase, 1061, 1066, 1071, 1087
Transições cooperativas alostéricas *ver* Regulação alostéricas
Translocação, cromossomal *ver* Translocação cromossomal
Translocação de cromossomo, 527–528F
cromossomo 12 e, 204F
evolução do genoma, 246–247
papel no câncer, 1261
ativação do gene *Myc*, 1239
cromossomo Filadélfia em CML, 1208, 1208F, 1261, 1261F, 1262F
reparo do DNA, recombinação homóloga, 309
Translocação de proteínas, 703F
através das membranas da mitocôndria, **713–718**
ver também Importação de proteínas mitocondriais
através das membranas do cloroplasto, **719–720**
ver também Cloroplasto(s), importação de proteínas
no retículo endoplasmático *ver também* Retículo endoplasmático (RE)
Translocadores de fosfolipídeos
apoptose, 627
flipases, 744, 744F
"misturador" (*scramblase*), 627, 744–745, 744F
montagem da bicamada lipídica, 622, 743–745
Translocadores de proteínas, **714–715**
Translocase da membrana mitocondrial externa *ver* Complexo TOM
Translocase da membrana mitocondrial interna *ver* Complexo TIM
Transmissão da informação
definindo as propriedades da vida, 1
energia, 8
moléculas
DNA *ver* DNA (ácido desoxirribonucleico)
origem da vida, 401, 402–403, 402F
RNA *ver* RNA (ácido ribonucleico)
Quantificação, 1
ver também Hereditariedade
Transplantação nuclear, 411, 413F
Transplante nuclear somático, 507–508, 507F
Transportador de glicose, transcitose, 798
Transportador(es) ABC, 20F, 660, **663–667**
apresentação de antígeno, 1582
bacteriano *vs.* eucariótico, 665F
desenho molecular, 660
ligação de ATP, 665
proteína de resistência a múltiplas drogas, 665–666
transporte auxiliar, 666F
Transporte ativo, **653–667**, 654F, 822, 823F
antiporte *ver* Antiporte
dirigido por gradiente iônico, **656–657**
primário *vs.* secundário, 656
resistência a antibióticos, 1522, 1523F
simporte, 656, 656F, 659
uniporte, 656, 656F
ver também Proteína(s) carreadora(s)
Transporte axonal
anterógrado *vs.* retrógrado, 1048
herpes vírus, 1516–1517, 1516F
Transporte de ida e volta na membrana, receptor(es) de manose-6-fosfato (M6P), 784
Transporte de membrana
de moléculas pequenas, **651–692**
proteínas carreadoras e transporte ativo, 9–10
Thermotoga maritima, 10F
ver também Transporte ativo; Proteína(s) carreadora(s); Canais de proteína; Canais iônicos
de proteínas, **695–736**
endereçamento de proteína; Translocação de proteína; Transporte de proteína
ver também Retículo endoplasmático (RE);
importância, 651
intracelular, **750–766**
princípios, **651–654**
tráfego vesicular *ver* Transporte vesicular
ver também Transporte ativo; Canais de proteína
Transporte de proteínas
através de membranas, **695–748**
através de vias de secreção, **749–787**
cloroplastos ver Cloroplasto(s), importação de proteínas
controlado, 700–701, 701F
entre organelas, **699–701**
estudos, 703F
fluxo geral, 701F
hipótese sinalizadora, 726–727, 727F, 728F
mitocôndria *ver* Importação de proteínas mitocondriais
núcleo *ver* Transporte núcleo-citoplasma
peroxissomos *ver* Peroxissomo(s), importação de proteínas
retículo endoplasmático *ver* Transporte de proteínas no retí-culo endoplasmático (RE)
ver também Sinal de endereçamento de proteínas; Proteína(s) transmembrana; Transporte vesicular
Transporte de RNA, 486–488
mecanismos, 486–487, 487F
3'UTR, 487–488, 488F
nuclear *ver* Transporte nuclear-citoplasmático
regulação, 710
regulação da expressão gênica, 379F, 415,**485–486**, **486–488**
Transporte intracelular
estudos de proteínas fusionadas a GFP, 753F
organelas delimitadas por membrana, **1020–1022**
ver também Citoesqueleto; Proteína(s) motora(s)
Transporte núcleo-citoplasma
complexos de poro nuclear *ver* Complexo(s) de poro nuclear
direcionalidade, 709, 709F
exportação de mRNA, 329F, **358–360**, 359F, 383
HIV, **485–486**, 486F
mecanismo de localização, **486–488**, 487F
regulação, 710
regulação da expressão gênica, 485–486
RNA pronto para exportação, 329F, 357, 358–359, 359F
importação, **705–710**
mecanismo, 708–709, 708F, 709F, 710F
receptores, **707–708**, 708F, 710F
regulação, 711F
mecanismo de exportação, **708–709**, 709F
nucleoporinas, 705
poros nucleares *ver* Poros nucleares
proteínas transportadoras, 709–710
Ran GTPase, **708–709**, 709F, 710F
receptores, 708
regulação, **709–710**, 711F
sinais de localização nuclear (NLSs), **705–707**, 706F
Transporte paracelular, junções compactas, 1152
Transporte passivo, 653, 654F
Transporte regulado, entre núcleo e citoplasma, 700–701, 701F
Transporte transcelular, 658–659, 659F
junções compactas, 1151, 1151F
Transporte vesicular, 701, 701F, **750–766**, 750F
do RE para o aparelho de Golgi, **766–787**
especificidade de endereçamento, 760–761, 761–762
exocitose, **799–809**
ver também Exocitose
investigação, 752, 752F, 753, 753F
proteínas SNARE e *ver* Proteínas SNARE
relações entre organelas, 701F
transporte no aparelho de Golgi
modelo, 777–778
para a superfície celular, **799–809**
ver também Exocitose
para lisossomos, **779–787**
vesículas revestidas *ver* Vesícula(s) revestida(s)
vesículas secretoras *ver* Vesículas secretoras
Transposase, 317, 318F
genes, 318F
splicing alternativo, 480
transposons de DNA-only, 317, 318T
Transposição, 316
enzimas, 318T
ver também enzimas específicas
integração viral, 321F
mecanismo *ver* Recombinação sítio-específica
retrotransposons, 318T
transposons de DNA-only, 318T
movimento de corte e colagem, 319F, 320F
Transposição de corte e colagem, 319F, 320F
ver também Transposons de DNA-only
Transposon Bs1, 318T
Transposon Tam3, 318T
Transposon Tn3, 318T
Transposon(s), 317, 1599
classificação, 318T
DNA-only, 317, 318F, 318T
retrotransposons, 317, 318T
ver também Retrotransposons; Retrotransposons tipo retroviral
genes de β-globina, 250F
genoma bacteriano, 318F
genoma humano, 207F
mecanismo de transposição *ver* Transposição
movimentos evolutivos, 323
mutagênese de inserção, 527–528F, 556
variação filogenética, homem *vs.* camundongo, 323F
ver também Transposase, *elementos individuais*
Transposons de DNA-apenas, 318F, 318T, 323
transposição de corte e colagem, 318T, 319F, 320F
Transposons não-retrovirais, 318T
Trans-splicing, 354–355, 354F
SL RNP, 353, 354F
Tripanossomos, 354, 354F
Treadmilling, **976–980**, 977FF
Treonina, estrutura, 129F
Treponema pallidum, 13–14F
tamanho do genoma, 18T
Triacilgliceróis, 115F
armazenamento de ácidos graxos, 58
armazenamento de energia, 95, 96
estrutura, 97F, 114F
Triagem genética, 553, **553**, **555**
identificação de mutantes, **556–557**
comportamental, 556, 557F
Tricelulina, 1153
Trichomonas, árvore da vida, 16F

- Tricotiodistrofia, camundongo nocaute, 568F
- Trifosfato de adenosina *ver* ATP
- Trifosfato de desoxirribonucleosídeo (dNTP), 266, 268F
- Trifosfato de guanosina *ver* GTP (trifosfato de guanosina)
- Trifosfatos de nucleosídeo, polimerização de RNA, 334–335
- Triglicerídeo(s) *ver* Triacilgliceróis
- Triosefosfato-isomerase, 120F, 161F
- Trioses, 112F
- Tripanossomo(s)
  - moscas tsé-tsé, 1502
  - variação antigênica, 1519F, 1520
- Tripsina, técnicas de isolamento celular, 502
- Triptofano, 129F, 433F
- Triton, solubilidade de proteína de membrana, 637
- Trk A, 923T
- tRNA iniciador, 380
- tRNA *ver* RNA transportador
- Troca de classe, **1567–1568**
  - ativação de células B, 482–483
  - V(D)J recombinação *vs.*, 1568
- Troca de fitas cruzadas *ver* Junções de Holliday
- Troca *flip-flop*, 457, 458F, 466
- Troca genética, recombinação homóloga, 305
- Trombina, 159
- Tropoelastina, 1190
- Tropomiosina, 349F, 480, 994F, 1001
- Tropomodulina, 1003
- *Trypanosoma*, 16F, 354, 354F, 483, 484F
- *Trypanosoma brucei*, 1502, 1519F, 1520
- *Trypanosoma cruzi*, 1509, 1510–1511, 1510–1511F
- Tubérculo, 1507
- Tuberculoide leprosa, 1593–1594
- Tuberculose, 1488, 1507–1508, 1508
  - *ver também Mycobacterium tuberculosis*
- Tubo neural, 1140, 1141F, 1370, 1371F, 1385F
- Tubulina(s)
  - conservação evolutiva, 982–983
  - estrutura, 972–973
  - forma T e forma D, 980
  - homólogo em bactérias, 989
  - isoformas, 982
  - montagem de filamentos, **972–975**
  - polimerização, tempo de curso, 914F
  - γ-tubulina, 992, 992F, 998
  - visualização da fotoativação, 594–595, 595F
  - *ver também* Microtúbulo(s)
- Túbulos seminíferos, 1293
- Tumor de córnea, angiogênese, 1448, 1448F
- Tumor(es) *ver* Câncer; *tipos/locais específicos*

U

- U1 snRNP, mecanismo de *splicing*, 350F
- U2 snRNP, mecanismo de *splicing*, 350F
- U4 snRNP, mecanismo de *splicing*, 350F
- U6 snRNP, mecanismo de *splicing*, 350F
- Ubiquinona *ver* Coenzima Q
- Ubiquitina, 392–393, 740F
- Ubiquitinação, cauda de histona, 223F
- Ubiquitina-ligase(s), 393, 394F, 396F
  - controle do ciclo celular, 1064, 1064–1065F, 1066T
  - SCF, 184–185, 185F, 188
  - *ver também enzimas específicas*
- Ultracentrifugação
  - fracionamento celular, 510–511, 511F
  - purificação de microssomos, 726
  - ultracentrifugação preparativa, **510–511**, 510F
- Unc5, receptor netrina, 1389
- Unc5H, receptor netrina, 1389
- Unidade de tempo evolutivo, evolução de proteínas, 265
- Unidade(s) de transcrição, 336–337, 477
  - *ver também* Gene(s)
- Unidades de replicação, origem(ns) de replicação em eucariotos, 283–284
- Uniporte(s), 656, 656F
- Universo, linha de tempo *ver* Origem da vida
- Uracila, 116F,331–332, 331F–334F
- Urânio, corantes de microscopia eletrônica, 606
- Urease, 1503
- Ureia, 101
- UTR *ver* Regiões não-traduzidas

V

- V(D)J-recombinase, **1564–1565**
- Vacinas/Vacinação, 1498–1499, 1498–1499F
  - prevenção do HIV, desenvolvimento, 1521
- Vacúolos vegetais, **781–782**, 781F, 782F
- Valina, estrutura, 129F
- Valium, mecanismo de ação, 686
- Valor adaptativo (evolutivo), reprodução sexual e, 1271, 1271F
- Valor posicional, **1312–1313**, 1392–1393
- Vancomicina, resistência, 1523
- Variação antigênica, 1519–1520, 1519F
- Variação de fase, rearranjo de DNA, 454–455, 454–455F
  - *ver também* Recombinação sítio-específica
- Variação do número de cópias, 258
  - evolução do genoma, 258–260, 258–259F
- Variações da ploidia, 38–39, 39F, 255, 1111, 1111F, 1112F
- Variações na energia livre Delta G (ΔG), **75–78**, **119F**
  - cálculo, potencial redox, 830
  - constante de equilíbrio, 76, 77T
  - efeitos de concentração na reação, 76
  - reação acoplada, 75F, 78F, 825, 825F
  - reação sequencial, 77–78
  - transferência de elétrons, 829
- Variegação, 866, 866F
- Vasopressina, 907T
- Vasos linfáticos, função, 1446
- Vasos sanguíneos, **1445–1450**, 1445F, 1446F
  - células endoteliais *ver* Células endoteliais
  - desenvolvimento, 1446
  - formação e ramificação *ver* Angiogênese
  - mecanismo de ramificação, 1448
  - *ver também tipos específicos*
- Veado Muntjac, diferenças nos cromossomos, 204–205, 205F
- VE-caderina, 1138T, 1145
- Velocidade de sedimentação, 510–511, 512F
- Vênula, pós-capilar, 1549, 1549F, 1551F
- Verificação dupla, correção da DNA-polimerase, 269
- Verme, nematódeo *ver Caenorhabditis elegans*
- Vermes turbelários, 12–13F
- Vertebrado(s)
  - desenvolvimento *ver* Desenvolvimento de vertebrados
  - momentos de divergência evolutiva, 43F
- Vesícula acromossômica, 1293
- Vesícula(s) revestida(s), **751**, **754**
  - formação
    - GTPase recrutadora de revestimento, **759–760**
    - proteína ARF, 759
    - proteína Sar 1, 759
  - transporte vesicular, 751, 754, 754F
  - *ver também tipos específicos*
- Vesícula(s) revestida(s) por clatrina, 751, **754**, 754F, 755F, 758F
  - Adaptina, 756F
  - estrutura, 755F
  - formação, **755–757**, 756F
  - liberação, **754–755**, 756F, 758F
  - receptores de carga, 754–755
  - regulação, 795
  - tráfego de vesículas, 754F
- Vesícula(s) revestida(s) por COPI, 751, 754,754FF
- Vesícula(s) revestida(s) por COPII, 751, 754F, 759F, **767**, 767F
- Vesícula(s) secretora(s), 800
  - espermatozoide, 1293
  - exocitose, 802F
  - formação, **801–802**, 801F
  - fusão de membranas, **803**
  - óvulo, 1288
  - processamento proteolítico do conteúdo, **803**, 803F
  - reciclagem de membranas, **805**
  - sináptica(s) *ver* Vesícula(s) sináptica(s)
- Vesículas de centro denso *ver* Vesícula(s) secretora(s)
- Vesículas de transporte, 749, **760**
- Vesículas sinápticas, **807–808**
  - estrutura, 809F
  - fusão de membranas, 803
  - *ver também* Neurotransmissor(es)
- Vetores
  - clonagem de DNA, 540–541, 541FF
    - *ver também* Clonagem de DNA
  - de patógenos, 1501–1502
  - expressão de proteínas, 546, 548, 548F, 548FF
  - transmissão de vírus por, 1502
- Vetores de expressão de proteína, 546, 548,548FF
- Via constitutiva de secreção, **800**, 801 F
  - *ver também* Exocitose
- Via da ubiquitina, **393–394**, 394F, 396F
  - ativação, 393–394, 394F
  - degradação N-terminal, 395–396
  - enzimas, 393, 394F
  - marcação para a proteína, 395F
  - marcação para o proteossomo, 393–394
  - ubiquitina, 393, 740F
  - *ver também* Proteossomo(s)
- Via de ativação do complemento de lectina, 1529
- Via de secreção regulada (exocitose), 800, 801F, 804
  - aumento da membrana plasmática, 805, 806F
  - localização, **804**, 804F
  - *ver também* Exocitose
- Via de sinalização dependente de Smad, 940F
- Via de sinalização Hedgehog, 950
  - ausente em *Arabidopsis*, 1400
  - desenvolvimento animal, 1316F
  - *Drosophila*, 1340, 1353, 1353F
  - na pele, 1426
  - no intestino, 1441
- Via de sinalização Jak-STAT, **937–939**, 938F, 939T
- Via de sinalização MAP-cinase, **928–931**, 929FF, 1103
  - *ver também componentes específicos*
- Via de sinalização por Wingless, 1353
  - *ver também* sinalização Wnt
- Via de sinalização Ras-MAP-cinase, **928–930**, 929F, 1103, 1176
- Via endocítica, 749, 750F, 751F, 795F
- Via(s) de sinalização Notch, 946–948
  - Angiogênese, 1449
  - *Arabidopsis*, ausência, 1400
  - células endoteliais, 1448
  - desenvolvimento animal, 1316F
  - diferenciação das células do intestino, 1439–1440, 1439F
  - em neurogênese, 1359–1361, 1359–1360F
  - em tecidos não-neurais, 1362
  - na borda da asa de *Drosophila, 1352, 1352F*
  - na pele, 1426
  - no desenvolvimento de cerdas sensoriais, 1356–1358, 1356F, 1358FF
  - nos membros de vertebrados, 1355
  - pâncreas, 1444
- Vias aéreas, histologia, **1434–1436**
- Vias padrão, **800**, 801F
  - *ver também* Exocitose
- Vias(s) metabólica(s)
  - catálise enzimática, 66F
    - regulação, 169–171, 170F
  - evolução, 870–872
  - interrelacionamento, 67F, 100
  - organização, 66, 66F, 101, 102F, 102FF
  - *ver também* Biossíntese; Catabolismo; vias *específicas*
- *Vibrio cholerae*, 13–14F
  - bacteriófago, 1491
  - bacteriófago CTXØ, 1492F
  - colonização do intestino, 1503
  - cromossomo, 1492F
  - estrutura, 1489F
  - genes de virulência, 1491
  - mapa gênico, 1492F
  - pandêmico, 1491
  - toxina *ver* Toxina da cólera
- Vida, 1
  - características universais, 1, 1–11
  - processo autocatalítico, 7F
- Vilina, ligação cruzada na actina, 1007
- Vilosidades, do intestino delgado, 1436, 1436F, 1441
- Vimblastina (vincristina), 988T
- Vimentina, 985, 985T
- Vírion, definição, 1496
- Vírus (*bushy stunt*) do tomate, capsídeo, 149F
- Vírus, 1488, **1496–1499**, **1534–1536**
  - adesão às células hospedeiras, 1504–1506
  - bacterianos *ver* Bacteriófago(s)
  - ciclos de vida, 1496–1497, 1496F
  - como carcinógenos, **1227–1228**
    - *ver também* Vírus tumorais de DNA
  - diversidade, 1488
  - efeitos citolíticos, 1496
  - entrada e perda do envelope, 1504–1505, 1506F
  - envelopado, 1497, 1497F, 1504–1505, 1513, 1513–1514F
  - enzimas codificadas, 1517–1518
  - estrutura, 148–149, 1496
    - automontagem, 149
    - capsídeos, 148, 148F, 149F, 150F, 1489F, 1497, 1513
    - esférico, 150F
    - icosaedral, 611F, 612
    - nucleocapsídeo, 1497F
  - evolução, 1520–1521
  - genoma, 1496, 1497, 1497F
  - inibição da expressão de MHC de classe I, 1535–1536
  - integração do genoma *ver* Ele-mentos genéticos móveis; Recombinação sítio-espe-cífica
  - morfologia, 1496, 1496F
  - movimento intracelular, **1513–1517**
  - mudanças no metabolismo do hospedeiro, 1517–1518
  - mudanças no tráfego de membranas da célula hospedeira, 1513–1514, 1513–1514F
  - não-envelopado, 1497, 1507

planta, plasmodesmata e, 1163
proteínas, 1497
que se desenvolvem no sangue, 1502
receptores, 1504–1506
replicação, 1497
retrovírus *ver* Retrovírus
síntese de proteínas, 1517, 1535–1536
tamanho, 1496
transmissão por vetores, 1502
vírus de RNA *ver* Vírus de RNA
vírus tumorais de DNA, 1247–1249, 1248F
ver também organismos/infecções específicas
Vírus da AIDS *ver* HIV
Vírus da catapora, 1516–1517
Vírus da caxumba, 1496F
Vírus da coriomeningite linfocítica (LCM), 1496F
Vírus da encefalite equina oriental, 1496F
Vírus da hepatite
câncer de fígado e, 1227–1228
doença crônica, 1500
receptores, 1504–1505
Vírus da imunodeficiência adquirida *ver* HIV
Vírus da imunodeficiência de símios (SIV), diversificação e origem, 1521F
Vírus da influenza, 1496F, 1521
entrada e desnudamento, 1506F, 1507
entrada na célula, 765
movimento dos microtúbulos com base em axônios, 1517
pandemia, 1521, 1522F
Vírus da raiva, 1496F, 1517, 1518
Receptores, 1504–1505
Vírus da varíola, 1496
Vírus de DNA, 1496F, 1497F
em câncer, 1227–1228, 1228T
ver Vírus tumorais de DNA
Vírus deRNA
defesa, RNAi, 495
estruturas, 1496F
genoma, 1497F
montagem, 149–151
RNA de fita dupla (dsRNA), 1534, 1535–1536
taxa de mutação, 1520–1521
Vírus de sarcoma de Rous, 1232, 1233F, 1499
Vírus do herpes, 1496F
aquisição de envelope, 1513–1514F
montagem, 1513–1514F
movimento de microtúbulos com base em axônios, 1516–1517, 1516F
Vírus do herpes simples (HSV), 1487–1488, 1496
inibição da translocação da proteína MHC de classe I, 1535–1536
receptores, 1504–1505
Vírus do mosaico do tabaco (TMV), automontagem, 149
Vírus Ebola, entrada na célula, corpos vesiculares, 797
Vírus envelopados, 1497, 1504–1505
ver também vírus específicos
Vírus Epstein-Barr (EBV), 1228T, 1499
Vírus satélite da necrose do tabaco, capsídeo, 149F
Vírus Semliki forest, 1507
Vírus símios 40 (SV40), capsídeo, 149F
Vírus tumorais de DNA, **1247–1249**, 1248F
Vírus vacínia, 1513–1514F, 1516F, 1517
Vírus Varicella zoster, movimento com base em microtúbulos, 1516–1517
Vírus vegetais, plasmodesmata e, 1163
Visão estérea, 1396
Vitamina A, 640, 890
Vitamina C, deficiência, 1186
Vitamina D, 890
Receptor, 891F
Vitamina D3, 889F
Vitamina(s)
como coenzimas, 167, 167T
ver também vitaminas individuais
Volvox, 501F

W

N-WASp, movimento de patógeno, 1516, 1516F
Watson, James D., 196
Western blotting, 518, 519F
Wolbachia
difusão vertical, 1517, 1518
modificação do comportamento do hospedeiro, 1518
movimento com base em microtúbulos, 1517, 1517F
tratamento da infecção, 1518
WRKY (dedo de zinco), proteína de regulação gênica, família membros em diferentes eucariotos, 1400T

X

Xenopus laevis, 39, 39F
desenvolvimento *ver* Desenvolvimento de *Xenopus laevis*
diferenças entre espécies, 38–39
duplicação do genoma, 38–39
Xenopus ruwenzoriensis, 39
Xenopus tropicalis, 39, 39F
Xenotransplantes, reações ao transplante, 1575
Xeroderma pigmentos o (XP), 295T, 1208
XIC (centro de inativação do X), 474
XIST RNA, 473F, 474
XMAP215, formação de microtúbulo, 995F, 1004, 1004F

Y

YACs *ver* Cromossomos artificiais de levedura (YACs)
Yersinia pestis, 1502, 1502F, 1520
Yersinia pseudotuberculosis, 1508, 1520

Z

Zap70 tirosina-cinase, 1590F
Zigóteno, 1275
Zigoto, 1269
centríolo, **1301**, 1301F
genes de efeito zigótico, 1337
reconstrução (clonagem), preservação do genoma, 411, 413F
ver também Fertilização
Zimogenes, 793
Zinco-protease, toxina letal, 1493
Zona pelúcida, 1287, 1288F, 1291F, 1298, 1298F, 1300
Zonas aderentes (cinto de adesão), 1142, 1143F
Zonas ocludentes *ver* Junções compactas

Tabela

O código genético					
Primeira posição (Extremidade 5′)	Segunda posição				Terceira posição (Extremidade 3′)
↓	U	C	A	G	↓
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	**DE PARADA**	**DE PARADA**	A
	Leu	Ser	**DE PARADA**	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

OS AMINOÁCIDOS E SEUS SÍMBOLOS			CÓDONS
A	Ala	Alanina	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Cisteína	UGC UGU
D	Asp	Ácido Aspártico	GAC GAU
E	Glu	Ácido Glutâmico	GAA GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC UUU
G	Gly	Glicina	GGA GGC GGG GGU
H	His	Histidina	CAC CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA AUC AUU
K	Lys	Lisina	AAA AAG
L	Leu	Leucina	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparagina	AAC AAU
P	Pro	Prolina	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA CAG
R	Arg	Arginina	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Serina	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Treonina	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Valina	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Triptofano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC UAU